

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN FAKÜLTESİ
FEN DERGİSİ



<http://dergipark.gov.tr/sufefd>

Ekim 2018

Cilt: 44

Sayı : 2



SELÇUK ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ FEN DERGİSİ

SELÇUK UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE FACULTY

Dergi Sahibi: **Prof.Dr. Mustafa KÜÇÜKÖDÜK**

Baş Editör: **Doç.Dr. Evren YILDIZTUGAY**

İletişim/Correspondence

Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı
Alaeddin Keykubat Kampusu, Selçuklu, 42130, Konya
Tel: +90 332 2238853 Fax: +90 332 2412499

Web: <http://dergipark.gov.tr/sufefd>

E-posta: selcukfendergi@gmail.com

Yayın Tarihi / Publication Date

11.10.2018

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ FEN DERGİSİ SELCUK UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE FACULTY

Baş Editör (Editor in chief)

Doç.Dr. Evren YILDIZTUGAY
(S.Ü. Fen Fakültesi Biyoteknoloji Bölümü)

Yayın Kurulu (Editorial Board)

Prof.Dr. Yavuz BAĞCI, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Türkiye
Prof.Dr. Ülfet ATAV, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, Türkiye
Prof.Dr. Ahmet Sinan ÇEVİK, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Matematik Bölümü, Türkiye
Doç.Dr. Haluk ÖZPARLAK, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Türkiye
Doç.Dr. İlkey Hilal GÜBBÜK, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Türkiye
Doç.Dr. Mustafa ÖZMEN, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Türkiye
Doç.Dr. İsmail KINACI, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstatistik Bölümü, Türkiye
Dr. Sinan ALKAN, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Türkiye
Dr. Marcello LOCATELLI, Università degli Studi G. d'Annunzio Chieti e Pescara, İtalya
Dr. Adriano MOLLICA, Università degli Studi G. d'Annunzio Chieti e Pescara, İtalya
Dr. Simone CARRADORI, Università degli Studi G. d'Annunzio Chieti e Pescara, İtalya

Danışma Kurulu (Advisory Board)

Prof.Dr. Rıza OĞUL, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, Türkiye
Prof.Dr. Ayhan ÖZMEN, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, Türkiye
Prof.Dr. Salih YILDIZ, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Türkiye
Prof.Dr. Mustafa YILMAZ, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Türkiye
Prof.Dr. Ahmet KOÇAK, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Türkiye
Prof.Dr. Kemal AYDIN, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Matematik Bölümü, Türkiye
Prof.Dr. Mehmet Fedai KAYA, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Aktüerya Bölümü, Türkiye
Prof.Dr. Coşkun KUŞ, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstatistik Bölümü, Türkiye
Doç.Dr. İmren HATAY PATİR, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Türkiye
Doç.Dr. Buğra SARAÇOĞLU, Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstatistik Bölümü, Türkiye
Doç.Dr. Gülşin ARSLAN, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Türkiye

44(2)
2018

Yazışma Adresi

Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı
Alaeddin Keykubat Kampusu, Selçuklu, 42130, Konya

✉: selcukfendergi@gmail.com

Tel : 0 332 223 88 53 • Faks : 0 332 241 24 99

..... Yılda İki Kez Yayınlanır



SELÇUK ÜNİVERSİTESİ FEN FAKÜLTESİ FEN DERGİSİ

SELÇUK UNIVERSITY JOURNAL OF SCIENCE FACULTY

e-ISSN: 2458-9411

CİLT:44, SAYI:2, EKİM 2018

VOLUME:44, ISSUE 2, OCTOBER 2018

İÇİNDEKİLER

Contents

- Bir Kez İyonlaşmış Argon (Ar II)'da Geçiş Olasılığı Hesaplamaları**107–116
The Calculation of Transition Probabilities in Singly Ionized Argon (Ar II)
Şule ATEŞ, Yağmur Nuray ATEŞ
- M-Matrisleri Üzerine Bir Eşitsizlik**117–120
An Inequality on M-Matrices
Ali ÖZDEMİR
- Mısır Ekmeğindeki Fitik Asit Miktarını Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesinde Yanıt Yüzey Yöntemi Yaklaşımı**121–134
Some Factors in the Effective Amount of Corn Bread Phytic Acid with Response Surface Method Approach
Duygu KILIÇ, Hülya BAYRAK, Berrin ÖZKAYA
- Böcek Dokularından DNA İzolasyonu Yöntemlerinin Kalite, Verim ve Maliyet Açısından Karşılaştırılması**135–148
Comparison of DNA Isolation Methods From Insect Tissues in Terms of Quality, Yield and Cost
Murat GÜLER, Filiz TOKGÖZ, Ertan Mahir KORKMAZ, Mahir BUDAK
- Deri Endüstrisinde Kullanılan Metilizotiazolinon İçeren Antimikrobiyal Maddelerin Referans Suşlar Üzerine Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu**149–156
Minimum Inhibition Concentration of an Antimicrobial Agent Containing Methylisothiazolinone Used in Leather Industry Against Reference Strains
Pınar ÇAĞLAYAN
- Yumurtaya Verilen Siklofosfamid ve C Vitamini'nin Tavuk Embriyoları Üzerindeki Bazı Etkileri**..157–173
Some Effects of Cyclophosphamide and Vitamin C Given in ovo on Chicken Embryos
Haluk ÖZPARLAK, Bülent ÇELİK, Döndü BALTA
- Bitki Patojeni Virüslerde Proteaz Tipleri ve Fonksiyonları**.....175–186
Protease Types and Functions of Plant Pathogenic Viruses
Şerife TOPKAYA, Filiz ERTUNÇ
- Planktonlarda Siklomorfozis Üzerine Derleme**187–202
A Review About Cyclomorphosis in Plankton
Duygu BERDİ, Evren YILDIZTUGAY, Mustafa KÜÇÜKÖDÜK, Ahmet ALTINDAĞ

Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi

ISSN 2458-9411 (e-dergi) Dergi web sayfası <http://dergipark.gov.tr/sufefd>

Doç Dr. Evren YILDIZTUGAY, Editör,

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi,

Biyoteknoloji Bölümü, 42130 Konya, TÜRKİYE

e-mail: selcukfendergi@gmail.com



Makale Gönderme ve Telif Hakkı Devir Sözleşmesi

| | |
|-----------------------|--|
| Makale Başlığı | |
| Yazar(lar) | |

Makaleden sorumlu yazarın bilgileri:

Adı ve Soyadı

Adresi

E-posta

Telefon

Faks

Sunmuş olduğumuz makalenin yazar(lar)ı olarak ben/bizler aşağıdaki konuları taahhüt ederiz:

- Bu makale tarafımı/tarafımızdan yapılmış özgün bir çalışmadır.
- Yazar/Yazarlar olarak makalenin sorumluluğunu üstlenirim/üstleniriz.
- Bu makale başka bir yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere herhangi bir yere yollanmamıştır.
- Yazar/Yazarlar gönderilen makaleyi görmüş ve sonuçlarını onaylamıştır.

Yukarıdaki konular dışında yazar(lar)ın aşağıdaki hakları ayrıca saklıdır:

- Telif hakkı dışındaki patent hakları yazar/yazarlara aittir.
- Yazar/Yazarlar makalenin tümünü kitaplarında ve derslerinde, sözlü sunumlarında ve konferanslarında kullanabilir.
- Satış amaçlı olmayan kendi faaliyetleri için çoğaltma hakları vardır.

Bunun dışında, makalenin çoğaltılması, postalanması ve diğer yollardan dağıtılması, ancak bilim ve yayın kurulunun izni ile yapılabilir. Makalenin tümü veya bir kısmından atıf yapılarak yararlanılabilir.

Ben/Biz bu makalenin, etik kurallara uygun olduğunu ve belirtilen materyal ve yöntemler kullanıldığında herhangi bir zarara ve yaralanmaya neden olmayacağını bildiririz.

Makaleye ait tüm materyaller (kabul edilen veya reddedilen fotoğraflar, orijinal şekiller ve diğerleri), bilim ve yayın kurulunca bir yıl süreyle saklanacak ve daha sonra imha edilecektir.

Bu belge, tüm yazar/yazarlar tarafından imzalanmalıdır. Bütün imzalar, ıslak imza olmalıdır.

| *Yazar(lar) Adı ve Soyadı | Adresi | Tarih | İmza |
|---------------------------|--------|-------|------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

*Satır sayısı, yazar sayısı kadardır. Yetersizse artırılabilir.

Makalenin Editörler Kurulunca yayına kabul edilmemesi durumunda bu belge geçersizdir.



Makaleler, A4 (210 mmx297 mm) boyutunda 12 punto Times New Roman yazı tipinde ve çift satır aralıklı yazılmalıdır. Sayfanın sağında, solunda, altında ve üstünde 2.5'er cm boşluk bırakılmalı ve yazılar sağa-sola dayalı olmalıdır. Makalenin her sayfası ve satırları numaralandırılmalıdır. Yazar ad(lar)ı açık olarak yazılmalı ve akademik unvan belirtilmemelidir. Türkçe hazırlanan makaleler Türk Dil Kurumu'nun son yazım kılavuzu dikkate alınarak yazılmalıdır.

Makale: Türkçe Başlık, Türkçe Öz, Anahtar Kelimeler, İngilizce Başlık, Abstract, Keywords, Giriş, Materyal ve Metot, Araştırma Sonuçları, Tartışma, Teşekkür (varsa), **Kaynaklar** bölümlerinden oluşmalıdır. Bölüm adları koyu yazılmalıdır. Varsa her bir şekil ve tablolar makale içerisinde bahsedildikleri yerden sonra sırayla yerleştirilmelidir.

Başlık: Kısa ve açıklayıcı olmalı, 14 punto ve koyu, kelimelerin ilk harfi büyük olmalı, ortalanarak yazılmalı ve 15 kelimeyi geçmemelidir. İngilizce başlık Türkçe başlığı tam olarak karşılmalı, 14 punto ve koyu yazılmalıdır.

Öz: Türkçe ve İngilizce özlerin her biri 300 kelimeyi geçmemelidir. Türkçe ve İngilizce özlere sırasıyla "Öz" ve "Abstract" kelimeleri kullanılmalıdır. Öz, çalışmanın amacını, nasıl yapıldığını, sonuçları ve sonuçlar üzerine yazar(lar)ın yaptığı değerlendirmeleri içermelidir.

Öz ve Abstract kısımlarında kesinlikle referans kullanılmamalıdır.

Anahtar Kelimeler: Özlerin 1 satır altına, her anahtar kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük harflerle, mümkünse başlıkta kullanılmayan, çalışmayı en iyi biçimde tanımlayacak en fazla 6 anahtar kelime yazılmalıdır.

Giriş: Bu bölümde; çalışma konusu, gerekçesi, konu ile doğrudan ilgili önceki çalışmalar ve çalışmanın amacı verilmelidir.

Materyal ve Metot: Bu bölümde makalede kullanılan materyal ve metot açıkça belirtilmelidir.

Araştırma Sonuçları: Elde edilen sonuçlar verilmeli, gerekirse çizelge, şekil ve grafiklerle desteklenerek bulgular açıklanmalıdır. Elde edilen bulgular tekrardan kaçınılması amacıyla ya çizelge yada grafik olarak verilmelidir. İstatistiki olarak önemli bulunan faktörler, uygulanan istatistik analiz tekniğine uygun karşılaştırma yöntemi ile yorumlanarak ilgili istatistikler üzerinde harflendirme yapılmalıdır. İstatistiki analiz yönteminin doğru seçilmediği ve/ya analiz gereği gibi yapılmadığı durumlarda editörler kurulu makaleyi değerlendirme dışında tutabilir.

Tartışma: Bulgular çalışma ile ilgili güncel makalelerle tartışılmalı, ancak gereksiz tekrarlardan kaçınılmalıdır. Bulguların başka araştırmalarla benzerlik ve farklılıkları verilmeli, nedenleri açıklanmalıdır.

Teşekkür: Mümkün olduğunca kısa olmalı ve yapılan katkı ifade edilerek verilmelidir.

Kaynaklar: Eserde yararlanılan kaynaklara ilişkin atıf metin içinde "(Yazarın soyadı, yıl)" yöntemine göre yapılmalıdır. Örnek: (Yıldızıtugay, 2006), (Yıldızıtugay ve Küçüköğdük, 2012). Yazara atıf yapılırsa sadece yayının yılı parantez içine alınmalıdır. Örnek: Yıldızıtugay (2006)'a göre ya da Bağcı ve Küçüköğdük (2000). Üç ya da daha fazla yazar için makale içindeki atıfta Türkçe makalelerde "ve ark." ; İngilizce makalelerde "et al." kullanılmalıdır. Örnek: (Yıldızıtugay ve ark., 2014), (Yıldızıtugay et al., 2014) veya Özfidan-Konakçı ve ark. (2015)'e göre. Aynı yazarın aynı yıl içinde 1'den fazla yayını varsa, yıldan sonra küçük harfler verilmelidir. Örnek: (Yıldızıtugay ve ark., 2014a). Aynı yazarın birden fazla yayınına atıf yapılacaksa yıldan sonra noktalı virgül (;) işareti ile ayırt edilmelidir. Örnek: (Yıldızıtugay, 2012; 2013; 2014). Birden fazla atıf yapılırsa atıflar arasında noktalı virgül (;) kullanılmalıdır. Örnek: (Yıldızıtugay ve Küçüköğdük, 2012; Yıldızıtugay ve ark., 2014; Yıldızıtugay, 2006).

Kaynaklar bölümünde metin içinde atıf yapılan tüm kaynaklar alfabetik olarak (yazarların soyadlarına göre) ve orijinal dilinde verilir. Dergi isimleri italik yazılmalıdır. **Kongre kitaplarında Türkçe ya da yabancı dilde özeti yayınlanmış çalışmalara atıf yapılamaz.** Makaledeki yanlış atıf ve kaynak gösterimlerine ait sorumluluk yazar(lar)a aittir.

Dergi:

Asada K (2006). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639.

Madhava Rao KV and Sresty TVS (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci* 157: 113-128.

Liu ZJ, Guo YK, Bai JG (2010a). Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress. *J Plant Growth Regul* 29: 171-183.

Kitap:

Kılınç M, Kutbay HG (2008). Bitki Ekolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara.

Odum EP (1971). Fundamentals of Ecology, Third Edition, W.B. Saunders Company, London.

Kitabın Bir Bölümü:

Babaoğlu M, Yorgancılar M, Akbudak MA (2001). Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri. (Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), *Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları*, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 1-35.

Eteve G (1985). Breeding for tolerance and winter hardiness in pea. In Hebblethwaite PD, Heath MC, Dawkins TCK (Eds) *The pea Crop: A Basis for Improvement*. Butterworths, London. UK, pp. 131-136.

Yazarı Belirtilmeyen Kurum Yayınları:

TÜİK (2012). Tarım İstatistikleri Özeti. Türkiye İstatistik Kurumu, Yayın No: 3877, Ankara

İnternette Alınan Bilgi:

FAO (2013). Production and trade statistics. <http://www.fao.org/economic/ess/ess-trade/en/> (Erişim tarihi:02.10.2013)

Şekiller ve Tablolar: Şekil, grafik, fotoğraf ve benzerleri "Şekil", sayısal değerler ise "Tablo" olarak belirtilmelidir. Tüm şekil ve tablolar makalenin içine yerleştirilmelidir. Şekil ve tabloların boyu tek sayfa düzeninde en fazla 16x20 cm ve çift sütun düzeninde ise genişliği en fazla 8 cm olmalıdır. Şekil ve tabloların boyutu baskıda çıkabilecek çözünürlükte olmalıdır. Araştırma sonuçlarını destekleyici nitelikteki resimler 600 dpi çözünürlüğünde "jpeg" formatında olmalıdır. Her tablo ve şekle metin içerisinde atıf yapılmalıdır. Tüm tablo ve şekiller makale boyunca sırayla numaralandırılmalıdır (**Tablo 1** ve **Şekil 1**). Tablo ve şekil başlıkları ve açıklamaları kısa ve öz olmalıdır. Şekil ve tablo başlık yazıları 10 punto, şekil ve tabloların içindeki yazılar 9 punto, tablo altı yazılar 8 punto Times New Roman yazı karakterinde olmalıdır. Tablo ve şekillerde kısaltmalar kullanılmış ise hemen altına bu kısaltmalar açıklanmalıdır.

Birimler: Tüm makalelerde SI (System International d'Units) ölçüm birimleri kullanılmalıdır. Ondalık kesir olarak nokta kullanılmalıdır (1,25 yerine 1.25 gibi). Birimlerde "/" kullanılmamalı ve birimler arasında bir boşluk verilmelidir (m/s yerine m s⁻¹, J/s yerine J s⁻¹, kg m/s² yerine kg m s⁻² gibi). Sayı ile sembol arasında bir boşluk bırakılmalıdır (4 kg N ha⁻¹, 3 kg m⁻¹ s⁻², 20 N m, 1000 s⁻¹, 100 kPa, 22 °C gibi). Bu kuralın istisnaları düzensel açılar için kullanılan derece, dakika ve saniye sembolleridir (°, ' ve "). Bunlar sayıdan hemen sonra konmalıdır (10°, 45', 60") gibi). Litrenin kısaltması "l" olarak belirtilmelidir. Cümle sonunda değillerse sembollerin sonuna nokta konulmamalıdır (kg, değil kg).

Formüller: Formüller numaralandırılmalı ve formül numarası formülün yanına sağa dayalı olarak parantez içinde gösterilmelidir. Formüllerin yazılmasında Word matematik işlemcisi kullanılmalı, ana karakterler 12 punto, değişkenler italik, rakamlar ve matematiksel ifadeler düz olarak verilmelidir. Metin içerisinde atıf yapılacaksa "Eşitlik 1" biçiminde verilmelidir (...ilişkin model, Eşitlik 1' de verilmiştir).

Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi

Fen Dergisi Editörlüğü

42130 Kampüs/KONYA

Faks: 0 332 241 24 99

E-mail: selcukfendergi@gmail.com

Web Sayfası: <http://dergipark.gov.tr/sufefd>

Bir Kez İyonlaşmış Argon (Ar II)'da Geçiş Olasılığı Hesaplamaları

Şule ATEŞ*, Yağmur Nuray ATEŞ

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü, KONYA

*e-mail: suleates@selcuk.edu.tr

Öz: Bu çalışmada, bir kez iyonlaşmış Argon (Ar II)'un bazı seviyeleri arasındaki elektrik dipol geçiş olasılıkları, en zayıf bağlı elektron potansiyel model (WBEPM) teori kullanılarak hesaplanmıştır. Hesaplamalar için gerekli olan parametrelerin belirlenmesinde, yarıçapların beklenen değerleri için sayısal Coulomb yaklaşımı (NCA) ve relativistik olmayan Hartree-Fock (NRHF) dalga fonksiyonları kullanılmıştır. Enerji değerleri ise NIST (National Institute of Standards and Technology)'den alınmıştır. Elde edilen geçiş olasılığı değerleri literatürdeki sonuçlarla karşılaştırılmış ve iyi bir uyum elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: Elektrik dipol geçiş olasılığı, En zayıf bağlı elektron potansiyel model teori, Bir kez iyonlaşmış Argon

The Calculation of Transition Probabilities in Singly Ionized Argon (Ar II)

Abstract: In this study, the electric dipole transition probability values between some levels in singly ionized argon (Ar II) have been calculated using the weakest bound electron potential model (WBEPM) theory. The Numerical Coulomb Approximation (NCA) and the numerical nonrelativistic Hartree-Fock (NRHF) wave functions for the expectation values of radii in the determination of parameters needed for calculations have been used. Energy levels have been taken from NIST database. The obtained transition probability values have been compared with results in the literature and, good agreement have been obtained.

Keywords: Electric dipole transition probability, Weakest bound electron potential model theory, Singly ionized argon

1. Giriş

Geçiş olasılığı gibi atomik parametrelerin bilinmesi, sadece teorik alanda değil aynı zamanda bilinen lambalar, lazerler, endüstriyel plazmalar, füzyon gibi herhangi bir radyasyon yayma kaynağı teşhislerinde veya astrofizikte büyük önem taşımaktadır (Belmonte ve ark., 2014). Ayrıca geçiş olasılığı verileri, güneş atmosferindeki bollukların tahmin edilmesine katkıda bulunur; bu da, karasal ve Venüs atmosferlerinin evrimini

modellemek için oldukça önemlidir (Belmonte ve ark., 2014; Lodders, 2008). Argon ise, lazer fiziği, laboratuvar plazmaları, tokamaklar ve astrofizikteki uygulamaları sebebiyle en çok çalışılan nadir gazdır (Dipti, 2016). Argonda geçiş olasılıklarının belirlenmesi, özellikle astrofizikte oldukça ilgi görmektedir. Argon plazmaları, arzulan özellikleri sebebiyle ve plazma teşhisi için, özellikle sıcaklık belirleme aracı olarak çalışmak için spektral çizgilerinin uygunluğundan dolayı, son 50

yılı aşkın süredir kapsamlı olarak çalışılmaktadır (Belmonte ve ark., 2014; Wiese, 1988; Behringer ve Thoma, 1976). Bununla birlikte, tam bir geçiş olasılığı seti oluşturmak için yapılan tüm çabalara rağmen, UV (Ultraviyole) bölgesindeki Ar II spektral çizgileri için Kramida ve çalışma arkadaşlarının önerdiği bazı verilerde yaklaşık %50'lik belirsizlikler vardır (Belmonte ve ark., 2014; Kramida ve ark., 2015).

Günümüze kadar Ar II'de geçiş olasılıkları ile ilgili teorik ve deneysel bazı çalışmalar yapılmıştır. Örneğin; Ar II'de $3s^23p^5$, $3s3p^6$, $3p^43d$, $3p^44s$, and $3p^44p$ seviyeleri arasındaki geçiş oranları, Hibbert ve arkadaşları tarafından çalışılmıştır (Hibbert ve Hansen, 1987; 1989; 1994). Belmonte ve ark., Aparicio ve ark. tarafından gerçekleştirilen deneysel çalışmayı daha fazla genişleterek UV Ar II spektral çizgileri için güvenilir ve yeni geçiş olasılığı değerleri rapor ettiler (Belmonte ve ark., 2014; Aparicio ve ark., 1997). Onlar bu deneylerinde, 294 nm'den 386 nm'ye kadar uzanan ultraviyole bölgede 43 iyonize argon spektral çizgi ölçtüler ve 11 yeni geçiş olasılığı ürettiler. Bir kez iyonlaşmış argon (Ar II)'da $3p4nd$ ($n=4-6$) seviyelerinin geçiş olasılığı ile ilişkili olan yaşam süreleri, Karmakar ve Das (2007) tarafından yüksek frekans sapma tekniği kullanılarak ölçüldü. Biemont ve Träbert (2000), Cl I

izoelektronik seride en düşük uyarılmış seviyeleri içeren geçiş oranlarını yeniden araştırdılar. Relativistik düzeltme ile Hartree-Fock metodu kullanarak hesaplamalarını yaptılar. Verner ve ark. (1996), argonun tüm iyonlarının izinli rezonans spektral çizgileri için enerji seviyelerini, vakum dalga boylarını, geçiş olasılıklarını, osilatör şiddetlerini, istatistiksel ağırlıklarını çeşitli kaynaklardan derleyerek listelediler. Hibbert ve Hansen (1994) çalışmalarında, $3s^23p^5$, $3s3p^6$, $3p^43d$, $3p^44s$ and $3p^44p$ durumlarının seviyeleri arasında Ar II'deki tüm geçişlerin osilatör şiddetlerinin, geçiş olasılıklarının ve uyarılmış seviyelerin yaşam sürelerinin genişletilmiş konfigürasyon etkileşim (CI) hesaplamalarını sunmuşlardır. Abbas ve ark. (1988), Ar II için çizgi kayması, geçiş olasılığı, yaşam süresi, osilatör şiddeti ve bazı çizgilerin profili gibi özellikleri high-current wall-stabilized arc tekniğini kullanarak araştırmışlardır. Morton (1991), hidrojenen germanyuma kadar tüm elementlerin tüm iyon durumlarının geçişleri için geçiş olasılıkları sonuçlarını derlemiş ve sunmuştur.

Bu çalışmada, bir kez iyonlaşmış Argon (Ar II)'un bazı seviyeleri arasındaki elektrik dipol geçiş olasılıkları, en zayıf bağlı elektron potansiyel model (WBEPM) teori kullanılarak karmaşık hesaplamalara girmeden hesaplanmıştır.

2. Materyal ve Metot

2.1. Teorik Hesaplama

En zayıf bağlı elektron potansiyel model teori, Zheng tarafından geliştirilen çok elektronlu sistemlerde elektronik hareketi tanımlamak için kullanılan bir yöntemdir (Zheng, 1986; Zheng ve Wang, 2002) ve çok elektronlu atomik ve iyonik sistemlerde enerji seviyeleri, iyonizasyon potansiyeli, geçiş olasılığı, osilatör şiddeti, uyarılmış seviyelerin yaşam süreleri gibi çeşitli atomik özellikleri hesaplamak için uygulanmaktadır (Zheng, 1986; 1987; 1988; Zheng ve ark., 2000a; 2004; Zheng ve Wang, 2002). Bu teori, en zayıf bağlı elektron ve en zayıf bağlı olmayan elektronlar olmak üzere elektronları iki

gruba ayırır. Verilen çok elektronlu sistemde en zayıf bağlı elektron, sistemdeki diğer elektronlarla karşılaştırıldığında sisteme en zayıf bağlı elektrondur. Elektronların bu şekilde ayrılması ile karmaşık çok elektron problemi, tek elektron problemi gibi ele alınarak basitleştirilebilir ve kolaylıkla çözüme ulaşılabilir (Zheng, 1988; Çelik, 2007; Çelik ve Ateş, 2007; 2008; Çelik ve ark, 2008; 2011; 2012-2016).

En zayıf bağlı elektron potansiyel model teoride elektronik radyal dalga fonksiyonu, yarıçapların beklenen değeri ve deneysel enerji verileri kullanılarak belirlenen bazı parametrelere göre Laguerre polinomunun bir fonksiyonu olarak ifade edilir (Zheng ve ark., 2000a; 2004; Zheng ve Wang, 2002; Zheng ve ark., 2000b; 2000c):

$$R_{nl}(r) = \left(\frac{2Z^*}{n^*}\right)^{l^*+3/2} \left[\frac{2n^*}{(n-l-1)!} \Gamma(n^* + l^* + 1) \right]^{-1/2} \exp\left(-\frac{Z^*r}{n^*}\right) r^{l^*} L_{n-l-1}^{2l^*+1}\left(\frac{2Z^*r}{n^*}\right). \quad (1)$$

İlgili parametreleri elde ettikten sonra iki farklı durum arasındaki radyal geçiş integrali, Eşitlik (1)'de verilen radyal dalga fonksiyonlarını kullanarak kolaylıkla

belirlenebilir. $(n_i; l_i)$ seviyesinden $(n_f; l_f)$ seviyesine geçiş durumunda $k=1$ için r_k nın beklenen değeri veya radyal geçiş integrali

$$\begin{aligned}
 \langle R_{n_i l_i} | Q(r)^{(2)} | R_{n_f l_f} \rangle &= \int_0^\infty r^4 R_{n_i l_i}(r) R_{n_f l_f}(r) dr \\
 &= (-1)^{n_f + n_i + l_f + l_i} \left(\frac{2Z_f^*}{n_f^*} \right)^{l_f^*} \left(\frac{2Z_i^*}{n_i^*} \right)^{l_i^*} \times \left(\frac{Z_f^*}{n_f^*} - \frac{Z_i^*}{n_i^*} \right)^{-l_f^* - l_i^* - 5} \times \left[\frac{n_f^{*4} \Gamma(n_f^* + l_f^* + 1)}{4Z_f^{*3} (n_f - l_f - 1)!} \right]^{-1/2} \times \\
 &\left[\frac{n_i^{*4} \Gamma(n_i^* + l_i^* + 1)}{4Z_i^{*3} (n_i - l_i - 1)!} \right]^{-1/2} \times \sum_{m_1=0}^{n_f - l_f - 1} \sum_{m_2=0}^{n_i - l_i - 1} \frac{(-1)^{m_2}}{m_1! m_2!} \left(\frac{Z_f^*}{n_f^*} - \frac{Z_i^*}{n_i^*} \right)^{m_1 + m_2} \times \left(\frac{Z_f^*}{n_f^*} + \frac{Z_i^*}{n_i^*} \right)^{-m_1 - m_2} \times \\
 &\Gamma(l_f^* + l_i^* + m_1 + m_2 + 5) \times \sum_{m_3=0}^S \binom{l_i^* - l_f^* + m_2 + 3}{n_f^* - l_f^* - 1 - m_1 - m_3} \times \binom{l_f^* - l_i^* + m_1 + 3}{n_i^* - l_i^* - 1 - m_2 - m_3} \times \\
 &\binom{l_i^* + l_f^* + m_1 + m_2 + m_3 + 4}{m_3}
 \end{aligned} \tag{2}$$

ifadesi ile verilebilir (Zheng ve ark., 2000a; 2000b). Burada Z^* , n^* , l^* nicelikleri sırasıyla etkin çekirdek yükü, etkin baş kuantum sayısı ve etkin açısal momentum kuantum sayısı olarak ifade edilir. n^* ve l^* parametreleri

$$n^* = n + d, \quad l^* = l + d \tag{3}$$

şeklinde verilir. Bu ifadelerde d , ayarlanabilir bir parametredir. Bu parametreler aşağıdaki denklem çifti birlikte çözümlenerek elde edilir:

$$\begin{aligned}
 I = -\varepsilon &= \frac{Z^{*2}}{2n^{*2}} \\
 \langle r \rangle &= \frac{3n^{*2} - \ell^*(\ell^* + 1)}{2Z^*}
 \end{aligned} \tag{4}$$

Burada I iyonlaşma enerjisidir. $\langle r \rangle$ ise en zayıf bağlı elektronun yarıçapı için beklenen

değerdir. Bu parametrelerin belirlenmesinde ilgili enerji değerleri, literatürdeki deneysel enerji verilerinden alınmıştır. Seviyelere ait yarıçapların beklenen değerleri ise sayısal Coulomb yaklaşımı (NCA) ve sayısal relativistik olmayan Hartree-Fock (NRHF) yöntemi kullanılarak hesaplanmıştır (Lindgard ve Nielsen, 1977; Gaigalas ve Fischer, 1996).

Geçiş olasılığı, osilatör şiddeti, yaşam süreleri gibi parametrelerin değerlerinin güvenilirliği, kullanılan hesaplama metodunun performansına bağlıdır. Geçiş olasılığı, bir üst elektronik durumdan daha düşük bir elektronik duruma bir elektronun kendiliğinden geçişinin istatistiksel olasılığıdır. γ JM kuantum sayılı

bir seviyeden γ 'J' lü tüm M' seviyelerine toplam elektrik dipol geçiş olasılığı

$$A_{J'J} = \frac{64\pi^4 e^2 a_0^2 (E_{J'} - E_J)^3}{3h(2J + 1)} S_{J'J} \quad (5)$$

ifadesi ile verilir (Cowan, 1981). Eşitlikte e elektron yükü, a_0 Bohr yarıçapı, h ise Planck sabitidir. $(E_{J'} - E_J)$, Kaysers (cm^{-1}) biriminde ilgili seviyeler arasındaki enerji farkıdır. $(2J + 1)$ başlangıç seviyesinin dejenereliğidir ve $S_{J'J}$ atomik birimlerde elektrik dipol çizgi şiddetidir.

LS çiftleniminde iki uyarılmış seviye arasındaki geçişler için elektrik dipol çizgi şiddeti,

$$S_{LS} \equiv \langle [(\dots \alpha_1 L_1, l_1) L (\dots S_1 s_2) S J] | r_N^{(1)} | [(\dots \alpha'_1 L'_1, l'_1) L' (\dots S'_1 s'_2) S' J'] \rangle^2 \quad (6)$$

$$= \left| (-1)^{S+J+L_1+l_1} [J J', L, L']^{1/2} \begin{Bmatrix} L & S & J \\ J' & 1 & L' \end{Bmatrix} \begin{Bmatrix} L_1 & l_1 & L \\ 1 & L' & l'_1 \end{Bmatrix} P_{l_1 l'_1}^{(1)} \right|^2$$

ile verilir. Eşitlik (6)'daki köşeli parantez içindeki ifadeler iki veya daha fazla açılmal momentumlar arasındaki çiftlenimi tanımlamak için kullanılan 6j sembolleridir.

$P_{l_1 l'_1}^{(1)}$ niceliği, atomik birimlerde radyal geçiş integrali veya geçiş matris elemanını gösterir ve

$$= \langle n_i \ell_i || r^{(1)} || n_f \ell_f \rangle = \delta_{\ell_f, \ell_i \pm 1} (-1)^{\ell_i + \ell_f} (\ell_i)_{\ell_i}^{1/2} \times \int_0^\infty r^3 R_{n_i \ell_i}(r) R_{n_f \ell_f}(r) dr. \quad (7)$$

bağıntısı ile ifade edilebilir (Cowan, 1981).

3. Sonuçlar ve Tartışma

Bu çalışmada, bir kez iyonlaşmış argonda bazı seviyeler arasındaki elektrik dipol geçiş olasılıkları, en zayıf bağlı elektron potansiyel model teori kullanılarak elde edilmiştir.

Çizelge 1. Ar II için elektrik dipol geçiş olasılıkları ($\times 10^8 \text{ s}^{-1}$)

| 1. seviye | 2. seviye | Terimler | J_1 | J_2 | Bu çalışma (WBEPMT) | Kramida ve ark. (2015) | Irimia ve F. Fischer (2003) | Hibbert ve Hansen (1994) |
|--------------------|--------------------|----------|-------|-------|------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
| [Mg]3s(2)3p(5) | [Mg]3p(4)(D1)3d(1) | P2P2 | 1,5 | 1,5 | 1,06E+02* | | 1,3886E+02 | |
| [Mg]3s(2)3p(5) | [Mg]3p(4)(D1)3d(1) | P2P2 | 1,5 | 0,5 | 4,26E+01* | | 5,1738E+01 | |
| [Mg]3s(2)3p(5) | [Mg]3p(4)(D1)3d(1) | P2P2 | 0,5 | 1,5 | 2,07E+01* | | 1,4293E+01 | |
| [Mg]3s(2)3p(5) | [Mg]3p(4)(D1)3d(1) | P2P2 | 0,5 | 0,5 | 2,71E+01 | | 1,0145E+02 | |
| [Mg]3s(2)3p(5) | [Mg]3p(4)(D1)3d(1) | P2P2 | Mult. | Mult. | 1,26E+02* | | 1,53E+02 | |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4P4 | 2,5 | 2,5 | 7,48E-01* | 7,80E-01 | 8,539E-01 | 7,812E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4P4 | 2,5 | 1,5 | 5,03E-01* | 5,80E-01 | 6,1431E-01 | 5,863E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4P4 | 1,5 | 1,5 | 1,32E-01* | 1,44E-01 | 1,573E-01 | 1,414E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4P4 | 1,5 | 0,5 | 8,68E-01* | 8,49E-01 | 8,9641E-01 | 8,536E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4P4 | 0,5 | 1,5 | 3,38E-01 | 2,23E-01 | 2,3774E-01 | 2,287E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4P4 | 0,5 | 0,5 | 1,43E-01 | 9,7E-02 | 1,0617E-01 | 1,046E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4P4 | Mult. | Mult. | 1,02E+00* | 9,4E-01 | 9,9365E-01 | |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4D4 | 2,5 | 3,5 | 1,24E+00 | 1,171E+00 | 1,2647E+00 | 1,188E+00 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4D4 | 1,5 | 2,5 | 8,39E-01 | 8,17E-01 | 9,1024E-01 | 8,542E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4D4 | 1,5 | 1,5 | 6,81E-01 | 5,74E-01 | 5,8414E-01 | 5,462E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4D4 | 1,5 | 0,5 | 2,20E-01 | 1,32E-01 | 1,4335E-01 | 1,307E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4D4 | 0,5 | 1,5 | 5,64E-01* | 5,69E-01 | 6,0034E-01 | 5,609E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4D4 | 0,5 | 0,5 | 1,17E+00* | 1,004E+00 | 1,0913E+00 | 1,017E+00 |
| [Mg]3p(4)(P3)4s(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | P4D4 | Mult. | Mult. | 1,23E+00 | 1,1E+00 | 1,2082E+00 | |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4D4 | 3,5 | 3,5 | 6,62E-02* | 1,05E-01 | 1,167E-01 | 1,098E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4D4 | 3,5 | 2,5 | 1,77E-02 | 4,1E-02 | 4,393E-02 | 4,018E-02 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4D4 | 1,5 | 2,5 | 1,85E-02* | 1,6E-02 | 1,564E-02 | 1,558E-02 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4D4 | 1,5 | 1,5 | 3,77E-02 | 3,7E-02 | 3,668E-02 | 3,442E-02 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4D4 | 2,5 | 3,5 | 1,08E-02* | 1,2E-02 | 8,289E-03 | 1,136E-02 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4D4 | 2,5 | 2,5 | 4,65E-02* | 4,8E-02 | 5,586E-02 | 5,055E-02 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4D4 | 0,5 | 1,5 | 2,09E-02* | 2,0E-02 | 2,121E-02 | 2,011E-02 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4D4 | 0,5 | 0,5 | 4,76E-02 | 4,3E-02 | 5,173E-02 | 4,735E-02 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4D4 | Mult. | Mult. | 9,16E-02 | 1,1E-01 | 1,244E-01 | |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4P4 | 3,5 | 2,5 | 3,06E-01 | 3,04E-01 | | 3,199E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4P4 | 2,5 | 1,5 | 2,16E-01* | 2,21E-01 | | 2,230E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4P4 | 1,5 | 1,5 | 1,23E-01 | 1,60E-01 | | 1,650E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4P4 | 1,5 | 0,5 | 1,98E-01 | 1,92E-01 | | 1,832E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4P4 | 0,5 | 0,5 | 1,97E-01 | 2,12E-01 | | 2,308E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | D4P4 | Mult. | Mult. | 3,83E-01 | 4,2E-01 | | |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | F4D4 | 4,5 | 3,5 | 1,32E-01* | 1,47E-01 | 1,527E-01 | 1,705E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | F4D4 | 3,5 | 2,5 | 1,19E-01* | 1,07E-01 | 1,181E-01 | 1,318E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | F4D4 | 2,5 | 3,5 | 9,51E-04 | 1,0E-03 | 6,189E-04 | 6,849E-04 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | F4D4 | 2,5 | 2,5 | 2,35E-02* | 2,5E-02 | 2,148E-02 | 2,398E-02 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | F4D4 | 2,5 | 1,5 | 1,75E-01 | 1,37E-01 | 1,310E-01 | 1,461E-01 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | F4D4 | 1,5 | 2,5 | 1,84E-03 | 2,0E-03 | 1,059E-03 | 1,181E-03 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | F4D4 | 1,5 | 1,5 | 2,85E-02* | 2,0E-02 | 2,945E-02 | 3,288E-02 |
| [Mg]3p(4)(P3)3d(1) | [Mg]3p(4)(P3)4p(1) | F4D4 | 1,5 | 0,5 | 1,51E-01* | 1,69E-01 | 1,714E-01 | 1,886E-01 |

Geçiş olasılığı değerlerinin hesaplanmasında gerekli olan Z^* , n^* , l^* parametrelerini elde etmek için enerji değerleri ve yarıçapların beklenen değerlerine ihtiyaç vardır. NIST (Kramida ve ark., 2015), enerji değerleri, geçiş olasılığı ve osilatör şiddeti verileri için referans bir veri tabanıdır. Bu sebeple hesaplamalar için gerekli olan enerji değerleri, NIST'den alınmıştır ve yarıçapların beklenen değerleri NCA ve NRHF dalga fonksiyonları kullanılarak belirlenmiştir. Ar II'de ikili ve dörtlü durumlar için elektrik dipol geçiş olasılıkları Çizelge 1'de verilmiştir. NRHF dalga fonksiyonları kullanılarak elde edilen yarıçapların beklenen değerleri ile hesaplanan geçiş olasılığı değerleri Çizelge 1'de (*) işareti ile belirtilmiştir. Ayrıca multiplet değerler, tabloda Mult. kısaltması ile verilmiştir.

Bu çalışmada göz önüne alınan geçişler için karşılaştırmalar, NIST'de verilen değerler (Kramida ve ark., 2015), MCHF değerleri (Irimia ve Fischer, 2003) ve Hibbert ve Hansen (1994) tarafından verilen teorik değerler ile yapılmıştır. Çizelge 1'e bakıldığında bizim elde ettiğimiz değerler ile göz önüne alınan karşılaştırma yaptığımız değerler arasında

oldukça iyi bir uyum olduğu gözlenmektedir. Bu sonuçtan yola çıkarak WBEPM teorisinin diğer yöntemler kadar kullanışlı olduğu, hatta bazı durumlarda daha avantajlı olduğu ifade edilebilir.

