

Volume / 17

Issue / 1

April / 2024

# 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*



Online: ISSN 1308-8084

Print: ISSN 1308-5301

<http://www.biodicon.com>

## Biological Diversity and Conservation

*Biyolojik Çeşitlilik Ve Koruma*

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*

**Volume / Cilt / 17 Issue / Sayı / 1 April/Nisan / 2024**

*Editor-in-Chief/ Editör: Prof.Dr. Ersin YÜCEL*

ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online

### **Description**

The journal "BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION" is an international journal that publishes in accordance with the principles of independent, impartial and double-blind peer review. The journal publishes experimental studies on all aspects of biodiversity, original articles, case reports, editorial comments and letters to the editor prepared in accordance with ethical rules. This journal accepts research in science and basic sciences, biodiversity conservation, biology, ecology, medicine, biochemistry, pharmacy and biotechnology. The editorial and publishing processes of the "BIOLOGICAL DIVERSITY AND CONSERVATION" journal are in line with the Council of Science Editors (CSE), Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) guidelines, World Association of Medical Journal Editors (WAME) and National Information Standards Organization (NISO). Complies with Journal Openness Principles and Best Practice in Scientific Publishing. Three issues are published annually; place of publication is Türkiye.

### **Açıklama**

"BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK VE KORUMA" dergisi, bağımsız, tarafsız ve çift-kör akran değerlendirme ilkelerine uygun olarak yayın yapan uluslararası bir dergidir. Dergide biyolojik çeşitliliğin tüm yönleriyle ilgili deneysel çalışmalar, orijinal makaleler, vaka raporları, editör yorumları ve etik kurallara uygun olarak hazırlanan editöre mektuplar yayımlanmaktadır. Bu dergi fen ve temel bilimler, biyolojik çeşitliliğin korunması, biyoloji, ekoloji, tıp, biyokimya, eczacılık ve biyoteknoloji üzerine yapılmış araştırmaları kabul eder. "BİYOLOJİK ÇEŞİTLİLİK VE KORUMA" dergisinin editörlük ve yayın süreçleri Council of Science Editors (CSE) doğrultusunda, Committee on Publication Ethics (COPE), European Association of Science Editors (EASE), International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) yönergeleri, World Association of Medical Editors (WAME) ve National Information Standards Organization (NISO) göre şekillendirilmektedir. Dergi Açıklık İlkeleri ve Bilimsel Yayıncılıkta En İyi Uygulama ile uyumludur. Yılda üç sayı yayımlanır; yayımlanma yeri Türkiye'dir.

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

Web of Science [Zoological Records Indexed] Clavariate Analytic, CiteFactor, JournalSeek Database, arastirmax, acarindex, Index Copernicus, IPindexing, Google Scholar, Medical Reads (RRS), CrossRef;10.46309/biodicon.

### **Libraries/Kütüphaneler**

Aberystwyth University; All libraries; Bath University; Birmingham University; Cardiff University; City University London; CONSER (Not UK Holdings); Edinburgh University; Essex University; Eskişehir Teknik Üniversitesi Library; Exeter University; EZB Electronic Journals Library; Feng Chia University Library; GAZİ Gazi University Library; Glasgow University; HEC-National Digital Library; Hull University; Imperial College London; Kaohsiung Medical University Library; ANKOS; 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 Record*

*This journal is a CrossRef;10.46309/biodicon. Member/ Bu dergi CrossRef;10.46309/biodicon. üyesidir.*

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

**Publisher:** ERSİN YÜCEL

**Address:** Ersin YÜCEL, Sazova Mahallesi, Ziraat Caddesi, No.277 F Blok, 26005, Tepebaşı-Eskişehir/Türkiye

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

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

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

**Editor-In-Chief:** Prof.Dr. Ersin YÜCEL,  
Eskişehir Technical University, Faculty of  
Sciences, 26470 Tepebaşı / Eskişehir-Türkiye  
E-mail: biodicon@gmail.com  
<https://orcid.org/0000-0001-8274-7578>  
<https://www.ersinyucel.com.tr/>

#### **Editorial Board**

**İlkin YÜCEL ŞENGÜN;** Ege University,  
Faculty of Engineering, Department of Food  
Engineering, Izmir, Türkiye  
E-mail: ilkinyucel@yahoo.com

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

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

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

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

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

**İsmühan POTOĞLU ERKARA;** Eskişehir  
Osmangazi University, Faculty of Arts and  
Sciences, Eskişehir, Türkiye  
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, Türkiye  
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

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

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

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

**Stefano VALDESALICI;** Associazione Italiana  
Killifish, Emilia-Romagna, Italy

E-mail: valdesalici.stefano@gmail.com,  
valdekil@tin.it

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

#### **Deputy Editor in Chief**

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

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

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

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

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

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

#### **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, Türkiye  
E-mail: seyda.guler@bilecik.edu.tr

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

**Atila OCAK;** Eskişehir Osmangazi University,  
Faculty of Arts and Sciences, Eskişehir, Türkiye  
E-mail: atilaocak@gmail.com

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

**Ayşe AK;** Kocaeli University, Medical Imaging  
Techniques Program, Vocational School of  
Health Services, Kocaeli, Türkiye  
E-mail: a\_ak@hotmail.com

**Bartu BADAĞ;** Eskişehir Osmangazi  
University, Faculty of Medicine, Department of  
Surgical Medical Sciences, Eskişehir, Türkiye  
E-mail: bbadak@ogu.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, Türkiye  
E-mail: eerdogdu@eskisehir.edu.tr

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

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

**Marjan KOMNENOV;** University of Novi Sad,  
Department of Biology and Ecology, Serbia  
E-mail: mkommenov@gmail.com  
**Murat KÜRŞAT;** Bitlis Eren University,  
Faculty of Arts and Sciences Biology, Bitlis,  
Türkiye  
E-mail: mkursat@beu.edu.tr

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

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

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

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

**Sezgin ÇELİK;** Yıldız Technical University,  
Science Faculty, Department of Biology,  
İstanbul, Türkiye  
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

**Taslma SHEİKH;** Sunrise University Alwar,  
Rajasthan, India  
E-mail: sheiktass@gmail.com

**Recep Sulhi ÖZKÜTÜK**; Eskişehir Technical University, Science Faculty, Department of Biology, Eskişehir, Türkiye  
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, Akademgorodok, 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, Vinnytsya, 56, Pirogov Street, Ukraine  
E-mail: vikarodi@gmail.com

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

**Statistical Editor**

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

**Dizgi**

**Emrullah Yılmaz**, Eskişehir Technical University,  
E-mail: emrullahyilmaz@eskisehir.edu.tr

---

**Reviewer**

- Abdullah Altunışık, Rize (Türkiye)  
 Abdullah Kaya, Ankara (Türkiye)  
 Ahmed Bakrim, Kbouribga (Morocco)  
 Ahmet Aksoy, Antalya (Türkiye)  
 Ahmet Asan, Edirne (Türkiye)  
 Ahmet Mert, Isparta (Türkiye)  
 Akın Kıracı, Çanakkale (Türkiye)  
 Alaaddin Yuksel, Bingöl (Türkiye)  
 Ali Dönmez, Ankara (Türkiye)  
 Ali Kandemir, Erzincan (Türkiye)  
 Ali Savaş Bülbül, Kahramanmaraş (Türkiye)  
 Ali Tarhan, Muğla (Türkiye)  
 Alptekin Karagöz, Aksaray (Türkiye)  
 Amed Aarab Azmani, Tangier (Morocco)  
 Anath Bandhu Das Ankara (Türkiye)  
 Arif Cemal Özsemir (Bafra) (Türkiye)  
 Arzu Bayır Yeğın, Antalya (Türkiye)  
 Arzu Morkoyunlu Yüce Kocaeli (Türkiye)  
 Asiye Uzun Yiğit, Isparta (Türkiye)  
 Asuman Karadeniz Pekgöz, Burdur (Türkiye)  
 Atilla Ocak, Eskişehir (Türkiye)  
 Ayçın Akınal, Konya (Türkiye)  
 Ayçın Yılmaz, Konya (Türkiye)  
 Ayhan Şenkardeşler, İzmir (Türkiye)  
 Ayla Kaya, Eskişehir (Türkiye)  
 Aynur Demir, Aksaray (Türkiye)  
 Aysel Bekleyen, Diyarbakır (Türkiye)  
 Ayşe Gül Mutlu, Burdur (Türkiye)  
 Ayşe Kaplan, Sivas (Türkiye)  
 Ayşegül Bayramoğlu, Kütahya (Türkiye)  
 Ayşen Türk, Eskişehir (Türkiye)  
 Aziz Gül Hatay, (Türkiye)  
 Aziz Türkoğlu, Muğla (Türkiye)  
 Bahar Gurdal, İstanbul (Türkiye)  
 Baran Yoğurtçuoğlu, Ankara (Türkiye)  
 Barış Bani Kastamonu, (Türkiye)  
 Barış Özüdoğru, Ankara (Türkiye)  
 Belgin Çamur Elipek, Trakya (Türkiye)  
 Betül Avcı, İzmir (Türkiye)  
 Betül Gıdık, Bayburt (Türkiye)  
 Betül Y. Öztürk, Eskişehir (Türkiye)  
 Bilal Şahin Çankırı, (Türkiye)  
 Burak Arıca, Kastamonu (Türkiye)  
 Burcu Yılmaz Çıtak, Konya (Türkiye)  
 Bülent Turgut, Artvin (Türkiye)  
 Bülent Yorulmaz, Muğla (Türkiye)  
 Cahit Çeçen, Harran (Türkiye)  
 Cahit Doğan, Ankara (Türkiye)  
 Cahit Özcan, Siirt (Türkiye)  
 Caner Aydın, Eskişehir  
 Carmen Galán Soldevilla, Cordoba (Spain)  
 Cem Dalyan, İstanbul (Türkiye)  
 Cemil Ata, İstanbul (Türkiye)  
 Cengiz Acar, Trabzon (Türkiye)  
 Cenk Burak Şahin, Hatay (Türkiye)  
 Cenk Paşa Balıkesir, (Türkiye)  
 Cihangir Kirazlı, Bolu (Türkiye)  
 Cüneyt Kaya Rize,, (Türkiye)  
 Cüneyt Nadir Solak, Kütahya (Türkiye)  
 Çağrı Bekircan, Trabzon (Türkiye)  
 Çiğdem Gül, Çanakkale (Türkiye)  
 Çiğdem Yamaner, Isparta (Türkiye)  
 Çiler Kartal, Edirne (Türkiye)  
 Çiler Meriç, Trakya (Türkiye)  
 Dalila Boust, Taounate (Morocco)  
 Dani Sarsekova, S. Seifullin (Kazakistan)  
 Deniz Ergüden, İskenderun (Türkiye)  
 Deniz Mercan, Eskişehir (Türkiye)  
 Derviş Öztürk Eskişehir (Türkiye)  
 Derya Çiçek Polat, Ankara (Türkiye)  
 Derya Yıldırım, Isparta (Türkiye)  
 Didem Turgut Coşan, Eskişehir (Türkiye)  
 Dilek Düzgün Ergün, İstanbul (Türkiye)  
 Duran Katar, Eskişehir (Türkiye)  
 Duygu Nur Çobanoğlu, Bingöl (Türkiye)  
 Ebru Ataşlar, Eskişehir (Türkiye)  
 Elif Soylu, Rize (Türkiye)  
 E-mail: fakyuz@ogu.edu.tr  
 Emel Ulupınar, Eskişehir (Türkiye)  
 Emel Uslu, Bolu (Türkiye)  
 Emre Aydemir, Antalya (Türkiye)  
 Emre Sevindik, Aydın (Türkiye)  
 Erdi Can Aytar, Samsun (Türkiye)  
 Erdoğan Atmış, Bartın (Türkiye)  
 Ergin Hamzaoğlu, Ankara (Türkiye)  
 Erhan Çalışkan, Trabzon (Türkiye)  
 Ernaz Altundağ, Düzce (Türkiye)  
 Ersan Bektaş, Giresun (Türkiye)  
 Ersen Aydın Yağmur, Manisa (Türkiye)  
 Ersin Demirel, Antakya (Türkiye)  
 Ersin Karabacak, Çanakkale (Türkiye)  
 Ersin Yücel, Eskişehir (Türkiye)  
 Esat Çetin, Sakarya (Türkiye)  
 Esra Martin, Konya (Türkiye)  
 Fahrettin AKYÜZ, Türkiye  
 Fahrettin Tilki, Artvin (Türkiye)  
 Faik Ceylan, Düzce (Türkiye)  
 Faruk Maraşoğlu, Çorum (Türkiye)  
 Faruk Saydam, Rize (Türkiye)  
 Faruk Selçuk, Kırşehir (Türkiye)  
 Fatih Kar, Kırşehir (Türkiye)  
 Fatih Satıl, Balıkesir (Türkiye)  
 Fatih Temel, Artvin (Türkiye)  
 Fatma Güneş, Edirne (Türkiye)  
 Fatma Kandemir Çevik, Adana (Türkiye)  
 Fatma Koyuncu, Eskişehir (Türkiye)  
 Fatma Yıldız, Antalya (Türkiye)  
 Fatmagül Geven, Ankara (Türkiye)  
 Fazle Subhan, Peshawar, (Pakistan)  
 Ferhat Altunsoy, Eskişehir (Türkiye)  
 Feyza Candan, Manisa (Türkiye)  
 Filiz Savaroglu, Eskişehir (Türkiye)  
 Filiz Yılmaz, Eskişehir (Türkiye)  
 Gencay Akgül, Nevşehir, (Türkiye)  
 Gökhan Abay, Rize (Türkiye)  
 Gözde-Elgin Cebe, İzmir (Türkiye)  
 Gül Nilhan Tuğ, Ankara (Türkiye)  
 Gülçin Işık, Eskişehir (Türkiye)  
 Gülderen Yılmaz, Ankara (Türkiye)  
 Gülgün F. Ünal Şengör, İstanbul (Türkiye)  
 Gülnur Ataklı, Tokat (Türkiye)  
 Gülriiz Bayçu, İstanbul (Türkiye)  
 Gülsen Kendir, İstanbul (Türkiye)  
 Gülşah Çobanoğlu, İstanbul (Türkiye)  
 Gülşah Özyiğitoğlu, İstanbul (Türkiye)  
 Güngör Yılmaz, Tokat (Türkiye)  
 Gürkan Semiz, Denizli (Türkiye)  
 H. Barış Özel, Bartın (Türkiye)  
 H.Askin Akpulat, Erzurum (Türkiye)  
 Hacı Halil Bıyık,, Aydın (Türkiye)  
 Haider Abbas, Karachi (Pakistan)  
 Hakan Allı, Muğla (Türkiye)  
 Hakan Çalışkan Eskişehir (Türkiye)  
 Halil İbrahim Güler, Trabzon (Türkiye)  
 Halil Koç, Sinop (Türkiye)  
 Hamdi Aydın, Kocaeli (Türkiye)  
 Handan Ucu Özel, Bartın (Türkiye)  
 Hasan Akan, Şanlıurfa (Türkiye)  
 Hasan Akgül, Gaziantep (Türkiye)  
 Hasan Asil, Hatay (Türkiye)  
 Hasan Korkmaz, Elazığ (Türkiye)  
 Hasan Özçelik, Isparta (Türkiye)  
 Hatice Güneş Muğla, (Türkiye)  
 Hatice Kiremit Özenoğlu, Aydın (Türkiye)  
 Hatice Nurhan Büyükkartal, Ankara (Türkiye)  
 Hayri Duman, Ankara (Türkiye)  
 Hızır Uzuner, Ankara (Türkiye)  
 Hülya Altuntaş, Eskişehir (Türkiye)  
 Hüseyin Dural, Konya (Türkiye)  
 İhsan A. Al-Shehbaz, Missouri (USA)  
 İlgaz Akata, Ankara (Türkiye)  
 İltaf Ullah, Nowshera (Pakistan)  
 İbrahim Ertekin, İzmir (Türkiye)  
 İbrahim İlker Özyiğit, İstanbul (Türkiye)  
 İbrahim Turna, Trabzon (Türkiye)  
 İbrahim Türkel, Tokat (Türkiye)  
 İlker Avan, Eskişehir (Türkiye)  
 İlknur Bağdatlı Niğde (Türkiye)  
 İlknur Dağ, Eskişehir (Türkiye)  
 İnci Kravkaz, Kastamonu (Türkiye)  
 İrem Ayrın, Konya (Türkiye)  
 İrfan Albayrak, Kırkkale (Türkiye)  
 İrfan Değirmenci, Kütahya (Türkiye)  
 İsa Başköse Ankara (Türkiye)  
 İsa Telci, Isparta (Türkiye)  
 İsmail Döker, Adana (Türkiye)  
 İsmail Poyraz, Bilecik (Türkiye)  
 İsmühan Potoğlu Erkara, Eskişehir (Türkiye)  
 Kadriye Uruç Parlak, Ağrı (Türkiye)  
 Kamil Koç, Manisa (Türkiye)  
 Kâmuran Aktaş, Manisa (Türkiye)  
 Kerim Çiçek, İzmir (Türkiye)  
 Khalid M. Khawar, Ankara (Türkiye)  
 Koray Özenk, Siirt (Türkiye)  
 Kübra Sağlam, İstanbul (Türkiye)  
 Levent İzci, Isparta (Türkiye)  
 M. Ufuk Özbek, Ankara (Türkiye)  
 Malik Faisal, İslamabad (Pakistan)  
 Manzoor Ahmad, İslamabad (Pakistan)  
 Marjan Komnenov, Skopje (Macedonia)  
 Maryam Keshavarzi, Tehran (Iran)  
 Matem Tunçdemir, İstanbul (Türkiye)  
 Mehmet Arslan, Kayseri (Türkiye)  
 Mehmet Burçin Mutlu, Eskişehir (Türkiye)  
 Mehmet Candan, Eskişehir (Türkiye)  
 Mehmet Cengiz Üstüner, Eskişehir (Türkiye)  
 Mehmet Karaismailoğlu, Siirt (Türkiye)  
 Mehmet Karataş, Konya (Türkiye)  
 Mehmet Maruf Balos, Şanlıurfa (Türkiye)  
 Mehmet Sağroğlu, Sakarya (Türkiye)  
 Mehmet Sincik, Bursa (Türkiye)  
 Mehmet Tekin Sivas (Türkiye)  
 Mehmet Yavuz Paksoy, Tunceli (Türkiye)  
 Mehmet Zülfü Yıldız, İzmir (Türkiye)  
 Mehtap Usta, Trabzon (Türkiye)  
 Menderes Çenet, Osmanlıye (Türkiye)  
 Meral Yılmaz Cankılıç, Eskişehir (Türkiye)  
 Mesut Kırmaç, Aydın (Türkiye)  
 Metin Armağan, Aydın (Türkiye)  
 Mikail Açar, Tunceli (Türkiye)  
 Mohammed Merzouki, Fez (Morocco)  
 Muammer Bahşi, Elazığ (Türkiye)  
 Muhammad Sarwar, Jam (Pakistan)  
 Muhammad Yasin Ashraf, (Pakistan)  
 Muhammed Mesud, Hürkul Ankara (Türkiye)  
 Muhittin Dinç, Konya (Türkiye)  
 Murat Alan, Karabük (Türkiye)  
 Murat Kurşat, Bitlis (Türkiye)  
 Murat Olgun, Eskişehir (Türkiye)  
 Murat Özbek, İzmir (Türkiye)  
 Murat Turan, Denizli (Türkiye)  
 Musa Türkmen, Hatay (Türkiye)  
 Mustafa Ateş, İzmir (Türkiye)  
 Mustafa Emre Akçay, Van (Türkiye)  
 Mustafa Korkmaz, Erzincan (Türkiye)

Mustafa Yamaç, Eskişehir (Türkiye)  
Mutlu Gültepe, Giresun (Türkiye)  
Müge Sayitoğlu, İstanbul (Türkiye)  
Nalan Yılmaz Sarıöz, Eskişehir (Türkiye)  
Naşit İğci, Nevşehir (Türkiye)  
Nazmi Polat, Samsun (Türkiye)  
Necdet Değermenci, Kastamonu (Türkiye)  
Necmi İşler, Hatay (Türkiye)  
Nesil Ertoran, Eskişehir (Türkiye)  
Nilsun Demir, Ankara (Türkiye)  
Nural Karagözlü, Manisa (Türkiye)  
Nurcan Yiğit, Kastamonu (Türkiye)  
Nurdilek Gülmezoğlu, Eskişehir (Türkiye)  
Nurhayat Dalkıran, Bursa (Türkiye)  
Nuri Öner, Çankırı (Türkiye)  
Nursel Aşan Baydemir, Kırıkkale (Türkiye)  
Nursel Aşan Baydemir, Kırıkkale (Türkiye)  
Oğuzhan Kaygusuz, Denizli (Türkiye)  
Olga Sak, Balıkesir (Türkiye)  
Onur Koyuncu, Eskişehir (Türkiye)  
Ömer Çeçen, Karaman (Türkiye)  
Ömer Koray Yaylacı, Eskişehir (Türkiye)  
Ömer Seyfettin Sevinç, Düzce (Türkiye)  
Özge Tufan Çetin, Antalya (Türkiye)  
Özge Tufan Çetin, Antalya (Türkiye)  
Özgür Emiroğlu, Eskişehir (Türkiye)  
Papatya Tiftikci, Çanakkale (Türkiye)  
Perihan Kendirci, İzmir (Türkiye)  
Rasime Demirel, Eskişehir (Türkiye)  
Recep Sulhi Özkütük, Eskişehir (Türkiye)  
Rıza Binzet, Mersin (Türkiye)  
Rıza Binzet, Mersin (Türkiye)  
Robert Angus, London (England)  
Rüstem Hayat, Antalya (Türkiye)

Saleem Ahmad, Islamabad (Pakistan)  
Salim Serkan Güçlü, Isparta, (Türkiye)  
Salman Khan, Uttarkhand (India)  
Saye Nihan Çabuk, Eskişehir (Türkiye)  
Seda Erkan Buğday, Kastamonu (Türkiye)  
Seher Karaman Erkul, Aksaray (Türkiye)  
Selami Selvi, Balıkesir (Türkiye)  
Selda Öztürk, Nevşehir (Türkiye)  
Selen İlgin, Kayseri (Türkiye)  
Selima Khatun, West Bengal (India)  
Selma Helli, Sakarya (Türkiye)  
Serap Pulatsü, Ankara (Türkiye)  
Serdar Aslan, Düzce (Türkiye)  
Serdar Gökhan Şenol, İzmir (Türkiye)  
Serdar Makbul, Rize (Türkiye)  
Serkan Gülsoy, Isparta (Türkiye)  
Servet Arslan, Antalya (Türkiye)  
Sevda Kırbag, Elazığ (Türkiye)  
Sevda Turkis, Ordu (Türkiye)  
Sevil Sungur, Nevşehir (Türkiye)  
Seyit Ahmet Oymak, İstanbul (Türkiye)  
Seyit Ahmet Sargın, Alanya (Türkiye)  
Sezgin Özden, Çankırı (Türkiye)  
Shyam Singh Yadav, Lae (New Guinea)  
Sinan Güner, Artvin (Türkiye)  
Snejana Doncheva, Sofia (Bulgaria)  
Soner Çetinkaya, Isparta (Türkiye)  
Sulhi Özkütük, Eskişehir (Türkiye)  
Sultan Çoban, Harran (Türkiye)  
Sumaira Sahren, Islamabad (Pakistan)  
Sunil Kumarkhan, Magra, Hooghly (India)  
Süphan Karaytuğ, Mersin (Türkiye)  
Şahane F. Arslanoğlu, Samsun (Türkiye)  
Şahin Toprak, Harran (Türkiye)

Şebnem Şimşek, İzmir (Türkiye)  
Şengül Aksan, Akseki-Antalya (Türkiye)  
Şeniz Karabıyıklı, Tokat (Türkiye)  
Tahir Atıcı, Ankara (Türkiye)  
Tamer Keçeli, Çankırı (Türkiye)  
Taner Özcan, Balıkesir (Türkiye)  
Tarkan Yorulmaz, Çankırı (Türkiye)  
Taslima Sheikh, Rajasthan (India)  
Temel Özek, Eskişehir (Türkiye)  
Tuğba Bayrak Özbucak, Ordu (Türkiye)  
Tuğba Ongun Sevindik, Sakarya (Türkiye)  
Turan Arabacı, Malatya (Türkiye)  
Turgay Dindaroğlu, K. Maraş (Türkiye)  
Tülay Ezer, Niğde (Türkiye)  
Ufuk Coşgun, Karabük (Türkiye)  
Ummahan Öz, Manisa (Türkiye)  
Umut Kökbaş, Nevşehir (Türkiye)  
Ümit Subaşı, İzmir (Türkiye)  
Ümit Şirin, Eskişehir (Türkiye)  
Ünal Özelmaz, Eskişehir (Türkiye)  
Vağif Atamov, Rize (Türkiye)  
Volkan Altay, Hatay (Türkiye)  
Yakup Yapar, Bingöl (Türkiye)  
Yasemin Evrenosoğlu, Eskişehir (Türkiye)  
Yavuz Bülent Köse, Eskişehir (Türkiye)  
Yeşim Dağlıoğlu, Ordu (Türkiye)  
Yeşim Kara, Denizli (Türkiye)  
Yusuf Uzun, Van (Türkiye)  
Zafer Ölmez, Artvin (Türkiye)  
Zafer Yücesan, Trabzon (Türkiye)  
Zekiye Kocakaya, Yozgat (Türkiye)  
Zeynel Arslangündoğdu, İstanbul (Türkiye)  
Zia Ullah, Beijing (China)

---

**Executive Editor/ Genel Yayın Yönetmeni:** Ersin YÜCEL, Mine YÜCEL  
**Production Editor/Yayın Editörü:** İlkin YÜCEL ŞENGÜN  
**Layout Editor/ Mizampaj Editörü:** Dilge YÜCEL  
**Spelling and Language Editor/Yazım ve Dil Editörü:** Mine YÜCEL  
**Web Consultant/ Veb düzeni:** Alper YARGIÇ, Didem AYDAN,  
Sibel Tabanlıoğlu, Elif Çağla DELİ, Şerife AKINCI

**Technical Editor/ Teknik Editör:** Recep Sulhi ÖZKÜTÜK  
**Editorial Office/ Editörlük Ofisi:** Yasemin YÜCEL, Umut KILINÇ  
**Subscription Manager/Abonelik Yöneticisi:** Yasemin YÜCEL,  
**Cover Layout/Kapak Düzeni:** Mine YÜCEL  
**Secretary/ Genel Sekreter:** Faik CEYLAN  
**Printing Press/Baskı:** Cetemenler, Eskişehir/Türkiye

**Biological Diversity and Conservation (ISSN: 1308-5301; e-ISSN: 1308-8084)  
Journal General Information (Year 2008-2024)**

Journal name	Biological Diversity and Conservation / Biyolojik Çeşitlilik Ve Koruma
CODEN	BIODICON
Frequency	Tri-annual
Publisher	ERSİN YÜCEL
ISSN	ISSN: 1308-5301
e-ISSN	e-ISSN: 1308-8084
Journal Barcode No.	977130853001
Starting Year	2008
Editors-in-Chief	Prof.Dr. Ersin YÜCEL
Subject	Biological Diversity, Conservation, Ecology, Environment and Human Health
Language	English and/or Turkish
Type of Access	Print and Online
Phone No.	+905364189988
e-mail	biodicon@gmail.com ; info@ersinyucel.com.tr
Journal Internet Access	<a href="http://www.biodicon.com">http://www.biodicon.com</a> ; <a href="https://dergipark.org.tr/en/pub/biodicon">https://dergipark.org.tr/en/pub/biodicon</a>
Publisher Address	ERSİN YÜCEL, Sazova Mahallesi, Ziraat Caddesi, No.277 F Blok, Eskisehir, Türkiye, 26005
Ethical Principles	The Copyright Agreement Form Conflict of Interest Form (ICMJE Form) Reviewer Evaluation Form
Authors Declaration and sign these forms	The Copyright Agreement Form Author Contribution Form Conflict of Interest Form (ICMJE Form)
Copyright © 2008-2024	© 2024 ERSİN YÜCEL All rights reserved
Owner	ERSİN YÜCEL
Publisher	ERSİN YÜCEL
Memberships	CrossRef;10.46309/biodicon. Medical Reads (RRS) Medical Journal Editors (ICMJE) PubMed
Publishing Processes	Council of Science Editors (CSE) Committee on Publication Ethics (COPE) European Association of Science Editors (EASE) World Association of Medical Journal Editors (WAME) National Information Standards Organization (NISO)
Editorial Board, Reviewers	Postal address, ORCID ID
Ethical issues	Permissions and copyright transfer policy specified
Corresponding Author Contact Information	Postal address, Phone, Fax, E-mail, ORCID ID
Authors Contact Information	Postal address, ORCID ID
Publication Process	3-15 week
Process of Review	Double-blind review
Editorial policy of the journal	This journal is an international, scientific, online and print published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles.
Indexes	Web of Science {Zoological Records Indexed} Clavariate Analytic,
Price Police	The article processing is free

ISSN 1308-5301





**A macrofungus taxon that is commonly eaten by the folk in Central Anatolia but never reported from Türkiye:  
*Agaricus pequinii* (Boud.) Konrad & Maubl.**

Mehmet Gökhan HALICI<sup>1</sup>, Mithat GÜLLÜ\*<sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0003-4797-1157; 0000-0001-7100-9609

<sup>1</sup>Erciyes University, Department of Biology, Faculty of Science, 38039 Kayseri, Türkiye

**Abstract**

As in the world, macrofungi are one of the important food sources in terms of closing the food deficit in our country. *Agaricus pequinii* (Boud.) Konrad & Maubl. is a rare and edible mushroom with a mild taste that grows mainly on forest soils and on meadows. Although this taxon is very common in the meadows of Kayseri, located in central Anatolia (Türkiye) and frequently collected and eaten by the folk between October and the end of December, it was never reported in the checklists of Türkiye. In this study, *Agaricus pequinii* was studied in terms of morphological, anatomical and molecular aspects and added to the fungal checklist of Türkiye.

**Key words:** *Agaricaceae*, biodiversity, edible mushroom, ITS gene region.

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

**Orta Anadolu'da halk tarafından yaygın olarak yenilebilen ancak Türkiye'den hiç bildirilmemiş bir makrofungus taksonu: *Agaricus pequinii* (Boud.) Konrad & Maubl.**

**Özet**

Makrofunguslar dünyada olduğu gibi ülkemizde de besin açığının kapatılması açısından önemli besin kaynaklarından biridir. *Agaricus pequinii* (Boud.) Konrad & Maubl., ağırlıklı olarak orman topraklarında ve çayırarda yetişen, hafif bir tada sahip, nadir ve yenilebilir bir mantardır. Bu takson, İç Anadolu'da (Türkiye) yer alan Kayseri'nin çayırlarında çok yaygın olmasına ve Ekim ile Aralık sonu arasında halk tarafından sıklıkla toplanıp yenmesine rağmen, Türkiye kontrol listelerinde hiç bildirilmemiştir. Bu çalışmada, *Agaricus pequinii* morfolojik, anatomik ve moleküler yönden incelenmiş ve Türkiye mantar kontrol listesine eklenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Agaricaceae*, biyoçeşitlilik, yenilebilir mantar, ITS gen bölgesi.

**1. Introduction**

Although there are around 144,000 identified fungal species in the world, it is estimated that the total number of fungal species may be between 2.2 and 3.8 million, which is more than 6 times the estimated number of plants [1]. These revised estimates are based on the analysis of environmental sequence data, which has grown rapidly as a result of particularly reliable statistical and phylogenetic approaches. Many systematic studies have been carried out on macrofungi in Türkiye and although significant progress has been made in recent years, Türkiye's mycota has not been completed yet [2-4]. Many studies on macrofungal diversity were carried out and yet many are still ongoing both in Turkey and in world. As a result of these studies, significant contributions have been made to the macrofungal diversity of Türkiye. A checklist of the fungi of Türkiye was published in 2020 with broad cooperation of Turkish mycologists [5]. According to this checklist, a total of 5865 fungal taxa, including 2782 Basidiomycota, 2728 Ascomycota 282 Myxomycota, 2 Chytridiomycota, 33 Oomycota and 38 Zygomycota species identified in Turkey have been listed so far. There are approximately 300 edible nature mushrooms in Türkiye [6]. With the completion of macrofungi biodiversity in Türkiye,

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel: +903522076666; Fax.: +903522076666; E-mail: mgullu@erciyes.edu.tr



the number of macrofungi taxa distributed in Türkiye, the distribution areas of these taxa, which ones are edible or poisonous, and how much the local and general local population witness and consume these mushrooms will be understood.

In this article, *Agaricus pequinii*, an edible macrofungi species that is consumed by the folk in Kayseri, has been studied in terms of morphological, anatomical and molecular aspects. As a result of the molecular studies, it was concluded that this species is a new record for Türkiye. This result was clearly determined by the phylogenetic tree created with the species belonging to the genus *Agaricus* taken from the Genbank (Figure 1).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Collection of Mushroom Sample and Recording of Morphological Characteristics

Photographs were taken of the mushroom sample before it was collected (due to the fact that some morphological characters (color, dimensions, etc.) change when the mushrooms are dried). In addition, vegetation (vegetation) characteristics of the area where the fungus was found, GPS (Global Positioning System) coordinates, altitude above sea level and some other necessary information for morphological diagnosis were recorded. The numbered sample was dried. Then, the collected mushroom was kept in ziplock plastic bags as a fungarium sample.

For example, when performing morphological characterization, the size, color, shape, slippery or dryness of the basidiocarps (cap), flesh color, stem dimensions, color (changes in color when cut or not), shape, whether the base of the stem is swollen or not, whether the stem is straight or completely or not.

### 2.2. Molecular Characterization

#### 2.2.1. DNA Isolation, PCR and Sequencing

For the molecular characterization of the sample, a dried macrofungi sample was used. DNA isolation from the macrofungi sample was performed using the protocol included in the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Catalog No: 69104). In the study, the ITS rDNA gene region, which cannot be transcribed, was used for DNA sequence analysis. ITS1F and ITS4 primers were used for both PCR amplification and DNA sequencing of isolated DNAs [7,8]. At the end of PCR applications, the amplified gene regions were run on agarose gel (1.5%) with the help of electrophoresis, and then stained with ethidium bromide and visualized with the help of UV imaging system. Sequencing was done at the BM Labosis laboratory.

#### 2.2.2. Sequence alignment and phylogenetic analysis

Sequences obtained from the analyzed samples were compared with the samples registered in the GenBank (NCBI) using the BLAST program and their suitability was determined. Alignment and editing of the raw data obtained from the DNA sequence analysis system was performed using the BioEdit 7.2.5 (Biological Sequence Alignment Editor) software program [9]. Alignment was performed using the Clustal W module in the BioEdit 7.2.5 software program. The sequence data we obtained from the fungus species used in our study were compared with the sequences of the ITS gene regions of the species belonging to the genus *Agaricus* in the GenBank. In order to obtain the phylogenetic relationship and evolutionary trees between the samples, the Maximum Likelihood method was used by selecting the 1000 repetitive Bootstrap value from the MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) modules and the results were evaluated [10].

## 3. Results

### 3.1. Phylogenetics analyses

The dataset comprised 25 sequences. The final alignment comprised a total of 718 characters, of which 378 were conserved sites, 323 variable sites and 136 parsimony-informative. The phylogenetic trees generated by ML. Collections ERC M 0.001 clustered in the *Agaricus gennadii*, *A.nevoi* and *Agaricus pequinii* clade with strong support (1/98) (Figure 1).

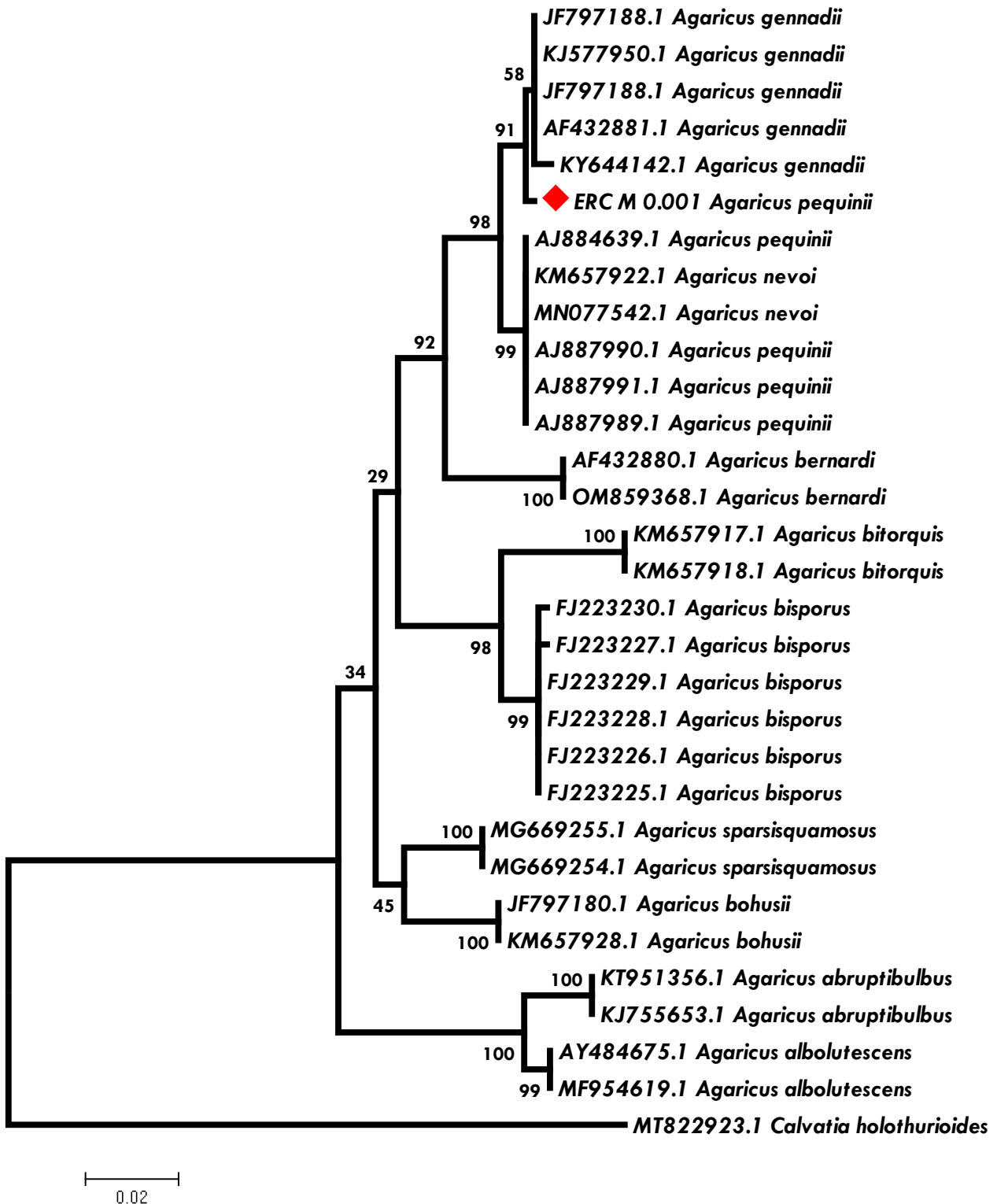


Figure 1. Maximum likelihood analysis inferred from ITS gene region sequences of *Agaricus pequinii* and related species

### 3.2. Taxonomy

#### 3.2.1. *Agaricus pequinii* (Boud.) Konrad & Maubl.

Pileus 3-7 cm in diam., thick-fleshed, at first spherical or hemispherical, then convex to depressed, margin with brown membranous remains, sometimes dirty ochraceous in the centre (Figure 2 and Figure 3). Gills free, thin, crowded,

*A macrofungus taxon that is commonly eaten by the folk in Central Anatolia but never reported from Türkiye: Agaricus pequinii (Boud.) Konrad & Maubl.*

Mehmet Gökhan HALICI, Mithat GÜLLÜ

with an even sterile margin, at first pink, later dark brown, chocolate-brown. Basidia 4 (sometimes 1-3) spored, 23-28 x 7-10  $\mu\text{m}$ , clavate. Spore print dark brown. Spores 5-7.5 x 4.5-6  $\mu\text{m}$ , pale brown, broadly ovoid, with refractive droplets (Figure 4). Flesh white, unchanging on exposure, or becoming slightly pinkish. Odor fugacious. Taste acidulous. Cross reaction with Schaeffer's reagent negative [11].

Specimen examined: Türkiye, Kayseri, Kocasinan, Buğdaylı, 38° 48' 05" N, 35° 32' 17" E, alt.1072 m, 15.10.2022.



Figure 2. *Agaricus pequinii* in natural habitat



Figure 3. *Agaricus pequinii*. Cleaned and ready for cooking

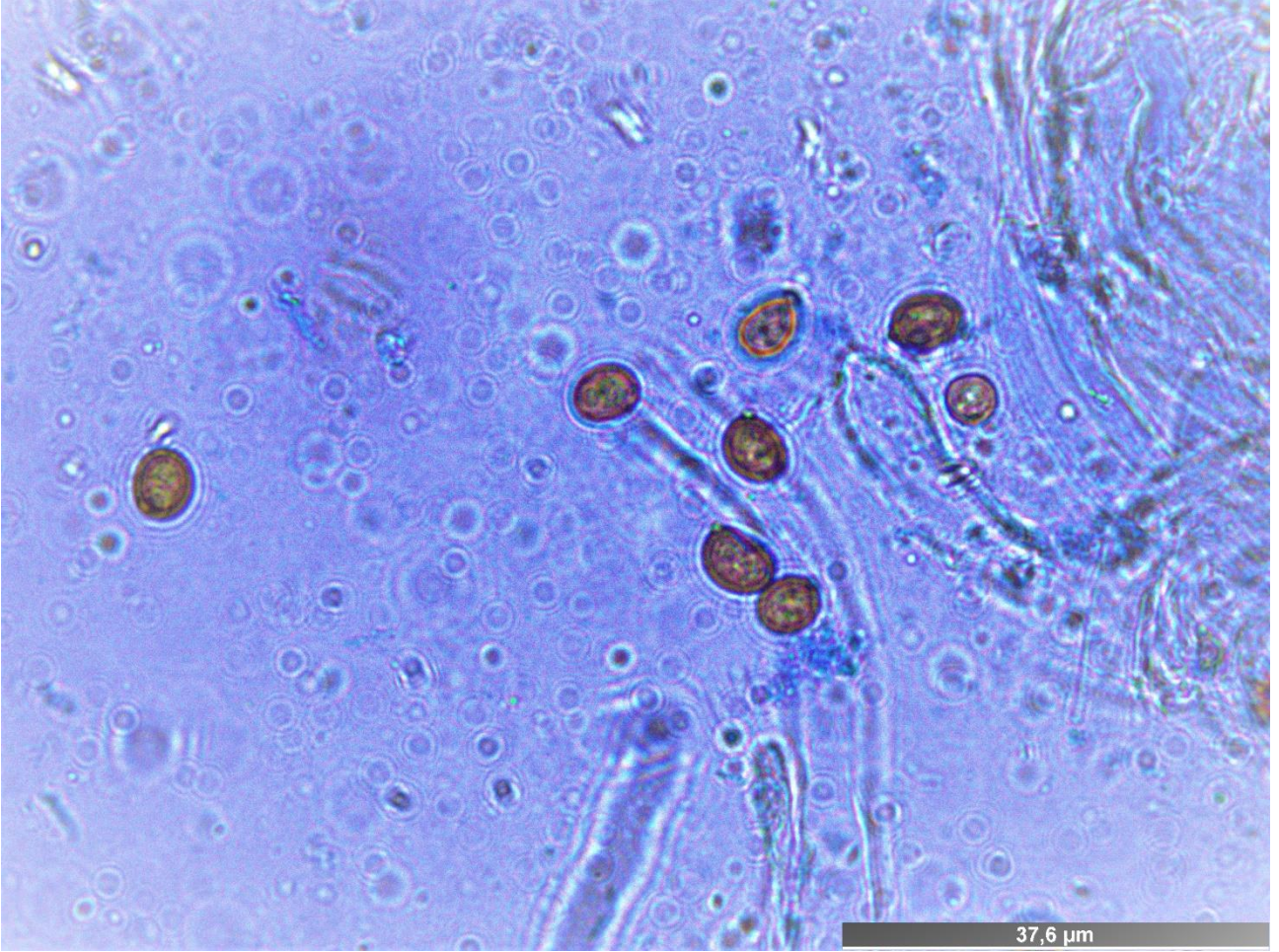


Figure 4. *Agaricus pequinii*. Basidium and basidiospores

#### 4. Conclusions and discussion

According to the phylogenetic tree (Figure 1), *Agaricus pequinii* (Boud.) Konrad & Maubl. is phylogenetically close to *A. nevoi* Wasser and *A. gennadii* (Chatin & Boud.) P.D. Orton. It differs from *A. nevoi* in the character of the remnants of its general veil and spore size [12]. *Agaricus pequinii* differs from *A. gennadii* in having spores of a smaller size, and in the presence of numerous white scales on the stipe and surface of the volva-like remnants of the general veil. This species has a distribution in Europe (Italy, France, Hungary, Ukraine) and Asia [13].

Morphological and microscopic identification methods are no longer sufficient for species identification. Morphological features can sometimes be easily affected by environmental factors. As a result of this effect, changes in properties such as color, mushroom size and shape may occur, which may lead to misdiagnosis. Microscopic analyzes, on the other hand, may not be distinctive because sometimes very close results are obtained (for example, very close results are obtained in spore measurements). For this reason, molecular methods based on DNA sequence analysis have been started to be used in taxonomic studies on fungi. However, although molecular methods provide important clues, they must be evaluated by combining them with microscopic and morphological studies. The first national study to include the molecular taxonomy of a fungal genus in Türkiye was carried out by Taşkın et al. (2010, 2012, 2016) for the genus *Morchella* [14-16]. Therefore, it is necessary to increase such studies in our country.

#### References

- [1] Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). Fungal diversity revisited: 2.2 to 3.8 million species. *Microbiology spectrum*, 5(4), 5-4. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016
- [2] Solak, M. H., Işıloğlu, M., Kalmış, E., Allı, H. (2007). *Macrofungi of Turkey Checklist*. Üniversiteliler ofset, İzmir, 254 s.
- [3] Sesli, E., Denchev, C. M. (2010). Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes and larger basidiomycetes in Turkey. *Mycotaxon* 106, 65–67.
- [4] Allı H, Çöl, B, Şen İ (2017). Macrofungi biodiversity of Kütahya (Turkey) province. *Biological Diversity and Conservation* 10/1: 133-143.

*A macrofungus taxon that is commonly eaten by the folk in Central Anatolia but never reported from Türkiye: Agaricus pequinii (Boud.) Konrad & Maubl.*

Mehmet Gökhan HALICI, Mithat GÜLLÜ

- [5] Sesli, E., Asan, A., Selçuk, F. (eds), Abacı Günyar, Ö., Akata, I., Akgül, H., “...” Yoltaş, A. (2020). Türkiye Mantarları Listesi. Ali Nihat Gökyiğit Vakfı Yayını. İstanbul.
- [6] Kıvrık, M., Süfer, Ö., & Bozok, F. (2022). A Research on Quality Evaluation of Eight Wild Edible Macrofungi Collected from East Mediterranean Region of Turkey. *Chemistry & Biodiversity*, 19(3), e202100967. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202100967>
- [7] Gardes, M. & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- [8] White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- [9] Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symposium Series*, 41: 95-98.
- [10] Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- [11] Wasser, S. P. (2000). A contribution to the taxonomy and species diversity of the Agariceae tribe (Higher Basidiomycetes) of Israel mycobiota. *Flora Mediterr*, 10, 191-221.
- [12] Wasser, S. P. (1995). New and noteworthy species of the genus *Agaricus* L.: Fr. emend. Karst. from Israel. *Documents Mycologiques*, 25, 98-100.
- [13] Wasser, S. P. (1996). New, remarkable and rare higher Basidiomycetes from Israel. *Czech Mycol*, 48(4), 237-250.
- [14] Taşkın, H., Büyükalaca, S., Doğan, H. H., Rehner, S. A., & O'Donnell, K. (2010). A multigene molecular phylogenetic assessment of true morels (*Morchella*) in Turkey. *Fungal Genetics and Biology*, 47(8), 672-682. doi: 10.1016/j.fgb.2010.05.004
- [15] Taşkın, H., Büyükalaca, S., Hansen, K., & O'Donnell, K. (2012). Multilocus phylogenetic analysis of true morels (*Morchella*) reveals high levels of endemics in Turkey relative to other regions of Europe. *Mycologia*, 104(2), 446-461. doi: 10.3852/11-180
- [16] Taşkın, H., Doğan, H. H., Büyükalaca, S., Clowez, P., Moreau, P. A., & O'Donnell, K. (2016). Four new morel (*Morchella*) species in the elata subclade (M. sect. Distantes) from Turkey. *Mycotaxon*, 131(2), 467-482. doi: 10.5248/131.467



**The morphological, anatomical, palynological, seed micromorphological studies and its taxonomical significance in *Delphinium turcicum* (Ranunculaceae), a local endemic spurless species for Türkiye**

Yağmur CÖMERT <sup>\*1</sup>, Osman TUGAY <sup>2</sup>, Deniz ULUKUŞ <sup>3</sup>  
ORCID: 0000-0001-7517-2833; 0000-0003-3980-7648; 0000-0002-9627-5492

<sup>1</sup> University of Yildirim Beyazit, Enstitute of Public Health, Department of Traditional, Complementary and Integrative Medicine, Ankara, Türkiye

<sup>2</sup> University of Selcuk, Faculty of Farmacy, Department of Pharmaceutical Botany, Konya, Türkiye

<sup>3</sup> University of Selcuk, Faculty of Science, Department of Biotechnology, Konya, Türkiye

**Abstract**

In this study, species of *Delphinium turcicum* (Ranunculaceae), which is endemic to Türkiye, for its morphological, anatomical, palynological, micromorphological and taxonomical significance was investigated. Additionally, *Delphinium venulosum*, which is a similar species of *Delphinium turcicum*, was studied. Anatomic structure descriptions of these species and seed descriptions of *Delphinium turcicum* were given for the first time in this work. In addition, the comparison of these species contributes to the solution of taxonomic problems. Features of anatomic structures (root, stem, and leaf sections) were shown. Also, these structures were discussed taxonomic significance. The similarities and differences between *D. turcicum* and *D. venulosum* were revealed in this study. In palynological investigations; polar, equatorial, exine, intine, colpus length and width were measured. Polar/Equatorial (P/E) ratio and pollen ornamentation were determined. The pollen grains of these two species are spherical and isopolar symmetrical. Pollen types have determined as monad for *D. turcicum* and *D. venulosum* species. Pollen aperture types are tricolpate. Pollen exine ornamentations are microechinate. In this work photographs of pollen and seed were taken by using light microscopy and scanning electron microscopy (SEM). Seed micromorphological characteristics were given for both species. Seeds are subglobose and have continuous rings of transversal squamulose for both species. Seed ornamentations have continuous rings of transversal squamulose and generally erect papillae.

**Keywords:** Anatolia, anatomy, morphology, palynology, *Pseudodelphinium*, taxonomy

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

**Türkiye için lokal endemik bir tür olan mahmuzsuz *Delphinium turcicum*'un (Ranunculaceae) morfolojik, anatomik, palinolojik, tohum mikromorfolojik çalışmaları ve taksonomik önemi**

**Özet**

Bu çalışmada Türkiye endemiği olan *Delphinium turcicum* (Ranunculaceae) türünün morfolojik, anatomik, palinolojik, mikromorfolojik ve taksonomik önemi araştırılmıştır. Ayrıca *Delphinium turcicum*'un benzer bir türü olan *Delphinium venulosum* çalışılmıştır. Bu türlerin anatomik yapılarının tanımları ve *Delphinium turcicum* taksonu için tohum tanımları ilk kez bu çalışmada verilmiştir. Ek olarak bu türlerin karşılaştırılması taksonomik problemlerin çözümüne katkı sağlamaktadır. Bu makalede anatomik yapıların (kök, gövde ve yaprak kısımları) özellikleri gösterilmiştir. Ayrıca bu yapıların taksonomik önemi tartışılmıştır. Bu çalışmada *D. turcicum* ve *D. venulosum* arasındaki benzerlikler ve farklılıklar ortaya konmuştur. Palinolojik araştırmalarda; polar, ekvatorial, ekzin, intin, kolpus uzunluk ve genişlikleri ölçülmüştür. Polar/Ekvatorial (P/E) oranı ve polen ornamentasyonu belirlenmiştir. İncelenen bu iki türün polenleri sferik (küresel) ve izopolar simetriye sahiptir. Polen tipi *D. turcicum* ve *D. venulosum* türleri için monad olarak tespit edilmiştir. Polen apertür tipleri trikolpattır. Polen ekzin ornamentasyonları ise mikroekinatır. Bu çalışmada ışık mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak polen ve tohum fotoğrafları çekilmiştir. Tohum mikromorfolojik özellikleri verilmiştir. Tohumlar subglobozdur ve her iki tür için de sürekli enine skuamüloz halkalara sahiptir. Tohum ornamentasyonları ise, sürekli enine skuamüloz halkalara ve genellikle dik papillalara sahiptir.

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903129062384; Fax.: +903129062384; E-mail: yagmurcomert1@gmail.com

**Anahtar kelimeler:** Anadolu, anatomi, morfoloji, palinoloji, *Pseudodelphinium*, taksonomi

## 1. Introduction

The *Ranunculaceae* family has approximately 2,500 species and 59 genera in the world [1]. *Ranunculaceae* is distributed from the Mediterranean Basin to Korea, Japan, Siberia, and North America [2]. In Türkiye, the family is described with 230 species and more than 19 genera [3].

The tribe of *Delphinieae* (subfamily *Ranunculoideae*) contains 700 species and its constitutes about 25% of all species diversity in this family [3].

The genus *Delphinium* has 33 taxa, which 17 of them are endemic in Türkiye [3]. *Delphinium* sensu lato including *Consolida* and *Aconitella* sensu [4] contains 58 species [5], making it one of Türkiye's most species rich angiosperm genera.

*Consolida* has been set apart from *Delphinium* by De Candolle because it has single spurred petals, one follicle, one year life cycle and *Consolida* has created in distinct section. Later, *Consolida* has presented as another genus by Gray in 1821 [6; 7]. However, in the study based on phylogenetic analysis, *Consolida* is included in *Delphinium* [4]. *Consolida* separated from *Delphinium* relatives in the early to middle Miocene, a period of increasing aridity, caused primarily by a decrease in sea level in the Mediterranean and desertification in Asia [8]. It was stated that the species of the *Delphinium* genus found in Türkiye are mostly interconnected hybrid species. Because of all these reasons, this genus is difficult to taxonomically classify [9].

Palynology, anatomy, and morphology studies on the *Ranunculaceae* family have been undertaken to help categorization within this family [10]. In addition, seed morphology ensure a significant resource of phylogenetic data and karyological analysis in taxonomic descriptions of the species [10].

Plant taxonomy and phylogenetic inference rely heavily on data on seed macro- and microstructure [10].

Vural et al. [11] reported a new taxons from Türkiye in the Karapınar basin of Konya province. As a result of field studies, it was reported that first time *Pseudodelphinium turcicum* H.Duman, Vural, Aytaç & Adıgüzel and this species doesn't spread outside of Karapınar. According to Vural et al. [11], the single population of *Pseudodelphinium turcicum* known to date was collected for the first time in 1997. The inflorescences are racemose, with pubescent bracts and bracteoles similar to the leaves. Flowers are actinomorphic with five free petaloid tepals, numerous free stamens, sepal and spur absent, perianth uniseriate, and three free carpels longitudinally striate [11].

Recently, based on the results of Espinosa et al. [12] in terms of phylogenetic markers, a different set of analyses and following molecular evidence, *P. turcicum* has been regarded as a species of *Delphinium*. Additionally, in the light of these molecular phylogenetic analyses, *Pseudodelphinium* was found to be highly similar to the *Delphinium venulosum* Boiss. and *Delphinium virgatum* Poir. *Pseudodelphinium turcicum* was transferred to the genus *Delphinium* and given the scientific name *Delphinium turcicum* (H.Duman, Vural, Aytaç & Adıgüzel) F.Espinosa by Espinosa et al. [12; 14], Espinosa and Myreya [13] and Xiang et al. [15].

The morphological, anatomical, palynological and, seed characteristics of *D. turcicum* are determined in this study. Anatomical structures, detailed seed micromorphology and all structures belonging to pollen morphology with measurements have been given for the first time. Also, *D. venulosum*'s anatomical, palynological, and seed micromorphological were described. Anatomical measurements and descriptions of *D. venulosum* were presented for the first time in this work. According to this information, *D. venulosum* and *D. turcicum*, which are sister species, were revealed in terms of anatomical, palynological, micromorphological similarities and differences. Also, these species have been discussed systematically.

The microscopic procedures are used for the determinate of species in different plant groups by using seed morphological, anatomical, and palynological characters [16; 17]. These features limit the species within the genus. Also, it will provide diagnostic characters for the species studied.

The purpose of this study is to specify and compare the pollen and seed morphology, anatomy, and micromorphology of *D. turcicum* and *D. venulosum* species. It also reveals the taxonomic importance of these species within the family. In addition, all structural features are presented together with measurements.

## 2. Materials and methods

*Delphinium turcicum* sample materials were collected from Konya, Karapınar Village in 2016 (KNYA Herb. number: 29.400) Specimens of *Delphinium venulosum* were collected from Konya, Selçuklu, and the Northwest slopes in 2021 (KNYA Herb. number: 29.401). The specimens collected were deposited at KNYA. The collected plant samples were dried according to common herbarium techniques. During the field study, root, stem and leaf parts were taken into 70% ethyl alcohol and it used for anatomical studies.

For anatomical studies, samples were embedded in paraffin wax and then approximately 10 µm thick sections were taken with a Leica RM2125RT rotary microtome. These samples were stained with the fastgreen-safranin staining method and it made into a fixed preparation using entellan [18]. Measurements and photos were taken using a Leica DM1000 binocular light microscope and a Leica DFC280 camera. For the anatomical studies of *D. turcicum*; C4 Konya; Karapınar, Merdivenli Village, step, 22.06.2016, O.Tugay 12.852 registered samples were used. For the

anatomical studies of *D. venulosum*; C4 Konya; Selçuklu, North West slopes, 1100 m, 03.08.2021, O.Tugay 18.927 & D.Ulukuş registered samples were used.

For palynological examinations; pollen samples was provided from a herbarium specimens. Pollen specimens were prepared according to the Wodehouse technique [19]. A Leica DM 1000 brand microscope was used for the morphological examination of the pollen. In light microscopy (LM) studies, pollen grains were dissected from herbarium samples and it placed on clean microscope slides. Safranin and glycerine-gelatin were mixed into the pollen before it was scattered with a clean pin. The pollens were photographed with a spot in-sight color digital camera on a LEICA DM1000 microscope with a digital imaging system, which is a Leica Application Suite program equipped with an apochromatic 100x oil immersion objective [20]. Morphological observations were carried out under the microscope in the LM of Selcuk University. The polar length (P), the equatorial length (E), for the pollen dimensions, polar axis (P), equatorial axis (E), colpus length (Clg), colpus width (Clt), exine and intine were measured under a light microscope (1000 ×) with 20-30 pollen grains per species. P/E ratios were calculated using Image Tool software. For the investigation of pollen surface ornaments, they were photographed using the SEM (Scanning Electron Microscope) located in Selcuk University Campus Technopolis Building Advanced Technology Research and Application Center (ILTEK) and in the Electron Microscopy Laboratory of Gazi University. For Scanning Electron Microscopy (SEM), pollen grains were mounted on double-sided carbon tape affixed to aluminum stubs, covered with gold with an Hummle VII sputter coater, and photographed at a magnification of ×2000 to ×7000 with a JEOL-5600. Punt et al. [21] terminology was used for pollen morphology.

The same method was used in seed and pollen micromorphology studies. Minimum-maximum range, mean, standard deviations of seed length and width, and length/width rate were determined. Stearn [22] terminology was used for seed ornamentation.

### 3. Results

#### Taxonomy

*Delphinium turcicum* (H.Duman, Vural, Aytaç & Adıgüzel) F.Espinosa

Type: Türkiye, C4 Konya: Karapınar to Konya road, 30 km, Merdivenli village, 1020 m, dry plain steppes, growing with *Peganum harmala* communities, 28.07.1998, H.Duman 6824 & Z.Aytaç (holotype: GAZI, isotypes: ANK, HUB).

