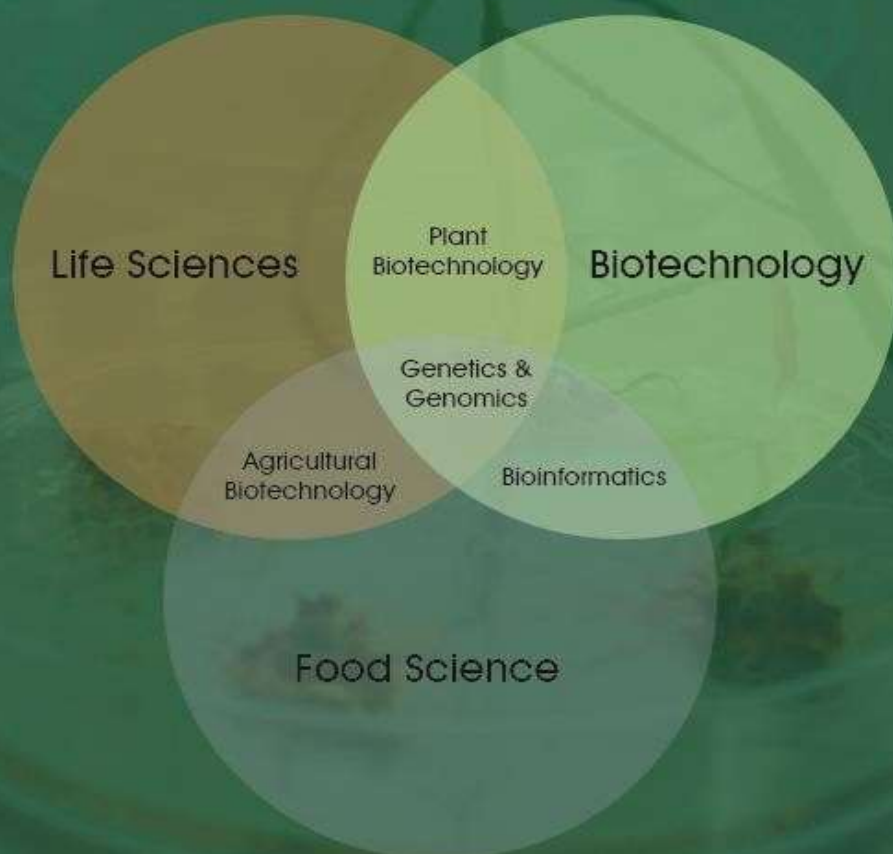


International Journal of Life Sciences and Biotechnology

e-ISSN:2651-4621



Editor in Chief / Baş Editör**Asst. Prof. Dr. Yılmaz Kaya**

Ondokuz Mayıs University, Turkey

Section Editors / Bölüm Editörleri*

* sıralama akademik unvan içinde alfabetik sıralamaya göre. * The ranking is arranged alphabetically within the academic title.

Prof. Dr. Ali ASLAN, PhD, Van Yuzuncuyıl University

Prof. Dr. Ercan BURSAL, PhD, Muş Alparslan University

Prof. Dr. Hasan AKAN, PhD, Harran University

Prof. Dr. Nermin GOZUKİRMİZİ, PhD Istinye University

Prof. Dr. Tengku Haziyaamin TENGKU ABDUL HAMİD, PhD, International Islamic University Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Ayhan HORUZ, PhD Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Hasan Murat AKSOY, PhD, Ondokuz Mayıs University

Editorial Board / Editör Kurulu

Prof. Dr. İsmail KOCAÇALIŞKAN, PhD, Yıldız Technical University

Prof. Dr. Kasim BAJROVIĆ, University of Sarajevo

Prof. Dr. Muhammet KURULAY, PhD, Yıldız Technical University

Assoc. Prof. Dr. Gulbubu KURMANBEKOVA, Kyrgyz-Turkish Manas University

Assoc. Prof. Dr. İsmail ERPER, PhD, Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Muhammad Arshad JAVED, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Roswanira AB. WAHAB, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Assoc. Prof. Dr. Sevgi MARAKLI, PhD, Amasya University

Asst. Prof. Dr. Abdussamat GÜZEL, PhD, Inonu University

Asst. Prof. Dr. Ali Yuksek, PhD, Ondokuz Mayıs University

Asst. Prof. Dr. Cihan İNAN, PhD, Karadeniz Technical University

Asst. Prof. Dr. Ertan ERMİŞ, PhD, Istanbul Sabahattin Zaim University

Asst. Prof. Dr. Feyza TUFAN, PhD, Halic University

Asst. Prof. Dr. Harun ÖZER, PhD, Ondokuz Mayıs University

Asst. Prof. Dr. Kasım TAKIM, PhD, Harran University

Asst. Prof. Dr. Mohamed EDBEİB, PhD, Baniwalid University, Libya

Asst. Prof. Dr. Muhammed YÜCEER, PhD, Canakkale Onsekiz Mart University,

Dr. Aliyu ADAMU, PhD, Kaduna State University

Dr. Abdulwali ABLAT, University of Malaya

Dr. Lect. Abdulgani DEVLET, PhD, Bilecik Seyh Edebali University

Dr. Nedim UZUN, PhD, Taksim Education and Research Hospital, Turkey

Dr. Res. Asst. Kiran NAWAZ, PhD, University of Arizona

Advisory Board / Danışma Kurulu

Prof. Dr. Ahmet OKUMUŞ, PhD, Aydın Adnan Menderes University

Prof. Dr. Didem ÖZÇİMEN, PhD, Yıldız Technical University

Prof. Dr. Fahrul Zaman HUYOP, PhD, Universiti Teknologi Malaysia

Prof. Dr. İbrahim İlker ÖZYİĞİT, PhD, Marmara University

Assoc. Prof. Dr. Funda ARSLANOĞLU, PhD, Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Kadyrbay CHEKİROV, Kyrgyz - Turkish Manas University, Kyrgyzstan

Assoc. Prof. Dr. Sibel YILMAZ, PhD, Yeni Yuzyil University

Assoc. Prof. Dr. Zarina Bt ZAINUDDİN, PhD, International Islamic University Malaysia

Language Editors/ Dil Editörleri

Assoc. Dr. Sevgi Maraklı, Amasya University, Turkey

Res. Assist. Bermet Kıdıralyeva, Kyrgyz - Turkish Manas University, Kyrgyzstan

Specialist Nurjamal Omurzakova, Kyrgyz - Turkish Manas University, Kyrgyzstan

Managing Editor / Yönetici Editör

Yunus Emre ARVAS, PhD Cand., Yıldız Technical University

Yönetim Ofisi/ Management Office

Yıldız Technical University, Faculty of Chemical and Metallurgical Engineering.
ESENLER/ISTANBUL

Yasal Sorumluluk

Yazıların yasal ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

Tüm hakları saklıdır. Derginin hiçbir bölümü, yazılı ön izin olmaksızın ve dergi adına referans gösterilmeden herhangi bir formatta çoğaltılamaz veya kullanılamaz.

Legal Responsibility

The legal responsibility of the articles belongs to the authors. All rights reserved. No part of this journal may be reproduced or used in any form without the prior written permission and a reference to name of the journal.

Editörden;

Değerli okurlar ve yazarlar,

“International Journal of Life Sciences and Biotechnology” olarak dergimizin altıncı sayısını yayın hayatına sunmaktan mutluluk ve onur duyuyoruz. “International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisi araştırma- geliştirme ve uygulama ilkeleri baz alınarak yayınlanan uluslararası hakemli açık erişimli akademik bir elektronik dergidir.

“International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisi Yaşam Bilimleri, Biyoloji, Biyoteknoloji, Biyomühendislik, Ziraat Bilimleri, Gıda Biyoteknolojisi ve Genetik alanlarındaki ilgili araştırmacılara, kurum ve kuruluşlara teorik ve pratik uygulamalarda katkı sağlamayı, tarafsızlık ve bilim etiği ilkelerine bağlı kalarak çözüm temelli, yenilikçi ve katma değeri olan çalışmalara odaklanan, günceli ve geleceği tartışan çalışmaların yayınlanmasını hedeflemektedir.

Bu düşüncelerle 2020 yılı üçüncü sayısını yayınladığımız “International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisini, makaleleri ile onurlandıran akademisyenlere, Fikir / Görüş / Öneri / Katkı ve Eleştirileri ile değerlendirme süreçlerine katkılarından dolayı hakem ve yayın kurullarında yer alan kıymetli bilim insanlarına yürekten teşekkür ediyoruz. Bir sonraki sayıda görüşmek ümidiyle...

15.12.2020
Editör
Dr. Öğrt. Üyesi Yılmaz KAYA

From The Editor;

Dear Readers and Authors,

As “International Journal of Life Sciences and Biotechnology”, we are pleased and honored to present the fifth issue of the journal. "International Journal of Life Sciences and Biotechnology" is an international double peer-reviewed open access academic journal published on the basis of research- development and code of practice.

The aims of this journal are to contribute in theoretical and practical applications in relevant researchers of Life Sciences, Biology, Biotechnology, Bioengineering, Agricultural Sciences, Food Biotechnology and Genetics institutions and organizations in Turkey, and to publish solution based papers depending on the principle of impartiality and scientific ethics principles, focusing on innovative and added value work, discussing the current and future.

With these thoughts, We are especially thankful to academicians honoring with the articles, valuable scientists involved in editorial boards and reviewers for their contributions to the evaluation processes with through their opinions/ideas/contributions/criticisms in third issue of 2020 "International Journal of Life Sciences and Biotechnology". Hope to see you in the next issue...

15.12.2020

Editor in Chief

Assit. Prof. Dr. Yilmaz KAYA

Sayının Hakemleri / Reviewers of the Issue*

* sıralama akademik unvan içinde alfabetik sıralamaya göredir. * The ranking is arranged alphabetically within the academic title.

Prof. Dr. Ahmet OKUMUŞ, PhD, Aydın Adnan Menderes University, Turkey

Prof. Dr. Halit YETİŞİR, PhD, Erciyes University, Turkey

Prof. Dr. Kazım MAVİ, PhD, Hatay Mustafa Kemal University, Turkey

Assoc. Prof. Dr. Ismaila Yada Sudi, PhD, Adamawa State University, Nigeria

Assoc. Prof. Dr. Kubilay Tekin, PhD, Karabuk University, Turkey

Assoc. Prof. Dr. Mesut IŞIK, PhD, Bilecik Şeyh Edebali University, Turkey

Assoc. Prof. Dr. Özhan ŞİMSEK, PhD, Erciyes University, Turkey

Assoc. Prof. Dr. Salih KÖSE, PhD, Eskisehir Osmangazi University

Assoc. Prof. Dr. Uğur ŞEN, PhD, Ondokuz Mayıs University, Turkey

Assist Prof. Dr. Ahmad Shehab Ahmad Lafi, PhD, Anbar University, Iraq

Assist. Prof. Dr. Canan ÖZTOKAT KUZUCU, PhD, Canakkale Onsekiz Mart University

Assist. Prof. Dr. Ertan ERMİŞ, PhD, İstanbul Sabahattin University, Turkey

Assist. Prof. Dr. Kaan Hürkan, PhD, Iğdır University, Turkey

Assist. Prof. Dr. Nurdoğan TOPAL, PhD, Uşak University, Turkey

Assist. Prof. Dr. Wafaa Hassan Muslem, PhD, Mustansiriyyah University

Assist. Prof. Dr. Zina HASHEM SHEHAB PhD., University of Baghdad, Baghdad, Iraq

Dr. Abdullahi NASİR, PhD, Bayero University, Kano, Nigeria

Dr. Amadu Kayode Salau, PhD, Fountain University, Osogbo, Nigeria

Dr. Res. Assit. Bermet KIDIRALIYEVA, PhD, Kyrgyz-Turkish Manas University, Kyrgyzstan

Dr. Res. Assist. Bilal AĞIRMAN, PhD, Çukurova University, Turkey

Dr. Res. Assist. Mehmet TÜTÜNCÜ, PhD, Ondokuz Mayıs University, Turkey

Dr. Res. Assit Serdar YEDİER, PhD, Ordu University, , Turkey

Dr. Veysi AKŞAHİN, PhD, Cukurova University, Turkey

Assist. Lect. Sara Thamer HADİ, Anbar University, Iraq

İçindekiler/ Contents

Research Articles/ Araştırma Makaleleri

- Isolation of Antibiotic Resistant Bacteria from Rivers in Terengganu, Malaysia**
Nor Azimah MOHD ZAİN, Nurul Aqidah SALİKAN, Kam KAR YERN 241-257
- Production and Biochemical Characterization of Cellulase Enzyme by Trichoderma Strains from Harran Plain**
Mümine GURUK, Mehmet KARAASLAN 258-274
- Polymorphism of Alpha S1-Casein Gene in Yankasa Sheep Breed of Mubi, Adamawa State of Nigeria**
Ismaila Yada SUDİ, Shuaibu MOHAMMED, Malachi TİZHE, Clément AUGUSTİNE 275-290
- Isolation of Antibiotic Resistant Bacteria from Rivers in Kelantan, Malaysia**
Nurul Liyana HASSAN, Kam KAR YERN, Dr. Nor Azimah MOHD ZAİN 291-307
- Gisela 6 ve SL 64 Anaçlarının İn vitro Koşullarda Çoğalma Performanslarının Belirlenmesi**
Erol AYDIN, Belgin TURUNÇ, Tarık YARILGAÇ 308-316
- Short term effect of zinc administration on some biochemical parameters and antioxidant enzymes in albino rats**
Yusuf JACOB AKURE, Maryam AHMED, Hyelni BUKAR, Gingsami SİMON..... 317-324
- Yenilenebilir Enerji Kaynaklarından Biyogazın Enerjisinin Çankırı İl'i İçin Potansiyelinin Belirlenmesi ve Kullanılabilirliği**
Olçay GENÇYILMAZ, Gamze SEÇKİN 325-341
- Farklı Priming Uygulamalarının Patlıcan (Solanum melongena L.) Çeşitlerinin Tohumları Üzerindeki Etkinliği**
Kübra ÖZMEN, Burcu KENANOĞLU 342-360
- Review Articles / Derleme Makaleler**
- Kendiliğinden Montajlı Peptidler ve Kullanım Alanları**
Şeyma AYDIN, Zülal KESMEN..... 361-385
- Biberlerde Türler Arası Melezleme**
Kazım MAVİ..... 386-406

Salikan N. A., K. K Yern, Zain, N. A, M, Isolation of Antibiotic Resistant Bacteria from Rivers in Terengganu, Malaysia. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(2): p. 241- 257.
DOI: 10.38001/ijlsb.711948

Isolation of Antibiotic Resistant Bacteria from Rivers in Terengganu, Malaysia

Nurul Aqidah Salikan¹ , Kam Kar Yern¹  and Nor Azimah Mohd Zain^{1*} 

ABSTRACT

Infectious disease cause by antibiotic resistant bacteria has been more difficult to treat because the ability of these bacteria to avoid the effect of antibiotic medication. Nowadays, water environment especially river has become the reservoir for the dissemination of antibiotic resistant bacteria due to antibiotic contamination derived from human activities. The exposure to antibiotic resistance bacteria in water increase the health risks associated with the waterborne bacteria in animals and humans. Therefore, this study was carried out to investigate the presence of antibiotic resistant bacteria from two rivers; Ibai River and Terengganu River in Terengganu. A total of 24 bacterial strains were isolated from both rivers. Antibiotic susceptibility of the bacteria isolates was assayed according to the Kirby-Bauer disk diffusion method using six types of antibiotics such as ampicillin, rifampicin, gentamicin, tetracycline, ciprofloxacin and chloramphenicol. The results of this study indicate that 100% of bacterial strains were resistant to at least two antibiotics tested. The multiple antibiotic resistant (MAR) index of these bacteria was calculated and 23 bacterial strains show MAR index of more than 20%. Among the 23 isolates, a total of 10 bacterial strains (2A, 2B, 2C, 2I, 3A, 3B, 4A, 4C, 4D and 4E) were successfully identified as *Chromobacterium violaceum*, *Enterobacter tabaci*, *Bacillus wiedmannii*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *Chromobacterium aquaticum*, *Cupriavidus metallidurans*, *Weeksella massiliensis*, *Cupriavidus necator* and *Acinetobacter nosocomialis*. The results from this study show that both of the rivers are exposed to high level of antibiotics compound which may lead the bacteria to develop mechanism of antibiotic resistant. This may cause a serious threat to the public health and environment.

ARTICLE HISTORY

Received

1 April 2020

Accepted

6 September 2020

KEYWORDS

Antibiotic resistance bacteria, multiple antibiotic resistance, river waters, Terengganu

Introduction

River is the most vital freshwater resources for the human and its use for various purposes such as agricultural, recreational, and also industrial activity [1]. However, uncontrolled and overuse of antibiotic in clinical setting and also in intensive animal husbandry gives negative impact to the water environment [2]. These occur due to the release of antibiotics compound into the aquatic system through the agricultural runoff or municipal wastewater as the antibiotic is not fully metabolize in the body human and animal treated with antibiotic [3]. The emergence and development of antibiotic resistance gene in bacteria occur due to natural selection cause by the high levels of antibiotics in the environment [4].

¹ Department of Biosciences, Faculty of Science 81310 Johor Bahru, Universiti Teknologi Malaysia

*Corresponding Autor: Nor Azimah Mohd Zain, e-mail: norazimah@utm.my

These cause the environment to become the reservoir for propagation and proliferation of antibiotics resistance genes to pathogen through food web and water [5]. As a consequence, the probability of becoming exposed to antibiotic resistant bacteria outside clinical setting increases [6]. For instance, people may become exposed through the preparation and consumption of contaminated food or ingestion of contaminated water. As a result, cases that involve the antibiotic resistance by organism elevated and become a threat to public life. This definitely become a threat to human health as antibiotic resistant bacteria will cause serious infection especially in debilitated patients which may therefore difficult to treat.

Different defense mechanisms have been developed by bacteria to evade themselves from the effect of antibiotics that was used against them. The genes encoding these defense mechanisms are located on the chromosome of bacteria or on extrachromosomal plasmids and are transmitted to the next generation and these known as vertical gene transfer. Meanwhile, horizontal gene transfer is plasmids that exchanged among bacteria of different taxonomic affiliation. Horizontal gene transfer by conjugation is common in nature because there will be more interaction between bacteria especially when the density of bacteria is high [7].

These environmental antibiotics resistance gene could be a reservoir and horizontally transferred to human-associated bacteria and thus contribute to antibiotic resistance proliferation. Antibiotics exert a selection in favor of resistant bacteria by killing or inhibiting growth of susceptible bacteria; resistant bacteria can adapt to environmental conditions and serve as vectors for the spread of antibiotic resistance depending on their concentrations [8]. Therefore, uncontrolled use of antibiotics may exert selective pressure and resistant pathogen will encounter more frequently [9]. The main risk for public health is that resistance genes are transferred from environmental bacteria to human pathogen.

Therefore, this study aimed to isolate and identify the prevalence of antibiotic resistance bacteria from Ibai River and Terengganu River in Terengganu through biochemical and molecular tools through comparison with Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The rivers may have become the reservoir for spread of these bacterial genes to the water due to discharge of antibiotics compound from the human activities such as fishery activities. Through this study, the implication of antibacterial resistance organism in the river water and the emergence of antibiotic resistance bacteria were evaluated. The risk of the antimicrobial resistance from river water to the public health and food security were also assessed.

Material and Methods

Study site and sampling

The sampling sites were located at two selected rivers such as Ibai River and Terengganu River in Terengganu (Figure 1). The first sampling site (Point 1) was selected from the Ibai River, was located near to small aquaculture farm and residential area in Kampung Laut, Kuala Ibai at the coordinate of (5.280724, 103.141581). Meanwhile, second sampling site (Point 2) was selected near to industrial area, residential area and restaurants in Kuala Ibai, Kuala Terengganu. The samples were collected at the coordinate of (5.278680, 103.168602). Meanwhile, another river was selected as Terengganu River which located in Kuala Terengganu. The first sampling site (Point 3) with coordinate at (5.279265, 103.084646) was located near large aquaculture farms and residential area in Kampung Selar Beladua. Meanwhile, second sampling site (Point 4) with coordinate at (5.328204, 103.125040) was located near large aquaculture farm and construction site in Pulau Duyong.

Water sample was collected from two rivers at two different sampling points into the 500 mL sterile bottle. All the samples were kept in an ice box to maintain its temperature at 4 °C while transporting to the laboratory and stored in cold room until further analysis [8].



Fig 1 The study map on sampling locations of a) Ibai River (point 1, point 2) and b) Terengganu River (point 3, point 4).

Isolation of pure bacterial isolates

In order to isolate the pure bacterial colonies, 1 mL of each water samples were diluted with 9 mL of distilled water. Then, the water samples were serially diluted up to 10^{-4} . After that, 100 μL of each dilution was spread on the nutrient agar. The plates were incubated at 37°C for 24 hours. The single colonies of different morphology from the spread plates were subculture by streaking method for isolation of pure colonies. The pure colonies of the subculture were characterized based on observation of their morphology. Gram staining was performed to further characterize the pure colonies into Gram-positive bacteria or Gram-negative bacteria [9]

Antibiotic susceptibility testing

Kirby-Bauer disk diffusion method was used by following the guidelines established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) to determine the antibiotic susceptibility profile of the bacterial isolates against six types of antibiotics such as gentamicin, ampicillin, rifampicin, chloramphenicol, tetracycline, and ciprofloxacin [10]. The antibiotics that were used in this study are broad spectrum antibiotics that could act against larger group of bacteria including Gram-negative and Gram-positive bacteria [12]. Broad spectrum antibiotics are normally used in treatment of community- or hospital-acquired infections [13]. Bacterial inoculum was prepared by transferring the bacteria into 5 mL of sterile nutrient broth. The turbidity of the suspension was adjusted to 0.5 McFarland standards. Then, the bacterial isolate in the nutrient broth was inoculated on Mueller-Hinton agar by spreading it using sterile cotton swab. The plates were seeded uniformly by rubbing the swab on the entire agar surface and then incubated for 24 hours [6]. After dried, antibiotic impregnated discs were placed using sterile forceps with appropriate distance; 30 mm apart and 10 mm away from the edge of the agar plate with bacterial cultures on it. Each of the antibiotics disc have two different concentrations which are 10 and 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Then, all the plates were incubated at 37°C for 24 hours. After overnight incubation, zone of inhibition around each disc was measured based on the interpretive standard of the CLSI used to define the bacterial isolates as sensitive, intermediate or resistant to the antibiotic evaluated.

Multiple Antibiotic Resistant (MAR) Index Value

The multiple antibiotic resistant (MAR) index for each bacterial isolate against the antibiotics tested were calculated using the formula. Multiple antibiotic resistance index is calculated by the ratio of number of resistant antibiotics to which isolate is resistance to total number of antibiotics to which organism is tested [14]. MAR index is a tool that helps in analyzing health risk which value equal or lower than 0.20 indicate low dose of antibiotic used while

value more than 0.20 indicates high dose of antibiotic used [10]. Bacteria with MAR index of more than 20% were selected for further analysis. Equation (1) explains the formula used to calculate the Multiple Antibiotics Resistant (MAR) index of bacteria. Number of antibiotics to which the bacteria is resistance (a) has to be divided by total number of antibiotics tested to bacteria (b) to get value of MAR index [11].

$$\text{MAR Index value} = a/b \times 100 \text{ (Equation 1)}$$

Characterization of the bacterial isolates by biochemical test

The bacterial isolates were further characterized by biochemical test as the bacteria have different physiology from one species to another. The biochemical tests were performed using the catalase test, indole test, Mac Conkey agar, urease test, mannitol salt agar, citrate test and oxidase test. The biochemical test results were compared with Bergey's Manual of Determinative Bacteriology to predict the possible bacteria species based on their biochemical activities.

Results and Discussion

Isolation and Characterization of Bacterial Strain from Both Rivers Water Samples










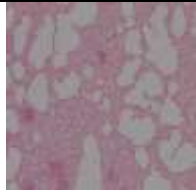





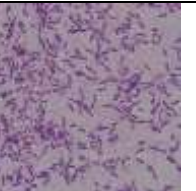

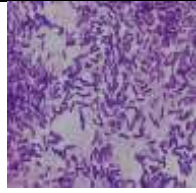

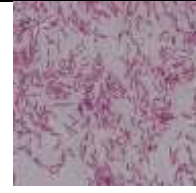



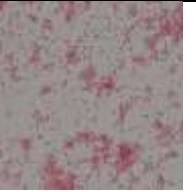








Total of 24 bacterial colonies were successfully isolated from the water samples of the two rivers. The pure colonies of the subculture were characterized based on observation of their morphology. From Ibai River, 4 colonies were isolated from upstream (Point 1) and 9 colonies were isolated from downstream (Point 2). Meanwhile, a total of 6 colonies were isolated from upstream (Point 3) and 5 colonies were isolated from downstream (Point 4) in Terengganu River. Table 1 shows the morphology characteristics of the bacterial colonies isolated from Ibai and Terengganu rivers. Table 2 shows the bacterial colonies isolated from both Ibai and Terengganu rivers with the Gram stains viewed under 100X magnification.

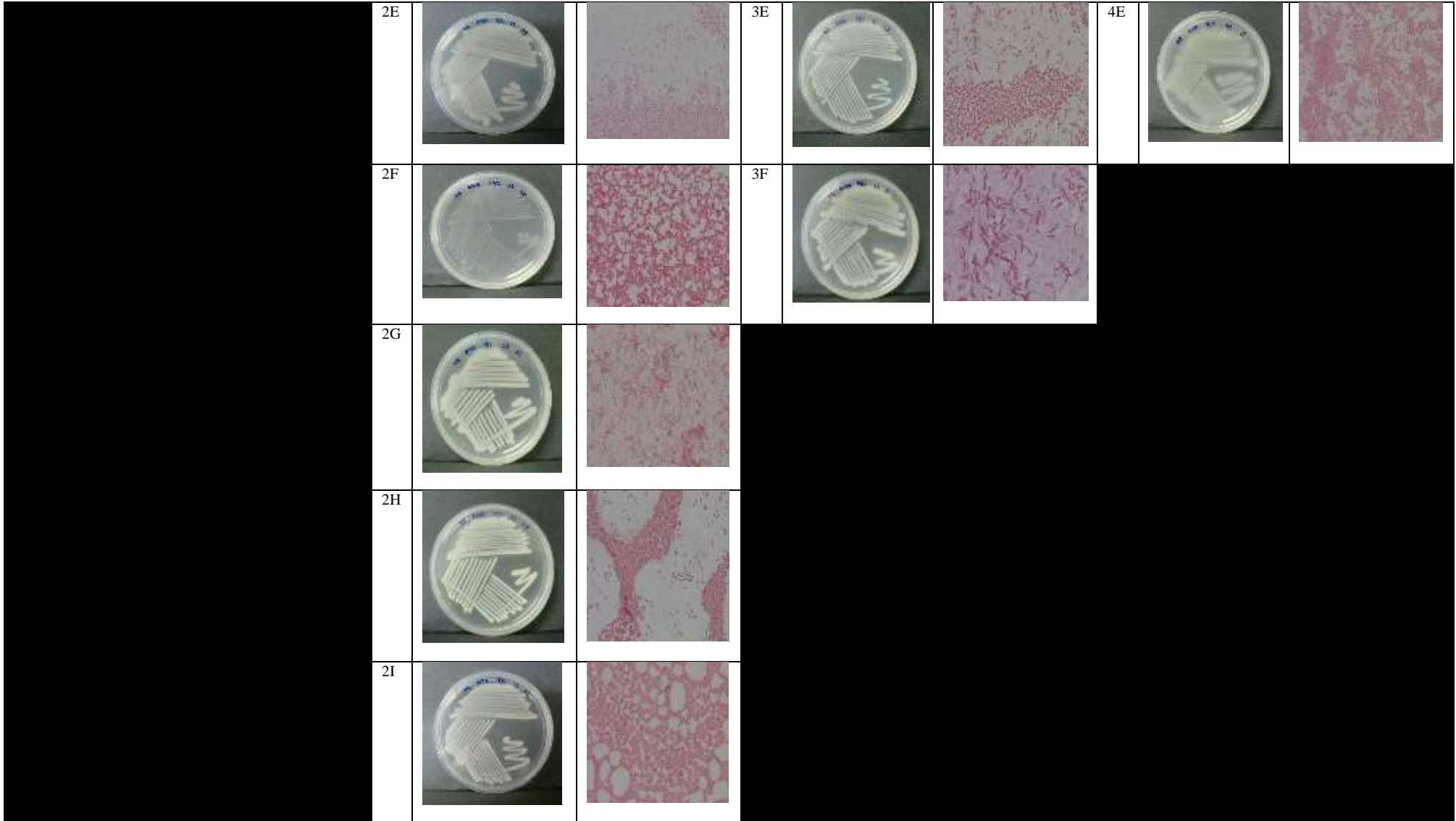
River is required in almost all the activities of mankind such as agricultural, recreational, irrigation and industrial purposes. However, water quality in many large rivers in many countries has been deteriorated significantly due to anthropogenic activities in the past few decades [15].

Table 1 The morphology characteristics of the bacterial colonies isolated from Ibai and Terengganu rivers

Ibai River						Terengganu River					
	Opacity	Form	Elevation	Surface	Color		Opacity	Form	Elevation	Surface	Color
Point 1						Point 3					
1A	Translucent	Circular	Umbonate	Rough	Pinkish	3A	Translucent	Circular	Raised	Smooth, glistening	White
1B	Translucent	Circular	Convex	Smooth, glistening	Whitish	3B	Translucent	Circular	Convex	Rough	Pinkish
1C	Opaque	Circular	Flat	Smooth,	White	3C	Translucent	Circular	Convex	Smooth, glistening	Yellowish
1D	Opaque	Circular	Flat	Smooth,	Blue-black	3D	Translucent	Circular	Convex	Smooth, glistening	Pinkish
Point 2						3E	Translucent	Circular	Raised	Smooth, glistening	Whitish
2A	Opaque	Circular	Flat	Smooth	Blue-black	3F	Translucent	Circular	Flat	Smooth	Color of agar
2B	Translucent	Circular	Raised	Smooth, glistening	Whitish	Point 4					
2C	Opaque	Irregular	Flat	Smooth	White	4A	Translucent	Circular	Raised	Smooth	Color of agar
2D	Translucent	Circular	Raised	Smooth, glistening	Yellowish	4B	Opaque	Circular	Umbonate	Rough	White
2E	Translucent	Circular	Convex	Smooth, glistening	Color of agar	4C	Translucent	Circular	Raised	Smooth, glistening	Yellowish
2F	Translucent	Irregular	Flat	Smooth	Whitish	4D	Translucent	Circular	Raised	Smooth, glistening	Pinkish
						4E	Translucent	Circular	Flat	Smooth, glistening	Color of agar

Table 2 The bacterial colonies isolated from both Ibai and Terengganu rivers with the Gram stains viewed under 100X magnification

Ibai River				Terengganu River							
Point 1		Point 2		Point 3		Point 4					
Strain	Gram Stain	Strain	Gram Stain	Stain	Grain Stain		Stain	Gram Stain			
1A			2A			3A			4A		
1B			2B			3B			4B		
1C			2C			3C			4C		
1D			2D			3D			4D		



Antibiotic Susceptibility Testing

The result from the antibiotic susceptibility test in Table 3 and Table 4 shows that all the isolated bacteria were multiple antibiotic resistant (MAR). All of the isolated bacteria show resistant to at least two antibiotics tested. The isolated bacteria were tested against both 10 µg/ml and 30 µg/ml concentration of all antibiotics tested, in which many of the bacterial isolates were resistant towards both concentration of antibiotics tested. Most of the bacterial isolates were highly resistant towards ampicillin, rifampicin, gentamicin, tetracycline and chloramphenicol. Meanwhile, only one isolated bacteria in Terengganu River was resistant towards both concentration of ciprofloxacin used. Furthermore, bacterial isolates from Ibai River shows no resistant towards ciprofloxacin at both concentrations tested. Low or no resistance of bacteria towards ciprofloxacin may indicate that both rivers were contaminated with low level of ciprofloxacin. There may be low use of ciprofloxacin from the human activities in that area [16].

The discharge of municipal and industrial wastewater to the river water may cause to the presence of antibiotic residual and antibiotic contamination in the river water [17, 18]. This may lead to the emergence and development of antibiotic resistant bacteria in river water. Therefore, in this study two rivers water in Terengganu which were Ibai River and Terengganu River were selected to study for the correlation between the anthropogenic activities nearby with the emergence of antibiotic resistant bacteria. In Terengganu, river plays as important asset for the economic resources especially in Terengganu River where there were many large aquaculture farms across the river owned by the resident as their source of income. Aquaculture surrounding environment may also become the cause of antibiotic pollution in river water [19]. Besides, Terengganu River located near to the construction site and residential area. It was selected because the location was in the area influenced by the construction site of drawbridge of Terengganu and large aquaculture farms as well as residential area. Meanwhile, Ibai River was located in Kuala Ibai, a densely populated area. It was selected because the location was in the urban area that affected by the residential area, industrial activities and aquaculture farm. Moreover, Ibai river also is connected with small rivers which cause the flows of water from other location. There is also a small aquaculture farm own by the resident at the upstream of this river.

Table 3 Antibiotic susceptibility tests for the bacterial colonies isolated from Point 1 and Point 2 at Ibai River.

		Antibiotics	Gentamicin		Ampicillin		Rifampicin		Chloramphenicol		Tetracycline		Ciprofloxacin	
		Bacterial Colonies	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml
Ibai River	Point 1	1A	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
		1B	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
		1C	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S
		1D	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S
	Point 2	2A	R	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S
		2B	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
		2C	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S
		2D	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
		2E	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S
		2F	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S
		2G	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
		2H	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
		2I	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S

Table 4 Antibiotic susceptibility test for the bacterial colonies isolated from Point 3 and Point 4 at Terengganu River.

		Antibiotics	Gentamicin		Ampicillin		Rifampicin		Chloramphenicol		Tetracycline		Ciprofloxacin	
		Bacterial Colonies	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml
Terengganu River	Point 3	3A	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
		3B	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
		3C	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
		3D	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
		3E	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R
		3F	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
	Point 4	4A	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S
		4B	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S
		4C	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S
		4D	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S
4E		R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	

MAR Index Analysis

From the Figure 2 (a), a total of 13 isolates from Ibai River shows MAR Index more than 20%. Meanwhile for Terengganu River, 10 out of 11 isolates shows MAR Index more than 20%. Based on the results, all the bacterial isolates were multiple antibiotic resistant (MAR) as it resistant to at least two antibiotics. MAR index with value more than 0.2 indicate a ‘high-risk’ source of antibiotic contamination [20]. The location was in the urban area that affected by the residential area, industrial activities and aquaculture farm. Besides, Ibai River also is connected with small rivers which cause the flows of water from other location. There is also a small aquaculture farm own by the resident at the upstream of this river. In this study, the samples obtained from Terengganu River were collected near to an aquaculture farm, industrial area, near to construction site area and also from the location that were close to the residential area. These findings show clear evidence of antibiotic resistant bacteria emergence at the sampling locations.

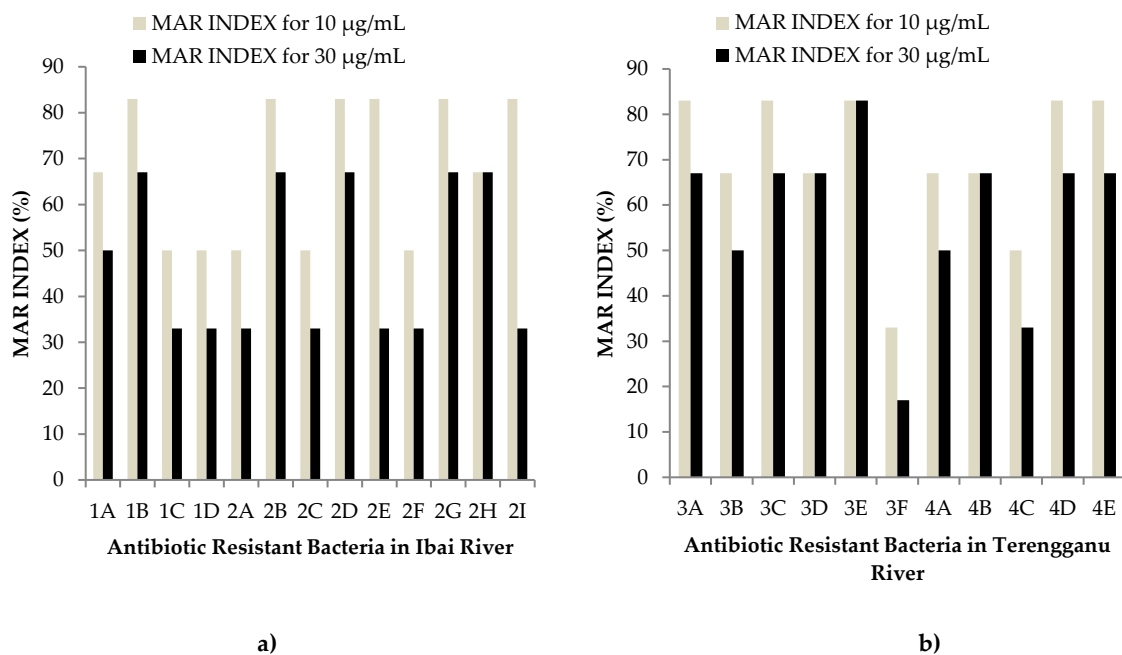


Fig 2 MAR Index for bacteria isolated from a) Ibai River and b) Terengganu River.

Biochemical Test

Table 5 tabulates the biochemical tests were conducted for all the isolates collected from Ibai and Terengganu rivers. Based on the table, it can be concluded that the different in bacterial population for different point in the same river may be due to the human activities around the sampling areas. From the result of Gram staining, there were 2 out of 24 bacterial colonies

(8.33%) were Gram-positive with rod shape. Meanwhile, 9 bacterial colonies (37.5%) were Gram-negative bacteria with cocci shape and 13 bacterial colonies (54.2%) were Gram-positive bacteria with rod shape. This meant that, most of the isolated bacterial were Gram-negative bacteria. The pH of both river water which has slightly acidic; range from pH 5 to 6 favor for the Gram-negative bacteria. In Point 1, with total of 4 bacterial colonies, one of them was Gram-positive bacteria with rod shape, 2 colonies were Gram-negative bacteria with rod shape and the rest was Gram-negative bacteria with cocci shape. Meanwhile in Point 2, all the bacterial isolates were Gram-negative bacteria with 5 colonies were rod shape and 4 colonies were cocci shape. The same to Point 3, most of the bacterial isolates also were Gram-negative bacteria with 4 colonies were rod shape and 2 colonies were cocci shape. From Point 4, one of the bacterial isolates was Gram-positive bacteria with rod shape. The rest of the bacterial isolates were Gram-negative bacteria with 2 colonies were rod shape and 2 colonies were cocci.

Table 5 Biochemical tests conducted for isolates from Ibai River and Terengganu River.

Ibai River								Terengganu River																											
Point 1				Point 2				Point 3				Point 4																							
Strain	Biochemical Test						Conclusion (Family Type)	Strain	Biochemical Test						Conclusion (Family Type)																				
	Catalase	Citrate	Mc Conkey Agar	Indol	Urease	Oxidase			Mannitol Salt Agar	Catalase	Citrate	Mc Conkey Agar	Indol	Urease		Oxidase	Mannitol Salt Agar																		
1A	-	+	-	-	-	+	-	<i>Vibrio</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	2A	+	-	-	-	-	-	-	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	3A	+	+	+	-	+	-	+	<i>Klebsiella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.	4A	+	+	-	-	-	+	-	<i>Vibrio</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Proteus</i> sp.
1B	+	+	+	-	+	+	+	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Vibrio</i> sp. <i>Proteus</i> sp.	2B	+	+	+	-	-	-	+	<i>Proteus</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Vibrio</i> sp.	3B	-	+	-	-	-	+	-	<i>Vibrio</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Proteus</i> sp.	4B	+	-	-	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp.
1C	+	-	-	-	+	+	-	<i>Bacillus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> sp.	2C	+	-	+	-	+	+	-	<i>Proteus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp.	3C	-	-	-	-	-	-	-	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	4C	+	-	-	+	-	+	-	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Vibrio</i> sp.

1D	+	-	-	-	+	-	-	<i>Klebsiella</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Proteus</i> sp.	2D	+	-	+	-	-	-	+	<i>Salmonella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp.	3D	-	+	-	-	-	-	-	<i>Enterobacter</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. <i>Vibrio</i> sp.	4D	+	+	-	-	-	+	-	<i>Vibrio</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Proteus</i> sp.
									2E	-	+	-	+	-	+	-	<i>Vibrio</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp.	3E	+	+	+	-	-	+	+	<i>Vibrio</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Proteus</i> sp.	4E	+	+	+	-	+	-	-	<i>Klebsiella</i> sp. <i>Proteus</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.
									2F	-	-	+	-	-	-	-	<i>Proteus</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp.	3F	+	-	-	-	+	+	-	<i>Salmonella</i> sp. <i>Klebsiella</i> sp. <i>Proteus</i> sp.									
									2G	-	+	-	-	-	-	-	<i>Klebsiella</i> sp. <i>Pseudomonas</i> sp. <i>Salmonella</i> sp.																		
									2H	+	+	+	-	+	-	+	<i>Proteus</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Vibrio</i> sp.																		
									2I	+	+	+	-	-	-	-	<i>Vibrio</i> sp. <i>Salmonella</i> sp. <i>Proteus</i> sp.																		

Conclusion

This study showed that a total of 24 pure bacterial colonies were successfully isolated from water samples of two selected rivers which are Ibai River (Point 1: 4 colonies; Point 2: 9 colonies) and Terengganu River (Point 3: 6 colonies; Point 4: 5 colonies) in Terengganu. The bacterial isolates were tested for its susceptibility towards 6 antibiotics; gentamicin, ampicillin, rifampicin, chloramphenicol, tetracycline, and ciprofloxacin. All of the isolates from Ibai River shows MAR index more than 20%. Meanwhile a total of 10 out of 11 isolates from Terengganu River shows MAR index more than 20%. The results obtained showed that most of the isolates were multiple antibiotic resistance, indicated that Ibai and Terengganu rivers might consist of 'high-risk' source of antibiotic contamination.

Abbreviations

CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute; MAR: Multiple antibiotics resistance

Acknowledgements

We sincerely thank the staff and administration of the Universiti Teknologi Malaysia for their assistance and support in this study.

Funding

This study is funded by the Geran Universiti Penyelidikan (GUP) sub vote 17H74 and UTMSHine Grant sub vote 04G97, which is supported by the Universiti Teknologi Malaysia.

Availability of data and material

Please contact the corresponding author for any data request.

References

1. Zaideen, I. M. M., S. Suratman, and N. M. Tahir, The Evaluation of Spatial Variation of Water Quality in Sungai Setiu Basin, Terengganu. *Sains Malaysiana*, 2017. 46(9): p. 1513-1520.
2. Loh, C.M., S. Mamphweli, E. Meyer, and A. Okoh, Antibiotic use in Agriculture and its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*, 2018. 23(4): p. 795.
3. Felis, E., J. Kalka, A. Sochacki, K. Kowalska, S. Bajkacz, M. Harnisz, and E. Korzeniewska, Antimicrobial Pharmaceuticals in the Aquatic Environment – Occurrence and Environmental Implications. *European Journal of Pharmacology*, 2020. 866(2020): p. 172813.
4. Ben, Y., C. Fu, M. Hu, L. Liu, M. H. Wong, and C. Zheng, Human Health Risk Assessment of Antibiotic Resistance Associated with Antibiotic Residues in the Environment: A Review, 2019. 169: p. 483-493.
5. Khan, G. A., et al., Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug formulation facilities—a study in Pakistan. *PLoS One*, 2013. 8(6): e62712.
6. Onuoha, S. C., The Prevalence of Antibiotic Resistant Diarrhogenic Bacterial Species in Surface Waters, South Eastern Nigeria. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 2017. 27(4): p. 319-330.
7. Schwartz, T., et al., Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 2003. 43(3): p. 325-335.
8. Moges, F., et al., Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste water in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. *BMC Research Notes*, 2014. 7(1): 215.

9. Roy, R. P., M. Bahadur, and S. Barat., Isolation, identification and Antibiotic resistance of *Aeromonas* spp. and *Salmonella* spp. from the fresh water loach, *Lepidocephalichthys guntea* and water of Terai River Lotchka, West Bengal, India. *Zoologica Poloniae*, 2013. 58(1-2): p. 5-17.
10. Laith, A., and M. Najjah, *Aeromonas hydrophila*: antimicrobial susceptibility and histopathology of isolates from diseased catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). *Journal of Aquaculture Research and Development*, 2013. 5: p. 215.
11. Joseph, A. A., M. S. Odimayo, L. B. Olokoba, A. B. Olokoba, and G. O. Popoola, Multiple Antibiotic Resistance Index of *Escherichia coli* Isolates in a Tertiary Hospital in South-West Nigeria. *Medical Journal of Zambia*, 2017. 44(4): p. 225-232.
12. Leekha, S., C. L. Terrell, and R. S. Edson, *General Principles of Antimicrobial Therapy*. *Mayo Clinic Proceedings*, 2011. 86(2): p. 156-167.
13. Almulhim, A. S., and F. M. Alotaibi, Comparison of Broad-spectrum Antibiotics and Narrow-spectrum Antibiotics in the Treatment of Lower Extremity Cellulitis. *International Journal of Health Sciences*, 2018. 12(6): p. 3-7.
14. Osundiya, O., R. Oladele, and O. Oduyebo, Multiple antibiotic resistance (MAR) indices of *Pseudomonas* and *Klebsiella* species isolates in Lagos University Teaching Hospital. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*, 2013. 14(3): p. 164-168.
15. Gasim, M. B., M. M. Hanafiah, A. Azid, H. M. A. Alssgeer, and E. R. A. Abdulhadi, GIS-based analysis of water quality deterioration in the Nerus River, Kuala Terengganu, Malaysia. *Desalination and Water Treatment*, 2018. 112(2018): p. 334-343.
16. Odonkor, S. T., and K. K. Addo, Prevalence of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water sources. *International Journal of Microbiology*, 2018. 2018: p.1-7.
17. Mahmood, A.R., H. H. Al-Haideri, and F. M. Hassan, Detection of Antibiotics in Drinking Water Treatment Plants in Baghdad City, Iraq. *Hindawi*, 2019. 2019: p. 1- 10.
18. Gao, P., Y. J. Ding, H. Li, and I. Xagorarakis, Occurrence of Pharmaceuticals in a Municipal Wastewater Treatment Plant: Mass Balance and Removal Processes. *Chemosphere*. 2012. 88(1): p. 17-24.
19. Kathleen, M., et al., Antibiotic resistance of diverse bacteria from aquaculture in Borneo. *International Journal of Microbiology*, 2016. 2016: p.1-9.
20. Amalina, N. Z., S. Santha, D. Zulperi, M. N. A. Amal, M. T. Yusof, M. Z. Saad, and M. Y. I. Salwany, Prevalence, Antimicrobial Susceptibility and Plasmid Profiling of *Vibrio* spp. Isolated from Cultured Groupers in Peninsular Malaysia. *BMC Microbiology*, 2019. 19: p. 251.

Guruk, M. and M. Karaaslan, Production and Biochemical Characterization of Cellulase Enzyme by *Trichoderma* Strains from Harran Plain. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(3). p. 258-274. DOI: 10.38001/ijlsb.756818

Production and Biochemical Characterization of Cellulase Enzyme by *Trichoderma* Strains from Harran Plain

Mümine Guruk^{1*} , Mehmet Karaaslan² 

ABSTRACT

In this research, *Trichoderma* spp. fungus, a major producer of cellulase, that was isolated from Harran plain had been investigated. Morphological, microscopic and genetic identification of the six fungi isolates were carried out and their cellulase production ability were determined. The ITS region of four of the isolates were displayed over 90% similarity with the DNA sequences of *Trichoderma* spp. currently deposited into the databases. The molecular size of fungal cellulase was found as to be 32 kDa by SDS-PAGE analysis. Optimum working conditions of cellulase had also been studied. The optimal conditions for cellulase activity determined at 40 °C, pH 5.0, 60 min incubation time and 2% Carboxymethyl Cellulose (CMC). The fungal cellulase activity was compared with the activity of the commercial cellulase enzyme. The fermentation produced enzyme by using *Trichoderma* spp. isolated from Harran plain displayed remarkable cellulase activity.

ARTICLE HISTORY

Received

23 June 2020

Accepted

4 September 2020

KEYWORDS

Trichoderma, enzyme, isolation, cellulase, PCR

Introduction

Cellulose is the most common carbohydrate polymer in the nature, and it is currently being used for the production of useful industrial materials such as biofuels and some chemicals. It is a biodegradable material and found in the structure of the plant cell wall and accounts for about 40% of the cell biomass [1]. Cellulose is a long chemical structure composed of glucose. Glucose molecules are linked to each other via β , 1-4 glycosidic bonds [2]. It can be directly converted into monomer by using chemicals, enzymes or by the combination of both. Chemical degradation is unuseful and uneconomical in comparison to the enzymatic degradation because it produces more byproducts at high temperatures and causes environmental problems. Cellulase enzymes which can hydrolyze cellulose can be divided

¹ Department of Food Engineering, Faculty of Agriculture, Cukurova University, Adana, Turkey

² Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Harran University, Sanliurfa, Turkey
Corresponding Author: muminegurukk@gmail.com

into three types: endoglucanase (endo- 1,4- β -glucanase EC 3.2.1.4), exoglucunase (exo-1,4- β -glucanase EC 3.2.1.91), β glucosidase (1,4- β -glucosidase EC 3.2.1.21)[3]. Cellulases are important industrial enzymes used in various industrial applications such as in textile an detergent, food and feed, baking, pulp an paper and waste treatment. Cellulase mainly produced by microorganisms like bacteria and filamentous fungi. There are many microorganisms capable of producing extracellular cellulases such as Cellulomonas, Pseudomonads, Bacillus; Actinomycetes, Aspergillus, Humicola, Trichoderma and Penicillium [4]. Complexity of fungal cellulase is less than bacterial cellulase and former is produced extracellularly in large amount [3].

Trichoderma is known a microorganism found in nature especially in soil commonly, capability of utilizing various substrates [5]. *Trichoderma* is a fast growing fungus and strains generally mature in 4 days. Colonies can be colorless, green or yellowish [6]. Some uses of *Trichoderma* are hyperparasitism, antibiosis, competition, enzyme production [7]. The most important feature of *Trichoderma* is that it can produce cellulosic and hemicellulotic enzymes. These enzymes are extremely important as they are used in the recycling of waste. Because it is widely available in nature, high enzyme capability under favorable conditions and is prone to genetic manipulations, *Trichoderma* is preferred in researchs [8]. Studies on cellulase production show that *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Trichoderma harzianum* are the most productive strains [9].

Harran Plain is a major source of agricultural residues, such as lignocellulosic material, which could be used as a raw material for microbial production of enzymes. Microbial cellulase production is an important strategy for the development of sustainable processes of industrial based cellulase enzyme for some industries such as food, textile, animal feed, detergent etc. This study aims to isolate the *Trichoderma* which is capable of producing cellulase enzyme from Sanhurfa Harran Plain soils. In this work we isolated some *Trichoderma* strains from soil and identified by molecular technics. Moreover cellulase was produced via *Trichoderma* strains and characterized.

Materials and Methods

Soil material and microbial media

Soil samples were collected at the latitude of 37 ° 0 '0 "latitude, 38 ° 0' 0" longitude from Şanlıurfa Harran corn, cotton and wheat plain after harvest. Samples were taken from soil, rotting plant roots and stems.

Isolation of *Trichoderma* strains

The soil samples were diluted 10^{-1} - 10^{-6} with sterilized water, and then the dilutions were cultivated in DRBC(Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol) medium at 28°C for 5 days. Colonies similar to *Trichoderma* were selected and cultivated on PDA (Potato Dextrose Agar) under the same conditions to obtain single colonies [10].

Microscopic and morphological identification of *Trichoderma* strains

Morphological definition is based on time dependent changes of colonies formed in PDA medium, structure of colony and hypha, color, of microorganism. Moreover a loopfull sample were taken from different parts of the colonies and spread over the coverslip in order to identify the strains microscopically. Samples were examined under the light microscope (Motic B series, Japan) and their definitions were made according to the spore structures [11].

Determination of cellulase activities of the *Trichoderma* strains

Cellulase activity ability was investigated on Carboxy Methyl Cellulose Agar (KH₂PO₄ 1 g, NaNO₃ 3 g, KCl 0.5 g, MgSO₄.7H₂O 0.5 g, FeSO₄.7H₂O 0.01 g, CMCNa 15 g, agar 15 g per 1.0 litre distilled water) at 30 °C for 3 days and colonies forming zones were evaluated as cellulase positive and those without zones were evaluated as cellulase negative [10].

Molecular identification of *Trichoderma* strains

DNA extraction

The collected isolates of *Trichoderma* (5 isolates) were cultured in 100 ml Erlenmayer flasks containing 10 ml PD medium after 5 days incubation, mycelium was collected by filtration and ground to a fine powder in liquid N₂. 2 g culture was transferred to a 1.5 ml Eppendorf tube and diluted with 500 µl TE (Tris-Cl, EDTA) buffer. The TE buffer was decanted and 300 µl of extraction buffer (200 mM Tris HCl pH 8.5, 250 mM NaCl, and 25 mM EDTA,

0.5% SDS) was added to the pellet. The mycelium was crushed with a sterile toothpick. Subsequently, 150 μ l of 3M Sodium acetate, pH 5.2 was added and tubes were placed at -20 °C for 30 minutes. Tubes were centrifuged 10000 rpm for 10 minutes. The supernatant was transferred to another sterile eppendorf tube. Equal volume of isopropanol was added and kept for 10 minutes at room temperature. DNA was precipitated by centrifugation at 12000 rpm for 10 minutes. After a wash with 70% ethanol, the pellet was dried for 5 minutes and re-suspended in 50 μ l of TE to make DNA suspension [12].

ITS regions sequencing: ITS-PCR was done for each sample in a 25 μ l reaction mixture. Each reaction mixture was contained with 2,5 μ l PCR buffer, 1.5 μ l MgCl₂, dNTP 1.25 μ l, 1 μ l ITS1 (forward primer), 1 μ l ITS4 (reverse primer), 0.25 Taq polymerase, 1 μ l DNA and 16.5 μ l of PCR water. The Thermal cycler was programmed for 30 cycles of initial denaturation at 94 °C for 2 minutes followed by denaturation at 94 °C for one minute. Primer annealing at 55 °C for 1 minute, elongation at 72 °C for 1 minutes, final extension at 72 °C for 5 minutes and final hold 4 °C (Shadid et al., 2013). PCR products were purified using illustra™ GFX™ PCR DNA and Band Purification Kit (GE Healthcare, USA) and sequencing analysis was performed by Iontech company, sequences were compared by NCBI GenBank, and then phylogenetic tree constructed by MEGA7.0.26 software.

Expression, purification and SDS-PAGE analysis of cellulases

For the production of cellulase in liquid state fermentation the fungus was grown in 250 mL erlenmayer flask containing 100 mL of fermentation medium. Concentrations of the nutrients were yeast extract 1 g/L, CMC.Na 5 g/L, NaCl 20 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄.7H₂O 0.5 g/L. pH of the medium was adjusted to 5.0. Microorganisms culture inoculated 10⁻⁶. The inoculum preparations were completed by 28°C, 8 days in an shaker (150 rpm). Liquid state cultures were harvested by centrifugation at 4000 rpm, for 50 min, at 4°C. The resulting supernatant was called as crude enzyme preparation.

Polyacrilamide gel electrophoresis was used to determine molecular mass of crude enzymes. SDS-PAGE was performed in a 12% (w/v) polyacrilamide gel [13]. The proteins were stained using Coomassie Brilliant Blue.

Enzyme activity assays

The activity of the cellulase was assayed with CMC.Na activity measurements. A crude enzyme sample of 0.5 mL was added into 0.5 mL of the reaction mixture (containing 0.05% (w/v) CMC.Na with pH citric acid buffer) and incubated at 40°C for 1 h. Then the reducing sugar released by the reaction was determined by DNS method [14]. One unit of the CMC enzyme activity was defined as the amount of enzyme that catalyzed to produce 1 μ mol of reduced sugar per minute with the reduction of CMC.Na.

Characterization of crude cellulase enzymes

Effect of incubation period, temperature, pH, substrat concantration on enzyme activity

Incubation time, temperature, pH and substrat concantration was determined respectively 30 min., 60 min., 120 min. and 240 min.; 30°C, 40°C, 50°C, 60°C (1 hour); 3.0, 5.0, 7.0, 9.0, 11.0 (1 hour); 1% CMC, 1.5 CMC, 2% CMC, 2.5% CMC concantration (1 hour). Then cellulase activity measured at 560 nm by spectrophotometer.

Comparison of isolated enzyme activity with commercial enzyme activity

Crude enzyme activity from *Trichoderma* strains compared with commercial Vegazym HC (cellulolytic enzyme) activity by DNS method. Enzyme-substrate incubated at 40°C for 1 h and results were measured at 560 nm by spectrophotometer.

Results and Discussion

Identification of *Trichoderma*

Six *Trichoderma* samples isolated from Harran Plain soil. Morphological and microscobic identification of *Trichoderma* strains were carried out and then cellulase activity investigated on CMC agar medium by using congo red. After third days incubation microorganism colonies began to grow up on PDA and end of five days mycelia became tight and green color was observed locally.

Strain called as TH1 (corn), TH2 (corn), TH3 (corn), TH4 (wheat), TH5 (corn), TH6 (corn). Morphological and microscobic apperance of *Trichoderma* strains are shown in Fig.1 and Fig.2. T1, T2, T4, T5, T6 were observed similar to some *Trichoderma* strains but T3 sample was different *Trichoderma* colony shape and growth characteristics. Also color of T3 was different from *Trichoderma*.

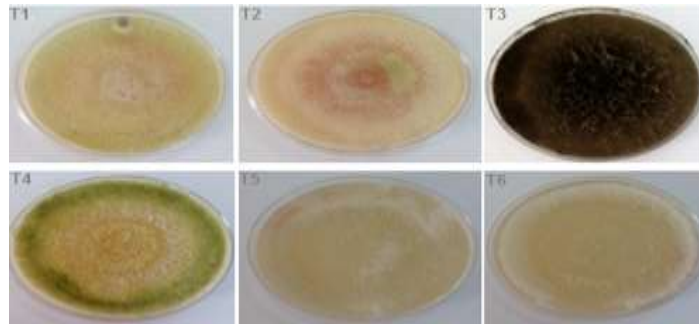


Fig. 1 Morphological appearance of strain TH1, TH2, TH3, TH4, TH5, TH6 on PDA

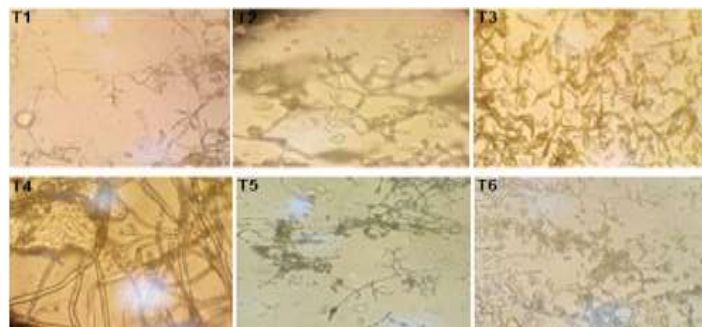


Fig. 2 Microscopic appearance of strain TH1, TH2, TH3, TH4, TH5, TH6

Looking at the microscopic view of the samples, main branches of conidophores formed lateral branches and spores were observed at the ends of the branches. The recorded image was observed to be the typical microscopic view of *Trichoderma*. It was observed that the sports structure of the T3 isolate is different from *Trichoderma* appearance.

Enzyme activity was calculated by dividing the hydrolysis zone diameter of the *Trichoderma* strain on the CMC agar medium by the diameter of the hydrolysis zone examined by using the congo red staining method. Cellulase activity of strains on CMC agar medium shown in Fig.3.

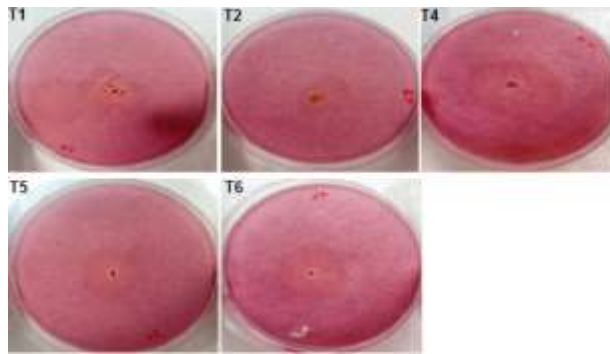


Fig. 3 Cellulase activity of *Trichoderma* strains on CMC kongo red medium

Table 1 Cellulase activity of *Trichoderma* isolates on CMC of strains

Sample	Colony diameter (cm)	Cellulase activity (EU)
T1	4.0±0.37	0.35±0.02
T2	2.7±0.25	0.29±0.01
T4	4.2±0.35	0.23±0.02
T5	2.6±0.20	0.15±0.01
T6	3.0±0.26	0.13±0.01

Similar results were also given by [10, 15, 16]. They measured the cellulose activity on CMC agar medium and found results similar to what we presented in here. Their obtained activity was slightly higher to the activity we regarded. While the slow growth of colonies in the PDA medium made it easier to observe colony development, the CMC solid fermentation medium developed within three days and completely covered the surface of the medium. The main problem of CMC method is that it is difficult to observe the formation of zones around the colony, since the hyphae are transparent in the outer wall.

Molecular identification of *Trichoderma* strains

Molecular identification of isolated *Trichoderma* strains was done by PCR method. ITS regions of the strains were amplified by ITS and ITS4 primers. The obtained PCR products were analyzed on Agarose gel and we were able to obtain bands at approximately 600 bp

size. The PCR products were purified and sent for the sequencing. The obtained sequences were compared to the DNA sequences deposited to NCBI database.

Results from ITS sequencing analysis indicated that the size of sequence was approximately 600 bp for all isolates, and similarities of T1 and T2 samples (95%) to *T. harzianum* and *T. piluliferum*, T4 (91%) to *T. citrinoviride*, T5 (91%) to *T. harzianum*. Although T6 sample showed similarity *T.harzianum*, sequence analyses resulted uncultured fungus. ITS sequencing analysis is shown in Fig 4 and phylogenetic tree is shown in Fig 5.