Çok elektronlu sistemlerde geçiş özelliklerini hesaplamak için bilinen önemli teorik yöntemler, relativistik etkileri ve korelasyon etkilerini hesaplamalara dahil ettikleri ve çok sayıda orbital baz-setleri ve çok sayıda konfigürasyonu kullandıkları için hesaplamalar oldukça karmaşıklaşmaktadır. Bu sebeple bu yöntemler, yüksek uyarılmış seviyelerden ziyade düşük uyarılmış seviyelere ait geçişleri göz önüne almaktadır. WBEPM teori ise karmaşık hesaplamalara girmeden hem düşük hem de yüksek uyarılmış seviyeler arasındaki geçiş özelliklerini kolayca ve daha kısa sürede hesaplayabilme imkanı sunar. Bu teoride geçiş özelliklerinin hesaplanabilmesi için Z^* , n^* ve l^* parametrelerinin belirlenmesi yeterlidir. Dolayısıyla özellikle yüksek uyarılmış seviyelere ait hesaplamalarda WBEPM teorisini kullanmanın diğer yöntemlere göre daha avantajlı olduğu söylenebilir.

Kaynaklar

- Abbas A, Basha TS, Abdel-Aal ZA (1988). Half-width, shift and transition probability of Ar II lines. *Jpn J Appl Phys* 27: 804–807.
- Aparicio JA, Gigosos MA, Mar S (1997). Transition probability measurement in an Ar II plasma. *J Phy B At Mol Opt Phys* 30: 3141–3157.
- Ateş Ş, Gökçe Y, Çelik G and Yıldız M (2014). Oscillator strengths and transition probabilities for singly ionized terbium. *Can J Phys* 92: 1043–1046.
- Behringer K, Thoma P (1976). Measurement of ultraviolet Argon (II) transition probabilities. *J Quant Spect Radiat Trans* 16: 605.
- Belmonte MT, Djurović S, Peláez RJ, Aparicio JA, Mar S (2014). Improved and expanded measurements of transition probabilities in UV Ar II spectral lines. *Mon Not R Astron Soc* 445: 3345–3351.
- Biemont E, Träbert E (2000). Transition rates of the resonance line doublet in the Cl I sequence, Ar II-Ge XVI. *J Phys B: At Mol Opt Phys* 33: 2939–2946.
- Cowan RD (1981). The theory of atomic structure and spectra. *University of California Press, Berkeley*.
- Çelik G, Ateş Ş, Tekeli G (2016). Electric dipole transition probabilities, oscillator strengths, and lifetimes for Co^{16+} . *Can J Phys* 94: 23–25.
- Çelik G, Ateş Ş, Erol E (2015). Oscillator strengths and lifetimes for Cu I. *Can J Phys* 93: 1015–1023.
- Çelik G, Gökçe Y, Yıldız M (2014). Electric quadrupole transition probabilities for atomic lithium. *At Data Nucl Data Tables* 100: 792–802.
- Çelik G, Erol E, Taşer M (2013). Transition probabilities, oscillator strengths and radiative lifetimes for Zn II. *J Quant Spect Radiat Trans* 129: 263–271.
- Çelik G, Doğan D, Ateş Ş, Taşer M (2012). Transition probabilities and radiative lifetimes of levels in F I. *At Data Nucl Data Tables* 98: 566–588.
- Çelik G, Ateş Ş, Özarıslan S, Taşer M (2011). Transition probabilities, oscillator strengths and lifetimes for singly ionized magnesium. *J Quant Spect Radiat Trans* 112: 2330–2334.
- Çelik G, Ateş Ş (2008). Calculations of transition probabilities for some excited levels of Na I. *Acta Phys Pol A* 113: 1619–1627.
- Çelik G, Çelik E, Kılıç HŞ (2008). Calculation of the 1s-2s two-photon excitation cross - section in atomic hydrogen. *Eur J Phys D* 50: 237.
- Çelik G, Ateş Ş (2007). The calculation of transition probabilities for atomic oxygen. *Eur J Phys D* 44: 433.

- Çelik G (2007). The calculation of transition probabilities between individual lines for atomic lithium. *J Quant Spect Radiat Trans* 103: 578.
- Dipti SD (2016). Electron-impact excitation rate-coefficients and polarization of subsequent emission for Ar⁺ ion. *J Quant Spect Radiat Trans* 176: 12–23.
- Gaigalas G, Fischer CF (1996). Extension of the HF program to partially filled F-subshells. *Comput Phys Commun* 98: 255.
- Hibbert A, Hansen JE (1987). Accurate wavefunctions for 2S and 2Po states of Ar II. *J Phys B At Mol Phys* 20: 245–251.
- Hibbert A, Hansen JE (1989). Lifetimes of some 3p44p levels in Ar II. *J Phys B At Mol Phys* 22: 347–351.
- Hibbert A, Hansen JE (1994). Transitions in Ar II. *J Phys B At Mol Phys* 27: 3325–3347.
- Irimia A, Fischer CF (2003). http://nlte.nist.gov/MCHF/Elements/Ar/Cl_18.20.abimchf-lin.dat.mp
- Karmakar S, Das MB (2007). Lifetime measurement of some excited states belonging to the 3p4nd (n=4–6) configuration of Ar II. *Pramana J Phys* 69: 477–480.
- Kramida A, Ralchenko Yu, Reader J, NIST ASD Team (2015). NIST Atomic Spectra Database (ver.5.3), [online]. Available: <http://physics.nist.gov/asd> [2017, September 22]. National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD.
- Lindgard A, Nielsen SE (1977). *At Data Nucl Data Tables* 19: 533.
- Lodders K (2008). *Ap J* 674: 607.
- Morton DC (1991). Atomic data for resonance absorption lines. i. wavelengths longward of the Lyman limit. *The Astrophysical Journal Supplement Series* 77: 119–202.
- Verner DA, Verner EM, Ferland GJ (1996). Atomic data for permitted resonance lines of atoms and ions from H to Si, and S, Ar, Ca, and Fe. *At Data Nucl Data Tables* 64 : 1–180.
- Wiese WL (1988). The atomic transition probabilities of argon—A continuing challenge to plasma spectroscopy. *Journal of Quantitative Spectroscopy & Radiative Transfer* 40: 421–427.
- Zheng NW (1986). A new theoretical model for many-electron atom and ion systems I. *Chin Sci Bull* 31: 1238–1242.
- Zheng NW (1987). A new theoretical model for many-electron atom and ion systems II. *Chin Sci Bull* 32: 1263–1267.
- Zheng NW (1988). A new outline of atomic theory. *Jiang Su Education Press*, Nanjing, P.R. China.

- Zheng NW, Wang T, Yang R, Wu YG (2000a). Theoretical calculation of transition probability for N atom and ions. *J Chem Phys* 112: 7042–7056.
- Zheng NW, Wang T, Ma DX, Zhou T, Fan J (2004). Weakest bound electron potential model theory. *Int J Quant Chem* 98: 281–290.
- Zheng NW, Wang T (2002). Theoretical resonance transition probabilities and lifetimes for atomic hydrogen. *Chem Phys* 282: 31.
- Zheng NW, Sun YJ, Wang T, Ma DX, Zhang Y, Su W (2000b). Transition probability of lithium atom and lithiumlike ions with weakest bound electron wave functions and coupled equations. *Int J Quant Chem* 76: 51–61.
- Zheng NW, Wang T, Yang R (2000c). Transition probability of Cu I, Ag I, and Au I from weakest bound electron potential model theory. *J Chem Phys* 113: 6169–6173.

An Inequality on M-Matrices

Ali ÖZDEMİR

Manisa Celal Bayar University, Faculty of Science and Arts, Department of Mathematics,
MANİSA

e-mail: acaozdemir@gmail.com

Abstract: Let A_0 be a nonsingular symmetric M-matrix. For a sufficiently large t , $A_t = tI + A_0$ is a new nonsingular symmetric M-matrix and the following inequalities hold for the sum of the principal minors of new matrix A_t :

$$\sum_{c_n^1} |A(1)| < \sum_{c_n^2} |A(1,2)| < \dots < \sum_{c_n^n} |A(1,2, \dots, n)|.$$

Keywords: Non-negative matrix, Nonsingular symmetric matrix

M-Matrisleri Üzerine Bir Eşitsizlik

Öz: A_0 tekil olmayan simetrik bir M- matrisi olsun. Yeteri kadar büyük bir t değeri için $A_t = tI + A_0$ şeklinde oluşturulan M- matrisinin esas minörlerinin toplamları arasında

$$\sum_{c_n^1} |A(1)| < \sum_{c_n^2} |A(1,2)| < \dots < \sum_{c_n^n} |A(1,2, \dots, n)|.$$

eşitsizliği vardır.

Anahtar Kelimeler: Negatif olmayan matris, Tekil olmayan simetrik matris

1. Introduction

Definition 1: Let $A = (a_{ij})$ be a real valued matrix for $i = 1, 2, \dots, m$ and $j = 1, 2, \dots, n$. If $a_{ij} \geq 0$ then matrix A is said to be a non-negative matrix (Gantmacher, 1956).

Definition 2: Let $B = (b_{ij})$ be a non-negative an n dimensional square matrix and I be a n dimensional unit matrix. Further let $\rho(B)$ be the spectral radius of B . Then let A be defined by

$$A = sI - B \quad (1)$$

A is called a M-matrix for $s \geq \rho(B)$. If $s = \rho(B)$ then A is a singular M-matrix, and conversely, if $s > \rho(B)$ then A is nonsingular M-matrix (Berman and Plemmons, 1979).

Theorem 1: let A_0 be a nonsingular symmetric M-matrix

$$A_t = tI + A_0 \quad (2)$$

is also a nonsingular symmetric M-matrix for sufficiently large positive integer t .

Proof: A_0 is a nonsingular symmetric M-matrix. Thus, $A_0 = sI - B$ when $s > \rho(B)$ where s is defined as in equation (1). We can write $A_0 = sI - B$, and putting this value into equation (2) we have $A_t = tI + (sI - B)$. Then it follows that $A_t = (s + t)I - B$. This shows that A_t is a nonsingular M-matrix (Berman and Plemmons, 1979).

Theorem 2: Let $A_0 = (A_{0ij})$ be an n dimensional nonsingular symmetric M-matrix and A_t be a matrix defined by $A_t = tI + A_0$ for $t \geq n$. Then, for new matrix A_t ,

$$\sum_{c_n^1} |A_t(1)| < \sum_{c_n^2} |A_t(1,2)| < \dots < \sum_{c_n^n} |A_t(1,2, \dots, n)|, \quad (3)$$

where C_n^r ($r = 1, 2, \dots, n$) is a binomial coefficient and

$|A_t(i_1, i_2, \dots, i_r)|$ with

$1 \leq i_1 < i_2 < \dots < i_r \leq n$ is the corresponding principal minor of A_t .

Proof: We will prove this theorem by induction using the properties of similar matrices, Since the characteristic polynomials of similar matrices are the same and the eigenvalues of a real symmetric matrix are real numbers (Mirsky, 1955). It is easily seen that A_t can be written explicitly in the following form.

$$A_t = \begin{bmatrix} t + a_{011} & a_{012} & \dots & a_{01n} \\ a_{021} & t + a_{022} & \dots & a_{02n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ a_{0n1} & a_{0n2} & \dots & t + a_{0nn} \end{bmatrix}$$

A_t is similar to such a triangular matrix whose elements on the main diagonal equal to the eigenvalues of A_t . Thus if the eigenvalues of A_0 are λ_i for $i = 1, 2, \dots, n$, then the eigenvalues of A_t will be $t + \lambda_i$ for $i = 1, 2, \dots, n$. In this case, we have a nonsingular n dimensional triangular matrix

$$PA_tP^{-1} = R_t = \begin{bmatrix} t + \lambda_1 & \gamma_{12} & \gamma_{13} & \dots & \gamma_{1n} \\ 0 & t + \lambda_2 & \gamma_{23} & \dots & \gamma_{2n} \\ \dots & \dots & \dots & \dots & \dots \\ 0 & 0 & 0 & \dots & t + \lambda_n \end{bmatrix}, \quad (4)$$

where $P = (p_{ij})$ is a nonsingular matrix. Now we will prove that equation (3) holds for R_t matrix. For $n = 2$, equation (4) can be written as

$$R_t = \begin{bmatrix} t + \lambda_1 & \gamma_{12} \\ 0 & t + \lambda_2 \end{bmatrix}. \quad (5)$$

When we evaluate the first and second order sums of principal minors, we get

$$\sum_{c_2^1} |R_t(1)| = (t + \lambda_1) + (t + \lambda_2) = 2t + \lambda_1 + \lambda_2 \quad (5.1)$$

$$\sum_{c_2^2} |R_t(1,2)| = (t + \lambda_1)(t + \lambda_2) = t^2 + (\lambda_1 + \lambda_2)t + \lambda_1\lambda_2 \quad (5.2)$$

Supposing $t \geq 2$ and using equations (5.1) and (5.2) we have

$$\sum_{c_2^1} |R_t(1)| < \sum_{c_2^2} |R_t(1,2)|.$$

It follows by hypothesis that $\lambda_1 \leq \lambda_2 \leq \dots \leq \lambda_n$ because the eigenvalues of A_0 are real numbers. Therefore, we have the same values for λ_i ; ($i = 1, 2$). When the result is correct for the smallest λ in equation (5) then it is trivial to prove that the

result is true for larger λ without losing any generality on choosing $\lambda = \min (\lambda_i); (i = 1, 2, \dots, n)$. This will help in improving

Theorem 2. Now, let $n=3$, then the matrix in equation (4) can be written in the following form

$$R_t = \begin{bmatrix} t + \lambda & \gamma_{12} & \gamma_{13} \\ 0 & t + \lambda & \gamma_{23} \\ 0 & 0 & t + \lambda \end{bmatrix} \tag{6}$$

Evaluating first

second and third order sums of the principal minors we will have

$$\sum_{c_3^1} |R_t(1)| = C_3^1 \sum (t + \lambda) = 3t + 3\lambda = 3(t + \lambda) \tag{6.1}$$

$$\sum_{c_3^2} |R_t(1,2)| = C_3^2 \sum (t + \lambda)^2 = 3(t^2 + 2\lambda t + \lambda^2) \tag{6.2}$$

and

$$\sum_{c_3^3} |R_t(1,2,3)| = C_3^3 \sum (t + \lambda)^3 = t^3 + 3t^2\lambda + 3t\lambda^2 + t^3. \tag{6.3}$$

Then for $t \geq 3$, using equations (6.1), (6.2) and (6.3) we obtain

$$\sum_{c_3^1} |R_t(1)| < \sum_{c_3^2} |R_t(1,2)| < \sum_{c_3^3} |R_t(1,2,3)|.$$

Now, assuming that the inequality in equation (3) holds for $n-1$, i.e.,

$$\sum_{c_{n-1}^0} |R_t(0)| < \sum_{c_{n-1}^1} |R_t(1)| < \sum_{c_{n-1}^2} |R_t(1,2)| < \dots < \sum_{c_{n-1}^{n-1}} |R_t(1,2, \dots, n-1)|$$

It follows that

$$C_{n-1}^0 \sum (t + \lambda)^0 < C_{n-1}^1 \sum (t + \lambda)^1 < C_{n-1}^2 \sum (t + \lambda)^2 < \dots < C_{n-1}^{n-1} \sum (t + \lambda)^{n-1}.$$

replacing $n-1$ by n in the last expression we get

$$C_n^1 \sum (t + \lambda)^1 < C_n^2 \sum (t + \lambda)^2 < C_n^3 \sum (t + \lambda)^3 < \dots < C_n^n \sum (t + \lambda)^n.$$

it follows easily that

$$\sum_{c_n^1} |R_t(1)| < \sum_{c_n^2} |R_t(1,2)| < \dots < \sum_{c_n^n} |R_t(1,2, \dots, n)|.$$

Since A_t is similar to R_t , then

$$\sum_{c_n^1} |A_t(1)| < \sum_{c_n^2} |A_t(1,2)| < \dots < \sum_{c_n^n} |A_t(1,2, \dots, n)|.$$

This completes the proof.

2. Result and Discussion

In this study, some inequalities on M-matrices are examined by using the properties of M- matrices and benefiting from principle minors by taking advantage

of studies on inequality of M- matrices by Ando (1980), Chun-Wei (1988), Furuichi and Lin (2010). As a result an inequality on the sum of the principal minors of M-matrices was proved.

References

- Ando T (1980). Inequalities for M-matrices. *Linear and Multilinear Algebra* 8(4): 291-316.
- Berman A, Plemmons RJ (1979). Nonnegative matrices in the mathematical sciences. *Academic Press*, New York.
- Chun-Wei H (1988). An inequality for M-matrices. *Linear and Multilinear Algebra* 23(3): 263–267.
- Furuichi S, Lin M (2010). A matrix trace inequality and its application. *Linear Algebra and its Applications* 433: 1324–1328.
- Gantmacher FR (1956). Applications of the theory of matrices, New York.
- Mirsky L (1955). An introduction to linear algebra. *Oxford At The Clarendon Press*.

Mısır Ekmeğindeki Fitik Asit Miktarını Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesinde Yanıt Yüzey Yöntemi Yaklaşımı

Duygu KILIÇ^{1*}, Hülya BAYRAK², Berrin ÖZKAYA³

¹Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstatistik Bölümü, ANKARA

²Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, İstatistik Bölümü, ANKARA

³Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ANKARA

*e-mail: duygukilic4@gmail.com

Öz: Deney düzenleme yöntemlerinin bilimsel araştırmalarda, gıda ve sağlık gibi alanlarda birçok farklı amaçla kullanıldığı bilinmektedir. Deney düzenleme yöntemlerinde, deneyi yapan kişinin ihtiyaçlarına karşılık bulabilmesi için; geliştirme sürecinde olan tasarımın sınırlarını bilmek, kullanılan değişkenlerinin tasarım üzerindeki etkilerini anlamak ve analitik olarak en iyi çözümü bulmak oldukça önemlidir. Ancak tasarımı tanımlarken kullanılan değişkenler ile tasarımın kalitesini ölçmek için kullanılacak olan değerlendirme ölçütü arasında analitik bir bağıntı ifade edilememesi durumunda en iyi çözüme ulaşmak için başka yöntemlerin kullanılmasını gerekir. Bu gibi durumlarda değerlendirme ölçütünün tasarım değişkenlerinde oluşturduğu değişimlerde gerekli bağıntıları deneysel yoldan elde etmek için yanıt yüzey yöntemi kullanılır. Bütün deneme düzenlerinde temel amaç üzerinde durulan yanıt değişkenine etkisi olabileceği düşünülen faktörlerin dikkate alınması ve deneme hatasının minimuma indirilmesidir. Bu çalışmada, mısır ekmeği üretimi sırasında uygulanan işlemlerin fitik asit miktarına etkileri incelenmiştir. Birinci derece yanıt yüzey modeli kullanılmıştır. Problemin yapısına ^{3k} CCD (Central Composite Design-CCD-Merkezi Bileşik deneme) düzeni uygundur. Deneme düzeni tek tekrarlıdır. CCD deneme düzenini etkileyen madde miktarını artırmak ya da azaltmak direkt olarak ilgili faktörü artıracak ya da azaltacaktır. Bu yöntem sayesinde belirli düzeylerdeki alanı daha iyi sınırlandırarak hem zamandan hem de madde miktarından tasarruf yapılması sağlanabilir.

Anahtar kelimeler: Faktöriyel Deney Tasarımı, Fitik Asit, Merkezi Bileşik Deneme Düzeni, Mısır Ekmeği, Yanıt Yüzey Yöntemi

Some Factors in the Effective Amount of Corn Bread Phytic Acid with Response Surface Method Approach

Abstract: Experimental arrangements are known to be used in scientific researches for a variety of purposes in areas such as food and health care. In order to be able to meet the needs of the experimenter in the experiment regulation methods, it is very important to know the limits of the design in the development process, to understand the effects of the variables used on the design, and to find the best solution analytically. However, if an analytical relationship cannot be expressed between the variables used in defining the design and the evaluation criterion used to measure the quality of the design, other methods must be used to achieve the best solution. In such cases, the response surface method (RSM) is used to experimentally derive the necessary correlations in the changes that the evaluation measure creates in the design variables. Consideration of the factors that are thought to be an effect on the response to the main objective in all testing schemes and to minimize the trial error. In this study, the effects of phytic acid treatment on corn meal production were investigated. The use of first-order response surface models and the application of the results are summarized in a one replicate experiment in the ^{3k} Central Composite Design (CCD) method of the RSM. Increasing or decreasing the amount of the substance that affects the CCD assay will directly reduce the relevant factor. By this method, it is possible to save both the time and the amount of material by better limiting the area at certain levels.

Keywords: Central Composite Design, Corn Bread, Factorial Design, Phytic Acid, Response Surface Method

1. Giriş

Deney tasarımı 1920’li yıllarda İngiliz istatistikçi R. A. Fisher tarafından tarımsal araştırmalarda kullanılmıştır. Zamanla pek çok uygulama alanı bulunmuştur. Günümüzde deney tasarımı tarım, hayvancılık, eczacılık, mühendislik, sağlık, gıda gibi birçok alanda kullanılmaktadır.

Deney tasarımı yöntemlerinden önemli bir tanesi yanıt yüzey yöntemidir. Yanıt yüzey yöntemi, optimizasyonu da içeren istatistiksel bir tekniktir (Koç ve Ertekin-Kaymak, 2010). Yanıt yüzey yöntemi, proseslerin geliştirilmesi ve optimizasyonu için gerekli istatistiksel ve matematiksel tekniklerin birlikte kullanıldığı bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Myers ve Montgomery, 1995). Bu bir yüzeyin veri setine uydurulması ve optimum faktör düzeylerinin belirlenmesinde kullanılır. Yüzeyin şekli; uygun olan model ve yanıt değerleri ile belirlenir. Yanıt yüzey yönteminin en yaygın uygulamaları özellikle birçok girdi değişkenin, ürünün veya sürecin performans ölçütlerini veya kalite özelliklerini potansiyel olarak etkilediği endüstriler olan sanayi, kimya ve gıda gibi birçok endüstride kullanılır. Ayrıca kompleks süreçlerin araştırılmasında kullanılan bir teknik olması nedeniyle mühendislik uygulamalarında da oldukça

geniş bir alan bulmuştur. Mühendislikte ve gıda bilimlerinde sistem performansı ve ürün geliştirmede bağımsız değişkenlerin optimum değerlerinin elde edilmesiyle ilgilenilir (Değirmencioğlu ve Yazgı, 2006).

Yanıt yüzey yöntemi ile, yalnızca bir yanıt ile kontrol faktörleri arasındaki ilişkiyi temsil eden bir denklem deneysel verilere dayanarak elde edilebilir. Yanıt yüzeyini grafik olarak çizdirmek ve optimum parametre düzenini belirlemek için kontur çizimi kullanılır.

Yanıt yüzey yöntemi “Denemelerin Optimum Koşullara Ulaşması” ismi ile 1951 yılında Box ve Wilson tarafından geliştirilmiş ve tanımlanmıştır. İlk olarak kimya endüstrisinde uygulanmıştır (Ryan, 2007). Daha ileriki yıllarda Mead ve Pike (1975) tarafından ziraat ile ilgili çalışmalarda, Stablein ve ark. (1983) tarafından tıbbi çalışmalarda ve Vining ve Myers (1990) tarafından da süreç dışı kalite kontrolünde kullanılmıştır. Modern anlamda ise yanıt yüzey çalışmalarının temellerini Box ve Wilson atmıştır.

İlerleyen yıllarda, Allen ve Yu, daha düşük maliyetli yanıt yüzey yöntemleri için tasarımlarla ilgili simülasyon programları üzerinde durmuşlardır (Allen ve Yu, 2002). Forrester ve ark. (2003), daha az maliyetli yanıt yüzey tasarımları üzerinde çalışmışlardır.

2006 yılında Goos ve Donev yanıt yüzey tasarımlarının blok yapısı üzerinde durmuşlardır. Oon ve Lee (2006) yanıt değişkenin sıralı olduğu durumlar için yanıt yüzey problemlerine değinmiştir. Hanrahan ve Lu (2006) faktöriyel tasarımlar üzerinde çalışmıştır. Yanıt yüzey yönteminin uygulama alanlarının genişlemesiyle beraber modellerin yapılarında da birtakım değişiklikler meydana gelmiştir. Bu değişiklikler, özellikle Poisson ve Gamma modellerinin yanıt yüzey yönteminde kullanılması fikrini öne çıkarmıştır ve bununla birlikte, “Bayesci tasarımlar” gündeme gelmiştir (Myers, 1999).

Yanıt yüzey yönteminin yapay sinir ağları gibi diğer sezgisel yöntemler ile karşılaştırılması da yapılmıştır. Bunlardan bazıları Dutta ve Banerjee (2004), Gomes ve Awruch (2004), Baş ve Boyacı (2007)’nın çalışmalarıdır.

Tsai ve ark. (2010), veri zarflama analizi ile yanıt yüzey yöntemlerini iç içe kullanmıştır. Tekindal ve ark. (2014) gıda sektörü üzerine uygulamalar yapmıştır. Cin ve Işık (2014) havacılık ve uzay alanında bu yöntemi kullanmıştır. Murithi (2015) tarımda verim üzerine çalışma yaparken, Aktaş ve Çiftçi (2015) ise sağlık alanında bir problem ele almıştır. Demir ve ark. (2017) farmakolojide ilaç formülüzasyonu için bu yöntemi kullanmışlardır. Yanıt yüzey

çalışmaları farklı alanlarda incelenmeye devam edilmektedir.

Bu çalışmada yanıt yüzey yöntemleri arasında en çok kullanılan tekniklerden biri olan merkezi bileşik deneme düzeni (Central Composite Design- CCD) kullanılarak mısır ekmeğindeki buğday unu katma oranının, maya miktarının ve fermantasyon süresinin ekmeğin fitik asit miktarına etkileri incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

Yanıt yüzey yönteminde modelin bilinmesine gerek yoktur. Oluşturulacak olan model gözlem değerleri esas alınarak oluşturulur ve ampirik bir modeldir. Yanıt yüzey yöntemlerinde model regresyon analizi yardımıyla oluşturulur. Bir faktörün ana etkisinin veya etkileşim etkisinin yanıt değişkenin değerlerinde ne derece önemli bir etkiye sahip olduğuna regresyon katsayıları yardımıyla karar verilir. Yanıt yüzey yönteminde ilk adım yanıt değişkeni üzerinde etkisi olduğu düşünülen faktörleri ve sahip oldukları düzeyleri belirlemektir. Bu adımdan sonra, deney tasarımı, regresyon ve optimizasyon teknikleri iç içe kullanılır.

2.1. Merkezi Bileşik Deneme Düzeni (Central Composite Design-CCD)

CCD en çok kullanılan yanıt yüzeyi tekniklerinin başında gelir. CCD’de 2^k tasarımdaki noktalardan oluşan faktöriyel

tasarımlar kullanılabilceği gibi aynı zamanda kesirli faktöriyel tasarımlarda kullanılabilir. Modelde yer alan faktörlerin en az iki düzeyli olması gereklidir (Tekindal ve ark., 2014). k faktör sayısı olmak üzere CCD 2^k veya 3^k sayıda iki yada üç düzeyli faktöriyel denemenin, 2k sayıda veya 3k sayıda eksen nokta ya da yıldız nokta ile kombinasyonundan oluşur (Bayrak ve ark., 2010).

CCD’de üç tür tasarım noktası bulunur. Bunlar; iki düzeyli tam faktöriyel ya da kesirli faktöriyel tasarım noktaları, star noktalar ve merkezi noktalardır. Tam faktöriyel tasarımda CCD’deki noktaların sayısı $2^k + 2k + c$ formülü ile bulunur. Burada 2^k faktöriyel noktaları gösterir. 2k star noktalar gösterir ve düzeyler $\pm\alpha$ değerlerini alır. α değeri genellikle 1’den büyüktür. α ’nın değeri star noktaların yerini belirler. Bu noktalar modelin eğriliğini belirlemede kullanılır. c merkez noktalarının sayısıdır.

$$\alpha = \sqrt[4]{F} \text{ ve burada } F = 2^k \text{ dir.} \quad (1)$$

CCD’nin en büyük avantajı, küp noktalar olan ana tasarım noktalarının dışında da deneysel tasarıma olanak vermesidir (Turan ve Altundoğan, 2011). CCD genellikle bir araştırmada matematiksel olarak doğrusal modellerin yetersiz kaldığı durumlarda ikinci dereceden model denklemlerinin açıklamasında ve tasarımında kullanılmaktadır. CCD’nin kullanılması halinde matematiksel model

ikinci dereceden bir polinom formuna dönüşür. Genel anlamda yanıt değerleri doğrusal ve ikinci dereceden modeller tarafından seçilen faktörlere bağlı olarak hesaplanır. Bu tasarımın en önemli avantajı yeni bir deney tasarımına gerek duyulmadan 2^k tasarımına sadece eksen ve merkez noktalarının eklenmesiyle yeni tasarımın elde edilmesidir. CCD aynı zamanda yanıt için tek bir değişkeni veya değişkenlerin kümülatif etkilerini hesaplayabilmektedir (Said ve Amin, 2015).

Taguchi tarafından önerilen ve yanıt yüzeyleri yöntemlerinde kullanılan çalışmanın amacına göre 3 tane özel yöntem vardır. Bunlar hedef en iyisidir, en büyük en iyidir ve en küçük en iyidir yöntemleridir. En küçük en iyidir yönteminde amaç minimum yanıt değişkenine ulaşmaktır. En büyük en iyidir yönteminde amaç maksimum yanıt değişkenine ulaşmaktır. Hedef en iyisidir yönteminde ise yanıt değişkenini hedef değer yapan kontrol değişkenlerinin düzeylerini veren χ^2 (ki-kare) değerini bulmaktır. Bu yöntem diğer iki yönteme göre biraz daha karmaşıktır.

3. Sonuçlar ve Tartışma

Bu çalışmada mısır ekmeği üretimi sırasında uygulanan işlemlerin fitik asit miktarına etkileri incelenmiştir. Bunun için mısır ununa değişik oranlarda buğday unu katılıp karışımlar hazırlanmış, bu

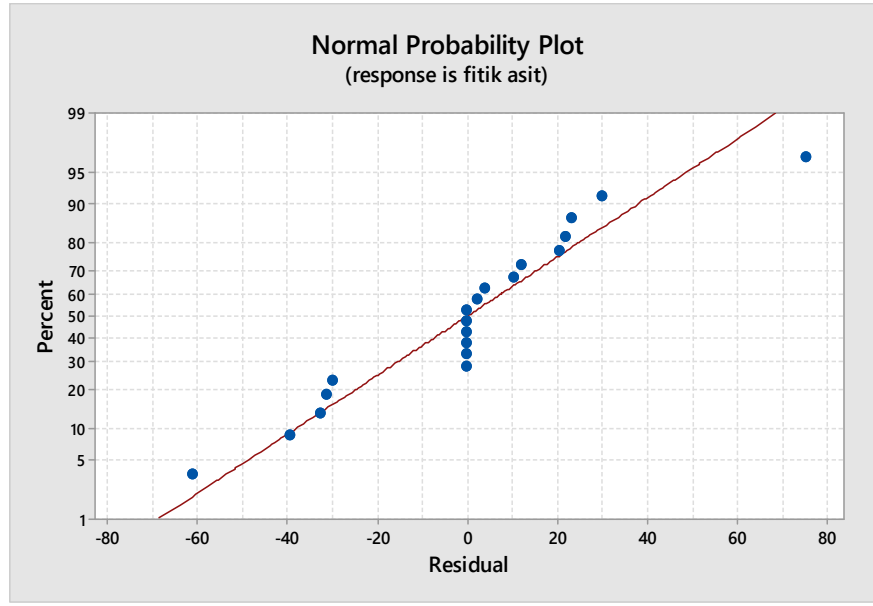
karişimlere değişik oranlarda maya katılarak elde edilen hamurlara farklı fermantasyon süreleri uygulanarak mısır ekmekleri yapılmıştır. Mısırdaki fazla miktarda bulunan fitik asit, demir, kalsiyum, çinko gibi minerallerle kompleks oluşturularak ve proteinlerle interaksiyona girerek bunların biyoyararlılığını düşüren ve beslenme açısından olumsuz olan bileşiklerdir. İstatistiksel analiz CCD kullanılarak yapılmıştır. Analiz için MINITAB 17 paket programı kullanılmıştır. Deneme modeli rasgele oluşturulmuştur. Belirlenen deneme düzeylerine göre analiz yapılmıştır. Analiz için kullanılan veri seti Çizelge 1 de verilmiştir.

Çizelge 1. Mısır ununa farklı oranlarda buğday unu katılıp değişik maya miktarları ve fermantasyon süreleri uygulanarak yapılan mısır ekmeklerinin fitik asit miktarları

| Buğday unu katma oranı (%) | Maya miktarı (%) | Fermentasyon süresi(dak) | Fitik asit miktarı (mg/100g) |
|----------------------------|------------------|--------------------------|------------------------------|
| 0 | 2 | 60 | 1190,3 |
| 0 | 2 | 90 | 1185,6 |
| 0 | 2 | 120 | 1174 |
| 0 | 4 | 60 | 1180,5 |
| 0 | 4 | 90 | 1173,1 |
| 0 | 4 | 120 | 1167,8 |
| 0 | 6 | 60 | 1171,4 |
| 0 | 6 | 90 | 1168,5 |
| 0 | 6 | 120 | 1161,5 |
| 15 | 2 | 60 | 1044,2 |
| 15 | 2 | 90 | 1038,5 |
| 15 | 2 | 120 | 1033,5 |
| 15 | 4 | 60 | 1029,2 |
| 15 | 4 | 90 | 1021,4 |
| 15 | 4 | 120 | 1019,3 |
| 15 | 6 | 60 | 1020,7 |
| 15 | 6 | 90 | 1017,4 |
| 15 | 6 | 120 | 1008,8 |
| 30 | 2 | 60 | 860,1 |
| 30 | 2 | 90 | 853,6 |
| 30 | 2 | 120 | 849,6 |
| 30 | 4 | 60 | 853,5 |
| 30 | 4 | 90 | 848,9 |
| 30 | 4 | 120 | 836,3 |
| 30 | 6 | 60 | 844,9 |
| 30 | 6 | 90 | 831,7 |
| 30 | 6 | 120 | 819,1 |

CCD için gerekli olan tanımlayıcı bilgiler aşağıdaki gibidir:

Faktör:3 Replikasyon: 1
 2.derece faktör: Tam faktöriyel
 Küp noktaları: 8
 Küpteki merkez noktaları: 6
 Alfa: 1.68179

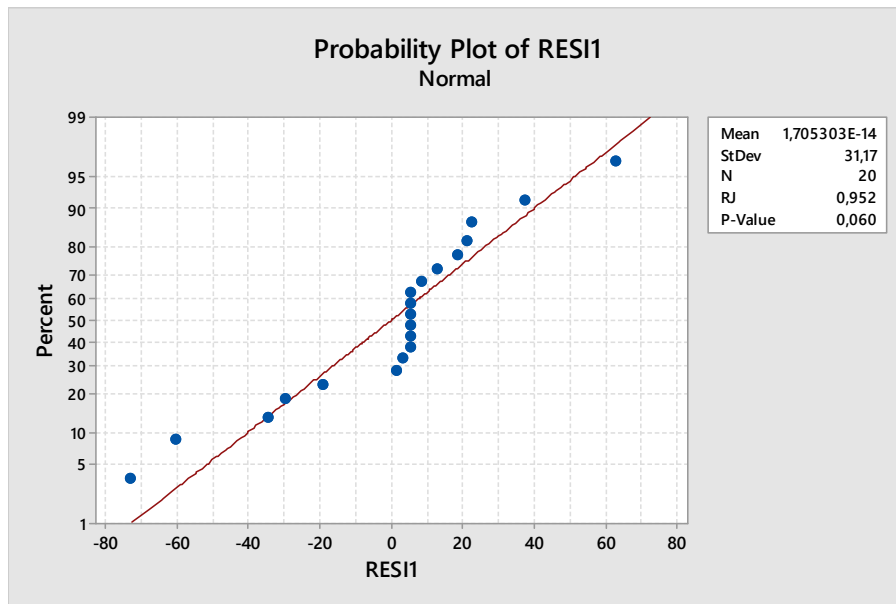


Şekil 1. CCD de artıkların normal dağılım grafiği

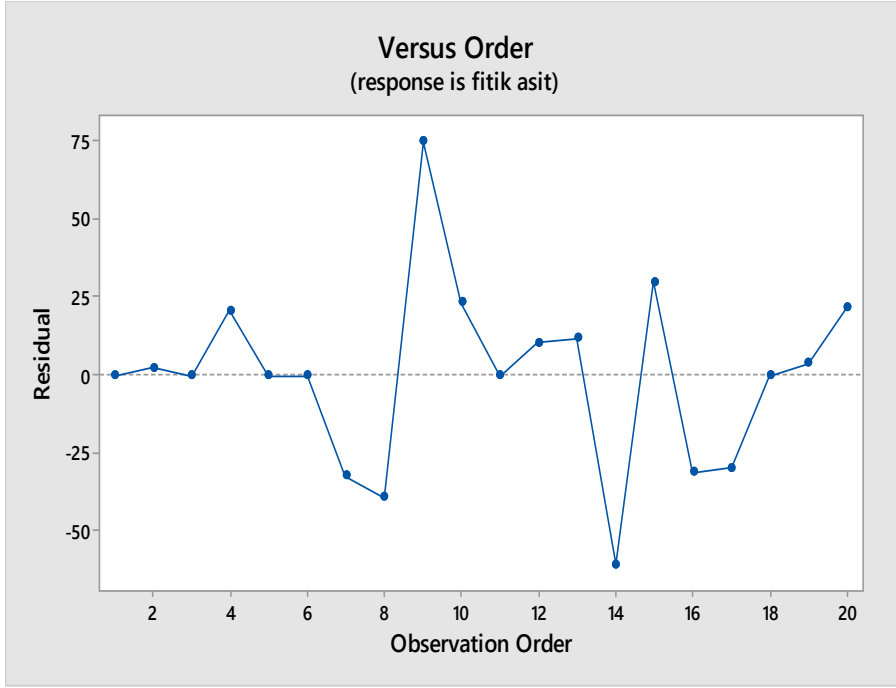
Şekil 1’de verilen grafik incelendiğinde regresyon modelini oluşturan artık değerleri normal dağılıma uygunluk göstermiş olduğu yorumu yapılabilir. Ayrıca normallik Ryan-Joiner normallik testi kullanılarak da kontrol edilmiştir. Test sonucu Şekil 2’de verilmiştir. Ryan-Joiner testi için oluşturulan hipotez;

H_0 : Veriler normal dağılıma uygundur.

H_1 : Veriler normal dağılıma uygun değildir şeklindedir. $p > 0,05$ olduğundan H_0 hipotezi red edilemez. Normal dağılıma uygundur.



Şekil 2. Ryan-Joiner testi normallik testi sonucu



Şekil 3. Artıkların sınır değerleri

Şekil 3’de artıkların veri seti içindeki sınırları görülmektedir. Dolayısıyla veri CCD için uygundur. Daha sonra regresyon analizine geçilir. Çizelge 2’de CCD için elde edilen regresyon analizi tablosu verilmiştir.

Çizelge 2. 3³ CCD regresyon analizi tablosu

| Faktörler | T | P değeri |
|---|--------|--------------------|
| Sabit | 61,72 | 0,000 [#] |
| Buğday unu katma oranı | -12,47 | 0,000 [#] |
| Maya miktarı | -0,75 | 0,470 |
| Fermantasyon süresi | -0,53 | 0,609 |
| Buğday unu katma oranı*Buğday unu katma oranı | -0,58 | 0,572 |
| Maya miktarı*mayanın miktarı | -0,02 | 0,981 |
| Fermantasyon süresi*Fermantasyon süresi | -0,15 | 0,887 |
| Buğday unu katma oranı*Mayanın miktarı | -0,12 | 0,903 |
| Buğday unu katma oranı*Fermantasyon süresi | -0,09 | 0,932 |
| Mayanın miktarı*Fermantasyon süresi | -0,08 | 0,940 |

Not: p değeri 0,05 ile karşılaştırılmıştır.

Yanında [#] işareti olan değerler yani sabit terimin ve buğday unu katma oranının tek başına mısır ekmeği içerisindeki fitik asit miktarını etkileyen faktörler olduğu gözlenmiştir.

Regresyon modeli eş 2 de verildiği gibi 3 tane tahmin edicinin olduğu etkileşimsiz bir modeldir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \varepsilon \quad (2)$$

Burada Y ; yanıt değişkenini, X_i ler tahmin edicileri (bağımsız değişkenleri) ifade etmektedir.