Glaucous, virgate, 3-24 cm. Stem simple or branched above, striate. Median cauline leaves shortly petiolate (to 6 millimeter), cuneate, divided with 3 linear-lanceolate, 7 × 3 mm or simple, upper cauline leaves entire, linear-oblongate, all leaves acute. Racemes 3–10 flowered, approximately 5 cm, pubescent; bracts like upper leaves, bracteoles similar to bracts, pedicels 2-8 mm. Flowers actinomorphic. Perianth uniseriate. Sepal absent. Petals 5, free, violet, purple, green and dark yellow, lanceolate to oblong or oblanceolate, 5–8 × 2-3 mm. Nectary absent. Stamens numerous (11–17), anthers 1 mm. Follicles 3, greenish, 5–7 × 2.5 mm, striate; style 1–2 mm, glabrous. Seeds 7–9 in each follicle, about 1.5 mm, blackish, subglobose, 4–7 uninterrupted circles of transversal scales [11].

Distribution - habitat: *Delphinium turcicum* is local endemic species distributing at Konya: Karapınar to Konya road, 30 km, Merdivenli village, 1020 m (Fig. 1 and Fig. 2).

#### Anatomical Properties

For the transverse sections of the root, stem, and leaf of the species, significant properties were observed. The measurements of the anatomical characters of *D. turcicum* and *D. venulosum* are given in Table 1.

**Root anatomy:**— *D. turcicum* and *D. venulosum* have epidermis cells 1-layered and these cells of shape are rectangular. There is a cortex layer below the epidermis. The cortex layer is consists of rectangular parenchymatic cells. This layer is 5–6 layers for both *D. turcicum* and *D. venulosum*. The vascular tissue consists of phloem and xylem. The metaxilem cells located in the core region (Fig. 3).

**Stem anatomy:**— *D. turcicum* and *D. venulosum* have epidermis cells 1-layered. Under the epidermis are 3–4 layers of cortex parenchyma, vascular tissue and pith region in the center. Epidermis cells are rectangular. The cortex parenchyma cells have irregular shapes. Under the cortex layer are 8–11 rows of sclerenchyma cells both of this species. The stem has a colleteral vascular bundle. The outermost sclerenchyma cells are consist of the outer phloem, cambium, xylem, inner phloem and pith region. Around of the sclerenchyma fibers has respectively the outer phloem and inner phloem (Fig. 4).

**Leaf anatomy:**— The leaf of *D. turcicum* and *D. venulosum* are consist of upper epidermis, mesophilic layer (2-layer palisade parenchyma, 2-layer sponge parenchyma and 2-layer palisade parenchyma) and lower epidermis. It is a mesophile type of equifacial leaves for both of *D. turcicum* and *D. venulosum* (Fig. 5).

**Pollen:**— Pollen types have determined as monad for *D. turcicum* and *D. venulosum* species. The pollen grains of these two species are spherical and isopolar symmetrical. The polar axis (P) was calculated as 21.75–23.39 µm for *D. turcicum* species and 17.42–22.84 µm for *D. venulosum* species. Equatorial Axis (E): 21.91–23.07 µm for *D. turcicum* and 18.21–23.57 for *D. venulosum*. P/E ratio is of *D. turcicum* 0.83–0.93 µm and 0.80–1.06 µm of *D. venulosum*. Pollen aperture types are tricolpate in both of *D. turcicum* and *D. venulosum*. Colpus length (Clg) is 12.97–15.00 µm for *D. turcicum* and 10.76–15.05 for *D. venulosum*. Colpus width (Clt) is 13.19–14.54 µm for *D. turcicum* and 10.93–14.58 for *D.venulosum*. Exine thickness was measured at 0.40–0.53 µm for *D. turcicum* and 0.13–0.52 for *D. venulosum*.



Intine thickness was calculated at 0.23–0.54  $\mu\text{m}$  for *D. turcicum* and 0.10–0.34 for *D. venulosum*. For both species; the equatorial and polar regions of the pollen was found microechinate (Figs. 6-7).

**Seed micromorphology:**— Each follicle of *D. turcicum* contains 8–10 seeds. The seed shape of *D. turcicum* is subglobose, open-mouthed, circular, and the seed color is blackish. It was measured at 0.69–1.28 mm in length and 0.80–1.34 mm in width. Hilum's position is basal. The seed's surface sculpturing is striped. The cell shape is long and rectangular. The seed layer is 4–7 uninterrupted circles of transversal squamulose, with the umbilical orifice occupying one half and 1/3 of the total seed volume. The exotesta layer is rectangular in shape and it has a thick outer wall. The seed surface is ornamented with spherical to stick-shaped papillae that are usually erect (Fig. 8).

Each follicle of *D. venulosum* contains 8–10 seeds. The seed shape of the *D. venulosum* species is subglobose, circular. The seed color is dark brown to black. It was measured at 1.03–1.23 mm in length and 1.11–1.21 mm in width. Hilum's position is basal with wrinkled. The seed layer is 6–8 helicoidal rings of continuous lamellae with minutely undulating margins because of the digitiform ends of the rectangular formed cells. Seed surface ornamentation is medium density spherical to stick shaped generally erect papillae (Fig. 8).

**Table 1.** Comparative anatomy of the root, stem and leaves *D. turcicum* and *D. venulosum*

		<i>D. turcicum</i>				<i>D. venulosum</i>			
		Width ( $\mu\text{m}$ )		Length ( $\mu\text{m}$ )		Width ( $\mu\text{m}$ )		Length ( $\mu\text{m}$ )	
		min-max	mean $\pm$ SD	min-max	mean $\pm$ SD	min-max	mean $\pm$ SD	min-max	mean $\pm$ SD
Root	Epidermis cell	8.03-12.85	10.38 $\pm$ 1.49	23.39-47.13	34.4 $\pm$ 8.30	18.75-57.37	42.02 $\pm$ 12.04	11.3-30.89	-20.34 $\pm$ 5.7
	Cortex cell	5.68-12.95	9.02 $\pm$ 2.38	10.29-19.61	15.32 $\pm$ 3.11	18.75-49.65	32.81 $\pm$ 7.77	8.82-19.86	14.51 $\pm$ 4.8
	Phloem	4.54-11.36	8.09 $\pm$ 2.16	4.68-17.19	15.32 $\pm$ 3.11	3.93-11.81	6.14 $\pm$ 2.05	3.94-11.82	8.21 $\pm$ 2.21
	Xylem	6.12-28.76	15.72 $\pm$ 7.10	12.50-21.85	17.01 $\pm$ 2.92	5.51-30.73	13.24 $\pm$ 6.66	7.09-29.95	18.76 $\pm$ 6.77
	Core cell	4.54-11.36	18.66 $\pm$ 7.36	4.68-17.19	15.92 $\pm$ 5.76	6.3-44.13	21.22 $\pm$ 10.64	5.51-35.86	18.47 $\pm$ 9.55
Stem	Epidermis cell	7.15-12.73	9.76 $\pm$ 1.79	7.09-28.78	18.10 $\pm$ 7.18	17.47-34.02	27.17 $\pm$ 5.94	9.19-20.22	15.79 $\pm$ 4.94
	Cortex cell	6.52-34.02	21.12 $\pm$ 9.65	23.33-50.24	37.08 $\pm$ 9.24	8.66-43.21	17.90 $\pm$ 7.29	7.72-28.37	17.41 $\pm$ 7.08
	Sclerenchyma	24.55-79.21	50.03 $\pm$ 18.43	38.36-68.57	53.41 $\pm$ 10.64	38.62-98.1	56.63 $\pm$ 20.10	32-78.34	53.92 $\pm$ 19.44
	Phloem	20.87-54.34	40.09 $\pm$ 11.50	21.12-48.54	35.51 $\pm$ 8.73	20.22-25.22	22.02 $\pm$ 1.99	10.24-12.61	11.53 $\pm$ 1.09
	Xylem	6.20-11.33	8.96 $\pm$ 1.62	4.96-11.30	7.99 $\pm$ 1.97	3.86-22.06	9.13 $\pm$ 5.28	6.06- 15.44	6.58 $\pm$ 3.27
	Core	19.97-52.87	34.99 $\pm$ 11.20	20.27-46.9	35.55 $\pm$ 8.27	34.48-74.45	47.40 $\pm$ 12.61	33.1 -74.48	51.77 $\pm$ 11.71
Leaves	Upper epidermis cell	30.53-52.55	41.50 $\pm$ 7.52	16.54-42.29	30.32 $\pm$ 8.38	22.37-50.34	39.15 $\pm$ 9.4	16.55-55.01	37.22 $\pm$ 9.62
	Lower epidermis cell	14.49-41.56	27.53 $\pm$ 8.22	14.79-40.26	27.50 $\pm$ 8.96	16.78-58.18	41.03 $\pm$ 12.45	22.37-50.34	38.46 $\pm$ 6.41
	Palisade parenchyma	4.71-69.05	36.75 $\pm$ 21.05	16.64-63.60	38.7 $\pm$ 16.39	4.89-13.28	9.99 $\pm$ 2.96	26.57-60.83	40.38 $\pm$ 7.56
	Sponge Parenchyma	4.28-21.27	13.76 $\pm$ 5.72	3.95-14.14	8.71 $\pm$ 3.31	10.48-44.05	21.57 $\pm$ 7.45	11.18-42.35	23.36 $\pm$ 7.51

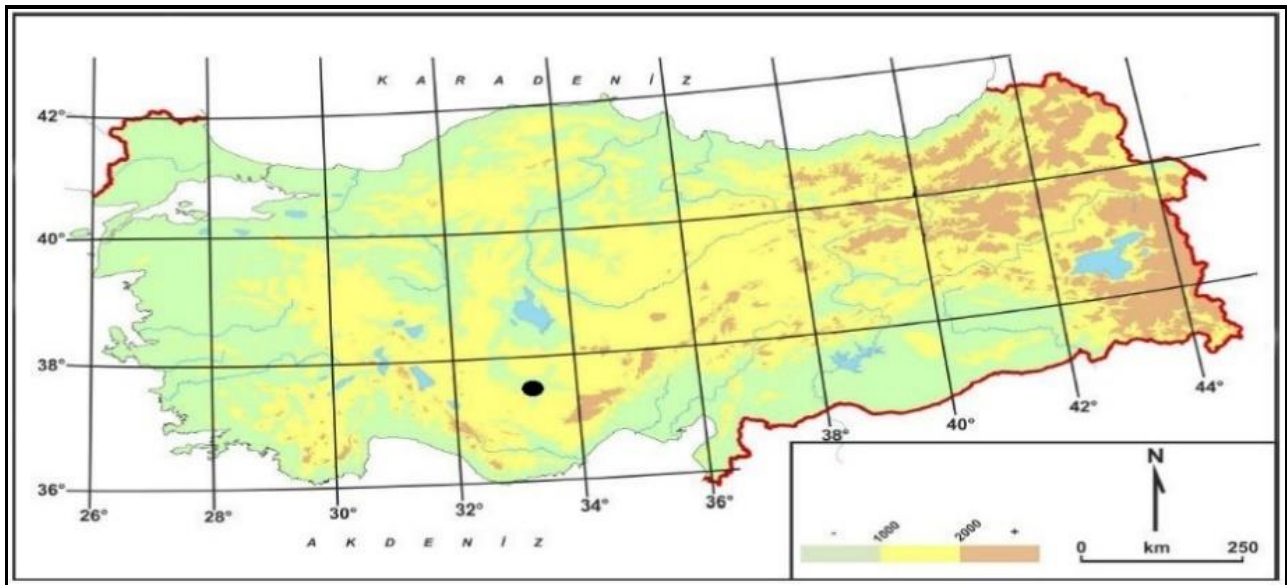
**Abbreviations:** Mean: Average, SD: Standart deviation, Min: Minimum, Max: Maximum,  $\mu\text{m}$ : Micrometer

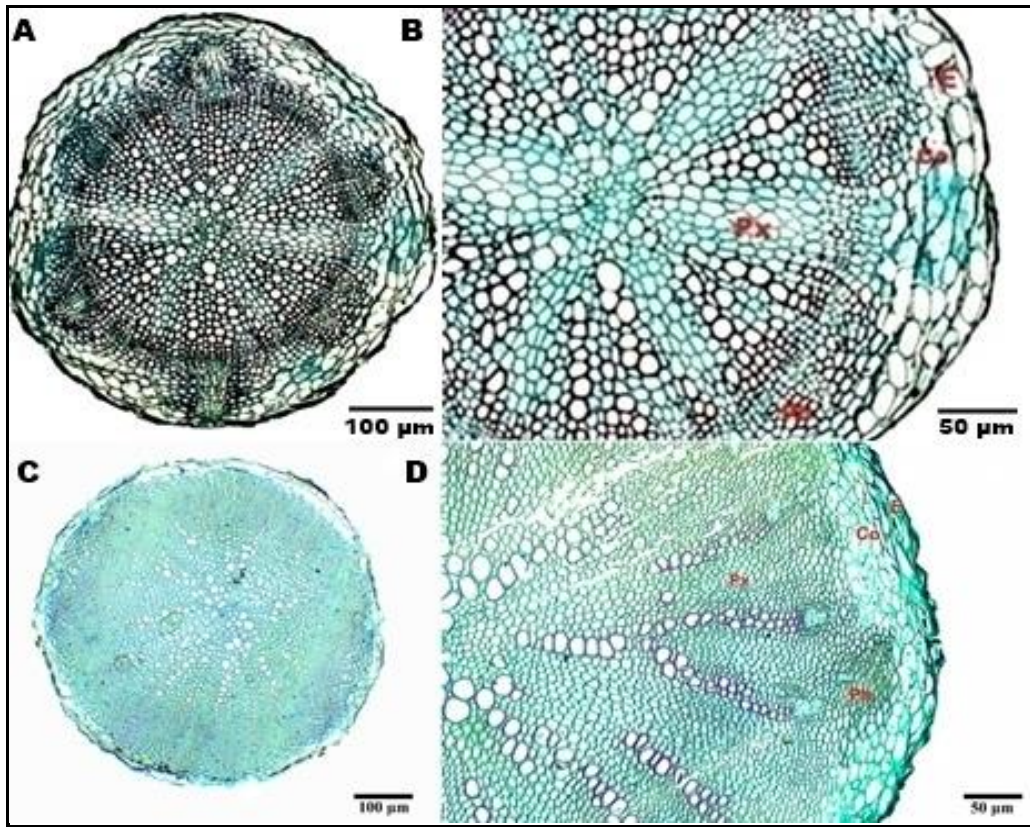
**Table 2.** Comparative pollen morphology of *D. turcicum* and *D. venulosum* showing mean value  $\pm$  standard deviation, and the range in parenthesis. All measurements are in  $\mu\text{m}$  except P/E

Species	Polar axis (P)	Equatorial axis (E)	P/E	Colpus length	Colpus width	Exine thickness	Intine thickness
<i>D. turcicum</i>	22.57 $\pm$ 0.49 (21.75-23.39)	22.49 $\pm$ 0.29 (21.91-23.07)	0.88 (0.83-0.93)	13.98 $\pm$ 0.51 (12.97-15.00)	13.86 $\pm$ 0,34 (13.19-14.54)	0.46 $\pm$ 0.07 (0.40 - 0.53)	0.38 $\pm$ 0.10 (0.23 - 0.54)
<i>D. venulosum</i>	20.68 $\pm$ 1.37 (17.42-22.84)	20.64 $\pm$ 1.70 (18.21-23.57)	0.91 (0.80-1.06)	12,51 $\pm$ 1.29 (10.76-15.05)	13.25 $\pm$ 1.17 (10.93-14.58)	0.21 $\pm$ 0.07 (0.13-0.52)	0.19 $\pm$ 0.06 (0.10-0.34)

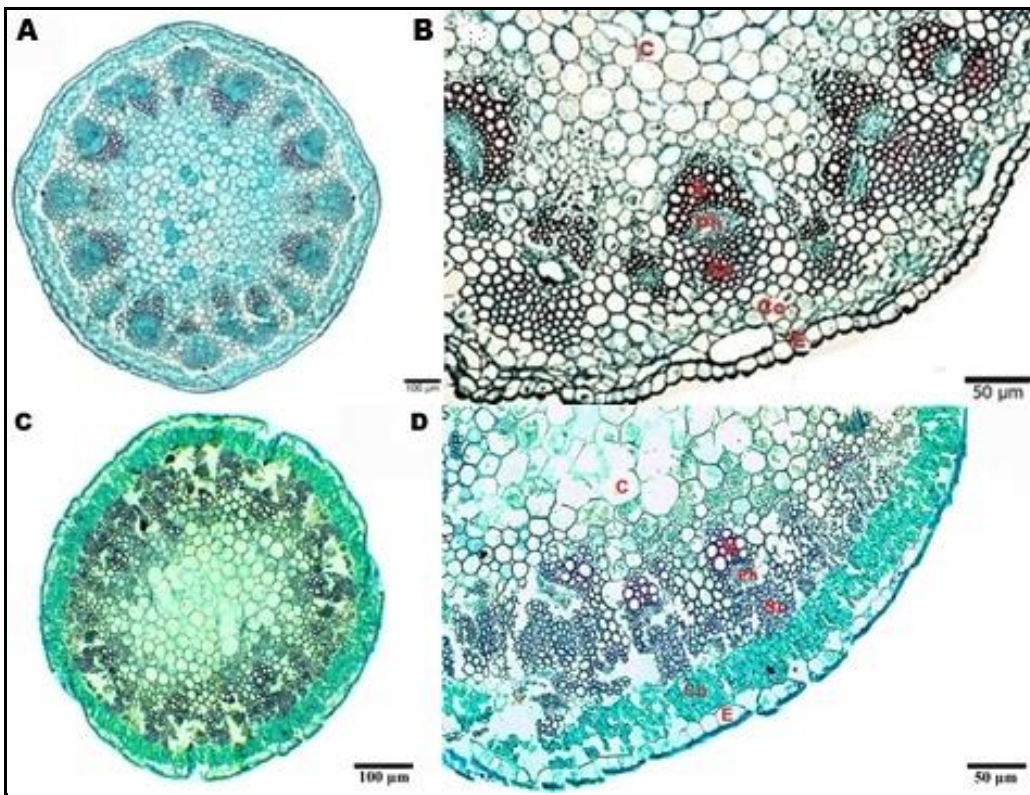
**Table 3.** Comparative seed morphological characteristics of *D. turcicum* and *D. venulosum*

Species	Seed shape	Seed width (mm)	Seed length (mm)	Number of seed layer	Seed color	Seed surface ornamentation
<i>D. turcicum</i>	Subglobose	0.80–1.34	0.69–1.28	4–7	Blackish	Spherical to stick shaped usually erect papillae
<i>D. venulosum</i>	Subglobose	1.11–1.21	1.03–1.23	6–8	Dark brown to black	Spherical to stick shaped generally erect papillae

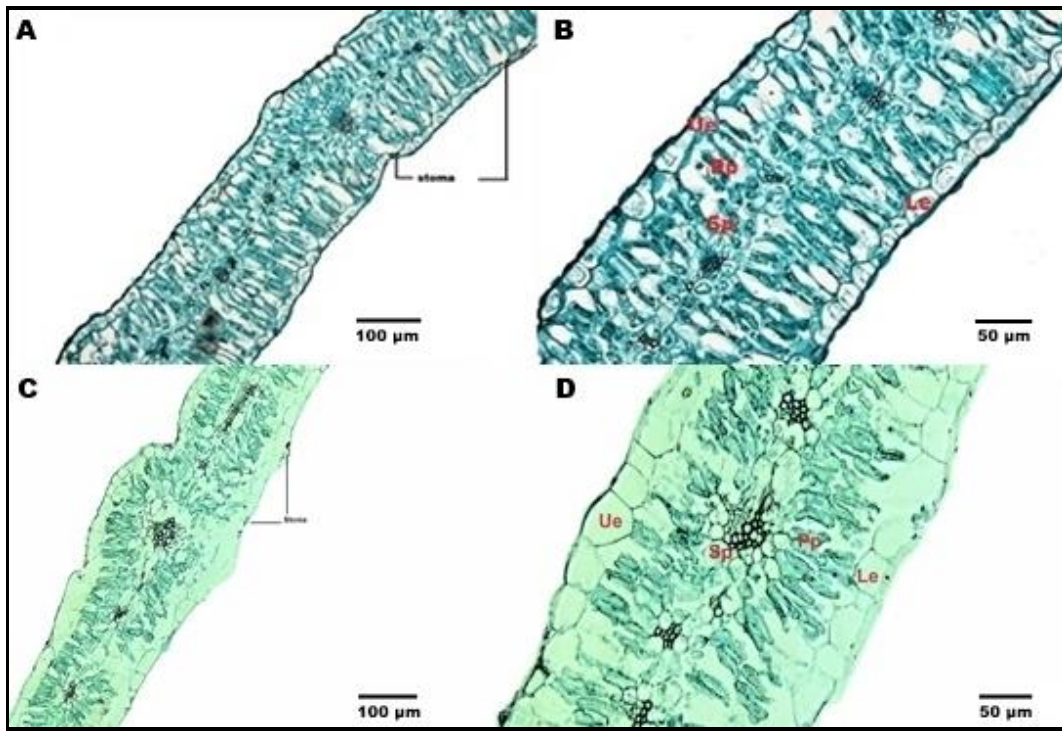
**Figure 1.** Distribution map of *Delphinium turcicum* in Türkiye.**Figure 2. A–B.** General view and flowers of *Delphinium turcicum* (Photos: Prof. Dr. Osman TUGAY).



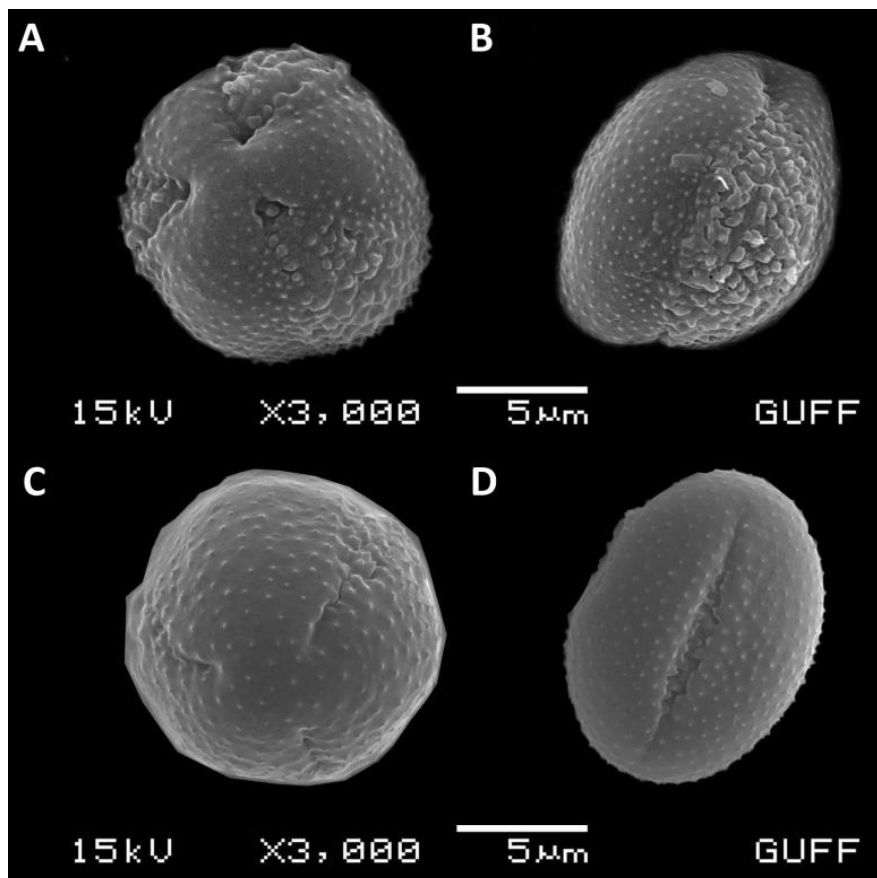
**Figure 3.** Transverse section of the root. **A–B.** *Delphinium turcicum*; **C–D.** *D. venulosum*  
 E: Epidermis, Co: Cortex, Px: Protoxylem, Ph: Phloem.



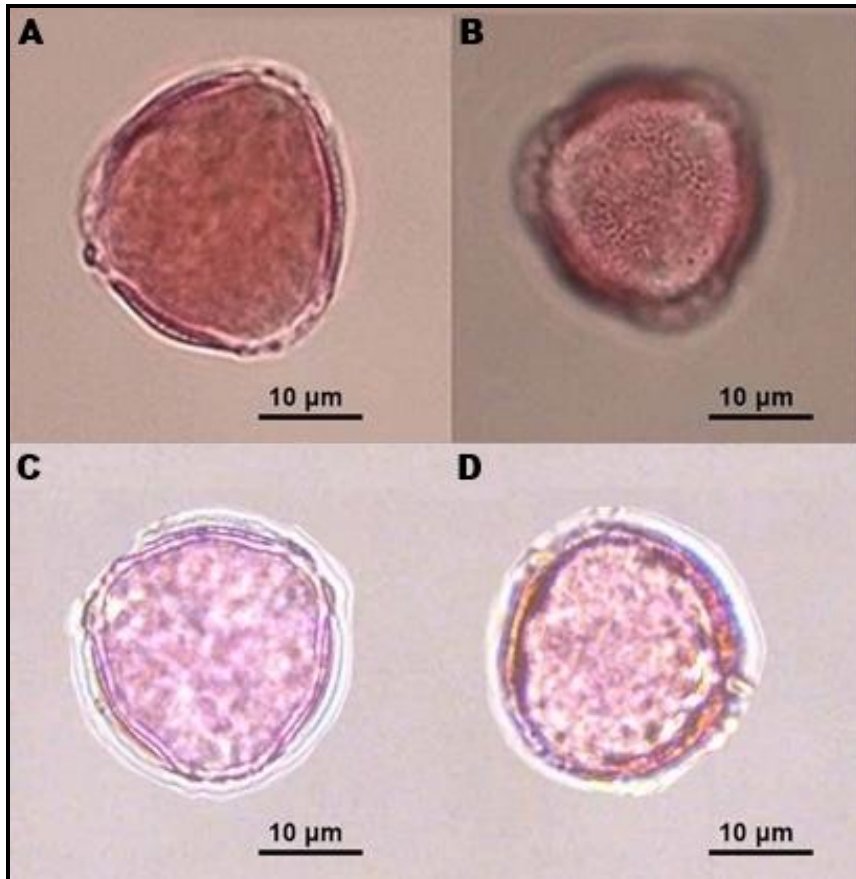
**Figure 4.** Transverse section of the stem. **A–B.** *Delphinium turcicum*; **C–D.** *D. venulosum*  
 X: Xylem, Ph: Phloem, Sc: Sclerenchyma, Co: Cortex, E: Epidermis, C: Core.



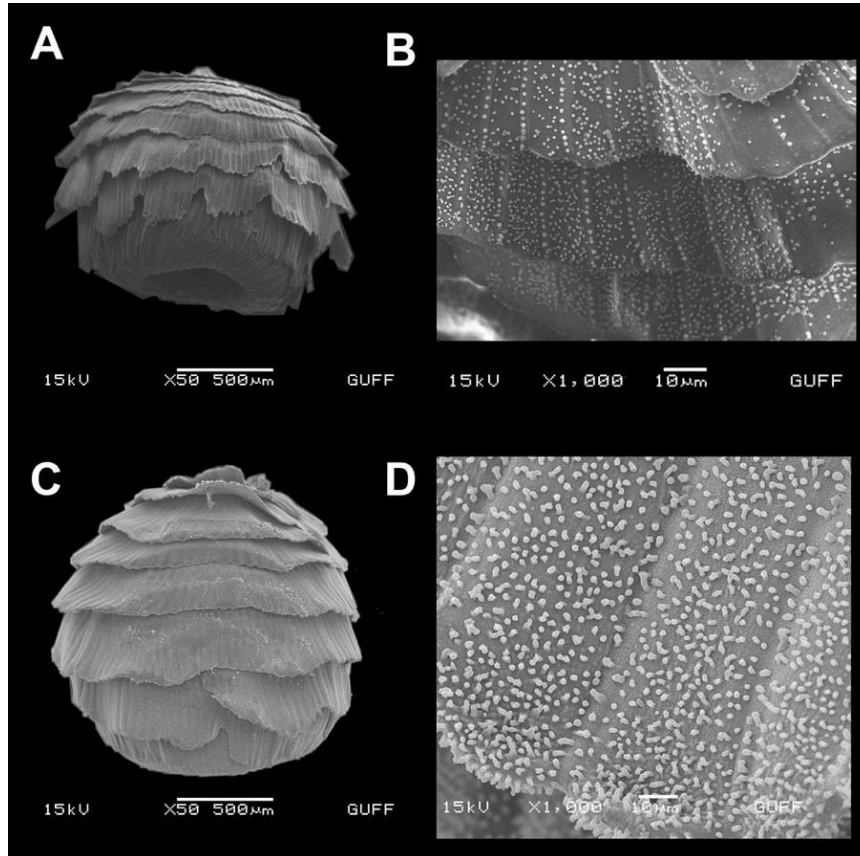
**Figure 5.** Transverse section of the lamina. **A–B.** *Delphinium turcicum*; **C–D.** *D. venulosum*  
 Ue: Upper epidermis, Le: Lower epidermis, Pp: Palisade parenchyma, Sp: Sponge parenchyma.



**Figure 6.** SEM micrographs of the pollen grains. **A–B.** *Delphinium turcicum* (O.Tugay 12.852);  
**C–D.** *D. venulosum* (O.Tugay 18.927 & D.Ulukus) polar and equatorial view.



**Figure 7.** Light micrographs of the pollen grains A–B. *Delphinium turcicum* (O.Tugay 12.852); C–D. *D. venulosum* (O.Tugay 18.927 & D.Ulukus).



**Figure 8.** SEM micrographs of the seed general view and sculpture structure A–B. *Delphinium turcicum* (O.Tugay 11.104) C–D. *D. venulosum* (O.Tugay 18.927 & D.Ulukus).

#### 4. Conclusions and discussion

In this study, morphological, anatomical, palynological, seed morphological and micromorphological data of *D. turcicum*, which is endemic to Türkiye, were obtained. In our results, anatomical, palynological, and seed features of *D. turcicum* species were given for the first time. In addition, anatomical, palynological and seed characterization of *D. venulosum* was investigated. In this work, the anatomical study of *D. venulosum* was reported for the first time. Data on pollen and seed studies are presented in comparison with other similar *Delphinium* species.

The root epidermis, the cortex cells and the apex (nucleus) cells of *D. venulosum* are larger and wider than *D. turcicum*. The xylem and phloem cells of *D. turcicum* are approximately same size compared to *Delphinium* species. Cortex and phloem cells are larger in *D. turcicum* compared to *D. venulosum*. The sclerenchyma and xylem cells are usually the same size for both species.

When the leaf anatomy; the lower epidermis of *D. venulosum* is wider than *D. turcicum*. In *D. turcicum*, the palisade parenchyma is approximately 4 times larger than *D. venulosum*. Sponge parenchyma of *D. venulosum* is larger than *D. turcicum*. As a result, all this information provides data of taxonomic importance for the root and stem. For the leaf anatomy; data of epidermis width, cortex and phloem cells, size difference of palisade and sponge parenchyma were determined as distinctive.

*D. venulosum* and *D. virgatum* pollen grains, which are sisters to *D. turcicum*; have a length of 22–31 µm, pollen shapes are spherical, tricolpate pollen grains and pollen ornaments are microechinate. The pollen of *D. turcicum* is heteromorphic; long (22–31 µm), both di- and tricolpate pollen grains were observed [13]. According to Espinosa et al. [13] pollen grains of *D. turcicum* are both di- and tricolpate 22–31 long. However, in our study, only tricolpate was observed among the pollen grains of *D. turcicum*. The pollen length of *D. turcicum* was measured at 21–23 µm. We think that this situation is caused by environmental factors. Our findings are generally consistent with the reporting of Espinosa et al. [13].

The seeds of the *D. turcicum* are blackish subglobose, It was measured as 0.69–1.28 mm in length and 0.80–1.34 mm in width. Seed surface sculpturing is striped. Seeds have 4–7 layer continuous rings of transversal squamulose. Seed surface ornamentation is spherical and mostly erect papillae. According to Vural et al. [12], *D. turcicum* has seeds eight-ten for every follicle, 2 mm, blackish, subglobose, 5–8 uninterrupted circles of transversal concrescent scales, umbilical orifice occupying one half, 1/3 of the sum seed size. However, in our study, the number of seed layers for *D. turcicum* was determined as 4–7.

Our study, *D. venulosum* seeds are detected as 8–10 in each follicle. The seed shape of the *D. venulosum* species is subglobose, seed color is dark brown to black. It was measured as 1.03–1.23 mm in length and 1.11–1.21 mm in width. Seed layer is 6–8 helicoidal rings of continuous lamellae. Seed surface ornamentation is medium density spherical to stick shaped generally erect papillae. According to Ilarsan et al. [5], *D. venulosum* brown subglobose seeds of  $1.34 \pm 0.03 \times 1.40 \pm 0.04$  mm with 7–9 helicoidal rings of continuous lamellae with minutely undulate margin, due to the digitiform ends of the rectangular-shaped cells. Faces with medium-density spherical to stick-shaped usually erect papillae. Seeds are deep crateriform hilum with wrinkled and crested cells. In our study, the seed size was determined to be smaller, but considering that the seed size of the genus *Delphinium* is generally less than 1.5. It is consistent with other results. However, it should not be ignored that there are differences in seed size between different populations of the same species, which can cause differences according to habitat conditions.

Compared to *D. venulosum*, it was observed that the granulation on the wing part of the seed layers was less in *D. turcicum*. Other structures and measurements for the seeds of both species shows similar characteristics. This work approves the former molecular studies. These two species have like characters in terms of anatomical and seeds micromorphological characters.

Morphological, palynological, leaf epidermis and anatomical characters are the most important features in *Ranunculaceae* taxonomy [23]. Although there are many publications on *Delphinium* L. (sensu lato), detailed data for anatomy and seed studies are scarce [10; 24]. Morphological, anatomical, palynological and seed differences are very important for taxonomic descriptions. Consequently, it is predicted that the information acquired with this work will contribute to the literature.

#### Acknowledgements

This article is derived from Master Thesis: “Palynological, morphological and anatomical characteristics of the endemic genus *Pseudodelphinium* (*Ranunculaceae*) in Türkiye”. The authors received no financial support for the research and thesis. I would like to thank S. Karagöz and Research Asst. E. Karahisar (Konya Selçuk University) for helping during the laboratory studies.

## References

- [1] Tamura, M. (1963). Morphology, ecology and phylogeny of *Ranunculaceae*, Sci. Rep. Coll. Gen. Education Osaka Univ. 13(1):25-38.
- [2] Chartier, M., Dressler, S., Schönenberger, J., Rojas Mora, A., Sarthou, C., Wang, W. & Jabbour, F. (2016). The evolution of afro-montane *Delphinium* (*Ranunculaceae*): Morphospecies, phylogenetics and biogeography. *Taxon*, 65(6), 1313-1327. <https://doi.org/10.12705/656.6>
- [3] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M. T. (edlr.) (2012). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler) [Türkiye plant list (Vascular plants)]. Türkiye (pp. 1-1290). Flora Araştırmaları Derneği ve Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları, İstanbul.
- [4] Jabbour, F. & Renner, S.S. (2011). *Consolida* and *Aconitella* are an annual clade of *Delphinium* (*Ranunculaceae*) that diversified in the Mediterranean basin and Irano-Turanian region. *Taxon*, 60(4), 1029-1040. <https://doi.org/10.1002/tax.604007>
- [5] İlarsan, H., İlarsan, R., & Blanché, C. (1997). Seed morphology of the genus *Delphinium* L. (*Ranunculaceae*) in Türkiye. *Collectanea Botanica*, 1997 vol. 23, p. 79-95. <https://doi.org/10.3989/collectbot.1997.v23.68>
- [6] Trifonova, V.I. (1990) Comparative biomorphological study of the taxonomy and phylogeny of the genera *Consolida* (DC.) S.F. Gray and *Aconitella* Spach. *Collectanea Botanica*, (19), 97-110.
- [7] Hadidchi, A. Attar, F. & Ullah, F. (2020). Using microscopic techniques for taxonomic implications of seed and fruits of *Delphinium* L.(sensu lato)(*Ranunculaceae*). *Microscopy Research and Technique*, 83(2), 99-117. <https://doi.org/10.1002/jemt.23393>
- [8] De Leeuw, A., Bukowski, K., Krijgsman, W. & Kuiper, K. F. (2010). Age of the badenian salinity crisis; impact of Miocene climate variability on the circum-Mediterranean region. *Geology*, 38(8), 715-718. <https://doi.org/10.1130/G30982.1>
- [9] Davis, P. H., Cullen, J., & Coode, M. J. E. (1965). *Ranunculaceae*. *Flora of Türkiye and The East Aegean Islands*, vol. 1, pp. 94-134.
- [10] Rewicz, A., Bomanowska, A., Magda, J. & Rewicz, T. (2017). Morphological variability of *Consolida regalis* seeds of south-eastern and central Europe. *Systematics and Biodiversity*, 15(1), 25-34. <https://doi.org/10.1080/14772000.2016.1216017>
- [11] Vural, M., Duman, H., Aytac, Z. & Adıgüzel, N. (2012). A new genus and three new species from Central Anatolia, Türkiye. *Turkish Journal of Botany*, 36(5): 427- 433.
- [12] Espinosa, F. Deroin, T. Xiang, K.-L. Wang, W. Castro, M. P. Byng, J. W. Aytaç, Z. Nadot, S. & Jabbour, F. (2017). The Turkish endemic *Pseudodelphinium turcicum* (*Ranunculaceae*): an unusual population of *Delphinium* with peloric flowers that has persisted in the wild for 20 years. *International Journal of Plant Sciences*, 178 (7), 000-000. <https://doi.org/10.1086/692764>
- [13] Espinosa, F. & Myreya, P.C. (2018). On the use of herbarium specimens for morphological and anatomical research. *Botany Letters*, 165(3-4), 361-367. <https://doi.org/10.1080/23818107.2018.1451775>
- [14] Espinosa, F., Deroin, T., Malécot, V., Wang, W., Pinedo, M., Nadot, S., & Jabbour, F. (2021). Historical note on the taxonomy of the genus *Delphinium* L.(*Ranunculaceae*) with an amended description of its floral morphology. *Adansonia*, 43(2), 9-18. <https://doi.org/10.5252/adansonia2021v43a>
- [15] Xiang, K.L. Aytaç, Z. Liu, Y. Espinosa, F. Jabbour, F. Byng, J. W. & Wang, W. (2017). Recircumscription of *Delphinium* subg. *Delphinium* (*Ranunculaceae*) and implications for its biogeography. *Taxon*, 66(3), 554-566. <https://doi.org/10.12705/663.3>
- [16] Ullah, F. Zafar, M. Ahmad, M. Dilbar, S. Shah, S. N. Sohail, A. & Tariq, A. (2018). Pollen morphology of subfamily Caryophylloideae (Caryophyllaceae) and its taxonomic significance. *Microscopy Research and Technique*, 81(7), 704-715. <https://doi.org/10.1002/jemt.23026>
- [17] Ullah, F. Papini, A. Shah, S.N. Zaman, W. Sohail, A. & Iqbal, M. (2019). Seed micromorphology and its taxonomic evidence in subfamily Alsinoideae (Caryophyllaceae). *Microscopy Research and Technique*, 82 (3), 250-259. <https://doi.org/10.1002/jemt.23167>
- [18] Johansen, D.A. (1940). *Plant microtechnique*. Inc; London: McGraw-Hill Book Company.
- [19] Wodehouse, R.P. (1935). *Pollen grains. Their structure, identification and significance in science and medicine*. New York, NY. London: McGraw-Hill Book Company.
- [20] Özdamar, K. (2004). *Paket Programlar ile İstatistiksel Veri Analizi-I*. Eskişehir: Kaan Kitabevi.

- [21] Punt, W. Hoen, P. Blackmore, S. Nilsson, S. & Le Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 143(1-2), 1-81.
- [22] Stearn, W.T. (1983). *Botanical Latin*. David & Charles Pub, London.
- [23] Stace, C.A. (1991). *Plant taxonomy and Biosystematics*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- [24] Kolar, F. Pai, S.R. & Dixit, G.B. (2017). *Delphinium malabaricum* (Huth) Munz: A potential ornamental crop from Western Ghats. *Horticulture International Journal*, 1(1), 16-21.  
[https://doi.org/ 10.15406/hij.2017.01.00003](https://doi.org/10.15406/hij.2017.01.00003)





## Impacts of three different magnetic field applications on seed germination and seedling development of *Melissa officinalis* L.

Canan ÜLGEN<sup>1</sup>, Arzu UÇAR TÜRKER\*<sup>2</sup>  
ORCID: 0000-0002-8272-3370; 0000-0001-9617-6673

<sup>1</sup> Şırnak University, Technology and Research Centre, 73000 Şırnak, Türkiye

<sup>2</sup> Bolu Abant İzzet Baysal University, Faculty of Science and Art, Department of Biology, 14030 Bolu, Türkiye

### Abstract

The herb *Melissa officinalis* L., most commonly recognized as lemon balm, has been used as a treatment for problems with the brain and central nervous system, headaches, nervousness, digestive disorders, respiratory and circulatory conditions, various types of cancer and rheumatism. This investigation was designated to compare the impacts of 3 discrete magnetic field strengths (50 mT, 100 mT and 150 mT) with various time periods of exposure (5 min, 15 min, 30 min, 1 hr and 3 hr) on *M. officinalis* seed germination (rate and onset) and seedling growth (length of shoot-root, weight of fresh-dry and water content). The seeds, which were surface sterilized in petri plates, were subjected to different applications, including exposure to various magnetic fields and control (without exposure). Germination was assessed by observing the radicular protrusion. The number of germinated seeds was recorded over 20 days. In all 3 magnetic field applications, exposure to magnetic field for 1 hr caused the highest number of seed germination (36%, 52% and 50% for 50 mT, 100 mT and 150 mT, respectively) comparing to control (28%). The onset of seed germination was earlier with magnetic field application (day 7) compared to control (day 11). Growth elements and water contents of the seedling were assessed in order to understand the impact of different magnetic field applications. Implementation of 100 mT and 150 mT magnetic field for 1 hr increased shoot and root length in addition to fresh weight of the seedlings. The maximum dry weight increase was provided by 150 mT-5 min, 15 min and 30 min. The highest water content (%) was observed with exposure to 150 mT (68%) and 100 mT (66%) for 1 hr compared to control (44%). Magnetic field intensity of 100 mT and 150 mT for 1 hr was the most efficient in the seed germination and seedling growth.

**Keywords:** germination, growth, lemon balm, magnetic field, *Melissa officinalis*.

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

### Üç farklı manyetik alan uygulamasının *Melissa officinalis* L.'nin tohum çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine etkileri

### Özet

Oğul otu olarak da bilinen *Melissa officinalis* L. bitkisi, beyin ve merkezi sinir sistemi ile ilgili sorunlar, baş ağrıları, sinirlilik, sindirim bozuklukları, solunum ve dolaşım rahatsızlıkları, çeşitli kanser türleri ve romatizma tedavisinde kullanılmaktadır. Bu araştırma, *M. officinalis* tohum çimlenmesi (hızı ve başlangıcı) ve fide büyümesi (sürgün-kök uzunluğu, yaş-kuru ağırlık ve su içeriği) üzerine çeşitli maruz kalma süreleri (5 dk, 15 dk, 30 dk, 1 s ve 3 s) ile 3 farklı manyetik alan şiddetinin (50 mT, 100 mT ve 150 mT) etkilerinin karşılaştırılmasını amaçlamaktadır. Petri kaplarında yüzey sterilizasyonu yapılan tohumlar, çeşitli manyetik alan maruziyeti ve kontrol (maruz bırakmadan) olmak üzere farklı uygulamalara tabi tutulmuştur. Çimlenme, radiküler çıkıntı gözlemlendiğinde değerlendirilmiştir. Çimlenen tohumların sayısı 20 gün boyunca kaydedilmiştir. Üç manyetik alan uygulamasının hepsinde, 1 saat boyunca manyetik alana maruz kalma, kontrol (%28) ile karşılaştırıldığında en yüksek sayıda tohum çimlenmesine (50 mT, 100

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903742545138; Fax.: +903742534642; E-mail: turker\_a@ibu.edu.tr

mT ve 150 mT için sırasıyla %36, %52 ve %50) neden olmuştur. Tohum çimlenmesinin başlangıcı, manyetik alan uygulamasıyla (7. gün) kontrole (11. gün) kıyasla daha erken olmuştur. Farklı manyetik alan uygulamalarının etkisini anlamak için fidelerin büyüme elementleri ve su içerikleri karşılaştırılmıştır. 1 saat süreyle 100 mT ve 150 mT manyetik alan uygulaması fidelerin taze ağırlığına ek olarak gövde ve kök uzunluğunu artırmıştır. En fazla kuru ağırlık artışı, 150 mT-5 dk, 15 dk ve 30 dk ile sağlanmıştır. Kontrole (%44) kıyasla en yüksek su içeriği (%) 1 saat süreyle 150 mT (%68) ve 100 mT (%66) maruziyetinde gözlemlenmiştir. 1 saat boyunca 100 mT ve 150 mT manyetik alan yoğunluğu, tohum çimlenmesi ve fide büyümesinde en etkili olmuştur.

**Anahtar kelimeler:** çimlenme, büyüme, manyetik alan, *Melissa officinalis*, oğul otu.

## 1. Introduction

*Melissa officinalis* L., generally recognized as lemon balm, is an aromatic plant indigenous to the Eastern Mediterranean area, Western Asia, Southern Europe, Caucasus, and Northern Iran [1, 2]. It has a wide distribution in the Mediterranean, Marmara and Black Sea regions of Turkey and is locally distributed in Central and Southeastern Anatolia regions [3]. It is widely cultivated in Europe and is extensively researched because of its chemical constituents and various therapeutic properties [1, 2, 4]. *M. officinalis* has a long history of usage in folk therapy due to its calming and herbal aromatic qualities. It is also used to treat fever, colds, headache, toothache and insomnia in folk medicine [4, 5]. It has tannins, phenolic acids, flavonoids, triterpenes, essential oils, and triterpenes [1, 2]. In general, living things are beings affected by Earth's magnetism. Magnetic and electromagnetic treatments are a technique used in agriculture to improve the germination of seeds and increase crop and yield [6]. Particularly, low-level magnetic field is reportedly stated to positively affect plant seed germination, growth, and content [7-18]. The investigations demonstrate the advantageous impacts seen on magnetically treated plants under various circumstances, depending on applications like exposure period and constant or variable magnetic field strength [6]. Applications of magnetic fields in agriculture can be utilized to increase the quality of its products and yield [6, 9]. Our previous study revealed the impact of 2 different magnetic field strengths (50 mT and 100 mT) with various exposure durations (1 h, 3 hr, 6 hr, 12 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 144 hr and 240 hr) on *M. officinalis* seed germination [16]. It was found that a magnetic field increased the germinated seed frequency and decreased the time needed for the germination of seeds [16]. Consequently, our goal was to evaluate the efficacy of three different magnetic fields strengths (50 mT, 100 mT and 150 mT) with discrete exposure times (5 min, 15 min, 30 min, 1 hr and 3 hr) on seed germination and seedling growth regarding shoot-root length, fresh-dry weights, and water content.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Magnetic Field Settings

Block magnets (neodymium) with dimensions of 100 x 50 x 5 mm were utilized to generate three different magnetic fields:  $50 \pm 5$  mT,  $100 \pm 5$  mT and  $150 \pm 5$  mT. The magnets were immobilized on the aluminum stand side by side to create the magnetic intensity (Figure 1A, B, C and D). Teslameter (Compensation®) was handled to determine the strength of the magnetic field [6].

### 2.2. Germination

*M. officinalis* L. subsp. *officinalis* L. seeds were collected at Bolu, Turkey and "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" was used to identify the plant [3]. The seeds were cleaned with an antibacterial soap, washed with distilled water, and surface sterilization was performed after 15 minutes of shaking in 0.1% HgCl<sub>2</sub> for 15 minutes, cleaned three more times with sterilized water, sterilized in 70% ethanol for 1-2 minutes, and then cleaned three more times with sterile water [16]. Completely sterilized seeds were put into sterile and disposable petri plates with Murashige and Skoog's minimal organics medium [19], which contains 30 g/l sucrose (Caisson®) and 8 g/l agar (BD-Bacto®) (pH 5.7, autoclaved at 121°C and 105 kPa for 20 minutes). Each petri plate contained ten seeds, and ten petri plates (90 mm) were utilized for each treatment. Seeds were properly aligned in petri dishes to be exposed to the most accurate magnetic field strengths (Figure 1E). Surface sterilized seeds in petri plates were placed into 3 different magnetic field strengths (50 mT, 100 mT and 150 mT) exposing to 5 different durations (5 min, 15 min, 30 min, 1 hr and 3 hr). Radicle protrusion was the sign to assess the germination. For a period of 20 days, the number of germinated seeds was recorded. For seedling development, germinated seeds were placed into Magenta containers (GA-7 Vessel, Sigma-Aldrich®) including MSMO medium for a further six weeks to allow for shoot elongation and root formation (Figure 1F). After 6 weeks of culture, shoot and root length, fresh and dry weights and water content were recorded (Figure 1G).

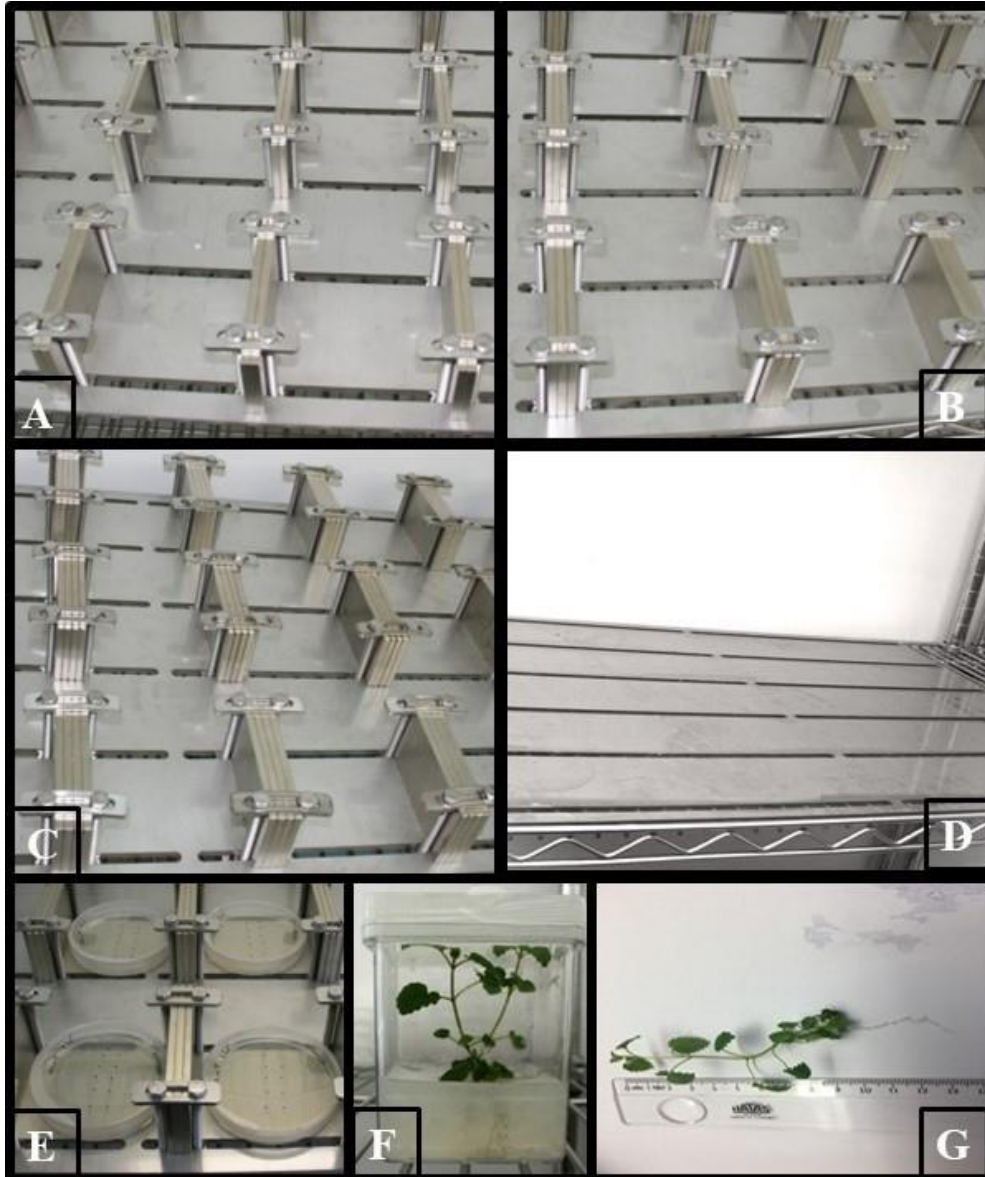


Figure 1. Magnetic field setup-(A) 50 mT, (B) 100 mT and (C) 150 mT, (D) Control; (E) Seed alignment demonstrated in magnetic field applications; (F) Seedling exposing 1hr-100 mT magnetic field after 6 weeks; (G) Shoot-root length measurement of the seedlings after magnetic field exposures

### 2.3. Statistical analysis

All the data were first tested for normality (Kolmogorov-Smirnov test) and homogeneity of variance (Levene's test) to meet statistical demands [20]. Then, the results were analyzed using ANOVA by a completely randomized design and multiple range parametric tests (Duncan's) in SPSS version 26 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The table's data was given as a mean number with standard error (SE). Differences between means were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

*M. officinalis* seeds were magnetically treated for varying exposure times (5 min, 15 min, 30 min, 1 hr, and 3 hr) to static magnetic fields with an intensity of 50 mT, 100 mT, and 150 mT. When compared to unexposed seeds (control), it was observed that the strength of the magnetic field and the length of exposure time had a profound impact on lemon balm seed germination. When the radicle started to protrude, seeds were regarded to have germinated. Magnetic field intensity of 100 mT and 150 mT with all exposure times enhanced the germination frequency comparing to control group (non-exposed seeds-28%). Lemon balm seeds required a 1 hr exposure to 50 mT, 100 mT, or 150 mT to germinate, with 36%, 52%, and 50%, respectively, being the best germination rates. With a 100 mT magnetic field

applied for one hr, the maximum seed germination was noted (52%) that is 1.9-fold increase regarding control (Figure 2 and 3). It was also noteworthy that magnetic field treatment to the seedlings accelerated germination. The time required for seed germination was reduced with magnetic field utilizations, with seed germination occurring in 7th day with all magnetic field applications (except for 50 mT with 3 hrs-8th day) and 11th day with non-treated seeds (Figure 2 and 3).

In order to understand the effect of 3 different magnetic field strength with various exposure durations, the shoot and root lengths, fresh and dry weights, and water content of the seedlings were compared (Table 1). Application of 100 mT magnetic field for 1 hr enhanced shoot and root lengths. Furthermore, 150 mT treatment for 1 hr was also effective in shoot and root length increments. Fresh weight raised the most with 150 mT and 1 hr application. Second, 100 mT treatment for 1 hr increased fresh weight successfully. The maximum dry weight increase was achieved with the application of 150 mT with 5 min, 15 min and 30 min exposure times. All applied magnetic field intensities with various durations increased water holding capacities comparing to no magnetic field exposure-control (44%). Water content (%) results showed that 1 hr exposure to 150 mT (68%) and 100 mT (66%) increased water holding capacity at most (Table 1).

#### 4. Conclusion and Discussion

Magnetic field intensity and exposure duration to magnetic field were crucial components for lemon balm seed germinations. Lemon balm seeds dealt with magnetic field germinated more quickly. Germination rate was higher for magnetically treated lemon balm seeds. Also, germination time was significantly reduced when seeds were exposed to magnetic fields. Magnetic field intensities of 100 mT and 150 mT for 1 hr were proven to be the most effective in seed germination and seedling growth. All magnetic field applications increased the amount of water in the seedlings. The magnetic field strength and duration, which are the most effective in germination and growth also caused more water retention. Our findings revealed that the fresh weight rose because it retained more water after 1 hr exposure to 100 mT and 150 mT. On the other hand, dry weight increase was the most efficient with 5 min exposure duration of 150 mT magnetic field.

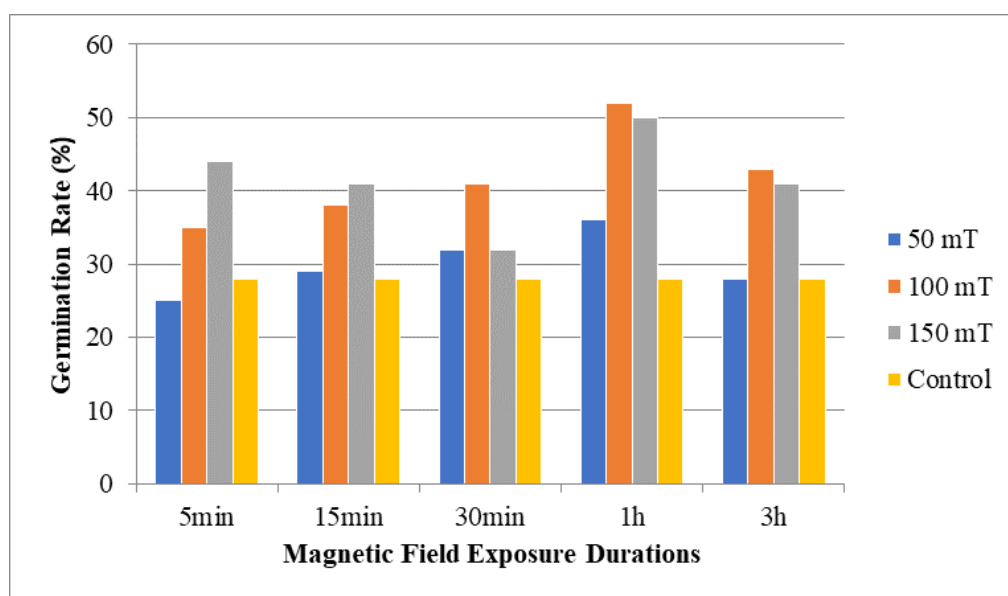


Figure 2. Influences of different applied magnetic fields with different durations on seed germination rate (%) of *M. officinalis*

Similar to present study, comparison of 50 mT and 100 mT magnetic field with discrete exposure durations (1 hr, 3 hr, 6 hr, 12 hr, 24 hr, 48 hr, 72 hr, 144 hr and 240 hr) in *M. officinalis* seed germination in our previous study [16] showed that among the different duration times, 1 hr exposure showed the best germination rate and seed germination, and onset of seed germination occurred on the 7th day with both magnetic field treatments. In line with this result, Reina and Pascual [7] showed that the applied magnetic field increased water uptake rate, which could explain the rise in germination of treated lettuce seedlings. Their explanation was that variations in intracellular  $Ca^{2+}$  levels and ionic current density across the cellular membrane due to magnetic field treatments generated changes in osmotic pressure and the capacity of cellular tissues to absorb water. Water intake was reported to increase with magnetic field treatments in multiple investigations [7] which is supposed to promote cell development. In chickpea, magnetic field treatments increased germination of the seeds, germination speed, the length of seedling, and dry weight, according to research by Vashisth and Nagarajan [21]. They came to the conclusion that [21]  $Ca^{2+}$  ion separation and subsequent increase of free

cell  $\text{Ca}^{2+}$  level may be caused by the mobility of ions in magnetic field (ion-cyclotron resonance). An early mitotic cell cycle entry signal could be provided by an elevated  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration. The cell's increased  $\text{Ca}^{2+}$  ion concentration may be the cause of the increased biomass in the seedlings.