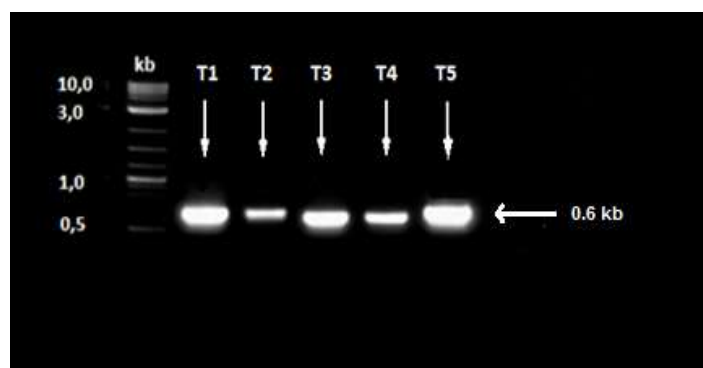


Fig. 4 1.2% agarose gel image obtained after amplification of DNA from T1, T2, T4, T5, T6 isolates using ITS1 and ITS4 primer pair. There are approximately 600 bp corresponding to the ITS1-5.8S-ITS2 gene region

Molecular identification reported by other researchers, DNA bands of about 660 bp were detected on the agarose gel as a result of studies performed using the ITS1 and ITS4 primer pair, and another study was resulted approximately 600 bp by using ITS1 and ITS2 primer [17]. Similar studies were carried out by other researchers. They performed PCR by using DNA from *Trichoderma* samples isolates. Shahid et al. (2013) studied a molecular characterization of the *Trichoderma longibrachiatum* 21PP strain isolated from soil. As a result of the studies conducted using the ITS1 and ITS4 primer pairs, DNA bands of approximately 660 bp size were detected on the agarose gel. Therefore, in order to reveal the molecular characterization of *Trichoderma* isolates obtained in this study, ITS1 and ITS4 primer pairs were used. As a result of PCR analysis by using ITS1 and ITS4 primers, approximately 600 bp DNA bands were detected on agarose gel, similar to the studies in the literature [18].

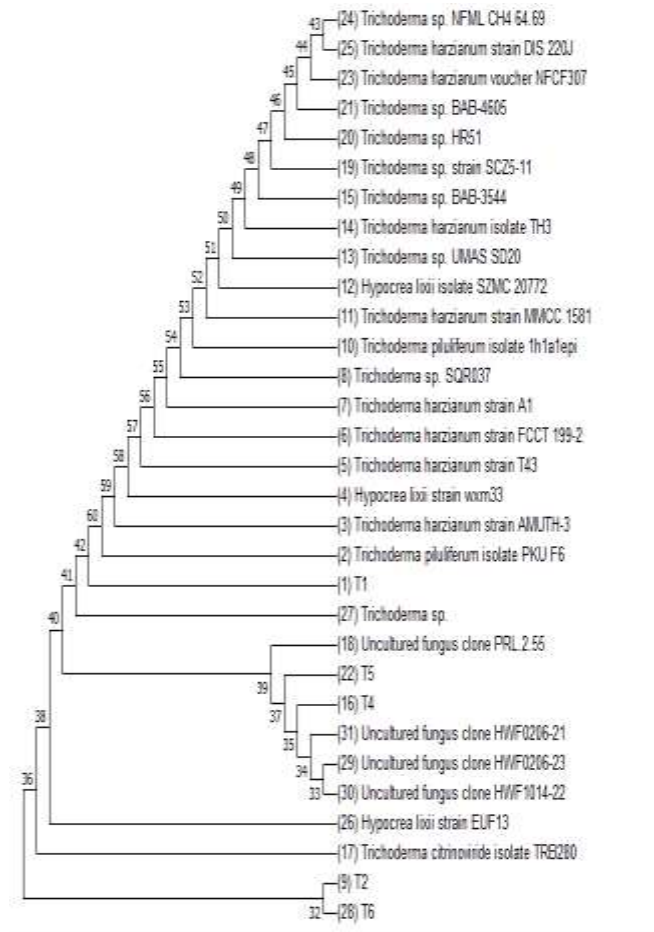


Fig. 5 Phylogenetic tree according to ITS1-5.8-ITS2 sequence results of isolates

Expression, purification and SDS-PAGE analysis of cellulases

Cellulase activity results measured by days are shown in Fig 6. We were able to detect enzyme activity at 5th day and also the highest activity was detected at 5th day.

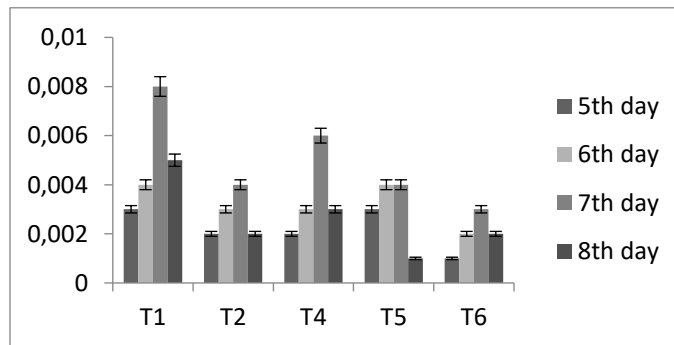


Fig. 6 Production of cellulase at CMC medium in shaker and activity by day (5, 6, 7, 8th day) by DNS method

It was observed that cellulase activity increased during fermentation. The activity started on the fifth day for all isolates. While activity increased on the sixth and seventh days of fermentation, there was a decrease on the eighth day. The day when it produced the highest amount of enzyme (the day the highest activity was measured) was observed as the seventh day. According to the activity data obtained, T1 isolate performed the highest activity with 0.008U / mL. Then the T4 isolate came with 0.006U / mL activity. T2 and T5 showed 0.004U / mL activity. The lowest activity was T6 with 0.003U / mL.

Although the time worked in the literature for fermentation is generally seen as 5 days, the activity varies depending on the microorganism and substrate difference. Mangalanayaki and Madhavan (2015) used *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* to produce cellulase by solid state fermentation in different substrates such as cotton seeds, corn cobs and rice bran. During fermentation, culture was taken from the medium and activity was determined. As a result, the highest activity in cotton seeds was observed in 144 hours, and the highest activity in corn cobs and rice bran was seen in 120 hours. Kim et al. (2002) produced cellulase from *Trichoderma harzianum* FJ1 strain. In the study, fermentation was followed up daily due to the increase in carbon source. The carbon source CMC was chosen for cellulase production. As a result, the highest activity was detected on the 5th day [19, 20].

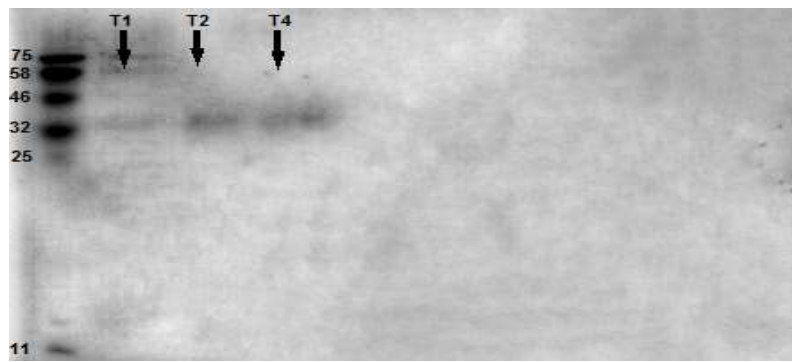


Fig. 7 SDS-PAGE analyses of *Trichoderma* isolates cellulase composition

Proteins isolated from *Trichoderma* strains are shown in Fig 7. Bands show protein size obtained from *Trichoderma* strains. Proteins were separated on 12 % SDS-PAGE and their size were determined by using molecular weight markers. Bands of protein and enzyme

samples obtained from *Trichoderma* strains named T1, T2, T4 seems in the protein gel. According to the results obtained, 32 kDa protein bands are present in all three samples. In a study on cellulase production from *Trichoderma reesei*, crude cellulase showed 32kDa band in SDS-PAGE analysis. In another study with cellulase from *Bacillus*, it was seen that 32.5 kDa band. Noronha and Ulhoa (1999), produced β -1,3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. In the study, SDS-PAGE analysis was performed to measure the size of cellulase. The enzyme purified by gel filtration and ion exchange chromatography showed a band of 29 kDa. Saravanakumar et al. (2016) worked with *Trichoderma* in biological control. In this study, they produced cellulase from *Trichoderma harzianum*. The produced raw cellulase showed two bands between 25-66 kDa in SDS-PAGE. Iqbal et al. (2011) detected 58 kDa band as a result of SDS-PAGE analysis in order to determine the molecular size of the cellulase enzyme produced from *Trichoderma viride* [21-25].

Enzyme activity assays

Effect of incubation period on enzyme activity

The enzyme and substrate were incubated for 30 minutes, 1 hour, 2 hours and 4 hours to determine the time at which the cellulase enzyme works best. Enzyme activity of *Trichoderma* samples are shown in Fig 8.

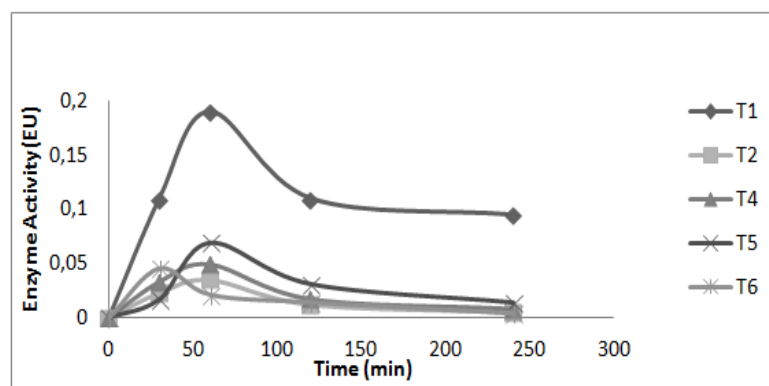


Fig. 8 Effect of incubation period on crude cellulase activity (U/mL)

When the data in the figure is examined, it is seen that cellulase activity starts at 30 minutes for all samples. While the activity in the T6 sample reached its maximum level in the 30th minute, the activity in the other samples continued to increase with advancing time.

Maximum activity levels for T1, T2, T4, T5 samples were measured at 60 minutes. In the determination of activity; T1 at 30 min; 0,11, T2; 0.023, T4; 0.033, T5; 0.017, T6; 0.045 U / mL, T1 at 60 min; 0.19, T2; 0.035, T4; 0.049, T5; 0.069, T6; 0.021 U / mL, T1 at 120 min; 0,11, T2; 0.012, T4; 0.017, T5; 0.031, T6; T1 at 0.014, 240 min; 0.095, T2; 0.005, T4; 0.008, T5; 0.014, T6; 0.004 U / mL was measured. According to the literature, 30-60 minutes was enough to break down the substrate of microbial cellulase[26-28].

Effect of temperature on enzyme activity

Temperature an important factor that influences the cellulase yield. In this study enzyme activity started by 30°C for all samples. Optimum temperature is determined as 30-40°C. Enzyme activity dependent temperature of *Trichoderma* samples are shown in Fig 9.

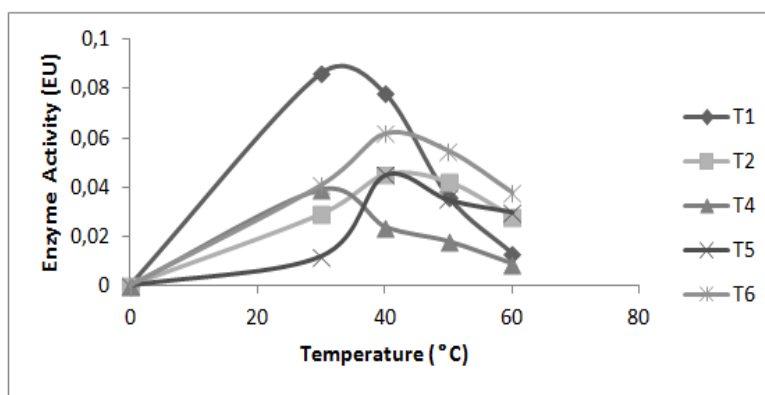


Fig. 9 Effect of temperature on crude cellulase activity (U/mL)

When the data were examined, the temperature-related activity started at 30 °C for the enzymes obtained from all samples. The optimum temperature has been determined as 30-40 °C in all. It was observed that enzyme activity decreased after 40 °C, especially T1, T5, T6. Looking at the effect of temperature on the enzyme, enzyme activity T1 at 30°C; 0.086, T2; 0.029, T4; 0.039, T5; 0.012, T6; 0.041 U / mL, T1 at 40 °C; 0.078, T2; 0.045, T4; 0.024, T5; 0.045, T6; 0.062 U / mL, T1 at 50 °C; 0.036, T2; 0.042, T4; 0.018, T5; 0.035, T6; 0.055 U / mL, T1 at 60 °C; 0.013, T2; 0.028, T4; 0.009, T5; 0.030, T6; 0.038 U / mL was measured. The lowest cellulase activity was observed at 60 °C for all enzyme samples.

Effect of pH on enzyme activity

Cellulase activity started by 3.0 pH and activity along with increased pH degree. Optimum pH was determined by 5.0. Enzyme activity dependent pH of *Trichoderma* samples are shown in Fig 10.

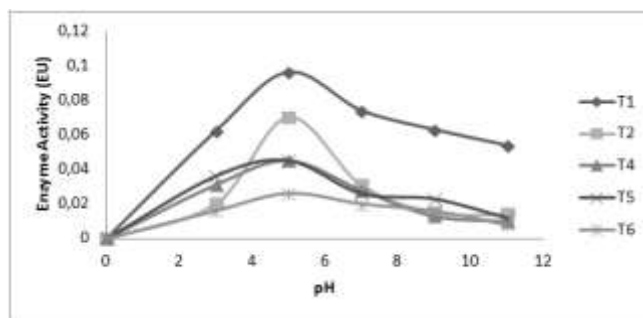


Fig. 10 Effect of pH on crude cellulase activity (U/mL)

Enzyme activity T1 at pH 3.0; 0.062, T2; 0.020, T4; 0.031, T5; 0.036, T6; 0.016 U / mL, T1 at 5.0; 0.096, T2; 0.070, T4; 0.045, T5; 0.045, T6; 0.026 U / mL, T1 at 7.0; 0.074, T2; 0.031, T4; 0.028, T5; 0.026, T6; 0.020 U / mL, T1 at 9.0; 0.063, T2; 0.015, T4; 0.013, T5; 0.023, T6; 0.016 U / mL, T1 at 11.0; 0.054, T2; 0.014, T4; 0.010, T5; 0.012, T6; It was calculated as 0.008 U / mL. The lowest activity was seen at pH 11.0 for all samples.

Cellulases are generally classified as acidic (pH 4.5-5.5), neutral (6,6-7,0), and alkaline (pH 9,0-10,0) cellulases, depending on their effective pH value. Since the enzyme obtained from *Trichoderma* has optimum activity at pH 5.0, it is accepted in the group of acidic cellulases[29].

In a study optimum conditions for cellulase activity were determined, the optimum temperature of the enzyme was 45 °C and the optimum pH was 6,5, and in these conditions the enzyme activity was measured at 1,95 U / mL[27]. Also cellulase activity may vary depending on the microorganism in which it is produced. There are many studies on the effect of temperature and pH on cellulase activity. Researchers usually worked on cellulase from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma reseei* [1, 2, 4, 30-34].

Effect of substrat concentration on enzyme activity

Data presented in Fig 11 shown that cellulase activity was significantly influenced by the concentration of substrate.

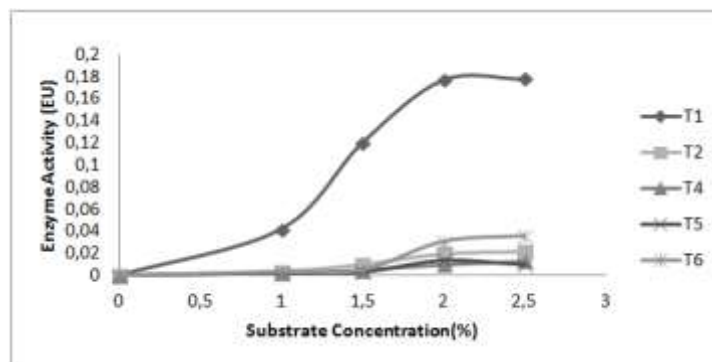


Fig. 11 Effect of substrate concentration on crude cellulase activity (U/mL)

The change of enzymes obtained from T1, T2, T4, T5, T6 *Trichoderma* isolates depending on the substrate concentrations is given. It was observed that enzyme activity increased as substrate concentration increased for all samples.

The increase in concentration varies greatly for the enzyme from T1 isolate, but no high increase has been observed for other samples. Enzyme activity increased with increasing substrate concentration showed the maximum activity value at 2% CMC concentration. The increase in the CMC concentration did not affect the enzyme activity after the 2% substrate, so the enzyme saturated with the substrate. Enzyme activity is T1 in 1% CMC substrate; 0.042, T2; 0.004, T4; 0.002, T5; 0.002, T6; 0.003 U / mL, T1 in 1.5% CMC substrate; 0.12, T2, 0.010, T4; 0.005, T5; 0.003, T6; 0.005 U / mL, T1 in a 2% CMC substrate; 0,177, T2; 0.020, T4; 0.010, T5; 0.014, T6; 0.031 U / mL, T1 in the 2.5% CMC substrate; 0,178, T2; 0.022, T4; 0.013, T5; 0,010, T6 was calculated as 0,036 U / mL.

Kim et al. (2002) tried 1.0%, CMC, 2.5% CMC and 5.0% CMC substrate concentrations to determine the substrate concentration in their enzyme characterization related to cellulase produced from *Trichoderma harzianum*. As a result of the study, the best substrate concentration was determined as 2.5% CMC[19].

Comparison of isolated enzyme activity with commercial enzyme activity

Max cellulase activity was determined for commercial Vegazyme enzyme by 1,8 U/mL activity. Then cellulase from T1 isolate followed by 0, 120 U/mL activity. And activity observed for cellulase from T2 0,045 U/mL, from T4 0,055 U/mL, from T5 0,067 U/mL and

from T6 0,025 U/mL. Min cellulase activity was registered for T6 sample's enzyme. Enzyme activity of *Trichoderma* samples are shown in Fig 12.

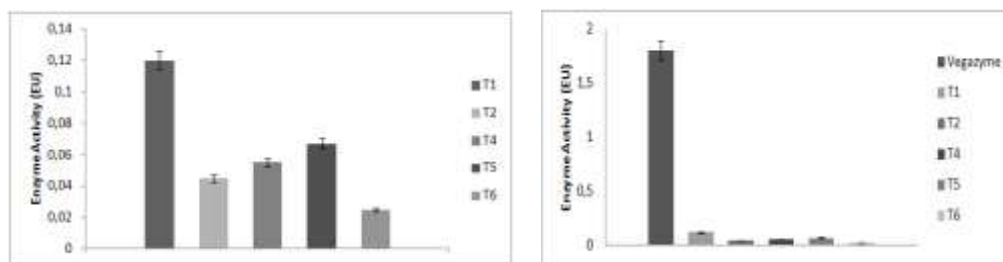


Fig. 12 Comparison of isolated enzyme activity with commercial enzyme activity (U/mL)

Conclusion

The successful use of cellulosic material as carbon source is dependent on the development of economically feasible process for cellulases production. The isolation *Trichoderma* strains and production of cellulases by *Trichoderma* strains investigated.

In the result of study T1 and T2 (95%) identified as *T. harzianum* and *T. piluliferum*, T4 (91%) identified as *T. citrinoviride*, T5 (91%) identified *T. harzianum*. Although T6 sample showed similarity *T.harzianum*, sequence analyses resulted uncultured fungus. Enzyme wight 32 kDa are observed in all three samples. The optimum working temperature of the enzyme was determined to be 40 ° C, optimum working pH of 5.0, optimum working time of 60 min and ideal substrate concentration of 2% CMC.

Acknowledgments

The authors are grateful to Harran University Scientific Research Projects for the financial support within the framework of project 17079 project.

References

1. Yan, H., et al., Purification and characterization of an endo-1, 4-β-glucanase from *Bacillus cereus*. African Journal of Biotechnology, 2011. 10(72): p. 16277-16285.
2. Sibtain Ahmed, A.B., Huma Saleem, Mubshara Saadia And Amer Jamil, Production And Purification Of Cellulose Degrading Enzymes From A Filamentous Fungus *Trichoderma harzianum*. Pakistan Journal of Botanic, 2009. 41(3): p. 1411-1419.
3. Sukumaran, R.K., R.R. Singhanian, and A. Pandey, Microbial cellulases-production, applications and challenges. 2005.
4. Maurya, D.P., et al., Optimization of solid state fermentation conditions for the production of cellulase by *Trichoderma reesei*. Journal of Environmental Biology, 2012. 33(1): p. 5.

5. Samuels, G.J., *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological research*, 1996. 100(8): p. 923-935.
6. Rifai, M.A., A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological papers*, 1969. 116: p. 1-56.
7. Aydın, M.H., Bitki fungal hastalıklarıyla biyolojik savaşta *Trichoderma*'lar. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 2015. 2(2): p. 135-148.
8. Pandey, S., et al., *Trichoderma* species cellulases produced by solid state fermentation. *J Data Mining Genomics Proteomics*, 2015. 6(2): p. 1-4.
9. Shafique, S., R. Bajwa, and S. Shafique, Cellulase biosynthesis by selected *Trichoderma* species. *Pak J Bot*, 2009. 41(2): p. 907-916.
10. Zeng, R., et al., A Novel Cellulase Produced by a Newly Isolated *Trichoderma virens*. *Bioengineering (Basel)*, 2016. 3(2).
11. Kumar, K., et al., Isolation and Characterization of *Trichoderma* spp. for Antagonistic Activity Against Root Rot and Foliar Pathogens. *Indian J Microbiol*, 2012. 52(2): p. 137-44.
12. Kannagara, S., R.M.G.C.S. Dharmarathna, and D.L. Jayarathna, Isolation, Identification and Characterization of *Trichoderma* Species as a Potential Biocontrol Agent against *Ceratocystis paradoxa*. *Journal of Agricultural Sciences*, 2017. 12(1).
13. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *a nature research journal*, 1970. 227(5259): p. 680-685.
14. Ghose, T., Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 1987. 59(2): p. 257-268.
15. Florencio, C., S. Couri, and C.S. Farinas, Correlation between Agar Plate Screening and Solid-State Fermentation for the Prediction of Cellulase Production by *Trichoderma* Strains. *Enzyme Res*, 2012. 2012: p. 793708.
16. Zhang, X.-Y., et al., Development of *Trichoderma reesei* mutants by combined mutagenesis and induction of cellulase by low-cost corn starch hydrolysate. *Process Biochemistry*, 2017. 54: p. 96-101.
17. Hassan, M.M., A. Gaber, and E. El-Hallous, Molecular and morphological characterization of *Trichoderma harzianum* from different Egyptian soils. *Wulfenia Journal*, 2014. 21: p. 80-96.
18. Shahid, M., et al., Sequencing of 28S rRNA gene for identification of *Trichoderma longibrachiatum* 28CP/7444 species in soil sample. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, 2013. 2(2): p. 84-90.
19. Kim, K.-C., et al., Isolation and Characteristics of *Trichoderma harzianum* FJI producing cellulases and xylanase. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2003. 13(1): p. 1-8.
20. Mangalanayaki, R. and S. Madhavan, Cellulase production by *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* under solid state fermentation. *WJPPS*, 2015. 4: p. 1822-1828.
21. Hafiz Muhammad Nasir, I., et al., Purification and characterization of the kinetic parameters of cellulase produced from wheat straw by *Trichoderma viride* under SSF and its detergent compatibility. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2011. 2011.
22. Pirzadah, T., et al., Characterization of *Actinomyces* and *Trichoderma* spp. for cellulase production utilizing crude substrates by response surface methodology. *SpringerPlus*, 2014. 3(1): p. 622.
23. Shanmugapriya, K., et al., Isolation, screening and partial purification of cellulase from cellulase producing bacteria. *Int J Adv Biotechnol Res*, 2012. 3: p. 509-514.
24. Noronha, E.F. and C. Ulhoa, Characterization of a 29-kDa β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. *FEMS microbiology letters*, 2000. 183(1): p. 119-123.
25. Saravanakumar, K. and K. Kathiresan, Bioconversion of lignocellulosic waste to bioethanol by *Trichoderma* and yeast fermentation. *3 Biotech*, 2014. 4(5): p. 493-499.
26. Behera, B.C., et al., Microbial cellulases - Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *J Genet Eng Biotechnol*, 2017. 15(1): p. 197-210.

27. Gautam, S., et al., Optimization of the medium for the production of cellulase by the *Trichoderma viride* using submerged fermentation. International journal of environmental sciences, 2010. 1(4): p. 656-665.
28. Olsson, L., et al., Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C-30. Enzyme and Microbial Technology, 2003. 33(5): p. 612-619.
29. Araujo, R., M. Casal, and A. Cavaco-Paulo, Application of enzymes for textile fibres processing. Biocatalysis and Biotransformation, 2008. 26(5): p. 332-349.
30. Topuz, U., Ö.E. Kiran, and U. Çömlekçioglu, Selülaz Üreticisi Bacillus Suşlarının Enzimatik Özelliklerinin Araştırılması. 2007.
31. Bischoff, K.M., et al., Purification and characterization of a family 5 endoglucanase from a moderately thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. Biotechnology Letters, 2006. 28(21): p. 1761-1765.
32. Hurst, P.L., et al., Purification and properties of a cellulase from *Aspergillus niger*. Biochemical Journal, 1977. 165(1): p. 33-41.
33. Krishna, S.H., et al., Studies on the production and application of cellulase from *Trichoderma reesei* QM-9414. Bioprocess Engineering, 2000. 22(5): p. 467-470.
34. de Castro, A.M., et al., High-yield endoglucanase production by *Trichoderma harzianum* IOC-3844 cultivated in pretreated sugarcane mill byproduct. Enzyme research. 2010.

Sudi, I.Y., et al., Alpha S1-Casein Gene Polymorphism in Yankasa Sheep Breed of Mubi, Adamawa State, Nigeria. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2010. 3(3): p. 275-290.
DOI: 10.38001/ijlsb.740103

Alpha S1-Casein Gene Polymorphism in Yankasa Sheep Breed of Mubi, Adamawa State, Nigeria

Ismaila Yada Sudi^{1,4*} , Mohammed Shuaibu² , Malachi Albert Tizhe³ ,
Augustine Clement² 

ABSTRACT

The present study was conducted on five yankasa breeds of sheep to determine *alpha S1-CSN1S1 casein* gene polymorphism. Five blood samples were collected using sterile needle and syringe into sample tubes containing EDTA, placed on ice in the cold-chain container and immediately transported to the laboratory for analysis. DNA extraction was carried out using Quick-DNA Miniprep™ kit. Primers were used to amplify the DNA fragment of interest. Nucleotide sequences were subjected to the BLAST search against the NCBI database and a similar sequence NC-0040257.1 was retrieved for comparison. Single nucleotide polymorphism was analysed for variations. Multiple sequence alignment was performed using Clustal W and reconstructed using Multalin. A MEGAx Program incorporated in GenAlix 6.503 was used to construct a phylogenetic tree and multiple sequence alignment regenerated in the Muscle (3.8) to construct phylogenetic tree within as well as with the reference (NC-040257.1). Results from the analysis revealed that the extracted DNA was found on chromosome 6, intron 16 and exon 17. The breeds showed a total number of polymorphic and monomorphic site of 68 and 600 respectively, and percentage polymorphism of 10.18%. High frequency of 0.733 was observed at position 201. Amino acid substitution in yankasa sheep breed was 4 at positions 161, 163, 164 and 201, showing the existence of variation in yankasa species possibly indicating long term chances of survival. CSN1S1 isolated in yankasa sheep showed polymorphism, genetic variation within and between breeds. Present study have revealed polymorphisms in milk proteins with high frequency (0.733) in variant at position 201Thr > Ile. In further studies, it is therefore of interest to characterize, genotype and find the allele frequencies of casein gene of yankasa sheep breed, provide a complete picture about milk protein gene and milk protein variation to improve consumer preference.

ARTICLE HISTORY

Received

20 May 2020

Accepted

7 september 2020

KEYWORDS

Alpha S1-casein gene,
milk protein,
Mubi,
polymorphism,
yankasa sheep breeds

Introduction

With the increasing population in the country, the demand for milk proteins through sustainable animal agriculture is increasing. There is vigorous research for an efficient

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Adamawa State University, Mubi, Nigeria.

² Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Adamawa State University, Mubi, Nigeria.

³ Department of Animal Physiology, School of Agricultural Technology, Federal Polytechnic Mubi, Nigeria.

⁴ North East Zonal Biotechnology Centre of Excellence, University of Maiduguri, Nigeria.

Corresponding author's Email: yada280@gmail.com H/P:+2348160787132

production system that will supplement nutrition. Valuable milk by-products have been documented to be suitable nutritional base for other foods due to their functional properties and health benefits [1]. Therefore, maintaining genetic variation is very important to avoid the loss of breeds by farmers and consumers. Already, numerous breeds are recorded extinct and others also are being classified at high risk of loss [2]. There is a need for characterization and description of casein gene polymorphism of ovine milk of native sheep breeds of Nigeria. It is important that casein DNA variation has been implicated in quantitative and qualitative parameters in milk, especially milk protein composition affecting properties of milk in cattle and goats [3, 4 5] and hence could be included in breeding strategies. Polymorphism in the casein gene might affect protein structure, which is a strong and biological fitness that suggests its important role of selection in the molecular evolution [4, 5, 6].

Improvement of livestock in the last century was restricted to the phenotypic selection, quantitative theory designs and accurate selection techniques. These provide economically important functions in bovine, ovine, sudae and avians. Recent advances in recombinant DNA techniques have contributed immensely towards genetic variation studies at the DNA level. The genetic variability in animals [7] can be assessed within and among the population for selection and preservation of the genetic structure. Preservation of genetic variation is crucial for breeding programs to match animal husbandry and consumer requirements. It has been shown that ovine genetic polymorphisms affect the physicochemical properties of milk hence, there is need for in-depth knowledge of the genetic polymorphism of indigenous ovine milk proteins for the improvement of the quality of ovine milk for its contribution to the Nigerian dairy industry. The genetic basis for diversity in sheep and its consequences on selection on gene polymorphism within the sheep breeds have not been assayed on a genomic scale worldwide [8]. Similarly, to our knowledge, there are no studies on variation in the alpha-casein gene of yankasa breed of sheep. There were genetic polymorphism studies in Ouda sheep breeds [9] and Balami sheep breed casein gene, which were both isolated within 154 bp of chromosome 6, intron 16 and exon 17 [10] and variations occurred within and between breeds. These reports prompted present similar study in yankasa sheep breeds.

Materials and Methods

Experimental location and metrological data

The study was conducted in Mubi South Local Government Area of Adamawa State, Nigeria. The area is located between Latitude 10° 05' N/ 10° 30' N and Longitude 13° 10' E/ 13° 30'E. The area has tropical weather. The minimum and maximum temperatures of the area are 23.4 °C and 29.3 °C. The highest and lowest rainfalls are 280 mm and 258 mm [11].

Materials

Blood samples, needle and syringe, cooler, extraction kits, vortex, and centrifuge, and electrophoresis apparatus, gel documentation system, and thermocycler were used. Also used were software like: Genalex 6.503 [12], NCBI, Clustal W, BioEdit [13], Multalin [14], Muscle 3.8 [15]. The laboratory analysis was conducted at African bioscience laboratory, Ibadan.

Experimental animals and collection of blood samples

Blood samples were randomly collected from five adult Yankasa female sheeps in Mubi, Adamawa State. Blood samples (5 mL) for DNA extraction were collected through the jugular vein, using a needle and syringe and preserved in EDTA an in EDTA tube. All the samples were transported to the laboratory inside cooler containing ice park.

Gene isolation

DNA isolation were performed according to Quick DNA™ microPrep Kit from Zymo Research following manufacturer's instruction. Four hundred (400) µl of Genomic Lysis Buffer was added to 100 µl of blood to make 4:1 volume and mixed by vortexing for about 4-6 seconds and left to stand for about 5-10 minutes at room temperature. The mixture was transferred to a zymo- spin™ II column in a collection tube and was centrifuged at 10,000 × g for one minute, the collection tube was discarded with the flow-through.

The zymo-spin™ IIC column was transferred into another sterile tube and added to 200 µl of DNA pre-wash buffer then centrifuged for 100,000 × g for 1 min. Again, 500 µl of gDNA

wash buffer was added to the spin column and eluted at $10,00 \times g$ for 1 min.

In the elution stage, the spin column content was poured into another tube and 50 μ l DNA elution` buffer was added to the spin column and incubated at room temperature for about 2-5 minute and thereafter, it was centrifuged at top speed for 30 seconds to elute the DNA. The eluted DNA was immediately used for molecular characterization.

All genomic DNA was checked on 1% agarose gel electrophoresis and all amplicons on 1.5% agaros gel electrophoresis. It was stained with ethidium bromide and visualized under blue light transilluminator.

For a 10 cm \times 10 cm minigel cast of 1% agarose gel , 0.5 g agarose was dissolved in 50 cm³ of 1 \times TAE (Tris Acetate EDTA) buffer, while 1.5% agarose gel for the amplicons by dissolving 0.75 g of agarose in 5 ml of 1 \times TAE. The mixture swilled until colloids formed. This was then heated for 1-3 min until a clear solution formed.

The gel was cooled to 50°C under running water. Ethidium bromide was added to 0.5 μ g/ml of 2.5 μ l stock in 50 ml and vortexed till no trace of the stain was detected [16].

The gel was allowed to set for 20 min. The casted gel was removed from the tray and submerged in the running buffer (1 \times TAE). The comb then gently removed and DNA samples loaded in the gel wells.

Each PCR amplicon, prepared from ready-to-load master mix, was loaded, 5 μ l per well, without the addition of loading dye. DNA samples were prepared for loading into the well by mixing 4 μ l of the extracted DNA sample with 1 μ l of the 5 \times loading dye. This proportion of loading dye to DNA was used when loading cleaned amplicons.

The electrophoresis was run at 100 volts for 40 min, after which the gel was viewed and photographed on biologix blue light transilluminator. Solisbodyne 100 bp DNA ladder was run alongside DNA samples according to manufacturer instructions.

DNA amplification

DNA amplification was conducted using standard methods. Primers for Casein Alpha S1 gene was designed from reference genomic sequence NC_019463.2 as described by Zhao et al [17] with little modification. The Primers (CSN1S1F 5'-ACCCCTCAGGTACCCTAAGAAA-3' and CSN1S1R 5'-GTTTATCCCCCACACTGCATTC-3') spans Intron 16 – Exon 17 – Intron 17 of Casein

Alpha S1 gene on Oar_v17 genomic sequence assembly. Amplification was performed on Labnet Multigene Mini thermal cycler. A 20 µl reaction consisting of 4 µl of 5X master mix, 0.6 µl each of the primers, 12.8 µl of nuclease-free water and 2 µl of DNA template was prepared. PCR cycling condition was as follows: Initial denaturation at 95°C for 3 minutes, denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 55°C for 30 seconds, extension at 72°C for 40 seconds and a final extension at 72°C for 5 minutes. PCR product was run on 1.5% agarose, viewed and photographed on Biologix bluelight transilluminator.

Amplicons were cleaned up for sequencing using DNA Clean & ConcentratorTm-5 from Zymo Research, according to the manufacturer's protocol. Cleaned amplicons were eluted with 30 µl nuclease-free water. The cleaned products were checked on 1.5% agarose.

Gene sequence analysis

The sequencing was carried out according to Sanger [17] at Xcelri Genomics, India. The sequences were searched for identity and similarity using BLAST against NCBI database. The yankasa sheep breed casein gene and reference sequences (NC_040257.1) [19] were used for multiple sequence alignment using Multalin [14]. Phylogenetic and molecular evolutionary analyses were conducted using MEGAx [20].

Result and Discussion

Alpha S1-casein gene sequencing

Amplicons were cleaned up for sequencing using Commercial DNA clean kit, with 30 µl nuclease-free water, the cleaned products were checked on 1.5 % agarose. The amplified DNA extracted were sequenced and sequences of all yankasa sheep breed are presented in figures 1 - 5. Yankasa sheep showed variation in the nucleotide sequence within breeds, the longest DNA fragment with the highest number of nucleotide sequence was found in sheep breed C as shown in figure 3 (718), sheep breed E showed the shortest DNA fragment with the lowest number of the nucleotide sequence (526), sheep breed B and D have 707 and 701 respectively as shown in figures 3, 4 and 5 respectively.

Variation of nucleotide sequence within yankasa sheep was also observed, at positions 706, 702, 700, and 564. The nucleotides were similar to those reported by Ramunno *et al.* [21], that casein gene CSN1S2 encoding α_{s2} had a length of 18438 nucleotide and divided into 19

exons ranging from 24 to 266 nucleotide, the observed differences may be due to differences of classes of casein, exon and breed. Gencheva and Georgieva [22] also reported two genetic variants of CSN1S1 gene and two genotypes in Bulgarian autochthonous sheep breeds based on nucleotide variation in alpha SI-casein gene.

The present study showed that, there was a consensus at a various position as shown, at position 120-123(ATT), 160-165 (T TT), 184-186(CTT), and 476- 478 (ATT) as depicted in figure 6. The consensus was observed in yankasa sheep breed with the reference sequence in different positions, at position 14637-14640 (AGA), and 14647- 14647 (TTC) among the many consensus found as depicted in figure 7. A phylogenetic tree within yankasa sheep breed showed that 2B and 2A, 2C and 2D are genetically closer, while and yankasa sheep breed 2E is genetically far away from sheep breeds 2B and 2A, 2C and 2D as shown in figure 8. Corpet [18] used the same method which resulted in similarity in the result obtained in this study. Phylogenetic tree of yankasa sheep breed with reference sequence to 2E is genetically closer to the reference sequence than 2A, 2B, 2D and 2C as showed in figure 9 and confirmed using Muscle phylogenetic tree 3.0 [15]. Yankasa sheep breed showed the same frequency of amino acid substitution of 0.067 at two different positions, the highest being 0.733 at position 201 and, at position 164 was 0.133 (Table 1).

> CSN1S1-Yankasa-1

```
CAAGGGGGGGGGGTGATACACAATACCTAGGGAGAGTTTGGTTTCTCTGTTTTTC
CTCACAGAGTAAACATCTCTTGTGATGCGAATAGCCATGTCTGAAATGAATGC
AATGATTCATTTTCAGAGATTCAAACTGATTTCTCATACTGTTGCTTTTTCA
ATGGTCTTTCTCTCTAGCTTTTCAGACAATTCTACCAGCTGGACGCCTATCCATC
TGGTGCCTGGTATTACCTTCCACTAGGCACACAATACACTGATGCCCCCTCATT
CTCTGACATCCCTAATCCCATTGGCTCTGAGAACAGTGGAAAGACTACTATGCC
ACTGTGGTGGTAAGTTCATTTAAATGACTGCATATTGCTGCCGTATCAAGGGAA
ATAGAAGAAAACATAATATAAAAATAAATTTAGAATAAGCATGACACTTAAAT
GCTTAGTGTCCTATGCTAGAATTTTCTGAAATGGAAAATTGATGATAACTTTCT
GATATATGGCTAATGTTAATCCATTACTCAGGAACATGTGGAGCAGTGCTATCT
ATTTGATAAGTGATAATCATTCTGATGAAAATAGGAGGAAAATTTTCTCTCCAA
```

AGTAAAAATTCAACTTTATCCTCCTTGCACCTTTTGCTAATCTTTAAATGCCTTTC
TTTGGATTATAACCCATGATATACATTAGAATGCAGTGAGGGGGAAAAATAACA
CAAA

Fig 1 Nucleotide sequence of yankasa sheep breed A

>CSN1S1-yankasa-2

CAGGGTGGGGATGAGCATCATCAGTAAGGAAGAGTTTGGTTTCTCTGTTTTCT
CACAGAGTAAACATCTCTTGTGATGCGAATAGCCATGTCTGAAATGAATGCAA
TGATTCATTTTCAGAGATTCAAACTGATTTCTCATACTGTTGCTTTTTCAAT
GGTCTTTCTCTCTAGCTTTTCAGACAATTCTACCAGCTGGACGCCTATCCATCTG
GTGCCTGGTATTACCTTCCACTAGGCACACAATACTGATGCCCCCTCATTCT
CTGACATCCCTAATCCCATTGGCTCTGAGAACAGTGGAAAGATTACTATGCCAC
TGTGGTGGTAAGTTCATTTAAATGACTGCATATTGCTGCCGTATCAAGGGAAAT
AGAAGAAAACATAATATAAAAATAAATTTAGAATAAGCATGACACTTAAATGC
TTAGTGTCTATGCTAGAATTTTCTGAAATGGAAAATTGATGATAACTTTCTGA
TATATGGCTAATGTTAATCCATTACTCAGGAACATGTGGAGCAGTGCTATCTAT
TTGATAAGTGATAATCATTCTGATGAAAATAGGAGGAAAATTTTCTCTCAAAG
TAAAATTCAACTTTATCCTCCTTGCACCTTTTGCTAATCTTTAAATGCCTTTCTT
TGGATTATAACCCATGATATACATTAGAATGCAGTGTGGGGGAAATAAAAACAA

Fig 2 Nucleotide sequence of yankasa sheep breed B

> CSN1S1-yankasa-3

TAGGGCCATGTTAAGGAAGATTAGCAAAAGTGCAAGGAGGATAAAGTTGAATT
TTACTTCTGTGAGAGAAAATTTTCCCTCTATTTTCATCAGAATGATTATCACTT
ATCAAATAGATAGCACTGCTCCACATGTTCCCTGAGTAATGGATTAACATTAGCC
ATATATCAGAAAGTTATCATCAATTTTCCATTTTCAGAAAATTCTAGCATAGGAC
ACTAAGCATTAAAGTGTCATGCTTATTCTAAATTTATTTTTATATTATGTTTTCTT
CTATTTCCCTTGATACGGCAGCAATATGCAGTCATTTAAATGAACTTACCACCA
CAGTGGCATAGTAATCTTTCCACTGTTCTCAGAGCCAATGGGATTAGGGATGTC
AGAGAATGAGGGGGCATCAGTGTATTGTGTGCCTAGTGGAAGGTAATACCAGG
CACCAGAAGGATAGGCGGCGAGCTGGTAGAATTGTCTGAAAAGCTA

Fig 3 Nucleotide sequence of yankasa sheep breed C

> CSN1S1-yankasa-4

GGTGGGTGCGCTCGCAAATGGTGCTCATGTAAAGTGATTAGCAAAGTGCAA
GGAGGATAAAGTTGAATTTTTACTTTGGAGAGAAAATTTTCCTCCTATTTTCAT
CAGAATGATTATCACTTATCAAATAGATAGCACTGCTCCACATGTTCCCTGAGTA
ATGGATTAACATTAGCCATATATCAGAAAGTTATCATCAATTTTCCATTTCAGA
AAATTCTAGCATAGGACACTAAGCATTAAAGTGTCATGCTTATTCTAAATTTAT
TTTTATATTATGTTTTCTTCTATTTCCCTTGATACGGCAGCAATATGCAGTCATT
TAAATGAACTTACCACCACAGTGGCATAGTAATCTTTCCACTGTTCTCAGAGCC
AATGGGATTAGGGATGTCAGAGAATGAGGGGGCATCAGTGTATTGTGTGCCTA
GTGGAAGGTAATACCAGGCACCAGATGGATAGGCGTCCACCTGGGAGAATTGT
CTGAAAAGCTAGAGAGAAAGACCGTTGAAAAGCAACAGTGTATGATAAATC
AGTTTTGAATCTCTGAAAATGAATCATT

Fig 4 Nucleotide sequence of yankasa sheep breed D

> CSN1S1-yankasa-5

TTACCTTACTGTGATTTACCATAGGGAAGAGTTTAGGTTTCTCTAGTTTTCTCA
CAGAGTAAACATCTCTTGTGATGCGAATAGCCATGTCTGAAATGAATGCAATG
ATTCATTTTCAGAGATTCAAACTGATTTCTCATACTGTTGCTTTTTCAATGG
TCTTTCTCTCTAGCTTTTCAGACAATTCTACCAGCTGGACGCCTATCCATCTGGT
GCCTGGTATTACCTTCCACTAGGCACACAATACTGATGCCCCCTCATTCTCT
GACATCCCTAATCCCATTTGGCTCTGAGAACAGTGGAAAGATTACTATGCCACTG
TGGTGGTAAGTTCATTTAAATGACTGCATATTGCTGCCGTATCAAGGGAAATAG
AAGAAAACATAATATAAAAATAAATTTAGAATAAGCATGACACTTAAATGCTT
AGTGTCCCTATGCTAGAATTTTCTGAAATGGAAAATTGATGATAACTTTCTGATA
TATGGCTAATGTAAATCCATTACTCAGGAACATGTGGAGCAGTGCTATCTATTT
GATAAGTGATAATCATTCTGATGAAAATAGGAGGAAAATTTTCTCTCCAAAGT
AAAAATTCAACTTTATCCTCCTTGCACTTTTGCTAATCTTTAAATGCCTTTCTTT
GGATTATACCCATGATATACATTAGAATGCATTGGGGGAAAAAAAAAAAAA

Fig 5 Nucleotide sequence of yankasa sheep breed E

Multiple sequence alignment (Figure 6 and 7) presents the nucleotide sequence variation among yankasa sheep within 154 bp of intron 16 and exon 17 are in positions 706 (highest) and 479 (lowest), nucleotide positions when compared to reference gene NC_040257.1 [19]. The dot represents the variation and similarity between the species and the reference gene, while the variation is represented as G, A, C, and T by using Multalin multiple sequences with hierarchical clustering [14].

Evolutionary relatedness of the sequences studied is presented in figures 8 and 9. The genetic distance between the reference gene [19] and yankasa breeds was genetically far from each other by 0.022 observed in the phylogenetic tree constructed in MEGA X using Nei's genetic distance [23] generated in GenAlex 6.50. This was also in tandem with multiple sequenced alignments generated in Muscle (3.8) neighbour-joining tree (Figure 6).

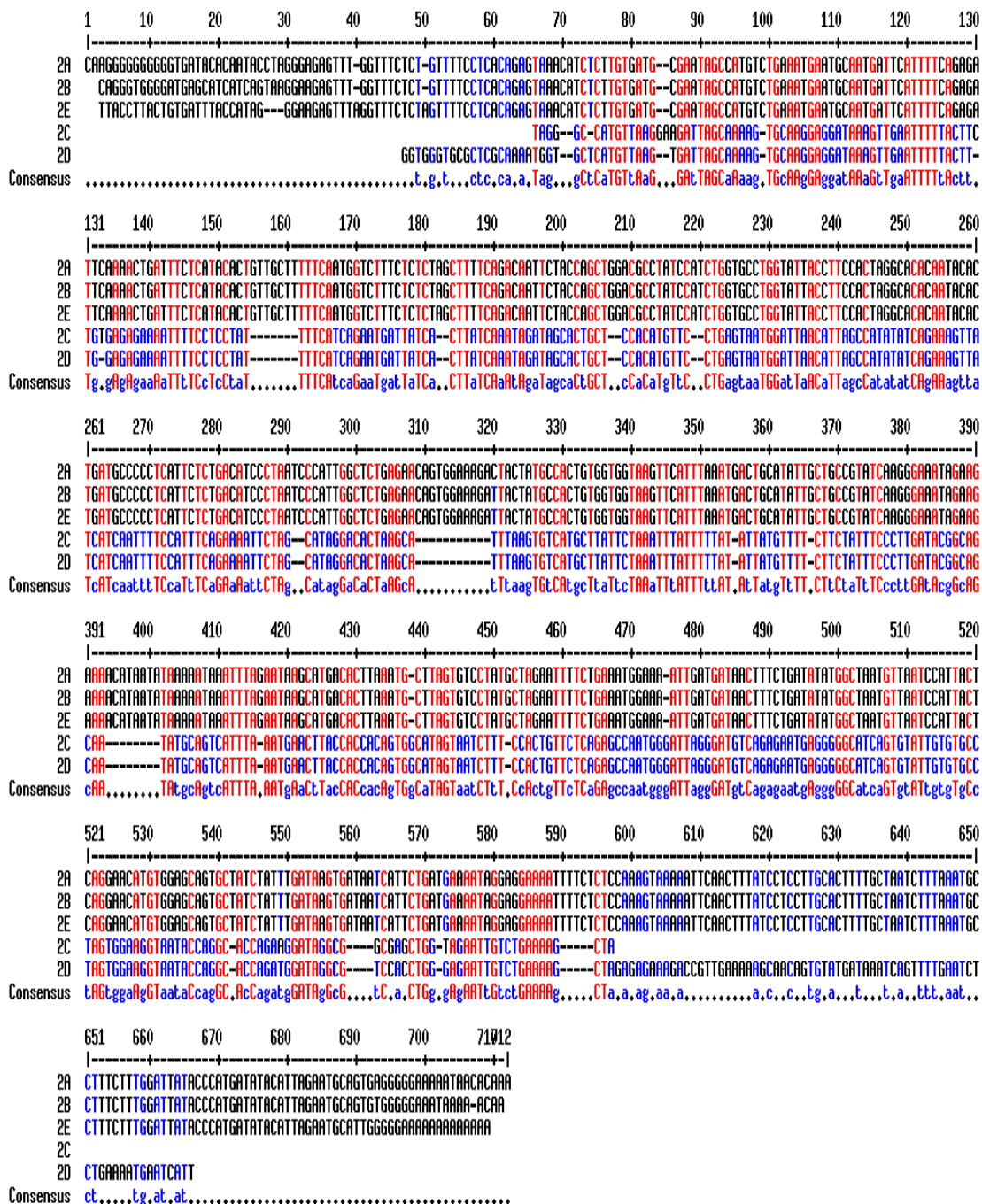


Fig 6 Multiple sequence alignment of nucleotide within yankasa sheep breed
 Note: 2A= Nucleotide sequence for yankasa sheep 1
 2B= Nucleotide sequence for yankasa sheep 2
 2E= Nucleotide sequence for yankasa sheep 5
 2C= Nucleotide sequence for yankasa sheep 3
 2D= Nucleotide sequence for yankasa sheep 5

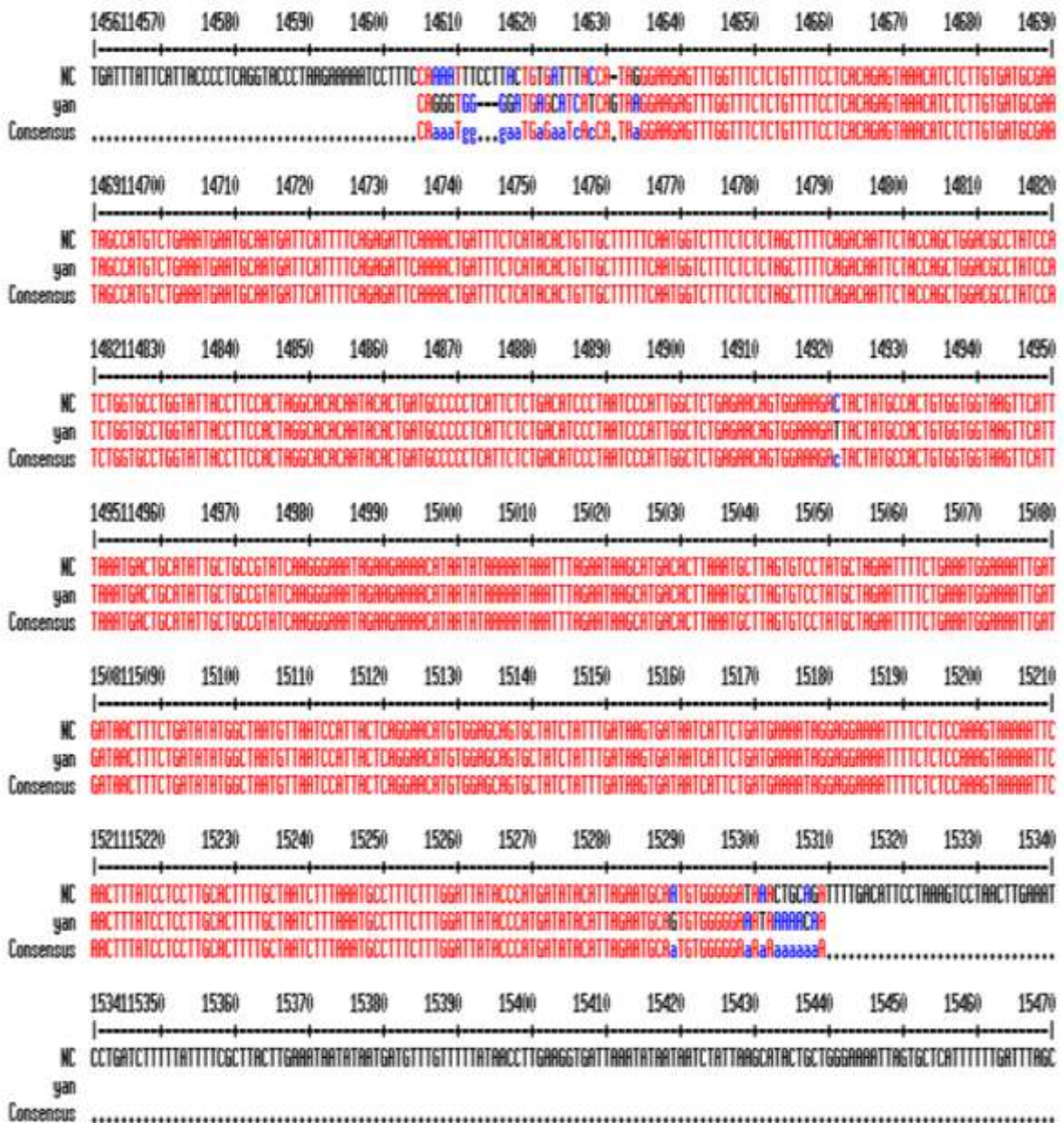


Fig 7 Pairs wise sequence alignment of nucleotide of yankasa sheep breed with reference sequence
 Note: NC= Nucleotide sequence for reference NC- 040257.1
 Yan= Nucleotide sequence for yankasa sheep

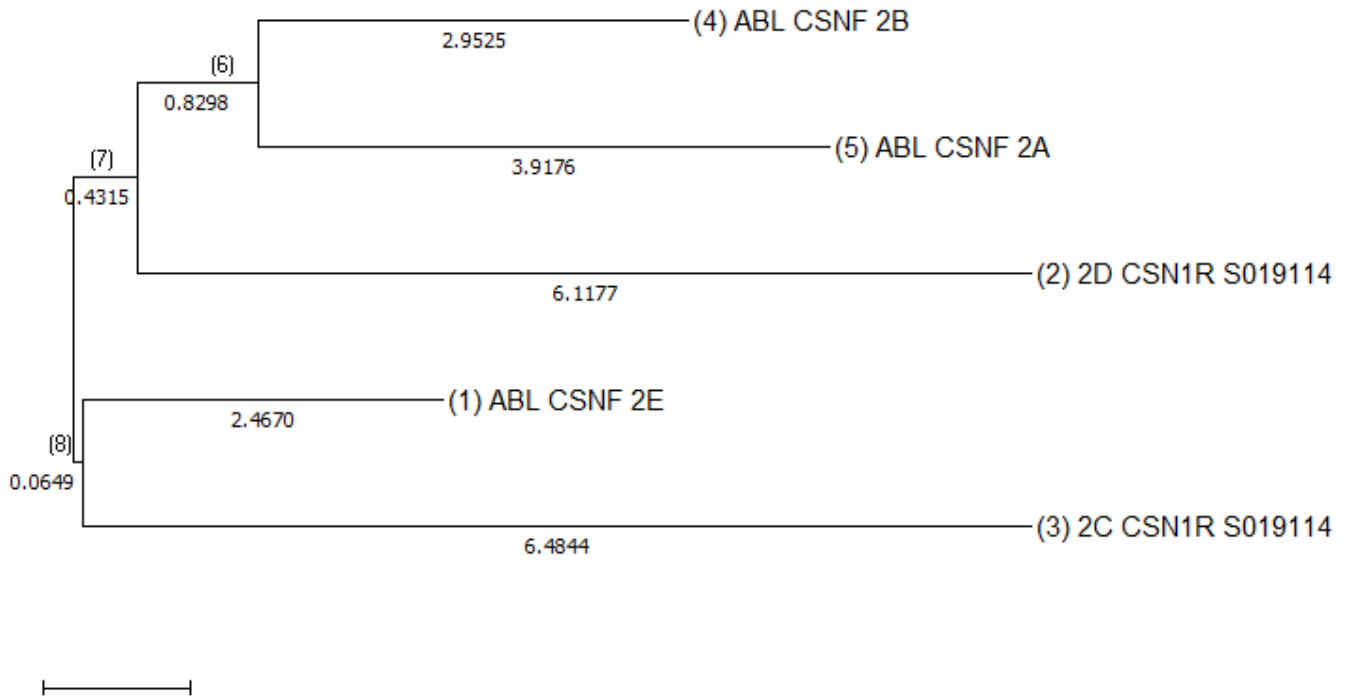


Fig 8 Phylogenetic tree within yankasa sheep breeds

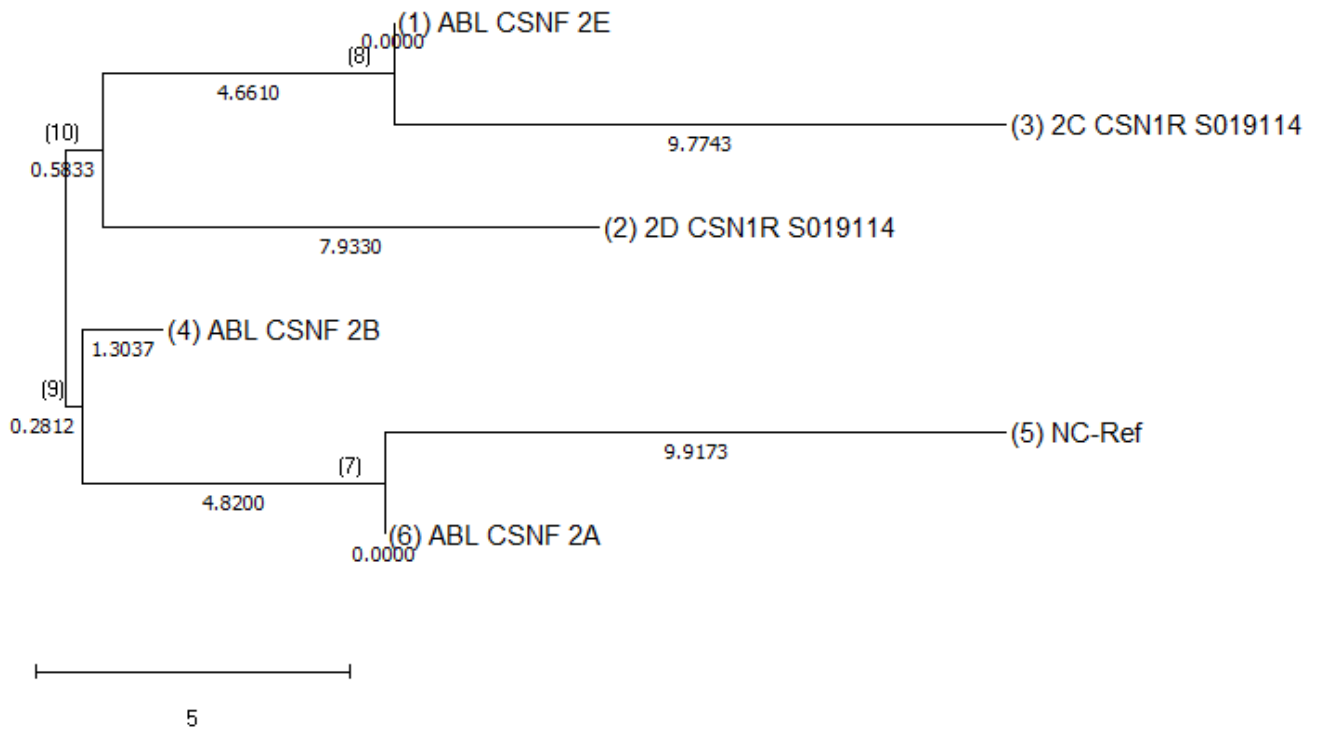


Fig 9 Phylogenetic tree of yankasa sheep breed with the reference gene

Genetic variation studies in sheep were mostly at phenotypic level. The polymorphism of *alpha S1-casein* was reported among some local Bulgarian sheep breeds at DNA level [22, 23]. Single nucleotide polymorphism (SNP) was detected in traditional sheep populations in Bulgaria at position 13 of the third exon in CSN1S1 gene with two genotypes (homozygous – CC and heterozygous – AC) [22]. The result of amino acid substitution in yankasa breeds of sheep in Mubi, Nigeria is presented in Table 1. Polymorphism in *alpha S1 casein* gene in yankasa breed of sheep in Nigeria have not been reported previously by either phenotypic or molecular methods. In present study, the polymorphic sites and frequency of polymorphism confirmed the variation and similarity in the multiple sequence alignment, where amino acids substitution and polymorphism were identified within the open reading frame of the CSN1S1 gene [24] as compared with the reference sequence. This result is similar to the finding of Calvo *et al.* [25] who observed polymorphism in Assaf sheep breed on exon 17. However, yankasa sheep breed showed the percentage polymorphism of 1.65%, and 11 number of polymorphic sites and monomorphic site of 657 with reference [19]. Amino acid substitution

were found at position 161 Tyr> Ser, 163 Leu>Val, with the same frequency of 0.067 respectively, at position 164 Asp> Ala with a frequency of 0.133, and a synonymous exchanged at position 163 Leu>Leu (Table 1). Similar to the finding of Ceriotti, et al. [26] that detected a single nucleotide polymorphism in casein CSN1S1 on exon 17 and also observed amino acid exchange at position 186 Ile>Thr, 183 Met> Val and 104 Ser> Leu. The observed difference may be due to difference on the base pairs used as well as geographical location.