Probleme uyan regresyon modeli aşağıdaki gibidir:

fitik asit = 1152,4- 8,29 buğday unu katma oranı- 6,5 maya miktarı -
 4,5 fermantasyon süresi- 0,0278 buğday unu katma oranı*buğday unu katma oranı -
 0,3 maya miktarı*maya miktarı-1,6 fermantasyon süresi*fermantasyon süresi-
 0,119 buğday unu katma oranı*maya miktarı-
 0,084 buğday unu katma oranı*fermantasyon süresi-1,1 maya miktarı*fermantasyon süresi
 şeklindedir.

Regresyon modeline göre, diğer bütün değişkenler sabit kaldığı durumda buğday unu katma oranı 1 birim artırıldığında fitik asit miktarındaki değişiklik ortalama 8,29 birim azalmaktadır yorumu yapılır.

Analiz sonucu elde edilen indirgenmiş model ise;

fitik asit = 1153,1 - 9,122 buğday unu katma oranı şeklindedir.

Regresyon modeli elde edildikten sonra deney için varyans analizi tablosu oluşturulur. Oluşturulan tablo Çizelge 3’de verilmiştir.

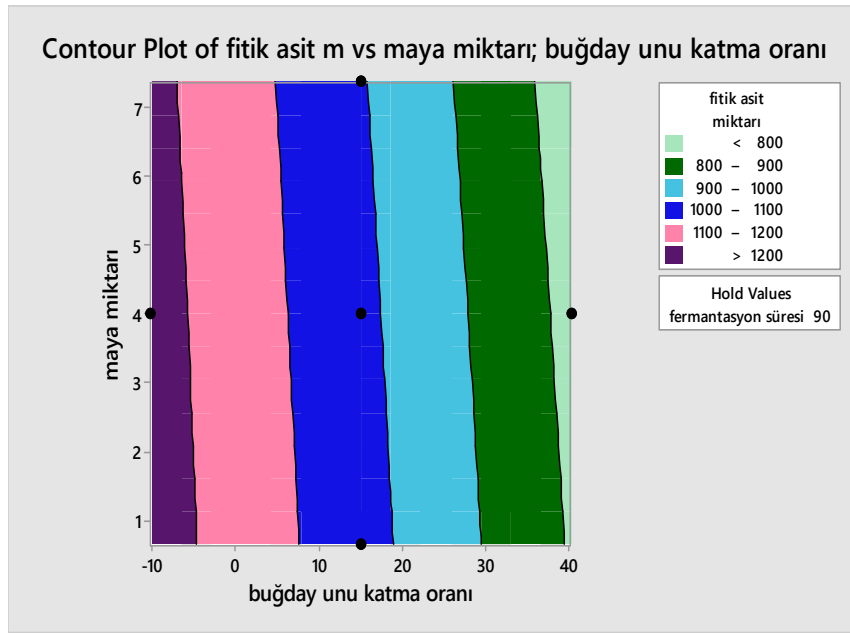
Çizelge 3. 3³CCD varyans analizi tablosu

| Değişim Kaynağı | Serbestlik Derecesi | Kareler Toplamı | Kareler Ortalaması | F | P |
|-----------------|---------------------|-----------------|--------------------|-------|--------------------|
| Regresyon | 9 | 257722 | 28636 | 17,41 | 0,000 [#] |
| Lineer | 3 | 257096 | 85699 | 52,10 | 0,000 [#] |
| Karesel | 3 | 579 | 193 | 0,12 | 0,948 |
| İnteraksiyon | 3 | 48 | 16 | 0,01 | 0,999 |
| Hata | 10 | 16450 | 1645 | | |
| Toplam | 19 | 274172 | | | |

Varyans analizi tablosu sonucunda lineer regresyon modelinin anlamlı olduğu ($p < 0,05$) görülmektedir. Bu durumda amacımız doğrultusunda hedef en iyidir modelini benimseyerek kontur ve yanıt grafikleri Şekil 4 ve Şekil 5’de verildiği gibi elde edilmiştir.



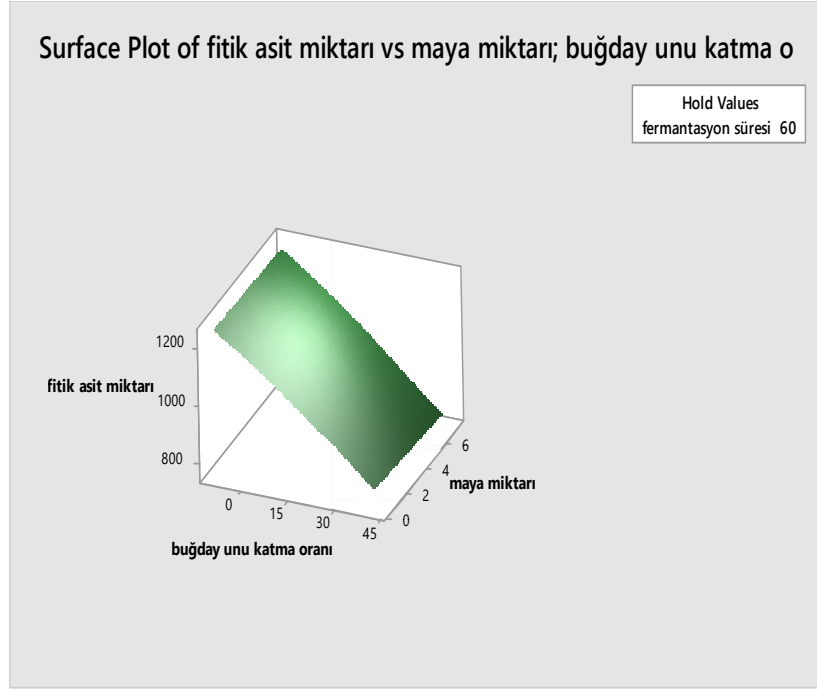
Şekil 4. CCD’de hedef en iyidir modeli yanıt grafiği



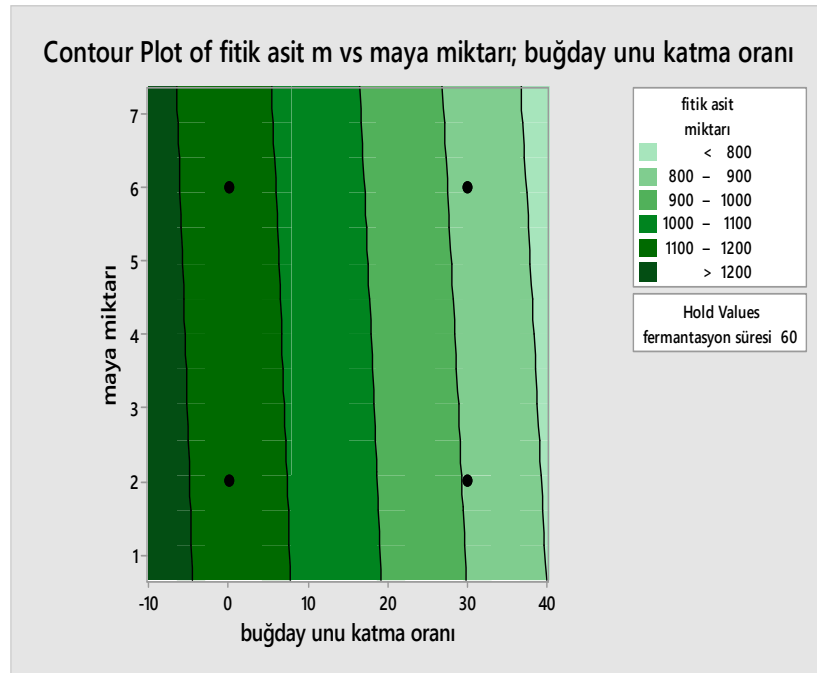
Şekil 5. CCD’de hedef en iyidir modeli kontur grafiği

Şekil 4 ve Şekil 5 hedef en iyidir modeli seçildiğinde buğday unu katma oranının düzeyi 10 ile 20 arasında seçildiğinde hedeflenen fitik asit miktarının 1000-1100 (mg/100g) olacağını göstermektedir.

Amacımız doğrultusunda en küçük en iyidir modeli benimseyerek kontur ve yanıt grafikleri Şekil 6 ve Şekil 7’de verilmiştir.



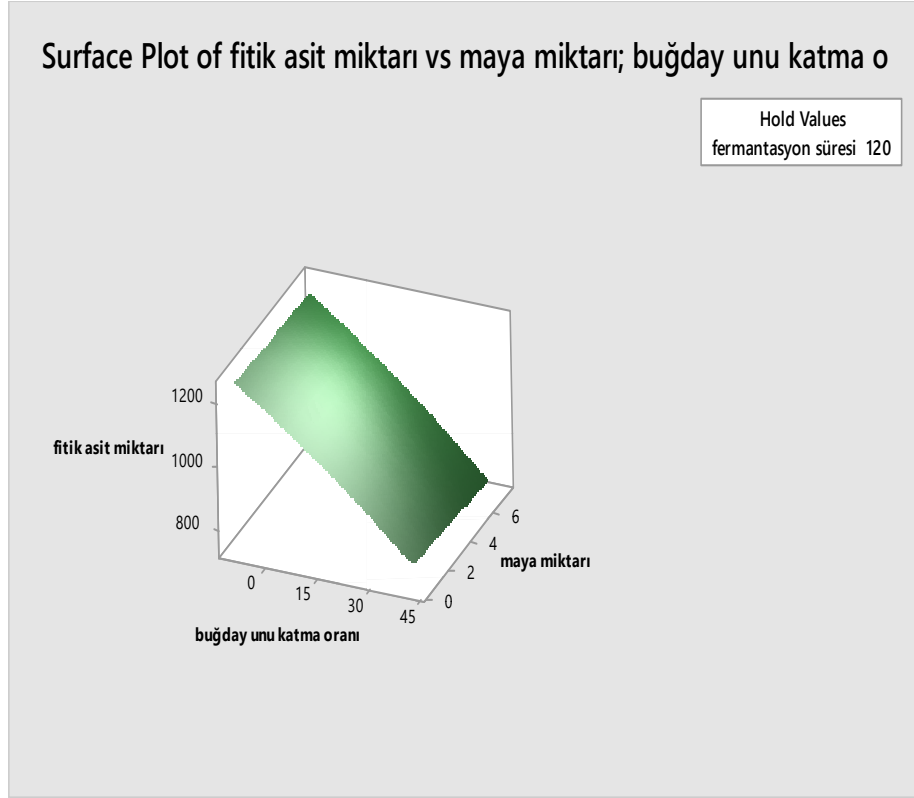
Şekil 6. CCD’de en küçük en iyidir modeli için yanıt grafiği



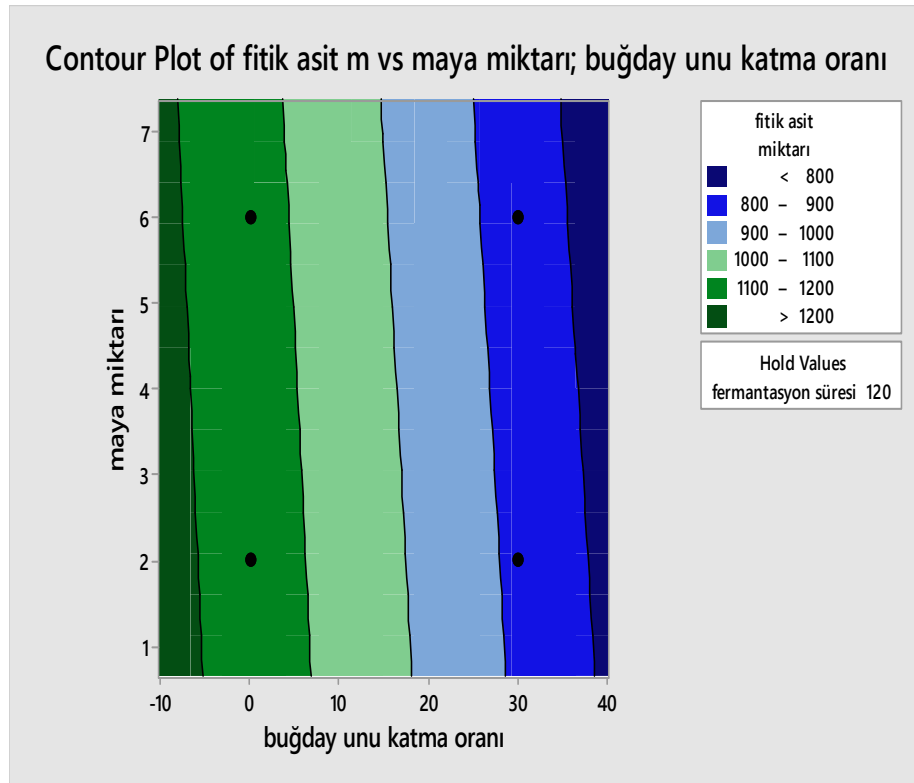
Şekil 7. CCD’de en küçük en iyidir modeli için kontur grafiği

Şekil 6 ile Şekil 7’de en küçük en iyidir modeli seçildiğinde buğday unu katma oranının düzeyi 0 seçildiğinde hedeflenen fitik asit miktarının 1100-1200 (mg/100g) olacağını göstermektedir.

Amacımız doğrultusunda en büyük en iyidir modeli benimsenerek çizdirilen kontur ve yanıt grafikleri Şekil 8 ve Şekil 9’da gösterildiği gibidir.



Şekil 8. CCD’de en büyük en iyidir modeli için yanıt grafiği



Şekil 9. CCD’de en büyük en iyidir modeli için kontur grafiği

Şekil 8 ile Şekil 9'da en büyük en iyidir modeli seçildiğinde buğday unu katma oranının düzeyini 30 ile 40 arasında seçtiğimizde hedeflenen fitik asit miktarının 800-900 (mg/100g) olacağını göstermektedir.

Mısır ve mısır ekmeği, iyi bir diyet lif, fenoliz madde ve antioksidan kaynağıdır. Fakat mısırdaki fazla miktarda fitik asit bulunmaktadır. Ayrıca buğdayda olduğu gibi öğütme işlemi sırasında fitik asidin bir kısmı kepeklerle ayrılamamakta, tamamına yakın kısmı mısır ununa geçmektedir. Fitik asit, fosforun büyük bir kısmına fitat fosforu olarak bağlamakta, Ca, Zn, Fe gibi minerallerle kompleks oluşturmakta ve proteinlerle interaksiyona girerek bunların vücuda yararlılığını ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle fitik asidin beslenmede dikkate alınması gereken bir madde olduğu özellikle de çocuklar, hamileler, emziren anneler ve yaşlılar için önemli olduğu ifade edilmektedir (Özkaya ve ark., 2013).

Buğday ununun fitik asit miktarı, mısır unundan düşük olduğundan, buğday unu katma oranı arttıkça fitik asit miktarı da düşmektedir. Veriler birinci derece yanıt yüzeyi modeli için hesaplandığı zaman R^2 değeri %94, R^2 (düzeltilmiş) değeri %88

bulunmuştur. Bu iyi bir açıklama yüzdesidir. CCD'de buğday unu katma oranının fitik asit üzerinde temel etkiye sahip olduğu, fermantasyon süresinin yada maya miktarının ise tek başlarına yada herhangi bir etkileşim ile fitik asit miktarı üzerinde etkili olmadığı görülmüştür. Bu durumda mısır ekmeği üretimi yaparken, buğday unu katma oranını optimum düzeyde kullanmak fitik asit miktarının azalmasına neden olacak, böylece daha sağlıklı ekmekler elde edilebilecektir.

Buğday unu katma oranının 3 düzeyinde de CCD kullanılmıştır. En büyük veya en küçük değerinin araştırılması ve bu değeri sağlayabilecek girdi değişkenlerinin değerlerinin tespiti yapılmıştır. Amacın çeşitliliğine göre elde edilebilecek tüm sonuçlar verilmiştir. Fitik asidin vücuda alınan miktarı ile Ca, Fe, Zn ve Mn gibi önemli minerallerin biyolojik yararlılıkları arasında ters bir orantı olduğu göz önüne alındığında, mısır ekmeği yapımında, mısır ununun, mısır ununa göre fitik asit miktarı daha düşük olan buğday unu ile belli oranlarda karıştırılarak kullanılmasının daha doğru olacağı ifade edilebilir.

Kaynaklar

- Aktaş S, Çiftçi E (2015). Hasta memnuniyetine yanıt yüzeyi yaklaşımı. *European Journal of Science and Technology* 2(4): 128–135.
- Allen TT, Yu L (2002). Low cots response surface methods from simulation optimization. *Quality and Engineering* 12(4): 583–591.
- Baş D, Boyacı İH (2007). Modelling and optimization ii: comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. *Journal of Food Engineering* 78: 846–854.
- Bayrak H, Özkaya B, Tekindal MA (2010) Productivity in the first degree for the optimum point determination of factorial trials: an application. *Türkiye Klinikleri Biyoistatistik Dergisi* 2(1): 18–27.
- Cin D, Işık O (2014). hava ulaştırma görevlerinin başarımının tatmini. *Havacılık ve Uzay Teknolojileri Dergisi* 7(1): 105–111.
- Değirmencioglu A, Yazgı A (2006). Tepki yüzeyleri metodolojisi optimizasyon esaslı çalışmalara ilişkin teorik esaslar ve tarımsal mekanizasyon uygulamaları. *Tarım Makineleri Bilimi Dergisi* 2(2): 111–115.
- Demir Ö, Aksu B, Özsoy Y (2017). İlaç formülasyonu geliştirilmesinde deney tasarımı seçimi ve kullanımı. *Marmara Pharmaceutical Journal* 21(2): 211–222.
- Dutta JR, Dutta PK, Banerjee R (2004). Optimization of culture parameters for extracellular protease production from a newly isolated pseudomonas using response surface and artificial neural network models. *Process Biochemistry* 39: 2193–2198.
- Gomes HM, Awruch AM (2004). Comparison of response surface and neural network with other methods for structural reliability analysis. *Structural Safety* 26: 49–67.
- Goos P, Donev AN (2006). Blocking response surface designs. *Computational Statistics and Data Analysis* 51: 1075–1088.
- Hanrahan G, Lu K (2006). Critical application of factorial and response surface methodology in modern experimental design and optimization. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 36: 141–151.
- Koç B, Ertekin-Kaymak F (2010) Yanıt yüzey yöntemi ve gıda işleme uygulamaları. *The Journal of Food* 35(1): 1–8.
- Mead R, Pike D (1975). A review of response surface methodology from a biometric viewpoint. *Biometrics* 31: 803–851.
- Myers RH, Montgomery DC (1995). Response surface methodology, process and product optimization using designed experiments. 2nd edition John Wiley and Sons, New York.

- Myers RH (1999). Response surface methodology - current status and future directions (with discussion). *Journal of Quality Technology* 31: 30–44.
- Oon SJ, Lee LH (2006). The impact of ordinal on response surface methodology. *Winter Simulation Conference*, California, 406–413.
- Özkaya B, Özkaya H, Duran B (2013) Effects of yeast types on phytic acid content of traditional corn bread. The 2. International Symposium on Traditional Foods From Adriatic to Caucasus, 24-17 October, 234, Makedonya.
- Ryan TP (2007). Modern experimental design. *New Jersey: John Wiley and Sons* 360–410.
- Said KAM, Amin MAM (2015). Overview on the response surface methodology in extraction processes. *Journal of Applied Science and Process Engineering* 2(1): 8–17.
- Stablein DM, Carter WH, Wampler GL (1983). Survival analysis of drug combinations using a hazards model with time-dependent covariates. *Biometrics* 36(3): 537–546.
- Tekindal MA, Bayrak H, Özkaya B, Yavuz Y (2014). Second order response surface method: factorial experiments an alternative method in the field on agronomy. *Turkish Journal of Field Crops* 19(1): 35–45.
- Turan MD, Altundoğan HS (2011). Hidrometalurjik araştırmalarda yanıt yüzey yöntemlerinin kullanımı. *Madencilik* 50(3): 11–23.
- Vining GG, Myers RH (1990). Combining taguchi and response surface philosophies: dual response approach. *Journal of Quality Technology* 22(1): 38–45.

Böcek Dokularından DNA İzolasyonu Yöntemlerinin Kalite, Verim ve Maliyet Açısından Karşılaştırılması

Murat GÜLER¹, Filiz TOKGÖZ², Ertan Mahir KORKMAZ¹, Mahir BUDAK^{1*}

¹Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, SİVAS

²Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Parazitoloji Bölümü, SİVAS

*e-mail: mbudak@cumhuriyet.edu.tr

Öz: Günümüzde moleküler biyoloji ve biyoinformatik alanındaki gelişmelere paralel olarak metagenomik, biyoteknoloji, tüm genom dizilemesi, genom evrimi gibi alanlarda çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Böcek türleri ile yapılan çalışmalarda ilk ve en önemli adım etkili bir DNA izolasyonu yönteminin kullanılmasıdır. Kitin yapılı bir dış iskelete sahip olan böceklerin çoğunun küçük canlılar olması DNA izolasyonunu zorlaştırmaktadır. Yapılan bu çalışma ile *Cephus pygmeus* (Linnaeus, 1767) türüne ait bireylerden dokuz farklı DNA izolasyon yöntemi ile total DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri verim, saflık, maliyet, zaman ve PCR başarısı kriterleri altında değerlendirilmiştir. Maliyet ve kullanılan kimyasalların toksisitesi göz önüne alındığında ise tuzla çöktürme yönteminin böcek dokularından DNA izolasyonu için en uygun yöntem olduğu yorumlanmıştır.

Anahtar kelimeler: DNA İzolasyon Yöntemleri, Böcek Genomik DNA'sı, DNA Kalitesi, PCR, *Cephus pygmeus*

Comparison of DNA Isolation Methods From Insect Tissues in Terms of Quality, Yield and Cost

Abstract: Today, there are many studies conducted in the areas such as metagenomics, biotechnology, whole genome sequencing, genome evolution, and so on parallel to the developments in molecular biology and bioinformatics in molecular biology and bioinformatics. The first and most important step in studies with insect species is the use of an effective DNA isolation method. Small body and external chitin skeleton of the insects cause difficulties in isolating the insect DNAs. In this study, nine different DNA isolation methods were applied to carry out total DNA isolation from the individuals belonging to the species *Cephus pygmeus* (Linnaeus, 1767). The results were interpreted in terms of DNA yield, purity, cost, time and PCR performance criteria. When the cost and the toxicity of the used chemicals are taken into consideration, it is interpreted that the salting out method is the most suitable method for DNA isolation from insect tissues.

Keywords: DNA Isolation Protocols, Insect Genomic DNA, DNA Quality, PCR, *Cephus pygmeus*

1. Giriş

Son yıllarda moleküler biyoloji alanındaki baş döndürücü gelişmeler araştırmacılar için metagenomik, biyoteknoloji, tüm genom dizilemesi ve genom evrimi gibi alanlara farklı bir bakış açısı getirmiştir. Biyolojik çeşitliliğin önemli bir üyesi olan böcekler bu gelişmelere paralel olarak farklı

sorulara yanıt aranan DNA dizi bilgisi temelli sayısız çalışmanın konusu olmuştur. Özellikle DNA dizileme teknolojisinin gelişmesi ve dizileme maliyetlerinin göreceli olarak azalması bu tarz çalışmaların sayısını oldukça artırmıştır (Van Dijk ve ark., 2014). Son zamanlarda ise, yeni nesil DNA dizileme (NGS) olarak bilinen ve oldukça yüksek

kapasitede genom verisi üretebilen platformlar sayesinde, tek ya da birkaç DNA belirteci ile sınırlı kalan çalışmalar, yerini daha büyük veri setleri kullanılan çalışmalara bırakmıştır (Mardis, 2017). Günümüzde böceklerde DNA dizileri kullanılarak akrabalık ilişkileri ve evrim (Misof ve ark., 2014), böcek-bitki ve böcek-mikrop-(bitki) etkileşimi (Biere ve Bennett, 2013), karşılaştırmalı genomik (Rosenfeld ve ark., 2015), beslenme alışkanlıkları (Juen ve Traugott, 2005), genetik çeşitlilik, populasyon genetiği (Davey ve Blaxter, 2010), koruma biyolojisi (Kress ve ark., 2015), biyocoğrafya (Korkmaz ve ark., 2014), tarım zararlılarının biyolojik kontrolü (Furlong, 2015), vektör taşıyıcılarla savaş (Carlton ve ark., 2008) ve referans DNA kütüphaneleri ile türlerin moleküler teşhisleri (DNA barkodlama) (Hebert ve ark., 2003) gibi birçok alanda araştırmalar gerçekleştirilmektedir.

Tüm bu araştırmalarda başarılı bir yöntemsel aşamanın sürdürülebilmesi için ilk ve en önemli basamak etkin bir DNA izolasyonu yönteminin kullanılmasıdır. Etkin bir DNA izolasyonu, PCR, DNA dizileme (NGS ya da Sanger), klonlama ve hibridizasyon gibi aşamaların da başarılı bir şekilde yürütülebilmesini sağlayacaktır. Peki, başarılı bir DNA izolasyonunda ana kriter nedir ve farklı DNA izolasyon yöntemleri arasında seçim neye göre yapılır? Başarılı bir DNA izolasyonunun sağlanması için DNA molekülüne zarar vermeden hücrenin tüm diğer

makro-moleküllerinin ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla böceklerden yaşamlarının farklı evrelerinde (erişkin, yumurta, larva ya da pupa) total genomik DNA izolasyonu gerçekleştirebilmek için çok sayıda yöntem ve kit geliştirilmiştir (Wingfield ve Klein, 2012; Asghar ve ark., 2015). Ancak, tercih edilen yöntem, izole edilen DNA'nın kalite ve miktarını doğrudan etkilemektedir. Bu çalışmada, standart olarak kullanılan yöntemler ve bu yöntemlerin modifiye edilmesi ile elde edilen dokuz farklı DNA izolasyon yöntemi verim, maliyet ve zaman açısından karşılaştırılmıştır. Ortalama büyüklüğü, tarım zararlısı olması ve geniş yayılış alanına sahip olması nedeniyle DNA izolasyonu karşılaştırmalarında, yaşam şekli ve tür çeşitliliği açısından ilk sıralarda yer alan Hymenoptera takımının bir üyesi olan *Cephus pygmeus* (Linnaeus, 1767) (Symphyta: Cephidae) kullanılmıştır. *C. pygmeus* türü Avrupa, Asya, Afrika ve Kuzey Amerika'da geniş ve devamlı bir yayılış alanına sahiptir. Konak bitki olarak buğdaygilleri seçtiği için buğday sap-arısı olarak da bilinmektedir ve ekonomik olarak buğdaylarda zarara yol açmaktadır (Shanower, 2008). Erginlerinin vücut büyüklüğü 5-11 mm arasında değişmekte ve sarı-siyah abdomen renklenmesi sergilemektedir (Korkmaz ve ark., 2010).

2. Materyal ve Metot

Böcek dokularından DNA izolasyon yöntemlerinin verim, maliyet ve zaman

açısından karşılaştırılması amacıyla dokuz farklı yöntem kullanılmış olup, her yöntem için aynı lokaliteden toplanmış iki dişi ve iki erkek olmak üzere toplam 4 birey kullanılmıştır (Tuzla çöktürme yönteminde üç birey kullanılmıştır). Çalışma kapsamında kullanılan örnekler ait bilgiler Çizelge 1’de sunulmuştur. Örnek seçiminde en az 10 yıl olmak üzere eski tarihli ve alkolde bekletilen örnekler olmasına dikkat edilmiştir. Bu kapsamda 2001-2004 yılları arasında toplanmış, Cumhuriyet Üniversitesi Entomoloji Koleksiyonu’nda (ECCUS) yer alan ve -20 °C’de %100 etanol içerisinde saklanan örnekler kullanılmıştır. Örnekler önce alkol uzaklaştırma işlemi uygulanmıştır. Bu amaçla filtreli tüpler kullanılarak santrifüj edilmiş ve yaklaşık yarım saat kurutma kağıdı üzerinde bekletilmiştir. Kurutulma sonrası örneklerin baş kısımları PCR inhibitörleri açısından yoğun oldukları için uzaklaştırılmış, kalan kısım ise hassas terazi kullanılarak tartılmıştır. Tartım işlemi sonrasında her bir bireye ait doku mikrosantrifüj tüpüne aktararak ezme işlemi ile mekanik olarak parçalanmıştır.

DNA izolasyonu için Chelex-100, fenol-kloroform, ısı şok, tuzla çöktürme, ticari kit yöntemler ve bu yöntemlerde çeşitli modifikasyonlar yapılarak oluşturulan toplam dokuz farklı yönteme başvurulmuştur (Çizelge 1). Bu yöntemlere ait uygulama basamakları aşağıda detaylı bir şekilde sunulmuştur. Her bir yöntem sonucunda izole edilen total genomik DNA’nın kalite ve miktar tayinleri 260, 280 ve

230 nm dalga boyunda absorbans değerlerinin nanodrop cihazı (Maestrogen, 2000) kullanılarak ölçülmesi ile hesaplanmıştır. Ayrıca, izole edilen DNA örneklerinin PCR uygulamalarındaki başarısının test edilebilmesi için çekirdek ve mitokondri genomlarına özgü fragmanların *in vitro* çoğaltılması uygulamasına başvurulmuştur. Bu amaçla böcek çalışmalarında barkod amaçlı kullanılan çekirdek genomuna ait ITS2 ve mitokondri genomuna ait COI gen fragmanları seçilmiştir. ITS2 fragmanının çoğaltılmasında Cas5p8sFt (5’-ATG AAC ATC GAC ATT TCG AAC GCA TAT-3’) ve Cas28SB1d (5’-TTC TTT TTC TTC GCT TAG TAA TAT GCT TAA-3’) primer çifti (Ji ve ark., 2003); COI gen bölgesinin çoğaltılmasında ise s1859 (5’-GGA ACI GGA TGA ACW GTT TAY CCI CC-3’) (Simon ve ark., 1994) ve HCOout (5’-GCT CCT ATT GAT ARW ACA TAR TGR AAA TG-3’) (Carpenter ve ark., 1999) primerleri tercih edilmiştir. PCR reaksiyonları 50 µl son hacimde hazırlanmış olup, reaksiyon hacminin içeriğine 0,5 U Taq DNA polimeraz, 5 µl 10× reaksiyon tampon (100 mM Tris-HCl, pH 8,8, 500 mM KCl), primerlerin her birinden 10 pmol, 0,2 mM her bir dNTP, 1,5 mM MgCl₂ ve 100 ng kalıp DNA (son konsantrasyon 2 ng/µl) eklenmiştir. Reaksiyonlar BioRad T-100 PCR cihazında: 95 °C’de 5 dakika ilk denatürasyon adımı; 35 döngüden oluşan üç amplifikasyon adımı: (1) 94 °C’de 1 dakika, (2) primer çiftine özgün bağlanma (annealing) sıcaklığında 1 dakika ve (3) 72 °C’de 30

saniye; 72°C'de 5 dakika bir son uzatma basamağı koşulları altında gerçekleştirilmiştir. DNA örnekleri ve tüm PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde GeneRuler 100 bp Plus DNA

Ladder (Thermo Scientific, Katalog Numarası: SM0321) ile birlikte yürütülerek görüntülenmiş ve sonuçlar kalitatif olarak değerlendirilmiştir.

Çizelge 1. DNA izolasyon yöntemlerinin karşılaştırılmasında kullanılan örneklere ait lokalite bilgileri.

| Kullanılan Yöntem | ECCUS NO | Toplam Birey | Enlem (N) | Boylam (E) | Toplanma Tarihi | Lokalite |
|-----------------------------------|----------|--------------|-----------|------------|-----------------|----------|
| Chelex-100 | 545 | 4 | 39,707219 | 37,032101 | 17.06.04 | SİVAS |
| Chelex-100+Proteinaz K | 646 | 4 | 39,633316 | 37,032991 | 23.05.02 | SİVAS |
| Chelex-100+Alkol Çöktürme | 572 | 4 | 39,683808 | 36,792156 | 01.06.01 | SİVAS |
| Fenol-Kloroform | 552 | 4 | 39,708535 | 36,650581 | 23.05.02 | SİVAS |
| Isı Şok | 619 | 4 | 39,835168 | 36,441772 | 07.06.02 | SİVAS |
| Isı Şok+Chelex-100 | 453 | 4 | 40,164838 | 38,084192 | 29.05.02 | SİVAS |
| Isı Şok+Chelex-100+Alkol Çöktürme | 580 | 4 | 39,874702 | 37,730385 | 12.06.02 | SİVAS |
| Tuzla Çöktürme | 595 | 3 | 38,150757 | 34,874525 | 02.06.02 | NİĞDE |
| KolonTabanlı Ticari Kit | 526 | 4 | 39,582407 | 36,622085 | 28.05.02 | SİVAS |

a) Chelex-100 yöntemi: Adli materyallerden DNA izolasyonu için geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır (Walsh ve ark., 1991). Örnek üzerine 1.5 ml Tampon A (200 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8.0) eklenmiştir. Vorteksenerek doku ile tamponun etkileşimi sağlanmıştır. 23640 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 1 ml Tampon B (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 300 mM Tris-HCl pH 8.0) eklenmiş, pelet süspansen hale getirilmiş ve 23.640 x g'de tekrar 5 dakika santrifüj edilerek üst faz uzaklaştırılmıştır. Örnek üzerine 100 µl dH₂O ve 200 µl %10 (ağırlık/hacim) Chelex-100 çözeltisi eklenerek 56 °C'de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası 8 dakika kaynatılan örnekler 23.640 x g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz, kalıntı doku

ve chelex-100 alınmadan dikkatli bir biçimde yeni tüpe aktarılmıştır.

b) Chelex-100 + Proteinaz-K Yöntemi: Walsh ve ark. (1991) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Chelex-100 yönteminden farklı olarak Tampon B (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 300 mM Tris-HCl pH 8.0) eklendikten sonra 10 µl proteinaz-K (20 mg/ml) ortama eklenerek gece boyunca 55 °C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamalarda Chelex-100 yöntemindeki basamaklar takip edilmiştir.

c) Chelex-100 + Alkol Çöktürme Yöntemi: Walsh ve ark. (1991) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak uygulanmıştır. Chelex-100 yöntemi sonucunda elde edilen DNA çözeltisi içerisindeki olası inhibitör etkideki ajanların

uzaklaştırılması amacıyla nükleik asitlerin alkolle çöktürülmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla Chelex-100 yöntemi ile elde edilen çözeltinin üzerine 1/10 hacim 5 M NaCl ve 2 hacim soğuk %99'luk etanol eklenmiştir. Ardından, son hacimde 0.01 mM olacak şekilde MgCl₂ eklenerek +4 °C'de 28.500 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek çöktürülmüştür. Alkol uzaklaştırılmış ve peletin üzerine 100 µl % 70'lik etanol eklenmiş, pelet yıkama işlemi sonrasında 4 °C'de 28.500 x g'de 6 dakika tekrar santrifüj edilmiştir. Alkol ortamdan uzaklaştırılarak peletin 50 µl 1×TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) içerisinde çözülmesi sağlanmıştır.

d) Fenol Kloroform Yöntemi:

Gemmell ve Akiyama (1996) tarafından optimize edilen yöntem esas alınmıştır. Mekanik ezme işlemi gerçekleştirilen örnek, 540 µl homojenizasyon tamponu (100 mM NaCl, 10 mM EDTA, 300 mM Tris-HCl pH 8.0) ve 60 µl %10'luk SDS ile süspansiyon edilmiştir. Son konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde proteinaz-K eklenerek 37 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. Özütleme sonrası özütlere bir hacim fenol ve bir hacim kloroform:izoamil alkol (24:1) eklenerek ve 13.000 x g'de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak aynı işlem bir kez daha tekrarlanmıştır. Üst faz üzerine bir hacim kloroform:izoamil alkol eklenerek 13.000 x g de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Üst faz yeni bir tüpe aktarılarak aynı işlem bir kez daha

tekrarlanmıştır. Üst fazın üzerine 1/10 hacim 5 M NaCl ve 2 hacim soğuk mutlak etanol eklenmiştir. DNA'nın çöktürülmesi için 4 °C'de 28.500 x g'de 30 dakika santrifüj edilerek alkol uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 100 µl %70'lik etanol eklenerek 4°C'de 28.500 x g'de 6 dakika santrifüj edilmiştir. Alkol uzaklaştırılarak peletin 100 µl 1×TE tamponu içerisinde çözülmesi sağlanmıştır.

e) Isı Şok Yöntemi (HotSHOT):

Truett ve ark. (2000) tarafından optimize edilen yöntem esas alınmıştır. Parçalanmış doku üzerine 50 µl Lizis Tamponu (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH 12) eklenerek 95 °C'de 30 dakika inkübe edilmiştir. Yaklaşık 4-5 dakika buz üzerinde örnekler bekletilmiş ve 50 µl Nötralizasyon Tamponu (40 mM Tris-HCl, pH 5.0) eklenmiştir. Karışımın homojenize olması amacıyla vorteks ile karıştırma işleminden sonra, dokuyu çöktürmek amacıyla 10.000 x g'de kısa süreli santrifüjleme gerçekleştirilmiştir. Sonraki aşamalarda kullanılmak üzere üst faz yeni tüpe alınmıştır.

f) Isı Şok + Chelex-100 Yöntemi:

Bu çalışma için optimize edilen yöntemde, ısı şok yönteminden farklı olarak nötralizasyon tamponu eklenmesinden sonra 100 µl dH₂O ve 200 µl %10 (ağırlık/hacim) Chelex-100 çözeltisi ortama eklenmiştir ve örnekler 8 dakika kaynatıldıktan sonra üst faz yeni tüpe alınmıştır.

g) Isı Şok + Chelex-100 + Alkol

Çöktürme Yöntemi: Bu çalışma için optimize edilen yöntemde, ısı şok + Chelex-100

yönteminde elde edilen DNA'nın alkol ile yıkanması işlemi gerçekleştirilmiştir. Alkol yıkaması sonrası elde edilen pelet 50 µl 1×TE tamponu içerisinde çözülmüştür.

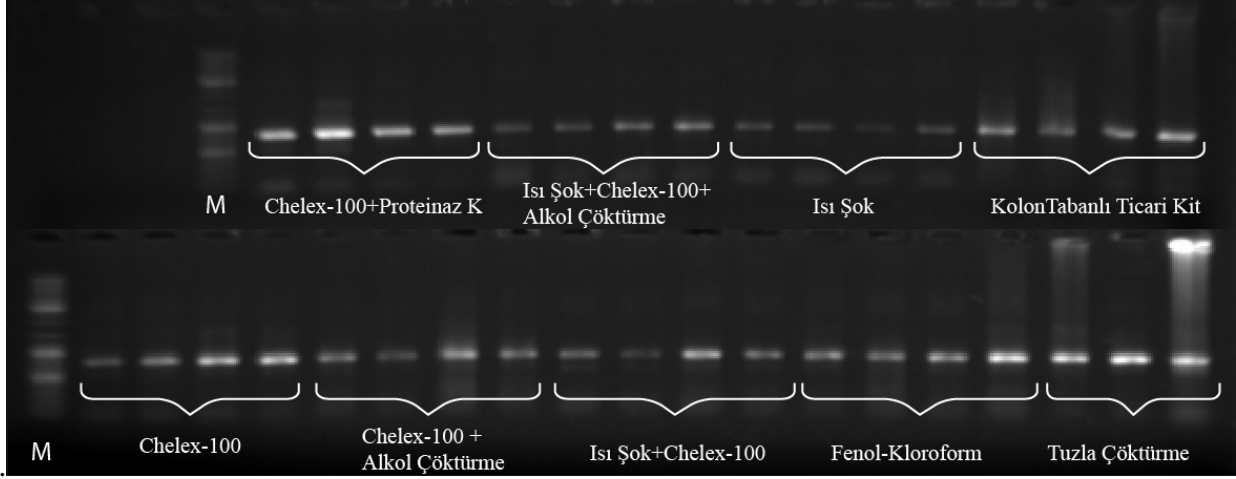
h) Tuzla Çöktürme Yöntemi: Aljanabi ve Martinez (1997) tarafından geliştirilen yöntemde bazı değişiklikler yapılarak yöntem uygulanmıştır. Dokuların mekanik olarak parçalanmasından sonrasında 300 µl TNES tamponu (50 mM Tris, pH:7,5, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0,5% SDS) 100 µg/ml proteinaz-K ile birlikte eklenerek 55 °C'de gece boyu inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası, örneklerin üzerine 85 µl 5 M NaCl eklenerek karıştırılmıştır. Örnekler 14.000 x g'de 5 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çöktürülmesi sağlanmıştır. Yeni bir tüpe alınan üst faz üzerine bir hacim %99'luk soğuk etanol eklenerek 12.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Alkol uzaklaştırılarak 100 µl %70'lik etanol ile yıkama ve çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Alkolün tamamen uzaklaştırılması sağlandıktan sonra pelet 50 µl 1×TE tamponu içerisinde çözülmüştür.

i) Kolon Tabanlı Ticari Kit

Kullanımı: Bu amaçla Roche firması tarafından üretilen "High Pure PCR Template Preparation Kit" kullanılmıştır. Üreticinin önerdiği protokol uygulanarak izolasyon gerçekleştirilmiş olup, farklı olarak yalnızca liziz aşamasında gece boyunca inkübasyon basamağı tercih edilmiştir. Kolondan DNA'nın geri kazanımında ise 50 µl elüsyon tamponu kullanılmıştır.