Table 1. Influences of 3 different magnetic fields with different durations on growth parameter and water content in *M. officinalis*

Magnetic Field Exposures	Shoot length (mm)	Root length (mm)	Fresh weight (gr)	Dry weight (gr)	Water content (%)
<b>50 mT</b>					
5 min	55±1.8 <sup>ef</sup>	31±3.1 <sup>ef</sup>	1.178±4.5 <sup>f</sup>	0.577±1.2 <sup>c</sup>	51
15 min	45±2.4 <sup>f</sup>	36±2.3 <sup>e</sup>	1.320±1.3 <sup>e</sup>	0.673±2.1 <sup>bc</sup>	49
30 min	49±1.9 <sup>f</sup>	37±4.1 <sup>e</sup>	1.509±3.4 <sup>d</sup>	0.679±0.6 <sup>bc</sup>	55
1 h	70±4.5 <sup>d</sup>	49±0.5 <sup>cd</sup>	1.782±1.9 <sup>bc</sup>	0.695±2.9 <sup>b</sup>	61
3 h	59±2.7 <sup>e</sup>	35±1.6 <sup>e</sup>	1.634±2.1 <sup>cd</sup>	0.752±0.8 <sup>b</sup>	54
<b>100 mT</b>					
5 min	69±1.7 <sup>d</sup>	44±2.5 <sup>d</sup>	1.358±1.8 <sup>e</sup>	0.578±1.5 <sup>c</sup>	57
15 min	80±2.9 <sup>c</sup>	58±3.8 <sup>bc</sup>	1.730±2.1 <sup>c</sup>	0.694±2.3 <sup>bc</sup>	59
30 min	90±3.0 <sup>bc</sup>	50±2.27 <sup>b</sup>	1.846±1.0 <sup>b</sup>	0.673±1.8 <sup>bc</sup>	64
1 h	<b>108±2.8<sup>a</sup></b>	<b>73±2.3<sup>a</sup></b>	<b>2.187±4.3<sup>ab</sup></b>	<b>0.735±1.4<sup>b</sup></b>	<b>66</b>
3 h	97±3.4 <sup>b</sup>	56±4.6 <sup>bc</sup>	1.812±2.7 <sup>b</sup>	0.656±4.2 <sup>bc</sup>	63
<b>150 mT</b>					
5 min	75±1.8 <sup>cd</sup>	47±1.1 <sup>cd</sup>	2.161±1.8 <sup>ab</sup>	0.908±3.4 <sup>a</sup>	58
15 min	74±3.6 <sup>cd</sup>	53±2.7 <sup>c</sup>	1.767±2.5 <sup>bc</sup>	0.848±1.4 <sup>ab</sup>	52
30 min	82±0.7 <sup>c</sup>	62±6.5 <sup>b</sup>	1.929±0.9 <sup>b</sup>	0.890±0.9 <sup>ab</sup>	55
1 h	94±4.2 <sup>b</sup>	72±4.1 <sup>ab</sup>	2.327±1.2 <sup>a</sup>	0.745±2.1 <sup>b</sup>	68
3 h	91±3.6 <sup>bc</sup>	65±0.7 <sup>b</sup>	2.234±1.6 <sup>ab</sup>	0.820±2.1 <sup>ab</sup>	63
<b>Control (no exposure)</b>	39±0.6 <sup>f</sup>	29±1.6 <sup>f</sup>	1.154±3.1 <sup>f</sup>	0.651±0.7 <sup>bc</sup>	44

The impact of magnetic field implementations (80 mT, 100 mT, and 170 mT) for 1 min, 3 min, 5 min, 10 min, 15 min, 20 min and 25 min on tomato seedling germination and growth was examined by Souza Torres et al. [22]. With some magnetic field applications, an enhancement in germination rate and seedling height was recorded, and the stimulus varied according to the magnetic field strength levels and exposure period. Similar to our study, one previous study evaluated that germination rate of *M. officinalis* seeds treated with 3.8-4.8 mT magnetic field was higher comparing to control [12]. However, unlike our findings, the seedlings remained short in length comparing with control in their study [12].

Different magnetic field treatments promoted the germination rate in numerous other plants, similar to our findings: Gholami and Sharafi [23] applied magnetic fields of 125 mT or 250 mT for varying lengths of time on wheat seeds and reported the stimulating effect of different magnetic doses on germination compared to the control. Rice and maize seeds subjected to 125 mT and 250 mT stationary magnetic fields showed an increase in early growth phases and an early sprouting [13, 14]. In another study with wheat, it was determined that root dry and fresh weight increased, and the germination rate raised at the end of magnetic field application [24]. Aladjadjiyan and Ylieva [25] found that magnetic field caused an increase in seed germination percentage in tobacco plant. It was reported that seedlings grown from magnetically treated wheat germ (180 mT) collected more water and grew faster than untreated controls [26]. Kavi [27] determined that the moisture absorption capacity of soybean seeds increased when exposed to a magnetic field of 300 mT [28-30]. In both *Salvia officinalis* and *Calendula officinalis*, the application of a magnetic field increased the percentage of germination in the treated group relative to the untreated group [15].

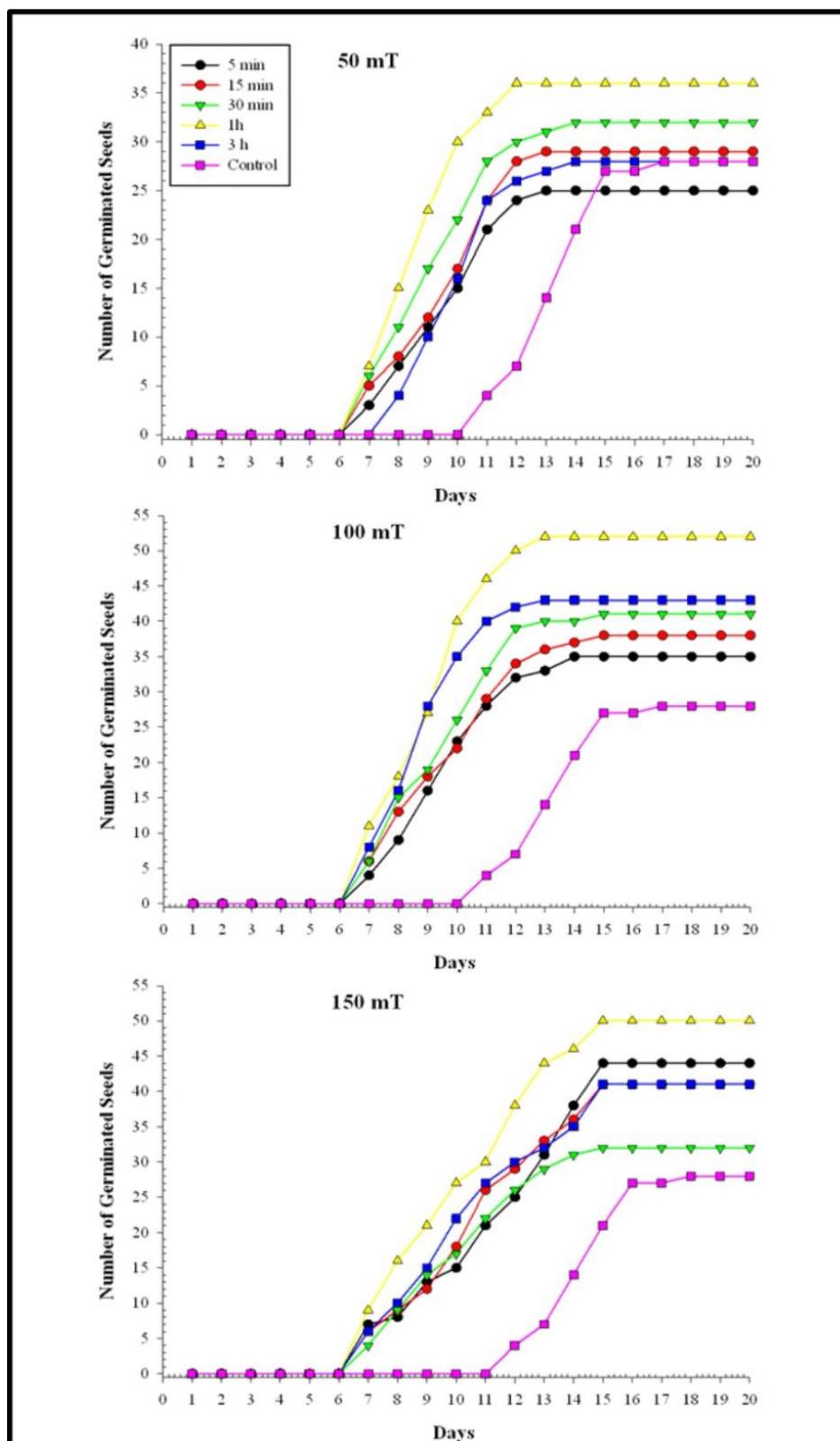


Figure 3. Influences of different applied magnetic fields with different durations on seed germination of *M. officinalis*

In consistent with our findings, Racuciu et al. [11] reported the stimulatory effect of the magnetic fields (50 mT-250 mT) in *Zea mays* seedlings and plant lengths were higher for all exposed samples. Racuciu et al. [10] evaluated the impact of varied magnetic field applications (50-250 mT) on the growth and development of maize seedlings during a 14-day period. They claimed that low magnetic field (50 mT) stimulated growth by increasing fresh tissue mass,

length of plant, chlorophyll ratio, assimilatory pigments, and average nucleic acid level. On the other hand, they discovered that high magnetic field utilizations (100 mT-250 mT) inhibited growth. Racuciu [9] showed that the treatment of seedlings with a 10 mT magnetic field for 4 hr had a substantial effect on the length of *Zea mays* plants, and this might be attributable to an improved capacity for water storage following magnetic field exposure. In contrast to our findings, Ghanati et al. [8] reported a decline in the development of *Ocimum basilicum* L. (basil) subjected to 30 mT magnetic field for 6 days and 5 hr each day.

It can be concluded that positive effect of stationary magnetic field can be used in agriculture sector for lemon balm to increase of germinated seeds and their biomass (fresh or dry weight).

### Acknowledgements

This study was supported by Bolu Abant İzzet Baysal University Research Foundation (BAP2016.03.01.1027). We are grateful to Assoc. Prof. Dr. Asaf Tolga Ülgen for his technical supports.

### References

- [1] Petrisor, G., Motelica, L., Craciun, L. N., Oprea, O. C., Ficai, D., & Ficai, A. (2022). *Melissa officinalis*: Composition, pharmacological effects and derived release systems—A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3591. <https://doi.org/10.3390/ijms23073591>
- [2] Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L.—A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*, 188, 204-228. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.010>
- [3] Davis, P.H. (1978). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 6. England: Edinburgh University Press.
- [4] Ülgen, C., Yıldırım, A.B., & Turker, A.U., (2023). *Melissa officinalis*: Antibacterial and antioxidant potential, phenolic profile and enzyme activities. *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 26, 1075-1085. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.1170784>
- [5] Uzun, M., & Kaya, A. (2019). Traditional medicinal plants used for oral and dental diseases in Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 12, 138-148.
- [6] Ülgen, C., Yıldırım, A. B., Sahin, G., & Turker, A. U. (2021). Do magnetic field applications affect in vitro regeneration, growth, phenolic profiles, antioxidant potential and defense enzyme activities (SOD, CAT and PAL) in lemon balm (*Melissa officinalis* L.)? *Industrial Crops and Products*, 169, 113624. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113624>
- [7] Reina, F. G., & Pascual, L. A. (2001). Influence of a stationary magnetic field on water relations in lettuce seeds. Part I: Theoretical considerations. *Bioelectromagnetics*, 22(8), 589-595. <https://doi.org/10.1002/bem.88>
- [8] Ghanati, F., Abdolmaleki, P., Vaezzadeh, M., Rajabbeigi, E., & Yazdani, M. (2007). Application of magnetic field and iron in order to change medicinal products of *Ocimum basilicum*. *The Environmentalist*, 27, 429-434. <https://doi.org/10.1007/s10669-007-9079-7>
- [9] Racuciu, M. (2012). Influence of extremely low frequency magnetic field on assimilatory pigments and nucleic acids in *Zea mays* and *Curcubita pepo* seedlings. *Romanian Biotechnological Letters*, 17(5), 7663.
- [10] Racuciu, M., Creanga, D., & Horga, I. (2008). Plant growth under static magnetic field influence. *Romanian Journal of Physics*, 53(1-2), 353-359.
- [11] Racuciu, M., Galugaru, G., & Creanga, D. E. (2006). Static magnetic field influence on some plant growth. *Romanian Journal of Physics*, 51(1/2), 245.
- [12] Yalçın, S., & Tayyar, Ş. (2011). Oğulotu tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişimi üzerine manyetik alanın etkisi. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 21(3), 190-197. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/yyutbd/issue/21981/236019>
- [13] Florez, M., Carbonell, M. V., & Martínez, E. (2007). Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: Effects on germination and early growth. *Environmental and Experimental Botany*, 59(1), 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2005.10.006>
- [14] Florez, M., Carbonell, M. V., & Martínez, E. (2004). Early sprouting and first stages of growth of rice seeds exposed to a magnetic field. *Electromagnetic Biology and Medicine*, 23(2), 157-166. <https://doi.org/10.1081/LEBM-200042316>
- [15] Florez, M., Martínez, E., & Carbonell, M. V. (2012). Effect of magnetic field treatment on germination of medicinal plants *Salvia officinalis* L. and *Calendula officinalis* L. *Polish Journal of Environmental Studies*, 21(1), 57-63.
- [16] Ülgen, C., Yıldırım, A. B., & Turker, A. U. (2017). Effect of magnetic field treatments on seed germination of *Melissa officinalis* L. *International Journal of Secondary Metabolite*, 4(3, Special Issue 1), 43-49. <https://doi.org/10.21448/ijsm.356283>
- [17] Ülgen, C., Yıldırım, A. B., & Turker, A. U. (2020). Enhancement of plant regeneration in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) with different magnetic field applications. *International Journal of Secondary Metabolite*, 7(2), 99-108. <https://doi.org/10.21448/ijsm.677102>

- [18] Turfan, N., Yer, E. N., Ayan, S., Hasdemir, B., & Hancerliogullari, A. (2016). The effect of magnetic field application on chemical composition in *Fagus orientalis* Lipsky. seed. *Biological Diversity and Conservation*, 9/2 (S1), 75-83.
- [19] Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497.
- [20] Zar J. H. (1996). *Biostatistical analysis*. 3rd ed. USA: Prentice-Hall.
- [21] Vashisth, A., & Nagarajan, S. (2008). Exposure of seeds to static magnetic field enhances germination and early growth characteristics in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Bioelectromagnetics*, 29(7), 571-578. <https://doi.org/10.1002/bem.20426>
- [22] Souza Torres, A. D., Porrás Leon, E., & Casate Fernández, R. (1999). Effect of magnetic treatment of tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* Mill) on germination and seedling growth. *Investigacion Agraria. Produccion y Proteccion Vegetales (España)*, 14(3), 67-74.
- [23] Gholami, A., Sharafi, S., & Abbasdokht, H. (2010). Effect of magnetic field on seed germination of two wheat cultivars. *International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering*, 4(8), 675-677.
- [24] Fischer, G., Tausz, M., Köck, M., & Grill, D. (2004). Effects of weak 162\over3 Hz magnetic fields on growth parameters of young sunflower and wheat seedlings. *Bioelectromagnetics*, 25(8), 638-641. <https://doi.org/10.1002/bem.20058>
- [25] Aladjadjiyan, A., & Ylieva, T. (2003). Influence of stationary magnetic field on the early stages of the development of tobacco seeds (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Central European Agriculture*, 4(2), 131-138.
- [26] Pittman, U. J., & Ormrod, D. P. (1970). Physiological and chemical features of magnetically treated winter wheat seeds and resultant seedlings. *Canadian Journal of Plant Science*, 50(3), 211-217. <https://doi.org/10.4141/cjps70-044>
- [27] Kavi, P. S. (1977). The effect of magnetic treatment of soybean seed on its moisture absorbing capacity. *Science and Culture*, 43(9), 405-406.
- [28] Carbonell, M. V., Martínez, E., & Amaya, J. M. (2000). Stimulation of germination in rice (*Oryza sativa* L.) by a static magnetic field. *Electro-and Magnetobiology*, 19(1), 121-128. <https://doi.org/10.1081/JBC-100100303>
- [29] Martínez, E., Carbonell, M. V., & Amaya, J. M. (2000). A static magnetic field of 125 mT stimulates the initial growth stages of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Electro-and Magnetobiology*, 19(3), 271-277. <https://doi.org/10.1081/JBC-100102118>
- [30] Martínez, E., Carbonell, M. V., & Florez, M. (2002). Magnetic biostimulation of initial growth stages of wheat (*Triticum aestivum*, L.). *Electromagnetic Biology and Medicine*, 21(1), 43-53. <https://doi.org/10.1081/JBC-120003110>





## An ethnobotanical study on plants used in broom making in different geographical regions of Türkiye

Fatih SATIL<sup>1</sup>, Selami SELVİ<sup>\*2</sup>  
ORCID: 0000-0002-4938-1161; 0000-0002-9959-6945

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Balıkesir University, 10145 Balıkesir, Türkiye

<sup>2</sup> Department of Plant and Animal Production, Altınoluk Vocational School, Balıkesir University, 10870 Balıkesir, Türkiye

### Abstract

In this study; It is aimed to record the wild plants used by local people in making brooms from past to present in Turkey. The study was carried out in 15 provinces selected from different geographical regions of Turkey between the years 2019-2022 and face-to-face interviews were conducted with 120 informants. As a result of the study, it was determined that 69 plant taxa belonging to 32 families were used in broom production. Most of the plants used as brooms are from the Asteraceae family (8 taxa), followed by the Amaranthaceae (6 taxa) and Fabaceae (6 taxa) families. The plants most used by the local people as brooms; *Bassia scoparia* (burning bush), *Artemisia scoparia* (virgate wormwood), *Erica arborea* (tree heath), *Spartium junceum* (Spanish broom), *Hypericum empetrifolium* (Crowberry-leaved St. John's wort), *Phillyrea latifolia* (green olive), *Sorghum bicolor* (great millet), *Sorghum halepense* (Johnson grass) and *Osyris alba* (Osyris) was observed. It was observed that the local people mostly used the brooms made from plants to clean the courtyards and gardens of the houses (49 taxa), followed by the brooms used for cleaning the barns (3 taxa) and ovens (3 taxa). The above-ground (38 taxa) parts of the plants are mostly used in the construction of the broom; It was determined that this was followed by branches (19 taxa), whole plant (7 taxa), tassel (2 taxa) and shoot (2 taxa). Natural brooms, which are made from plants that have fallen in demand compared to the past, can partially continue to be used as a tool mostly used in courtyards, balconies and gardens in city life. However, it is also seen that natural brooms made from very different plant species are still used in rural neighborhoods.

**Keywords:** broom, handicrafts, ethnobotany, Türkiye

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

## Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde süpürge yapımında kullanılan bitkiler üzerine etnobotanik bir çalışma

### Özet

Bu çalışmada; Türkiye'de geçmişten günümüze değin yerel insanların süpürge yapımında kullandığı doğal bitkilerin kayıt altına alınması amaçlanmıştır. Çalışma 2019-2022 yılları arasında Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinden seçilen 15 ilde yürütülmüş ve 120 kaynak kişiyle yüz yüze görüşmeler yapılmıştır. Çalışma sonucunda, 32 familyaya ait 69 bitki taksonunun süpürge yapımında kullanıldığı tespit edilmiştir. Süpürge olarak kullanılan bitkilerin çoğunluğu Asteraceae familyasından (8 takson) olup bunu Amaranthaceae (6 takson) ve Fabaceae (6 takson) familyaları takip etmektedir. Yerel halkın süpürge olarak en çok kullandığı bitkiler; *Bassia scoparia* (Ateştopu), *Artemisia scoparia* (Karasüpürge), *Erica arborea* (Funda), *Spartium junceum* (Katırtırnağı), *Hypericum empetrifolium* (Çobanyaprığı), *Phillyrea latifolia* (Akçakesme), *Sorghum bicolor* (Süpürgearası), *Sorghum halepense* (Ekinsüpürgesi) ve *Osyris alba* (Morcak) olduğu gözlenmiştir. Yerel halkın bitkilerden yapılan süpürgeleri daha çok evlerin avlu ve bahçelerini temizlemek amacıyla kullandığı (49 takson), bunu ahır (3 takson) ve fırın (3 takson) temizliği için kullanılan süpürgelerin

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902663961552; Fax.: +902663961509; E-mail: sselvi@balikesir.edu.tr

takip ettiği görülmüştür. Süpürge yapımında bitkilerin daha çok toprak üstü (38 takson) kısımlarının kullanıldığı; bunu, dallar (19 takson), tüm bitki (7 takson), püskül (2 takson) ve filiz (2 takson) kısımlarının takip ettiği belirlenmiştir. Eskiye oranla talep azlığına düşen bitkilerden yapılan doğal süpürgeler şehir hayatında en çok avlu, balkon ve bahçelerde kullanılan bir araç olarak kullanımını kısmen sürdürebilmektedir. Bununla birlikte kırsal mahallelerde çok farklı bitki türlerinden yapılan doğal süpürgelerin halen kullanıldığı da görülmektedir.

**Anahtar kelimeler:** süpürge, el sanatları, etnobotanik, Türkiye

## 1. Giriş

Bitkilerin insanlar tarafından kültürel bağlamlarda kullanımını inceleyen bir bilim dalı olan etnobotanik kavramı, ilk defa Amerikalı botanikçi John W. Harshberger tarafından 1896’ da yayımlanan “The purposes of ethnobotany” başlıklı makalesiyle bilim dünyasına tanıtılmıştır. Harshberger’ in başlattığı bu etnobotanik akım, değişik ülkelerde yaşayan insanların bitkilerden hangi amaçlarla (gıda, şifa, yakacak, süs, nazarlık, oyuncak, el sanatları vb.) kullandığını ortaya koyan ve gelecek nesillere aktarılmasını sağlayan önemli bir alanı oluşturmuştur [1-3]. Türkiye’de de etnobotanik çalışmalar son 20 yılda önemli bir ivme kazanmıştır. Bu ivmenin kazanılmasında Anadolu'nun zengin bir flora sahne sahip olmasının yanında tarih boyunca birçok kültüre ev sahipliği yapmış olması da etkili olmuştur. Bitkilerin geleneksel olarak tıbbi ve gıda kullanımları dışında özellikle geçmişten günümüze el sanatlarındaki zengin bitki kullanım geleneği günümüze kadar ulaşmıştır [4-6].

Anadolu insanı asırlardır bitkileri geleneksel olarak; süpürge, nazarlık, süs ve mutfak aletleri yapımında yoğun bir şekilde kullanmaktadır. Bunlar içerisinde de halkın bulunduğu coğrafyaya göre değişen doğal bitkilerden yararlanılarak yapılmış süpürgeler önemli bir yer tutmaktadır. Zamanla bazı bölgelerde süpürge üretimi şeklinde ticari amaçla bitkilerin bazılarının kültüre alınmasına da dönüşmüştür [7-8].

Halk kültürünün önemli bir parçası olan süpürge; gelişen teknoloji karşısında temizlik aracı olarak önemini yitirmiş olmasına rağmen geleneksel bir sanat ürünü olarak değerini korumaktadır. Eskiye oranla talep azlığına düşen bitkilerden yapılan doğal süpürgeler şehir hayatında en çok balkon ve bahçelerde kullanılan bir araç olarak kullanımını kısmen sürdürebilmektedir. Bununla birlikte kırsal mahallelerde çok farklı bitki türlerinden yapılan doğal süpürgelerin halen kullanıldığı görülmektedir [8]. Şehir hayatında halkın balkon ve bahçelerinde kullandığı süpürgeler daha çok kültür formundaki süpürge otlarından üretilen ticari amaçla üretilen süpürgelerdir. Kırklareli, Edirne ve Trakya civarı geleneksel süpürgeciliğin geçmişten günümüze başlıca üretim merkezleridir [9]. Benzer şekilde Adapazarı’nda açılan süpürge atölyeleri Anadolu’dan gelen talebin neredeyse hepsini üstlenmiş durumdadır [8]. Kırsal mahallelerde kullanılan süpürgeler ise daha çok doğada yabani olarak yetişen türlerden yapılmaktadır. Yerleşim yerlerinin çevrelerinde yayılış gösteren ve süpürge yapımına uygun olan türler bu amaçla kullanılmaktadır. Ancak Dünya’da ve Türkiye’de bu tarz yabani bitki türlerinden yapılmış süpürgelerle ilgili etnobotanik çalışmalar oldukça azdır [10-12]. Bununla birlikte gerek genel etnobotanik çalışmalarda gerekse el sanatların ait etnobotanik çalışmalarda süpürge olarak kullanılan bitkilerden kısmen bahsedilmektedir [13-15].

Bu çalışmada Türkiye’nin farklı bölgelerinde geleneksel olarak süpürge yapımında kullanılan bitki türleri belirlenerek etnobotanik özellikleri verilmiştir.

## 2. Materyal ve yöntem

Türkiye yedi coğrafik bölgeye ayrılmaktadır (Şekil 1). Bu çalışmanın Türkiye’yi temsil etmesi açısından yedi coğrafik bölgeden en az bir il olmak üzere toplamda 15 farklı ilde yaklaşık 4 yıllık (2019-2022) bir etnobotanik araştırma gerçekleştirilmiştir. Tablo 1’ de coğrafik bölgelerde hangi illerin çalışıldığı gösterilmiştir. Ayrıca çalışmada etnobotanik ziyaretler yapılan coğrafik bölgeler ve iller harita üzerinde sunulmuştur (Şekil 1).

Tablo 1. Çalışılan coğrafik bölgeler ve iller

Coğrafi Bölgeler	Coğrafi Bölgede yer alan il/iller	Çalışılan il sayısı
Akdeniz Bölgesi	Mersin	1
Doğu Anadolu Bölgesi	Tunceli	1
Ege Bölgesi	Denizli, İzmir, Muğla	3
Güneydoğu Anadolu Bölgesi	Adıyaman, Siirt, Şanlıurfa	3
İç Anadolu Bölgesi	Aksaray, Konya	2
Karadeniz Bölgesi	Rize	1
Marmara Bölgesi	Balıkesir, Bilecik, Çanakkale, Edirne	4
<b>Toplam İl Sayısı</b>		<b>15</b>



Şekil 1. Etnobotanik çalışmaların gerçekleştirildiği coğrafik bölgeler ve iller (Yıldız ile gösterilmiştir)

2019-2022 yıllarını kapsayan çalışma süresince Tablo 1’ de gösterilen illerdeki bazı kırsal mahallelere etnobotanik ziyaretler gerçekleştirilmiş ve çoğunluğu bayan ve mesleği ev hanımı olan 120 kaynak kişi tespit edilmiştir. Tespit edilen bu kaynak kişilerin demografik özellikleri Tablo 2’ de sunulmuştur.

Tablo 2. Araştırma sahalarında görüşme yapılan kaynak kişilerin demografik özellikleri

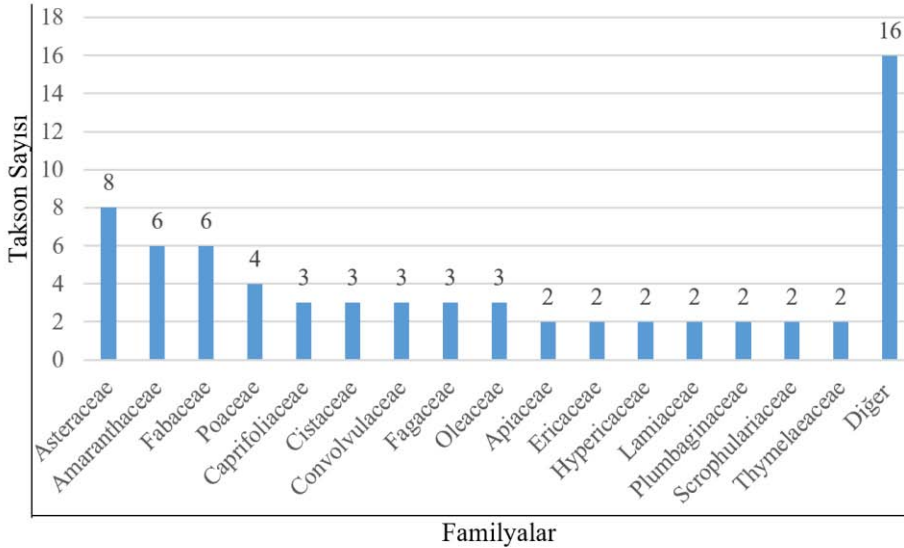
Demografik Özellikler	Kriter	Kaynak Kişi Sayısı	Yüzde (%)
Cinsiyet	Erkek	22	18
	Kadın	98	82
Yaş	< 40	8	6
	41 -50	35	29
	51-59	47	39
	>60	30	25
Eğitim Seviyesi	Okumamış	11	9
	İlkokul/İlköğretim	65	54
	Ortaokul	28	23
	Lise	14	12
	Üniversite	2	2
Meslek	Ev hanımı	85	70
	Çiftçi	21	18
	Emekli	14	12

Belirlenen kaynak kişilerle yapılandırılmış ve yarı yapılandırılmış görüşme yöntemi uygulanarak onlara hangi bitkilerden süpürgeler yaptıkları ve bu süpürgeleri hangi amaçlar için (bahçe, ahır, fırın vb.) kullandıkları gibi etnobotanik soru tipleri yöneltilmiştir.

Saha çalışmaları sonucunda, kaynak kişilerin süpürge olarak kullandıkları bitkiler kaynak kişilerle birlikte doğal ortamlarından toplanmış ve herbaryum örneği haline getirildikten sonra çeşitli floristik eserlerden faydalanılarak teşhisleri gerçekleştirilmiştir [16-18]. Taksonların Türkçe isimleri “Türkiye Florası”nın yaygın etkisini artırmak amacıyla hazırlanan Türkiye Bitkileri Listesine göre verilmiştir [19]. Teşhisi yapılan örneklerden bazıları etiketlenerek herbaryum materyali olarak Balıkesir Üniversitesi Altınoluk Meslek Yüksekokulu Botanik Laboratuvarı’nda korunmak üzere saklanmıştır.

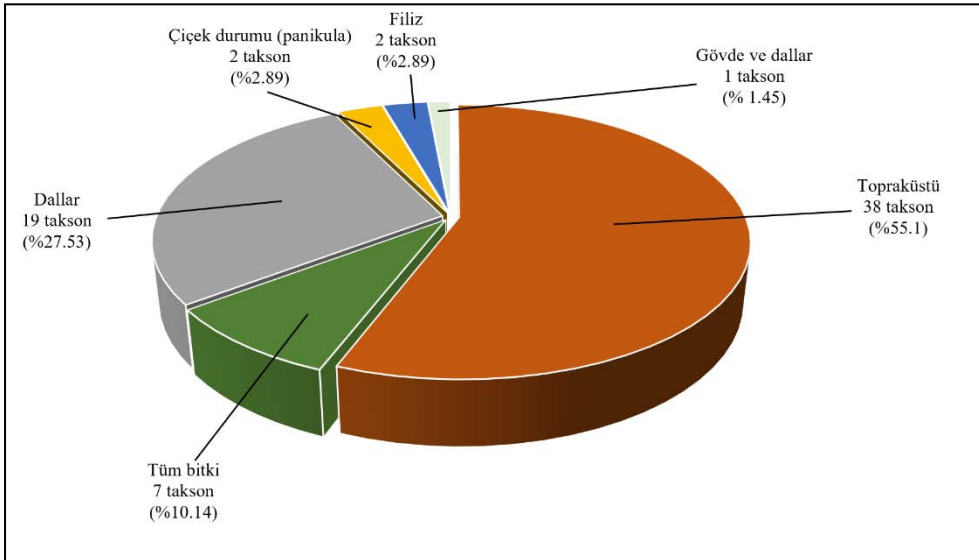
### 3. Bulgular

Çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinde doğal bitkilerden geleneksel olarak süpürge yapılan ya da süpürge yapımında kullanılan 32 familyaya ait 69 bitki taksonu tespit edilmiştir (Tablo 3). En fazla taksona sahip olan familyalar; Asteraceae (8 takson), Amaranthaceae (6 takson), Fabaceae (6 takson) ve Poaceae (4 takson) olduğu belirlenmiştir. Caprifoliaceae, Cistaceae, Convolvulaceae, Fagaceae ve Oleaceae familyalarında 3'er takson; Apiaceae, Ericaceae, Hypericaceae, Lamiaceae, Plumbaginaceae, Scrophulariaceae ve Thymelaeaceae familyalarında 2'şer takson yer almaktadır. Geri kalan 16 familyanın her biri ise 1'er taksona sahiptir (Şekil 2).



Şekil 2. En fazla taksona sahip olan familyalar

Çalışma süresince tespit edilen 69 taksondan süpürge yapılırken bitkinin çeşitli organlarının kullanıldığı tespit edilmiştir. Bitkinin kullanılan organlarına göre sınıflandırma yapıldığında; topraküstü (38 takson), dallar (19 takson), tüm bitki (7 takson), çiçek durumu /panikula (2 takson), filiz (2 takson) ve gövde ile dallar (1 takson) olarak çoktan aza doğru bir eğilim olduğu görülmektedir (Şekil 3)



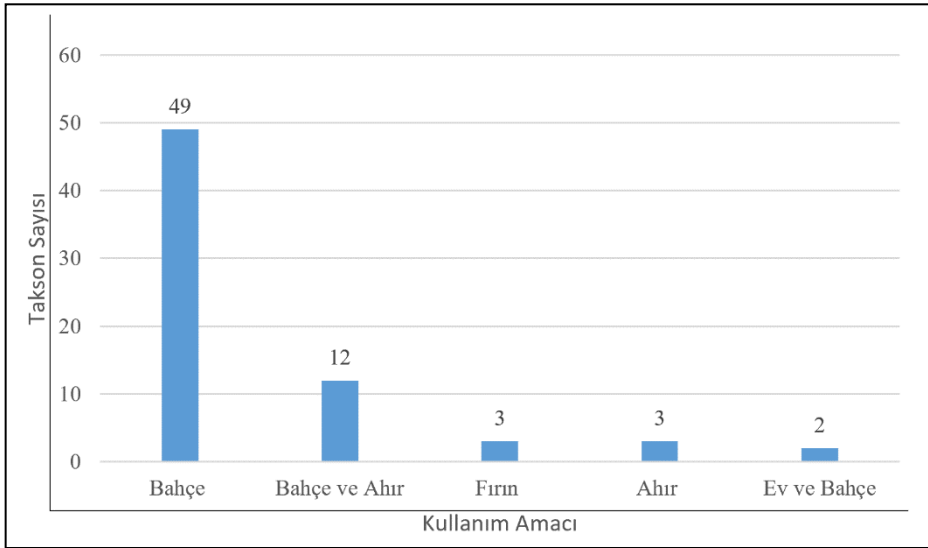
Şekil 3. Süpürge yapımında kullanılan bitkilerin kullandıkları organlarının dairesel gösterimi

Yapılan etnobotanik saha gözlemlerinde yerel halkın süpürge yapımında en çok tercih ettiği bitkiler; *Bassia scoparia* (Ateştopu), *Artemisia scoparia* (Karasüpürge), *Erica arborea* (Funda), *Spartium junceum* (Katırtırnağı), *Hypericum empetrifolium* subsp. *empetrifolium* (Çobanyaprağı), *Phillyrea latifolia* (Akçakesme), *Sorghum bicolor* (Süpürgearası), *Sorghum halepense* var. *halepense* (Ekinsüpürgesi), ve *Osyris alba* (Morcak) olduğu gözlenmiştir. Arazi çalışmaları süresince kaynak kişilerden temin edilen bazı süpürgeler Şekil 4' te gösterilmiştir.



Şekil 4. Araştırma sahasında süpürge olarak kullanımı yaygın gözlenen bazı bitkiler. A) *Osyris alba*, B-C) *Phillyrea latifolia*, D) *Hypericum empetrifolium* subsp. *empetrifolium*, E) *Spartium junceum*, F) *Artemisia campestris* G) *Bassia scoparia*

Kaynak kişilerle yapılan söyleşilerde; bitkilerden yapılan süpürgelerin daha çok evlerin avlu ve bahçelerini temizlemek amacıyla kullanıldığı (49 takson), onu ahır (3 takson) ve fırın (3 takson) temizliği için kullanılan süpürgelerin takip ettiği görülmüştür. Ayrıca 12 taksonun hem bahçe hem de ahır süpürgesi olarak aynı anda kullanıldığı; 2 taksonun da bahçe temizliği dışında ev temizliğinde kullanıldığı tespit edilmiştir. Şekil 5’ de süpürgelerin kullanım şekilleri grafik ile gösterilmiştir.



Şekil 5. Süpürgelerin farklı kullanım amaçları

Tablo 3. Süpürge yapımında kullanılan bitkiler

NO	Familya	Tür Adı	Türkçe Adı	Yerel Adı	Kullanılan Kısım	Kullanıldığı Yöre	Kullanım Şekli
1	Amaranthaceae	<i>Amaranthus albus</i> L.	Kömüşmancarı	Süpürge otu, Deli sirken	Topraküstü	Tunceli	Bahçe süpürgesi
2	Amaranthaceae	<i>Amaranthus retroflexus</i> L.	Tilkikuyruğu	Bostan bozan	Topraküstü	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
3	Amaranthaceae	<i>Amaranthus blitoides</i> S.Wats.	Mordanmancarı	Gihaye sıpırge, bostanbozan	Topraküstü	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
4	Amaranthaceae	<i>Bassia scoparia</i> (L.) A.J.Scott	Ateştopu	Süpürge otu, Uşub el, Saray süpürgesi	Tüm bitki	Şanlıurfa	Bahçe ve ahır süpürgesi
5	Amaranthaceae	<i>Chenopodium album</i> L.subsp. <i>album</i>	Aksirken	Sirkenotu	Topraküstü	Aksaray	Bahçe süpürgesi
6	Amaranthaceae	<i>Suaeda altissima</i> Pall.	Cirimotu	Süpürgelik	Topraküstü	Adıyaman	Bahçe süpürgesi
7	Apiaceae	<i>Pimpinella saxifraga</i> L.	Taşanasonu	Gezik	Topraküstü	Bingöl	Bahçe süpürgesi
8	Apiaceae	<i>Pimpinella tragioides</i> Vill. subsp. <i>lithophila</i> (Schischk.) Tutin	Tekeanasonu	Teke anasonu	Topraküstü	Bingöl	Bahçe süpürgesi
9	Asparagaceae	<i>Ruscus aculeatus</i> L.	Tavşanmemesi	Sidikkesen otu	Dallar	Balıkesir	Bahçe süpürgesi
10	Asteraceae	<i>Artemisia campestris</i> L. var. <i>campestris</i>	Karayavşan	Kızıl piren, süpürge otu	Topraküstü	Denizli	Bahçe süpürgesi
11	Asteraceae	<i>Artemisia scoparia</i> Waldst. & Kit.	Karasüpürge	Kızıl piren, süpürge otu	Topraküstü	Denizli	Bahçe süpürgesi
12	Asteraceae	<i>Centaurea pulchella</i> Ledeb.	Gümüşsüpürge	Süpürgelik	Topraküstü	Aksaray	Bahçe süpürgesi
13	Asteraceae	<i>Centaurea virgata</i> Lam.	Acısüpürge	Süpürge Otu, Böbrek otu, Acı ot	Tüm bitki	Adıyaman	Bahçe süpürgesi
14	Asteraceae	<i>Conyza canadensis</i> (L.) Cronquist	Selviotu	Süpürgeotu, Bostan süpürgesi	Topraküstü	Konya	Bahçe süpürgesi
15	Asteraceae	<i>Inula britannica</i> L.	Çayırاندızı	Sipurge	Topraküstü	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
16	Asteraceae	<i>Xeranthemum annuum</i> L.	Kâğıtçiçeği	Güvercin gözü, Dağ karanfili	Topraküstü	Konya	Bahçe süpürgesi
17	Asteraceae	<i>Crupina crupinastrum</i> (Moris) Vis.	Gelindöndüren	Gelindöndüren, Melkesasemavik	Topraküstü	Mardin	Bahçe süpürgesi
18	Brassicaceae	<i>Sinapis alba</i> L. subsp. <i>alba</i>	Mamanık	Ğardel	Tüm bitki	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
19	Buxaceae	<i>Buxus sempervirens</i> L. subsp. <i>sempervirens</i>	Şimşir	Şimşir	Tüm bitki	Rize	Bahçe ve ahır süpürgesi
20	Caprifoliaceae	<i>Knautia integrifolia</i> (L.) Bert. var. <i>integrifolia</i>	Götürotu	Kağıt süpürgesi Uyuz otu, yazı süpürgesi, Zivan, sipirgeye zer	Tüm bitki	Balıkesir	Bahçe süpürgesi
21	Caprifoliaceae	<i>Scabiosa argentea</i> L.	Yazısüpürgesi		Topraküstü	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
22	Caprifoliaceae	<i>Scabiosa calocephala</i> Boiss.	Çayırıyuzotu	Çayırıyuzotu, Melkesasemavik	Topraküstü	Mardin	Bahçe süpürgesi
23	Caryophyllaceae	<i>Eremogone gypsophiloides</i> (L.) Fenzl	Çövenkumotu	süpürgeotu	Topraküstü	Rize	Bahçe süpürgesi
24	Cistaceae	<i>Cistus creticus</i> L.	Laden	Pamukla	Dallar	Çanakkale	Bahçe süpürgesi
25	Cistaceae	<i>Cistus salviifolius</i> L.	Kartli	Laden	Dallar	Çanakkale, Balıkesir	Bahçe süpürgesi
26	Cistaceae	<i>Cistus laurifolius</i> L.	Karağan	Karağan	Dallar	Balıkesir	Bahçe süpürgesi
27	Convolvulaceae	<i>Convolvulus dorycnium</i> L. subsp. <i>oxysepalus</i> (Boiss.) Rech.f.	Bağlıkotu	Kızley	Tüm bitki	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
28	Convolvulaceae	<i>Convolvulus galaticus</i> Rost. ex Choisy	Bozsarmaşık	Yer sarmaşığı, Boz sarmaşık	Topraküstü	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
29	Convolvulaceae	<i>Convolvulus holosericeus</i> M.Bieb. subsp. <i>holosericeus</i>	Gündüzsefası	Süpürge otu, Tehli süpürgesi	Topraküstü	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
30	Ephedraceae	<i>Ephedra major</i> Host. subsp. <i>major</i>	Hum	Deniz üzümü	Dallar	Balıkesir	Bahçe süpürgesi

31	Ericaceae	<i>Erica arborea</i> L.	Funda	Piren, funda	Dallar	Balıkesir, Bilecik	Bahçe ve ahır süpürgesi
32	Ericaceae	<i>Erica manipuliflora</i> Salisb.	Püren	Piren, funda Süpürge otu	Gövde ve dal	Çanakkale, Mersin	Bahçe süpürgesi
33	Fabaceae	<i>Alhagi maurorum</i> Medik. subsp. <i>maurorum</i>	Aguldikeni	Aguldikeni, Hurnif, Çeti	Topraküstü	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
34	Fabaceae	<i>Anhyllis hermanniae</i> L.	Akıllıgeven	süpürgeotu	Topraküstü	Çanakkale	Bahçe ve ahır süpürgesi
35	Fabaceae	<i>Cytisus hirsutus</i> L.	Keçitürlü	Süpürge otu	Topraküstü	Balıkesir	Bahçe ve ahır süpürgesi
36	Fabaceae	<i>Cytisus austriacus</i> L.	Korukeçitürlü	Süpürgelek	Topraküstü	Balıkesir, Edirne	Bahçe süpürgesi
37	Fabaceae	<i>Cytisus scoparius</i> (L.) Link	Kuşçubuğu	Süpürgelek	Topraküstü	Çanakkale	Bahçe süpürgesi
38	Fabaceae	<i>Spartium junceum</i> L.	Katırtırnağı	Çalı süpürgesi, porut	Dallar	Çanakkale	Bahçe ve ahır süpürgesi
39	Fagaceae	<i>Castanea sativa</i> Mill.	Kestane	Kestane	Dallar	Çanakkale	Ahır süpürgesi
40	Fagaceae	<i>Quercus cerris</i> L.	Saçlımeşe	Kızıl meşe, Palamut meşesi	Dallar	Balıkesir	Fırın süpürgesi
41	Fagaceae	<i>Quercus coccifera</i> L.	Kermesmeşesi	Pelit, Pinar	Dallar	Balıkesir	Fırın süpürgesi
42	Hypericaceae	<i>Hypericum empetrifolium</i> Willd. subsp. <i>empetrifolium</i>	Çobanyaprağı	Püren	Topraküstü	Balıkesir	Bahçe süpürgesi
43	Hypericaceae	<i>Hypericum triquetrifolium</i> Turra	Pırpırotu	Kantaron	Tüm bitki	Balıkesir	Bahçe süpürgesi
44	Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	Biberiye	Biberiye	Topraküstü	Adıyaman	Bahçe süpürgesi
45	Lamiaceae	<i>Vitex agnus-castus</i> L.	Hayıt	Hayıt, Şirt	Dallar	Mardin	Bahçe ve ahır süpürgesi
46	Myrtaceae	<i>Myrtus communis</i> L. subsp. <i>communis</i>	Mersin	Murt	Dallar	Çanakkale	Bahçe süpürgesi
47	Oleaceae	<i>Jasminum fruticans</i> L.	Boruk	Sarı Çiçekli Yasemin	Topraküstü	Balıkesir	Ahır süpürgesi
48	Oleaceae	<i>Phillyrea latifolia</i> L.	Akçakesme	Pinar	Dallar	Çanakkale	Bahçe ve ahır süpürgesi
49	Oleaceae	<i>Olea europaea</i> L. subsp. <i>europaea</i>	Zeytin	Zeytin	Filizler	Balıkesir	Bahçe süpürgesi
50	Pinaceae	<i>Pinus brutia</i> Ten.	Kızılçam	Çam	Filizler	Çanakkale	Fırın süpürgesi
51	Plantaginaceae	<i>Anarrhinum orientale</i> Benth.	Süpürgeotu	Süpürgeotu	Topraküstü	Tunceli	Bahçe süpürgesi
52	Plumbaginaceae	<i>Limonium graecum</i> (Poir.) Rech.f. var. <i>graecum</i>	Kumkaranfili	Kunduzotu	Topraküstü	İzmir	Bahçe süpürgesi
53	Plumbaginaceae	<i>Limonium gmelinii</i> (Willd.) Kuntze	Çardaksüpürgesi	Çalı süpürgesi, çardak süpürgesi	Dallar	Denizli	Bahçe süpürgesi
54	Poaceae	<i>Arundo donax</i> L.	Kargı	Sazotu	Çiçek durumu (panikula)	Denizli	Bahçe ve ahır süpürgesi
55	Poaceae	<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Trin. ex Steud.	Kamış	Sazotu	Çiçek durumu (panikula)	Denizli	Bahçe süpürgesi
56	Poaceae	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	Süpürge darısı	Süpürge darısı	Topraküstü	İzmir, Edirne	Ev ve bahçe süpürgesi
57	Poaceae	<i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers. var. <i>halepense</i>	Ekinsüpürgesi	Ekinsüpürgesi, Karuş, Kaluş	Topraküstü	Mardin	Ev ve bahçe süpürgesi
58	Polygalaceae	<i>Polygala supina</i> Schreb. subsp. <i>supina</i>	Gihayesipirge	Gihaye sipirge	Topraküstü	Şanlıurfa	Bahçe süpürgesi
59	Polygonaceae	<i>Polygonum patulum</i> Bieb. subsp. <i>patulum</i>	Atmercimeleği	Süpürge	Topraküstü	Balıkesir, Edirne	Bahçe süpürgesi
60	Rosaceae	<i>Cotoneaster nummularius</i> Fisch. & C.A.Mey.	Dağmuşmulası	Dara Çuke, Çuk, Süpürge, kurt çalısı	Dallar	Bingöl	Bahçe ve ahır süpürgesi
61	Salicaceae	<i>Salix caprea</i> L.	Sorgun	Çırpi	Dallar	Bingöl	Ahır süpürgesi
62	Santalaceae	<i>Osyris alba</i> L.	Morcak	Sıyrığı	Topraküstü	Balıkesir, İzmir, Çanakkale	Bahçe süpürgesi

63	Scrophulariaceae	<i>Scrophularia canina</i> L. subsp. <i>bicolor</i> (Sm.) Greuter	İtsiracaotu	Sıraca Otu	Dallar	Adıyaman	Bahçe süpürgesi
64	Scrophulariaceae	<i>Verbascum sinuatum</i> L.	Bodanotu	Süpürge otu	Topraküstü	Denizli	Bahçe süpürgesi
65	Styracaceae	<i>Styrax officinalis</i> L.	Ayıfındığı	Tesbihlik	Dallar	Balıkesir	Bahçe süpürgesi
66	Tamaricaceae	<i>Tamarix smyrnensis</i> Bunge	İlgın	İlgın, Yılgın	Dallar	Balıkesir	Bahçe süpürgesi
67	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze var. <i>sinensis</i>	Çay	Çay	Topraküstü	Rize	Bahçe süpürgesi
68	Thymelaeaceae	<i>Daphne gnidioides</i> Jaub. & Spach	Sıyırıcık	Çoban süpürgesi	Topraküstü	Tunceli	Bahçe ve ahır süpürgesi
69	Thymelaeaceae	<i>Daphne oleoides</i> Schreb. subsp. <i>oleoides</i>	Gövçek	Çoban süpürgesi	Topraküstü	Tunceli	Bahçe ve ahır süpürgesi



#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Türkiye'nin farklı coğrafik bölgelerinde yer alan toplam 15 farklı ilde gerçekleştirilen bu çalışmada, 32 familyaya ait 69 bitki taksonunun süpürge yapımında kullanıldığı tespit edilmiştir. Süpürge olarak kullanılan bitkilerin çoğunluğunu Asteraceae familyası (8 takson; %12) oluşturmakta olup, onu Amaranthaceae (6 takson; % 8.7) ve Fabaceae (6 takson; % 8.7) familyaları takip etmektedir. Süpürge olarak kullanılan bitkiler ve yerel isimleri bölgeden bölgeye değişiklik gösterebilmektedir. Bununla birlikte en çok kullanılan yerel isimlerin; Süpürge otu, Süpürgelik ve Çalı süpürgesi olduğu gözlenmiştir (Tablo 3).

15 il üzerinde yürütülen etnobotanik araştırmalarda en fazla saha gezileri Marmara Bölgesinde yer alan Balıkesir ve Çanakkale illerinde gerçekleştirilmiştir. Bu illerde yapılan etnobotanik çalışmalarda yerel halkın süpürge bitkisi olarak; *Ruscus aculeatus*. (Sidikkese otu), *Knautia integrifolia* var. *integrifolia* (Kağıt süpürgesi), *Cistus laurifolius* (Karağan), *Ephedra major* subsp. *major* (Deniz üzümü), *Erica manipuliiflora* (Funda) *Cytisus hirsutus* (Süpürge otu), *Cytisus scoparius* (Süpürgelik), *Quercus cerris* (Kızıl meşe), *Quercus coccifera* (Pelit), *Hypericum empetrifolium* subsp. *empetrifolium* (Püren), *Hypericum triquetrifolium* (Kantaron), *Jasminum fruticans* (Sarı çiçekli Yasemin), *Olea europaea* subsp. *europaea* (Zeytin), *Phillyrea latifolia* (Pinar), *Osyris alba* (Sıyrgı), *Styrax officinalis* (Tesbihlik), *Tamarix smyrnensis* (Ilgın) taksonlarını kullandıkları tespit edilmiştir. Polat ve Satıl (2010)'ın Havran ve Burhaniye'de (Balıkesir) yapmış oldukları etnobotanik çalışmalarda 8 bitkinin süpürge yapımında kullandıklarını görülmüştür. Bu bitkilerin tümüne bizim çalışmamızda da rastlanmıştır [20]. Bulut'un (2008) yapmış olduğu etnobotanik çalışmada; Bayramiç (Çanakkale) yöresinde süpürge yapımında kullanılan 9 bitkiye yer verilmiştir (*Anthyllis hermanniae*, *Castanea sativa*, *Cistus creticus*, *C. salviifolius*, *Erica manipuliiflora*, *Myrtus communis* subsp. *communis*, *Phillyrea latifolia*, *Pinus brutia*, *Spartium junceum*). Bu bitkilerin tümü bizim çalışmamızda da tespit edilmiş olup bazı türlerin (*Pinus brutia*, *Castanea sativa*, *Myrtus communis* subsp. *communis*) geçmişte yapıldığı ve günümüzde artık eskisi gibi yapılmadığı kayıt edilmiştir [21].

Edirne ilinde 3 taksonun süpürge yapımında kullanıldığı tespit edilmiştir (*Cytisus austriacus* (Süpürgelik) *Polygonum patulum* subsp. *patulum* (Süpürge otu), *Sorghum halepense* var. *halepense* (Ekinsüpürgesi)). Bu taksonlardan Ekinsüpürgesi'nin diğer türlere nazaran daha yaygın kullanımı olduğu görülmüştür. Ege Bölgesinde yer alan İzmir ilinde süpürge yapımında kullanılan 8 takson tespit edilmiştir (*Artemisia campestris* var. *campestris* (Kızıl piren), *Artemisia scoparia* (Kızıl piren), *Limonium gmelinii* (Çalı süpürgesi), *Limonium graecum* var. *graecum* (Kunduzotu), *Arundo donax* (Sazotu), *Phragmites australis* (Sazotu), *Sorghum bicolor* (Süpürge darısı), *Verbascum sinuatum* L. (Süpürge otu)). Bu taksonlardan en çok kızıl piren ve süpürge darısının kullanımı tespit edilmiş olup diğer taksonların kullanımlarının nadir olduğu görülmüştür. Ertuğ ve ark. (2004)'nın Buldan (Denizli)'da yapmış olduğu etnobotanik çalışmalarında üç türün (*Artemisia campestris*, *Artemisia scoparia* ve *Bassia scoparia*) süpürge yapımı için bahçelerde yetiştirildiği ve *Arundo donax* ile *Phragmites australis* türlerinin çiçek durumlarının (panikula çiçek durumu) ocak süpürgesi yapımında kullanıldığı ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda bu üç türe bazı evlerin bahçelerinde rastlanmıştır [22].

Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yer alan Şanlıurfa ilinde çok çeşitli etnobotanik araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Aslan ve ark. (2020). Yaşlıca beldesi ve Arıkök mahallesi (Şanlıurfa)'nda *Amaranthus retroflexus*, *Centaurea virgata*, *Sinapis alba*, *Bassia scoparia* *Convolvulus dorycnium* subsp. *oxysepalus* taksonlarının; Fidan ve Akan (2019), Tek Tek Dağları Milli Parkı eteklerinde, *Bassia scoparia*, *Centaurea virgata*, *Scabiosa argentea* subsp. *argentea*, *Convolvulus galaticus*, *Convolvulus holosericeus* subsp. *holosericeus*, *Alhagi maurorum* subsp. *maurorum* taksonlarını yine; Akan ve ark. (2008) Arat Dağı ve çevresinde (Birecik, Şanlıurfa) *Convolvulus holosericeus* türünün süpürge yapımında kullanıldığını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda Şanlıurfa ilinde 11 bitki taksonunun süpürge yapımında kullanıldığı ve bu taksonların ilgili literatürlerle uyumlu olduğu görülmüştür [23-25].

Modern temizleme aygıtlarının ortaya çıkması ile temizlik aracı kullanım işlevi son derece daralan süpürgecilik henüz yok olmaya yüz tutmasa da yok olmak üzere olan el sanatlarımızdan birisidir. Gecekondu yerleşmelerinde varlığını devam ettirmeye çalışan bir temizlik aracı olarak hala talep edilmekte eskiye nazaran talep daralması yaşıyor olsa da hala talebi olan bir ürün olarak üretimini sürdürmektedir. Kullanım eşyası olarak yapımı halen devam eden süpürgelerin yanı sıra nişan ve düğün geleneklerinde bir süs eşyası folklorik bir malzeme hatta batıl itikatlar sebebiyle olması gereken süpürgelerin aynalı veya süslü süpürge diye de anılan çeşitleri farklı ebatlarda ve aksesuarlarla, Türkiye'nin dört bir yanında hala rağbet görmektedir. Bunun dışında özellikle kırsal yerleşim alanlarında yayılış gösteren bitkilerin toprak üstü kısımları süpürge olarak kullanılmaktadır. Bitkilerden yapılan süpürgeler çok ucuz olduğu için hala temizlik amaçlı olarak kırsal bölgelerde kullanılmaktadır.

#### Kaynaklar

- [1] Harshberger, J.W.(1896). The purposes of ethnobotany. *The Botanical Gazette*, 21, 146–154.
- [2] Polat, R., & Satıl, F. (2012). An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf (Balıkesir – Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 626–641. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.12.004>
- [3] Polat, R., Selvi, S., Çakılcıoğlu, U., & Açar, M. (2012). Investigations of ethnobotanical aspect of wild plants sold in Bingöl (Turkey) local markets. *Biological Diversity and Conservation*, 5(3), 155-161.

- [4] Sadıkoğlu, N., & Alpınar, K. (2004). An Evaluation of Turkish Ethnobotanical Studies (1928-1997). *İstanbul Eczacılık Fakültesi Mecmuası* 37, 61-66.
- [5] Selvi, S., Polat, R., Çakılcıoğlu, U., Celep, F., Dirmenci, T., & Ertuğ, Z.F. (2022). An ethnobotanical review on medicinal plants of the Lamiaceae family in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 46(4),283-332. <https://doi:10.55730/1300-008X.2712>
- [6] Ertuğ, F (2014). Etnobotanik. Güner A, Ekim T (eds), *Resimli Türkiye Florası* Vol I: 319-344, Ali Nihat Gökyiğit Vakfı, Flora Araştırmaları Derneği ve Türkiye İş Bankası Kültür Yayınları, İstanbul.
- [7] Satıl, F., Tümen G., Dirmenci, T., Çelik, A., Arı, Y., & Malyer, H. (2007). Kazdağı Milli Parkı ve çevresinde (Balıkesir) etnobotanik envanter çalışması 2004-2006. *TUBA Kültür Envanter Dergisi*, 5,171-203
- [8] Eroğlu, E., & Köktan, Y. (2013). Geleneksel Türk el sanatlarından süpürgecilik (Sakarya örneği). *Türk Dil, Edebiyat ve Halkbilimi Araştırmaları Dergisi*, 1 (1), 212-226.
- [9] Balkan, A., & Gençtan, T. (2008). Trakya Bölgesi'nde yetiştirilen süpürge darısı (*Sorghum bicolor* (L.) Moench var. *technicum* (Körn.)) genotiplerinin bazı agronomik özellikler yönünden değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 14 (2), 163-168.
- [10] Tardío J., Aceituno L., & Morales, R. (2006). The use of plant-based brooms in the province of Madrid (Spain). Proceedings of the IVth International Congress of Ethnobotany (ICEB 2005), 347-349.
- [11] Dogan, Y., Nedelcheva, A. M., & Yarci, C. (2008). Plant taxa used as brooms in several Southeast European and West Asian countries. *Natura Croatica*, 17(3), 193–206.
- [12] Senol, S.G, Seçmen, Ö., Eroğlu, V., & Şahin, B. (2013). Brooms of Turkey. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25, 76.
- [13] Polat, R., Satıl, F., & Selvi, S. (2013). Havran ve Burhaniye (Balıkesir) yörelerinde el sanatlarında yararlanılan bitkiler üzerine etnobotanik araştırmalar. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 29(1), 95-100.
- [14] Akan, H., & Bakır Sade, Y. (2015). Kahta (Adıyaman) merkezi ve narince köyünün etnobotanik açıdan araştırılması. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 4(2), 219-248.
- [15] Tel, A.Z., Furkan, M.K., & Satıl, F. (2021). Adıyaman İlinde el sanatlarında yararlanılan bitkiler üzerine etnobotanik bir araştırma. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 22 (1), 1-8.
- [16] Davis, P.H. (ed.). (1965-1985). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. vol. 1-9. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- [17] Davis,P.H., Mill,R.R. & Tan, K. (eds.). (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. vol. 10. Edinburgh: Edinburgh University Press
- [18] Güner, A, Özhatay, N, Ekim, T. & Başer KHC (eds.). (2000). *Flora of Turkey and the East Aegean Island*. (Suppl. 2), vol. 11, Edinburgh: Edinburgh University Press.
- [19] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., & Babaç, M. T. (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
- [20] Polat R., & Satıl, F. (2010). Havran ve Burhaniye'de (Balıkesir) etnobotanik araştırmaları. *TUBA Kültür Envanter Dergisi (TÜBA-KED)* 8, 65-100. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tubaked/issue/57432/814183>
- [21] Bulut, G. E., & Tuzlacı, E. (2015). An ethnobotanical study of medicinal plants in Bayramiç. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 19 (3), 268-282. <https://doi:10.12991/mpj.201519392830>
- [22] Ertuğ, F., Tümen, G., Çelik, A., & Dirmenci, T. (2003). Buldan (Denizli) etnobotanik alan araştırması. *TÜBA Kültür Envanteri Dergisi*, 187-218.
- [23] Aslan, S, Akan, H., & Pekmez, H. (2020). Yaslıca beldesi ve Arıkök mahallesi (Şanlıurfa)'nin etnobotanik açıdan araştırılması. *Biological Diversity and Conservation*, 13(1), 44-61.
- [24] Fidan, E.S., & Akan, H. (2019). Tek Tek Dağları Milli Parkı (Şanlıurfa-Türkiye) eteklerindeki bazı köylerde etnobotanik bir çalışma. *Bağbahçe Bilim Dergisi*, 6(2), 64-94.
- [25] Akan, H., Korkut, M.M., & Balos, M.M.(2008). Arat Dağı ve çevresinde (Birecik, Şanlıurfa) etnobotanik bir araştırma. *Fırat Üniversitesi Fen ve Müh. Bilimleri Dergisi*, 20 (1), 67-81.