Table 1 Amino acid substitutions and frequencies in yankasa sheep breed

Positions	Amino Acid Substitution	Frequency
161	161Tyr > Ser (161Y > S)	0.067
163	163Leu > Val (163L > V)	0.067
164	164Asp >Ala (P>A)	0.133
201	201Thr > Ile (201T > 201I)	0.733

The breeds showed a total number of polymorphic and monomorphic site of 68 and 600 respectively, percentage of polymorphism of 10.18%, and amino acid substitution was four, it showed variation exists within breeds these are very important for species long term survival. High frequency of 0.733 was observed at position 201 (201Thr > Ile). However, Cerotti *et al.* [26] reported an amino acid exchange on exon 17 positions 183 Met>Val with a frequency of 0.12 to 0.26 this difference could be as a result of differences in targeted segments on the exon as well as the position of the exchanged protein.

Conclusion

In conclusion, casein CSN1S1 was isolated in yankasa sheep within 154 bp of chromosome 6, intron 16 and exon 17. Present study has shown variations of nucleotides in the casein gene coding for milk protein at position 201Thr > Ile of balami breed of sheep indigenous to Mubi, Nigeria. It was characterized and showed polymorphism and genetic variation within and between breeds. These sequence obtained from yankasa sheep breeds will be deposited on

NCBI database for further research. This will assist in conserving the genes of the native animals for breeding purposes. There is need for complete characterization, genotyping and finding the allele frequencies of casein gene of indigenous sheep breeds, this will offer the possibility to get a complete picture about milk protein gene and then consider milk protein variation in a specific breeding programme for improving consumer preference.

Conflict of interest

The authors hereby declare that there is no conflict of interest.

References

1. Henchion, M., et al., Future protein supply and demands: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium. *Foods*, 2017. 6(7): Article number 53. Doi: 10.3390/foods6070053
2. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Database on agriculture, 2010. <http://www.fao.org/> 15.03
3. Ikonen, T., et al., Genetic parameters for the milk coagulation properties and prevalence of non-coagulating milk in Finnish dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 1999. 82: p. 205- 214.
4. Martin, P., et al., The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction Nutrition Development*. EDP Sciences, 2002. 42: p. 433-459.
5. Boettcher, P. J., et al., Effects of casein haplotypes on milk production traits in Italian Holstein and Brown Swiss cattle. *Journal of Dairy Science*, 2004. 87(12): p. 4311-4317.
6. Amigo, L., I. Recio, M. Ramos, Genetic polymorphism of ovine milk proteins: its influence on technological properties of milk - a review. *International Dairy Journal*, 2000. 10, 135-149.
7. Arif, I. A., and H.A. Khan, Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: A brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*. 2009. 32(1): p. 9-17. *Tropical Animal Health and Production*. (2010).
8. Ilori, B. M., et al., Assessment of OvineSNP50 in Nigerian and Kenyan sheep populations. *Nigerian Journal of Biotechnology*. 2018. 35(2): p. 176-183.
9. Sudi, I. Y., et al., Alpha S1 casein gene polymorphism in Ouda sheep breed of Mubi. Nigeria. *Nigerian Journal of Genetics*, 2019a. 33(1): p. 110-116.
10. Sudi, I. Y., et al., Alpha S1 casein gene polymorphism in Balami sheep breed indigenous to Mubi. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*. 2019b. 2(3): p. 231-242.
11. Degerforsrertr, A.M., Climate Mubi. *Climate-Data.Org*. 2019. <http://en.climate-data.org/info/sources> Retrieved on 30.09.2019.
12. Peakall, R. and P.E. Smouse, GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 2012. 28(19): p. 2537-2539.
13. Hall, T. A., BioEdit: A user- friendly biological sequence alignment editor and analysis programmed windows 95/98nt. *Nucleic acids. Symposium*. 1999. Ser.41: p. 95- 98.
14. Corpet, F., Multiple sequence alignment with hierarchical clustering". *Nucleic Acids Research*, 1988. 16 (22): p.10881-10890.
15. Edgar, R. C., MUSCLE: Muscle multiple sequence alignment with high accuracy and throughput. *Nucleic acid Research*, 2004. 32(5). p. 1792-1797.

16. Olaniyan T.O., et al., Ovarian metabolic activity in dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovary in wistar rats treated with aspirin. *JBRA Assisted Reproduction*, 2019. 24(1). p. 41-54.
17. Zhao, H., et al., Two new insertion of the *PITX2* gene and their effects on growth traits in sheep. *Animal Biotechnology*, 2018. 29(4): p. 276-282.
18. Sanger, F; and A.R. Coulson, A rapid method for determining sequence in DNA by primed synthesis with DNA polymerase *Journal of Molecular Biology*, 1975. 94 (3): p. 441-448.
19. BCMHGSC, Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center. *Ovis aries* strain OAR_USU_Benz2616 breed Rambouillet chromosome 6, Ovar_rambouillet_v1.0, Whole genome shotgun sequence, NC_040257.1. 2017. www.ncbi.nlm.nih.gov
20. Kumar, S, et al., MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018. 35: p. 1547-1549.
21. Ramunno, L., et al., Characterization of two new alleles at the goat CSN1S2 locus. *Animal Genetics*, 2001. 32(5): p. 264-268.
22. Gencheva, D. and S. Georgieva, Genetic diversity and population structure of Bulgarian autochthonous sheep breeds based on nucleotide variation in alpha SI-casein gene. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 2019. 25(Suppl. 3): p. 95-102.
23. Hristova, D., Genetic polymorphism of *alpha SI-casein* gene in Bulgarian sheep breeds. *Agricultural Science and Technology*, 2011. 3(1): 8-12.
24. Tetens, J.L., et al., DNA based identification of novel ovine milk protein gene variants. *Small Ruminants Research*. 2014. 121(2-3). p. 225-231.
25. Calvo, J.H., et al., Structural and functional characterization of the α 1- casein gene and association studies with milk traits in Assaf sheep breed. *Livestock Science*, 2013. p. 01-08.
26. Ceriotti, G., et al., Single nucleotide polymorphisms in the ovine casein genes detected by Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism. *Journal of Dairy Science*, 2004. 87: p. 2606-2613.

Hassan N. L. A., K. K. Yern, Zain, N. A. M., Isolation of Antibiotic Resistant Bacteria from Rivers in Terengganu, Malaysia. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(2): p. 291- 307. DOI: 10.38001/ijlsb.712542

Isolation of Antibiotic Resistant Bacteria from Rivers in Kelantan, Malaysia

Nurul Liyana Hassan¹ , Kam Kar Yern¹  and Nor Azimah Mohd Zain^{1*} 

ABSTRACT

Antibiotic resistant bacteria have been a major concern due to the problems that they may pose in terms of public and environmental health. This present study aimed to investigate the presence of antibiotic resistance among bacterial strains isolated from rivers and to determine the impact of various human activities on the distribution of antibiotic resistant bacteria. Bacteria were isolated from river water samples of Lebir River (Point 1 and Point 2) and Kelantan River (Point 3 and Point 4). A total of 27 bacterial isolates were successfully isolated from the rivers, followed by characterization and identification of the isolates using a series of biochemical tests. All the isolated bacteria were predicted as *Actinomyces* sp., *Arachnia* sp., *Streptomyces* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Neisseria* sp., *Veillonella* sp., *Bacteroides* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Actinobacillus* sp., and *Flavobacterium* sp. Antibiotic susceptibility test was conducted on the bacterial isolates against six types of antibiotics (ampicillin, gentamycin, tetracycline, chloramphenicol, rifampicin and ciprofloxacin). Almost all bacterial isolates were resistant to at least one type of antibiotic, whereas more than half of the isolates showed multiple antibiotic resistance. The findings show the presence of antibiotic resistant bacteria in all four samples, indicating the relationship between the resistance of isolates and the human activities within the vicinity of the area. However, further analysis of the antibiotic resistant bacteria is recommended to further identify and understand them due to the potential risk that they may pose to human and environment.

ARTICLE HISTORY

Received

1 April 2020

Accepted

6 September 2020

KEYWORDS

Antibiotic resistance
bacteria,
Rivers,
Kelantan,
Malaysia

Introduction

Antibiotic resistant bacteria potentially pose to the public and environmental health, serve as a major concern in the society. The presence of antibiotic resistant bacteria especially in the waterways, for instance a river, may lead to horrible consequences as rivers are commonly used by the nearby residents as water sources for their daily activities. One of the negative consequences would be in the treatment of life-threatening illnesses [1], as the disease-causing bacteria are unable to be combatted with the use of antibiotics.

¹ Department of Biosciences, Faculty of Science 81310 Johor Bahru, Universiti Teknologi Malaysia

*Corresponding Autor: Nor Azimah Mohd Zain, e-mail: norazimah@utm.my

Manyi-Loh et al. projected that the intensive farming and antibiotic use in agriculture results in antibiotic residues in the environments. The antibiotic residues and antibiotic-resistant bacteria are considered as environmental pollutants and responsible for the increment of public health crisis linked to antibiotic-resistant bacteria [2]. Review from Martinez and Berendonk et al. reported that the extensive use of antibiotics in human treatment, animal farming and agriculture results in residues that contain antibiotics resistant bacteria that have the potential to pollute the natural environments. In these reviews, stated that apart of its utilization for human therapy, antibiotics are extensively used for agricultural purposes for animal farming. Residues from farms and human environments may contain antibiotics and antibiotic resistance genes that have the potential to be a contaminant natural environment.[3, 4].

Nnadozie and Odume reviewed that the freshwater environments are subjected to possible contamination by residual antibiotics that makes the freshwater environments to become reservoirs and pose public health concern [5]. Al-Badaii and Othman stated that in both polluted and unpolluted surface water, antibiotic resistant bacteria are present in surface water, with the quantity of antibiotic resistant bacteria isolated from polluted water exceeded that of the latter. The inability to assess the quality of the freshwater and avoid future disease outbreaks associated to contaminated water utilization are possibly the impacts when the complete picture of the distribution and frequency of antibiotic resistance in the environment is lacking [6]. As the aquatic ecosystem health pose major impact on all terrestrial ecosystems including humans, animals, and plants, the measurement of water quality variables and heavy metals alone may not be sufficient to assess a river. Residual antibiotics in the freshwater are possibly from different sources such as agriculture, wastewater discharge and animal farming. The residual antibiotics serve as the selective pressure and main concern for the development of antibiotic resistant bacteria. Hence, the measurement of concentration of antibiotics in the natural water is important [7].

Therefore, the present study was conducted to assess the presence of antibiotic resistant bacteria in Kelantan River and Lebir River in Kelantan, by first isolating the antibiotic resistant bacteria from the rivers. Biochemical tests were also done to characterize and identify the antibiotic resistant bacteria that present in the selected rivers, followed by conducting the antibiotic susceptibility test for the bacteria isolates towards the chosen antibiotics; gentamicin, ampicillin, rifampicin, chloramphenicol, tetracycline, and ciprofloxacin.

Material and Methods

Study site and sampling

The sampling process took place at the two selected rivers in Kelantan which were Lebir River and Kelantan River. The sampling sites chosen from the Lebir River was in the Gua Musang district, located near to agricultural area at the coordinate of (4.870728, 102.438744) (Point 1) and the other site was at the residential area at the coordinate of (4.932378, 102.418298) (Point 2).

In a meanwhile, another river that had been selected was Kelantan River, around Kuala Krai area and Tangga Krai area. The first sampling site selected from the Kelantan River was located near to the medical centers area in Kuala Krai at the coordinate of (5.530988, 102.195158) (Point 3) while the second sampling site from Kelantan River was located at Tangga Krai. This sampling site was located near to the residential area at the coordinate of (5.612043, 102.144881) (Point 4). An amount of 500 ml of water sample were taken from surface water of both rivers at two different places each in November 2018. The water samples collected in sterile glass bottles and the samples then were put in an ice box to maintain its temperature at 4°C while being transferred to laboratory and stored in the cold room until further analysis [8].

Isolation and Characterization of bacterial isolate by Biochemical Test

A series of serial dilution of water sample was prepared. Then, 1 ml of the diluted water samples was spread on the nutrient agar. The plates were then incubated at 37°C for 24 hours. The single colonies of different morphology from the spread plates was streaked for subcultures on nutrient agar to obtain the pure colonies of the bacterial isolates. The subcultures of the bacterial pure colonies isolated were characterized based on their morphological characteristics. Then, Gram staining will be performed to further characterize them into Gram negative and Gram positive bacteria [9]. The isolated bacteria were further characterized by the biochemical tests since that bacterial physiology are different from one species to another. In order to determine the biochemical characteristics of bacteria, the biochemical tests performed were catalase, indole, McConkey agar, urease, mannitol salt agar, citrate test, and oxidase test. The results of the biochemical tests were then compared to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology to predict the possible bacteria species based on the biochemical activities of the bacteria [10,11].

Antibiotic susceptibility test

In order to determine the antibiotic susceptibility profiles of the bacterial isolates, the bacterial isolates were tested by using the standard Kirby-Bauer disk diffusion method. The antibiotic susceptibility testing was performed by using Mueller-Hinton agar against six types of antibiotics, which are gentamicin, ampicillin, rifampicin, chloramphenicol, tetracycline, and ciprofloxacin. These six antibiotics are the broad-spectrum antibiotics which can be used for both Gram negative and Gram positive bacteria. Each of the antibiotics disk had two different concentrations which were 10 and 30 µg/ml per disk. The freshly grow bacterial isolates were suspended in 4 to 5 ml of sterile nutrient broth for the bacterial inoculum preparation. The turbidity of the broth was adjusted to 0.5 McFarland standards and using sterile cotton swab, it was spread on Mueller-Hinton agar plates. The different antibiotic impregnated disks were placed over the freshly prepared agar (which already had bacterial cultures on it) at appropriate distances from one another. Then, all of the plates were incubated at 37°C for 24 hours [12]. The zone of inhibition was measured and compared with Clinical and Laboratory Standard Institutes (CLSI) guidelines to classify the bacterial colonies as resistant or susceptible to the antibiotics [13].

Multiple Antibiotic Resistant (MAR) Index Value

Multiple antibiotic resistant (MAR) index was calculated for each of the bacterial isolates and the antibiotic resistant bacteria that have the MAR index for more than 20% were selected for further analysis. MAR index were calculated using the formula a/b , in which, a is the total number of antibiotics to which the organism is resistant, and b is the total number of antibiotics to which the organism is tested [14]. In this study, the antibiotics used were gentamicin, ampicillin, rifampicin, chloramphenicol, tetracycline, and ciprofloxacin. Equation below explains how the MAR index was calculated for each of the bacteria isolated in this study.

MAR Index

$$= \frac{\text{total number of antibiotics to which the organism is resistant (a)}}{\text{total number of antibiotics to which the organism is tested (b)}}$$

Results and Discussion

Isolation and Characterization of Bacterial Strain from Both Rivers Water Samples

The four river water samples were collected, including Lebir River (Point 1, Point 2) that located near to agricultural area and the residential area, and Kelantan River (Point 3, Point 4) that located near to the medical centers area and residential area (Figure 1). A total of 27 pure colonies were managed to be isolated from the samples from both of the rivers. From Lebir River, 4 and 8 pure colonies were isolated at Point 1 and Point 2, respectively. Meanwhile, from Kelantan River, 8 and 7 pure colonies were successfully isolated from Point 3 and Point 4, respectively. Table 1 shows the morphology characteristics of the bacterial colonies isolated from Lebir River and Kelantan River whereas Table 2 shows the bacterial colonies isolated from both Lebir River and Kelantan River with the Gram stains viewed under 100X magnification. Table 3 tabulates the biochemical tests conducted for all the isolates collected from Lebir River and Kelantan River. Based on the table, it can be concluded that the population for different point in the same river may differ from one another. The human activities near the sampling areas might have contributed to the populations of the bacteria present in both rivers.

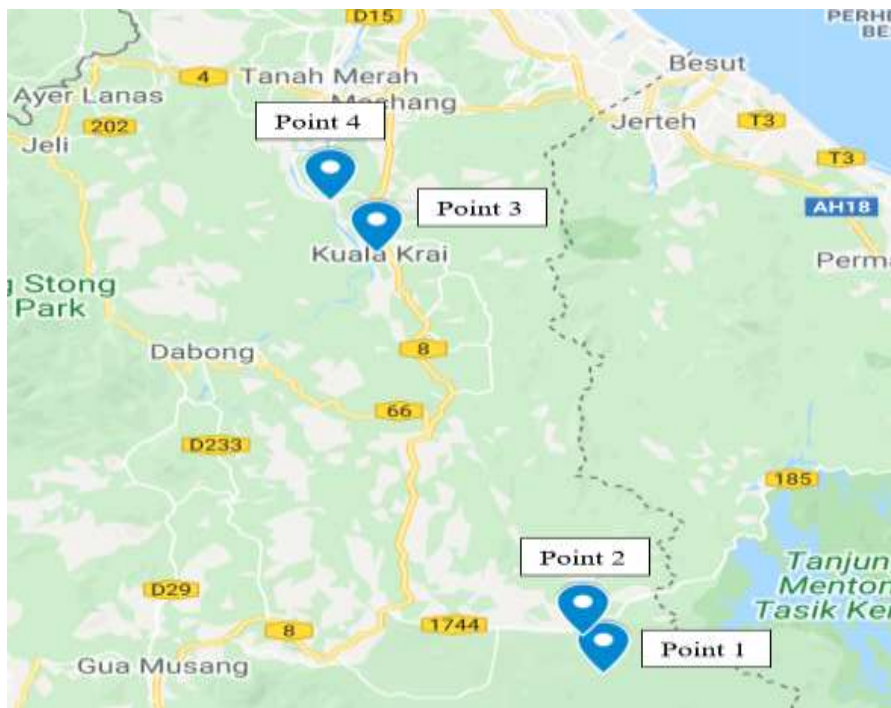

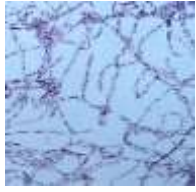







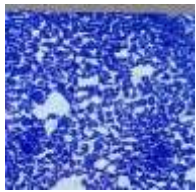
























Fig 1 Sampling location of Lebir River (Point 1, Point 2) and Kelantan River (Point 3, Point 4)

Table 1 Morphology characteristics of bacterial colonies isolated from Lebir and Kelantan River

Lebir River						Kelantan River					
Isolate	Form	Elevation	Opacity	Colour	Surface	Isolate	Form	Elevation	Opacity	Colour	Surface
Point 1						Point 3					
1A	Irregular	Flat	Opaque	Whitish	Rough	3A	Circular	Raised	Opaque	Light purple	Smooth, glistening
1B	Circular	Flat	Opaque	Yellowish	Smooth	3B	Circular	Raised	Translucent	Yellow	Smooth
1C	Irregular	Flat	Opaque	Whitish	Smooth	3C	Irregular	Flat	Opaque	Whitish	Smooth
1D	Irregular	Umbonate	Opaque	Whitish	Rough	3D	Circular	Raised	Opaque	Yellowish	Smooth
Point 2						3E	Circular	Raised	Opaque	Yellowish	Rough
2A	Circular	Raised	Opaque	Dark purple	Smooth	3F	Circular	Raised	Translucent	Yellowish	Smooth, glistening
2B	Circular	Raised	Opaque	Whitish	Smooth	3G	Irregular	Flat	Opaque	Whitish	Rough
2C	Irregular	Crateriform	Opaque	Whitish	Rough	3H	Circular	Flat	Opaque	Whitish	Smooth
2D	Irregular	Flat	Opaque	Whitish	Smooth, glistening	Point 4					
2E	Irregular	Flat	Opaque	Whitish	Smooth	4A	Circular	Raised	Opaque	Dark purple	Smooth
2F	Circular	Raised	Translucent	Yellowish	Smooth, glistening	4B	Circular	Raised	Translucent	Whitish	Smooth
2G	Circular	Raised	Opaque	Yellowish	Smooth	4C	Irregular	Flat	Opaque	Whitish	Smooth
2H	Circular	Raised	Opaque	Yellow	Smooth	4D	Circular	Raised	Translucent	Whitish	Smooth
						4E	Circular	Raised	Opaque	Whitish	Smooth
						4F	Irregular	Flat	Translucent	Whitish	Smooth
						4G	Circular	Raised	Translucent	Yellowish	Smooth

Table 2 The bacterial colonies isolated from both Lebr River and Kelantan River with the Gram stains viewed under 100X magnification

Lebir River				Kelantan River							
Point 1		Point 2		Point 3		Point 4					
Strain	Gram Stain	Strain	Gram Stain	Strain	Gram Stain	Strain	Gram Stain				
1A			2A			3A			4A		
1B			2B			3B			4B		
1C			2C			3C			4C		
1D			2D			3D			4D		




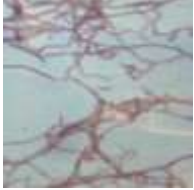

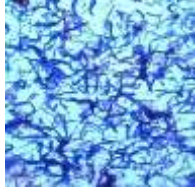



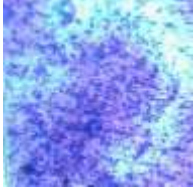

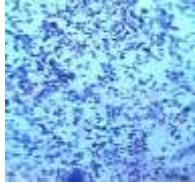










			2E			3E			4E		
			2F			3F			4F		
			2G			3G			4G		
			2H			3H					

Table 3 Biochemical tests conducted for isolates from Lebir River and Kelantan River

Lebir River										Kelantan River																						
Point 1					Point 2					Point 3					Point 4																	
S t r a i n	Biochemical Test						Conclusion (Family Type)	S t r a i n	Biochemical Test						Conclusion (Family Type)	S t r a i n	Biochemical Test						Conclusion (Family Type)									
	C a t a l a s e	C i t r a t e	M c C o n k e y A g a r	I n d o l	U r e a s e	O x i d a s e			M a n n i t o l S a l t A g a r	C a t a l a s e	C i t r a t e	M c C o n k e y A g a r	I n d o l	U r e a s e			O x i d a s e	M a n n i t o l S a l t A g a r	C a t a l a s e	C i t r a t e	M c C o n k e y A g a r	I n d o l		U r e a s e	O x i d a s e	M a n n i t o l S a l t A g a r						
1A	-	-	-	-	+	+	-	2A	-	-	+	-	-	+	-	3A	+	+	+	-	+	+	+	4A	-	+	+	-	-	+	-	Vibrio sp. Pseudomonas sp. Aeromonas sp.
1B	-	-	-	-	+	+	-	2B	-	-	+	-	+	+	-	3B	-	-	+	-	-	-	-	4B	-	+	+	-	-	+	-	Neisseria sp. Veillonella sp.
1C	-	-	-	-	-	+	-	2C	-	-	+	-	-	-	+	3C	-	-	-	-	-	-	-	4C	+	+	+	-	-	+	+	Bacteroides sp. Actinobacillus sp. Flavobacterium sp.
1D	+	-	+	-	-	+	+	2D	-	-	+	-	-	-	+	3D	-	-	-	-	-	+	-	4D	-	-	+	-	-	-	-	Neisseria sp. Veillonella sp.

Antibiotic Susceptibility Testing

The result obtained for the antibiotic susceptibility tests using disk diffusion method were as listed in Table 4 and Table 5. Based on the results obtained, out of 27 bacterial isolates, almost all bacterial isolates were resistant to at least one type of antibiotic, whereas more than half of the isolates showed multiple antibiotic resistance (resistance to more than one type of antibiotics).

Among all of the species predicted, only *Neisseria* sp. and *Veillonella* sp. that could be found in both Point 1 and Point 2, however at different population sizes. The population sizes of both species were higher in Point 1, which may indicate that the niche is more suitable for the species to live in. With that apart, the bacterial population for both sampling points were different, probably due to the higher nitrogen, potassium and heavy metals from the fertilizers used for the agriculture (Point 1) and other elements from human activities (Point 2), which made the river water there unsuitable for certain species to inhabit. On the other hand, *Pseudomonas* sp., *Actinobacillus* sp., *Flavobacterium* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp. and *Bacteroides* sp. were found at Point 4 (residential area) but not at Point 3 (medical centres area), which might indicate that those species were not resistant to the antibiotic residues that present in the river water of Point 3, hence could not survive as well as they could at Point 4.

Lebir River and Kelantan River were chosen for this study because there is a concern of Kelantan River being polluted due to the various human activities within the vicinity of the area [15]. In the other hand, Lebir River is claimed to have a good water quality despite the fact that Lebir River is not completely free from human activities either, hence there is still a possibility that both rivers are contaminated with antibiotic residues which lead to the prevalence of antibiotic resistant bacteria [16]. With regard of the pollution status of the rivers, this study had found that antibiotic resistant bacteria are present in both polluted river (Kelantan River) and unpolluted river (Lebir River), which is similar to what Al-Badaii and Othman (2015) reported [6].

Table 4 Antibiotic susceptibility tests for the bacterial colonies isolated from Point 1 and Point 2 of Lebir River

	Antibiotics	Ampicillin		Gentamycin		Chloramphenicol		Tetracycline		Rifampicin		Ciprofloxacin	
	Bacterial colonies	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml
Point 1	1A	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	1B	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
	1C	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	S
	1D	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	S
Point 2	2A	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
	2B	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
	2C	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S
	2D	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S
	2E	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S
	2F	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S
	2G	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
	2H	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Table 5 Antibiotic susceptibility test for the bacterial colonies isolated from Point 3 and Point 4 at Kelantan River

	Antibiotics	Ampicillin		Gentamycin		Chloramphenicol		Tetracycline		Rifampicin		Ciprofloxacin	
		Bacterial colonies	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml	30 µg/ml	10 µg/ml
Point 3	3A	S	S	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
	3B	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
	3C	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S
	3D	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S
	3E	S	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
	3F	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
	3G	R	R	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R
	3H	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R
Point 4	4A	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
	4B	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S
	4C	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
	4D	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
	4E	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	S	S
	4F	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
	4G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

MAR Index Analysis

Based on Figure 2 (a), it can be seen that almost all isolates from Lebir River have MAR index of >20%. Half of the four isolates from Point 1 has MAR index of >20% whereas another half of them has MAR index of < 20%. For Point 2 isolates, six out of eight isolates have MAR index of >20% for both antibiotic concentrations tested. Only one isolate has MAR index of <20% for both antibiotic concentrations and also only one isolate that has MAR index of >20% for one antibiotic concentration tested. Figure 2 (b) illustrates that 50% of Point 3 isolates have MAR index of >20% for both antibiotic concentrations tested. In the meantime, only two isolates (4B and 4E) out of seven isolates from Point 4 have MAR index of >20% for both antibiotic concentrations tested.

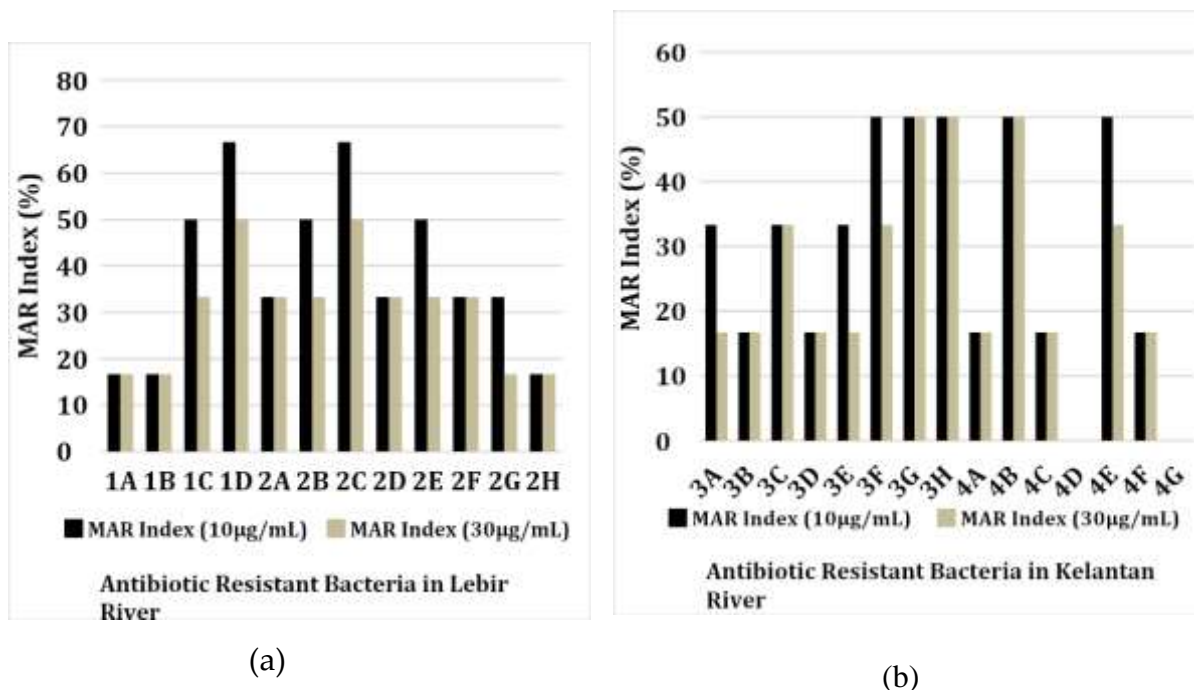


Fig 2 MAR index value for bacteria isolated from a) Lebir River and b) Kelantan River.

Conclusion

In this study, the antibiotic resistant bacteria were managed to be isolated from the water samples of all four sampling points of Lebir River and Kelantan River in Kelantan, summed up to a total of 27 bacterial isolates (Point 1: 4 isolates; Point 2: 8 isolates; Point 3: 8 isolates; Point 4: 7 isolates). Based on the results, the isolates were predicted as *Actinomyces* sp., *Arachnia* sp., *Streptomyces* sp., *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Neisseria* sp., *Veillonella* sp., *Bacteroides* sp., *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Proteus* sp., *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Vibrio* sp., *Staphylococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Actinobacillus* sp., and *Flavobacterium* sp. The antibiotic susceptibility testing using disk diffusion method against six types of antibiotics (gentamicin, ampicillin, rifampicin, chloramphenicol, tetracycline, and ciprofloxacin) were performed towards all of the bacterial isolates and the MAR index values for each of the isolates were successfully calculated. The present study is expected to provide a baseline data on the MAR in the water environment. The result obtained showed that both polluted and unpolluted rivers consist of antibiotic resistant bacteria. Almost all isolates in Lebir river are claimed to be MAR bacteria, indicating that the human activities have strong correlation with the MAR in the freshwater environment. The isolated MAR bacteria could be potentially human pathogenic bacteria and pose high risk to human, animal, and environmental health. Therefore, further identification on the bacterial species using molecular method to justify the potential virulence of the MAR bacteria in the freshwater environment are strongly recommended.

Abbreviations

AR: Antibiotic Resistance; ARB: Antibiotic resistance bacteria, AMR: antimicrobial resistance; CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute; MAR: Multiple antibiotics resistance; sp: species

Acknowledgements

We sincerely thank the staff and administration of the Universiti Teknologi Malaysia for their assistance and support in this study.

Funding

This study is funded by the Geran Universiti Penyelidikan (GUP) sub vote 17H74 and UTMSHine Grant sub vote 04G97, which is supported by the Universiti Teknologi Malaysia.

Availability of data and material

Please contact the corresponding author for any data request.

References

1. Jiang, L., et al., Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Science of the Total Environment*, 2013. 458: p. 267–272.
2. Manyi-Loh, C., S. Mamphweli, E. Meyer, and A. Okoh, Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential Public Health Implications. *Molecules*, 2018. 23(4): p. 795.
3. Martinez, J.L., Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*, 2009. 157: p. 2893–2902.
4. Berendonk, T.U., C. M. Manaia, C. Merlin, D. Fatta-Kassinos, E. Cytryn, D. Walsh, H. Bürgmann, H. Sørum, M. Norström, M. Pons, N. Kreuzinger, P. Huovinen, S. Stefani, T. Schwartz, V. Kisand, F. Baquero, and J. L. Martinez, Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology*, 2015. 13: p. 310-317.
5. Nnadozie, C.F., and O.N. Odume, Freshwater environments as reservoirs of antibiotic resistant bacteria and their role in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Environmental Pollution*, 2019. 254(B): p. 113067.
6. Al-Badaii, F., and M.S. Othman, Water Pollution and its Impact on the Prevalence of Antibiotic-Resistant *E. coli* and Total Coliform Bacteria: A Study of the Semenyih River, Peninsular Malaysia. *Water Qual Expo Health*, 2015. 7: p. 319–330.
7. Barancheshme, F., and M. Munir, Strategies to combat antibiotic resistance in the wastewater treatment plants. *Frontiers in Microbiology*, 2018. 8: p. 1-12.
8. Moges, F., et al., Isolation and characterization of multiple drug resistance bacterial pathogens from waste water in hospital and non-hospital environments, Northwest Ethiopia. *BMC Research Notes*, 2014. 7(1): p. 215.
9. Barile, M.F., Gram staining technique. *Methods in Mycoplasma V1: Mycoplasma Characterization*, 2012. 1: p. 39.
10. Holt, J. G., S. T. Williams, and Holt, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4: Lippincott Williams & Wilkins, 1989.
11. Vos, P., et al., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes (Vol. 3)*: Springer Science & Business Media, 2011.
12. Hudzicki, J., Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American Society for Microbiology*, 2009. 2016: p. 1-23.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI, M100-S25. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.

14. Bhuvaneshwari, G., Multiple Antibiotic Resistance Indexing of Non-Fermenting Gram-Negative Bacilli. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 2017. 10 (6): p. 78-80.
15. Ahmad, A. K., I. Mushrifah, and M.S. Othman, Water Quality and Heavy Metal Concentrations in Sediment of Sungai Kelantan, Kelantan, Malaysia: A Baseline Study. *Sains Malaysiana*, 2009. 38(4): p. 435-442.
16. Akmaliah Razak Potensi komersial Sungai Lebir. *Kumpulan Media Karang kraf*. Retrieved November 7, 2018, from <https://www.karangkraf.com/berita/potensi-komersial-sungai-lebir-1.639980> (2017, 9 March).

Aydın, E., B.T. Biçen, and T. Yarılgaç, Gisela 6 ve SL 64 Anaçlarının *in vitro* Koşullarda Çoğalma Performanslarının Belirlenmesi. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(3). p. 308-316. DOI: 10.38001/ijlsb.754996

Gisela 6 ve SL 64 Anaçlarının *in vitro* Koşullarda Çoğalma Performanslarının Belirlenmesi

Erol Aydın^{1*}, Belgin Turunç Biçen², Tarık Yarılgaç³

ÖZET

Bu çalışmada Gisela 6 ve SL 64 anaçlarının *in vitro* koşullarda çoğaltılabilme performansları araştırılmıştır. Eksplant kaynağı olarak sürgün ucu, besi ortamı olarak ise MS besi ortamı ile farklı hormon doz kombinasyonları kullanılmıştır. Eksplantlar başlangıç aşamasında 0.5 mg/l-1 BAP+0.1 mg/l-1 GA3+0.1 mg/l-1 IBA içeren MS besi ortamına dikilerek kültüre alınmıştır. Sürgün çoğaltma aşamasında farklı BAP (0, 0.5 ve 1 mg/l-1) dozlarının etkisini belirlemek için çalışma yapılmıştır. BAP dozunun artması ile sürgün sayısının arttığı belirlenirken, en fazla sürgün sayısı Gisela 6 anacında 0.5 mg/l-1 BAP dozunda SL 64 anacında ise 1 mg/l-1 BAP dozunda gerçekleşmiştir. Köklendirme ortamında ½ MS besi ortamında farklı IBA (0, 0.5, 1, 2 mg/l-1) dozlarının köklenme oranına etkisi incelenmiştir. Gisela 6 ve SL 64 anaçlarında IBA dozunun artması ile köklenme oranının arttığı ve en yüksek köklenme oranı 2 mg/l-1 IBA dozundan elde edilmiştir.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş
20 Haziran 2020
Kabul
4 Eylül 2020

ANAHTAR KELİMELER

MS, kiraz anacı, sürgün sayısı, köklenme oranı

Gisela 6 and SL 64 Rootstock of *in vitro* Conditions Determination of Production Performance

ABSTRACT

This study, was carried out in order to determine the propagation performance in *in vitro* conditions of Gisela 6 and SL 64 rootstocks. The explants prepared from the shoot tips of Gisela 6 and SL 64 rootstocks as plant material were cultured in the initial stage by planting on MS nutrient medium containing 0.5 mg/l-1 BAP + 0.1 mg/l-1 GA3 + 0.1 mg/l-1 IBA. The effect of different BAP doses (0, 0.5 and 1 mg/l-1) was determined in the shoot propagation stage. While increasing the number of shoots with the increase of BAP dose is determined, the maximum number of shoots was obtained from 0.5 mg/l-1 BAP dose in Gisela 6 rootstock and 1 mg/l-1 BAP dose SL 64 rootstock.

ARTICLE HISTORY

Received
20 June 2020
Accepted
4 September 2020

KEY WORDS

MS, cherry rootstock, shoot number, rooting rate

Giriş

Kiraz üretiminde çoğunlukla kuş kirazı (*Prunus avium*), vişne (*Prunus cerasus*) ve mahlep (*Prunus mahaleb*) çöğürleri kullanılmaktadır [1]. Çöğür anaçlar tohumla kolaylıkla çoğaltılabilmesine rağmen, heterozigot yapı nedeniyle genetik olarak açılım

¹ Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Bölümü, Samsun

² Çukurova Üniversitesi, Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Adana

³ Ordu Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ordu

*Corresponding Author: Erol AYDIN, e-mail: aydin.erol@tarimorman.gov.tr

göstermesi, verim çağına gelmesi için uzun zamana ihtiyaç duyması ve modern meyve bahçe tesisi için çok uygun olamamaktadır. Çöğür anaçlardaki bu tür sorunlardan dolayı kiraz fidanı üretiminde üniform bitki oluşturan, daha erken meyveye yatan ve modern meyve yetiştiriciliği için uygun olan klon anaçlar tercih edilmektedir.

Kiraz yetiştiriciliğinde ağaçların büyüme kuvvetinin kontrol altında tutulamaması yetiştiricilik sorunlarının başında gelmektedir. Bu nedenle ağaç habituslarının küçültülmesi büyük önem taşımaktadır. Bodur anaçlarla kurulan meyve bahçelerinde verim ve meyve kalitesi artmakta, kültürel bakım işlemleri daha kolay yapıldığından masraflar azalmaktadır.

Dünyada son 70-80 yılda meyvecilikte anaç ıslahı konusunda yapılan çalışmalar kapsamında Almanya'da geliştirilen Gisela serisi, İtalya'da geliştirilen CAB 6P ve E-11 ve Fransa'da geliştirilen MxM serisi, Weriot ve Tabel Edabriz, klon anaçlarının kullanımı yaygınlaşmıştır [2]. SL 64 anacı seleksiyonla elde edilmiş mahlep klonudur. Mahlep çöğürünün %75-80'i kadar gelişme göstermektedir. Mahlep tiplerine göre farklı toprak tiplerine adaptasyonu daha iyidir.

Klon anaçlarının çoğaltılmasında geleneksel yöntemlerin (daldırma, çelik vb.) yanı sıra, kısa zamanda az sayıda materyalden çok fazla sayıda materyal elde edilmesini sağlayan doku kültürü yöntemleri önem kazanmıştır. Doku kültürü teknikleri özellikle klonal *Prunus* anaçlarının doku kültürü ile çoğaltımı büyük bir ticari sektör haline gelmiştir [3].

Kiraz anaçlarının *in vitro* koşullarda çoğaltılmasında genellikle MS besi ortamının modifiye edilmiş şekli kullanılarak başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Genel olarak hazırlanan ortama 20-30 g^l⁻¹ sakkaroz ilave edilmek ile birlikte bazı durumlarda ise daha yüksek konsantrasyonlarda sakkaroz kullanılmaktadır. *Prunus* türlerinde katı besi ortamı, sıvı besi ortamına göre daha yaygın olarak kullanılmakta olup ve besi ortamı için 6-8 g^l⁻¹ agar uygun bir dozdur. Besi ortamına ilave edilen bitki büyümeyi düzenleyici miktarları kültür aşamasına ve bitki türlerine göre değişiklik gösterebilmektedir [4, 5]. MxM 14, Tabel Edabriz ve Gisela 5 anaçlarının *in vitro* koşullarda çoğaltma performanslarının belirlenmesine yönelik yapılan çalışmada başlangıç safhasında enfeksiyon dışında önemli bir sorun ile karşılaşmazken, kardeşlenme safhasında vitrifikasyon (camsılaşma) önemli bir sorun olarak tespit etmişlerdir [6]. Gisela 5 MS ve 2 MS besi ortamında büyüme ve gelişme bakımından iyi

performans göstermiştir. Mikroçoğaltım çalışmalarında başarı sağlanmasında genotipin de önemli düzeyde etkili olması nedeniyle her klon anaç için ayrı bir protokolün geliştirilmesi önem arz etmektedir. Bu bakımdan kiraz anaçlarının çoğalma katsayılarının artırılması amacıyla yeni büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonlarının denenmesi gerekmektedir [7]. Bu çalışmada MS besi ortamına ilave edilmiş farklı büyümeyi düzenleyici madde kombinasyonlarının Gisela 6 ve SL 64 kiraz anaçlarının *in vitro* koşullarda çoğaltma performanslarının belirlenmesi amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve Metot

Çalışma 2015-2016 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde yürütülmüştür. Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü genetik kaynaklar parselindeki 5 yaşındaki Gisela 6 ve SL 64 anaçları çalışmanın materyalini oluşturmaktadır.

Genetik kaynaklar parselinden alınan Gisela 6 ve SL 64 anaçlarının yıllık sürgünleri, nemli kağıt havluya sarılarak araç tipi buzdolabı içerisinde laboratuvar ortamına getirilmiştir. Sürgün ucu ve yan tomurcuk hazırlanan eksplantlar yabancı maddelerden uzaklaştırılması için 30 dakika çeşme suyu altında yıkanmıştır. Steril kabin içerisine alınan eksplantlar %70'lik etil alkolde 3 dakika bekletildikten sonra 3 defa steril saf sudan geçirilmiştir. Daha sonra materyaller 1-2 damla tween 20 içeren ticari sodyum hipokloritin (%10 active chlorine) %10 konsantrasyonunda 10 dakika süre ile bekletilmiştir. Eksplantlar sodyum hipokloritten sonra 3 defa steril saf sudan geçirilerek sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

Eksplantların kültüre alınmasında MS temel besi ortamı kullanılmış ve ortama 30 gl⁻¹ sakkaroz eklenmiş, ortamın pH'sı 5.7'e ayarlanmış ve ortama 7 gl⁻¹ agar eklenmiştir. Çoğaltma aşamasında alt kültürler oluşturulurken, en çok kullanılan sitokininlerden olan BAP'ın 0, 0.5, 1.0 mg l⁻¹ konsantrasyonlarının MS ortamında sürgün çoğaltmaya olan etkisi incelenmiştir. Köklenme denemeleri için 0, 0.5, 1 ve 2 mg l⁻¹ IBA içeren ½ MS besi ortamı kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1 Başlangıç, çoğaltma ve köklendirme ortamlarındaki bitki büyüme düzenleyicilerin kombinasyonları

Ortam Adı	Bitki büyüme düzenleyici dozları ve kombinasyonları
Başlangıç Ortamı	MS + 0.5 mg ^l ⁻¹ BAP + 0.1 mg ^l ⁻¹ GA ₃ + 0.1 mg ^l ⁻¹ IBA + 0 mg ^l ⁻¹ BAP
Çoğaltma Ortamı	MS + 0.1 mg ^l ⁻¹ GA ₃ + 0.1 mg ^l ⁻¹ IBA + 0.5 mg ^l ⁻¹ BAP + 1 mg ^l ⁻¹ BAP + 0 mg ^l ⁻¹ IBA
Köklendirme Ortamı	½ MS + 0.5 mg ^l ⁻¹ IBA + 1 mg ^l ⁻¹ IBA + 2 mg ^l ⁻¹ IBA

Hazırlanan ortamlar başlangıç aşamasında cam tüplere, çoğaltma ve köklendirme aşamasında ise cam kavonozlara dökülerek 1.2 kg/cm² basınç altında ve 121 °C sıcaklık 20 dakika otoklavlanmış ve otoklavdan çıkarılan ortamlar soğuması için steril kabin içerisine konulmuştur. Cam tüp ve kavanoz içerisindeki ortamlara dikilen eksplantlar 25±1 °C sıcaklıkta 2500 lux aydınlatmada 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık karanlık koşullardaki iklim odasında başlangıç ve çoğaltma ortamında 4'er hafta bekletilerek steril kabin içerisinde alt kültüre alma işlemi gerçekleştirilmiş ve dördüncü alt kültürden sonra da eksplantlar kök ortamına aktarılmıştır.

Çalışmada incelenen özellikler

Enfeksiyonlu kültür oranı (%)

Kültürlerin gelişmeleri dikkate alınarak 28 günlük kültür sonunda, enfekte olan kültür sayısının tüm kültürler oranı hesaplanarak yüzde olarak ifade edilmiştir [8].

Sürgün sayısı (adet)

İlk dikim, şaşırtma ve çoğaltma aşamalarında, her bir eksplanttan oluşan sürgünler sayılarak tespit edilmiştir [9].

Köklenme oranı (%)

Köklendirme ortamına alınan sürgünlerden 30 gün sonra köklenme görülenlerin oranını ifade etmektedir [9]. Çalışmadaki tüm denemeler tesadüf parselleri bölünmüş parseller deneme desenine göre bitki büyüme düzenleyiciler ana parselde, anaçlar ise alt parselde yer almak koşulu ile 3 tekerrür ve her tekerrürde 20 eksplant olacak şekilde

kurulmuştur. Denemeden elde edilen veriler ANOVA istatistik paket programında tek yönlü analiz edilmiş olup, genotipler arasındaki farklılıklar LSD çoklu karşılaştırma testi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Eksplant alma zamanının, enfeksiyon oranı üzerine ait sonuçlar Tablo 2’de verilmiştir. Yıllar ortalamasına göre Tablo 2 incelendiğinde Gisela 6 ve SL 64 anaçlarındaki enfeksiyon oranı %17.72 ve %18.57’dir.

Tablo 2 Gisela 6 ve SL 64 anacının enfeksiyonlu kültür oranı (%)

Yıl	Gisela 6	SL 64
2015	13.21±2.00	17.14±1.56
2016	22.22±1.91	20.0±3.25
Ortalama	17.72±1.93	18.57±2.20

Bulgularımıza paralel olarak SL 64, F12/1, Gisela 5 ve Gisela 6 klon anaçları ile sarı ve kara idris çöğür anaçları ile yapılan çalışmalarda enfeksiyonlu kültür oranı %35.0-45.0 arasında olduğunu bildirmişlerdir [9, 10]. Gisela 5, MxM 14 ve Tabel Edabriz kiraz anaçları ile *in vitro* şartlarda yaptıkları çalışmada, Nisan ayı son haftası ile Haziran ayının ilk haftası arasında eksplant alınması için en uygun dönemin olduğunu, daha erken dönemde eksplant alındığında enfeksiyon oranının arttığı, daha geç dönemde alınan eksplantlar ile başlatılan kültürde ise sürgün oluşumunun azaldığını bildirilmiştir [11].

Farklı BAP dozlarının sürgün sayısı üzerine etkisi Tablo 3’de verilmiştir. Yıllar ortalamasına göre BAP dozlarının sürgün sayısı üzerine etkisinde çeşitli doz etkisi istatistik olarak önemli bulunmaması ile birlikte Gisela 6 anacında 0.5 mg^l⁻¹, SL 64 anacında ise 1 mg^l⁻¹ BAP dozunda sürgün sayısı en fazladır.

Gisela 6 kiraz anacının çoğaltımında 1 mg^l⁻¹ BAP, 0.1 mg^l⁻¹ NAA ve 0.1 mg^l⁻¹ GA₃ konsantrasyonunun iyi sonuç verdiğini bildirilmiştir [18]. SL 64 kiraz anacının *in vitro* koşullarda MS, WPM besi ortamlarında farklı BAP ve IBA konsantrasyonlarında çoğaltılması için yapılan çalışmalarda en fazla sürgün sayısı 1.0 mg^l⁻¹ BAP + 0.5 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamdan elde edilmiştir [19]. Bitki büyümeyi düzenleyici olarak sadece BAP’in kullanıldığı QL besi ortamında *Prunus* anaçlarının çoğaltılabilme

performanslarını belirlemek için yapılan çalışmada 0.5 mg^l⁻¹ BAP dozunda sürgün sayısının en fazla olduğunu tespit etmiştir [20].

Tablo 3 BAP dozlarının Gisela 6 ve SL 64 anacındaki sürgün sayısı ortalamaları (adet) ve LSD çoklu gruplandırılmaları

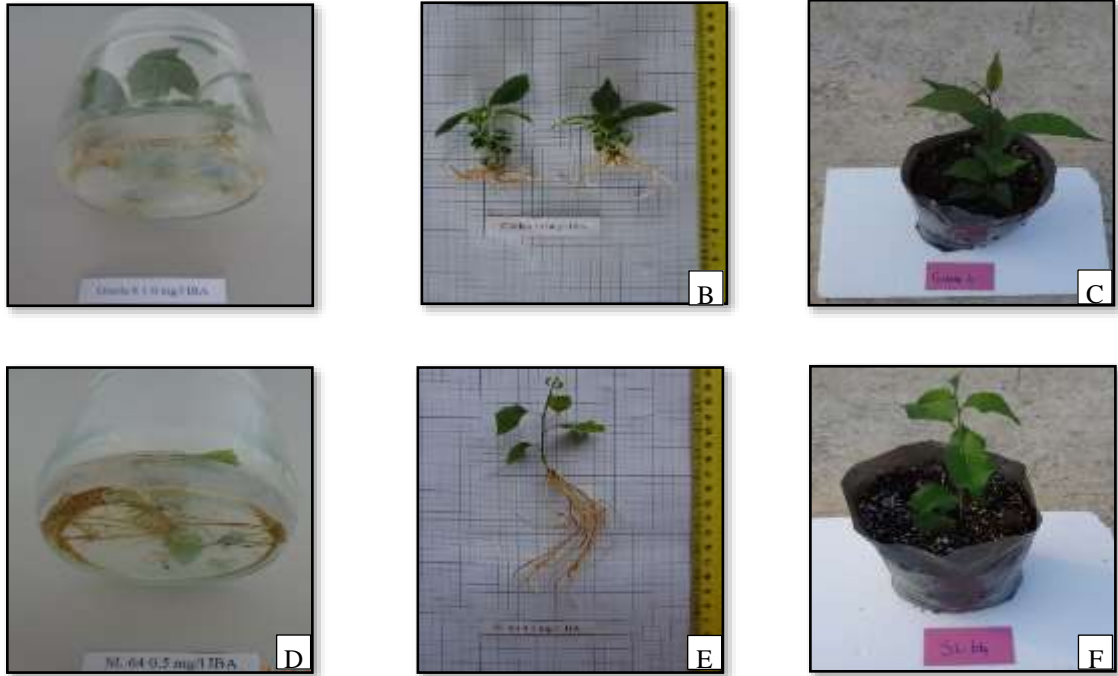
Yıl	Anaç	BAP Doz			Ortalama
		0 mg ^l ⁻¹	0.5 mg ^l ⁻¹	1 mg ^l ⁻¹	
2015-2016	Gisela 6	1.29c	3.41a	3.04b	2.58
	SL 64	1.67c	2.17b	3.33b	2.39
	Ortalama	1.48B	2.79A	3.19A	
	VK (%)			12.04	
	Çeşit	ÖD			-
	Doz	**	AÖF		0.47
	Çeşit x Doz	**			0.47

Tablo 4’te belirtildiği gibi yıllar ortalamasına göre IBA dozlarının köklenme oranı üzerine etkisinde Gisela 6 ve SL 64 anaçları 2 mg^l⁻¹ IBA uygulamasında en yüksek köklenme oranına sahip olurken, en düşük köklenme oranı kontrol uygulamasından elde edilmiştir.

SL 64 anacının farklı IBA konsantrasyonlarında köklenme oranını belirlemeye yönelik yapılan çalışmada en yüksek köklenme oranı 2 mg^l⁻¹ IBA konsantrasyonunda gerçekleşmiştir [21]. Gisela 5 ve MxM 14 kiraz anaçlarının *in vitro* koşullarda köklendirilmesi ile ilgili yapılan çalışmada en yüksek köklenme oranı Gisela 5 anacında 0.5-1 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamda, MxM 14 anacında ise IBA içermeyen ortamda gerçekleştiğini belirlemiştir [22]. *Prunus* türlerinde IBA dozunun artmasının köklenmeyi olumlu etkilediğini bildirmiştir [3]. Kiraz ve vişne çeşitlerinin yapraklarından bitki rejenerasyonu ile ilgili yaptıkları çalışmada en yüksek köklenme oranını (%65-92) 2 mg^l⁻¹ IBA dozundan veya NAA ile destekli ½ MS besi ortamından elde etmiştir [23]. SL 64 ve F 12/1 anaçlarının köklendirme performanslarını belirlemek için yapılan çalışmada en yüksek köklenme oranını (%75-91.7) 0.5 ve 2.0 mg^l⁻¹ IBA içeren ortamlardan elde etmiştir. Oblacinska vişne anacının 4 genotipiyle yapılan köklendirme çalışmasında ½ MS besi ortamı ile dört farklı IBA konsantrasyonun kullanıldığı çalışmada en yüksek köklenme oranını %71.3-81.3 olarak belirlemişlerdir [23, 24, 25]. Çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile elde etmiş olduğumuz sonuçlar benzerlik göstermektedir.

Tablo 4 IBA dozlarının Gisela 6 ve SL 64 anacındaki köklenme oranı ortalamaları (%) ve LSD çoklu gruplandırılmaları

Yıl	Anaç	IBA Doz				Ortalama
		0 mg ^l ⁻¹	0.5 mg ^l ⁻¹	1 mg ^l ⁻¹	2 mg ^l ⁻¹	
2015-2016	Gisela 6	69.17c	97.42a	95.00a	96.95a	89.64A
	SL 64	50.00d	50.50d	70.83c	81.67b	63.25B
	<i>Ortalama</i>	<i>59.59D</i>	<i>73.96C</i>	<i>82.92B</i>	89.31A	
	VK (%)			4.05		
	Genotip	**			2.40	
	Doz	**	AÖF		3.68	
	Çeşit x Doz	**			4.77	



Şekil 1 Gisela 6 anacının köklenme ve dış ortam koşullarına uyum sağlama aşaması (A, B, C). SL 64 anacının köklenme ve dış ortam koşullarına uyum sağlama aşaması (D, E, F).

Sonuç

in vitro koşullarda üç farklı BAP dozu (0, 0.5 ve 1 mg^l⁻¹) ile 4 IBA dozu (0, 0.5, 1 ve 2 mg^l⁻¹) uygulanarak Gisela 6 ve SL 64 anaçlarının çoğaltılabilirlik performanslarının belirlenmesi amacı ile yapılmıştır. Araştırma bulgularına göre Gisela 6 anacında SL 64 anacına göre daha az enfeksiyon gerçekleşmiştir. Sürgün sayısı bakımından Gisela 6 anacında 0.5 mg^l⁻¹, SL 64 anacında ise 1 mg^l⁻¹ BAP dozu en iyi sonucu vermiştir.

Ayrıca IBA dozunun artmasıyla da Gisela 6 ve SL 64 anacında köklenme oranının arttığı görülmüştür.

Kısaltmalar

AÖF: Asgari önemli fark, BAP: 6-Benzilaminopurin; °C: Santigrad derece; cm²: Santimetre kare; g: gram; GA₃: Gibberellik asit; IBA: İndol-3-butirik asit; Kg: Kilogram; l: litre; LSD: Least significant difference; MxM: Maxma; MS: Murashige ve Skoog; NAA: α-Naftalen asetik asit; Ö.D: Önemli değil; pH: Hidrojen konsantrasyonunun eksi logaritması; VK: Varyasyon katsayısı; %: Yüzde; **: %1 düzeyinde önemli

Acknowledgements / Teşekkürler

Bu çalışma, Çukurova Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürlüğünde yürütülmüştür. İşbirliğinden dolayı Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Müdürü ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Funding / Destekleyen Kurum veya Kuruluş

Yazarlar olarak bu çalışma Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğünün BBNB/10/10 numaralı ve Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünün TF 1506 numaralı projesi ile desteklenmesinden dolayı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğüne ve Ordu Üniversitesine teşekkür ederiz.

Kaynaklar

1. Webster, A.D. and N. E. Looney, Cherries. 1996, CAB International Press. 513 p. UK.
2. Özyigit, S., 0900 Ziraat ve dölleyicileri ile bazı klonal anaçlarının uyuşma durumları. Eğirdir Bahçe Kültürü Araştırma Enstitüsü Eylül Dergisi, 2003.
3. Aka Kaçar, Y., et al., *In vitro* besin ortamında kullanılan değişik katılaştırıcı maddelerin ve farklı pH düzeylerinin bazı kiraz (*Prunus avium* L.) anaçlarının çoğaltılması üzerine etkileri. I. Sert Çekirdekli Meyveler Sempozyumu, 2001. 25-28 Eylül, Yalova.
4. Borkowska, B. and J. Szczerba, Influence of different carbon sources on invertase activity and growth of sour cherry (*Prunus cerasus* L.) shoot cultures. J. of Exp. Botany, 1991. 240(42): p. 911-915.
5. Morini, S. and P. Sciutti-Fortuna, *In vitro* growth response of *Prunus cerasifera* shoots as influenced by different light-dark cycles and sucrose concentrations. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1992. 28(3): p. 245-248.
6. Fidancı, A., M. Burak, and B. Erenoğlu, Bazı klonal kiraz ve vişne anaçlarının *in vitro*'da hızlı çoğaltım tekniklerinin belirlenmesi (I. Aşama). I. Sert Çekirdekli Meyveler Sempozyumu, 2001. P. 25-28 Eylül, 181-186, Yalova.
7. Güçlü, F., F. Koyuncu, and B. Şan, The *in vitro* micropropagation of some clonal cherry rootstocks. Journal of Natural & Applied Sciences, 2010. P. 14.
8. Yıldırım, H., Hacıhaliloğlu kayısı (*Prunus armeniaca* L.) çeşidinin *in vitro* çoğaltımı. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, 2006. Diyarbakır.
9. Sülüsoğlu, M., Kiraz-vişne anaçlarının *in vitro* çoğaltımı. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, 2002. Ankara.
10. Hepaksoy, S., Bazı kiraz anaçlarının mikroçoğaltımı üzerinde araştırmalar I. Gelişme ve çoğalma. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2004. 41(3): p. 11-22.
11. Fidancı, A., et al., Determination of *in vitro* propagation techniques for some clonal cherry rootstocks, V International Cherry Symposium, 2008. Acta Horticulturae. 795: p. 409-412.
12. Ruíz Anchondo T.J, et al., Effect of the gelling agent and alternative substrates on micropropagation of peach rootstock GF 677 (*Prunus amygdalus* × *P. persica*). XXVIII international horticultural congress on science and horticulture for people, 2010. 923, p. 209–212.
13. Sülüsoğlu, M. and M. Çelik, SL 64 (*Prunus mahaleb*) ve F 12/1 (*Prunus avium*) anaçlarının mikro üretiminde temel besin ortamının ve hormonlarının sürgün proliferasyonu ve kalitesi üzerine etkileri. Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 2003. Cilt I: 111-114.

20. Silva, A.L., et al., *In vitro* establishment and multiplication of prunus rootstock. Revista Brasileira de Fruticultura, 2003. 25(2): p.297-300.
21. Xilogiannis, C., A. Xilogiannis, and E. Mpalas,. Micropropagation of two cherry rootstocks and their behavior in the nursery and the orchard. V International Cherry Symposium, 2008. Acta Horticulturae. 795: p. 429-434.
22. Büyükdemirci, H., The effects of medium ingredients on shoot propagation and rooting of cherry rootstocks *in vitro*. V International Cherry Symposium 2008. Acta Horticulturae. 795:p.419-422.
23. Tang, H., et al. Plant regeneration from leaves of sweet and sour cherry cultivars. Scientia Horticulturae, 2002. 93:p. 235-244.
24. Sülüšoğlu, M. and M. Çelik., SL 64 (*P. mahaleb*) ve F 12/1 (*P. avium*) anaçlarının mikro sürgünlerinin köklendirilmesi ve adaptasyonu üzerine arařtırmalar. Türkiye IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 2003. 08-12 Eylül, Antalya.
25. Doric, D., et al., Use of *in vitro* propagation of Oblacinska sour cherry in rootstock breeding. Turkish Journal of Biology, 2015. 39(4):p. 575-581.

Akure, Y.J., et al., Short Term Effect of Zinc Administration on Some Biochemical Parameters and Antioxidant Enzymes in Albino Rats. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2020. 3(3). p. 317- 324. DOI: 10.38001/ijlsb.741158

Short Term Effect of Zinc Administration on Some Biochemical Parameters and Antioxidant Enzymes in Albino Rats

Yusuf Jacob Akure^{1*} , Ahmed Maryam Usman¹ , Bukar M. Hyelni¹ , and Simon G. Mijah¹ 

ABSTRACT

Zinc is an essential trace element used as a supplement in the treatment of many diseases such as diarrhoea. This study was conceived to evaluate the short term effect of zinc administration on some biochemical parameters in albino rats. Sixteen albino rats (both sexes) were allocated randomly into four groups of four rats each. Group 1 served as the control and were given distilled water, groups II-IV were administered 10, 20 and 40 mg/kg body weight of Zn respectively for 14 consecutive days. The animals were sacrificed on the 15th day and blood was collected for liver and kidney function parameters, antioxidant enzymes activities and malondialdehyde concentration using standard procedures. The concentrations of alkaline phosphatase (ALP) and alanine aminotransferase (ALT) significantly increased ($p < 0.05$) while aspartate aminotransferase (AST) significantly decreased in a dose dependent manner when compared with the control group. There was a significant decrease ($p < 0.05$) in creatinine, a significant increase in potassium and no significant difference in serum urea level when compared with the control group. The activities of glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and catalase significantly increased while MDA significantly decreased when compared with the control group. Increased potassium level is an indication of kidney dysfunction. Increased antioxidant enzymes and decreased MDA indicates that zinc improved antioxidant status and decreased free radical generation. Increased serum ALT activity infers improvement in its activity rather than hepatocellular injury. Further studies on the effect of zinc at larger doses and long term should be carried out.

ARTICLE HISTORY

Received

23 June 2020

Accepted

4 September 2020

KEYWORDS

Zinc, biochemical parameters, antioxidant, enzymes, albino rats

Introduction

The element zinc is an essential element which exerts important anti-inflammatory, apoptotic and antioxidants effects [1]. It plays important roles in cellular metabolism[2]. Zinc additionally plays extensive roles in both specific (adaptive) and non specific (innate) immunity at multiple levels of cell differentiation, natural phenomenon and development of immune cells [3]. The extent of harmful or beneficial effects of xenobiotic compounds on

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, Adamawa State University, PMB 25, Mubi, Adamawa State, Nigeria.