3. Sonuçlar

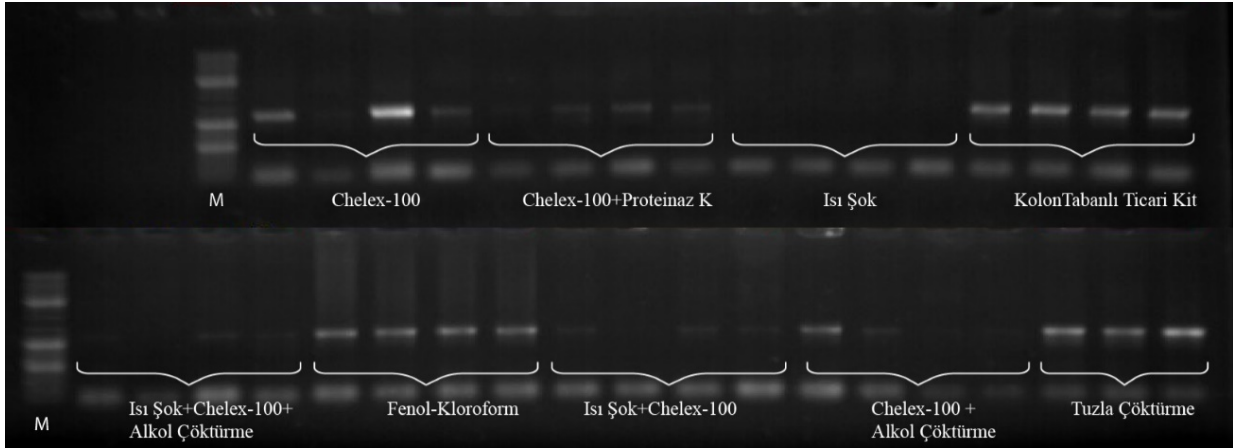
DNA izolasyon yöntemlerinin zaman, maliyet ve PCR verimi bakımından değerlendirilebilmesi amacıyla gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda birim doku başına izole edilen DNA miktarı (µg/mg), A260/A280 ve A260/230 oranı, izolasyon için harcanan zaman, maliyet (\$) ve her iki gen bölgesi için PCR başarısı Çizelge 2'de özetlenmiştir. PCR başarıları açısından değerlendirmede agaroz jel görüntüleri kullanılarak hesaplama yapılmış olup, COI genine ait PCR ürünleri Şekil 1 ve ITS2 bölgesine ait PCR ürünleri ise Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 1. COI genine ait PCR ürünlerin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü gösterilmiştir.

Konsantrasyonu yeterli görülen (kit ile gerçekleştirilen PCR ürünlerine yakın parlaklık) ürünlerin başarısı kuvvetli, bu parlaklığın altında olan fakat çoğaltılan ürünler zayıf ve PCR ürünü sinyali içermeyenler başarısız olarak nitelendirilmiştir. PCR başarılarının yüzde değerlerinin hesaplanmasında ise başarılı tüm ürünlerin

(kuvvetli ve zayıf) toplam reaksiyon içindeki oranı kullanılmıştır. COI bölgesinin PCR uygulamalarıyla çoğaltılmasında bütün yöntemlerde başarı sağlanmıştır. Isı-şok yöntemi dışındaki tüm PCR ürünlerinin konsantrasyonları kuvvetli olarak nitelendirilmiş ve ısı-şok yönteminde kuvvetli-zayıf olarak sonuç alınmıştır (Şekil 1).



Şekil 2. ITS2 bölgesine ait PCR ürünlerin %1'lik agaroz jel üzerindeki görüntüsü gösterilmiştir.

ITS2 bölgesinin çoğaltılmasında kullanılan tüm yöntemler birlikte değerlendirildiği zaman, toplamda %68.5 oranında PCR başarısı elde edilmiştir. Tuzla çöktürme, fenol-kloroform ve ticari kit

yöntemlerinde tam başarı sağlanırken (%100), yalnızca ısı şok yöntemi sonucunda PCR uygulamaları başarısız olmuştur (Şekil 2). Ancak ısı şok yönteminin modifiye edilmesiyle oluşturulan ısı-şok + chelex-100 (%75) ve ısı-

şok + chelex-100 + alkol çöktürmesi sergilemiştir.
yöntemlerinde PCR başarıları (%50) artış

Çizelge 2. DNA izolasyon yöntemlerinin verim, saflık, maliyet, zaman ve PCR başarıları açısından karşılaştırılması için kullanılan parametreler.

| DNA İzolasyon Yöntemi | DNA Miktarı (µg/mg) | A260/A280 | A260/A230 | Maliyet (10 örnek – USD) | Harcanan Zaman (10 örnek için saat) | PCR Başarısı | | | |
|--|---------------------|-----------|-----------|--------------------------|-------------------------------------|--------------|------------------------|----------|----------------------------|
| | | | | | | COI (%) | Amplifiye olan ürünler | ITS2 (%) | Amplifiye olan ürünler |
| Chelex-100 | 20.13±2.87 | 1.29-1.43 | 1.00-0.77 | 3.97 | 2.5 | 100 | Kuvvetli | 75 | Kuvvetli, Zayıf, Başarısız |
| Chelex-100 + Proteinaz K | 7.72±1.59 | 1.06-1.23 | 0.67-0.94 | 3.99 | 19.5 | 100 | Kuvvetli | 75 | Zayıf, Başarısız |
| Chelex-100 + Alkol Çöktürme | 6.85±1.05 | 1.76-1.97 | 1.71-1.86 | 5.85 | 5.5 | 100 | Kuvvetli | 50 | Zayıf, Başarısız |
| Fenol-Kloroform | 11.03±1.18 | 1.63-1.92 | 1.75-2.02 | 4.81 | 19.5 | 100 | Kuvvetli | 100 | Kuvvetli |
| Isı Şok | 34.85±3.32 | 1.01-1.22 | 1.10-1.27 | 4.52 | 0.7 | 100 | Kuvvetli, Zayıf | 0 | Başarısız |
| Isı Şok + Chelex-100 | 51.59±5.09 | 1.06-1.42 | 1.00-1.30 | 7.17 | 1.0 | 100 | Kuvvetli | 75 | Zayıf, Başarısız |
| Isı Şok + Chelex-100 + Alkol Çöktürme | 13.44±4.63 | 1.79-2.03 | 1.86-2.19 | 9.05 | 3.5 | 100 | Kuvvetli | 50 | Zayıf, Başarısız |
| Tuzla Çöktürme | 6.86±0.72 | 1.80-1.89 | 1.56-1.83 | 3.80 | 17.5 | 100 | Kuvvetli | 100 | Kuvvetli |
| Kolon Tabanlı Ticari Kit | 6.41±1.63 | 1.67-2.08 | 1.73-2.16 | 30.77 | 19.5 | 100 | Kuvvetli | 100 | Kuvvetli |

Birim doku başına izole edilen ortalama DNA miktarı, en çok ısı-şok + chelex-100 yöntemi kullanılarak (51.59 $\mu\text{g}/\text{mg}$) elde edilirken, en az ticari kit yöntemi kullanılarak (6.41 $\mu\text{g}/\text{mg}$) elde edilmiştir (Çizelge 2). İzole edilen DNA'nın saflık derecesini ölçmek için kullanılan 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbans değerlerinin oranı 1.8'e yakın olan ölçümler chelex-100 + alkol çöktürmesi, fenol-kloroform, ısı-şok + chelex-100 + alkol çöktürmesi, tuzla çöktürme ve ticari kit kullanılarak elde edilmiştir. Diğer yöntemlerde protein kontaminasyonuna işaret eden düşük A260/A280 oranları elde edilmiştir (Çizelge 2). Aynı zamanda ısı şok + chelex-100 + alkol çöktürmesi ve ticari kit yöntemi ile elde edilen DNA örneklerinin bazılarında A260/A280 oranı 2'nin üzerinde hesaplanmıştır. İzole edilen DNA'nın saflığının kontrolü için bir ölçü olan A260/A230 oranı karbohidrat, fenolik bileşikler ve glikojen gibi kontaminasyonları tespit etmek için kullanılmakta olup bu değerlerin 2.0-2.2 arasında olması beklenmektedir. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda ısı-şok + chelex-100 + alkol çöktürmesi ve ticari kit yöntemleri dışındaki yöntemlerde A260/A230 oranının 2.0-2.2 değerlerinin altında oranlara sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 2).

Başarılı DNA izolasyon yöntemleri için oldukça önemli iki parametre olan maliyet ve zaman için gerçekleştirilen

hesaplanmalarda izolasyon için kullanılan zaman açısından en az 0.7 saat ile ısı şok yöntemi ve en fazla 19.5 saat ile chelex-100 + proteinaz K, fenol-kloroform ve ticari kit yöntemi olduğu bulunmuştur (Çizelge 2). Maliyet bakımından tuzla çöktürme, chelex-100 ve ısı-şok yöntemlerinin ticaret kit yöntemine göre oldukça avantajlı olduğu belirlenmiştir.

4. Tartışma

Bu çalışma böcek dokularından farklı DNA izolasyon yöntemlerinin verim, saflık, çekirdek ve mitokondri gen bölgelerinde PCR başarısı, maliyet ve harcanan zaman açısından karşılaştırılmasını hedeflemektedir. Özellikle, tüm parametreler bir bütün olarak değerlendirildiği zaman fenol-kloroform, tuzla çöktürme ve ticari kit yöntemleri ön plana çıkmaktadır (Çizelge 2, Şekil 1-2). Özellikle, tuzla çöktürme yöntemi tüm yöntemler arasında en avantajlı olarak öne çıkmaktadır. Ancak, kullanılan yöntemlerin ve seçilen parametrelerin tamamı ele alındığında diğer yöntemlerinde zaman, maliyet, kolay uygulama ve PCR başarısı gibi farklı açılardan başarılı olduğu yönler bulunmaktadır.

Chelex-100 polivalent metal iyonlarına yüksek afinite gösteren bir şelat ajanıdır. Doku ile birlikte kaynatılarak hücrelerin parçalanmasını ve DNA'nın serbest kalmasını sağlamaktadır (Walsh et

al., 1991). Özellikle tüp aktarma gibi aşamalar içermemesi kontaminasyon riskini oldukça düşürmekte, maliyet ve zaman açısından diğer yöntemlere göre önemli bir avantaj sağlamaktadır. Birim doku başına izole edilen ortalama 20.13 ± 2.87 µg/mg DNA miktarı ile ısı şok ve ısı şok + chelex-100 yöntemlerinden sonra üçüncü sırada yer alması ile verim açısından başarılı bir yöntem olarak kabul edilebilir (Çizelge 2). Ancak, bu yöntem düşük absorbans değerleriyle ortamda kirlilik etkeni olarak makromoleküller barındırması açısından dezavantajlıdır. Chelex-100 yöntemi yüksek saflıkta bir DNA izolasyonu sunmasa da mitokondri genomuna ait COI geninin çoğaltılmasında oldukça başarılı sonuçlar vermiştir (Şekil 1). Ancak, chelex-100 yönteminin çekirdek genomunu temsilen kullanılan ITS2 bölgesinin çoğaltılmasında COI geni kadar başarılı olmadığı gözlenmiştir (Şekil 2). Bu durum hücrelerin içerdiği mitokondri sayısı ile ribozomal rRNA genleri arasında yer alan ITS2 bölgelerinin kopya sayısı arasındaki olası farklılıktan kaynaklı olabilir. Ayrıca, ortamda yer alan inhibitörlerin PCR verimini düşürdüğü söylenebilir. Bu nedenlerle Chelex-100 yöntemi proteinazK enzimi uygulaması ve elde edilen üründen nükleik asitlerin çöktürülmesini amaçlayan chelex-100 + alkol çöktürmesi yöntemleri denenmiş olup, proteinazK uygulaması hem DNA konsantrasyonunda hem de

A260/A280 oranında önemli ölçüde iyileşmeye yol açmıştır (Çizelge 2). Chelex-100 + proteinazK yönteminde konsantrasyon düşmesi ve kirliliğin artması COI geni için PCR verimini düşürmezken, ITS2 bölgesi için PCR veriminde düşüşe neden olmuştur. Chelex-100 sonrasında alkol çöktürmesi protein nedenli kontaminasyonları büyük ölçüde gidermiş olup, yine COI bölgesi için PCR veriminde değişikliğe neden olmamıştır (Çizelge 2, Şekil 1). Ancak, ITS2 bölgesi için PCR verimi Chelex-100 yöntemine göre daha düşük orandadır. Wingfield ve Klein (2012) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, maliyet ve izolasyon için harcanan zaman açısından bu çalışmada elde edilen veriler ile uyumlu, PCR başarısı açısından ise farklı sonuçlar bulunmuştur. Bu çalışmada Chelex-100 PCR başarısı toplamda %87,5 (%100 mitokondriyal, %75 çekirdek) olarak bulunurken, Wingfield ve Klein (2012) tarafından %40 olarak bulunmuştur. Bu durumda chelex-100 yöntemi için oldukça basit, ekonomik ve göreceli kullanışlı bir yöntem olduğu söylenebilir ve bu nedenle böcek dokularından DNA izolasyonu için uygun bir yöntem olarak önerilebilir.

Isı şok yöntemi hücrelerin sıcak ve alkali ortamda parçalanması sonrasında ortamın pH'sının dengelenmesini kapsamaktadır. Yöntem bir saatten kısa sürede tamamlanmakta ve maliyeti oldukça düşüktür. Dokudan DNA kazanımı açısından

diğer yöntemlere göre yüksek avantajlı olan ısı şok yöntemi, DNA saflığı açısından düşük A260/A280 ve A260/A230 oranlarına sahiptir (Çizelge 2). Bu değerler ortamda çok çeşitli biyomoleküllerin neden olduğu kirliliğe işaret etmektedir. PCR başarısı açısından ise COI geni için başarılı, ancak diğer yöntemlere göre daha zayıf bantlar oluşturmaktadır (Şekil 1). ITS2 bölgesi için PCR uygulamalarında ise başarı elde edilememiştir (Şekil 2). Isı şok yöntemi ile Chelex-100 yönteminin hibrid bir uyarlaması olan ısı şok + Chelex-100 yöntemi hem COI geninin hem de ITS2 bölgesinin PCR başarısını artırmıştır (Şekil 1-2, Çizelge 2). Ayrıca kullanılan yöntemler arasında dokulardan en yüksek DNA geri kazanımını ısı şok + Chelex-100 yöntemi ile (ortalama 51.59 ± 5.09 $\mu\text{g}/\text{mg}$) başarmıştır. Ancak, bu yöntemde de DNA saflığı yeterli düzeyde olmadığı için elde edilen çözeltilerdeki nükleik asitlerin çöktürülmesi ve kirliliğin giderilmesi için ısı şok + Chelex-100 + alkol çöktürmesi yöntemi denenmiştir. Bu yöntemle özellikle protein kaynaklı kirlilikler büyük oranda giderilmiş (Çizelge 2), yine de yeni bir basamağın sürece eklenmesi izole edilen DNA miktarını düşürdüğü için PCR veriminde iyileşme görülmemiştir. Isı şok yönteminin COI geni için PCR başarısı, maliyeti ve harcanan zaman açısından Gutiérrez-López (2015) tarafından gerçekleştirilen çalışmanın sonuçları bu çalışmada elde edilen sonuçlara

benzerlik göstermiştir. Lopez ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada ayrıca DNA dizi kalitelerini de değerlendirmişler ve ısı şok yönteminin ticari kitler ile gerçekleştirilen DNA izolasyonları ile çok benzer sonuçlar verdiğini göstermişlerdir. Aynı çalışmada fenol-kloroform yönteminin DNA dizileme kalitesini düşürdüğünü belirtmişlerdir.

Fenol-kloroform yöntemi birçok laboratuvarında rutin olarak kullanılan bir DNA izolasyon yöntemi olmasına rağmen, oldukça toksik kimyasalların kullanımı nedeniyle dezavantajlı bir yöntemdir (Chen ve ark., 2010). Diğer ele alınan parametreler açısından ise çalışmada kullanılan en avantajlı yöntemlerden biri olarak görünmektedir (Çizelge 2, Şekil 1-2). Doku başına izole edilen DNA miktarı Chelex-100 ve ısı şok yöntemine göre düşük olmasına rağmen, izole edilen DNA'nın saflığı oldukça iyi düzeydedir. Ayrıca maliyet ve PCR başarısı açısından da başarılı bir yöntem olduğu söylenebilir.

Tuzla çöktürme yöntemi maliyet, izole edilen DNA'nın saflığı ve PCR başarısı açısından en uygun yöntem olarak görülmektedir (Çizelge 2, Şekil 1-2). Fenol-kloroform yöntemine göre kullanılan kimyasalların toksik olmaması, maliyet ve uygulama kolaylığı açısından avantajlara sahiptir. Tuzla çöktürme yöntemi ayrıca Chelex-100 ve ısı şok yöntemlerine göre DNA verimi açısından geride kalmış olsa da kalitesi yüksek ortamda bekletme ve

DNA'nın denatürasyonuna neden olan kaynatma gibi süreçler içermediği için izole edilen DNA hem kalitesi hem de saflık derecesi PCR, hibridizasyon ve klonlama gibi uygulamalar için uygundur. Tuzla çöktürme yöntemine alternatif olarak PCR başarısı açısından benzer sonuçlar veren silika-kolon tabanlı ticari kit bu çalışmada karşılaştırma amacıyla kullanılmıştır. Üreticinin protokolünde inkübasyon zamanı gibi bazı basamaklar değiştirilerek uygulanan yöntem maliyet açısından tuzla çöktürme ve diğer yöntemlere göre oldukça pahalıdır. Ayrıca fenol-kloroform, Chelex-100 ve ısı şok yöntemleriyle karşılaştırıldığında izole edilen DNA miktarı kolondan geri kazanıma bağlı olarak oldukça düşük düzeydedir.

Sonuç olarak, böcekler oldukça çeşitli ve yer yüzünün hakim türleridir. Bu nedenle ekosistemde üstlendikleri rollere bağlı olarak, yalnızca temel bilimlerin değil biyoteknoloji, adli tıp, tarım, ziraat, tıp ve veterinerlik gibi uygulamalı bilimlerinde araştırma konuları içerisinde yer almaktadır. Günümüzde DNA barkodlama ile türlerin teşhisi, sessiz süreçlerde rol alan enzimleri kodlayan genlerin belirlenmesi, türlerin evrimsel tarihi, populasyonların genetik

yapısı, hastalık etkenlerinin izlenmesi ve hatta jeolojik olayların aydınlatılması araştırılmaktadır. Bu nedenle DNA dizi verisinin oluşturulmasında ilk adım olan DNA izolasyonunda, etkin ve kullanışlı bir yöntemin seçilmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada dokuz farklı yöntemden PCR başarısı açısından karşılaştırmalar yapılmış ve bütün yöntemlerin mitokondriyal genoma ait bölgenin çoğaltımında başarılı olduğu, ancak çekirdek genoma ait bölgenin çoğaltımında ise tüm yöntemlerin başarılı sonuç vermediği tespit edilmiştir. Hem mitokondriyal hem de çekirdek genomuna ait bölgelerin PCR ile çoğaltımında ise fenol-kloroform, tuzla çöktürme ve kolon tabanlı ticari kit yöntemlerinin başarılı sonuç verdiği gösterilmiştir. Maliyet ve kullanılan kimyasalların toksisitesi göz önüne alındığında ise tuzla çöktürme yönteminin böcek dokularından DNA izolasyonu için en uygun yöntem olduğu yorumlanmıştır.

Teşekkür: Bu çalışma kapsamında özel bir destek alınmamıştır. Gamze KOÇAK ve Zeliha GÜLER çalışmanın laboratuvar aşamalarında katkı sağlamışlardır.

Kaynaklar

- Aljanabi SM, Martinez I (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research* 25: 4692–4693.
- Asghar U, Malik MF, Anwar F, Javed A, Raza A (2015). DNA Extraction from Insects by Using Different Techniques: A Review. *Advances in Entomology* 3: 132–138.
- Biere A, Bennett AE (2013). Three-way interactions between plants, microbes and insects. *Functional Ecology* 27: 567–573.
- Carlton JM, Adams JH, Silva JC, Bidwell SL, Lorenzi H, Caler E, Crabtree J, Angiuoli S V, Merino EF, Amedeo P (2008). Comparative genomics of the neglected human malaria parasite *Plasmodium vivax*. *Nature* 455: 757–763.
- Carpenter JM, Carpenter JM, Wheeler WC, Wheeler WC (1999). Towards simultaneous analysis of morphological and molecular data in *Hymenoptera*. *Zoologica*: 251–260.
- Chen H, Rangasamy M, Tan SY, Wang H, Siegfried BD (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE* 5: e11963.
- Davey JL, Blaxter MW (2010). RADseq: Next-generation population genetics. *Briefings in Functional Genomics* 9: 416–423.
- Van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C (2014). Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics* 30: 418–426.
- Furlong MJ (2015). Knowing your enemies: Integrating molecular and ecological methods to assess the impact of arthropod predators on crop pests. *Insect Science* 22: 6–19.
- Gutiérrez-López R, Martínez-de la Puente J, Gangoso L, Soriguer RC, Figuerola J (2015). Comparison of manual and semi-automatic DNA extraction protocols for the barcoding characterization of hematophagous louse flies (Diptera: Hippoboscidae). *Journal of Vector Ecology* 40: 11–15.
- Hebert PDN, Ratnasingham S, deWaard JR (2003). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 270 Suppl: S96–S99.
- Ji YJ, Zhang DX, He LJ (2003). Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes* 3: 581–585.
- Juen A, Traugott M (2005). Detecting predation and scavenging by DNA gut-content analysis: A case study using a soil insect predator-prey system. *Oecologia* 142: 344–352.
- Korkmaz EM, Budak M, Orgen SH, Bagda E, Gencer L, Ulgenturk S, Basibuyuk HH (2010). New records and a checklist of Cephidae (Hymenoptera: Insecta) of Turkey with a short

- biogeographical consideration. *Turkish Journal of Zoology* 34: 203–211.
- Korkmaz EM, Lunt DH, Çıplak B, Değerli N, Başbüyük HH (2014). The contribution of Anatolia to European phylogeography: the centre of origin of the meadow grasshopper, *Chorthippus parallelus*. *Journal of biogeography* 41: 1793–1805.
- Kress WJ, García-Robledo C, Uriarte M, Erickson DL (2015). DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 30: 25–35.
- Mardis ER (2017). DNA sequencing technologies: 2006–2016. *Nature Protocols* 12: 213–218.
- Misof B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A et al. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* 346: 763–767.
- Rosenfeld J, Fook J, DeSalle R (2015). Insect genome content phylogeny and functional annotation of core insect genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 97: 224–232.
- Shanower TG (2008). History of biological control of wheat stem sawflies (Hymenoptera: Cephidae). In: Capinera J (Ed), *Encyclopedia of Entomology*, Springer, Netherlands, s. 1826–1829.
- Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H, Flook P (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651–701.
- Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, Truett AA, Walker JA, Warman ML (2000). Preparation of PCR-quality mouse genomic dna with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *BioTechniques* 29: 52–54.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506–513.
- Wingfield MJ, Klein H (2012). DNA extraction techniques for DNA barcoding of minute gall-inhabiting wasps. *Molecular Ecology Resources* 12: 109–115.

Deri Endüstrisinde Kullanılan Metilizotiazolinon İçeren Antimikrobiyal Maddenin Referans Suşlar Üzerine Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

Pınar ÇAĞLAYAN

Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, İSTANBUL

*e-mail: pinar.caglayan@marmara.edu.tr

Öz: Deri endüstrisinde tuzlanmış deriye kaybettiği suyun geri kazandırılması, derinin yumuşatılması, derideki tuzun, kanın, gübrenin, pisliğin ve mikroorganizmaların uzaklaştırılması amacıyla ıslatma işlemi uygulanmaktadır. Islatma işlemi bakterilerin gelişmesi için oldukça uygun bir ortam olup, bu süreçte derilerde önemli hasarlar meydana gelmektedir. Islatılmış deriler antimikrobiyal maddelerle muamele edilmesine rağmen, bu derilerin kalitesini olumsuz etkileyebilecek gram-pozitif ve gram-negatif bakterileri içerdikleri bilinmektedir. Antimikrobiyal maddelerin az ve rastgele kullanılması bu bakterilerin sayılarının kontrol edilmesinde yetersiz kaldığı gibi, fazla kullanılması da antimikrobiallere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Uygun antimikrobiyal madde seçimi derilerde bakterilerden kaynaklanan zararın önlenmesi açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle, deri endüstrisinde kullanılan bir antimikrobiyal maddenin referans bakteri suşlarına karşı uygulanması ve minimum inhibisyon konsantrasyonunun araştırılması, deri işleni basamaklarında deriye zarar verebilecek bakterilerin üzerine bu antimikrobiyal maddenin etkinliğinin belirlenmesi açısından önemli bilgi verecektir. Bu çalışmada gram-negatif ve gram-pozitif referans suşları ve bunların karışık kültürü üzerine metilizotiazolinon içeren antimikrobiyal maddenin onsekiz farklı konsantrasyonu uygulanarak minimum inhibisyon konsantrasyonu agar dilüsyon metodu ile araştırılmıştır. Minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Micrococcus luteus* ATCC9341, ve tüm test bakterilerinin karışık kültürü için 5000 µg/ml; *Escherichia coli* ATCC25922 için 1250 µg/ml; *Bacillus cereus* ATCC11778 için 156 µg/ml; *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 ve *Enterococcus faecalis* ATCC29212 için 39 µg/ml; ve *Bacillus subtilis* ATCC6633 için ise 9.76 µg/ml olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, test edilen antimikrobiyal maddenin sekiz farklı referans suşun ve bunların karışık kültürünün gelişimlerini inhibe ettiği ve etki spektrumunun geniş olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal madde, Gram-pozitif bakteri, Gram-negatif bakteri, Minimum inhibisyon konsantrasyonu

Minimum Inhibition Concentration of an Antimicrobial Agent Containing Methylisothiazolinone Used in Leather Industry Against Reference Strains

Abstract: In leather industry soaking process is applied to salted hides and skins in order to rehydrate, to soften, to remove the salt, blood, dung, dirt and microorganisms. The soaking process is a favorable environment for bacterial growth, and during this process significant damage occurs on the hides and skins. It is known that soaked hides/skins contain Gram-positive and Gram-negative bacteria, which can adversely affect hide/skin quality even though they are treated with antimicrobial agents. Insufficient and random use of antimicrobial agents is inadequate in controlling the numbers of these bacteria, and excessive use of them also leads to the emergence of antimicrobial-resistant bacteria. The choice of appropriate antimicrobial agent is very important in preventing damage caused by bacteria found on the hides. Therefore, application of methylisothiazolinone-containing antimicrobial agent used in the leather industry against reference bacterial strains and investigation of the minimum inhibitor concentration will provide important information on the effectiveness of this antimicrobial agent on bacteria that may be harmful to hides in leather processing. In the present study, the eighteen different concentration of antimicrobial agent containing methylisothiazolinone were applied against Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC25922) and Gram-positive (*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Bacillus cereus* ATCC11778, *Bacillus subtilis* ATCC6633) reference strains and their mixed culture. The minimum inhibitor concentrations were determined using agar dilution method. The minimum inhibitor concentrations of antimicrobial agent were found as 5000 µg/ml for *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC29213, *Micrococcus luteus* ATCC9341,

mixed culture of test bacteria; 1250 µg/ml for *Escherichia coli* ATCC25922; 156 µg/ml for *Bacillus cereus* ATCC11778; 39 µg/ml for *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 and *Enterococcus faecalis* ATCC29212; and 9.76 µg/ml for *Bacillus subtilis* ATCC6633. As a result, it was determined that the tested antimicrobial agent inhibited the growth of eight different reference strains and their mixed culture, and that spectrum of action was broad.

Keywords: Antimicrobial agent, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, Minimum inhibition concentration

1. Giriş

Dericilik sektörü ülkemizde son yıllarda gelişme göstererek Türkiye'nin önemli sektörleri arasında yerini almıştır. Tuzlanmış ve ıslatılmış deriler kesim, istifleme, depolama ve taşıma sırasında, üzerlerinde bulunan bakterilerin gelişimini ve bu bakterilerin deriye verebilecekleri zararları önlemek amacıyla tuz, borik asit ve çeşitli antimikrobiyal maddelerle korunmaktadır (Adminis ve Money, 2003). Deriler çeşitli yöntemlerle korunduğu halde, hayvan kesildikten sonra hayvanın vücudundan, havadan, sudan, kesimhaneden, dışkıdan, topraktan, dış ortamdan bulaşan gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler kendileri için ideal bir besin ortamı olan deride gelişmektedir (Newton ve ark., 1977; Antic ve ark., 2010). Araştırmacılar bu durumun derinin yapısının bozulmasına, deride sırça zararına, kıl dökülmesine, kötü koku oluşumuna yol açtığını saptamışlardır (Haines, 1984; Bailey ve Birbir, 1993). Daha önce yapılan çalışmalarda çeşitli gram-pozitif, gram-negatif bakteri türleri tuzlanmış ve ıslatılmış hayvan derilerinden izole edilmiştir (Berber ve Birbir, 2010; Aslan ve Birbir 2011; Aslan ve Birbir 2012; Akpolat ve ark., 2015; Çağlayan ve ark., 2015; Ulusoy ve Birbir, 2015; Birbir ve Yazıcı, 2016).

Kaliteli deri üretiminin deri endüstrisindeki ekonomik öneme sahip olması sebebiyle bu çalışmada deri sektöründe kullanılan metilizotiazolinon içeren antimikrobiyal maddenin farklı konsantrasyonları sekiz farklı referans bakteri suşlarına ve bunların karışık kültürlerine karşı uygulanmıştır. Her bir bakteri türüne ve bu bakterilerin karışık kültürüne karşı test antimikrobiyalinin minimum inhibisyon konsantrasyonu ayrı ayrı araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler, deri işleni basamaklarında deriye zarar verebilecek gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin üzerine bu antimikrobiyal maddenin etkin olduğu konsantrasyonun belirlenmesi ve gereksiz kimyasal kullanımının önlenmesi açısından önemli katkıda bulunacaktır.

2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada metilizotiazolinon içeren ve deri endüstrisinde ıslatma işleminde kullanılan test antimikrobiyalinin gram-negatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 ve *Escherichia coli* ATCC25922) ve gram-pozitif (*Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *S. aureus* ATCC29213, *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Bacillus cereus* ATCC11778 ve

B. subtilis ATCC6633) referans suşları ve bunların karışık kültürünü inhibe ettiği Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri agar dilüsyon test metodu ile araştırılmıştır (Anonymous, 2000; Wiegand ve ark., 2008). Antimikrobiyalın 18 farklı konsantrasyonu (10000 µg/ml, 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml, 625 µg/ml, 312

µg/ml, 156 µg/ml, 78 µg/ml, 39 µg/ml, 19.5 µg/ml, 9.76 µg/ml, 4.88 µg/ml, 2.44 µg/ml, 1.22 µg/ml, 0.6 µg/ml, 0.3 µg/ml, 0.15 µg/ml ve 0.07 µg/ml) hazırlanarak 19 ml agarlı Nutrient besiyerine Çizelge 1’de gösterildiği şekilde ilave edilmiştir.

Çizelge 1. Farklı konsantrasyondaki antimikrobiyal maddenin hazırlanması

| İlk konsantrasyon (µg/ml) | Stok (ml) | Distile su (ml) | 19 ml besiyerinin ilavesinden önceki konsantrasyon (µg/ml) | 19 ml besiyerinin, 1 ml antimikrobiyal maddenin üzerine ilavesinden sonra son konsantrasyon (µg/ml) |
|---------------------------|-----------|-----------------|--|---|
| 200.000 | 2 | 0 | 200.000 | 10.000 |
| 200.000 | 2 | 2 | 100.000 | 5000 |
| 200.000 | 1 | 3 | 50.000 | 2500 |
| 50.000 | 2 | 2 | 25.000 | 1250 |
| 50.000 | 1 | 3 | 12.500 | 625 |
| 50.000 | 1 | 7 | 6250 | 312 |
| 6250 | 2 | 2 | 3125 | 156 |
| 6250 | 1 | 3 | 1562.5 | 78 |
| 6250 | 1 | 7 | 781.25 | 39 |
| 781.25 | 2 | 2 | 390.63 | 19.5 |
| 781.25 | 1 | 3 | 195.31 | 9.76 |
| 781.25 | 1 | 7 | 97.66 | 4.88 |
| 97.66 | 2 | 2 | 48.83 | 2.44 |
| 97.66 | 1 | 3 | 24.41 | 1.22 |
| 97.66 | 1 | 7 | 12.21 | 0.6 |
| 12.21 | 2 | 2 | 6.10 | 0.3 |
| 12.21 | 1 | 3 | 3.05 | 0.15 |
| 12.21 | 1 | 7 | 1.53 | 0.07 |

Stok Antimikrobiyal Madde Solüsyonunun Hazırlanması
Metilzotiazolinon içeren antimikrobiyal maddeden 200.000 mg tartılarak 1000 ml steril distile su ile karıştırılmıştır.

0.5 Nolu McFarland Bulanıklık Standardının Hazırlanması
5 ml 1 Nolu McFarland bulanık tüpündeki çözeltinin üzerine 5 ml distile su eklenerek hazırlanmıştır (Bilgehan, 2004).

1 Nolu McFarland Bulanıklık Standardının Hazırlanması
0.18 M’lık H₂SO₄’ten 9.9 ml alınarak, 0.1 ml 0.048 M’lık BaCl₂ ile karıştırılmıştır (Bilgehan, 2004).

%0.85 NaCl İçeren Nutrient Agar Besiyerinin Hazırlanması
20 g Nutrient Agar, 8.5 g NaCl tartılarak 1000 ml distile su ile karıştırılmıştır. Besiyerinin pH’ı 7.0’ye ayarlandıktan sonra 121°C’de 20 dakika otoklavda steril edilmiştir.

gram-negatif ve gram-pozitif referans suşlarına ait saf koloniler alınarak ayrı ayrı Nutrient Agar besiyerine ekilmiş ve petri kapları 37°C'de 24 saat etüvde bekletilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra koloni oluşturma birimi (kob) hesaplanması için her bir bakterinin 0.5 McFarland bulanıklık tüpüne göre (10^8 kob/ml) ayrı ayrı bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır. Her bir referans suşun süspansiyonlarından 1 ml alınarak, 9 ml steril fizyolojik tuzlu su ile karıştırılmıştır. Toplam bakteri yoğunluğu her bir suş için 10^7 kob/ml olmuştur. Ayrı ayrı hazırlanan bu bakteri solüsyonlarından 1 ml alınarak steril bir tüpte karıştırılmıştır ve bakterilerin karışık kültürü (10^7 kob/ml) yapılmıştır (Hammer ve ark., 1999; Anonymous, 2000). Toplam bakteri yoğunluğu 10^7 kob/ml olan solüsyonlardan ayrı ayrı 1 µl alınarak (10^4 kob/damla) petrideki besiyerine konulmuştur. Etüvde 37°C'de 24

saat bekletilerek test antimikrobiyalinin MİK değerleri saptanmıştır (Anonymous, 2000).

3. Sonuçlar

Pseudomonas aeruginosa ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 ve *Micrococcus luteus* ATCC9341 için MİK değeri 5000 µg/ml bulunmuştur (Çizelge 2). *Escherichia coli* ATCC25922 için MİK değeri 1250 µg/ml bulunmuştur (Çizelge 2). *Bacillus cereus* ATCC11778 için MİK değeri 156 µg/ml iken, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228 ve *Enterococcus faecalis* ATCC29212 için 39 µg/ml olarak bulunmuştur. *Bacillus subtilis* ATCC6633 için MİK değeri ise 9.76 µg/ml olarak hesaplanmıştır (Çizelge 2). Test antimikrobiyalinin farklı konsantrasyonları sekiz adet referans suşun karışık kültürü üzerine uygulandığında MİK değeri 5000 µg/ml olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Amerikan tipi kültür koleksiyonu referans bakteri suşlarının üzerine metilizotiazolinon içeren antimikrobiyal maddenin farklı konsantrasyonlarının minimum inhibitör konsantrasyonları

| | Son Konsantrasyon (µg/ml) | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC29213 | <i>Micrococcus luteus</i> ATCC9341 | <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC29212 | <i>Escherichia coli</i> ATCC25922 | <i>Bacillus cereus</i> ATCC11778 | <i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633 | Karışık kültür |
|----|---------------------------|---|---|--|------------------------------------|--|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 1 | 10.000 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 5000 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 3 | 2500 | + | - | + | + | - | - | - | - | + |
| 4 | 1250 | + | - | + | + | - | - | - | - | + |
| 5 | 625 | + | - | + | + | - | + | - | - | + |
| 6 | 312 | + | - | + | + | - | + | - | - | + |
| 7 | 156 | + | - | + | + | - | + | - | - | + |
| 8 | 78 | + | - | + | + | - | + | + | - | + |
| 9 | 39 | + | - | + | + | - | + | + | - | + |
| 10 | 19.5 | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| 11 | 9.76 | + | + | + | + | + | + | + | - | + |
| 12 | 4.88 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 13 | 2.44 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 14 | 1.22 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 15 | 0.6 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 16 | 0.3 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 17 | 0.15 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 18 | 0.07 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |

+ : üreme var, - : üreme yok

4. Tartışma

Daha önceki çalışmalarda *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* ve *Staphylococcus* cinslerine ait olan bakterilerin ıslatma sıvılarından izole edildiği bildirilmiştir (Pfleiderer ve Reiner, 1988; Yapıcı ve Yapıcı, 2002; Rangarajan ve ark., 2003; Yapıcı ve ark., 2004). Ayrıca *Bacillus cereus*, *B. laterosporus*, *B. liquefaciens*, *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. pumilus*, *Micrococcus* spp. ve *Pseudomonas aureginosa* türleri de ıslatma sıvılarından izole edilmiştir (Birbir ve Ilgaz, 1996; Orlita, 2004). Diğer bir çalışmada, % 0.4 ticari bakterisit ile ıslatılmış koyun derilerinde proteolitik, lipolitik ve sporlu bakteriler tespit edilmiştir (Bilgi ve

ark., 2009). Berber ve ark. (2010), aktif içeriği didesildimetilamonyum klorür olan antimikrobiyal maddenin ıslatma sıvılarında 0.4 g/l'lik konsantrasyonda uygulandığı bir tabakhaneden ıslatma sıvısı örnekleri almıştır. Bu sıvı örneklerinde yüksek sayıda proteolitik (10^4 - 10^7 kob/ml) ve lipolitik (10^2 - 10^6 kob/ml) bakterilerin varlığı saptanmıştır. Bu tabakhanelerde önerilen 0.4 g/l'lik kullanım konsantrasyonu iki katına (0.8 g/l) çıkarıldığında dahi ıslatma sıvısı içinde proteolitik (10^3 kob/ml) ve lipolitik (10^3 - 10^4 kob/ml) bakterilerin saptandığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Berber ve ark., 2010). Araştırmacılar, bu ıslatma sıvısı örneklerinden *Bacillus mycooides*, *B. lentus*, *B.*

amyloliquefaciens, *Enterobacter gergoviae*, *E. sakazakii*, *E. amnigenus* biogrup I, *E. cloacae*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. luteola*, *P. putida*, *Enterococcus avium*, *E. faecium*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Aerococcus viridans*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. cohnii* ssp. *urealyticus*, *S. epidermidis*, *S. intermedius*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. cohnii* ssp. *cohnii*, *S. warneri*, *Kocuria varians* türleri izole edilerek tanımladıklarını bildirmişlerdir (Berber ve Birbir, 2010). Veyselova ve ark. (2013) ıslatma sıvılarında kullanılan % 12.5 didesil dimetil amonyum klorür ve % 12.5 benzil dimetil amonyum klorür içeren kuarternler amonyum bileşiğinin *Bacillus licheniformis*, *B. pumilus*, *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas luteola*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio fluvialis* ve *Enterococcus faecium* türleri üzerine ve bu bakterilerin karışık kültür üzerine ayrı ayrı etkisini araştırmıştır. Bileşiğin 2.97 g/l konsantrasyonunun 8 ve 24 saatlik uygulamalarında, 25°C ve 37°C sıcaklıkta bakteriler ve bunların karışık kültürleri tamamen inaktive edilmiştir (Veyselova ve ark., 2013). Birbir ve ark., (2015), aktif içeriği sodyum dimetilditiyokarbamat olan bir antimikrobiyalin minimal inhibisyon etkisini hem *Chromohalobacter israelensis*, *C. canadensis*, *Staphylococcus nepalensis*, *Halomonas halodenitrificans*, *H. halmophila* izolatları üzerine hem de bu izolatların karışık kültürü üzerine uygulayarak araştırmışlardır.