## Investigation of proapoptotic and anticancer effects mediated by intracellular ceramide changing dependent on ARN14974=BOC treatment in human non-small cell lung cancer

Gökhan KUŞ<sup>1</sup>, Canan VEJSELOVA SEZER<sup>2</sup>, Ömer Koray YAYLACI<sup>3</sup>, Emre ÇÖMLEKÇİ<sup>4</sup>,  
Hatice Mehtap KUTLU<sup>2\*</sup>

ORCID: 0000-0002-2424-2720; 0000-0002-3792-5993; 0000-0002-1846-9646; 0000-0002-7597-0381; 0000-0002-8816-1487

<sup>1</sup>Anadolu University, Faculty of Open Education, Department of Health Sciences, 26470, Eskisehir, Türkiye

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

<sup>3</sup>Anadolu University, Plant, Pharmaceutical and Scientific Research Applications and Research Center, 26470, Eskisehir, Türkiye

<sup>4</sup>Anadolu University, Rectorate, 26470, Eskisehir, Türkiye

### Abstract

Sphingolipids are structural molecules of cellular membranes, that regulate biological processes such growth, proliferation, migration, metastasis by controlling signaling functions of cancer cells. Recent research in cancer therapy has sought to find mechanical details of tumor growth and roles of sphingolipids and their downstream targets in chemotherapy, radiotherapy and/or immunotherapy responses, by innovative molecular and pharmacological tools targeting sphingolipid signaling nodes in cancer cells.

Lung cancer is one of the most common cancers in our country and in the world. An important part of cancer-derived deaths is lung cancer-derived. New and effective treatment modalities for lung cancer are increasingly needed.

This research investigated the novel and effective treatment approach by inhibiting the formation of ceramidase-1-phosphate, which inhibits apoptosis, with synthesis of solid lipid nanoparticles of the ceramidase inhibitor-ARN14974=BOC, thereby increasing the intracellular level of cell and promoting cell viability and proliferation.

Results showed, cytotoxicity, antiproliferative effect, morphological and ultrastructural changes indicating apoptosis caused by ARN14974=BOC and its nanoparticle formulation on A549 cells. Apoptosis was induced by the agents via raising ROS, causing cell cycle arrest. The results underlined and proved that cell death is triggered more effectively by the nanoparticle formulation of ARN14974=BOC on human non-small cell lung cancer cells.

**Keywords:** lung cancer, cytotoxicity, ceramidase inhibition, apoptosis, cell culture.

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

### ARN14974=BOC tedavisine bağlı intrasellüler seramid değişimi aracılı proapoptotik ve antikanser etkilerinin insan küçük hücreli dışı akciğer kanserinde araştırılması

### Özet

Sfingolipidler hücre membran yapısında bulunan ve kanser hücresinde sinyalleşme işlevlerini kontrol ederek büyüme, proliferasyon, göç, metastaz gibi biyolojik fonksiyonları düzenlemekte olan moleküllerdir. Kanser tedavisinde son yıllardaki araştırmalar, kanser hücrelerindeki sfingolipid sinyalleşmesini hedef alan, yenilikçi moleküller ve farmakolojik araçlar kullanılarak tümör büyümesinin ve kemoterapi, radyoterapi ve/veya immünoterapiye yanıtta sfingolipidlerin ve alt hedeflerinin rolü hakkında mekanik ayrıntılar bulmayı amaçlamıştır.

\* Corresponding author / Hatice Mehtap KUTLU: Tel.: +902223350580/4721; Fax: 902223350580; E-mail: hmkutlu@eskisehir.edu.tr

Akciğer kanseri ülkemizde ve dünyada en sık görülen kanser türlerindedir. Kanser kaynaklı ölümlerin önemli bir kısmı akciğer kanserine bağlıdır. Akciğer kanseri için yeni ve etkili tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine her gün daha çok ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada, ARN14974=BOC seramidaz inhibitörünün katı lipit nanopartikül formunun sentezlenmesi ile seramidin hücre içi seviyesini artırarak hücrenin yaşamını ve proliferasyonunu sağlayan ve apoptozu inhibe eden seramidaz-1-fosfatın oluşumunu engelleyerek yeni ve etkili bir tedavi yaklaşımının küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücre hattı A549 hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma sonuçları ARN14974=BOC'un ve nanopartikül formunun A549 hücrelerinde sitotoksik ve antiproliferatif etkileri tespit edilmiş ve bu hücrelerde apoptozu gösteren morfolojik ve ince yapısal değişiklikler saptanmıştır. Bu moleküllerin A549 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin artması ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olarak apoptozu tetiklemiştir. Bu sonuçlar, insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde hücre ölümünün sentezlenen ARN14974=BOC'un nanopartikül formu tarafından daha etkin bir biçimde gerçekleştirildiğini göstermiştir.

**Anahtar kelimeler:** akciğer kanseri, sitotoksisite, seramidaz inhibisyonu, apoptoz, hücre kültürü

## 1. Giriş

Seramidler hücrelerin membranlarında bulunan büyüme, farklılaşma ve apoptoz gibi çok önemli metabolik süreçte görev almakta olan yapısal moleküllerdir. Seramid, tümör baskılayıcı lipit olarak işlev görmekte olup, çeşitli stres uyarımları varlığında hücre içi miktarı artarak apoptozise neden olmaktadır. Seramid üretimi ve sfingolipid metabolizması hataları, kanserli hücre sağ kalımı ve kanser tedavisinde önemli faktörlerdir. Bu hataları düzeltmek için seramid metabolizmasını hedeflemek, kanser tedavisinde direncin üstesinden gelmek için bir alternatif sunma potansiyeli taşımaktadır.

Seramidler ile yapılan çeşitli çalışmalar kanser araştırmalarına yeni boyutlar kazandırmaktadır. Son yıllarda sfingolipid metabolizmasında etkili olan ilaçların karsinojen ya da antikanser etkileri üzerine pek çok araştırma yapılmaktadır. Sfingozin kinaz-1 ve glukozilseramid sentaz seramid metabolizmasında rol alan kritik enzimlerdir. Seramidler apoptotik sfingozine seramidazlar ile dönüşmektedir ve bu sfingozinler; sfingozin kinaz-1'ler ile sfingozin-1-fosfata fosfatlanırlar. Sfingozin-1-fosfat, hücrenin yaşamını ve proliferasyonunu sağlar ayrıca apoptozu inhibe eder. Bu nedenle, sfingolipid metabolizmasında seramidaz aktivitesinin baskılanmasının kanser tedavisinde önemli bir rolünün olduğu vurgulanmıştır.

Akciğer kanseri, prostat kanserinden sonra en sık görülen kanser çeşitidir. Tüm kanser ölümlerinin yaklaşık üçte birini oluşturan akciğer kanserleri dünya çapında önde gelen kanser insidansının ve mortalitenin en sık nedenidir [1]. Her yıl yaklaşık 1 milyon kişi akciğer kanseri nedeniyle ölmektedir. Ortalama süresi 8 ay olmak ile birlikte 5 yıllık sağ kalım oranı % 15'tir [2]. Akciğer kanserinde kemoterapiyi destekleyen yeni tedavi yaklaşımları önem taşımaktadır. Hücre dışından gelen sinyallerin hücre içinde apoptotik mekanizmayı çalıştırmaya aracılık eden yollardan biri sfingolipid yolağıdır.

Sfingolipidler, kanser hücresi sinyal iletimindeki sinyal fonksiyonlarını kontrol etmekte, büyüme, proliferasyon, göç, istila ve/veya metastaz gibi çeşitli biyolojik olayları da düzenlemektedirler. Örneğin, sfingozin ve seramid üretimi, kemoterapi, radyasyon ve/veya oksidatif stres ile indüklenir ve bu sfingolipidler hücre ölümüne, yaşlanmasına ve/veya hücre döngüsü durdurulmasına aracılık ederler [3]. Sfingozin, sfingozin 1-fosfat ve seramid; hücre proliferasyonunu ve apoptozu kontrol etmeye katkıda bulunurlar. Seramid ve katabolit sfingozin sfingolipid metabolitleri olarak bilinir ve bunlar hücre proliferasyonunun negatif düzenleyicileri olarak görev yaparlar, apoptozu teşvik ederler. Öte yandan, bir sfingozin kinaz ile sfingozinin fosforilasyonu ile oluşan sfingozin 1-fosfat hücre büyümesinin uyarılmasında, apoptozu inhibe etmede rol oynamaktadır [4].

Çeşitli uyarımlar morfolojik değişikliklerden önce meydana gelen seramidin birikimi eşliğinde sfingomyelin hidrolizini indükleyebilmektedir ve seramidin apoptoz sinyalleşmesinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, seramidin pro-apoptotik fonksiyonu, apoptotik sinyal yolu boyunca çeşitli kontrol noktalarında düzenlenebilmektedir. Seramid, ayrıca apoptozun erken aşamalarında üretildiği gösterilen sfingozini üretmek üzere bir seramidaz ile metabolize edilebilir ve birçok hücre tipine ekzojen olarak eklendiğinde sfingozinin kendisi apoptozu indükleyebilmektedir. Sfingozin, Sfingozin-1-fosfat'ı (S-1P) oluşturmak üzere sfingozin kinaz ile fosforile edilebilir. S-1P, seramid aracılı apoptozu antagonize eden bir sinyal molekülüdür. Seramidaz, sfingozin kinaz ve S-1P fosfataz aktivitelerinin modülasyonu, seramid, sfingozin ve S-1P arasındaki intrasellüler oranı düzenleyerek apoptozun düzenlenmesinde önemli bir rol oynayabilmektedir [5, 6].

Seramid ve sfingozinin hücre çoğalmasını düzenleyen önemli rolünden dolayı kanser tedavisinde önemli hedefler haline gelmiştir [7]. Buna ilaveten, asid seramidaz sfingolipid metabolizmasını düzenleyen en önemli enzimlerden biri olduğundan, yeni kanser terapi araştırmalarının birçoğu bu enzime odaklanmıştır. Örneğin, murin L929 fibrosarkoma hücrelerinde asid seramidazın aşırı ekspresyonu, muhtemelen seramid düzeylerini azaltarak tümör nekroz faktörü alfa (TNF $\alpha$ ) tarafından indüklenen apoptotik hücre ölümünü bastırmıştır [8-10].

Seramidazlar, seramidin sfingozine ve yağ asitlerine indirgenmesini katalize eder. Seramid sadece sfingolipid biyosentezinin ve parçalanmanın merkezi olmakla kalmayıp, aynı zamanda sfingolipid sinyalizasyonunda önemli bir

molekül olup, farklılaşmayı veya apoptozu teşvik eder. Asit seramidaz inhibisyonu bazı kanser türlerini kemo ve radyoterapiye duyarlı hale getirmektedir. Son yirmi yılda seramidin yapısal ve stereokimyasal modifikasyonlarına dayalı bir seri seramidaz inhibitörü geliştirilmiştir. Seramidazın ilk seramidi taklit eden inhibitörü, N-Oleoyl-tololamid (NOE)'dir ve seramidin endojen hücrese seviyelerini arttırıp farklı hücre hatlarında apoptozu indükler [11].

Sfingolipid metabolizması sfingolipidler, metabolik enzimler ve / veya reseptörler dahil olmak üzere çoklu sinyalleme düğümleri, yeni antikanser müdahale stratejilerinin geliştirilmesi için yeni terapötik hedefleri temsil etmektedir. Hücrese strese yanıt olarak seramidin sentezi ve / veya birikimi, apoptoz, nekrotoz, otofaji ve ER stresinin indüklenmesi de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla kanser hücresi ölümüne aracılık ettiği bilinmektedir. Bu seramid aracılı hücre ölüm yolları hücre ve / veya doku türüne, seramidin subseleler lokalizasyonu ve / veya seramidin aşığı akış hedeflerinin mevcudiyetine göre farklı şekilde düzenlenmektedir [3].

Kanser tedavisinde kullanılan radyasyon ve kemoterapi sonucu ortaya çıkan apoptoz etkisine aracılık eden seramid, aynı zamanda kanser koruyucu etkileri ile bilinen ilaçların da (curcumin, resveratrol, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar gibi) etkisini düzenlemektedir. Bu ilaçların kanser hücrelerinde seramid düzeyini arttırarak hücrelerde apoptoza yol açtıkları belirtilmiştir [12].

ARN14974, asit seramidazı ( $IC_{50}=79$  nM) inhibe eden bir benzoksazolone karboksamididir. ARN14974, hücrelerde 24 saate kadar asit seramidaz aktivitesini inhibe etme özelliğinden dolayı kalıcı etki göstermektedir. Tamponlar ve plazmada son derece stabil olan ARN14974 farelerde intravenöz veya intraperitoneal uygulandığında son derece iyi farmakokinetik etki göstermektedir. Farelerde beyin, karaciğer, kalp, akciğerler ve böbrek gibi çoklu organlarda asit seramidaz aktivitesinde belirgin bir azalmaya neden olmaktadır [13]. Benzoksazolone-3-karboksamid yapısı üzerinde ayrıntılı olarak gerçekleştirilen bir çalışmada, 3-karboksamit N-H parçasının bir asit seramidaz aktivitesinin inhibisyonu için zorunlu bir yapısal özellik olduğunu ortaya çıkarmıştır [13].

Kanser hücrelerinde sfingolipid yolağını hedefleyerek kanser hücrelerinde ölümü indüklemek kanser tedavisinde yeni ve güncel bir yaklaşımdır [14, 15, 16]. Bu kapsamda literatürde çeşitli çalışmalar olmakla beraber kullanılan bileşiklerin katı lipid nanopartikül formlarının kullanılması daha önce hiçbir çalışmada yapılmamıştır.

Bu çalışma ile akciğer kanser hücrelerinde bir seramidaz inhibitörü olan ARN14974=BOC ile çalışılmıştır. Akciğer kanseri hücrelerinde, hücre içi seramid birikiminin arttırılması sağlanarak hücrelerde apoptoz indüksiyonu sağlanmıştır. Bu bileşiğin A549 akciğer kanser hücrelerindeki etkin dozu MTT, SRB ve ATP canlılık testleriyle bulunmuş ve akım sitometrisiyle hücre ölüm kinetikleri saptanmıştır. Bunun ardından hücrese morfolojideki etkileri belirlemek için konfokal mikroskop ile hücre çekirdeği ve iskeletindeki değişiklikler, geçirimli elektron mikroskopi ile de organel bazındaki ince yapısal değişiklikler belirlenmiştir. Böylelikle ilaç geliştirme çalışmalarının temel çalışmaları olan *in vitro* çalışmalar ile ilaç etkinlik potansiyeli değerlendirmesi gerçekleştirilmiştir.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. Materyal

Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI), Dimetil sülfoksit (DMSO), Fetal Bovine Serum (FBS), Tripsin-Etilendiaminotetraasetik asit (Tripsin/EDTA), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Penisilin-Streptomisin Solüsyonu (10000 U/mL penisilin, 10mg/mL streptomisin), Osmium tetraoksit, Glutaraldehit, Araldit, Propilen oksit, Uranil asetat, Kurşun sitrat (Electron Microscopy Science), 25 ve 75 cm<sup>2</sup>'lik flask, 96 ve 6 kuyucuklu plakalar, Cam pipetler (1, 2, 5 ve 10 mL hacimlerinde), Pastör pipetler, Enjektörler (10, 20 ve 50 mL hacimlerinde), Steril falkon tüpler (15 ve 50 mL), Steril tek kullanımlık filtreler (0,2 mikron çapında), Kryotüp, Yuvarlak lamel, Bakır grid deney aşamalarında kullanılmış olup tedarikçi firmalardan bu materyaller satın alınmıştır.

### 2.2. Yöntem

#### 2.2.1. Katı lipid nanopartiküllerin sentezi

ARN14974=BOC yüklü katı nano partikülleri (KLN) hazırlamak için sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. KLN hazırlanmasında % 3 lipit, % 5 ARN14974=BOC ve % 1 oranında Tween 80 kullanılmıştır. Öncelikle lipidin 80°C'de erimesi sağlanarak, madde ve sonrasında da Tween 80 eklenerek ultraturaks ile 20.500 rpm'de yaklaşık 1 dakika karıştırılarak madde yüklü KLN formülasyonu elde edilmiştir. Elde edilen süspansiyonlar soğutulurak 0.22 µm'lik filtrelerden geçirip kullanıma hazır hale getirilmiştir.

#### 2.2.2. Partikül boyutu ve zeta potansiyel ölçümü

ARN14974=BOC yüklü katı lipid nano partikülleri zeta potansiyel ve elektriksel iletkenlik ölçümleri Zetasizer Nano Series (Nano-ZS) (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak yapılmıştır. Bu işlem için hazırlanan katı lipid nanopartiküller NaCl ile iletkenliği 50µS'ye ayarlanıp distile suda seyreltilerek süspansiyon edilmiş ve cihazın kuvetine yerleştirilmiştir. Kuvetten yapılan ölçümler sırasında cihazın sıcaklığı 25°C, ışık saçılım açısı 90° olacak şekilde ayarlanmıştır.

### 2.2.3. A549 hücrelerinin çoğaltılması

Akciğer kanser hücreleri A549, sıvı azot tankından çıkarılarak, hücre içeriği eritildikten sonra %10 serum (Fetal Bovine Serum/FBS) içeren RPMI-1640 besi yeri eklenen falkon tüp içerisine alınıp, 1200 rpm' da 10 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası tüp içerisindeki süpernatant kısım döküldükten sonra, hücreler yeni besi yeri ortamında süspanse edilip kültür flaskalarına alınmıştır. Hücreler 37°C'de, %5 CO<sub>2</sub> ve uygun nem standartlarını içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. Bu şekilde çoğaltılan hücreler 8. pasajdan sonra deneylerde kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan hücrelerin flask tabanını %85 oranında kaplamış olmasına dikkat edilmiştir.

### 2.2.4. MTT sitotoksosite testi

A549 hücreleri 96 kuyulu hücre kültürü plakalarına, kuyu başına 5x10<sup>3</sup> hücre olacak şekilde ekilmiştir. Plakaya ekilen hücreler 37°C'de ve %5 karbon dioksitli etüvde inkübe edilmiştir. Kullanılan ARN14974=BOC ve nanopartikül formülasyonu 3.13-200 µM konsantrasyon aralığında seri dilüsyon yapılarak 24, 48, 72 saat hücreler ile inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklara 20 µL MTT boyası (5mg/mL) ilave edilerek, 37°C'de 2 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda plakada bulunan her kuyucuk içerisindeki sıvı kısım boşaltılarak 200 µL DMSO ilave edilip HTX-Synergy Bio-Tek, plaka okuyucusunda 570 nm dalga boyunda okuma gerçekleştirilmiştir. ARN14974=BOC ve katı lipid nano partikül formülasyonu ile muamele edilmeyen hücre grubu kontrol olarak kabul edilmiştir. Her doz için ayrı ayrı canlılık değerleri kontrol grubuna göre hesaplanmıştır. Uygulanan madde yüklü katı lipid nano partiküllerin A549 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> konsantrasyonu bu canlılık değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

### 2.2.5. Sulforhodamine B metodu (SRB)

A549 hücreleri, 2500-7500 arası değişen yoğunlukta, kuyucuk başına 100 µL olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin adaptasyonunu sağlamak üzere 24 saat boyunca inkübe edildikten sonra ARN14974=BOC bileşiği ve katı lipid nanopartikül formu belirlenen doz aralığında, 24, 48 ve 72 saat süreyle muamele edilmiştir. Hücreler %50 (w/v) soğuk TCA ile *in situ* fikse edilerek hücrelere kompleksler eklendiği andaki (Tz) hücre popülasyonunun ölçümü için %1 asetik asit içinde %0.4 (w/v) SRB ile boyanmıştır. Komplekslerin her birinin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılan hücreler ek olarak 24, 48 ve 72 saat süreyle inkübe edilmiştir. Muamele süresi sonunda hücrelere bağlanan SRB boyası tamponlanmamış 10 mM Tris kullanarak çıkarılmış ve optik yoğunluk (absorbans) 530 nm'de ELISA "microplate" okuyucusunda (HTX Biotek, USA) ölçülmüştür.

### 2.2.6. ATP canlılık metodu

Bu amaçla, A549 hücreleri 5x10<sup>3</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekildikten sonra, ARN14974=BOC ve katı lipid nanopartikül formunun tedavisi, belirlenen doz aralığında 24, 48 ve 72 saat süreyle uygulanmıştır. Tedavi uygulanmış hücrelerdeki ve kontrol hücrelerindeki ATP içeriği aşağıda gösterilen lusiferin-lusiferaz bioluminesans reaksiyonu yardımıyla ölçme zamanı 1 saniye olacak şekilde luminometre (Bio-Tek, USA) kullanılarak ölçülmüştür. Sonuçlar rölatif ışık ünitesi (Relative Light Unit, RLU) olarak alınmıştır. Böylece tedavi uygulanmış ve kontrol hücrelerinden elde edilecek RLU değerlerine göre örneklerin % canlılığı hesaplanmıştır. Canlılık hesabı aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

$$\text{Canlılık (\%)} = [100 \times (\text{Örnek RLU}) / (\text{Kontrol RLU})]$$

### 2.2.7. Konfokal mikroskopisi yöntemi

A549 hücrelerinin hazırlık aşamasında ilk olarak 3x10<sup>5</sup> hücre/kuyu yoğunluğunda 6 kuyucuklu plakalarda inkübe edilmiş ve ARN14974=BOC, ARN14974=BOC yüklü KLN formülasyonunun IC<sub>50</sub> konsantrasyonları ile 24 saat süresince inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon sonunda besi yeri uzaklaştırılarak, hücreler fosfat tamponu (PBS)'de yıkanmış glutaraldehitte fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrasında tekrar PBS ile yıkanan hücreler akrinin oranj ve falloidin boyaları ile ikili boyama uygulaması gerçekleştirilerek hücrelerde oluşan morfolojik değişiklikler konfokal mikroskopta (Leica TCS-SP5 II) Leica Confocal Software Version 2.00 yazılımı kullanılarak incelenip görüntülenmiştir.

### 2.2.8. Geçirimli elektron mikroskopisi yöntemi

Geçirimli elektron mikroskopunda (TEM) ince yapı değişikliklerini incelemek amacıyla 1x10<sup>6</sup>/mL yoğunluğundaki A549 hücreleri 12 ayrı flaska her grup için üçer tekrarlı olacak şekilde ekilerek, 24 saat süresince CO<sub>2</sub> etüv içerisinde inkübe edilmiştir. ARN14974=BOC, ARN14974=BOC yüklü KLN formunun IC<sub>50</sub> konsantrasyonları üçer flaska uygulanarak ve 24 saat etüv içerisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda flaskalarda glutaraldehit ile fikse edilen A549 hücreleri doku takibine alınarak gece boyu +4 °C'de glutaraldehit içinde fikse edilmiştir. Bu süre sonunda tampon ile yıkamaya tabi tutulan hücreler osmiyum tetraoksit içerisinde ikincil fiksasyon uygulamasına tabi tutulmuştur. Daha sonra hücreler etil alkol serisinde (%50, %70, %90, %96 ve absölu etil alkol) dehidrate edilmiştir. Dehidrasyonu gerçekleştirilen hücreler propilen oksit ile şeffaflaştırılarak resine alıştırıldıktan sonra resin ile bloklanarak, 60°C'de etüv içerisinde 48 saat boyunca polimerizasyonu yapılmıştır. Hazır hale getirilen bloklar traşlanıp, 80-100 nm'lik ince kesitleri alınmıştır. Hazırlanan ince kesitler bakır gridlere alınıp, kurşun sitrat ve uranil asetatta boyanarak geçirimli elektron mikroskopunda 120 KV'de (Biotwin FEI, USA) görüntüleme yapılmıştır.

### 2.2.9. Akış sitometrisinde annaksin V boyama tekniği ile apoptoz tayini

A549 hücreleri 6 kuyucuklu plakalara her kuyuda  $5 \times 10^5$  hücre olacak şekilde ekilerek 24 saat süresince,  $37^\circ\text{C}$ 'de, %5  $\text{CO}_2$  etüv içerisinde çoğaltılmıştır. 24 saatlik süre neticesinde A549 hücreleri ARN14974=BOC, ARN14974=BOC yüklü KLN formülasyonunun  $\text{IC}_{50}$  konsantrasyonları ile 24 saat süresince inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyon süresi sonucunda hücreler flasktan kaldırılıp, 2 defa PBS ile santrifüjlenip yıkanmıştır. Hücreler yıkandıktan sonra 1 mL içerisindeki sayısı hesaplanmıştır. Akış sitometri tüpüne  $100\mu\text{L}$  hücre örneği ve  $100\mu\text{L}$  annaksin eklenip oda sıcaklığında karanlık ortamda 15 dakika bekletilerek hücre analiz cihazında (Muse™ Cell Analyzer Merck, Millipore, Hayward, California, USA) analiz edilmiştir.

### 2.2.10. Oksidatif stres seviyelerinin belirlenmesi

A549 hücreleri kuyu başına  $1 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 6 kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Flask içerisinde  $\text{CO}_2$  etüvde inkübe edilen hücreler proje kapsamındaki maddeler ile tedavi edilmiş ve ardından PBS ile yıkanmıştır ( $\sim 10$  mL). Daha sonra 5 dakika süresince  $37^\circ\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. Her bir madde için  $1 \times 10^6$  sayıdaki hücreler iki farklı 15 mL'lik tüplere ayrılmıştır. Böylece, en az iki tüp hazırlanmıştır.  $670 \times \text{g}$ 'de hücreler 5 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar hücre pelletlerini bozmadan dikkatlice atılarak her tüp için 0.5 mL soğuk 1X yıkama tamponu ile hücreler yavaşça tekrar süspansiyon haline getirilmiştir.  $670 \times \text{g}$ 'de hücreleri 5 dakika santrifüjlenerek yine süpernatantları hücre pelletlerini bozmadan atılmıştır. Her tüpe 0.5 mL soğuk %100 metanol eklenerek yavaşça karıştırılmıştır. 5 dakika buz üzerinde inkübe ederek hücreleri sabitlemiştir.  $670 \times \text{g}$ 'de hücreler 5 dakika santrifüjlenerek ortamı ve /veya kimyasalları aspire edilmiş, ardından PBS ile yıkanmıştır ( $\sim 10$  mL). Süpernatantlar hücre pelletleri bozulmadan dikkatlice atılmıştır. Hücreler iki kez soğuk 1X yıkama tamponu (her biri 0.5 mL) ile yavaşça yıkanmıştır. Süpernatantlar hücre pelletleri bozulmadan dikkatlice atılmıştır. Her test örneğine  $100 \mu\text{L}$  DNPH solüsyonu eklenerek yavaşça karıştırılmıştır sonrasında 45 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Tüp başına  $100 \mu\text{L}$  taze seyreltilmiş FITC konjuge anti-DNP antikoru eklenmiştir. Hücreler ve antikor çözeltisi nazikçe pipetlenip arada hafifçe karıştırarak karanlıkta bir saat boyunca buz üzerinde inkübe edilmiştir. Hazırlanan örnekler Muse™ Cell Analyzer (Merck, Millipore, Hayward, California, USA) cihazında oksidatif stres ölçme programında analiz edilmiştir.

### 2.2.11. Kaspaz 3/7 aktivitesi

Hücreler kaspaz 3/7 çalışma solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Daha sonra kaspaz 7-ADD solüsyonu ile muamele edilip Muse™ Cell Analyzer (Merck, Millipore, Hayward, California, USA) cihazında okutulmuştur.

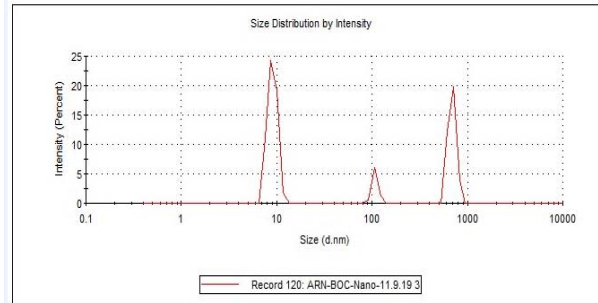
### 2.2.12. İstatistiksel analiz

Sitotoksite test sonuçları tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile test edilerek belirlenmiştir. Tüm testler  $\alpha$  0.05 anlamlılık düzeyinde sınanmıştır. İstatistiksel analizler GraphPad 6.0 bilgisayar paket programı ile değerlendirilmiştir.

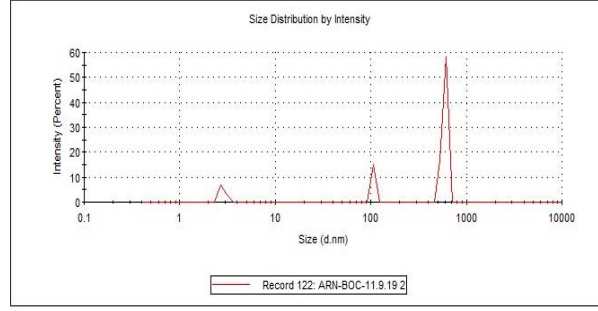
## 3. Bulgular

### 3.1. KLN sentez ve karakterizasyon bulguları

Projede sentezlenmiş olan ARN14974=BOC yüklü katı lipid nano-partiküllerinin (KLN) sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir ve ARN14974=BOC KLN formu oluşturulmuştur. Sentez aşamasında projede belirtildiği üzere sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen KLN formunun partikül boyutu, polidispers indeks özellikleri ölçülerek karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen ölçüm sonuçları Figür 3.1 ve Figür 3.2'de verilmiştir.



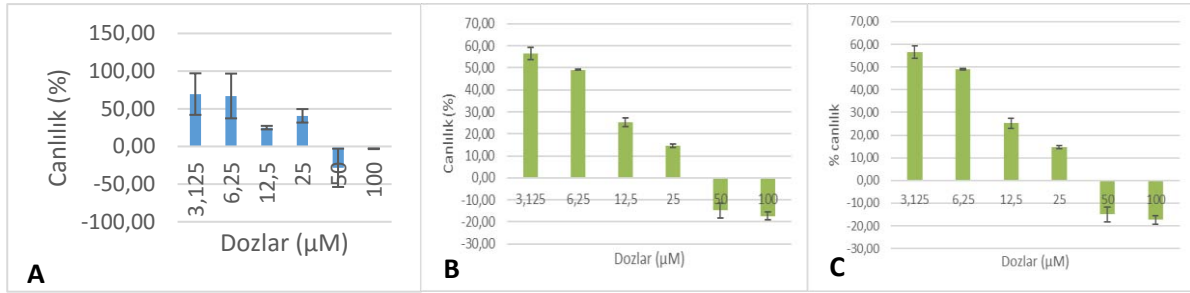
Figür 3.1. ARN14974=BOC KLN formu partikül boyutu, ve polidispers indeks ölçümleri. Yapılan ölçümler ile, ARN14974=BOC nanoformülasyonunun partikül boyutu 310.7 nm ve polidispers indeksi 0.562 olarak tespit edilmiştir



Figür 3.2. ARN14974=BOC partikül boyutu, ve polidispers indeks ölçümleri. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda, ARN14974=BOC partikül boyutu 1483 nm olarak belirlenirken polidispers indeksi ise 0.925 olarak tespit edilmiştir

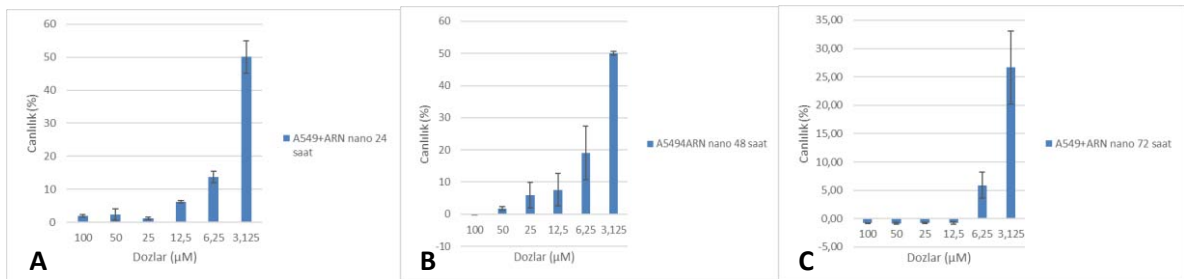
Sentez edilen nanopartiküllerin boyutunun ARN14974=BOC molekülünün partikülleri ile karşılaştırıldığında yaklaşık 4.7 kat bir küçülme gösterdikleri tespit edilmiştir. Karakterizasyon sonucunda ise nanopartikül boyutunun ve polidispers indeksinin uygun ve nanopartikül sentezinin gerçekleştirilmiş olduğunu gösterdiği saptanmıştır.

### 3.2. MTT bulguları



Figür 3.3. ARN14974=BOC 24 (A), 48 (B) ve (C) 72 saat uygulanmış A549 hücreleri MTT test sonuçları.

Gerçekleştirilen MTT testi sonucunda ARN14974=BOC maddesinin A549 hücreleri üzerinde düşük dozlarda sitotoksisiteyi 24 saatlik uygulama sonucunda gösterdiği ve etkili bir sitotoksik ajan olabileceği tespit edilmiştir. Deney sonucunda 24 saat sürede tespit edilen  $IC_{50}$  değeri 35.1  $\mu M$  olarak saptanmıştır. 48 saat uygulandığında bu maddenin A549 hücreleri üzerinde 46  $\mu M$ , 72 saat uygulandığında ise 43  $\mu M$  dozunda  $IC_{50}$  değeri verdiği bulunmuştur.



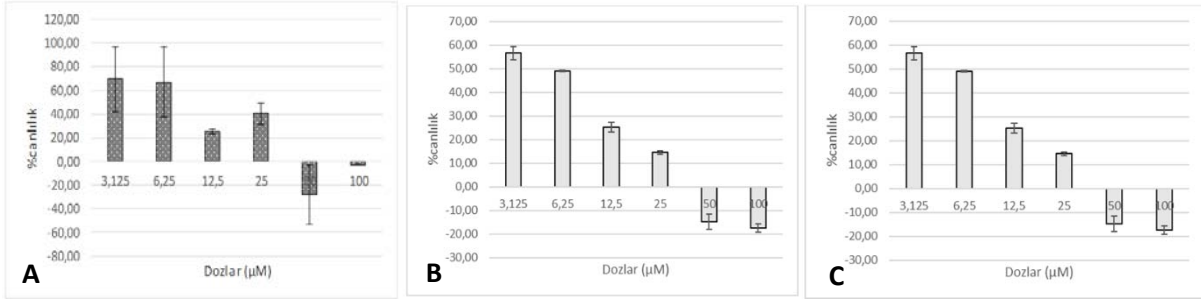
Figür 3.4. ARN14974=BOC nanopartikül formunun 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin MTT sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafikleri

Proje kapsamında sentezlenip karakterize edilmiş olan ARN nanopartikül formülasyonu ile A549 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen MTT testi sonucunda nu nanopartiküllerin A549 hücreleri üzerinde oldukça çok düşük dozlarda sitotoksisiteyi gösterdiği ve etkili bir ARN14974=BOC ile karşılaştırıldığında daha etkili bir sitotoksik ajan olabileceği sonucu çıkarılabilmektedir. Deney sonucunda 24 saat sürede tespit edilen  $IC_{50}$  değeri 3.13  $\mu M$  iken, 48 saat sonunda bu nanopartiküllerin yine yaklaşık aynı konsantrasyonda A549 hücreleri üzerinde (3.125  $\mu M$ )  $IC_{50}$  değeri vermiş olduğu bulunmuştur. 72 saat süre ile nanopartikül uygulandığında ise elde edilen canlılık değerleri kör kuyu absorbanslarından daha düşük seviyeye düştüğünden canlılıklar çok düşük eksi (-) değerlerde tespit edilmiş olup  $IC_{50}$  değeri



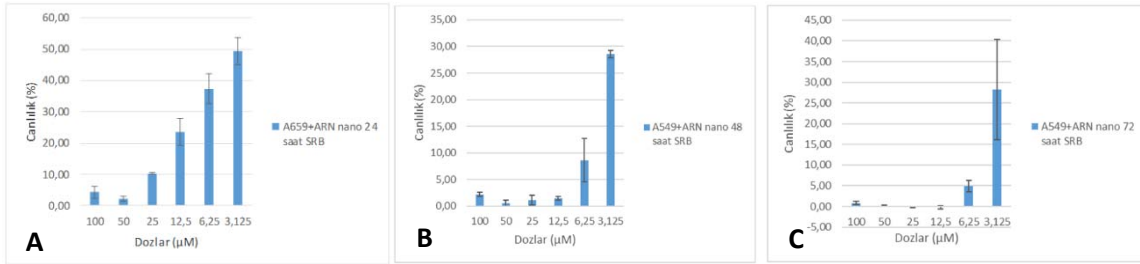
belirlenememiştir. Buradan nanopartikül formunun doza ve zamana bağlı olarak A549 hücrelerinde sitotoksisteye yol açmış olduğu saptanmıştır.

### 3.3. SRB test bulguları



Figür 3.5. ARN14974=BOC 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin SRB sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafikleri

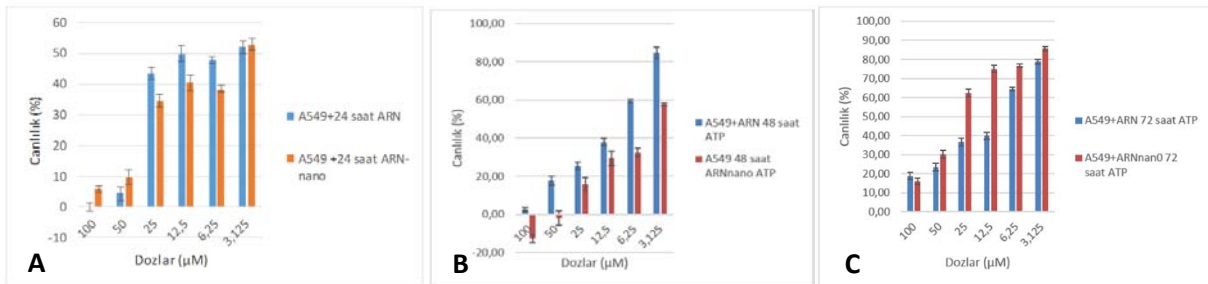
A549 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süre ile farklı dozlarda ARN14974=BOC uygulaması ile gerçekleştirilen SRB test sonuçlarında tespit edilen IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 34.2 µM, 47.8 µM ve 43.1 µM'dır. Bu sonuçlar MTT test sonuçlarıyla uyumluluk göstermekle birlikte ARN14974=BOC'un en düşük dozda IC<sub>50</sub> değeri verdiği uygulama süresinin 24 saat olduğunu ifade etmektedir. Bu durum MTT sonucu elde edilen ARN14974=BOC'un A549 akciğer kanseri hücreleri üzerinde sitotoksik ajan olma potansiyelini SRB testi sonuçları da vurgulamaktadır.



Figür 3.6. ARN14974=BOC nanopartikül formunun 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin SRB sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafikleri

A549 hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süre ile uygulanan ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonunun uygulaması ile gerçekleştirilen SRB testi sonuçlarından elde edilen absorbans değerlerinde IC<sub>50</sub> değeri sadece 14 saat için 2.95 µM olarak tespit edilmiştir. Diğer uygulama süreleri sonunda canlılık değerleri absorbans olarak eksi (-) değerlere düşmüş olduğundan canlılık değerleri eksi olarak bulunup grafikte gösterilmiştir. Bu nedenle IC<sub>50</sub> değerleri 48 ve 72 saatlik uygulama süreleri için hesaplanamamıştır. Bu durum ARN nanopartikül formunun A549 hücreleri üzerinde ki ileri derecede sitotoksik olduğunu ifade etmekle birlikte doza bağlı hücre ölümüne neden olduğunu göstermektedir.

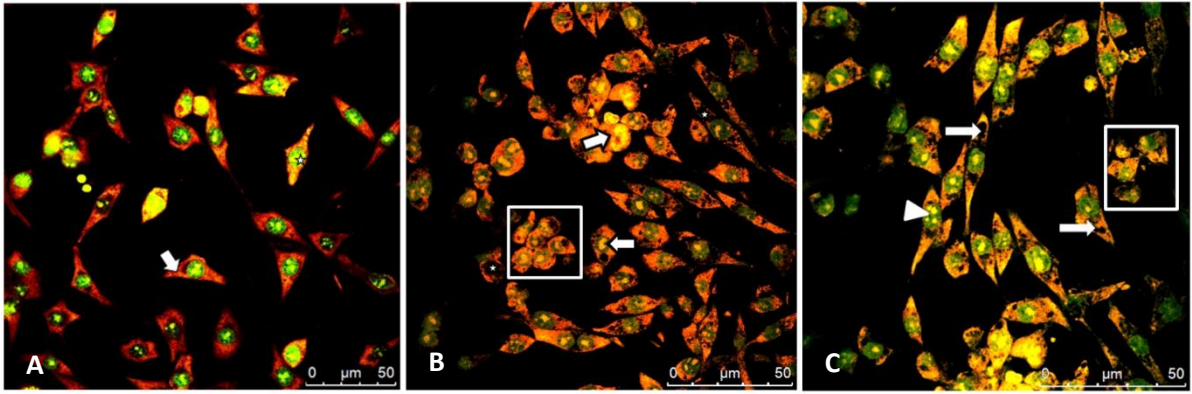
### 3.4. ATP test bulguları



Figür 3.7. ARN14974=BOC 24 (A), 48 (B) ve 72 (C) saat süre ile uygulandığı A549 hücrelerinin ATP testi sonucunda elde edilen canlılık inhibisyon grafikleri

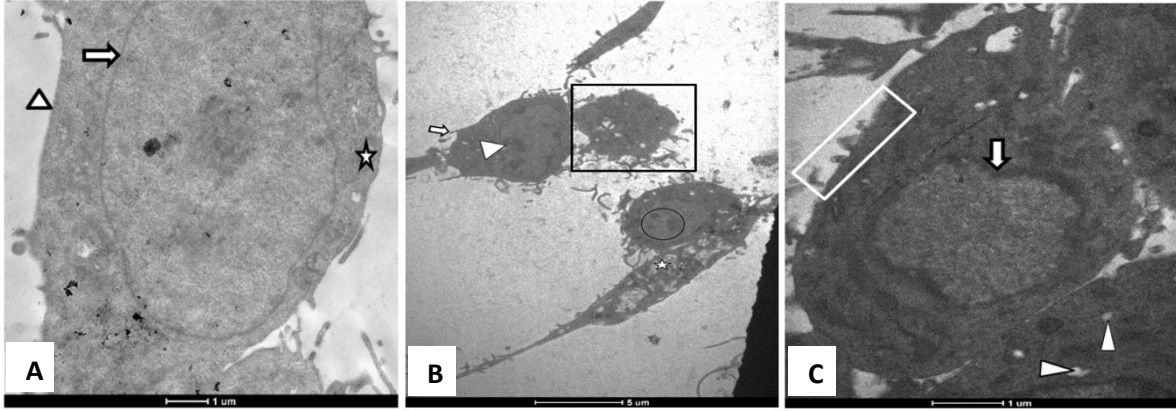
A549 akciğer kanseri hücrelerine 24, 48 ve 72 saat süre ile ARN ve nanopartikül formülasyonunun farklı dozları uygulanmış ve bunun sonucunda ATP testi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen canlılık değerlerinden hesaplanan  $IC_{50}$  konsantrasyonları ARN için 24, 48 ve 72 saat uygulama süresince sırasıyla 12.5  $\mu$ M, 9.01  $\mu$ M ve 9.94  $\mu$ M olarak tespit edilirken bu değerler ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu için sırasıyla 3.77  $\mu$ M, 4.10  $\mu$ M ve 34.72  $\mu$ M olarak bulunmuştur. Bu değerler ARN'nin A549 hücreleri üzerine her uygulama süresinde sitotoksik etki gösterdiğini ifade etmektedir. Bunun yanı sıra A549 hücrelerine uygulanan nanopartikül formunun ARN'ye göre hücreleri daha düşük konsantrasyonlarda öldürebildiği ve yüksek sitotoksik kapasiteye sahip olduğu sonuçlardan görülmüştür. Ayrıca ARN nanopartikül formunun hücreleri doza bağlı olarak A549 akciğer kanseri hücrelerini öldürdüğü sonucu elde edilmiştir.

### 3.5. Konfokal mikroskopi bulguları



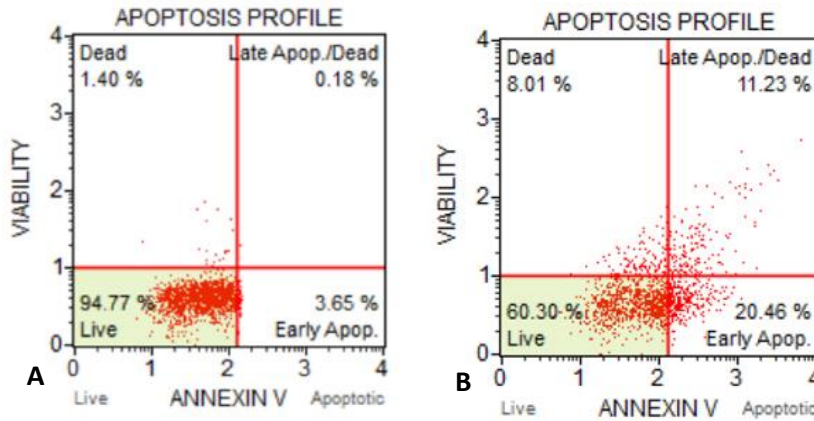
Figür 3.8. Kontrol (A), ARN14974=BOC (B) ve ARN14974=BOC nanopartiküllerinin (C) uygulamasından sonra A549 hücrelerinin konfokal mikroskopik görüntüsü. (A); Yıldız: Hücre çekirdeği, Ok: Hücre iskeleti. (B); Yıldız: Hücre iskeletinde delik, Ok: Kromatin yoğunlaşması, Kare: büzüşmüş ve yuvarlaklaşmış hücreler. (C); Ok: Hücre iskeletinde parçalanma, Ok başı: Kromatin kondenzasyonu ve çekirdek parçalanması, Kare: Parçalanmış ve yuvarlaklaşmış hücreler

A549 kontrol hücrelerine gerçekleştirilen ikili boyama sonucunda elde edilen konfokal mikroskopik görüntülerde hücre morfolojisinin değişmemiş olduğu, çekirdeğin, hücre membranının ve iskeletinin bütün olarak durduğu saptanmıştır. A549 kontrol hücrelerine ait konfokal mikroskop görüntüsü Figür 3.8.A'da yer almaktadır. ARN14974=BOC uygulanan A549 hücrelerinin konfokal mikroskop görüntülerinde hücre iskeletinde deliklerin olduğu, kromatin yoğunlaşmasının ve çekirdek parçalanmasının meydana geldiği görülmektedir (Figür 3.8. B). Ayrıca hücre bütünüünün büzüştüğü ve yuvarlaklaşmaların meydana geldiği saptanmış ve bu değişikliklerin apoptotik hücre ölümüne işaret edebileceği düşünülmüştür. ARN14974=BOC'un proje kapsamında sentezlenen nanopartikül formülasyonunun uygulandığı A549 hücrelerinde konfokal mikroskopta hücre iskeletinde büyük deliklerin olduğu, ileri derecede kromatin yoğunlaşması ve çekirdek parçalanmasının gerçekleştiği saptanmıştır (Figür 3.8. C). Buna ilaveten hücre yapısının meydana gelen büzüşmeden dolayı yuvarlaklaştığı tespit edilmiştir. Bu morfolojik değişikliklerin ARN uygulanan A549 hücrelerinde meydana gelen değişikliklerden daha yoğun ve belirgin olarak meydana gelmiş olması sentezlenen nanopartikül formülasyonunun A549 hücre morfolojisi üzerinde etkin sitotoksik aktivite gösterdiğinin belirtisi olarak yorumlanmıştır.

3.6. *İnce yapısal değişiklik bulguları*

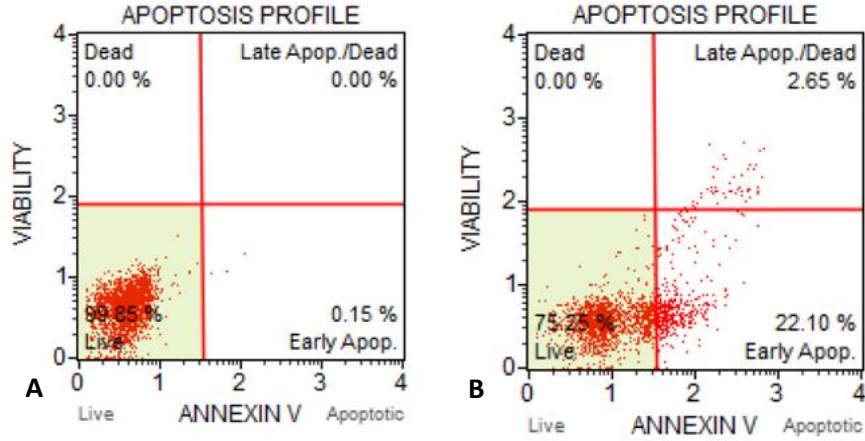
Figür 3.9. Kontrol (A), ARN14974=BOC uygulanmış (B) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonunun uygulandığı (C) A549 hücrelerinin TEM görüntüsü. (A); Yıldız: Mitokondri, Ok başı: Hücre membranı, Ok: Çekirdek membranı. (B); Yuvarlak: Kromatin kondenzasyonu, Kare: Hücre büzüşmesi ve mitokondri kaybı, Yıldız: Krista kaybı, Ok başı: çekirdek parçalanması ve kromatin kondenzasyonu, Ok: Membran tomurcuklanması.(C); Diktörtgen: Membran tomurcuklanması, Ok: Kromatin yoğunlaşması ve çekirdek boğumlanması, Ok başı: Mitokondri bozulmaları ve krista kaybı

ARN14974=BOC uygulanan A549 hücrelerinin ince yapısında mitokondri kristalarında ve zarlı organellerde kayıplar olduğu tespit edilmiştir. Hücre çekirdeğinin kromatin yoğunlaşması sonucunda at nalına benzer bükülme gösterdiği bulunmuştur. Hücre şeklinin yuvarlaklaşması ve membran tomurcuklanmalarının gerçekleştiği TEM görüntülerinde net olarak görülmektedir (Figür 3.9). ARN14974=BOC'un nanopartikül formülasyonunun 24 saat uygulandığı A549 hücrelerinde yoğun krista kaybı, ileri seviyede kromatin yoğunlaşması ve çekirdek boğumlanması meydana geldiği tespit edilmiştir (Figür 3.9). Bu ince yapısal değişiklikler de kontrol grubuna göre bakıldığında (Figür 3.9) ARN14974=BOC'un ve daha yoğun olarak da nanopartikül formülasyonunun A549 hücrelerinin ince yapısı üzerinde sitotoksitesine işaret etmektedir ve konfokal mikroskop bulgularıyla uyumluluk göstererek apoptotik belirteçler olarak değerlendirilebilecek sonuçlar teşkil etmektedirler.

3.7. *Aneksin V analizi bulguları*

Figür 3.10 Kontrol (A) ve ARN14974=BOC uygulanan (B) A549 hücrelerinin apoptotik profili

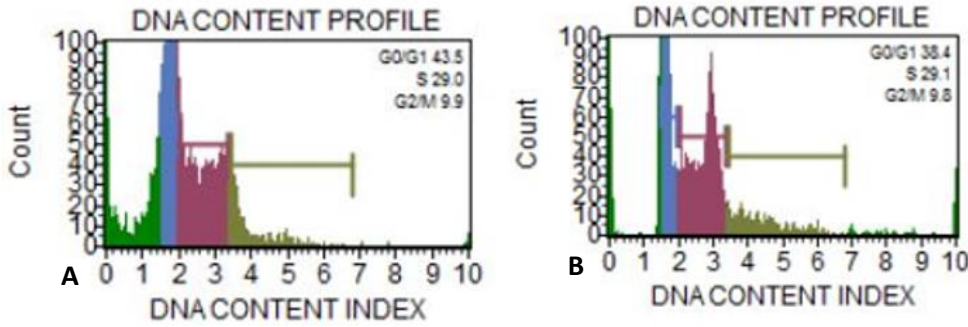
ARN14974=BOC'un 24 saat uygulandığı A549 hücrelerinin apoptotik profilindeki apoptotik hücre yüzdesinin 31.69'a çıktığı canlı hücre yüzdesinin ise 60.30'a düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum ARN14974=BOC maddesinin A549 akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediğini göstermektedir.



Figür 3.11. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulanan (B) A549 hücrelerinin apoptotik profili

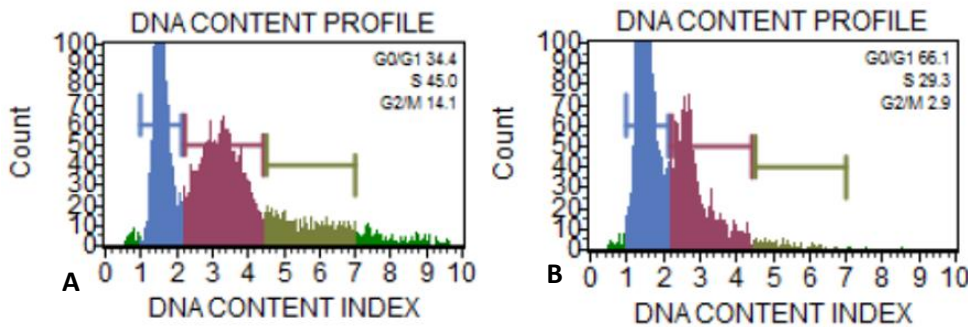
ARN14974=BOC'un nanopartikül formülasyonunun 24 saat uygulandığı A549 hücrelerinin apoptotik profilindeki hücrelerin % 75.25'inin canlı olup apoptotik hücre yüzdesinin 24.75 olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular ARN14974=BOC maddesinden sentezlenmiş olan nanopartikül formülasyonunun A549 akciğer kanseri hücrelerinde apoptozu tetiklediğini açıkça ifade etmiştir.

### 3.8. Hücre döngüsü analiz bulguları



Figür 3.12. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC uygulanan (B) A549 hücrelerinde hücre döngüsü analizi

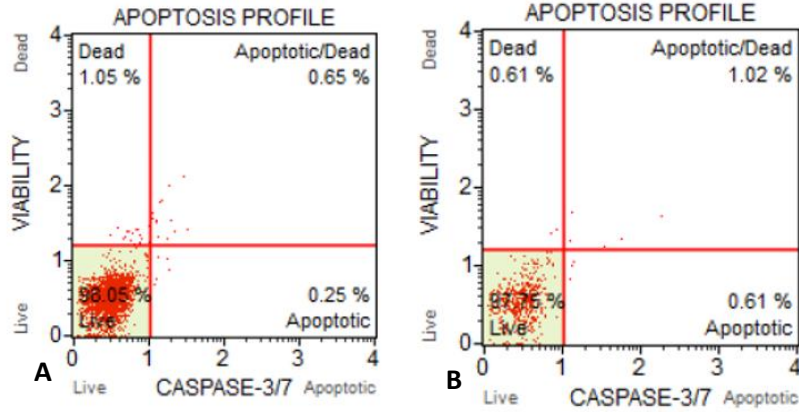
Yapılan hücre döngüsü analiz sonuçları Figür 3.12 ve Figür 3.13'de yer almaktadır. Deney sonuçlarından anlaşılacağı üzere ARN14974=BOC uygulanan A549 hücrelerinde 24 saatlik inkübasyon sonucunda G0/G1 evresinde bulunan hücrelerin yüzdesi (38.4) kontrol grubuna göre (%43.5) hafif olarak azalmıştır.



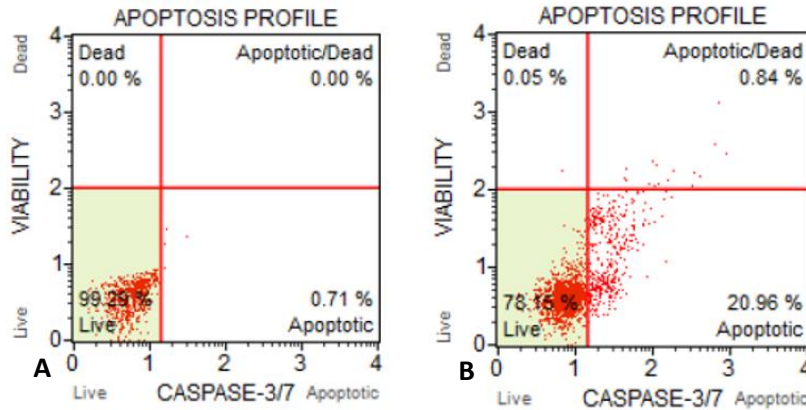
Figür 3.13. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulanan (B) A549 hücrelerinde hücre döngüsü analizi

Nanopartikül uygulanan A549 hücrelerinde S ve G2/M evrelerindeki populasyon kontrol grubuna kıyasla azalmıştır.

### 3.9. Kaspaz 3/7 analiz bulguları



Figür 3.14. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC uygulanan (B) A549 hücrelerinin kaspaz 3/7 analizi bulguları

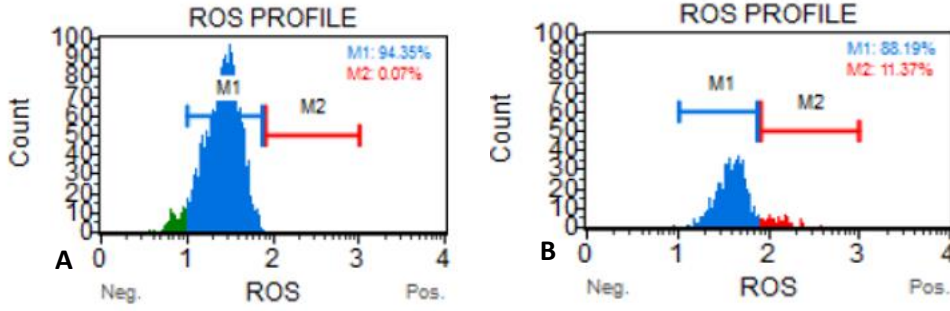


Figür 3.15. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulanan (B) A549 hücrelerinin kaspaz 3/7 analizi bulguları

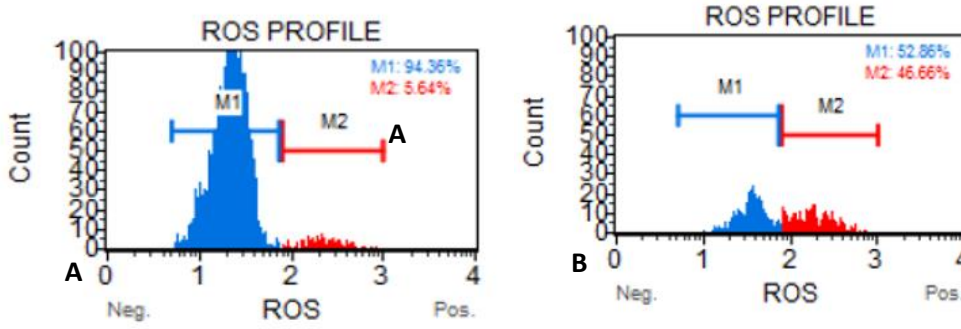
Deney sonuçlarından görülebildiği üzere ARN14974=BOC maddesi A549 hücreleri üzerinde kaspaz 3/7 aktivasyonuna neden olmamıştır. Bu grupta elde edilen total apoptotik hücreler %1.63 (Figür 3.15), kontrol grubunda ise (Figür 3.30) %0,90'dır. Nanopartikül formülasyonunun uygulandığı A549 hücrelerinde ise kontrol grubuna kıyasla kaspaz 3/7 aktivasyonu gerçekleşmiş ve total apoptotik hücreler % 21.80 olarak tespit edilmiştir (Figür 3.15). Bu grubun kontrol hücrelerinin total apoptotik hücre yüzdesi ise 0.71'dir (Figür 3.15).

### 3.10. Oksidatif stres seviyesi analiz bulguları

**A**



Figür 3.16. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC uygulanan (B) A549 hücrelerinin oksidatif stres seviyesi bulguları



Figür 3.17. Kontrol (A) ve ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulanan (B) A549 hücrelerinin oksidatif stres seviyesi bulguları

Flow sitometrik olarak gerçekleştirilen ölçümlerde A549 kontrol hücrelerinde ((Ros (-)=%94.35), Ros (+)= %0.07) ve (Ros (-)=%94), Ros (+)= %5.64) reaktif oksijen türleri üretmemiş populasyon yüzdesi yüksek iken ARN uygulanmış A549 hücrelerinde ((Ros (-)=%88.19), Ros (+)= %11.37)) bu seviye kontrol grubuna göre artış göstermiştir. Bu seviyedeki en büyük artışın ARN14974=BOC nanopartikül formülasyonu uygulamasından sonra gerçekleştiği tespit edilmiştir ((Ros (-)=%52.86), Ros (+)= %46.66)) (Figür 3.16 ve Figür 3.17).