*Correspondence: Yusuf Jacob Akure, E-mail: Yusufjacob58@gmail.com

blood and other body fluids are often determined by assessing the biochemical parameters levels [4]. Aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, alkaline phosphatase, total bilirubin, blood urea nitrogen (BUN) and creatinine are serum biochemical parameters of great significance in assessing liver and kidney function [5]. Blood-related functions of chemical compounds can likewise be explained by assessing the blood level of these liver enzymes which are biomarkers for infection[6]. The body comprises of enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems, which include superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), e.t.c, that regulate the balance between antioxidants and reactive oxygen species (ROS) [7]. Malondialdehyde (MDA) is an end product of lipid peroxidation. Nielsen *et al.*^[8] reported that MDA may be a vital marker of lipid peroxidation and oxidative damage caused by reactive oxygen species. Talpur *et al.*^[9] reported that zinc administration decreased the activity of liver enzymes (AST, ALT and ALP) in an induced hepatotoxicity. Mohamed *et al.*^[10] also reported a significant decrease in the levels of these liver markers including some renal function parameters like urea, in an induced renal toxicity upon zinc administration. There is little information on the effect of zinc in normal rats and the implication of prolonged usage in normal subjects with no disease. Studies have reported that zinc increased the activities of antioxidant enzymes in subjects with diseases, but little information is available on its effect on normal subjects. This study therefore evaluated the effect of zinc administration on liver, kidney and antioxidant enzyme activity in normal albino rats.

Materials and Methods

Experimental Animals

Albino rats of both sexes were obtained from the animal breeding unit Adamawa State University Mubi, Nigeria. All procedures involving the animals were duly conducted with strict adherence to guidelines and procedures. The experiments were carried out according to the rules and guidelines of the Animal Ethical Committee of Adamawa State University, Mubi.

Source of Zinc

The zincsulphate was obtained from Gombi pharmacy, Adamawa State, Nigeria produced by Archy with NAFDAC registration number A4-2156.

Experimental Design

Sixteen (16) albino rats (both sexes) were allocated randomly into four experimental groups of four rats each. The rats were given distilled water and standard pelletized feed. The rats were fasted overnight. One group served as the control and were given distilled water. The three experimental groups were orally administered with 10 mg/kg body weight, 20 mg/kg body weight and 40 mg/kg body weight of zincsulphate (dissolved in distilled water) respectively. The administration of the zinc sulphate in all groups continued for 14 consecutive days.

Sample Collection for Biochemical and Antioxidant Assays

This was done according to the method described by Mahmoud *et al.*^[11]. Briefly, on the 14th day, all the animals were sacrificed 24 hours after the administration of the final dose and blood samples from each animal was collected in to plain bottles, and was centrifuged at 5000rev/min for 10minutes to obtain the serum for biochemical analysis and antioxidant assay.

Biochemical Analysis

The method for biochemical analysis was adapted from Olorunfemi *et al.*^[12]. Appropriate commercial kits (Randox laboratory) were used to determine the concentrations of ALT, ALP, AST, Serum urea, creatinine and potassium using a spectrophotometer.

Antioxidant parameters

The method of Hosseini-Vashan *et al.*^[13] as modified by Fathi *et al.*^[14] was adopted. In this method, superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities were determined in 2 mL blood sample, washed and centrifuged (748 g for 10 min) several times with 0.9% NaCl. The washed-centrifuged erythrocytes volume was made up to 2.0 mL with cold redistilled water. At this point, the lysate was prepared using the procedures in the packs manual RANSEL and RANDOX (Ransel, RANDOX/RS-504 provided by Randox Laboratories) to determine the movement of GPx and SOD, individually. The absorbance was determined spectrophotometrically at 340 and 505 nm for GPx and SOD,

respectively. The activities of catalase was determined using the method as described by Luck,^[15] where the reaction mixture contained 50 mmol/L potassium phosphate support (pH 7.0), 1.25×10^{-2} mol/L H₂O₂, and the sample. Each of the sample was analyzed with appropriate blanks without H₂O₂. The change in absorbance was determined at 240 nm, and the activities of the enzyme were expressed as nanomoles of H₂O₂ decomposed per minute per milligram protein. Lipid peroxidation (MDA) assay was determined using the method as described by Ohkawa *et al.*^[16] where a mixture of 8% dissolvable sodium dodecyl sulfate (0.2 mL), 0.9% TBA (thiobarbituric corrosive; 0.2 mL), and 20% acetic corrosive (1.5 mL) was prepared, in which 0.2 mL of hemolysate was added and the volume was made up to 4 mL by adding distilled water. After boiling for 60 minutes, the mixture was allowed to cooled, and 5 mL of solution of n-butanol + pyridine (vol/vol 15:1) was added and centrifuged at 1000g for 15 minutes, and the absorbance in the supernatant was measured at 532 nm using spectrophotometer.

Statistical Analysis

All results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Data was analyzed using one-way ANOVA followed by Duncans multiple range test. $p < 0.05$ was considered as statistically significant, using SPSS software version 20.

Results

Biochemical Parameters Analysis

Table 1 shows the result of zinc administration on liver biochemical parameters in albino rats treated with zinc for 14 days. The concentrations of alkaline phosphatase (ALP) and alanine aminotransferase (ALT) significantly increased ($p < 0.05$) when compared with the control while aspartate aminotransferase (AST) shows no significant difference ($p > 0.05$) with the control group. The serum creatinine concentration significantly decreased ($p < 0.05$) when compared with the normal control group while there was a significant increase in serum potassium concentration. There was no significant difference in serum urea concentration at all test doses when compared with the control group.

Table 1 Effect of Zinc administration on biochemical parameters

Parameters	Control	10 mg/kg b.w of zinc	20 mg/kg b.w of zinc	40 mg/kg b.w of zinc
ALP (U/L)	16.92±1.96 ^a	40.48±1.43 ^b	43.24±1.61 ^b	45.89±1.02 ^b
ALT (U/L)	59.33±2.91 ^a	77.00±1.00 ^b	83.33±1.76 ^c	84.33±0.67 ^c
AST (U/L)	53.67±2.18 ^a	52.67±2.73 ^a	53.00±1.53 ^a	52.33±1.85 ^a
Creatinine (µmol/L)	64.65±1.53 ^b	14.23±0.19 ^a	13.92±0.44 ^a	13.96±0.04 ^a
Urea (mmol/L)	4.54±0.21 ^a	3.94±0.42 ^a	4.42±0.15 ^a	4.58±0.11 ^a
Potassium (mEq/L)	6.00±0.22 ^a	11.89±0.64 ^b	21.50±0.50 ^c	22.49±0.73 ^c

Values are expressed as mean ± S.E.M, (n=4). Values across the same row with same superscripts are not significantly different. $p < 0.05$ was considered significant.

The data summarized in table 2 shows the effect of zinc on antioxidant enzymes. There was a significant increase in GPx, SOD and CAT activities after 14 days zinc administration when compared with the control group.

Table 2 Effect of zinc supplementation on antioxidant enzymes

Treatment	SOD (U/L)	GPX (U/L)	Catalase (U/L)
Control	15.33 ± 1.37 ^a	15.50 ± 0.51 ^a	16.00 ± 1.00 ^a
10 mg/kg b.w of zinc	51.67 ± 1.33 ^b	14.67 ± 0.67 ^a	25.53 ± 1.23 ^b
20 mg/kg b.w of zinc	53.67 ± 0.84 ^b	35.33 ± 1.05 ^b	31.27 ± 1.20 ^c
40 mg/kg b.w of zinc	53.33 ± 0.78 ^b	40.00 ± 1.00 ^c	39.83 ± 0.39 ^d

Values are expressed as mean ± standard error of mean (S.E.M), n=4. Values along the same column with same superscripts are not significantly different. $P < 0.05$ was considered significant.

Table 3 shows the result of zinc administration on malondialdehyde (MDA) concentration. There was a significant decrease ($p < 0.05$) in MDA concentration in the zinc treated groups when compared with the control.

Table 3 Effect of zinc supplementation on Malonaldehyde (MDA)

Treatment	MDA (mg/dl)
Control	34.83±1.09 ^c
10 mg/kg b.w of zinc	17.20±0.98 ^b
20 mg/kg b.w of zinc	14.67±1.16 ^b
40 mg/kg b.w of zinc	10.07±1.03 ^a

Values are expressed as mean ± standard error of mean (S.E.M), n=4. Values along the same column with same superscripts are not significantly different. P < 0.05 was considered significant.

Discussion

Biochemical Parameters

The concentration of alanine aminotransferase is said to be higher in the liver than in the kidney, heart, skeletal muscle, pancreas, spleen, and lung tissue [17]. The increased levels of ALT and ALP from this study may indicate an improvement in the activities of these liver enzymes or hepatocellular damage. ALT is a cytosolic enzyme found predominantly in the liver. An increase in plasma concentration may be due to damage to the cell membrane of the liver [18]. This is in line with the studies from Seyyed *et al.*^[19] who reported that zinc pretreatment has a hepatoprotective effect by increasing the serum liver enzymes concentration of ALT and ALP. There was no significant difference in the concentration of AST.

Renal function parameters/indices are important for the diagnosis and treatment of kidney disease. The observed result from this study shows a decrease in serum creatinine level which may suggest kidney damage. Serum urea as observed from the study shows no significant difference among the treated groups and the control group. The observed significant increased level of potassium in serum from this study is associated with glomerular filtration rate in the kidney, where K⁺ is freely filtered by glomerulus [20]. According to Palmer,^[20] he reported that the bulk of K⁺ is reabsorbed in the proximal tubule of Henle so that only 10% of the filtered load reaches the distal nephron and the reabsorbed K⁺ are transported in the blood and this absorption is approximately proportional to Na⁺ and water absorption. Therefore, the significant increase in serum potassium concentration indicates dysfunction in reabsorption of potassium by the kidney indicating possible kidney damage.

Antioxidant Enzymes

The observed significant increased ($p < 0.05$) in the antioxidant enzymes superoxidodismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), when compared with the control group is an indication that zinc increased the activities of these enzymes to suppresses the generation of reactive oxygen species and this is in line with the studies from Prasad,^[21] and Ozturk and Gumuslu,^[22] who reported that zinc is capable of scavenging free radicals and can prevent lipid membrane damage. This is evidenced by the decreased concentration of MDA, which is an index biomarker of lipid peroxidation. Thus, Low concentration of MDA may suggest that zinc can prevent membrane damage and thus, decreased in lipid peroxidation, this is in line with the study of Zhao *et al.* ^[23] who reported that appropriate concentration of zinc can reduce the concentration of malondialdehyde (MDA) and enhance antioxidant activities to suppress the generation of ROS. This further indicates that the increased ALT and ALP observed above is not due to liver cell membrane damage since zinc is able to prevent lipid peroxidation that can cause cell damage. Results from this study has shown that zinc is able to prevent oxidative damage of cell membrane due to lipid peroxidation, thus the increased ALT observed in this study is due to reasons (such as improvement of the enzyme activity) rather than oxidative damage.

Conclusion

Fourteen (14) days administration of zinc improved liver function biomarkers, antioxidant status and prevented lipid peroxidation in normal albino rats. It had toxic effect on the kidney. Zinc supplementation should therefore be used with caution.

Acknowledgement

The authors wish to thank Mr. Iliya Kaigama and Mr. Janyo of Chemistry Research Lab. Adamawa State University, Mubi, for their assistance in the laboratory.

References

1. Grüingreiff, K., D. Reinhold, and H. Wedemeyer, The role of zinc in liver cirrhosis. *Annals Hepatology*. 2016. 15(1): 7-16.
2. Leoni, G., A. Rosato, and G. Perozzi, Zinc proteome interaction network as a model to identify nutrient-affected pathways in human pathologies. *Genes Nutrition*. 2014. 9: 436.
3. Rink, L. and H. Haase, Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunology*. 2007. 28: 1-4.
4. Ashafa, A. O. T., *et al.*, Toxicological evaluation of the aqueous extract of *Felicia muricata* thumb leaves in wistar rats. *African Journal of Biotechnology*. 2009. 8(6): 949-954.
5. Stockham, S. L., and M. A. Scott, *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. 2008. 2nd ed. Ames (IA): Blackwell Publishing, Iowa, USA.

6. Yakubu, M. T., M. A. Akanji, and A. T. Oladiji, Haematological evaluation in male albino rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem. *Pharmacological Mag.* 2007. 3:34.
7. Salehi, B., Martorell, M., Arbiser, J. L., Sureda, A., Martins N., Maurya, P. K., Sharifi-Rad, M., Kumar, P. and Sharifi-Rad, J. Antioxidants: Positive or Negative Actors?. *Biomolecules*. 2018. 8: pp 124.
8. Nielsen, F., *et al.*, Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clinical Chemistry*. 1997. 43, 1209–1214.
9. Talpur, M., *et al.*, Zinc Sulphate in Azathioprine induced Hepatotoxicity-An Experimental Study. *World Journal of Biological and Medical Science*. 2014. 1(4); 72-80.
10. Mohamed, E. T., *et al.*, Protective effect of zinc aspartate against acetaminophen induced hepatorenal toxicity in albino rats. *Journal of Radiation Research and Applied Science*. 2011. Vol. 4, No. 2(B), pp. 709 – 723.
11. Mahmoud, Y.N., A. Z. Salem, and M. A. El-Moslemany, Nephroprotective and Antioxidant Effects of Parsley Plant Parts Against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. *Academic Journal of Nutrition*. 2015. 4 (3): 113-122.
12. Olorunfemi, A. E., *et al.*, Biochemical changes in serum of rat treated with aqueous extract of the fruit of *Telferia occidentalis*. *African Journal of Biomedical Research*. 2006. 9(2): 235-237.
13. Hosseini-Vashan, S.J., A. Golian, and A. Yaghobfar, Effects of turmeric rhizome powder and source of oil in diet on blood metabolites, immune system and antioxidant status in heat stressed broiler chickens. *Journal of Livestock Science and Technology*. 2015. 3, 13-20.
14. Fathi, M., M. Haydari, and T. Tanha, Effects of zinc oxide nanoparticles on antioxidant status, serum enzymes activities, biochemical parameters and performance in broiler chickens. *Journal of Livestock Science and Technology*. 2016. 4 (2): 07-13.
15. Luck H. Bergmeyer HU, editor. *Methods of enzymatic analysis*. New York: Academic Press. 1971.
16. Ohkawa, H., N. Ohisshi, and K. Yagi, Assay of lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochemistry*. 1979. 95:351-8.
17. NHANES. *Biochemical profile in refrigerated serum: Laboratory procedure manual*. 2000.
18. Binukumar, B.K., *et al.*, Mitochondrial energy metabolism impairment and liver dysfunction following exposure to dichlorvos. *Toxicology*. 2010. 270(2-3), 77-84.
19. Seyyed, A. M., *et al.*, The effects of zinc sulphate on miR-34a, antioxidants, biochemical and histopathological parameters following ischemia/Reperfusion injury in rats. *Biological Trace Element Research*. 2018. 1 (2); pp 1425-1428.
20. Palmer, B. F. Regulation of potassium homeostasis. *Clinical Journal of Nephrology*. 2015. 10: 1050-1060.
21. Prasad, A. S. Clinical, immunological, anti-inflammatory and antioxidant roles of zinc. *Experimental Gerontology*. 2008. 43, 370–377.
22. Ozturk, O. and S. Gumuslu, Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase, copper, zinc-superoxide dismutase and catalase activities glutathione and its metabolizing enzymes, and lipid peroxidation in rat erythrocytes with age. *Experimental Gerontology*. 2004. 39, 211–216.
23. Zhao, C.Y., *et al.*, Effects of dietary zinc oxide nanoparticles on growth performance and antioxidative status in broilers. *Biological Trace Element Research*. 2014. 160, 361–367.

Gençyılmaz, O. and Seçkin, G. Çankırı İl'inin Hayvansal Kaynaklı Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(3). p. 325-341.
DOI: 10.38001/ijlsb.756288

Çankırı İl'inin Hayvansal Kaynaklı Biyogaz Potansiyelinin Belirlenmesi

Olçay Gençyılmaz^{1*} , Gamze Seçkin² 

ÖZET

Son yıllarda, tüm dünyada artan enerji ihtiyacının karşılanması ve çevresel sorunların çözümü için yenilenebilir kaynakların kullanımı giderek artmaktadır. Türkiye'de yenilenebilir enerji kaynaklarının kullanımını arttırmak ve enerji bağımlılığını azaltmak için çeşitli çalışmalar yapılmaktadır. Bu sebeple, Türkiye'deki alternatif enerji kaynağı arayışı biyogaz enerjisi üretiminin de yaygınlaşmasına sebep olmuştur. Özellikle tarım ve hayvancılığa uygun olan alanlarda oluşan organik atıklardan biyogaz enerji üretimini arttırmak için çalışmalar yapılmaktadır. Bu bölgelerde bitkisel ve hayvansal atıkların biyogaz enerji üretiminde kullanılması toplam enerji tüketiminin azaltılmasına ve atık yönetimine katkı sağlamaktadır. Bu çalışmada, Türkiye'nin İç Anadolu Bölgesi'nde yer alan Çankırı İl'inin biyogaz enerji potansiyeli ve kullanılabilirliği araştırılmıştır. Genellikle tarım ve hayvancılık sektörünün geliştiği, sanayileşme oranının düşük olduğu Çankırı İl'inde hayvansal atıklardan elde edilebilir biyogaz enerji potansiyeli belirlenmiştir. Biyokimyasal metan üretim potansiyeli (BMP) ve elektrik üretimine katkısı hesaplanarak her bir ilçe için ayrı ayrı bölgesel harita ve grafikleri oluşturularak biyogaz enerji potansiyeli analizi yapılmıştır. Ayrıca, biyogaz üretiminden elde edilecek elektrik geliri ve CO₂ emisyon değerleri de hesaplanmıştır.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

22 Haizran 2020

Kabul

3 Eylül 2020

ANAHTAR

KELİMELELER

Biyogaz,

CO₂ emisyon,

Çankırı,

Yenilenebilir enerji

¹ Çankırı Karatekin University, Çerkeş Vocational School, Materials and Materials Processing Technologies Department, Çankırı / Turkey

² Çankırı Karatekin University, Çerkeş Vocational School, City and Regional Planning, Çankırı / Turkey

*Corresponding Author: Olçay Gençyılmaz, e-mail: ogencyilmaz@karatekin.edu.tr

Determination of Animal Source Biogas Potential of Çankırı Province

ABSTRACT

In recent years, the world has focused on the use of renewable resources to meet increasing energy needs and to solve environmental problems. Several studies have been done to increase the use of renewable energy sources in Turkey and to reduce energy dependence. Therefore, the quest for alternative energy sources, biogas energy production in Turkey has led to the spread. Studies are carried out to increase biogas energy production from organic wastes, especially in areas suitable for agriculture and animal husbandry. Using vegetable and animal waste in biogas energy production in these regions contributes to reducing total energy consumption and waste management. In this study, Turkey Located biogas energy potential of Çankırı Province in Central Anatolia and availability were investigated. The biogas energy potential that can be obtained from animal wastes has been determined in Çankırı, where the agriculture and livestock sector is developed and the industrialization rate is low. Biogas energy potential analysis was made by calculating biochemical methane production potential (BMP) and its contribution to electricity production by creating regional maps and graphs for each district. In addition, electricity income and CO₂ emission values from biogas production were calculated.

ARTICLE HISTORY

Received

22 June 2020

Accepted

3 September 2020

KEY WORDS

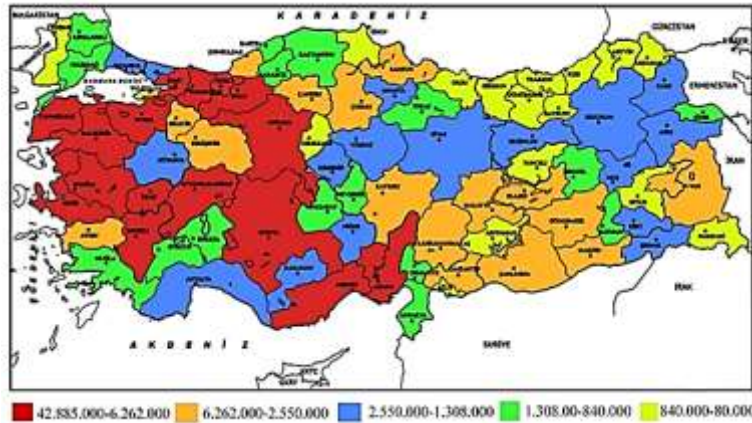
Biogas,
CO₂ emission,
Çankırı,
renewable energy

Giriş

Alternatif enerji kaynakları kullanılabilirliğinin artırabilmesi için son yıllarda geniş çapta araştırmalar ve yatırımlar yapılmaktadır [1-10]. Gelişmiş ülkelerin çoğu enerji verimliliğini artırılması, endüstriyel üretimin sürdürülebilirliği ve enerji tasarrufunu geliştirilmesine yönelik projeler ve araştırmalar yapmaktadır [11, 12]. Ayrıca, 2030 yılına kadar Avrupa Birliği üye ülkeleri enerji verimliliği konusundaki hedeflerini, enerji tüketimini azaltmak olarak belirlemiştir. Enerji tüketen sektörler ile motorlu taşıtlar için enerji verimliliği oranını % 27- % 30 olarak belirlenmiştir [13, 14]. Örneğin; Danimarka ve İsviçre’de tarımsal atıkların enerji olarak kullanılması için yapılan araştırmalar örnek teşkil etmiş, iki ülke arasındaki üretim ile tüketim farklarının sebepleri incelenmiştir [15]. Bununla beraber Arjantin, Brezilya, Kanada, Meksika ve Amerika gibi ülkelerde de yenilenebilir enerji politika konusunda çalışmalar yapılmaktadır [16]. Benzer şekilde Hollanda’da CO₂ emisyonu ve su kaynaklarının yönetimi gibi alanlarda da çalışmalar mevcuttur [17, 18]. Ayrıca Almanya diğer ülkelere göre alternatif enerji dönüşümü üzerinde çok ciddi yatırımlar yapmakta ve 2050 yılına kadar enerji tüketimini tamamen yenilenebilir enerjiden sağlamayı hedeflemektedir [19, 20]. İsveç’te de endüstriyel enerji verimliliği politikaları konusunda araştırmalar yapılmaktadır [21]. Diğer ülkelerde olduğu gibi ülkemizde de var olan alternatif enerji kaynaklarını değerlendirmek için geniş çapta yatırımlar ve

araştırmalar yapılmaktadır [22-30]. 2020 yılı için dünyada yenilenebilir enerji kaynaklarından elde edilecek retim 2.3-3.3 MTEP (milyon ton petrol eşdeğeri) civarında olacağı hedefler arasında yer almaktadır [31].

Son yıllarda, yenilenebilir enerji kaynakları arasında biyogaz enerji üretimi fosil enerjilere alternatif bir kaynak haline gelmiştir. Biyogaz retimi özellikle kk yerleşim yerlerinde; bölgesel gelişime, kırsal kalkınmaya ve istihdama destek olmaktadır. Dünyada biyogaz üretimi başta in olmak üzere Asya, Amerika, Almanya, İsveç, Danimarka, Hindistan ve Japonya gibi pek çok ülkede yapılmaktadır [32]. Literatür incelendiğinde, özellikle diğer kk illere kıyasla yüksek hayvan varlığına sahip olan ankırı ili için biyogaz enerji potansiyelinin belirlenme konusunda yeteri kadar çalışmanın yapılmadığı saptanmıştır (şekil 1). Bu çalışmada; ankırı İl'i için elde edilebilir hayvansal atıklar değerlendirilerek oluşabilecek biyogaz enerji potansiyeli, elektrik enerji geliri ve CO₂ emisyonunun azaltılması sağlayacağı katkı tespit edilmiştir. Bunun yanında; ankırı İl'inin hayvansal atıklardan elde edilebilir biyogaz enerji üretimi konusundaki elverişliliği, kullanılabilirliği ve bölgesel enerji politikalarına sağlayacağı katkının belirlenmesi amaçlanmıştır.



şekil 1. Türkiye'de illere göre hayvan varlıkları

Materyal ve Yöntem

Materyal

ankırı, İç Anadolu Bölgesi'ndeki Orta Kızılırmak Bölümünün 40° 30' ve 41° kuzey enlemleri ile 32° 30' ve 34° doğu boylamları arasında yer alan geçimini genel olarak tarım ve hayvancılıkla sağlayan kk bir ildir [33]. İl'in yüzölçümü ise 749.00 hektar (7 490 km²)' dir [34]. Tablo 1'de ankırı ilinin arazi dağılımı verilmiştir.

Tablo 1 Çankırı İli'nin arazi dağılımı 2016 [34]

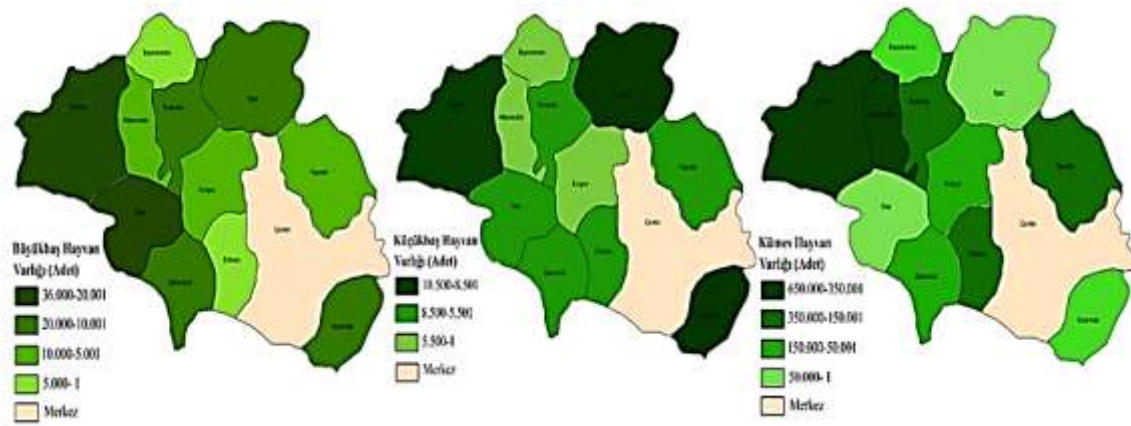
Arazinin Cinsi	Hektar	Yüzdesi (%)
Tarım Alanı	268 580	36
Orman Alanı	192 163	26
Çayır-Mera	149 520	20
Kullanılmayan ve Yerleşim Alanı	138 757	18
Toplam	749 000	100

Çankırı İl'inin arazi dağılımında en fazla payı % 36 ile tarım alanları oluştururken, en az payı % 18 ile kullanılmayan ve yerleşim alanları oluşturmaktadır. Çankırı ilinde ekonominin tarım ve hayvancılığa dayalı olduğunu göstermektedir. Bu durum göz önünde alındığında hayvansal ve bitkisel atık miktarları, kentleşme oranı yüksek olan illere kıyasla kentleşme oranı düşük olan yerlerde daha yüksek olacağı öngörülmektedir.

Yöntem

Çankırı İl'indeki hayvan sayıları ve atık miktarlarının belirlenmesi

Çankırı İl'inin biyogaz enerji potansiyelinin belirlenebilmesi için Çankırı İl'i 2018 yılına ait büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvan varlığı hakkında istatistik bilgileri Biyokütle Enerjisi Potansiyeli Atlası (BEPA)'dan elde edilmiştir. Şekil 2'de Çankırı ilçelerinin büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvan sayılarına göre dağılım haritaları verilmiştir. Ayrıca, Tablo 2'de Çankırı İli'nin ilçelerine ait hayvan sayıları verilmiştir.



Şekil 2 Çankırı İl'ine ait (a) büyükbaş (b) küçükbaş ve (c) kümes hayvan sayısı dağılımı

Tablo 2 Çankırı İl'i hayvan varlığı (2018)

İlçeler	Büyükbaş hayvan varlığı	Küçükbaş hayvan varlığı	Kümes hayvan varlığı	Toplam hayvan varlığı
---------	-------------------------	-------------------------	----------------------	-----------------------

Atkaracalar	5 279	2 320	643 605	651 204
Bayramören	3 550	3 868	5 529	12 947
Eldivan	3 300	8 738	306 821	318 859
Ilgaz	10 150	10 150	2 705	23 005
Korgun	8 932	4 007	54 705	67 644
Kurşunlu	12 367	7 829	255 425	275 621
Kızılırmak	13 480	10 090	11 230	34 800
Orta	25 230	8 440	2 320	35 990
Yapraklı	5 533	6 665	218 447	230 645
Çerkeş	35 404	9 900	643 492	688 796
Şabanözü	12 149	5 677	140 760	158 586
Toplam	135 374	77 684	2 285 039	2 498 097

Tablo 2'ye göre; Çankırı İl'inin ilçeleri arasında büyükbaş hayvan sayısının en fazla olduğu ilçe Çerkeş, küçükbaş hayvan sayısının en fazla olduğu ilçeler Ilgaz, Kızılırmak, Çerkeş ve kümes hayvan sayısının en fazla olduğu ilçe ise Atkaracalar ile Çerkeş'dir. Toplam hayvan varlığı en fazla olan ilçe ise Çerkeş ilçesidir. Şekil 2'de görüleceği gibi toplam hayvan varlığının yüksek olduğu Çerkeş ve Atkaracalar'ın olduğu görülmektedir. Biyogaz üretiminde kullanılacak atık miktarları, her bir ilçe için ayrı ayrı büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvanlarının yıllık atık miktarları kullanılarak hesaplanmıştır.

Hayvansal atıklardan elde edilebilir biyogaz potansiyelinin belirlenmesi

Çankırı İl'i genelinde üretebilecek biyogaz enerji potansiyeli elde edilen hayvansal atık miktarlarından yararlanılarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar yapılırken hayvansal atık türlerinin hayvan türüne göre göstermiş olduğu fiziksel ve kimyasal değişimler göz önüne alınmıştır [35, 36]. Buna göre hesaplamalarda kullanılan büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvanlarının atık türlerine göre kabul edilen özellikleri Tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3 Hayvan atıklarının elde edilecek biyogaz üretimindeki hesaplamalarda büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvanlarının atık türlerine göre kabul edilen özellikleri [35, 36, 41]

Atık Türü	Birim	Büyükbaş Hayvan Atığı	Küçükbaş Hayvan Atığı	Kümes Hayvan Atığı
Bir yılda üretilebilecek toplam atık miktarı (TGM)	ton/yıl	1 034 187.00	82 403.00	72 812.00
Katı Madde Oranı (KMO)	(%)	14.50	30	28
Katı Madde İçindeki Uçucu Madde Oranı (UMO)	(%)	77.5	80	80
Toplanabilir Yaş gübre oranı (FGO)	(%)	100	13	78
Biyogaz Potansiyeli	(m ³ /ton UMO)	250	200	400

Biyogaz enerjisi elde etme sürecinde, materyalin cinsi ve içeriği, kuru madde ve organik madde oranı, partikül büyüklüğü, uçucu madde oranı, organik kuru madde oranı, fermantasyon sıcaklığı, bekleme süresi gibi üretimi etkileyen pek çok parametre vardır. Çankırı İl'i için biyogaz potansiyelinin belirlenmesinde bu parametreler göz önünde bulundurulularak çeşitli hesaplamalar yapılmıştır. Çankırı İl'i için hayvansal atıklardan üretebilecek biyogaz potansiyelinin hesaplanmasında (1-5) numaralı denklemler kullanılmıştır [37, 38].

$$TGM = T_{YG} \times 365 \times \sum HS_i \quad (1)$$

$$T_{YFYG} = TGM \times FGO \quad (2)$$

$$T_{KM} = T_{YFYG} \times KMO \quad (3)$$

$$T_{UMM} = T_{KM} \times UMO \quad (4)$$

$$T_{METAN} = T_{UMM} \times MO \quad (5)$$

T_{YFYG} ; yıllık toplanabilir yaş gübre miktarı (ton/yıl), TGM ; hayvanlar tarafından üretilebilecek yıllık gübre miktarı (ton/yıl), FGO ; toplanabilir faydalı gübre oranı (%), T_{KM} ; toplanabilir faydalı gübre içerisindeki toplam katı madde miktarı (ton/yıl), KMO ; yaş gübre içindeki katı madde oranı, T_{UMM} ; hayvanlar tarafından üretilebilen katı madde içindeki uçucu katı madde miktarı (ton/yıl), UMO ; katı madde içerisindeki uçucu madde oranı, T_{METAN} ; toplanabilir faydalı gübreden elde edilecek toplam yıllık metan miktarı ($m^3 CH_4/yıl$), MO ; 1kg UMO 'den üretilen metan gazı miktarıdır.

Biyogaz üretiminden elde edilebilecek enerji miktarının belirlenmesi

Çankırı İl'i için yıllık hayvansal atık miktarları kullanılarak biyogaz potansiyeli sonucu elde edilebilecek metan gazında üretilebilecek ısı ve elektrik enerjisi miktarları hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar aşağıdaki bağıntılardan yararlanarak belirlenmiştir [39]:

$$Q = T_{METAN} \times Q_{METAN} \quad (6)$$

Metan gazından elde edilecek enerjiler hesaplanırken ortalama % 60 'ı metan gazından oluşan $1 m^3$ biyogazın içerisindeki metan gazının (Q_{METAN}) ısı ve elektrik enerjisi değeri $36 MJ/m^3$ ve elektrik enerjisi miktarı $4.70 kWh$ olarak saptanmıştır [40, 41].

Biyogaz üretimi sonucu oluşan CO₂ emisyonunun belirlenmesi

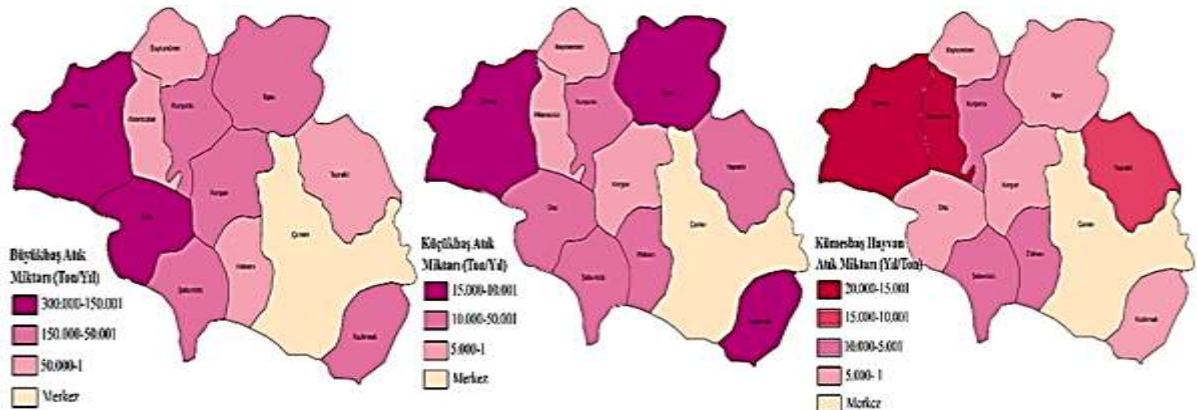
Biyogaz potansiyelleri elektrik enerjisine dönüştürüldüğünde oluşan CO₂ emisyonları ayrı ayrı hesaplanmıştır. Bu hesaplamalarda $1 m^3$ biyogaz için $9.19 kg CO_2$ emisyonu (CO_{2bio}) ve biyogazdan üretilen elektrik (CO_{2e}) ise 0.8 değerleri kabul edilmiştir [40].

Bulgular ve Tartışma

Tablo 4’de hesaplanan büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvanlarına ait yıllık atık miktarları ve toplam atık miktarları gösterilmektedir. Ayrıca Şekil 3’ de, Çankırı ilçelerine göre büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvan atık miktarlarının dağılım haritası verilmiştir.

Tablo 4 Çankırı İl’i yıllık hayvan atık miktarları

İlçeler	Büyükbaş hayvan atık miktarı (ton/yıl)	Küçükbaş hayvan atık miktarı (ton/yıl)	Kümes hayvan atık miktarı (ton/yıl)	Toplam atık miktarı (ton/yıl)
Atkaracalar	43 953	2 537	17 420	63 910.00
Bayramören	24 594	4 035	300	28 929.00
Eldivan	25 294	8 351	8 469	42 114.00
Ilgaz	78 831	11 743	133	90 707.00
Korgun	72 619	3 975	1 519	78 113.00
Kurşunlu	105 453	8 398	7 041	120 892.00
Kızılırmak	88 546	11 575	575	100 696.00
Orta	179 788	9 117	118	189 023.00
Yapraklı	40 164	6 390	11 536	58 090.00
Çerkeş	288 915	10 639	19 048	318 602.00
Şabanözü	860 30	5 643	6 653	98 326.00
Toplam	1 034 187.00	82 403.00	72 812.00	1 189 402.00



Şekil 3. Çankırı ilçelerine göre (a) büyükbaş (b) küçükbaş ve (c) kümes hayvan varlığına bağlı yıllık atık miktarı dağılımı

Çankırı İl'i için büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvanlarından elde edilebilir toplam atık miktarı 1 189 402.00 ton/yıl olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4 ve Şekil 3'e göre, hayvan sayıları ve türlerine bağlı olarak büyükbaş ve kümes hayvanları atık miktarlarının en fazla olduğu ilçe Çerkeş'tir. Küçükbaş hayvan atık potansiyeli en yüksek ilçeler ise Ilgaz ve Kızılırmak'tır.

Hayvansal atıklardan elde edilebilir biyogaz potansiyeli

Büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvan sayılarına göre hesaplanan atık miktarı için, uçucu madde ve metan değerleri ve hesaplanan metan gazı miktarına ait sayısal grafiği ile dağılım haritası sırasıyla Tablo 5 ve Şekil 4 verilmiştir.

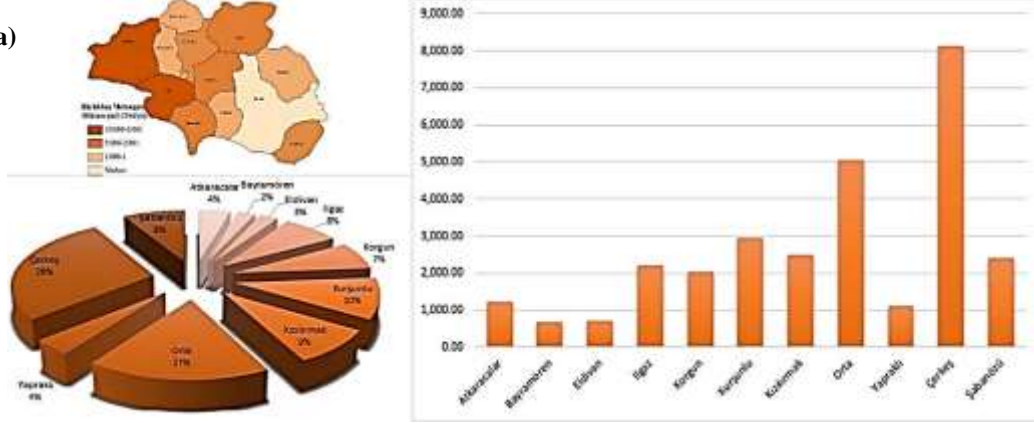
Tablo 5 Hayvan grupları için (a) büyükbaş, (b) küçükbaş, (c) kümes hesaplanan atık ve atık içerisindeki uçucu madde ve metan miktarı gazı değerleri

(a) İlçeler	TGM(ton/yıl)	T _{YFYG} (ton/yıl)	T _{KM} (%)	T _{UMM} (ton/yıl)	T _{METAN} (m ³ CH ₄ /yıl)
Atkaracalar	43 953	43 953	6 373.19	4 939.22	1 234.80
Bayramören	24 594	24 594	3 566.13	2 763.75	690.94
Eldivan	25 294	25 294	3 667.63	2 842.41	710.60
Ilgaz	78 831	78 831	11 430.50	8 858.63	2 214.66
Korgun	72 619	72 619	10 529.76	8 160.56	2 040.14
Kurşunlu	105 453	105 453	15 290.69	11 850.28	2 962.57
Kızılırmak	88 546	88 546	12 839.17	9 950.36	2 487.59
Orta	179 788	179 788	26 069.26	20 203.68	5 050.92
Yapraklı	40 164	40 164	5 823.78	4 513.43	1 128.36
Çerkeş	288 915	288 915	41 892.68	32 466.82	8 116.71
Şabanözü	86 030	86 030	12 474.35	9 667.62	2 416.91
Toplam	1 034 187.00	1 034 187.00	149 957.12	116 216.76	29 054.19

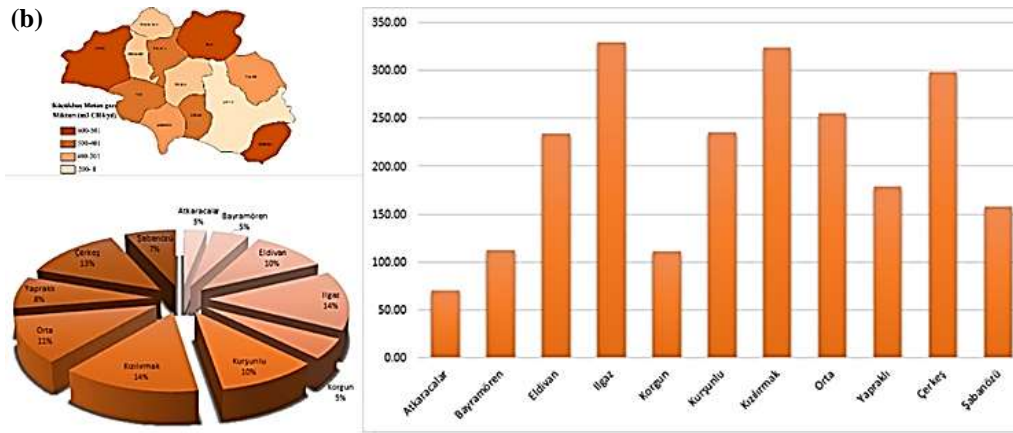
(b) İlçeler	TGM(ton/yıl)	T _{YFYG} (ton/yıl)	T _{KM} (%)	T _{UMM} (ton/yıl)	T _{METAN} (m ³ CH ₄ /yıl)
Atkaracalar	2 537	2 537	367.87	285.10	71.27
Bayramören	4 035	4 035	585.08	453.43	113.36
Eldivan	8 351	8 351	1 210.90	938.44	234.61
Ilgaz	11 743	11 743	1 702.74	1 319.62	329.90
Korgun	3 975	3 975	576.38	446.69	111.67
Kurşunlu	8 398	8 398	1 217.71	943.73	235.93
Kızılırmak	11 575	11 575	1 678.38	1 300.74	325.19
Orta	9 117	9 117	1 321.97	1 024.52	256.13
Yapraklı	6 390	6 390	926.55	718.08	179.52
Çerkeş	10 639	10 639	1 542.66	1 195.56	298.89
Şabanözü	5 643	5 643	818.24	634.13	158.53
Toplam	82 403.00	82 403.00	11 948.44	9 260.04	2 315.01

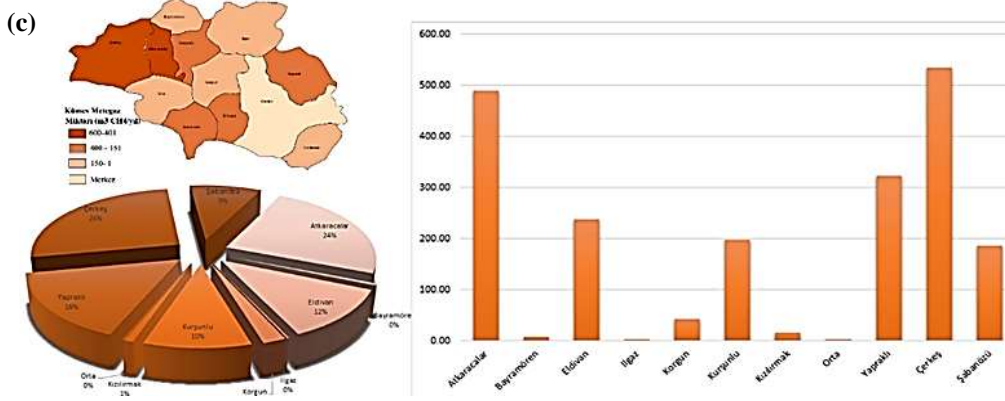
(c) İlçeler	TGM (ton/yıl)	TYFYG (ton/yıl)	T _{KM} (%)	T _{UMM} (ton/yıl)	T _{METAN} (m ³ CH ₄ /yıl)
Atkaracalar	17 420	17 420	2 525.90	1 957.57	489.39
Bayramören	300	300	43.50	33.71	8.43
Eldivan	8 469	8 469	1 228.01	951.70	237.93
Ilgaz	133	133	19.29	14.95	3.74
Korgun	1 519	1 519	220.26	170.70	42.67
Kurşunlu	7 041	7 041	1 020.95	791.23	197.81
Kızılırmak	575	575	83.38	64.62	16.15
Orta	118	118	17.11	13.26	3.32
Yapraklı	11 536	11 536	1 672.72	1 296.36	324.09
Çerkeş	19 048	19 048	2 761.96	2 140.52	535.13
Şabanözü	6 653	6 653	964.69	747.63	186.91
Toplam	72 812.00	72 812.00	10 557.74	8 182.25	2 045.56

(a)



(b)





Şekil 4 Çankırı İl'i için (a) büyükbaş (b) küçükbaş (c) kümes hayvan atıklardan yararlanılarak hesaplanan metan gazı miktarı sayısal grafiği ve dağılım haritası

Tablo 5 (a) ve Şekil 4 (a) incelendiğinde; büyükbaş hayvan varlığı için yıllık faydalı yaş atık miktarının en çok Çerkeş (288 915 ton/yıl), ikinci olarak da Orta (179 788 ton/yıl) ilçesinde tespit edilmiştir. Büyükbaş hayvan varlığı için yıllık metan gazı üretiminin en yüksek olduğu ilçeler sırasıyla Çerkeş (8 116.71 m³ CH₄/yıl), Orta ve Kurşunlu ilçelerinde belirlenmiştir. Büyükbaş hayvan atıklarından elde edilebilecek biyogaz üretiminin en düşük üretim potansiyeline sahip olduğu ilçenin ise Bayramören olduğu görülmüştür. Tablo 5 (b) ve Şekil 4 (b) incelendiğinde; küçükbaş hayvan varlığı için yıllık faydalı yaş atık miktarının en fazla Ilgaz (11 743 ton/yıl), ikinci olarak da Kızılırmak (11 575 ton/yıl) ilçesinde olduğu tespit edilmiştir. Küçükbaş hayvan varlığı için yıllık yaş atık miktarlarından elde edilebilecek yıllık metan gazı üretiminin en yüksek olduğu ilçeler sırasıyla Ilgaz ve Kızılırmak olarak bulunmuştur. Ayrıca, Çerkeş ilçesinde de yıllık metan gazı üretim (298.89 m³ CH₄/yıl) miktarı, Ilgaz ve Kızılırmak ilçelerine çok yakın değerdedir. Küçükbaş hayvan atıklarından biyogaz üretimi için en düşük üretim potansiyeline sahip ilçenin ise Atkaracalar olduğu görülmüştür. Tablo 5 (c) ve Şekil 4 (c) incelendiğinde; kümes hayvan varlığı için yıllık faydalı yaş atık miktarının en fazla Çerkeş (19 048 ton/yıl), Atkaracalar (17 420 ton/yıl) ve Yapraklı (11 536 ton/yıl) ilçelerinde olduğu belirlenmiştir. Kümes hayvan sayısı için yıllık yaş atık miktarlarından yapılan hesaplamalar sonucu; gerçekleştirilecek yıllık metan gazı üretiminin en yüksek olduğu ilçeler sırasıyla Çerkeş ve Atkaracalar olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, Yapraklı ilçesinde de yıllık metan gazı üretim (324.09 m³ CH₄/yıl) miktarı, Çerkeş ve Atkaracalar ilçelerine yakın değerdedir.

Biyogaz üretiminden elde edilebilecek enerji miktarının belirlenmesi

Tablo 6’da Çankırı İl’i hayvansal atık miktarlarından elde edilebilecek metan gazından üretilen ısı ve elektrik enerji değerleri verilmiştir. Ayrıca, Çankırı’nın ilçelere göre hayvan sayılarına ait elektrik enerjisi sayısal grafikleri ve dağılım haritaları verilmiştir (Şekil 5).

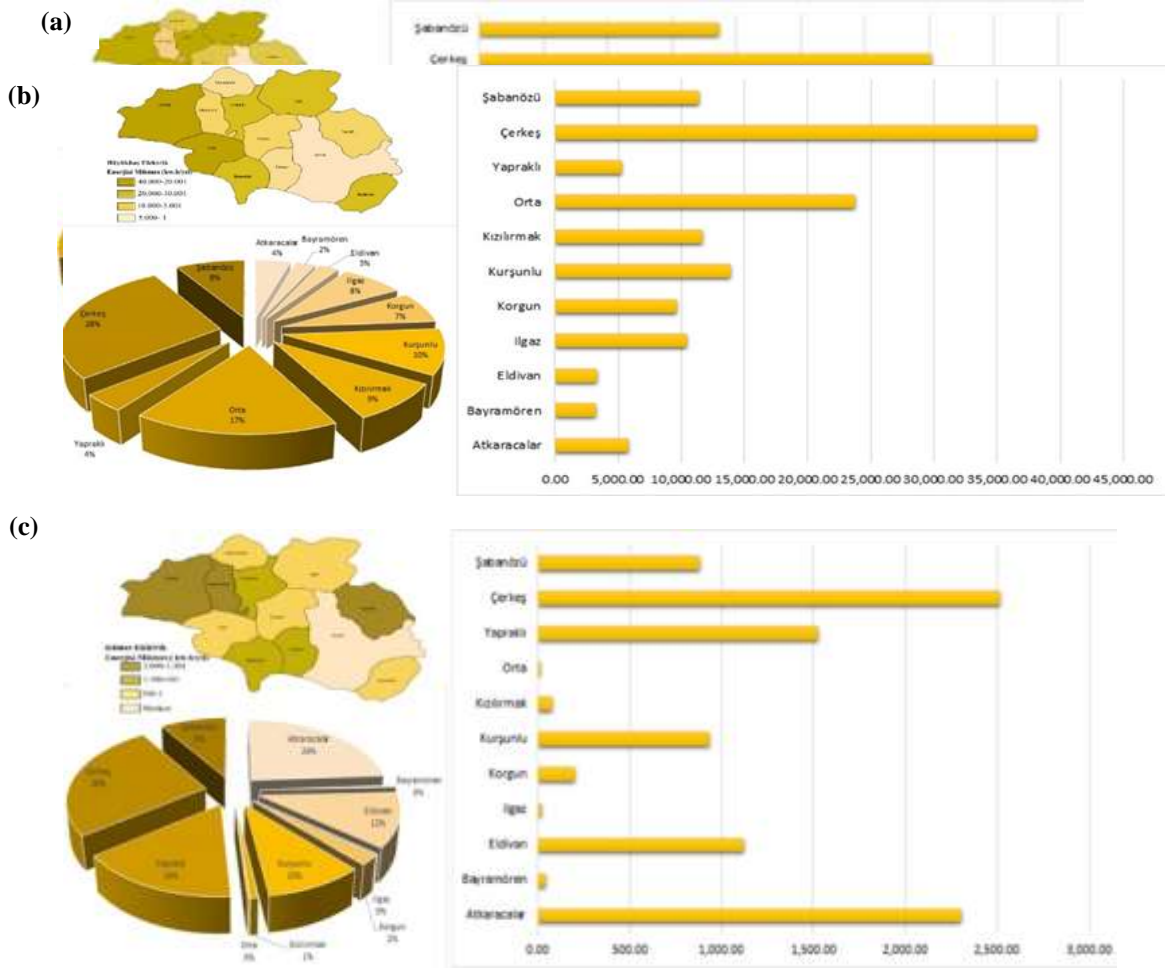
Tablo 6 Hayvan grupları için (a) büyükbaş, (b) küçükbaş, (c) kümes hesaplanan enerji ve gelir değerleri

(a) İlçeler	Q (MJ/yıl)	Elektrik enerjisi (kWh/yıl)	Yıllık elektrik üretimi (kWh/yıl)	Yıllık gelir (TL/yıl)
Atkaracalar	44 452.97	5 803.58	2 089 289.37	710 358.39
Bayramören	24 873.76	3 247.41	1 169 066.57	397 482.63
Eldivan	25 581.72	3 339.84	1 202 340.80	408 795.87
Ilgaz	79 727.70	10 408.89	3 747 202.02	1 274 048.69
Korgun	73 445.04	9 588.66	3 451 916.93	1 173 651.76
Kurşunlu	106 652.53	13 924.08	5 012 668.81	1 704 307.40
Kızılırmak	89 553.21	11 691.67	4 209 000.91	1 431 060.31
Orta	181 833.09	23 739.32	8 546 155.16	2 905 692.75
Yapraklı	40 620.87	5 303.28	1 909 180.68	649 121.43
Çerkeş	292 201.41	38 148.52	13 733 466.18	4 669 378.50
Şabanözü	87 008.59	11 359.45	4 089 403.79	1 390 397.29
Toplam	1 045 950.88	136 554.70	49 159 691.22	16 714 295.02

(b) İlçeler	Q (MJ/yıl)	Elektrik enerjisi kWh/yıl	Yıllık elektrik üretimi (kWh/yıl)	Yıllık gelir (TL/yıl)
Atkaracalar	2 565.86	334.99	120 595.34	41 002.42
Bayramören	4 080.90	532.78	191 802.21	65 212.75
Eldivan	8 445.99	1 102.67	396 961.65	134 966.96
Ilgaz	11 876.58	1 550.55	558 199.10	189 787.69
Korgun	4 020.22	524.86	188 950.13	64 243.05
Kurşunlu	8 493.53	1 108.88	399 195.78	135 726.57
Kızılırmak	11 706.67	1 528.37	550 213.28	187 072.52
Orta	9 220.71	1 203.81	433 373.18	147 346.88
Yapraklı	6 462.69	843.74	303 746.25	103 273.73
Çerkeş	10 760.02	1 404.78	505 720.88	171 945.10
Şabanözü	5 707.19	745.11	268 237.89	91 200.88
Toplam	83 340.33	10 880.54	3 916 995.70	1 331 778.54

(c) İlçeler	Q (MJ/yıl)	Elektrik enerjisi kWh/yıl	Yıllık elektrik üretimi (kWh/yıl)	Yıllık gelir (TL/yıl)
Atkaracalar	17 618.15	2 300.15	828 053.17	281 538.08
Bayramören	303.41	39.61	14 260.39	4 848.53
Eldivan	8 565.33	1 118.25	402 570.74	136 874.05
Ilgaz	134.51	17.56	6 322.11	2 149.52

Korgun	1 536.28	200.57	72 205.10	24 549.73
Kurşunlu	7 121.09	929.70	334 691.29	113 795.04
Kızılırmak	581.54	75.92	27 332.41	9 293.02
Orta	119.34	15.58	5 609.09	1 907.09
Yapraklı	11 667.22	1 523.22	548 359.43	186 442.21
Çerkeş	19 264.67	2 515.11	905 439.54	307 849.44
Şabanözü	6 728.68	878.47	316 247.86	107 524.27
Toplam	73 640.24	9 614.14	3 461 091.12	1 176 770.98



Şekil 5 (a) Büyükbaş (b) Küçükbaş ve (c) Kümes hayvan sayılarına ait elektrik enerjisi sayısal grafikleri ve dağılım haritaları

Metan gazından elde edilebilecek ısı ve elektrik enerjisi hesaplamaları açısından Çerkeş (292 201.41 MJ/yıl-38 148.52 kWh/yıl) ve Orta ilçesinin en fazla olduğu görülmüştür. Büyükbaş hayvan atıklarından üretilebilecek enerji değerlerinin en az Bayramören ve Eldivan ilçesinde olduğu tespit edilmiştir. Küçükbaş hayvan atıklarından en yüksek enerji potansiyellerinin Çerkeş, Ilgaz ve Kızılırmak olduğu bulunmuştur. Küçükbaş hayvan atıklarından üretilebilecek enerji değerlerinin en az Atkaracalar ilçesinde olduğu

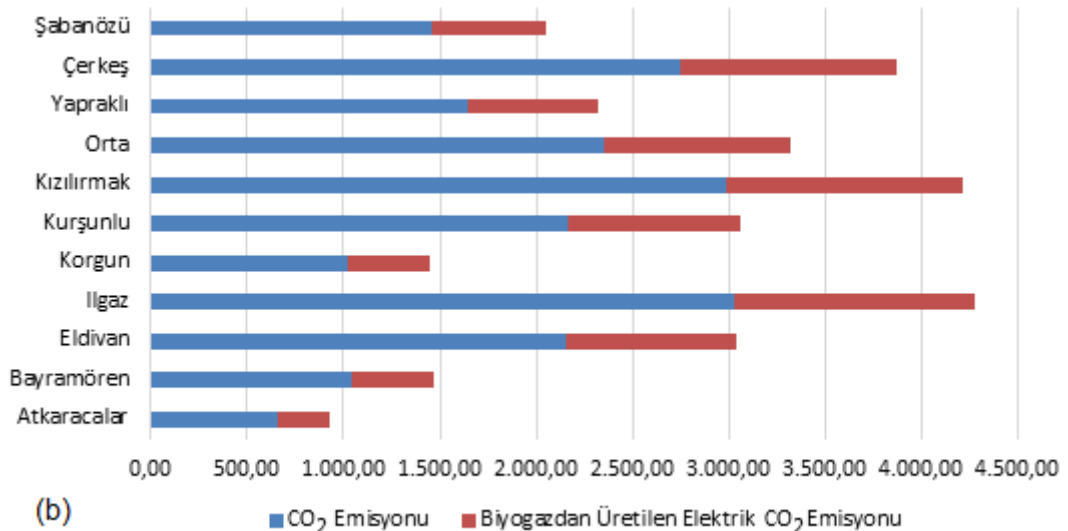
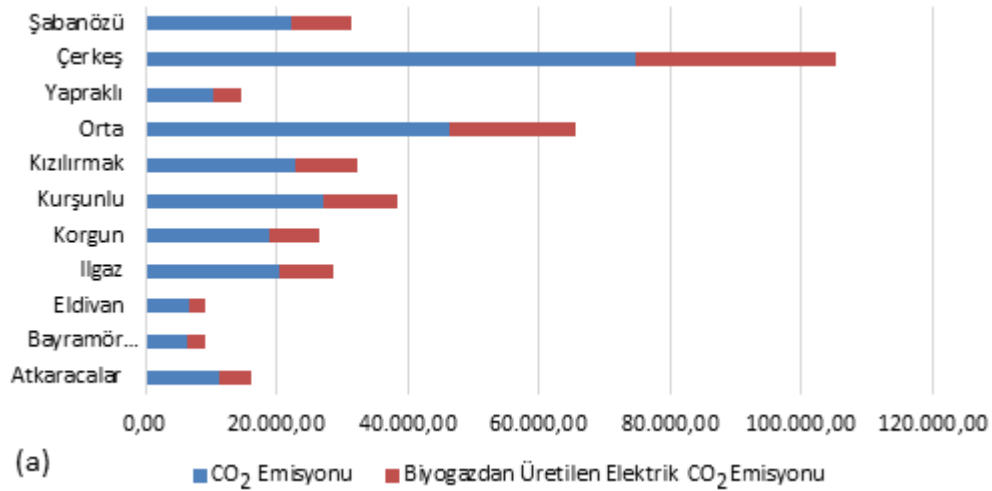
tespit edilmiştir. Kümes hayvan atıklarında enerji potansiyelinin en yüksek olduğu ilçeler; Çerkeş ve Atkaracalar iken, en az ise Ilgaz'dır.

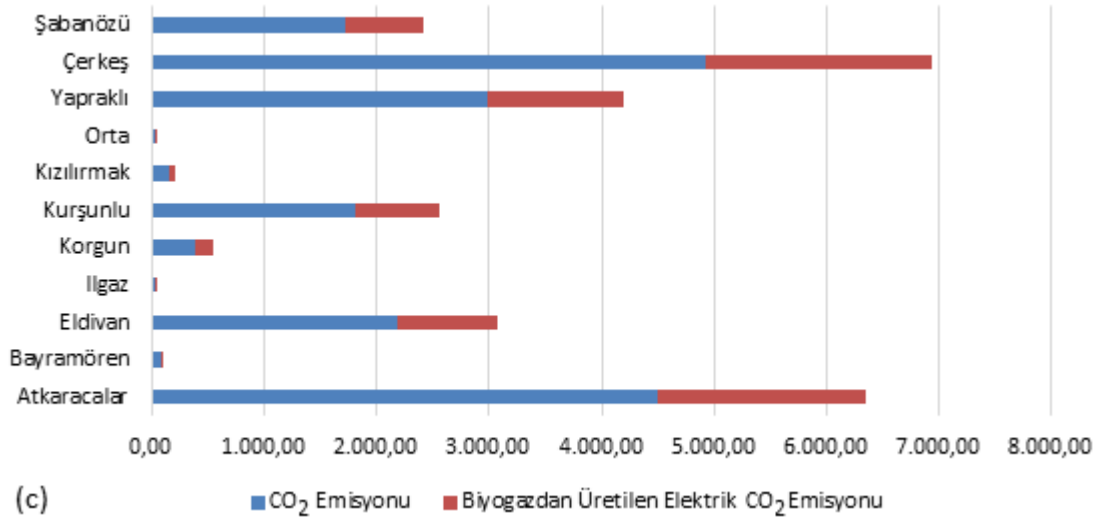
Biyogazdan elde edilecek yıllık elektrik üretimi potansiyeli hesaplanırken 1m³ biyogaz için elektrik enerjisi olarak alınmıştır (4.70 kWh). Ayrıca, yıllık biyogazdan üretilecek elektrikten elde edilecek gelir hesabında mesken için 1kWh elektrik için 0.3496 TL olarak hesaplanmıştır. Yapılan hesaplamalar Tablo 6'de verilmektedir.