Araştırmacılar *Chromohalobacter israelensis*, *C. canadensis*, *Halomonas halodenitrificans*, *H. halmophila* ve bunların karışık kültürü için MİK değerini 15.6 µg/ml bulmuş iken, *Staphylococcus nepalensis* (KT1) için MİK değerini 0.96 µg/ml olarak bulduklarını bildirmişlerdir (Birbir ve ark., 2015). ıslatılmış sığır ve koyun derilerinde bulunan *Enterobacteriaceae* familyasını ait bakteri türleri Birbir ve Yazıcı (2016) tarafından detaylıca araştırılmıştır. Araştırmacılar, *Citrobacter freundii*, *C. koseri*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter amnigenus*, *E. cloacae*, *Kluyvera intermedia*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgerii* türlerini ıslatılmış koyun derilerinden, *Citrobacter koseri*, *Cronobacter sakazakii*, *Ewingella americana*, *Kluyvera intermedia*, *Morganella morganii*, *Providencia rettgerii*, *Serratia marcescens*, *S. plymuthica* ve *S. rubidae* türlerini ıslatılmış sığır derilerinden izole ettiklerini açıklamışlardır (Birbir ve Yazıcı, 2016). *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Staphylococcus epidermidis* ATCC12228, *S. aureus* ATCC29213, *Micrococcus luteus* ATCC9341, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Escherichia coli* ATCC25922, *Bacillus cereus* ATCC11778, *B. subtilis* ATCC6633 suşlarının üzerine ve bunların karışık kültürü üzerine metilizotiazolinon içeren antimikrobiyal maddenin minimum inhibisyon konsantrasyonlarının araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Sonuç olarak, ıslatma

işleminde etkili antimikrobiyal maddelerin önlemesi ve yüksek kaliteli deri üretimi uygun konsantrasyonda kullanımını, bu işlenti açısından oldukça önemlidir. basamağında bulunan bakterilerin gelişiminin

Kaynaklar

Adminis U, Money CA (2003). Short-term preservation of hides and skins. *Leather International* 26.

Akpolat C, Ventosa A, Birbir M, Sánchez-Porro C, Caglayan P (2015). Molecular identification of moderately halophilic bacteria and extremely halophilic archaea isolated from salted sheep skins containing red and yellow discolorations. *J Am Leather Chem As* 110: 211–220.

Anonymous, EUCAST, European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (2000). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution, EUCAST Definitive Document E. Def 3.1, *Clinical Microbiology and Infection*, 6: 509–515.

Antic D, Blagojevic B, Ducic M, Nastasijevic I, Mitrovic R, Buncic S (2010). Distribution of microflora on cattle hides and its transmission to meat via direct contact. *Food Control* 21: 1025–1029.

Aslan E, Birbir M (2011). Examination of gram-positive bacteria on salt-pack cured hides. *J Am Leather Chem As* 106: 372–380.

Aslan E, Birbir M (2012). Examination of Gram-negative bacteria on salt-pack cured hides. *J Am Leather Chem As* 107: 106–115.

Bailey DG, Birbir M (1993). A study of the extremely halophilic microorganisms found on commercially brine-cured cattle hides. *J Am Leather Chem As* 88: 285–293.

Berber D, Birbir M (2010). Examination of bacterial populations in salt, salted hides, soaked hides and soak liquors. *J Am Leather Chem As* 105: 320–326.

Berber D, Birbir M, Hacıoğlu H (2010). Efficacy assesment of bactericide containing didecyldimethylammonium chloride on bacteria found in soak liquor at different exposure times. *J Am Leather Chem As* 11: 354–359.

Bilgehan H (2004). Clinical microbial identification. *Barış Yayınları*, Ankara, Türkiye.

Bilgi ST, Yapici BM, Yapici AN (2009). Determination of bacterial and fungal numbers in floats of pre-tanning operations. *Afr J Biotechnol* 8: 1602–1607.

- Birbir M, Ilgaz A (1996). Isolation and identification of bacteria adversely affecting hide and leather quality. *J Soc Leath Tech Ch* 80: 147–153.
- Birbir M, Ventosa A, Çağlayan P (2015). Characterization of moderately halophilic bacteria found on the sheep and goat skins. *The Scientific Research Project Commission of Marmara University*, Project number FEN-C-DRP-040712-0281.
- Birbir M, Yazıcı E (2016). Isolation and identification of bacterial species belonging to family *Enterobacteriaceae* on soaked hide and skin samples and determination of their antibiotic susceptibilities to different antibiotics. *The Scientific Research Project Commission of Marmara University*, Project number FEN-C-YLP-041213-0456.
- Çağlayan P, Birbir M, Ventosa A, Sánchez-Porro C (2015). Characterization of moderately halophilic bacteria from the salt-pack cured hides. *J Soc Leath Tech Ch* 5: 250–254.
- Haines MB (1984). Quality rawstock. *J Am Leather Chem As* 4: 164–173.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV (1999). Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol* 86: 985–990.
- Newton KG, Harrison JCL, Smith KM (1977). Coliforms from hides and meat. *J Appl Environ Microbiol* 33: 199–200.
- Orlita A (2004). Microbial biodeterioration of leather and its control: A review. *Int Biodeterior Biodegradation* 53: 157–163.
- Pfleiderer E, Reiner R (1988). Microorganisms in Processing of Leather in Biotechnology.
- Rangarajan R, Didato TD, Bryant S (2003). Measurement of bacterial populations in typical tannery soak solutions by traditional and new approaches. *J Am Leather Chem As* 98: 477–485.
- Ulusoy K, Birbir M (2015). Identification and metabolic activities of bacterial species belonging to the *Enterobacteriaceae* on salted cattle hides and sheep skins. *J Am Leather Chem As* 110: 86–199.
- Veyselova C, Birbir M, Berber D (2013). Minimal bactericidal concentration for a quaternary ammonium compound used in soak liquors. *J Soc Leath Tech Ch* 4(97): 166–171.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock REW (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc* 3: 163–175.
- Yapıcı AN, Yapıcı BM (2002). Deri işletmelerinde karşılaşılan mikrobiyal olaylar ve kullanılan mikrobisidler. *Teknik Bülten* 34.
- Yapıcı BM, Yapıcı AN, Karaboz İ, Tozan M (2004). Deri sektöründe kullanılan bazı bakterisitlerin etkinliğinin tespiti üzerine bir araştırma. *I. Ulusal Deri Sempozyumu*, İzmir, 7-8 Ekim.

Yumurtaya Verilen Siklofosfamid ve C Vitamini'nin Tavuk Embriyoları Üzerindeki Bazı Etkileri

Haluk ÖZPARLAK*, Bülent ÇELİK, Döndü BALTA

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KONYA

*e-mail: hozparlak@selcuk.edu.tr

Öz: Literatürdeki *in vivo* ve *in vitro* ortamda gerçekleştirilen pek çok genotoksisite-antigenotoksisite çalışmasında genotoksik bir madde olarak Siklofosfamid (CP) ve antigenotoksik bir madde olarak C vitamini (Askorbik Asit, AA) yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar alternatif bir mikronükleus testi olan tavuk yumurtası mikronükleus testinde (Hen's Egg Test for Analysis of Micronucleus Induction, HET-MN) de 50 µg/yumurta (50 µg/y) dozunda kullanılmaktadır. Bu çalışmayla 50 µg/y dozunda CP ve AA'nın tavuk embriyoları üzerindeki bazı etkilerinin ilk kez tespit edilmesi amaçlandı. Çalışma için dömlü tavuk yumurtalarından oluşan dört grup oluşturuldu. CP, AA, CP+AA birlikte ve steril bidistile su (kontrol olarak) gruplardaki yumurtaların hava kamarasına kuluçkanın 8. gününde enjekte edildi. Kuluçkanın 11. gününde her bir grubun ölü ve anormal embriyo oranları, malformasyon tipleri, canlı ve rölatif embriyo oranları tespit edildi. Ayrıca kemik gelişiminin belirlenebilmesi için embriyoların bir kısmı total olarak Alizarin Red-S yöntemiyle boyandı. Çalışma iki tekrarlı olarak gerçekleştirildi. İki denemenin sonucunun birbiriyle uyumlu olduğu tespit edildi. Sonuç olarak, test edilen dozda CP, AA ve CP+AA'nın önemli bir embriyotoksik veya teratojenik etki göstermediği ve embriyoların kemik gelişimini makroskobik düzeyde etkilemediği belirlendi.

Anahtar kelimeler: Alizarin Red-S, Askorbik asit, Siklofosfamid, Tavuk Embriyosu

Some Effects of Cyclophosphamide and Vitamin C Given *in ovo* on Chicken Embryos

Abstract: In the literature, Cyclophosphamide (CP) as a genotoxic substance and vitamin C (Ascorbic Acid, AA) as an antigenotoxic substance have been used extensively in many genotoxicity-antigenotoxicity studies conducted *in vivo* and *in vitro*, and these substances at doses of 50 µg/egg are also used in Hen's Egg Test for Analysis of Micronucleus Induction (HET-MN) which is an alternative micronucleus test. The aim of this study was to determine the some effects of CP and AA at 50 µg/egg dose on the development of chicken embryos for the first time. Four groups were formed from the fertilized hen's eggs. CP, AA and CP+AA together, and sterile bidistilled water (as a control) were injected into the air sac of eggs in groups at 8th day of incubation. Following parameters of each group were examined on 11th day of the incubation: rates of dead and abnormal embryo, malformation types, live and relative embryo weights. In addition, some of the embryos were totally stained with Alizarin Red-S method for bone development. Two trials were conducted in the study. The results of the two trials were compatible with each other. As a result, CP, AA and CP+AA together at the examined doses did not present significant embryotoxic and teratogenic effects on chick embryos. They also did not affect the bone development of chicken embryos at the macroscopic level.

Keywords: Alizarin Red-S, Ascorbic Acid, Cyclophosphamide, Chick Embryo

1. Giriş

Siklofosamid (Cyclophosphamide, CP), yaygın olarak kanser tedavisinde kullanılan güçlü bir ilaçtır. CP, akut ve kronik lösemi, meme kanseri, multiplemyeloma, lenfoma, romatoidartrit tedavisinde ve kemik iliği nakillerinde sıkça kullanılır (Kumar ve Kuttan, 2005; Senthilkumar ve ark., 2006). Kemoterapiyle kanser tedavisinde, neoplastik hastalık sürecini yavaşlatmak, durdurmak ya da geriletme amacıyla antineoplastik ilaç kullanılmaktadır. Bununla birlikte kanser tedavisinde kullanılan antineoplastik ilaçların bazılarının kansere neden olduğu gerek insanlar üzerinde yapılan gözlemler gerekse hayvan deneylerinde kanıtlanmıştır (Fairchild ve ark., 1979; Kinlen ve ark., 1981; Ehrenfried ve ark., 1997; Furuta ve ark., 2000; Watanabe ve ark., 2001). Antineoplastik ilaçların en fazla kanserojenik olanları alkilleyici tipte olanlarıdır. CP alkilleyici (hızlı hücre bölünmesi geçiren dokularda hücre bölünmesini DNA üzerindeki alkilleyici etkisi sayesinde sekteye uğratan) bir antineoplastik (kansere ya da tümöre engelleyici) bir ilaçtır (Perini ve ark., 2008). CP meme kanseri, lenf sistemi kanseri, çocukluk çağı akut lenfoblastik lösemi gibi hastalıkların tedavisinde tek başına ya da diğer antineoplastik ajanlarla birleştirilerek kullanılmaktadır. CP bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde veya organ nakli sonrası organ reddini kontrol etmede de kullanılmaktadır (Ataya ve ark., 1989). Literatürde *in vivo* ve *in vitro* ortamda

gerçekleştirilen pek çok genotoksisite çalışmasında pozitif kontrol gruplarında genotoksik madde olarak yüksek dozda CP yaygın bir şekilde kullanılmıştır (Bramwell ve ark., 1987; Blom ve ark., 1995; Moore ve ark., 1995; Wolf ve Luepke, 1997; Campana ve ark., 1999; Wolf ve ark., 2002; Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2003; Wolf ve ark., 2003; Çavaş ve Ergene-Gözükara, 2005; Özparlak, 2006, Çavaş ve Könen, 2007; Özparlak ve ark., 2011).

C vitamini (Askorbik asit, AA) suda çözünen ve vücudumuzda depolanamayan bir vitamin çeşididir. Yapılan çalışmalar C vitamininin antijenotoksik ve antioksidan olduğunu göstermektedir (Kaya ve ark., 2002; Surjyo ve Anisur, 2004). C vitamini yapısı itibarıyla reaktif bir özelliğe sahiptir. Bu özelliği sayesinde oksidan maddelerin olumsuz etkilerinden DNA, RNA, protein ve lipidleri korur yani AA serbest radikallerin olumsuz etkilerini çeşitli yollarla ortadan kaldırır (Hartman ve Shankel, 1990). AA suda kolay çözünme avantajından ve bilinen bir antioksidan olduğundan literatürde de *in vivo* ve *in vitro* ortamda gerçekleştirilen pek çok çalışmada antijenotoksik madde olarak kullanılmıştır (Goncharova ve Kuzhir 1989; Guha ve Khuda-Bukhsh, 2002; Kaya, 2003; Premkumar ve Bowlus, 2003; Ahmad ve Afzal, 2004; Surjyo ve Anisur, 2004; Ural ve ark., 2005; Landino ve ark., 2006; Guha ve ark., 2007; Könen, 2007; Akpolat ve ark., 2008; Jiraungkoorskul ve ark., 2010).

Gelişen teknoloji ile birlikte kullanımı sürekli artan ilaç, endüstriyel bileşik, pestisit ve gıda katkı maddelerinin teratojenik, mutajenik ve genotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla çok çeşitli testler uygulanmaktadır. Bu testler içinde en sık kullanılanlardan bazıları kanatlı embriyolarının kullanıldığı testlerdir. Kanatlı embriyolarıyla yapılan son yıllardaki bir çalışmada kuluçkalık dömlü tavuk yumurtalarındaki embriyoların perifer kan eritrositlerinde mikronukleus (MN) oluşumu tanımlanmış ve tavuk yumurtası mikronukleus testi (Hen's Egg Test for Micronucleus Induction, HET-MN) olarak adlandırılan yöntem geliştirilmiştir (Wolf ve Luepke, 1997). Alternatif bir MN test sistemi olan HET-MN basit, ucuz ve hızlı bir yöntem olup daha sonra Wolf ve ark. (2002) ve Wolf ve ark. (2003) tarafından modifiye edilmiş ve geliştirilmiştir. HET-MN kullanılarak yapılan tüm çalışmalarda (Wolf ve Luepke, 1997; Wolf ve ark., 2002; Wolf ve ark., 2003; Özparlak, 2006; Wolf ve ark., 2008; Greywe ve ark., 2012) bu test için pozitif kontrol grubunda genotoksik madde olarak en ideal 50 µg/yumurta (µg/y) dozunda CP kullanılması ideal olduğu rapor edilmiş ve kullanılmıştır. Tavuk embriyolarına kuluçkanın 8. gününde enjekte edilen bu dozdaki CP kuluçkanın 11. gününde embriyoların perifer kan eritrositlerinde %1.24 oranında MN oluşumuna sebep olmaktadır (Wolf ve ark., 2008). Ayrıca Çelik (2016) ve Balta (2017) HET-MN kullanarak yaptıkları çalışmalarda bu test için antigenotoksik madde grubunda 50 µg/y dozunda AA kullanımının

ideal olduğunu, bu dozdaki AA'nın MN oranını azalttığını rapor etmişlerdir. Bahsedilen literatürler ışığında bu çalışmayla 50 µg/y dozunda CP ve AA'nın tavuk embriyoları üzerindeki olası embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin ilk kez ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve Metod

Çalışmada ticari bir işletmeden temin edilen kahverengi renkte ATAK-S cinsi damızlıklara ait toplam 90 adet dömlü kuluçkalık özelliklerde yumurta kullanıldı. İki tekrarlı gerçekleştirilen çalışmada, birinci denemede 50 adet ve ikinci denemede 40 adet yumurta kullanıldı. Her bir deneme için Kontrol (su), CP (50 µg/y), AA (50 µg/y) ve CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) olmak üzere dört grup oluşturuldu. Gruplardaki yumurtalar önce tartıldı ve ağırlıkları kaydedildi. Kuluçka işlemine başlamadan önce %70'lik etanolle kuluçka makinesi dezenfekte edilip yumurtalar kuluçka makinesine uygun konumda yerleştirildi. Kuluçka gelişim makinesine (Cimuka-Prodi HB500S) sıcaklık 37.7°C'ye, nispi nem %55'e ve her saat başı yumurtalar bir kez 180° çevrilecek şekilde gerekli ayarlamalar yapılarak kuluçka işlemi başlatıldı.

Kuluçkanın 8. gününde önceden steril şartlarda hazırlanan ve 4°C'de saklanan test solüsyonlarıyla steril şartlar altında enjeksiyon işlemleri gerçekleştirildi. Enjeksiyon işlemi yapılmadan yaklaşık 12 saat önce hava kamaralarının uygun pozisyon alması amacıyla çevirme işlemi durdurularak yumurtaların küt

ucu yukarı gelecek şekilde dik pozisyona getirildi. Yumurtaların küt uçları enjeksiyon yapılmadan önce %96'lık etanollü pamukla dezenfekte edildi ve yumurta delicisi yardımıyla hava kamarasına delikler açılarak enjeksiyon işlemlerine geçildi. Kontrol (su) grubundaki yumurtalara 60 µl hacminde steril bidistile su; CP (50 µg/y) grubundaki yumurtalara 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP (Sigma-C0768); AA (50 µg/y) grubundaki yumurtalara 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg AA (Applichem-A1052,250); CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) grubundaki yumurtalara 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg CP ve 60 µl hacminde steril bidistile suda çözdürülmüş 50 µg AA birlikte enjekte edildi. Enjeksiyon işlemi tamamlandığında daha önce açılan delikler hızlı bir şekilde sıvı parafinle kapatıldı. Enjekte edilen solüsyonların diffüze olabilmesi için ilk 1 saat yumurtalar hava kamarası yukarıda olacak biçimde dik pozisyonda bekletildi. Takiben yumurtalar kuluçka gelişim makinesine tekrar yerleştirilip kuluçka işlemine 11. güne kadar devam edildi.

Kuluçkanın 11. günü açılan yumurtalarda canlı ve ölü embriyoların gelişme evreleri Hamburger ve Hamilton (Hamburger ve Hamilton, 1951) skalasına (HH skalası) göre belirlendi. Canlı embriyolar hassas teraziyle tartıldı ve rölatif embriyo ağırlıkları (REA) aşağıda gösterilen formülle hesaplandı;

$$REA = \frac{\text{Embriyo ağırlığı}}{\text{Yumurtanın son ağırlığı}} \times 100$$

Elde edilen embriyolar malformasyonlar ve gelişme geriliklerinin belirlenmesi amacıyla %10'luk nötr formalinde 4°C'de saklandı. Bu embriyolarda kanat ve bacakların gelişmemesi, parmaklarda kıvrılma ve bükülmeler, tüylenmede anorallik, hemoraji, anormal gaga oluşumu, ödem, iç organların ters dönük dışarıda oluşu, tek ve çift göz anormalliği, boyun ve kalça defektleri, beyin dışarda gelişimi ve genel gelişim geriliği gibi çeşitli malformasyonların olup olmadığı öncelikle çıplak gözle daha sonra stereo mikroskopla belirlendikten sonra fotoğrafları çekildi. Her gruptan 2-3 adet embriyo kemik gelişiminin tespit edilmesi amacıyla total olarak Alizarin Red-S boyama metoduyla (Tamayo Arango ve ark., 2012) boyandı. Bu metoda göre; tespit edilmiş embriyolar bir gün %70'lik etanolde ve ardından bir gün %2'lik KOH'de bekletildikten sonra, %2'lik KOH'de taze olarak hazırlanmış %0.005-0.0025'lik Alizarin Red-S (Merc-106278) içerisinde kontrollü bir şekilde 1-2 gün süreyle boyandı. Embriyolar 1-2 gün tekrar %2'lik KOH'e alındı. Son olarak KOH (%2'lik)+gliserol+amonyak (1:1:1) karışımında 3-7 gün bekletilen embriyolar gliserole alınarak fotoğrafları çekildi.

Embriyolardan elde edilen sayısal verilere istatistiksel analiz (t-testi) uygulanmıştır.

3. Sonuçlar

Bu çalışmada kullanılan yumurtaların döllülük oranları Çizelge 1'de verilmiştir. Günlük yumurta ağırlık kaybı Kontrol gruplarında I. denemede %0.50 ve II. denemede ise %0.58 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1).

II. denemede tüm gruplarda canlılık oranı %100 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). I. denemede sadece CP (50 µg/y) grubundaki bir embriyoda erken embriyonik ölüm gözlenmiştir. Ancak bu ölüm enjeksiyon günü olan kuluçkanın 8. gününden çok önce gerçekleştiği için CP'nin etkisinden kaynaklanmayan bir ölüm olacağı düşünülmüş ve göz ardı edilmiştir. Dolayısıyla CP, AA ve CP+AA'nın test edilen dozlarda bir embriyonik ölüme sebep olmadığı ve tavuk embriyoları üzerinde embriyotoksik bir etki göstermediği tespit edilmiştir.

I. denemede canlı ve rölatif embriyo ağırlığı bakımından CP (50 µg/y), AA (50 µg/y) ve CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) gruplarıyla Kontrol grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir fark gözlenmemiştir (Çizelge 2). II. denemede ise sadece canlı embriyo ağırlığı bakımından AA (50 µg/y) grubunda Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlenmiş ($p<0.05$), ancak rölatif embriyo ağırlığı bakımından istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır (Çizelge 2). Canlı embriyo ağırlığındaki bu azalmanın sadece bir denemede gözlenmesi ve rölatif

embriyo ağırlığının daha güvenilir bir sonuç yansıtması C vitaminin önemli bir embriyotoksik etki göstermediğine işaret etmektedir. Ayrıca test edilen dozda CP ve CP ile AA'nın birlikte uygulanması da tavuk embriyoları üzerinde embriyotoksik bir etki göstermemiştir.

Malformasyonlar ve gelişme geriliklerini tespit etmek için çıplak gözle ve stereo mikroskop altında yapılan gözlemlere göre, II. denemede CP (50 µg/y) grubunda ve CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) grubunda birer embriyonun genel gelişim geriliği gösterdiği tespit edilmiştir. I. denemede ise herhangi bir anormal embriyo gözlenmemiştir (Şekil 1-4). Ayrıca iskelet sisteminin gelişim geriliklerini incelemek amacıyla Alizarin Red-S yöntemiyle boyanan embriyolar makroskopik olarak incelenmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığı zaman bahsedilen iki gruptaki genel gelişim geriliği gösteren iki embriyo dışında diğer gruplardaki embriyoların iskelet gelişiminde önemli bir geriliğe ve herhangi bir anormalliğe rastlanmamıştır. Kemik gelişimi normal embriyolara ait bir fotoğraf Şekil 5'de görülebilir. Bununla birlikte CP (50 µg/y) grubunda genel gelişim geriliği gösteren ve Alizarin Red-S yöntemiyle boyanan embriyonun kontrol grubuna kıyasla kısmen geri kalan kemik gelişimini gösteren bir fotoğraf Şekil 6'da görülebilir. Anormal embriyo oranları ve Alizarin Red-S boyama yöntemi sonuçları göz önüne alındığında; test edilen dozlarda CP, AA ve CP ile AA'nın birlikte uygulanmasının tavuk embriyoları üzerinde önemli bir teratojenik etkiye sahip olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 1. Kuluçkanın 11. gününe ait veriler ($\mu\text{g/y}$, mikrogram/yumurta; Ort \pm SS, ortalama \pm standart sapma)

| | Gruplar (Doz) | Gruptaki yumurta sayısı | Döllü yumurta sayısı | Döllülük oranı (%) | Yumurta başlangıç ağırlığı (g) (Ort \pm SS) | Kuluçkanın 11. gününde yumurta ağırlığı (g) (Ort \pm SS) | 11 günlük yumurta ağırlık kaybı (%) | Günlük yumurta ağırlık kaybı (%) |
|------------|---|-------------------------|----------------------|--------------------|---|--|-------------------------------------|----------------------------------|
| I. deneme | Kontrol (Su) | 12 | 10 | 83.33 | 59.95 \pm 2.56 | 56.63 \pm 2.72 | 5.54 | 0.50 |
| | CP (50 $\mu\text{g/y}$) | 13 | 13 | 100.00 | 61.67 \pm 3.18 | 57.17 \pm 3.41 | 7.30 | 0.66 |
| | AA (50 $\mu\text{g/y}$) | 12 | 9 | 75.00 | 60.83 \pm 3.33 | 53.25 \pm 6.24 | 7.13 | 0.65 |
| | CP (50 $\mu\text{g/y}$)+AA (50 $\mu\text{g/y}$) | 13 | 10 | 76.92 | 60.96 \pm 4.59 | 57.1 \pm 5.05 | 6.33 | 0.58 |
| II. deneme | Kontrol (Su) | 10 | 7 | 70.00 | 64.13 \pm 4.71 | 60.03 \pm 4.59 | 6.39 | 0.58 |
| | CP (50 $\mu\text{g/y}$) | 10 | 9 | 90.00 | 59.55 \pm 3.46 | 55.97 \pm 4.05 | 6.01 | 0.55 |
| | AA (50 $\mu\text{g/y}$) | 10 | 10 | 100.00 | 61.98 \pm 4.82 | 58.05 \pm 4.58 | 6.34 | 0.58 |
| | CP (50 $\mu\text{g/y}$)+AA (50 $\mu\text{g/y}$) | 10 | 8 | 80.00 | 61.35 \pm 3.84 | 56.60 \pm 3.85 | 7.74 | 0.70 |

Çizelge 2. Kuluçkanın 11. gününde embriyolara ait bazı veriler ($\mu\text{g/y}$, mikrogram/yumurta; Ort \pm SS, ortalama \pm standart sapma)

| | Gruplar (Doz) | Döllü yumurta sayısı | Canlı embriyo sayısı | Canlılık oranı (%) | Canlı embriyo ağırlığı (g) (Ort \pm SS) | Rölatif embriyo ağırlığı (%) (Ort \pm SS) | Anormal embriyo sayısı | Anormal embriyo oranı (%) |
|------------|---|----------------------|----------------------|--------------------|---|---|------------------------|---------------------------|
| I. deneme | Kontrol (Su) | 10 | 10 | 100 | 3.27 \pm 0.26 | 5.73 \pm 0.30 | 0 | 0 |
| | CP (50 $\mu\text{g/y}$) | 13 | 12 | 92.31 ^e | 3.30 \pm 0.18 | 5.75 \pm 0.50 | 0 | 0 |
| | AA (50 $\mu\text{g/y}$) | 9 | 9 | 100 | 3.07 \pm 0.30 | 5.60 \pm 0.51 | 0 | 0 |
| | CP (50 $\mu\text{g/y}$)+AA (50 $\mu\text{g/y}$) | 10 | 10 | 100 | 3.32 \pm 0.32 | 5.82 \pm 0.25 | 0 | 0 |
| II. deneme | Kontrol (Su) | 7 | 7 | 100 | 3.27 \pm 0.37 | 5.44 \pm 0.38 | 0 | 0 |
| | CP (50 $\mu\text{g/y}$) | 9 | 9 | 100 | 2.99 \pm 0.27 | 5.37 \pm 0.65 | 1 | 11.11 |
| | AA (50 $\mu\text{g/y}$) | 10 | 10 | 100 | 2.87 \pm 0.31* | 4.95 \pm 0.51 | 0 | 0 |
| | CP (50 $\mu\text{g/y}$)+AA (50 $\mu\text{g/y}$) | 8 | 8 | 100 | 3.01 \pm 0.38 | 5.36 \pm 0.87 | 1 | 12.50 |

* Kontrol (Su) grubuyla arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir (t-test. $p < 0.05$)

^e Bir embriyoda siklofosfamitten kaynaklanmayan erken bir embriyonik ölüm gözlenmiştir



Şekil 1. Kontrol (su) grubuna ait bir embriyonun görünümü

Şekil 2. CP (50 µg/y) grubuna ait bir embriyonun görünümü



Şekil 3. AA (50 µg/y) grubuna ait bir embriyonun görünümü

Şekil 4. CP (50 µg/y)+AA (50 µg/y) grubuna ait bir embriyonun görünümü



Şekil 5. Kontrol (su), CP (50 µg/y) ve AA (50 µg/y) gruplarına (soldan sağa doğru) ait kemik gelişimi normal embriyolar (Alizarin Red-S boyama).



Şekil 6. Kontrol (su) grubu (solda) ve CP (50 µg/y) grubuna (sağda) ait embriyolar. CP (50 µg/y) grubuna ait embriyoda kemik gelişiminin kısmen geri kaldığı dikkati çekmektedir (Alizarin Red-S boyama).

4. Tartışma

Günümüz toplumunda insanlar artan miktarlarda embriyotoksik ve teratojenik potansiyeli bilinmeyen ilaçlar, endüstri yan ürünleri ve çevre kirleticilerine maruz kalmaktadır. Bu tip kimyasal bileşiklerin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin sıçan veya fare gibi kemirgenler ya da tavşanlar üzerinde ayrıntılı olarak test edilmesi gerekir. Ancak her bir yeni kimyasal bileşiğin test edilmesi mümkün görülmemektedir. Bundan dolayı bir kimyasal bileşiğin memeli embriyosu üzerine etkilerini doğru bir şekilde tahmin edebilecek, ucuz ve hızlı alternatif tarama yöntemlerinin geliştirilmesi faydalı olacaktır. Bu amaca yönelik olarak memeli ve memeli olmayan hayvan türlerinin kullanıldığı çeşitli *in vivo* ve *in vitro* test sistemleri kullanılmaktadır. Literatürde kanatlı embriyoları özellikle de tavuk embriyoları kullanılarak değişik kimyasal bileşiklerin embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin belirlendiği çok sayıda araştırma mevcuttur. Bu çalışmaların uzun bir listesine Özparlak (2015)'den ulaşılabilir.

Jelinek (1977) dömlü tavuk yumurtası kullanarak Tavuk Embriyotoksisite Tarama Testini (Chicken Embryotoxicity Screening Test, CHEST) geliştirmiştir. Bu test CHEST-I (embriyotoksik doz sınırlarının belirlenmesi) ve CHEST-II (teratojenik parametrelerin tespiti) olmak üzere iki basamakta gerçekleştirilmektedir. CHEST'in yanı sıra dömlü tavuk yumurtası kullanılarak çeşitli modifikasyonlarla, Kemper ve Luepke (1986)

Tavuk Yumurtası Testini (Hen's Eggs Test, HET) ve Nishigori ve ark. (1992) ise Dömlü Tavuk Yumurtası Tarama Testini (Hen's Fertile Egg Screening Test, HEST) geliştirmişlerdir.

Yukarıda bahsedilen ve benzer diğer testler ucuz ve kolay olup tekrarlanabilir sonuçlar vermekte ve kısa sürede gerçekleştirilebilmektedir. Cıvciv embriyosunun gelişim safhalarının çok iyi bilinmesi önemli diğer avantajlarıdır. Çok sayıda cıvciv embriyosunun kullanılabilmesi toksisitenin istatistiksel açıdan değerlendirilmesinde memeli türlerle yapılacak çalışmalara karşı bir avantaj sağlamaktadır. Bu testler daha sonra memeliler üzerinde yapılacak çalışmalarda kullanılacak olan denek sayısını ve deneme sayısını azaltmakta, canlı bir organizmaya verilebilecek ağrı ve acıyı da en aza indirgeyerek, etik kurallara, yasal kısıtlamalara ve hayvan haklarına da aykırı düşmemektedir. Bununla birlikte tavuk embriyosu kullanılan bu modellerde plasenta ve memelilerdeki anne-fetüs ilişkisi olmaması, ayrıca bazı bileşiklerin nonspesifik bir hassasiyet göstererek hatalı pozitif sonuçlar verebilmesi dezavantajları olarak kabul edilmektedir. HET yöntemiyle ölüm oranının (LD₅₀), gelişme geriliğinin (yumurtadan çıkış ağırlığı, kemik uzunlukları ve organ ağırlıkları), teratojenitenin (iskelet gelişimi anormallikleri, makroskobik ve anatomik anormallikler), sistemik etkilerin (kan kimyasal parametreleri, hematolojik parametreler ve organ histopatolojisi) ve immünopatolojik

etkilerin (timus ve bursa Fabricii'nin histolojik yapıları) değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Özparlak, 2015).

Embriyotoksisite çalışmalarında kuluçka şartlarının optimum olması çalışmanın güvenilirliğini artırmaktadır. Kuluçka makinesinin nispi (%) neminin belirlenebilmesi için yumurtaların kabuklarındaki porlardan nemin buharlaşması sonucu kaybedilmesiyle oluşan ağırlık kaybı önemli bir ölçüttür. Kuluçka süresince günlük ortalama %0.55-0.70 aralığında ağırlık kaybı önerilmektedir (Mauldin, 1993). Birinci deneme kontrol grubumuzda %0.50, ikinci deneme kontrol grubunda %0.58 günlük ağırlık kaybı tespit edilmiştir ki bu oranlar önerilen değerlere yakındır ve kuluçka şartlarımızın optimum şartlara yakın olduğuna işaret etmektedir. Ayrıca Romanoff (1997) 10 günlük tavuk embriyolarının 2.26 g, 11 günlüklerin 3.68 g ve 12 günlük olanların 5.07 g ağırlığında olduğunu rapor etmiştir. Bu çalışmada ise birinci ve ikinci denemelerin kontrol gruplarında embriyo ağırlıkları ortalama 3.27 g olarak tespit edilmiştir. Rapor edilen değerlere yakın olmakla birlikte aradaki farklılık yumurta büyüklüğünden veya tavuk ırklarındaki farklılıklardan kaynaklanabilir.

Tavuk embriyolarıyla yapılan çalışmalarda enjeksiyonun zamanı ve bölgesi, kullanılacak test solüsyonunun hacmi, uygulanacak doz ve bu dozlar için kullanılacak tavuk yumurtalarının sayısı, kullanılacak çözücünün cinsi ve konsantrasyonu dikkat

edilmesi gereken önemli hususlardır (Özparlak, 2015). Tavuk yumurtalarıyla yapılan testlerde test edilecek maddenin verileceği yer hava kamarası, embriyonun kaudal bölgesi, albümin ve yumurta sarısı olabilmektedir. Bu yöntemler arasında en çok tercih edilen yöntem hava kamarasına yapılan enjeksiyon yöntemidir. Uygulamasının basit olması, solüsyonun hızlı ve homojen bir şekilde diffüze olması, yumurtaların enfekte olma olasılığının düşük olması, iç basıncın artmasına bağlı olarak embriyoda oluşması muhtemel mekanik hasarların tolere edilmesi açısından hava kamarasına enjeksiyon ideal yöntem olarak göze çarpmaktadır (Prelusky ve ark., 1987; Çelik ve ark., 2000; Sur, 2001; Öznurlu, 2003).

Enjeksiyon zamanı açısından bakıldığında ise test edilmek istenilen maddenin doğal formunun etkileri belirlenmek isteniyorsa erken dönemde enjeksiyon tercih edilmektedir. Test edilecek maddenin karaciğerde metabolize edilmesiyle oluşacak metabolitlerinin etkileri belirlenmek isteniyorsa enjeksiyonun daha geç dönemde tercih edilmesi gereklidir (Jelinek ve ark., 1985; Prelusky ve ark., 1987; Özcan, 1992). Çünkü tavuk embriyosunda embriyonik dönemin 4. gününde karaciğer farklılaşması gözlenmektedir. Bu dönemden itibaren karaciğer görevlerini yerine getirmeye başlar ve detoksifikasyon olayları başlamış olur (Hamilton ve ark., 1983). HET-MN yönteminde de solüsyonların kuluçkanın 8. gününde hava kamarasına enjekte edilmesi ve

kuluçkanın 11. gününde kan örnekleri alınması optimum olarak kabul edilmiştir (Wolf ve ark., 2002). Bu sebeple bu çalışmada da HET-MN yöntemine bağlı kalınarak kuluçkanın 8. gününde hava kamarasına enjeksiyon yöntemi kullanılmıştır.

Enjeksiyon işleminde kullanılacak solüsyonlar için 3-100 µl/y arasında değişen hacimlerde solüsyonlar kullanılsa da hava kamarasına yapılacak enjeksiyonlarla ilgili olarak; Çelik ve ark. (2000) kuluçka başlangıcında 20 µl'den daha yüksek hacimdeki solüsyonunun enjeksiyonunun iç basıncı artırmasıyla zararlı etkiler oluşturabileceğini ve bunun sonucunda test maddesinin etkisini maskeleyebileceğini bildirmiştir. Döllü tavuk yumurtalarıyla yapılan bir çalışmada hava kamarasına kuluçkanın 24., 48. ve 72. saatlerinde 50 µl hacimde solüsyon verilmiştir (Wytttenbach ve Thompson, 1985). Başka bir çalışmada ise kuluçkanın hemen başlangıcında ve 12. gününde 100 µl hacim tercih edilmiştir (Varga ve ark., 2002). Diğer pek çok çalışmada ise hava kamarasına kuluçkanın 12. gününde 100 µl hacminde enjeksiyon uygulanmıştır (Varga ve ark., 1999; Varnagy, 1999; Budai ve ark., 2001; Varnagy ve ark., 2001; Budai ve ark., 2002; Fejes ve ark., 2002). HET-MN'de ise hava kamarasına enjeksiyon yönteminde kuluçkanın 8. gününde hidrofilik özellikteki test maddeleri için 100 µl hacminde ve hidrofobik test maddeleri için 50 µl hacminde enjeksiyon uygulanmıştır (Wolf ve ark., 2002). Mekanik hasarların daha az etkili olmasından dolayı kuluçkanın ilerleyen

günlerinde çok daha yüksek solüsyon hacimleri tercih edilmektedir. Bu çalışmada da kuluçkanın 8. gününde enjeksiyon hacmi olarak embriyoların tolere edebileceği düşünülen 60 µl/y ve 60 µl/y+60 µl/y toplam 120 µl/y solüsyon hacimleri tercih edilmiştir.

Toksisite testlerinde bir maddeyi test etmek için farklı dozlarının denenmesi gerekir. Brown ve ark. (1986) denemelerde en az üç farklı dozun çalışılması gerektiğini belirtmişlerdir. Bununla birlikte bu çalışmada HET-MN yönteminde CP ve AA'nın genotoksik ve antigenotoksik madde olarak kullanıldığı 50 µg/y dozunun (Wolf ve ark., 2002) olası embriyotoksik ve teratojenik etkilerinin ortaya konması amaçlandığı için bu doz kullanılmıştır. Ayrıca çalışmanın güvenilirliğini artırmak için denemeler iki tekrarlı gerçekleştirilmiştir.

Tavuk yumurtalarıyla yapılan çalışmalarda her grup için Jelinek ve ark. (1985) 6-10 yumurta kullanmışlardır. HET-MN için de her grupta en az beş-altı yumurta kullanılmıştır (Wolf ve Luepke, 1997; Wolf ve ark., 2002). Bu çalışmada da denemelerimizde her grup için 10-13 yumurta kullanılmıştır.

Tavuk yumurtalarının kullanıldığı çalışmalarda test maddesinin uygun çözücüde çözünmesi oldukça önemlidir. Çözücü olarak %30'luk etanol, fizyolojik bidistile su, ayçiçeği yağı, %1'lik karboksimetilselüloz (CMC), %10'luk dimetilsülfoksit (DMSO) gibi maddeler kullanılmaktadır. Bu çalışmada da HET-MN'de kullanıldığı şekliyle CP ve AA

için en uygun steril bidistile su çözücü olarak kullanılmıştır.

Bu çalışmadaki her iki denemenin sonuçları birbirleriyle uyumlu bir şekilde göstermiştir ki, kuluçkanın 8. gününde dömlü yumurtaların hava kamarasına ayrı ayrı ve birlikte enjekte edilen 50 µg/y dozundaki CP ve AA, 11 günlük tavuk embriyoları üzerinde

önemli bir embriyotoksik ve teratojenik etki göstermemiştir. Dolayısıyla ilk kez CP ve AA'nın bu dozlarda genotoksik ve antigenotoksik madde olarak HET-MN testinde kullanılmasının embriyotoksikite ve teratojenite açısından olumsuz bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşılmıştır.