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Küçük hücreli dışı akciğer kanseri dünyada en sık görülen ve mortalitesi yüksek kanserlerden biridir. Gerçekleştirilen istatistiksel çalışmalarda yer alan verilere göre akciğer kanseri hem erkek hem de kadınlarda dünyada en yüksek mortalite gösteren kanser türüdür. Tüm akciğer kanseri vakaları için ve küçük hücreli dışı akciğer kanserinde de erken teşhis ve tedavi yaklaşımları, hastaların yaşam süresini ve kalitesini yükseltmekte ve ölüm oranlarını düşürmektedir. Aktif olarak kullanılmakta olan tedavi yaklaşımları ve ilaçlar tam tedaviyi sağlayamamakla birlikte yüksek yan etkilere sahiptirler ve tedavi süreci bu nedenlerle çok sancılı bir şekilde dönüşmektedir. Bu nedenle akciğer kanserinin tedavisi için yeni tedavi yaklaşımları ve ilaç potansiyeli olan maddelere ve yan etkisi az olan yeni terapötik ajanlara ihtiyaç vardır. Tüm bu bilgiler kapsamında bu çalışmada bir seramidaz inhibitörü olan ARN14974=BOC'un ve bundan sentezlenen katı lipid nanopartikül formülasyonunun küçük hücreli dışı akciğer kanseri A549 hücre hattı üzerindeki sitotoksik/sitostatik, antiproliferatif ve proapoptotik potansiyellerinin araştırılması hedeflenmiştir.

A549 hücreleri üzerinde sitotoksik, sitostatik ve antiproliferatif etkiler ARN ve ARN nanopartikül formülasyonlarının uygulamaları ile MTT, SRB ve ATP canlılık tesleri ile belirlenmiştir. Nanopartikül formülasyonunun sitotoksik etkisinin daha çok olduğu gösterilmiştir. Bu bulgularımız seramidaz inhibitörü kullanılarak kanser hücrelerinde sitotoksik etkinin oluştuğunu raporlayan çalışmalarla uyumludur [13, 14]. Hücrelerin ölüm şeklinin yapısal değişiklikler bazında belirlemek için konfokal mikroskopi ile morfolojik değişiklikler ve geçirimli elektron mikroskopunda ince yapısal değişiklikler analiz edilmiştir. Flow sitometrik analizler ile hücrelerde gerçekleşen ölüm yolları ve bu yollarda etkili olan proteinlerin aktivasyon ve ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Deneyler sonucunda ARN14974=BOC'un A549 hücreleri üzerindeki IC<sub>50</sub> değeri 35.1 µM olarak hesaplanmıştır. Hücrelerde ARN14974=BOC'un meydana getirdiği morfolojik değişiklikler ise konfokal mikroskopi yöntemi ile saptanmıştır. Bunun için A549 hücreleri ARN14974=BOC'un IC<sub>50</sub> değerine yine 24 saat süre ile maruz bırakılarak falloidin ve akridin oranj ile boyandıktan sonra morfolojik yapıları konfokal mikroskopunda görüntülenmiştir. Hem ince yapısal değişiklikler hem de morfolojik

değişiklikler seramidaz inhibitörü ARN14974=BOC ve nanopartikül formülasyonunun A549 hücrelerinde tetiklediği ölüm şeklinin apoptoz olduğunu göstermiştir. Literatürde hücre içinde seramid birikime neden olan seramidaz inhibiyonu nedenli ölümün apoptoz olduğu vurgulanmış [3] olup çalışma sonuçlarımızı desteklemiştir. Hücre döngüsünü durdurma, proapoptotik etki, reaktif oksijen türlerinin üretimi gibi biyolojik süreçlerin çalışmamız sonucunda A549 hücrelerinde ARN14974=BOC uygulanmasından sonra aktive olduğu ve bu aktivasyonun yeni sentezlenmiş olan ARN14974=BOC katı lipid nanopartikülde daha belirgin olduğu ve düşük dozda gerçekleştiği literatür bilgisine [1] uyumlu olarak ve bu alandaki diğer çalışmaların verileri ile tutarlı olduğu [1, 3, 13, 14] bulunmuştur.

Sonuç olarak ARN14974=BOC'un ve nanopartikül formunun A549 insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde sitotoksik ve antiproliferatif etkileri saptanmıştır. ARN14974=BOC ve KLN formülasyonunun bu hücrelerde morfolojik ve ince yapısal değişikliklere neden olmuş ve bu değişiklikler apoptoz indikatörü olarak yorumlanmışlardır. Hem ARN14974=BOC hem de KLN formülasyonunun A549 hücrelerinde reaktif oksijen türlerinin artması ve hücre döngüsünün durdurulmasına neden olarak apoptozu tetiklediği bulunmuştur. Tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, insan küçük hücreli dışı akciğer kanseri hücrelerinde hücre ölümünün sentezlenen ARN14974=BOC'un nanopartikül formu tarafından daha etkin bir biçimde gerçekleştirildiğini göstermiştir. Bu nedenle ARN14974=BOC KLN formülasyonunun kanser tedavisinde kullanılmak üzere ilaç potansiyeli taşıdığı ortaya konulmuş olup daha ileri farmakokinetik ve farmasötik çalışmalardan sonra ilaç geliştirilmesinde kullanımı önerilmektedir.

### Teşekkür

Bu çalışma Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Kapsamında 1901S014 proje numarası ile desteklenmiştir.

### Kaynaklar

- [1] Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. (2002). Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 55(2), 74-108.
- [2] Müsellim B. (2007). Akciğer kanserinin epidemiyolojisi ve etiyolojisi. *Akciğer Kanserine Güncel Yaklaşım Sempozyum Dizisi 2007*, 58, 113-118.
- [3] Oğretmen B. (2018). Sphingolipid metabolism in cancer signalling and therapy. *Nat Rev Cancer*, 201818(1), 33-50.
- [4] Pathwardhan G. A., & Liu, Y. Y. (2011). Sphingolipids and expression regulation of genes in cancer. *Prog Lipid Res*, 50(1), 104-114.
- [5] Cu villier O. (2002). Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1585(2-3), 153-162.
- [6] Reynolds, D., Shi, B. J., McLean, C., Katsis, F., Kemp, B., & Dalton, S. (2003). Recruitment of Thr 319-phosphorylated Ndd1p to the FHA domain of Fkh2p requires Clb kinase activity: a mechanism for CLB cluster gene activation. *Genes Dev.*, 17(14), 1789-802.
- [7] Kolesnick, R. (2002). The therapeutic potential of modulating the ceramide/sphingomyelin pathway. *J Clin Invest*, 110(1), 3-8.
- [8] Strelow, L., Janigro, D., & Nelson, J. A. (2002). Persistent SIV infection of a blood-brain barrier model. *J Neurovirol.*, 8(4), 270-80.
- [9] Rombaut, R., Dejonckheere, V., & Dewettinck, K. (2006). Microfiltration of butter serum upon casein micelle destabilization. *J Dairy Sci*, 89(6), 1915-25.
- [10] Schmelz, E. M., Crall, K. J., Larocque, R., Dillehay, D. L., & Merrill, A. H. (1994). Uptake and metabolism of sphingolipids in isolated intestinal loops of mice. *J Nutr*, 124(5), 702-12.
- [11] Saied, E. M., & Arenz, C. (2016). Inhibitors of ceramidases. *Chem Phys Lipids.*, 197, 60-8.
- [12] Oskouian, B., & Saba, J. D. (2010). Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv Exp Med Biol*, 688, 185-205.
- [13] Pizzirani, D., Bach, A., Realini, N., Armirotti, A., Mengatto, L., Bauer, I., Giroto, S., Pagliuca, C., De Vivo, M., Summa, M., Ribeiro, A., & Piomelli, D. (2015). Benzoxazolone carboxamides: potent and systemically active inhibitors of intracellular acid ceramidase. *Angew Chem Int Ed Engl*, 54(2), 485-9.
- [14] Vejselova, D., Kutlu, H. M., Kus, G., Kabadere, S., & Uyar, R. (2014). Cytotoxic and apoptotic effects of ceranib-2 offering potential for a new antineoplastic agent in the treatment of cancer cells. *Turk J Biol.*, 38, 916-921.
- [15] Vejselova, D., Kutlu, H. M., & Kus, G. (2016). Examining impacts of ceranib-2 on the proliferation, morphology and ultrastructure of human breast cancer cells. *Cytotechnology*, 68, 2721-2728.
- [16] Albayrak, M. & Kutlu, H. M. (2021). Investigation of apoptotic activities of NOE on human ovarian cancer cells . *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14 (1), 132-137.



## The bryophyte flora of Aydın Mountain

Gözde ASLAN <sup>\*1</sup>, Mesut KIRMACI <sup>2</sup>, Hatice ÖZENEÖĞLU <sup>3</sup>, Uğur ÇATAK <sup>2</sup>  
ORCID:0000-0001-6157-1382; 0000-0001-8373-6520; 0000-0002-2600-7353; 0000-0001-5770-8243

<sup>1</sup> Aydın Adnan Menderes University, Buharkent Vocational School, Department of Chemistry and Chemical Processing Technologies 09010, Aydın, Türkiye

<sup>2</sup> Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Science, Department of Biology 09010 Aydın, Türkiye

<sup>3</sup> Aydın Adnan Menderes University, Faculty of Education, Department of Science and Mathematics Education 09010 Aydın, Türkiye

### Abstract

This study was planned and completed to reveal the bryophyte flora of the Aydın Mountains. A total of 268 bryophytes were identified from the research area, of which 216 taxa belong to Bryophyta, 51 taxa belong to Marchantiophyta and one taxon belongs to Anthocerotophyta. *Acaulon mediterraneum* Limpr. has been recorded for the second time for Turkish bryophyte flora. Among liverworts, *Riccia* (17 taxa), and among mosses, *Didymodon* (13 taxa), *Tortula* (13 taxa), *Grimmia* (12 taxa), *Syntrichia* (12 taxa), *Orthotrichum* (11 taxa), *Ptychostomum* (10 taxa), *Fissidens* (9 taxa) and *Lewinskya* (7 taxa) were found as the richest genera. In addition, different habitats in Aydın Mountains and bryophytes representing these habitats were determined, as well. The study of a large mountain range which was not known for bryophytes in Western Anatolia has filled a significant gap in this area.

**Keywords:** Aydın, biodiversity, cryptogams, Western Anatolia, Türkiye

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

## Aydın Dağları karayosunları florası

### Özet

Bu çalışma, Aydın Dağları'nın karayosunları florasını ortaya çıkarmak amacıyla planlanmış ve tamamlanmıştır. Araştırma alanında yapraklı karayosunlarına ait 216, ciğerotlarına ait 51 ve boynuzlu otlara ait 1 takson olmak üzere toplam 268 karayosunu tespit edilmiştir. *Acaulon mediterraneum* Limpr. Türkiye karayosunları florası için ikinci kez kaydedilmiştir. Ciğerotlarından *Riccia* (17 takson), karayosunlarından *Didymodon* (13 takson), *Tortula* (13 takson), *Grimmia* (12 takson), *Syntrichia* (12 takson), *Orthotrichum* (11 takson), *Ptychostomum* (10 takson), *Fissidens* (9 takson) ve *Lewinskya* (7 takson) en zengin cins olarak bulunmuştur. Ayrıca Aydın Dağları'ndaki farklı habitatlar ve bu habitatları temsil eden karayosunları da belirlenmiştir. Batı Anadolu'da karayosunları açısından bilinmeyen geniş bir dağ silsilesinin incelenmesi bu alanda büyük bir boşluğu doldurmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Aydın, biyoçeşitlilik, tohumuz bitkiler, Batı Anadolu, Türkiye

### 1. Introduction

Studies aimed at determining the diversity of bryophytes in Turkey are continuing intensively [1, 20, 24, 25]. In this sense, Western Anatolia is one of the most studied areas with regard to Bryophytes [2, 3, 4, 9]. Despite this high level of research activity, there is a noticeable scarcity of studies conducted in the Aydın Mountains [10, 12, 14].

Aydın Mountains, determined as the study area, is a mountain range located between Bozdağ and Menteş Mountain in the Western Anatolian Mountain ranges. It extends perpendicularly to the Aegean Sea conforming to the

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905369126889; Fax.: + 90 256 214 66 87; E-mail: gozdeaslan88@hotmail.com



typical mountain structure of the region. Aydın Mountains are surrounded by the districts of Buldan in Denizli, Çamlık, Selçuk, Tire and Beydağ in İzmir, Germencik, İncirliova, Sultanhisar, Nazilli, Kuyucak, and Buharkent in Aydın (Figure 1). The important peaks of the mountain range, which includes large and small elevations, are Bayrak Tepe (1724m.), Karlık Mountain (1675m.), İmam Baba (1648m.), Beydağ (1575m.), Oyuk Mountain (1479m.), Dela Mountain (1413m.), They can be listed as Kara Mountain (1390m.), Malgaçemir (1349m.), and Kurusivri (713m.). The valleys formed between these elevations contain important habitats for bryophytes and other organisms. Wetlands in the study area are important for bryophytes. Located within the borders of Buldan district, Yayla Lake is at an altitude of 1100 meters and is fed by snow and rainwater. Additionally, there are many large and small rivers which are active in the rainy season in the north and south directions. The majority of these streams, which exhibit heightened activity especially during the rainy season, dry up by the middle of summer. Nevertheless, they provide extremely important habitats for the bryophytes under study, due to their ability to retain moisture, particularly in deep and closed valleys. The most widespread plant communities of the region are *Pinus brutia* Ten. and *Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb) Holmboe communities. *Quercus coccifera* L. assemblages, though mostly degraded, are distributed across elevations ranging from 250 to 1200 meters in the west, south and north of our study area. Elevations between 800 and 1250 meters host *Cistus laurifolius* L. assemblages especially in Nazilli's Oyukbaba location and in the upper parts of Aksu village. There are *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* communities either in pure form or mixed compositions at 1400 meters around Aydın Paşa plateau. In the south of Aydın Mountains, especially within the borders of Kuyucak Kara Mountain and Buharkent, there exists *Quercus ithaburensis* subsp. *macrolepis* (Kotschy) Hedge & Yalt. assemblage that spans a wide area, ranging from 150 to 1400 meters. The *Liquidambar orientalis* Miller assemblage is locally distributed in Aydın, Umurlu Aköz stream bed. These taxa, found in individual small communities, are important in terms of their role in forming the northernmost distribution area of these plants.

This study was carried out to determine the bryophytes of the Aydın Mountains, which was previously unexplored as mountain range in terms of bryophytes.



Figure 1. Study area with collecting localities

## 2. Materials and methods

Between the years 2018 and 2022, a total of 182 field studies were carried out in different habitats within the research area and approximately 10.000 bryophyte samples were collected. During the sample collection process, an effort was made to collect ephemeral taxa as much as possible, taking into account the different vegetation periods. The collecting localities of bryophyte samples are shown in Table 1 and listed below. Relevant flora books and revisions were used to identify the plants. The nomenclature of bryophytes was arranged according to Hodgetts et al. (2020) [8]. Also, all names were checked from Tropicos web page URL 1 [23]. The term “common” is used for taxa found in more than 20 localities in the floristic list. The samples were preserved in Aydın Adnan Menderes University Herbarium (AYDN). Only one collector numbers are given for every taxon in the study. Second records are marked “\*”. Collector and identifying author abbreviation is GZD (Gözde Aslan) and the others Substr: Substrat, R: Rock, S: Soil, SCR: Soil Covered Rock, E: Epiphytic.

Table 1. Collected localities

No	Date	Latitude	Longitude	Altitude (m)	Locality
1	06.11.2018	37° 59' 37.9" N	28° 44' 52.6" E	518	Aydın: Buharkent, Ortakçı
2	06.11.2018	38° 00' 17.4" N	28° 45' 25" E	684	Denizli: Buldan, Çatak
3	06.11.2018	38° 01' 21.3" N	28° 41' 33.3" E	900	Aydın: Buharkent, Gündoğan
4	20.12.2018	37° 52' 19" N	27° 42' 43" E	50	Aydın: İncirliova, Hürriyet
5	20.12.2018	37° 52' 42" N	27° 42' 38" E	60	Aydın, İncirliova, Karabağ
6	07.02.2019	37° 54' 1" N	27° 58' 51" E	250	Aydın: Efeler, Çayyüzü
7	07.02.2019	37° 56' 33" N	27° 58' 41" E	740	Aydın: Efeler, Eğrikavak
8	07.02.2019	37° 58' 26" N	27° 59' 7" E	850	Aydın: Efeler, Eğrikavak
9	13.02.2019	37°57'12.0"N	27°53'19.7"E	630	Aydın: Efeler, Paşayaylası
10	15.04.2019	37° 59' 13.9" N	28° 41' 22.2" E	250	Aydın: Efeler, Feslek
11	15.04.2019	37° 59' 38" N	28° 45' 1" E	560	Aydın: Buharkent, Ortakçı
12	15.04.2019	38° 02' 08" N	28° 44' 34" E	1140	Aydın: Buharkent, Ericek
13	15.04.2019	38° 01' 37" N	28° 47' 44" E	1150	Denizli: Buldan, Süleymanlı
14	15.04.2019	38° 01' 18" N	28° 47' 16" E	1220	Denizli: Buldan, Çatak
15	15.04.2019	37° 59' 39" N	28° 45' 55" E	670	Denizli: Buldan, Between Çatak Savcılı
16	07.05.2019	38° 00' 10" N	28° 32' 42" E	1040	Aydın: Kuyucak, Ören
17	07.05.2019	38° 00' 24" N	28° 32' 55" E	1110	Aydın: Kuyucak, Ören
18	07.05.2019	38° 00' 48" N	28° 33' 32" E	1290	Aydın: Kuyucak, Belenova
19	07.05.2019	38° 01' 06" N	28° 33' 34" E	1290	Aydın: Kuyucak, Belenova
20	21.12.2019	37° 52' 59" N	27° 50' 32" E	90	Aydın: Efeler, Danişment/Kalfaköy
21	21.12.2019	37° 53' 37" N	27° 50' 46" E	200	Aydın: Efeler, Ambarcık köyü/Eski Değirmen
22	21.12.2019	37° 56' 19" N	27° 52' 7" E	510	Aydın: Efeler, Karaköy/Tire road
23	21.12.2019	37° 57' 49" N	27° 52' 21" E	640	Aydın: Efeler, Karaköy
24	28.12.2019	37° 52' 30" N	27° 45' 5" E	170	Aydın: İncirliova Dereağzı/İncirliova Tire road
25	28.12.2019	37° 54' 30" N	27° 47' 8" E	300	Aydın: Efeler, Gözpinar/Şirindere-Kahvedağı location
26	28.12.2019	37° 55' 58" N	27° 47' 43" E	440	Aydın: İncirliova, east of Karagözler/Şirindere
27	28.12.2019	37° 55' 58" N	27° 47' 43" E	440	Aydın: İncirliova Karagözler/Arpadere
28	28.12.2019	38° 0' 3" N	27° 45' 39" E	850	İzmir: Tire, Dağdere/İncirliova Tire road
29	28.12.2019	38° 2' 27" N	27° 44' 52" E	1070	İzmir: Tire Küçükkömürücü/İncirliova Tire road
30	14.02.2020	37° 58' 48" N	28° 44' 53" E	250	Aydın: Buharkent
31	24.02.2020	37° 59' 40" N	28° 43' 33" E	640	Aydın: Buharkent, Muratdağı
32	24.02.2020	38° 3' 22" N	28° 43' 26" E	1140	Denizli: Buldan, Kavanoluk
33	24.02.2020	38° 0' 31" N	28° 43' 34" E	810	Aydın: Buharkent, Muratdağı
34	24.02.2020	38° 3' 3" N	28° 44' 46" E	1100	Denizli: Buldan, Kavanoluk
35	24.02.2020	38° 3' 23" N	28° 44' 25" E	1180	Denizli: Buldan, Kavanoluk
36	24.02.2020	38° 4' 28" N	28° 41' 17" E	1123	Denizli: Buldan, Kurudere
37	24.02.2020	38° 4' 5.9" N	28° 38' 47.5" E	1140	Aydın: Kuyucak, Musakolu
38	24.02.2020	38° 2' 33.5" N	28° 39' 58.8" E	850	Aydın: Kuyucak, Taşoluk
39	07.03.2020	37° 59' 19" N	28° 56' 35" E	172	Denizli: Buldan, Mahmutlu
40	07.03.2020	37° 59' 14" N	28° 56' 17" E	193	Denizli: Buldan, Mahmutlu
41	07.03.2020	38° 0' 45" N	28° 54' 34" E	298	Denizli: Buldan, Bölmekaya
42	07.03.2020	38° 1' 18" N	28° 53' 42" E	328	Denizli: Buldan, Bölmekaya
43	07.03.2020	38° 2' 29" N	27° 47' 43" E	763	Denizli: Buldan, Süleymanlı
44	07.03.2020	38° 2' 56" N	28° 46' 21" E	1157	Denizli: Buldan, Yayla lake
45	07.03.2020	38° 0' 10" N	28° 45' 20"E	640	Denizli: Buldan, Aktaş
46	09.03.2020	37° 57' 1" N	28° 53' 1" E	180	Denizli: Sarayköy, Karataş
47	09.03.2020	37° 57' 1" N	28° 52' 37" E	160	Denizli: Sarayköy, Karataş water tank
48	09.03.2020	37° 56' 53" N	28° 49' 2" E	330	Aydın: Buharkent, Kızıldere village
49	09.03.2020	37° 58' 6" N	28° 44' 30" E	390	Aydın: Buharkent, Savcılı
50	20.03.2020	37° 52' 19" N	27° 56' 15" E	110	Aydın: Efeler, Emirdoğan village
51	20.03.2020	37° 55' 20" N	27° 55' 59" E	655	Aydın: Efeler, Ortaköy
52	20.03.2020	37° 54' 33" N	27° 55' 57" E	457	Aydın: Efeler, Aşağı Kayacık
53	20.03.2020	37° 54' 26" N	27° 56' 5" E	318	Aydın: Efeler, Aşağı Kayacık
54	26.03.2020	37° 58' 49.6" N	28° 36' 12" E	1079	Aydın: Kuyucak, Dereköy
55	26.03.2020	37° 59' 5.8" N	28° 36' 0.2" E	1233	Aydın: Kuyucak, Dereköy
56	26.03.2020	38° 0' 39.7" N	28° 36' 2.4" E	1480	Aydın: Kuyucak, Dereköy
57	20.04.2020	38°05'14.0" N	28°22'09.0" E	540	Aydın: Nazilli, Çaylı
58	20.04.2020	38°06'46.6" N	28°22'04.6" E	1056	Aydın: Nazilli, Derebaşı
59	29.04.2020	37°56'52.0" N	28°09'56.0" E	330	Aydın: Sultanhisar, Malgaçmustafa
60	29.04.2020	37°58'50.0" N	28°09'04.0" E	540	Aydın: Sultanhisar, Malgaçmustafa
61	29.04.2020	37°58'02.0" N	28°09'24.0" E	560	Aydın: Sultanhisar, Malgaçmustafa

Table 1. Continued

62	29.04.2020	37°57'04.0" N	28°09'20.0" E	510	Aydın: Sultanhisar, Malgaçmustafa
63	29.04.2020	37°56'01.0" N	28°09'16.0" E	470	Aydın: Sultanhisar, Malgaçemir
64	29.04.2020	37°55'44.0" N	28°08'36.0" E	540	Aydın: Sultanhisar, Kavaklı village
65	06.05.2020	37°51'24.0" N	28°00'06.0" E	260	Aydın: Efeler, Kuyucular
66	06.05.2020	37°59'56.0" N	28°07'05.0" E	840	Aydın: Köşk, Sarıçam
67	06.05.2020	38°00'55.0" N	28°07'31.0" E	1040	Aydın: Sultanhisar, Malgaçmustafa
68	06.05.2020	37°57'24.0" N	28°02'30.0" E	980	Aydın: Köşk, İliğağ
69	11.05.2020	37°54'23.1" N	27°51'23.7" E	320	Aydın: Efeler, Zeytinköy
70	11.05.2020	37°54'33.2" N	27°51'42.6" E	400	Aydın: Efeler, Zeytinköy
71	11.05.2020	37°55'12.5" N	27°52'03.8" E	530	Aydın: Efeler, Zeytinköy
72	11.05.2020	37°57'32.8" N	27°57'50.3" E	1000	Aydın: Efeler, Eğrikavak
73	28.05.2020	37°55'58.0" N	27°52'05.0" E	480	Aydın: Efeler, Zeytinköy
74	28.05.2020	37°56'36.0" N	27°52'09.0" E	530	Aydın: Efeler, Karaköy
75	28.05.2020	37°56'59.0" N	27°52'10.0" E	560	Aydın: Efeler, Karaköy
76	28.05.2020	37°57'45.0" N	27°52'18.0" E	650	Aydın: Efeler, Karaköy
77	28.05.2020	37°59'43.0" N	27°54'14.0" E	920	İzmir: Tire, Eğridere
78	28.05.2020	38°00'08.0" N	27°55'04.0" E	950	İzmir: Tire, Eğridere
79	28.05.2020	37°59'36.0" N	27°53'57.0" E	880	İzmir: Tire, Eğridere
80	01.02.2021	37°54'51.0" N	28°28'56.0" E	110	Aydın: Kuyucak, Aydınoğlu
81	01.02.2021	37°56'08.0" N	28°29'16.0" E	310	Aydın: Kuyucak, Çobanisa
82	01.02.2021	37°56'30.0" N	28°32'52.0" E	230	Aydın: Kuyucak, Pamukören /Deđirmendere
83	01.02.2021	37°56'24.0" N	28°32'14.0" E	440	Aydın: Kuyucak, Ören
84	03.02.2021	37°57'21.0" N	28°26'04.0" E	300	Aydın: Nazilli, Kestel
85	03.02.2021	37°57'01.0" N	28°26'47.0" E	430	Aydın: Nazilli, Kestel
86	03.02.2021	38°01'58.0" N	28°27'14.0" E	590	Aydın: Nazilli, Ketenova
87	03.02.2021	38°04'32.0" N	28°28'18.0" E	940	Aydın: Nazilli, Kahvederesi
88	03.02.2021	38°04'43.0" N	28°29'18.0" E	830	Aydın: Nazilli, Aşağıyakacık
89	03.02.2021	38°04'24.0" N	28°31'47.0" E	910	Aydın: Kuyucak, Yukarıyakacık
90	27.02.2021	37°58'01.0" N	28°22'47.0" E	170	Aydın: Nazilli, Kardeşköy/Beydağ- Nazilli road
91	27.02.2021	38°03'54.0" N	28°20'50.0" E	620	Aydın: Nazilli, Işıklar/Beydağ- Nazilli road
92	27.02.2021	38°04'37.0" N	28°19'48.0" E	720	Aydın: Nazilli, Aksu
93	27.02.2021	38°04'36.0" N	28°17'15.0" E	700	İzmir: Beydağ, Palamutçuk
94	27.02.2021	38°04'43.0" N	28°16'32.0" E	680	İzmir: Beydağ, Aktepe
95	27.02.2021	38°04'53.0" N	28°16'14.0" E	620	İzmir: Beydağ, Aktepe
96	27.02.2021	38°05'39.0" N	28°15'24.0" E	380	İzmir: Beydağ
97	27.02.2021	38°05'21.0" N	28°18'12.0" E	830	İzmir: Beydağ, Yeşiltepe
98	02.03.2021	37°53'55.0" N	27°36'10.0" E	100	Aydın: Germencik, Dađkaraađaç
99	02.03.2021	37°51'14.0" N	27°36'10.0" E	120	Aydın: Germencik, Reisköy
100	02.03.2021	37°59'01.0" N	27°34'46.0" E	520	Aydın: Germencik, Dampınar
101	02.03.2021	37°59'01.0" N	27°33'17.0" E	440	Aydın: Germencik, Dađyeni
102	02.03.2021	38°00'21.0" N	27°36'39.0" E	580	Aydın: Germencik, Habibler
103	02.03.2021	37°59'36.0" N	27°39'03.0" E	330	İzmir: Tire, Bařköy
104	02.03.2021	38°02'01.0" N	27°40'50.0" E	590	İzmir: Tire, Yemiřler
105	02.03.2021	38°02'32.0" N	27°41'28.0" E	890	İzmir: Tire, Çukurköy
106	02.03.2021	38°00'08.0" N	27°41'31.0" E	660	İzmir: Tire, Akmescit
107	07.03.2021	37°53'54.0" N	27°28'35.0" E	110	Aydın: Germencik, Balatçık
108	07.03.2021	37°53'21.0" N	27°29'41.0" E	120	Aydın: Germencik, Ortaklar
109	07.03.2021	37°53'22.0" N	27°25'38.0" E	280	İzmir: Selçuk, Havutçulu
110	07.03.2021	37°53'40.0" N	27°26'22.0" E	260	İzmir: Selçuk, Havutçulu
111	07.03.2021	37°53'53.0" N	27°26'35.0" E	190	İzmir: Selçuk, Havutçulu
112	07.03.2021	37°53'54.0" N	27°26'55.0" E	200	İzmir: Selçuk, Havutçulu
113	07.03.2021	37°58'20.0" N	27°29'43.0" E	410	İzmir: Tire, Selatin
114	07.03.2021	37°56'31.0" N	27°31'01.0" E	180	İzmir: Tire, Selatin
115	08.03.2021	37°53'36.0" N	27°41'24.0" E	120	Aydın: İncirliova, Hürriyet
116	08.03.2021	37°53'51.0" N	27°41'51.0" E	150	Aydın: İncirliova, Arzular
117	08.03.2021	37°56'34.0" N	27°41'31.0" E	270	Aydın: İncirliova, Çarıklar
118	13.03.2021	37°55'01.0" N	28°12'24.0" E	200	Aydın: Sultanhisar, Yađdere
119	13.03.2021	37°56'40.0" N	28°12'44.0" E	380	Aydın: Sultanhisar, İncealan
120	13.03.2021	37°59'18.0" N	28°13'22.0" E	720	Aydın: Nazilli, Çobanlar
121	13.03.2021	37°59'05.0" N	28°13'38.0" E	740	Aydın: Nazilli, Çobanlar
122	13.03.2021	37°58'37.0" N	28°15'13.0" E	680	Aydın: Nazilli, Yaylapınar
123	13.03.2021	38°00'02.0" N	28°15'19.0" E	1010	Aydın: Nazilli, Yaylapınar
124	13.03.2021	38°02'01.0" N	28°14'46.0" E	1340	Aydın: Nazilli, Beyköy,

Table 1. Continued

125	13.03.2021	38°02'01.0" N	28°14'45.0" E	1330	Aydın: Nazilli, Beyköy
126	13.03.2021	38°02'22.0" N	28°14'21.0" E	1210	İzmir: Beydağ, Beyköy
127	13.03.2021	37°57'32.0" N	28°16'25.0" E	510	Aydın: Nazilli, Hasköy
128	13.03.2021	37°56'30.0" N	28°16'49.0" E	190	Aydın: Nazilli, Ocaklı
129	21.03.2021	37°52'42.0" N	28°03'23.0" E	180	Aydın: Köşk, Baklaköy
130	21.03.2021	37°53'04.0" N	28°03'48.0" E	290	Aydın: Köşk, Baklaköy
131	21.03.2021	37°54'52.0" N	28°04'32.0" E	790	Aydın: Köşk, Mezeköy
132	21.03.2021	37°56'10.0" N	28°05'22.0" E	840	Aydın: Köşk, Karatepe
133	21.03.2021	37°56'31.0" N	28°05'36.0" E	830	Aydın: Köşk, Karatepe
134	21.03.2021	37°57'35.0" N	28°06'30.0" E	610	Aydın: Köşk, Kızılcaköy
135	10.04.2021	37°55'34.0" N	28°00'55.0" E	160	Aydın: Köşk, Koçak
136	10.04.2021	37°56'22.0" N	28°01'09.0" E	330	Aydın: Köşk, Gündoğan
137	10.04.2021	37°57'38.0" N	28°01'38.0" E	640	Aydın: Köşk, Akçaköy
138	10.04.2021	37°59'40.0" N	28°00'30.0" E	660	Aydın: Köşk, Çayır
139	10.04.2021	38°00'34.0" N	27°59'51.0" E	610	İzmir: Ödemiş, Hamam
140	10.04.2021	38°01'17.0" N	27°59'36.0" E	650	İzmir: Ödemiş, Küçükören
141	10.04.2021	38°02'45.0" N	27°59'37.0" E	890	İzmir: Ödemiş, Küre
142	10.04.2021	38°03'34.0" N	27°59'58.0" E	1030	İzmir: Ödemiş, Küre
143	10.04.2021	38°03'47.0" N	28°01'20.0" E	1030	İzmir: Ödemiş, Bademli
144	10.04.2021	38°05'07.0" N	28°03'43.0" E	300	İzmir: Ödemiş, Between Bademli/Prinçci, dam edge
145	10.04.2021	38°03'51.0" N	28°06'45.0" E	550	İzmir: Ödemiş, Bıçakcı
146	10.04.2021	38°02'55.0" N	28°07'04.0" E	900	İzmir: Ödemiş, Bıçakcı
147	10.04.2021	38°02'03.0" N	28°07'32.0" E	1240	İzmir: Ödemiş, Bıçakcı
148	20.04.2021	38°00'32.0" N	27°26'56.0" E	30	İzmir: Selçuk, Belevi
149	20.04.2021	38°00'57.0" N	27°27'55.0" E	20	İzmir: Selçuk, Belevi,
150	20.04.2021	37°59'43.0" N	27°29'02.0" E	120	İzmir: Selçuk, Tire road
151	20.04.2021	37°59'03.0" N	27°30'08.0" E	250	İzmir: Tire, Halkapınar
152	20.04.2021	38°01'41.0" N	27°31'50.0" E	110	İzmir: Tire, Küçükkale
153	20.04.2021	38°04'09.0" N	27°41'35.0" E	190	İzmir: Tire, Hisarlık
154	20.04.2021	38°02'49.0" N	27°37'21.0" E	160	İzmir: Tire, Akçaşehir
155	20.04.2021	38°01'02.0" N	27°35'50.0" E	220	İzmir: Tire, Akyurt
156	20.04.2021	38°00'25.0" N	27°37'24.0" E	470	İzmir: Tire, Akyurt
157	20.04.2021	37°57'08.0" N	27°35'35.0" E	340	Aydın: Germencik, Çamköy
158	17.02.2022	37°54'40" N	27°22'40" E	150	İzmir: Selçuk, Acarlar
159	17.02.2022	37°56'49" N	27°23'24" E	210	İzmir: Selçuk, Between Selçuk-Şirince
160	17.02.2022	37°56'49" N	27°23'24" E	490	İzmir: Selçuk, Şirince
161	17.02.2022	37°57'19" N	27°27'21" E	520	İzmir: Selçuk, Şirince
162	17.02.2022	37°57'44" N	27°28'37" E	430	Aydın: Germencik, between Şirince-Selatin village
163	17.02.2022	37°57'28" N	27°25'6" E	160	İzmir: Selçuk, between Selçuk-Şirince (old way)
164	17.02.2022	37°57'27" N	27°23'12" E	50	İzmir: Selçuk, Zafer
165	19.02.2022	38°5'5" N	27°45'42" E	190	İzmir: Tire, Karaca Ali
166	19.02.2022	38°4'46" N	27°47'6" E	410	İzmir: Tire, Boynu Yoğun
167	19.02.2022	38°3'17" N	27°48'46" E	970	İzmir: Tire, Dallık South ridge
168	19.02.2022	38°1'53" N	27°50'45" E	1350	İzmir: Tire, Yamandere
169	19.02.2022	38°2'53" N	27°49'57" E	890	İzmir: Tire, Yamandere
170	19.02.2022	38°3'22" N	27°49'40" E	690	İzmir: Tire, Kürdüllü
171	19.02.2022	38°4'23" N	27°49'54" E	500	İzmir: Tire, between Ekindik-Kürdüllü
172	19.02.2022	38°5'35" N	27°49'12" E	140	İzmir: Tire, Kürdüllü Kuyucak road
173	15.03.2022	37°57'25" N	28°37'22" E	410	Aydın: Kuyucak, Kurtuluş, Dereköy entrance
174	15.03.2022	37°58'55" N	28°36'52" E	710	Aydın: Kuyucak, Dereköy ahead
175	15.03.2022	37°58'37" N	28°36'15" E	1060	Aydın: Kuyucak, Dereköy
176	15.03.2022	37°59'1" N	28°36'3" E	1190	Aydın: Kuyucak, Dereköy
177	15.03.2022	37°58'27" N	28°35'43" E	1030	Aydın: Kuyucak, Dereköy
178	15.03.2022	37°55'28" N	28°26'54" E	190	Aydın: Kuyucak, Mustafapaşa
179	15.03.2022	37°55'56" N	28°28'6" E	400	Aydın: Kuyucak, Cumhuriyet
180	15.03.2022	37°57'12" N	28°28'45" E	980	Aydın: Kuyucak, Çobanisa
181	15.03.2022	37°57'30" N	28°28'48" E	1130	Aydın: Kuyucak, above Çobanisa
182	15.03.2022	37°58'32" N	28°28'54" E	990	Aydın: Kuyucak, Kayran

### 3. Results

As a result of the examination of approximately 10000 samples collected during field studies in the Aydın Mountains, designated as the research area, 216 taxa (26 families and 76 genera) belonging to Bryophyta, 51 taxa (22 families and 25 genera) belonging to Marchantiophyta and only one taxon belonging to Anthocerotophyta were found. In total, the moss diversity of the research area was recorded as comprising 102 genera and 268 taxa belonging to 49 families. The list of taxa is provided with a list with their Turkish names [15]. The floristic list is presented in evolutionary order. [7].

#### Floristic List of Aydın Mountains

##### ANTHOCEROTOPHYTA/BOYNUZLUOTLAR

###### 1- NOTOXYLADACEAE [YEŞİLBOYNUZGİLLER]

*Phaeoceros laevis* (L.) Prosk. [Yeşilboynuz] Common, Substr: S, SCR, GZD 552

##### MARCHANTIOPHYTA/ CİĞEROTLARI

###### 1- CEPHALOZIELLACEAE [SARGINCİKİGİLLER]

*Cephalozieella baumgartneri* Schiffn. [Kireç sargıncığı] Loc: 103, Substr: S, GZD 1530

*C. divaricata* (Sm.) Schiffn. [Koyu sargıncık] Loc: 163, Substr: SCR, GZD 2110

*C. hampeana* (Nees) Schiffn. [Sargıncık] Loc: 69,73, 92, 96, 100, 117,125, Substr: S, R, GZD 1155

###### 2- SCAPANACEAE [SATIRCAGİLLER]

3- *Scapania undulata* (L.) Dumort. [Katlı satırca] Loc: 78, Substr: R, GZD 1223

###### 4- GYMNOMITRIACEAE [KURTÇUKGİLLER]

*Marsupella emerginata* (Ehrh.) Dumort. [Dikilcik] Loc: 116, Substr: S, R, GZD 1677

###### 5- JUNGERMANNIACEAE [YAKACIKGİLLER]

*Mesophytica turbinata* (Raddi) L. Söderstr & Vana [Sokulgan] Loc: 6, 59, 60, 82, 101, 103, 107, 114, 115, 116, 119, 120, 134, Substr: S, R, SCR, GZD 1714

###### 6- SOLENOSTOMATAACEAE [BAĞIRCİKİGİLLER]

*Solenostoma hyalinum* (Lyell) Mitt. [Parlak bağircık] Loc: 82, Substr: S, GZD 1258

###### 7- SOUTHBYACEAE [GERÇEKYAKALIGİLLER]

*Gongylanthus ericetorum* (Raddi) Nees [Dikyakalı] Loc: 129, Substr: R, GZD 1810

*Southbya nigrella* (De Not.) Henriques [Kara yakalı] Loc: 101,130, 152, Substr: S, R, SCR, GZD 1824

*S. tophacea* (Spruce) Spruce [Yakalı] Loc: 6, 21, 25, 26, 63, 69, 73, 75, 82, 101, 108, 114, 115, 129, 134, 138, 149, Substr: S, R, GZD 447

###### 8- FRULLANIACEAE [MIĞFERCEGİLLER]

*Frullania dilatata* (L.) Dumort. [Miğferce] Loc: 43, 60, 117, 119, 120, 133, 134, 139, Substr: E, GZD 1872

###### 9- PORELLACEAE [KATLICAGİLLER]

*Porella cordeana* (Hübener) Moore [Sarı katlıca] Loc: 125, Substr: R, SCR, GZD 1774

*P. pinnata* L. [Su katlıcası] Loc: 77, 125, Substr: R, SCR, GZD 1779

*P. platyphylla* (L.) Pfeiff. [Katlıca] Loc: 23, 66, 75, 77, 78, 88, 120, 125, 126, 133, 134, 144, Substr: R, SCR, GZD 1191

###### 10- RADULACEAE [YASSICIKGİLLER]

*Radula complanata* (L.) Dumort. [Yassıcık] Loc: 120, Substr: E, GZD 1726

###### 11- METZGERIACEAE [TÜLLÜCEGİLLER]

*Metzgeria furcata* (L.) Corda [Tüllüce] Loc: 58, 63, 77, 120, 133, Substr: SCR, E, GZD 1058

###### 12- FOSSOMBRONACEAE [FIRFIRLIGİLLER]

*Fossombronia angulosa* (Dicks.) Raddi [Uzun firfırlı] Loc: 69, 77, 149, 151, 158, Substr: S, SCR, GZD 2013

*F. caespitiformis* (Raddi) De Not.ex Rabenh [Zar firfırlı] Loc: 101, Substr: S, GZD 1518

*F. echinata* Macvicar [Diken firfırlı] Loc: 107, 109, 158, 159, Substr: S, GZD 1607

*F. pusilla* (L.) Nees [Fırfırlı] Common, Substr: S, GZD 877

###### 13- PETALOPHYLLACEAE [DALGALIKGİLLER]

*Petalophyllum ralfsii* (Wilson) Nees & Gottsche ex Lindenb [Dalgalık] Loc: 90, 107, Substr: S, GZD 1367

###### 14- PELLICEAE [SUPULCUĞUGİLLER]

*Apollia endiviifolia* (Dicks.) Nebel & D. Quandt [Çatalsupulcuğu] Loc: 23, 59, 62, 68, 76, 78, 92, 103, 120, 134, 145, 154, 158, Substr: S, SCR, GZD 1727

###### 15- LUNULARIACEAE [AYÇANAKGİLLER]

*Lunularia cruciata* (L.) Dumort. ex Lindb. [Ayçanak] Common, Substr: S, SCR, GZD 514

###### 16- AYTONIACEAE [KAPAKLIGİLLER]

*Mannia androgyna* (L.) A. Evans [Mantarbaş] Common, Substr: S, SCR, E, GZD 587

*M. fragrans* (Balb.) Frye & L. Clark [Kokar mantarbaş] Loc: 50, Substr: S, GZD 639

*Plagiochasma rupestre* (J.R. Forst. & G. Forst.) Steph. [Çatalparmak] Loc: 26, Substr: SCR, GZD 620

*Reboulia hemisphaerica* (L.) Raddi [Yarımbaş] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 859

#### 17- CONOCEPHALACEAE [KONİKBAŞGİLLER]

*Conocephalum conicum* (L.) Dumort. [Konikbaş] Loc: 23, 32, 56, 59, 62, 77, 78, 119, 120, 134, 160, Substr: S, SCR, GZD 937

#### 18- CORSINIACEAE [BAĞRIYARIKGİLLER]

*Corsinia coriandrina* (Spreng.) Lindb. [Bağrıyarık] Common, Substr: R, SCR, GZD 1616

#### 19- MARCHANTIAACEAE [CİĞEROTUGİLLER]

*Marchantia polymorpha* L. [Cığerothu] Loc: 77, Substr: SCR, GZD 1201

#### 20- OXYMITRACEAE [KARNİYARIKLIGİLLER]

*Oxymitra incrassata* (Brot.) Sérgio & Sim-Sim [Karnıyarıklı] Loc: 22, 24, 30, 83, 107, 111, 118, 129, 158, Substr: S, R, SCR, GZD 1692

#### 21- RICCIACEAE [ÇATALCIKGİLLER]

*Riccia beyrichiana* Hampe ex Lehm. [Kanallı çatalcık] Loc: 6, 21, 96, 107, 108, 146, Substr: S, GZD 1468

*R. bicarinata* Lindb. [Çiftdişli çatalcık] Loc: 87, 107, 110, 118, 129, 148, 158, Substr: S, GZD 1304

*R. bifurca* Hoffm [Ayrık çatalcık] Loc: 87, 96, 107, 118, 158, Substr: S, GZD 1311

*R. ciliata* Hoffm [Kısatüylü çatalcık] Loc: 83, 96, 141, 158, Substr: S, GZD 1272

*R. ciliifera* Link [Kıllı çatalcık] Loc: 44, Substr: S, GZD 819

*R. crinita* Taylor [Sakallı çatalcık] Loc: 83, Substr: S, GZD 1271

*R. crozalsii* Lev. [Ege çatalcığı] Loc: 96, 107, 109, 111, 116, 128, 129, 146, 148, 158, Substr: S, GZD 1792

*R. glauca* L. [Çatalcık] Loc: 83, 107, Substr: S, GZD 1270

*R. gougetiana* Durieu & Mont. [Koca çatalcık] Common, Substr: S, GZD 432

*R. gougetiana* Durieu & Mont. var. *armatissima* Levier ex Müll. Frib. [Yoz çatalcık] Loc: 24, 44, Substr: S, GZD 901

*R. lamellosa* Raddi [Akçatalcık] Loc: 26, 41, 107, 123, Substr: S, GZD 1751

*R. macrocarpa* Lev. [İri çatalcık] Loc: 83, Substr: S, GZD 1269

*R. michelii* Raddi [Paslı çatalcık] Loc: 21, 44, 85, 89, 101, 103, 179, Substr: S, GZD 821

*R. nigrella* DC. [Kara çatalcık] Loc: 24, 28, 81, 83, 85, 86, 91, 96, 107, 171, 174, 176, Substr: S, GZD 1464

*R. papillosa* Moris. [Siğilli çatalcık] Loc: 22, 30, 83, 89, 96, 179, Substr: S, GZD 1465

*R. sorocarpa* Bisch. [Bol çatalcık] Common, Substr: S, GZD 450

*R. subbifurca* Warnst. ex Croz. [Uzun çatalcık] Loc: 20, 28, 92, 96, 99, 109, 110, 116, 118, 121, 128, 129, 136, 144, Substr: S, GZD 533

#### 22- TARGIONIACEAE [ARDIKARAGİLLER]

*Targionia hypophylla* L. [Ardıkara] Common, Substr: S, GZD 1098

#### 23- SPHAEROCARPACEAE [DİŞİKÜREGİLLER]

*Sphaerocarpos michelii* Belardi [Diken dişiküre] Loc: 107,153,172, Substr: S, GZD 2037

*S. europaeus* Lorb. [Dişiküre] Common, Substr: S, GZD 442

#### BRYOPHYTA/YAPRAKLI KARAYOSUNLARI

##### 1- POLYTRICHACEAE [BÖRKLÜCEGİLLER]

*Polytrichum juniperinum* Hedw. [Bol börklüce] Loc: 18, 32, 36, 57, 89, 93, 133, 141, Substr: S, SCR, GZD 676

##### 2- TIMMIACEAE [YILDIZVERENGİLLER]

*Timmiella barbuloidea* (Brid.) Mönk. [Duvarlık] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 2042

##### 3- ENCALYPTACEAE [DUVAKLIGİLLER]

*Encalypta rhaptocarpa* Schwagr. [Koca duvaklı] Loc: 55, 131, Substr: R, GZD 1842

*E. streptocarpa* Hedw. [Kıvrık Duvaklı] Loc: 162, Substr: SCR, GZD 2106

*E. vulgaris* Hedw. [Duvaklı] Loc: 12, 14, 19, 23, 26, 93, 105, 113, 131, 155, 169, Substr: S, R, SCR, GZD 1553

##### 4- FUNARIACEAE [KEPÇEBAŞGİLLER]

*Enthostodon attenuatus* (Dicks.) Bryhn [Uzun topuzcuklu] Loc: 158, Substr: S, GZD 2076

*E. convexus* (Spruce) Brugués. [Şiş topuzcuklu] Loc: 90, 136, Substr: S, GZD 1911

*E. fascicularis* (Hedw.) Müll. Hal. [Kat topuzcuklu] Loc: 107, Substr: S, GZD 1573

*E. muhlenbergii* (Turner) Fife [Topuzcuklu] Loc: 45, 107, 121, 153, 158, Substr: S, GZD 2038

*E. pulchellus* (H. Philib.) Brugués [Bol topuzcuklu] Loc: 62, 96, 99, 101, 103, 118, 121, 127, 128, 131, 133, 142, 148, 157, Substr: S, R, GZD 1538

*Funaria hygrometrica* Hedw. [Kepçebaş] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 1083

##### 5- DICRANELLACEAE [İNCELİKGİLLER]

*Dicranella howei* Renaud & Cardot. [Ayrı incelik] Common, Substr: S, SCR, GZD 2012

*D. varia* (Hedw.) Schimp. [İncelik] Loc: 98, 108, 163, Substr: S, GZD 1595

##### 6- FISSIDENTACEAE [CEPKENLİGİLLER]

*Fissidens dubius* P. Beauv [Yoz cepkenli] Loc: 63, 69, 70, 73, 136, 155, Substr: S, E, GZD 2058

*F. taxifolius* Hedw. [Zarif cepkenli] Loc: 152, 160, Substr: S, GZD 2094

- F. arnoldii* R.Ruthe [Cüce cepkenli] Loc: 50, 103, Substr: R, GZD 1141  
*F. bryoides* Hedw. [Bol cepkenli] Loc: 158, Substr: S, GZD 2081  
*F. crispus* Mont. [Kıvrık cepkenli] Loc: 57, 71, Substr: S, SCR, GZD 964  
*F. incurvus* Starke ex Röhl. [Dönük cepkenli] Loc: 98, Substr: S, GZD 1487  
*F. rufulus* Bruch & Schimp. [Uzun cepkenli] Loc: 26,154, Substr: SCR, GZD 621  
*F. viridulus* (Sw. ex anon.) Wahlenb. [Cepkenli] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 1938  
*F. exilis* Hedw. [Yitik cepkenli] Loc: 158, Substr: S, GZD 2079

**7- RHABDOWEISIAEAE [BAKIRLIKĞİLLER]**

- Dicranoweisia cirrata* (Hedw.) Lindb. [Kütükcan] Loc: 5, 25, 32, 34, 72, 88, 99, 125, 134, 145, Substr: S, SCR, E, GZD 1774

**8- DITRICHACEAE [ÇATALDIŞĞİLLER]**

- Ceratodon conicus* (Hampe) Lindb. [Sivri boynuzdiş] Loc: 85, Substr: R, GZD 1285  
*C. purpureus* (Hedw.) Brid. [Boynuzdiş] Loc: 5, 36, 125, Substr: R, SCR, GZD 419  
*Cheilothea chloropus* (Brid.) Broth. [Ayrıkdış] Loc: 22, 47, 48, 55, 57, 101, 107, 108, 111, 113, 123, 149, 158, 159, 171, Substr: S, SCR, GZD 1625  
*Pleuroidium acuminatum* Lindb. [Silli kapaksız] Loc: 92, Substr: S, GZD 1402

**9- POTTIACEAE [POTURCUKĞİLLER]**

- Acaulon fontiquerianum* Casas & Sérgio [Kit boncukçuk] Loc: 83, Substr: S, GZD 1274  
 \**A. mediterraneum* Limpr. [Ege boncukçuk] Loc: 95, 172, Substr: S, GZD 1433  
*A. muticum* (Hedw.) Müll. Hal. [Boncukçuk] Loc: 47, Substr: S, GZD 838  
*A. triquetrum* (Spruce) Müll. Hal. [Üçgen boncukçuk] Loc: 39, 50, 54, 128, 135, 179, Substr: S, GZD 1792  
*Aloina aloides* (Koch ex Schultz) Kindb [Pidecik] Loc: 5, 15, 25, 39, 50, 71, 100, 101, 102, 107, 111, 116, 159, 163, Substr: S, R, SCR, GZD 400  
*A. ambigua* (Bruch & Schimp.) Limpr. [Etlı pidecik] Loc: 46, 84, 85, 90, 96, 107, 108, 127, 129, 149, 153, Substr: S, R, SCR, GZD 1563  
*B. unguiculata* Hedw. [Fırçacık] Common, Substr: S, SCR, GZD 2021  
*Crossidium aberrans* Holz. & E.B.Bartram [Düz kartpulcuk] Loc: 58, Substr: S, GZD 982  
*C. squamiferum* (Viv.) Jur [Kartpulcuk] Loc: 2, 24, 41, 46, 80, 85, 100, 107, 108, 130, 159, Substr: S, R, SCR, GZD 1830  
*Dialytrichia mucronata* (Brid.) Broth. [Gergeflice] Loc: 21, 154, Substr: R, GZD 2049  
*Didymodon acutus* (Brid.) K. Saito [Sivri ikizcik] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 1519  
*D. australiase* (Hook. & Grev.) R.H.Zander [Yaban ikizcik] Loc: 134, Substr: S, GZD 1897  
*D. bistratosus* Hébrard & Pierrot [Katlı ikizcik] Loc: 50, 64, Substr: S, GZD 1060  
*D. cordatus* Jur. [Üçgen ikizcik] Loc: 5, 81, 93, 146, Substr: S, R, Substr: S, R, SCR, GZD 1239  
*D. fallax* (Hedw.) R.H. Zander [Dönük ikizcik] Loc: 44, 84, 170, Substr: S, SCR, GZD 1281  
*D. insulanus* (De Not.) M.O. Hill [Uzun ikizcik] Common, Substr: S, R, SCR, E, GZD 2065  
*D. luridus* Hornsch. [Bol ikizcik] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 1648  
*D. rigidulus* Hedw. [Boncuklu ikizcik] Loc: 47, 57, 64, 93, 95, 115, 125, 131, 156, Substr: S, R, SCR, GZD 1849  
*D. spadiceus* (Mitt.) Limpr. [Düz ikizcik] Loc: 2, 3, 36, 48, GZD 695  
*D. tophaceus* (Brid.) Lisa [Çok ikizcik] Loc: 23, 26, 46, 57, 62, 63, 97, 103, 115, 119, 120, 135, 138, 156, 157, 158, 163, Substr: S, R, SCR, Substr: S, R, SCR, GZD 2071  
*D. tophaceus* subsp. *sicculus* M.J.Cano, Ros, García- Zam. & J.Guerra) Jan Kučera [Küçük ikizcik] Loc: 142, Substr: S, GZD 1953  
*D. umbrosus* (Müll. Hal.) R.H. Zander [Dalgalı ikizcik] Loc: 3, 24, 64, 92, 96, 147, Substr: S, R, SCR, E, GZD 579  
*D.vinealis* (Brid.) R.H. Zander [İkizcik] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 1546  
*Microbryum curvicolium* (Hedw.) R.H.Zander [Kıvrık küfecik] Loc: 47, Substr: S, GZD 838  
*M. rectum* (With.) R.H. Zander [Son küfecik] Loc: 46, 107, Substr: S, GZD 1563  
*M. starkeanum* (Hedw.) R.H. Zander [Küfecik] Common, Substr: S, SCR, GZD 2003  
*Pseudocrossidium hornschurchianum* (Schultz) R.H. Zander [Dönükçe] Loc: 5, 18, 24, 46, 96, 102, 105, 107, 111, 118, 123, 127, Substr: S, SCR, GZD 1697  
*P. revolutum* (Brid.) R.H. Zander [Kıvrık dönükçe] Loc: 100, Substr: SCR, GZD 1503  
*Pterygoneurum ovatum* (Hedw.) Dixon [Atkılıca] Loc: 13, Substr: S, GZD 495  
*Syntrichia calcicola* J.J. Aman [Kireç ulduzu] Loc: 89, 142, Substr: S, GZD 1350  
*S. caninervis* Mitt var. *gypsophila* (J.J. Amann ex G. Roth) Ochyra [Kurak ulduz] Loc: 55, 88, 133, Substr: R, SCR, GZD 1862  
*S. handelii* (Schiffn.) S.Agnew & Vondr. [Öz ulduz] Loc: 126, Substr: R, GZD 1783  
*S. laevipila* Brid. [Ağaç ulduzu] Loc: 4, 167, Substr: E, GZD 356  
*S. minör* (Bizot) M.T.Gallego [Cüce ulduz] Loc: 167 Substr: E, GZD 2127  
*S. montana* Nees [Bol ulduz] Loc: 14, 21, 57, 59, 134, Substr: R, E, GZD 1894  
*S. papillosissima* (Copp.) Loeske [Uzun ulduz] Loc: 58, Substr: SCR, GZD 979

- S. princeps* (De Not.) Mitt. [Kaba ulduz] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 1747  
*S. ruraliformis* (Besch.) Mans. [Sivri ulduz] Loc: 44, 88, 122, 125, Substr: S, SCR, GZD 1737  
*S. ruralis* (Hedw.) F. Weber & D. Mohr [Ulduz] Common, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1339  
*S. subpapillosissima* (Bizot & R.B. Pierrot ex W.A. Kramer) M.T. Gallego & J. Guerra [Zarif ulduz] Loc: 17, 18, 58, 124, 131, 133, 142, 176, Substr: S, R, SCR, GZD 1844  
*S. virescens* (De Not.) Ochyra [Küçük ulduz] Loc: 60, 91, 94, 141, Substr: E, GZD 1390  
*Tortula acaulon* (With.) R.H. Zander [Cüce kurucan] Loc: 39, 50, 80, 83, 95, 96, 128, 131, 162, 181, Substr: S, GZD 1793  
*T. acaulon* var. *pilifera* (Hedw.) R.H. Zander [Tüylü kurucan] Loc: 127, Substr: S, GZD 1790  
*T. atrovirens* (Sm.) Lindb. [Küt kurucan] Loc: 5, Substr: R, GZD 426  
*T. brevissima* Schiffn. [Narin kurucan] Loc: 5, 39, 51, 168, 180, Substr: S, GZD 391  
*T. canescens* Mont. [Boz kurucan] Loc: 107, 127, Substr: R, SCR, GZD 1789  
*T. caucasica* Broth. [Kaf kurucan] Loc: 144, Substr: S, GZD 1961  
*T. cuneifolia* (Dicks.) Turner [Seyrek kurucan] Loc: 47, 66, 91, 96, 118, 158, 165, 171, Substr: S, R, SCR, GZD 1075  
*T. inermis* (Brid.) Mont [Tüysüz kurucan] Loc: 2, 13, 18, 54, 57, 99, 105, 120, 133, 142, 156, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1954  
*T. marginata* (Bruch & Schimp.) Spruce [Kenarlı kurucan] Loc: 83, 84, 95, 96, Substr: S, GZD 1283  
*T. muralis* Hedw. [Kurucan] Loc: 2, 5, 45, 59, 65, 84, 104, 105, 118, 122, 127, 137, 153, 165, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1918  
*T. muralis* Hedw. var. *aestiva* Hedw. [Köse kurucan] Loc: 141, 154, Substr: SCR, GZD 409  
*T. subulata* Hedw. [Biz kurucan] Common, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1653  
*T. vahliana* (Schultz) Mont [Efe kurucan] Loc: 80, 122, 130, 180, Substr: R, SCR, GZD 1828  
*Streblotrichum convolutum* (Hedw.) P.Beauv. [Bol firçacık] Common, Substr: S, R, GZD 422  
*S. convolutum* P.Beauv. var. *commutatum* (Jur.) J.J. Amann [Yoz firçacık] Loc: 13, 95, 137, Substr: SCR, E, GZD 1918  
*Ephemerum serratum* (Hedw.) Hampe [Cüce tezgiden] Loc: 22, Substr: S, GZD 567  
*Eucladium verticillatum* (With.) Bruch & Schimp. [Sızıcık] Common, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1637  
*Gymnostomum aeruginosum* Sm. [Damlacık] Loc: 50, 108, Substr: SCR, GZD 1593  
*G. calcareum* Nees & Hornsch. [Kireç damlacık] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 1602  
*G. viridulum* Brid. [Yeşil damlacık] Loc: 21, 22, 39, 81, 100, 130, 163, Substr: S, R, SCR, GZD 1826  
*Gyroweisia tenuis* (Schrad. ex Hedw.) Schimp [Dilcikli] Loc: 24, 59, 63, 64, 101, 108, 114, 130, 135, 152, 163, 170, Substr: S, R, SCR, GZD 1823  
*Hydrogonium bolleanum* (Müll.Hal.) A.Jaeger [Dere firçacığı] Loc: 6, Substr: R, GZD 446  
*Hymenostylium recurvirostrum* (Hedw.) [İnce kıvrık] Loc: 23, Substr: R, GZD 573  
*Tortella flavovirens* (Bruch) Broth. [Kokar camtaban] Loc: 21, 107, 108, Substr: R, SCR, GZD 1577  
*T. humilis* (Hedw.) Jenn. [Bodur camtaban] Loc: 48, 107, 108, 115, 130, 151, Substr: S, R, SCR, GZD 2027  
*T. nitida* (Lindb.) Broth. [Cıbil camtaban] Loc: 108, 115, Substr: R, GZD 1589  
*T. squarrosa* (Brid.) Limpr. [Dönük camtaban] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 427  
*T. tortuosa* (Hedw.) Limpr. [Camtaban] Loc: 2, 45, 49, 50, 52, 60, 69, 77, 82, 92, 114, 133, 179, Substr: S, SCR, GZD 1026  
*Trichostomum brachydontium* Bruch [Dik kayıkçık] Loc: 24, 69, 125, Substr: S, GZD 1607  
*T. crispulum* Bruch [Kayıkçık] Common, Substr: S, R, SCR, GZD 1775  
*Weissia brachycarpa* (Nees & Hornsch.) Jur. [Kısa kıvrıklı] Loc: 66, 67, Substr: S, GZD 1099  
*W. condensa* (Voit) Lindb. [Bol kıvrıklı] Loc: 87, 95, 100, 107, 111, 148, Substr: S, R, SCR, GZD 1508  
*W. controversa* Hedw. [Kıvrıklı] Common, Substr: S, SCR, GZD 1620  
*W. longifolia* Mitt. [Uzun kıvrıklı] Loc: 148, Substr: S, GZD 2003
- 10- GRIMMIACEAE [YASTIKÇIKGİLLER]**  
*Grimmia anodon* Bruch & Schimp. [Düz yastıkçık] Loc: 17, 124, GZD Substr: S, R, 1757  
*G. dissumulata* E. Maier [Zeytin yastıkçık] Loc: 88, Substr: S, GZD 1327  
*G. elongata* Kaulf. [Boylu yastıkçık] Loc: 28, 80, 105, 125, 135, 142, 129, 133, 148, Substr: R, SCR, GZD 1869  
*G. funalis* (Schwägr.) Bruch & Schimp. [Sarı yastıkçık] Loc: 55, 66, 125, 133, 166, 169, Substr: R, GZD 1768  
*G. laevigata* (Brid.) Brid. [Akça yastıkçık] Loc: 17, 22, 46, 54, 55, 67, 80, 123, 129, 130, 142, 168, Substr: R, SCR, GZD 1815  
*G. lisae* De Not. [Cam yastıkçık] Loc: 14, 47, 50, 57, 58, 66, 88, 102, 106, 115, 123, 124, 136, 139, 148, 164, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1323  
*G. nutans* Bruch. [Öz yastıkçık] Loc: 130, Substr: SCR, GZD 1829  
*G. orbicularis* Bruch ex Wilson [Göz yastıkçık] Loc: 47, GZD 836  
*G. ovalis* (Hedw.) Lindb. [Katlı yastıkçık] Loc: 1, 2, 58, 87, 117, 145, 168, Substr: R, GZD 330  
*G. pulvinata* (Hedw.) Sm. [Yastıkçık] Common, Substr: R, SCR, GZD 1686  
*G. torquata* Hornsch. in Grev. [Kıvrımlı yastıkçık] Loc: 125, Substr: R, GZD 1766  
*G. trichophylla* Grev. [Bol yastıkçık] Loc: 86, 130, 133, 141, 148, Substr: SCR, GZD 1293



*Schistidium apocarpum* (Hedw.) Bruch & Schimp. [Aldışli] Loc: 53, 125, Substr: R, GZD 907

*S. confertum* (Funck) Bruch & Schimp. [Pek aldişli] Loc: 170, Substr: R, GZD 2153

*S. flaccidum* (De Not.) Ochyra [Öykü aldişli] Loc: 56, 124, 168, Substr: R, GZD 1762

*S. helveticum* (Schkuhr) Deguchi [Mine aldişli] Loc: 58, Substr: SCR, GZD 989

#### **11- HEDWIGIACEAE [AKTÜYLÜGİLLER]**

*Hedwigia ciliata* (Hedw.) P.Beauv [Aktüylü] Loc: 1, 31, 57, 58, 126, 133, Substr: R, GZD 1780

*H. stellata* Hedenäs [Kıvrık aktüylü] Loc: 14, 66, Substr: R, GZD 502

#### **12- BARTRAMIACEAE [KÜRELİGİLLER]**

*Anacolia webbii* (Mont.) Schimp. [Misketçik] Loc: 49, 55, 56, 58, 125, 18, 87, 124, 125, 142, 169, Substr: S, R, GZD 984

*Bartramia pomiformis* Hedw. [Kıvrık küreli] Loc: 14, 34, 36, 89, 92, 93, 125, Substr: S, R, GZD 1763

*B. aprica* Müll. Hal. [Kürelî] Loc: 2, 10, 50, 54, 57, 81, 83, 92, 129, 133, 136, 152, 155, 165, Substr: S, R, SCR, GZD 2030

#### **13- BRYACEAE [İLİMIKGİLLER]**

*Bryum argenteum* Hedw. [Boz ılımk] Loc: 30, 50, 95, 96, 111, 130, 142, 143, Substr: S, SCR, GZD 1958

*B. dichotomum* Hedw. [Al tomurcuklu] Loc: 41, 96, 99, 107, 111, 127, 143, 153, 164, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1789

*B. gemmilucens* (R.Wilczek & Demaret) J.R.Spence [Cüce tomurcuklu] Loc: 95, Substr: S, GZD 1437

*Ptychostomum capillare* (Hedw.) Holyoak & N.Pedersen [Gülilımk] Common, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1149

*P. cellulare* (Hook.) D.Bell & Holyoak [Dik ılımk] Loc: 64, 141, 146, Substr: S, SCR, GZD 1950

*P. cernuum* (Hedw.) Hornsch. [Damla karayosunu] Loc: 57, Substr: S, GZD 974

*P. donianum* (Grev.) Holyoak & N.Pedersen [Bey karayosunu] Loc: 57, 59, 97, 99, 134, 147, Substr: S, R, SCR, GZD 1880

*P. elegans* (Nees) D.Bell & Holyoak Loc: 54, Substr: S, GZD 916

*P. imbricatum* (Müll.Hal.) Holyoak & N.Pedersen [Pul tomurcuklu] Loc: 39, 96, 104, 105, 107, 129, 143, 163, 168, Substr: S, SCR, GZD 1578

*P. inclinatum* (Sw. ex Brid.) J.R.Spence [Ece karayosunu] Loc: 96, Substr: S, GZD 1468

*P. moravicum* (Podp.) Ros & Mazimpaka [Gür gülilımk] Loc: 93, Substr: SCR, GZD 1423

*P. pseudotriquetrum* (Hedw.) J.R.Spence & H.P.Ramsay ex D.T.Holyoak & N.Pedersen [Bol karayosunu] Loc: 78, 169, Substr: S, GZD 1221

*P. torquescens* (Bruch & Schimp.) J.R.Spence [Kıvrık gülilımk] Loc: 25, 43, 87, 88, 104, 156, Substr: S, R, GZD 2061

#### **14- MNIACEAE [YIŞILCAGİLLER]**

*Pohlia artropurpurea* (Wahlenb.) H. Lindb. [Mor balırcık] Loc: 125, Substr: S, GZD 1767

*P. elongata* Hedw. [Yaban balırcık] Loc: 36, 39, 145, Substr: S, GZD 1971

*P. melanodon* (Brid.) A.J. Shaw [Kara balırcık] Loc: 39, 120, Substr: S, GZD 1723

*P. wahlenbergii* (F.Weber & D.Mohr) A.L.Andrews var. *calcareo* (Warnst.) E.F.Warb. [Kireç balırcığı] Loc: 23, 59, Substr: R, GZD 576

*Epipterygium tozeri* (Grev.) Lindb. [Zarkanat] Loc: 145, Substr: S, GZD 1978

*Plagiomnium affine* (Blandow ex Funck) T.J.Kop. [Yatkın yışılcalı] Loc: 134, Substr: S, GZD 1886

*P. cuspidatum* (Hedw.) T.J. Kop. [Biz yışılcalı] Loc: 59, Substr: S, GZD 1018

*P. medium* (Bruch & Schimp.) T.J. Kop. [Orta yışılcalı] Loc: 69, 70, 77, 103, 134, 155, Substr: S, SCR, GZD 1886

*P. undulatum* (Hedw.) T.J. Kop. [Yışılcalı] Loc: 59, 78, 120, 139, Substr: S, R, E, GZD 1927

#### **15- ORTHOTRICHACEAE [YOSGUNCUKGİLLER]**

*Lewinskya acuminata* (H. Philib.) F. Lara, Garilleti & Goffinet [Sivri yosguncuk] Loc: 86, 141, Substr: E, GZD 1944

*L. affinis* (Schr. ex Brid.) F. Lara, Garilleti & Goffinet [Deli yosguncuk] Common, Substr: E, GZD 1872

*L. breviseta* (F. Lara, Garilleti & Mazimpaka) F. Lara, Garilleti & Goffinet [Kısa Yosguncuk] Loc: 126, Substr: E, GZD 1788

*L. rupestris* (Schleich. ex Schwägr.) F. Lara, Garilleti & Goffinet [Yosguncuk] Common, Substr: R, SCR, E, GZD 1746

*L. shawii* (Wilson) F. Lara, Garilleti & Goffinet [Çizik yosguncuk] Loc: 2, Substr: E, GZD 345

*L. speciosa* (Nees) F. Lara, Garilleti & Goffinet [Güz yosguncuk] Loc: 16, 56, 89, 92, 123, 132, 134, 167, 169, 172, Substr: E, GZD 682

*L. striata* (Hedw.) F. Lara, Garilleti & Goffinet [Koru yosguncuk] Loc: 67, 77, 88, 91, 105, 118, 123, 127, 132, 137, 139, 143, 170, Substr: E, GZD 1750

*Orthotrichum bistratosum* (Schiffn.) Guerra [Katlı yosguncuk] Loc: 59, 68, 87, 130, 146, Substr: S, R, GZD 1303

*O. cupulatum* Hoffm. ex Brid. [Yosguncuk] Loc: 17, 53, 67, Substr: R, SCR, E, GZD 908

*O. diaphanum* Schrad. ex Brid. [Tüylü yosguncuk] Common, Substr: R, SCR, E, GZD 1712

*O. macrocephalum* F.Lara, Garilleti & V. Mazimpaka [Kabuklu yosguncuk] Loc: 143, 154, Substr: E, GZD 1959

*O. pallens* Bruch ex Brid. [Soluk yosguncuk] Loc: 37, 91, 136, 141, 153, Substr: E, GZD 699

*O. pulchellum* Brunt. [Kit yosguncuk] Loc: 51, Substr: E, GZD 899

- O. pumilum* Sw. ex anon. [Bıdık yosguncuk] Loc: 50, 57, 72, 86, 87, 91, 132, 140, 165, Substr: R, E, GZD 1858  
*O. scanicum* Gronvall [Uçlu yosguncuk] Loc: 44, 52, 173, Substr: E, GZD 2166  
*O. schimperi* Hammar [Şirin yosguncuk] Loc: 8, 91, Substr: E, GZD 455  
*O. stellatum* Brid. [Yıldız yosguncuk] Loc: 167, Substr: E, GZD 2117  
*O. tenellum* Bruch ex Brid. [İnce yosguncuk] Loc: 2, 17, 21, 51, 52, 59, 91-106-120-129-131-134-136-137-140, 172, Substr: R, E, GZD 331  
*Pulviger a lyellii* (Hook. & Taylor) Plášek, Sawicki & Ochyra [Paslı yosguncuk] Common, Substr: E, GZD 1756  
*Zygodon catarinoides* C. Garcia, F. Lara, Sérgio & Sim-Sim [Katlı girişik] Loc: 119, 120, Substr: E, GZD 1720  
*Z. rupestris* Schimp. ex Lorentz [Girişik] Common, Substr: R, E, GZD 1788  
*Z. viridissimus* (Dicks.) Brid. [Yeşil girişik] Loc: 167, Substr: E, GZD 2127
- 16- AULACOMNIACEAE [YİVLİCEGİLLER]**  
*Aulacomnium androgynum* (Hedw.) Schwägr. [Er yivlice] Loc: 89, Substr: E, GZD 1355
- 17- FABRONIACEAE [KADEHLİGİLLER]**  
*Fabronia pusilla* Raddi. [Kadehli] Common, Substr: SCR, E, GZD 1581
- 18- PTERYGYNANDRACEAE [TELKİLİMGİLLER]**  
*Pterigynandrum filiforme* Hedw. [Telkilim] Loc: 88, Substr: R, GZD 1324
- 19- HABRODONTACEAE [KABUKTÜYÜGİLLER]**  
*Habrodon perpusillus* (De Not.) Lindb. [Kabuktüyü] Loc: 120, 136, Substr: E, GZD 1913
- 20- AMBLYSTEGIACEAE [ÜSÜMGİLLER]**  
*Cratoneuron filicinum* (Hedw.) Spruce [Kancacık] Loc: 26, 56, 60, Substr: R, SCR, GZD 611  
*Palustriella commutata* (Hedw.) Ochyra [Kancalı] Loc: 23, Substr: R, GZD 578  
*Amblystegium serpens* (Hedw.) Schimp. [Üsüm] Loc: 71, 77, 120, 154, 166, Substr: S, R, GZD 1731  
*Hygroamblystegium humile* (P.Beauv.) Vanderp., Goffinet & Hedenäs [Koca yaşüsüm] Loc: 89, Substr: E, GZD 1363  
*H. tenax* (Hedw.) Jenn. [Yaşüsüm] Loc: 23, 26, 76, 116, Substr: R, SCR, GZD 1199  
*H. varium* (Hedw.) Mönk. [Ala yaşüsüm] Loc: 139, Substr: S, GZD 1933  
*Leptodictyum riparium* (Hedw.) Warnst. [Islak dereüsümü] Loc: 89, Substr: E, GZD 1362
- 21- BRACHYTHECIACEAE [ÖSÜMLÜKGİLLER]**  
*Eurhynchium striatum* (Hedw.) Schimp. [Dikburun] Loc: 25, Substr: S, GZD 596  
*Rhynchostegium confertum* (Dicks.) Schimp. [İnce gagalık] Loc: 88, 89, Substr: S, GZD 1318  
*R. megapolitanum* (Blandow ex F. Weber & D. Mohr) Schimp. [Kaba gagalık] Loc: 89, 173, Substr: S, GZD 1352  
*R. riparioides* (Hedw.) Cardot [Gagalık] Loc: 26, 77, 88, 101, 106, 134, 140, 147, 149, 153, 154, 164, Substr: R, SCR, GZD 1523  
*Scorpiurium circinatum* (Bruch) M. Fleisch. & Loeske [Kıvrık akrepli] Loc: 4, 21, 50, 59, 108, 114, 128, 151, Substr: S, SCR, GZD 2026  
*S. deflexifolium* (Solms) M. Fleisch. & Loeske [Küt akrepli] Loc: 68, 71, Substr: R, GZD 1119  
*S. sendtneri* (Schimp.) [Akrepli] Loc: 21, 28, 50, 134, 150, Substr: R, E, GZD 1891  
*Cirriphyllum crassinervium* (Taylor) Loeske & M. Fleisch. [Kaba tuğluca] Loc: 34, 69, Substr: R, E, GZD 1129  
*Microeurhynchium pumilum* (Wilson) Ignatov & Vanderp. [Cüce dikburun] Loc: 59, 70, 153, Substr: S, R, SCR, GZD 1013  
*Oxyrrhynchium hians* (Hedw.) Loeske [İri emzikli] Loc: 4, 6, 56, 67, 69, 77, 78, 92, 103, 118, 120, 134, 136, 139, 145, 154, Substr: S, R, SCR, GZD 365  
*O. schleicheri* (R. Hedw.) Röhl [Kıvrık emzikli] Loc: 4, 59, 67, 158, 166, 167, Substr: S, R, GZD 361  
*O. speciosum* (Brid.) Warnst [Emzikli] Loc: 4, 35, 71, 77, 89, 120, Substr: S, R, GZD 1142  
*Rhynchostegiella curviseta* (Brid.) Limpr. [Kıvrık gagalıca] Loc: 28, 70, 77, 103, 134, 140, Substr: S, R, SCR, GZD 1539  
*R. litorea* (De Not.) Limpr. [Taş gagalıcası] Loc: 13, 14, 89, 92, 97, 115, 120, Substr: S, R, E, GZD 1358  
*R. teneriffae* (Mont.) Dirkse & Bouman [Narin gagalıca] Loc: 59, Substr: R, GZD 1005  
*Brachytheciastrum velutinum* (Hedw.) Ignatov & Huttunen [Kadifeli] Loc: 29, 36, 43, 50, 70, 89, 92, 93, 108, 117, 167, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1597  
*Brachythecium albicans* (Hedw.) Schimp. [Ak ösümlük] Loc: 43, 50, 67, 134, Substr: R, GZD 1087  
*B. rivulare* Schimp. [Islak ösümlük] Loc: Common, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1773  
*B. rutabulum* (Hedw.) Schimp. [Kaba ösümlük] Loc: Common, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1671  
*Eurhynchiastrum pulchellum* (Hedw.) Ignatov & Huttunen [Hunicik] Loc: 36, 77, 82, 93, 116, 120, 134, Substr: S, R, SCR, GZD 1265  
*Homalothecium lutescens* (Hedw.) H. Robins [Yeşil Halıcık] Loc: 21, Substr: E, GZD 547  
*H. sericeum* (Hedw.) Schimp. [Halıcık] Common, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1718  
*Kindbergia praelonga* (Hedw.) Ochyra [Narince] Loc: 34, 59, Substr: S, GZD 671  
*Sciuro-hypnum starkei* (Brid.) Ignatov & Huttunen [Bey ösümce] Loc: 43, Substr: SCR, GZD 802  
*Scleropodium cespitans* (Wilson ex Müll. Hal.) L.F. Koch. [Cemrecik] Loc: 77, 82, 86, 89, 90, 99, 102, 117, 125, 166, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1202

*S. tourettii* (Brid.) L.F. Koch. [Bey cemrecik] Loc: 21, 25, 34, 50, 56, 57, 66, 81, 104, 131, 150, 169, Substr: S, E, GZD 2022

## 22- HYPNACEAE [ORAKLIGİLLER]

*Hypnum andoi* A.J.E. Sm. [Bay oraklı] Loc: 25, Substr: SCR, GZD 597

*H. cupressiforme* Hedw. [Oraklı] Common, Substr: S, SCR, GZD 1799

*H. cupressiforme* Hedw. var. *lacunosum* Brid. [Kaba oraklı] Loc: 58, Substr: SCR, GZD 988

*H. resupinatum* Taylor [Zarif oraklı] Loc: 21, 25, 89, Substr: E, GZD 599

## 23- LEUCODONTACEAE [ÖRTENCEGİLLER]

*Leucodon sciuroides* (Hedw.) Schwägr. [Örtence] Common, Substr: R, SCR, E, GZD 1916

*Nogopterium gracile* (Hedw.) Crosby & W.R. Buck [Örtücü] Common, Substr: R, SCR, E, GZD 1527

## 24- ANTITRICHACEAE [TELLİCANGİLLER]

*Antitrichia californica* Sull. [Tellican] Common, Substr: R, SCR, E, GZD 1760

*A. curtipendula* (Hedw.) Brid. [Kaba tellican] Loc: 126, Substr: R, GZD 1782

## 25- NECKERACEAE [YIŞSACAĞIGİLLER]

*Leptodon smithii* (Hedw.) F. Weber & D. Mohr [Kayasaçağı] Loc: 59, 63, 120, 126, 131, 133, 134, 136, Substr: S, R, SCR, E, GZD 1850

*Neckera menziesii* Drumm [Yışsaçağı] Loc: 125, 126, 131, 169, Substr: R, GZD 1772

## 26- LEMBOPHYLLACEAE [BALIRLIKİLLER]

*Isoetecium alopecuroides* (Lam. ex Dubois) Isov. [Bol balırlık] Loc: 69, 100, Substr: S, R, GZD 1134

*I. myosuroides* Brid. [Balırlık] Loc: 28, 119, Substr: S, R, GZD 634

## 4. Conclusions and discussion

268 bryophyte records obtained from the research area indicate the highest rate of representation among bryofloristic studies conducted in nearby regions to date [2, 12, 13]. Ricciaceae (17 taxa belonging to 1 genus), Aytoniaceae (4 taxa belonging to 3 genera), Fossombroniaceae (4 taxa belonging to 1 genus), Southbyaceae (3 taxa belonging to 2 genera) and Cephaloziellaceae (3 taxa belonging to 1 genus) families with 8 genera and 31 taxa constitute 60,7 % of the liverworts in study area. Considering the taxa determined from the research area at the genus level, *Riccia* emerges as the richest genus with 17 taxa. While *Fossombronia* is the second with 4 taxa, *Cephaloziella* and *Porella* are represented by 3, *Sphaerocarpos*, *Mannia*, *Southbya*, 2 taxa each. *Reboulia hemisphaerica*, one of the liverworts distributed in the study area, is the most common taxon when the percentage ratio is calculated according to the number of localities (34,6 %). This taxon is followed by *Lunularia cruciata*, *Riccia sorocarpa*, *Mannia androgyna*, *Targionia hypophylla*, *Corsinia coriandrina* and *Fossombronia pusilla*, respectively. As it can be understood from the floristic list, many ephemeral liverwort records were given from our research area. Among these, the genus *Riccia* has a very important place in terms of the taxa it contains. The representation rate of this genus, which is represented by approximately 250 taxa in the world [21], in our country has increased to 28 (26 species and 2 subspecies) in recent studies [19, 20]. The genus *Riccia* determined from the research area constitutes 60% of the total number in our country with 17 taxa, and Aydın Mountains is seen as an important refuge area for this genus. Among the liverworts recorded in our research area, there are also taxa with limited distribution. *Scapania undulata*, *Fossombronia caespitiformis*, *F. echinata*, *Petalophyllum ralfsii*, *Gongylanthus ericeterum*, *Southbya nigrella*, *Cephaloziella baumgartneri*, *Solenostoma hyalinum* and *Marsupella emarginata* are examples of this category. *Scapania undulata* is one of the remarkable taxa among liverworts. Especially, this taxon, which is more common in the Black Sea Region, was also recorded in Western Anatolia [17]. It was found in only one locality in our study area. This finding can be considered as an indication of the formation of microhabitats in the north-facing and relatively heavy rainfall areas of the Aydın Mountains. The presence of the high cover *Conocephalum conicum* in the areas where *Scapania* congregates supports this situation. Another remarkable liverwort taxon included in our list is *Solenostoma hyalinum*, primarily found in the eastern Black Sea Region. Like *Scapania*, it thrives in acidic or slightly calcareous streams and in permanently moist, sandy, or clayey areas. Similarly, *Marsupella emarginata* is a common taxon in the Eastern Black Sea Region. This taxon, registered in Kütahya province, is likely to appear in different localities in Western Anatolia depending on the appropriate environmental conditions [17].

Pottiaceae (75 taxa belonging to 21 genera), Brachytheciaceae (26 taxa belonging to 14 genera), Orthotrichaceae (22 taxa belonging to 4 genera), Grimmiaceae (16 taxa belonging to 2 genera), Bryaceae (13 taxa belonging to 2 genera), Fissidentaceae (9 taxa belonging to 1 genus), Miniaceae (9 taxa belonging to 2 genera), Amblystegiaceae (7 taxa belonging to 5 genera), Funariaceae (6 taxa belonging to 2 genera), Hypnaceae (4 taxa belonging to 1 genus) and Ditrichaceae (4 taxa belonging to 3 genera) are the most crowded family among the other families. These families constitute 88,4 % of the mosses in our research area with a total of 57 genera and 191 taxa. *Tortula* and *Didymodon* with 13, *Grimmia* and *Syntrichia* with 12, *Orthotrichum* with 11, *Ptychostomum* with 10, *Fissidens* with 9, *Lewinskya* with 7 and *Tortella* with 5 is the most crowded genera among the flora. A very large percentage of these families and the taxa they encompass include taxa adapted to xeric environments and this observation aligns with findings from other studies conducted in the region [2, 10, 12, 13]. Among the mosses

distributed in the study area, the most common taxa are *Grimmia pulvinata*, *Homalothecium sericeum*, *Didymodon luridus*, *Dicranella howei*, *D. insulanus*, *D. acutus*, *D. vinealis*, *Barbula unguiculata*, *Syntrichia princeps*, *Tortella squarrosa*, *Lewinskya rupestris*, *Orthotricum diaphanum*, *Brachytecium rutabulum*, *Fissidens viridulus*, *Funaria hygrometrica*. *Grimmia torquata* was recently collected from the research area and added to the bryophytes of Turkey as a new record [14]. With the addition of the new record, the number of representative taxa of the genus in Turkey increased to 32 [16]. *Acaulon mediterraneum* was determined as the 2nd record, *Fissidens arnoldii*, *Pohlia arthropurpurea*, *Lewinskya shawii*, *Acaulon fontiquerianum* and *Crossidium aberans* as the 3rd record [2, 5, 6, 11, 12, 13, 20].

*Grimmia elongata*, previously recorded in Trabzon, Rize, Giresun, Gümüşhane, Kastamonu, Bartın, Zonguldak, Artvin, Ordu, Iğdır and Ankara in earlier studies, has now been discovered in 8 different localities in our research area [18]. The taxon, which has a distribution in different habitats from 30 m to 1330 m in our research area, is likely to be found in other parts of the country. The genus *Plagiomnium*, which always prefers moist and wet places, is represented by 8 taxa in our country and generally spreads in the Black Sea Region of these, *P. medium* was recorded from a single locality in Western Anatolia [18]. The taxon, which we frequently encounter in our research area, continues to thrive in suitable habitats in the Aydın Mountains. Although the basement rock formation of our study area is composed of schists, in some localities, limestone rocks are encountered among this formation. The waters, particularly enriched with CaCO<sub>3</sub>, especially when they percolate through these rocks, interact with the CO<sub>2</sub> released through the respiration of mosses and other plants that grow in these areas. This interaction leads to the precipitation of calcium bicarbonate. The most common taxa in this special habitat, also called the Tufa formation, are *Bryum cellulare*, *Eucladium verticillatum*, *Didymodon tophaceus*, *Gymnostomum calcareum*, *Pellia endiviifolia*, *Southbya tophacea*.

Finally, in this study, a Turkish name was suggested for *Grimmia torquata* which were newly recorded in our country and *Southbyaceae*. *Grimmia torquata* has been named "Kıvrımlı yastıkcık" and *Southbyaceae* has been named "Gerçekyakalığiller".

Even though Western Anatolia, including our research area, has been one of the most studied regions for bryophytes, it continues to yield new records, indicating its richness in terms of bryophyte diversity. The completion of this study holds significant importance in further uncovering and understanding the bryophyte diversity present in Western Anatolia.

#### Acknowledgements

We would like to express our sincere gratitude to TUBITAK for their financial support to Mesut Kırmacı (TBAG 119Z393). Additionally, we extend our heartfelt thanks to Prof. Dr. Adnan ERDAĞ for his invaluable assistance in laboratory studies.

#### References

- [1] Abay, G., Erata, H., Batan, N. & Özdemir, T. (2021). Two new records for the bryophyte flora of Turkey and Southwest Asia. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 156(4), 875-881.
- [2] Ağcagil, E., Kırmacı, M. & Özenoğlu, H. (2020). The bryophyte flora of Samsun Mountain (Aydın/Turkey). *Acta Biologica Turcica*, 33, 193-204.
- [3] Batan, N. & Özdemir, T. (2016). The bryophyte flora of Burdur province (Turkey). *Arctoa*, 25(1), 160-170.
- [4] Çatak, U. & Kırmacı, M. (2020). Epiphytic bryophyte flora of *Liquidambar orientalis* forests. *Anatolian Bryology*, 6(2), 70-77. doi:10.26672/anatolianbryology.715769
- [5] Erdağ, A. & Kürschner, H. (2009). New national and regional bryophyte records, 20. *Fissidens arnoldii*, Turkey. *Journal of Bryology*, 31, 56.
- [6] Ezer T., Kara R., Seyli, T. & Ertek, A. (2015). The bryophyte flora of Aladağlar national park (Turkey). *Folia Cryptogamica Estonica*, 52, 7-20.
- [7] Hodgetts, N., Cáliz, M., Englefield, E., Fettes, N., García Criado, M., Patin, L., ... Żarnowiec, J. (2019). A miniature world in decline: European Red List of Mosses, Liverworts and Hornworts. Belgium: Brussels.
- [8] Hodgetts, N. G., Söderström, L., Blockeel, T.L., Caspari, S., Ignatov, M.S., Konstantinova, N.A., ... Porley, R.D. (2020). An annotated checklist of bryophytes of Europe, Macaronesia and Cyprus. *Journal of Bryology*, 42, 1-116.
- [9] Kırmacı, M. (2008). Tufa formation originating from bryophytes in Babadağ and Honaz Mountain (Denizli/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 1, 116-126.
- [10] Kırmacı, M. & Ağcagil, E. (2009). The bryophyte flora in the urban area of Aydın (Turkey). *International Journal of Botany*, 5(3), 216-225.

- [11] Kırmacı, M. & Ağcagil, E. (2012). *Crossidium aberrans* Holz. & E.B.Bartram. In Ellis, J. (Ed.), New national and regional bryophyte records 33. *Journal of Bryology*, 281-282.
- [12] Kırmacı, M., Ağcagil, E. & Aslan, G. (2013). The Bryophyte Flora of Ancient Cities of Aydın Province (Turkey). *Botanica Serbica*, 37(1), 31-38.
- [13] Kırmacı, M. & Ağcagil, E. (2018). The bryophyte flora of Fethiye Babadağ (Muğla/Turkey). *Anatolian Bryology*, 4(1), 17-30. doi: 10.26672/anatolianbryology.389216
- [14] Kırmacı, M., Aslan, G. & Özenoğlu, H. (2022). *Grimmia torquata* Drumm. In Ellis, J. (Ed.), New national and regional bryophyte records, 69. *Journal of Bryology*, 44(1), 87-102.
- [15] Kürschner, H. & Erdağ, A. (2017). Türkiye Bitkileri Listesi Karayosunları. İstanbul: ANG Vakfı.
- [16] Kürschner, H. & Frey, W. (2020). Liverworts, mosses and hornworts of Southwest Asia (Marchantiophyta, Bryophyta, Anthocerotophyta) second enlarged and revised edition. Stuttgart: J. Cramer in Borntraeger Science Publishers.
- [17] Kürschner, H. & Erdağ, A. (2020). Bryophyte locality data from the Near and Middle East, Anthocerotophyta/Marchantiophyta 1775-2019. İstanbul: Hiperlink.
- [18] Kürschner, H. & Erdağ, A. (2021). Bryophyte locality data from the Near and Middle East 1775-2019. İstanbul: Hiperlink.
- [19] Özenoğlu, H., Kırmacı, M. & Kiremit, F. (2019). Contributions to the genus *Riccia* L. (Ricciaceae) in Turkey. *Turk Journal of Botany*, 43(2), 253-261. doi:10.3906/bot-1801-25
- [20] Özenoğlu, H. & Kırmacı, M. (2022). *Riccia anatolica* sp. nov. a new liverwort (Ricciaceae) species from Turkey. *Phytotaxa*, 532(1), 78-84.
- [21] Söderström, L., Hagborg, A., Von Konrat, M., Bartholomew-Began, S., Bell, D., Briscoe, L., ... Zhu, R.L. (2016). World checklist of hornworts and liverworts. *PhytoKeys*, 59, 1-828. doi:10.3897/phytokeys.59.6261
- [22] Tonguç Yayıntaş, Ö. (2001). Moss flora of Muğla and its environment. *Ot Sistemik Botanik Dergisi*, 8, 95-111.
- [23] URL 1. <https://www.tropicos.org/> [Accessed: 10 August 2023].
- [24] Uygur, A., Ezer, T., Erkul Karaman, S. & Alataş, M. (2022a). The bryophyte flora of Ermenek Valley (Karaman, Mersin-Turkey). *Anatolian Bryology*, 8(1), 37-49.
- [25] Uygur, A., Ezer, T. & Alataş, M. (2022b). Toros Dağları briyofit florasına katkılar. *Anatolian Bryology*, 8(2), 96-105.



## Anatomy, palynology and seed micromorphology of Turkish rare *Verbascum racemiferum* Boiss. & Hausskkn Ex Boiss. (Scrophulariaceae)

Fatma MUNGAN KILIÇ<sup>1</sup>, Murat KILIÇ<sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0001-6858-3458; 0000-0002-6408-9660

<sup>1</sup> Department of Crops and Animal Production, Mardin Artuklu University, 47200 Mardin, Artuklu, Türkiye

### Abstract

*Verbascum racemiferum* Boiss. & Hausskkn ex Boiss. is a member of the *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) genus called as "Sığırkuyruğu" in Turkish name. It is a rare species that grows in Turkey which is the center of endemism for *Verbascum* species. In this study, the anatomical, palynological and seed micromorphological features of *V. racemiferum*, which is known to grow only in Mardin in the Southeastern Anatolia region, were investigated for the first time. In the root cross-section, the xylem elements occupy a considerable area. In the stem cross-section, the upper part of the epidermis cells is surrounded by a separate cuticle layer and the pith region covers a large area. The main vein of the leaf is shaped as collateral bundle. Idioblasts were observed in the leaves of *V. racemiferum*. Pollen grains of *V. racemiferum* are tricolporate-tricolpate, spheroidal; P/E ratio is 0.96 and exine ornamentation is reticulate. Seeds of *V. racemiferum* are brown and oblong-ovate to prismatic and alveolate. The apex is acute beak. The seed coat ornamentation is irregular polygonal cells, with densely and distinct vesicles. In addition, this study will be a reference to studies on the genus *Verbascum*.

**Key words:** anatomy, Mardin, pollen, seed, SEM, *Verbascum*

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

### Türkiye nadir *Verbascum racemiferum* Boiss. & Hausskkn Ex Boiss. (Scrophulariaceae) anatomisi, palinolojisi ve tohum mikromorfolojisi

#### Özet

*Verbascum racemiferum* Boiss. & Hausskkn ex Boiss. "Sığırkuyruğu" olarak bilinen *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) cinsinin bir üyesidir. Tür, *Verbascum* türleri için endemizm merkezi olan Türkiye'de yetişen nadir bir türdür. Bu çalışmada Güneydoğu Anadolu bölgesinde sadece Mardin'de yetiştiği bilinen *V. racemiferum*' un anatomik, palinolojik ve tohum mikromorfolojik özellikleri ilk kez araştırılmıştır. Kök kesitinde ksilem elemanları hatırı sayılır bir alan kaplar. Gövde kesitinde epidermis hücrelerinin üst kısmı ayrı bir kütikül tabakası ile çevrelenmiş olup, öz bölgesi geniş bir alanı kaplamaktadır. Yaprığın ana damarı kollateral demet şeklindedir. *V. racemiferum*' un yapraklarında idioblastlar gözlemlendi. *V. racemiferum*' un polen taneleri trikolporat-trikolpat, küreseldir; P/E oranı 0,96 olup ekzin süslemesi ağ şeklindedir. *V. racemiferum*' un tohumları kahverengidir ve dikdörtgen-oval ila prizmatik ve alveolattır. Tepe noktası keskin gagadır. Tohum kabuğu süslemesi, yoğun ve belirgin keseciklere sahip düzensiz çokgen hücrelerdir. Ayrıca bu çalışma *Verbascum* cinsi üzerinde yapılan çalışmalara da referans olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** anatomi, Mardin, polen, SEM, tohum, *Verbascum*

#### 1. Introduction

*Verbascum* L. genus, which is also known as "Sığırkuyruğu" in Anatolia, is one of the largest genera of the Scrophulariaceae family [1]. The genus, which is represented by more than 360 species in the world, grows widely in the temperate regions of the Northern Hemisphere, especially in the eastern part of Eurasia [2]. The general distribution area of *Verbascum* species is Anatolia, predominantly the Irano-Turanian phytogeographic region [3]. In Turkey, it is

<sup>1</sup> Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905364191581; Fax.: +904822134004; E-mail: mail.muratkiliç04@gmail.com

distributed with a total of 257 species and 132 additional hybrids under 13 groups, 80% of which are endemic and 130 of which are hybrids [3-4].

The genus *Verbascum* is one of the largest genera in terms of the number of species it contains, which is known to have problems in its diagnosis and taxonomy in general. There are few studies on the morphological and anatomical features of the genus [5]. There are Scanning Electron Microscope (SEM) studies on the pollen morphology of *Verbascum* species [6-13]. Additionally, researchers conducted studies on the seed micromorphology of the *Verbascum* genus [7, 13-16]. Anatomical studies on the genus are few [11-12, 17-20], there are still deficiencies and unstudied taxa in Turkey.

*Verbascum racemiferum* is a rare species that grows in Mardin in the Irano-Turanian phytogeographic region and is rare in our country [3]. According to Davis's grid system, *V. racemiferum* spreads in the C8 square.

In this study, anatomy, pollen, and seed micromorphology features of the rare *V. racemiferum* species were investigated for the first time. In addition, this study will be a reference to studies on the genus *Verbascum*.

## 2. Material and methods

This study was conducted on the rare *Verbascum racemiferum* species collected from Artuklu, Derik and Kızıltepe districts of Mardin province between 2022 and 2023 (Table 1). The plant collection studies were carried out in May, which is the flowering period of the *Verbascum* species. The treatises of Davis et al. [3] and Karavelioğulları [4] were used to identify the collected samples.

Collected specimens were preserved in falcon tubes in 70% alcohol for use in anatomical studies. Sections taken from the root, stem and leaf parts of the plants with the help of a razor were prepared by staining with safranin-fast green and examined under the light microscope and photographed [21].

Pollen samples used for palynological examinations were made according to Erdtman [22]. The pollen preparations examined were prepared according to the method of Wodehouse [23]. Anthers taken from the flowers of the herbarium specimens were placed on a clean slide and the thecae were opened with the help of a needle. It was cleaned by dropping a few drops of 96% ethanol onto it. This process was repeated twice and the alcohol was evaporated. The coverslip was covered by adding a few drops of glycerin gelatin dye melted on the heater and examined under a light microscope. For SEM, pollens were mounted directly onto the stubs using double-sided adhesive tape and coated with gold. The photomicrographs were taken with a ZEISS EVO 50 scanning electron microscope. The values of P (polar axis length), E (equatorial diameter), Clg (Colpus longitude [length]), Clt (Colpus latitude [width]), Plg (Polar longitude [length]), Plt (Polar latitude [width]), Ex (Exine thickness), and In (Intine thickness) were measured, and the P/E ratio was calculated, Apt (Aperture type), and Or (Ornamentation) for 30 pollen grains were measured under light microscope. The terminology of the pollen follows that of Punt et al. [24]. The values are presented as minimum, maximum and mean, that is represented in Table 3.

The measurements of the seeds were primarily made macromorphologically (length, width etc). Thirty mature seeds belonging to the *V. racemiferum* species were measured and their average values were taken. For SEM, seed residues were removed by distilled water treatment, air-dried seeds were then mounted on the cobs and covered. Photomicrographs were taken with a ZEISS EVO 50 scanning electron microscope. Terminology for the description of morphological features of mericarps has been applied [7, 14, 16]. SEM photographs of the species were interpreted.



Figure 1. General appearance of *V. racemiferum*

Table 1. *V. racemiferum* species used for anatomy and morphology studies and collected localities

Species	Group	Collection areas and habitat	Collector	Collector's number
<i>V. racemiferum</i>	F	Mardin: Kızıltepe, Ğurs villages, Karaman village location, roadside, rocky slope, 37°16'26"N 40°38'41"E, 620 m.	M. Kılıç F. Mungan Kılıç	M.Kılıç 249 M.Kılıç 320
		Mardin: Kızıltepe, Ğurs villages, after Karaman village, winding roadside, rocky slope, 37°16'40"N 40°38'24"E, 637 m.	M. Kılıç F. Mungan Kılıç	M.Kılıç 250 M.Kılıç 321 M.Kılıç 376
		Mardin: Kızıltepe, Başdeğirmen road, roadside, rocky slope, 37°16'31"N 40°32'41"E, 655 m.	M. Kılıç F. Mungan Kılıç	M.Kılıç 323-2 M.Kılıç 324
		Mardin: Artuklu, Yenişehir Neighborhood, Turkmenler road location, roadside, rocky slope, 37°18'36"N 40°42'46"E, 831 m.	M. Kılıç F. Mungan Kılıç	M.Kılıç 251
		Mardin: Artuklu, Yenişehir Neighborhood, Turkmenler road location, roadside, rocky slope, 37°18'38"N 40°42'46"E, 822 m.	M. Kılıç F. Mungan Kılıç	M.Kılıç 255 M.Kılıç 369
		Mardin: Derik, district exit location, roadside, stony area, 37°22'30"N 40°16'33"E, 862 m.	M. Kılıç F. Mungan Kılıç	M.Kılıç 276
		Mardin: Derik, Derik-Mazıdağı road, 2-3 km from Derik, roadside, rocky slopes, 37°23'20"N 40°17'19"E, 1.004 m.	M. Kılıç F. Mungan Kılıç	M.Kılıç 277
		Mardin: Derik, Derik-Mazıdağı road, 5-7 km from Derik, roadside, rocky slopes, 37°23'52"N 40°17'49"E, 1.083 m.	M. Kılıç F. Mungan Kılıç	M.Kılıç 278

### 3. Results

In this study, various features of anatomy, pollen, and seed structure of rare *Verbascum racemiferum* species are stated. Biometric measurements of the root, stem, and leaf tissues and cells are given in Table 2 and shown in Figure 2, 3, 4. The characteristics of pollen grains are summarized in Table 3 and shown in Figure 5. The morphological characters of the seed grains, including their size, shape, color, and surface characteristics, are summarized in Table 4 and shown in Figure 6.

#### 3.1. Anatomy

The root is of this species, the outer protective tissue peridermis usually consists of 7-10 layered cells. The primary parenchyma, located under the peridermis, comprised of oval, quadrangular, irregular cell rows limited to a narrow area. There is a multilayered secondary parenchyma between the primary parenchyma and the vascular bundle. There are 3-5 rows of phloem cells under the parenchyma. The cambium is indistinct. Xylem covers a larger area and fills the middle of the root. Tracheal cells are irregularly located, larger than tracheid cells, and longer than they are wide. Phloem occupies a narrower area than xylem (Figure 2, Table 2).

When cross-sections taken from the stem of *V. racemiferum* are examined; The epiderma consists of a single layer of regular cells and well-arranged cells. There are multicellular, glandular and non-glandular hairs in the epidermis. There are 3-5 rows of collenchyma cells just below the epidermis. After the collenchyma layer comes the parenchyma, which is generally wider than it is long and consists of oval and quadrangular cells. There are 2-4 rows of sclerenchyma layers under the parenchyma. Xylem covers a larger area than phloem. The trachea is usually longer than they are wide. The core region of the stem consists of large and small parenchymatic polygonal and round shaped cells (Figure 3, Table 2).

In the cross-section of the leaves of the species, the outer surface of the adaxial and abaxial epidermis is surrounded by a 2.25-6.21  $\mu$  thick cuticle. The adaxial and abaxial epidermis are single-layered and often have amaryllis-type stomata surrounded by 3-4 epidermis cells. The mesophyll consists of 2-3 rows of palisade parenchyma cells under the upper epidermis and 1-2 rows above the lower epidermis. Between the lower and upper palisade parenchyma cells, there are sponge parenchyma cells consisting of 2-3 rows of cells. There are glandular, eglandular and multicellular branched hairs on the adaxial and abaxial epidermis surfaces. Vasculer bundles are collateral. It is well developed and has a crescent shape that curves inwards. Xylem is located towards the upper epidermis, and phloem is located towards



the lower epidermis. In the xylem, tracheal elements are arranged radially, and there are thin-walled parenchymatic cells between them. Phloem lies below the xylem. There are 8-10 rows of distinct parenchyma cells under the upper epidermis. There are 15-20 rows of parenchymatic tissue under the phloem, down to the lower epidermis. The midrib is well developed. The parenchyma layer surrounding the vascular bundle covers a large area. Parenchymal tissue cells are polygonal and tightly arranged. Additionally, idioblasts are observed in the mesophyll tissue of the leaves (Figure 4, Table 2).

Table 2. The anatomical measurements of *V. racemiferum*

Tissues	Width ( $\mu$ )			Length( $\mu$ )		
	Min.	Mak.	Mean $\pm$ S.	Min.	Mak.	Mean $\pm$ S.
<b>Root</b>						
Peridermis cell	7.27	47.63	25.38 $\pm$ 10.25	6.37	22.48	16.50 $\pm$ 4.72
Parenchyma cell	9.70	53.65	28.60 $\pm$ 11.17	11.17	26.26	17.74 $\pm$ 5.12
Phloem cell	2.80	12.54	6.53 $\pm$ 3.01	2.32	7.59	4.48 $\pm$ 1.68
Trachea cell	14.53	81.49	44.51 $\pm$ 19.72	15.27	104.10	50.70 $\pm$ 27.13
<b>Stem</b>						
Cuticle	-	-	-	3.53	9.02	6.83 $\pm$ 1.88
Epidermis cell	11.93	31.68	19.80 $\pm$ 4.75	8.66	20.94	13.22 $\pm$ 3.10
Collenchyma cell	11.47	25.60	17.08 $\pm$ 3.78	9.54	21.74	15.20 $\pm$ 3.46
Parenchyma cell	12.85	41.66	23.85 $\pm$ 7.92	10.42	34.12	16.54 $\pm$ 5.34
Phloem cell	3.53	12.56	8.71 $\pm$ 2.80	3.62	10.15	6.31 $\pm$ 1.93
Trachea cell	8.88	18.09	12.65 $\pm$ 2.55	7.50	19.06	13.30 $\pm$ 3.80
Pith cell	49.85	130.29	83.22 $\pm$ 24.36	50.51	137.25	87.36 $\pm$ 28.76
<b>Leaf</b>						
Cuticle	-	-	-	2.25	6.21	3.88 $\pm$ 1.00
Upper epidermis cell	9.09	36.09	23.25 $\pm$ 10.20	8.68	29.09	15.85 $\pm$ 6.12
Palisade parenchyma	9.60	18.46	13.81 $\pm$ 2.34	26.72	48.48	33.20 $\pm$ 6.34
Spongy parenchyma	10.48	27.68	17.37 $\pm$ 3.63	12.72	24.98	17.77 $\pm$ 3.70
Mesophyll layer	-	-	-	114.71	249.51	199.07 $\pm$ 38.25
Lower epidermis cell	4.09	36.66	17.73 $\pm$ 8.75	6.11	23.02	12.30 $\pm$ 4.50

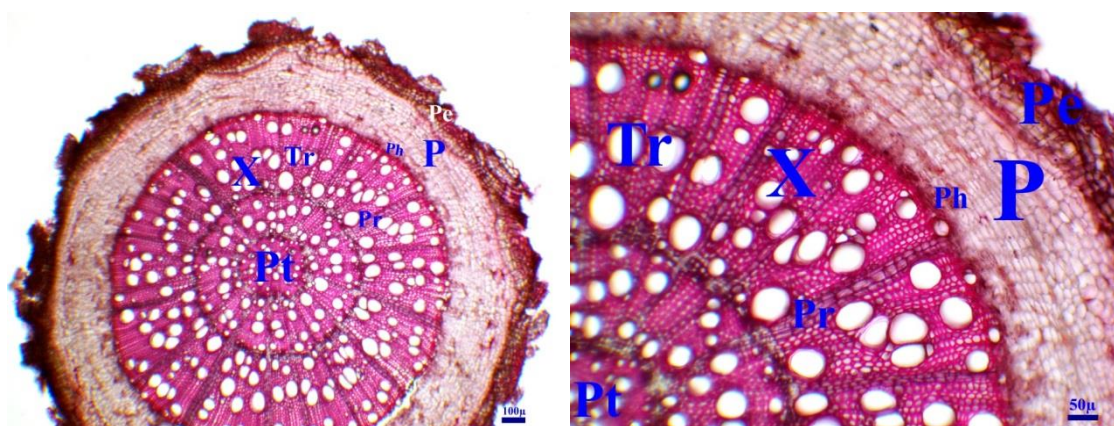


Figure 2. Cross-section of the root of *V. racemiferum*. Pe: Periderm, P: Parenchyma, Ph: Phloem, X: Xylem, Pr: Pith ray, Tr: Trachea, Pt: Pith region

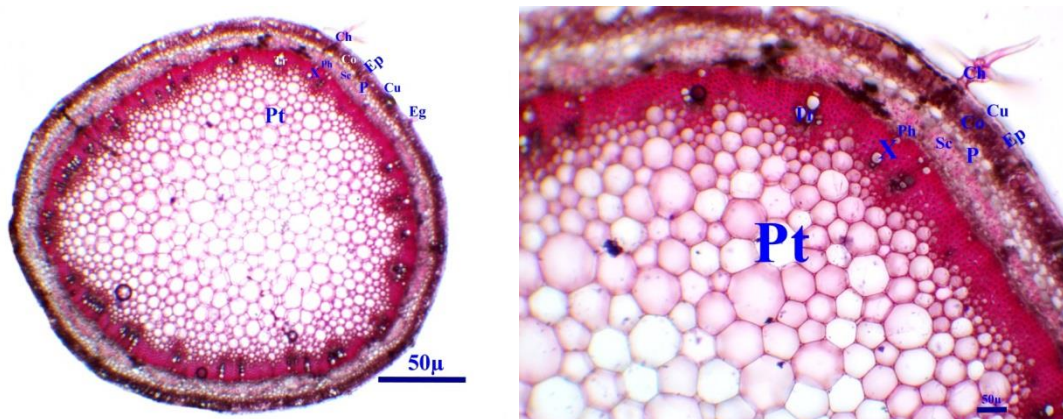


Figure 3. Cross-section of the stem of *V. racemiferum*. Eg: Eglandular hair, Ch: Compound hair, Cu: Cuticle, Ep: Epidermis, Co: Collenchyma, P: Parenchyma, Sc: Sclerenchyma, Ph: Phloem, X: Xylem, Tr: Trachea, Pt: Pith region

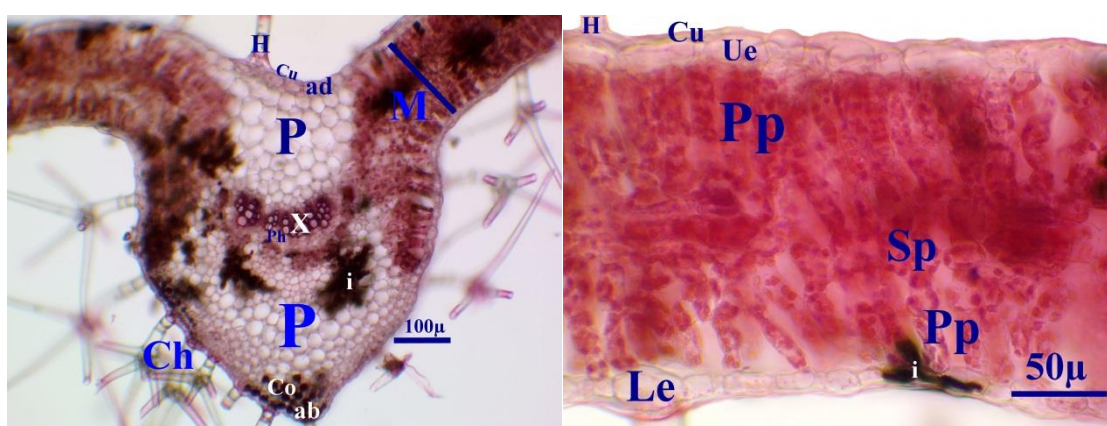


Figure 4. Cross-section of the leaves of *V. racemiferum*. H: Hair, Ch: Compound hair, M: Mesophyll layer, ad: Adaxial surface, Co: Collenchyma, P: Parenchyma, X: Xylem, Ph: Phloem, ab: Abaxial surface, Ue: Upper epidermis, Le: Lower epidermis, Pp: Palisade parenchyma, Sp: Spongy parenchyma, i: idioblast

### 3.2. Pollen morphology

The pollen dimensions of *Verbascum racemiferum* are isopolar and radially symmetric. The shape is spheroidal with a polar axis of 10.41-14.71  $\mu$  and an equatorial diameter of 10.85-14.16  $\mu$ . The pollen dimensions of *V. racemiferum* is tricolporate (20% tricolporate). The colpus length is (7.05-12.51  $\mu$ ) and width (2.04-3.70  $\mu$ ), margins distinct, regular, and ends acute. The porus is 3.12-5.47  $\mu$  in length and 2.60-4.64  $\mu$  in width. The exine thickness ranges from 0.67 to 1.20  $\mu$ . The intine thickness is 0.35-0.73  $\mu$  thin. Exine ornamentation is reticulate (Figure 5, Table 3).

### 3.3. Seed micromorphology

According to the measurements made, the dimensions vary between species from 0.53 to 0.96 mm in length and 0.23 to 0.56 mm in width. Prismatic-oblong to ovate with  $\pm$ shallow alveolate are the shapes of seeds. The seeds' acute beak. The seed is color brown. Because of the irregular polygonal and small rectangular cells, with densely and distinct vesicles, a networklike appearance is seen and the seed surface coat is longitudinally alveolate (Figure 6, Table 4).

## 4. Discussion

Analyzes of anatomy, pollen, and seeds of the rare *Verbascum racemiferum* species studied for the first time in this study make them comparable to some of the other *Verbascum* members investigated.

It was observed that *V. racemiferum* had a very large xylem area at the root and a thick cuticle layer on the stem. In addition, the same features were also noted by researchers [12, 17-20]. In some studies [12, 17], it was stated that the cambium was indeterminate in the vascular bundle in the root, and in this study, it was found that the root had similar characteristics for the species. In the leaf, cross-section analyses of the species, densely glandular, eglandular, and multicellular branched hairs were observed on the epidermal cells. Similar results have been reported for other investigated *Verbascum* species [12, 17, 19-20]. Idioblasts seen in the mesophyll tissue of the leaf can be considered a factor for identification within the genus *Verbascum* [25]. In this study, the presence of idioblasts in leaf mesophyll was determined and this feature was also noted in other studies [15, 18].

Table 3. Pollen morphological characters of *V. racemiferum*

Species	P ( $\mu$ ) min (mean) max	E ( $\mu$ ) min (mean) max	P/E ratio	Shape	Clg ( $\mu$ ) min (mean) max	Clt ( $\mu$ ) min (mean) max	Plg ( $\mu$ ) min (mean) max	Plt ( $\mu$ ) min (mean) max	Ex ( $\mu$ ) min (mean) max	In ( $\mu$ ) min (mean) max	Apt	Or
<i>V. racemiferum</i>	10.41 (11.70) 14.71	10.85 (12.12) 14.16	0.96	Spheroidal	7.05 (9.38) 12.51	2.04 (2.98) 3.70	3.12 (4.25) 5.47	2.60 (3.80) 4.64	0.67 (0.93) 1.20	0.35 (0.52) 0.73	80% Tricolporate 20% Tricolpate	Reticulate

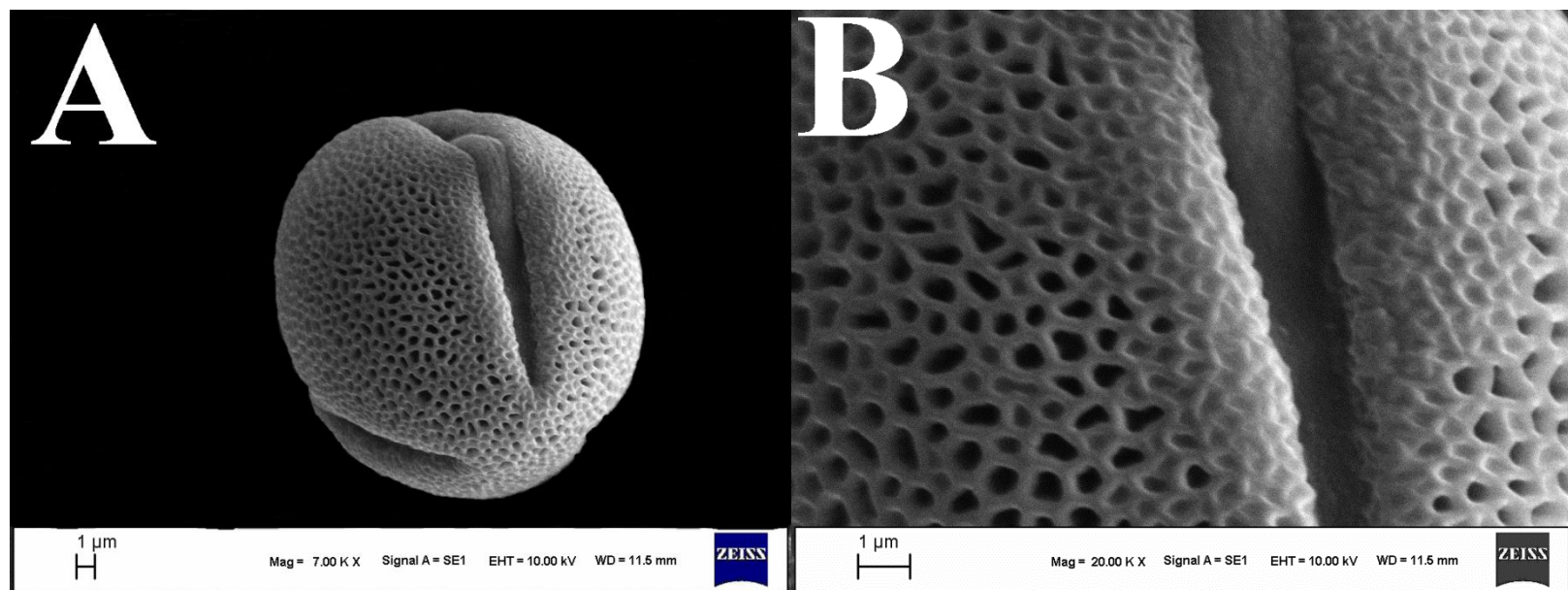
Figure 5. Scanning electron micrographs of pollen of *V. racemiferum*. A- Equatorial view, B- Exine sculpturing

Table 4. Seed morphological characters of *V. racemiferum*

Species	Group	Length (mm) min (mean) max	Width (mm) min (mean) max	Colour	Shape	Seed surface
<i>V. racemiferum</i>	F	0.53 (0.78) 0.96	0.23 (0.41) 0.57	Brown	Prismatic-oblong to ovate, with ±shallow alveolate, deep and broad back, acute beak	Irregular polygonal and small rectangular cells, with densely and distinct vesicles

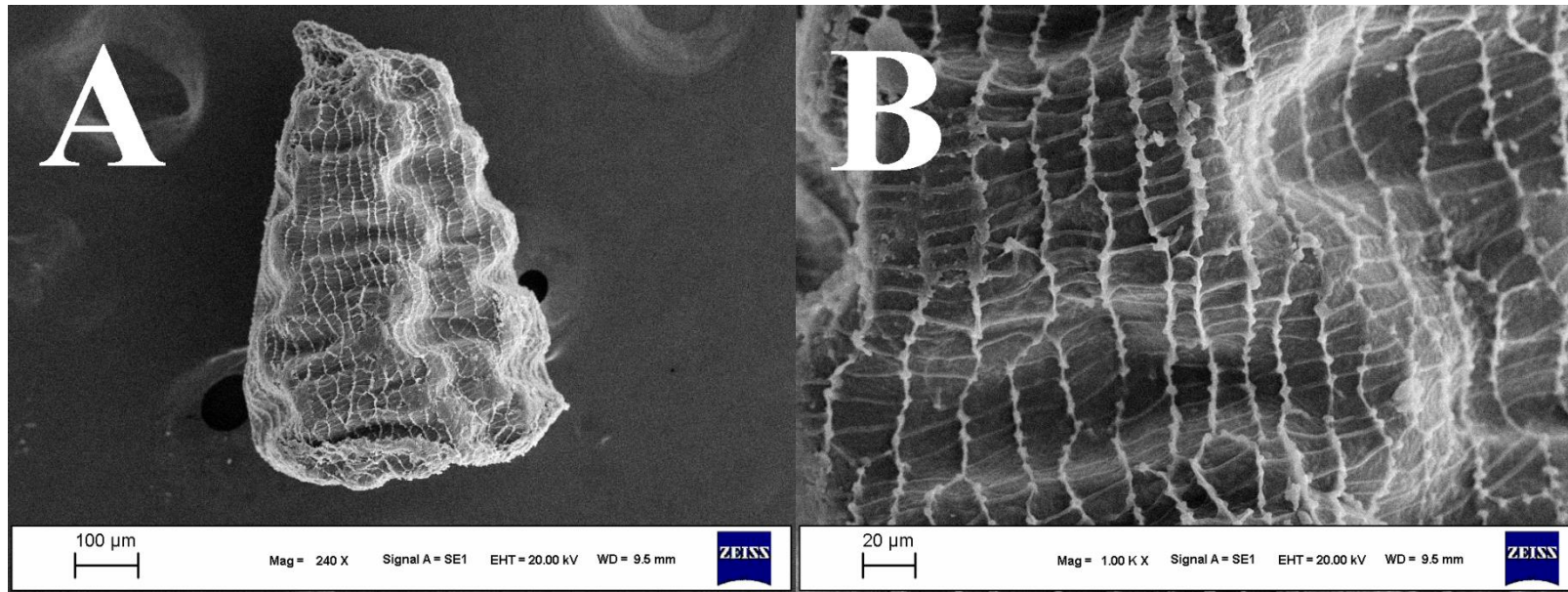


Figure 6. Scanning electron micrographs of seed of *V. racemiferum*. A- General appearance, B- Surface ornamentation

The pollen of rare *V. racemiferum* species isopolar and radially symmetric, spheroidal, tricolporate (there is tricolpate), the exine exhibits a tectate structure and reticulate ornamentation. Baser [13], in his study on *Verbascum* (8 species), established the pollen grains as tricolporate and tricolpate. Aktas et al. [12] determined the pollen grain as tricolpate in their study on the endemic *Verbascum* species. Aktas [11] noted the pollen grain as tricolpate in his study on *Verbascum* species. Öztürk et al. [10] reported that there were tricolporate and tricolpate aperture types in their pollen study on *Verbascum* (F groups). Al-Hadeethy et al. [9] in their study on 20 *Verbascum* species in Iraq, reported that the aperture types were tricolporate. In addition, it has been reported in other studies that the aperture type of *Verbascum* has a tricolporate aperture type [8, 15].

The pollen of the examined species was determined as spheroidal shape. However, Aktas et al. [12] recorded the prolate pollen shape in the endemic *Verbascum* species examined. Aktas [11] stated that the pollen shape of the species he researched has subprolate. Nevertheless, Baser [13] recorded the prolate pollen shape in the *Verbascum* (8 species) taxa in the studied. Öztürk et al. [10] stated that pollen shapes were prolate-spheroidal and oblate-spheroidal in the taxa studied. Asmat et al. [8] determined that the pollen grains of *V. thapsus* was oblate-spheroidal. Kheiri et al. [15] determined that the pollen of *V. mucronatum* species was prolate-spheroidal. In addition, Al-Hadeethy et al. [9] observed the presence of prolate-spheroidal and oblate-spheroidal pollen in *Verbascum* (20 species). Morphological pollen traits observed through LM proved not very important in their taxonomic use, but sculpting examined by SEM was found to be more significant in the classification of taxa [13].

It was determined that the exine thickness of the examined species was similar to studies [8-13] conducted on some species of *Verbascum*, therefore it was concluded that this character was very little taxonomic value [9]. However, the studied species showed a neat reticulate exine sculpture pattern.

The seeds were brown when mature. The size of the seed usually ranged between 0.53 to 0.96 mm in length and 0.23 to 0.56 mm in wide. Although Attar et al. [14] demonstrated that the size of the seed showed variations among the various populations of the same species, even among seeds in the same capsule, the experimental variation design in size was limited among the species. The measurements taken in the present study were compatible with those of the common species in the studies of Attar et al. [14] and Kheiri et al. [15]. Yet, the measurements taken in this study were larger than the mean measurements of the species common in Cabi et al. [16] study.

Seeds in shape from prismatic-oblong and ovate in the species studied, and they ended in an broad, acute beak. The seed coat was longitudinally alveolate. Usually, most seeds of the species are prismatic-oblong (Table 4, Figure 6). The result regarding seed shape is more or less consistent with the results of Baser [13], Attar et al. [14], Kheiri et al. [15], and Cabi et al. [16].

The rare species examined in this study was observed to be brown. Juan et al. [7] reported that the seeds of 10 *Verbascum* species grown in Spain were dark brown or black. Attar et al. [14] noted that the seeds of 22 *Verbascum* species grown in Iran were dark brown or black. Cabi et al. [16] also reported that the seeds of 30 *Verbascum* species grown in Turkey were dark brown or brown. Aktas [11] reported that the *Verbascum x splendidum* was dark brown. Aktas et al. [12] determined that the endemic *V. exuberans* was dark brown. However, Baser [13] determined that the seeds of eight *Verbascum* taxa grown in Turkey were dark brown or brown. According to the above findings, seed color cannot be used alone to make a delimitation between taxa.

As a result, the lack of a taxonomic and anatomical study on *V. racemiferum*, a rare species, makes the research important in terms of systematically introducing the species and genus.

## Acknowledgements

We wish to thank Scientific Investigation Project to Coordinate of Mardin Artuklu University (Project No. MAÜ.BAP.22.KMY.011) for financial support. We thank Veysel YILDIZ for their technical assistance with the scanning electron microscopy and photography.

## Data availability statement

There are no additional data for this paper.

## References

- [1] Heywood, V.H. (1993). Flowering plants of the world. Oxford Univ. Press.
- [2] Mabberley, D.J. (2008). Mabberley's plant-book (3th ed., p. 1021). Cambridge, Cambridge University Press.
- [3] Davis, P.H., Mill, R.R., & Tan, K. (1988). *Verbascum* L.. In P.H. Davis (Ed. ), Flora of Turkey and the East Aegean, Islands (10 th ed., pp. 191-193). Edinburgh, Edinburgh Univ. Press.
- [4] Karavelioğulları, F.A. (2012). *Verbascum* L. In: Güner, A. et al. (eds), Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler, pp 850-870). İstanbul, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
- [5] Çakir, T., & Bağcı, E. (2006). A taxonomical study on the *Verbascum euphraticum* Benth and *Verbascum melitenense* Boiss (Scrophulariaceae). *Sci Eng J Firat Univ.*, 18(4), 445-58.

- [6] Minkin, J.P., & Hardy-Eshbaugh, W. (1989). Pollen morphology of the Orobanchaceae and Rhinanthoid Scrophulariaceae. *Grana*, 28, 1-18. <https://doi.org/10.1080/00173138909431007>
- [7] Juan R., Fernandez, I., & Pastor, J. (1997). Systematic consideration of microcharacters of fruits and seeds in the genus *Verbascum* (Scrophulariaceae). *Ann. Bot.*, 80, 591-598.
- [8] Asmat, T. (2011). Pollen morphology of selected species of Scrophulariaceae of District Dir Upper, Pakistan. *J Medic Plants Res.*, 5(28), 6423-8.
- [9] Al-Hadeethy, M., Al-Mashhadani, A., Al-Khesraji, T., Barusrux, S., Al-Jewari, H., Theerakulpisut, P., & Pornpongrungrueng, P. (2014). Pollen morphology of *Verbascum* L. (Scrophulariaceae) in Northern and Central Iraq. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 21, 159-165. <https://doi.org/10.3329/bjpt.v21i2.21355>
- [10] Öztürk, A., Güney, K.B., Bani, B., Güney, K., Karaveliogullari, F.A., Pinar, N.M., & Çeter, T. (2018). Pollen morphology of some *Verbascum* (Scrophulariaceae) taxa in Turkey. *Phytotaxa*, 333(2), 209-18.
- [11] Aktas, K. (2019). Morphology, Anatomy, Palynology and Seed Micromorphology of Turkish Endemic *Verbascum X splendidum* Boiss. (Scrophulariaceae). *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(12), 10004-10010.
- [12] Aktas, K., Özdemir, C., & Özdemir, B. (2020). Morphology, Anatomy, Palynology and Seed Micromorphology of Turkish Endemic *Verbascum exuberans* Hub.-Mor. (Scrophulariaceae). *Planta Daninha*, v38:e020191125. doi: 10.1590/S0100-83582020380100003
- [13] Baser, B. (2021). Pollen and Seed Morphology of *Verbascum* Species (Group D) (Scrophulariaceae) in Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 30(7), 8978-8987.
- [14] Attar, F., Keshvari, A., Ghahreman, A., Zarre, S., & Aghabeigi, F. (2007). Micromorphological studies on *Verbascum* (Scrophulariaceae) in Iran with emphasis on seed surface, capsule ornamentation and trichomes. *Flora*, 202(2), 169-75.
- [15] Kheiri, S., Khayami, M., & Mahmoudzadeh, A. (2009). Micromorphological and anatomical studies of certain species of *Verbascum* (Scrophulariaceae) in West Azerbaijan, Iran. *Iran J Bot.*, 15, 105-13.
- [16] Cabi, E., Baser, B., Yavru, A., Polat, F., Toprak, U., & Karaveliogullari, F.A. (2011). Scanning electron microscope (SEM) and light microscope (LM) studies on the seed morphology of *Verbascum* taxa (Scrophulariaceae) and their systematic implications. *Australian Journal of Crop Science*, 5, 660-667.
- [17] Alan, S., & Gökman, A.B. (2015). Investigation of morphological, morphometric and anatomical characteristics of endemic *Verbascum orgyale* Boiss. & Heldr. *Biological Diversity and Conservation*, 8(1), 94-103.
- [18] Tekin, M., & Yilmaz, G. (2018). Anatomical and Palynological Studies on Endemic *Verbascum weidemannianum* Fisch. & Mey. (Scrophulariaceae) In Turkey. *International Journal of Agriculture, Forestry and Life Science*, 2(2), 6-15.
- [19] Küçük, S., Elmaskaya, A., & Göktürk, R.S. (2021). Endemic *Verbascum deterrentum* Boiss. & Heldr.'s (Scrophulariaceae) Anatomical Features. *Biological Diversity and Conservation*, 14(3), 390-395. DOI:10.46309/biodicon.2020.863066.
- [20] Kılıç Mungan, F., & Kılıç, M. (2023). Şanlıurfa'da yayılış gösteren endemik *Verbascum stepporum* Murb., ve *Verbascum tenue* Hub.-Mor., (Scrophulariaceae) türleri üzerinde anatomik araştırmalar. *Biological Diversity and Conservation*, 16(2), 132-139. DOI: 10.46309/biodicon.2023.1252992
- [21] Bozdağ, B., Kocabaş, O., Akyol, Y., & Özdemir, C. (2016). A New Staining Method for Hand-Cut in Plant Anatomy Studies. *Marmara Pharm J.*, 20, 184-190. doi:10.12991/mpj.20162044231
- [22] Erdtman, G. (1952). Pollen Morphology and Plant Taxonomy: Angiosperms. Massachusetts, USA, Chronica Botanica Co.
- [23] Wodehouse, R.P. (1935). Pollen Grains, their structure, identification and significance in science and medicine. New York, Hafner Publishing Company.
- [24] 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.
- [25] Lersten, N.R., & Curtis, J.D. 2001. Idioblasts and other unusual internal foliar secretory structures in Scrophulariaceae. *Plant Syst. Evol.*, 227, 63-73.



### *Floccularia luteovirens*, a new edible mushroom record for Turkish Mycobiota

Yakup KARADUMAN<sup>1</sup>, Faruk YEŞİLYURT<sup>2</sup>, Yasin UZUN<sup>3</sup>, Abdullah KAYA<sup>\*4</sup>  
ORCID: 0009-0005-3963-7521; 0000-0002-5573-4509; 0000-0002-6423-6085; 0000-0002-4654-1406

<sup>1</sup> Çubuklu Mahallesi Engürübağı Caddesi Katar Sokak no: 17/3 Beykoz - İstanbul, Türkiye

<sup>2</sup>Yenice Mahallesi, Yeşilyurt Sokak No 4, 61250 Trabzon, Türkiye

<sup>3</sup>Karamanoğlu Mehmetbey University, Ermenek Uysal and Hasan Kalan Health Services Vocational School,  
Department of Pharmacy Services, 70400 Karaman, Türkiye

<sup>4</sup>Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, 06560 Ankara, Türkiye

#### Abstract

The edible mushroom *Floccularia luteovirens* (Alb. & Schwein.) Pouzar, is reported as a new record for the mycobiota of Türkiye, based on the identification of the samples collected from Bolu province. It is the first member of the genus *Floccularia* Pouzar in Türkiye. A brief description of the species is provided together with the suggested Turkish name and the photographs, related to the macroscopy and microscopy.

**Key words:** Biodiversity, Agaricales, IUCN, New record

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

### *Floccularia luteovirens*, Türkiye Mikobiyotası için yeni bir yenilebilir mantar kaydı

#### Özet

Yenilebilir bir mantar olan *Floccularia luteovirens* (Alb. & Schwein.) Pouzar, Bolu'dan toplanan örneklerin teşhis edilmesiyle, Türkiye mikobiyotası için yeni kayıt olarak verilmiştir. Bu tür, *Floccularia* Pouzar cinsinin Türkiye'deki ilk üyesidir. Türün kısa bir betimlemesi, önerilen Türkçe ismi ve makroskopi ve mikroskobisine ilişkin fotoğraflarıyla birlikte verilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyoçeşitlilik, Agaricales, IUCN, Yeni kayıt

#### 1. Introduction

*Floccularia* Pouzar is a genus in the order Agaricales. The members of the genus are mainly characterized by tricholomatoid to agaricoid, pyramidal scaly fruting bodies; adnate to adnexed or slightly emarginate, crowded lamellae; cylindrical to clavate stipe, differing above and below white to yellow ring zone; ellipsoid to broadly ovoid, smooth, hyaline and amyloid basidiospores without germ pore. Though they feature *Tricholoma*-like stature, the amyloid basidiospores differ them from *Tricholoma* species. Since the genus has not been subjected to contemporary, DNA-based study, as a whole, the position of *Floccularia* within the Agaricales order has not been reliably determined yet [1,2].

Though 15 members of *Floccularia* had been recorded worldwide, at species or infraspecific level, IndexFungorum lists four conformed *Floccularia* species (*F. albolanaripes* (G.F. Atk.) Redhead, *F. fusca* (Mitchel & A.H. Sm.) Bon, *F. luteovirens* (Alb. & Schwein.) Pouzar, *F. pitkinensis* (Mitchel & A.H. Sm.) Bon). Almost 2700 macrofungi species have so far been reported from Türkiye. But, the current checklists [3,4] and the latest contributions [5-9] indicate that none of them were reported from Türkiye before. Here we present the edible species *F. luteovirens* as a new record for the mycobiota of Türkiye, based on the identification of the samples collected from Bolu province. The study aims to make a contribution to the mycobiota of Türkiye.

#### 2. Materials and methods

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel:+903362262156; Fax.: +903362262150; E-mail: kayaabd@hotmail.com

Fruit bodies of *Floccularia luteovirens* were collected from Abant Lake Nature Park (Mudurnu-Bolu) in 2023, during a field trip. Fruit bodies were photographed at the collection site, and necessary notes related to its ecology and morphology were taken. Microscopic investigations were carried out under a Leica DM1000 trinocular compound microscope, equipped with a EC3 camera and LasEZ application software. The sections were obtained from dried material, and mounted in water, Congo red and Lactophenol cotton blue. The sample was identified by comparing the accumulated data with Kuo [1], Smith and Walters [10], Pilát [11], Wollweber [12], Mitchel and Smith [13], McKnight and McKnight [14], Kuo and Methven [15], Roberts and Evans [16] and Malik et al. [17].

The specimen is kept at Karamanoğlu Mehmetbey University, Science Faculty, Department of Biology.

### 3. Results

**Fungi** R.T. Moore

**Basidiomycota** R.T. Moore

**Agaricales** Underw.

*Floccularia luteovirens* (Alb. & Schwein.) Pouzar, *Česká Mykol.* 11(1): 50 (1957)

**Syn:** [*Agaricus luteovirens* Alb. & Schwein., *Agaricus stramineus* Krombh., *Amanita luteovirens* (Alb. & Schwein.) M.M. Moser, *Armillaria luteovirens* (Alb. & Schwein.) Sacc., *Armillaria luteovirens* f. *alba* A.H. Sm., *Armillaria luteovirens* var. *americana* (Mitchel & A.H. Sm.) Bon, *Armillaria straminea* P. Kumm., *Armillaria straminea* f. *alba* (A.H. Sm.) Mitchel & A.H. Sm., *Armillaria straminea* var. *americana* Mitchel & A.H. Sm., *Cortinellus luteovirens* (Alb. & Schwein.) P. Karst., *Floccularia luteovirens* f. *alba* (A.H. Sm.) Pilát, *Floccularia straminea* (P. Kumm.) Pouzar, *Floccularia straminea* f. *Alba* (A.H. Sm.) Bon, *Floccularia straminea* var. *americana* (Mitchel & A.H. Sm.) Bon, *Gyrophila luteovirens* (Alb. & Schwein.) Quél., *Mastoleucomyces luteovirens* (Alb. & Schwein.) Kuntze, *Tricholoma luteovirens* (Alb. & Schwein.) Ricken]

#### Macroscopic and microscopic features

Cap 40-70 mm in diameter, at first hemispherical to pulvinate, convex to spreading or almost flat at maturity. Surface fibrous-scaly to squamosa with flat scales when young, somewhat glabrescent in extreme age, white or slightly dull-white with sulphur-yellow coloration at marginal zone. Margin incurved at first and scaly from veil remnants. Flesh white. Odor and taste not distinctive. Lamellae moderately broad, adnate or notched around apex of stipe; edges even to irregularly torn at maturity; white to inconspicuously yellowish. Stipe 35-70 × 9-18 mm, central, cylindrical, slightly enlarged towards the base, white, annulus submembranous, smooth above the annulus while covered with protruding scales below (Fig.1). Spore print white.



Figure 1. Basidiocarps of *Floccularia luteovirens*

Basidia 22-27.5 × 4-7 μm, clavate with four sterigmata. Basidiospores (5.7)6.4-7.3(7.6) × (4.2)4.3-4.8(5.3) μm, ellipsoid, with oblique apiculus (Fig. 2), and smooth colorless, distinctly amyloid membrane.



**Habitat:** *Floccularia luteovirens* was reported to grow in deciduous forests, conifer forests or on grassland or alpine meadows as scattered or in groups [14, 17-18].

**Specimen examined:** Bolu, Mudurnu, Abant Lake Nature Park, sequentially in meadow, surrounded with *Abies* and *Pinus* spp., 40.603308N, 31.265675E, 1.400 m, 11/06/ 2023, YKaraduman 1.

**Turkish name:** Suggested Turkish name for the presented species is “Sarılı Kırpık”.

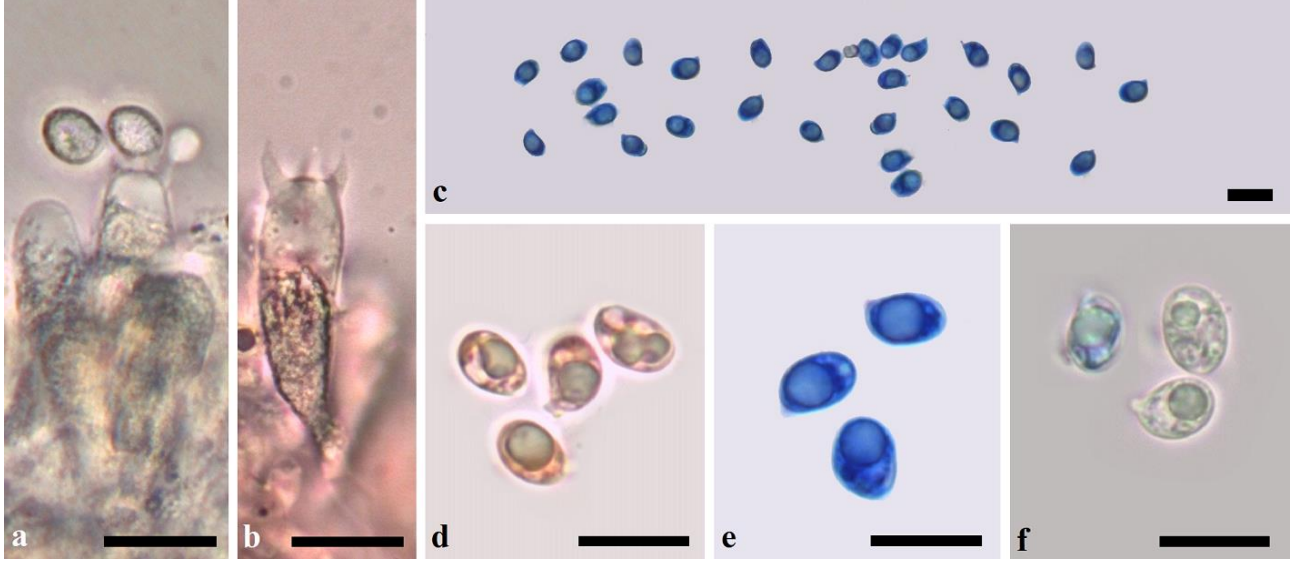


Figure 2. Basidia (a,b) and basidiospores (c-f) of *Floccularia luteovirens* (bars-10  $\mu$ m) (a in KOH; b,d in Congo-Red; c,e in Lactophenol cotton blue; f in water)

#### 4. Conclusions and discussion

*Floccularia luteovirens* was added as a new record for the mycobiota of Türkiye. This species is the first member of the genus *Floccularia* in Türkiye. The characteristics of the examined collection generally match with the description given by Smith and Walters [10], Pilát [11], Wollweber [12], McKnight and McKnight [14], Kuo and Methven [15], Roberts and Evans [16] and Malik et al. [17]. Though basidia lengths are given by Malik et al. [17] as “18.26-22.4  $\times$  3.32-6.64  $\mu$ m”, we measured them as “22-27.5  $\times$  4-7  $\mu$ m”. The altitude of our collection locality is another difference. Current published data indicate that this fungus has so far been collected from the altitudes ranging mainly between 2600 and 4800 meters [2,17-18]. The examined sample were collected at an altitude of 1.400 meters, which is relatively lower compared to the common altitudes. But Wollweber [12] and Melis et al. [19] reports much more lower altitudes of 230-300 and 30 meters respectively.

*Floccularia luteovirens* is a rare edible mushroom [20]. It has been valued in Asia as an important medicinal and ecological species with the name “golden mushroom” [21]. The consumption of this fungus was also reported from Mexico with the names “hongo de yema”, “canario” and “hamburguesa” [22]. Though it is known from Austria, China, Czech Republic, Germany, Italy, Netherland, Romania, Slovakia and USA, it was included in the red list of species to protect in some countries mainly as critically endangered (CR) [19, 23-25].

#### References

- [1] Kuo, M. (2020). *Floccularia luteovirens*. Retrieved from the MushroomExpert.Com Web site: <http://www.mushroomexpert.com/floccularia.html>
- [2] Gan, X., Cao, D., Zhang, Z., Cheng, S., Wei, L. & Liu, B. (2020). Draft Genome Assembly of *Floccularia luteovirens*, an Edible and Symbiotic Mushroom on Qinghai-Tibet Plateau. *G3 Genes, Genomes, Genetics*, 10, 1167-1173.
- [3] Sesli, E., Asan, A., Selçuk, F., (Eds.), Abacı Günyar, Ö., Akata, I., Akgül, H., Aktaş, S., Alkan, S., Allı, H., Aydoğdu, H., Berikten, D., Demirel, K., Demirel, R., Doğan, H.H., Erdoğan, M., Ergül, C.C., Eroğlu, G., Giray, G., Haliki Uztan, A., Kabaktepe, Ş., Kadaifçiler, D., Kalyoncu, F., Karaltı, İ., Kaşık, G., Kaya, A., Keleş, A., Kırbag, S., Kıvanç, M., Ocağ, İ., Ökten, S., Özkale, E., Öztürk, C., Sevindik, M., Şen, B., Şen, İ., Türkekul, İ., Ulukapı, M., Uzun, Ya., Uzun, Yu. & Yoltaş, A. (2020). *Türkiye Mantarları Listesi (The Checklist of Fungi of Turkey)*. İstanbul: Ali Nihat Gökyiğit Vakfı Yayını.

- [4] Uzun, Y. (2023). The checklist of Turkish Pezizales species. *Anatolian Journal of Botany*, 7(1), 1-20.
- [5] Akçay, M.E., Dengiz, Y. & Kesici, S. (2022). *Coprotus* Korf & Kimbr.: A new coprophilous genus record for the mycobiota of Türkiye. *Anatolian Journal of Botany*, 6(2), 75-77.
- [6] Şengül Demirak, M.Ş., Işık, H. & Türkekul, İ. (2022). Molecular and morphological identification of *Cortinarius eucaeruleus* Rob. Henry (subgenus *Phlegmacium*) from Türkiye. *Anatolian Journal of Botany*, 6(1), 27-33.
- [7] Sesli, E. (2023). *Pseudoporpoloma pes-caprae* (Tricholomataceae): A new record for Türkiye. *Anatolian Journal of Botany*, 7(1), 29-31.
- [8] Yeşilyurt, F., Uzun, Y. & Kaya, A. (2023). *Pseudoboletus parasiticus* (Bull.) Šutara, a New Record for Turkish Mycobiota. *Biological Diversity and Conservation*, 16(1), 70-74.
- [9] Kaygusuz, O., Bandini, D., Knudsen, H. & Türkekul, İ. (2023). *Pseudosperma pamukkalense* (Inocybaceae: Agaricomycetes), a new species from Turkey. *Phytotaxa*, 599(4), 225-238.
- [10] Smith, A.H. & Walters, M.B. (1947). Notes on the genus *Armillaria*. *Mycologia*, 39(5), 622-625.
- [11] Pilát, A. (1969). Ueber *Floccularia luteovirens* (Alb. et Schw. ex Fr.) Pouz. f. *alba* (A. H. Smith) Pil. in Ungarn. *Ceska Mykologie*, 23(1), 13-14.
- [12] Wollweber, V.H. (1970). *Armillaria luteovirens* (Alb. et Schw. ex Fr.) in Deutschland gefunden. *Westfälische Pilzbriefe*, 8(1), 1-6.
- [13] Mitchel, D.H. & Smith, A.H. (1976). Notes on Colorado fungi II. Species of *Armillaria* (Fr.) Kummer. (Agaricales). *Mycotaxon*, 4, 513-533.
- [14] McKnight, K.H. & McKnight, V.B. (1987). A field guide to mushrooms of North America. New York: Houghton Mifflin Co.
- [15] Kuo, M. & Methven, A. (2010). *100 Cool Mushrooms*. Michigan: The University of Michigan Press.
- [16] Roberts, P. & Evans, S. (2011). *The Book of Fungi*. UK: Ivy Press Ltd.
- [17] Malik, N.A., Saini, M.K. & Wani, N.A. (2020). The genus *Floccularia* (Agaricaceae, Basidiomycota) in India. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Biology)*, 10(1), 386-399.
- [18] Xie, Z.L., Zhao, L.Z., Li, Y., Lei, J.Q. & Zhang, F.M. (2016). The correlation of geographic distribution and ecological environment of endemic species *Floccularia luteovirens* on Qinghai-Tibet Plateau. *Acta Ecologica Sinica*, 36, 2851-2857.
- [19] Mellis, J.L.L., Mir, G. & Prats, M.C. (2017). Aportación Al Catálogo Micológico De Las Illes Balears. Menorca, II. *Micobotánica-Jaén*, ANO XII No:1 Marzo-2017.
- [20] Wang, H., Yang, Y., Wang, S., Li, C., Chen, C., Wan, X., Li, D. & Li, Y. (2023). Polysaccharides of *Floccularia luteovirens* Alleviate Oxidative Damage and Inflammatory Parameters of Diabetic Nephropathy in db/db Mice. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)*, 28(4), 82.
- [21] Arana-Gabriel, Y., Burrola-Aguilar, C., Alcalá-Adán, A., Zepeda-Gomez, C., Estrada, Z. & Maria, E. (2020). Mycelial growth of the edible wild mushrooms *Floccularia luteovirens* in different culture mediums and pH. *Agroproductividad*, 13(10), 33-38.
- [22] Davis, M., Sommer, R. & Menge, J. (2012). *Field guide to mushrooms of western North America* (Vol. 106). Univ. of California Press.
- [23] The Global Fungal Red List Initiative (2023). Retrieved from [https://redlist.info/iucn/species\\_view/330944/](https://redlist.info/iucn/species_view/330944/)
- [24] Holec, J. & Beran M. [eds.] (2006): Červený seznam hub (makromycetů) České republiky [Red list of fungi (macromycetes) of the Czech Republic]. *Příroda, Praha*, 24, 1-282.
- [25] Tingstad, L., Gjerde, I., Dahlberg, A. & Grytnes, J.A. (2017). The influence of spatial scales on Red List composition: Forest species in Fennoscandia. *Global Ecology and Conservation*, Vol. 11, Pages 247-297.



## Phytochemical analysis and biological effects of *Turgenia latifolia* (L.) Hoffm. (Apiaceae)

Gökalp İŞCAN<sup>1</sup>, Bilge Nur MUTLU<sup>2\*</sup>, Seda HACIOĞLU<sup>2</sup>, Arzu İŞCAN<sup>3</sup>, Yavuz Bülent KÖSE<sup>4</sup>,  
Mine KÜRKCÜOĞLU<sup>1</sup>  
ORCID: 0000-0003-1210-0490; 0009-0005-1725-3826; 0000-0003-2357-9038; 0000-0003-2366-2114;  
0000-0002-3060-7271; 0000-0002-9375

<sup>1</sup>Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir, Türkiye  
<sup>2</sup>Anadolu Üniversitesi, Lisanüstü Eğitim Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir, Türkiye  
<sup>3</sup>Anadolu Üniversitesi, Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırmalar Merkezi, 26470 Eskişehir, Türkiye  
<sup>4</sup>Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, 26470 Eskişehir, Türkiye

### Abstract

*Turgenia latifolia* (L.) Hoffm. (Apiaceae) is an annual, herbaceous weed that naturally growing in Türkiye. It is known as “karaheci, pıtrak, broad-leaved pıtrak, pıtrak thistle, water pıtrak” in local population. Knowing that there are few studies on this plant and its usage in folk medicine is quite limited.

In the present study crude extracts were prepared from the fruits, roots and the aerial parts of the plant collected from its natural habitat. The volatile components was obtained by microdistillation method and its full composition was determined by gas chromatography (GC-FID) and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS) simultaneously. Overall 57, 52 and 42 different components were characterized, representing 96.3%, 99.7% and 99.3% of the oils of aerial parts, fruits and roots respectively. Methanol extracts prepared from fruit, roots and aerial parts showed DPPH• scavenging activity in the range of 22.54%-41.3% at the doses studied and had shown at 0.016 mg/ml concentration 7.34%, 21% and 67% respectively ABTS<sup>•+</sup> scavenging effects. It was determined that at a dose of 20 µg/mL, the fruit inhibited 5-lipoxygenase enzyme by 2.8% and the root by 3.4%. According to antimicrobial test results, it was shown that the root extract inhibited *Staphylococcus aureus* and *Salmonella typhimurium* at a dose of 500 µg/mL, and the extract of aerial parts extract inhibited *C. tropicalis*, *C. albicans* and *S. typhimurium* at a dose range of 250-500 µg/mL. The mode of action of the aerial parts extract on candida species was demonstrated by transmission electron microscopy analysis.

**Keywords:** *Turgenia latifolia*, antimicrobial, antioxidant, phytochemical profile, gas chromatography, TEM

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

### *Turgenia latifolia* (L.) Hoffm.’nın (Apiaceae) fitokimyasal analizi ve biyolojik etkileri

#### Özet

*Turgenia latifolia* (L.) Hoffm. (Apiaceae) tek yıllık, otsu formda yabancı bir bitki olup Türkiye’de doğal olarak yayılış göstermektedir. Halk arasında “karaheci, pıtrak, geniş yapraklı pıtrak, pıtrak dikenli, su pıtrağı” isimleriyle bilinir. Bu çalışmada, halk arasında oldukça sınırlı kullanımı olan ve hakkında neredeyse hiç araştırma olmayan bu bitki, doğal olarak yetiştiği bölgeden toplanarak toprak üstü, meyve ve kök kısımlarından total ekstratlar hazırlanmıştır. Bitkinin uçucu bileşenleri mikrodistilasyon yöntemi ile elde edilerek, kompozisyonu gaz kromatografisi (GK-AID) ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GK/KS) kullanılarak belirlenmiştir. Toprak üstü, meyve ve kök yağlarının sırasıyla %96,3, %99,7 ve %99,3’ünü temsil eden 57, 52 ve 42 farklı bileşen tespit edilmiştir. Meyve kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanollü ekstratlarının çalışılan dozlarda %22,54-%41,3 aralığında DPPH• süpürücü aktivite gösterdikleri, 0.016 mg/ml konsantrasyonda ise sırasıyla %7,34, %21 ve %67 ABTS<sup>•+</sup> süpürücü etkisinin olduğu

\* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905414713417; Fax.: +905414713417; E-mail: bilgmutlu99@gmail.com

gösterilmiştir. 20 µg/mL dozda meyvenin %2,8, kökün %3,4 oranında 5-lipooksijenaz enzim inhibisyonu yaptığı belirlenmiştir.

Yapılan antikandidal ve antibakteriyal aktivite testlerinde kök ekstresinin *Staphylococcus aureus* ve *Salmonella typhimurium*'u 500 µg/mL dozda, toprak üstü ekstresinin *C. tropicalis* *C. albicans* ve *S. typhimurium*'u 250-500 µg/mL doz aralığında inhibe ettiği gösterilmiştir ve toprak üstü ekstresinin kandida türleri üzerindeki etkisinin mekanizması geçirimli elektron mikroskobu ile ortaya konmuştur.

**Anahtar kelimeler:** *Turgenia latifolia*, antimikrobiyal, antioksidan, fitokimyasal profil, gaz kromatografisi, TEM

## 1. Giriş

Apiaceae (Umbelliferae) familyası tüm dünyada geniş yayılış gösteren yaklaşık 434 cins ve 3780 türe sahip oldukça büyük bitki çeşitliliği ile tıbbi ve ekonomik açıdan önemli bir familyadır [1-6]. Dünyanın çeşitli bölgelerinde ve farklı iklimlerde, özellikle kuzeyde ılıman ve rakımın yüksek olduğu bölgelerde yayılış gösterir [5]. Türkiye'de Apiaceae familyasının 130'u endemik olmak üzere 450 türü kapsayan 109 cinsi bulunmaktadır. Tür sayısı bakımından dünyada ikinci sırada yer alan bu familya ülkemizde, 101 cins ve 485 tür ile temsil edilmektedir. Bu türlerden 188'i endemiktir [4, 7, 8]. Apiaceae familyasındaki bitkiler, taşıdıkları uçucu yağ, reçine, zamk ve müsilajdan dolayı, kendilerine özgü bir koku ve tada sahiptirler. Bu bileşikler bitkinin özellikle meyve, yaprak sapı, gövde, yaprak ve köklerinde bulunan salgı kanallarında yer almaktadır. Familyaya ait bitkilerin bünyesinde barındırdığı fenolik bileşenler, terpenler, karotenoidler, vitaminler ve alkaloidler kayda değer biyolojik aktiviteler göstermektedir [9]. Familya, dünyada ekonomik önemi bulunan birçok sebze ve baharatı bünyesinde barındırmaktadır. Etnobotanik çalışmalar dünyada çeşitli kısımlarının çok farklı amaçlarla kullandığını göstermektedir. Yiyecek ve içecek kaynağı olarak kullanımlarının yanı sıra, tat ve aroma verici, hayvan yemi, süs bitkisi ayrıca tıbbi ve kozmetik amaçlar ile kullanılırlar. Familyaya ait bitkiler antiviral, antimikrobiyal, antioksidan, antienflamatuar, anti-anksiyete, anti-mutajenik, antidiyabetik, antikanser, gastroprotektif, hepatoprotektif ve hafıza koruyucu etkiler göstermektedir [4]. Bu farmakolojik aktiviteler büyük ölçüde polisakkaritler, alkaloidler, terpenler, fenilpropanoidler, kumarinler, flavonoidler ve polien alkinler gibi moleküller ile ilişkilidir [8].

*Turgenia latifolia* (L.) Hoffmann (Apiaceae) tek yıllık otsu bir bitkidir. Hakkında yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olduğu bu tür, ülkemizde istilacı bir tür olarak kabul edilmekte ve ekonomik değeri bulunmamaktadır [11]. *Turgenia latifolia* halk arasında "Karaheci, Pıtrak, Pıtrak dikenli, Su pıtrağı" gibi isimlerle bilinmektedir. Petalleri beyaz, pembemsi veya morumsudur. Meyve dikenlidir. Meyve dikenleri yükselici veya yüzeye diktir. Gövde dik, dallanmış, kısa sert tüylü, 8-60 cm boyunda, yapraklar; pinnat, oblong veya lanseolat ve dişlidir [10,11]. Nisan, mayıs ve haziran aylarında çiçek açar. Geçirgen ve nemli toprağı, güneşli ya da yarı gölgeli bölgeleri tercih eder. Yol kenarı, tarla ve çayırlarda, ekilmemiş ve kültüre alınmış yerlerde, deniz seviyesinden 3000 m'ye kadar olan yüksekliklerde yetişir. Killi kalkerli ve verimli toprakları tercih etmekte ve böyle toprakların indikatörü olma özelliğini taşımaktadır. Ülkemizde neredeyse tüm Anadolu'da yayılış göstermektedir [12].

Literatürde *T. latifolia*'nın halk arasındaki kullanımı ile ilgili yalnızca 2 kayda rastlanmıştır. Anadolu'da yaprak infüzyonu romatizma için kullanılmış olup, İran'da halk arasında Darehjouyi ismiyle, toprak üstü kısımlarının infüzyon şeklinde idrar yolu hastalıklarına karşı kullanıldığı kayıtlıdır [13].

Bu çalışmada *T. latifolia*, Eskişehir ilinde doğal olarak yetiştiği bölgeden toplanarak uygun şekilde kurutulmuş, toprak üstü, meyve ve kök kısımları ayrılarak metanolik total ekstreleri hazırlanmıştır. Uçucu yağı mikrodistilasyon yöntemi ile elde edilerek uçucu bileşenleri ve rölatif miktarları gaz kromatografisi-alev iyonlaşma dedektörü sistemi (GK-AID) ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GK/KS) sistemleri eş zamanlı olarak kullanılarak belirlenmiştir. Bitkinin kök, toprak üstü kısımları ve meyvelerinden elde edilen ekstrenin total fenolik madde miktarları, antioksidan aktiviteleri (DPPH• ve ABTS•+), lipooksijenaz (LOX) inhibitor aktiviteleri çalışılmıştır. Antimikrobiyal aktivite testleri yapılarak antikandidal etkinin mekanizması taramalı Elektron Mikroskobu (TEM) analizi ile aydınlatılmıştır.

## 2. Materyal ve yöntem

### 2.1. Bitkisel materyal

Tarım ve Orman Bakanlığı'ndan alınan araştırma izni ile Eskişehir; Alpu-Mihalıççık yolu (Temmuz 2021) üzerinden toplanan bitkisel materyal, teşhis edilmiş bir herbaryum örneği (Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, ESSE No: 15814) ayrılması suretiyle, uygun koşullarda kurutulmuş ve meyve, kök ve toprak üstü kısımları ayrılarak 3 kısım halinde kullanılmıştır (Şekil 1).



Şekil 1. Bitkinin kurutulmuş kısımları

## 2.2. Uçucu yağ ve ekstrelerin elde edilmesi

### 2.2.1. Uçucu bileşenlerin mikrodistilasyon yöntemi ile elde edilmesi

Clevenger aparatı ile uçucu yağ eldesi, toprak üstü ve toprak altı kısımlarındaki uçucu yağ miktarlarının çok az olması nedeniyle yapılamamış, bunun yerine uçucu bileşenlerin eldesi mikrodistilasyon cihazı (Eppendorf MicroDistiller®) ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kurutulmuş toprak üstü, meyve ve kök kısımları kaba toz haline getirilerek 1'er gram tartılmıştır. 10 ml su eklenerek numune şişesine aktarılmıştır. Toplama şişesine, NaCl (2.5 g), distile su (0.5 ml) ve *n*-Hekzan (300 µL) ilave edilmiştir. Numune şişeleri, dakikada 20°C artışla ortam sıcaklığından 108°C'ye getirilmiş ve bu sıcaklıkta 90 dakika tutulmuş sonrasında dakikada 20°C artışla 112°C'ye getirilerek bu sıcaklıkta 30 dakika tutulmuştur. Son olarak numuneler aynı koşullar altında 6 dakika daha bekletilmiştir. Toplama şişeleri, distilasyon süresince -1°C'de tutulmuştur. Distilasyon tamamlandıktan sonra, toplama şişesindeki organik faz analiz için kullanılmıştır [14].

### 2.2.2. Ekstraksiyon

Bitkinin toprak üstü, meyve ve kök kısımlarından metanol (Sigma-Aldrich) ekstraktları hazırlanmıştır (verim; %2, %3, %4 sırasıyla). Rotary evaporatör ile ekstre kuruluğa kadar uçurulmuş ve biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere +4°C'de muhafaza edilmiştir.

## 2.3. Gaz Kromatografisi (GK) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi (GK/KS) Analizi

Agilent 5975 GC-MSD sistemine bağlı, HP-Innowax Silika kapiler (60 m x 0.25 mm Ø, 0.25 mm film kalınlığı) kolon kullanılmıştır. Enjektör sıcaklığı 250°C'dir. Uygulanan 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'dir. Taşıyıcı gaz olarak Helyum (0.8 ml/dak) kullanılmış, kütle aralığı, *m/z* 35-450'dir. Split oranı 40:1, Elektron enerjisi, 70 eV'dir. Bileşiklerin belirlenmesinde, BAŞER Uçucu Yağ Bileşenleri Kütüphanesi, Wiley ve Adams-LIBR (TP) Kütüphane tarama yazılımları kullanılmıştır GK analiz koşulları; eş zamanlı olarak GK/MS sistemindeki madde çıkış zamanları ile aynı olacak şekilde ayarlanmıştır (FID 300°C) [15-17].

## 2.4. Antioksidan Aktivite

Bitkisel materyalden elde edilen ekstraktların antioksidan etkileri toplam fenol miktar tayini, DPPH radikali süpürücü aktivite ve ABTS radikali katyon süpürme aktivitesi yöntemleri ile ortaya konulmuştur.

### 2.4.1. Toplam fenolik madde miktar tayini

Ekstrelerdeki toplam fenol miktarı gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak hesaplanmıştır. 1.2 ml distile suya 20 µl ekstre ilave edilmiştir. 1-8 dakika ultrasonik banyoda üzeri kapatılarak bekletilmiştir. 100 µl Folin-Ciocalteu ve 300 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (%20) eklenmiş distile su ile 2 ml hacime tamamlanmıştır. Plate 2 saat 25 °C'de karanlıkta inkübe edildikten sonra absorbans 760 nm'de ölçülmüş ve gallik asit kalibrasyon eğrisi ile karşılaştırılarak toplam fenolik madde miktarı gallik asite eş değeri olarak hesaplanmıştır [18].

### 2.4.2. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Radikal Süpürücü Aktivite

DPPH• süpürücü aktivitesinde, ekstraktların belirlenen konsantrasyonları hazırlanmıştır. 100 µL 80 µg/mL konsantrasyonda DPPH• çözeltilisi ilave edilip oda sıcaklığında ve karanlıkta 60 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon

süresi sonunda 517 nm’de UV Spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülmüştür. Askorbik asit (Vit C) ve gallik asit pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. DPPH• süpürme kapasitesi formülünden yararlanılarak hesaplanmış ve (%) cinsinden verilmiştir. DPPH• süpürme aktivitesini yarıya düşüren numune miktarı (EC<sub>50</sub>) µg/mL cinsinden belirlenmiştir [19, 20].

$$\% \text{ inhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{ekstre}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A<sub>kontrol</sub>; Kontrol absorbansı, A<sub>ekstre</sub>; farklı derişimlerdeki *T. latifolia* meyve, kök, toprak üstü kısımlarının ekstreleri ile pozitif kontrollerin absorbansı

#### 2.4.3. ABTS [2,2’-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sülfonik asit)] Radikal Katyon Süpürme Aktivitesi (TEAC)

Bu yöntem, antioksidan etkili Trolox (Vitamin E’nin suda çözünen analogu) ile örneklerin stabil ABTS•+ süpürücü aktivitelerini karşılaştırma esasına dayanmaktadır. Konsantr haldeki ABTS çözeltisi, 734 nm’deki absorbans değeri 0.7-0.8 olacak şekilde etanol ile seyreltilmiştir. 10 µL ekstre (0.6, 0.3 ve 0,1 mg/mL konsantrasyonlarda), 990 µL ABTS çözeltisine ilave edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda 300 µL alınarak düz taban mikrotitrasyon petrisine aktarılmıştır ve 734 nm’de UV Spektrofotometresinde absorbans değerleri ölçülmüştür. Trolox’un 0,125-3 mM aralığında çözeltilerine kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş ve ekstrelerin ABTS•+ süpürücü etkileri Trolox’a eş değer olarak hesaplanmıştır [20, 21].

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{ekstre}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A<sub>kontrol</sub>: Kontrol absorbansı A<sub>ekstre</sub>: Farklı derişimlerdeki *T. latifolia* meyve, kök, toprak üstü kısımlarının ekstreleri ile pozitif kontrollerin absorbansı

#### 2.5. 5- Lipooksijenaz enzim inhibisyonu

Lipooksijenaz enzim aktivitesi inhibisyon düzeylerinin belirlenmesi 96 kuyucuklu kuartz plakada spektrofotometrik olarak gerçekleştirilmiştir. 1,94 mL potasyum fosfat tamponu (100 mM; pH: 8.80), 40 µL değişik konsantrasyonlardaki ekstreler ve 20 µL lipooksijenaz enzimi karıştırılarak 25 °C’de 10 dakika inkübe edilmiştir. Bu karışımın 300 µL’si her kuyucuğa eklenmiştir. Ardından 7.5 µL substrat (linoleik asit) ilave edilerek 30 sn çalkalanmıştır. 10 dakikadaki absorbans değişimi 243 nm’de ölçülmüştür. Denemeler 4 tekrarlı ve 2 paralel olarak gerçekleştirilmiştir [22].

Nordihidroguairatik asit (NDGA) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (E - S) / E \times 100$$

E: ekstrenin eklenmediği enzim absorbansı S: ekstrenin eklendiği enzim absorbansı

#### 2.6. Antimikrobiyal Aktivite Tayini

##### 2.6.1. Antikandidal aktivite

Testlerde *C. albicans*’ın iki suşu (ATCC-10231, ATCC 90028), *C. utilis* (NRRL Y-900), *Candida tropicalis* (ATCC 750) ve *C. parapsilosis* (NRRL Y- 12696) kullanılmıştır.

Toprak üstü, meyve ve kök kısımlarından hazırlanan ekstreler steril DMSO’da çözülerek çalışmada kullanılmıştır. Bir gün önceden Patates Dekstroz Agar (PDA) plaklarında canlandırılan *Candida* kültürlerinden saf koloni seçilerek steril salin solüsyonu (%0,85) içinde konsantrasyonu McFarland No:0.5 bulanıklık standardına göre 10<sup>6</sup> KOB/mL olacak şekilde bulanıklık ölçer (BIOSAN) kullanılarak ayarlanmıştır. Ekstreler 96 kuyucuklu mikrotitrasyon petrisinde RPMI besiyerinde dilüe edilerek, kuyucuklardaki son hücre konsantrasyonu 2.5 x 10<sup>3</sup> KOB/mL olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. 37°C de 24 saat inkübasyon sonunda minimum inhibitor konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Ketokonazol standart antifungal ajan olarak kullanılmıştır [23].

##### 2.6.2. Antibakteriyel aktivite

*Escherichia coli* NRRL B-3008, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Serratia marcescens* NRRL B-2544, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 1222 kullanılmıştır. Toprak üstü, meyve ve kök kısımlarından hazırlanan ekstreler steril DMSO’da çözülerek testlerde kullanılmıştır. Mueller Hinton Agar (MHA) plaklarında aktiflenen bakteri kültürleri McFarland No:0.5 bulanıklık standardına göre 10<sup>6</sup> KOB/mL olacak şekilde bulanıklık ölçer (BIOSAN) kullanılarak ayarlanmıştır. Ekstreler 96 kuyucuklu mikrotitrasyon petrisinde MHB besiyerinde dilüe edilerek, kuyucuklardaki hücre konsantrasyonu 1.5x10<sup>3</sup> KOB/mL olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. 37°C de 24 saat inkübasyon sonunda minimum inhibitor konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Kloramfenikol standart antibakteriyel ajan olarak kullanılmıştır [24].

### 2.7. Antikandidal etki mekanizmasının belirlenmesi

Toprak üstü ekstresinin kandida hücreleri üzerindeki etki mekanizması, transmisyon elektron mikroskobu ile görüntülenmiştir. *C. albicans* ATCC® 90028 ve *C. tropicalis* NRRL Y-12968'e ait deney plakalarında MİK kuyucuğu ile ½ ve ¼ MİK dozlarındaki kuyucuk içeriği eppendorf tüplerine pipetlenerek aseptik koşullar altında 5 dakika 1200 rpm'de santrifüjleme ile besiyerinden hücrelerin ayrılması sağlanmıştır. Pelet 0.1 M fosfat tamponunda (pH 7.4) %2,5 glutaraldehit ile fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası hücreler sodyum fosfatla yıkanarak 2 saat 4°C'de %2 OsO<sub>4</sub> (EMS, Hatfield, ABD) ile yeniden fikse edilmiş ve sırasıyla %70, 90, 96 ve 99 etanolde dehidre edilmiştir. Daha sonra EPON 812 epoksi içine gömülen hücrelerden maksimum 100 nm kalınlığa kadar ince kesitleri alınmıştır. Kesitler kurşun sitrat ve uranil asetat (EMS, Hatfield, ABD) boya ile boyanmıştır. Candida hücrelerinin yapı ve morfolojisinin analizi için Hitachi HT7800 marka transmisyon (geçirimli) elektron mikroskobu (ESOGÜ, Arum, Eskişehir) sistemi kullanılmıştır [25, 26].

## 3. Bulgular

### 3.1. Uçucu Bileşenler

*Turgenia latifolia*'nın mikrodistilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu bileşenlerinin kompozisyonu Tablo 1'de sunulmuştur. Meyvelerden elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri), *epi*- $\alpha$ -Bisabolol (%20,4), 1-oktil asetat (%14,9), germakren D-4 $\alpha$ -ol (%6,7),  $\alpha$ -pinen (%6,3), T-kadinol (%5,7),  $\delta$ -kadinen (%4,2),  $\alpha$ -kadinol (%3,7) germakren D-4-ol (%3,4) olarak belirlenmiştir. Kökten elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri, heksadekanoik asit (%11), oktanal (%10,4), nonanal (%7,5),  $\alpha$ -pinen (%4,1), heptanal (%4,1), amilfuran (%3,6), terpinen-4-ol (%3,4),  $\beta$ -Pinen (%3,2); toprak üstü kısmından elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri ise  $\alpha$ -pinen (%61), spatulenol (%6,6), *trans*-pinokarveol (%4,9) ve kamfen (%3,8) olarak saptanmıştır.

Tablo 1. *T. latifolia*'nın uçucu bileşenleri (%)

RRI	Bileşikler	Meyve	Kök	Toprak üstü	TM
1032	$\alpha$ -Pinen	6.3	4.1	61.0	tr, MS
1076	Kamfen	1.3	0.5	3.8	tr, MS
1093	Hekzanal	0.6	1.5	-	tr, MS
1118	$\beta$ -Pinen	0.2	3.2	1.9	tr, MS
1132	Sabinen	tr	0.7	0.1	tr, MS
1138	Tuya-2,4 (10)-dien	-	-	0.6	MS
1174	Mirsen	0.6	-	1.3	tr, MS
176	$\alpha$ -Fellandren	0.3	-	-	tr, MS
1194	Heptanal	0.2	4.1	-	MS
1203	Limonen	0.5	0.7	1.8	tr, MS
1213	$\beta$ - Fellandren	2.1	-	tr	tr, MS
1225	(Z)-3- Hekzanal	-	-	tr	tr, MS
1244	Amilfuran	0.2	3.6	tr	MS
1255	$\gamma$ -Terpinen	0.1	1.6	tr	tr, MS
1266	(E)- $\beta$ -Osimen	0.1	-	tr	tr, MS
1280	<i>p</i> -Simen	0.2	1.5	0.5	tr, MS
1290	Terpinolen	tr	-	tr	tr, MS
1296	Oktanal	0.3	10.4	tr	tr, MS
1300	Tridekan	tr	-	-	tr, MS
1345	3-Oktil asetat	tr	-	-	tr, MS
1385	Heptil asetat	0.1	-	-	MS
1386	Oktenil asetat	0.2	-	-	MS
1398	2-Nonanon	-	1.0	-	MS
1399	Nonanal	0.2	7.5	tr	MS
1400	Tetradekan	0.1	-	0.2	tr, MS
1429	Perillen	-	-	0.1	MS
1439	$\gamma$ -Kamfolen aldehit	-	-	0.1	MS
1441	(E)-2-Oktenal	-	0.6	-	MS
1466	$\alpha$ -Kubeben	0.3	-	0.2	MS

1482	Longipinen	0.6	-	-	MS
1483	1-Oktil asetat	14.9	-	-	t <sub>R</sub> , MS
1495	Bisikloelemen	0.7	-	0.1	MS
1497	$\alpha$ -Kopaen	-	-	0.2	MS
1499	Kamfolenal (= $\alpha$ -Kamfolen aldehyt)	-	-	1.2	MS
1500	Pentadekan	-	-	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1516	(Z)-4-Oktenil asetat	2.1	-	-	MS
1532	Kafur	2.1	-	-	t <sub>R</sub> , MS
1535	$\beta$ -Burbonen	-	-	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1536	Pinokamfon	-	-	0.3	MS
1541	Benzaldehit	-	2.7	tr	MS
1544	Dihidroakillen	-	-	0.2	MS
1548	(E)-2-Nonenal	2.0	4.9	-	MS
1550	$\beta$ -Kubeben	0.9	-	0.3	MS
1553	Linalol	-	0.6	-	t <sub>R</sub> , MS
1565	Linalil asetat	-	tr	-	t <sub>R</sub> , MS
1571	<i>Trans-p</i> -Ment-2-en-1-ol	-	tr	-	MS
1585	Pinokarvon	-	-	0.5	MS
1590	Bornil asetat	-	1.2	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1600	$\beta$ -Elemen	1.2	-	-	MS
1600	Hekzadekan	-	1.7	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1611	Terpinen-4-ol	-	3.4	0.2	t <sub>R</sub> , MS
1628	Aromadendren	-	-	0.2	MS
1648	Mirtenal	-	-	0.8	MS
1651	$\gamma$ -Elemen	1.4	-	-	MS
1655	(E)-2-Dekenal	-	2.5	-	MS
1664	<i>trans</i> -Pinokarveol	-	-	4.9	t <sub>R</sub> , MS
1683	<i>trans</i> -Verbenol	-	-	1.7	MS
1687	$\alpha$ -Humulen	1.1	-	-	t <sub>R</sub> , MS
1704	$\gamma$ -Murolen	0.7	-	0.4	MS
1706	$\alpha$ -Terpineol	-	1.4	-	t <sub>R</sub> , MS
1725	Verbenon	-	-	0.9	t <sub>R</sub> , MS
1726	Germakren D	2.1	-	-	MS
1737	$\beta$ -Bisabolen	0.8	-	-	t <sub>R</sub> , MS
1740	$\alpha$ -Murolen	1.4	-	-	MS
1747	<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	-	-	0.3	MS
1751	Bisiklogermakren	2.8	-	0.1	MS
1757	Karvon	-	0.5	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1772	$\delta$ -Kadinen	4.2	-	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1776	$\gamma$ -Kadinen	1.8	-	0.1	MS
1786	(E)- $\alpha$ -Bisabolen	0.4	-	-	MS
1800	Oktadekan	0.4	1.9	0.3	t <sub>R</sub> , MS
1802	Mirtenol	-	-	0.1	MS
1811	$\alpha$ -Kadinen	0.3	-	-	MS
1827	(E,E)-2,4-Dekadienal	-	0.3	-	MS
1845	<i>trans</i> -Karveol	-	-	0.1	t <sub>R</sub> , MS
1853	Germakren B	0.8	-	-	MS
1878	2,5-Dimetoksi- <i>p</i> -simen	-	0.4	-	MS
1882	1-Izobütil 4-izopropil-2,2-dimetil suksinat	-	0.4	0.1	MS
1900	Nonadekan	-	0.4	-	t <sub>R</sub> , MS
1904	Epi-kubebol	-	-	0.2	MS
1941	$\alpha$ -Kalakoren I	-	-	0.2	MS
1957	(E)- $\beta$ -Iyonon	-	-	0.5	MS
2000	Eikosan	-	2.0	0.3	t <sub>R</sub> , MS
2008	Karyofilen oksit	-	-	1.0	t <sub>R</sub> , MS
2037	Salvial-4(14)-en-1-on	-	-	0.3	MS
2053	$\gamma$ -Nonalakton	-	0.6	-	t <sub>R</sub> , MS



2068	(E)-Sinamaldehyt	-	1.7	-	MS
2069	Germakren D-4 $\beta$ -ol	6.7	-	-	MS
2071	Humulen epoksit-II	-	-	0.4	MS
2080	1, 10-diepi- Kubenol	0.7	-	-	MS
2084	Oktanoik asid	-	1.8	-	MS
2144	Spatulenol	1.4	0.7	6.6	t <sub>R</sub> , MS
2174	Nonanoik asit	-	2.0	-	MS
2191	T-Kadinol	5.7	-	-	MS
2200	Dokosan	-	2.5	-	t <sub>R</sub> , MS
2205	Germakren D-4 $\alpha$ -ol	3.4	-	-	MS
2209	T-Murolol	1.1	-	-	MS
2250	1-Metiletil heksadekanoat (=Izopropil palmitat)	-	1.4	-	t <sub>R</sub> , MS
2255	epi- $\alpha$ -Bisabolol	20.4	-	-	t <sub>R</sub> , MS
2256	$\alpha$ -Kadinol	3.7	-	-	t <sub>R</sub> , MS
2400	Tetrakosan	-	2.2	-	t <sub>R</sub> , MS
2500	Pentakosan	-	1.9	-	MS
2700	Heptakosan	-	-	0.7	MS
2800	Oktakosan	-	1.8	-	MS
2931	Heksadekanoik asit (= Palmitik asit)	-	11.0	-	MS
	<i>Monoterpen hidrokarbon</i>	11.7	12.3	71.2	
	<i>Oksijenli monoterpen</i>	2.1	5.9	11.5	
	<i>Seskiterpen hidrokarbon</i>	21.5	-	2.3	
	<i>Oksijenli seskiterpen</i>	43.1	0.7	8.5	
	<i>Diğer</i>	21.3	74.0	2.8	
	<b>Tanımlanan bileşik</b>	<b>52</b>	<b>42</b>	<b>57</b>	
	<b>Toplam %</b>	<b>99.7</b>	<b>92.9</b>	<b>96.3</b>	

TM:Tanımlama metodu, tr: <math>\leq 0.1</math>, MS: Kütle spektrumu, t<sub>R</sub>: Alıkonma zamanı, Tespit edilmedi, RRI: Relatif tutunma zamanı indisi *n*-alkan serisine göre hesaplanmıştır; %: FID verilerine göre hesaplanmıştır; e: Eser (<math>\leq 0.1</math>)

### 3.2. Antioksidan aktivite sonuçları

#### 3.2.1. Toplam fenolik madde miktarı

Meyve, kök, toprak üstü ekstralarının gallik asit eş değerliğine göre total fenolik madde miktarları Tablo 2’de gösterilmiştir. 0,1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanmış ekstralarda, meyvenin %13,5, kökün %7 ve toprak üstü kısmının %14 oranında fenolik madde içerdiği gösterilmiştir.

#### 3.2.2. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) Radikal Süpürücü Aktivite

Meyve, kök, toprak üstü ekstralarının gallik asit ve askorbik asit standartları kullanılarak % giderimleri Tablo 3’te gösterilmiştir. Standart gallik asit ve askorbik aside göre oldukça yetersiz etkiler ortaya koymakla birlikte, meyveden hazırlanan metanol ekstresinin 0,4 mg/ml konsantrasyonda %39,07, kökün metanol ekstresinden 0,5 mg/ml konsantrasyonda %22,54 ve toprak üstü kısmının 0,2 mg/ml konsantrasyonda %41,3 DPPH radikali süpürücü etki gösterdikleri saptanmıştır.

Tablo 2. *T. latifolia* ekstralarının DPPH radikali süpürücü etkileri

Numune	mg/mL	% DPPH•	± std
Meyve	0,4	39,07	0,82
Kök	0,5	22,54	1,96
Toprak üstü	0,2	41,3	3,37
Gallik asit	0,002	67,12	1,30
Askorbik asit	0,008	66,46	1,78

3.2.3. *ABTS [2,2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sülfonik asit)] Radikali Katyon Süpürme Aktivitesi (TEAC)*

Meyve, kök, toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstralarının troloks eşdeğerliğine göre % renk giderimleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Meyveden hazırlanan metanol ekstresinin 0,016 mg/ml konsantrasyonda %7,34, kökün metanol ekstresinden 0,16 mg/ml konsantrasyonda %21 ve toprak üstü kısmının 0,016 mg/ml konsantrasyonda %67 ABTS<sup>•+</sup> süpürücü etki gösterdikleri saptanmıştır.

Tablo 3. *T. latifolia* ekstralarının troloks eşdeğerliğine göre ABTS radikali süpürücü etkileri

Numune	% ABTS İnhb.	±std	mM
Meyve	67	0,03	1,73
Kök	21	0,06	0,54
Toprak üstü	7,34	0,03	0,19
Gallik asit	58,1	0,01	1,5

3.3.5- *Lipooksijenaz enzim inhibisyonu*

Meyve, kök, toprak üstü ekstralarının nordihidroguaiaretik (NDGA) asit eşdeğerliğine göre % inhibisyon değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir. *In vitro* 5-lipooksijenaz inhibisyon testi sonuçlarına göre çalışılan konsantrasyonlarda meyvenin (%2,8± 4,27) ve kökün (%3,4±0,69) inhibisyon yaptığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, numunelerin hiçbirinin standart olarak kullanılan NDGA kadar etkili olmadığı görülmektedir.

Tablo 4. *T. latifolia* ekstralarının NDGA eşdeğerliğine göre lipooksijenaz inhibe edici etkileri

Numune	% inhibisyon	± std
Meyve 20 µg/mL)	2,8	4,27
Kök (20 µg/mL)	3,4	0,69
Toprak üstü (20 µg/mL)	-	-
NDGA (10 µg/mL)	80,3	2,33
NDGA EC <sub>50</sub>	4,81	1,87

-: Etki yok

3.3. *Antimikrobiyal aktivite testleri*3.3.1. *Antikandidal aktivite bulguları*

Antikandidal aktivite sonuçları Tablo 5. de gösterilmiştir. *C. tropicalis* ATCC 750, toprak üstü ekstresi tarafından 250 µg/mL dozda, *C. albicans* ATCC 90028 ise 500 µg/mL dozda inhibe olmuştur. Bu dozların alt ve üst kuyucuklarından alınan örnekler TEM analizi için toplanmıştır. Bitkinin 3 farklı kısmına ait ekstralar kıyaslandığında toprak üstü ekstresinin aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 5. Antikandidal etki sonuçları

(MİK, µg/mL)	ME	KE	TÜE	Ketokonazol
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	>1000	>1000	>1000	0,125
<i>C utilis</i> NRRL Y-900	250	500	250	0,06
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	500	500	500	0,06
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	500	>1000	250	0,125
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	>1000	>1000	>1000	0,03

ME: Meyve ekstresi; KE: Kök ekstresi; TÜE: Toprak üstü (Yaprak, çiçek ve dal) ekstresi

3.3.2. *Antibakteriyel aktivite bulguları*

Yapılan antibakteriyel aktivite sonuçları Tablo 3. de gösterilmiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ve *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 kök ekstresi tarafından 500 µg/mL dozda inhibe edilmiştir. *Salmonella typhimurium* ATCC 13311 toprak üstü ekstresi tarafından 500 µg/mL dozda inhibe edilmiştir. Bitkinin 3 farklı kısmının

ekstreleri incelendiğinde bakteri suşlarına karşı kök ve toprak üstü ekstresinin aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir.

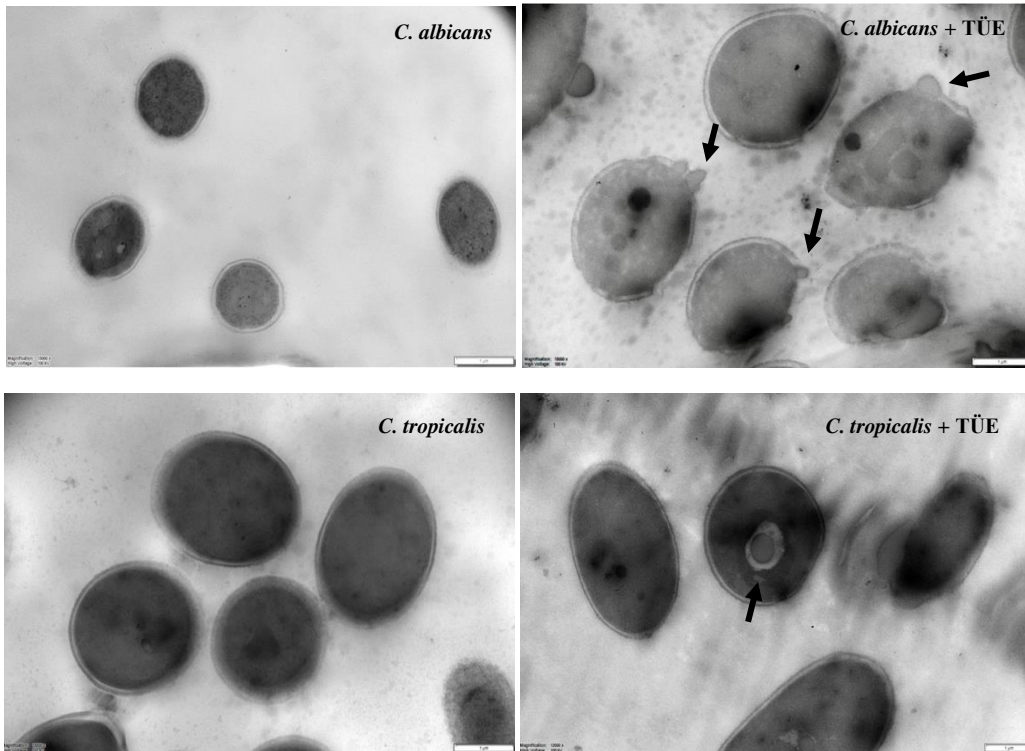
Tablo 6. Antibakteriyel etki sonuçları

(MİK, µg/mL)	ME	KE	TÜE	Kloramfenikol
<i>Escherichia coli</i> NRRL B-3008	>4000	>4000	>4000	4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1000	500	1000	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>4000	>4000	1000	16
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	2000	500	500	8
<i>Serratia marcescens</i> NRRL B-2544	>4000	1000	1000	8
<i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 9633	>4000	>4000	>4000	16

ME: Meyve MeOH ekstresi; KE: Kök MeOH ekstresi; TÜE: Toprak üstü (Yaprak, çiçek ve dal) MeOH ekstresi

### 3.4. TEM analizi

*C. albicans* ve *C. tropicalis*'e karşı inhibisyon etkileri belirlenen toprak üstü ekstresinin MİK, ½ ve ¼ MİK kuyucukları ile kontrol kuyucuklarından alınan örneklerin takibi ve analizi ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan analizlerde toprak üstü ekstresinin (HE) *C. albicans* kontrol hücreleri ile kıyaslandığında deney setlerinde, hücre duvarı ve membranında bütünlüğün bozulduğu, hücre içeriğinin dışarıya doğru çıktığı görülmektedir. *C. tropicalis* analizinde ise çok sayıda hücrede ve spesifik olarak hücre çekirdek membranında hasarların ve nukleus yapısında bozulmaların oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 2. *C. albicans* ve *C. tropicalis* sağlıklı kontrol hücreleri (solda) ile toprak üstü ekstresi (TÜE) ile muamele edilmiş hücreler (ölçek: 1 µm).

#### 4. Sonuçlar ve tartışma

Yapılan GK/KS analizinde *Turgenia latifolia* meyve, kök, toprak üstü kısımlarından elde edilen uçucu yağların sırasıyla %99,7, %92,9, %96,3'ünü temsil eden 52, 42, 57 bileşen karakterize edilmiştir. Meyvelerden elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri, *epi- $\alpha$ -bisabolol* (%20,4), 1-oktil asetat (%14,9), germakren D-4 $\alpha$ -ol (%6,7),  $\alpha$ -pinen (%6,3), T-kadinol (%5,7),  $\delta$ -kadinin (%4,2),  $\alpha$ -kadinol (%3,7) germakren D-4-ol (%3,4) olarak belirlenmiştir. Kökten elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri, heksadekanoik asit (%11), oktanal (%10,4), nonanal (%7,5), heptanal (%4,1),  $\alpha$ -pinen (%4,1), amilfuran (%3,6), terpinen-4-ol (%3,4),  $\beta$ -Pinen (%3,2); toprak üstü kısmından elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri ise  $\alpha$ -pinen (%61), spatulenol (%6,6), *trans*-pinokarveol (%4,9) ve kamfen (%3,8), olarak saptanmıştır. Bu çalışma kapsamında bitkinin meyve, kök ve toprak üstü kısımlarından mikrodistilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu bileşenler ve % miktarları ortaya konulmuştur. Bitkinin farklı kısımlarından uçucu yağ eldesi ve kompozisyonunun ayrıntılı olarak belirlenmesi açısından yapılan ilk çalışma niteliğini taşımaktadır. Yapılan kaynak taramasında Ceylan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Turgenia latifolia* bitkisinin fitokimyasal kompozisyonunun belirlenmesi amacıyla yapılan GK/KS analizinde  $\alpha$ -Bisabolol, T-kadinol, spatulenol,  $\alpha$ -kadinol ana bileşikler olarak tespit edilmiştir [27].

Yapılan antioksidan aktivite çalışmaları sonuçlarına göre; hazırlanmış ekstrelerde 0,1 mg/mL konsantrasyonda total fenolik madde miktarları; kök %7 meyve %13 ve toprak üstü ise %14 olarak belirlenmiştir. DPPH• süpürücü etkilerine bakıldığında meyveden hazırlanan metanol ekstresinin 0,4 mg/ml konsantrasyonda %39,07, kökten hazırlanan metanol ekstresinden 0,5 mg/ml konsantrasyonda %22,54 ve toprak üstü kısmından hazırlanan ekstrenin 0,2 mg/ml konsantrasyonda %41,3 aktivite gösterdikleri saptanmıştır. ABTS•+ süpürücü etkileri ise meyvenin 0,016 mg/ml konsantrasyonda %7,34, kökün 0,16 mg/ml konsantrasyonda %21 ve toprak üstü kısmının 0,016 mg/ml konsantrasyonda %67 olarak bulunmuştur. Standartlara göre dikkat çekici bir aktivite olmadığı gözlenmiştir.

Antiinflatuvar etkisini belirlemek için yaptığımız bir diğer çalışma olan 5-lipooksijenaz enzim inhibisyonu sonuçlarına göre 20  $\mu$ g/mL konsantrasyonda meyvenin %2,8± 4,27, 20  $\mu$ g/mL konsantrasyonda kökün %3,4±0,69 inhibisyon yaptığı belirlenmiştir. Toprak üstü kısmının antiinflatuvar etkisi tespit edilememiştir. Meyve ekstresi ve kök ekstresi sonuçları standart ile karşılaştırıldığında antiinflatuvar etkisinin düşük olduğu görülmektedir.

Hajimehdipoor ve ark. (2016) tarafından *T. latifolia*'nın bütün bitki kısımları kullanılarak yapılan çalışmada asetilkolinesteraz inhibe edici etkilerinin olmadığı görülmüştür (300  $\mu$ g/mL konsantrasyonda %0 inhibisyon). *T. latifolia*'nın DPPH• inhibisyonu ve ferrik-TPTZ kompleksinin azaltılması için değerleri IC50 62.3  $\mu$ g/mL ve FRAP değeri 40.7 mmol FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/100g olarak bulunmuştur. Bu çalışmada ise farklı olarak bitkinin meyve, kök, toprak üstü kısımlarından ayrı olarak hazırlanan ekstreler total fenolik madde miktarları, DPPH•, ABTS•+ ve 5-lipooksijenaz enzim inhibisyonu açısından değerlendirilmiş ve bitkinin farklı kısımlarından elde edilen ekstrelerin biyolojik aktivite farklılıkları ortaya konulmuştur [28].

Yaptığımız antimikrobiyal aktivite testlerinde standart ajanlara göre zayıf etkiler gözlenirse de toprak üstü ekstresinin, meyve ve kök ekstrelerine oranla seçilen kandida suşlarına karşı daha etkili olduğu görülmüştür. Bitkinin toprak üstü, meyve ve kök kısımlarının ekstreleri incelendiğinde bakteri suşlarına karşı kök ve toprak üstü ekstrelerinin aktivitesinin daha yüksek olduğu görülmektedir. TEM analizinde toprak üstü ekstresinin *C. albicans* kontrol hücreleri ile kıyaslandığında hücre duvarı ve membran bütünlüğünün bozulması, hücre içeriğinin dışarıya çıkması yoluyla etki ettiği belirlenmiştir. *C. tropicalis* analizinde ise çok sayıda hücrede ve spesifik olarak hücre çekirdek membranında hasara sebep olarak nükleus yapısında bozulmalar oluşturduğuna dikkat çekilmiştir (Şekil 2).

Bu tür ile yapılan tek aktivite çalışmasında [29], *T. latifolia*'nın toprak üstü kısımlarının *Aspergillus fumigatus* PLM 712, ve farklı *Candida albicans* suşları ile, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida guilliermondi* IF00838, *Candida kefyr* ATCC 38296, *Candida krusei* ATCC 44507, *Candida pseudotropicalis* Y06-01, *Candida tropicalis* ATCC 13803 suşlarına karşı antimikrobiyal aktivite göstermediği, toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstrenin yalnızca *Aspergillus niger* PLM 1140'e karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca ilginç olarak *Candida glabrata* ATCC 90030, *Candida kefyr* ATCC 38296 ve *Candida pseudotropicalis* Y06-01 suşlarının büyümesini stimüle ettiğini bildirmişlerdir. Yaptığımız deneylerde bahsedilen çalışmadan farklı olarak toprak üstü kısmından hazırlanan ekstrenin *C. albicans* ve *C. tropicalis*'e karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Seçilen kandida suşlarında meyve kök ve toprak üstü elde edilen ekstrelerin antimikrobiyal etkilerinin farklılığı, MİK değerleri ve söz konusu etkilerin mekanizması da gösterilerek literatüre kazandırılmıştır.

Ülkemizde oldukça yaygın olarak yetişen ve tarla zararlısı olarak mücadele edilen bu türün uçucu bileşiklerinin yanında fenolik madde miktarı ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Bitkinin toprak üstü, kök ve meyve kısımlarından elde edilen ekstrelerde antibakteriyel, antikandidal ve antioksidan etki çalışmaları ile bu bitkinin ilaç hammaddesi olabile potansiyeli araştırılmıştır. Bu çalışma ile tarla zararlısı olarak kabul edilen bir bitkiye ait total metanol ekstresinin patojen *Candida* hücreleri üzerinde olan etkileri dikkat çekici olup, ülkemizde benzer şekilde halk arasında kullanımının sınırlı olduğu türlerin biyolojik etkileri bakımından potansiyel taşıyabileceği ortaya konmuştur.

## Teşekkür

Geçirimli elektron mikroskopu ile elde edilen fotoğraflar için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Merkezi Araştırma Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi'ne (ARUM) ve destekleri için Doç. Dr. Bükay YENİCE GÜRSU'ya teşekkürlerimizi sunarız. Bu çalışma ANABAP desteği ile sağlanan sarf malzemeler ve Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünce alınan izin ile gerçekleştirilmiştir.

## Kaynaklar

- [1] Hanf, M. (1983). The arable weeds of Europe with their seedlings and seeds. *The arable weeds of Europe with their seedlings and seeds*, BASF United Kingdom.
- [2] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., & Babaç, M. T. (2012). Türkiye bitkileri listesi. *Damarlı Bitkiler, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını*, 262.
- [3] Sayed-Ahmad, B., Talou, T., Saad, Z., Hijazi, A., & Merah, O. (2017). The Apiaceae: Ethnomedicinal family as source for industrial uses. *Industrial crops and products*, 109, 661-671 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.027>
- [4] Başer, K., Kirimer, N. (2014). Essential oils of Anatolian Apiaceae-A profile. *Natural Volatiles and Essential Oils*, 1(1), 1-50.
- [5] Hickey, M., King, C. (1997). Common families of flowering plants. Cambridge University Press.
- [6] Pimenov, M. G., Leonov, M. V., van Wyk, B. E., & Tilney, P. M. (2004). Asia, the continent with the highest Umbelliferae biodiversity. *South African Journal of Botany*, 70(3), 417-419. [https://doi.org/10.1016/S0254-6299\(15\)30224-6](https://doi.org/10.1016/S0254-6299(15)30224-6)
- [7] Wang, X. J., Luo, Q., Li, T., Meng, P. H., Pu, Y. T., Liu, J. X., & Xiong, A. S. (2022). Origin, evolution, breeding, and omics of Apiaceae: a family of vegetables and medicinal plants. *Horticulture Research*, 9, <https://doi.org/10.1093/hr/uhac076>
- [8] Li, M., Li, M., Wang, L., Li, M., & Wei, J. (2023). Apiaceae Medicinal Plants in China: A Review of Traditional Uses, Phytochemistry, Bolting and Flowering (BF), and BF Control Methods. *Molecules*, 28(11), <https://doi.org/10.3390/molecules28114384>
- [9] Amiri, M. S., & Joharchi, M. R. (2016). Ethnobotanical knowledge of Apiaceae family in Iran: A review. *Avicenna journal of phytomedicine*, 6(6), 621.
- [10] Davis, P. H. (1972). Flora Of Turkey. Edinburgh at the University Press 22, vol. 4: 527, Edinburgh.
- [11] Rechinger, K. H. (1964). Flora Iranica: Akademische Druck-und Verlagsanstalt Graz. *University of Tehran, Iran*, 549.
- [12] Walters, S. M., & Pawlowski, B. (1968). Flora Europaea, Cambridge University Pres.
- [13] 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.org/10.1016/j.jep.2012.02.004>
- [14] Baser KHC, Demirci B, Demirci F, Kirimer N, Hedge IC. Microdistillation as a useful tool for the analysis of minute amounts of aromatic plant materials. *Chemistry of Natural Compounds*. 2001, 37:336-8. <https://doi.org/10.1023/A:1013718517771>
- [15] McLafferty, F. W., & Stauffer, D. B. (1989). *The Wiley/NBS registry of mass spectral data* (Vol. 1). New York: Wiley.
- [16] Boelens, M. (1999). The complete database of essential oils, Boelens Aroma chemical information service. The Netherlands.
- [17] Vl, S. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
- [18] Kumarasamy, Y., Byres, M., Cox, P. J., Jaspars, M., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2007). Screening seeds of some Scottish plants for free radical scavenging activity. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(7), 615-621. <https://doi.org/10.1002/ptr.2129>
- [19] Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199-1200. <https://doi.org/10.1038/1811199a0>
- [20] Kumarasamy, Y., Fergusson, M. E., Nahar, L., & Sarker, S. D. (2002). Bioactivity of moschamindole from *Centaurea moschata*. *Pharmaceutical Biology*, 40(4), 307-310. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.4.307.8467>

- [21] Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237 [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- [22] Baylac, S., & Racine, P. (2003). Inhibition of 5-lipoxygenase by essential oils and other natural fragrant extracts. *International Journal of Aromatherapy*, 13(2-3), 138-142. [https://doi.org/10.1016/S0962-4562\(03\)00083-3](https://doi.org/10.1016/S0962-4562(03)00083-3)
- [23] PA, W. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved standard. *CLSI document M27-A2*.
- [24] MA, W. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. *CLSI (NCCLS)*, 26, M7-A7
- [25] İşcan, G., İşcan, A., & Demirci, F. (2016). Anticandidal effects of thymoquinone: Mode of action determined by transmission electron microscopy (TEM). *Natural product communications*, 11(7), <https://doi.org/10.1177/1934578X1601100726>
- [26] Gürsu, B. Y. (2022) Klinik Candida izolatlarında karvakrolün antimikrobiyal etkilerinin araştırılması ve immunoelektron mikroskopik yöntem ile görüntülenmesi. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 15(2), 265-272. <https://doi.org/10.46309/biodicon.2022.1120159>
- [27] Ceylan, R., Zengin, G., Aktümsek, A., Apiaceae familyasına ait *Turgenia latifolia*'nın GC-MS ile Uçucu Yağ Kompozisyonunun Belirlenmesi, 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, 2014.
- [28] Hajimehdipoor, H., Ara, L., Moazzeni, H., & Esmaili, S. (2016). Evaluating the antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities of some plants from Kohgiluyeh va Boyerahmad province, Iran. *Research Journal of Pharmacognosy*, 3(4), 1-7.
- [29] Sardari, S., Amin, G., Micetich, R. G., & Daneshtalab, M. (1998). Phytopharmaceuticals. Part 1. Antifungal activity of selected Iranian and Canadian plants. *Pharmaceutical Biology*, 36(3), 180-188. <https://doi.org/10.1076/phbi.36.3.180.6348>



## Isolation and characterization of microorganisms for potential use with manure and chemical fertilizers

Levent DEĞİRMENÇİ<sup>1</sup>, Özge KAYGUSUZ İZGÖRDÜ<sup>2</sup>, Cihan DARCAN<sup>3</sup>  
ORCID: 0000-0001-6608-0398; 0000-0002-3652-4266; 0000-0003-0205-3774

<sup>1</sup> Department of Chemical Engineering, Bilecik Şeyh Edebali University, 11210, Bilecik Türkiye

<sup>2</sup> Biotechnology Application and Research Center, Bilecik Şeyh Edebali University, 11210, Bilecik Türkiye

<sup>3</sup> Department of Molecular Biology and Genetics, Bilecik Şeyh Edebali University, 11210, Bilecik Türkiye

### Abstract

In the present study a microbial consortium with the ability to utilize nitrogen of certain chemical fertilizers were established with a series of tests. The strains' indole acetic acid (IAA) and siderophore production, utilization of urea as carbon source were tested with 15 isolates, %50 of which belonged to *Bacillus* spp. based on caseinase and amylase activities. Nitrogen utilization was tested with nitrogen fixation, ammonia and nitrite oxidation abilities of the strains. Phosphate evaluation, another component of chemical fertilizers, was also determined with phosphate solubility test conducted in the presence of Pikovskaya agar. Identification of isolates was conducted via evaluating MALDI-TOF MS analyses. Results indicated four strains, 3 of which were identified as *Bacillus cereus* sp. and an *Alcaligenes faecalis* sp. which was the only non-*Bacillus* member of the consortium. The members of the consortium showed no antagonistic activity against each other implying their successful utilization as components of a commercial fertilizer. Media selection along with diversified tests were concluded to serve as fine criteria to establish a microbial consortium with targeted features.

**Keywords:** Indole acetic acid, siderophore, *Bacillus* spp., nitrogen fixation, ammonia/nitrite oxidation

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

### Organik ve kimyasal gübre olarak kullanım potansiyeline sahip mikroorganizmaların izolasyonu ve karakterizasyonu

### Özet

Sunulan çalışma kapsamında kimyasal gübre içeriğindeki azotu kullanabilme özelliğine sahip mikroorganizmalardan oluşan bir konsorsiyum bir dizi test sonucunun değerlendirilmesiyle oluşturulmuştur. Suşların indol asetik asit (IAA) ve siderofor üretme yetenekleri ve üre içeriğinde yer alan karbonu besiyeri olarak kullanma yetenekleri 15 farklı izolat için test edilmiştir. Suşlara uygulanan amilaz ve kazeinaz aktivite testleri sonucunda %50'sinin *Bacillus* spp. olduğu belirlenmiştir. Azot kullanımının incelenmesi kapsamında suşların azotu fikse edebilme ayrıca amonyak ve nitriti oksitleme yetenekleri belirlenmiştir. Kimyasal gübrelerde bir diğer makro element olan fosfat kullanımı Pikosvkaya agar'da inokülasyon ile görülmüştür. Son olarak suşların cins bazında tanımlanması MALDI-TOF MS analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesiyle mikroorganizma karışımına üç *Bacillus cereus* sp. suşu ile karışımın *Bacillus* sp. olmayan tek üyesi *Alcaligenes faecalis* sp. seçilmiştir. Mikroorganizma karışımında yer alan suşların birbirlerine karşı antagonistik etki göstermediği dolayısıyla karışımın mikrobiyal gübre olarak ticarileştirilmesinin mümkün olduğu da elde edilen sonuçlar arasındadır. Uygun besi yeri seçimi ve hedefe yönelik testlerin uygulanması hedefe yönelik mikroorganizmalardan oluşan bir konsorsiyumun oluşturulmasında etkili olmuştur.

**Anahtar kelimeler:** İndol asetik asit, siderofor, *Bacillus* spp. azot fiksasyonu, amonyum/nitrit oksidasyonu

## 1. Introduction

The opinion that world population would have risen over 9 billion in the next 40 years is acknowledged by a majority of demographers and environmentalists. The inevitable increase in population resulted in deficit of sources needed to meet nutritional requirement [1]. Proper nutrition of plant to achieve maximum yield and product quality has become a popular research area due to population increase. Addition of chemical fertilizers to soil is the most frequent and privileged application to solve yield and quality problems. Utilization of chemical fertilizers are lower in Türkiye compared to developed and developing countries. Nevertheless, chemical fertilizer is gaining an increasing attention and its harmful effects on environment possesses a serious threat [2].

Nitrogen, phosphorus and potassium are the main constituents of chemical fertilizer and the impact on environment varies according to the element. Nitrogen in the form of nitrate has the potential to accumulate in drinking water and nitrosamine compounds are known to be highly carcinogenic. Heavy metal accumulation is another problem during utilization of chemical fertilizers [2].

The harm oriented from chemical fertilizers is in fact related to its excessive use. Soil with its high buffering potential could tolerate chemical fertilizers to an extent. However, exceeding threshold leads to significant health and environmental problems [3].

Hence studies, mainly focused on developing the substitute of chemical fertilizers, have recently increased. The prerequisite of these substitutes is to lower environmental impact along with maintaining sustainable production. Plant growth promoting bacteria are fine candidates meeting these demands. These bacteria, when added to soil, operate via certain mechanisms facilitating acquisition of already existing resources in soil [4].

Facilitation of existing resources are mostly accomplished through solubilization of phosphate and nitrogen fixation from atmosphere. The compounds related to these two elements exist in high amounts in soil, yet the problem is the deficit of compounds suitable for plant uptake. PGPB intercedes at this point enabling their acquisition by plant. PGPB could also produce cytokinin, gibberellins and indole acetic acid (IAA). These bacteria also operate via indirect mechanisms such as siderophore production. Siderophore producing bacteria also acts as biocontrol agent capable of decreasing phytopathogen population in the flora [4,5].

The number of studies regarding the use of PGPB as fertilizer is relatively low, however, the results are promising with examples of successful utilization in mangrove reforestation [6], development of faba bean seeds [7] domestic apple [8].

Based on the findings presented so far, it was our opinion that PGPB could have been successful in the case of either simultaneous addition with chemical fertilizer or application to soil already containing chemical fertilizer. Apart from nitrogen which could be fixed via PGPB from atmosphere, PGPB would be less effective in the case of a serious nutrient deficit in soil. Hence the main purpose of PGPB utilization should be enhancement of nutrient uptake which was supplied via chemical fertilization or by other means. Chemical fertilizer is highly effective over a short period of time. However, long-term utilization of chemical fertilizer requires its simultaneous application with organic matter such as manure and straw.

Certain procedures were developed and/or modified in the present study to establish a microbial consortium. The procedures were developed to select plant growth-promoting microorganisms. These were intended to act as fertilizer in the case of sole utilization and potential enhancer when utilized in conjunction with either manure or chemical fertilizer.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Semi-selective isolation procedure as starting-point

As previously stated, the priority in selection of consortium members is the ability to utilize nitrogen supplied by any kind of chemical fertilizers. Selection of consortium members started with semi-selective isolation procedure from 18-month compost samples. These samples were previously obtained from compost prepared by manure, wheat straw and grass. Semi-selective isolation procedures were simply consecutive dilution of 0.5 g samples and inoculation of  $10^{-6}$  dilutions in an ammonifying medium containing 0.05% peptone, 0.05%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.05%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.05%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in 1 L with 12 g agar. This medium was recently utilized for enumeration of ammonifying bacteria [9]. The media was adopted as isolation procedure and acted as a starting point to determine microorganisms with the ability to utilize organic nitrogen. Isolation procedure was followed by purification and obtaining isolates as single colonies. These isolates were further tested for their potential as PGPB.

### 2.2. Standard tests applied to determine the potential of isolates as PGPB.

Nitrogen fixation ability of selected isolates was initially tested to detect isolates with ability to fix atmospheric nitrogen. Traditional procedure with semi-solid agar require long-term inoculation, instead a simpler and practical method based on inoculation with Ashby's mannitol and Ashby's sucrose agar was adopted to determine isolates with nitrogen fixing ability. Ashby's agars were originally utilized to isolate nitrogen fixing microorganism. Inoculation in the presence



of these agars were simply utilized as test procedure in the present study. Ashby’s agar contained (g/L) 0.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.2 NaCl, 0.1 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5CaCO<sub>3</sub> and 15 agar. Carbon sources were mannitol and sucrose which were added 20 g/L [10].

IAA production was determined with color change to pink at 530 nm via UV-Vis spectrophotometer. The method contains addition of Salkowski reagent to 1 ml of Luria Bertani supernatant containing % 0.05 l-tryptophan. 1.35 g FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O was completed to 100 ml via dH<sub>2</sub>O and 2 ml of this solution was then combined with 49 ml dH<sub>2</sub>O and 49 ml of per chloric acid, respectively. Salkowski reagent was added with the ratio of 2/1. The strains were incubated at 30 °C for 48 hours in l-tryptophan containing LB broth [11].

Pikovskaya agar containing (g/L) 0.5 yeast extract, 10 dextrose, 5 Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 KCl, 0.1 MgSO<sub>4</sub>, 0.0001 MnSO<sub>4</sub>, 0.0001 FeSO<sub>4</sub> and 15 agar were utilized to determine phosphate solubility. Transparent zone formation was evaluated as positive indicator [12].

Chrome Azurol S Assay with certain modifications was applied to determine siderophore production of strains. CAS solution prepared with mixing of 4 solutions was finally mixed with King’s B agar to formulate CAS agar. The ratio of CAS solution to Kings’s B agar was adjusted to 35/100 according to the method [13]. The ingredients of CAS solution and King’s B agar were given in Table 1.

Table 1. Chrome Azurol S agar utilized in siderophore production

Solutions				
C	D	B	A	King’s B agar (g/L)
0.03 ml HCl, complete to 100 ml via dH <sub>2</sub> O	0.026 g FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O, complete to 100 ml via dH <sub>2</sub> O	0.06 g Chrome Azurol reagent, complete to 50 ml via dH <sub>2</sub> O	0.07 g HDTMA, complete to 40ml via dH <sub>2</sub> O	Peptone 20 MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O 1.5 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.5 Glycerine 10 ml Agar 20
Add 10 ml	Add 100 ml	Add 50 ml	Add 40 ml	pH 7.2
Procedure:				
Solutions were combined with the order of C, D, B and A. The resulting 200 ml solution was finally mixed with King’s B agar with the ratio of 35/100				

Urea degradation ability of strains was tested via urea broth. The test was based on strains’ urea utilization as carbon source. Ammonium formation during the process was detected by color change of the broth. Inoculation of strains was conducted at 37 °C for 48 hours. The original “orange red” color of the broth turned into red in the presence of strains with positive results. The broth utilized in the study contained (g/L) 0.1 yeast extract, 9.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9.5 Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>, 20 urea and 0.01 phenol red.

2.3. Specified tests to determine nitrogen evaluation potential of PGP isolates.

The highlight of the present study was to determine isolates with the ability to facilitate plant’s nitrogen utilization. Hence sustainable supplement of plant available nitrate nitrogen was crucial for crop development. As previously stated the isolates were examined to detect the ones with the ability to transform ammonia from organic nitrogen and urea. However, these are only the initial states of nitrogen cycle and nitrogen should be converted to nitrate. Hence two media originally utilized for enumeration of both ammonium and nitride oxidizers were utilized to test nitrifying potential of strains. The media utilized for ammonia oxidation contained (g/L) 0.5 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.03 FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.3 NaCl, 0.3 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 7.5 CaCO<sub>3</sub>. Nitride oxidizing potential of strains was determined via of a separate medium containing (g/L) 0.006 NaNO<sub>3</sub> as nitrogen source. The media which was originally used for ammonia oxidizer detection was further modified with CaCl<sub>2</sub> addition. Calcium was supplied with 0.1 CaCl<sub>2</sub> and 1 CaCO<sub>3</sub> in nitride oxidizing media. The remaining ingredients and their amounts were kept identical. Nitrifying potential of strains was determined based on color change. Magenta colored media formed via phenol addition and pH adjustment to 8 should change into shades of yellow due to a decrease in pH value [14].

2.4. Biochemical tests conducted to determine Bacillus sp. in accordance with MALDI-TOF MS analyses evaluated for validation.

Biochemical tests were selected based on facile determination of Bacillus sp. presence among isolates. Evaluation of tests were based on positive results for both caseinase activity and starch hydrolysis. The modified medium used for caseinase activity contains (g/L) 5 peptone, 3 meat extract, and 15 agar. The ingredients were dissolved in 900

ml dH<sub>2</sub>O. The procedure was modified with addition of %10 skim milk after sterilization. Zone formation was the expected indicator for caseinase activity [15].

Starch hydrolysis was also evaluated according to zone formation following Lugol addition to the agar plates prepared with (g/L) 5 peptone, 3 meat extract, 2 starch and 15 agar. The test was conducted at 37 °C for 24 h [16].

The tests applied in the course of study were simply inoculation procedures conducted to visualize zone or color change in media. All agar inoculation was applied at 30 °C unless stated otherwise. The last test applied to validate *Bacillus* sp. presence was MALDI-TOF MS analyses applied for selected strains and an isolate with positive activity towards siderophore production (See. Results and Discussion). MALDI-TOF MS analyses were conducted via service procurement from Hatay Mustafa Kemal University.

### 3. Results

Variation of IAA production capacity was illustrated in Figure 1. The values were obtained for 3 separate runs and capacity values were presented as pie chart with clockwise variation starting from LFSN1 isolate. In our opinion, the capability of IAA production was more important compared to the amount of IAA produced as IAA production was adopted as a standard criterion for selection. Hence the figure was evaluated for the strains with the highest production capacity, yet remaining tests were applied for all.

Nitrogen fixation from atmosphere was another important property that should be standard for a microbial consortium. The consortium was originally combined to facilitate plants' fertilizer consumption, however properties such as IAA production and nitrogen fixation ability were also crucial in the case of fertilizer deficit. Inoculation performances of isolates in the presence of Ashby's sucrose and mannitol agars (AMA and ASA) were illustrated in Table 2. Results indicated relatively higher affinity of the isolates towards mannitol presence.

Table 2. Nitrogen fixation performance of isolates in the presence of AMA and ASA agars; biochemical tests to determine caseinase activity and starch hydrolysis

Isolate code	Nitrogen fixation		Biochemical tests	
	AMA	ASA	Caseinase	Starch hydrolysis
LFNS1	++	+	-	-
LFNS2	++	+	+	+
LFNS3	++	+	-	-
LFNS4	--	+	-	-
LFNS5	+	+	+	+
LFNS6	+	++	+	+
LFNS7	+	+	+	+
LFNS8	--	+	+	+
LFNS9	++	+	+	+
LFNS10	++	+	-	-
LFNS11	+	+	+	+
LFNS12	++	+	-	-
LFNS13	--	--	-	-
LFNS14	--	--	+	+
LFNS15	+	+	-	-

+: production with visible colonies

++: completed development of isolates, stronger production

As previously stated, a semi-selective agar was adopted during isolation of microorganisms. The idea was to detect certain microorganisms preferably the ones with ability to utilize organic nitrogen. A simple twist to the procedure was conducted with exclusion of agar from the media and following addition of Nessler's reagent. By doing so, the isolation procedure could easily be evaluated for the selection of ammonifiers. The results for both agar and broth were given in Figure 2. The isolates with positive results were given in Figures with orange color formation as positive indicators.

Phosphate solubility in the presence of Pikovskaya's agar could be determined via transparent zone formation. Results given in comparison with a positive sample revealed only 3 isolates with the ability to solubilize inorganic phosphate. Hence this test has become one of the main selection criterion in the course of microbial consortium preparation (Figure 3).

Siderophore synthesis to facilitate iron transport to plants was another selection criterion. The results indicated only LFNS13 as siderophore producer (Figure 4).

Urea degradation ability of strains was initially conducted as specified test. The test determines degradation of urea and hence production of ammonia through urea utilization as carbon source. Figure 5 revealed the color change from orange-red to red color for LFNS6 and LFNS15 isolates.

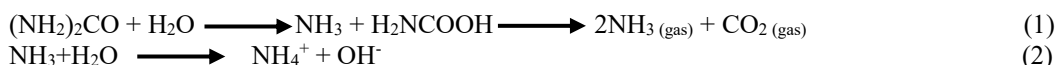
Ammonium oxidation and nitrite oxidation ability of the strains were also determined via color change from magenta to yellow color. Results were illustrated in Figure 6.

#### 4. Conclusions and discussion

Selection of isolates as participants of a microbial consortium might as well be an impossible task considering similar properties that the isolates might possess. Isolation procedures are generally conducted at identical conditions including media, inoculation temperature and antibiotics utilization if required. Hence a different approach meeting multiple criteria should be adopted during isolation. The isolation procedure itself becomes a selection criterion with the use of various antibiotics and heating procedures. However, antibiotics utilization is expensive and there is no guarantee for acquisition of isolates with beneficial traits for plant growth. Hence a more facile method based on media selection was applied in the present study. As previously stated, the isolation procedure is originally utilized for determination of ammonifiers among isolates. Isolates with the ability to mineralize organic nitrogen is in fact not preferred in the case of composting. On the contrary, studies on composting aim to increase bioavailable organic nitrogen content during the process and regulation of nitrogen conversion in the course of composting is considered as the key factor [17]. However, the conditions in the present study were entirely different with mature compost being the source of isolation and isolates with the ability of utilizing organic nitrogen would be preferable in the case of manure application to cultivation area. In other words, isolates using organic nitrogen would continue to survive or even thrive long after their application to cultivation area amended with manure.

Nitrogen fixation from atmosphere was considered as another solution for survival of potential consortium. This was considered as the worst-case scenario for cultivation areas without amendment of any kind. It is noteworthy to point out the fact that the medium AMA and ASA could both be used as selective isolation media and in that case isolates with the ability to fix atmospheric nitrogen would be starting point for establishing the consortium.

Nitrogen utilization of isolates was one of the key factors during selection of isolates. Another key factor of selection was the ability of isolate to utilize the fertilizer as media. This scenario was tested with urea degradation in which urea was the carbon source. Urea is preferred among the farmers as the fertilizer continues the highest among of nitrogen with lowest price. The main problem in urea utilization ammonia volatilization. Certain precautions to reduce ammonia emissions are still being studied. However, these precautions generally included utilization of additives to reduce ammonia leading to an increase in the amount of externally supplied chemicals to the soil. Utilization of microbial consortium offers an accelerated pathway with utilization of urea as food source. Urea degradation will result in ammonia volatilization. However, enhanced breakdown of urea to ammonia will also lead to plant available ammonium formation in the presence of water. Consequently, it was thought that addition of urea degrading isolates to the consortium would have increased the amount of ammonia transforming to ammonium. The reactions occurred during ammonium formation was given as [18]:



Microbial consortium would also contain isolates with the ability to transform nitrogen into plant available nitrate through ammonia and nitrite oxidation mechanisms. Transformation of ammonia or ammonium to nitrate is a two step process involving initial formation of nitrite which is then converted to nitrate. It was crucial to include both ammonium and nitrite oxidizers to the consortium to maintain plants' highest possible nitrate assimilation [19]. The aim was simply to determine the potential of isolates that could oxidize ammonium/ammonia and/or nitrite to nitrate. Hence observation of color change through inoculation in ammonia and nitrite oxidizer in the presence of media utilized for enumeration was thought to be a simple yet an effective method to determine isolates. As long as an isolate could be determined based on the tests conducted so far, the consortium would be effective as the isolates would be able to directly interfere to nitrogen cycle, hence increasing plants' nitrate assimilation.

Phosphorus, another macronutrient for plant growth, is scarce which impels its external addition. Another problem in utilization of phosphorus is the amount of CaCO<sub>3</sub> in Türkiye. 48 % of agricultural area in Türkiye was classified as mid-calcitic while there is a surplus of CaCO<sub>3</sub> in 30 % of Türkiye's agricultural area [20]. Phosphorus when added to soil reacts with CaCO<sub>3</sub> which resulted in formation of Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> unavialbe for plant assimilation. External phosphorus application is a continious process. In other words there is a vast and increasing source of potassium in agricultural area. Selected isolates would be effective at this point dissolving Ca<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> which will result in formation of plant available phosphorus [21]. Iron deficiency is also closely related to CaCO<sub>3</sub> presence and an isolate with the ability of producing siderophore will benefit from the presence of a phosphate solubilizing isolate when applied in accordance [22].

Biochemical tests were also applied in the course of study to maintain uniformity of the isolates within the bounds of possibility. Results obtained from caseinase activity and starch hydrolysis revealed the first clue on determination of isolates. Hence over 50 % of isolates could hydrolyse starch and have caseinase activity and had a very high chance to belong *Bacillus* spp. (Table 2). Based on the results a scheme revealing the effects of isolates was prepared and illustrated in Figure 7.

Selection of consortium members is primarily detected according to the results of specific tests. Some results were unique for certain *Bacillus* sp. members and hence these strains were directly added to the consortium. Urea degradation was one of the tests with specific results and LFNS6 was the only strain with positive results. This is not the only property of the strain, LFNS6 could also utilize atmospheric and organic nitrogen. This strain also had the ability to oxidize both ammonium and nitrite which makes it a perfect candidate for use in consortium. Another strain LFNS8 could also utilize organic nitrogen. The strain further oxidizes ammonium to nitrite and nitrite to nitrate. Apart from these properties the strain's distinguishing feature and reason of selection was its ability to solubilize phosphate.

LFNS9 was selected with its features similar to LFNS8 with an additive feature of nitrogen fixing ability. Except siderophore production, this strain with its many properties was an ideal candidate for consortium. LFNS13 was the only non-*Bacillus* member of the consortium and selected for its unique feature as siderophore producer. Hence microbial consortium included LFNS6, LFNS8, LFNS9 and LFNS13.

Determination of antagonism between the strains was conducted with a relatively easy procedure. This test was among the simplest procedures, yet the results were crucial in case the consortium would be commercialized as bio fertilizer. The results for consortium including LFNS6,8,9 and 13 were illustrated in Figure 8. Consortium members could thrive in same medium as seen from the figure (Figure 8).

The last step in determination of microbial consortium was the identification of members. Based on the results, selected members of *Bacillus* spp. along with LFNS13 were analyzed via MALDI-TOF MS device. The results for selected consortium members were given in Table 3. Score values for LFNS6, 8 and 9 were between 2-2.299 revealing selection of the right genus. However, identification of species with these scores also revealed a probability implying the presence of members other than *Bacillus cereus* sp. LFNS13 was thought to be *Alcaligenes faecalis* sp. based on the results.

Table 3. MALDI-TOF MS analysis results for selected *Bacillus* sp. strains

Analyte code	Organism (best match)	Score value
LFNS6	<i>Bacillus cereus</i>	1.846
LFNS8	<i>Bacillus cereus</i>	2.03
LFNS9	<i>Bacillus cereus</i>	2.092
LFNS13	<i>Alcaligenes faecalis</i>	2.529

MALDI-TOF MS analysis is more viable in terms of economy when compared with 16S rRNA sequencing. The results obtained for *Bacillus cereus* sp. is a unique situation and it was thought that identical results would have been acquired via 16S rRNA sequencing. 16S rRNA sequencing is a costlier alternative and results indicated that MALDI-TOF MS should have been considered as the first step prior to trying costlier alternatives.

As stated, the score values for *Bacillus cereus* sp. was unique yet these values should be expected in this particular case. *Bacillus cereus* was indeed a group of organisms with four members which were recently identified. The members *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* and *Bacillus anthracis* could only be separated with few physiological characteristics [23]. Literature survey on *Bacillus cereus* sp. indicated the presence of various strains including siderophore producing [24] members. Consequently, an advanced analysis such as whole genome sequencing was required for detailed validation.

LFNS13 identified as *Alcaligenes faecalis* sp. is one of the well-known organisms studied for its plant growth promoting traits. A quick literature survey on the species revealed phosphate solubilizing ability of some strains [25]. However, that was not the case for our strain and the only selection criterion for LFNS13 was its siderophore production ability which was unique among other isolates. The conclusions obtained in the present study were summarized below.

- Media selection could serve as a selection criterion to assemble a certain group of microorganisms.
- Tests conducted for isolates could be diversified to establish a consortium with modified properties.
- Test procedures could be modified to facilitate establishment of microbial consortium.
- Strains with different properties could serve as members of consortium which was the case in our study.
- Identification in species level was possible to a certain extent. MALDI-TOF MS analysis presented a brief idea on strains and similar results would have been obtained in the case of applying its costlier alternatives. Hence a relatively simpler procedure is concluded to be better for initial investigation.

## References

- [1] Karim, A. Z. (2013). Impact of a growing population in agricultural resource management: exploring the global situation with a micro-level example. *Asian Social Science*, 9(15), 14.
- [2] Savci, S. (2012). An agricultural pollutant: chemical fertilizer. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(1), 73.
- [3] Aygün, Y. Z., & Mert, M. (2021). The effect of phosphorus doses on cotton growth under full and deficit irrigation conditions. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14(3), 464-469.
- [4] Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- [5] Felestrino, É. B., Santiago, I. F., Freitas, L. D. S., Rosa, L. H., Ribeiro, S. P., & Moreira, L. M. (2017). Plant growth promoting bacteria associated with *Langsdorffia hypogaea*-rhizosphere-host biological interface: a neglected model of bacterial prospecting. *Frontiers in microbiology*, 8, 172.
- [6] Bashan, Y., & Holguin, G. (2002). Plant growth-promoting bacteria: a potential tool for arid mangrove reforestation. *Trees*, 16(2-3), 159-166.
- [7] Elsheikh, E. A., & Elzidany, A. A. (1997). Effects of Rhizobium inoculation, organic and chemical fertilizers on yield and physical properties of faba bean seeds. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51, 137-144.
- [8] Miliute, I., Buzaitė, O., Gelvonauskienė, D., Sasnauskas, A., Stanys, V., & Baniulis, D. (2016). Plant growth promoting and antagonistic properties of endophytic bacteria isolated from domestic apple. *Zemdirbyste-Agriculture*, 103(1).
- [9] Meng, L., Li, W., Zhang, S., Wu, C., Jiang, W., & Sha, C. (2016). Effect of different extra carbon sources on nitrogen loss control and the change of bacterial populations in sewage sludge composting. *Ecological Engineering*, 94, 238-243.
- [10] Woźniak, M., Gałazka, A., Tyśkiewicz, R., & Jaroszek-Ścisiel, J. (2019). Endophytic bacteria potentially promote plant growth by synthesizing different metabolites and their phenotypic/physiological profiles in the Biolog GEN III MicroPlate™ Test. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(21), 5283.
- [11] Hussein, K. A., & Joo, J. H. (2015). Isolation and characterization of rhizomicrobial isolates for phosphate solubilization and indole acetic acid production. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 58, 847-855.
- [12] Prijambada, D. I., Widada, J., Kabirun, S., Widiyanto, D. (2009). Secretion of Organic Acids by Phosphate Solubilizing Bacteria Isolated from Oxisols. *Journal of Tropical Soils*, 14(3), 245-251.
- [13] Qing-Ping, H., & Jian-Guo, X. (2011). A simple double-layered chrome azurol S agar (SD-CASA) plate assay to optimize the production of siderophores by a potential biocontrol agent *Bacillus*. *African Journal of Microbiology Research*, 5(25), 4321-4327.
- [14] Elbanna, K., El-Shahawy, R. M., & Atalla, K. M. (2012). A new simple method for the enumeration of nitrifying bacteria in different environments. *Plant, Soil and Environment*, 58(1), 49-53.
- [15] Mehmet, A. Ş. A. N. (2007). Development of New Culture Medium for Various Microorganisms. *Journal of Agricultural Sciences*, 13(01), 75-79.
- [16] El-Banna, T. E., Abd-Aziz, A. A., Abou-Dobara, M. I., & Ibrahim, R. I. (2007). Production and immobilization of alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 10(12), 2039-2047.
- [17] Li, H., Wei, Z., Song, C., Chen, X., Zhang, R., & Liu, Y. (2022). Functional keystone drive nitrogen conversion during different animal manures composting. *Bioresource Technology*, 361, 127721.
- [18] Wu, Y., Li, H., & Li, Y. (2021). Biomineralization induced by cells of *Sporosarcina pasteurii*: Mechanisms, applications and challenges. *Microorganisms*, 9(11), 2396.
- [19] Amoo, A. E., & Babalola, O. O. (2017). Ammonia-oxidizing microorganisms: key players in the promotion of plant growth. *Journal of soil science and plant nutrition*, 17(4), 935-947.
- [20] Sönmez, B., Özbahçe, A., Akgül, S., & Keçeci, M. (2018). Türkiye topraklarının bazı verimlilik ve organik karbon (TOK) içeriğinin coğrafi veritabanının oluşturulması (in Turkish). Tarım ve orman bakanlığı, tarımsal araştırmalar ve politikalar genel müdürlüğü proje sonuç raporu TAGEM. *Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü Proje Sonuç Raporu TAGEM*, 13.
- [21] Hasan, M. M., Hasan, M. M., Teixeira da Silva, J. A., & Li, X. (2016). Regulation of phosphorus uptake and utilization: transitioning from current knowledge to practical strategies. *Cellular & molecular biology letters*, 21, 1-19.
- [22] Merry, R., Espina, M. J., Lorenz, A. J., & Stupar, R. M. (2022). Development of a controlled-environment assay to induce iron deficiency chlorosis in soybean by adjusting calcium carbonates, pH, and nodulation. *Plant Methods*, 18(1), 36.
- [23] Lechner, S., Mayr, R., Francis, K. P., Prüß, B. M., Kaplan, T., Wießner-Gunkel, E. L. K. E., ... & Scherer, S. (1998). *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 48(4), 1373-1382.

- [24] Antil, S., Kumar, R., Pathak, D. V., Kumar, A., Panwar, A., & Kumari, A. (2022). Plant growth-promoting rhizobacteria-*Bacillus cereus* KMT-5 and *B. megaterium* KMT-8 effectively suppressed *Meloidogyne javanica* infection. *Applied Soil Ecology*, 174, 104419.
- [25] Saranya, K., Sundaramanickam, A., Manupoori, S., & Kanth, S. V. (2022). Screening of multi-faceted phosphate-solubilising bacterium from seagrass meadow and their plant growth promotion under saline stress condition. *Microbiological Research*, 261, 127080.

Contents / İçindekiler

Page No. Order No.

01. 1 A macrofungus taxon that is commonly eaten by the folk in Central Anatolia but never reported from Türkiye: *Agaricus pequinii* (Boud.) Konrad & Maubl.
02. 7 The morphological, anatomical, palynological, seed micromorphological studies and its taxonomical significance in *Delphinium turcicum* (*Ranunculaceae*), a local endemic spurless species for Türkiye
03. 18 Impacts of three different magnetic field applications on seed germination and seedling development of *Melissa officinalis* L.
04. 26 An ethnobotanical study on plants used in broom making in different geographical regions of Türkiye
05. 36 Investigation of proapoptotic and anticancer effects mediated by intracellular ceramide changing dependent on ARN14974=BOC treatment in human non-small cell lung cancer
06. 49 The bryophyte flora of Aydın Mountain
07. 63 Anatomy, palynology and seed micromorphology of Turkish rare *Verbascum racemiferum* Boiss. & Hausskn Ex Boiss. (*Scrophulariaceae*)
08. 72 *Floccularia luteovirens*, a new edible mushroom record for Turkish Mycobiota
09. 79 Phytochemical analysis and biological effects of *Turgenia latifolia* (L.) Hoffm. (*Apiaceae*)
10. 91 Isolation and characterization of microorganisms for potential use with manure and chemical fertilizers

**Abstracted-Indexed in / Dergiyi tarayan veri tabanları:** Web of Science [Zoological Records Indexed] Clavariate Analytic, CiteFactor, Turkey Citation Index, JournalSeek Database, arastirmax, Medical Reads (RRS), CrossRef;10.46309/biodicon.

**Libraries / Kütüphaneler:** Aberystwyth University; All libraries; Bath University; Birmingham University; Cardiff University ;City University London; CONSER (Not UK Holdings); Edinburgh University; Essex University; Exeter University; Eskişehir Teknik Üniversitesi Library, 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

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

“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 yayınlanan makalelere” [http:// www.biodicon.com](http://www.biodicon.com)” adresinden ulaşabilir.

This journal is available online at [http:// www.biodicon.com](http://www.biodicon.com)

Copyright 2024 ©ERSİN YÜCEL All rights reserved/Tüm hakları saklıdır.

ISSN 1308-5301 Print / ISSN 1308-8084 Online

ISSN 1308-5301



## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

“BIOLOGICAL DIVERSITY 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 requests.



### 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	25	7	maximum 20 images
Review Article	5000	350	35	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.eblib.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 taahhüt 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 infringe 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

Sazova Mahallesi, Ziraat Caddesi, No.277 F Blok, Eskişehir, Türkiye, 26005

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 Subscription Rate for Outside Turkey is 70 USD or 60 EUR for 3 issues.**

\*Abone olmayanlar için her bir sayı 100 TL 'dir (Türkiye içi) / **Each volume is 50 USD or 40 EUR for non-subscribers (Outside of Turkey).**

Sadece belirttiğim sayıyı olmak istiyorum / **I would like to have an issue;**

Vol. 1/1.....( ), Vol. 1/2 ..... ( )  
 Vol. 2/1 .....( ), Vol. 2/2 ..... ( ), Vol. 2/3.....( )  
 Vol 3/1. ....( ), Vol. 3/2.....( ), Vol .3/3.....( )  
 Vol 4/1. ....( ), Vol. 4/2.....( ), Vol .4/3.....( )  
 Vol 5/1. ....( ), Vol. 5/2.....( ), Vol .5/3.....( )  
 Vol 6/1. ....( ), Vol. 6/2.....( ), Vol .6/3.....( )  
 Vol 8/1. ....( ), Vol. 8/2.....( ), Vol .8/3.....( )  
 Vol 9/1. ....( ), Vol. 9/2.....( ), Vol .9/3.....( )  
 Vol 10/1. ....( ), Vol. 10/2.....( ), Vol .10/3.....( )  
 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.....( )  
 Vol 16/1. ....( ), Vol. 16/2.....( ), Vol .16/3.....( )  
 Vol 17/1. ....( ), Vol. 17/2.....( ), Vol .17/3.....( )

Abone olmak istiyorum / **I would like to have an annual subscription;**

..... ( ) 2024.....( ) 20

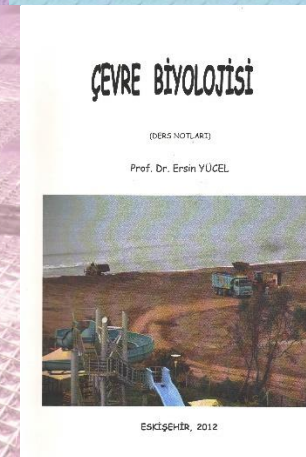
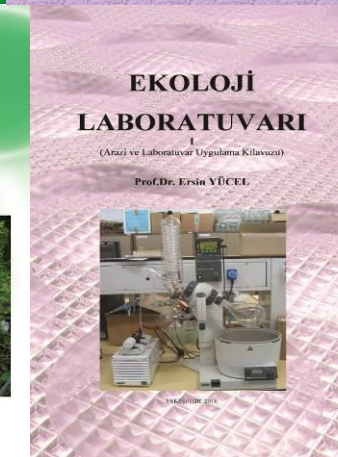
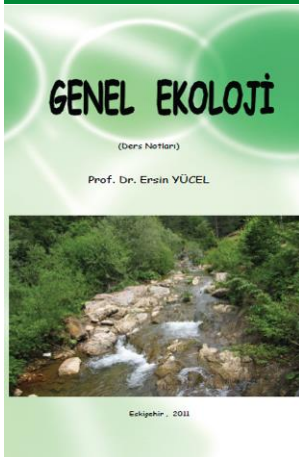
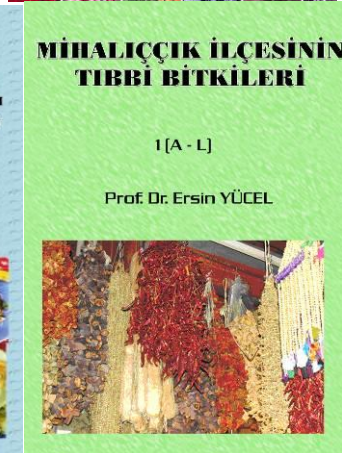
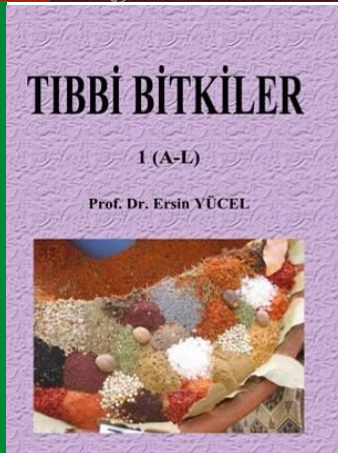
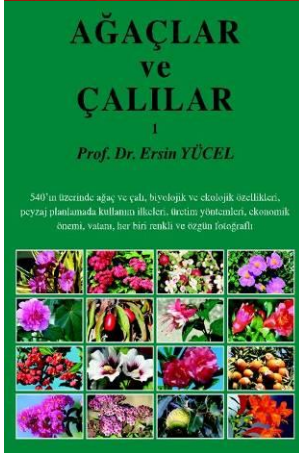
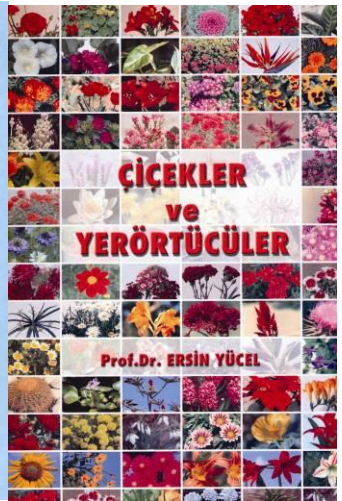
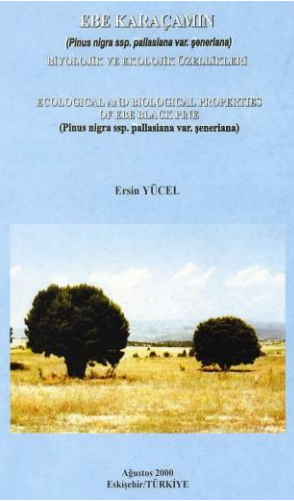
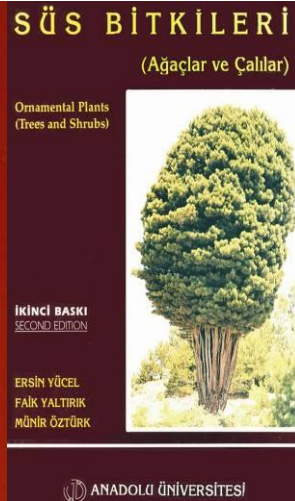
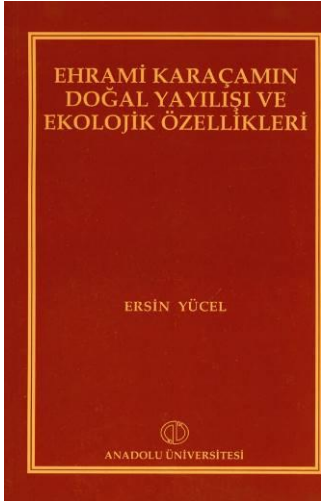
Dergi aboneliğiniz ile ilgili ücreti

**“VAKIFBANK, Ersin YÜCEL, IBAN: TR17 0001 5001 5800 7308 0978 79”** 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: **“VAKIFBANK, Ersin YÜCEL, IBAN: TR17 0001 5001 5800 7308 0978 79”**. 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>