Biyogazdan elde edilebilecek yıllık elektrik üretimi potansiyeli 56 537 778 kWh olarak hesaplanmıştır. Yıllık potansiyelin en yüksek olduğu ilçe Çerkeş en düşük olduğu ilçe ise Bayramören'dir. Çankırı İl'i yıllık elektrik üretiminde kullanılan kaynak dağılımları güneş enerjisi % 40.8, HES % 23.3, Kömür % 35.9 şeklindedir. Bu dağılımda biyogaz enerjisi yoktur.

Biyogaz üretimi sonucu oluşan CO₂ emisyonunun belirlenmesi

Çankırı İl'indeki hayvansal atıklardan oluşan CO₂ emisyon hesaplamaları Tablo 7'de verilmiştir. Ayrıca, Şekil 6'da ilçelerdeki CO₂ emisyonunun değişim değerleri verilmiştir. Şekil 6'da biyogazdan elektrik üretimi ile hayvansal atıklardan oluşacak CO₂ emisyonu değerlerinin ciddi oranda azaltılabileceği görülmektedir.





Şekil 6 Çankırı İl'i (a) büyükbaş (b) küçükbaş (c) kümes hayvan atıklarından elde edilen biyogaz üretimi için CO₂ emisyonu değişimi

Tablo 7 Çankırı İl'indeki hayvansal atıklardan oluşan CO₂ emisyonu değerleri

İlçeler	Büyükbaş hayvan		Küçükbaş hayvan		Kümes hayvanı	
	CO ₂ bio	CO ₂ e	CO ₂ bio	CO ₂ e	CO ₂ bio	CO ₂ e
Atkaracalar	11 347.85	4 642.87	655.01	267.99	4 497.52	1 840.12
Bayramören	6 349.72	2 597.93	1 041.76	426.23	77.45	31.69
Eldivan	6 530.44	2 671.87	2 156.07	882.14	2 186.54	894.60
Ilgaz	20 352.71	8 327.12	3 031.83	1 240.44	34.34	14.05
Korgun	18 748.89	7 670.93	1 026.27	419.89	392.18	160.46
Kurşunlu	27 226.02	11 139.26	2 168.21	887.10	1 817.86	743.76
Kızılırmak	22 860.94	9 353.34	2 988.45	1 222.70	148.45	60.74
Orta	46 417.95	18 991.46	2 353.84	963.05	30.47	12.46
Yapraklı	10 369.60	4 242.62	1 649.78	674.99	2 978.38	1 218.58
Çerkeş	74 592.53	30 518.81	2 746.79	1 123.82	4 917.84	2 012.09
Şabanözü	22 211.36	9 087.56	1 456.92	596.08	1 717.68	702.77
Toplam	267 008.02	109 243.76	21 274.94	8 704.43	18 798.72	7 691.31

Tablo 7 incelendiğinde, hayvansal atıkların biyogaz üretiminde oluşturacağı yıllık toplam CO₂bio emisyon değeri 307081.68'dir. Bu atıklar sadece biyogaz üretimde kullanıldığında toplam CO₂bio emisyon değeri kadar sera gazı etkisi yaratacağı tespit edilmiştir. Fakat bu atıklar biyogaz üretiminde değerlendirilerek elektrik enerjisine

dönüştürülürse yıllık toplam 125639.5'lık CO_{2e} elektrik enerjisi elde edilebileceği görülmüştür. Bu hesaplamalar hayvansal atıkların elektrik enerjisinde kullanıldığında Çankırı İl'inde oluşturacağı karbon emisyonunun % 40 azaltılabileceğini göstermiştir.

Sonuç ve Öneriler

Biyogaz üretiminin yapılabilmesi için dikkat edilmesi gereken en önemli husus biyogaz tesislerinin tasarımı ve kurulacak lokasyonun belirlenmesidir. Diğer önemli bir husus ise tesisin kurulduğu yerin bölgesel olarak depolanmaya, taşıma ve dağıtımına elverişli olmasıdır. Çankırı ili batıya en yakın olmasından dolayı avantajlı olup, devletten en fazla destek alan ve coğrafi konum olarak ulaşım, güvenlik ve birçok alanda diğer iller içerisinde ön plana çıkmaktadır. Bu sebeple, çalışmamızda alternatif enerji kaynaklarından biyokütle enerji yatırımları için Çankırı ilinin elverişliliği ve uygulanabilirliği araştırılmıştır. Bu çalışmada Çankırı ilinde oluşan hayvan atıklarından yararlanılarak üretebilecek biyogaz enerji miktarı, enerjinin ısı ve elektrik olarak karşılığı hesaplanmıştır. Ayrıca, biyogaz üretiminden elde edilecek yıllık gelir ve CO₂ emisyonu belirlenmiştir.

Bu analiz ve hesaplamalar sonunda elde edilen sonuçlar şunlardır:

- Büyükbaş hayvan atıklarından elde edilebilecek biyogaz üretimi için en yüksek potansiyele sahip ilçenin Çerkeş, küçükbaş hayvanlar için Çerkeş, Orta ve Kurşunlu, kümes hayvanları için ise Çerkeş ve Atkaracalar olduğu sayısal olarak (33 414.76 m³ CH₄/yıl) tespit edilmiştir.
- İlçeler arasında biyogaz üretim potansiyeli büyükbaş, küçükbaş ve kümes hayvan atıklarının her üçü içinde elverişli olan ve biyogazın kullanılabilirliği (8 950.73 m³ CH₄/yıl) en iyi olacak ilçe Çerkeş'dir.
- Biyogaz üretiminden elde edilen elektrik ile yıllık elektrik tüketiminin 56 537 778.04 kWh/yıl karşılanabileceği tespit edilmiştir.
- Biyogaz üretimi sırasında açığa çıkan CO₂ emisyonunun % 41 oranında azalacağı tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın sonuçlarından yararlanarak Çankırı ili öneriler ise;

- Biyogazın üretilmesi ve kullanılması Çankırı ili ekonomik kazanç ve istihdam sağlayabileceği,
- Biyogaz ile elektrik üretimi gerçekleştirilerek çevresel kirliliğe yol açan CO₂ emisyonunu azaltılabileceği,

- Kurulacak biyogaz üretim tesisleri, Çankırı ili için hayvancılığın gelişmesini ve sürdürülmesini teşvik edebileceği,

- Enerji bağımlılığını azaltmaya katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, Çerkeş ve Atkaracalar ilçeleri, coğrafi özellikleri, ulaşım olanakları hayvansal atıklardan elde edilecek biyogaz üretimi ve kullanılabilirliği açısından Çankırı İl'i için en elverişli bir bölgedir. Çankırı İl'i için başta bu ilçeler olmak üzere biyogaz üretimi teşvik edilmelidir.

Kaynaklar

1. W. Choia., et al ., Greenhouse gas emissions of conventional and alternative vehicles: Predictions based on energy policy analysis in South Korea, *Applied Energy*, 2020. 2651 : p. 114754.
2. C. A. Simona, and M. C. Moltz, Going native? Examining nativity and public opinion of environment, alternative energy, and science policy expenditures in the United States , *Energy Research & Social Science*, 2018. 46: p. 296-302.
3. D. Yang., et al., Sectoral energy-carbon nexus and low-carbon policy alternatives: A case study of Ningbo, *China Journal of Cleaner Production*, 2017. 15610: p.480-490.
4. T. Hui Oh., et al., Energy policy and alternative energy in Malaysia: Issues and challenges for sustainable growth – An update *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018. 81: p. 3021-3031.
5. K. Steinbacher and S. Röhrkasten, An outlook on Germany's international energy transition policy in the years to come: Solid foundations and new challenges, *Energy Research & Social Science*, 2019. 49: p. 204-208.
6. I. T Santos, Confronting governance challenges of the resource nexus through reflexivity: A cross-case comparison of biofuels policies in Germany and Brazil *Energy Research & Social Science*, 2020. 65:p.101464.
7. Tasova, M. and I. Naneli, Bolu ve Tokat İllerindeki Buğday Sap Atıklarının Enerji Potansiyel Değerlerinin Karşılaştırmalı Teorik Analizi. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2019. 2(3): p. 136-144.
8. C. Stagnaro., et al., Managing the liberalization of Italy's retail electricity market: A policy proposal *Energy Policy*, 2020.137: p. 111150.
9. K. Hofman, and X. Li, Canada's energy perspectives and policies for sustainable development, *Applied Energy*, 2009. 86:p. 407-415..
10. I. Kyprianoua., et al., Energy poverty policies and measures in 5 EU countries: A comparative study, *Energy and Buildings*, 2019. 1961: p. 46-60.
11. K.J.Chua., et al ., Achieving better energy-efficient air conditioning – A review of technologies and strategies, *Applied Energy*, 2013. 104: p. 87-104.
12. S. Safarzadeh., et al., A review of optimal energy policy instruments on industrial energy efficiency programs, rebound effects, and government policies, *Energy Policy*, 2020. 139: p. 111342.
13. J.Yan., et al ., Efficient and affordable energy for a sustainable future, *Applied Energy* 2017.185 (2): p. 953-962.
14. Stefan Frank., et al ., Dynamics of the land use, land use change, and forestry sink in the European Union: the impacts of energy and climate targets for 2030, *Climatic Change*, 2016. 138: p. 253–266.

15. N. S. Bentsen, D. Nilsson, and S. Larsen, Agricultural residues for energy - A case study on the influence of resource availability, economy and policy on the use of straw for energy in Denmark and Sweden, *Biomass and Bioenergy*, 2018. 108: p. 278-288.
16. E.C. Pischke ., et al ., From Kyoto to Paris: Measuring renewable energy policy regimes in Argentina, Brazil, Canada, Mexico and the United States, *Energy Research & Social Science*, 2019. 50: p. 82-91.
17. S. Akerboom., et al ., Meeting goals of sustainability policy: CO2 emission reduction, cost-effectiveness and societal acceptance. An analysis of the proposal to phase-out coal in the Netherlands *Energy Policy*, 2020. 138: p. 111210.
18. R. A. Al-Masri, J. Chenoweth, and R. J. Murphy, Exploring the Status Quo of Water-Energy Nexus Policies and Governance in Jordan, *Environmental Science & Policy*, 2019. 100: p. 192-204.
19. K. Hansen, B.V. Mathiesen, and I. R Skov, Full energy system transition towards 100% renewable energy in Germany in 2050, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2019. 102: p. 1-13.
20. J. Blazejczak., et al ., Economic effects of renewable energy expansion: A model-based analysis for Germany, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2014. 40: p. 1070-1080.
21. S. Safarzadeh, M. Rasti-Barzoki, and S.R Hejazi, A review of optimal energy policy instruments on industrial energy efficiency programs, rebound effects, and government policies, *Energy Policy*, 2020. 139: p. 111342.
22. K. Barış, and S. Kucukali, Availability of renewable energy sources in Turkey: Current situation, potential, government policies and the EU perspective, *Energy Policy*, 2012. 42: p. 377-391.
23. K. Baris, The role of coal in energy policy and sustainable development of Turkey: Is it compatible to the EU energy policy?, *Energy Policy*, 2011. 39: p. 1754–1763.
24. O.G. Austvik, and G. Rzayeva, Turkey in the geopolitics of energy, *Energy Policy*, 2017. 107: p. 539-547.
25. I. Yüksel, Energy production and sustainable energy policies in Turkey, *Renewable Energy*, 2010. 35(7): p. 469-1476.
26. B. Hacisalihoglu, Turkey's natural gas policy, *Energy Policy*, 2008. 36 (6): p. 1867-1872.
27. E. Kulińska, and M. Dendera – Gruszka, Green cities – problems and solutions in Turkey, *Transportation Research Procedia*, 2019. 39: p. 242-251.
28. S. Oksay, and E. Iseri, A new energy paradigm for Turkey: A political risk-inclusive cost analysis for sustainable energy, *Energy Policy*, 2011. 39 (5):p. 2386-2395.
29. K. Kaygusuz, Sustainable energy, environmental and agricultural policies in Turkey *Energy Conversion and Management*, 2010. 51 (5): p. 1075-1084.
30. M. Ozturk, Y. E. Yuksel, and N. Ozek, A Bridge between East and West: Turkey's natural gas policy *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2011. 15 (9): p. 4286-4294.
31. M. Acaroğlu, Biyokütle enerjisinin global potansiyeli, Biyokütle enerji politikaları, Avrupa Birliği ve Türkiye I. Ege Sempozyumu ve Sergisi, Denizli, Türkiye, 22-13 Mayıs 2003.
32. F. T. Özbaşer, Biyogaz Üretimi ve Kullanımı, *Lalahan Hay. Araşt. Enst. Derg.* 2013. 53 (2): p. 115-124.
33. Çankırı Belediyesi. *Coğrafi yapı*, <http://www.cankiri.bel.tr/sayfa-16/cografya-yapi.php>
34. Çankırı İl Gıda Tarım ve Hayvancılık Müdürlüğü, 2016 Çalışma Raporu, p. 24
35. Bahtiyar Ö., Emin O., Temmuz, 2008, Membran yöntemiyle biyogazdan karbondioksitin ayrıştırılması ve metan saflaştırma projesi, PROJE NO: 105Y084
36. Nagamani, B. and Ramasamy, K., Biogas production technology: An Indian perspective. <http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles13.htm>
37. C. Karaca, ve M. Eşgünoğlu, Türkiye'nin 2023 Yılı Yenilenebilir Enerji Yatırım Hedeflerinin İşsizliğe Etkisi, *Icomep 2016 | 26-27 October | İstanbul, Turkey.*
38. BEPA. <https://bepa.enerji.gov.tr/>

39. Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı, <http://www.eigm.gov.tr/tr-TR/Denge-Tablolari/Denge-Tablolari>
40. C. İlkiliç, H. Deviren, Biyogazın Üretimi ve Üretimi Etkileyen Faktörler, 6. Uluslararası İleri teknolojiler Sempozyumu, 16-18 Mayıs 2011, Elazığ, Turkey
41. H. Yağlı, Y. Koç, Hayvan Gübresinden Biyogaz Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi:Adana İli Örnek Hesaplama, Çkurova Üniversitesi Mühendislik Mimarlık Fakültesi Dergisi, 2019. 34 (3): p. 35-48.

Özmen, K. and Kenanoğlu, B.B. Farklı Priming Uygulamalarının Patlıcan (*Solanum melongena* L.) Çeşitlerinin Tohumları Üzerindeki Etkinliği. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2020. 3(3). p. 342-360. DOI: 10.38001/ijlsb.798333

Farklı Priming Uygulamalarının Patlıcan (*Solanum melongena* L.) Çeşitlerinin Tohumları Üzerindeki Etkinliği

Kübra Özmen^{1*} , Burcu Begüm Kenanoğlu² 

ÖZET

Bu çalışmada, farklı patlıcan çeşitlerine ait tohumların hidropriming (HP), ozmopriming (OP) ve termopriming (TP) uygulamalarının tohum çimlenme kalitesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Manisa kır çizgili (MKÇ), Kemer 27 (K) ve Aydın Siyahı (AS) çeşitlerinin farklı olgunluk seviyelerinde hasat edilen (çiçeklenmeden sonraki 50, 55, 60 ve 75 gün sonra) patlıcan tohumları 35 °C’de 4 ve 8 saat (2 ve 4 sa aydınlık, karanlık) süre boyunca, %10’luk PEG-6000 ile OP, 35 °C’de 4 ve 8 saat (2 ve 4 sa aydınlık, karanlık) sürede saf su ile HP ve 50°C’de 2 farklı sürede (15 ve 30 dakika) su banyosunda TP işlemlerine tabi tutulmuştur. İncelenen parametreler ile priming olumlu etkisinin tohumların olgunluğu ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bağımlı değişkenler olan normal ve toplam çimlenme parametrelerinde priming, çeşit, olgunluk ve interaksyonları istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar barındırmaktadır ($p<0.01$). Kök ve sürgün uzunluk ölçüm sonuçları özellikle çeşitxolgunluk interaksyonu bakımından ortalamalar arası farklılıklar ($p<0.01$) istatistiksel açıdan çok önemli bulunmuştur. AS çeşidinin 75.gün hasatlarına ait tohumlar, TP-15 dak ile kontrol tohumlarından %10 daha fazla çimlenme oranı göstermiştir. MKÇ 60.gün hasadının tohumlarında OP-4sa (%92) ve HP-4sa (%81) kontrol (%76) tohumlarına göre çimlenme üzerine daha olumlu etki yapmıştır. K çeşidi 60.gün hasadının tohumları ise, TP-30 dak uygulaması ile kontrolden yaklaşık %30 daha fazla çimlenmiştir. Tüm çeşitlerde özellikle olgun tohumlarda (60-75. gün hasat) kök ve sürgün uzunlukları TP ile kontrole göre daha fazla gelişim göstermiştir. Ayrıca OP ve HP uygulamalarının tohumlarında ilk nem kapsamlarında özellikle ham dönemde (50-55.gün hasat) daha fazla değişkenlik sağladığı belirlenmiştir. Patlıcan tohumlarında ekim öncesi uygulama olarak termopriming, kimyasal uygulamalara nazaran olumlu bir alternatif olarak sonuç vermiştir.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

22 Eylül 2020

Kabul

27 Ekim 2020

ANAHTAR

KELİMELELER

Solanum melongena L.
hidropriming,
ozmopriming,
termopriming,
çimlenme oranı

¹ Sciences Institute, Agriculture Sciences Department, University of Uşak

² Department of Horticulture, Agriculture faculty, University of Uşak, Uşak / Turkey

*Corresponding Author: Burcu Begüm Kenanoğlu, e-mail: burcu.kenanoglu@usak.edu.tr

The Effectiveness of Different Priming Treatments on the Seeds of Eggplant (*Solanum melongena* L.) Varieties

ABSTRACT

In this research, the effects of hidropriming (HP), ozmopriming (OP) and thermopriming (TP) treatments on seed germination quality in different aubergine varieties seeds were investigated. Aubergine cvs. Manisa Kır Çizgili (MKÇ), Kemer 27 (K) and Aydın Siyahı (AS) seeds which harvested at different maturity levels (50, 55, 60 and 75 days after flowering) were subjected to OP at 35 °C for 4 and 8 hours (2 and 4 h dark-light) with 10% PEG-6000 solution, HP at 35 °C (2 and 4 h dark-light) for 4 and 8 hours with distilled water and TP were applied in water bath for different times (15 and 30 min.) at 50 °C. With all parameters; it was seen that the priming positive effect was related to the maturity of the seeds. It was found statistically significant differences in priming, variety, maturity and their interactions in normal and total germination parameters, which are dependent variables ($p < 0.01$). The differences between the means ($p < 0.001$) of the measurement results of root and shoot lengths, especially in terms of variety x maturity interaction, are statistically significant. 75.day seeds of the AS variety germinated 10% more than the control seeds with TP-15 min. OP-4sa (92%) and HP-4sa (81%) had a more positive effect on germination than control (76%) seeds in the seeds of MKÇ 60. day harvest. The seeds of the K variety 60. day germinated approximately 30% more than the control with TP-30 min treatments. In all varieties, especially in mature seeds (60-75. day), root and shoot lengths showed more development with TP than control. It has been determined that OP and HP provide more variability in the initial moisture content of seeds, especially in the immature period (50-55. day). Thermopriming, as a pre-sowing treatments in aubergine seeds, has yielded results as a positive alternative to chemical treatments.

ARTICLE HISTORY

Received

22 September 2020

Accepted

27 October 2020

KEY WORDS

Solanum melongena L.
hidropriming,
ozmopriming,
thermopriming,
germination percentage

Giriş

Patlıcan, *Solanaceae* familyasına ait olup, anavatanı Hindistan-Burma ve Assam olduğu bilinmektedir. Dünya ve Türkiye’de sebze yetiştiriciliği ele alındığında; patlıcan (*Solanum melongena* L.) en çok üretilen, tüketilen ve ekonomik açıdan en yüksek olan türler arasında yer almaktadır [1]. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) verilerine göre, 2018 yılı dünya patlıcan üretimi 29 milyon tondur [2]. İstatistiklere göre; ülkemizde 2019 yılında 30 milyon ton sebze üretimi yapılırken, bunun 822659 tonunda patlıcan üretimi yapılmıştır [3].

Tohumluk üretim periyodunda, tohum kalitesi üzerine etki eden çevresel etmenler, kültürel işlemler ve tohum hasat olgunluğu gibi faktörler kalite açısından üzerinde durulması gerekli unsurlardır [4]. En önemlisi ise, tohum hasat olgunluğunun doğru belirlenmesidir. Erken hasat ya da geç hasatlar sonucu yağmur, kuraklık ve don gibi faktörlere de bağlı olarak düşük çimlenme ve tohum gücü ile karşı karşıya kalınacağı ifade edilmiştir [5]. Döllenmeden sonra tohum gelişimi üç farklı dönemde

tamamlanmaktadır. Döllenme sonrası ilk gelişme döneminde hızlı hücre büyümesi ve farklılaşması sonucu tohumun yaş ağırlık ve nem içeriğinde artış gerçekleşmektedir. Ardından depo maddelerinin sentezi ve depolanması ile tohumda kuru ağırlık hızla artış gösterir ve yaş ağırlık sabit kalmaktadır [6]. Tohum nem içeriğinin azalması ile suyun yerini suda erimeyen depo rezervleri alır. Tohum gelişimi devam ederken, son dönem kuruma dönemidir. Bu dönemde kuru ağırlık azda olsa artarak yaş ağırlık ile neredeyse aynı seviyeye ulaşır. Bu gelişme ve olgunlaşma döneminde, tohumda olgunlaşma tamamlanmadan çimlenme özelliği kazanabildiği belirtilmiştir. Gelişimin ilk dönemlerinde hasat edilen ve etrafındaki dokularından ayrılan ve çimlenme ortamına konulan embriyoda çimlenme görülebilmektedir [6]. Tohum üretiminde hasat genellikle çiçeklenmeden 60-70 gün sonra, yani meyve botanik olgunluğa ulaştığında ve meyve rengi kahverengileşince başlamaktadır. Genelde meyvenin içindeki tohumun, döllenmeden 50-55 gün sonra tamamen olgunlaştığı belirlenmiştir [7]. Meyve gelişimi ve olgunlaşması sırasında bitkideki meyveler arasında rekabet oluşur ve tohum boyutunda azalma görülmektedir [8,9]. Bu nedenle, antesisden sonra mümkün olan en erken zamanda hasat yapabilmesi ve bu tarihten sonra bitkide meyve tutmaması tohum üreticisi için bir avantaj olacaktır. Patlıcan klimakterik olmayan bir tür olmasına ve meyveler hasattan sonra olgunlaşmamasına rağmen, hasat edilen meyvenin içindeki tohumlar gelişmeye ve olgunlaşmaya devam ederek daha iyi çimlenmeye yol açabilmektedir. Patlıcan, klimakterik olmayan bir meyvedir ve bu nedenle olgunlaşma etilene maruz kalmasıyla indüklenemez [10]. Tohumların hasat edilen meyvenin içinde dolumu ve olgunlaşmaya devam etmesi, tohum gelişiminin meyve olgunlaşmasından bağımsız olarak gerçekleştiğini göstermektedir [7].

Çimlenme süreci daha zor ve uzun sürede gerçekleşen bazı sebze tohumları ekim sonrası ortamda hem çevre kaynaklı stres faktörleri, hem de tohum kalitesinden kaynaklanan olumsuz nedenlerle geç ve düzensiz çimlenmekte yada çimlenememektedir. Bu gibi olumsuz koşullarda ekilen tohumların çimlenme oranları düşük olup, fide gelişimi ve verim de azalmaktadır. Bu durum ekim öncesinde tohum canlılığı ve gücünü arttırma amaçlı çalışmaların önemini daha da arttırmaktadır [11].

Tohumlarda uygulanan priming (ön uygulama) işlemleri birçok türde çimlenme performansını iyileştirmektedir. Tohum çimlenmesinin hızını ve senkronizasyonunu arttırmak için çeşitli ön hidrasyon veya priming işlemleri birçok araştırmacı tarafından

kullanılmıştır [12,13]. Priming, ön çimlenme safhasında metabolik aktivitelerin ilerlemesine izin veren ancak kök oluşumunu önleyen kontrollü bir hidrasyon sürecidir [14]. Priming sonrası tohumlar kurutulduğunda, çimlenme oranı artarak ve bazı durumlarda çimlenmenin meydana gelebileceği sıcaklık aralığı genişlemektedir [15]. Priming, kökün ortaya çıkışından önce çimlenme öncesi metabolik aktiviteyi modüle ederek fide gelişimini etkilemek ve genellikle çimlenme oranını ve bitki performansını artırmak için ekim öncesi kullanılan bir strateji olarak da tanımlanmaktadır [16]. Hidrasyon uygulamalarının faydaları; saklama koşulları [17], uygulama türü [18], uygulama süresi [19] ve uygulama öncesi tohum kalitesi gibi farklı faktörlerle ilişkilendirilmiştir [20]. Patlıcan tohumlarının depolanma süresi kısadır, bu periyotta yavaş ve düzensiz bir şekilde çimlenme göstermektedir. Maksimum depo ömrü elde etme konusunda hasat zamanı kritik önem taşımaktadır. Priming (kontrollü hidrasyon) işlemlerinin tohum çimlenmesi ve uzun ömürlü olması üzerindeki yararlı etkileri, çok çeşitli türler için rapor edilmiştir [21]. Priming sırasında tohumlar kısmen hidrasyona uğrar, böylece çimlenme öncesi metabolik faaliyetler devam ederken, kökçük çıkışı önlenir ve ardından orijinal nem seviyesine kadar kurutulur [22]. Harris vd. (1999), tarla ekimlerinde priming (tohumları bir gecede suda bekletme) pirinç, mısır ve nohutun çimlenmesini ve erken fide gelişimini önemli ölçüde iyileştirdiğini ve bunun daha hızlı gelişme, daha erken çiçeklenme ve olgunluk sonucu daha yüksek verimle sonuçlandığını göstermiştir [23]. Argerich ve Bradford (1989)'a göre, priming yapılmış tohumların içinde oluşan boşluk ile su alımını kolaylaştırarak çimlenme oranını hızlandırabilmektedir [24]. Priming sırasında embriyo genişler ve endospermi sıkıştırır. Embriyonun kompresyon kuvveti ve endosperm hücre duvarları üzerindeki hidrolitik faaliyetler, dehidrasyon ile esnekliğini yitirmiş dokuları deforme ederek boş alan oluşturarak rehidrasyon sonrası kök çıkışı kolaylaştırabilir [25,26]. Priming etkileri, nükleik asitlerin onarımı ve oluşumu, protein sentezinin artması ve zarların onarımı ile ilişkilidir [27].

Priming ayrıca uygulama görmüş tohumlarda anti-oksidatif enzimlerin aktivitelerini de artırır [28,29]. Ayrıca, priming hazırlanmış acı kabak (*Momordica charantia*) tohumlarında gliksizom enzimlerinin aktivitesini artırır [30]. Daha önceki çalışmalar, priming başarısının, bitki türleri de dahil olmak üzere birçok faktörün (priming ajanının su potansiyeli, priming süresi, sıcaklık, tohum gücü ve priming yapılan tohumların depo

koşulları) interaksiyonundan etkilendiğini göstermiştir [22]. Çeşitli ürünlerin çimlenmesini ve fide büyümesini iyileştirmek amacıyla, tohumlarda ön koşullandırma için kurutma, priming, tohum ıslatma ve tohum kaplama dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar kullanılmıştır [31]. Günümüzde hidropriming (suda ıslatma), halopriming (inorganik tuz solüsyonlarında ıslatma), ozmopriming (farklı organik osmotik solüsyonlarda ıslatma), termopriming (tohumların düşük veya yüksek sıcaklıklara maruz bırakılması), katı matris priming (tohumun katı matris ortamda işlenmesi) ve biyopriming (biyolojik bileşikler kullanılarak hidrasyon) gibi alternatif uygulamalar mevcuttur [11]. Normal ve stres koşulları altında çoğu türde çimlenmeyi, fide büyümesini ve verimi hızlandırmak için ozmopriming, hidropriming, matrikspriming, hormonal priming gibi tohum işlemleri uygulanmıştır [31]. Ozmopriming, tohumların havalandırılmış düşük su potansiyeli olan solüsyonunda ıslatıldığı en yaygın tohum ön uygulama türüdür [32]. Tohum hazırlama işlemlerinin mekanizması tam olarak anlaşılmamış olmakla birlikte, tohum işlemleri sırasında tohumların ekimden önce çimlenme dizilerine başlamasına izin verebilecek fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklerin gerçekleştiği gözlemlenmiştir.

Hidropriming, tohumlarda hidrasyon yapmak ve kimyasalların kullanımını en aza indirmek için en basit yaklaşımdır. Bununla birlikte, tohumlarda hidrasyon doğru bir şekilde yapılmazsa, hidrasyon hızı tam olarak kontrol edilemez. Hidropriming uygulamasının, düşük anormal fide yüzdesi ile birlikte hızlı ve tekdüze çimlenmeyi pratik olarak sağladığı görülmüştür [33]. Hidropriming uygulamasının tarla çıkışını iyileştirmede yüksek potansiyele sahip olduğu ve özellikle kuru alanlarda stres koşullarında erken çiçeklenme ve hasat sağladığı bilinmektedir. Tuz stresi veya mikro besin uygulaması altında daha yüksek çimlenme yüzdesine sahip hidrate olan tohumlar tuz stresine karşı toleransları daha yüksektir. Ek olarak, rapor edilen protokol basittir, ucuzdur ve pahalı kimyasallar ve gelişmiş ekipman gerektirmez.

Termopriming tekniğinde tohumlar, yüksek sıcaklıkta oksijence zengin saf su içerisinde ve karanlık ortamda belirli sürelerde tutulmaktadır. Uygulama sıcaklığı ve süresi türlere göre değişiklik gösterebilmektedir. Hiçbir kimyasal girdi kullanılmadığından çevre dostu bir ön uygulamadır. Ayrıca yüksek sıcaklık sayesinde tohum dezenfeksiyonu sağlanarak tohum kaynaklı hastalıkların önlenmesinde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, üç farklı patlıcan çeşidine ait (Kemer 27, Aydın Siyahı ve Manisa Kır Çizgili) tohumlara ozmo, hidro ve termo priming uygulamaları yapılarak, tohum canlılığı

(normal çimlenme oranı ve çimlenme hızı, fide sürgün ve kök uzunlukları) ve fide oluşturma kapasitesini nasıl etkilendiğini ortaya koymak amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışma 2019 - 2020 yılları arasında Uşak Üniversitesi, Ziraat Fakültesi araştırma laboratuvar ve uygulama alanında yürütülmüştür.

Materyal

Ticari firmadan (Fitalya fide) alınan patlıcan (*Solanum melongena* L.) türüne ait Kemer 27, Aydın Siyahı ve Manisa Kır Çizgili çeşitlerinin fideleri kullanılmıştır.

Yöntem

- Çiçeklenmeden sonraki gün sayısına göre tohum hasatları:

Kemer 27, Aydın siyahı ve Manisa Kır çizgili çeşitlerine ait meyveler çiçeklenmeden sonraki 50, 55, 60 ve 75. günlerde tohum amaçlı hasat edilmiştir. Ardından bu hasatlardan ekstraksiyon (su) yöntemi ile tohumlar elde edilmiştir.

- Tohum partilerinin başlangıç canlılıkları ve nem kapsamlarının belirlenmesi

- **Nem tayini (%)**: Her partinin tohum nemi, 1g'lık 2 tekerrürlü örnekler ile başlangıç ağırlıkları tartıldıktan sonra 130°C 'de 1 saat bekletilmiştir [34]. Tohumlar, bu süre sonunda fırından çıkartılarak soğuması amacıyla fırın kaplarının ağızları kapalı şekilde desikatörde yarım saat bekletildikten sonra son ağırlıkları tartılmış ve başlangıç nem miktarları (%) saptanmıştır. Nem tayini başlangıç nemi ve tüm uygulamalar sonucunda yapılmış olup uygulamalar arasındaki nem değişimi gözlemlenmiştir.

$$\text{Nem miktarı (\%)} = \frac{\text{BTA-STA} \times 100}{\text{BTA}}$$

BTA: Başlangıç tohum ağırlığı

STA: Son tohum ağırlığı

- **Çimlendirme testi (%)**: Her uygulama için 3 tekerrür x 25 tohum kullanılarak, her tekerrürdeki tohumlar, petrielerde 25 °C'de 14 gün süre ile devam etmiştir (ISTA 2005). Çimlenme kriteri olarak 2mm'lik kökçük çıkışı esas alınarak, sayımlar her gün yapılmıştır. Çimlendirme denemesinin sonunda toplam (TÇ) ve normal (NÇ) çimlenme oranları (%) belirlenmiştir. Çimlendirme testi sonunda fidelerin kök ve sürgün (KU, SU) uzunluk (mm) ölçümleri yapılmıştır [35].

-Ortalama Çimlenme zamanı (gün): Çimlendirme denemesi sırasında yapılan günlük sayımlar ile aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır [34].

$$O\check{C}Z = \frac{\sum n.D}{\sum n}$$

Formülde; OÇZ: Ortalama çimlenme zamanı

n: D. günde çimlenen tohum sayısı

D: Çimlenme başlangıcından itibaren geçen günü ifade etmektedir.

Priming uygulamaları

-Hidropriming uygulaması

Farklı olgunluk dönemlerine göre sınıflandırılarak keselenen tohumlar saf su içeren küvetlere yerleştirilen tel üzerine dizilmiştir. Uygulama 4 ve 8 saat üzerinden iki farklı aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk uygulamada tohumlar 35°C’de 8sa (4sa aydınlık, 4sa karanlık) etüv de bekletilip çimlenme testi için petrilere aktarılmıştır. İkinci uygulamada ise tohumlar 35°C’de 4sa (2sa aydınlık, 2sa karanlık) etüv de bekletilip çimlenme testi için petrilere aktarılmıştır.

-Ozmopriming uygulaması

Farklı olgunluk dönemlerine göre sınıflandırılarak keselenen tohumlar, PEG çözeltisi (%10’luk) içeren küvetlere yerleştirilen tel üzerine dizilmiştir. Uygulama 4 ve 8sa üzerinden iki farklı aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk uygulama tohumlar 35°C’de 8sa (4sa aydınlık, 4sa karanlık) etüv de bekletilip çimlenme testi için petrilere aktarılmıştır. İkinci uygulamada ise tohumlar 35°C’de 4sa (2sa aydınlık, 2sa karanlık) etüv de bekletilip çimlenme testi için petrilere aktarılmıştır.

-Termopriming uygulaması

Farklı olgunluk dönemlerine göre sınıflandırılarak keselenen tohumlar, 50°C’de 2 farklı sürede (15 dakika ve 30 dakika) su banyosunda bekletilmiştir. Çıkarılan tohumlar kurutma kağıtlarında fazla nemi alındıktan sonra çimlenme testi için petrilere aktarılmıştır.

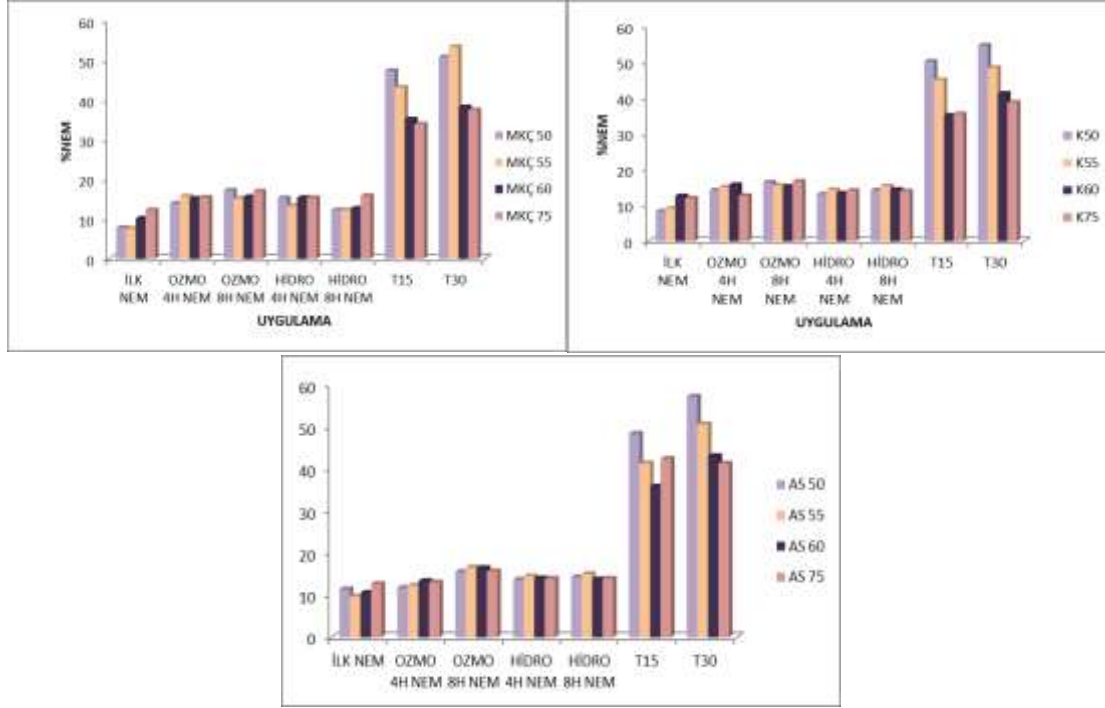
İstatistiksel Analiz

Çalışma tesadüf parselleri deneme desenine göre yürütülmüştür. Laboratuvar testleri sonuçlarının istatistiksel önemi ve ortalamalar arasındaki farklar Duncan'ın çoklu

karşılaştırma yöntemi ile $p \leq 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir. İstatistiksel analizde SPSS 23 paket programı kullanılmıştır.

Bulgular ve Tartışma

Tohumluk işletmelerinde olgunlaşma farklılıkları ve bir defalık hasat uygulamaları nedeniyle, aynı partideki tohumlar farklı olgunlaşma aşamalarında olabilmektedir. Bu nedenle, daha az olgun tohumlar, aynı partide yeterince gelişmemiş embriyo ve düşük tohum ağırlığı nedeniyle dormanside kalabilir. Tohum üretimi amacıyla patlıcan meyveleri, antesisden 55 gün ve daha sonra bitkiden hasat edilebileceği belirlenmiştir [36]. Çeşitli fizyolojik olaylar, dormansi hali ve çimlenmenin artışı ilişkilendirilebilir [37]. Patlıcan tohum üretiminde, farklı hasat zamanları ile priming uygulamalarının tohum kalitesi üzerine etkilerini belirlemek için yapılan çalışmada, aynı zamanda çeşitlerin tepkileri de irdelenmiştir. Yapılan Duncan testi ($p \leq 0,05, 0,01$) sonuçlarına göre toplam ve normal çimlenme oranları (%), ortalama çimlenme süresi (gün), kök ve sürgün uzunlukları (mm) açısından uygulamalar arasındaki farklılığın istatistiki olarak değişken düzeylerde genel olarak önemli olduğu belirlenmiştir. Çeşitlerin her hasat grubunda ve her uygulama sonrasındaki nem değişimi incelenmiştir. Şekil 1’de görüldüğü gibi ilk nem (%8-12) ve OP ile HP uygulamaları sonrası belirlenen nem (%13-17) miktarları arasında çok fazla değişim bulunmamıştır. Ancak TP uygulaması nem oranını oldukça belirgin düzeyde (%33-57) artırmıştır ve bu durum diğer uygulamalara göre çimlenme performansının daha iyi olmasının sebeplerindendir (Şekil 2,3). Çeşitler ve hasat dönemleri kıyaslandığında ise; 75. Gün olgunluğuna kadar diğer hasat zamanlarında nem oranı kontrolsüz ve istikrarsız yükseliş göstermiştir.



Şekil 1 Manisa Kır Çizgili, Aydın siyahı ve Kemer 27 çeşitlerinin farklı olgunluktaki tohumlarında kontrol ve uygulama sonrası nem değişimleri (%)

Tohum canlılık değerleri bakımından Manisa Kır Çizgili, Aydın siyahı ve Kemer 27 çeşitleri arasında çok önemli ($p<0.01$) farklılıklar tespit edilmiştir (Tablo 1).

Tablo 1 Manisa Kır Çizgili, Aydın siyahı ve Kemer 27 çeşitlerine ait varyans analiz tablosu

	F	df1	df2	Sig.
Toplam çimlenme	3,166	83	168	,000
Ortalama Çimlenme Zamanı	7,641	83	168	,000
Normal çimlenme	3,136	83	168	,000
Kök uzunluğu	4,508	83	168	,000
Sürgün uzunluğu	6,039	83	168	,000

Denemelerde tohum canlılığının ele alındığı; priming, çeşit ve olgunluk konularına bağlı olarak belirlenen parametrelerin istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi tablo 2’de verilmiştir. Priming ve olgunluk konularından elde edilen sonuçların ortalamaları arasındaki farklılıklar ($p<0.01$) istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur.

Tablo 2 İncelenen parametrelere ait varyans analiz tablosu (1)

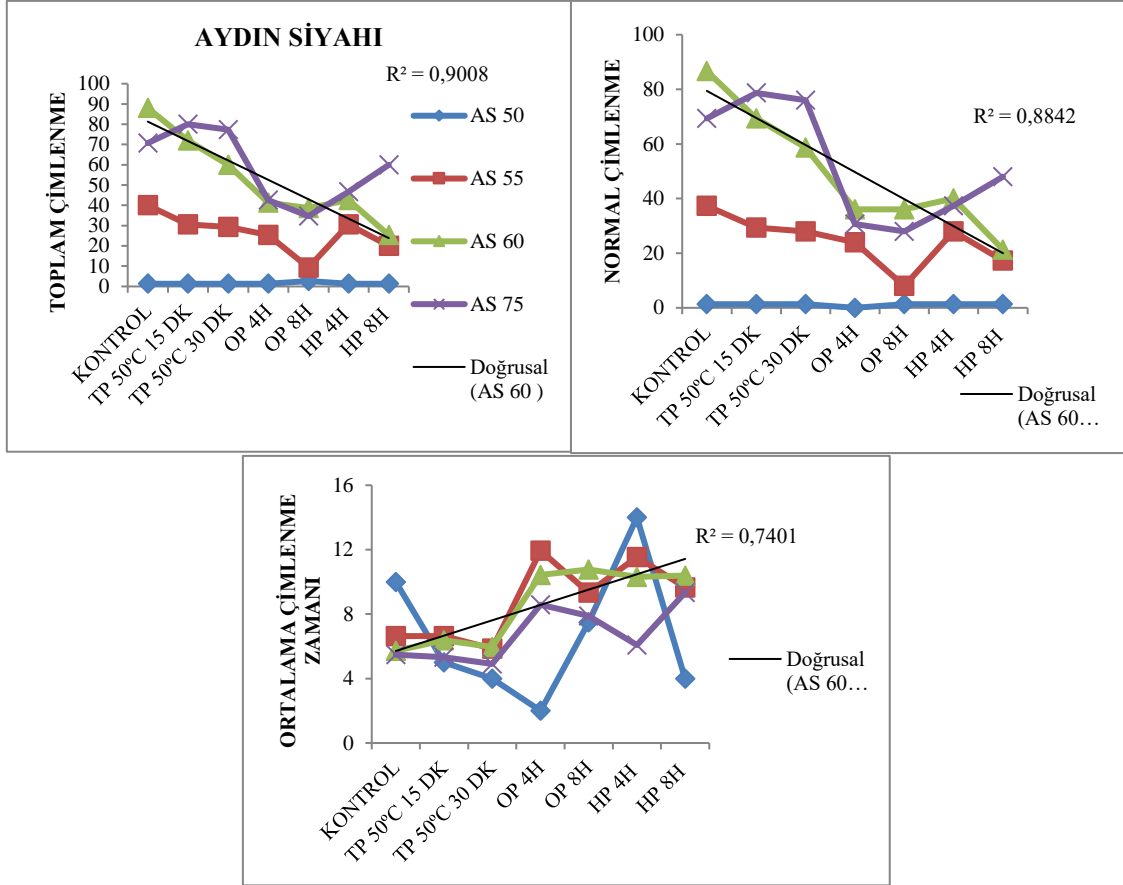
Varyasyon kaynağı	Bağımlı değişkenler	df	Kareler ortalaması	Sig.
Priming	Toplam çimlenme	6	1802,582	,000
	Ortalama çimlenme zamanı	6	60,960	,000
	Normal çimlenme	6	2607,915	,000
	Kök uzunluğu	6	185,063	,000
	Sürgün uzunluğu	6	257,898	,000
Çeşit	Toplam çimlenme	2	759,111	,000
	OÇZ	2	20,483	,012
	Normal çimlenme	2	406,540	,005
	Kök uzunluğu	2	6,131	,604
	Sürgün uzunluğu	2	291,671	,004
Olgunluk	Toplam çimlenme	3	66185,788	,000
	OÇZ	3	645,969	,000
	Normal çimlenme	3	53939,979	,000
	Kök uzunluğu	3	2026,841	,000
	Sürgün uzunluğu	3	14682,526	,000

Aydın siyahı çeşidine ait toplam ve normal çimlenme değerlerinin priming uygulamaları sonucundaki değişimi incelendiğinde, kontrol grubuna göre sadece 75.gün hasadının tohumlarında termoprining ile olumlu etki elde edilmiştir (Şekil 2). Ortalama çimlenme hızı bakımından belirgin bir olumlu etki görülmemiştir. Aydın siyahı çeşidinin tohum canlılık parametrelerinde en yüksek R^2 değerleri 60. gün tohum hasadında belirlenmiştir. Tüm çeşitlerde priming, olgunluk ve priming x olgunluk interaksyonu bakımından TÇ, NÇ ve OÇZ parametreleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 2). Tohumlarda uygulanan farklı sıcaklık uygulamaları (termoprining) tohum çimlenmesi ve fide gelişimini önemli derecede etkilemektedir. Farklı sıcaklık (50, 55 ve 60°C) ve sürelerde (15, 30 ve 60 dk) uygulama gören kuru ve su emdirilen domates tohumlarının çimlenme sonuçlarına göre, kuru tohumlara yapılan uygulamalardan daha iyi sonuç alınmıştır [38]. Çeşit x olgunluk interaksyonu ele alındığında, ortalama çimlenme zamanı parametresi hariç interaksyon ortalamaları arasındaki farklılıklar ($p<0.01$) istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (Tablo 3). Priming x çeşit x olgunluk interaksyonunda ise toplam çimlenme değer ortalamaları istatistiksel ($p<0.01$) açıdan önemlidir. Her üç çeşitte de tohum

partilerinin OÇZ değerleri açısından farklılık, priming x olgunluk interaksyonu hariç diğer gruplarda ($p>0.05$) anlamlı bulunmamıştır.

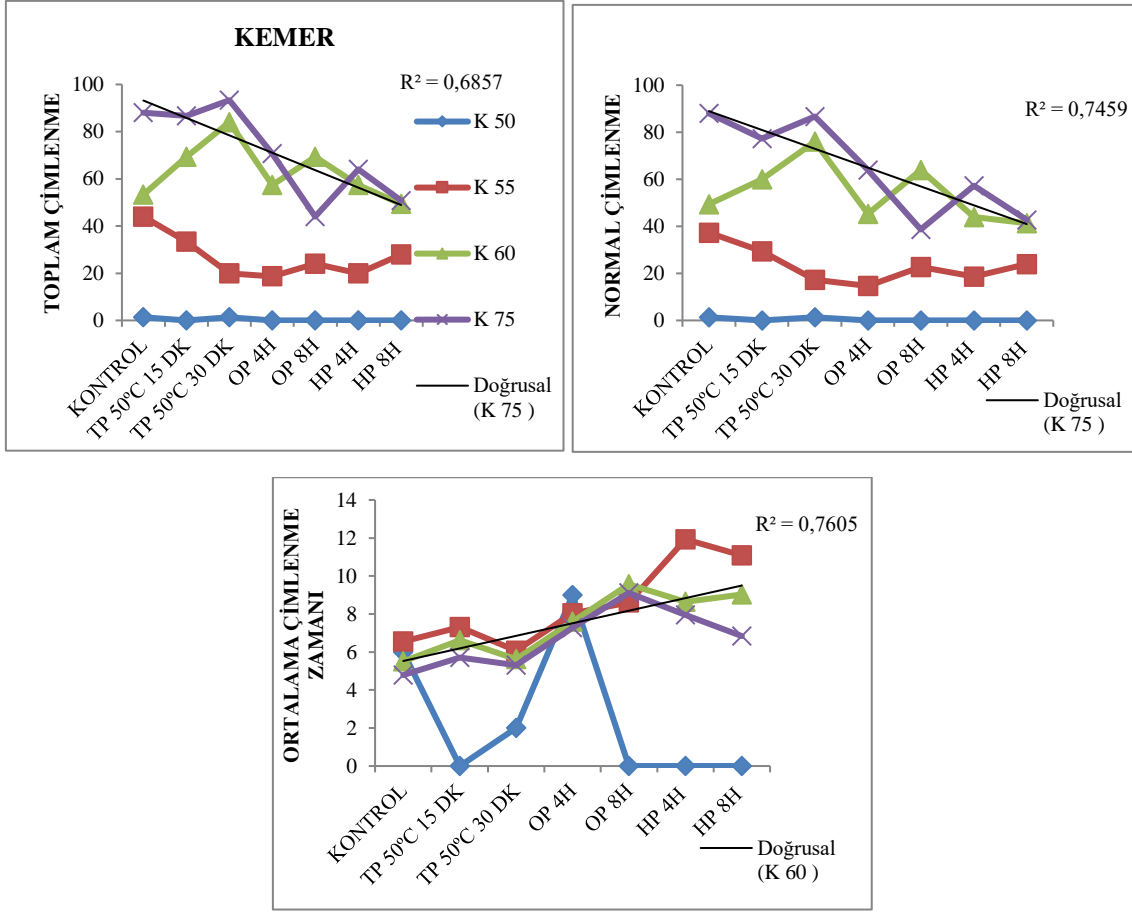
Tablo 3 İncelenen parametrelere ait varyans analiz tablosu (2)

Varyasyon kaynağı	Bağımlı değişkenler	df	Kareler ortalaması	Sig.
Priming x Çesit	Toplam çimlenme	12	242,963	,001
	OÇZ	12	3,617	,654
	Normal çimlenme	12	191,503	,004
	Kök uzunluğu	12	10,132	,614
	Sürgün uzunluğu	12	51,276	,433
Priming x Olgunluk	Toplam çimlenme	18	551,122	,000
	OÇZ	18	11,242	,001
	Normal çimlenme	18	773,954	,000
	Kök uzunluğu	18	21,033	,038
	Sürgün uzunluğu	18	76,458	,088
Çesit x Olgunluk	Toplam çimlenme	6	1551,249	,000
	OÇZ	6	8,782	,078
	Normal çimlenme	6	1261,566	,000
	Kök uzunluğu	6	64,000	,000
	Sürgün uzunluğu	6	385,366	,000
Priming x Çesit * Olgunluk	Toplam çimlenme	36	275,915	,000
	OÇZ	36	3,861	,711
	Normal çimlenme	36	250,282	,000
	Kök uzunluğu	36	9,312	,824
	Sürgün uzunluğu	36	72,950	,062



Şekil 2 Aydın siyahı çeşidinin farklı olgunluktaki tohumlarında kontrol ve OP, HP ve TP uygulamaları sonrası toplam ve normal çimlenme oranları (%) ile ortalama çimlenme zamanları (OÇZ, gün)

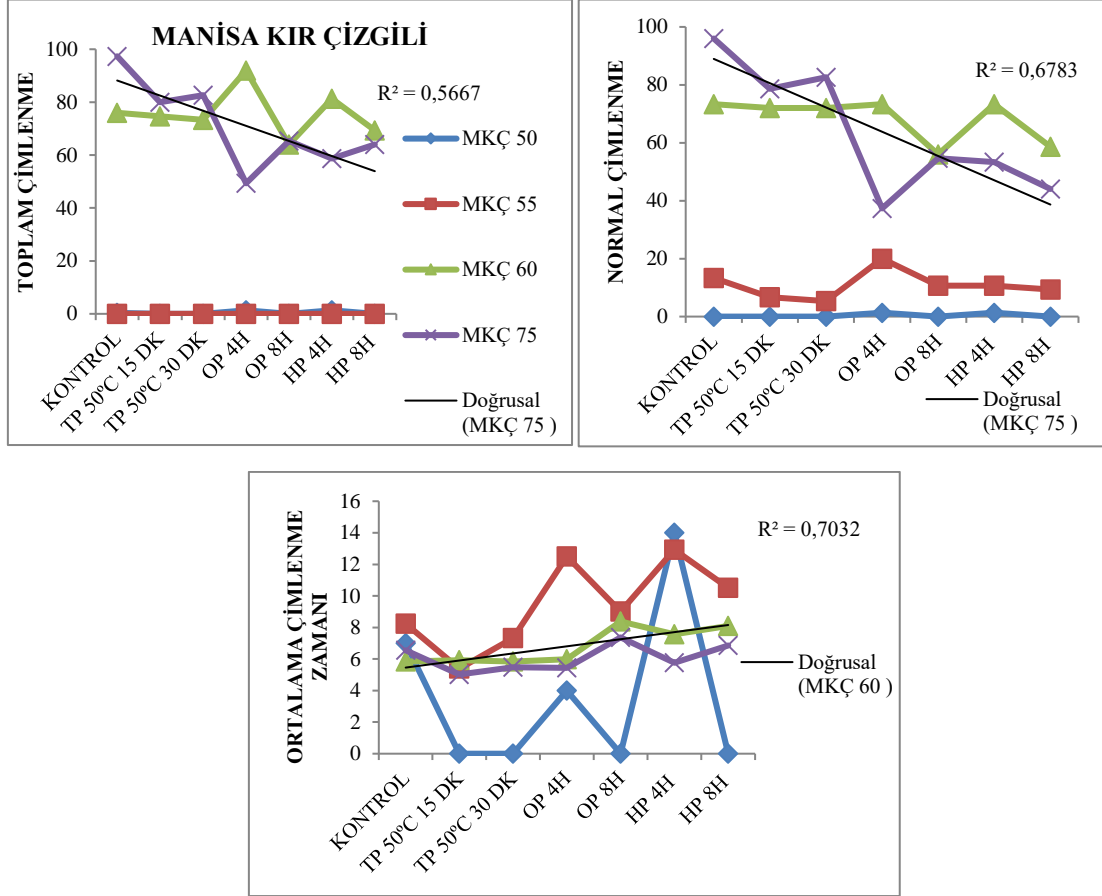
Kemer 27 çeşidine ait toplam ve normal çimlenme değerlerinin priming uygulamaları sonucundaki değişimi incelendiğinde, kontrol grubuna göre 60 ve 75.gün hasatlarının tohumlarında termoprimering ile olumlu etki elde edilmiştir (Şekil 3). Kemer 27 çeşidinin çimlenme parametrelerinde en yüksek R² değerleri 75. gün tohum hasadında iken, OÇZ için en yüksek değer 60. gün tohum grubunda belirlenmiştir.



Şekil 3 Kemer 27 çeşidinin farklı olgunlukta tohumlarında kontrol ve OP, HP ve TP uygulamaları sonrası toplam ve normal çimlenme oranları (%) ile ortalama çimlenme zamanları (OÇZ, gün)

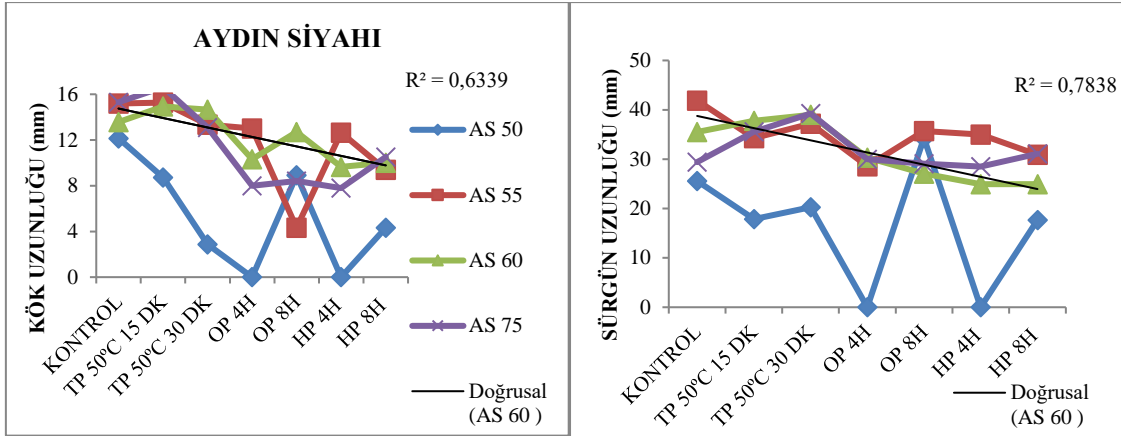
Farklı konsantrasyonlardaki (-1 ve -1.5 MPa) PEG-6000 ile %3, 5, 10 ve 15'lik KNO₃ ve NaCl ozmotik ajanlarla hazırlanan çözeltilerde uygulamalara tabi tutulan domates, patlıcan ve biber tohumlarının tohum gücüne olan etkileri araştırılmıştır. Domates tohumları için 48 saat süre uygulanan hidropriming; patlıcan ve biber tohumları için nem içeriği %80 olan kumda 3 gün süren katı matris priming uygulamalarının canlılık ve güç parametrelerinde en iyi sonucu verdiği belirlenmiştir [39]. Kullanılan priming işlemleri sırasında tekniğin etkili olması için kök çıkışı oluşmamalıdır. Bu nedenle uygulama süre ve sıcaklıkları çok önemlidir. Önceki çalışmalarda değişken sıcaklık (10–30°C) ve 1-15 gün arasında değişen süreler kullanılmıştır. Örneğin, Trigo ve Trigo (1999), 25°C ve 72 saat süre ile doğal olarak yaşlandırılan patlıcan tohumlarında 20°C ve 48 saat kombinasyonu ile yapılan priming işlemi en uygun olarak belirlenmiştir [40]. Patula ve Erecta bitki yaprakları ile yapılan organik priming işlemleri ve su ile uygulanan tohumlara

kıyasla doğal olarak yaşlandırılmış patlıcan tohumlarının kök uzunluğunu ve fide taze ağırlığını önemli ölçüde arttırmıştır [41].



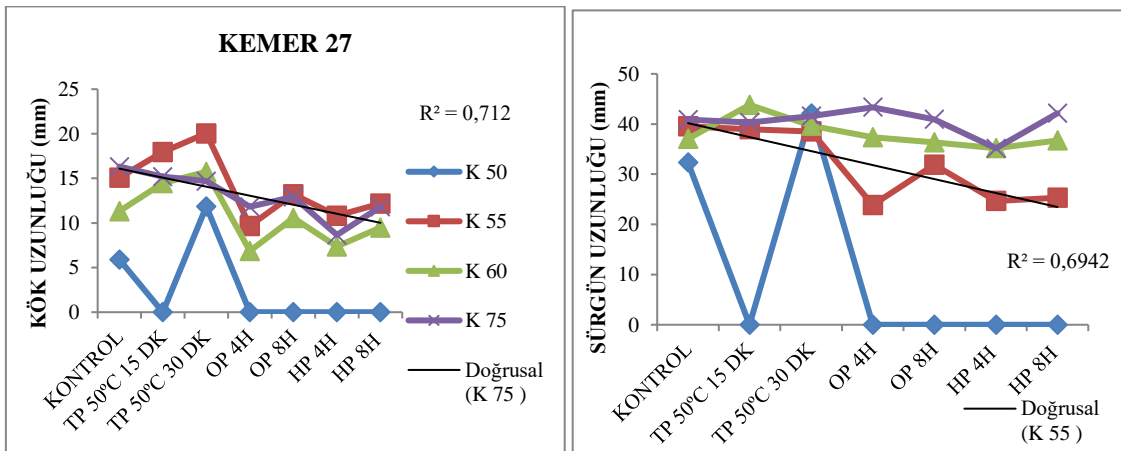
Şekil 4 Manisa kır çizgili çeşidinin farklı olgunlukta tohumlarında kontrol ve OP, HP ve TP uygulamaları sonrası toplam ve normal çimlenme oranları (%) ile ortalama çimlenme zamanları (OÇZ, gün)

55 ve 60. Gün Manisa kır çizgili çeşidinin tohum hasat grubunun toplam ve normal çimlenme değerlerinin 4 saatlik OP uygulaması sonucunda, kontrol grubuna göre daha yüksek değerler vermiştir (Şekil 4). Bu çeşidin çimlenme parametrelerinde en yüksek R² değerleri 75. gün tohum hasadında iken, OÇZ için en yüksek değer 60. gün tohum grubunda belirlenmiştir. Biber tohumlarına PEG 6000 (212 g/L) ile yapılan ozmoprime sonucunda, fide üretiminde görülen çimlenme ve çıkış problemlerinin azaltılabileme olanaklarının incelendiği araştırma sonucunda; uygulama yapılmış tohumların kontrol tohumlarına göre çimlenme gücü ve hızında artış belirlenmiştir [42]. Ispanak tohumlarında yapılan bir çalışmada; 4 gün 10°C'de yapılan PEG uygulaması ile toplam çimlenmede %50 artış sağlanmıştır [43].



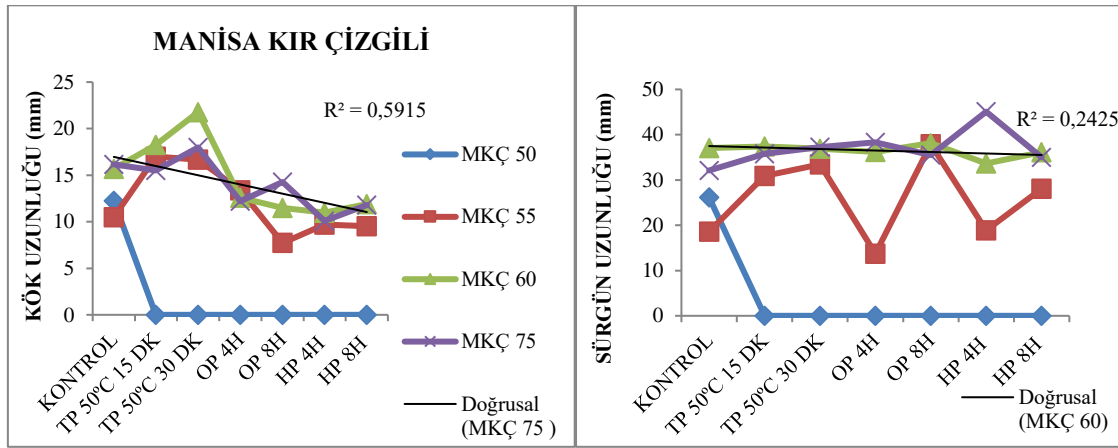
Şekil 5 Aydın siyahı çeşidinin farklı olgunlukta tohumlarında kontrol ve OP, HP ve TP uygulamaları sonrası kök-sürgün uzunluğu (mm)

Aydın siyahı çeşidine ait kök ve sürgün uzunluğunun kontrol grubundaki değişimine bakıldığında, olgunluk dönemlerine bağlı olarak dalgalı seyretmekle beraber yükselmiştir. Genelde, 50 °C’de 15 dakika yapılan termoprümling grubu hariç tüm olgunluklardaki kök ve sürgün uzunluklarında azalma saptanmıştır. Şekil 5’de de görüldüğü üzere çiçeklenmeden sonraki 50. günde (ham tohum) hasat edilen tohumların fizyolojik olgunluğu tamamlanamamasından dolayı sonuçları oldukça değişken ve uzunluk olarak daha azdır. Tüm çeşitlerde priming, olgunluk ve çeşit x olgunluk interaksiyonu bakımından kök ve sürgün uzunlukları istatistiksel olarak oldukça anlamlı bulunmuştur (Tablo 2). Çeşidin kök ve sürgün ölçümlerinde en yüksek R^2 değerleri 60. gün tohum hasadından alınmıştır.