Kaynaklar

- Ahmad MS, Afzal M (2004). Amelioration of genotoxic damage by certain phytoproducts in human lymphocyte cultures. *Chemico-Biological Interactions* 149: 107–115.
- Akpolat M, Tarladaçalışır YT, Kanter M (2008). İyonizan radyasyonun neden olduğu ince bağırsak hasarına karşı curcumin ve C vitamininin koruyucu etkilerinin incelenmesi. *Tıp Araştırmaları Dergisi* 6: 77–85.
- Ataya KM, Valeriote FA, Ramahi-Ataya AJ (1989). Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary. *Cancer Research* 49: 1660–1664.
- Balta D (2017). Kültür *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst'ın genotoksik-antigenotoksik etkilerinin tavuk yumurtası mikronükleus testiyle belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, Konya.
- Blom J, Tamarkin L, Shiber J, Nelson R (1995). Learned immunosuppression is associated with an increased risk of chemically-induced tumors. *Neuroimmunomodulation* 2: 92–99.
- Bramwell VH, Mouridsen H, Santoro A, Blackledge G, Somers R, Verwey J, Dombernowsky P, Onsrud M, Thomas D, Sylvester R (1987). Cyclophosphamide versus ifosfamide: final report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology* 23: 311–321.
- Brown LP, Flint OP, Orton TC, Gibson GG (1986). Chemical teratogenesis: testing methods and the role of metabolism. *Drug Metabolism Reviews* 17: 221–260.
- Budai P, Fejes S, Várnagy L, Somlyay I, Takács I (2001). Teratogenicity test of dimethoate containing insecticide formulation and heavy elements (Cu, Cd) in chicken embryos after administration as single compounds or in combination. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)* 66: 885–889.

- Budai P, Fejes S, Várnagy L, Szabo R, Keserü M (2002). Embryonic toxicity of a dimethoate containing insecticide formulation and Cu-sulphate in chicken after individual or combined administration. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)* 67: 99–103.
- Campana MA, Panzeri AM, Moreno VcJ, Dulout FN (1999). Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 438: 155–161.
- Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2003). Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 538: 81–91.
- Çavaş T, Ergene-Gözükara S (2005). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquatic Toxicology* 74: 264–271.
- Çavaş T, Könen S (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22: 263–268.
- Çelik B (2016). Türkiye'deki yabancı *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst'ın genotoksik-antigenotoksik etkilerinin tavuk yumurtası mikronükleus testiyle belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi*, Konya.
- Çelik I, Oguz H, Demet O, Boydak M, Donmez H, Sur E, Nizamlioglu F (2000). Embryotoxicity assay of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *British Poultry Science* 41: 401–409.
- Ehrenfried JA, Ko TC, Thompson EA, Evers BM (1997). Cell cycle-mediated regulation of hepatic regeneration. *Surgery* 122: 927–935.
- Fairchild W, Spence C, Solomon H, Gangai M (1979). The incidence of bladder cancer after cyclophosphamide therapy. *The Journal of Urology* 122: 163.
- Fejes S, Budai P, Varnagy L, Molnar T, Szabo R, Fancsi T (2002). Toxicity of a mancozeb containing fungicide formulation and Cu-sulphate to chicken embryos after administration as single compounds or in combination. *Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen)* 67: 105–109.

- Furuta K, Kakita A, Takahashi T, Tomiya T, Fujiwara K (2000). Experimental study on liver regeneration after simultaneous partial hepatectomy and pancreatectomy. *Hepatology Research* 17: 223–236.
- Goncharova R, Kuzhir T (1989). A comparative study of the antimutagenic effects of antioxidants on chemical mutagenesis in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 214: 257–265.
- Greywe D, Kreutz J, Banduhn N, Krauledat M, Scheel J, Schroeder KR, Wolf T, Reisinger K (2012). Applicability and robustness of the hen's egg test for analysis of micronucleus induction (HET-MN): Results from an inter-laboratory trial. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 747: 118–134.
- Guha B, Das JK, Khuda-Bukhsh AR (2007). Ameliorative effects of vitamin supplementation on ethyl methane sulphonate-induced genotoxicity in a fish, *Anabas testudineus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68: 63–70.
- Guha B, Khuda-Bukhsh A (2002). Efficacy of vitamin-C (L-ascorbic acid) in reducing genotoxicity in fish (*Oreochromis mossambicus*) induced by ethyl methane sulphonate. *Chemosphere* 47: 49–56.
- Hamburger V, Hamilton HL (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* 88: 49–92.
- Hamilton JW, Denison MS, Bloom SE (1983). Development of basal and induced aryl hydrocarbon (benzo [a] pyrene) hydroxylase activity in the chicken embryo in ovo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80: 3372–3376.
- Hartman PE, Shankel DM (1990). Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 15: 145–182.
- Jelinek R (1977). The chick embryotoxicity screening test (CHEST). *Methods in Prenatal Toxicology* 381–386.
- Jelinek R, Peterka M, Rychter Z (1985). Chick embryotoxicity screening test-130 substances tested. *Indian Journal of Experimental Biology* 23: 588.
- Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Kosai P, MyungHuk K (2010). Micronucleus test: the effect of ascorbic acid on cadmium exposure in fish (*Puntius altus*). *Research Journal of Environmental Toxicology* 4: 103–112.
- Kaya B (2003). Anti-genotoxic effect of ascorbic acid on mutagenic dose of three alkylating agents. *Turkish Journal of Biology* 27: 241–246.

- Kaya B, Creus A, Velázquez A, Yanikoğlu A, Marcos R (2002). Genotoxicity is modulated by ascorbic acid: studies using the wing spot test in *Drosophila*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 520: 93–101.
- Kemper F, Luepke N (1986). Toxicity testing by the hen's egg test (HET). *Food and Chemical Toxicology* 24: 647–648.
- Kinlen L, Peto J, Doll R, Sheil A (1981). Cancer in patients treated with immunosuppressive drugs. *British Medical Journal (Clinical research ed.)* 282: 474.
- Könen S (2007). Trifluralin ve askorbik asit kombinasyonlarının *Oreochromis niloticus* üzerindeki genotoksik ve antijenotoksik etkilerinin mikronükleus testi kullanılarak araştırılması. *Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Mersin*.
- Kumar K, Kuttan R (2005). Chemoprotective activity of an extract of *Phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Phytomedicine* 12: 494–500.
- Landino LM, Koumas MT, Mason CE, Alston JA (2006). Ascorbic acid reduction of microtubule protein disulfides and its relevance to protein S-nitrosylation assays. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 347–352.
- Mauldin JM (1993). Quality control procedures for the hatchery. *Poultry Science* 93: 1-24.
- Moore F, Urda G, Krishna G, Theiss J (1995). An in vivo/in vitro method for assessing micronucleus and chromosome aberration induction in rat bone marrow and spleen 1. Studies with cyclophosphamide. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects* 335: 191–199.
- Nishigori H, Mizumura M, Iwatsuru M (1992). The hen's fertile egg screening test (HEST): A comparison between the acute toxicity for chick embryos and rodents of 20 drugs. *Cell biology and Toxicology* 8: 255–265.
- Özcan M (1992). Hidrokinon'un (HK) gelişim toksisitesinin döllenmiş tavuk embriyosunda analiz ve değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi, GÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara*.
- Öznurlu Y (2003). Yumurtaya verilen Aflatoksin B1'in, etçi piliçlerin kemik dokularının embriyonik gelişimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi. *SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Konya*.
- Özparlak H (2006). Yumurtaya verilen organik insektisit fipronil'in tavukların embriyonik ve kuluçka sonu erken dönem gelişimi üzerindeki zararlı etkilerinin belirlenmesi. *Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya*.

- Özparlak H (2015). Tavuk embriyolarının embriyotoksisite testlerinde kullanımı. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi* 40: 13–22.
- Özparlak H, Aslan A, Güler GÖ (2011). Organik insektisit fipronil'in genotoksik etkilerinin civciv mikronukleus test sisteminde belirlenmesi. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi* 2: 1–8.
- Perini P, Calabrese M, Rinaldi L, Gallo P (2008). Cyclophosphamide-based combination therapies for autoimmunity. *Neurological Sciences* 29: 233–234.
- Prelusky D, Hamilton R, Foster B, Trenholm H, Thompson B (1987). Optimization of chick embryotoxicity bioassay for testing toxicity potential of fungal metabolites. *Journal-Association of Official Analytical Chemists* 70: 1049–1055.
- Premkumar K, Bowlus CL (2003). Ascorbic acid reduces the frequency of iron induced micronuclei in bone marrow cells of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 542: 99–103.
- Romanoff A (1997). Life in Twenty-one Days. *Extention Bulletin*, 205.
- Senthilkumar S, Yogeeta SK, Subashini R, Devaki T (2006). Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats. *Chemico-Biological Interactions* 160: 252–260.
- Sur E (2001). Yumurtaya verilen Aflatoksin B1 (AFB1)'in Tavukların Lenfoid Organlarının Embriyonal Gelişimi Üzerindeki Etkilerinin Enzim Histokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. *Doktora Tezi, SÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya*.
- Surjyo B, Anisur K (2004). Protective action of an anti-oxidant (L-Ascorbic acid) against genotoxicity and cytotoxicity in mice during p-DAB-induced hepatocarcinogenesis. *Indian Journal of Cancer* 1: 72–80.
- Tamayo Arango LJ, Suárez Avendaño PA, Cano Valderrama AI, Martínez C, Brayian A, Ciro Y, Sergio A, Mejía Giraldo CA, Lenis Sanin YY (2012). Didactic model of the chicken embryo development using modified Dawson's diaphanization and staining technique. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 25: 620–624.
- Ural M, Özgüner M, Şenal D, Sütçü R, Delibaş N (2005). Siklosporin A'nın sıçanlarda oluşturduğu nefrotoksisiteye Vitamin C ile Vitamin E'nin ve verapamilin etkilerinin ışık mikroskopunda değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 12: 28–35.
- Varga T, Cravedi J, Fuzesi I, Varnagy L (2002). Residues of fenitrothion in chick embryos following exposure of fertile eggs to this organophosphorus insecticide. *Revue De Medecine Veterinaire* 153: 275–278.

- Varga T, Hlubik I, Várnagy L, Budai P, Molnár E (1999). Embryonic toxicity of insecticide Sumithion 50 EC and herbicide Fusilade S in pheasants after individual or combined administration. *Acta Veterinaria Hungarica* 47: 123–128.
- Varnagy L (1999). Degradation of some pesticides in avian embryos. *Acta Veterinaria Hungarica* 47: 117–122.
- Varnagy L, Budai P, Molnar E, Füzesi I, Fáneci T (2001). Teratogenicity testing of BI 58 EC (38% dimethoate) in chicken embryos with special respect to degradation of the active ingredient. *Acta Veterinaria Hungarica* 49: 355–361.
- Watanabe M, Yamaguchi K, Chijiwa K, Tanaka M (2001). FR167653 improves survival and pulmonary injury after partial hepatectomy under ischemia/reperfusion in rats. *Journal of Surgical Research* 101: 146–151.
- Wolf T, Luepke N-P (1997). Formation of micronuclei in incubated hen's eggs as a measure of genotoxicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 394: 163–175.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, Banduhn N, Eschrich D, Scheel J, Luepke N-P (2008). The hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN): novel analyses with a series of well-characterized substances support the further evaluation of the test system. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 650: 150–164.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, Luepke N-P (2002). Some new methodological aspects of the hen's egg test for micronucleus induction (HET-MN). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 514: 59–76.
- Wolf T, Niehaus-Rolf C, Luepke N-P (2003). Investigating genotoxic and hematotoxic effects of N-nitrosodimethylamine, N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodiethanolamine in the hen's egg–micronucleus test (HET–MN). *Food and Chemical Toxicology* 41: 561–573.
- Wytenbach CR, Thompson SC (1985). The effects of the organophosphate insecticide malathion on very young chick embryos: malformations detected by histological examination. *American Journal of Anatomy* 174: 187–202.

Bitki Patojeni Virüslerde Proteaz Tipleri ve Fonksiyonları

Şerife TOPKAYA^{1*}, Filiz ERTUNÇ²

¹Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, TOKAT

²Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, ANKARA

*e-mail: serife.topkaya@gop.edu.tr

Öz: Bitkileri hastalandıran çok sayıda bitki patojeni virüs bulunmaktadır. Bitki patojeni virüsler konukçu hücreleri içerisine girdikten sonra, hayatlarını devam ettirmek ve konukçu içinde çoğalmak için örtü proteinlerinden ayrılırlar. Çoğalma işlemini gerçekleştirmek için yapılarında bulunan enzimleri kullanarak yeni virüsler kopyalarlar. Bu enzimleri proteazlar ve nükleik asit sentezinden sorumlu enzimler (replikasyon enzimleri) oluşturur. Virüslerin genom ifadeleri esnasında proteazlar önemli fonksiyona sahiptir. Bu enzimler genomu fonksiyonel proteinlere işlenmesinde ilk basamağı oluştururlar. Bu derlemede bitki patojeni virüslerin yapıları ve fonksiyonlarından bahsedilmiştir.

Anahtar kelimeler: Bitki virüsleri, Proteazlar, Viral proteinler

Protease Types and Functions of Plant Pathogenic Viruses

Abstract: There are numerous virus that infect the plants. After the plant viruses penetrated in to the host plant cells, they uncoat from coat protein for surviving and genome expression. Then viruses use the enzymes for replication and genome expression. The important enzymes for genome expression are proteases and replication enzymes. The proteases have important role for replication. In the review, structure of plant pathogenic viruses and functions are discussed.

Keywords: Plant viruses, Proteases, Viral proteins

1. Giriş

Proteaz enzimleri virüslerin genom ifadelerinde önemli role sahiptirler. Proteazlar peptid zincirlerinin hidrolizini katalizleyen enzimlerdir. Bu enzimler hareket alanlarına göre; ekzoproteaz ya da endoproteaz şeklinde sınıflandırılır. **Ekzoproteazlar** sadece proteinlerin yapısındaki peptid zincirinin sonundaki bölgeye etki eden enzimlerdir ve proteinlerin karboksil ya da amino uçlarından amino asitlerin uzaklaştırılmasında rol oynamaktadırlar. **Endoproteazlar** ya da proteazlar ise, polipeptid zincirinin N ve C

ucundan uzakta veya polipeptid zincirinin iç bölgesindeki peptid zincirlerini açan enzimlere denir (Ryan ve Flint, 1997; Dougherty ve Semler, 1993).

Virüsler tarafından kodlanan proteazların ise virüsün replikasyonu esnasında iki fonksiyondan birini gerçekleştirdiği bilinmektedir. İlki, virüslerin kodladığı proteazların çoğu fonksiyonel gen ürünleri içinde yüksek moleküler ağırlığa sahip moleküllerin işlenmesiyle birlikte gen ifadesinde rol oynamaktadır. Bu polypeptin, genomik RNA'nın translasyonu ile sentezlenmektedir. İkinci genel işlem ise, virüs

replikasyonu sonunda virionların oluşması esnasında yapısal proteinlerin olgunlaşmasını sağlamaktır. Bu tipik olarak virüs replikasyonunun (döngüsündeki) son adımıdır ve genellikle virion bilgisinden önce gerçekleşir (Ryan ve Flint, 1997; Dougherty ve Semler, 1993; Fernandez-Rodriguez ve Voigt, 2016).

Doğada aminoasitlerin katalitik alanını oluşturan sekansı korunmuştur ve bu amino asitler proteaz sınıflandırılmasının oluşmasında önemli role sahiptir. Proteazlar aktif bölgelerindeki fonksiyonel amino asit köküne göre dört ana grup altında sınıflandırılmaktadırlar. Bunlar; serin proteaz, sistein (thiol) proteaz, aspartik (ya da asidik) proteaz ve metalloproteazlardır. Proteinlerin yapısında bulunan peptid bağlarını parçalamakta sistein aminoasitlerini kullananlara **sistein proteaz**, aspartat

aminoasitlerini kullananlara **aspartat proteaz** ve metal iyonlarını kullananlara ise **metalloproteaz** denilmektedir. Virüsler tarafından kodlanan bu 4 tür proteazın üçü bitki patojeni virüslerde bulunmaktadır (Çizelge 1) (Dougherty ve Semler, 1993). Bitki patojeni virüslerin bitkiyi enfeksiyonları esnasında viral proteazlar, genomun fonksiyonel proteinlere işlenmesinde öncü protein rolündedir. Ayrıca bu proteazların virüs birikiminde, sistemik taşınmada, konukçu aralığının genişletilmesi, genom amplifikasyonu gibi pek çok farklı fonksiyona sahip olduğu ve bu fonksiyonların onların proteaz fonksiyonundan bağımsız olarak gerçekleştiği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (Liu ve ark., 2009; Atallah ve ark., 2016; Rodamilans ve ark., 2018). Bu derlemede bitkilerde hastalık yapan virüslerin kodladığı proteazlar hakkında bilgi verilmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 1. Bitki patojeni virüslerin kodladığı proteazlar ve virus cins ve familyaları

| Serin proteaz | Sistein proteaz | Aspartik proteaz |
|---|--|-----------------------|
| <i>Polerovirus</i> | <i>Potyviriidae</i> (<i>Potyvirus</i> , <i>Bymovirus</i>) | <i>Caulimoviridae</i> |
| <i>Comoviridae</i> ^a | <i>Tymovirus</i> | <i>Closteravirus</i> |
| <i>Sequiviridae</i> ^a | <i>Benyvirus</i> * | |
| <i>Potyviriidae</i> (<i>Potyvirus</i> , <i>Bymovirus</i>) | <i>Closteravirus</i> | |
| <i>Luteoviridae</i> | | |
| <i>Sobemovirus</i> | | |

Proteaz Tipleri ve Fonksiyonları

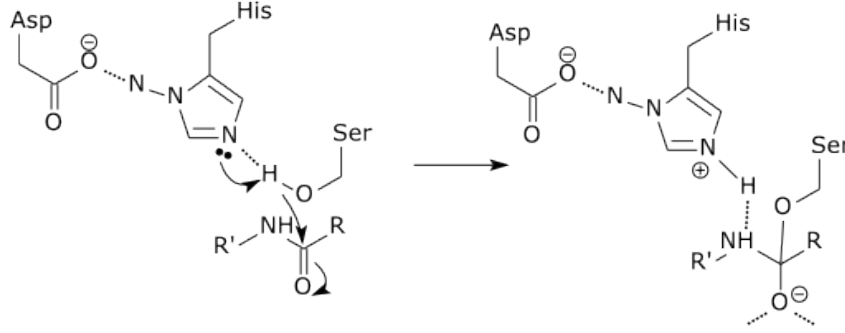
Serin ve serin tipi proteazlar

Serin ve serin tipi proteazlar, amino asitlerin peptid bağlarını parçalamakta ve substrat bağlanma bölgelerinde bulunan aktif

serin rezidülerini kullanan enzimlere denir (Şekil 1). Bu tip proteazlar “3C proteaz” ya da “chymotrypsin benzeri proteaz” olarak da ifade edilmektedirler. Çoğunluğu histidin (His), asparajin (Asn) ve serin (Ser) katalitik üçlüsüne

sahiptir. Bu tip poteazların yapılarında bulunan histidin ve asparajin amino asitleri yapısal olarak korunmuştur. Fakat bazılarında serin yerine sistein (Cys) bulunmaktadır. Bunlar daha sonradan “serin benzeri proteazlar” olarak adlandırılmıştır. Serin residüleri nadiren aktiftir ve kataliz esnasında nükleofil (genelde eksi yük ya da serbest elektron çifti içeren

elektronca zengin moleküller) olarak hareket etmektedirler. Bu enzimler hem ökaryotik hem de prokaryotik organizmalarda bulunur (Ryan ve Flint, 1997). Virüslerde, bakterilerde, ökaryotlarda çok çeşitli ve yaygın olarak bulunmalarıyla organizmalar için hayati olduğu düşünülmektedir (Tekin, 2008).

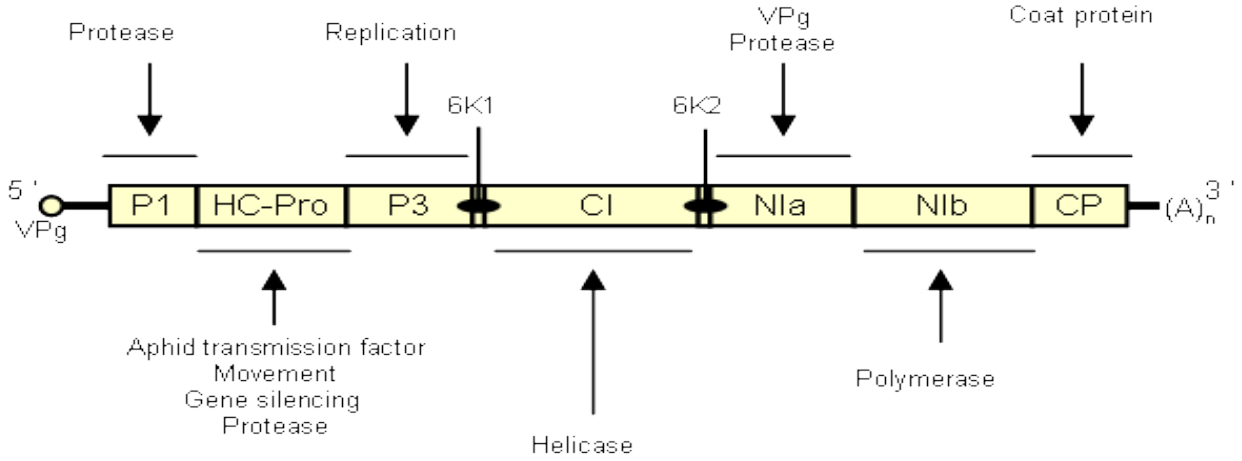


Şekil 1. Serin proteazın kimyasal yapısı (Anonymous, 2018a).

Bitki virüslerinin kodladığı serin tipi proteazlar ise Potyviridae familyası üyelerinde ve *Polerovirus* cinsinde; serin benzeri proteazlar ise *Comoviridae* ve *Sequiviridae* familyasında rapor edilmiştir (Dougherty ve Semler, 1993). Benzer şekilde Secoviridae (Thompson ve ark., 2014), Luteoviridae (Prüfer ve ark., 1999; Li ve ark., 2000) ve Solemoviridae (*Sobemovirus* ve *Polemovirus*) familyalarında serin tipi proteazlar bildirilmiştir (Satheshkumar ve ark., 2004; Sömera ve ark., 2015). Secoviridae familyasında *rice tungro spherical virus* (RTSV)(*waikavirus*) (Thole ve Hull, 1998), *tomato ringspot virus* (TomRSV) (Wang ve ark., 1999; Wang ve Sanfaçon, 2000) ve *strawberry mottle virus* (SMoV) (*Nepovirus*) (Mann ve ark., 2017) etmenlerinde viral serin

proteazların varlığı bildirilmiştir. Bu proteazların açılma bölgeleri belirlenmesine rağmen, viral replikasyondaki rolü hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (Rodamilans ve ark. 2018).

Potyvirus cinsine ait virüslerin genomlarında ise **P1 proteaz**, **N1a proteaz** ve **Helper Component proteaz (HC-pro)** (Şekil 2) olmak üzere 3 farklı proteaz kodlanmaktadır. Bu proteazlardan ikisi **P1 proteaz** ve **N1a proteaz** serin tipi proteazdır (Pasin ve ark., 2014). Üçüncü proteaz **HC-pro** ise sistein tipi proteaz yapısındadır (Dougherty ve Semler, 1993; Gou ve ark. 2011). Bu bölümde **P1 proteaz** ve **N1a proteaz** hakkında bilgi verilecektir.



Şekil 2. *Potyvirus* genom yapısı ve genlerin genom üzerindeki yeri (Anonymous, 2017)

***Potyvirus* P1 proteinaz:** P1 proteinaz enzimi *Potyvirus* genomunun N uç kısmında bulunan P1 protein tarafından kodlanmaktadır. Bu enzim tek komponentli potyvirüslerde bulunurken Potyviridae familyasının üyesi olan bipartite genoma sahip Bymovirüslerde bulunmadığı rapor edilmiştir. P1 proteinin iki fonksiyonel domaine sahip olduğu ve bunlardan ilkinin; genomun N ucunun yarısı *Potyvirus* grupları arasında amino asit sekans farklılığı gösterdiği bildirilmiştir. *Tobacco vein mottling potyvirus*'un P1 proteininin analizi yapıldığında bu sekansın bitki virüslerinin taşıma proteinleri ile bazı benzerlikler gösterdiği, fakat diğer potyvirüslerde bu benzerliğe sahip olmadığı görülmüştür. İkinci olarak, P1 proteinin C- uç bölgesinin yarısı ise proteolitik aktivite ile ilişkili olduğu (Dougherty ve Semler, 1993) ve aynı zamanda bu bölgenin RNA'ya bağlanma aktivitesine sahip olduğu rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda P1 proteinazın serin tipi bir proteinaz olduğu belirlenmiştir. Serin tipi P1 proteinaz genom amplifikasyonu esnasında

transaktivatör olarak rol oynadığı bildirilmiştir (Ryan ve Flint, 1997; Verchot ve Carrington, 1995, Rodamilans ve ark., 2013; Pasin ve ark., 2014; Rodamilans ve ark., 2018).

Bir diğer çalışmada ise, bir *Potyvirus* üyesi olan *Tobacco etch virus* (TEV) ile yapılan analizlerde virüsün genom ekspresyonu esnasında sentezlenen tek bir polyproteinin öncü maddesi olduğunu ortaya çıkarmıştır. P1 proteinaz TEV genomunun N terminal bölgesinde bulunan ve proteolitik aktiviteye sahip olan 35 kDa uzunluğunda bir proteindir. Üç viral proteinaz, bu öncü maddenin ara ürün öncü maddelere ve final ürünlere katılma işleminden sorumlu olduğu bildirilmiştir.

***Potyvirus* NIa proteinaz (27kDa NIa):** NIa proteinaz yapısal ve fonksiyonel olarak en iyi karakterize edilen viral proteinazdır. Bu proteinazın viral döngüde replikasyonda ve konukçu aralığının belirlenmesinde rol oynadığı rapor edilmiştir (Rodamilans ve ark., 2018). Bazan ve Fletterick (1988, 1990) ve Gorbalyena ve ark. (1989) ayrı ayrı yaptıkları moleküler modelleme çalışmalarında *Potyvirus*

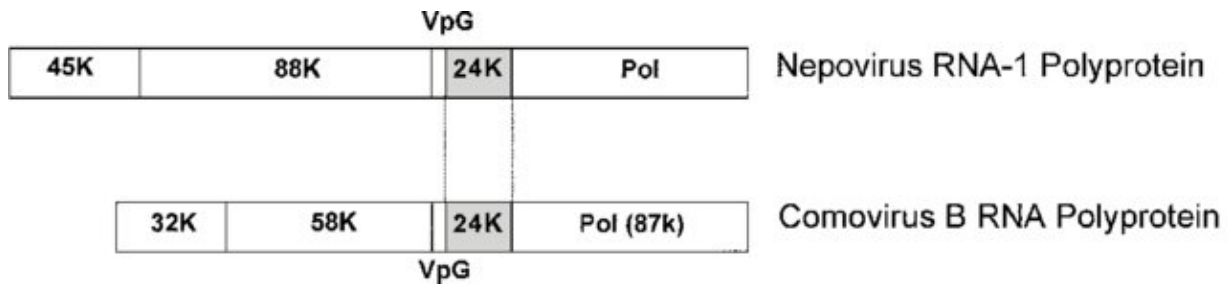
NIa proteinazın hücrel serin proteazlarla yapısal olarak benzer motiflere sahip olduğunu göstermişlerdir. Virüslerle yapılan diğer çalışmalarda bu enzimin eşdeğerinin *Picornavirus* 3C proteinaz ve *Comovirus* 24kDa proteinazlar olduğu görülmüştür. NIa protein bağımsız çekirdek sinyallerine sahip bir proteindir. Bu sinyaller NIa proteinin hücre çekirdeğinde birikmesini sağlamaktadır. Ayrıca, NIa proteinaz enziminin RNA'ya spesifik olmayan bir şekilde bağlandığı da gösterilmiştir.

NIa protein iki domaine sahiptir. Bunlar: C ucu NIa proteinaz (27kDa) ve N ucu VPg- 22kDa proteinazdır (Ryan ve Flint, 1997, Dougherty ve Semler, 1993). Genom ekspresyonu esnasında moleküllerin ayrılmasından sorumlu olan proteaz 27-kDa NIa proteazdır. NIa proteaz genom ekspresyonu esnasında yüksek moleküler yoğunluklu öncü madde olarak açığa çıkmaktadır. 49-kDa NIa polyprotein bu öncü maddelerde en yaygın olanıdır. Ancak bazen 55-kDa polyproteinde oluşabilmektedir. 27-kDa NIa proteaz, 49-kDa NIa polyproteinin C-terminal kısmını gösterdiği ve yapısal olarak hücrel serine proteazlara benzer olduğu ileri

sürülmüştür (Ryan ve Flint, 1997; Dougherty ve Semler, 1993; Rodamilans ve ark., 2018).

NIa proteinin konukçu aralığının belirlenmesinde önemli role sahip olduğu gösterilmiştir. *Papaya ringspot virus* (PRSV) ile yapılan bir çalışmada, chymotrypsin benzeri proteaz (serin proteaz)'da meydana gelen tek bir amino asit değişimi sonucunda virüsün kabakgillerden papaya'yı tercih ettiği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2008).

Comovirus 24kDa proteinaz: *Como* ve *Nepovirus*'ler pozitif duyarlı iki RNA molekülünden oluşmaktadır. Replikasyon proteinleri, comovirüslerde B RNA ve nepovirüslerde RNA1 tarafından kodlanmaktadır. *Comovirus* B ve *Nepovirus* RNA1'in kodladığı polyprotein moleküllerin ayrılmasından sorumludur ve 24K proteinaz olarak tanımlanmıştır (Şekil 3) (Franssen ve ark., 1984; Verver ve ark., 1987; Margis ve Pink, 1992). *Comovirus* 24K proteinaz aktivitesi diğer virüs proteinlerinin interaksyonuyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Ryan ve Flint, 1997; Dougherty ve Semler, 1993). Bu iki virüs tarafından kodlanan proteinazların potyvirusler tarafından kodlanan NIa proteinaz ile benzerlik gösterdiği görülmüştür.



Şekil 3. *Comovirus* ve *Nepovirus* cinslerinin genom organizasyonu. *Comovirus* B ve *Nepovirus* RNA1'in şematik gösterimi (Ryan ve Flint, 1997)

***Polerovirus* P1 proteinaz (ORF1):**

Polerovirus'lar (Luteoviridae familyası) zarfsız ikosahedral 26–30 nm çapında virionlara sahip olup, 6.2 kb büyüklüğünde pozitif duyarlı ssRNA genomundadır. *Polerovirus* cinsi 6 tane ORF içermekte olup, ORF1 tarafından kodlanan P1 proteinazın virüsün kodladığı proteinlerin açığa çıkmasından sorumlu olan polyproteini içerdiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2000).

***Sobemovirus* ORF2A protein:**

Sobemovirus'un tip üyesi olan *Southern bean mosaic virus* (SBMV) tarafından kodlanan ORF2A proteinin serin tip proteinaz yapısında olduğu rapor edilmiştir (Gorbalenya ve ark., 1988).

Sistein proteazlar

Sistein proteazlar aynı zamanda “papain benzeri” ya da “thiol proteaz” olarak bilinmektedir. Bu proteazların, biri diğeri ile etkileşim halinde olan yakın çevrede histidin (His) ve sistein (Cys) kalıntılarından oluşan katalitik iki moleküle sahip olduğu bildirilmiştir. Bu residüler arasındaki boşluk virüslerin kodladığı proteazlarda hücresel protezlara oranla daha kısa olduğu görülmüştür (Dougherty ve Semler, 1993). Virüslerin kodladığı sistein tipi proteaza örnek olarak potyviruslerde kodlanan helper component (yardımcı bileşen) proteaz gösterilmiştir.

Helper component protease (Yardımcı bileşen-Hc-Pro)

Hücresel sistein proteazlara benzer olduğu gösterilen ilk proteaz HC-proteazdır

(Şekil 4). Bu proteaz enzimi tüm potyviruslerin genomik RNA'sında HC-Pro tarafından kodlanmaktadır (Dougherty ve Semler, 1993; Huet ve ark., 1994; Agrios, 2005).

Yardımcı bileşen (HC-Pro) proteinin multifonksiyonel bir protein olduğu ve viral döngüde pek çok fonksiyonu gerçekleştirdiği bildirilmektedir. İlk olarak virüsün afit vektörleriyle konukçudan konukçuya taşınması için zorunlu yardımcı faktör olduğu fark edilmiştir. Daha sonralarda ise proteaz aktivitesine sahip olduğu bulunmuştur. Yapılan diğer çalışmalarda HC-Pro'nun daha çok fonksiyonu tanımlanmış olup bunlar; virüsün genom amplifikasyonunu ve enfekte etme yeteneğini artırıcı olduğu ve bitkide sistemik ve hücreden hücreye taşınma için zorunlu olduğu rapor edilmiştir. En son yapılan çalışmalarda ise transkripsiyon sonrası gen susturulması (Post-transcriptional gene silencing – PTGS) ve virüsler tarafından teşvik edilen gen susturulması (VIGS)'nda baskılayıcı olarak rol aldığı tanımlanmıştır (Plisson ve ark., 2003; Ballut ve ark., 2005; Taliansky ve ark., 2008; Gou ve ark., 2011).

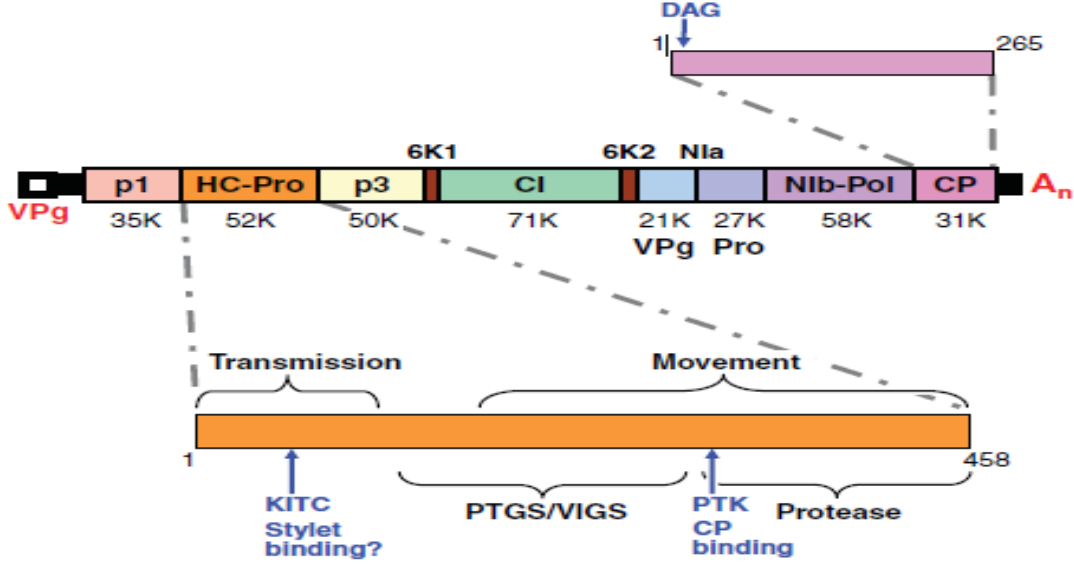
Mutasyon çalışmalarında ve genom sekanslama çalışmalarında HC-Pro gen bölgesinin şematik olarak üç bölgeye ayrıldığı ileri sürülmüştür (Gou ve ark. 2011) (Şekil 4).

1. Taşınma işleminde gerekli olan N- terminal bölgesi,
2. Proteinaz aktivitesinin bulunduğu C- terminal bölgesi ve

3. Diğer tüm fonksiyonları içeren merkezi bölge olarak tanımlanmıştır.

Yapılan çalışmalarda proteinaz domaini C ucundaki 155 amino asitlik bölgede

haritalanmıştır ve bu bölgenin aktif bölgelerde Cys³⁴⁴ ve His⁴¹⁷ kalıntılarıyla sistein proteaz benzeri aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir.



Şekil 4. Helper Component proteazın aktif bölgeleri (Anonymous, 2018b)

Aspartik Proteazlar

Aspartik ya da asit proteazlar iki asparajin residülerinin katalitik iki molekülünden oluşmaktadırlar. Bu enzimler peptid substratlarını katalizlemek için aspartat kullanan enzimlerdir. Aspartik proteazlarda kovalent enzim-substrat ara ürünleri oluşmamaktadır. Virüsler tarafından kodlanan aspartat proteazların fonksiyonel ve yapısal olarak hücrel aspartik proteazlara benzerlik gösterdiği görülmüştür. Genellikle asidik proteazlar diye bilinirler (Rao ve ark., 1998). Birkaç istisna dışında bu hücrel enzimler asidik PH'da aktiftir. Retrovirüslerin genomik RNA'larında kodlanan enzimlerle hücrel orjinli enzimler arasında farklılıklar vardır. Örneğin, hücrel proteazlar yaklaşık olarak

325 residü uzunluğunda iken viral enzimler 99-125 amino asit uzunluğundadır (Dougherty ve Semler, 1993).

Asparajin residüleri yapısal olarak korunmuş olan asparajin-tyrisin-glisin (Asp-Thr-Gly) üçlü katalitik bölgeden oluşmaktadır. Aspartik proteazlar ve endonükleazlar, proteolitik enzimlerdir. Bu enzimler spesifik dipeptid bağlarını açar. Aspartik proteazlar omurgalı canlılarda (Vertebrata), bitkilerde, insan virüsleri yanı sıra bazı bitki virüslerinde de bulunmaktadır. Aspartik proteinaz kodlayan bitki virüsleri *Pararetrovirus* cinsi içinde yer almaktadır.

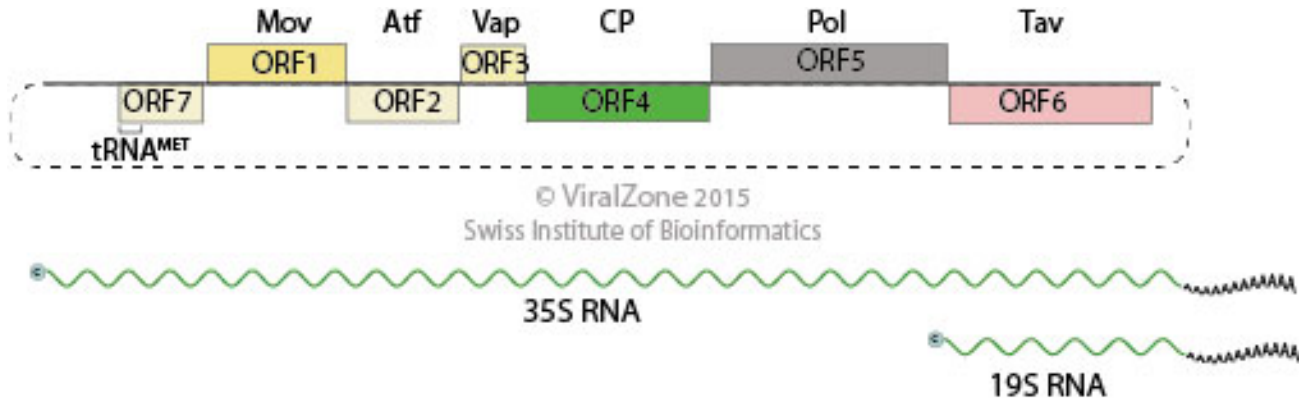
Pararetrovirüsler dsDNA genomuna sahip küresel şekilli virüslerdir (Dougherty ve Semler, 1993). Bitki pararetrovirüsleri içinde

Commelina virus ve *Caulimovirus* cinsleri olmak üzere iki cins tanımlanmıştır. *Commelina virus* cinsine ait proteazlarla ilgili fazla bilgi bulunmamaktadır. Fakat nükleotidlerin sekanslama çalışmalarında ve bu cins virüslerin gen ifadelerinde aspartik proteazların rol oynadığı rapor edilmiştir.

Caulimovirus cinsinin tip üyesi *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)'dür. CaMV 8 kilobaz (kbp) büyüklüğünde olup 7 işlevsel polipeptit (P1-P7) kodlamaktadır (Lutz ve ark., 2012). CaMV enfekteli bitkilerin dokularında CaMV genlerinin ifadesinden sorumlu iki tane RNA (35S RNA ve 19S RNA) üretmektedir (Şekil 5). 19S RNA tarafından kodlanan ORF 6 viral enfeksiyon için gerekli olan multifonksiyonel bir proteindir ve monosistronik mRNA olarak rol oynamaktadır. 35S RNA ise kalan diğer ORF'lerin oluşmasında mRNA olarak rol oynamaktadır. ORF 6 multifonksiyonel bir protein olup 35S RNA'nın 5' transkripsiyonu yapılmayan ucuna bağlanarak transkripsiyonu kontrol ettiği rapor edilmiştir. Ribozomlar bu bölgeye bağlanarak 35S RNA'nın transkripsiyonunu gerçekleştirir.

ORF'lerin her biri başlangıçta polyprotein olarak ifade edilir ve viral kapsit proteinin (ORF4) ve proteaz ve RT-RNase H domainlerini içeren (ORF5) yapısal olmayan polyproteinlerin öncül formunu temsil etmektedir. Proteinaz aktivitesine sahip olan ORF5 80kDa moleküler ağırlığa sahip olup 22 kDa ağırlığında N uç kısmı ve 58 kDa C uç kısmı olmak üzere iki segmente ayrılmaktadır. 58 kDa C uç kısmının RT-RNase H aktivitesine sahip korunmuş amino asit motifleri içerirken 22 kDa N uç kısmının aspartik proteinaz özelliğine sahip korunmuş amino asit motifleri içerdiği bildirilmiştir (Torruella ve ark., 1989; Dougherty ve Semler, 1993).

CaMV proteinase genom ifadesi esnasında bazı açılmaları gerçekleştirmektedir. İlk olarak ORF 5'in transkripsiyon ürünlerini serbest proteinaz ürünlerine dönüştürür. Diğerleri ise ORF 4 polyproteinini 44kDa (kapsit protein bileşenleri) ve 11 kDa ürünlerini ortaya çıkarır (Torruella ve ark., 1989).



Şekil 5. *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) genom yapısı (Anonymous, 2018b)

2. Sonuç

Bu derlemede bitkilerde hastalık yapan virüslerin replikasyonunda rol oynayan proteolitik enzimlerin yapıları ve fonksiyonları hakkında bilgi verilmeye çalışılmıştır. Bitki patojeni virüsler konukçu hücrelerine girdikten sonra genomlarını ifade etmek için yapılarında kodladıkları çeşitli enzimlerle fonksiyonel proteinleri aktif hale getirirler. Bunlar içinde viral genomun ifadesinde en önemli rolü viral polyproteini fonksiyonel proteinlere işleyen proteaz enzimleri almaktadır. Bu enzimler, viral döngüde farklı fonksiyonlara sahip olmalarının yanı sıra virüsün konukçu hücre

çinde hayatsal faaliyetlerinin başlatılmasında kilit rol oynamaktadır.

Tarım alanlarında bitki patojeni virüslerden dolayı önemli verim kayıpları ortaya çıkmaktadır. Bu etmenlerin mücadelesinde kimyasal yöntemlerin kullanılamamaktadır. Son yıllarda biyoteknolojinin gelişmesi ile virüslerin yapılarına dair çalışmalar artmış ve virüsler hakkında birçok bilgi açıklığa kavuşmuştur. Virüslerin kodladığı bu proteinlerin yapılarının ve fonksiyonlarının bilinmesi bitki patojeni virüsler ile mücadele yöntemleri geliştirme açısından büyük öneme sahiptir.

Kaynaklar

- Agrios GN (2005). Plant pathology. *Elsevier Academic Press*, United States of America, 922.
- Anonymous (2017). https://www6.inra.fr/pvy_organization_eng/Potato-virus-Y/Genome. (Erişim tarihi: 02.12.2017).
- Anonymous (2018a). https://en.wikipedia.org/wiki/File:Serine_protease_catalysis.png. (Erişim tarihi: 02.10.2018).
- Anonymous (2018b). Caulimovirus. https://viralzone.expasy.org/119?outline=all_by_species. (Erişim tarihi: 02.10.2018).
- Atallah OO, Kang SH, El-Mohtar CA, Shilts T, Bergua M, Folimonova SY (2016). A 50-proximal region of the *Citrus tristeza* virus genome encoding two leader proteases is involved in virus superinfection exclusion. *Virology* 489: 108–115.
- Ballut L, Drucker M, Pugnier M, Cambon F, Blanc S, Roquet F, Candresse T, Schmid HP, Nicolas P, Gall P, Badaoui S (2005). HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymic activities. *Journal of General Virology* 86: 2595–2603.
- Bazan JF, Fletterick RJ (1988). Viral cysteine proteases are homologous to the trypsin-like family of serine proteases: structural and functional implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7872–7876.

- Bazan JF, Fletterick RJ (1990). Structural and catalytic models of trypsin-like viral proteases. *Semin Virol* 1: 311–322.
- Chen KC, Chiang CH, Raja JA, Liu FL, Tai CH, Yeh SD (2008). A single amino acid of NIa pro of Papaya ringspot virus determines host specificity for infection of papaya. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 1046–1057.
- Dougherty W, Semler BL (1993). Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiological Reviews* 781–822.
- Fernandez-Rodriguez J, Voigt CA (2016). Post-translational control of genetic circuits using *Potyvirus* proteases. *Nucleic Acids Research* 44(13): 6493–6502.
- Franssen H, Moerman M, Rezelman G, Goldbach R (1984). Evidence that the 32,000-dalton protein encoded by bottom-component RNA of cowpea mosaic virus is a proteolytic processing enzyme. *Journal Virology* Apr 50(1): 183–190.
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Blinov VM, Donchenko AP (1988). Sobemovirus genome appears to encode a serine protease related to cysteine proteases of picornaviruses. *FEBS Lett* 236: 287–290.
- Gorbalenya AE, Donchenko AP, Blinov VM, Koonin EV (1989). Cysteine proteases of positive strains RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. *FEBS Lett* 243: 103–114.
- Guo B, Lin J, Ye K (2011). Structure of the autocatalytic cysteine protease domain of potyvirus helper-component proteinase. *The Journal of Biological Chemistry* 286(24): 21937–21943.
- Huet H, Gal-On Meir EA, Lecoq H, Raccach B (1994). Mutations in the hepler component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *Journal of General Virology* 75: 1407–1414.
- Li X, Ryan MD, Lamb J W (2000). Potato leaf roll virus protein P1 contains a serine proteinase domain. *Journal of General Virology* 81: 1857–1864.
- Li X, Ryan MD, Lamb JW (2000). Potato leafroll virus protein P1 contains a serine proteinase domain. *J Gen Virol* 81: 1857–1864.
- Liu YP, Peremyslov VV, Medina V, Dolja VV (2009). Tandem leader proteases of Grapevine leafroll-associated virus-2: host-specific functions in the infection cycle. *Virology* 383: 291–299.
- Lutz L, Raikhy G, Leisner SM (2012). Cauliflower mosaic virus major inclusion body protein interacts with the aphid transmission factor, the virion-associated protein, and gene VII product. *Virus Res* 170: 150–153.

- Mann KS, Walker M, Sanfaçon H (2017). Identification of cleavage sites recognized by the 3C-like cysteine protease within the two polyproteins of strawberry mottle virus. *Front Microbiol* 8: 745.
- Margis R, Pinck L (1992). Effect of site-directed mutagenesis on the presumed catalytic triad and substrate-binding pocket of grapevine fanleaf nepovirus 24-kDa proteinase. *Virology* 190: 884–888.
- Pasin F, Simón-Mateo C, García JA (2014). The hypervariable amino-terminus of P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. *PLoS Pathog* 10(3): e1003985.
- Plisson C, Drücker M, Blanc S, German-Retana S, Le Gall O, Thomas D, Bron P (2003). Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J Biol Chem* 278: 23753–23761.
- Prüfer D, Kawchuk L, Monecke M, Nowok S, Fischer R, Rohde W (1999). Immunological analysis of potato leafroll luteovirus (PLRV) P1 expression identifies a 25 kDa RNA-binding protein derived via P1 processing. *Nucleic Acids Res* 27: 421–425.
- Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 597–635.
- Rodamilans B, Valli A, Antonio Garcia A (2013). Mechanistic divergence between P1 proteases of the family Potyviridae. *Journal of General Virology* 94: 1407–1414.
- Rodamilans B, Shan H, Pasin F, García JA (2018). Plant viral proteases: beyond the role of peptide cutters. *Frontiers in Plant Science* 9.
- Ryan MD, Flint M (1997). Virus-encoded proteinases of the picornavirus super-group. *Journal of General Virology* 78: 699–723.
- Satheshkumar PS, Lokesh GL, Savithri HS (2004). Polyprotein processing: *cis* and *trans* proteolytic activities of Sesbania mosaic virus serine protease. *Virology* 318: 429–438.
- Sõmera M, Sarmiento C, Truve E (2015). Overview on sobemoviruses and a proposal for the creation of the family *Sobemoviridae*. *Viruses* 7: 3076–3115.
- Taliansky M, Torrance L, Kalinina N (2008). Role of plant virus movement proteins. from: methods in molecular biology, Vol. 451, Plant Virology Protocols: 33 From Viral Sequence to Protein Function Edited by Foster GD, Johansen IE, Hong Y. and Nagy P.D., Humana Press, Totowa, NJ.

- Tekin N (2008). Türkiye kaynaklı *Bacillus spp.*'lerin alkalen proteaz üretim kapasiteleri ve enzimlerin kısmen karakterizasyonu. *Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı*, Yüksek Lisans Tezi 109.
- Thole V, Hull R (1998). Rice tungro spherical virus polyprotein processing: identification of a virus-encoded protease and mutational analysis of putative cleavage sites. *Virology* 247: 106–114.
- Thompson JR, Kamath N, Perry KL (2014). An evolutionary analysis of the *Secoviridae* family of viruses. *PLoS One* 9: e106305.
- Torruella M, Gordon K, Hohn T (1989). Cauliflower mosaic virus produces an aspartic proteinase to cleave its polyproteins. *EMBO J* 8: 2819–2825.
- Verchot J, Carrington JC (1995). Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J Virol* 69: 3668–3674.
- Verver J, Goldbach R, Garcia JA, Vos P (1987). In vitro expression of a full-length DNA copy of cowpea mosaic virus B RNA: identification of the B RNA encoded 24-kd protein as a viral protease. *EMBO J* 6: 549–554.
- Wang A, Carrier K, Chisholm J, Wieczorek A, Huguenot C, Sanfaçon H (1999). Proteolytic processing of tomato ringspot nepovirus 3C-like protease precursors: definition of the domains for the VPg, protease and putative RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* 80: 799–809.
- Wang A, Sanfaçon H (2000). Proteolytic processing at a novel cleavage site in the N-terminal region of the tomato ringspot nepovirus RNA-1-encoded polyprotein *in vitro*. *J Gen Virol* 81 2771–2781.

Planktonlarda Siklomorfosis Üzerine Derleme

Duygu BERDİ^{1*}, Evren YILDIZTUGAY², Mustafa KÜÇÜKÖDÜK¹, Ahmet ALTINDAĞ³

^{1*}Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KONYA

²Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, KONYA

³Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KONYA

*e-mail: duygu.berdi@selcuk.edu.tr

Öz: Siklomorfizm veya mevsimsel polimorfizm zooplanktonlarda ilk olarak Lauterborn tarafından 1904 yılında tanımlanmıştır. Bu terim günümüzde küçük akuatik organizmalarda abiyotik (sıcaklık, türbülans, ışık) ve biyotik (besin, predatör baskısı) çevrenin etkisiyle vücut yapılarında mevsimsel olarak meydana gelen fiziksel değişiklikler olarak adlandırılmaktadır. Bu mevsimsel değişiklikler türün mevsimsel olarak iki farklı form gibi görünmesine neden olabilmektedir. Siklomorfosis özellikle planktonik kladoseralar arasında daha fazla gözlemlenirken, ayrıca protozoa, dinoflagellat ve rotiferler arasında da yaygın olarak görülmektedir. Siklomorfosis sonucu canlıların fiziksel görünüşlerinde ve davranışlarında birtakım değişiklikler söz konusudur. Siklomorfosis akuatik ortamda organizmanın batma oranını azaltıp yüzmede kolaylık sağlarken, aynı zamanda planktonla beslenen predatörlere karşı da bir savunma mekanizması olarak kullanılmaktadır. Araştırmacılar tarafından bazı avcı türlerin salgıladığı kimyasalların (kairomonlar) canlıda kaudal spin, tepelik gibi vücut çıkıntılarına neden olduğu ortaya konmuştur. Bu derleme de planktonlardaki siklomorfosis olayı ve meydana gelen değişikliklerden detaylı olarak bahsedilmiştir.

Anahtar kelimeler: Siklomorfosis, Plankton, Mevsimsel, Polimorfizm

A Review About Cyclomorphosis in Plankton

Abstract: Cyclomorphism or seasonal polymorphism was first described in zooplankton by Lauterborn at 1904. This term is nowadays referred to as the seasonal changes in body structures affected by the abiotic (temperature, turbulence, light) and biotic (nutrient, predator, pressure) circulation in small aquatic organisms. These seasonal changes may cause the season to look like two different forms. Cyclomorphosis more prevalent, especially among planktonic cladocerans, but also among protozoa, dinoflagellates and rotifers. Cyclomorphosis is a consequence of changes in the physical appearance and behavior of organisms. Cyclomorphosis is reduce the sinking rate of the organism in aquatic environment and facilitates swimming, at the same time, another advantage is the defense against feeding with planktons predators. Researchers have shown that chemicals released by some hunter species (kairomons) cause body spurs such as caudal spin, hump, and defense against the predator. This review also details cyclomorphosis and changes in the plankton.

Keywords: Cyclomorphosis, Plankton, Seasonal, Polymorphism

Giriş

Suda serbest halde yaşayan özel hareket organelleri olmayan veya olsa bile bu organelleri yer değiştirmede aktif olarak kullanamayan, ancak su hareketleri ile pasif olarak yer değiştirebilen organizmalar topluluğuna plankton adı verilmektedir. Bu küçük akuatik organizmalarda abiyotik

(sıcaklık, türbülans, ışık) ve biyotik (besin, predatör baskısı) çevrenin etkisiyle vücut yapılarında mevsimsel olarak meydana gelen fiziksel değişiklikler söz konusudur. Siklomorfizm veya mevsimsel polimorfizm olarak adlandırılan bu olay, özellikle planktonik kladoseralar arasında göze çarpar,

fakat protozoa, dinoflagellat ve rotiferler arasında da oldukça yaygındır (Wetzel, 2001).

Meydana gelen morfolojik değişiklikler sonucu aynı türün yaz ve kış formları, iki ayrı tür olarak karşılaştırılmalarına neden olacak kadar farklı bir görünüm alır. Kış formu yaz formuna dönüşürken vücut yüzeyi hacmine göre önemli bir artış gösterir. Örneğin üç uzantısı olan *Ceratum hirundinella* yazın dördüncü bir uzantı çıkardığı gibi, vücudu daha uzar ve daha daralır (Tanyolaç, 2011).

Canlının yüzeyi büyüdükçe oransal yüzeyide büyür ve çökme oranı azalır. Suyun vizkozitesinin canlıların batmasında önemli rolü vardır. Sıcaklık arttıkça vizkozite azaldığı için sıcak suların viskozitesi de azdır. Bu nedenle sıcak sularda canlıların batma hızı artar. Siklomorfosis sonucu oluşan uzamış yapılar yaz aylarında yüzey alanını genişleterek yüzmede avantaj oluşturmaktadır (Tanyolaç, 2011). Normal morfolojileri ile karşılaştırıldığında tepelikli *Daphnia* yüksek besin konsantrasyonu içeren yüzey tabakalarında daha rahat yüzeyde kalabilmektedir (Laforsch ve Tollrian, 2004).

Doğal seleksiyon, organizmalarda predatör ile karşı karşıya kalındığında kendilerini güvende tutmak için morfolojilerinde bir takım değişiklik meydana getirir. Siklomorfik yanıt aslında seçici predasyon nedeniyle, predasyonun gelişini iyi tahmin eden çevresel sinyallerin hareketi olarak bilinmektedir. Sucul ortamda organizmalar genelde predatörler tarafından salınan kairomon sayesinde avcı risk

derecesini hesaplar ve avlanmanın etkisini azaltmak için kendi davranış ve morfolojilerini değiştirirler (Riessen ve ark., 2012).

Beauchamp (1952) ve Gilbert (1966) yılında *Asplanchna* tarafından ortama salınan kimyasalların *Brachionus calyciflorusta* büyük spin oluşumuna sebep olduğunu gözlemlemişlerdir. Çeşitli avcı varlığında kladoserlerde bu kimyasalların boyun dişi, tepelik, kaudal spin gibi vücut çıkıntılarının uzamasına neden olduğu ve predatöre karşı savunma sağladığı keşfedilmiştir. Bu kimyasal sinyalin 500 mW'dan az, polar, asite ve baza karşı dirençli fakat bakteriyal parçalanmaya dirençli olmayan bir protein olduğu ortaya konmuştur. İndüklenmiş morfolojinin av türlerine avantaj sağladığı bilindiği durumlarda morfolojik savunma kaybolmaktadır (Dodson, 1989; Gilbert, 1966).

Siklomorfosisde Av-Avcı Arasındaki Etkileşimler

Planktivor avcıların avlanma stilleri farklılık göstermektedir ve bu avlanma stillerine göre planktonlar avlanma oranlarını azaltmak için farklı savunma mekanizmaları oluşturabilmektedirler (Beckius, 2013).

1. Omurgasız (dokunsal) avlanmaya karşı savunma: Avını görünürlüklerine göre seçemedikleri için bu predatörler ağız parçasına uygun boyutlarda av seçerler (Beckius, 2013). Bu nedenle bazı rotiferler ve 1 mm'den az kladoserler omurgasız avcı predasyonuna maruz kalabilmektedir (Zaret,

1980). Örneğin dokunsal avcı olan omurgasız *Chaoborus* larvaları suda hareketsiz pusuya yatarak, uygun bir anda avını yakalar, fakat dokunsal avcıya karşı geliştirilen spin, tepelik ve boyun dişi gibi uzamış çıkıntılar larvalar tarafından çiğnenmelerine ve yem olmalarına engel olur (Riessen, 2012).

2. Omurgalı (görsel) avlanmaya karşı savunma: Akuatik sistemlerde bu predatörler avını boyuta göre değil görünürlüğüne göre seçmektedir. Orta boylarda ki (1 ile 2 mm arasındaki) kladoserler vücutlarının görünen orta kısmını (göğüs, karın, baş) küçük tutar ve şeffaf periferik yapılarını genişletip ve uzatarak morfolojik savunma sağlayabilirler (Brooks, 1965-1966; Jacobs, 1966).

Kladoserlerde Siklomorfosisin Tanımı

Birçok zooplanktonda mevsimsel polimorfizm veya siklomorfosis görülmesine rağmen, en önemli örnekleri kladoserlerde görülmektedir. İlkbaharın sonlarında, yazın başında *Daphnia*'da uzamış ya da genişlemiş başlıklar "tepelik" olarak adlandırılmaktadır. Morfolojik savunma bu tepelik, kaudal spin uzunluğunda artış, boyun dişi veya kalın karapaks oluşumunu içerir (Dodson, 1974; Tollrian, 1995; Tollrian ve Dodson, 1999; Laforsch ve Tollrian, 2004; Rabus ve ark., 2013).

İlkbaharda bulunan bireylerin baş kısmı daha yuvarlak olup, daha kısa spinleri vardır. İlkbaharın sonlarında yazın başında oluşan kask ve uzun spinler üreme için dezavantaj oluşturmaktadır (Jacobs, 1967;

Dodson, 1974). Yapılan çalışmalarda yazın kasklı türlerde daha az yumurta bulunmuş ve bunun kask üretimine bağlı enerji kaybından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Hutchinson TC, 1967). Fakat bu enerji kaybının dışında diğer faktörlerde önemli rol oynamaktadır. Ilıman göllerde otçul zooplankton besin olarak kullanılmaktadır. Yenilebilir fitoplankton oranı ilkbaharda fazla olup yaz aylarında azalır (Wetzel, 1983). Bu nedenle besin seviyesinin yüksek olduğu predasyon baskısının düşük olduğu ilkbahar aylarında yumurta sayısının artışına etkisinden dolayı kask oluşumu gözlenmez (Riessen, 1984).

Kladoserler içinde siklomorfosisize neden olan mekanizma ile ilgili birçok geçerli çalışma vardır. Bu mekanizmalardan abiyotik ve biyotik çevrenin etkileri deneylerle ortaya konmuştur.

Abiyotik Faktörler: Sıcaklık, Işık ve Türbülans

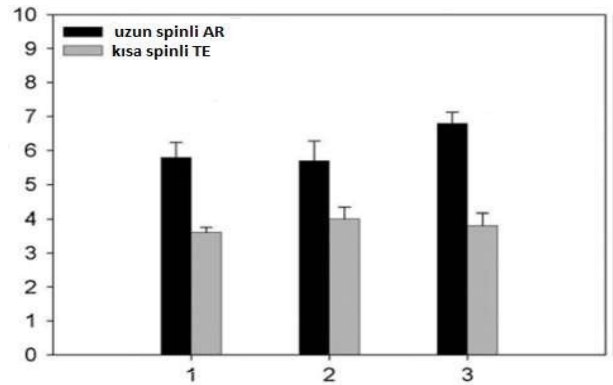
Sıcaklık *Daphnia*'daki kaskın yüksekliğini artıran en önemli uyarandır. Sıcaklık embriyogenezin ortalarına kadar etkilidir (Wetzel, 2001). Kış ve ilkbaharın başına kadar su sıcaklığı ve besin kaynaklarının aşırı kullanılmasının etkisi bahar ayındaki tepe yüksekliğini ve oluşma zamanını etkilemektedir. Bunun sonucunda Nisan ve Mayıs aylarında *Daphnia* biyokütlesi yüksek ve uzun tepeli, sıcaklığın düşük olduğu (10-15 °C) aylarda ise tepelik uzunluğu kısadır (Wojtal, 2004; Benndorf ve ark., 2001). Bunun dışında su türbülansı ve ışık tepe oluşumuna etki eden faktörler

arasındadır. Su türbülansının çok olduğu sularda uzun tepe yapısı görülmektedir (Florkin, 2012).

Biyotik Faktörler: Besin ve Predatör

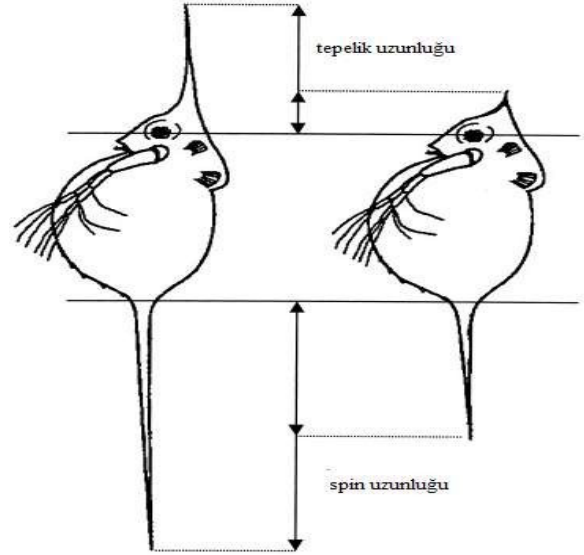
Bazı hipotezler zooplanktonların üreme ve büyüme hızının fitoplankton topluluğunun bolluğuna göre belirlendiği yönündedir. Buna göre büyük boyutlu besin kaynağı olarak daha fazla fitoplankton filtre edebilirler ve büyük türlerin üreme başarısının küçük türlerden daha fazla olduğu görülmüştür (Brooks ve Dodson, 1965). Büyük boyutlu olmak bu nedenle avantaj sağlamaktadır (Gliwicz ve Lampert, 1990). Diğer bir biyotik faktör ise, yaz ortasında artan predatör baskısıdır (Carpenter ve ark., 1985). Balık predatör ve omurgasız *Chaoborus* varlığında uzun spin yapısı *Daphnia*'da avantaj sağlamaktadır. Bu durum *D. lumholtzi* üzerinde yapılan deneylerle desteklenmiştir. Yapılan deneyde genç ve yetişkin *Daphnia*'ların spinlerinin predatörden kaçınmada ne kadar yeterli olduğu ortaya konmuştur. Bunun için *D. lumholtzi* kısa spinli (TE) klonlar seçilmiştir (predatör yokluğunda yetişkinler uzun kaska sahip değildir). Bu klonda ilk yavru larvalar yetişkinliğe kadar geçen zamanda uzunluğu azalan küçük tepe yapısı sergilemektedir. Başka bir gölden temin edilen diğer klon *D. lumholtzi* uzun spinli (AR) klonudur (Şekil 1). Bu uzun spinli form büyük tepeliğe ve uzun kaudal spine sahiptir. Deneyde dikenli balık

(Avrupa, Kuzey Asya ve Kuzey Amerikada yaygın) *Gasterosteus aculeatus* balık predatör olarak kullanılmıştır. Balık predatör deneyi 20 °C florasan ışık altında aynı yaşta ve vücut büyüklükleri aynı hamile olmayan dişiler seçilerek gerçekleştirilmiştir. Vücut uzunluğu ve davranış etkisinin balık tercihi yönünde bir etkisinin olup olmadığını ortaya koymak için dişiler tercih edilmiş ama konu ile ilgili hipotezi destekleyecek herhangi bir veri elde edilememiştir. Balık deneyi sonunda yapılan ölçümler neticesinde vücut uzunlukları arasında her iki klon için belirgin bir farklılık gözlemlenmemiştir. Fakat uzun spinli klonda tepe uzunluğu % 69, kaudal spin uzunluğu % 92, kısa spinli formda ise % 14 ve % 61 olarak ölçümlenmiştir. Bu deney 3 tekrarlar gerçekleştirilmiş ve bunun sonucunda hayatta kalma oranlarının uzun spinli türlerde daha fazla olduğu saptanmıştır. Ardından ortam koşulları değiştirilmiş ve karanlıkta aynı deney tekrarlanmıştır. Karanlık ortamda *Daphnia*'ların yarısının tükenmesi sonucu balık ortamdan alınarak deney sonlandırılmıştır (Engel ve ark., 2014).



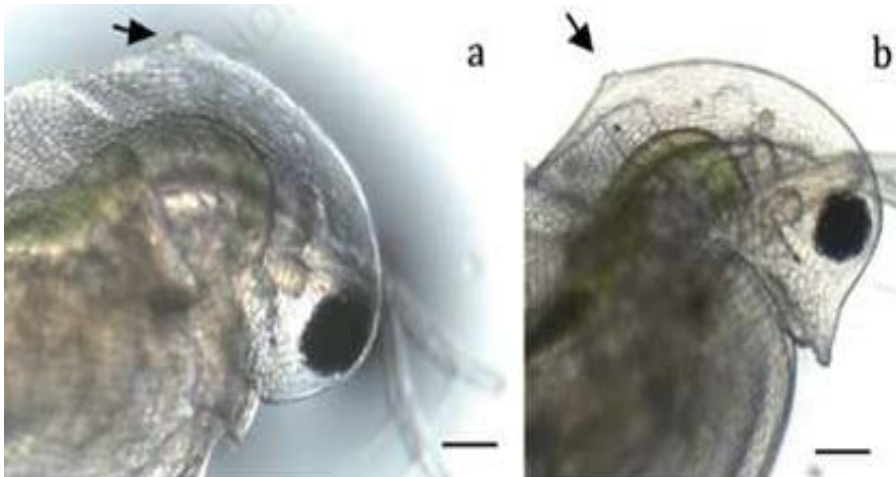
Şekil 1. Predasyon sonucu yetişkin *D. lumholtzi* uzun spin ve kısa spin formlarının hayatta kalım grafiği (Engel ve ark., 2014)

Aynı deneyde omurgasız predatör *Chaoborus*'a karşı gençlerde morfolojik savunmanın ne kadar avantaj sağladığı ortaya konmuştur. Deneyde 1. yenidoğan larva 2. ve 3. genç larvalar seçilip iki *Daphnia lumholtzi* klonu 20 °C'de florasan ışık altında predasyona maruz bırakılmıştır. Deneyde kısa spinli ve uzun spinli türlerin yeni doğan larvaları arasında önemli bir farklılık gözlemlenmemiş, fakat 2. ve 3.'ncü aşama larvalarının uzun spinli türlerinin daha iyi hayatta kaldığı görülmüştür (Şekil 2). Deney sonuçları uzun spinin bir predatöre karşı avantaj olduğunu göstermiştir (Engel ve ark., 2014). Yenidoğanlarda ise belirgin bir farklılık olmamasının nedeni tepe ve spin uzunluklarının vücutlarını koruyabilecekleri boyutlarda olmamasından dolayı *D. pulex* ve *D. cucullata*'da olduğu gibi genç ve yetişkin türlerin daha iyi savunma sağladığı düşünülmüştür (Laforsch ve Tollrian, 2004).



Şekil 2. *Daphnia lumholtzi*'de siklomorfosis (Yurista, 2000)

Siklomorfosisin görüldüğü diğer bir tür *Daphnia pulex* yaz aylarında *Chaoborus*'tan salgılanan kairomonların dışında (sıcaklığın etkisi, besin miktarı gibi etkenlerin etkisiyle) predatörden kaçınma amaçlı mevsimsel bir değişiklik olan karapaksın arka kısmında küçük çıkıntı şeklinde boyun dişini üreterek predasyondan kaçınmıştır (Şekil 3) (Rossi ve ark., 2014).



Şekil 3. Genç *Daphnia pulex* boyun dişi oluşumu a. erkek b. dişi (Rossi ve ark., 2014)

Daphnia magna'da ise *Coloepora* varlığında sıcaklığın siklomorfosisine etkisi araştırılmıştır (Şekil 4). Deney sonucunda

Nisan ayında su sıcaklığı 16 °C iken *Daphnia* siklomorfosis göstermiş ve kaudal spin uzunluğu 20-25 µm, litrede *Coloepora* sayısı

105 olarak ölçümlenmiştir; Mayıs ayında sıcaklığın 24 °C dereceye yükselmesi ile kaudal spin uzunluğu 100-150 µm, litrede bulunan *Claoptera* sayısı 165; Haziran ayında

ise sıcaklığın 28 °C'ye yükselmesi ile kaudal spin uzunluğu 200-250 µm, *Claoptera* sayısı 253 olarak gözlemlenmiştir (Toumi ve ark., 2015).



Şekil 4. *Daphnia magna*'da mevsimsel değişiklikler (Toumi ve ark., 2015)

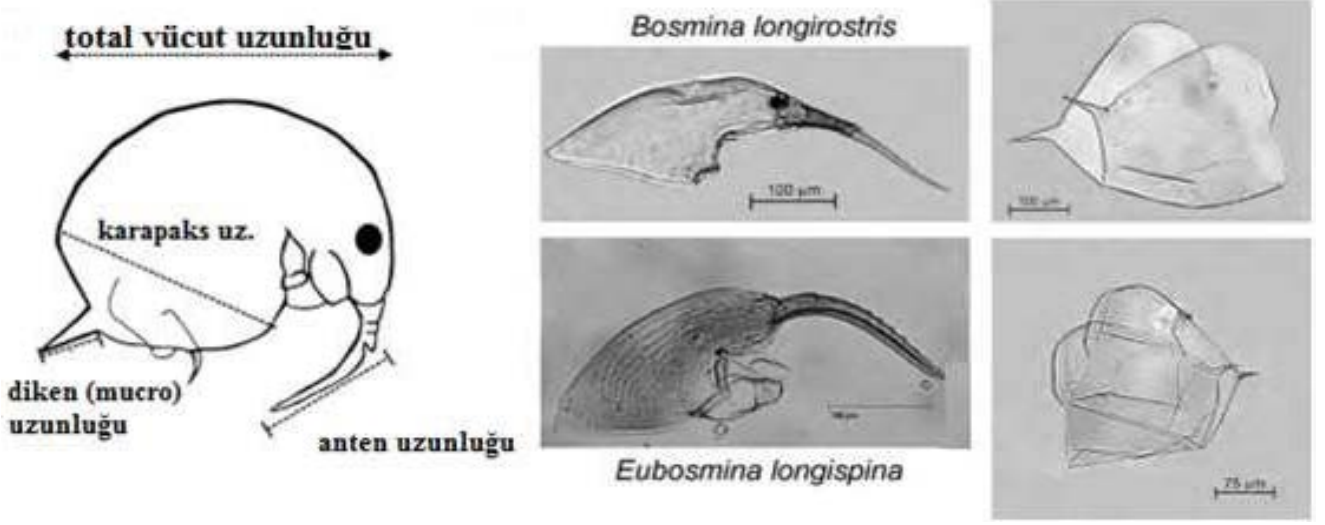
Siklomorfosizin görüldüğü diğer bir tür olan *Bosmina* küçük vücutlu, pelajik ve littoral zonda besinini süzerek elde eden kladoserlerin olduğu göl ve göletlerde yaygın olarak bulunan bir türdür (Korosi ve ark., 2013). Predatör omurgasız kopepot varlığında küçük vücutlu *Bosmina*'da mucro uzunluğu artarken, büyük vücutlu *Eubosmina* türünde anten uzamasında önemli bir büyüme gözlenmez. Bunun nedeni olarak büyük vücudun avantajını kullanan *Eubosmina*'nın daha az savunmasız olmasıdır (Sprules ve

ark., 1984; Wong ve Sprules, 1985).

Bosmina'da uzun antenler karın bölgesine kadar uzanan bir eğri oluşturarak savunmasız yüzme antenleri ve yumuşak olan karın bölgesini predatör saldırılarına karşı bir kalkan olarak korumaktadır (Şekil 5) (Kerfoot, 1975; Sakamoto ve ark., 2007; Sakamoto ve Hanazato, 2008). Teorik olarak *E. longispina*'nın büyük vücut boyutundan dolayı planktivör balık avcılara karşı daha görünür halde olması özellikle büyük boyutlu uzun uzantıları nedeniyle daha fazla

avlanması ve küçük boyutlu *Bosmina*'nın ise balık avcı varlığında vücut büyüklüğünü

azaltması beklenmiştir (Korosi ve ark., 2013).



Şekil 5. *Bosmina*'nın genel görünümü (Korosi ve ark., 2013)

Fakat yapılan deneyler ile bunun böyle olmadığı balık avcının midesinden daha fazla sayıda *Bosmina*'nın çıktığı görülmüştür (Kerfoot, 1975). Bu durumun açıklayıcı nedeni *E. longispina*'nın yazın vücut yapısında küçülmenin meydana gelmesi omurgalı predatöre karşı bir avantaj oluşturmuştur (Black ve Hairston, 1983). *Bosmina longirostris*'in küçük boyutlu olmasına rağmen daha fazla yem olması yüksek oranda göz pigmentasyonu içermesinden kaynaklı bir durum olarak düşünülmüştür (Korosi ve ark., 2013).

Bosmina longirostris'in yeni doğan yavruları üzerine yapılan araştırmada yenidoğanların anten, mucro ve karapaks uzunluklarının sıcaklıkla ters orantılı olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Kışın % 65 olan karapaks uzunluğu yazın % 50'ye, mucro uzunluğu ise kışın % 30'dan yazın % 20'ye düşmüştür. Avlanmaya karşı geliştirilmiş bu

savunmada *B. longirostris*'in yenidoğanlarında bulunan anten ve mucrolar, onların gerçek vücut boyutundan daha büyük olduğu izlenimini vermiş ve kopepot avcılarında kolaylıkla kaçmalarını sağlamıştır. Fakat planktivor balıkların yaz aylarında büyük zooplanktonları, kış aylarında ise omurgasız kopepotların küçük bireyleri avlaması nedeniyle *B. longirostris*'in yaz ayında küçük boyut, kış ayında ise büyük vücut büyüklüğü tercih ederek predatörden kaçtığı ve böyle bir stratejinin diğer kladoserler için geçerli olmadığı ortaya konmuştur (Razak ve Saisho, 2011).

Rotiferlerde Siklomorfozis

Siklomorfozis, lorikalı (sert ya da yarı sert kabuk içeren) rotiferler arasında, genellikle sıcaklık, türbülans, besin kalitesi gibi çevresel faktörler etkisiyle mevcut spin uzaması veya ilave spinler geliştirerek vücut boyutunun uzunluğunda bir artış şeklinde

görülmektedir (Alam, 1998). Bazı rotiferler arasında büyüme şeklinde yaygın olarak görülen değişiklikler şunlardır;

1. Vücut genişliğine göre uzama:

Asplanchna'nın bazı türlerinde, yaz ortasında populasyon genişliği yaklaşık 5 katı olabilir. İlkbaharın sonlarında ve yaz ortasına kadar küresel şekilleri belirgin olarak değişmiştir. Bu uzamış yapılar yaz ortasından bir sonraki ilkbahara kadar kaybolmaktadır (Wetzel, 2001).

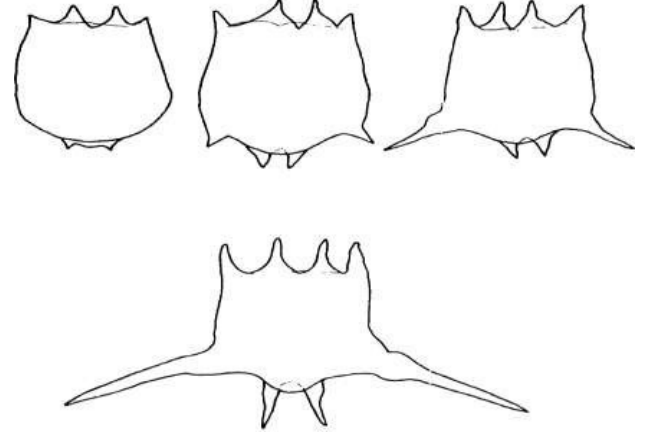
2. Genişleme: Gövde duvarından dışarı doğru büyüme ve tepe oluşumu ile genişleme meydana gelir. *Asplanchna sieboldi*'de tartışıldığı gibi bu mevsimsel değişiklikler bitki kaynaklı besin tokoferol içeriğine bağlı görünmekte ve büyük olasılıkla daha büyük boyutlu besinlerle başa çıkmak için bir adaptasyon olarak düşünülmektedir (Wetzel, 2001).

3. Boyutta meydana gelen azalma:

Genellikle yaz aylarında daha yüksek sıcaklıkta, lorikal spinlerin uzunluğunda orantısız azalma meydana gelir. Bu mekanizma tam olarak belirgin olmasa da bu değişiklik *Keratella*'nın birçok türleri arasında görülmektedir. Yüksek yaz sıcaklığında spin uzunluğundaki azalma ile suda batma hızını artırır ve vücut boyutundaki azalma ile de bunu telafi eder (Wetzel, 2001).

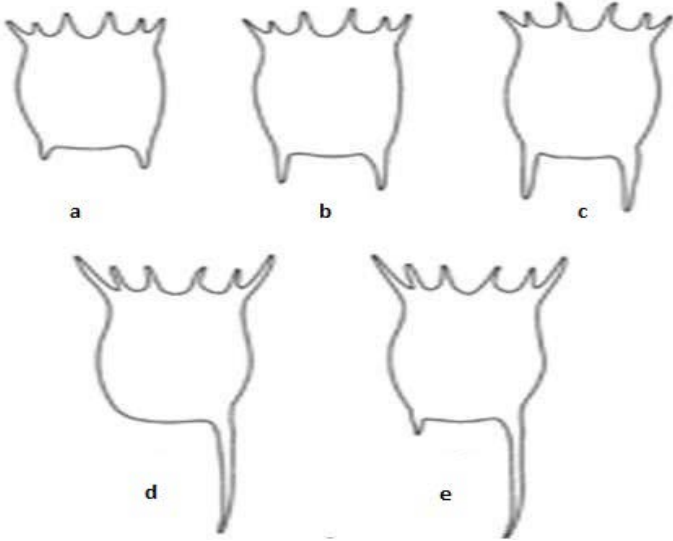
4. Yanal spin üretimi: Siklomorfosizin

bu aşamasında en iyi çalışmalar *Brachionus calyciflorus* üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bu türün büyük yırtıcı rotifer *Asplanchna* varlığında arka spinlerinin uzunluğunda bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 6) (Wetzel, 2001).



Şekil 6. Predatör *Asplanchna* tarafından tetikleyici kairomonun rotifer *Brachionus calyciflorus*'da spin uzamasını tetikler (Gilbert, 1967).

Asplanchna'dan ve bazı kladoserlerden salınan kairomonlar ve sıcaklığın etkisiyle rotiferler değişik morfolojiler sergilemektedir. Bu durumdan yola çıkılarak *K. tropica*'da sıcaklığın sağ, sol spin uzunluğuna ve lorikaya etkisi araştırılmıştır. Sıcaklığın 20 °C'den 15 °C'ye düşmesiyle sol spinde uzama meydana geldiği gözlemlenmiştir. Ortamda *Daphnia* kairomonları varlığında sıcaklık 20 °C'ye yükseldiğinde her iki arka spin ve lorika uzunluğunda artış, *Asplanchna* varlığında diğer predatörlere göre, sağ arka spinde ekstrem uzama, sol spinde azalma lorika uzunluğunda ve her iki ön spinlerde ve ön iç spinlerde dışa doğru uzama tespit edilmiştir (Şekil 7) (Gilbert, 2011).



Şekil 7. *Keratella tropica*'da spin gelişiminin çeşitli varyasyonları

a. Kairomonların olmadığı ortamda sıcaklık 20 ve 25°C b. Ortamda kairomon yokken sıcaklık 10 ve 15 °C, veya *Daphnia*'lı ortam ve sıcaklık 20 °C. c. Ortam *Daphnia*'lı sıcaklık 15 °C. d. *Asplanchna* varlığında sıcaklık 20 °C. e. *Asplanchna* varlığında sıcaklık 15 °C, veya ortamdaki *Asplanchna* ve *Daphnia* varlığında sıcaklık 20 °C (Gilbert, 2011).

Bir dizi doğal populasyon analizleri, *Asplanchna* tarafından ortama salınan kairomonlardan dolayı *B. calyciflorus* populasyonunda arka-yanal spin oluşumunu kanıtlamıştır (Gilbert ve Waage, 1967; Green ve Lan, 1974). *B. calyciflorus*'da hareketli uzun arka-yanal spinler *Asplanchna* tarafından predasyonu önemli ölçüde azaltmıştır. Bu arka-yanal spin uzunluğu su sıcaklığına bağlı olmayıp *Asplanchna* yoğunluğu ve *Asplanchna*'dan salınan maddenin eşik miktarına bağlı olarak değişebilmektedir (Wetzel, 2001).

Yetişkin *A. sieboldi*, *B. calyciflorus*'a ait yetişkinlerin tamamını normal koşullar altında avlayabilmektedir. Fakat morfolojik savunmanın tetiklenmesi ile *B. calyciflorus*'taki yetişkinlerin % 78'i uzun

spinli forma dönüşmektedirler. Bu durumda avlanma oranı *A. sieboldi*'de % 15 ve altına düşer (Wetzel, 2001).

Rotiferler üzerinde predasyon av-avcı etkileşimine bağlı olarak türlere göre değişmektedir. Örneğin, predatör kopepot *Mesocyclops*, rotifer *Asplanchna* ve *Polyarthra* ile etkili beslenirken bir diğer rotifer türü olan *Keratella* ile beslenemez (Gilbert ve Williamson, 1978). Yakalanan *Keratella*, *Mesocyclops* tarafından geri salınır çünkü bu rotiferin yumuşak kısımlarını avcı kaldıramaz ve taşıyamaz. *Asplanchna* düzenli olarak *Keratella* ile beslenirken, etkili kaçış özelliğinden dolayı *Polyarthra* ile beslenemez (Wetzel, 2001).

Kopepodlarda Siklomorfosis

Çok çabuk ve düzensiz yüzen yetişkin kopepotlarda siklomorfosis olayı diğer türler kadar belirgin değildir. Mevsimsel değişiklikler soğuk mevsimlerde (sıcaklığın düşük olduğu aylarda) büyüme oranlarında artış şeklinde ortaya çıkmaktadır (Havel, 2009). Kopepotlar oldukça hareketli olduklarından avcıdan su sıçratarak uzaklaşma mekanizmaları ile kendilerini çoğu rotiferler ve kladoserlere göre, omurgasız predatörlerden çok daha iyi korumaktadırlar (Anonymus, 2016b).

Fitoplanktonda Siklomorfosis

Zooplankton dışında birkaç fitoplanktonda siklomorfosis olayı yazın ortasına kadar sıcaklık artışının etkisiyle koloni oluşumu veya hücresel uzantıların oluşturulması şeklinde görülmektedir (Wetzel,

2001).

Fitoplanktonlarda ağırlığı ve özgül ağırlığı azaltmaya yarayan yağ damlaları, gaz kabarcıkları, jelatinsi zarflar, su kesecikleri, vakuoller gibi yapılar vardır (Tanyolaç, 2011). Bunlardan bazılarında görülen spin, seta ve uzamış vücut yapıları total yüzey alanlarını artırarak batmaya karşı dayanıklılık sağlamaktadır. Canlının ağırlığını azaltıcı ve özgül yüzey alanını artırıcı etmenler sıcaklığa bağlı olarak veya ortamın viskozitesine bir uyum olarak gelişir. Bu nedenle yüzmeye yarayan yapılar, sıcak sularda soğuk sulardakinden daha fazla gereklidir. Örneğin, yeşil alglerden *Scenedesmus* cinsinin fırça ve spinlere sahip olan türleri, bunlara sahip olmayan türlerinden daha iyi yüzücüdürler. Fakat düşük ve yüksek sıcaklıktaki doğal habitatlarda yapılan gözlemler bunu her zaman doğrulamaz. Fitoplanktonik canlılar hacimlerini artırarak, jelatinsi kılıf veya çeşitli çıkıntılar oluşturarak veya kolonileşerek zooplankton beslenmesine karşı korunurlar. Örneğin planktonik bir *Chlorophyta* olan *Sphaerocyttis*'in çeperi jelatinsi bir kılıfla kaplıdır. Bu canlı herbivor bir *Daphnia* tarafından yendiği zaman onun sindirim kanalını yırtar. Buna rağmen krustaselerin çoğu bu canlıları barsaklarına zarar vermeyecek şekilde yutmayı başarırlar (Tanyolaç, 2011). Karsten (1907), uzun spinli *Ceratium* türlerini sıcak sularda gözlemleyen ve bunun adaptif bir karakter olduğunu ortaya koyan ilk araştırmacıdır.

Ceratium sert selüloz zırha (lorika)

sahiptir. Bu özellik onların otçul kladoserler tarafından yem olmalarına engel olmaktadır (Sommer ve ark., 2003). Yapılan deneyler sonucunda *C. hirundinella*'da oluşan spinler balık predatörlerin baskısıyla açıklanmaz. Bunun aksine omurgasız predatör herbivor kladoserlerin beslenme aparatıyla fiziksel temastan kaçmak amaçlı üretilen bir mekanizma olarak açıklanmıştır (Bertolo ve ark., 2010).

Ceratium hirundinella türleri arasındaki bolluk ve morfolojilerini etkileyen faktörler aşağıda belirtildiği gibidir.

1. Bulanıklık: Çeşitli ışık spektrumlarında *C. hirundinella* morfolojisi değişmektedir (Hutchinson, 1957).

2. Planktivor balık varlığı: İki spinli yapılarından ziyade üç spinli yapıları predatör balık tarafından daha etkili bir şekilde ele geçirilmiş ve predatör balıklar arasında negatif bir ilişki gözlenmiştir. Avrupa levreği (*Perca fluviatilis*) ve Çamça balığı (*Rutilus rutilus*) ile yapılan deneyde Çamça balığının üç spinli *C. hirundinella*'yı tükettiği, ama levreklerin küçük partikülleri yakalama yeteneklerinin daha az olmasından dolayı avlanmada başarısız oldukları görülmüştür (Nunn ve ark., 2007).

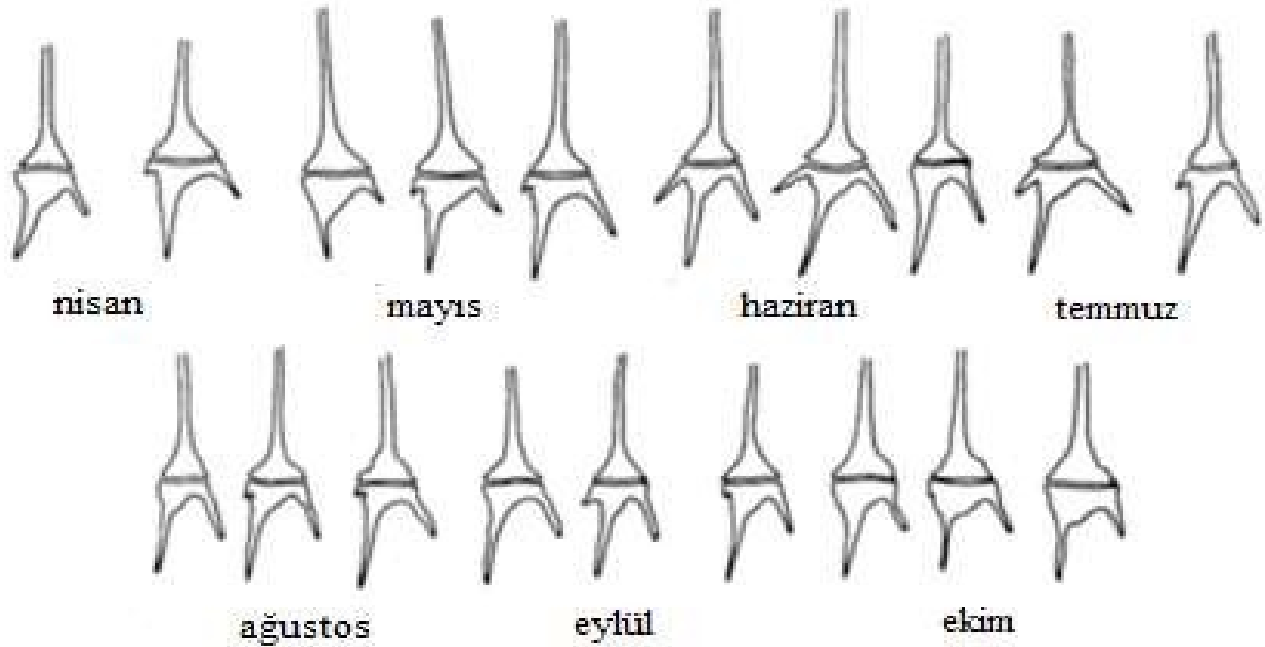
3. Omurgasız yırtıcı varlığı: Üçüncü veya dördüncü bir spin oluşumu avcı rotifer *Asplanchna* varlığında yakalanma olasılığını azaltırken kopepot varlığının *C. hirundinella* morfolojisini etkilemediği görülmüştür. Bunun nedeni kopepotlar için düşük lezzette olmalarıdır (Bertolo ve ark., 2010).

4. Otlama: Besinini süzerek alan

zooplanktonlar ile her ne kadar yenilebilir olmasada *C. hirundinella* morfolojileri arasında pozitif bir ilişki söz konusudur (Bertolo ve ark., 2010). Herbivor kladoserler *C. hirundinella*'da morfolojik çeşitliliğe neden olmaktadır. Gözlemler sonucu *Ceriodaphnia*'nın filtre bölmelerinde *C. hirundinella* hücreleri bulunmuştur. *C. hirundinella*'nın bol olduğu durumlarda büyük kladoserler tarafından önemli ölçüde beslenme gerçekleşir (Xie ve ark., 1998). Herbivor kladoserler filtre edici aparat mekanizmasının işleyişi için geçici olarak solungaç boşluklarında yenilemeyen parçaları tutarlar ve postabdominal uzantılarını kullanarak daha sonra bunları geri dışarı atarlar (Gilbert, 1988; Xie ve ark., 1998). Bunun sonucunda, büyük kladoserlerin hakim olduğu

durumlarda *C. hirundinella* spinlerinde kırıklar gözlemlenmiştir (Cyr ve Curtis, 1999). Bu nedenle üçüncü bir spin oluşumu ile üçten fazla spin görünümü kladoserlerin filtreleme boşluklarında savrulma olasılıklarını düşürerek *C. hirundinella*'nın kırılabilirliğini azaltmaktadır (Bertolo ve ark., 2010).

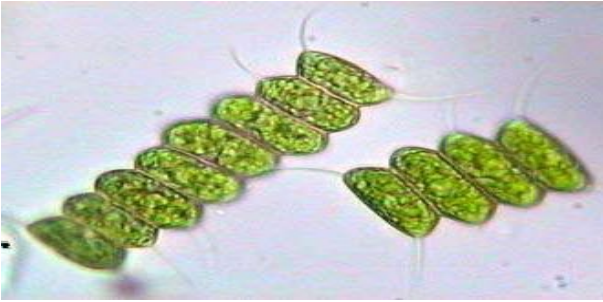
Ceratium'un sıcak sularda spin uzunluğunda artış, hücrelerin genel boyutunda azalma görülmektedir (Şekil 8). Yazın ortasında sıcaklığın artması ile kısa üçüncü bir spin gelişimi gözlenerek bu dörtlü morfoloji azalan viskozite nedeniyle batma oranını azaltmış ve *Ceratium*'un yüzeyle daha fazla kalmalarını sağlamıştır (Wetzel, 2001).



Şekil 8. Sıcaklığa bağlı olarak *Ceratium hirundinella*' da spin gelişimi (Hutchinson GE, 1967)

Morfolojik savunma çeşitli oluşturmaktadır. Bazı herbivorlar küçük predatörlere karşı farklı şekillerde yanıtlar fitoplanktonlarla beslenirken bazıları büyük

boyutlarla beslenme sağlamaktadır. Bu nedenle koloni oluşumu veya küçük tek hücre halinde kalma, fitoplanktonlar için en iyi savunma mekanizmasıdır (Long ve ark., 2007). Örneğin *Daphnia* tarafından salgılanan kairomonlar bir diğer fitoplankton türü olan *Scenedesmus* türünde koloni oluşumunu tetiklemektedir (Hessen ve Van Donk, 1993). *Scenedesmus acutus*, herbivor planktivorlar tarafından salgılanan kairomonlar ve diğer faktörlerin etkisiyle (besin, sıcaklık, ışık) sekiz hücreli bir koloni oluşturmaktadır (Şekil 9) (O'Donnell ve ark., 2013).



Şekil 9. *Scenedesmus* türünde koloni oluşumu (Anonymus, 2016a)

Bunun sonucu olarak daha büyük bir koloni oluşumu ile *Daphnia magna* tarafından beslenme oranlarında azalma görülmüştür (Hessen ve Van Donk, 1993).

Sonuç ve Öneriler

Yukarıdaki bulgular ve konunun örneklerinden anlaşıldığı üzere siklomorfosisin çok karışık bir mekanizma olduğu açıktır. Bu derleme ile siklomorfosisin tanımı ve oluşum sürecine açıklık getirilmesi amaçlanmıştır.

Planktonlar arasında çok farklı biyolojik özelliklere sahip olan siklomorfik karakterlerin, nicelik ve sayı çeşitliliği, durumu daha fazla büyüleyici kılmaktadır. Kapsamlı bir araştırma çalışması ve ılıman bölgelerdeki bir dizi klasik ve modern yayınlar ılıman bölgedeki zooplanktonlardaki siklomorfosisi çok net şekilde ortaya koymaktadır. Sıcaklık değişimleri ve predatör baskısı gibi abiyotik ve biyotik çevrenin etkisiyle oluşan mevsimsel olan bu değişiklikler canlılarda savunma mekanizması olarak hayatta kalım oranlarını artırıcı bir etkiye sahiptir. Tüm bunlardan yola çıkılarak siklomorfosisin canlılar için 2 nedenle gerçekleştirildiği ortaya konulmuştur. Sıcak sularda vizkozitenin azalması canlıların batma hızını artırmaktadır. Bu nedenle yaz sularında meydana gelen uzamış yapılar yüzey alanını genişleterek canlıya yüzmeye kolaylık sağlamaktadır. Bunun dışında siklomorfosis predatörden korunma yöntemi olarak geliştirilmiş bir savunma mekanizması olarak da işlev görmektedir. Avcı varlığında (*Asplancha*'da olduğu gibi) avcı tarafından salgılanan kairomonların *Brachionus calyciflorus*'taki gibi büyük spin oluşumuna veya uzantılara neden olduğu yapılan deneylerle ortaya konmuştur.

Kaynaklar

- Alam A (1998). Studies on the culture and cyclomorphosis of certain freshwater planktonic Rotifers. *Aquaculture and Fisheries Section Department of Zoology Faculty of Life Sciences*, Aligarh Muslim University in India.
- Anonymus (2016a). <http://concerncrisis.blogspot.com.tr/2008/01/scenedesmus.html/>(Erişim Tarihi:14.04.2016)
- Anonymus (2016b). Seasonal changes in zooplankton communities. http://www.people.bethel.edu/Zooplankton_cyclomorph. (Erişim Tarihi: 14.04.2016)
- Beauchamp PDE (1952). Un facteur de la vericabilite chez les rotifers du genre *Brachionus*. *Seances Acad Sci* 234: 219–244.
- Beckius J (2013). Structural cyclomorphosis in populations of low motility zooplankton. University of Wyoming.
- Benndorf J, Kranich J, Mehner T, Wagner A (2001). Temperature impact on the midsummer decline of *Daphnia galeata*: an analysis of long-term data from biomanipulated Bautzen Reservoir (Germany). *Freshwater Biology* 46(2): 199–211.
- Bertolo A, Lacroix G, Lescher-Moutoué F, Hjelm J (2010). Relationship between fish and the number of horns in *Ceratium hirundinella* (Dinophyceae): A food web mediated effect on algal morphology. *J Phycol* 46: 33–40.
- Black RW, Hairston N Jr (1983). Cyclomorphosis in *Eubosmina longispina* in a small North American pond. *Hydrobiologia* 102: 61–67.
- Brooks JL (1965). Predation and relative helmet size in cyclomorphic *Daphnia*. *Proc Natl Acad Sci* 53: 119–126.
- Brooks JL, Dodson SI (1965). Predation, body size and composition of plankton. *Science* 150: 28–35.
- Brooks JL (1966). Cyclomorphosis, turbulence, and overwintering in *Daphnia*. *Verh Int Ver Limnol* 16: 1653–1659.
- Carpenter SR, Kitchell JF, Hodgson JR (1985). Cascading trophic interactions and lake ecosystem productivity. *Bio Science* 35: 635–639.
- Cyr H, Curtis JM (1999). Zooplankton community size structure and taxonomic composition affects size-selective grazing in natural communities. *Oecologia* 118: 306–315.
- Dodson SI (1974). Adaptive change in plankton morphology in response to size-selective predation: A new hypothesis of cyclomorphosis. *Limnol Oceanogr* 19: 721–729.
- Dodson SI (1989). The ecological role of chemical stimuli for the zooplankton: predator induced morphology in *Daphnia*. *Oecologia (Berl.)* 78: 361–367.

- Engel K, Schreder T, Tollrian R (2014). Morphological defences of invasive *Daphnia lumholtzi* protect against vertebrate and invertebrate predators. *J Plankton Res* 36(4): 1140–1145.
- Florkin M (2012). Metabolism and growth, 2012 - books.google.com. Erişim Tarihi: 15.04.2016
- Gilbert JJ (1966). Rotifer ecology and embryological induction. *Science* 151: 1234–1237.
- Gilbert JJ (1967). *Asplanchna* and posterolateral spine production in *Brachionus calyciflorus*. *Arch Hydrobiol* 64: 1–62.
- Gilbert JJ (1988). Susceptibilities of ten rotifer species to interference from *Daphnia pulex*. *Ecology* 69: 1826–1838.
- Gilbert JJ, Waage JK (1967). *Asplanchna*, *Asplanchna*-substance, and posterolateral spine length variation of the rotifer *Brachionus calyciflorus* in a natural environment. *Ecology* 48: 1027–1031.
- Gilbert JJ, Williamson CE (1978). Predator-prey behavior and its effect on rotifer survival in associations of *Mesocyclops edax*, *Asplanchna girodi*, *Polyarthra vulgaris*, and *Keratella cochlearis*. *Oecologia* 37: 13–22.
- Gilbert JJ (2011). Induction of different defenses by two enemies in the rotifer *Keratella tropica*: response priority and sensitivity to enemy density. *Freshwater Biology* 56: 926–938.
- Gliwicz ZM, Lampert W (1990). Food thresholds in *Daphnia* species in the absence and presence of blue-green filaments. *Ecology* 71(2): 691–702.
- Green J, Lan OB (1974) *Asplanchna* and the spines of *Brachionus calydflorus* in two Javanese sewage ponds. *Fresh Water Biology* 4: 223–226.
- Havel JE (2009). Stanley Ivan Dodson: a distinguished ecologist, naturalist, and teacher. *Hydrobiologia* 636: 1–6.
- Hessen DO, Van Donk E (1993). Morphological changes in *Scenedesmus* induced by substances released from *Daphnia*. *Arch Hydrobiol* 127: 129–140.
- Hutchinson GE (1957). A treatise on limnology, 1st ed. Chapman and Hall, 1015, London.
- Hutchinson GE (1967). A treatise on limnology, vol. II. Introduction to lake biology and the limnoplankton. *John Wiley ve Sons*, New York.
- Hutchinson TC (1967). Comparative studies of the ability of species to withstand prolonged periods of darkness. *J Ecol* 55: 291-299.

- Jacobs J (1966). Predation and rate of evolution in cyclomorphic *Daphnia*. *Int Ver Theor Angew Limnol Verh* 16: 1645-1652.
- Jacobs J (1967). Untersuchungen zur funktion and evolution der zyklomorphose bei *Daphnia* mit besonderer berucksichtigung der selektion durch *Fische*. *Arch Hydrobiol* 62: 467-541.
- Karsten G (1907). Das indische phytoplankton. Nach dem Material der Deutschen Tiesee-Expedition 1898-1899. Deutsche Tiefsee- Expedition 1898-1899, 2, 1-328, Taf. 35–54.
- Kerfoot WC (1975). The divergence of adjacent populations. *Ecology* 56: 1298–1313.
- Korosi BJ, Kurek J, Smol PJ (2013). A review on utilizing *Bosmina* size structure archived in Lake sediments to infer historic shifts in predation regimes. *Journal of Plankton Research* 35: 444–460.
- Laforsch C, Tollrian R (2004). Extreme helmet formation in *Daphnia cucullata* induced by small-scale turbulence. *Limnol Oceanogr* 29(5): 1127–1131.
- Long JD, Smalley GW, Barsby T, Anderson JT, Hay ME (2007). Chemical cues induce consumer-specific defenses in a bloom-forming marine phytoplankton. *Proc Natl Acad Sci* 104: 10512–10517.
- Nunn AD, Harvey JP, Cowx IG (2007). The food and feeding relationships of larval and 0+ year juvenile fishes in lowland rivers and connected waterbodies. II. Prey selection and the influence of gape. *J Fish Biol* 70: 743–757.
- O'Donnell DR, Fey SB, Cottingham KL (2013). Nutrient availability influences kairomone induced defenses in *Scenedesmus acutus* (Chlorophyceae). *J Plankton Res* 35(1): 191–200.
- Rabus M, Sollradl T, Schaumann HC, Laforsch C (2013). Uncovering ultrastructural defences in *Daphnia magna* an interdisciplinary approach to assess the predator-induced fortification of the carapace. *Plos One* 8: e67856.
- Razak AS, Saisho T (2011). Cyclomorphism in *Bosmina longirostris* (Crustacea: Cladocera) from Lake Ikeda, Japan. *Sains Malaysiana* 40(6): 543–547.
- Riessen HP (1984). The other side of cyclomorphosis: why *Daphnia* lose their helmets. *Limnol Oceanogr* 29: 1123–1127.
- Riessen HP (2012). Costs of predator-induced morphological defences in *Daphnia*. *Freshwater Biology* 57: 1422–1433.
- Riessen HP, Linleyb RD, Altshulerd L, Rabus M, Söllradl T, Schaumannf HC, Laforsche C, Yan NB (2012). Changes in water chemistry can disable plankton prey defenses. *Pnas*

109: 15377–15382.

- Rossi V, Maurone C, Benassi G, Ferrari I (2014). Reproduction of *Daphnia pulex* in a Northern Italy pond. *J Limnol* 73(3): 459–467.
- Sakamoto M, Hanazato T (2008). Antennule shape and body size of *Bosmina*: key factors determining its vulnerability to predacious Copepoda. *Limnology* 9: 27–34.
- Sakamoto M, Chang KH, Hanazato T (2007). Plastic phenotypes of antennule shape in *Bosmina longirostris* controlled by physical stimuli from predators. *Limnol Oceanogr* 52: 2072–2078.
- Sommer U, Sommer F, Santer B, Zollner E, Jurgens K, Jamieson C, Boersma M, Gocke K (2003). *Daphnia* versus copepod impact on summer phytoplankton: functional compensation at both trophic levels. *Oecologia* 135: 639–647.
- Sprules WG, Carter JCH, Ramcharan CW (1984). Phenotypic associations in the Bosminidae (Cladocera): zoogeographic patterns. *Limnol Oceanogr* 29: 161–169.
- Tanyolaç J (2011). Limnoloji. Tatlı su bilimi. 6.Baskı. Hatipoğlu Yayınları.
- Tollrian R (1995). Predator-induced morphological defences: costs, life history shifts, and maternal effects in *Daphnia pulex*. *Ecology* 76: 1691–1705.
- Tollrian R, Dodson SI (1999). Inducible defenses in Cladocera: constraints, costs, and multipredator environments. In: *The Ecology and Evolution of Inducible Defenses* (Eds R. Tollrian & C.D. Harvell), pp. 177–202.
- Toumi H, Bejaoui M, Boumaiza M (2015). Cyclomorphosis in *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia reticulata* (Cladocera) from northern Tunisian groundwater: influence of temperature and invertebrates? *Crustaceana* 88: 1139–1148.
- Wetzel RG (1983). *Limnology*, 2nd ed. Saunders. College Publisher, Philadelphia.
- Wetzel RG (2001). *Limnological analyses*, 3rd ed. Limnology: lake and river ecosystems.
- Wojtal A, Frankiewicz P, Lotkowska WI (2004). The evaluation of the role of pelagic invertebrate versus vertebrate predators on the seasonal dynamics of filtering Cladocera in a shallow, eutrophic reservoir. *Hydrobiologia* 515: 123–135.
- Wong CK, Sprules WG (1985). Size-selective feeding by the predatory copepod *Epischura lacustris* Forbes. *Can J Fish Aquat Sci* 42: 189–193.
- Xie P, Iwakuma T, Fujii K (1998). Changes in the structure of a zooplankton community during a *Ceratium* (Dinoflagellate) bloom in a eutrophic fishless pond. *J Plankton Res* 20: 1663–1678.
- Yurista PM (2000). Cyclomorphosis in *Daphnia lumholtzi* induced by temperature. *Fresh Water Biology* 43: 207–213.
- Zaret TM (1980). *Predation and freshwater communities*. Yale University Press, New Haven, London, 155–180.

Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi

ISSN 2458-9411 (e-dergi) Dergi web sayfası <http://dergipark.gov.tr/sufefd>

Doç Dr. Evren YILDIZTUGAY, Editör,

Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi,

Biyoteknoloji Bölümü, 42130 Konya, TÜRKİYE

e-mail: selcukfendergi@gmail.com



Makale Gönderme ve Telif Hakkı Devir Sözleşmesi

| | |
|-----------------------|--|
| Makale Başlığı | |
| Yazar(lar) | |

Makaleden sorumlu yazarın bilgileri:

Adı ve Soyadı

Adresi

E-posta

Telefon

Faks

Sunmuş olduğumuz makalenin yazar(lar)ı olarak ben/bizler aşağıdaki konuları taahhüt ederiz:

- Bu makale tarafımı/tarafımızdan yapılmış özgün bir çalışmadır.
- Yazar/Yazarlar olarak makalenin sorumluluğunu üstlenirim/üstleniriz.
- Bu makale başka bir yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere herhangi bir yere yollanmamıştır.
- Yazar/Yazarlar gönderilen makaleyi görmüş ve sonuçlarını onaylamıştır.

Yukarıdaki konular dışında yazar(lar)ın aşağıdaki hakları ayrıca saklıdır:

- Telif hakkı dışındaki patent hakları yazar/yazarlara aittir.
- Yazar/Yazarlar makalenin tümünü kitaplarında ve derslerinde, sözlü sunumlarında ve konferanslarında kullanabilir.
- Satış amaçlı olmayan kendi faaliyetleri için çoğaltma hakları vardır.

Bunun dışında, makalenin çoğaltılması, postalanması ve diğer yollardan dağıtılması, ancak bilim ve yayın kurulunun izni ile yapılabilir. Makalenin tümü veya bir kısmından atıf yapılarak yararlanılabilir.

Ben/Biz bu makalenin, etik kurallara uygun olduğunu ve belirtilen materyal ve yöntemler kullanıldığında herhangi bir zarara ve yaralanmaya neden olmayacağını bildiririz.

Makaleye ait tüm materyaller (kabul edilen veya reddedilen fotoğraflar, orijinal şekiller ve diğerleri), bilim ve yayın kurulunca bir yıl süreyle saklanacak ve daha sonra imha edilecektir.

Bu belge, tüm yazar/yazarlar tarafından imzalanmalıdır. Bütün imzalar, ıslak imza olmalıdır.

| *Yazar(lar) Adı ve Soyadı | Adresi | Tarih | İmza |
|---------------------------|--------|-------|------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

*Satır sayısı, yazar sayısı kadardır. Yetersizse artırılabilir.

Makalenin Editörler Kurulunca yayına kabul edilmemesi durumunda bu belge geçersizdir.



Makaleler, A4 (210 mmx297 mm) boyutunda 12 punto Times New Roman yazı tipinde ve çift satır aralıklı yazılmalıdır. Sayfanın sağında, solunda, altında ve üstünde 2.5'er cm boşluk bırakılmalı ve yazılar sağa-sola dayalı olmalıdır. Makalenin her sayfası ve satırları numaralandırılmalıdır. Yazar ad(lar)ı açık olarak yazılmalı ve akademik unvan belirtilmemelidir. Türkçe hazırlanan makaleler Türk Dil Kurumu'nun son yazım kılavuzu dikkate alınarak yazılmalıdır.

Makale: Türkçe Başlık, Türkçe Öz, Anahtar Kelimeler, İngilizce Başlık, Abstract, Keywords, Giriş, Materyal ve Metot, Araştırma Sonuçları, Tartışma, Teşekkür (varsa), **Kaynaklar** bölümlerinden oluşmalıdır. Bölüm adları koyu yazılmalıdır. Varsa her bir şekil ve tablolar makale içerisinde bahsedildikleri yerden sonra sırayla yerleştirilmelidir.

Başlık: Kısa ve açıklayıcı olmalı, 14 punto ve koyu, kelimelerin ilk harfi büyük olmalı, ortalanarak yazılmalı ve 15 kelimeyi geçmemelidir. İngilizce başlık Türkçe başlığı tam olarak karşılmalı, 14 punto ve koyu yazılmalıdır.

Öz: Türkçe ve İngilizce özlerin her biri 300 kelimeyi geçmemelidir. Türkçe ve İngilizce özlere sırasıyla "Öz" ve "Abstract" kelimeleri kullanılmalıdır. Öz, çalışmanın amacını, nasıl yapıldığını, sonuçları ve sonuçlar üzerine yazar(lar)ın yaptığı değerlendirmeleri içermelidir.

Öz ve Abstract kısımlarında kesinlikle referans kullanılmamalıdır.

Anahtar Kelimeler: Özlerin 1 satır altına, her anahtar kelimenin ilk harfi büyük diğerleri küçük harflerle, mümkünse başlıkta kullanılmayan, çalışmayı en iyi biçimde tanımlayacak en fazla 6 anahtar kelime yazılmalıdır.

Giriş: Bu bölümde; çalışma konusu, gerekçesi, konu ile doğrudan ilgili önceki çalışmalar ve çalışmanın amacı verilmelidir.

Materyal ve Metot: Bu bölümde makalede kullanılan materyal ve metot açıkça belirtilmelidir.

Araştırma Sonuçları: Elde edilen sonuçlar verilmeli, gerekirse çizelge, şekil ve grafiklerle desteklenerek bulgular açıklanmalıdır. Elde edilen bulgular tekrardan kaçınılması amacıyla ya çizelge yada grafik olarak verilmelidir. İstatistiki olarak önemli bulunan faktörler, uygulanan istatistik analiz tekniğine uygun karşılaştırma yöntemi ile yorumlanarak ilgili istatistikler üzerinde harflendirme yapılmalıdır. İstatistiki analiz yönteminin doğru seçilmediği ve/ya analizin gereği gibi yapılmadığı durumlarda editörler kurulu makaleyi değerlendirme dışında tutabilir.

Tartışma: Bulgular çalışma ile ilgili güncel makalelerle tartışılmalı, ancak gereksiz tekrarlardan kaçınılmalıdır. Bulguların başka araştırmalarla benzerlik ve farklılıkları verilmeli, nedenleri açıklanmalıdır.

Teşekkür: Mümkün olduğunca kısa olmalı ve yapılan katkı ifade edilerek verilmelidir.

Kaynaklar: Eserde yararlanılan kaynaklara ilişkin atıf metin içinde "(Yazarın soyadı, yıl)" yöntemine göre yapılmalıdır. Örnek: (Yıldızıtugay, 2006), (Yıldızıtugay ve Küçüköğdük, 2012). Yazara atıf yapılırsa sadece yayının yılı parantez içine alınmalıdır. Örnek: Yıldızıtugay (2006)'a göre ya da Bağcı ve Küçüköğdük (2000). Üç ya da daha fazla yazar için makale içindeki atıfta Türkçe makalelerde "ve ark." ; İngilizce makalelerde "et al." kullanılmalıdır. Örnek: (Yıldızıtugay ve ark., 2014), (Yıldızıtugay et al., 2014) veya Özfidan-Konakçı ve ark. (2015)'e göre. Aynı yazarın aynı yıl içinde 1'den fazla yayını varsa, yıldan sonra küçük harfler verilmelidir. Örnek: (Yıldızıtugay ve ark., 2014a). Aynı yazarın birden fazla yayınına atıf yapılacaksa yıldan sonra noktalı virgül (;) işareti ile ayırt edilmelidir. Örnek: (Yıldızıtugay, 2012; 2013; 2014). Birden fazla atıf yapılırsa atıflar arasında noktalı virgül (;) kullanılmalıdır. Örnek: (Yıldızıtugay ve Küçüköğdük, 2012; Yıldızıtugay ve ark., 2014; Yıldızıtugay, 2006).

Kaynaklar bölümünde metin içinde atıf yapılan tüm kaynaklar alfabetik olarak (yazarların soyadlarına göre) ve orijinal dilinde verilir. Dergi isimleri italik yazılmalıdır. **Kongre kitaplarında Türkçe ya da yabancı dilde özeti yayınlanmış çalışmalara atıf yapılamaz.** Makaledeki yanlış atıf ve kaynak gösterimlerine ait sorumluluk yazar(lar)a aittir.

Dergi:

Asada K (2006). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 601-639.

Madhava Rao KV and Sresty TVS (2000). Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon pea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh] in response to Zn and Ni stresses. *Plant Sci* 157: 113-128.

Liu ZJ, Guo YK, Bai JG (2010a). Exogenous hydrogen peroxide changes antioxidant enzyme activity and protects ultrastructure in leaves of two cucumber ecotypes under osmotic stress. *J Plant Growth Regul* 29: 171-183.

Kitap:

Kılınç M, Kutbay HG (2008). Bitki Ekolojisi. Palme Yayıncılık, Ankara.

Odum EP (1971). Fundamentals of Ecology, Third Edition, W.B. Saunders Company, London.

Kitabın Bir Bölümü:

Babaoğlu M, Yorgancılar M, Akbudak MA (2001). Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri. (Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), *Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları*, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 1-35.

Eteve G (1985). Breeding for tolerance and winter hardiness in pea. In Hebblethwaite PD, Heath MC, Dawkins TCK (Eds) *The pea Crop: A Basis for Improvement*. Butterworths, London. UK, pp. 131-136.

Yazarı Belirtilmeyen Kurum Yayınları:

TÜİK (2012). Tarım İstatistikleri Özeti. Türkiye İstatistik Kurumu, Yayın No: 3877, Ankara

İnternette Alınan Bilgi:

FAO (2013). Production and trade statistics. <http://www.fao.org/economic/ess/ess-trade/en/> (Erişim tarihi:02.10.2013)

Şekiller ve Tablolar: Şekil, grafik, fotoğraf ve benzerleri "Şekil", sayısal değerler ise "Tablo" olarak belirtilmelidir. Tüm şekil ve tablolar makalenin içine yerleştirilmelidir. Şekil ve tabloların boyu tek sayfa düzeninde en fazla 16x20 cm ve çift sütun düzeninde ise genişliği en fazla 8 cm olmalıdır. Şekil ve tabloların boyutu baskıda çıkabilecek çözünürlükte olmalıdır. Araştırma sonuçlarını destekleyici nitelikteki resimler 600 dpi çözünürlüğünde "jpeg" formatında olmalıdır. Her tablo ve şekle metin içerisinde atıf yapılmalıdır. Tüm tablo ve şekiller makale boyunca sırayla numaralandırılmalıdır (**Tablo 1** ve **Şekil 1**). Tablo ve şekil başlıkları ve açıklamaları kısa ve öz olmalıdır. Şekil ve tablo başlık yazıları 10 punto, şekil ve tabloların içindeki yazılar 9 punto, tablo altı yazılar 8 punto Times New Roman yazı karakterinde olmalıdır. Tablo ve şekillerde kısaltmalar kullanılmış ise hemen altına bu kısaltmalar açıklanmalıdır.

Birimler: Tüm makalelerde SI (System International d'Units) ölçüm birimleri kullanılmalıdır. Ondalık kesir olarak kullanılmamalıdır (1,25 yerine 1.25 gibi). Birimlerde "/" kullanılmamalı ve birimler arasında bir boşluk verilmelidir (m/s yerine m s⁻¹, J/s yerine J s⁻¹, kg m/s² yerine kg m s⁻² gibi). Sayı ile sembol arasında bir boşluk bırakılmalıdır (4 kg N ha⁻¹, 3 kg m⁻¹ s⁻², 20 N m, 1000 s⁻¹, 100 kPa, 22 °C gibi). Bu kuralın istisnaları düzlemsel açılar için kullanılan derece, dakika ve saniye sembolleridir (°, ' ve "). Bunlar sayıdan hemen sonra konmalıdır (10°, 45', 60" gibi). Litrenin kısaltması "l" olarak belirtilmelidir. Cümle sonunda değillerse sembollerin sonuna nokta konulmamalıdır (kg, değil kg).

Formüller: Formüller numaralandırılmalı ve formül numarası formülün yanına sağa dayalı olarak parantez içinde gösterilmelidir. Formüllerin yazılmasında Word matematik işlemcisi kullanılmalı, ana karakterler 12 punto, değişkenler italik, rakamlar ve matematiksel ifadeler düz olarak verilmelidir. Metin içerisinde atıf yapılacaksa "Eşitlik 1" biçiminde verilmelidir (...ilişkin model, Eşitlik 1' de verilmiştir).

Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi

Fen Dergisi Editörlüğü

42130 Kampüs/KONYA

Faks: 0 332 241 24 99

E-mail: selcukfendergi@gmail.com

Web Sayfası: <http://dergipark.gov.tr/sufefd>



İÇİNDEKİLER (CONTENTS)



- Bir Kez İyonlaşmış Argon (Ar II)'da Geçiş Olasılığı Hesaplamaları**107-116
The Calculation of Transition Probabilities in Singly Ionized Argon (Ar II)
Şule ATEŞ, Yağmur Nuray ATEŞ
- M-Matrisleri Üzerine Bir Eşitsizlik**117-120
An Inequality on M-Matrices
Ali ÖZDEMİR
- Mısır Ekmeğindeki Fitik Asit Miktarını Etkileyen Faktörlerin Belirlenmesinde Yanıt Yüzey Yöntemi Yaklaşımı**121-134
Some Factors in the Effective Amount of Corn Bread Phytic Acid with Response Surface Method Approach
Duygu KILIÇ, Hülya BAYRAK, Berrin ÖZKAYA
- Böcek Dokularından DNA İzolasyonu Yöntemlerinin Kalite, Verim ve Maliyet Açısından Karşılaştırılması**135-148
Comparison of DNA Isolation Methods From Insect Tissues in Terms of Quality, Yield and Cost
Murat GÜLER, Filiz TOKGÖZ, Ertan Mahir KORKMAZ, Mahir BUDAK
- Deri Endüstrisinde Kullanılan Metilizotiazolinon İçeren Antimikrobiyal Maddenin Referans Suşlar Üzerine Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu**149-156
Minimum Inhibition Concentration of an Antimicrobial Agent Containing Methylisothiazolinone Used in Leather Industry Against Reference Strains
Pınar ÇAĞLAYAN
- Yumurtaya Verilen Siklofosfamid ve C Vitamini'nin Tavuk Embriyoları Üzerindeki Bazı Etkileri** 157-173
Some Effects of Cyclophosphamide and Vitamin C Given in ovo on Chicken Embryos
Haluk ÖZPARLAK, Bülent ÇELİK, Döndü BALTA
- Bitki Patojeni Virüslerde Proteaz Tipleri ve Fonksiyonları**.....175-186
Protease Types and Functions of Plant Pathogenic Viruses
Şerife TOPKAYA, Filiz ERTUNÇ
- Planktonlarda Siklomorfozis Üzerine Derleme**.....187-202
A Review About Cyclomorphosis in Plankton
Duygu BERDİ, Evren YILDIZTUGAY, Mustafa KÜÇÜKÖDÜK, Ahmet ALTINDAĞ

Ekim 2018

Cilt: 44

Sayı : 2