Şekil 6 Kemer 27 çeşidinin farklı olgunlukta tohumlarında kontrol ve OP, HP ve TP uygulamaları sonrası kök-sürgün uzunluğu (mm)

Kemer 27 çeşidinde 55 ve 60. gün hasat gruplarında ait kök ve sürgün uzunlukları termoprining uygulamaları ile kontrol grubu sonuçlarına göre artış belirlenmiştir. Şekil 6'da da görüldüğü üzere özellikle kök uzunluğu sonuçlarında da bu grupları değerleri benzer sonuçlar vermiştir. Kemer 27 çeşidinin kök ölçümünde en yüksek R^2 değeri 75. gün tohum hasadından alınırken, sürgün ölçümünde ise en yüksek değer 55. gün tohum grubunda belirlenmiştir (Şekil 6). Domates tohumlarında 2 saat süresince 60°C 'de yapılan termoprining sonucu; sürgün uzunluğu, sürgün ağırlığı, yaprak alanı, çiçek sayısı, meyve tutumu ve toplam verim gibi parametrelerde 50°C 'de yapılan uygulamaya göre daha iyi sonuçlar alınmıştır [38].



Şekil 7 Manisa kır çizgili çeşidinin farklı olgunluktaki tohumlarında kontrol ve OP, HP ve TP uygulamaları sonrası kök-sürgün uzunluğu (mm)

Manisa kır çizgili çeşidinde 50. gün hasat grubu hariç, kök uzunluklarında termoprining uygulamaları kontrol grubuna göre etkinken, sürgün uzunluklarında tüm priming uygulamaları değerlerinde artış sağlanmıştır. 60 ve 75. gün hasadına ait tohumlarda kök ve sürgün uzunluklarının priming sonucu gösterdiği değişim benzer olmuştur (Şekil 7). Bu çeşidin kök uzunluk değerinde en yüksek R^2 değeri 75. gün tohum hasadında belirlenirken, sürgün uzunluğu için ise bu değer 60. gün tohum grubunda belirlenmiştir. Genel olarak tuz koşullarında NaCl konsantrasyonundaki artışla çimlenme aşamalı olarak inhibe edilebilmektedir. En güçlü inhibisyon 140 mM NaCl'de belirlenen çalışmada, gelişimin erken (antesiden sonraki 42, 45. gün) ve daha sonraki (antesiden sonraki 70, 80. gün) aşamalarında hasat edilen tohumlarında, 2000'deki son sayıma göre bu konsantrasyonda % 40'tan daha düşük çimlenmeye sahip olmuştur. Sodyum klorür

konsantrasyonu arttıkça çimlenme ve çıkış azalmıştır. Benzer sonuçlar, olgun soğan (*Allium cepa* L.), şeker pancarı (*Beta vulgaris* L.) ve jojoba (*Simmondsia chinensis* L.) [44, 45, 46] tohumlarında gözlenmiştir. Patlıcan tohumlarının gelişim aşaması, stres altında performansı ayırt eden faktörlerden biridir. Gelişim aşaması ayrıca diğer türlerdeki potansiyel depolama ömrünü ve fide büyümesini de belirler [47]. Tuzluluk, fide büyümesini (normal çıkış, taze ağırlık ve kuru ağırlık) toplam çimlenme yüzdesinden daha şiddetli etkilemektedir.

Sonuç ve Öneriler

Priming uygulamasının tohum canlılığını teşvik edebilmesi, türe bağlı olarak değişen kritik nem seviyesinin üzerine çıktığı zaman mümkündür. Bu aşamada tohumlarda rejenerasyon mekanizması çalışmakta ve böylece tohum canlılığı ile gücü olumlu etkilenmektedir [48]. Elde edilen sonuçlara göre, tohum canlılık parametrelerinin çoğu tohumun olgunluk durumuna bağlı olarak priming ile pozitif ilişki gösterdiği sonucuna varılabilir. MKÇ ve AS çeşitlerinde çimlenme performansı 60.gün hasadının tohumlarında görülürken, K çeşidinde ise 75.gün hasadında belirlenmiştir. Kök ve sürgün uzunluğu kriterlerinde ise tüm çeşitlerde özellikle termopriming uygulaması ile 55-60 ve 75. gün hasatlarının tohumlarında olumlu etki elde edilmiştir. Priming işlemleri arasında termopriming, diğer işlemlere kıyasla en iyi sonucu göstermiştir. Genelde 50 ve 55.gün hasatlarında fizyolojik olgunluk açısından yetersiz olduğu için canlılık parametrelerinde dalgalanma belirlenmiştir (Şekil 2, 4 ve 7). İlerleyen çalışmalarda, daha fazla olgunluk seviyelerine sahip tohum gruplarında, alternatif süre ve konsantrasyonlarda priming uygulamaları ile daha kesin sonuçlar elde edilebilir.

Teşekkür

Bu çalışma birinci yazarın ikinci yazar danışmanlığında hazırladığı yüksek lisans tezinin bir bölümünden üretilmiştir.

Kaynaklar

1. D. Eşiyok, Kışlık ve Yazlık Sebze Yetiştiriciliği, Meta Basım, Bornova-İzmir, 2012. p. 404.
2. FAO. Patlıcan üretim miktarı 2018, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>, [Erişim Tarihi: 17.09.2020].
3. TUIK. Patlıcan üretim miktarı 2019, <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr> , [Erişim Tarihi: 17.09.2020].
4. M. Ashraf, and M.R Foolad, Pre-sowing seed treatment- a shotgun approach to improve germination, plant growth and crop yield under saline and non-saline conditions, *Advances in Agronomy*, 2005. 88: p. 223-271.

5. J.C. Delouche, Environmental effects on seed development and seed quality, *Hortscience*, 1980. 15: p. 775-780.
6. K.J. Bradford, *Seed Production and Quality*, College of Agricultural & Environmental Sciences, 2004. p: 31-57.
7. H.C. Passam, et al., Influence of harvest time and after-ripening on the seed quality of eggplant, *Scientia Horticulturae*, 2010. 125: p. 518–520.
8. H.C. Passam, et al., Flower morphology and number of aubergine (*Solanum melongena* L.) in relation to fruit load and auxin application, *Scientia Horticulturae*, 2001. 89: p. 309-316.
9. H. Petrov, M. Doikova, and D. Popova, Studies on the quality of eggplant seed, *Acta Horticulturae*, 1981. 111: p. 273-280.
10. H.C. Passam, and I.C. Karapanos, Eggplants, peppers and tomatoes: factors affecting the quality and storage life of fresh and fresh-cut (minimally-processed) produce, *European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 2008. 2 (Special issue 1): p. 156-170.
11. M. Ashraf, and M.R. Foolad, Pre-sowing seed treatment: A shotgun approach to improve germination, plant growth and crop yield under saline and non-saline conditions, *Advances in Agronomy*, 2005. 88: p. 223-271.
12. K.J. Bradford, Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions, *Hortscience*, 1986. 21: p. 1105–1112.
13. A.A. Khan, Preplant physiological seed conditioning, *Horticultural Reviews*, 1992. 51: p. 53–76.
14. W. Heydecker, and P. Coolbear, Seed treatments for improved performance, Survey and attempted prognosis, *Seed Science and Technology*, 1977. 5: p. 353-425.
15. G.E. Welbaum, and K.J. Bradford, Water relations of seed development and germination in muskmelon (*Cucumis melo* L.) VI. Influence of priming on germination responses to temperature and water potential during seed development, *Journal of Experimental Botany*, 1991. 42: p. 393–399.
16. A.G. Taylor, and G.E. Harman, Concepts and technologies of selected seed treatments, *Annual Reviews Phytopathology*, 1990. 28: p. 321– 339.
17. A.D. Alvarado, and K.J. Bradford, Priming and storage of tomato seeds, I. Effects of storage temperature on germination rate and viability, *Seed Science and Technology*, 1988. 16: p. 601–612.
18. R. Mitra, and R.N. Basu, Seed treatment for viability, vigour and productivity of tomato, *Scientia Horticulturae*, 1979. 11: p. 365–369.
19. S. Penalzoza, and M.T.S. Eira, Hydration and dehydration treatments on tomato seeds (*Lycopersicon esculentum* Mill.), *Seed Science and Technology*, 1993. 21: p. 309–316.
20. A.A. Powell, et al., The influence of aerated hydration seed treatment on seed longevity as assessed by the viability equations, *Journal of Experimental Botany*, 2000. 51(353): p. 2031–2043.
21. L.W. Jett, and G.W. Welbaum, Changes in broccoli (*Brassica oleracea* L.) seed weight, viability and vigour during development and following drying and priming, *Seed Science and Technology*, 1996. 24: p. 127–137.
22. C.A. Parera, and D. J. Cantliffe, Pre-sowing seed priming, *Horticultural Reviews*, 1994. 16: p. 109-141.
23. D. Harris, et al., On-farm seed priming in semi-arid agriculture development and evaluation in maize, rice and chick pea in India using participatory methods, *Experimental Agriculture*, 1999. 35: p. 15-29.
24. C.A. Argerich, and K.J. Bradford, The effects of priming and ageing on seed vigour in tomato, *Journal of Experimental Botany*, 1989. 40: p. 599-607.
25. Y. Lin, et al., X-ray studies on changes in embryo and endosperm morphology during priming and inhibition of tomato seeds, *Seed Science Research*, 1993. 3: p. 171-178.
26. A. Liptay, and N. Zariffa, Testing the morphological aspects of polyethylene glycol-primed tomato seeds with proportional odds analysis, *Hort Science*, 1993. 28: p. 881-883.

27. M.B. McDonald, M. Black, and J.D. Bewley., Seed priming, *Seed Technology and Its Biological Basis*, Sheffield Academic Press, Sheffield, 2000. UK, p. 287–325.
28. H.Y. Wang, C.L. Chenand, and J.M. Sung, Both warm water soaking and solid priming treatments enhance antioxidation of bitter gourd seeds germinated at sub-optimal temperature, *Seed Science and Technology*, 2003. 31: p. 47-56.
29. Y.M. Huang, H.H. Wang, and K.H. Chen, Application of seed priming treatments in spinach (*Spinacia oleracea L.*) production, *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*, 2002. 48: p. 117–123.
30. J.M. Lin, and J.M. Sung, Pre-sowing treatments for improving emergence of bitter gourd seedling sunder optimal and sub-optimal temperatures, *Seed Science and Technology*, 2001. 29: p. 39-50.
31. S.M.A. Basra, et al., Comparison of different in vigorati on techniques in wheat (*Triricum aestivum L.*) seeds, *Pak. Journal of Arid Agriculture*, 2003. 5: p. 11-16.
32. M. Farooq, et al., Thermal hardening: A new seed vigor enhancement tool in rice, *Acta Botanica Sinica*, 2005. 47: p. 187-193.
33. R.S. Shivankar, D.B. Deore, and N.G. Zode, Effect of pre-sowing seed treatment on establishment and seed yield of sun flower, *Journal of Oil seeds Research*, 2003. 20: p. 299-300.
34. ISTA, International rules for seed testing, *Seed Science ve Technology 21: Supplement, Rules*, 1993.
35. ISTA, *Handbook of Method Validation*, Bassersdorf, Switzerland. In press, 2005.
36. I. Demir, et al., Seed development and maturation in aubergine, *Gartenbauwissenschaft*, 2002. 67(4): p. 148-154.
37. R. Iglesias-Fernandez, M. Carmen Rodriguez-Gacio, and A.J. Matilla, Progress in research on dry afterripening, *Seed Science Research*, 2010. 20: p. 1-12.
38. S. Khalil, H.A. Moursy, and S.A. Saleh, Wheat plant reactions to pre-sowing heat hardening of grains, II. Changes in photosynthetic pigments, nitrogen and carbohydrate metabolism, *Bulletin of Egyptian Society for Physiological Siences*, 1983. 3: p. 161–175.
39. A. Venkatasubramanian, and R. Umarani, Evaluation of seed priming methods to improve seed performance of tomato (*Lycoperison esculentum*), eggplant (*Solanum melongena*) and chilli (*Capsicum annum*), *Seed Science and Technology*, 2007. 35: p. 487-493.
40. M.F.O. Trigo, and L.F.N. Trigo, Effect of priming on germination and on vigor of eggplant (*Solanum melongena L.*) seeds, *Rev. Bras. de Sem.*, 1999. 21(1): p. 107–113.
41. K. Mavi, Use of extract from dry marigold (*tagates spp.*) flowers to prime eggplant (*Solanum melongena L.*) seeds, *Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus*, 2014. 13(4): p. 3-12.
42. H. Pullu, *Tohum Önçimlendirme Uygulamalarından Ticari (Hazır) Fide Üretiminde Yararlanma Olanaklarının Belirlenmesi*, Y.Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2008. İzmir.
43. C.C. Hsu, et al., Accelerated aging-enhanced lipid peroxidation in bitter gourd seed sand effects of priming and hot water soaking treatments, *Scientia Horticulture*, 2003. 98: p. 201-212.
44. S. Miyamoto, Salt effects on germination, emergence and seedling mortality of onion, *Agron. J.*, 1989. 81: p. 202–207.
45. M.J. Durrant, A.P. Drycott, and P.A. Payne, Some effects of sodium chloride on germination and seedling growth of sugar beet, *Ann. Bot.*, 1974. 38: p. 1045–1051.
46. S.A. Kayani, H. Naqvi, and I.P. Ting, Salinity effects on germination and mobilization of reserve in jojoba seed, *Crop Sci.*, 1990. 30: p. 704–708.
47. I. Demir, and Y. Samit, Seed quality in relation to fruit maturation and seed dry weight during seed development in tomato, *Seed Sci. Technology*, 2001. 29: p. 453–462.
48. F.H. Ward, and A.A. Powell, Evidence for repair processes in onion seeds during storage at high seed moisture contents, *Journal of Experimental Botany*, 1983. 34: p. 277-282.

Kendiliğinden Montajlı Peptidler ve Kullanım Alanları

Şeyma Aydın¹ , Zülal Kesmen^{1*} 

ÖZET

Moleküler kendiliğinden montaj, moleküllerin kovalent olmayan etkileşimler yoluyla bir araya gelerek supramoleküler yapılar oluşturduğu doğal bir mekanizmadır. Doğada mevcut olan nano ve mikro yapıdaki kendiliğinden montaj mekanizmalarının taklit edilmesiyle, istenilen özellikte çeşitli materyallerin tasarlanması mümkündür. Bu nanoyapılar, karbonhidrat, nükleik asitler ve peptidler gibi yapı taşlarının kendiliğinden montajıyla oluşmakla birlikte bunlar arasında kendiliğinden montajlı peptidler biyouyumluluk, biyobozunurluk ve kimyasal çeşitlilik yönünden en umut verici olanıdır. Peptidlerin kendiliğinden montaj özelliklerinden yararlanılarak, nanotüpler, nano lifler, nano küreler, nano kapsüller ve hidrojeller gibi çok sayıda nanoyapı elde edilmiştir. Kendiliğinden montajlı peptid nanoyapılarının işlevi, uygun peptid bloklarının tasarımı ile ayarlanırken stabilite ve aktivitesi sıcaklık, pH, ışık ve elektriksel kuvvet gibi dış uyarıcılar kullanılarak değiştirilebilmektedir. Bugüne kadar peptidlerin kendiliğinden montaj mekanizması kullanılarak çok sayıda işlevsel materyal tasarlanmış ve bu materyaller birçok alanda uygulama imkanı bulmuştur. Bunlar arasında en çok öne çıkanlar, ilaç salınımı ve doku mühendisliği uygulamalarıdır. Bu derlemede, kendiliğinden montajlı peptid yapı blokları, kendiliğinden montaj mekanizması ve kendiliğinden montajlı peptid nanoyapıların uygulama alanları üzerinde durulmuştur.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

3 Şubat 2020

Kabul

23 Mayıs 2020

ANAHTAR KELİMELELER

Kendiliğinden montajlı peptidler, ilaç salınımı, doku mühendisliği, enkapsülasyon, antimikrobiyal uygulamalar

Self-Assembled Peptides and Their Applications

ABSTRACT

Molecular self-assembly is a natural mechanism by which molecules come together through non-covalent interactions to form supramolecular structures. It is possible to design various materials with the desired properties by mimicking the self-assembling mechanisms in the nano and micro structures present in nature. Although these nanostructures are formed by self-assembly of building blocks such as carbohydrates, nucleic acids and peptides, self-assembled peptides are the most promising in terms of biocompatibility, biodegradability and chemical diversity. By utilizing the self-assembly properties of peptides, many nanostructures such as nanotubes, nanofibers, nanospheres, nanocapsules and hydrogels have been produced. The function of the self-assembled peptide nanostructures can be adjusted by the design of suitable peptide blocks, while the stability and activity can be altered using external stimulants such as temperature, pH, light and electrical force. To date, a large number of functional materials have been designed using the self-assembly mechanism for peptides and they have been applied in many areas. The most prominent of these are drug release and tissue engineering applications. In this review, self-assembled peptide building blocks, the self-assembly mechanism and the application areas of self-assembled peptide nanostructures have been discussed.

ARTICLE HISTORY

Received

3 February 2020

Accepted

23 May 2020

KEY WORDS

Self-assembled peptides, drug release, tissue engineering, encapsulation, antimicrobial applications

¹ Erciyes University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, Kayseri/ Turkey

*Corresponding Author: Zülal Kesmen, e-mail: zkesmen@erciyes.edu.tr

Giriş

Doğada bulunan bazı yapıların (hücre zarlarının, hücre iskelet yapılarının ve hücre dışı matriksin) oluşumunda kendiliğinden montaj mekanizması önemli bir rol oynamaktadır. Son zamanlarda doğadaki bu üretim mekanizmasını taklit eden çeşitli malzemelerin tasarımı üzerine yoğun çalışmalar yapılmış ve biyolojik sistemleri taklit eden kendiliğinden montajlı yapay sistemler geliştirilmiştir.

Moleküler kendiliğinden montaj, termodinamik denge koşulları altında bir dizi kovalent olmayan etkileşimler (H-bağı, hidrofobik, elektrostatik, vander Waals etkileşimleri, π - π istifleme etkileşimi gibi) sonucunda moleküllerin kendiliğinden bir araya gelerek düzenli ve oldukça kararlı yapılar oluşturmasıdır. Kendiliğinden montaj, aşağıdan yukarıya doğru (bottom up) gerçekleşen bir moleküler organizasyondur ve nano malzeme üretiminde önemli bir yöntemdir [1, 2, 3]. Peptidler, yağ asitleri ve nükleik asitler, kendiliğinden birleşebilen biyolojik moleküllerdir. Bu moleküller içerisinde, sekansa özgü modifikasyonlara izin veren, yapısına antikorlar, enzimler, manyetik parçacıklar veya flüoresan bileşikler eklenerek ilave işlevsellik kazandırılabilen ve özellikleri, ortam koşulları (örneğin, pH, iyonik kuvvet, ışık ve sıcaklık) modifiye edilerek değiştirilebilen peptidler, en dikkat çekici yapı bloklarıdır [2]. Amino asitlerin sayısı, türü ve dizisi değiştirilerek istenilen yapı ve fonksiyonlara sahip kendiliğinden montajlı peptidler (KMP)'i tasarlamak mümkündür. Peptidlerin kendiliğinden montajı, amino asit kalıntılarının belirli bir düzene göre gerçekleşen etkileşimleri ile ilgilidir. Bu nedenle amino asit dizisini dikkatlice seçip düzenleyerek istediğimiz ikincil yapıdaki bir peptid ve bunların kendiliğinden montajı ile yüksek stabilite ve fonksiyonelliğe sahip çeşitli nanoyapılar oluşturulabilir. Halkasal peptidler, amfifilik peptidler, kopolipeptidler, yüzey aktif madde benzeri oligopeptidler ve aromatik dipeptidler gibi bir çok peptid yapı bloğu, nanoveziküller, nanotüpler ve nanomiseller gibi supramoleküler yapıların üretilmesi ve bunların potansiyel uygulamalarının araştırılması için tasarlanmıştır [4]. KMP'lerin uygulama alanları incelendiğinde, bu yapıların ilaç salınımı, doku mühendisliği, antibakteriyel etkinlik, biyosensör vb. gibi uygulamalarda önemli bir role sahip olduğu görülmüştür.

Kendiliğinden Montajlı Peptidler

Bugüne kadar yapı blokları ve montaj mekanizmalarına göre farklı KMP sınıfları tanımlanmıştır. Bunlar içerisinde en fazla araştırılan KMP sınıfları aşağıda açıklanmıştır.

Amfifilik peptidler

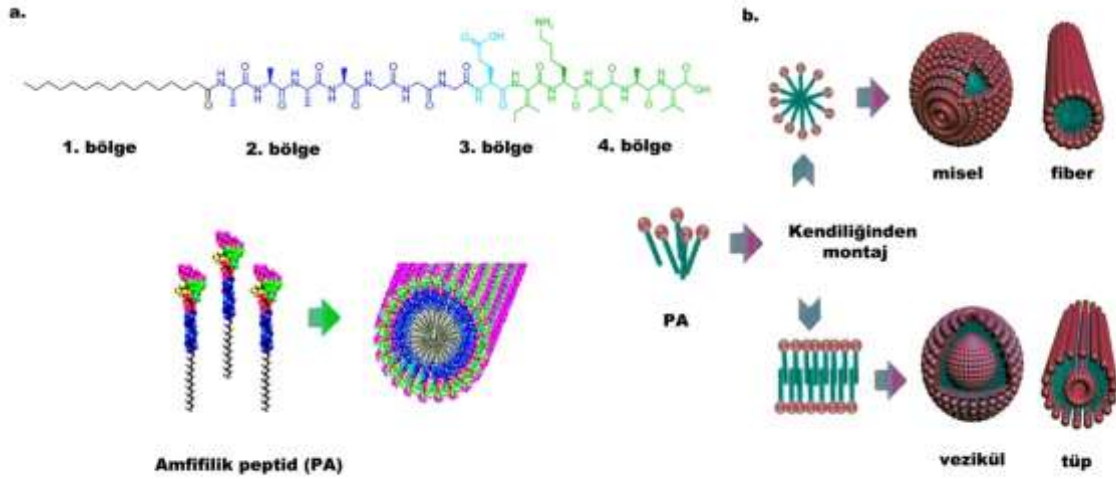
Amfifilik peptidler içerisinde, lineer peptidler, iyonik tamamlayıcı peptidler, uzun zincirli alkilenmiş peptidler, peptid fosfolipitler ve peptid bazlı kopolimerler yer alır [5]. Bu peptidler, hem kimyasal özellikleri (peptid dizisi, yük, konsantrasyon vb.) ve hem de fiziksel özelliklerine (boyut, şekil vb.) bağlı olarak kendiliğinden bir araya gelebilirler [6,7]. Amfifilik peptidler, genellikle hidrofilik peptid baş grupları ile çeşitli ikincil ve üçüncül konformasyonlar oluşturan hidrofobik kuyruklar içerir [8, 9].

Hidrofobik kuyruklu ve hidrofilik başlıklı doğrusal peptidler, kendiliğinden bir araya gelerek farklı nanoyapılar oluştururlar. Hidrofobik kuyruk içinde glisin (G), alanin (A), valin (V), lösin (L), izolösin (I) ve fenilalanin (F) gibi amino asitler, hidrofilik alanlarda ise aspartat (D), lizin (K), glutamat (E), arjinin (R) ve histidin (H) gibi amino asit kalıntıları bulunur [10]. Örneğin, A₆D, V₆D, G₄DD, G₆DD, G₈DD, A₆K ve KA₆ dizilerine sahip yüzey aktif özellik gösteren lipid benzeri peptidler kritik toplanma konsantrasyonuna (CAC) ulaştığında (örneğin, A₆D için CAC, 1.6 mM; A₆K için ise 1.5 mM) kendiliğinden montajlı nanoyapılar oluştururlar [11, 12, 13].

Tipik bir peptid amfifil (PA) molekülünün dört temel bölgeden oluşan kimyasal yapısı, sırasıyla; hidrofobik interaksiyonlar oluşturmak için tasarlanmış uzun bir alkil zincirinden oluşan bir hidrofobik kuyruk (1. bölge), moleküller arası hidrojen bağlarının oluşumunu sağlayan kısa bir peptid sekansı (2. bölge), yüksek seviyede çözünürlük sağlayan ve pH veya tuz konsantrasyonuna bağlı olarak kendiliğinden montajı indükleyen yüklü gruplar (3. bölge), hücreler veya biyomoleküller ile etkileşime girecek şekilde tasarlanmış oligopeptid dizilerden (4. bölge) oluşur (Şekil 1a).

Amfifilik peptidlerin sulu ortamda kendiliğinden birleşmesi en az üç ana kuvvet tarafından yönetilir. Bunlar: 1. alkil kuyruklarının hidrofobik etkileşimi, 2. yüklü gruplar arasındaki elektrostatik etkileşim ve 3. peptidler arasındaki hidrojen bağıdır. PA'nın kendiliğinden montaj yapısı bu kuvvetlerden her birinin dengeli bir katkısını yansıtır [14]. PA ünitelerinin kendiliğinden montajı, pH, sıcaklık, konsantrasyon ve diğer faktörlerin kontrolü ile de ayarlanabilmektedir. Bu durum, birçok faktöre karşı

duyarlı biyomalzemelerin üretimine imkan sağlamaktadır [5, 15, 16]. Biyolojik fonksiyonları yüzey aktif özellikler sayesinde artırılmış amfifil peptidlerin, tek tabakalı (ör., miseller) veya çok tabakalı (ör., veziküller) tasarımları büyük ilgi görmektedir (Şekil 1b).



Şekil 1 PA molekülünün kimyasal yapısı. a.1. bölge: hidroforik kuyruk, 2. bölge: β -tabaka oluşturan segment, 3. bölge: yükli gruplar, 4. bölge: biyoaktif epitop b. PA molekülünün tek tabakalı (misel) ve çok tabakalı (vezikül) tasarımları [14, 17]

İyonik-tamamlayıcı kendiliğinden montajlı peptidler

Nanolif oluşturan kendiliğinden montajlı iyonik-tamamlayıcı peptid ailesinin ilk üyesi EAK16 (n-AEAEAKAKAEAEAKAK-c)'dir. Bu peptid, yükli ve hidroforik yan gruplara sahiptir. Sulu ortamda, yükli taraf dışarıya, hidroforik taraf ise, nanoliflerin içine doğru yönelir [18, 19]. Bu arada, periyodik olarak tekrarlanan pozitif ve negatif yüklere sahip peptid dizileri, iyonik-tamamlayıcı kuvvetlerin etkisiyle stabil bir yapı oluşturur, daha sonra kendiliğinden birleşerek tipik β -tabaka şeklindeki agregatlara dönüşür ve nihayetinde bu β -tabaka'ların daha ileri derecede agregasyonu ile nanoliflerden oluşan bir hidrojel ağı meydana gelir [20, 21]. Bu hidrojeller, hidrojen bağları ve iyonik kuvvet nedeniyle geniş bir pH, sıcaklık ve organik çözücü aralığında oldukça kararlı olabilirler [22].

İyonik tamamlayıcılığa sahip olmak için, yüklerin dağılımı belirli düzende olmalıdır. Farklı tiplerde sıralama gösteren yük dağılımlarının tekrarlanması ile çok sayıda iyonik-tamamlayıcı peptid tasarlamak mümkündür [23, 24, 25]. İyonik tamamlayıcı peptidlerin en önemli özelliği yük dağılımlarının basit moleküler tasarımlarla değiştirilebilmesidir.

Bu sayede, ardışık tekrarlanan yüklere sahip peptid tipleri (Tip I, II ve IV) dışında, peptidlerin VE20, RF20 ve EHK16'da olduğu gibi tamamen negatif, tamamen pozitif veya düzensiz olacak şekilde tasarlanması da mümkün olabilmektedir [26]. Farklı iyonik-tamamlayıcı kendinden-montajlı peptid tiplerine aşağıda örnekler verilmiştir:

Tip I: - + - + - + - + (örneğin, peptid RADA16-I: n-RADARADARADARADA-c),

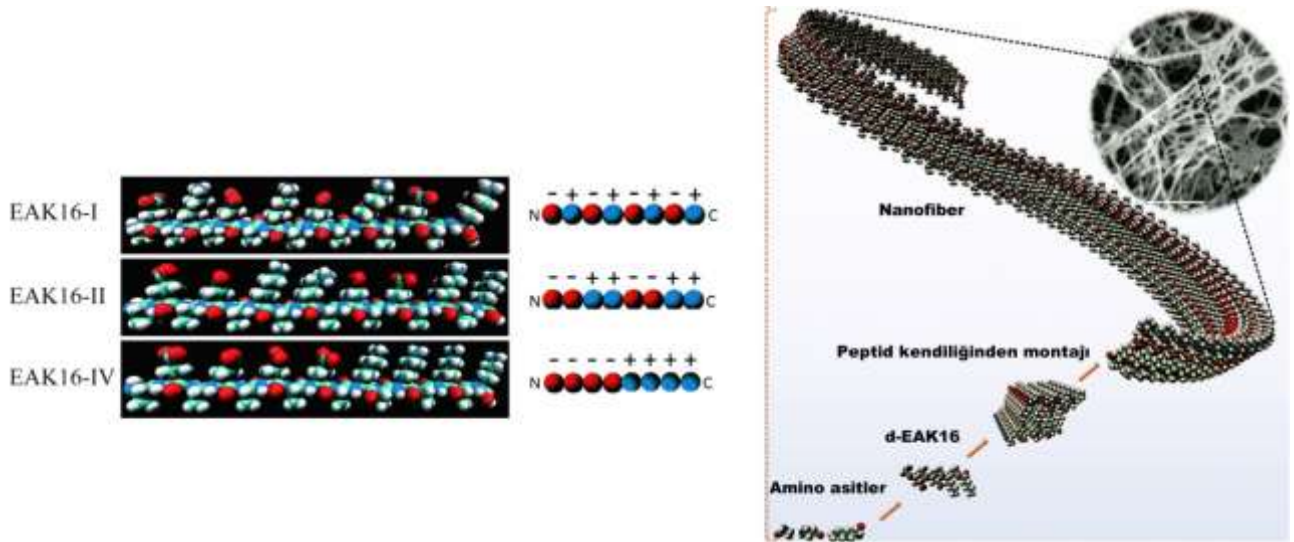
Tip II: - - ++ - - ++ (örneğin, peptid RADA16-II: n-RARADADARARADADA-c),

Tip IV: ----++++ (örneğin, peptid EAK16-IV: n-AEAEAEAEAKAKAKAK-c)

İyonik tamamlayıcı peptidlerin ikinci önemli özelliği, aynı yük dağılımının farklı amino asit kalıntıları kullanılarak elde edilebilmesidir. Örneğin, EAK peptidinin yapısındaki glutamik asit (E) ve lizin (K) kalıntılarının sırasıyla aspartik asit (D) ve arginin (R) ile değiştirilmesiyle DAR peptidi türetilir. Benzer şekilde, EAK'nın yapısındaki alanin (A) hidrofobik kalıntısının fenilalanin (F) veya lösin (L) ile değiştirilmesiyle, sırasıyla EFK ve ELK iyonik-tamamlayıcı peptidleri üretilebilir. Böylece, iyonik tamamlayıcı peptidlerin içsel özellikleri bu basit değişikliklerle kontrol edilerek, istenen supramolekülleri oluşturma eğilimi artırılabilir. İyonik tamamlayıcı peptidlerin üçüncü özelliği de, iyonik tamamlamanın belirli sayıda aminoasitle mümkün olmasıdır. Örneğin; Tip IV peptidlerini oluşturmak için gerekli olan minimum aminoasit sayısı 16 iken, Tip I ve Tip II peptidlerin oluşturulması için sırasıyla dört ve sekiz aminoasit kalıntısı gerekmektedir [26].

İyonik-tamamlayıcı peptidlerin son derece önemli olan bir özelliği de sulu çözeltide karakteristik β -tabakalar oluşturmalarıdır. Kısa amino asit sekanslarına sahip peptidler rastgele bobin yapıları oluşturma eğilimi gösterirken, Tip IV dağılımına sahip olanlar α -/ β -konformasyonel değişikliklerine karşı yüksek bir eğilim gösterir. İyonik tamamlayıcı peptidlerin oluşturduğu β -tabakalar, membran benzeri supramoleküller oluşturabilir. Fizyolojik koşullar altında son derece kararlı olan bu β -tabakalar, denatüre edici ajanlara bile dayanıklıdır. Örneğin, EAK16-II membranları, % 1 sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisinde 4 saatten fazla süreyle 90°C'ye kadar yüksek sıcaklıklara dayanabilir. Ayrıca, tripsin, α -kimotripsin, papain, proteaz K ve pronaz gibi birçok proteaza karşı dirençlidirler. Membranlar mekanik olarak da oldukça kararlıdır ve katı bir destek vasıtasıyla bir çözeltiden diğerine transfer edilebilir. Membranın bu olağanüstü stabilitesinin, kararlı β -tabakalarından kaynaklandığı düşünülmektedir [26].

Yüklü peptidler hücre tanıma ve biyolojik moleküllere bağlanma mekanizmalarında önemli bir rol oynarlar. İyonik-tamamlayıcı peptidlerin iki üyesi, EAK16-II ve RAD16-II'nin, memeli hücrelerinin yapışmasını destekleyen matrisler oluşturduğu bildirilmiştir. Çeşitli memeli hücre tipleri, hem RAD16 hem de EAK16 membran matrislerine bağlanabilir. Bu matrisler, *in vitro* hücre bağlanma mekanizmalarını analiz etmek için deneysel bir sistem oluşturduğu gibi doku yenilenmesi, doku nakli ve yara iyileşmesine yönelik *in vivo* çalışmalarda da kullanım potansiyeline sahiptir [20]. Ayrıca, iyonik tamamlayıcı KMP'lerin, kemik, kıkırdak, damar, kalp ve sinir sistemi dahil olmak üzere çeşitli dokularda hücre büyümesi ve farklılaşmasını destekleme amacıyla kullanılabilirliği gösterilmiştir [27, 28]. Örneğin, RADA16-I'in ticari formu olan PuraMatrix hücre büyümesini ve doku yenilenmesini desteklemek için kullanılmaktadır [24].

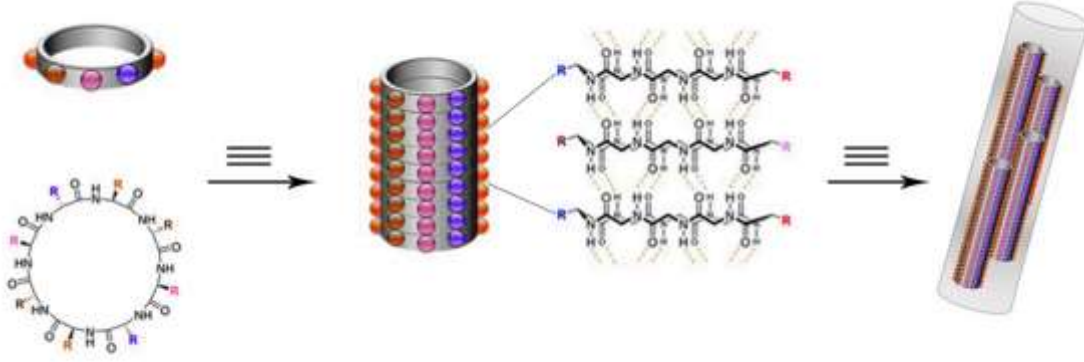


Şekil 2 İyonik-tamamlayıcı peptidlerin kendiliğinden montajı [29]

Halkasal peptidler

Tipik halkasal peptidler, ardışık tekrarlanan D, L tipi α -amino asitler, ardışık tekrarlanan α - ve β -amino asitler, ardışık tekrarlanan α -ve γ -amino asitler gibi kendiliğinden montaj olabilecek amino asitleri içerir [30, 31, 32, 33]. De Santis ve ark. [34] teorik olarak, ardışık tekrarlanan D- ve L-amino asitlerini içeren halkasal peptidlerin kendiliğinden nanotüpler halinde birleşebileceğini göstermişlerdir. Daha sonraki yıllarda Ghadiri ve

ark. [30] ilk kendiliğinden montajlı halkasal peptid olan siklo-(L-Gln-D-Ala-L-Glu-D-Ala)₂'yi sentezlemişlerdir. Araştırmacılar, bu heterokiral halkasal peptidlerin, birbirlerinin üstüne istiflenmesiyle içi boş nanosilindirler elde etmişlerdir. Kendiliğinden montaj, asidik ortamda tetiklenmiş ve halka şeklindeki oktapeptid birimlerinin hidrojen bağı etkileşimleriyle belirli bir çapa sahip nanotüp yapıları oluşturduğu gözlenmiştir [4].



Şekil 3 Halkasal D, L- α peptidinin kendiliğinden montajlı nanotüplerinin şematik gösterimi [35]

Aynı amino asit kalıntılardan oluşan doğrusal ve halkasal peptidlerin, kendiliğinden montaj sırasında farklı davranışlar gösterdiği belirtilmiştir. Yapılan bir çalışmada, triptofan ve arginin kalıntılarını içeren doğrusal peptidlerin düzensiz morfolojiler gösterdiği, halkasal muadilinin ise, küresel nanoyapılar oluşturduğu bildirilmiştir [36]. Başka bir çalışmada ise, [FR]₄, [FK]₄, [WK]₅, [CR]₄, [AK]₄ ve [WR]₄'ü içeren bir dizi halkasal peptidin kendiliğinden montaj davranışları kapsamlı olarak araştırılmıştır (F = fenilalanin, R = arginin, K = lisin, W = triptofan, C = sistein, A = alanin). Buna göre, kendiliğinden montajlı nanoyapıların, sulu çözelti içinde, optimum hidrofobiklik ve yük dengesi koşullarında molekül içi ve/veya moleküller arası etkileşimler yoluyla oluşabileceğini bildirmişlerdir. Tasarlanan [WR]₄ peptidi, belirli bir inkübasyon süresinden sonra oda sıcaklığında kendiliğinden montajlı nanoyapılar üretmiştir. [WR]₄'teki triptofanın indol halkasının, potansiyel hidrofobik etkileşimler oluşturarak kendiliğinden montaj işleminde kritik bir rol oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca, arginindeki pozitif yüklü guanidin grubunun, hidrojen bağı etkileşimlerine katıldığı bulunmuştur. Bununla birlikte, geriye kalan 5 halkasal peptidin, muhtemelen hidrofobik ve pozitif yüklü kalıntıların uygun olmayan kombinasyonundan dolayı kendiliğinden montajlı nanoyapılar oluşturamadığı belirtilmiştir. Kendiliğinden montaj işlemi üzerine halka

büyükliğünün rolünü araştırmak için, [WR]₄'ün türevleri, [WR]₃ ve [WR]₅ tasarlanmış ve test edilmiştir. TEM sonuçlarına göre tüm peptidlerin veziküler yapı gösterdiği halka büyüklüğü arttıkça boyutunun da büyüdüğü gözlenmiştir. Sonuçta, bu halkasal peptidlerin kendiliğinden montaj işlemini etkileyen başlıca üç faktörün; hidrofobik güç, kısmi β- yapılar arasındaki hidrojen bağları ve/veya triptofan kalıntıları arasındaki π-π etkileşimleri olduğu bildirilmiştir [37].

Hibrit peptidler

Peptidler; lipitler, polimerler, nükleikasitler, sakkaritler, aromatik gruplar, halojen elementler gibi çeşitli kimyasal gruplar ile birlikte hibrit peptid sistemlerini oluşturmaktadır. Peptidler, sadece aminoasit sekansları değiştirilerek değil, aynı zamanda N- veya C- ucuna bir cap molekülü ekleyerek veya peptid domainlerinin arasına bir linker yerleştirilerek de modifiye edilebilir. Bu modifikasyonlar, peptidlerin kendiliğinden montaj mekanizmalarını araştırmak ve peptid nanoyapıların yapısal özelliklerini kontrol etmek için kullanılmıştır [38, 39].

Tang ve ark. [40] fenilalanin ve glisin kalıntısının kombinasyonundan oluşan Fmoc-dipeptidlerin kendiliğinden montaj davranışlarını incelemiş ve yapının esneklik ve konformasyonun, amino asit tipi ve sekansından etkilendiğini ortaya koymuşlardır. Fmoc (floretilmetiloksikarbonil) grubu dışında, naftalin [41], fenotiyazin [42], piren [43], karboksibenzil [44], azobenzen [45, 46], naproksen [47] ve benzimidazol [48] grupları da, kendiliğinden montajı kolaylaştırmak için aromatik bir cap olarak N-ucuna eklenmektedir. Taurin ve naftalinin, FF dipeptidi (naftalin-FF-aurin) ile birleştirilmesi, sıcaklık, sonikasyon ve pH gibi montaj koşullarına bağlı olarak nanotüp, nanolif veya nanoribon oluşumuna yol açmıştır [41]. Başka bir çalışmada ise, fenotiyazinle konjuge edilmiş tetrapeptidlerin (-GFFY), 25 nm çapında uniform nanolifler oluşturduğu gözlenmiştir [42]. Ayrıca C- ucunun hidrofobikliği ve hidrojen bağlama kapasitesinin, bu uçtaki karboksilik asitin yerine, amid ve metil ester türevleri getirilerek ayarlanabileceği bildirilmiştir [49].

Kendiliğinden Montajlı Peptidlerin Kullanım Alanları

Bugüne kadar, kendiliğinden montaj mekanizmasını daha iyi anlayabilmek ve KMP nanoyapılarını, doku rejenerasyonu, ilaç salınımı ve biyosensörler gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanabilmek amacıyla çok sayıda araştırma yapılmıştır.

KMP'lerin esnek tasarım özellikleri, bu yapıların birçok alanda çeşitli amaçlarla kullanımına imkan tanımaktadır. Bu uygulamalardan bazılarında aşağıda yer verilmiştir.

İlaç salınımı

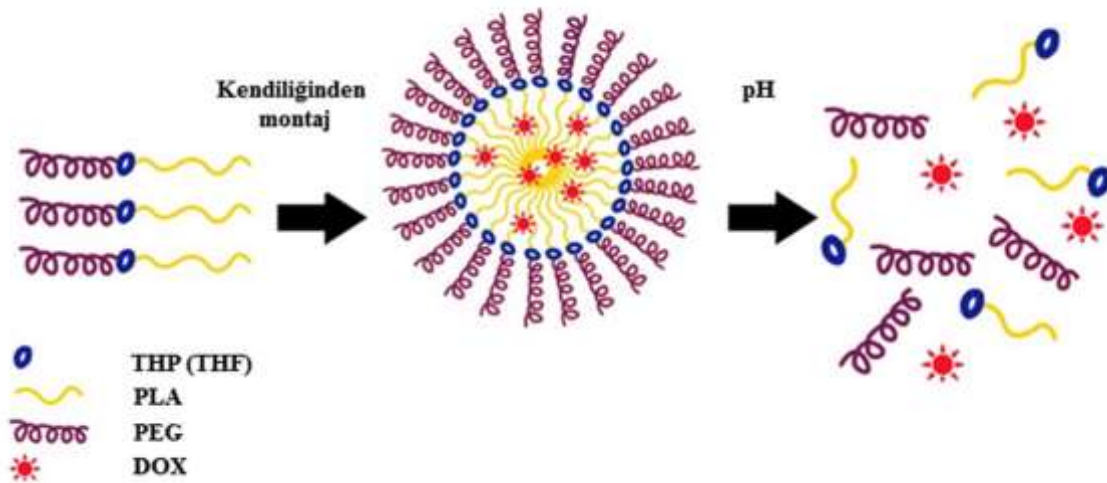
Geleneksel ilaçlarda karşılaşılan düşük çözünürlük, hızlı biyolojik bozunma, spesifik olmayan salınım gibi dezavantajlar, kontrollü ilaç salınım sistemlerine duyulan ihtiyacı artırmıştır. Terapötik ajanları içine hapseden bu sistemler, molekülleri, bozulmaya karşı korumakta, kontrollü ve uzun süreli salınımlara izin vererek ilacın etkinliğini arttırabilmektedir [50, 51, 52, 53]. İlaç dağıtım sistemi için geliştirilen akıllı nano taşıyıcıların, birçok hastalığın tedavisinde kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Webber ve ark. [54] anti-enflamatuar ilaç olan deksametazonu (Dex), uzun süreli ilaç salınımı elde etmek için bir amfifil peptid (C₁₆-V₂A₂E₂) ile konjuge etmişlerdir. *In vitro* çalışmalarda uzun süreli ve lokalize ilaç salınımı sağlamak için jel ağları oluşturan bu materyalin enjeksiyon bölgesinde sitoprotektif ve antiinflamatuar özellikler gösterdiği tespit edilmiştir. Bu nanofiber jeller, fizyolojik ortamda bir ay boyunca Dex'in sürekli salınımı sağlamıştır. Ayrıca faredeki *in vivo* çalışmalar, bu amfifil peptidin sistemik immün baskılama olmaksızın lokal akut enflamasyonunu büyük ölçüde azalttığını göstermiştir.

KMP nanoyapılar, mükemmel biyobozunurluk ve biyoyumlulukları nedeniyle, antikanser ilaç salınım uygulamalarında büyük bir ilgi görmüş ve bu yapılar sayesinde kanser tedavisinde ilerleme kaydedilmiştir. Enjekte edilebilir özellikte hidrojel oluşturan KMP nanolifler, kemoterapötik ilaçların hedeflenen kanser dokularına daha yüksek konsantrasyonlarda ulaşmasını sağlamaktadır. Ayrıca bu peptid hidrojeller, yavaş salınım hızlarından dolayı daha güvenli bulunmaktadır. Kendiliğinden montajlı peptid nanoyapılara yüklenmiş doksorubisin (DOX), kurkumin, fluorourasil ve paklitaksel gibi birçok antikanser ajanın, kanser tedavisindeki başarısı prelinik veya klinik deneylerde test edilmiştir [55, 56, 57].

Zhua ve ark. [58] tarafından yapılan bir çalışmada, pH'ya duyarlı tetrahidropiran (THP) veya tetrahidrofuran (THF) bağlantısı içeren bir amfifilik blok kopolimer tasarlanmıştır. Kapsüllenmiş ilaçların salınım hızının, pH değerine bağlı olduğu bulunmuştur. PLA-THP-PEG miseller için DOX salınım miktarı pH 5'de % 62 iken pH 7.4'te bu değerden yaklaşık dört kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı koşullar altında PLA-THF-PEG miselleri için salınım oranı ise, PLA-THP-PEG misellerininkinden biraz daha

yüksek bulunmuştur. Hücresel alım çalışması, DOX yüklü misellerin hücelere kolayca girebildiğini ve istenen farmakolojik etkiyi üretebildiğini ayrıca serbest DOX'un olumsuz etkisinin en aza indirildiğini göstermiştir. Bu bulgular, THP ve THF bağlı diblok kopolimer misellerinin, ilaç taşıyıcı bir aday olarak öne çıktığını göstermektedir (Şekil 4).

Hücre penetran peptidler (CPP'ler), lizinler ve /veya argininler bakımından zengin küçük (tipik olarak <20 amino asit) bir katyonik peptid sınıfıdır. Çoğu durumda, CPP destekli taşıma sisteminde, ilaç, hücre içinde zamanla salınmasına izin veren parçalanabilir bir bağlayıcı (linker) vasıtasıyla CPP'ye kimyasal olarak konjuge edilmiştir. Örneğin, insan bağışıklık yetmezliği virüsünden (HIV) türetilen ilk CPP, transkripsiyon transaktivatör (TAT) peptidi, küçük moleküller, peptidler, proteinler, oligonükleik asitler, nanopartiküller ve çeşitli tıropatik moleküllere membran penetrasyonlarını artırmak için konjuge edilen moleküler salınım aracıdır [59].



Şekil 4 KMP nanoyapıların ilaç salınım mekanizması. THP: tetrahidropiran, THF: tetrahidrofuran, PLA: polilaktikasit, PEG: poli etilen glikol, DOX: doksorubisin [58]

Zhang ve ark. [60] tarafından yapılan bir çalışmada, biyoaktif Tat peptidine hidrokarbon kuyruklar konjuge edildiğinde, β -tabakalı bir sekonder yapı kazandığı ve böylece 1D nanoyapıların oluşumuna yol açtığı rapor edilmiştir. Çalışmada farklı sayıda oktanoik asit (C8) kuyruğu taşıyan 3 Tat konjugatı (qC8-Tat, dC8-Tat ve mC8-Tat) sentezlenmiştir. Bu tasarımda kısa hidrofobik kuyrukların bir araya gelmesiyle hidrofobik alanın genişlemesi ve daha az kristalleşmesini sağlayarak ilaç yükleme kapasitesinin (DLC) artırılması amaçlanmıştır. Yumurtalık, meme ve diğer kanser

türleri için kullanımı onaylanmış hidrofobik bir ilaç olan paklitakselin (PTX) suda çözünürlüğünün zayıf olması nedeniyle genellikle nano ölçekli salınım araçları kullanılarak uygulanmaktadır. Moleküler yapı ünitesi olarak Tat'ın kullanıldığı supramoleküler nanolifler, PXT'in enkapsülasyonunda kullanılmış ve ilaç yükleme kapasitesinin yükseldiği tespit edilmiştir. İncelenen Tat peptidleri arasında 4 adet C8 kuyruğu taşıyan qC8-Tat'ın pH 7.4'te sulu çözelti içerisinde nanotüpler oluşturan, enkapsülasyon etkinliği en yüksek peptid olduğu bildirilmiştir.

Doku mühendisliği

Doku rejenerasyonu uygulamalarında kullanılan nanotüp veya nanolif yapıdaki KMP'ler, hasarlı bölgelerde, üç boyutlu bir geometride hücre üretimi ve hücre dışı matriks (ECM) oluşumu için bir iskele oluşturabilmektedir [51, 61, 62]. Yapılan bir çalışmada, kıkırdak rejenerasyonunu artırmak için, KLD12 peptidi (KLDLKLKLDL) tarafından oluşturulan bir hidrojel iskelesi geliştirilmiş ve birincil sığır kondrositleri ile birlikte 4 hafta kültüre alınmıştır. Bu süreçte peptid hidrojelinde kültürlenmiş kondrositlerin morfolojik yapılarını korudukları ve proteoglikanlarca zengin kıkırdak benzeri ECM ve stabil bir kondrosit fenotipinin göstergesi olan tip II kollajen ürettikleri gözlenmiştir. ECM'nin zamana bağlı olarak biriktikçe yeni dokunun mekanik olarak işlevselliğini gösteren materyal sertliğinin de arttığı bulunmuştur. Bu sonuçlar, kendiliğinden montajlı KLD12 peptid hidrojelinin, kıkırdak dokusu onarımında, kıkırdak benzeri ECM'nin sentezi ve birikimi için bir iskele olarak kullanılabileceğini göstermiştir [63].

Hosseinkhani ve ark. [64] mezenkimal kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını, peptid amfifil (PA) moleküllerinin kendiliğinden montajı ile oluşturulan üç boyutlu (3D) bir nanolif ağı içerisinde incelemiştir. Bu amaçla katı faz kimyası ile sentezlenmiş PA'lara, evrensel hücre tanıma motifi arginin-glisin-aspartik asit (RGD) dizisi eklenmiştir. Sonuçta kendiliğinden monte edilmiş PA nanoliflerinin, mezenkimal kök hücrelerin bağlanması, çoğalması ve osteojenik farklılaşmasını pozitif yönde etkilediği ve doku rejenerasyonunda kullanım potansiyelinin olduğu bildirilmiştir.

Bu gibi doku mühendisliği uygulamalarına yönelik biyomalzemelerin geliştirilmesinde bazı spesifik peptid motiflerinin önemli bir rol oynadığı ve peptid amfifillerinin bu alanda yüksek bir potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir [65, 16]. Örneğin, Hartgerink ve ark. [66] yapay kemik sentezi için ümit verici bir peptid-amfifil tasarlamışlardır. Beş

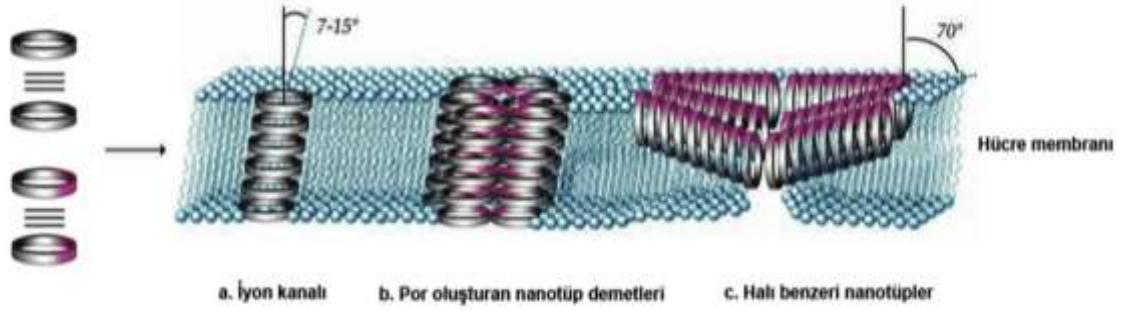
bölgeden oluşan bu amfifil peptid sırasıyla; (1) moleküle hidrofobik karakter kazandıran 16 karbonlu bir alkil kuyruğu; (2) nanoyapıları disülfid bağları vasıtasıyla stabilize eden dört sistein kalıntısından oluşan bir dizi; (3) esnek bir bağlantı sağlayan üç glisin kalıntısı; (4) hidroksiapatitin biomineralizasyonu için fosforile edilmiş tek bir serin kalıntısı; ve (5) bir hücre adezyon grubu olan RGD'yi içermektedir. Molekülün peptid ucu, biomineralizasyonu düzenlemek için tasarlanmıştır. Kemik oluşumunda mineralizasyon olarak bilinen işlemde hidroksiapatit kristalleri kalsiyum ve fosfat iyonlarının birikmesi ile oluşmaktadır. Fosforile edilmiş bir serin sentetik amfifilik peptid kompleksi ile birleştirildiğinde, hidroksiapatit kristalleri oluşturmak için kalsiyum ve fosfat iyonlarını çekme ve düzenleme işlevi görmektedir. Araştırmacılar ayrıca, peptidin C-terminaline bir hücre adezyon motifi olan arginin-glisin-aspartik asit (RGD) ekleyerek sentetik amfifilik peptid kompleksini işlevselleştirmişlerdir. Bu peptid-amfifil moleküllerin kendiliğinden birleşmesiyle oluşturdukları nanolifler, hidroksiapatit kristallerinin büyümesi için kemik dokusundaki kollajen liflerini taklit eden bir ortam sağlamaktadır [67].

Kendinden montajlı sentetik amfifiller ve peptid hidrojellerin, titanyum yüzeyler üzerinde osteoblastların düzenlemesi ve kontrol edilmesi amacıyla kullanılabileceği bildirilmiştir. Moleküler tasarım yoluyla yüksek oranda biyoaktif özellik kazandırılan PA nanolifler, inert bir titanyum köpüğünün potansiyel olarak biyoaktif bir implanta dönüştürülmesinde kullanılabilir. Örneğin dental implantlarda biyoaktif implant yüzeyleri oluşturmak amacıyla gözenekleri PA nanolifler ile doldurulmuş Ti-6Al-4V köpüğünden oluşan bir hibrid implant materyali hazırlanmıştır. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve konfokal mikroskop kullanarak, PA'ların metal köpük içinde kendiliğinden birleşerek nanolif yapısında bir matriks oluşturduğu ve köpüğün gözeneklerini tamamen doldurduğu gözlenmiştir. Ayrıca, bu yapının, hücrelerin biyoaktif matriks içinde enkapsülasyonuna izin verdiği ve uygun koşullar altında nanoliflerin, Ca:P oranına bağlı olarak hidroksiapatitin başlangıç çekirdeklenmesine katkı sağladığı bildirilmiştir. Sonuçta, PA-Ti hibrid stratejisinin, mineralleşmeyi başlatmak ve konak dokudan gözenekli implantlara hücre sel yanıtı yönlendirmek ve böylece implantların fiksasyonunu, osteointegrasyonu ve uzun süreli stabilitesini arttırmak için potansiyel bir yöntem olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir [68].

Antimikrobiyal uygulamalar

Doğal savunma sisteminin bir parçası olarak, antimikrobiyal peptidler farklı organizma türlerinde yaygın olarak bulunmuştur. Antimikrobiyal peptidler, prokaryotlardan insanlara kadar hemen hemen tüm canlılar tarafından doğal olarak üretilen, mikroorganizmalara karşı inhibitör etkili bileşiklerdir. Antimikrobiyal peptidler genellikle, bakteri hücre membranıyla etkileşerek hücre geçirgenliğinin bozulmasına ve böylece hücrenin ölümüne sebep olmaktadır. Antimikrobiyal peptidlerin (AMP) bakteriyel membranlarla etkileşimlerinde, peptid dizisinin büyüklüğünün, hidrofobikliğinin, amfifilikliğinin, net yükünün ve ikincil yapısının etkili olduğu gösterilmiştir [69, 70, 71, 72]. Bugüne kadar AMP'lerle ilgili yapılan araştırmalar monomerik AMP'lerin bakteriyel membranlarla olan etkileşimi ve membranların selektif olarak deformasyonuna yönelik peptid dizaynı üzerinde yoğunlaşmıştır [73]. Ancak, son yıllarda yapılan araştırmalar, AMP'lerin, antimikrobiyal aktivitesinde kendiliğinden montaj mekanizmasının da etkili olduğunu göstermektedir. Örneğin, Schnaider ve ark. [74] antibakteriyel supramoleküler polimer oluşturmak için minimal motif olarak kullandıkları difenilalaninin antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Kendiliğinden montajlı difenilalanin nano yapılarının bakteri morfolojisinde önemli derecede bozulmaya yol açtığı, membran geçirgenliği ve depolarizasyonuna neden olduğu ve bakteriyel gelişmeyi tamamen inhibe ettiği gösterilmiştir.

Antimikrobiyal peptidlerin etki mekanizmalarını açıklamak için çeşitli modeller mevcut olmakla birlikte “namlu gözenek” ve “halı benzeri” mekanizma öne çıkmaktadır. Namlu gözenek mekanizmasında peptidler, hidrofilik bir por oluşturan küçük demetler halinde transmembranal olarak yerleşirken, halı benzeri mekanizmada, membran yüzeyine paralel uzanırlar ve böylece membran özelliklerini değiştirirler. Bunların dışında toroidal gözenek veya düzensiz toroidal gözenek gibi bazı ek modeller de önerilmiştir, ancak bunlar yukarıda belirtilen iki mekanizmanın ara modelleri olarak kabul edilmiştir. Şekil 5'de gösterilen lipit çift tabakasındaki nanotüp organizasyonu, halkasal peptidin yapısına bağlıdır. Amfipatik yapıdaki peptidin non-polar kalıntıları, lipit çift tabakasındaki fosfolipidlerin hidrokarbon zincirleri ile etkileşime girerken, katyonik ve hidrofilik kalıntıları fosfolipidlerin baş kısmı veya sulu ortam ile etkileşim içerisindedir [75].



Şekil 5 Halkasal peptidlerin lipit çift tabakasında nanotüp organizasyonu. Hidrofilik bölgeler mor ve hidrofobik bölgeler ise gri renkte gösterilmiştir. a. iyon kanalı, b. por oluşturan nanotüpler (namlu-gözenek modeli), c. halı benzeri modelde nanotüplerin membrana yerleşimi [75]

Peptid nanotüpler, tübüler yapıya sahip supramoleküler nanobiyomalzemelerdir. Halkasal peptidlerin kendiliğinden montajı, membranlardaki iyon kanallarını taklit eden transmembran gözenekler oluşturabilirler. Membran üzerindeki nanotüp oryantasyonu, halkasal peptidin yapısına bağlıdır. Öyleki, tüm hidrofobik halkasal peptidler, membrana dik şekilde yönlendirilmiş nanotüpler oluşturarak lipit tabaklarla van der Waals etkileşimlerini en üst düzeye çıkarmaya çalışırken, amfifilik halkasal peptidler ise, membrana paralel uzanan nanotüpler oluşturur. Yapılan deneyler, sub-letal konsantrasyonlardaki peptidlere uzun süre maruz kaldıktan sonra bile *S. aureus*'un direnç geliştirmedeğini göstermiştir. Bu durum peptidlerin bakteri membranının birden fazla bileşeni ile etkileşime girmesi ile açıklanmıştır [75].

Veiga ve ark. [72] kendiliğinden montajlı arjinince zengin β -hairpin peptidlerinden oluşan hidrojelleri incelemiş ve bunların çoklu ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa* dahil olmak üzere hem Gram-negatif ve hem de Gram-pozitif bakterilere karşı kuvvetli antimikrobiyal aktivite gösterdiklerini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, 8 arjinin kalıntısı içeren PEP8R hidrojeli, mükemmel antibakteriyel özelliğe sahip olmakla birlikte, insan kırmızı kan hücrelerine (hRBC) de litik aktivite gösterdiğinden, arjinin kalıntıları lizin ile değiştirilerek üç peptid (PEP6R, PEP4R ve PEP2R) daha tasarlanmıştır. Hücre bazlı deneyler, arjinin içeriğinin azaltılmasının hemolitik aktivitede belirgin, antibakteriyel aktivitede ise hafif bir düşüşe yol açtığını göstermiştir. Bunlardan PEP6R (VKVRVRVRV^DPPTRVRVRVKV) peptidinden oluşan PEP6R jelinin, bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal etki gösterirken, insan eritrositleri ve

memeli mezenkimal kök hücrelerine karşı sito-uyumlu olduğu ve reolojik olarak enjekte edilebilir özellik gösterdiği tespit edilmiştir.

Benzer şekilde, Salick ve ark. [76] MAX1 (VKVKVKVK(dV)PPTKVKVKVKV-NH₂) peptidinin kendiliğinden birleşmesinden elde edilen hidrojelleri araştırmışlar ve sonuçta bu jellerin Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir aktiviteye sahip olduğunu göstermişlerdir. Membran geçirgenlik analizleri ve canlı-ölü testleri, MAX1 hidrojellerinin bakteriyel membran bozulmasına neden olduğu ancak memeli fibroblastlarına veya insan eritrositlerine karşı düşük toksisite sergilediğini göstermiştir. Başka bir çalışmada ise Salick ve ark. [77] MAX1 ve MARG1 (VKVKVRVK(dV)PPTKVKVRVKV-NH₂) peptidlerinin kendiliğinden birleşmesiyle oluşturulan hidrojelleri karşılaştırmış ve her iki peptidin de metisiline duyarlı *S. aureus*'a (MSSA) karşı etkili olduğu, ancak sadece MARG1'in metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)'a karşı güçlü antimikrobiyal etki gösterdiğini bulmuşlardır. Bu durum, arginin kalıntılarının lizin kalıntılarına kıyasla daha güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

Lombardi ve ark. [78] tarafından yapılan bir çalışmada, bir AMP dizisinin antibakteriyel etkinliklerini arttırmak için kendiliğinden montajlı antimikrobiyal peptidler tasarlanmıştır. Bu amaçla sıradışı bir deniz canlısı olan hagfish'in epidermal mukusundan izole edilen miksinidin'in bir türevi olan, antibakteriyel WMR peptidi (13-amino-asitlik peptid: NH₂-WGIRRLKYGKRS-CONH₂), bir peptid amfifili (WMR-PA) elde etmek için lipidik bir kuyruk (C₁₉H₃₈O₂) içeren ve alifatik kalıntılardan (AAAAAAA) oluşan bir peptid segmentine bağlanmıştır. Kendiliğinden montajlı WMR-PA'ların antibiyofilm aktivitesi incelenmiş ve WMR ile karşılaştırılmıştır. Çalışma kapsamında ayrıca hidrofobik kuyruk içeren ancak AMP dizisini içermeyen daha kısa PA'lar tasarlanmış ve WMR peptidi ile karşılaştırılmıştır. PA'ların, stabil nanolif yapılar şeklinde kendiliğinden toplandıkları ve bu nanomontajların, *P. aeruginosa* (Gram-negatif bakteriler) ve *C.albicans*'ın biyofilm oluşumunu WMR peptidine kıyasla önemli ölçüde inhibe ettiği ve hali hazırda oluşturulmuş biyofilmleri de yok ettiği görülmüştür. Medikal implantlarda bakteriyel tutunma ve biyofilm oluşumundan kaynaklanan enfeksiyonlarda özellikle antibiyotiklere karşı bakteri direncinin ortaya çıkmasıyla yaşanan ciddi zorluklar düşünüldüğünde, antibakteriyel

aktiviteye sahip peptid bazlı supramoleküler yapıların biyomedikal uygulamalar için yenilikçi bir strateji oluşturduğu sonucuna varılmıştır.

Liu ve ark. [79] tarafından, hidrofilik kısmı bir TAT peptidi ile birlikte altı arginin ve üç glisin kalıntısından oluşan ve hidrofobik kısmı ise kolesterol içeren kısa bir amfifilik peptid (CG3R6TAT) tasarlanmıştır. Tasarlanan amfifilik peptidin kendiliğinden montajı ile oluşan ve merkezinde kolesterol bulunan çekirdek-kabuk yapıları nanopartiküllerin antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Bu nanopartiküllerin, çoklu ilaç dirençli bakteriler dahil olmak üzere çeşitli gram pozitif bakteriler ile bazı küf ve maya türlerinin gelişmesini etkili bir şekilde inhibe eden geniş bir antimikrobiyal etki spektrumuna sahip olmakla birlikte nispeten düşük hemolitik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Antimikrobiyal etkinin, pozitif yüklü nanopartiküllerin, elektrostatik çekimler yoluyla mikrobiyal yüzeylerle kolayca etkileşime girerek, hücre duvarına zarar vermesi veya hücre duvarı sentezini inhibe etmesi neticesinde oluştuğu bildirilmiştir.

Hidrojeller

Hidrojeller, bünyesine yüksek oranda su alarak “şişme” özelliği gösterebilen çapraz bağlı polimerik ağı yapılar olarak tanımlanır. Hidrojel oluşumu sıcaklığa, pH'ya, polimer veya tuz konsantrasyonuna bağlıdır. Hidrojeller, homopolimerler, kopolimerler veya çoklu polimer ağları kullanılarak doğal dokuya benzer mekanik özelliklerde tasarlanabilirler [80].

Kendiliğinden montajlı peptid hidrojelleri, mükemmel biyoyumluluk ve biyobozunurluk gibi çeşitli avantajları nedeniyle ilaç salınımı, doku mühendisliği ve antitümör tedavisi gibi uygulamalarda öne çıkmıştır. Peptidlerin, hidrojen bağı, hidrofobik veya elektrostatik etkileşimler, polimer-nanopartikül (NP) etkileşimleri gibi kovalent olmayan etkileşimler yoluyla kendi kendine montajı, esnek mekanik özellikte fonksiyonel hidrojellerin geliştirilmesine neden olmuştur [16].

Poli-L-lisin, (PLL), mükemmel biyoyumluluğa sahip katyonik bir biyomakromoleküldür. Genellikle hücre zarlarından (negatif yüklü) penetrasyonun artırılması için kullanılır. Fibröz hidrojeller şeklinde kendiliğinden monte olabilen, ancak zayıf mekanik özellikleri nedeniyle enjeksiyon uygulamalarında kullanımı sınırlı olan negatif yüklü dipeptid N-florenilmetoksikarbonil difenilalanin (Fmoc-FF) ile pozitif yüklü PLL arasındaki elektrostatik etkileşimler, istenen reolojik özelliklere sahip enjekte edilebilir hidrojellerin oluşumuna yol açmıştır. Böylece supramoleküler

organizasyon ve mükemmel viskoelastik davranışlar sergileyen yeni enjekte edilebilir malzemelerin tasarımı ve üretimi için alternatif bir yaklaşım geliştirilmiştir [81].

Hücre kültürü çalışmalarında Fmoc-RGD hidrojellerinin, fibroblastları desteklemek için kullanılabileceği gösterilmiştir. Bu amaçla kullanılan peptid hidrojelleri, hücre dışı matriksi taklit etmeli ve peptid yapışma motiflerini içermelidir. RGD, bu amaçla kullanılan en yaygın peptid dizilerinden biridir. Yapılan bir çalışmada, bir Fmoc-RGD peptidinin β -tabaka sekonder yapı oluşturduğu ve amiloid fibriller şeklinde kendiliğinden toplandığı gösterilmiştir. Bu Fmoc-RGD hidrojelinin, hücreleri tutabildiği ve fibroblastları destekleyebildiği tespit edilmiştir [82].

Naftalen ile konjuge edilmiş kendiliğinden montajlı bir antimikrobiyal peptid (naftalen-2-1) -asetil-difenilalanin-dilisin-OH (NapFFKK-OH) hidrojelinin klinik kaynaklı Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin planktonik hücre ve biyofilm formlarına karşı antibakteriyel etki gösterdiği kanıtlanmıştır [83]. Burada aromatik hidrojelatör olarak Fmoc yerine daha güvenli olduğu düşünülen naftalen kullanılmıştır. Ayrıca yapılan bir çalışmada NapFFKK-OH'ın geniş bir spektrumdaki klinik fungal (*Aspergillus niger*, *Candida glabrata*, *C. albicans*, *Candida parapsilosis* and *Candida dubliniensis*) suşlar üzerinde etkili, antifungal hidrojel oluşturma özelliğine sahip olduğu gösterilmiştir. Böylece, NapFFKK-OH'ın enfekte olmuş bölgelere uygulanacak antifungal ilacın konsantrasyonunu düşürerek tedavide mantar izolatlarının direnç geliştirme riskini azaltacağı bildirilmiştir [84].

Sıcaklık, pH, enzim, iyonik kuvvet, elektrik ve manyetik alanlar ve ışık gibi dış uyarılarla kontrol edilebilen geri dönüşümlü kendiliğinden montajlı peptid bazlı hidrojeller biyomedikal uygulamalar için büyük bir potansiyele sahiptir. Verma ve ark. [85] veziküler mikro yapılar oluşturan bir tetrapeptid, PWWPn'in kendiliğinden monte olduğunu ve veziküllerin rhodamin B boya moleküllerini tutabildiğini ancak KCl'nin (0.25 mM) eklenmesi ile veziküller yapının bozulduğunu bildirmiştir. Tine ve ark. [86] sıcaklığın RWDW peptidinin kendi kendine montajı üzerindeki etkisini incelemiş ve sıcaklık artışı ile daha küçük çaplı nanolifler oluştuğunu bulmuştur. AFM sonuçları, bu peptidin 15°C'de kendiliğinden bir araya gelmesi ile yoğun bir nanolif ağı oluşurken, 35°C'de seyrek küresel ve fibriler yapılar şeklinde toplandıklarını göstermiştir.

Enkapsülasyon

Nanometrik boyuttaki moleküler kapsüllerin ortaya çıkışı, kimya, nanoteknoloji ve malzeme bilimi alanları için devrim niteliğinde bir gelişmedir. Bu kendiliğinden montajlı nanokapsüller, küçük alt ünitelerin birleşmesiyle üretilen boş yapılar olup konuk moleküller bu kapalı yapının iç boşluğuna hapsedilir. İyonik-tamamlayıcı KMP'lerin peptid sekansındaki hidrofilik ve hidrofobik kalıntılar arasındaki denge değiştirilerek yükleme ve boşaltma kapasitesini arttırmak mümkün olabilmektedir. Bu nedenle KMP'ler, ilaç ve gen terapisi uygulamalarında etkili bir biyo-uyumlu koloidal stabilizatör olarak işlev görebilmektedir. Ayrıca bu yapılar sıcaklık, pH, enzim, iyonik kuvvet, elektrik ve manyetik alanlar ve ışık gibi dış uyarılarla kontrol edilebilmeleri nedeniyle de biyomedikal uygulamalar için büyük bir potansiyele sahiptirler [26, 87].

İyonik-tamamlayıcı peptidlerin, hidrofobik bileşikler kolayca kapsüllediği ve sulu ortamdaki çözünürlüklerini arttırdığı gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada piren, düşük çözünürlüğü ve iyi karakterize edilmiş floresans özelliği nedeniyle model bir hidrofobik ilaç molekülü olarak kullanılmıştır. Kendinden montajlı EAK16-II peptidinin, sulu çözelti içerisinde piren ile kararlı kompleksler oluşturduğu ve çözünürlük kapasitesini 10.000 kat kadar artırdığı tespit edilmiştir. Sonuçta bu çalışma kendinden montajlı EAK16-II'nin sulu çözeltide hidrofobik bir ilaç molekülünü stabilize ederek lipofilik bir ortama salabileceğini ve transfer hızının da peptid/piren oranı ayarlayarak düzenlenebileceğini göstermiştir [26, 88].

Kapsüllenmiş bir ilaç, peptid matriks içinde dağılmış moleküller şeklinde olabileceği gibi bir peptid kılıf ile kaplanmış mikro kristal şeklinde de bulunabilmektedir. Kapsüllenmiş ilacın bu yapısal formu, ilacın aktivitesini etkilemektedir. Kristal formunda kapsüllenen ilaçlar, kristal içindeki lokal konsantrasyonun yüksek olması nedeniyle, daha yüksek aktivite gösterirler [26, 89].

Supramoleküler kapsüllerin montajında esas olarak hidrojen bağı, metalloporfirin koordinasyonu ve hidrofobik etkileşimler gibi stratejiler kullanılmaktadır. Ozores ve ark. [87] tarafından yapılan bir çalışmada β - tabaka yapılı iki halkasal peptidin kendiliğinden montajına dayanan bir moleküler kapsül tanımlanmıştır. Zn-porfirin kapaklar taşıyan kendiliğinden montajlı bu α, γ -halkasal peptid dimerinin oluşturduğu supramoleküler kapsül, uygun büyüklükte bipiridin bazlı ligandları tanıyabilmekte ve

kapsülleyebilmektedir. Bu yapıdaki dinamik hidrozon bağlarının tersinirliği sayesinde kapsüllenmiş ligandlar serbest bırakılabilmektedir.

Sulu ortamdaki peptid amfifillerinin (PA) hidrofobik çekirdekli, yüksek en-boy oranlı silindirik nano lifleri oluşturduğu bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada hidrofobik blok olarak kolesterol veya palmitik asit, hidrofilik blok olarak da biyolojik adhezyon epitopu RGDS kullanılarak, kendiliğinden toplanan PA nanoliflerin içinde küçük bir hidrofobik molekül olan pirenin kapsüllemesi incelenmiştir. Supramoleküler yapıların oluşumunu karakterize etmek için dairesel dikroizm (CD) ve transmisyon elektron mikroskopu (TEM) kullanılmış ve sonuçta pirenin hidrofobik çekirdekler içinde kapsüllendiği ve biriktiği gösterilmiştir [90].

Başka bir çalışmada, bir antikanser ilaç olan kurkumin, kemik kanseri hücrelerini (MG-63 osteosarkomu) seçici olarak inhibe etmek amacıyla kendiliğinden birleşebilen bir peptid olan "C18GR7RGDS" ile enküpsüle edilmiştir. Fourier transform infrared, kızılötesi ve X ışını kırınım spektroskopik analizleri, kurkuminin, peptid nanopartiküllerinin hidrofobik çekirdeğinde kapsüllenmiş olduğunu göstermiştir. Ayrıca, sağlıklı kemik hücrelerine kıyasla kurkumin yüklü peptid nanopartikülleri, kemik kanseri hücrelerine karşı seçici sitoksisite göstermiştir [91].

Nanosensörler

Kendiliğinden monte edilen peptidlerin, biyomoleküller veya metalik nanoparçacıklar ile birleştirilmesiyle oluşan nanotüpler, yüksek hassasiyet ve seçiciliği olan biosensörler olarak görev yapabilir. Örneğin, metal iyonlarını tespit etmek amacıyla, lineer veya dallanmış alkil zincirler (sırasıyla 1 veya 2) içeren ve kendiliğinden monte olabilen, histidin bakımından zengin peptidler (HGGHGHGGGHH,HG12) piren ile etiketlenmiştir. Peptidlerin her iki formu da (1 veya 2) sulu ortamda nanolif oluşturma eğilimi göstermiştir. Her iki peptidin oluşturduğu supramoleküller, metal iyonlarına karşı farklı afinite göstermişlerdir. Histidinle (HG12 sekansı) kaplanmış nanolifler Cu^{+2} 'ya spesifik olarak bağladığından floresans ışımaya bloke edilmiştir. Öte yandan, Ag^{+} 'nin saptamasında ışıkla indüklenen elektron transferinin (PET) inhibisyonu nedeniyle, dallanmış alkil zincirler içeren peptidlerin (2. grup) düşük konsantrasyonunda bile floresan ışımaya gözlenmiştir. Bu sonuçlar nanoliflerin hücre içi görüntüleme çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir [92].

Sonuç

Peptid bazlı supramoleküler nanoyapılar son yıllarda mükemmel biyouyumlulukları ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Bu amaçla, aromatik dipeptidler, yüzey aktif madde benzeri peptidler ve halkasal peptidler dahil olmak üzere pek çok peptid bazlı yapı bloğu tasarlanmış ve supramoleküler nanoyapıların oluşturulmasında kullanılmıştır. Bu çok yönlü nano ölçekli yapılar yeni bir nanomalzeme sınıfı olup çok sayıda araştırmacıya, biyonanoteknoloji, doku mühendisliği, rejeneratif tıp ve diş hekimliği gibi alanlarda ilham kaynağı olmuştur. Bu peptidlerin biyomateryaller olarak cazip seçenekler sunmasında; kolayca sentezlenebilmeleri ve çeşitli bileşikler eklenerek ilave işlevsel özellikler kazandırılabilmesi etkili olmuştur. Kendinden montajlı moleküler sistemlerin, bazı karmaşık ve önceden saptanamayan biyolojik olayları incelemek için de yeni fırsatlar sunacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak genel bir yaklaşımla değerlendirildiğinde başta peptidler olmak üzere biyolojik yapı taşlarının yeniden tasarım ve kendiliğinden montajına dayanan moleküler mühendisliğin, gelecekte farklı disiplin ve sektörlerdeki sorunların çözümüne yönelik yenilikçi yaklaşımlar geliştireceğine ve yaşamımızı kolaylaştıracak yeni olanaklar sunacağına inanılmaktadır.

Kısaltmalar

CD: Dairesel Dikroizm; CPP: Hücre penetran peptidler; Dex: Deksametazon; DOX: Doksorubisin; ECM: Hücre dışı matriks; Fmoc: Florenilmetiloksikarbonil; hRBC: İnsan kırmızı kan hücreleri; KMP: Kendiliğinden montajlı peptidler; MRSA: Metisiline dirençli *S. aureus*; MSSA: Metisiline duyarlı *S. Aureus*; Nap: Naftalen; PA: Peptid amfifilleri; PEG: Poli etilen glikol; PLA: Polilaktik asit; PTX: Paklitakselin; RGD: Arginin-glisin-aspartik asit; SEM: Taramalı Elektron mikroskobu; SDS: Sodyum dodesil sülfat; TAT: Transkripsiyon transaktivatör; TEM: Transmisyon elektron mikroskobu; THF: Tetrahidrofur; THP: Tetrahidropiran.

Kaynaklar

1. Whitesides, G., J. Kriebel, and B. Mayers, Self-assembly and nanostructured materials. In Nanoscale Assembly. editör: Springer, Boston, MA., 2005. p. 217–238.
2. Habibi, N., et al., Self-assembled peptide-based nanostructures: Smart nanomaterials toward targeted drug delivery. Nano Today, 2016. 11(1): p. 41–60. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2016.02.004>.
3. Ateş, H., ve E. Bahçeci, Nano Malzemeler için Üretim Yöntemleri. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Part C: Tasarım ve Teknoloji, 2015. 3(2): p. 483-499. <<https://dergipark.org.tr/tr/pub/gujsc/issue/7467/98323>>.
4. Mandal, D., A.N. Shirazi, and K. Parang, Self-Assembly of Peptides to Nanostructures. Organic and Biomolecular Chemistry, 2014. 12(22). doi: 10.1039/c4ob00447g. Epub 2014 Apr 23.
5. Lowik, D., and J.C.M. Van Hest, Peptide based amphiphiles. Chemical Society Reviews, 2004. 33(4): p. 234–245. DOI: 10.1039/b212638a.

6. Antonietti, M., and S. Forster, Vesicles and liposomes: a self-assembly principle beyond lipids. *Advanced Materials* Deerfield, 2003. 15(16): p. 1323–1333. DOI: 10.1002/adma.200300010.
7. Liu, L., et al., The role of self-assembling polypeptides in building nanomaterials. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2011. 13(39): p. 17435–17444. DOI: 10.1039/c1cp21338e.
8. Gore, T, et al., Self-assembly of model collagen peptide amphiphiles. *Langmuir*, 2001. 17(17): p. 5352–5360. <https://doi.org/10.1021/la010223i>.
9. Tu, R.S., and M. Tirrell, Bottom-up design of biomimetic assemblies. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004. 56(11): p. 1537–1563. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.047>.
10. Caplan, M.R., et al., Lauffenburger DA. Control of self-assembling oligopeptide matrix formation through systematic variation of amino acid sequence. *Biomaterials*, 2002. 23(1): p. 219–227. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00099-0](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00099-0).
11. Vauthey, S., et al., Molecular self-assembly of surfactant-like peptides to form nanotubes and nano-vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. 99(8): p. 5355–5360. <https://doi.org/10.1073/pnas.072089599>.
12. Von Maltzahn, G., et al., Positively charged surfactant-like peptides self-assemble into nanostructures. *Langmuir*, 2003. 19(10): p. 4332–4337. <https://doi.org/10.1021/la026526+>.
13. Hosseinkhani, H., P.D. Hong, and D.S. Yu, Self-assembled proteins and peptides for regenerative medicine. *Chemical Reviews*, 2013. 113(7): p. 4837–4861. <https://doi.org/10.1021/cr300131h>.
14. Cui, H., M.J. Webber, and S.I. Stupp, Self-assembly of peptide amphiphiles: from molecules to nanostructures to biomaterials. *Biopolymers*, 2010. 94(1): p. 1–18. <https://doi.org/10.1002/bip.21328>.
15. Dehsorkhi, A., V. Castelletto, and I.W. Hamley, Self-assembling amphiphilic peptides. *Journal of Peptide Science*, 2014. 20: p. 453–467. <https://doi.org/10.1002/psc.2633>.
16. Edwards-Gayle, C.J.C., and I.W. Hamley, Self-assembly of bioactive peptides, peptide conjugates, and peptide mimetic materials. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2017. 15: p. 5867. <https://doi.org/10.1039/c7ob01092c>.
17. Song, Z., et al., Self-assembly of peptide amphiphiles for drug delivery: the role of peptide primary and secondary structures. *Biomaterial Science*, 2017. 5(12): p. 2369–2380. DOI:10.1039/c7bm00730b.
18. Zhang, S., et al., Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. 90(8): p. 3334–3338. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.8.3334>.
19. Zhang, S., et al., Unusually stable beta-sheet formation in an ionic self-complementary oligopeptide. *Biopolymers*, 1994. 34(5): p. 663–672. <https://doi.org/10.1002/bip.360340508>.
20. Zhang S, et al., Self-complementary oligopeptide matrices support mammalian cell attachment. *Biomaterials*, 1995. 16(18): p. 1385–1393. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(95\)96874-Y](https://doi.org/10.1016/0142-9612(95)96874-Y).
21. Kim, S, et al., Beta-sheet-forming, self-assembled peptide nanomaterials towards optical, energy, and healthcare applications. *Small*, 2015. 11(30): p. 3623–3640. <https://doi.org/10.1002/smll.201500169>.
22. Zhao, X.B., et al., Molecular self-assembly and applications of designer peptide amphiphiles. *Chemical Society Reviews*, 2010. 39(9): p. 3480–3498. DOI:10.1039/b915923c.
23. Zhang, S.G., Emerging biological materials through molecular self-assembly. *Biotechnology Advances*, 2002. 20(5–6): p. 321–339. [https://doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00026-5](https://doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00026-5).
24. Yokoi H., T. Kinoshita, and S.G. Zhang, Dynamic reassembly of peptide RADA16 nanofiber scaffold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. 102(24): p. 8414–8419. DOI:10.1073/pnas.0407843102.
25. Yang, Y., et al., Designer self-assembling peptide nanomaterials. *Nano Today*, 2009. 4(2): p. 193–210. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2009.02.009>.

26. Chen, P., Self-assembly of ionic-complementary peptides: a physicochemical viewpoint, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2005; 261: 3–24. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2004.12.048>.
27. Davis, M.E., et al., Injectable self-assembling peptide nanofibers create intramyocardial microenvironments for endothelial cells. *Circulation*, 2005. 111(4): p. 442–450. doi: 10.1161/01.CIR.0000153847.47301.80.
28. Wen, Y., et al., Coassembly of amphiphilic peptide EAK16-II with histidinylated analogues and implications for functionalization of beta-sheet fibrils in vivo. *Biomaterials*, 2014. 35(19): p. 5196–5205. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.009>.
29. He, B., X. Yuanb, and D. Jiang, Molecular self-assembly guides the fabrication of peptide nanofiber scaffolds for nerve repair. *RSC Advances*, 2014. p. 45. <https://doi.org/10.1039/c4ra01826e>.
30. Ghadiri, M.R., et al., Self-assembling organic nanotubes based on a cyclic peptide architecture. *Nature*, 1993. 366(6453): p. 324–327. DOI: 10.1038/366324a0.
31. Hartgerink, J.D., et al., Self-assembling peptide nanotubes. *Journal of the American Chemical Society*, 1996. 118(1): p. 43–50. <https://doi.org/10.1021/ja953070s>.
32. Ishihara, Y. and S. Kimura, Nanofiber formation of amphiphilic cyclic tri- β -peptide. *Journal of Peptide Science*, 2010. 16(2): p. 110–114. DOI: 10.1002/psc.1206.
33. Chapman, R., et al., Design and properties of functional nanotubes from the selfassembly of cyclic peptide templates. *Chemical Society Reviews*, 2012. 41(18): p. 6023–6041. DOI: 10.1039/c2cs35172b.
34. De Santis, P., E. Forni, R. Rizzo, Conformational analysis of DNA-basic polypeptide complexes: possible models of nucleosome protamines and nucleosome histones. *Biopolymers*, 1974. 13(2): p. 313–326. DOI: 10.1002/bip.1974.360130207.
35. Shaikh, H., et al., Hydrogel and Organogel Formation by Hierarchical Self-Assembly of Cyclic Peptides Nanotubes. *Chemistry A European Journal*, 2018. 24: p. 19066–19074. <https://doi.org/10.1002/chem.201804576>.
36. Lim, Y-b., E. Lee, and M. Lee, Controlled Bioactive Nanostructures from Self-Assembly of Peptide Building Blocks. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007. 46: p. 9011–9014. <https://doi.org/10.1002/anie.200702732>.
37. Mandal, D., et al., Self-assembled surfactant cyclic peptide nanostructures as stabilizing agents. *Soft Matter*, 2013. 9: p. 9465–9475. DOI: 10.1039/C3SM50764E.
38. Adler-Abramovich, L. and E. Gazit, The physical properties of supramolecular peptide assemblies: from building block association to technological applications. *Chemical Society Reviews*, 2014. 43: p. 6881–93. DOI: 10.1039/c4cs00164h.
39. Fleming, S. and R.V. Ulijn, Design of nanostructures based on aromatic peptide amphiphiles. *Chemical Society Reviews*, 2014. 43: p. 8150–77. DOI: 10.1039/c4cs00247d.
40. Tang, C., R.V. Ulijn, and A. Saiani, Effect of glycine substitution on Fmoc-diphenylalanine self-assembly and gelation properties. *Langmuir*, 2011. 27: p. 14438–49. DOI: 10.1021/la202113j.
41. Kuang, Y., et al., The first supramolecular peptidic hydrogelator containing taurine. *Chemical Communication*, 2014. 50: p. 2772–4. DOI: 10.1039/c3cc48832b.
42. Ou, C., et al., Phenothiazine as an aromatic capping group to construct a short peptide-based ‘super gelator’. *Chemical Communication*, 2013. 49: p. 1853–5. DOI: 10.1039/c3cc38409h.
43. Garifullin, R. and M.O. Guler, Supramolecular chirality in self-assembled peptide amphiphile nanostructures. *Chemical Communication*, 2015. 51: p. 12470–3. DOI: 10.1039/c5cc04982b.
44. Tena-Solsona, M., J.F. Miravet, and B. Escuder, Tetrapeptidic molecular hydrogels: self-assembly and Coaggregation with amyloid fragment A β 1-40. *Chemistry A European Journal*, 2014. 20: p. 1023–31. DOI: 10.1002/chem.201302651.

45. Matsuzawa, Y. and N. Tamaoki, Photoisomerization of azobenzene units controls the reversible dispersion and reorganization of fibrous self-assembled systems. *The Journal of Physical Chemistry*, 2010. 114: p. 1586–90. DOI: 10.1021/jp909460a.
46. Zeng, G., et al., Transition of chemically modified diphenylalanine peptide assemblies revealed by atomic force microscopy. *RSC Advances*, 2014. 4: p. 7516–20. DOI: 10.1039/c3ra46718j.
47. Qin, S.Y., et al., Adjustable nanofibers self-assembled from an irregular conformational peptide amphiphile. *Polymer Chemistry*, 2015. 6: p. 519–24. DOI: 10.1039/C4PY01237B.
48. Martin, A.D., et al., A capped dipeptide which simultaneously exhibits gelation and crystallization behavior. *Langmuir*, 2016. 32: p. 2245–50. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b03963.
49. Adler-Abramovich, L. and E. Gazit, Controlled patterning of peptide nanotubes and nanospheres using inkjet printing technology. *Journal of Peptide Science*, 2008. 14: p. 217–23. DOI: 10.1002/psc.963.
50. Kopecek, J., Smart and genetically engineered biomaterials and drug delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2003. 20(1): p. 1–16. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(03\)00164-7](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(03)00164-7).
51. Rajagopal, K. and J.P. Schneider, Self-assembling peptides and proteins for nanotechnological applications. *Current Opinion in Structural Biology*, 2004. 14(4): p. 480–486. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2004.06.006>.
52. Santana, H., et al., How does growth hormone releasing hexapeptide self-assemble in nanotubes? *Soft Matter*, 2014. 10(46): p. 9260–9269. DOI: 10.1039/C4SM01693A.
53. Su, C.W., et al., Multifunctional nanocarriers for simultaneous encapsulation of hydrophobic and hydrophilic drugs in cancer treatment. *Nanomedicine*, 2014. 9(10): p. 1499–1515. DOI: 10.2217/nnm.14.97.
54. Webber, M. J., et al., Controlled release of dexamethasone from peptide nanofiber gels to modulate inflammatory response. *Biomaterials*, 2012. 33(28): p. 6823–6832. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.003.
55. Yishay-Safranchik, E., M. Golan, and A. David, Controlled release of doxorubicin and Smac-derived pro-apoptotic peptide from self-assembled KLD-based peptide hydrogels. *Polymer for Advanced Technologies*, 2014. 25(5): p. 539–544. <https://doi.org/10.1002/pat.3300>.
56. Yu, Z., et al., Self-assembling peptide nanofibrous hydrogel as a versatile drug delivery platform. *Current Pharmaceutical Design*, 2015. 21(29): p. 4342–4354. DOI: 10.2174/1381612821666150901104821.
57. Fan, T., et al., Peptide Self-Assembled Nanostructures for Drug Delivery Applications. *Hindawi Journal of Nanomaterials*, 2017. p. 16. <https://doi.org/10.1155/2017/4562474>.
58. Zhua, F., et al., Self-assembled polymeric micelles based on THP and THF linkage for pH-responsive drug delivery. *Polymer*, 2014. 55(13): p. 2977–2985. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.05.010>.
59. Zou, L.L., et al., Cell-penetrating peptide-mediated therapeutic molecule delivery into the central nervous system. *Current Neuropharmacology*, 2013. 11(2): p.197-208. DOI: 10.2174/1570159X11311020006.
60. Zhang, P., et al., Self-assembled tat nanofibers as effective drug carrier and transporter. *American Chemical Society Nano*, 2013. 7(7): p. 5965–5977. DOI: 10.1021/nn401667z.
61. Silva, G.A., et al., Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science*, 2004. 303(5662): p. 1352–1355. DOI: 10.1126/science.1093783.
62. Wan, A.C.A. and J.Y.Ying, Nanomaterials for in situ cell delivery and tissue regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2010. 62(7–8): p. 731–740. DOI: 10.1126/science.1093783.
63. Kisiday, J., et al., Self-assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: Implications for cartilage tissue repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. 99(15): p. 9996–10001. DOI: 10.1073/pnas.142309999.

64. Hosseinkhani, H., et al., Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self assembled-peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials*, 2006. 27: p. 4079. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.03.030>.
65. Keung, A.J., S. Kumar, and D.V. Schaffer, Presentation Counts: Microenvironmental Regulation of Stem Cells by Biophysical and Material Cues. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2010. 26: p. 533–556. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100109-104042.
66. Hartgerink, J.D., E. Beniash, and S.I. Stupp, Self-assembly and mineralization of peptide amphiphile nanofibers. *Science*, 2001. 294: p. 1684. DOI: 10.1126/science.1063187.
67. Beniash, E., et al., Self-assembling peptide amphiphile nanofiber matrices for cell entrapment. *Acta Biomaterialia*, 2005. 1: p. 387. DOI: 10.1016/j.actbio.2005.04.002.
68. Sargeant, T. D., Hybrid bone implants: Self-assembly of peptide amphiphile nanofibers within porous titanium. *Biomaterials*, 2008. 29: p.161. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.09.012>.
69. Van Kan, E.J.M., et al., Membrane activity of the peptide antibiotic clavamin and the importance of its glycine residues. *Biochemistry*, 2001. 40(21): p. 6398–6405. DOI: 10.1021/bi0028136.
70. Galanth, C., et al., Mechanism of antibacterial action of dermasseptin B2: interplay between helix-hinge-helix structure and membrane curvature strain. *Biochemistry*, 2009. 48(2): p. 313-27. doi: 10.1021/bi802025a.
71. Chen, C., et al., Antibacterial activities of short designer peptides: a link between propensity for nanostructuring and capacity for membrane destabilization. *Biomacromolecules*, 2010. 11(2): p. 402–411. <https://doi.org/10.1021/bm901130u>.
72. Veiga, A.S., et al., Arginine-rich self-assembling peptides as potent antibacterial gels. *Biomaterials*, 2012. 33(35): p. 8907–8916. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.08.046.
73. Häffner, S.M. and M. Malmsten, Influence of self-assembly on the performance of antimicrobial peptides. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 2018. 38: p. 56-79. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2018.09.002>.
74. Schnaider, L., et al., Self-assembling dipeptide antibacterial nanostructures with membrane disrupting activity. *Nature Communications*, 2017. 8: p. 1365. DOI: 10.1038/s41467-017-01447-x.
75. Rodríguez-Vázquez, N., et al., Membrane-targeted self-assembling cyclic peptide nanotubes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014. 14(23): p. 2647-61. DOI: 10.2174/1568026614666141215143431.
76. Salick, D.A., et al., Inherent antibacterial peptide-based b-hairpin hydrogel. *Journal of the American Chemical Society*, 2007. 129: p. 14793–14799. DOI: 10.1021/ja076300z.
77. Salick, D.A., D.J. Pochan, and J.P.Schneider, Design of an injectable b-hairpin peptide hydrogel that kills methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Advanced Materials*, 2009. 21: p. 4120–4123. DOI: 10.1002/adma.200900189.
78. Lombardi, L., et al., Enhancing the Potency of Antimicrobial Peptides through Molecular Engineering and Self-Assembly. *Biomacromolecules*, 2019. 20(3): p. 1362-1374. DOI: 10.1021/acs.biomac.8b01740.
79. Liu, L., et al., Self-assembled cationic peptide nanoparticles as an efficient antimicrobial agent. *Nature Nanotechnology*, 2009. 4: p. 457–463. DOI: 10.1038/nnano.2009.153.
80. Ahmed, E.M., Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *Journal of Advanced Research*, 2015. 6: p. 105–121. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.
81. Xing, R., et al., Self-Assembled Injectable Peptide Hydrogels Capable of Triggering Antitumor Immune Response. *Biomacromolecules*, 2017. 18(11): p. 3514-3523. DOI: 10.1021/acs.biomac.7b00787.
82. Cheng, G., et al., Hydrogelation of self-assembling RGD-based peptides. *Soft Matter*, 2011. 7: p. 1326–1333. DOI: 10.1039/c0sm00408a.

83. Lavery, G., et al., Ultrashort Cationic Naphthalene-Derived Self-Assembled Peptides as Antimicrobial Nanomaterials. *Biomacromolecules*, 2014. 15: p. 3429–3439. DOI: 10.1021/bm500981y.
84. Albadr, A.A., S.M.Coulter, and S.L. Porter, Thakur RRS and Lavery G. Ultrashort Self-Assembling Peptide Hydrogel for the Treatment of Fungal Infections. *Gels*, 2018. 4(2): p. 48. DOI: 10.3390/gels4020048.
85. Verma, G., V.K. Aswal, and P. Hassan, Ph-Responsive Self Assembly in an Aqueous Mixture of Surfactant and Hydrophobic Amino Acid Mimic. *Soft Matter*, 2009. 5: p. 2919–2927. DOI: 10.1039/b900891h.
86. Tine, M.R., et al., Effect of Temperature on Self-Assembly of an Ionic Tetrapeptide. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2011. 103: p. 75–80. DOI: 10.1007/s10973-010-1060-x.
87. Ozores, H.L., M. Amorín, and J.R.Granja, Self-Assembling Molecular Capsules Based on α,γ -Cyclic Peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 2017. 139(2): p. 776-784. DOI: 10.1021/jacs.6b10456.
88. Fung, S.Y., et al., Concentration Effect on the Aggregation of a Self-Assembling Oligopeptide. *Biophysical Journal*, 2003. 85(1): p. 537–548. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74498-1](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74498-1).
89. Jin, W., X. Shi, and F. Caruso, High Activity Enzyme Microcrystal Multilayer Films. *Journal of the American Chemical Society*, 2001. 123: p. 8121. <https://doi.org/10.1021/ja015807l>.
90. Guler, M.O., R.C. Claussena, and S.I. Stupp, Encapsulation of pyrene within self-assembled peptideamphiphile nanofibers. *Journal of Materials Chemistry*, 2005. 15(42). DOI: 10.1039/b509246a.
91. Chang, R., L. Sun, and T.J. Webster, Selective inhibition of MG-63 osteosarcoma cell proliferation induced by curcumin-loaded self-assembled arginine-rich-RGD nanospheres. *International Journal of Nanomedicine*, 2015. 10: p. 3351–3365. doi: 10.2147/IJN.S78756.
92. Kim, I., et al., A “light-up” 1D supramolecular nanoprobe for silver ions based on assembly of pyrene-labeled peptide amphiphiles: cell-imaging and antimicrobial activity. *Journal of Materials Chemistry*, 2014. 2(38): p. 6478–6486. DOI: 10.1039/C4TB00892.

Biberlerde Türler Arası Melezleme

Kazım Mavi^{1*} 

ÖZET

Türler arası melezleme doğada yeni türlerin ortaya çıkmasında sıklıkla rastlanılan bir durumdur. *Helianthus*, *Triticum*, *Brassica* gibi cinsler içerisindeki türlerde sıklıkla görülen melezlemeler sonucunda doğal olarak kromozom sayıları da katlanmış olan melez türler ortaya çıkmıştır. Diğer birçok tür açısından ise doğada türler arası melezleme çok sık karşılaşılan bir durum değildir. Patlıcangiller familyasının bir üyesi olan biberlerde doğal ortamda türler arası melezleme rastlanılan bir durum olmamakla birlikte, türler arası melezlerin üstün özelliklerinden faydalanabilmek amacıyla ıslahçılar tarafından türler arası melezleme çalışmaları yapılmaktadır. Özellikle kök çürüklüğü hastalığı başta olmak üzere, verim artışı sağlamak, biyotik ve abiyotik stres faktörlerine dayanımı arttırmak, anaç olarak kullanılacak çeşitler geliştirmek ve çeşitlerin sağlık açısından kalitesini arttırmak için türler arası melezlemelerden elde edilecek bilgi ve veriler çok önemlidir. Ülkemizde biberde türler arası melezleme konusunda çalışmalar ise yok denecek kadar azdır. Bu sebeple bu derleme ile biberde türler arası melezleme konusunda yapılan çalışmalar ışığında konunun önemine dikkat çekilmesi hedeflenmiştir.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş 17 Nisan 2020
Kabul 22 Mayıs 2020

ANAHTAR KELİMELER

Biber ıslahı,
Capsicum spp.,
türler arası melezleme

Interspecific Hybridization in Pepper Species

ABSTRACT

Interspecific hybridization is a common situation in the emergence of new species in natural flora. As a result of crosses frequently seen in species in the genus such as *Helianthus*, *Triticum*, *Brassica*, hybrid species, whose chromosome numbers are also doubled, naturally emerged. In terms of many other species, interspecific hybridization is not very common in crossing of nature flora. In pepper, which is a member of the Solanaceae family, interspecific hybridization studies are carried out by breeders to benefit from the superior properties of interspecific crosses. The information and data to be obtained from interspecific crosses are very important to increase yield, increase resistance to abiotic and biotic stress factors, to develop varieties that can be used as rootstocks and to improve the quality of the cultivars, especially root rot disease. In our country, studies on interspecific hybridization in pepper are almost nonexistent. For this reason, with this review, it is aimed to draw attention to the importance of the subject in the light of previous studies on interspecific hybridization in pepper.

ARTICLE HISTORY

Received
17 April 2020
Accepted
22 May 2020

KEY WORDS

Pepper breeding,
Capsicum spp.,
interspecific
hybridization

¹ Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Hatay, Türkiye

* Sorumlu yazar: kazimmavi@hotmail.com

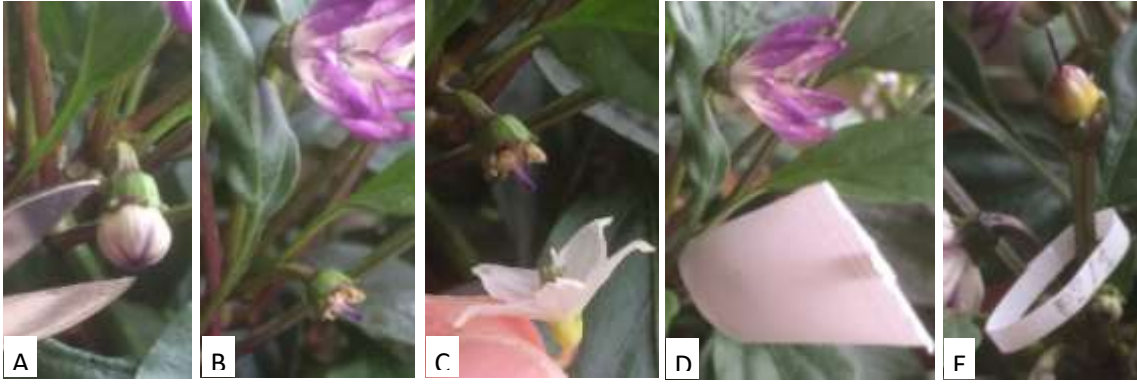
Giriş

Türler arası melezleme, biyotik ve abiyotik strese dayanım gibi belirli özellikleri yabani akrabalarından kültür bitkilerine aktararak özelliklerini iyileştirmek için kullanılır. Uygulanabilir olduğunda, bu yaklaşım çok etkili bir gen transfer yöntemidir. Doğada, çiçekli bitki türlerinin % 30 ila % 35'i türler arası melezleme ve ardından kromozom sayılarının ikiye katlanması ile meydana gelmişlerdir [1]. Türler arası melezlemeden yola çıkılarak, allotetraploitler gibi allopoliploitler, F₁ hibritlerin kromozom sayısının iki katına çıkarılmasında da kullanılabilir. Başarılı bir allopoliploit eldesi, yeni bir genom kombinasyonunun oluşması veya daha önce var olmayan bir türün meydana gelmesi ile sonuçlanabilir. Ancak, kültür türlerini ve yabani türleri melezlemek için çok büyük çaba gösterilmesi gerekebilir. İnsan eli ile yapılan ilk türler arası melezlemenin 1717'de karanfil (*Dianthus caryophyllus* L.) ve *Dianthus barbatus* L. arasında yapıldığı bildirilmektedir [2]. O zamandan beri binlerce türler arası melezleme denemesine rağmen başarı oldukça sınırlı kalmıştır. Başarılı bir türler arası melezlemeyi, türler arasındaki kromozomal, genetik, sitoplazmik veya mekanik izolasyon bariyerleri engelleyebilmektedir. Bitki ıslahçılarının, buğday (*Triticum aestivus* L.) ve çavdar (*Secale cereale* L.) türlerinin melezlemesinden, yeni bir bitki türü olan tritikale'yi ıslah etmesi yaklaşık 100 yıl sürmüştür [3]. Türler arası melezleme, yararları ve başarıdaki zorlukları ile genetikçiler ve bitki ıslahçıları için önemli bir amaç haline gelmiştir.

Solanaceae familyasındaki türler arası melezlemeler *Solanum* [4], *Nicotiana* [5], *Datura* [6], *Petunia* [7], *Lycium* [8] ve *Physalis* [9] gibi bazı cinslerde çalışılmıştır. *Nicotiana* cinsi içerisinde *Nicotiana tabacum* (2n=48) ve *Nicotiana glauca* (2n=24) türlerinin melezlenmesinden amphidiploid (2n=36) F₁ bireyler elde edilmiştir [10]. Bununla birlikte, Solanaceae familyasında *Solanum* cinsinde türler arası melezleme, bazı türler açısından başarıyla kullanılmıştır [11]. Ancak bu cins içerisindeki tüm türlerde türler arası melezlemede başarıyı yakalamak mümkün olmamıştır.

Günümüzde kültürü yapılan biberler Solanaceae familyasının 98 cinsinden [12] birisi olan *Capsicum* cinsi içerisinde yer almaktadır. *Capsicum* cinsi içerisinde 38 olan tür sayısı [12, 13], yeni keşfedilen 5 türlerle [14, 15] birlikte 43 olarak revize edilmiştir (Tablo 1). Bu türlerden *C. annuum* L., *C. frutescens* L., *C. baccatum* L., *C. chinense* Jacq. ve *C. pubescens* Ruiz & Pav. olmak üzere 5 tanesinin kültürü yapılmaktadır. *Capsicum* cinsi içerisindeki türlerin kromozom sayıları 2n=24 ve 2n=26 olarak değiştiği

belirlenmiştir. Henüz kromozom sayıları belirlenmemiş 13 adet *Capsicum* türü bulunmaktadır (Tablo 1). *Capsicum annuum* türü içerisinde genetik varyasyon her ne kadar geniş olsa da, kök çürüklüğü (*Phytophthora capsici*) ve antraknoz (*Colletotrichum acutatum*, *C. capsici* vb) gibi hastalıklar başta olmak üzere bazı durumlarda bu geniş varyasyon yetersiz kalmaktadır. Biber türlerindeki geniş çeşitlilik ise, biyotik ve abiyotik stres koşullarına dayanımlarındaki farklılıklar nedeniyle ıslahçıların her zaman ilgi alanları içerisinde olmuştur. Bu nedenle türler arası melezlemeler önem kazanmakta ve ıslahçılar tarafından sorunların çözümüne yönelik olarak kullanılmaktadır. Türler arası melezleme bir türü ait dişi organın başka bir türün çiçek tozu ile tozlanıp döllenmesi işlemidir (Şekil 1).



Şekil 1 Melezleme aşamaları; A emaskulasyon için uygun balon çiçek şekli, B emaskulasyon sonrası, C farklı bir tür ile tozlama, D tozlama sonrası çiçek izolasyonu, E döllenme ve etiketleme (Orijinal Kazım MAVİ 2020)

Biberlerde bilinen ilk türler arası melezleme çalışması 1912'de Halstead tarafından *Capsicum annuum* ve *C. frutescens* türleri arasında yapılmıştır [16]. Tarihsel olarak, biberlerde türler arası melezlemede çeşitli yaklaşımlar (geleneksel ve biyoteknolojik) farklı türler arasındaki tozlanma ve döllenme engellerinin üstesinden gelmek için kullanılmıştır.

Tablo 1 *Capsicum* cinsi içerisindeki türler, kültür durumları, kromozom sayıları, yayılma alanları

****	Tür	*	KS**	Yayılma alanı***	Kaynak
1a	<i>C. annuum</i> var. <i>annuum</i>	K	12	Tüm dünya	[12]
1b	<i>C. annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	YK	12	Amerika Birleşik Devletlerinden Kuzey/Kuzeydoğu Brezilya	[13]
2a	<i>C. baccatum</i> var. <i>baccatum</i>	K	12	Kolombiya-Kuzey Arjantin, Güney-Doğu Brezilya	[13]
2b	<i>C. baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	K	12	ABD, Orta ve Güney Amerika ve Hindistan	[13]
2c	<i>C. baccatum</i> var. <i>praetermissum</i>	YK	12	Paraguay, Güneydoğu ve Merkez Brezilya	[13]
3	<i>C. benoistii</i>	Y	?	Ekvator (endemik)	[14]
4	<i>C. buforum</i>	Y	13	Brezilya: SP ve RJ	[12]
5	<i>C. caatingae</i>	Y	12	Brezilya: BA, PE, ve Kuzey MG (endemik)	[13]
6	<i>C. caballeroi</i>	Y	?	Bolivya (endemik)	[12]
7	<i>C. campylopodium</i>	Y	13	Brezilya: ES, MG, ve RJ (endemik)	[12]
8	<i>C. carrasense</i>	Y	?	Güneydoğu Brezilya (endemik)	[15]
9	<i>C. cardenasii</i>	Y	12	Bolivya (endemik)	[12]
10	<i>C. ceratocalyx</i>	Y	?	Bolivya (endemik)	[12]
11	<i>C. chacoense</i>	Y	12	Güney Bolivya, Paraguay, Kuzey ve Orta Arjantin	[12]
12	<i>C. chinense</i>	K/YK	12	EUA, Orta ve Güney Amerika, Çin ve Japonya	[12]
13	<i>C. coccineum</i>	Y	?	Peru ve Bolivya	[12]
14	<i>C. cornutum</i>	Y	13	Brezilya: RJ and SP (endemik)	[12]
15	<i>C. dimorphum</i>	Y	?	Kolombiya ve Ekvator	[12]
16	<i>C. dusenii</i>	Y	?	Güneydoğu Brezilya	[12]
17	<i>C. eshbaughii</i>	Y	12	Güney-Merkez Bolivya	[12]
18	<i>C. eximium</i>	Y	12	Güney Bolivya ve Kuzey Arjantin	[12]
19	<i>C. flexuosum</i>	Y	12	Paraguay, Güney ve Güneydoğu Brezilya ve Kuzeydoğu Arjantin	[12]
20	<i>C. friburgense</i>	Y	13	Brezilya: RJ (endemik)	[12]
21	<i>C. frutescens</i>	K	12	Amerika, Afrika, Asya	[12]
22	<i>C. galapagoense</i>	Y	12	Galapagos Adaları (endemik)	[12]
23	<i>C. geminifolium</i>	Y	?	Kolombiya, Ekvator ve Peru	[12]
24	<i>C. hookerianum</i>	Y	?	Güney Ekvator ve Kuzey Peru (endemik)	[12]
25	<i>C. hunzikerianum</i>	Y	13	Brezilya: SP (endemik)	[12]
26	<i>C. lanceolatum</i>	Y	13	Meksika ve Guatemala	[12]
27	<i>C. leptopodum</i>	Y	?	Brezilya	[12]
28	<i>C. longidentatum</i>	Y	12	Brezilya: BA and PE (endemik)	[13]
29	<i>C. longifolium</i>	Y	13	Andean	[14]
30	<i>C. lycianthoides</i>	Y	13	Andean	[17]
31	<i>C. minutiflorum</i>	Y	?	Bolivya	[17]
32	<i>C. mirabile</i>	Y	13	Brezilya: MG, RJ, and SP (endemik)	[12]
33	<i>C. neei</i>	Y	?	Bolivya (Endemik)	[14]

Tablo 1. Devamı

	Tür	*	KS**	Yayılma alanı***	Kaynak
34	<i>C. parvifolium</i>	Y	12	Kolombiya, Venezuela ve Kuzeydoğu Brezilya	[12]
35	<i>C. pereirae</i>	Y	13	Brezilya: ES, RJ, and SP (endemik)	[12]
36	<i>C. piuranum</i>	Y	13	Peru	[14]
37	<i>C. pubescens</i>	K	12	Meksika, Orta ve Güney Amerika	[12]
38	<i>C. recurvatum</i>	Y	13	Brezilya: RJ, SP, PR, and SC (endemik)	[12]
39	<i>C. rhomboideum</i>	Y	13	Brezilya: MG, RJ, and SP (endemik)	[12]
40	<i>C. schottianum</i>	Y	13	Brezilya: MG, RJ, and SP (endemik)	[12]
41	<i>C. scolnikianum</i>	Y	?	Peru ve Ekvator (endemik)	[12]
42	<i>C. tovarii</i>	Y	12	Peru (endemik)	[12]
43a	<i>C. villosum</i> var. <i>villosum</i>	Y	13	Brezilya: MG, RJ ve SP (endemik)	[13]
43b	<i>C. villosum</i> var. <i>muticatum</i>	Y	13	Güneydoğu Brezilya	[13]

* K Kültür, Y Yabani, YK Yarı kültür

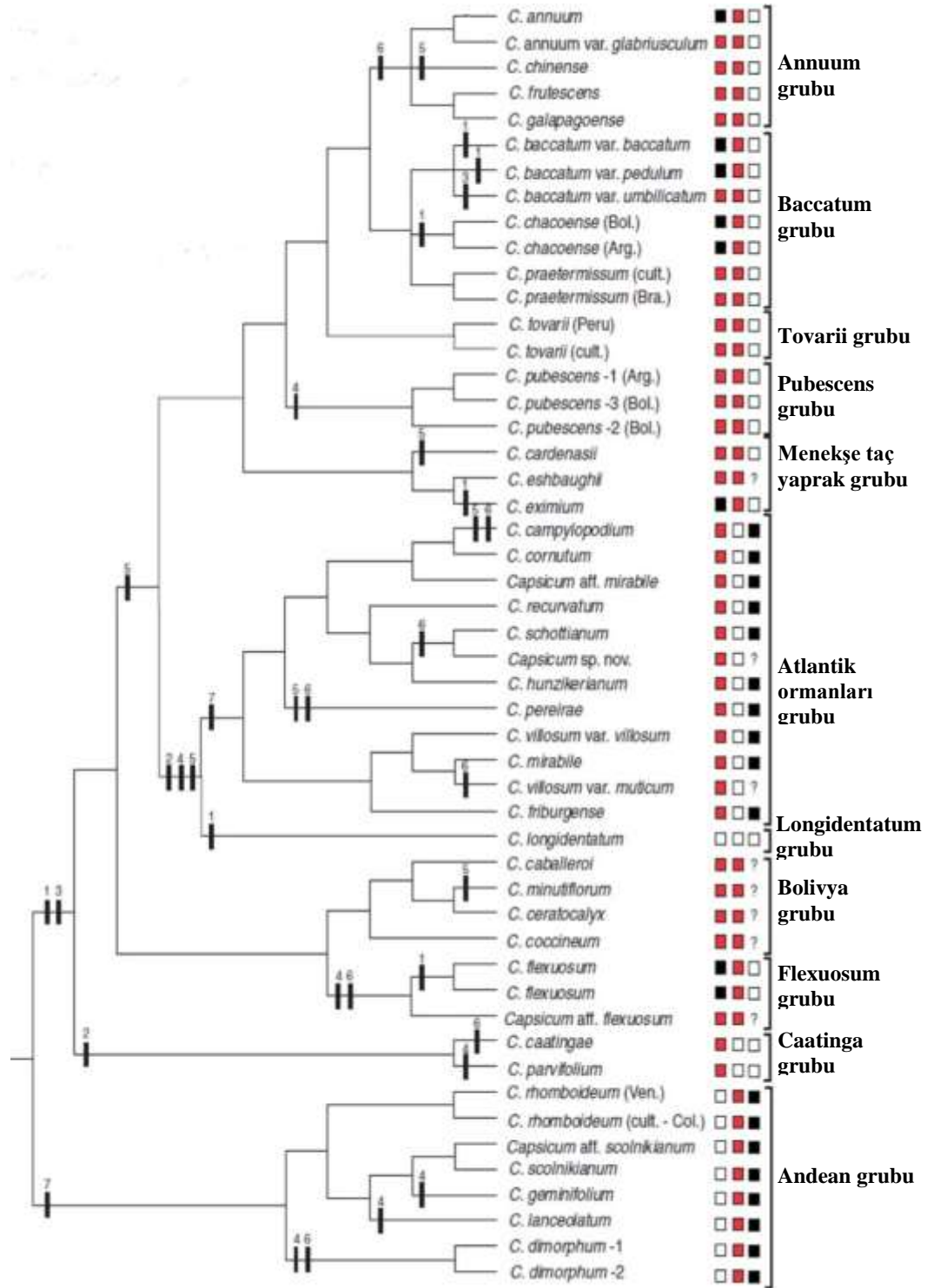
** KS Kromozom sayısı, ? kromozom sayısı belli olmayan türler

***RJ Rio de Janeiro, SP São Paulo, MG Minas Gerais, ES Espirito Santo, BA Bahia, PE Pernambuco

**** Sıra numaralarından sonraki harfler o tür içerisindeki alt türleri ifade etmektedir.

Sistematik ve Türler arası Melezlemedeki Gelişmeler

İlk başarılı türler arası melezler *Capsicum pubescens* ve *C. cardenasii* türlerinin melezlenmesinden elde edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen F₁ hibritlerin yüksek fertiliteye sahip oldukları belirlenmiştir [18]. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda türler arası melezleme yetenekleri açısından cinsin türleri üç farklı grup olarak ayrılmışlardır. Bunlardan birincisi *C. annuum* L. [var. *annuum* ve *glabriusculum* (Dunal) Heiser & Pickersgill], *C. frutescens* L., *C. chinense* Jacq., *C. chacoense* Hunz. ve *C. galapagoense* Hunz. türlerini içeren *C. annuum* grubu [19], ikincisi *C. baccatum* L. [var. *baccatum*, *praetermissum* ve *pendulum* (Willd.) Eshbaugh], ve *C. tovarii* Eshbaugh, Smith & Nickerent türlerini içeren *C. baccatum* grubu [20], üçüncüsü *C. cardenasii* Heiser & Smith, *C. eximium* Hunz. ve *C. pubescens* Ruiz & Pav. türlerini içeren *C. pubescens* grubudur [21]. Son yıllardaki çalışmalarda ise moleküler teknikler (Plastid DNA markörleri matK ve psbA-trnH) ile türlerin akrabalıkları belirlenmiş ve cins içerisindeki türler 11 farklı grup olarak sınıflandırılmışlardır (Şekil 2) [13].

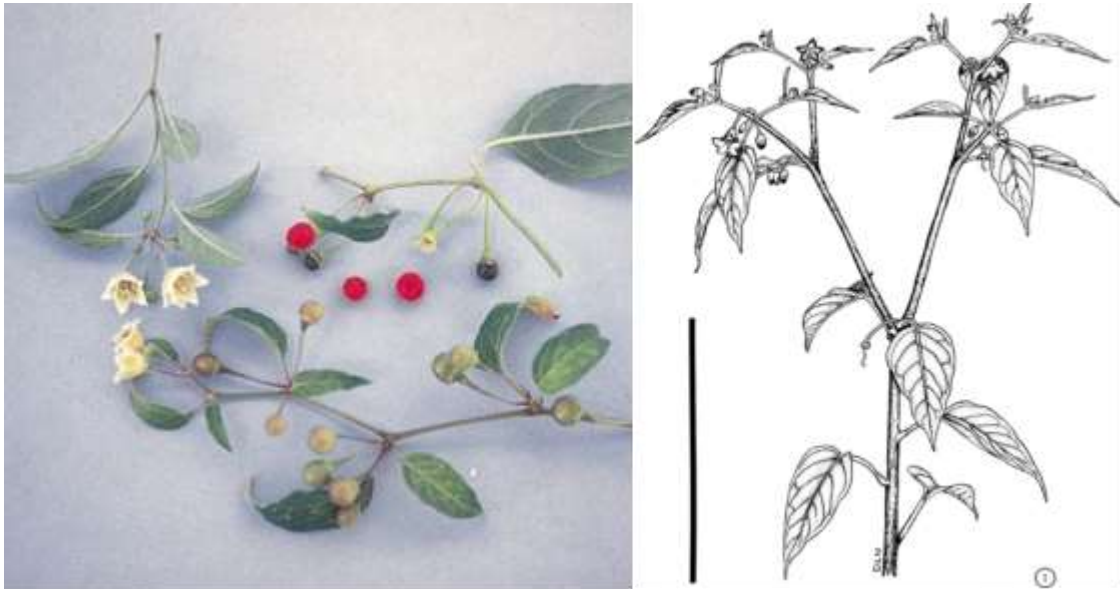


Şekil 2 Biber türlerinin filogenetik akrabalıkları; Birinci sütun acılık □ yok, ■ var, ■ değişken, ikinci sütun olgun meyve rengi □ altın sarısı, ■ kırmızı, üçüncü sütun kromozom sayısını (n) □ 12, ■ 13 [13]

Kültür türlerinin ve çeşitlerinin geliştirilmesi ve ıslahı, türler arası melezleme çalışmalarında yabani türlerin başarılı bir şekilde kullanılması ile çok yakından ilişkilidir.

Capsicum cinsi içerisinde türler arası filogenetik akrabalıkları anlayabilmek için, türler arasında morfolojik karşılaştırmalar [22], polen tüpü gelişimi [23], uyuşmazlık mekanizması [19], mezlelenebilme [24], kromozom eşleştirmesi [25], izoenzim değişkenliği [26] ve DNA varyasyonu [27] üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Her bir çalışmada türlerin grup sayıları değişmekle birlikte, farklı çalışmalardan elde edilen temel filogenetik ağaçlar benzer bulunmuştur. Örneğin, *Capsicum annuum* ve diğer kültür türleri birbirine daha yakın bulunurlarken, *C. longidentatum* tek başına ayrı bir grup oluşturmuş ve diğer yabani türler kültür türlerinden farklı gruplarda yer almışlardır. *C. dimorphum* ve içerisinde yer aldığı grup cins içerisindeki en uzak akrabalığa sahip grup olmuştur (Şekil 2).

Capsicum tovarii, Eshbaugh ve ark. tarafından 1983 [28] yılında Peru'nun Mantaro nehri kıyılarında bulunmuş ve tanımlanmıştır (Şekil 3). Yapılan çalışmalar, *C. tovarii*'nin, *C. baccatum* grubuna, *C. annuum* ve *C. pubescens* grubuna kıyasla, genetik olarak daha yakın ilişkili olduğunu göstermektedir. Araştırmacılar bu kanıya geniş bir türle (*C. annuum*, *C. chinense*, *C. frutescens*, *C. chacoense*, *C. galapogense*, *C. baccatum*, *C. praetermissum*, *C. cardenasii*, *C. eximium* and *C. pubescens*) yaptıkları resiprokal melezlemeler sonucunda, *C. baccatum* × *C. tovarii*'nin melezlemesinden F₁, F₂ ve geriye melezlerin (backcross) elde edilmesi sonucunda varmışlardır [20]. Bununla birlikte Ibiza ve ark. [29] ve Carrizo Garcia ve ark. [13] yapmış oldukları gruplandırmalara göre türü *Baccatum* grubundan uzak ve farklı bir grupta sınıflandırmışlardır (Şekil 2).



Şekil 3 *Capsicum tovarii* morfolojik özellikleri [20, 28]

C. tovarii ve diğeri *Capsicum* türleri arasında yapılan melezlemeler sonucunda elde edilen F₁ hibritler sitolojik olarak analiz edilmiş ve türün diğeri türlerle olan genetik ilişkisi daha iyi anlaşılmasına çalışılmıştır. Sonuçta *C. tovarii* ve *C. baccatum*'un diakinez ve metafaz-I safhasındaki mayotik hücreleri analiz edildiğinde, hücrelerin % 100'ünde 12 çift kromozom olduğu, hiçbir kromozom köprüsü veya kromozom bozulmasının (lagging) bu türlerde gözlenmediği belirlenmiştir. Bu melezlemeden elde edilen F₁ (*C. baccatum* x *C. tovarii*) bitkilerinin diakinez ve metafaz-I safhalarındaki hücreleri incelendiğinde ise oldukça kompleks kromozom ilişkileri saptanmıştır. Çoğu kromozom iki değerlikli (bivalent) olarak eşlenirken, tek değerlikli (univalent), dört değerlikli (quadrivalent) ve bir tanede quinquevalent değerlikli eşleşme tespit edilmiştir. Bu duruma rağmen F₁'lerden bazılarının kendilenmesi ile F₂ bitkiler ve anne ile melezlenmesi ile geriye melez bitkilerde elde edilmiştir [20].

C. tovarii türündeki heterokromatin içeriği ve dağılımının bu türü mor çiçek türler grubu ile daha yakın akraba olabileceğini düşündürmüştür [21]. Moscone ve ark. [30] ise türün *C. baccatum* grubunun türlerine daha yakın olduğunu bildirmektedir. Çalışmalarda kullanılan her iki genotipin morfolojik olarak benzer olduğu bildirilmiştir. Dolayısıyla, heterokromatin içeriği ve dağılımında bulunan farklılıklar, *C. tovarii* içindeki genotiplerdeki doğal değişkenlik ile açıklanabilmektedir. İnce ve ark. [31] RAPD markörleri kullanarak yaptıkları moleküler çalışma ile *C. tovarii* türünün *C. baccatum*'a yakın olduğunu belirlemişlerdir. Scaldaferrro ve ark. [32] da yaptıkları çalışma ile *C. baccatum* kompleksine dahil edilmesini desteklemektedirler. Bu durumdan farklı olarak, Ibiza ve ark. [29], AFLP ve SSR primerleri kullanarak yaptıkları analizde *C. tovarii*'nin Annum grubuna biraz daha yakın görünse de, farklı bir grupta sınıflandığını göstermişlerdir. Bu durumun araştırmacıların farklı genotip kullanmalarından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Kromozom sayısı 2n=26 olan biber türlerinde ise henüz fertil bireylere sahip türler arası melez kombinasyonuna yapılan çalışmalarda rastlanmamıştır. Bu amaçla yabani türler olan *C. lanceolatum* (2n=26) ve *C. buforum* (2n=26) üzerinde çalışılmıştır. Tong ve Bosland [33] *C. buforum* türünü 2n=24 kromozomlu olarak bildirmesine rağmen, bunu doğrulayan başka çalışma bulunmamaktadır. *C. buforum*, *C. cardenasii* ile birlikte kendine uyumsuz olarak bildirilen bir türdür. Bu tür *C. pubescens*, *C. cardenasii* ve *C. eximium* ile diğeri *Capsicum* türlerinden daha yakından ilişkili bulunmuş ve farklı

uyumluluk düzeyleri göstermiştir [34]. Bu çalışmalar türler arası melezlemeler için kullanılacak tür kombinasyonlarına alt yapı oluşturmaktadır.

Türler Arası Melezlemelerde Sorunlar ve Çözüm Önerileri

Melezleme bariyerleri

Birçok çalışma, *Capsicum*'da türler arası melezlemeye karşı güçlü bir bariyer bulunduğunu göstermiştir. Kültürü yapılan *Capsicum* türleri ile bunların yabancı akrabaları arasındaki çaprazlamalardaki uyumsuzluğun nedenleri tam olarak anlaşılammıştır. Uyuşmazlık, polen gelişiminin gecikmesi, polenlerin dişicik tepesinde çimlenememesi, stigma içerisinde polen çim borusunun uzamasının duraklaması, polen tüpünün yumurtalıktan içeri girememesi, zigotun hücre bölünmesinin engellenmesi ve endosperm kısmında anormallikler oluşması şeklinde karakterize edilmektedir [19, 24, 35, 36].

Capsicum cinsi içerisindeki türler arasındaki melezleme bariyerlerinin üstesinden gelmek için bazı geleneksel yaklaşımlar kullanılmıştır. Bu amaçla genetik köprü kullanımı [37], büyümeyi düzenleyiciler [38], polen ışınlaması [19] ve *in vitro* polen tüpü gelişim çalışmaları yapılmıştır [23]. Somatik hibridizasyon gibi biyoteknolojik tekniklerin de *Capsicum* cinsindeki türler arası bu engellerin üstesinden gelmek için kullanılabileceği önerilmiştir [39]. Ancak bu teknikler biber türlerindeki türler arası melezleme engellerinin tamamını ortadan kaldırmak için yeterli olmamaktadır. Örneğin *C. pubescens* türünün polen tüpünün dişicik borusu içerisinde büyümesini önleyen prezigotik bariyerler ve polen tüpü gelişse bile görülebilen postzigotik bariyerler nedeniyle, diğer dört kültür türü ile melezlenmesi mümkün olmamaktadır [23].

Capsicum baccatum türünde türler arası melezlemede üzerinde yoğun çalışılan türlerden biridir. Bu türde *C. annuum* ile başarısız melezleme sonuçları göstermiştir [40], ancak bu türün hastalıklara karşı önemli bir dayanıklılık kaynağı olması ıslah çalışmalarında genetik kaynak olarak sürekli kullanılmasına neden olmaktadır. *C. annuum* ile *C. baccatum* var. *pendulum* türlerinin melezlenmesindeki ısrarlı çalışmalar, sonunda elde edilen geriye melezlerden antraknoza dayanıklı çeşitler geliştirilmesi ile sonuçlanmıştır [41].

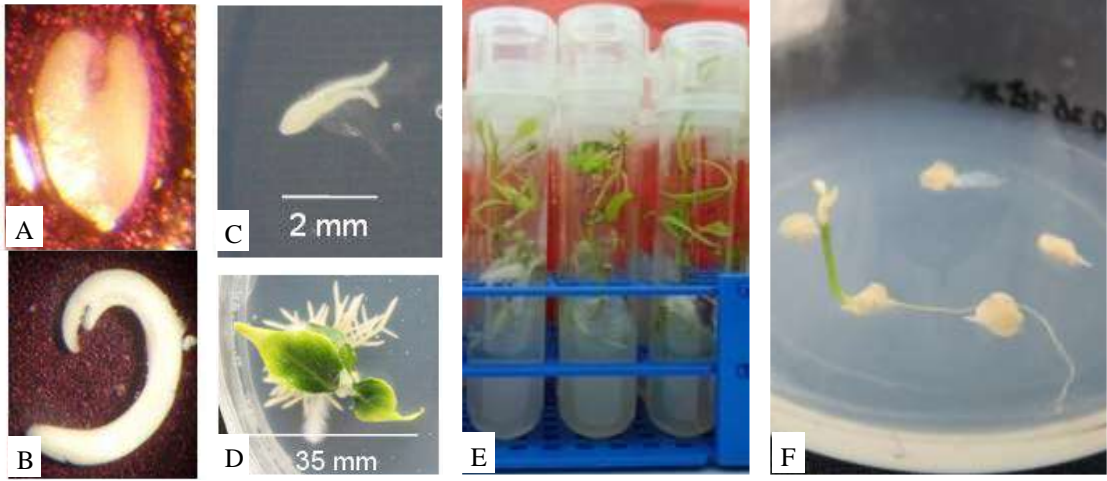
Zijlstra ve ark. [23], *C. chinense* × *C. annuum* ve *C. baccatum* × *C. annuum* türleri arasındaki melezlenme engelini polen tüpü uzama seviyesinin yumurta hücresine ulaşmamasından meydana geldiğini belirlemişlerdir. Aynı yazarlar ayrıca *C. chinense* ×

C. pubescens ve *C. baccatum* × *C. pubescens* arasındaki melezleme engellerinin ise çiçek borusu içerisinde polen tüpü büyümesinin durmasından kaynaklandığını bulmuşlardır. *C. chinense* ve *C. baccatum* türlerinin resiprokal olarak melezlendiği başka bir çalışmada ise tozlanmadan 24 saat sonra polen tüplerinin dışıçık borusu içerisinde gelişimini devam ettirdiği, yumurtalığa girebildiği ve ovüllere ulaşabildiği belirlenmiştir. Özellikle *C. baccatum* × *C. chinense* melezlemesinden çimlenme yüzdesi yüksek sağlıklı tohumlar ve bu tohumlardan da sağlıklı gelişen fideler elde etmişlerdir [42]. Bu nedenle biberlerdeki türler arası melezlenme sorunları sadece post zigotik olarak gerçeklemede, farklı türlerde farklı melezlenme engelleri görülebilmektedir.

Döllenme sonrası anormallikler ve embriyo kurtarma

Gelişmiş bitkilerde, hibrit embriyoların postzigotik başarısızlığı genellikle ebeveyn kromozomları arasındaki uyumsuzluğa değil, endospermdeki uyumsuzluk sorunlarına bağlı olduğu ifade edilmektedir. Bu gibi durumlarda, türler arası melezleme sonrasında gelişen meyvelerden erken dönemde embriyoların kurtarılması gerekir; aksi takdirde embriyonun gelişmemesi ve/veya endosperm dejenerasyonu nedeniyle çimlenme kabiliyetinde tohum elde edilememesi ile sonuçlanacaktır. Embriyolar bazen olgunlaşmamış veya endospermden yoksun olsalar bile yeni bitki üretiminde kullanılabilir. Doku kültürü ile entegre olarak kullanılan embriyo kurtarma tekniği, türler arası melezlemede daha fazla ilerlemeye imkân sağlayacak önemli bir tekniktir.

Capsicum cinsi içerisindeki türler arası melezlemelerde, postzigotik bazı uyumsuzluk bariyerlerinden dolayı elde edilen hibrit embriyoların bitkiye dönüşüm oranı çok düşük kalmaktadır [43]. Hossain ve ark. [43] tozlanmadan 28-33 gün sonra, temel MS ortamının kazein hidrolizat, maya özü, hindistan cevizi suyu, gibberellin (GA) ve naftalenasetik asit (NAA) ile takviye edildiğinde embriyoların doku kültürü ortamında başarılı bir şekilde geliştirilebildiğini saptamışlardır. Biber için bu tekniğe çok sınırlı dikkat edilmiştir, ancak türler arası hibridizasyon için son yıllarda yapılan çalışmalar ile önemli bir potansiyele sahip olduğu belirlenmiştir [44, 45, 46, 47, 48]. Bu çalışmalar sonucunda bazı türler arası melezlerden embriyo kurtarma tekniği ile başarılı bir şekilde bitki elde edildiği bildirilmiştir (Şekil 4).

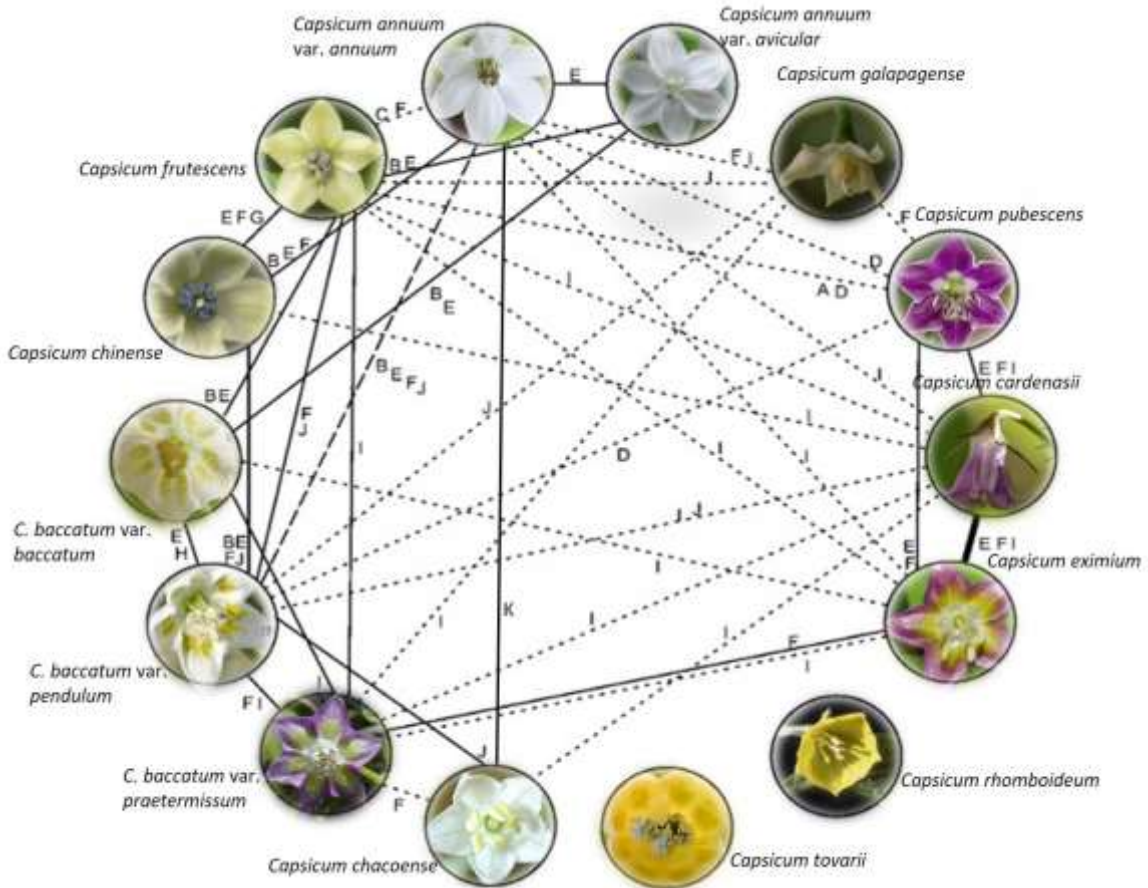


Şekil 4 A. B. Embriyo kurtarma tekniğinde kullanılabilen torpedo ve kotiledon tip embriyo örnekleri, C. Kotiledon tip embriyo (tozlanmadan 30 gün sonra doku kültürü ortamında), D. Tozlanmadan 60 gün sonra doku kültüründeki gelişim [49], E. *C. chinense* × *C. annuum* melezleri embriyo kurtarma tekniği ile bitki gelişimi [45], F. *C. annuum* × *C. chinense* melezleri embriyo kurtarma tozlanmadan 32-34 gün sonra [46]

Türler arası hibritlerde kısırlık (sterillik)

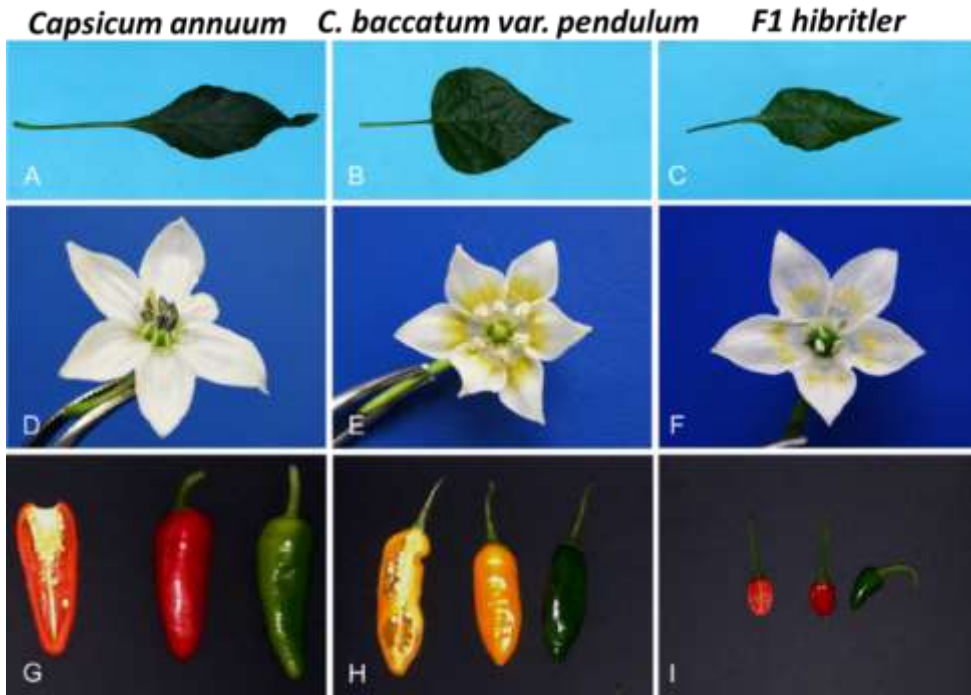
Biberde türler arası melezlemelerde yapılan çalışmalar incelendiğinde melezleme sonrasında elde edilen hibritlerin büyük çoğunluğunun kısırlık problemleri gösterdiği ifade edilmektedir. Çalışmalardaki kısırlık sorunlarının ise mayotik anormallikler ile ilişkili olduğu ve türler arası melezlemenin kullanılabilirliğini engellediği sonucuna varılmıştır. Türler arası mezlenebilme yeteneği, yabani türlerdeki istenilen özelliklerin kültür türlerine aktarılması için bir umut ışığı olarak görülmektedir. Ancak *Capsicum* cinsi içerisindeki türler arası melezlemede fertil birey elde edilme oranları bazı kombinasyonlarda çok düşük kalmış bazı kombinasyonlarda ise tamamen başarısız olmuştur. Bunun başlıca nedeni türler arasındaki uyumsuzluklar, tek taraflı uyumsuzluklar olarak gösterilmektedir ve döllenme sonrasında embriyonun gelişmemesi ve erkek kısır bireyler elde edilmesi ile sonuçlanmaktadır. Türler arası melezleme çalışmalarından derlenen mezlenebilirlik durumları şekil üzerinde özetlenmiştir (Şekil 5). Ayrıca iki tür genetik olarak birbirlerinden ne kadar uzaksa, melezleri o kadar fazla steril veya cansız olmaktadır. Monteiro ve ark. [50] altı farklı türe ait farklı genotipleri kullandığı çalışmalarında diğer türlere en uzak akraba olan *C. pubescens* türünün diğer türlerle melezlenmesinden meyve tutumu dahi elde edememiştir.

Maraş biberlerinde meyvenin saptan kolay kopması istenen bir özelliktir. Ancak ülkemizde geliştirilen çeşitlerde meyvenin saptan kopma durumu maraş biberlerinde çok kuvvetli ve istenmeyen bir özellik göstermektedir. Yapılan çalışmalar kolay kopma özelliğine sahip çeşit geliştirilmesi için sürmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalardan birinde türler arası melezleme ile saptan kopma direnci zayıf (0.199 N) olan *C. chacoense* türünün bir çeşidi kullanılarak, bu özelliğin *C. annuum* türünün çeşitleri (kopma dirençleri 3.86 ve 7.34 N arasında değişen) olan Maraş tipi biberlere aktarılması hedeflenmiştir. Dila, Sena, K7 ve K8 Maraş biberi genotiplerinin *C. chacoense* türü ile melezlemesinden başarılı şekilde F₁ bireyler elde edilmiştir. Bu bireylerin tamamının saptan kopma durumları 0.22 ile 0.26 N arasında değiştiği ve Maraş genotipleri ile kıyaslandığında oldukça düşük olduğu belirlenmiştir (Şekil 5) [51].



Şekil 5 *Capsicum* türleri arası melezleme çalışmalarında kullanılan bazı türler ve başarı durumları, — yüksek oranda fertil bireyler, — canlı hibritler ve tohumlar, - - - F₁ bireyler steril, - - - tamamen steril, aralarında çizgi olmayanlar ise tozlanma ve dölleme başarı elde edilemeyenler A - [52]; B - [53]; C - [54]; D - [55]; E - [56]; F - [25]; G - [57]; H - [58]; I - [59]; J - [60]; K - [51]

Ancak bu başarılı sonuçların yanında türler arası melezlemelerin kısır bireyler meydana getirdiği farklı çalışmalarda bildirilmiştir. Cremona ve ark. [48] *C. annuum* (cv. Friariello) türünü anne, *C. baccatum* var. *pendulum* (cv. P04) türünü baba olarak kullandıkları çalışmada F₁ bireyler elde etmişler ancak elde ettikleri F₁'lerin polen canlılıklarının çok düşük olduğunu ve bu bireylerin erkek kısır olduklarını bildirmişlerdir (Şekil 6). Çiçekteki lekeler ve hibritlerin bu kanı taşıyanlarında çiçeklerde leke küçülse de varlığı devam etmektedir. F₁ bireylerin partenokarpi eğilimli oldukları görülmektedir (Şekil 6).



Şekil 6 *Capsicum annuum* × *C. baccatum* var. *pendulum* türler arası melezlemesi sonucunda elde edilen hibritlerde yaprak (A, B, C), çiçek (D, E, F) ve meyvelerin (G, H, I) fenotipik görünüşleri [48]

Genel olarak, *C. frutescens* × *C. chinense* türleri arasındaki melezleme kombinasyonlarının mümkün olduğu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Pickersgill [21] ve Zijlstra ve ark. [23], *C. frutescens* × *C. chinense* türlerinin aynı genetik kompleks (grup) içerisinde yer almaları nedeniyle çaprazlanmaları sonucunda verimli F₁ bireyler meydana getirebildiklerini bildirmişlerdir. Aynı türleri kromozom homolojisi açısından inceleyen Moreira ve ark. [61] da türler arası melezlemeden elde edilen hibritlerin normal mayoz bölünme gösterdiğini, bivalent 12 kromozom sayısına sahip olduklarını ve hibritlerden elde edilen tohumların canlılığının %73 olduğunu belirlemişlerdir. Diğer

açından farklı genetik komplekslere ait türler arasındaki çaprazlamalardan verimli türler arası melezler oluşturmak çok daha zordur (Şekil 5).

Moleküler Teknikler ile Türler Arası Melezlerin Tespiti

Sitogenetik ve moleküler analizler birçok türün akrabalık seviyelerini, evrim genetiğini ve karyotipik stabilitesini aydınlatmaya yardımcı olmaktadır. Türler arası melezlemeler de genetik haritalama popülasyonları oluşturmak, istenen lokusları etiketlemek, markör tabanlı linkage haritaları elde etmek için başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Tablo 2). Moleküler markörler ile melez bireylerin haritalanması konusundaki yapılan ilk çalışmada *C. annuum* × *C. chinense* türlerinin melezlerinin tanımlaması RFLP markörleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir [62].

Tablo 2 Biber türler arası melezlerinde yapılan moleküler çalışmalar ve moleküler markör haritaları

Ebeveynler	Populasyon	Markör tipi	Markör Sayısı	Kaynak
<i>C. annuum</i> cv. Doux des landes × <i>C. chinense</i> cv. PI 159234	BC	RFLP, isozyme	85	[62]
<i>C. annuum</i> cv. NuMex RNaky × <i>C. chinense</i> cv. PI 159234	F ₂	RFLP	192	[63]
<i>C. annuum</i> cv. NuMex RNaky × <i>C. chinense</i> cv. PI 159234	F ₂	AFLP, RAPD, RFLP	1007	[64]
<i>C. annuum</i> cv. TF68 × <i>C. chinense</i> cv. Habanero	F ₂	AFLP, RFLP	580	[65]
<i>C. annuum</i> cv. Maor × <i>C. frutescens</i> cv. BG2816	BC ₂	RFLP	92	[66]
<i>C. annuum</i> cv. TF68 × <i>C. chinense</i> cv. Habanero	F ₂	SSR, RFLP	333	[67]
<i>C. annuum</i> cv. TF68 × <i>C. chinense</i> cv. Habanero	F ₂	SSR, EST-SSR, RFLP	243	[68]
<i>C. annuum</i> cv. NuMex RNaky × <i>C. frutescens</i> cv. BG 2814-6	F ₂	COS II	263	[69]
<i>C. annuum</i> cv. BA3 × <i>C. frutescens</i> cv. YNXML	F ₂	SSR	64	[70]
<i>C. annuum</i> cv. FL 201 × <i>C. galapagoense</i> cv. TC 07245	F ₂	SSR	400	[71]

Türler arası melezlerin ebeveynler ile akrabalıklarını belirlemek için yapılan moleküler tanımlamalar neticesinde türler arasındaki uyuma durumları ve F₁ bireylerdeki fertilitte durumları da ortaya konulabilmektedir. RAPD [64] tekniğinin yanı sıra, AFLP [65], RFLP [65, 66, 67, 68], COS II [69] ve SSR [67, 68, 70, 71] gibi moleküler markör teknikleri de türler arası melezlerin haritalanmasında başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Türler Arası Melezlerin Diğer Kullanılma Potansiyelleri

Türler arası melezleme çalışmalarında türlerin biyotik ve abiyotik stres şartlarına dayanıklılıkları melezleme çalışmalarında en öncel hedeflerin başında gelmektedir. İkincil bazı özellikler açısından ise farklı biber türlerinde eşsiz bir genetik potansiyel bulunmaktadır. Özellikle acılık, aroma bileşikleri, renk ve bazı süs bitkisi olarak kullanılabilme özellikleri (Alacalı yaprak rengi, boğum arası kısalığı) açısından farklı türlerdeki özelliklerin diğer türlere aktarılabilmesi için türler arası melezleme çalışmalarının sürdürülmesi gerekmektedir.

Biberlerde olgun meyve rengi sarı, turuncu, kahverengi ve kırmızı tonlarında olabileceği bildirilmektedir. Stommel ve Griesbach [72] farklı biber özelliklerinin kalıtımını açıklayabilmek için yürüttükleri çalışmada olgun meyve rengi turuncu ve kırmızı olan ebeveynleri melezlemiştir. F₁, F₂ ve geriye melezlerin olgun meyve renklerinin turuncu ve kırmızı olduğunu bildirmişlerdir. *C. baccatum* türü genotipleri kullanılarak yapılan bir çalışmada ise sarı ve kırmızı olgun meyve rengine sahip ebeveynlerin melezlenmesi sonucu çok daha geniş bir renk yelpazesi (beyaz, sarı, açık sarı koyu sarı, turuncu, koyu turuncu ve kırmızı) gözlemlenmiştir (Şekil 7) [73].



Şekil 7 *Capsicum baccatum* var. *pendulum* türü içerisindeki olgun meyve renk ve şekil farklılıkları (Orijinal resim. Foto: Kazım Mavi 2020)

Bu daha geniş renk çeşitliliğinin Annuum kompleksi içerisindeki çeşitlere aktarılabilmesi için türler arası melezleme bir alternatif olabilir. Olgun meyve rengi, klorofil ve

antosiyenin pigmentlerindeki azalma ve karotenoid pigmentlerin birikmesi sonucunda oluşmaktadır. Olgun meyvelerdeki renk oluşumu üzerine 30'dan fazla farklı karotenoid birikimini etkileyen, çok sayıda gen etki etmektedir [74]. Baskın *B* geni olgun meyvelerde yüksek β -karoten içeriğini kontrol etmektedir. *B* geni ile etkileşime giren *t* geninin ise β -karoten seviyesindeki farklılıklara neden olmaktadır [75]. Kahverengi meyvelerin ise *y+* (kırmızı meyve rengi) geni ile *cl* (klorofil tutucu gen) geninin birleşmesi ile meydana geldiği belirlenmiştir [76]. Meyve şeklinin olgunlaşmamış meyve rengiyle ilişkili olarak ve olgun meyve renginden bağımsız olarak sonraki bireylere aktarıldığı belirlenmiştir [77].

Biberlerde yaprak renginin alacalılığı ve antosiyenin birikmesi çok sayıda gen tarafından kontrol edilmektedir. Süs biberlerinde alacalı yaprak rengi süs bitkisi olarak kullanılacak çeşitlerde istenen bir özelliktir. Alacalı yaprak rengine sahip çeşitler geliştirilmiştir. Bu çeşitlerde hastalık ve zararlılara dayanıklılık zayıf olabilmektedir. Bu nedenle farklı türler ile melezlenerek dayanıklılıkları artırılabilir. Biberlerde *pi* geninin, plastitlerde düzensizliğe neden olarak yapraklarda yeşil ve beyaz renklenmeye neden olduğu tespit edilmiştir [77]. *A* ve *MoA* genlerinin ekspresyonu, alacalı ve alacalı olmayan yeşil yapraklarda menekşe renkli beneklenmeler olmasına neden olmaktadır [77, 78, 79].

Biberlerde acılığın kalıtımı, üzerinde çok fazla çalışılan konuların başında gelmektedir. Tatlı ve acı çeşit ve türler bu amaçla melezlenmiş ve acılığın tatlılık üzerine baskın olduğu belirlenmiştir. Biberlerde ilk tatlı çeşidin acı biberlerden mutasyon yolu ile ortaya çıktığı tahmin edilmektedir. Bir başka deyişle yabani türlerin tamamının acı olduğu düşünülmüştür [80]. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı yabani türlerinde tatlı genotiplere sahip olduğu bildirilmiştir. *C. longidentatum* türü ve Andean kompleksindeki türlerin tatlı biberlere sahip oldukları tespit edilmiştir (Şekil 2) [13]. Günümüzde ıslah edilen en acı çeşitler olan Bhut jolokia, Trinidad Moruga Scorpion gibi çeşitler (1.019.687 scoville acılık değeri üzerinde) *C. chinense* türüne ait çeşitlerdir [81]. Yapılan moleküler analiz sonucunda ilginç bir şekilde bu çeşidin genetik yapısında *C. frutescens* kanı olduğu belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak çeşidin doğal olarak oluşan bir türler arası melez olduğu ifade edilmiştir [82]. Bu durum *C. chinense* türünü kapsaisin içeriğini arttırmak için önemli bir genetik kaynak haline getirmektedir.

Kültürlere ve taleplere bağlı olarak acı ve tatlı çeşit tercihleri, acılık seviyesi tercihleri değişebilmektedir. Acılık stres koşullarına bağlı olarak bir miktar artış gösterebilmekte,

ancak tatlı bir çeşidin acı olması veya acı bir çeşidin tatlı olması söz konusu olmamaktadır. Özellikle daha önce de belirtildiği gibi acılık baskın bir karakter olması nedeniyle tatlı çeşitlerin eldesi için mutlaka iki tatlı çeşidin kullanılması gerekmektedir ki bu durumda bile elde edilecek varyasyonda acı bireylerin meydana gelmesi olasıdır. Türler arası melezlemeler acılık oranını arttırılması ve tatlı genotiplerin bir miktar acılaştırılması için kullanılabilceği gibi türlerin hastalık dayanımlarının aktarılması içinde kullanılabilir. Acılığın kalıtımının incelenmesi için yürütülen bir çalışmada *C. annuum* (cv. Takanotsume orta acı) ve *C. frutescens* (cv. Ac 1443 çok acı) türlerine ait çeşitler kullanılarak melez bireylerdeki acılık durumları belirlenmiştir. Melezlemeden elde edilen F₁ bireyler kendilenmiş ve elde edilen tüm F₂ bireylerin acılık değerleri belirlenmiştir. Elde edilen 22 adet F₂ bireyden 18 tanesi, anne olarak kullanılan *C. annuum* cv. Takanotsume çeşidinden daha acı olarak belirlenmiştir. F₂ bireylerden 9 tanesinin ise baba tür olan *C. frutescens*'ten de daha acı olduğunu tespit etmişlerdir [83]. Biberlerde türler arası melezleme kültür türleri arasında daha yoğun olarak çalışılmıştır. Yabani türlerin melezlenebilirlikleri konusunda hala çok fazla bilinmeyen konu bulunmaktadır. Bu derleme ile bazı konularda daha önce yapılan çalışmalar üzerinden bilgiler sunulmuştur. Özellikle birbirine yakın gruplardaki türlerin melezlenmesinde başarı şansı daha yüksektir. Amaç ve hedeflere yönelik olarak türler arası melezlemelerin bir programlama çerçevesinde yapılması gereklidir. Türlerdeki hastalık ve zararlılara dayanıklılık, abiyotik stres koşullarına dayanıklılık ve meyve kalitesine yönelik kullanılabilir türler belirlenmeli ve kültür türleri ile melezlenerek üstün özelliklerin istediğimiz türlere aktarılması için çalışmalar devam ettirilmelidir. Başarılı bir melezleme için çalışılan türlerle ilgili olarak türler arasındaki prezigotik ve postzigotik engellerinde ayrı ayrı incelenmesi ve ortaya konulması gereklidir. Sonuçta bu ilişkilerin araştırılmasıyla elde edilen yeni bilgiler, biberlerde kültür türleri ile yabani türler arasında melezlemede başarılı olmamızı sağlayabilecektir. Ayrıca ıslahçılar için varyasyon kaynağı olarak başarı sağlanan her türün ıslah programlarında yer alınmasının önü açılmış olacaktır.

Kaynaklar

1. Stebbins, G.L., Chromosomal evolution in higher plants. Addison-Wesley, London. 1971. p. 216.
2. Stalker, H.T., Utilization of wild species for crop improvement. Adv. Agron., 1980. 33: p.111–147.

3. Zillinsky, F.J., Triticale: An update on yield, adaptation, and world production, In: Triticale. R.A. Forsberg (Editor). Crop Sci. Soc. Amer. Spec. Publ. No. 9. Amer. Soc. Agron., 1985. Madison, Wis. p. 1–7.
4. Pandey, K.K., Interspecific incompatibility in *Solanum* species. American Journal of Botany, 1962. 49(8): p.874-882.
5. Lammerts, W.E. Interspecific hybridization in *Nicotiana*. XII. The amphidiploid *rustica-paniculata* hybrid; its origin and cyto-genetic behavior. Genetics, 1930. 16: p.191-211.
6. Schieder, O., Somatic Hybrids of *Datura innoxia* Mill. + *Datura discolor* Bernh. and of *Datura innoxia* Mill. + *Datura stramonium* L. var. *tatula* L. II. Analysis of progenies of three sexual generations. Molec. Gen. Genet., 1980. 179: p.387-390.
7. Wijsman, H.J.W., and J.H. De Jong, On the interrelationships of certain species of *Petunia* IV. Hybridization between *P. linearis* and *P. calycina* and nomenclatorial consequences in the *Petunia* group. Acta Bot. Neerl., 1985. 34(3): p. 337-349.
8. Bernardello, L. et al., The hybrid nature of *Lycium ciliatum* × *cestroides* (Solanaceae): experimental, anatomical and cytological evidence. Canadian Journal of Botany, 1995. 73: p. 1995-2005.
9. Azeez, S.O., and J. O. Faluyi, Hybridization in four Nigerian *Physalis* (Linn.) species. Not Sci Biol, 2018. 10(2): p. 205-210.
10. Trojak-Goluch, A., and A. Berbec, Cytological investigations of the interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *N. glauca* Grah. J. Appl. Genet., 2003. 44(1): p. 45-54.
11. Fatokun, C.A., Cytological studies of the F₁ interspecific hybrid between *Solanum aethiopicum* and *S. gilo* Raddi. Cytologia, 1989. 54: p. 425-428.
12. Eshbaugh, W.H., The taxonomy of the genus *Capsicum*. In: Peppers Botany, Production and Uses. Vincent M. Russo (Editor), 2012. CAB International. p. 14-28.
13. Carrizo Garcia, C. et al, Phylogenetic relationships, diversification and expansion of chili peppers (*Capsicum*, *Solanaceae*). Annals of Botany, 2016. 118: p. 35-51.
14. Barboza, G.E. et al., Four new species of *Capsicum* (*Solanaceae*) from the tropical Andes and an update on the phylogeny of the genus. PLoS ONE, 2019. 14(1): e0209792.
15. Barboza, G.E., B.L. Bianchetti, and J.R. Stehmann, *Capsicum carassense* (*Solanaceae*), a new species from the Brazilian Atlantic Forest. PhytoKeys, 2020. 140: p. 125–138.
16. Halstead, H. D., Experiments with peppers. N. J. Agr. Exp. Sta. Ann. Rpt., 1912. 33: p. 365-368.
17. Khoury C.K. et al., Modeled distributions and conservation status of the wild relatives of chile peppers (*Capsicum* L). Diversity and Distributions, 2020. 26: p. 209-225.
18. Yakub, C.M., and P. Smith, Nature and inheritance of self-incompatibility in *Capsicum pubescens* and *C. cardenasii*. Hilgardia, 1971. 40(12): p. 459-470.
19. Onus, A.N., and Pickersgill, B., Unilateral incompatibility in *Capsicum* (*Solanaceae*): occurrence and taxonomic distribution. Annals of Botany, 2004. 94: p. 289–295.
20. Tong, N., and P.W. Bosland, *Capsicum tovarii*, a new member of the *Capsicum baccatum* complex. Euphytica, 1999. 109: p. 71-77.
21. Pickersgill, B., Cytogenetics and evolution of *Capsicum* L., in Chromosome Engineering in Plants: Genetics, Breeding, Evolution, Part B, T. Tsuchiya and P.K. Gupta, Editors. 1991, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, p. 139-160.
22. Baral, J.B., and P.W. Bosland, Unraveling the species dilemma in *Capsicum frutescens* and *C. chinense* (*Solanaceae*): A multiple evidence approach using morphology, molecular analysis, and sexual compatibility. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004. 129(6): p. 826-832.
23. Zijlstra, S., A.C. Purimahu, and P. Lindhout, Pollen tube growth in interspecific crosses between *Capsicum* species. HortScience, 1991. 26: p. 585-586.
24. Martins, K.C. et al, Crossability and evaluation of incompatibility barriers in crosses between *Capsicum* species. Crop Breeding and Applied Biotechnology, 2015. 15: p. 139-145.

25. Lippert L.F., P.G. Smith, and B.O. Bergh, Cytogenetics of the vegetable crops. Garden pepper, *Capsicum* sp. The Botanical Review, 1966. 32: p. 24-55.
26. McLeod, M.J. et al., An electrophoretic study of the evolution in *Capsicum* (*Solanaceae*). Evolution, 1983. 37: p. 562-574.
27. Kochieva E.Z. et al., Assessment of genetic relationships in the genus *Capsicum* using different DNA marker systems. XIIth Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* and Eggplant, 2004. p: 44-50, Noordwijkerhout, The Netherlands.
28. Eshbaugh, W.H., P.G. Smith, and D.L. Nickrent, *Capsicum tovarii* (*Solanaceae*), a new species of pepper from Peru. Brittonia, 1983. 35(1): p. 55-60.
29. Ibiza V.P. et al., Taxonomy and genetic diversity of domesticated *Capsicum* species in the Andean region. Genetic Resources and Crop Evolution, 2012. 59: p. 1077-1088.
30. Moscone, E.A. et al., The evolution of chili peppers (*Capsicum*–*Solanaceae*): A cytogenetic perspective. Acta Horticulturae, 2007. 745: p. 137-170.
31. Ince, A.G., M. Karaca, and N. Onus, Genetic relationships within and between *Capsicum* species. Biochem Genetics, 2010. 48: p. 83-95.
32. Scaldaferrro, M.A., M. Grabilele, and E.A. Moscone, Heterochromatin type, amount and distribution in wild species of chili peppers (*Capsicum*-*Solanaceae*). Genetic Resources and Crop Evolution, 2013. 60: p. 693-709.
33. Tong, N., and P.W. Bosland, Observations on interspecific compatibility and meiotic chromosome behavior of *Capsicum buforum* and *C. lanceolatum*. Genetic Resources and Crop Evolution, 2003. 50: p. 193-199.
34. Batista, F.R.C., Cytogenetics in *Capsicum* L. in, Production and Breeding of Chilli Pepper (*Capsicum* spp.), do Rêgo, E.R. et al., (Editors). 2016. Springer. p: 41-56.
35. Onus, A.N., A study on crossability relationships between some of the white and purple flowered *Capsicum* species. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 2001. 14(1): p. 101-106.
36. Onus, A.N., *Capsicum* cinsi içerisinde tek taraflı uyumsuzluk üzerine bir araştırma. Anadolu, 2002. 12(2): p. 75-86.
37. Kannangara K. N. et al., Tri-species bridge crosses (*C. annuum* L. × *C. chinense* Jacq.) × (*C. chinense* Jacq. × *C. frutescens* L.) as an alternative approach for introgression of Cucumber Mosaic Virus (CMV) and Chilli Veinal Mosaic Virus (CVMV) resistance from *C. frutescens* L. into *C. annuum* L. Tropical Agricultural Research, 2017. 28 (4): p. 472-489.
38. Yoon J.B. et al., Overcoming two post-fertilization genetic barriers in interspecific hybridization between *Capsicum annuum* and *C. baccatum* for introgression of anthracnose resistance. Breeding Science, 2006. 56: p. 31–38.
39. Morrison, R.A., R.E. Koning, and D.A. Evans, Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. Journal of Plant Physiology, 1986. 126(1): p. 1-9.
40. Yoon J.B. et al., Interspecific cross compatibility among five domesticated species of *Capsicum* genus. Journal of Korean Society of Horticultural Science, 2004. 45: p. 324-329.
41. Yoon J.B., J. Lee, and J.W. Do, Breeding anthracnose resistance in chili pepper: From genetic resources to commercialization. APSA Seed Congress, <https://apsaseed.org/wp-content/uploads/2017/02/1.-Breeding-Anthracnose-Resistance-in-Chilli-from-genetic-resources-to-commercialization-J.B.-Yoon.pdf> (Erişim tarihi: 29.03.2020).
42. Kamvorn, W. et al., Compatibility of inter-specific crosses between *Capsicum chinense* Jacq. and *Capsicum baccatum* L. at different fertilization stages. Scientia Horticulturae, 2014. 179: p. 9-15.
43. Hossain, M.A., M. Minami, and K. Nemoto, Immature embryo culture and interspecific hybridization between *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. via embryo rescue. Jpn. J. Trop. Agric., 2003. 47: p. 9-16.
44. Suprunova, T.P. et al., Production and analysis of interspecific hybrids among four species of the genus *Capsicum*. Proceedings of the XIVth EUCARPIA Meeting on Genetics and Breeding of *Capsicum* & Eggplant. Ed. Universitat Politècnica de València. 2010.

45. Debbarama, C. et al., Wide hybridization and embryo-rescue for crop improvement in *Capsicum*. *Agrotechnology*, 2013. 11: p. 2-6.
46. Sui, Y.H., and N.B. Hui, Acquisition, identification and analysis of an inter-specific *Capsicum* hybrid (*C. annuum* × *C. chinense*). *J Hortic Sci Biotechnol*, 2015. 90: p. 31-38.
47. Manzur, J.P. et al., Successful wide hybridization and introgression breeding in a diverse set of common peppers (*Capsicum annuum*) using different cultivated Aji' (*C. baccatum*) accessions as donor parents. *PLoSONE*, 2015. 10(12):e0144142.
48. Cremona, G. et al., Production of embryo rescued hybrids between the landrace "Friariello" (*Capsicum annuum* var. *annuum*) and *C. baccatum* var. *pendulum*: phenotypic and cytological characterization. *Euphytica*, 2018. 214(8): p. 129.
49. Manzur, J.P., Técnicas y estrategias de mejora para facilitar la hibridación interespecífica y el acortamiento del ciclo generacional en el género *Capsicum*. Para optar al título de Doctor Ingeniero Agrónomo por la Universidad Politécnica de Valencia. 2013.
50. Monteiro, C.E.S., T.N.P. Pereira, and K.P. Campos, Reproductive characterization of interspecific hybrids among *Capsicum* species. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2011. 11: p. 241-249.
51. Arpacı, B.B., and F. Yaralı Karakan, Inter-specific (*Capsicum chacoense* Hunz. and *Capsicum annuum* L.) inheritance of fruit detachment force trait in hot pepper. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, 2018. 57: p. 391-394.
52. Heiser, C.B.Jr, and P.G. Smith, Observations on another species of cultivated pepper, *Capsicum pubescens* R & P. *Proceedings of the American Society of Horticultural Science*, 1948. 52: p. 331-335.
53. Pickersgill, B., Relationships between weedy and cultivated form in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*, 1971. 25: p. 683-691.
54. Smith, P.G., and C.B.Jr. Heiser, Taxonomic and genetic studies on the cultivated peppers *Capsicum annuum* L. and *C. frutescens* L. *American Journal of Botany*, 1951. 38: p. 362-368.
55. Heiser, C.B.Jr, and P.G. Smith, The cultivated *Capsicum* species. *Economic Botany*, 1953. 7: p. 214-227.
56. Eshbaugh, W.H., Genetic and biochemical systematic studies of chili peppers (*Capsicum* - *Solanaceae*). *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 1975. 102: p. 396-403.
57. Smith, P.G., and C.B. Jr. Heiser, Taxonomy of *Capsicum sinense* Jacq. and the geographic distribution of the cultivated *Capsicum* species. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 1957. 84: p. 413-420.
58. Eshbaugh, W.H. A biosystematic and evolutionary study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae). *Brittonia*, 1970. 22: p. 31-43.
59. Heiser, C.B.Jr, and P.G. Smith, New species of *Capsicum* from South America. *Brittonia*, 1958. 10: p. 194-201.
60. Emboden, W.A.Jr., A preliminary study of the crossing relationships of *Capsicum baccatum*, *Butler University Botanical Studies*, 1961. Vol. 14, Article 2.
61. Moreira, N.F., T.N.S. Pereira, and K.C. Martins, Meiotic analysis of interspecific hybrids between *Capsicum frutescens* and *Capsicum chinense*, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2017. 17: p. 159-163.
62. Tanksley, S.D. et al., Conservation of gene repertoire but not gene order in pepper and tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1988. 85(17): p. 6419-6423.
63. Prince, J.P., E. Pochard, and S.D. Tanksley, Construction of a molecular linkage map of pepper and a comparison of synteny with tomato. *Genome*, 1993. 36: p. 404-417.
64. Livingstone, K.D. et al., Genome mapping in *Capsicum* and the evolution of genome structure in the Solanaceae. *Genetics*, 1999. 152: p. 1183-1202.
65. Kang, B.C. et al., An interspecific (*Capsicum annuum* × *C. chinense*) F₂ linkage map in pepper using RFLP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001. 102: p. 531-539.

66. Rao, U.G. et al., Mapping of yield related QTLs in pepper in an interspecific cross of *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens*. Theoretical and Applied Genetics, 2003. 106: p. 1457-1466.
67. Lee, J.M. et al., Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. Theoretical and Applied Genetics, 2004. 108: p. 619-627.
68. Yi, G. et al., Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map. Theoretical and Applied Genetics, 2006. 114: p. 113-130.
69. Wu, F. et al., A COSII genetic map of the pepper genome provides a detailed picture of synteny with tomato and new insights into recent chromosome evolution in the genus *Capsicum*. Theoretical and Applied Genetics, 2009. 118: p. 1279-1293.
70. Tan, S. et al., Construction of an interspecific genetic map based on indel and SSR for mapping the QTLs affecting the initiation of flower primordia in pepper (*Capsicum* spp.). PLoS ONE, 2015. 10(3): e0119389.
71. Arjun, K. et al., Mapping of fruit length related QTLs in interspecific cross (*Capsicum annuum* L. × *Capsicum galapagoense* Hunz.) of chilli. Breeding Science, 2018. 68: p. 219-226.
72. Stommel, J.R., and R.J. Griesbach, Inheritance of fruit, foliar and plant habit attributes in *Capsicum* L. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2008. 133: p. 396-407.
73. Mavi, K. et al., *Capsicum baccatum* var. *pendulum* türü biberlerde melezleme yolu ile çeşit geliştirilmesi. III. Uluslara Arası Tarım Kongresi Özet Kitabı, ISBN: 978-605-80128-2-0, Sayfa:18, Hammamet-Tunus (5-9 Mart), 2020.
74. Matus, Z., J. Deli, and J.J. Szaaboles, Carotenoid composition of yellow pepper during ripening— isolation of b-cryptoxanthin 5,6-epoxide. J. Agr. Food Chem., 1991. 39: p. 1907-1914.
75. Brauer, O., Untersuchungen ueber qualitatseigenschaften in F₁ hybriden von paprika, *Capsicum annuum* L. Z. fuer Pflanzenzuecht. 1962. 48: p. 259-276.
76. Smith, P.G., Brown, mature fruit color in pepper (*Capsicum frutescens*). Science, 1948. 107: p. 345-346.
77. Lippert, L.F., B.O. Bergh, and P.G. Smith, Gene list for the pepper. J. Heredity, 1965. 56: p. 30-34.
78. Peterson, P.A., Linkage of fruit shape and color genes in *Capsicum*. Genetics, 1959. 44: p. 407-419.
79. Wang, D., and P.W. Bosland, The genes of *Capsicum*. HortScience, 2006. 41(5): p. 1169-1187.
80. Mavi, K., Kendisi küçük acısı büyük bir lezzet: Süs biberi. *Agrokop*, 2013. Ağustos: p. 24-28.
81. Bosland, P.W., D. Coon, and G. Reeves, Trinidad Moruga Scorpion pepper is the world's hottest measured chile pepper at more than two million Scoville heat units. Horttechnology, 2012. 22: p. 534-538.
82. Bosland, P.W., and J.B. Baral, 'Bhut Jolokia' the world's hottest known chile pepper is a putative naturally occurring interspecific hybrid. HortScience, 2007. 42: p. 222-224.
83. Ohta, Y., Physiological and genetic studies on the pungency of *Capsicum*, V. Inheritance of pungency. Jpn. J. Genet., 1962. 37: p. 169-175.

Bir sonraki sayıda grşmek midiyle..
Hope to see you in the next issue..

Author Guidelines

General Principles

1. The article should be submitted by the responsible author responsible as Microsoft Word (Doc, Docx).
2. The responsible author is responsible for monitoring all the processes of the article.
3. The main section headings should be bold and the first letter in capital letters, the first letter of the first word in the 2nd-degree headings should be large. If a third-degree title is required, the title should be in italics and only the first letter of the first word should be capitalized. If possible, articles with fourth-degree titles should not be used in our journal.
4. The main headings and sub-headings should not be numbered.
5. Turkish and English titles of the articles should be short, descriptive, and not more than fourteen words (except prepositions).
6. In the Pre-Control and Evaluation processes, the authors must submit the proposed corrections within 30 days at the latest. Otherwise, the article will be rejected.
7. Please click here to see the article written according to the rules of our journal.

Note: The general similarity rate should not exceed 20% except the bibliography part of the submitted articles. It is necessary to inform the journal editor if the rate specified in the necessary cases is exceeded. All articles submitted to the journal are screened with iThenticate plagiarism program.

8. Except for the Turkish and English titles of the work, all remaining parts should be written on the right side.
9. The text should be written on an A4-size page, in 12-font size Times New Roman, and double-spaced.
10. There should be 3 cm margin on the left, right, and top of the page.
- 11 Text should be written in a single column, all pages should be given a page number.
There is no page limit in publishing an article in our journal.

Names Section

A double-blind peer reviewer system is applied in our journal. Therefore, the names and addresses of authors should not be given in the main text when loading the Manuscript to the system. Author names and contact information should be written on a separate cover page. The cover page is available in the article submission section of our journal.

Abstract

The article can be written in Turkish and English. English and Turkish abstracts should be written at the beginning of the Turkish manuscripts.

The abstract should contain brief and clear information about the purpose, method, and results of the article. 10 font size, single line spacing and maximum 300 words should be written. No reference should be made to the "Abstract".

Keywords: Keywords should be 10 font sizes, minimum 3, and maximum of 5 words. Keywords must be separated with a comma (,) sign and should be in lowercase.

Introduction

The sections of the main part of the study should be written in 14 font sizes; Bold and the first letter should be capitalized; Article should have Introduction, Methods, Results, Discussion, and Conclusion sections. The second level titles should be written in the left, in 12 font sizes, the first letter of the first word should be capitalized, bold, and numbered. A line in the previous paragraph must be separated by a space.

Figures and Tables

In the Turkish article for Figures and Tables;” Şekil“, ”Tablo“; whereas in The English article “Fig”, “Table” should be used (Table 1, Fig 1).

Figure and Table words should be written in bold, and at the end of the description of figures and tables should not have a dot (.)

Figures, graphics, photographs and the like should be written under Figures and written with 11 fonts. Figure and Table should be given in the main document in the relevant places, should not be uploaded as separate files or should not be added to the end of the text.

Examples;

Table 1 Possible effects of genetically modified organisms

Table 2 Methods of tissue culture in tomato plants

Fig. 1 Amount of GMO products in the world

Fig. 2 Countries with the highest number of GM cultivation in the world

Citation Inside the Text

In the text, the author should be numbered. Name and year should not be specified.

Example: Potatoes produced on a global scale are used in many basic areas [1, 2, 3]. Fifty percent of primarily produced potatoes are used for fresh consumption, such as baking, frying, boiling [4, 5, 6, 7].

References

The references section should be written in 10 font sizes and without hanging indentations. In the references section, italics should not be written except in italic words such as “in vivo, in vitro, ex-situ” and species names. References should be written according to the “Chicago style”. Besides, there is an endnote style preparing for “International Journal of Life Sciences and Biotechnology”. You can prepare your references using that style. For Endnote style, you can reach it by clicking on the endnote at the bottom right part of the main page of the journal.

Examples

Example of an article with 1 author;

Marakli, S., A Brief Review of Molecular Markers to Analyze Medicinally Important Plants. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2018. 1 (1): p. 29-36.

Example of an article with 2 authors;

Kocacaliskan, I. and I. Tailor, Allelopathic effects of walnut leaf extracts and juglone on seed germination and seedling growth. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2001. 76 (4): p. 436-440.

Example of an article with 3 authors;

Segura-Aguilar, J., I. Hakman, and J. Rydström, The effect of 5OH-1,4-naphthoquinone on Norway spruce seeds during germination. Plant Physiology, 1992. 100 (4): p. 1955-1961.

Example of articles with 4 or more authors

Arasoglu, T., et al., Synthesis, characterization, and antibacterial activity of juglone encapsulated PLGA nanoparticles. Journal of applied microbiology, 2017. 123 (6): p. 1407-1419.

Example for the book;

Kocalishkan, I., Allelopathy. 2006, Ankara, Turkey: Our Office Press-In Turkish.

Example for Book Chapter;

Kaya, Y., F.Z. Huyop, and M.F. Edbeib, Genetic Diversity in Plants, in Advances in Biosciences, F.Z. Huyop and S. Mohammed, Editors. 2019, Penerbit UTM Press. Malaysia: Malaysia. p. 04-24.

Ethical Principles and Publication Policy

Ethical standards for publication exist to ensure high-quality scientific publications, public trust in scientific findings, and that people receive credit for their ideas. In addition, the authors are encouraged to follow the ethic guidelines of the Committee on Publication Ethics (COPE) which can be viewed on the COPE website.

International Journal of Life Sciences and Biotechnology (Int J. Life Sci. Biotechnol.) is an electronic peer-reviewed international journal trying to have the highest standards of publication ethics. For that, we affirm the following principles of the Publication Ethics and Malpractice Statement.

If malpractice is discovered at any time even after the publication, the articles not in accordance with these standards will be removed from the publication. Int J. Life Sci. Biotechnol. is checking all papers in a double-blind peer-review process. We also check for plagiarisms, research fabrication, falsification, and improper use of any organisms in research. We will also report any cases of suspected plagiarism or duplicate publishing. Int J. Life Sci. Biotechnol. reserves the right to use plagiarism detecting software to screen submitted papers at all times.

Author's responsibilities: The author or authors must guarantee that they have written a unique study. Moreover, they must make sure that the article has not been submitted and evaluated elsewhere at the same time. Literature of the other researchers, all contributors and sources (including online sites) should be appropriately credited and referenced. All submitted manuscripts should be edited for language. All references should be cited without been copied or plagiarized. If needed, any financial sources or another conflict of interest should be disclosed. In order to correct the paper, any significant error or inaccuracy in the published works should be notified by the related authors. An author agrees to the license agreement before submitting the article. All articles must be submitted using the online submission procedure. Submitting a paper simultaneously to more than one publication at a time is a violation of publications' ethics.

Editorial responsibilities: Editors along with Editor-in-Chief and Editorial Board have publication decisions. Editors must guarantee a fair double-blind peer-review of the submitted articles for publication. They have to prevent any potential conflict of interests between the author and editors and reviewers. They have to guarantee the confidentiality of submitted articles before publishing. Editor-in-Chief will coordinate the work of the editors.

Peer review/responsibility for the reviewers: They have to review the manuscripts based on content without regard to ethnic origin, gender, sexual orientation, citizenship, religious belief, or political philosophy of the authors. They have to guarantee the confidentiality of submitted articles before publishing. They have to report any plagiarisms, research fabrication, falsification, and improper use of any organisms in research to the editors and/or the Editor-in-Chief. They have to review the papers objectively and state their opinions clearly in the forms and on the paper. A reviewer having inadequate time or feeling unqualified should notify the editors as soon as possible and excuse her/himself from the review process.

Plagiarism

All journals published by IJLSB are committed to publishing only original material, i.e., material that has neither been published elsewhere nor is under review elsewhere. Manuscripts that are found to have been plagiarized from a manuscript by other authors, whether published or unpublished, will incur plagiarism sanctions.

Manuscripts are checked by Ithenticate Plagiarism System.

Duplicate Submission

Manuscripts that are found to have been published elsewhere, or to be under review elsewhere, will incur duplicate submission/publication sanctions. If authors have used their own previously published work or work that is currently under review, as the basis for a submitted manuscript, they are required to cite the previous work and indicate how their submitted manuscript offers novel contributions beyond those of the previous work.

Citation Manipulation

Submitted manuscripts that are found to include citations whose primary purpose is to increase the number of citations to a given author's work or articles published in a particular journal, will incur citation manipulation sanctions.

Data Fabrication and Falsification

Submitted manuscripts that are found to have either fabricated or falsified experimental results, including the manipulation of images, will incur data fabrication and falsification sanctions.

Improper Author Contribution or Attribution

All listed authors must have made a significant scientific contribution to the research in the manuscript and approved all its claims. It is important to list everyone who made a significant scientific contribution, including students and laboratory technicians.

Redundant Publications

Redundant publications involve the inappropriate division of study outcomes into several articles.

Sanctions

In the event that there are documented violations of any of the above-mentioned policies in any journal, regardless of whether or not the violations occurred in a journal published by Int J. Life Sci. Biotechnol., the following sanctions will be applied:

Immediate rejection of the infringing manuscript.

Immediate rejection of every other manuscript submitted to any journal published by Int J. Life Sci. Biotechnol. by any of the authors of the infringing manuscript.

The prohibition against all of the authors for any new submissions to any journal published by IJLSB, either individually or in combination with other authors of the infringing manuscript, as well as in combination with any other authors. This prohibition will be imposed for a minimum of 36 months. Prohibition against all of the authors from serving on the Editorial Board of any journal published by Int J. Life Sci. Biotechnol.

In cases where the violations of the above policies are found to be particularly egregious, the publisher reserves the right to impose additional sanctions beyond those described above.

Publication Charge

“International Journal of Life Sciences and Biotechnology” is an Open Access Journal and does not charge any printing charges from authors, during article delivery, assessment and printing stages.

Aim and Scope

International Journal of Life Sciences and Biotechnology (Int J. Life Sci. Biotechnol.) is an international peer-reviewed journal that publishes original articles from all biology and molecular biology studies, particularly in the fields of life sciences and biotechnology. The language of publication is Turkish and English. Also the main objective of Int J. Life Sci. Biotechnol. is to provide quality publications to scientists, researchers, and engineers from both academia and industry who want to communicate the latest developments and practices in their field.

Int J. Life Sci. Biotechnol. publishes original papers in various fields of Life Sciences and Biotechnology that covers, but is not limited to, the following areas:

- Agricultural Biotechnology
- Animal (livestock and fish production, physiology, breeding and genetics, biotechnology, etc),
- Animal Biotechnology
- Biochemical Genetics,
- Biochemistry
- Biodiversity and biodiscovery
- Bioinformatics and system biology
- Biology and Molecular Biology,
- Bioremediation and biodegradation
- Biotechnology
- Bioethics (Life Sciences and Biotechnology)
- Botany,
- Evolution and Population Genetics,
- Food Biotechnology
- Genetic engineering and cloning
- Lichens
- Genetics,
- Biotechnological product and Halal Food
- Industrial Biotechnology
- Medical Biotechnology
- Molecular Genetics
- Plant (Plant production, physiology, breeding and genetics, biotechnology, agronomy, horticulture, plant protection, etc.),
- Plant Biotechnology
- Soil (soil ecology, physics, and chemistry, etc)
- Polar Science (Life Sciences and Biotechnology)

DECLARATION: This work is part of Gülfidan KUYUMCU's MA thesis. Articles on 27-29 September 2017 held in Bayburt in Turkey was presented as a Oral Presentation I. International Organic Agriculture and Biodiversity Symposium

Genetic Analysis Related To Organized Genetic Changes in Potato And Processed Potatoes

Gulfidan Kuyumcu^{1*}, Muhammed Majed Abed²

Author Addresses: ¹ Samsun Ondokuz Mayıs University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Samsun / Turkey

² Samsun Ondokuz Mayıs University, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Biotechnology, Samsun / Turkey

*Corresponding Autor: Gulfidan Kuyumcu, e-mail: ijlsb@intsa.org

Please write the e-mail addresses and Orcid ID numbers of all authors **(required fields)**

Author 1 mail and Orcid ID:

Author 2 mail and Orcid ID:

Author 3 mail and Orcid ID:

Ethics Committee Report

Article If an Ethics Committee Report is required to conduct a research on animals and humans and to conduct this research, it is mandatory that the **Ethics Committee Report be scanned and uploaded as a PDF file**. Otherwise, the article is returned to the author at the preliminary examination and other stages.

1.REVIEWER SUGGESTION

DEGREE:
FIRST NAME:
LAST NAME:
MAIL ADDRESS:
INSTITUTION:
DEPARTMENT:
SUBJECTS:

2.REVIEWER SUGGESTION

DEGREE:
FIRST NAME:
LAST NAME:
MAIL ADDRESS:
INSTITUTION:
DEPARTMENT:
SUBJECTS:

3.REVIEWER SUGGESTION

DEGREE:
FIRST NAME:
LAST NAME:
MAIL ADDRESS:
INSTITUTION:
DEPARTMENT:
SUBJECTS: