

ISSN 1308-5301 Print
ISSN 1308-8084 Online

Biological Diversity and Conservation

CİLT / VOLUME 12

SAYI / ISSUE 3

ARALIK / DECEMBER 2019

Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma Üzerine Yayın Yapan Hakemli Uluslararası Bir Dergidir
An International Journal is About Biological Diversity and Conservation With Refree



BioDiCon
Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma
Biological Diversity and Conservation

Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma Üzerine Yayın Yapan Hakemli Uluslararası Bir Dergidir
An International Journal is About Biological Diversity and Conservation With Refree
Cilt / Volume **12**, Sayı / Issue **3**, Aralık / December **2019**

Editör / *Editor-in-Chief*: Ersin YÜCEL

ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online

Açıklama

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

Description

"Biological Diversity and Conservation" journal is an international, scientific, online and print journal published in accordance with independent, unbiased, and double-blinded peer-review principles. This journal is an international journal, about biological diversity and conservation with refree. "Biological Diversity and Conservation" publishes experimental studies on all aspects of biological diversity, original manuscripts, reviews on current topics, case reports, editorial comments and letters to the editor that are prepared in accordance with the ethical guidelines. This journal accepts research on biological diversity, biotechnology, botanic, conservation, ecology, endangered habitats, endangered species, environmental science, ethnobotany, farming, food, forestry, genetics, medicinal plants, medicine, microorganisms, other organisms, pharmacology, zoology. Descriptive or experimental studies presenting clear research questions are accepted. Manuscripts in English or in Turkish languages are welcome. Printed in Turkey. This journal is published triannullay.

Dergiyi tarayan veri tabanları / Abstracted-Indexed in

EBSCO; Genamics JournalSeek Database; Index Copernicus; InfoBaseIndex; International Institute of Organized Research, I2OR; Google Scholar, OhioLINK Databases-OPC4-Online-Katalog der Bibliothek der Fachhochschule Anhalt; Online-Katalog der UB Clausthal; Turkey Citation Index; Ulakbim; Clarivate Analytics Thomson Reuters, Zoological Record.

Kütüphaneler / Libraries

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

Clarivate Analytics Thomson Reuters, Zoological Record Impact Factor, 5.00

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

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

Yazışma Adresi / Correspondance Adres: Prof. Ersin YÜCEL, P.K. 86, İki Eylül PTT Merkez, 26000 Eskişehir / Turkey
E-posta / E-mail : biodicon@gmail.com ; **Web Address:** <http://www.biodicon.com>

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

Ege University, Faculty of Engineering,
Department of Food Engineering, Izmir,
Turkey

E-mail: ilkinyucel@yahoo.com

Associate Editors

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

Birgül YELKEN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Statistical Editor

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

Alan editörleri/ Field Editors

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ergin Hamzaoğlu

Gazi University, Gazi Faculty of Education,
Science Education Depart., Ankara, Turkey
E-mail: erginhamzaoglu@yahoo.com

Fahrettin AKYÜZ; Eskişehir Osmangazi
University, Faculty of Medicine, Medical
Biochemistry, Eskişehir, Turkey

E-mail: fakyuz@ogu.edu.tr

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

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

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

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

Muhsin KONUK; Üsküdar University,
Engineering and Natural Sciences, Molecular
Biology and Genetics, 34662 Üsküdar-
Istanbul, Turkey
E-mail: mkonuk@gmail.com

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

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

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

Snejana DONCHEVA; Bulgarian
Academy of Sciences, Institute of Plant
Physiology, Department of Mineral Nutrition
and Water Relations, Sofia, Bulgaria
E-mail: doncheva@obzor.bio21.bas.bg

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

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

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

Language Editors

Okan SEZER; Eskişehir Osmangazi
University, Department of Biology, Art and
Science Faculty, Meşelik, Eskişehir/Turkey
E-mail: okanszr@gmail.com

Burcu SEZER; Süleyman Şah Anatolian
High School, Eskişehir/Turkey
E-mail: burcusezer89@gmail.com

Hakemler/ Reviewer

Abdullah Altunışık, Rize (Turkey)
 Ahmet Aksoy, Antalya (Turkey)
 Ahmed Bakrim, Kbouribga (Morocco)
 Ahmet Mert, Isparta (Turkey)
 Ali Dönmez, Ankara (Turkey)
 Ali Kandemir, Erzincan (Turkey)
 Amed Aarab Azmani, Tangier (Morocco)
 Anath Bandhu Das Ankara (Turkey)
 Arif Cemal Özsemir (Bafra) (Turkey)
 Arzu Morkoyunlu Yüce Kocaeli (Turkey)
 Atilla Ocak, Eskişehir (Turkey)
 Ayçin Akınal, Konya (Turkey)
 Ayçin Yılmaz, Konya (Turkey)
 Ayla Kaya, Eskişehir (Turkey)
 Aysel Bekleyen, Diyarbakır (Turkey)
 Ayşen Türk, Eskişehir (Turkey)
 Aziz Türkoğlu, Muğla (Turkey)
 Betül Gıdık, Bayburt (Turkey)
 Betül Y. ÖZTÜRK, Eskişehir (Turkey)
 Burak Arıca, Kastamonu (Turkey)
 Burcu Yılmaz Çıtak, Konya (Turkey)
 Bülent Turgut, Artvin (Turkey)
 Cahit Doğan, Ankara (Turkey)
 Carmen Galán Soldevilla, Cordoba (Spain)
 Cem Dalyan, İstanbul (Turkey)
 Cemil Ata, İstanbul (Turkey)
 Cengiz ACAR, Trabzon (Turkey)
 Çiler Meriç, Trakya (Turkey)
 Dalila Boust, Taounate (Morocco)
 Dani Sarskova, S. Seifullin (Kazakistan)
 Deniz Ergüden, İskenderun (Turkey)
 Derya Yıldırım, Isparta
 Duran Katar, Eskişehir (Turkey)
 Emel Uslu, Bolu (Turkey)
 Emre Sevindik, Aydın (Turkey)
 Erdoğan Atmış, Bartın (Turkey)
 Ergin Hamzaoğlu, Ankara (Turkey)
 Erhan Çalışkan, Trabzon (Turkey)
 Ersin Demirel, Antakya (Turkey)
 Ersin Karabacak, Çanakkale (Turkey)
 Esat Çetin, Sakarya (Turkey)
 Esra Martin, Konya (Turkey)
 Fahrettin Tilki, Artvin (Turkey)
 Faruk Selçuk, Kırşehir (Turkey)
 Fatih Satıl, Balıkesir (Turkey)
 Fatih Temel, Artvin (Turkey)
 Fatma Kandemir Çevik, Adana (Turkey)
 Fatmagül Geven, Ankara (Turkey)
 Fazle Subhan, Peshawar, (Pakistan)
 Feyza Candan, Manisa (Turkey)
 Filiz Savaroğlu, Eskişehir (Turkey)
 Filiz Yılmaz Eskişehir (Turkey)
 Gencay Akgül, Nevşehir, (Turkey)
 Gökhan Abay, Çankırı (Turkey)
 Gözde-Elgin Cebe, İzmir (Turkey)
 Gülriş Bayçu, İstanbul (Turkey)
 Gülsen Kendir, İstanbul (Turkey)
 Gülşah Özyiğitöğlu, İstanbul (Turkey)

H. Barış Özel, Bartın (Turkey)
 H.Askin Akpulat, Erzurum (Turkey)
 Haider Abbas, Karachi (Pakistan)
 Halil Koç, Sinop (Turkey)
 Hamdi Aydın, Kocaeli (Turkey)
 Handan Uçun Özel, Bartın (Turkey)
 Hasan Akgül, Gaziantep (Turkey)
 Hasan Korkmaz, Elazığ (Turkey)
 Hasan Özçelik, Isparta (Turkey)
 Hatice Kiremit Özenoğlu, Aydın (Turkey)
 Hatice Nurhan Büyükkartal, Ankara (Turkey)
 Hayri Duman, Ankara (Turkey)
 Hülya Altuntaş, Eskişehir (Turkey)
 Hüseyin Dural, Konya (Turkey)
 Ihsan A. Al-Shehbaz, Missouri (USA)
 Ilgaz Akata, Ankara (Turkey)
 İltif Ullah , Nowshera (Pakistan)
 İbrahim Turna, Trabzon (Turkey)
 İbrahim Türkekul, Tokat (Turkey)
 İnci Kravkaz, Kastamonu (Turkey)
 İrfan Albayrak, Kırıkkale (Turkey)
 İsa Başköse Ankara (Turkey)
 Kadriye Uruç Parlak, Ağrı (Turkey)
 Kerim Çiçek, İzmir (Turkey)
 Khalid M. Khawar, Ankara (Turkey)
 M. Ufuk Özbek, Ankara (Turkey)
 Malik Faisal, İslamabad (Pakistan)
 Manzoor Ahmad, İslamabad (Pakistan)
 Marjan Komnenov, Skopje (Macedonia)
 Maryam Keshavarzi, Tehran (Iran)
 Mehmet Candan, Eskişehir (Turkey)
 Mehmet Sağiroğlu, Sakarya (Turkey)
 Mehmet Sincik, Bursa (Turkey)
 Mehmet Tekin Sivas (Turkey)
 Menderes Çenet, Osmaniye (Turkey)
 Meral Yılmaz Cankılıç, Eskişehir
 Mesut Kırmacı, Aydın (Turkey)
 Mohammed Merzouki, Fez (Morocco)
 Muammer Bahşi, Elazığ (Turkey)
 Muhammad Sarwar, Jam (Pakistan)
 Muhammad Yasin Ashraf, (Pakistan)
 Murat Alan, Karabük (Turkey)
 Murat Kuşat, Bitlis (Turkey)
 Mustafa Yamaç, Eskişehir (Turkey)
 Müge Sayitoğlu, İstanbul (Turkey)
 Nalan Yılmaz Sarıoğlu, Eskişehir (Turkey)
 Naşit İğci, Nevşehir (Turkey)
 Necdet Değermenci, Kastamonu (Turkey)
 Nesil Ertoran, Eskişehir (Turkey)
 Nilsun Demir, Ankara (Turkey)
 Nurcan Yiğit, Kastamonu (Turkey)
 Nurdilek Gülmezoğlu, Eskişehir (Turkey)
 Nurhayat Dalkıran, Bursa (Turkey)
 Nuri Öner, Çankırı (Turkey)
 Nursel Aşan Baydemir, Kırıkkale (Turkey)
 Nursel Aşan Baydemir, Kırıkkale (Turkey)
 Oğuzhan Kaygusuz, Denizli (Turkey)
 Olga Sak, Balıkesir (Turkey)
 Onur Koyuncu, Eskişehir (Turkey)
 Ömer Koray Yaylacı, Eskişehir (Turkey)

Özgür Emiroğlu, Eskişehir (Turkey)
 Rasime Demirel, Eskişehir (Turkey)
 Recep Sulhi Özkütük, Eskişehir (Turkey)
 Rıza Binzet, Mersin (Turkey)
 Robert Angus, London (England)
 Saleem Ahmad, İslamabad (Pakistan)
 Salman Khan, Uttarkhand (India)
 Saye Nihan Çabuk, Eskişehir (Turkey)
 Seda Erkan Buğday, Kastamonu (Turkey)
 Seher Karaman Erkul, Aksaray (Turkey)
 Selami Selvi, Balıkesir (Turkey)
 Selima Singh, West Bengal (India)
 Serap Pulatsü, Ankara (Turkey)
 Serdar Aslan, Düzce (Turkey)
 Serdar Gökhan Şenol, İzmir (Turkey)
 Serdar Makbul, Rize (Turkey)
 Serkan Gülsoy, Isparta (Turkey)
 Sevda Kırbağ, Elazığ (Turkey)
 Seyit Ahmet Sargın, Alanya (Turkey)
 Sezgin Çelik, İstanbul (Turkey)
 Sezgin Özden, Çankırı (Turkey)
 Shyam Singh Yadav, Lae (New Guinea)
 Sinan Güner, Artvin (Turkey)
 Snejana Doncheva, Sofia (Bulgaria)
 Sumaira Sahren, İslamabad (Pakistan)
 Sunil Kumarkhan, Magra, Hooghly (India)
 Şahane F. Arslanoğlu, Samsun (Turkey)
 Şengül Aksan, Akseki-Antalya (Turkey)
 Şeniz Karabıyıklı, Tokat (Turkey)
 Tahir Atıcı, Ankara (Turkey)
 Tamer Keçeli, Çankırı (Turkey)
 Taner Özcan, Balıkesir (Turkey)
 Tarkan Yorulmaz, Çankırı (Turkey)
 Temel Özek, Eskişehir (Turkey)
 Tuğba Bayrak Özbucak, Ordu (Turkey)
 Turan Arabacı, Malatya (Turkey)
 Turgay Dindaroğlu, K. Maraş (Turkey)
 Tülay Ezer, Niğde (Turkey)
 Ufuk Coşgun, Karabük (Turkey)
 Ümit Subaşı, İzmir (Turkey)
 Ümit Şirin, Eskişehir (Turkey)
 Ünal Özelmaz, Eskişehir (Turkey)
 Yavuz Bülent Köse, Eskişehir (Turkey)
 Yeşim Dağlıoğlu, Ordu (Turkey)
 Yeşim Kara, Denizli (Turkey)
 Yusuf Uzun, Van (Turkey) (Turkey)
 Zafer Ölmez, Artvin (Turkey)
 Zafer Yücesan, Trabzon (Turkey)
 Zekiye Kocakaya, Yozgat (Turkey)
 Zeynel Arslangündoğdu, İstanbul (Turkey)
 Zia Ullah, Beijing (China)



Antioxidative effects of tannic acid, cacao oil and st. john's wort oil on the oxidative stress induced by cadmium in packed human erythrocytes

İbrahim Uğur ÇALIŞ^{*1}, Ahu SOYOCAK², Aylin DAL¹, Hülyam KURT¹, Ertuğrul ÇOLAK³,
Didem TURGUT COŞAN¹

ORCID: 0000000329072035; 0000000309992774; 0000000233829451; 0000000324339925; 0000000332511043;
0000000284886405

¹ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Eskişehir, Turkey

² İstanbul Aydın Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, İstanbul, Turkey

³ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyoistatistik AD, Eskişehir, Turkey

Abstract

Cadmium (Cd) is among the heavy metals causing environmental pollution and can cause temporary or permanent oxidative stress in the cells. Antioxidative enzyme mechanisms may be inadequate in the response of living organisms to oxidative stress caused by these toxic substances. In this study, in order to prevent Cd induced oxidative stress, the possible protective effects of (TA), cacao oil (CO) and St. John's Wort oil (JWO) on lipid erythrocytes and antioxidant enzymes were investigated. We prepared packed erythrocytes from the blood samples of 7 healthy volunteers. Experiment groups consisting of control, Cd, TA, CO, JWO and their combinations (Cd+TA, Cd+CO ve Cd+JWO) were arranged. In all groups, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured. Comparisons between groups of normally distributed variable were evaluated by One-Way variance analysis (ANOVA). Comparisons between groups of not normally distributed variable were evaluated by Kruskal-Wallis test. After Cd administration SOD activity was increased in TA (3507± 68.2 u/gHb), CO (3518 ±170.0 u/gHb) and JWO (3469±249.5 u/ gHb) groups compared to Cd group. After Cd administration MDA levels were decreased in CO (52,1±24,3 nmol/gHb) and JWO (54,1±23,7 nmol/gHb) groups compared to Cd group. However, it did not change in the TA (61,5±50,0 nmol/gHb) group. After Cd administration CAT activity was increased in TA (228,2±31,3 u/gHb), CO (281,6±295,3 u/gHb) and JWO (267,8±69,4 u/gHb) groups compared to Cd group (196,2±223,0 u/gHb). These results indicate that HF and SCI may reduce Cd-induced oxidative stress, but TA is not very effective in terms of MDA levels. These data obtained in terms of other studies may be guiding.

Key words: cadmium, oxidative stress, human erythrocytes

----- * -----

İnsan eritrosit paketinde kadmiyum ile indüklenen oksidatif strese tannik asit, kakao ve sarı kantaron yağının antioksidatif etkileri

Özet

Kadmiyum (Cd), çevre kirliliğine neden olan ağır metaller arasında yer almakta ve hücrelerde geçici veya kalıcı oksidatif strese sebep olabilmektedir. Bu toksik maddelerin oluşturduğu oksidatif strese canlı organizmaların oluşturduğu yanıtta antioksidatif enzim mekanizmaları yetersiz kalabilmektedir. Bu çalışmada, Cd ile indüklenen oksidatif stresi önlemek amacıyla, antioksidan etkileri bilinen tannik asit (TA), kakao yağı (KY) ve sarı kantaron yağının (SKY) insan eritrositlerindeki lipit peroksidasyonu ve antioksidan enzimler üzerine olası koruyucu etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada, 7 sağlıklı gönüllüden kan örnekleri alınarak eritrosit paketleri hazırlanmıştır. Hazırlanan eritrosit paketlerinden kontrol, Cd, TA, KY, SKY ve kombinasyonlarını (Cd+TA, Cd+KY ve Cd+SKY) içeren deney grupları oluşturulmuştur. Tüm gruplarda süperoksit dismutaz (SOD), malondialdehit (MDA) ve katalaz (KAT) enzim düzeyleri ölçülmüştür. Normal dağılım gösteren ve göstermeyen değişken grupları arasındaki karşılaştırmalar Tek Yönlü Varyans

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905333662680; Fax.: +905333662680; E-mail: ugur0620@gmail.com

analizi (ANOVA) ve Kruskal-Wallis testi ile değerlendirilmiştir. SOD aktivitesinin Cd grubuna göre (3231±214,6 ü/gHb), Cd uygulaması sonrası TA (3507±168,2 ü/gHb), KY (3518±170,0 ü/gHb) ve SKY (3469±249,5 ü/gHb) uygulanan gruplarda arttığı gözlemlendi. MDA aktivitesinin Cd grubuna göre (60,3±14,9 nmol/gHb), Cd uygulaması sonrası KY (52,1±24,3 nmol/gHb) ve SKY (54,1±23,7 nmol/gHb) uygulanan gruplarda azaldığı ancak TA (61,5±50,0 nmol/gHb) uygulanan grupta değişmediği gözlemlendi. KAT aktivitesinin Cd grubuna göre (196,2±223,0 ü/gHb), Cd uygulaması sonrası TA (228,2±31,3 ü/gHb), KY (281,6±295,3 ü/gHb) ve SKY (267,8±69,4 ü/gHb) uygulanan gruplarda arttığı gözlemlendi. Bu sonuçlar KY ve SKY'nin Cd ile indüklenen oksidatif stresi azaltabileceğini ancak MDA düzeyleri açısından TA'nin çok fazla etkili olmadığını göstermektedir. Yapılacak diğer çalışmalar açısından elde edilen bu veriler yol gösterici olabilecektir.

Anahtar kelimeler: kadmiyum, oksidatif stres, insan eritrositi

1. Giriş

Oksijen, yaşam için oldukça önemlidir. Fakat metabolizma sonucu ortaya çıkan bazı reaktif oksijen türleri hücre ve dokulara zarar verme potansiyeline sahiptir [1, 2]. Reaktif oksijen türleri moleküler oksijenle kıyaslandığında kimyasal olarak daha aktif yapıdadırlar [3]. Hücrelerdeki oksijen metabolizması gibi endüstriyel atık kirliliği, radyasyon, pestisitler ve kirlenmiş sular serbest radikallerin oluşumuna yol açabilmektedir [4]. Metabolizma sonucu oluşan, O²⁻ (süperoksit radikali), OH (hidroksil radikali) ve H₂O₂ (hidrojen peroksit) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) DNA'da kırıklara neden olurken bazların yapısını bozmaktadırlar [4]. Hücrenin normal redoks durumunun bozulmasıyla peroksitler ve serbest radikallerin üretilmesiyle protein, lipid ve DNA'da dahil olmak üzere hücrenin tüm kısımları zarar görmektedir [5].

Kadmiyum (Cd), nikel-kadmiyum piller, boyalar, plastikler, elektrokimya gibi endüstriyel atıkların suya ve çevreye karışmasıyla bitkilerde birikmektedir. Bitkilerde biriken bu Cd'un büyük bir kısmı gıda ve su yolu ile birlikte canlıya geçmektedir. Bunların yanında sigara tüketimiyle de Cd maruziyeti olmaktadır. Cd insanlarda ve hayvanlarda serbest radikal oluşumuna yol açarak, hücresel seviyede hasarı indüklemekte aynı zamanda hücresel redoks tepkimelerinde önemli olan onarım sürecine de hasar vermektedir [6].

Sıçan karaciğer, böbrek ve beyin dokularında oluşan oksidatif hasara karşı antioksidan ajanlar olan vitamin C, vitamin E ve tannik asit gibi polifenolik bileşenler etkili olabilmektedir. Taninlerce zengin tannik asit, çay, kahve, üzüm, fındık gibi bitkilerde yaygın olarak bulunmakta ve bitkinin predatörlerine karşı savunmasında görev yapmaktadır. Ayrıca tannik asidin antioksidan etkisinin olduğu da belirtilmektedir. Yaptığımız bir başka çalışmada da tannik asidin beyin dokusundaki MDA seviyelerini azaltıcı etkili olduğu belirlendi [7-9].

Hypericum cinsi Clusiaceae familyası ve Hypericoideae alt familyasına dahil olan *Hypericum perforatum* L. (sarı kantaron) yağı (St. John's Wort Oil) Türkiye'de çeşitli bölgelerde bulunmaktadır. Geçmiş tarihlerden günümüze kadar mide ağrısı, sinir hastalıkları yaraları iyileştirici etkisi bilinen sarı kantaron, son zamanlarda klinik deneylerde kullanılan ve tıpta popüler olarak kullanılan bir bitkidir [10, 11].

Hypericum perforatum örnekleri *in vitro* da iyi derecede antioksidan aktivite göstermektedir [12].

Kakao, *Theobroma cacao* bitkisinin tohumlarından üretilmektedir. Milattan önce 600 yılından itibaren Mayalar ve Azteklerin bu bitkiyi kullandığı bilinmektedir. Kakao, epikateşin, kateşin ve prosiyanidinler gibi yüksek miktarlarda flavonoidler ihtiva eder. Kakao flavonoidleri güçlü antioksidanlar olarak kabul edilir ve radikal süpürücü etkilidirler [13].

Ağır metal toksisitesinin en çok etkilediği hücreler eritrositlerdir, *in vitro* çalışmalarda Cd'un eritrositlerde oksidatif stresi arttırdığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir [14, 15]. Eritrositler, oksidatif strese karşı oksijenle yüksek konsantrasyonda karşılaşmaları sonucu yapılarındaki hemoglobinin kolayca otooksidasyona uğraması ve membranlarının lipid peroksidasyona duyarlı olması ve hasar gören yapı taşlarını tamir etme yeteneklerinin az olması nedeniyle oldukça hassas yapıdadırlar [16].

Cd gibi oksidatif stres oluşturan bazı ajanların neden oldukları hasarı azaltmak ya da tamamen ortadan kaldırmak için çeşitli antioksidan maddeler uygulanmaktadır. Bu çalışmada, ağır metal Cd'un uygulanması sonucu insan eritrositlerinde meydana gelen hasarın belirlenmesi, antioksidan enzim sistemlerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi için etkinlikleri çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olan TA, KY ve SKY'nin olası etkilerinin karşılaştırılması olarak araştırılması amaçlanmıştır.

2. Materyal ve yöntem

Çalışmada sigara ve alkol kullanmayan 23-47 yaş arası 7 sağlıklı gönüllüden alınan 6 ml kan örneğinden eritrosit paketi hazırlandı (Etik kurul no: 80558721/14) Deney için kontrol grubu ile Cd sonrası TA, KY ve SKY uygulanan 8 deney grubu oluşturuldu [17-19] (Tablo 1). Tüm gruplara ait 7 örnekte SOD, MDA ve KAT ölçümleri yapıldı.

Sağlıklı gönüllülerden alınan kanlar EDTA'lı tüplere kondu. 6 ml kan 3000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak kalan kana 3 ml serum fizyolojik kondu. 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant atılarak kalan kana 3 ml PBS kondu. Bu işlem 3 kez tekrar edildi. Süpernatant atılıp kalan kana 3 ml RPMI 1640 besiyeri koyduktan sonra içerisinde 7 ml besiyeri bulunan tüplere aktarıldı. Total hacim 13 ml'ye tamamlanarak 1'er ml olacak şekilde 8 tüpe dağıtıldı. Bu tüplere uygun solüsyonlar eklenerek 37°C'de su banyosunda 1 saat inkübe edildi.

İnkübasyonun ardından örneklerde MDA, SOD ve KAT spektrofotometrik olarak ölçülerek enzim aktiviteleri belirlendi. Serbest radikal analizleri için; süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivite düzeyi (ünite/gram hemoglobin) Yi Sun ve ark. (1988) metodu ile; malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyon düzeyi (nanomol/ gram hemoglobin) Uchiama ve Mihara (1978) metodu ile, katalaz (KAT) enzim aktivite düzeyi (ünite/gram hemoglobin) Goth L. (1991) metodu ile, hemolizat (kan) örneklerinde belirlendi [20-22]. Normal dağılım gösteren değişken grupları arasındaki karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve normal dağılım göstermeyen değişken grupları arasındaki karşılaştırmalar Kruskal-Wallis testi ile değerlendirildi.

Tablo 1. Deney grupları ve uygulanan madde miktarları

Deney Grupları (n=7)	Madde miktarları
Kontrol	-
Kadmiyum (Cd)	150 µM
Tannik Asit (TA)	50 µM
Kakao yağı (KY)	1 µl/ml
Sarı Kantaron Yağı (SKY)	1 µl/ml
Cd+ TA	150 µM+50 µM
Cd+ KY	150 µM+1 µl/ml
Cd+ SKY	150 µM+1 µl/ml

3. Bulgular

Çalışmada kontrole grubuna göre ($49,7 \pm 18,4$ nmol/gHb) MDA seviyesinin Cd uygulanan grupta ($60,3 \pm 14,9$ nmol/gHb) arttığı, KAT aktivitesinin kontrol grubuna göre ($508,7$ ü/gHb) Cd uygulanan grupta ($196,2$ ü/gHb) azaldığı, SOD aktivitesinin ise, kontrol grubuna göre ($3531 \pm 140,4$ ü/gHb), Cd grubunda ($3231 \pm 214,6$ ü/gHb) azaldığı gözlenmiştir. SOD aktivitesinin Cd grubuna göre ($3231 \pm 214,6$ ü/gHb), Cd uygulaması sonrası TA ($3507 \pm 168,2$ ü/gHb), KY ($3518 \pm 170,0$ ü/gHb) ve SKY ($3469 \pm 249,5$ ü/gHb) uygulanan gruplarda arttığı gözlemlendi. MDA aktivitesinin Cd grubuna göre ($60,3 \pm 14,9$ nmol/gHb), Cd uygulaması sonrası KY ($52,1 \pm 24,3$ nmol/gHb) ve SKY ($54,1 \pm 23,7$ nmol/gHb) uygulanan gruplarda azaldığı ancak TA ($61,5 \pm 50,0$ nmol/gHb) uygulanan grupta değişmediği gözlemlendi. KAT aktivitesinin Cd grubuna göre ($196,2 \pm 223,0$ ü/gHb), Cd uygulaması sonrası TA ($228,2 \pm 31,3$ ü/gHb), KY ($281,6 \pm 295,3$ ü/gHb) ve SKY ($267,8 \pm 69,4$ ü/gHb) uygulanan gruplarda arttığı gözlemlendi. (Tablo 2). Bu sonuçlara göre Cd uygulanan gruplarda SOD ve KAT düzeylerinin kontrole göre daha düşük, MDA değerlerinin daha yüksek olduğu, kadmiyum uygulaması sonrası antioksidan madde uygulanan gruplarda TA'nın MDA değerlerini değiştirmediği gözlenmiştir. Cd'un neden olduğu oksidatif stresi ortadan kaldırmada TA'ya göre, KY ve SKY daha etkili bulunmuştur. Gözlenen farklar bulunmakla birlikte sonuçların istatistiksel açıdan anlamlılığı gösterilememiştir.

Tablo 2. Deney grupları ve bunlara ait SOD (ü/gHb), MDA (nmol/gHb) ve KAT (ü/gHb) aktiviteleri (ortalama \pm standart sapma; $p < 0.05$)

Gruplar	SOD ü/gHb (ortalama \pm ss)	MDA nmol/gHb (ortalama \pm ss)	KAT ü/gHb (ortalama \pm ss)
Kontrol	$3531 \pm 140,4$	$49,7 \pm 18,4$	$252,0 \pm 78,0$
Kadmiyum (Cd)	$3231 \pm 214,6$	$60,3 \pm 14,9$	$196,2 \pm 223,0$
Tannik Asit (TA)	$3531 \pm 159,1$	$45,6 \pm 19,0$	$254,1 \pm 66,6$
Kakao Yağı (KY)	$3543 \pm 159,4$	$41,3 \pm 16,0$	$245,8 \pm 68,3$
Sarı Kantaron Yağı (SKY)	$3554 \pm 136,4$	$52,5 \pm 27,7$	$243,2 \pm 33,9$
Cd+ TA	$3507 \pm 168,2$	$61,5 \pm 50,0$	$228,2 \pm 31,3$
Cd+ KY	$3518 \pm 170,0$	$52,1 \pm 24,3$	$281,6 \pm 295,3$
Cd+ SKY	$3469 \pm 249,5$	$54,1 \pm 23,7$	$267,8 \pm 69,4$
Gruplar arası fark	$p=0,050$	$p=0,347$	$p=0,709$

4. Sonuçlar ve tartışma

Sunulan bu çalışmada oksidatif stres ajanı olarak eritrositlere uygulanmak üzere Cd seçilmiştir. Cd zehirlenmelerinde birçok organ zarar görür. Kadmiyumun vücuttaki dağılımı, alınış yolu, dozu ve süresine bağlı olarak değişmektedir. Kadmiyum vücutta kan hücrelerine ve kan dolaşımındaki proteinlere bağlanarak diğer organlara taşınır. Elimine edilmesinde rol oynayan karaciğer ve böbrek kadmiyum toksisitesinin ana hedefidir. Kadmiyum serbest radikal

oluşumuna neden olması ve antioksidan savunma sisteminde bozukluğa neden olması nedeniyle sitotoksiktir. Bununla birlikte kadmiyum direkt olarak serbest oksijen radikali üretmekten çok, mitokondriyal elektron transfer zincirini etkileyerek ya da glutatyon tüketimini artırarak indirekt yoldan da serbest radikal üretimine katkıda bulunur [23, 24].

Serbest radikaller hücrede DNA, lipid, protein, karbohidratlar gibi bileşiklerine etki ederek onların bozulmasına ve böylece lipid peroksidasyonuna neden olur [25]. Malondialdehit (MDA), hücre lipidlerinin yapılarının okside edilerek bozulması ile oluşan ana metabolit olup, lipid peroksidasyonunun bir göstergesidir [26]. Serbest radikallerden kaynaklanan oksidasyonları önleyen, oluşan serbest radikalleri yakalayan ve stabilize eden maddeler ise antioksidan olarak bilinir. Antioksidanlar, oluşan serbest radikallerle reaksiyona girerek yeni serbest radikal oluşumunu önleyen bileşiklerdir. Doğal antioksidan kategorisindeki katalaz (KAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSHPx) gibi enzim sistemleri, serbest radikalleri yok etme özelliğine sahiptir. Bu enzimler, serbest radikallerin proteinler, lipidler ve DNA gibi hücresel bileşenlere zarar vermesini önleyebilmektedirler [23].

Zikic ve arkadaşlarının akvaryum balıklarının eritrositlerinde yaptığı bir çalışmada kadmiyum (Cd)'un SOD ve KAT aktivitelerini önemli derecede azalttığını bildirmişlerdir [27].

Diğer bir çalışmada Shukla ve ark. intraperitoneal olarak verilen kadmiyumun katalaz aktivitesini engellediğini bildirmiştir [28]. Yine Hussain ve arkadaşlarının sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada intraperitoneal olarak uygulanan kadmiyum asetatın lipid peroksidasyonuna yol açtığı, SOD enzim aktivitesini inhibe ettiği bildirilmektedir [29]. Kara ve arkadaşlarının kadmiyum ile yaptığı bir çalışmada kadmiyumun MDA seviyelerini yükselttiği gözlenmiştir [30].

El Sayed ve arkadaşları ağır metal olan kurşunla farelerde oluşturulan oksidatif strese, kurşunun SOD ve KAT aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir. Yine bu çalışmada kurşunla birlikte verilen tannik asit SOD ve KAT'ın aktivitesini olumlu yönde etkilemiştir [31].

Çalışmamızda lipid peroksidasyonun göstergelerinden olan MDA düzeylerinin, Cd uygulaması sonrası arttığı, antioksidan enzim sistemlerinden SOD ve katalazın ise düştüğü gözlemlendi. Cd nedeni ile oluşan bu olumsuz tablonun düzeltilmesinde etkili olabileceği düşünülen çeşitli doğal antioksidan bileşenler uygulandığında ortaya çıkan sonuçlar literatürdeki bilgilerle karşılaştırıldı. Flavonoidler, özellikle epikateşin ve kateşin Fe ve Cu gibi metalleri şelatlarlar. Flavonoidler, peroksil, peroksintrit, süperoksit ve 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil gibi radikalleri nötralize ederler [32]. Bir flavanoid olan TA'nın demir iyonlarına etki ederek tekli oksijen, azot oksit ve hidroksil radikallerinin oluşumunu önlediği gösterilmiştir [33].

Lenfositlerle yapılan bir çalışmada H₂O₂ ile indüklenmiş oksidatif DNA stresinde TA'nın DNA hasarını azalttığı gözlenmiştir [34]. TA'nın demir iyonlarına bağlanarak (şelasyon) hidroksil radikali oluşumunu önlemek yoluya oksidatif hasarı engellediği ileri sürülmüştür [33]. Bunun yanı sıra tannik asidin antioksidan etkisinin in vitro insan lenfositlerinde H₂O₂ aracılı DNA hasarlarında Fe, Cu gibi metalleri ve serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırarak gösterdiği bildirilmiştir [34]. Çalışmamızda Cd uygulaması ile azalan SOD seviyesinin artırılmasında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte TA'nın etkili olabileceği gözlemlendi.

Bir diğer flavanoid KY doğal bir antioksidandır. Jalil ve arkadaşlarının obez ve diyabetik ratlarda yaptığı bir çalışmada kakaonun SOD enzim aktivitesini arttığı, katalaz aktivitesinin kakao uygulanan grupta azaldığını bildirmişlerdir [35]. Çalışmalarda kakao'nun antioksidan sistemini olumlu etkilediği vurgulanmaktadır. Kakao ile süperoksit dismutaz ve katalaz aktivitesinin artırılması O₂ ve H₂O₂ gibi enzim substratlarının doğrudan nötralizasyonuna bağlı olabilir. Kakao fenoller, süperoksit dismutaz gibi güçlü antioksidanların up-regülasyonu için önemli bir role sahip olabilir. Çalışmamızdan elde edilen veriler Cd uygulaması sonrası SOD, katalaz düzeyleri ve MDA açısından kakaonun olumlu etkileri olduğunu göstermektedir. Noori ve arkadaşları tarafından yapılan ve kakaonun antioksidan rolünün araştırıldığı bir çalışmada, sıçan karaciğer, kalp ve böbrek dokularında farklı dokularda SOD, katalaz ve MDA'nın farklı sonuçlar verdikleri bildirilmiştir. Bu çalışmada kakao uygulanan gruplarda karaciğer dokusunda SOD, katalaz ve MDA da artış olurken, kalp dokusunda SOD ve MDA'da değişiklik gözlenmemiş ancak katalaz aktivitesi artmıştır. Aynı çalışmada böbrekte SOD, katalaz ve MDA'da değişiklik görülmemiştir [36]. Çalışmamızda Cd uygulaması ile artan MDA seviyesini düşürmede, azalan SOD ve KAT aktivitesini arttırmada KY'nin etkili olduğu gözlemlendi.

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antioksidan bileşik olan *Hypericum perforatum* (sarı kantaron) ile çeşitli çalışmalar yapılmıştır. El-Sherbiny ve arkadaşları tarafından scopolamin ile sıçan beyinde oluşturulan oksidatif stres sonrası uygulanan *Hypericum perforatum* (sarı kantaron) ekstraktlarının MDA seviyelerini düşürdüğü, SOD seviyelerini değişmediği gösterilmiştir [37]. Rotenonun toksik etkisiyle yapılan bir çalışmada farklı olarak sarı kantaron ekstraktının sıçan beyinde MDA seviyelerini azalttığı ve katalaz aktivitesini artırdığı bildirilmiştir. Çalışmamızda Cd uygulaması ile artan MDA seviyesini düşürmede, azalan SOD ve KAT aktivitesini arttırmada SKY'nin etkili olduğu gözlemlendi.

Kaynaklar

- [1] Pizzino G, Irrera N, Cucinotta M, Pallio G, Mannino F, Arcoraci V, et al. (2017). Oxidative stress: harms and benefits for human health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>.
- [2] Zhou D, Shao L, Spitz DR. (2014). Reactive oxygen species in normal and tumor stem cells. *Advances in cancer research*: Elsevier. p. 1-67. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420117-0.00001-3>
- [3] Nawar WW. (1996). Lipids. In "Food Chemistry", O.R.Fennema. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; p. 225-319.

- [4] Kaur C, Kapoor HC. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. *International journal of food science & technology*. 36:703-25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.00513.x>
- [5] Wijeratne SS, Cuppett SL, Schlegel V. (2005). Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. *Journal of agricultural and food chemistry*. 53:8768-74. <https://doi.org/10.1021/jf0512003>
- [6] Attia A, Ibrahim F, EL-Latif NAA, Aziz SW. (2014). Antioxidant effects of curcumin against cadmium chloride-induced oxidative stress in the blood of rats. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 6:33-40. <https://doi.org/10.5897/JPP2014.0316>
- [7] Calis IU, Cosan DT, Saydam F, Kolac UK, Soyocak A, Kurt H, et al. (2016). The effects of monosodium glutamate and tannic acid on adult rats. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 18. DOI: <https://doi.org/10.5812/ircmj.37912>
- [8] Katie E, Thorington R. (2006). *Squirrels: the animal answer guide*. Baltimore: Johns Hopkins University Press.
- [9] Kuppasamy UR, Das NP. (1993). Protective effects of tannic acid and related natural compounds on *Crotalus adamanteus* subcutaneous poisoning in mice. *Pharmacology & toxicology*. 72:290-5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1993.tb01652.x>
- [10] Altay V, Karahan F, Sarcan YB, İlçim A, Fen MKÜ. (2015). An ethnobotanical research on wild plants sold in Kırıkhan district (Hatay/Turkey) herbalists and local markets. *Biological Diversity and Conservation*. 8:81-91.
- [11] Ekren S. (2010). *Hypericum perforatum L. Klonlarının Bazı Tarımsal ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma*. *Tarım Bilimleri Dergisi*. 16.
- [12] Sanchez-Reus M, del Rio MG, Iglesias I, Elorza M, Slowing K, Benedi J. (2007). Standardized *Hypericum perforatum* reduces oxidative stress and increases gene expression of antioxidant enzymes on rotenone-exposed rats. *Neuropharmacology*. 52:606-16. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.09.003>
- [13] Ramiro-Puig E, Castell M. (2009). Cocoa: antioxidant and immunomodulator. *British Journal of Nutrition*. 101:931-40. <https://doi.org/10.1017/S0007114508169896Published>
- [14] Bansal A, Bhatnagar D. (1996). Cadmium induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in vitro in human erythrocytes. *Fresenius Environmental Bulletin*. 5:460-5. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(96\)00052-5](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(96)00052-5)
- [15] Coşan DT, Aylin D, Soyocak A, Çolak E, Çiçek A, Hülyam K. (2017). Kadmiyum toksisitesi oluşturulan sıçanlarda tannik asitin, ağır metal giderimi ve bazı biyokimyasal değerler üzerine etkisinin araştırılması. *Kocatepe Tıp Dergisi*. 18:146-53.
- [16] Kılınç İ, Altuntaş İ, Kaptanağası M, Doğuç DK, Mollaoglu H, Kaleli S. (2003). Chlorpiriphos-ethyl'in rat plazmasında in vivo lipoperoksidatif etkisi ile melatonin ve vitamin C+ vitamin E'nin koruyucu etkilerinin araştırılması. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 10.
- [17] Hasan SA, Ali B, Hayat S, Ahmad A. (2007). Cadmium-induced changes in the growth and carbonic anhydrase activity of chickpea. *Turkish Journal of Biology*. 31:137-40.
- [18] Abed M, Herrmann T, Alzoubi K, Pakladok T, Lang F. (2013). Tannic acid induced suicidal erythrocyte death. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 32:1106-16. <https://doi.org/10.1159/000354510>
- [19] Dasgupta A, Tso G, Szelei-Stevens K. (2006). St. John's wort does not interfere with therapeutic drug monitoring of 12 commonly monitored drugs using immunoassays. *Journal of clinical laboratory analysis*. 20:62-7. <https://doi.org/10.1002/jcla.20098>
- [20] Sun Y, Oberley LW, Li Y. (1998). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*. 34:497-500.
- [21] Uchiyama M, Mihara M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry*. 86:271-8. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90342-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90342-1)
- [22] Goth L. (1991). A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clinica chimica acta*. 196:143-51. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90067-M](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90067-M)
- [23] Karaca Ö, Sunay FB, Kuş MA, Gülcen B, Özcan E, Ögetürk M, et al. (2014). Kadmiyum ile Oluşturulan Deneysel Karaciğer Hasarına Karşı Melatoninin Etkilerinin Biyokimyasal ve Histopatolojik Düzeylerde İncelenmesi. *Fırat Tıp Derg.* 19:110-5.
- [24] Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. (2014). Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *International journal of environmental health research*. 24:378-99. <https://doi.org/10.1080/09603123.2013.835032>
- [25] El-Sokkary GH, Nafady AA, Shabash EH. (2010). Melatonin administration ameliorates cadmium-induced oxidative stress and morphological changes in the liver of rat. *Ecotoxicology and environmental safety*. 73:456-63. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.014>
- [26] Shaikh ZA, Vu TT, Zaman K. (1999). Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicology and applied pharmacology*. 154:256-63. <https://doi.org/10.1006/taap.1998.8586>
- [27] Žikić R, Štajn A, Pavlović S, Ognjanović B, Saičić Z. (2001). Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and plasma transaminases of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch.) exposed to cadmium. *Physiol Res*. 50:105-11.

- [28] Shukla GS, Hussain T, Srivastava RS, Chandra SV. (1989). Glutathione peroxidase and catalase in liver, kidney, testis and brain regions of rats following cadmium exposure and subsequent withdrawal. *Industrial health*. 27:59-69.
- [29] Hussain T, Shukla GS, Chandra S. (1987). Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: in vivo and in vitro studies. *Pharmacology & toxicology*. 60:355-8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1987.tb01526.x>
- [30] Kara H, Karatas F, Canatan H, Servi K. (2005). Effects of exogenous metallothionein on acute cadmium toxicity in rats. *Biological trace element research*. 104:223-32.
- [31] El-Sayed IH, Lotfy M, El-Khawaga O-AY, Nasif WA, El-Shahat M. (2006). Prominent free radicals scavenging activity of tannic acid in lead-induced oxidative stress in experimental mice. *Toxicology and industrial health*. 22:157-63. <https://doi.org/10.1191/0748233706th256oa>
- [32] Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. (2006). Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *The Journal of nutritional biochemistry*. 17:291-306. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.10.005>
- [33] Lopes GK, Schulman HM, Hermes-Lima M. (1999). Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1472:142-52. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(99\)00117-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(99)00117-8)
- [34] Wu L, Chu C, Chung J, Chen C-H, Hsu L-S, Liu J-K, et al. (2004). Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 556:75-82. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.07.004>
- [35] Jalil AMM, Ismail A, Pei CP, Hamid M, Kamaruddin SHS. (2008). Effects of cocoa extract on glucometabolism, oxidative stress, and antioxidant enzymes in obese-diabetic (Ob-db) rats. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56:7877-84. <https://doi.org/10.1021/jf8015915>
- [36] Noori S, Nasir K, Mahboob T. (2009). Effects of cocoa powder on oxidant/antioxidant status in liver, heart and kidney tissues of rats. *J Anim Plant Sci*. 19:174-8.
- [37] El-Sherbiny DA, Khalifa AE, Attia AS, Eldenshary EE-DS. (2003). Hypericum perforatum extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnestic dose of scopolamine. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 76:525-33. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2003.09.014>

(Received for publication 16 June 2019; The date of publication 15 December 2019)



The effect of different harvest dates on the yield and quality properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) plant

Nimet KATAR^{*1}, Duran KATAR², Recep TEMEL³, Serkan KARAKURT³, İzzet BOLATKIRAN³, Emel YILDIZ³, Amir SOLTANBEİGİ⁴
ORCID: 0000-0003-0699-167X; 0000-0003-1340-8040; 0000-0002-7566-9724; 0000-0002-3296-5734; 0000-0002-0712-1548; 0000-0001-7190-593X; 0000-0002-8791-0482

¹ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Eskişehir, Turkey
² Osmangazi Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü-Eskişehir, Turkey
³ Orman Bölge Müdürlüğü-Eskişehir, Turkey
⁴ Afyon Kocatepe Üniversitesi-Afyon, Turkey

Abstract

The purpose of this research carried out in 2018 under Eskişehir ecological conditions was to determine the effect of six different harvest dates (T₁: 16 August, T₂: 29 August, T₃: 14 September, T₄: 28 September, T₅: 15 October and T₆: 31 October) on the yield and quality properties rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). The experiment was established according to a randomized complete-block design with four replications. The composition of the essential oil obtained by the hydro-distillation from the dry leaves of the rosemary plant was analyzed by GC-MS. In the experiment carried out, the mean values of plant height (cm), fresh herb yield (t ha⁻¹), dry herb yield (t ha⁻¹), dry leaf yield (t ha⁻¹), essential oil ratio (%), essential oil yield were determined as 61.87 cm, 15.78 t ha⁻¹, 5.80 t ha⁻¹, 3.55 t ha⁻¹, 0.69% and 23.92 l ha⁻¹, respectively. In the essential oil samples obtained from the harvests made at different dates, 35 different components were identified. The values of the camphor, 1-verbenone, α -pinene, borneol and 1,8-cineol components determined as the main component in the analyzed essential oil samples ranged from 11.67 to 14.78%, from 8.47 to 11.77%, from 8.74 to 11.82%, from 8.61 to 11.12% and from 7.01 to 9.07%, respectively.

Key words: Rosemary, *Rosmarinus officinalis*, different harvest dates, essential oil

----- * -----

Farklı hasat zamanlarının biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinin verim ve kalite özellikleri üzerine etkisi

Özet

Bu araştırma, farklı hasat zamanlarının (Z₁: 16 Ağustos, Z₂: 29 Ağustos, Z₃: 14 Eylül, Z₄: 28 Eylül, Z₅: 15 Ekim ve Z₆: 31 Ekim) biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) bitkisinin verim ve kalite özellikleri üzerine etkisini belirlemek amacıyla Eskişehir ekolojik koşullarında 2018 yılında yürütülmüştür. Deneme, tesadüf blokları deneme desenine göre 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Biberiye bitkisinin drog yapraklarından su distilasyonu yöntemiyle elde edilen uçucu yağın kompozisyonu GC-MS ile analiz edilmiştir. Yürütülen çalışmada, ortalama bitki boyu (cm), yeşil herba verimi (t ha⁻¹), kuru herba verimi (t ha⁻¹), kuru yaprak verimi (t ha⁻¹), uçucu yağ oranı (%) ve uçucu yağ verimi değerleri sırasıyla 61.87 cm, 15.78 t ha⁻¹, 5.80 t ha⁻¹, 3.55 t ha⁻¹, % 0,69 ve 23.92 l ha⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Farklı zamanlarda yapılan hasatlardan elde edilen uçucu yağ örneklerinde 35 farklı komponent olduğu tespit edilmiştir. Analiz edilen uçucu yağ örneklerinde ana bileşen olarak tespit edilen camphor, 1-verbenone, α -pinene, borneol ve 1,8-cineol bileşenlerin değerleri sırasıyla %11.67-14.78, %8.47-11.77, %8.74-11.82, %8.61-11.12 ve 7.01-9.07 arasında değişmiştir.

Anahtar kelimeler: Biberiye, *Rosmarinus officinalis*, farklı hasat zamanları, uçucu yağ

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905416767386; Fax.: +9902223242990; E-mail: nimetkatar@gmail.com

1. Introduction

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) plant, an important species of the Lamiaceae/Labiatae family, is an important medicinal and aromatic plant naturally distributed in the Mediterranean region [1, 2, 3]. The genus *Rosmarinus* has *R. officinalis*, *R. laxiflorus*, *R. eriocalyx* and *R. lavandulaceus*, which are distributed in different parts of the world. *R. officinalis* has varieties of erectus, humilis and albiflorus [4, 5]. Rosemary having a strong taproot and a plant height of 50-100 cm, needle-shaped leaves and pale blue flowers is an evergreen, perennial, in bush form and cross-fertilization plant [1, 2, 6].

The leaves of the rosemary plant are used as spice and herbal tea mixtures. Otherwise, the essential oil obtained from rosemary plants is used in perfume, food and pharmaceutical industry [1, 7]. Also, rosemary is widely used in aromatherapy and folk medicine, as well as being used as an ornamental plant in different regions of the world [8, 9, 10]. Rosemary is well known a medicinal plant and has been used as anti-oxidant, anti-cancer, antidiabetic, anti-inflammatory, antimicrobial, antifungal, antimutagenic, antispasmodic, wound healing, strengthening capillaries of hair and protecting liver [2, 7, 11, 12, 13, 14, 15].

In some countries such as France, Spain, Portugal and Greece, rosemary is cultivated to meet the demand for the use of essential oils in the food, perfume, cosmetic and pharmaceutical industries [7]. Many other countries meet the needs of rosemary by harvesting from natural plants. In Turkey, rosemary collected from the natural flora of Mersin and Adana are presented to domestic and foreign markets [16]. Rosemary has attracted attention as an important medicinal and aromatic plant in recent years due to the industrial demand for the essential oil obtained from the plant. In order to meet this demand for both the essential oil and the drug leaves of the rosemary, the cultivation of the plant in field conditions is becoming increasingly important.

Studies on the volatile oil components of the rosemary plant have shown that the plant has different chemotypes such as eucalyptol/1,8-cineole (Italy, Morocco and Tunisia), camphor-borneol (Spain) and α -pinene-verbanon (France and Corsica) in different parts of the world [5, 17, 18, 19]. Many studies conducted on rosemary's essential oil ratio and its components have shown that many factors are effective on essential oil content and its composition [1, 5, 7, 21, 30]. One of the most important factors affecting the rate and composition of essential oil is the different harvest dates. The studies conducted to determine the optimum harvest date in order to obtain the desired yield and quality product in the rosemary plant revealed different findings [5, 7].

The aim of the experiment was to determine the effect of harvest at different dates on the yield and quality of the rosemary in Eskişehir ecological conditions.

2. Materials and methods

The field experiment of the study was conducted in the province of Eskişehir. The province located in Aegean, Marmara and Central Anatolia Region with 788 meters altitude has semi-arid and cool continental climate.

The average annual precipitation of the long years is 349,8 mm. In the region, the summer months are hot, dry (but summer nights are cold) while the winter months are snowy, frosty and cold. The differences between day and night temperatures are high. In addition to the low annual precipitation in the region, its distribution throughout the year is not ideal for the cultivation of some plants. In 2018, total annual precipitation of 371.8 mm, average temperature of 13.5 °C and an average humidity of 69.93% were recorded in Eskişehir (Table 1).

Table 1. Meteorological data of the experimental site* (2018)

Months	Total precipitation (mm)	Mean temperature (°C)	Relative humidity (%)
January*	30,00	1,40	82,60
February	28,80	5,60	78,60
March	49,80	8,90	69,80
April	16,80	13,60	58,70
May	72,00	16,40	72,40
June	60,60	19,30	68,20
July	42,00	21,90	63,60
August	19,30	22,70	60,70
September	3,80	18,30	62,70
October	30,10	13,00	74,30
November	18,60	7,40	77,60
Total/Mean	371,80	13,50	69,93

**Data were taken from Eskişehir Regional Meteorological Service

Soil at a depth of 60 cm was sampled before the experiment and subjected to a physicochemical analysis. Data for the years and locations are demonstrated in Table 2. The results showed that the soil was Clay loam with pH 7.6, salt (22.25%), clay (35.91%), organic matter (1.73%) and amount of macro nutrients were, total N (0.13 %), total P (36 ppm).

Table 2. Analysis of the soil sample taken from the area where the experiment was conducted

Physical analysis				
Depth (cm)	Soil texture	Sand (%)	Salt (%)	Clay (%)
0-60	Clay loam	41,83	22,25	35,91
Chemical analysis				
pH	Lime (%)	Organic matter (%)	Total nitrogen (%)	P ₂ O ₅ (ppm)
7,60	8,46	1,73	0,13	36,00

* Analysis was conducted in the laboratory of Forestry, Soil and Ecology Research Institute.

In this research, the seedlings obtained from Afyonkarahisar Medicinal and Aromatic Plants Center were used as plant material. Seedlings used in the field experiment were propagated by clonal method. The field experiment was established in 2017 with 4 replications according to randomized complete block design. This study was carried out in experimental area of Eskişehir Forest Nursery Directorate. Each plot has six rows with 5.0 m in length. Seedlings were transplanted at a distance of 0.35 m between plants and 0.75 m between rows on 10.05.2017 [18, 21]. The dry materials used in this study were harvested the specified dates in the second year of the plantation. The plots were kept weed free. The plots were irrigated by system of drip irrigation. The frequency of irrigation was determined by taking into account the monthly average air temperatures. The plots were irrigated when necessary. The plants were irrigated 6 times in the second year of the plantation. No fertilizer application has been made to experiment. Plants were harvested at six different dates T₁: 16 August, T₂: 29 August, T₃: 14 September, T₄: 28 September, T₅: 15 October and T₆: 31 October) at intervals of 15 days each. Plants in plots were harvested by cutting 20-25 cm above soil surface. The fresh plants harvested was dried at 35 °C for 48 hours in the drying-oven. The essential oil contents of the samples taken from the dried leaves were determined by the water distillation method in Clevenger apparatus for 3.5 hours. Essential oil samples were stored in refrigerator at 4 °C until the composition analysis.

The essential oil composition of the oil samples was analyzed by gas chromatography (Agilent 5975C) coupled to mass spectrometry (Agilent 5975C) using capillary column (HP Innnowax Capillary; 60.0 m x 0.25 mm x 0.25 µm) [31].

The experiment findings were subjected to variance analyses according to a Randomized Complete Block Design. The differences between the mean values were determined by Least Significant Difference Method (LSD) via TARIST statistical package program [22].

3. Results

The harvest of the rosemary plant in the ecological conditions of Eskişehir was made 6 dates in 2-week periods, the first harvest of which was made on 16 August 2018. There was a time difference of about 75 days between the first harvest and the last harvest. The climatic changes due to seasonal differences in harvesting dates affected the growth and development of the rosemary plant and caused differences in the yield and quality of the product. In addition, the variation in vegetation period of the plants due to different harvest dates caused a change in the yield of dry herb and dry leaf [23; 24, 30].

The results of the study showed that the different harvest dates had a significant effect on the dry herb yield, dry leaf yield and essential oil content, but different harvest dates did not have significant effect on plant height, fresh herb yield and essential oil yield (Table 3). The lowest plant height (57.75 cm) was obtained from the first harvest, while the highest plant height (65.24 cm) was found from the last harvest. However, all values of plant height were found in the same group. The mean plant height value obtained from the experiment was recorded as 61.87 cm (Table 3). This situation showed that the varying climatic conditions and vegetation period due to different harvest dates are not significantly effective on plant height.

When the fresh herb yields obtained from the study were examined, it was observed that the lowest fresh herb yield (13,92 t ha⁻¹) was obtained from the first harvest and the highest value (16,44 t ha⁻¹) was obtained from the last harvest. The mean value of fresh herb yield was determined as 15,78 t ha⁻¹ for different harvest dates (Table 3). Due to the late harvest dates, increased vegetation periods and the climate changes did not cause a significant increase in fresh herb yield as in plant height.

Different harvest dates had significant effect on dry herb yield and dry herb values formed two different groups. While the value of the first harvest date was in the second group, all other values were in the first group. The highest dry herb value (6.32 t ha) was obtained from the last harvest date in the same group, except for the first harvest date. The lowest dry herb yield value (4.62 t ha⁻¹) was determined at the first harvest date. The average value was 5.8 t ha⁻¹ (Table 3). This situation showed us that the vegetative growth of the rosemary plant in the ecological conditions of our region generally ends at the end of August. It is observed that the assimilate substances produced by the photosynthesis of the rosemary plant in September and October were used in dry matter accumulation rather than plant growth.

The part of the rosemary plant, which is used both as a spice and as extracting of the essential oil, is the dry leaves. Therefore, dry leaf yield in the unit area is considered to be an important factor in rosemary cultivation. Experimental results revealed that the different harvest dates significantly affected the dry leaf yield (at p<0.01 level).

Different harvest dates occurred statistically two different groups for the dry leaf yields. The values of dry leaf yields obtained from the harvests on October 15 and 31 were in the first group while others were in the second group. While the highest dry leaf yield (4,31 t ha⁻¹) was recorded from the last harvest date it was observed that the lowest yield value (2,99 t ha⁻¹) was obtained from the first harvest date. At the same time, the average dry leaf yield value was 3.55 t ha⁻¹ (Table 3). As it was understood from the values given above, the late harvest dates (in September and October) did not significantly increase the values of the plant height and the fresh herb yield but caused a significant increase in the dry herb and dry leaf yield values. This situation can be explained by the fact that the rosemary plant used the assimilate substances produced by photosynthesis in September and October and not in plant growth but in dry matter accumulation under the ecological condition of our region [25, 26, 30]. In Eskişehir ecological conditions, decreases in mean monthly temperatures in September and October and decreases in day length had a negative effect on plant growth (Table 1).

Table 3. Average values of rosemary plants harvested at different dates, different groups formed and analysis of variance

Harvest Dates	Plant Height (cm)	Fresh Herb Yield (t ha ⁻¹)	Dry Herb Yield (t ha ⁻¹)
16 August 2018	57,75	13,92	4,62 B
29 August 2018	58,75	15,85	5,91 A
14 September 2018	62,75	16,25	5,98 A
28 September 2018	62,50	16,04	5,69 A
15 October 2018	64,25	16,21	6,31 A
31 October 2018	65,24	16,44	6,32 A
Mean	61,87	15,78	5,80
L.S. D. (%) :	-	-	0,72
F values :	2,825ns	2,653ns	13,26**
C.V. (%) :	6,84	8,61	11,52
Harvest Dates	Dry Leaf Yield (t ha ⁻¹)	Essential Oil Ratio (%)	Essential Oil Yield (l ha ⁻¹)
16 August 2018	2,99 B	0,79 A	23,51
29 August 2018	3,21 B	0,75 A	24,16
14 September 2018	3,28 B	0,77 A	25,19
28 September 2018	3,28 B	0,71 A	25,06
15 October 2018	4,20 A	0,57 B	24,07
31 October 2018	4,31 A	0,50 B	21,50
Mean	3,55	0,69	23,92
L.S.D. (%) :	0,47	0,08	-
F values :	24,99**	45,42**	1,70ns
C.V. (%) :	15,88	17,05	9,21

ns: not significant; **: p<0,01; L.S.D.(%): Least significant difference; C.V.: Coefficient of variance.

The changing harvest dates were significantly influential on the essential oil content of the rosemary plant. The highest essential oil content (0,79%) was obtained from the first harvest in August when the average monthly temperature was highest, and the lowest value (0,50%) was obtained from the harvest at the end of October when the average temperature was the lowest. The contents of essential oil extracted from harvested plants in August and September were higher than the amount of volatile oil obtained from the harvests in October (Table 3). This change in the essential oil content values can be explained by the higher average monthly temperatures in August and September compared to October under Eskişehir ecological conditions, respectively (Table 1). As is known, increasing average monthly temperatures create an effect of temperature stress on aromatic plants and cause an increase in essential oil contents [23, 27, 30].

In the study carried out, different harvest dates did not significantly affect the yield of essential oil. The lowest yield of essential oil (21,5 l ha⁻¹) was obtained from the sixth harvest date (on 31 October), while the highest value (25,19 l ha⁻¹) was obtained from the third harvest date (on 14 September) (Table 3). The essential oil yield values in the unit area appear as a function of the volatile oil content and the dry leaf yield values. In the study, there was an increase in the yield of dry leaves in parallel with the delayed harvest dates, while the decrease in the essential oil content was observed. This can explain the fact that different harvest dates were not significantly effective on the yield of essential oil.

Thirty-five components were identified accounting for 94.1-96.1 % in the oil. Camphor, 1-verbenone, α -pinene, borneol and 1,8-cineole/eucalyptol were the main components of the oil from rosemary. While α -pinene, one of these

main components, was monoterpene hydrocarbon, the other four compound (camphor, 1-verbenone, borneol and 1,8-cineole) were oxygenated monoterpenes. Depending on the different harvest dates, the camphor ratio (11.67-14.78%) changed. The highest camphor rate was taken from the fifth harvest date (on 15 September), while the lowest value was obtained from the first harvest date (on 16 August). While the camphor rate increased from the first harvest date to the fifth harvest date, on the other hand, in the sixth harvest date, the camphor value decreased again. In the other main components of the essential oil, no regular changes were determined depending on the harvest dates (Table 4). The change in essential oil components due to harvest dates can be explained by varying average temperatures and day length [26, 28, 29].

Table 4. Essential oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) plant harvested at different dates

RT	Compounds	Different Harvest Dates						Mean
		16 Aug.	29 Aug.	14 Sept.	28 Sept.	15 Oct.	31 Oct.	
23,794	Camphor	11,67	12,08	12,10	12,94	14,78	13,85	12,90
30,435	1-Verbenone	8,47	11,44	11,46	13,61	11,50	11,77	11,38
7,521	α -Pinene	10,26	8,74	8,75	10,87	11,25	11,82	10,28
30,155	Borneol	9,90	8,61	8,62	9,78	11,12	10,95	9,83
12,868	1,8-Cineole	7,01	7,01	7,01	7,06	9,07	8,47	7,61
24,642	Linalool	4,06	3,87	3,88	3,94	4,03	4,18	3,99
26,955	Caryophyllene	5,54	4,48	4,49	3,47	2,27	2,37	3,77
12,570	DL-Limonene	3,58	3,07	3,07	3,38	3,40	3,45	3,32
26,266	(-)-bornyl acetate	3,68	4,37	4,38	2,39	1,54	1,46	2,97
8,605	Camphene	2,76	2,22	2,22	2,50	2,78	2,91	2,56
38,464	15-Crown-5	1,36	3,44	3,45	1,78	0,60	1,74	2,06
33,286	trans-Carveol	3,05	2,10	2,10	1,10	2,20	1,05	1,93
30,001	α -Terpineol	1,62	1,79	1,79	1,77	2,03	1,94	1,82
32,324	Nopol	1,58	1,71	1,71	1,66	1,82	1,74	1,70
24,943	Pinocamphone	1,53	1,69	1,69	1,55	1,98	1,72	1,69
10,955	δ -3-Carene	1,77	1,57	1,57	1,75	1,69	1,61	1,66
33,292	Phenylurea	-	1,03	1,03	1,92	1,08	2,15	1,44
29,488	cis-Verbenol	1,37	-	-	-	-	-	1,37
29,494	trans-Verbenol	-	1,42	1,42	1,15	1,27	1,15	1,28
37,946	18-Crown-6 ether	1,32	1,92	1,93	0,46	0,21	1,10	1,15
15,453	α -Terpinolen	1,36	1,30	1,30	1,15	0,91	0,81	1,14
15,061	ρ -Cymene	1,01	0,83	0,83	1,06	1,24	1,36	1,05
23,417	chrysanthenone	1,14	1,02	1,02	0,95	0,96	0,98	1,01
10,253	verbenene	0,96	0,82	0,82	1,26	0,97	1,06	0,98
11,403	β -Myrcene	1,03	0,92	0,92	0,97	0,99	1,03	0,98
31,579	δ -Cadinene	0,96	0,92	0,92	1,07	0,54	0,74	0,86
29,338	α -Homulene	1,08	0,93	0,93	0,74	0,58	0,61	0,81
27,056	Terpinen-4-ol	0,67	0,71	0,71	0,74	0,96	0,86	0,78
30,767	trans- α -Bisabolene	0,84	0,88	0,88	0,66	0,60	0,60	0,74
29,831	α -Amorphene	1,21	0,92	0,92	0,39	0,52	0,26	0,70
28,273	Menthol	0,35	-	-	1,01	-	-	0,68
36,082	(-)-Caryophyllene oxide	0,92	0,71	0,71	0,49	0,60	0,64	0,68
9,733	β -Pinene	0,69	0,63	0,63	0,52	0,74	0,63	0,64
14,157	γ -Terpinene	0,69	0,59	0,59	0,69	0,59	0,58	0,62
28,804	(S)-cis-Verbenol	0,63	0,59	0,59	0,50	0,64	0,56	0,58
	< 0,50	5,95	5,69	5,56	4,73	4,60	3,88	5,07
	Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	

4. Conclusions and discussion

In Eskişehir ecological conditions, the fifth harvest date (on 15 October) may be recommended to obtain the highest dry leaf yield in rosemary cultivation, while the third harvest date (on 14 September) can be recommended for the highest yield of essential oil.

References

- [1] Hussain, A.I., Anwar, F., Chatha, S., A., S., Jabbar, A., Mahboob, S., Nigam, P.,S. (2010). *Rosmarinus officinalis* Essential Oil: Antiproliferative, Antioxidant and Antibacterial Activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 1070-1078, ISSN 1517-8382.
- [2] Hassan, F.A.S., Bazaid, S., Ali, E.F. (2013). Effect of Deficit Irrigation on Growth, Yield and Volatile Oil Contenton *Rosmarinus officinalis* L. *Plant. Journal of Medicinal Plants Studies*, 1(3), 12-21, ISSN: 2320-3862.
- [3] Borrás-Linares, I., Stojanović, Z., Quirantes-Piné, R., Arráez-Román, D., Švarc-Gajić, J., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. (2014). *Rosmarinus officinalis* Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 20585-20606; doi:10.3390/ijms151120585.
- [4] Angioni, A., Bara, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J. D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V., Cabras, P. (2004). Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(11), 3530-3535.
- [5] Yıldırım, K.D. (2018). The Effect of Seasonal Variation on *Rosmarinus officinalis* (L.) Essential Oil Composition. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi (UTYHBD)*, 4(1), 33-38, DOI: 10.24180/ijaws.381564.
- [6] Malayoğlu, H.B. (2010). Biberiyenin (*Rosmarinus officinalis* L.) Antioksidan Etkisi. *Hayvansal Üretim*, 51(2), 59-67.
- [7] Miguel, M.G., Guerrero, C., Rodrigues, H., Brito, J. (2007, February 23-25). *Essential oils of Rosmarinus officinalis L., effect of harvesting dates, growing media and fertilizers*. In: Proceedings of the 3rd IASME/WSEAS International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development, Agios Nikolaos, Greece, July, pp. 24–26.
- [8] Baytop, T. (1984). *Türkiye’de bitkilerle tedavi*. İstanbul Üniversitesi Yayınları Yayın No:3255, Ecz. Fak. Yayın No:40, İstanbul.
- [9] Kırpık, M. (1998). *Farklı Kökenli Rosmarinus officinalis L. (Biberiye) Bitkilerinin Verim ve Uçucu Yağları Üzerinde Araştırmalar*. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi.
- [10] Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C.S., Shao, X., Pan, M.H. (2010). Flavonoids and phenolic compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5363-5367.
- [11] Gülbaba, A.G., Kürkçüoğlu, M., Özkurt, N., Başer, K.H.C. (2002). *Mersin ve Adana Yöresindeki Doğal Biberiye (Rosmarinus officinalis L.) Populasyonlarının Tespiti ve Uçucu Yağ Verim ve Bileşimlerinin Belirlenmesi*. Orman Bakanlığı Yayın No: 193, DOA Yayın No: 25, Teknik Bülten No: 16, ISSN: 1300-7912.
- [12] Santonyo, S., Cavero, S., Janime, L., Ibenaz, E., Senorans, F.J., Reglero, G. (2005). Activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Food Protection*, 68(4), 790-795.
- [13] Faheem, M., Ali, M., Ullah, N., Alam, M., Ullah, H., Khan, W.U., Anwar, M. (2016). Antitumour activity of essential oil of rosemary by potato disc method. *Biological Diversity and Conservation*, 9(1), 44-48.
- [14] Hendel, N., Larous, L. and Belbey, L. (2016). Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. *International Food Research Journal*, 23(4), 1725-1732.
- [15] Hamidpour, R., Hamidpour S., Elias G. (2017). *Rosmarinus officinalis* (Rosemary): A Novel Therapeutic Agent for Antioxidant, Antimicrobial, Anticancer, Antidiabetic, Antidepressant, Neuroprotective, Anti- Inflammatory, and Anti-Obesity Treatment. Rafie Hamidpour. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, 1(4), 1098-1103, DOI: 10.26717/BJSTR.2017.01.000371.
- [16] Kırıcı, S., Inan, M. (2002). *Effect of Different Harvesting Time on the Essential Oil Content of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) in the Çukurova Conditions*. In Proceedings of the Workshop on Agricultural and Quality Aspects of Medicinal and Aromatic Plants (Ed. M. Özgüven) May 29- June 01-2001 Adana.
- [17] Baytop, T. (1999). *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi* (2.Baskı). Nobel Yayınları, Sayfa: 166 ISBN: 975-420-021-1. Ankara.
- [18] De Mastro, G., Ruta, C., Mincione, A., Poiana, M. (2004). *Bio-morphological and Chemical Characterization of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) Biotypes*. Proc. XXVI IHC – Future for Medicinal and Aromatic Plants Eds. L.E. Craker et al. Acta Hort. 629, ISHS 2004, Publication supported by Can. Int. Dev. Agency (CIDA), 471-482.
- [19] Satyal, P., Jones, T. H., Lopez, E. M., McFeeters, R. L., Ali, N. A. A., Mansi, I., Al-kaf, A. G., Setzer, W. N. (2017). Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*, *Foods*, 6, 20, DOI: 10.3390/foods6030020.
- [20] Jan, A.,K., Rehman, N., Mehmood, N., Rauf, A., Farooq, U., Khan, A., Khan, H. (2017). Chemical Composition and Biological Profile of Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Science, Technology and Development*, 36(1), 1-5.

- [21] Baydar, H. (2005). *Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi*. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 51, ISBN: 975-7929-79-4. ISPARTA.
- [22] Düzgüneş, O., Kesici, T., Kavuncu, O., Gürbüz, F. (1987). *Araştırma ve Deneme Metotları*. Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, 381s.
- [23] Abdelmajeed, N. A., Danial, E. N., Ayad, H. S. (2013). The effect of environmental stress on qualitative and quantitative essential oil of aromatic and medicinal plants. *Archives Des Sciences*, 66(4),100-116.
- [24] Ebrahimghochi, E., Mohsenabadi, G., Majidian, M. (2018). Effect of Planting Date and Intercropping with Fenugreek (*Trigonella foenum-graceum* L.) on Yield and Essential Oil Content of Peppermint (*Mentha piperita* L.), *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(3), 759-768, DOI: 10.1080/0972060X.2018.1465857.
- [25] Grausgruber-Groger, S., Schmiderer, C., Steinborn, R., Novak, J. (2012). Seasonal influence on gene expression of monoterpene syntheses in *Salvia officinalis* (Lamiaceae). *Journal of Plant Physiology*, 169, 353-359.
- [26] Madandoust, M., Fooladchang, M. (2018). Effect of Nitrogen Fertilizer on Essential Oil Content and its Compositions in *Anethum graveolens* L., *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(5), 1266-1271, DOI: 10.1080/0972060X.2018.1544934.
- [27] Said-Al Ahl, H.A.H., Sabra, A.S., Gendy, A.S.H., Astatkie, T. (2018). Essential Oil Content and Concentration of Constituents of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) at Different Harvest Dates, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(5), 1410-1417, DOI: 10.1080/0972060X. 2018.1553636.
- [28] Villers, C. J. (2007). *The effect of Phosphorus on the growth, plant mineral content and essential oil composition of Buchu (Agathosma betulina)*. Thesis presented in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Agricultural Science at Stellenbosch University.
- [29] Ennajar, M., Bouajila, J., Lebrihi, A., Mathieu, F., Savagnac, A., Abderraba, M., Raiesf, A., Romdhane, M. (2010). The influence of organ, season and drying method on chemical composition and antioxidant and antimicrobial activities of *Juniperus phoenicea* L. essential oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 462-470.
- [30] Katar, D., Olgun, M., Katar, N. and Aydın, D. (2019). Determination of Relationship between Yield Components in Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Genotypes. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University*, 36(3), 177-186. DOI:10.13002/jafag4542.
- [31] Aydın, D., Katar, N., Katar, D. ve Olgun, M. (2019). Farklı Kurutma Sıcaklıklarının Anadolu Adaçayının (*Salvia fruticosa* Mill. =*Salvia triloba* L.) Uçucu Yağ Oranı ve Bileşenleri Üzerine Etkisinin Belirlenmesi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 5(1), 103-109. DOI: 10.24180/ijaws.450195

(Received for publication 31 December 2018; The date of publication 15 December 2019)



Physicochemical soil properties of genus *Origanum* (Lamiaceae) L. grown in Turkey

Turan ARABACI ^{*1}, Türker YAZICI ², Taner ÖZCAN ², Tuncay DİRMENCİ ²
ORCID: 0000-0003-3869-4557, 0000-0001-7709-9828, 0000-0003-1683-7297, 0000-0003-3038-6904

¹ Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, İnönü University, 44280, Malatya, Turkey

² Department of Biology Education, Necatibey Education Faculty, Balıkesir University, Balıkesir, Turkey

Abstract

This study aimed to determine the physicochemical soil properties of genus *Origanum* L. (in Turkish: Mercanköşk) grown in Turkey. Soils samples were collected from 22 localities where the 24 *Origanum* taxa grown. Soil texture, pH, electrical conductivity, CaCO₃, organic matter, P, K, Cu, Fe, Zn, and Mn parameters were evaluated for each sample. According to soil analysis the texture consists from clay, clay-loam or loam, pH value between 6.62 and 7.49, electrical conductivity (E.C.) is saltless or slightly salty, CaCO₃ content among 0.08 % to 48.97 % and the amount of organic matter were between 0.01 % and 11.54 %. The availability of P, K, Cu, Fe, Zn and Mn were determined low, medium, adequate or high level in the analyzed soils. The results are discussed with the previous studies.

Key words: ecology, *Lamiaceae*, *Origanum*, soil, Turkey

----- * -----

Türkiye’de yetişen *Origanum* L. (Lamiaceae) cinsinin toprağının fiziko-kimyasal özellikleri

Özet

Bu çalışmada, Türkiye’de yetişen *Origanum* L. (Mercanköşk) cinsinin fiziko-kimyasal toprak özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Origanum* cinsinin 24 taksonunun büyüdüğü 22 bölgeden toprak örnekleri alındı. Her bir örnek için toprak bünyesi, pH, elektriksel iletkenlik, CaCO₃, organik madde, P, K, Cu, Fe, Zn ve Mn parametreleri değerlendirildi. Toprak analizine göre bünye killi, killi-tınlı veya tınlı, pH değeri 6.62 ile 7.49 arasında, Elektriksel İletkenlik (E.İ.) tuzsuz veya az tuzlu, CaCO₃ içeriği % 0.08 ile % 48.97 arasında ve organik madde miktarı % 0.01 ila % 11.54 arasında bulundu. Analiz edilen topraklarda P, K, Cu, Fe, Zn ve Mn miktarı düşük, orta, yeterli veya yüksek seviyelerde belirlendi. Sonuçlar önceki çalışmalarla tartışıldı.

Anahtar kelimeler: ekoloji, *Lamiaceae*, *Origanum*, toprak, Türkiye

1. Introduction

The aromatic and medicinal genus *Origanum* L (Lamiaceae). (in Turkish: Mercanköşk) is represented by 43 species (50 taxa) and 19 hybrids in the world. The members of *Origanum* are widespread in Turkey, mainly in the Mediterranean area, with 21 species (24 taxa) and 12 hybrids, 23 of which are endemic [1,2,3]. *O. vulgare* L. *s.l.* is one of the widespread species in Turkey [4,5].

Origanum has antimicrobial, antifungal, antioxidant, antibacterial, antithrombin, antimutagenic, angiogenic, antiparasitic and antihyperglycemic activities that are important medicinally [6]. Many phytochemical studies such as their essential oil and phenolic components have been conducted to investigate the chemical profiles and activities of *Origanum* species [7,8,9]. A broad variability was observed in the essential oil profiles of *O. vulgare* populations, suggesting that the basis of variation in essential oil composition could be the differences in the geographical area of collection site, altitude and soil types [10]. A significant correlation between some edaphic factors (pH, K₂O content, soil texture) and the essential oil yield *O. compactum* Benth. was determined [11].

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +904223773090; Fax.: +904223773090; E-mail: turan.arabaci@inonu.edu.tr

This study included the physical and chemical properties of soil in native growing areas of *O. amanum* Post, *O. bilgeri* P.H.Davis, *O. boissieri* Ietsw (2 areas), *O. brevidens* (Bornm.) Dinsm. (2 areas), *O. haussknechtii* Boiss., *O. husnucan-baseri* H.Duman, Aytaç & A.Duran, *O. hypericifolium* O.Schwarz & P.H.Davis, *O. laevigatum* Boiss. (2 areas), *O. leptocladum* Boiss., *O. majorana* L., *O. minutiflorum* O.Schwarz & P.H. Davis, *O. onites* L., *O. rotundifolium* Boiss., *O. saccatum* P.H. Davis, *O. sipyleum* L., *O. solymicum* P.H. Davis, *O. syriacum* L. subsp. *bevanii* (Holmes) Greuter & Burdet, *O. vogelii* Greuter & Burdet, *O. vulgare* L. subsp. *hirtum* (Link) Ietsw. (3 areas), *O. vulgare* L. subsp. *vulgare*, *O. × bilgilii* Dirmenci, Yazıcı & Arabacı, *O. × haradjanii* Rech.f., *O. × intercedens* Rech.f. and *O. × sevcaniae* Dirmenci, Arabacı & Yazıcı.

2. Materials and methods

Soils samples were collected from 22 localities where the 24 *Origanum* taxa occurred during the field studies conducted on the flowering time of the taxa, between the years 2013 and 2015 from Turkey (Table 1). The organic matter on the soil surface was removed. The materials were taken from 0-30 cm depth and dried in air circulated oven. The soil samples were grinded by a 2 mm sieve. Soil texture, pH, electrical conductivity (E.C.), CaCO₃, organic matter, P, K, Cu, Fe, Zn, and Mn parameters were analyzed for each sample. The crushing, drying and sieving were made according to the TS 10308 ISO 11464 Soil Quality Pretreatment for Samples for Physico-Chemical Analysis. Determination of P, K, trace elements (Cu, Fe, Zn, and Mn), CaCO₃, organic matter and water saturation of soil samples were made according to the TS 8340 UDK 631.41, TS 8341 UDK 631.41, TS ISO 14870, TS 8335 ISO 10693, TS 8336 UDK 631.41 and TS 8333 UDK 631.43 respectively. The soil sample, where more than one *Origanum* taxa growth on, was evaluated for all taxa occurs there.

3. Results

The main physicochemical soil properties of *Origanum* taxa in this study are given in Table 2-3. The soil sample of 24 *Origanum* taxa collected from 22 localities are analyzed in term of soil texture, pH, E.C., CaCO₃, organic matter, P, K, Cu, Fe, Zn, and Mn parameters.

The texture consist from clay in *O. amanum*, *O. brevidens* (TD3996), *O. majorana*, *O. vulgare* subsp. *vulgare*, *O. × haradjanii*, *O. syriacum* subsp. *bevani* and *O. laevigatum* (TD 4334); clay-loam in *O. bilgeri*, *O. boissieri* (TD 4319), *O. brevidens* (TD4270), *O. haussknechtii*, *O. laevigatum* (TD 4000), *O. leptocladum*, *O. minutiflorum*, *O. × intercedens*, *O. onites*, *O. saccatum*, *O. × bilgilii* and *O. vulgare* subsp. *hirtum* (TD 4294 & TD 4309) and loam in *O. boissieri* (TD 4285), *O. husnucan-baseri*, *O. hypericifolium*, *O. rotundifolium*, *O. sipyleum*, *O. solymicum*, *O. vogelii*, *O. × sevcaniae* and *O. vulgare* subsp. *hirtum* (TD 4018) (Table 2).

Amount of organic matter is between 0.01 and 11.54 %. The soil, where the endemic species *O. amanum* growth on, is the richest by the organic matter with the 11.54 %. *O. vulgare* subsp. *vulgare*, *O. solymicum*, *O. majorana* and *O. bilgeri* has poor soil with the 0.01 % organic matter value (Table 2).

The availability of P, K, Cu, Fe, Zn and Mn were determined low, medium, adequate or high level in the analyzed soils. The lowest P amount is found as <1.0 mg/kg in *O. leptocladum*, *O. solymicum*, *O. vogelii* and *O. × sevcaniae* while, the highest level is observed in *O. × haradjanii*, *O. syriacum* subsp. *bevanii* and *O. laevigatum* (TD 4334) soil samples. The K was lower in 59%, adequate in 36% and high in 5% of the plant soil samples. Cu, Fe, Zn and Mn levels are mostly adequate with the ratio of 55%, 82%, 59% and 73% of the plant soil samples respectively (Table 3).

4. Conclusions and discussion

The soil samples where the *Origanum* taxa grow naturally in Turkey are consist from clay to loam soil texture and saltless or slightly salty soil with neutral pH values. *Origanum compactum* populations sampled in Morocco were growth on clayey, silty and sandy soils [11]. The soils where the oregano occurs naturally in Greece was found to be alkaline with the pH values between 7.5 and 8.5 in the 65% of the soil samples, the E.C. was calculated 1.15- 0.4 dS/m in the 72% of the soil samples, the organic matter content determined higher than 5% in the 60% soil samples and the CaCO₃ content measured among 4 to 7% in the 70 % soil samples [12]. The soils found to be alkaline and relatively acidic with the pH between 6.3 and 7.9 in *Origanum compactum* populations [11].

The organic matter amount mostly has a low concentration in the examined soil samples. The organic matter content was found 2.28%, 6.43%, 10.18% and 6.05% in *Origanum solymicum*, *O. husnucan-baseri*, *O. bilgeri* and *O. minutiflorum* soil samples respectively in previous studies [13]. The soil samples are generally determined adequate in term of Cu, Fe, Zn and Mn, low in term of K, both adequate and low in term of P parameters.

Table 1. Localities of *Origanum* taxa

Taxa	Localities
<i>O. amanum</i>	C6 Osmaniye: Düziçi, west slopes of Düldül Mountain, Between Başkonuş plateau and Hüseyinoluk fountain, rocky places in the pass, 19.09.2014, Dirmenci 4321 & Arabacı (NEF-TD4321)
<i>O. bilgeri</i>	C3 Antalya: 13 km Gündoğmuş to Hanboğazı, 1460 m, 17.08.2014, Dirmenci 4300, Arabacı & Yazıcı (NEF-TD4300)
<i>O. boissieri</i>	C5 Mersin: 15 km from Çamlıyayla to Saydibi, 1850 m, 18.09.2014, Dirmenci 4319 (NEF-TD4319)
	C5 Mersin: 15 km from Çamlıyayla to Saydibi, 1850 m, 16.08.2014, Dirmenci 4285, Arabacı & Yazıcı (NEF-TD4285)
<i>O. brevidens</i>	C6 Osmaniye: Between Yarpuz and Yağlıpınar, 1350 m, 15.07.2013, Dirmenci 3996 (NEF-TD3996)
	C6 Osmaniye: Between Yarpuz and Yağlıpınar, 1310 m, 15.08.2014, Dirmenci 4270, Arabacı, Yazıcı (NEF-TD4270)
<i>O. haussknechtii</i>	B7 Erzincan: 15-20 km from Kemaliye to Arapkir, 1000-1100 m, calcareous rocks, 22.08.2013, Arabacı 2824, (NEF-TA2824)
<i>O. husnucan-baseri</i>	C4 Antalya: 43 km from Alanya to Gökbel plateau, Kuşyuvası place, around tunnels, 1350 m, 17.08.2014, Dirmenci 4298, Arabacı, Yazıcı (NEF-TD4298)
<i>O. hypericifolium</i>	C2 Denizli: Honaz, Honaz Mountain, Arpacık plateau road, north slopes, <i>Pinus nigra</i> openings, 1260 m, , 19.08.2014, Dirmenci 4315 & Yazıcı (NEF-TD4315)
<i>O. laevigatum</i>	C5 Osmaniye: Zorkun plateau, 8 km from Erzin junction, 1250 m, 15.07.2013, Dirmenci, 4000 (NEF-TD4000)
	C6 Hatay: Between Antakya and Samandağ, Around St. Symeon Church, slopes facing the sea, 20.09.2014, Dirmenci 4334, Arabacı & Yazıcı (NEF-TD4334)
<i>O. leptocladum</i>	C4 Karaman: Between Ermenek and Kazancı, 1 km above Görmeli village, 880 m, 17.08.2014, Dirmenci 4290, Arabacı, Yazıcı (NEF-TD4290)
<i>O. majorana</i>	C5 Mersin: Güzeldere, 252 m, 13.07.2013, Dirmenci 3984 (NEF) (TD3984)
<i>O. minutiflorum</i>	C3 Antalya: Kemer, Üçoluk, above Tülek, <i>Cedrus libani</i> and <i>Pinus nigra</i> openings, 1360 m, 18.08.2014, Dirmenci 4305 & Yazıcı (NEF-TD4305)
<i>O. onites</i>	C2 Denizli: Taşocağı, <i>Quercus</i> scrubs, stony places in maquis shrubland, 530 m, 19.08.2014, Dirmenci 4311 & Yazıcı (NEF-TD4311)
<i>O. rotundifolium</i>	A8 Artvin: 10 km from Artvin to Ardanuç, 600-700 m, 27.08.2013, Dirmenci 3943 & B.Yıldız (NEF-TD3943)
<i>O. saccatum</i>	C4 Antalya: Alanya, 8 km from Gökbel to Çökelek, 1370 m, 17.08.2014, Dirmenci 4296, Arabacı & Yazıcı (NEF-TD4296)
<i>O. sipyleum</i>	C3 Konya: 1 km from Akşehir to Yalvaç, Sultan Mountain foothill, 1100 m, 09.07.2013, Dirmenci 3959-a (NEF-TD3959-a)
<i>O. solymicum</i>	C3 Antalya: Kemer, Kesme couloir, <i>Pinus brutia</i> opening, calcareous rocks, 100 m, 18.08.2014, Dirmenci 4302 & Yazıcı (NEF-TD4302)
<i>O. syriacum</i> subsp. <i>bevanii</i>	C6 Hatay: Between Antakya and Samandağ, Around St. Symeon Church, slopes facing the sea, 20.09.2014, Dirmenci 4336, Arabacı & Yazıcı (NEF-4336)
<i>O. vogelii</i>	C5 Mersin: Gülek, around castle, 1500 m, 01.10.2015, Dirmenci 4503 & Yazıcı (NEF-TD4503)
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i>	C4 Antalya: Alanya, 8 km from Gökbel to Çökelek, 1370 m, 17.08.2014, Dirmenci 4294, Arabacı & Yazıcı (NEF-TD4294)
	C5 Adana: 16 km from Feke to Yahyalı, 940 m, 17.07.2013, Dirmenci 4018 (NEF-TD4018)
	C2 Denizli: Taşocağı, <i>Quercus</i> scrubs, stony places in maquis shrubland, 530 m, 19.08.2014, Dirmenci 4309, & Yazıcı (NEF-TD4309)
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	A8 Artvin: 17.5 km from Borçka to Hopa, slopes, 26.08.2013, Dirmenci 3937 & Yıldız (NEF-TD3937)
<i>O. × bilgilii</i>	C4 Antalya: Alanya, 8 km from Gökbel to Çökelek, 1370 m, 17.08.2014, Dirmenci 4295, Arabacı & Yazıcı (NEF-TD4295)
<i>O. × haradjanii</i>	C6 Hatay: Between Antakya and Samandağ, Around St. Symeon Church, slopes facing the sea, 20.09.2014, Dirmenci 4335, Arabacı & Yazıcı (NEF-TD4335)
<i>O. × intercedens</i>	C2 Denizli: Taşocağı, <i>Quercus</i> scrubs, stony places in maquis shrubland, 530 m, 19.08.2014, Dirmenci 4310-a/b, & Yazıcı (NEF-TD4310-a/ T.D. 4310-b)
<i>O. × sevcaniae</i>	C5 Mersin: Gülek, around castle, 1500 m, 01.10.2015, Dirmenci 4504 & Yazıcı (NEF-TD4504)

Table 2. Soil texture, pH, E.C., CaCO₃ and organic matter parameters of examined soil

Taxa	Parameters									
	Soil Texture %		pH		E.C. µS/cm		CaCO ₃ %		Organic matter %	
<i>O. amanum</i>	104	C	6.62	N	211	SS	2.36	limy	11.54	high
<i>O. bilgeri</i>	53	CL	7.42	N	88	S	35.45	high limy	0.01	low
<i>O. boissieri</i> (TD 4285)	40	L	7.09	N	71	S	27.63	high limy	0.43	low
<i>O. boissieri</i> (TD 4319)	51	CL	7.02	N	169	S	32.81	high limy	1.66	low
<i>O. brevidens</i> (TD 3996)	94	C	7.49	N	172	S	6.81	limy	9.28	high
<i>O. brevidens</i> (TD 4270)	58	CL	6.99	N	216	SS	14.75	limy	5.71	high
<i>O. haussknechtii</i>	59	CL	7.25	N	111	S	22.59	high limy	2.99	medium
<i>O. husnucan-baseri</i>	33	L	7.17	N	70	S	27.46	high limy	0.49	low
<i>O. hypericifolium</i>	41	L	7.43	N	92	S	9.64	limy	0.61	low
<i>O. laevigatum</i> (TD 4000)	51	CL	7.25	N	172	S	32.41	high limy	1.62	low
<i>O. leptocladum</i>	66	CL	7.16	N	112	S	38.02	high limy	1.11	low
<i>O. majorana</i>	71	C	7.05	N	184	S	32.22	high limy	0.01	low
<i>O. minutiflorum</i>	54	CL	6.91	N	107	S	32.85	high limy	0.12	low
<i>O. onites</i> , <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> (TD 4309), <i>O. × intercedens</i>	51	CL	7.02	N	169	S	32.81	high limy	1.66	low
<i>O. rotundifolium</i>	40	L	6.68	N	79	S	1.11	limy	2.13	medium
<i>O. saccatum</i> , <i>O. × bilgii</i> , <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> (TD 4294)	66	CL	7.03	N	102	S	0.08	low limy	8.29	high
<i>O. sipyleum</i>	40	L	7.20	N	119	S	18.09	high limy	1.22	low
<i>O. solymicum</i>	33	L	7.21	N	68	S	48.97	high limy	0.01	low
<i>O. vogelii</i> , <i>O. × sevcaniae</i>	33	L	6.85	N	56	S	3.47	limy	0.18	low
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> (TD 4018)	48	L	6.89	N	80	S	0.08	low limy	1.73	low
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	81	C	7.15	N	185	S	23.59	high limy	0.01	low
<i>O. × haradjanii</i> , <i>O. syriacum</i> subsp. <i>bevanii</i> , <i>O. laevigatum</i> (TD 4334)	89	C	6.93	N	266	SS	24.60	high limy	11.18	high

C: clay, CL: clay loam, L: loam, N: neutral, S: saltless, SS: slightly salty The pH of soil samples is evaluated as neutral between 6.62 and 7.49. E.C. value is slightly salty in the soil samples of *O. amanum*, *O. brevidens* (TD 4270), *O. × haradjanii*, *O. syriacum* subsp. *bevanii* and *O. laevigatum* (TD 4334) whereas saltless for the others. CaCO₃ content ranging from 0.08 to 48.97 % among the soil samples. The soil of *O. saccatum*, *O. × bilgii* and *O. vulgare* subsp. *hirtum* (TD 4294 & TD 4018) are poor in terms of CaCO₃, while *O. solymicum* has a high CaCO₃ percentage (Table 2).

Table 3. P, K, Cu, Fe, Zn, and Mn parameters of examined soil

Taxa	Parameters											
	P mg/kg		K mg/kg		Cu mg/kg		Fe mg/kg		Zn mg/kg		Mn mg/kg	
<i>O. amanum</i>	9.6	M	115	A	1.1	H	10.5	A	1.4	A	13.6	A
<i>O. bilgeri</i>	14.3	M	106	L	0.8	A	9.1	A	0.5	A	14.8	A
<i>O. boissieri</i> (TD 4285)	8.5	M	<60	L	0.5	A	4.1	A	0.9	A	2.3	M
<i>O. boissieri</i> (TD 4319)	4.3	L	152	A	1.2	H	8.7	A	0.9	A	16.1	A
<i>O. brevidens</i> (TD 3996)	1.1	L	97	L	0.1	A	15.9	A	1.4	A	15.9	A
<i>O. brevidens</i> (TD 4270)	7.3	L	<60	L	<1.0	L	13.9	A	0.9	A	6.8	A
<i>O. haussknechtii</i>	4.9	L	194	A	0.4	A	5.7	A	0.5	A	18.7	A
<i>O. husnucan-baseri</i>	10.7	M	<60	L	0.2	A	3.1	M	0.7	A	1.0	M
<i>O. hypericifolium</i>	8.5	M	<60	L	0.7	A	8.7	A	0.3	L	5.6	A
<i>O. laevigatum</i> (TD 4000)	8.4	M	<60	L	0.3	A	1.9	L	0.1	L	4.3	M
<i>O. leptocladum</i>	<1.0	L	126	A	0.1	A	11.0	A	0.3	L	1.9	M
<i>O. majorana</i>	17.7	A	196	A	0.6	A	8.7	A	0.7	A	22.0	A

Table 3. Continued

<i>O. minutiflorum</i>	9.6	M	166	A	1.2	H	8.7	A	0.4	L	2.2	M
<i>O. onites</i> , <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> (TD 4309), <i>O. × intercedens</i>	4.3	L	152	A	1.2	H	8.7	A	0.9	A	16.1	A
<i>O. rotundifolium</i>	15.8	A	<60	L	1.4	H	4.8	A	0.6	A	26.3	A
<i>O. saccatum</i> , <i>O. × bilgilii</i> <i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> (4294)	19.6	A	105	L	0.6	H	27.9	A	1.6	H	5.9	A
<i>O. sipyleum</i>	10.2	M	<60	L	0.2	A	2.9	M	0.2	L	8.7	A
<i>O. solymicum</i>	<1.0	L	<60	L	<1.0	L	2.4	L	0.4	L	1.2	M
<i>O. vogelii</i> <i>O. × sevcaniae</i>	<1.0	L	<60	L	<1.0	L	22.7	A	0.5	A	5.2	A
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>hirtum</i> (TD 4018)	4.4	L	<60	L	0.2	A	10.9	A	0.2	L	35.1	A
<i>O. vulgare</i> subsp. <i>vulgare</i>	12.5	M	148	A	1.1	H	7.7	A	0.4	L	21.3	A
<i>O. × haradjanii</i> , <i>O. syriacum</i> subsp. <i>bevanii</i> <i>O. laevigatum</i> (TD 4334)	34.5	H	339	H	0.7	A	7.7	A	1.0	A	13.7	A

A: adequate, H: high, L: low, M: medium

Acknowledgements

We would like to thank TUBITAK (project no. 113Z225) for financial support to our researches, as well as the Balıkesir University Science and Teknology Application and Research Center, whose made analyses.

References

- Dirmenci, T., Yazıcı, T., Özcan, T., Çelenk, Ç. & Martin, E. (2018a). A new species and a new natural hybrid of *Origanum* L. (Lamiaceae) from the west of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 42, 73-90. [https://doi: 10.3906/bot-1704-35](https://doi.org/10.3906/bot-1704-35)
- Dirmenci, T., Özcan, T., Yazıcı, T., Arabacı, T. & Martin, E. (2018b). Morphological, cytological, palynological and molecular evidence on two new hybrids: an example of homoploid hybridization in *Origanum* (Lamiaceae). *Phytotaxa*, 371(3), 145-167. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.371.3.1>
- Dirmenci, T., Özcan, T., Açar, M., Arabacı, T., Yazıcı T., & Martin, E. (2019). A rearranged homoploid hybrid species of *Origanum* (Lamiaceae): *O. × munzurensense* Kit Tan & Sorger, *Botany Letters*, 166(2), 153-162, <https://doi.org/10.1080/23818107.2019.1585283>
- Keser, A.M. & Özgökçe, F. (2019). The Flora of Karz (Garez) Mountain (Tatvan, Bitlis/ Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 12(2), 78-91. DOI: 10.5505/biodicon.2019.46220
- Baykal, H., Atamov, V. & Yüksek, T. (2018). Flora of Tunca Valley Natural Park and environs (Ardeşen-Rize/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 11(2), 9-24.
- Chishti, S., Kaloo, Z.A. & Sultan, P. (2013). Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 5(10), 170-177.
- Çarıkcı S., Kılıç T., Özer Z., Dirmenci T., Arabacı T. & Gören AC. (2018). Quantitative determination of some phenolics in *Origanum laevigatum* Boiss. extracts via validated LC-MS/MS metod and antioxidant activity. *Journal of Chemical Metrology*, 12(2), 121-127. <http://doi.org/10.25135/jcm.21.18.11.1115>
- Özer Z., Kılıç T., Selvi S. & Paşa C. (2018). Effect of Different Drying Methods and Development Stages on the Essential Oil Chemical Composition of Aerial Parts of *Origanum vulgare* L. subsp. *hirtum* (link) Ietsw. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 21(5), 1403-1409. <https://doi.org/10.1080/0972060X.2018.1439774>
- Yılmaz, H., Çarıkcı, S., Kılıç, T., Dirmenci, T., Arabacı, T. & Gören, A.C. (2017). Screening of Chemical Composition, Antioxidant and Anticholinesterase Activity of Section *Brevifilamentum* of *Origanum* (L.) Species. *Rec. Nat. Prod.*, 11(5), 439-455. <http://doi.org/10.25135/acg.rnp.56.17.04.029>

- [10]. Mastro, G.D., Tarraf, W., Verdini, L., Brunetti, G. & Ruta, C. (2017). Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. *Food Chemistry*, 235, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.019>
- [11]. Aboukhalid, K., Al Faiz, C., Douaik, A., Bakha, M., Kursu, K., Agacka-Mołodoch, M., ... Lamiri, A. (2017). Influence of Environmental Factors on Essential Oil Variability in *Origanum compactum* Benth. Growing Wild in Morocco. *Chemistry and Biodiversity*, 14(9), e1700158. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201700158>
- [12]. Gougoulas, N., Papachatzis, A., Kalorizou, H., Wogiatzi, E. & Chouliaras, N. (2011). Physicochemical Soil Properties in Wild Type Oregano Growth Areas. *Universitatea Din Craiova Seria: Biologie, Horticultură, Tehnologie prelucrării produselor agricole, Ingineria mediului*, 16(52), 191-196.
- [13]. Ünal, O., Topçuoğlu, Ş.F. & Gökçeoğlu, M. (2005). Antalya İli İçin Endemik Olan *Origanum* Türlerinin Biyolojik Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(1), 1-14.

(Received for publication 15 January 2019; The date of publication 15 December 2019)



Contributions to the records of *Dysmachus praemorsus* (Loew, 1854) (Diptera, Asilidae) in Turkey and some notes on its seasonal activity

Hakan ÇALIŞKAN*¹
ORCID: 0001-0001-7879-6449

¹ Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Science and Arts, Department of Biology, Eskişehir, Turkey

Abstract

The genus *Dysmachus* is one of the richest species in the Palearctic region of the Asilidae (Diptera) family. It is known that *Dysmachus praemorsus* (Loew, 1854) (Diptera: Asilidae), which is one of the common species with wide habitat preference, is also in our country. In this study, *D. praemorsus* species were identified in 76 different habitats throughout the country in the summer months of 2002, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2018 and 2019, from sea level to 2200 meters. As a result of the study, new locality records contributed to the knowledge of distribution of the species in our country. The species was reported from 19 provinces for the first time. However, the distribution of the species depending on the height and temperature and the change in seasonal activity in different habitats were investigated.

Key words: *Dysmachus*, *D. praemorsus*, Asilidae, robberflies, biology

----- * -----

***Dysmachus praemorsus* (Loew, 1854)'ün (Diptera, Asilidae) Türkiye'deki kayıtlarına katkılar ve mevsimsel aktivitesi üzerine notlar**

Özet

Dysmachus cinsi Asilidae (Diptera) familyasının Palearktik Bölge'de en zengin tür çeşitliliğine ve geniş yayılışa sahip cinslerinden bir tanesidir. Cinsin geniş habitat tercihi ile yaygın türlerinden biri olan *Dysmachus praemorsus* (Loew, 1854) (Diptera: Asilidae) türünün ülkemizde de yayılış gösterdiği bilinmektedir. Bu çalışmada *D. praemorsus* türü 2002, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2018 ve 2019 yılları yaz aylarında ülke genelinde deniz seviyesinden 2200 metre yüksekliklere kadar 76 farklı habitatda tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda yeni lokalite kayıtları ile türün ülkemizdeki yayılış bilgilerine katkı sağlanmıştır. Tür 19 ilden ilk kez bu çalışmada rapor edilmiştir. Bununla birlikte türün yüksekliğe ve sıcaklığa bağlı olarak yayılışı ve farklı yaşam alanlarındaki mevsimsel aktivitesinin değişimi incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: *Dysmachus*, *D. praemorsus*, asilidae, robberflies, biology

1. Introduction

Robber flies (Asilidae), one of the largest families of true flies, have an important role as a prey in balancing insect populations in terrestrial ecosystems. These animals, with more than 7000 species, live in all terrestrial habitats from the deserts to the tundra. The 60 species of *Dysmachus*, known in the Palearctic region, are one of the largest genus in terms of the number of species. In the faunistic studies conducted so far, 17 species belonging to this genus have been reported from our country [1].

D. praemorsus, which is one of the common species in our country, was recorded by different researchers in May, June, July and August in 8 different provinces ([2, 3, 4]). The members of the species are medium-sized (20 mm) strong flies. Body color is grayish, wings are transparent and wing veins are brown-gray. The legs are black and the male and female genitalia are shiny black [5].

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905055617945; Fax.: +902222393578; E-mail: hakan@ogu.edu.tr

D. praemorsus is known as a steppe species [6]. Populations of the species show adult activity from May to July. Individuals of the species are more common in clay-alluvial soils and mesophytic meadows. It is known that they prefer meadow areas covered by plant species such as *Alopecurus pratensis*, *Poa pratensis*, *Poa trivialis* and *Clementis integrifolia* and grassland areas on the borders of cultivated fields. In general, species belonging to the genus *Dysmachus* are placed on the stems of plants with a height of 20-30 cm in the meadow areas and lay eggs in appropriate parts such as the spikes of plants. The larvae hatching fall into the soil with the spikes and continue to live as larvae predators on the ground and under the ground [5].

In this study, specimens collected from different regions of Turkey in 2002, 2003, 2005, 2006, 2007, 2008, 2018 and 2019 and data such as temperature obtained from sampling studies were used. Starting from the end of Edirne in western Turkey, at the eastern end to Kars (about 1450 km between the two cities) from different habitats of up to 2212 m above sea level examples of *D. praemorsus* have been determined. Changes in seasonal activity of the species between May and July were observed depending on the altitude and temperature.

2. Materials and methods

Collecting studies were done in May-September 2002, July 2003, April 2005, April-June 2006, April 2007, April 2008-April 2008, June-July 2018, May-September 2019. Sampling sites are from west to east in following provinces; Edirne, Çanakkale, Balıkesir, Kırklareli, İstanbul, Kocaeli, Eskişehir, Burdur, Antalya, Karabük, Kastamonu, Çorum, Ordu, Samsun, Amasya, Yozgat, Kayseri, Adana, Sivas, Kahramanmaraş, Erzincan, Tunceli, Bingöl, Tatvan, Erzurum, Kars and Ağrı. 76 different sampling localities range from 2212 meters above sea level. Sampling localities were determined by considering high mountain ranges which may affect the spread of animal organisms such as Anatolian diagonals. The geographical information, sampling dates, measured temperature and altitude values of collecting sites are given in Table 1 and Map 1. Temperatures are measured as the temperature value 1 meter above the ground.

Adult *D. praemorsus* specimens were collected with hand net with sweeping method, preserved in bottles contaminated with etil asetat. 189 male and 182 female total 371 adult individuals were evaluated. Preparations of samples were performed in the laboratory. The end of the abdomen was cut out and the male genitals were removed. Aedeagus, epandrium, gonococyte, dististylus and hypandrium were separated and measured with Leica MZ 16 and Leica Microsystems Framework. Male terminalia were placed in small capsules filled with glycerin and attached to pinned the specimens. All specimens were deposited in Entomology Laboratory of the Department of Biology, Eskişehir Osmangazi University. Following literature were used for species identification [7].

The vegetation in the collecting sites was photographed and the plant species, especially which these flies lay on, were identified by experts.

In order to monitor the seasonal activity changes of *D. praemorsus* due to temperature and altitude, the sampling localities were divided into 5 groups as 0-500 meters, 500-1000 meters, 1000-1500 meters, 1500-2000 meters and 2000-2500 meters.

Table 1. Geographic informations of collecting sites with dates and temperature data

No	Province	Lokâlite Name	Date	Latitude	Longitude	Alt (m)	°C
1	Edirne	Kurttepe	06.06.18	41°22'K	26°41'D	106	25
2	Edirne	Beyköy	02.06.02	40°39'K	26°30'D	38	25
3	Edirne	Lalapaşa	29.05.02	41°51'K	26°42'D	181	20
4	Edirne	Çukurköy (Bakışlar)	06.06.18	41°27'K	26°49'D	66	31
5	Edirne	Çavuşköy Göleti	02.06.02	40°40'K	26°11'D	50	25
6	İstanbul	Çilingir köyü	21.05.02	41°10'K	28°40'D	129	21
7	İstanbul	Akalan-Kalfa	03.06.18	41°15'K	28°25'D	117	23
8	Kırklareli	Vize-Pınarhisar	25.05.02	41°36'K	27°43'D	241	20
9	Kırklareli	Madara Deresi	26.05.02	41°52'K	27°54'D	35	19
10	Kırklareli	Dereköy	27.05.02	41°54'K	27°21'D	453	22
11	Kırklareli	Kömürköy	04.06.18	41°37'K	27°52'D	280	23
12	Çanakkale	Yeniköy	05.06.02	40°37'K	26°55'D	43	24
13	Tekirdağ	Malkara	06.06.02	40°55'K	26°52'D	199	24
14	Tekirdağ	Karababa Köyü	06.06.02	41° 7'K	27° 1'D	111	27
15	Tekirdağ	Palamut Köyü-	09.06.02	40°45'K	27°10'D	600	24
16	Tekirdağ	Yeniceköy	10.06.02	41° 6'K	27°44'D	75	22
17	Tekirdağ	Yakuplu	11.06.02	41° 2'K	27°54'D	52	21
18	İstanbul	Şileye 7 km	13.06.02	41° 7'K	29°33'D	27	22
19	Kocaeli	Uzuntarla	19.05.02	40°45'K	30° 6'D	187	20
	Kocaeli	Uzuntarla	19.06.02				22
20	Kocaeli	İsaklı	14.06.02	41° 3'K	29°56'D	216	24
21	Kocaeli	Balcı Köyü	02.06.18	41° 3'K	30°11'D	55	25

Table 1. Continued

22	Kocaeli	Pirceler	02.06.18	40°54'K	30° 3'D	232	24
23	Kocaeli	Kargalı Köyü	20.06.02	40°54'K	29°38'D	309	27
24	Sakarya	Karapınar	17.06.02	41° 3'K	30°37'D	24	22
25	Sakarya	Arifiye	18.06.02	40°40'K	30°21' D	104	26
26	Ordu	Ünye	27.06.18	41° 6'K	37°20'D	14	34
27	Yalova	Elmalık	21.06.02	40°36'K	29°19'D	176	35
28	Eskişehir	Yazılıkaya	08.06.18	39°12'K	30°42'D	1295	26
29	Eskişehir	Oynaş Köyü	12.06.18	39°10'K	30°37'D	1107	26
30	Eskişehir	Çukurca	06.07.18	39°17'K	30°40'D	1257	25
31	Eskişehir	Yenisofça	01.06.19	39°38'K	30°22'D	838	24
32	Karabük	Eflani	22.06.18	41°25'K	32°56'D	905	21
33	Karabük	Sine	22.06.18	41°21'K	32°44'D	1019	20
34	Kastamonu	Pınarbaşı	21.06.18	41°35'K	33° 5'D	684	22
35	Kastamonu	Kastamonu	20.06.18	41°28'K	33°26'D	877	23
36	Kastamonu	Karafasıl Köyü	21.06.18	41°34'K	33°10'D	1023	23
37	Kastamonu	Bahçeköy	22.06.18	41°18'K	33°33'D	1151	21
38	Çorum	Kuşsaray	25.06.18	40°36'K	35° 7'D	1069	18
39	Çorum	Yeni Hayat	25.06.18	40°23'K	34°43'D	842	26
40	Samsun	Ahmet Saray	27.06.18	40°59'K	35°53'D	765	20
41	Samsun	Ağaçpınar Köyü	26.06.18	40°56'K	35°54'D	981	23
42	Amasya	Destek Köyü	26.06.18	40°50'K	36°10'D	644	29
43	Amasya	Yeşilöz	26.06.18	40°33'K	36° 8'D	855	25
44	Yozgat	Sazlıdere	21.06.19	39°41'K	35°40'D	1235	24
45	Kayseri	Dikme	28.05.19	38° 1'K	35°32'D	1330	25
46	Kayseri	Avlağa	28.05.19	37°58'K	35°32'D	1265	24
47	Kayseri	Şihliya 2 km	28.05.19	38° 4'K	35°36'D	1422	26
48	Kayseri	Küçük Künye Yolu	28.05.19	38° 9'K	35°48'D	1500	30
49	Kayseri	Yahyalı-Dikme	27.05.19	38° 2'K	35°24'D	1370	26
50	Adana	Hanyeri	28.05.19	38°12'K	36° 1'D	1668	26
51	Sivas	Divriği Madenli	15.05.19	39°27'K	38°16'D	1160	27
52	Sivas	Zaraya 10km	03.07.18	40° 1'K	38° 1'D	1542	26
53	Sivas	Yıldızeli 5km	03.07.18	39°50'K	36°31'D	1389	23
54	Sivas	Nasır/ Zara	22.06.19	39°49'K	37°53'D	1365	24
55	Kahramanmaraş	Yalak Yol	29.05.19	38°14'K	37°30'D	1355	27
56	Kahramanmaraş	Doğankonak	28.05.19	38°13'K	36°25'D	1577	26
57	Erzincan	Mustafabey	01.07.18	39°48'K	40°31'D	1645	19
58	Erzincan	Köroğlu	02.07.18	39°53'K	38°56'D	1722	26
59	Erzincan	Altköy	02.07.18	39°57'K	38°38'D	1566	22
60	Erzincan	Gemecik	25.06.19	39°53'K	38°26'D	1785	26
61	Erzincan	Aydıncık	22.06.19	39°49'K	38°50'D	1789	23
62	Erzincan	Refahiye	22.06.19	39°53'K	38°46'D	1555	25
63	Tunceli	Çoban Yıldızı	02.07.18	39°27'K	39°53'D	1393	38
64	Tunceli	Pülümür	02.07.18	39°30'K	39°52'D	1627	28
65	Tunceli	Pişi Köyü/ Tunceli	02.07.18	39°39'K	39°44'D	1162	33
66	Erzurum	Sarıkamış 15km	28.06.18	40°15'K	42°38'D	1998	34
67	Erzurum	Nenehatun Termal	30.06.18	39°58'K	41°26'D	1836	25
68	Erzurum	Nenehatun	30.06.18	39°54'K	41°20'D	1979	26
69	Erzurum	Çimenli Köyü	30.06.18	40°11'K	41°54'D	2145	31
70	Erzurum	Alaca/Erzurum	01.07.18	39°59'K	40°58'D	1873	20
71	Erzurum	Hacıhamza	01.07.18	39°52'K	40°38'D	1935	19
	Erzurum	Hacıhamza	25.06.19			1860	23
72	Erzurum	Yukarı Çat	01.07.18	39°40'K	41° 0'D	2136	32
73	Kars	Sarıkamış	28.06.18	40°16'K	42°25'D	2212	25
74	Kars	Sarıkamış 2	23.06.19	40°19'K	42°32'D	2050	25
75	Kars	Yenigazi Köyü	23.06.19	40°24'K	42°44'D	1830	25
76	Kars	Horasan Yolu	23.06.19	40°17'K	42°23'D	2110	24

3. Results

Dysmachus praemorsus was recorded from 24 provinces and 76 localities. The species was firstly reported from 19 provinces (Edirne, Çanakkale, Balıkesir, Kırklareli, İstanbul, Kocaeli, Karabük, Kastamonu, Çorum, Ordu, Samsun, Amasya, Yozgat, Kayseri, Adana, Sivas, Kahramanmaraş, Tunceli, Kars) in this study.

Basic taxonomic characteristics of the species are listed below, with details of the distribution in the world and Turkey.

Dysmachus Loew, 1860

Tip tür: *Asilus trigonus* Meigen, 1804

Dysmachus praemorsus (Loew, 1854)

Body length: 13-19,5 mm, Wing length: 9-11,5 mm

They are mostly gray or grayish-brown. One hundred tubercles are large, hairs are dense on the face. In the thorax, the dorsocentral cetas reach the anterior edge of the mesonotum. Discal cetas are well developed in the abdomen and they are observed in a large number of lateral and posterior parts of the tergites. Male genitalia and female ovipositor are triangular. The eighth tergite is short and a quarter circle on the sides. The eighth sternite is long and ends with the ninth tergite. The length of the ninth tergite is half or slightly longer than the length of the eighth sternite. Serci sides are flat and wide. It is located at the tip of the ninth tergite. Male genitalia is covered with black hair and yellow hairs. The eighth sternite carries tassel-shaped hairs. The apical apex of the gonococcus is angular and is often dark red or orange. The general appearance of individuals (male Figure 1, female Figure 2 and ovipositor of female in Figure 3) and male genitalia (Figure 4) are given.

Examined material: Edirne (Kurttepe), 106 m, 06.06.2018, 1 ♂, 1 ♀; Edirne (Beyköy), 38 m, 02.06.2002, 1 ♂; Edirne (Lalapaşa), 181 m, 29.05.2002, 1 ♂; Edirne (Çukurköy- Bakışlar), 66 m, 6.06.2018, 1 ♂; Edirne (Çavuşköy Göleti), 50 m, 2.06.2002, 2 ♂♂, 2 ♀♀; İstanbul (Çilingir köyü), 129 m, 21.05.2002, 3 ♂♂, 2 ♀♀; İstanbul (Akalan-Kalfa), 117 m, 3.06.2018, 1 ♀; Kırklareli (Vize-Pınarhisar), 241 m, 25.05.2002, 9 ♂♂, 2 ♀♀; Kırklareli (Madara Deresi), 35 m, 26.05.2002, 2 ♂♂, 1 ♀; Kırklareli (Dereköy), 453 m, 27.05.2002, 11 ♂♂, 3 ♀♀; Kırklareli (Kömürköy-Küçükyayla), 280 m, 4.06.2018, 9 ♂♂, 5 ♀♀; Çanakkale (Yeniköy), 43 m, 5.06.2002, 6 ♂♂, 7 ♀♀; Tekirdağ (Malkara), 199 m, 6.06.2002, 5 ♂♂, 3 ♀♀; Tekirdağ (Karababa Köyü), 111 m, 6.06.2002, 1 ♂, 5 ♀♀; Tekirdağ (Palamut Köyü-Radar), 600 m, 9.06.2002, 3 ♂♂, 1 ♀; Tekirdağ (Yeniceköy), 75 m, 10.06.2002, 1 ♀; Tekirdağ (Yakuplu), 52 m, 11.06.2002, 3 ♂♂, 7 ♀♀; İstanbul (Şileye 7 km), 27 m, 13.06.2002, 5 ♂♂, 3 ♀♀; Kocaeli (Uzuntarla), 187 m, 19.05.2002, 1 ♂, 2 ♀♀; Kocaeli (İsaklı), 216 m, 14.06.2002, 2 ♂♂, 2 ♀♀; Kocaeli (Balçı Köyü), 55 m, 2.06.2018, 3 ♂♂, 8 ♀♀; Kocaeli (Pirceler), 232 m, 2.06.2018, 8 ♂♂, 5 ♀♀; Kocaeli (Kargalı Köyü), 309 m, 20.06.2002, 2 ♂♂, 6 ♀♀; Sakarya (Karapınar), 24 m, 17.06.2002, 16 ♂♂, 22 ♀♀; Sakarya (Arifiye), 104 m, 18.06.2002, 5 ♂♂, 4 ♀♀; Ordu (Ünye), 14 m, 27.06.2018, 1 ♀; Yalova (Elmalık), 176 m, 21.06.2002, 4 ♂♂, 4 ♀♀; Eskişehir (Yazılıkaya), 1295 m, 8.06.2018, 3 ♂♂, 1 ♀; Eskişehir (Oynaş Köyü), 1107 m, 12.06.2018, 2 ♀♀; Eskişehir (Çukurca), 1257 m, 6.07.2018, 1 ♀; Eskişehir (Yenisofça), 838 m, 1.06.2019, 1 ♂, 2 ♀♀; Karabük (Eflani), 905 m, 22.06.2018, 3 ♂♂; Karabük (Sine), 1019 m, 22.06.2018, 1 ♂, 2 ♀♀; Kastamonu (Pınarbaşı), 684 m, 21.06.2018, 2 ♀♀; Kastamonu (Daday Çıkışı), 877 m, 20.06.2018, 1 ♂, 9 ♀♀; Kastamonu (Karafasıl Köyü), 1023 m, 21.06.2018, 6 ♂♂; Kastamonu (Bahçeköy), 1151 m, 22.06.2018, 4 ♂♂, 6 ♀♀; Çorum (Kuşsaray), 1069 m, 25.06.2018, 1 ♀; Çorum (Yeni Hayat), 842 m, 25.06.2018, 2 ♂♂, 2 ♀♀; Samsun (Ahmet Saray), 765 m, 27.06.2018, 1 ♀; Samsun (Ağaçpınar Köyü), 981 m, 26.06.2018, 11 ♂♂, 2 ♀♀; Amasya (Destek Köyü), 644, 26.06.2018, 2 ♀♀; Amasya (Yeşilöz), 855 m, 26.06.2018, 1 ♂, 1 ♀; Yozgat (Sazlıdere), 1235 m, 21.06.2019, 2 ♂♂; Kayseri (Dikme), 1330 m, 28.05.2019, 4 ♂♂; Kayseri (Avlağa), 1265 m, 28.05.2019, 1 ♂; Kayseri (Şihliya 2 km), 1422 m, 28.05.2019, 1 ♂; Kayseri (Küçük Künye Yolu), 1500 m, 28.05.2019, 2 ♂♂; Kayseri (Yahyalı Dikme), 1370 m, 27.05.2019, 1 ♂; Adana (Hanyeri) 1668 m, 28.05.2019, 1 ♂, 1 ♀; Sivas (Divriği Madenli), 1160 m, 15.05.2019, 3 ♂♂, 4 ♀♀; Sivas (Zaraya 10km), 1542 m, 3.07.2018, 1 ♀; Sivas (Yıldızeli 5km), 1389 m, 3.07.2018, 1 ♀; Sivas (Nasır/ Zara), 1365 m, 22.06.2019, 4 ♂♂; Kahramanmaraş (Yalak Yolu), 1355 m, 29.05.2019, 7 ♂♂, 3 ♀♀; Kahramanmaraş (Doğankonak), 1577 m, 28.05.2019, 4 ♂♂, 1 ♀; Erzincan (Mustafabey), 1645 m, 1.07.2018, 2 ♀♀; Erzincan (Köröğlu), 1722 m, 2.07.2018, 3 ♂♂, 1 ♀; Erzincan (Altköy), 1566 m, 2.07.2018, 1 ♀; Erzincan (Gemecik), 1785 m, 25.06.2019, 2 ♂♂, 2 ♀♀; Erzincan (Aydıncık), 1789 m, 22.06.2019, 4 ♀♀; Erzincan (Refahiye), 1555 m, 22.06.2019, 2 ♂♂, 2 ♀♀; Tunceli (Çoban Yıldızı), 1393 m, 2.07.2018, 1 ♀; Tunceli (Pülümür), 1627m, 2.07.2018, 1 ♂; Tunceli (Pişi Köyü), 1162 m, 2.07.2018, 1 ♂, 3 ♀♀; Erzurum (Sarıkamış 15km), 1998 m, 28.06.2018, 1 ♂, 1 ♀; Erzurum (Nenehatun Termal), 1836 m, 30.06.2018, 4 ♂♂; Erzurum (Nenehatun), 1979 m, 30.06.2018, 1 ♀; Erzurum (Çimenli Köyü), 2145 m, 30.06.2018, 1 ♀; Erzurum (Alaca), 1873 m, 1.07.2018, 4 ♂♂, 11 ♀♀; Erzurum (Hacıhamza), 1935 m, 1.07.2018, 3 ♀♀; 1860m, 25.06.2019, 1 ♂, 1 ♀; Erzurum (Yukarı Çat), 2136 m, 1.07.2018, 2 ♀♀; Kars (Sarıkamış), 2212 m, 28.06.2018, 1 ♀; Kars (Sarıkamış 2), 2050 m, 23.06.2019, 1 ♂, 1 ♀; Kars (Yenigazi Köyü), 1830 m, 23.06.2019, 1 ♂, 1 ♀; Kars (Horasan Yolu), 2110 m, 23.06.2019, 1 ♂.

Distribution in the world: Germany, Albania, Austria, Bulgaria, France, Hungary, Poland, the European part of old Soviet Union, Turkey, Yugoslavia [1].

Distribution in Turkey: Erzincan, Cevizli, 04.08.1990, Erzurum, Merkez, 01.06.1971, Atatürk Üniversitesi, 23.07.1990, 27.08.1990, Palandöken, 17.07.1990, Oltu-Uzunoluk, 19.07.1992, Olur-Süngübayır, 13.07.1992, Pasinler, 14.08.1992, Senkaya-Turnalı, 03.07.1990, Tortum, 04.07.1991, [2]; Ankara, [8]; Eskişehir, İnönü, Uludere, 27.05.2001 [3]; Ağrı, Tutak, Suluçam, 26.06.1993, Bitlis, Tatvan, 30.06.1993, Tatvan, Karakurt, 01.07.1993; Kütahya, Sobran, Porsuk barajı, 08.07.1993, Van, Karasun Brige, 29.06.1993 [4].



Figure 1. Male of *Dismachus praemorsus*



Figure 2. Female of *Dismachus praemorsus*

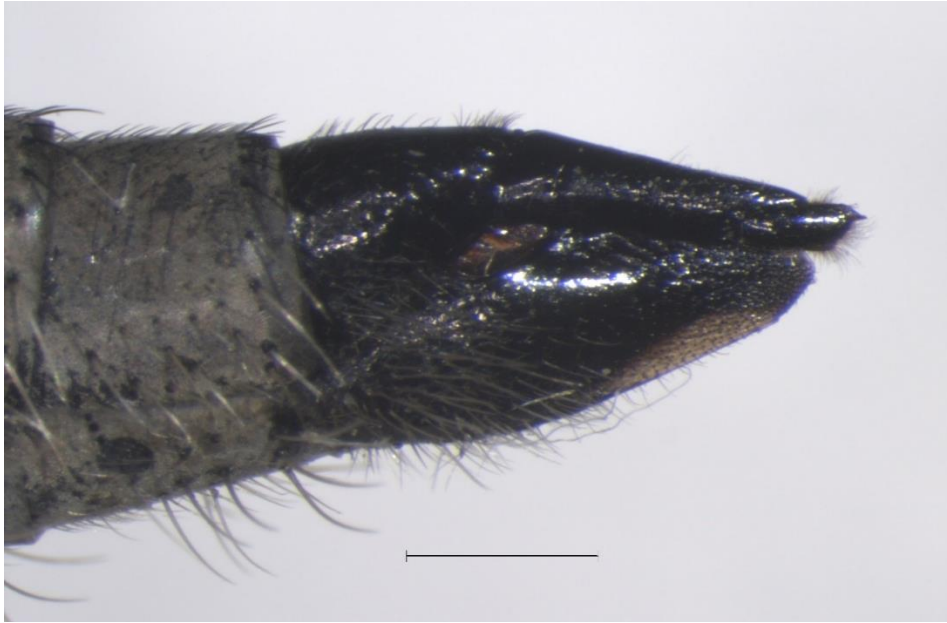


Figure 3, Female ovipositor of *Dismachus praemorsus*



Figure 4. Male genitalia of *Dismachus praemorsus* a) aedeagus, b) epandrium, c) side view of gonocoxite and dystistylus, d) gonocoxite, e) hypandrium, f) dystistylus

D. praemorsus individuals were caught on the grass in grassland, forest edge or clearing areas in the forest, on the sides of the field, Perching on the stems of the grasses, and especially egg-laying behavior in the spikes of the Poacea members were observed. Table 2 shows the meadow plant species in sampling area

Table 2: Dominant plant species in sampling areas

Family	Genus	Species	Note
Asteraceae	<i>Anthemis</i>	<i>Antemis cretica</i>	
	<i>Achillea</i>	<i>Achillea millefolium</i>	
		<i>Achillea wilhelmsii</i>	
	<i>Beta</i>	<i>Beta vulgaris</i>	
	<i>Centaurea</i>	<i>Centaurea triumfettii</i>	
	<i>Daucus</i>	<i>Daucus carota</i>	
	<i>Antemis</i>	<i>Antemis sp.</i>	
Brassicaceae	<i>Sisymbrium</i>	<i>Sisymbrium loeselii</i>	
	<i>Alyssum</i>	<i>Alyssum sp.</i>	
	<i>Isatis</i>	<i>Isatis sp.</i>	perching
	<i>Neslia</i>	<i>Neslia sp.</i>	
Caryophyllaceae	<i>Silene</i>	<i>Silene sp.</i>	
Cyperaceae	<i>Scirpoides</i>	<i>Scirpoides holoschoenus</i>	Laying and perching
Fabaceae	<i>Trifolium</i>	<i>Trifolium Pratense</i>	
Hypericaceae	<i>Hypericum</i>	<i>Hypericum Perforatum</i>	
Lamiaceae	<i>Stachys</i>	<i>Stachys Lavandulifolia</i>	
	<i>Mentha</i>	<i>Mentha sp.</i>	
Plantaginaceae	<i>Plantago</i>	<i>Plantago lanceolata</i>	
Poaceae	<i>Alopecurus</i>	<i>Alopecurus arundinaceus</i>	Laying
		<i>Alopecurus aucheri</i>	Laying
	<i>Bromus</i>	<i>Bromus tectorum</i>	
		<i>Dactylis glomerata sbsp hispanica</i>	Laying and perching
	<i>Dactylis</i>	<i>Dactylis glomerata</i>	
	<i>Festuca</i>	<i>Festuca arundinacea subsp.</i>	
		<i>Festuca Rubra</i>	Laying and perching
	<i>Hordeum</i>	<i>Hordeum bulbosum</i>	Laying and perching
		<i>Hordeum murinum</i>	Laying and perching
	<i>Phleum</i>	<i>Phleum Pratense</i>	
	<i>Poa</i>	<i>Poa bulbosa</i>	
		<i>Poa trivialis</i>	
	<i>Alopecurus</i>	<i>Alopecurus sp.</i>	
	<i>Aven</i>	<i>Avena sp.</i>	
	<i>Poa</i>	<i>Poa sp.</i>	
	<i>Stipa</i>	<i>Stipa sp.</i>	
	Rubiaceae	<i>Ranunculus</i>	<i>Ranunculus sp</i>
<i>Galium</i>		<i>Galium sp.</i>	

The variation of the measured temperature and altitude values at the localities where the samples were collected is shown in the graph in Figure 5.

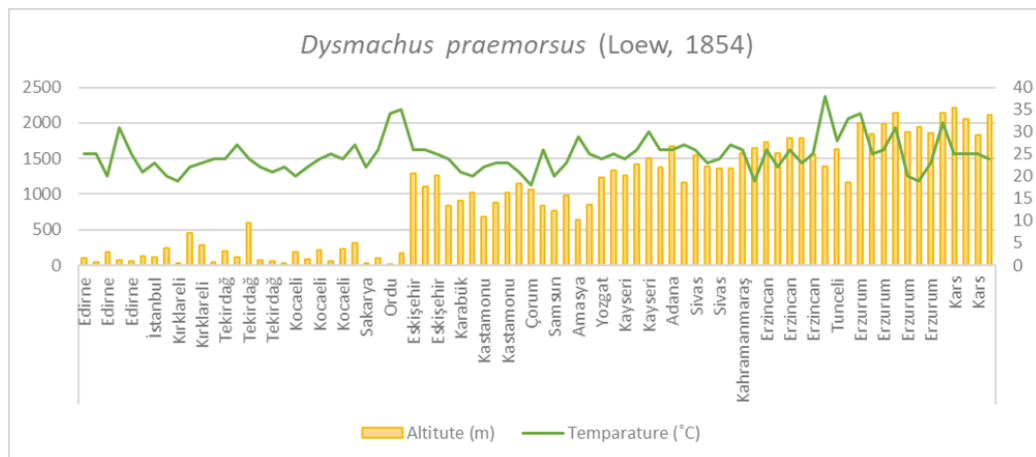


Figure 5. The relationship between altitude and air temperature values at the collecting sites

4. Conclusions and discussion

Dsymachus praemorsus had been identified in different habitats in previous studies in our country. In these studies, it was reported that adult individuals of the species showed flight activity from the end of May to the beginning of August [2], [8], [3], [4]. In our study, the specimens belonging to the species were found in the earliest in May and the latest in July, although the temperature and elevation were different in different years.

The years and months in which the species is not identified are important in terms of the species' seasonal activity limit. During the second and third weeks of April 2002, 2005, 2006, 2007, 2008, 26 individuals belonging to the species were not found in Thrace and South Marmara region (Kaz Mountains), mostly in meadow areas. Similarly, in the last week of July in 2018 and 2019, 33 different stations could not be detected in Eastern Anatolia (Erzurum, Ağrı, Bingöl, Tatvan and Süphan Mountain). Especially in this region in June and July, when the temperature in the valley exceeds 30 ° C, the meadows are dry and no species belonging to the species except the meadows under the influence of wetlands are observed. However, when the climb to the altitude of 1500-2000 meters from the valley floor to 20-25 ° C, *D. praemorsus* individuals were observed.

Figure 5 shows the temperature preferences of the species. The lowest temperature at which the species is caught is 18 ° C and the highest temperature is 36 °C. However, temperatures between 24-26 °C can be considered as the optimum temperature range of this species.

Dsymachus praemorsus females lay their eggs on the plant. Therefore, the activity of the species is also in parallel with the activity of the plants in which the eggs lay in the living environment. Adamovic [9], [5] observed in the species Obedska Bara (in Serbia) in green meadows covered with *Clematis integrifolia* and in the alluvial plains of the Sava river in May and June. The vegetation of the meadows in Obedska Bara mostly includes *Alopecurus pratensis*, *Poa pratensis*, *Poa trivialis*, *Clematis integrifolia* and other plant species.

In the present study, the plant species in the meadows where the adults were caught were *Alopecurus arundinaceus*, *Alopecurus aucheri*, *Dactylis glomerata* sbsp *hispanica*, *Festuca rubra*, *Hordeum bulbosum*, *Hordeum murinum* from the Poacea family, *Scirpoides holoschoenus* from Cyperaceae and *Isatis* sp. from Brassicaceae. It was observed that female flies laid eggs on these plants (Table 2). These plant species start to sprout and continue to grow on the soil at least 20-30 days before the onset of the seasonal activity of *D. praemorsus*. The seasonal activity of the species is in parallel with the sprouting of the plant species and the development of the spikes..

Acknowledgements

This research was partially granted by Scientific Research Projects Commission of Eskisehir Osmangazi University (Proje No: 2018-1987). The author are indebted Ümit ŞİRİN, Ceren Küçükaykay Fidan and Adem Aslan for collecting of specimens and to Dr. Dervis ÖZTÜRK for his support about information of vegetation.

References

- [1] Geller-Grimm, F., 2019, .www.geller_grimm.de. 07.11.2019.
- [2] Hayat, R., Alaoglu, Ö., 1996, Faunistic and systematics studies on the Asilidae (Diptera) species in Erzurum and neighbouring provinces III. Asilinae. Atatürk Ü. Zir. Fak. Der., 27(1): 121-138.
- [3] Çalışkan, H., 2002, Investigations on the Asilidae (Diptera) Fauna of Eskişehir Province. Anadolu University Journal of Science and Technology, 3(2):317-328.
- [4] Bosak, J., Hradsky, M., 2001, Some remarks on the distribution of robberflies (Diptera: Asilidae) in Turkey. Journal of Entomological Research Society, 3 (3): 1-28.
- [5] Adamovic. Z.R., 1973: The mating habits and egg-laying of some *Echthistus*, *Eutolmus* and *Dsymachus* species of the robber flies (Diptera, Asilidae). - Glasnik Prir. muz. Beograd, B, 28: 111-133.
- [6] Richter, V.A., 1964, Zoogeographical characteristics of the robber flies fauna (Diptera, Asilidae) of the Caucasus.
- [7] Weinberg, M. & Bachli, G., 1995, Diptera Asilidae. Insecta Helvetica. Fauna. II. 124 pp. Entomologisches Obozrenie 43 (2): 170 .
- [8] Durmuş, Y., 1999, Ankara Çevresi Asilidae (Diptera) familyasının Faunistik ve Sistemik Yönden Araştırılması. Gazi University. Institute of Science and Technology, Ankara, 135
- [9] Adamovic, Z.R., 1964, The feeding habits of some Asilid species (Diptera, Asilidae) in Yugoslavia, - Archives biol. sc. Beograd. IS (1-2): 221-227.

(Received for publication 13 December 2019; The date of publication 15 December 2019)



Effects of wing loading on take-off and turning performance which is a decisive factor in the selection of resting location of the Great Bustard (*Otis tarda*)

Göksel KESKİN^{*1}, Seyhun DURMUŞ², Üyesi Ünal ÖZELMAS¹, Muharrem KARAKAYA¹
ORCID: 0000-0003-4945-2166; 0000-0002-1409-7355; 0000-0003-3533-0256; 0000-0002-7729-7653

¹ Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Science and Letters, Department of Biology, Eskişehir, Turkey
² Balıkesir University, Edremit School of Civil Aviation, Balıkesir, Turkey

Abstract

Great Bustard is one of the heaviest birds in the Western Palearctic, so aerodynamic effects are critically important for their distribution and conversation. To understand why do they need to find open areas during the resting and feeding time, aerodynamic features were discussed in this study. Mass of the Great Bustard and having proportionally small wings cause weak flight performance. In this work, those disadvantages were identified by aerodynamic approach and observation. Great Bustard tries to use the relative wind during the take-off to close these disadvantages. Also, turning performance which is affected by the same specifications with take-off performance can determine their behavior. As a result, aerodynamic factors may also play important role in their current status.

Key words: otis tarda, great bustard, conservation, bird flight, bird flight performance, Turkey

----- * -----

Toy kuşunun (*Otis tarda*) dinlenme alanı seçiminde etkili olan kalkış ve dönüş performansına kanat yüklemesinin etkisi

Özet

Batı Palearktik bölgede ki en ağır kuşlardan biri olan Toy kuşları için aerodinamik etkiler dağılımlarında ve korunmalarında oldukça önemlidir. Bu çalışmada, dinlenme ve beslenme zamanlarında neden açık alanları seçtikleri aerodinamik özellikleri bakımından tartışılmıştır. Ağırlığına göre küçük kanatlara sahip olan Toy kuşları çok daha zayıf bir uçuş performansına sahiptirler. Bu çalışmada bu dezavantajlar aerodinamik yaklaşım ve gözlemlerle açıklanmıştır. Bu dezavantajları kapatmak için Toy kuşları kalkış esnasında bağıl rüzgârları kullanmışlardır. Ayrıca kalkış performansına etki eden aynı aerodinamik özellikler kuşun davranışına etki eden dönüş performansını da etkilemektedir. Sonuç olarak türün duyarlı statüde olmasındaki en önemli etkenlerden biride aerodinamik özellikleridir.

Anahtar kelimeler: otis tarda, toy kuşu, koruma biyolojisi, kuş uçuşu, kuşların uçuş performansı, Türkiye

1. Introduction

Due to high wing loading, which means body weight divide to wing area is extremely important for flight performance that can determine flight style and behavior, Great Bustard prefers open areas and hills to take-off easily and also observe the environment. Therefore, they cannot land and take-off on a tree branch, electric pole or other narrow areas. Their long take-off distance carries many disadvantages. For example, the predators, especially foxes can find time to catch the Great Bustards during the take-off roll. Its effects are on much different flight performance. Wings beat frequency also has been attracting the researchers' attention for a long time [1,2,3]. Take-off performance is extremely important for avian flight but there is a limited number of works on that flight phase [1,2,4,5,6,7,8]. In gliding flight, wing loading determines glide speed. For high aspect ratio wings, gliding is the most effective for cheaper flights [9, 10].

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902222393750; Fax.: +902222393750; E-mail: gokselkeskin@outlook.com

The broad wings and relatively short wingspan avoid the Great Bustard from gliding due to high induced drag. Their wing is similar to a vulture or an eagle wing morphologically. Nevertheless, these birds' wing loading is lower and they take advantage of it. Vultures and eagles are usually observed while using thermals since their lower wing loading provides lower stall speed and narrow turning radius in the thermal [11, 12]. However, Great Bustard's higher wing loading causes higher stall speed and a wide turning radius that keep them away from the well thermal performance. Therefore, they have to flap their wings for extra thrust force in order to gain speed for enough lift force [13, 14, 15]. Moreover, these reasons cause extended take-off distance because they need more lift force to overcome their weights. To ensure that force, take-off roll must be longer. Besides, the Great Bustard usually prefers sand, grass, plowed fields or steep lands hence the acceleration to static state in these areas can be more difficult. On the other hand, the relative wind may help to reduce take-off distance if the bird runs into a headwind [16]. Thus, they cannot prevent potential dangers like hitting power lines [17].

2. Materials and methods

The study area is located in the Sivrihisar, Eskişehir, Turkey. Our observations lasted for 2 months. Although, 25 individuals were identified in 2 lek areas, only 10 different take-off footprints were determined and measured. These take-offs were monitored by Canon 7D camera and 500 mm lenses before measuring take-off roll. To ensure true results, almost the same size birds were designated and others were eliminated from videos and photos. To measured wind speed and direction, anemometer and windsock were used while taking-off. Effect of the crosswind eliminated until the full crosswind. Take-off distance was measured from heel to heel of birds' footprint by tape measure.

Thrust (T) can be used for acceleration and there is a counter force called drag (D), however; we have to make an allowance for the average aerodynamic resistance during the take-off run. Therefore, we estimate the net thrust to be 20 percent of the take-off weight. An avian need a minimum velocity to take-off and need acceleration to reach that velocity. Net thrust is needed for acceleration [16].

$$F_{net} = T - D = 0.2W \quad (1)$$

Well known W (Weight) is the mass times the acceleration of gravity.

$$W = mg \quad (2)$$

Kinetic energy is proportional to the mass and to the square of its velocity.

$$E_k = \frac{1}{2} mV^2 = \frac{1}{2} \left(\frac{W}{g}\right) V^2 \quad (3)$$

The energy supplied equals to the supplied work (W=F.L) so the net force (F_net) times the takeoff length (Ltakeoff). Multiplying the Eq. 1. With L and make the equality of the supplied energy and work.

$$\frac{1}{2} \left(\frac{W}{g}\right) V^2 = 0.2WL \quad (4)$$

So simply a minimum velocity needed for take-off is related with acceleration of gravity and the takeoff length (Ltakeoff)

$$V^2_{takeoff} = 0.4gL_{takeoff} \quad (5)$$

Another important effect on the conversation of the Great Bustard is turning radius. The turn radius can be calculated in two ways. In Eq. 6, it was calculated with the aid of wing loading and bank angle. In Eq. 7 the turn radius was calculated with aid of velocity (V) and loading factor (n).

$$r = \frac{2W}{C_L * \rho * g * S * \sin\theta} \quad (6)$$

$$r = \frac{v^2}{g\sqrt{n^2-1}} \quad (7)$$

Rewriting the Eq. (7) by leaving the loading factor (n) alone, we get the Eq. 8.

$$n = \sqrt{\left(\frac{v^4}{g^2 r^2} + 1\right)} \quad (8)$$

Yet another way to find the loading factor is given in. Eq. (9) and in such formula the n is related only with the bank angle (θ). Therefore, it is entitled as n_check.

$$n_{check} = \frac{L}{W} = \frac{1}{\cos\theta} \quad (9)$$

However, the key point of these formulas is velocity. In our work, the estimation method comes from bird size was used [18]. Later, to prove our findings, laser speed measurement binocular was used. In literature, the airspeed of Great Bustard

is expected about 17 m/s it was compatible with velocity estimation comes from bird size in Eq. 3. which was derived by Alerstam et al. [18].

$$V = 4,3 \cdot \left(\frac{W}{S}\right)^{0,31} \quad (10)$$

Still, there were two unknown parameters (Lift coefficient (CL) and θ) for Great Bustard so, by validating the loading factor (n) value from Eq. (8) and Eq. (9). The bank angle (θ) was taken an average value (30). The lift coefficient is validated from bank angle and load factor relations i.e.Eq. (9) and Eq. (10). The lift coefficients estimated when the n values overlapped.

To find angular velocity of bird,

$$\Omega = \frac{V}{R} = g \cdot \frac{\tan\theta}{V} \quad (11)$$

3. Results

For our study area, an average 3 m/s fast wind is a significant factor. In contrast, it was seen that the bird did not try to turn into a headwind in a dangerous situation during the quick take-off. Other factors affecting take-off performance are the air density and temperature. Altitude which affects to air pressure in the study area ranges from 700 m to 800 m at the sea level and the average temperature was 20 °C which are improper conditions for better flight performance. For all of these reasons, they choose to open areas for easy take-off also they can watch the hazards easily in these places. Higher wing loading also affects the turning radius. In risky situations, the birds must change their flight direction rapidly. However, it's hard for birds which have high wing loading that provides higher flight speed.

According to our observations, the shortest take-off run is 1.57m and the longest is 5 m. Of course, it's impossible to determine the same size birds which are important for take-off performance from photos and videos.

Table 1. Total number of investigated foot prints. Relative wind speed shows the total take-off speed of Great Bustard. Short distance take-offs are supported by strong wind

A number of investigated footprints.	Takeoff Roll (m)	V _{Wind} (m/s)	V _{Bustard} (m/s)	Relative wind (m/s)
1	1,57	+3	2,48	5,48
2	3,77	+1,92	3,84	5,76
3	1,94	+2,1	2,75	4,85
4	4,00	+1,5	3,96	5,46
5	4,22	+1,8	4,06	5,86
6	2,78	+2,42	3,3	5,72
7	3,21	+2	3,54	5,54
8	5,00	-1,3	4,42	3,12
9	3,20	+1,1	3,54	4,64
10	4,80	-1	4,33	3,33

Nevertheless, If the wind was eliminated, an average take-off roll would increase from 3m to 4.73m (except 8 and 10 because they took off with a tailwind). To calculate the bird's speed from equation 8, these parameters were assessed (Table 2).

Table 2: An average Aerodynamic features and performance of the Great Bustard.

Parameters	
Aspect Ratio (AR)	6.6
Wingspan (b)	220 cm
Wing Area (S)	0,73 m ²
Weight (W)	11 kg (107.91 N)
Wing Loading, W/S (N/m ²)	147.8 N/m ²
Lift Coefficient, C _L	0.99
Turn Angle θ (Degree)	30
Turn Radius (r)	50 m
Estimated Velocity (Vest)	20 m/s
Measured Velocity (V)	17 m/s
n from Eq. (8)	1.15
n _{check} by Eq. (9)	1.15

To find out turning radius, bank angle of the birds was determined from photos and videos. As a result, 30° was selected as an optimum bank angle.



Figure 1. An optimum bank angle of the Great Bustard. Sharper bank angles cause higher sink rate so that energy consumption increases to keep level flight.

In addition, Great Bustard usually takes-off into the wind as it can be seen at table 1 except dangerous situations. In contrast, tailwind generally adversely affects take-off distances and it also affects individuals in this study. However, more frequently flapping style reduces the tailwind effects and decay proportion between the headwind and tailwind.

Another effect of wing loading is the turning radius. They need 100 m to change their direction 180° which means length of the football pitch. If we compared with the almost the same weight birds, Cinereous Vulture's turning radius would be 30m with 30° bank angle. Also, almost the same wing area of Golden Eagle's turning radius would be 32 m. For these reason, higher turning radius causes lower soaring ability. So, it's impossible to use thermals for these birds Moreover, we know that their bank angle is sharper. Besides, low angular velocity doesn't provide high manoeuvrability. For this reason, they can't change their flight direction quickly so they hit power lines suddenly or can't addle the predators and hunters..

4. Conclusions and discussion

That results also may explain why Great Bustard population is lower in Turkey [19] than Europe because their ability to fly is already limited with these aerodynamic specification, higher altitude of mainland of the Turkey [20] make this flight ability lower with lower air density. Moreover, most of the population is seen in center of Anatolia and east of Turkey. Cultivated lands of these regions long and wide which provide longer and enough take-off area. As can be seen in results, most of the taking-offs made into headwind to ensure shorter take-off distances. Therefore, their habitat distribution is limited in Turkey. Besides, we often interacted with these birds in the morning when the weather was cold which also means higher air density that increases flight performance.

9 kg of Cinerous Vulture can take-off from tree and other small places without take-off roll. Although mass of the vulture near Great Bustard, Great Bustards' wing area significantly lower than the vultures. These differences in wing loading decrease flight performance and increase energy consumption. For these reasons, permanent hunts are effective on these birds because they cannot astonish hunters with quick turns, so they are easy target for hunters to follow them. Due to high energy consumption they become tired later. Hence, they would be easy target for permanent hunters.

According to Akos et al. [21] turning radius of stork is 20 m. If we look at eating habits of that birds, their food selection looks the same. However, with 20 m of turning radius stork can use thermals and reach other regions easily while the flying long distance is hard for Great Bustard. For this reason, threaten level between stork and Great Bustard may come from that aerodynamic differences.

If we compared with the almost the same weight birds, Cinereous Vulture's turning radius would be 30m with 30° bank angle. Also, almost the same wing area of Golden Eagle's turning radius would be 32 m. For these reason, higher turning radius causes lower soaring ability. So, it's impossible to use thermals for these birds Moreover, we know that their bank angle is sharper. Besides, low angular velocity doesn't provide high maneuverability. For this reason, they can't change their flight direction quickly so they hit power lines suddenly or can't addle the predators and hunters.

The effect of high wing loading is the Great Bustard must flap their wings continuously which needs more energy. In that case, they fly short distances at low altitude that means they take advantages of ground effect which provides low energy consumption at low altitudes. Of course, the bigger size of that bird is measured and also known. In our work, 11 kg male was studied. However, they can reach up to 15 kg. For that size, the effects of wing loading are felted much more might be fatal.

Acknowledgements

This work was supported by Eskişehir Osmangazi University Scientific Research Project Commission under Grant 2018-2245 coded project.

References

- [1] McFarlane, L. A. (2014). Avian wing morphology: intra-and inter-specific effects on take-off performance and muscle function in controlling wing shape over the course of the wing stroke. (*Doctoral dissertation*). University of Leeds, Leeds, England.
- [2] Dial, K. P., & Biewener, A. A. (1993). Pectoralis muscle force and power output during different modes of flight in pigeons (*Columba livia*). *Journal of Experimental Biology*, 176(1), 31-54.
- [3] Crandell, K. E., & Tobalske, B. W. (2011). Aerodynamics of tip-reversal upstroke in a revolving pigeon wing. *Journal of Experimental Biology* 214, 1867-1873. [https://doi: 10.1242/jeb.051342](https://doi.org/10.1242/jeb.051342)
- [4] Provini, P., Tobalske, B. W., Crandell, K. E., & Abourachid, A. (2012). Transition from leg to wing forces during take-off in birds. *Journal of Experimental Biology*, jeb-074484. [https://doi: 10.1242/jeb.074484](https://doi.org/10.1242/jeb.074484)
- [5] Robertson, A. M. B., & Biewener, A. A. (2012). Muscle function during takeoff and landing flight in the pigeon (*Columba livia*). *The Journal of experimental biology*, 215, 4104-4114. [https://doi: 10.1242/jeb.075275](https://doi.org/10.1242/jeb.075275)
- [6] Heppner, F. H., & Anderson, J. G. (1985). Leg thrust important in flight take-off in the pigeon. *Journal of Experimental Biology*, 114(1), 285-288.
- [7] Bonser, R., & Rayner, J. (1996). Measuring leg thrust forces in the common starling. *Journal of Experimental Biology*, 199(2), 435-439.
- [8] Tobalske, B. W., & Dial, K. P. (2000). Effects of body size on take-off flight performance in the Phasianidae (Aves). *Journal of Experimental Biology*, 203(21), 3319-3332.
- [9] Henningsson, P., Hedenström, A., & Bomphrey, R. J. (2014). Efficiency of lift production in flapping and gliding flight of swifts. *Plos one*, 9(2), e90170. [https://doi: 10.1371/journal.pone.0090170](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090170)
- [10] Spedding, G. R., & McArthur, J. (2010). Span efficiencies of wings at low Reynolds numbers. *Journal of Aircraft*, 47(1), 120-128. [https://doi: 10.2514/1.44247](https://doi.org/10.2514/1.44247).
- [11] Pennycuik, C. J. (1983). Thermal soaring compared in three dissimilar tropical bird species, *Fregata magnificens*, *Pelecanus occidentalis* and *Coragyps atratus*. *Journal of Experimental Biology*, 102(1), 307-325.
- [12] Duriez, O., Kato, A., Tromp, C., Dell'Omo, G., Vyssotski, A. L., Sarrazin, F., & Ropert-Coudert, Y. (2014). How cheap is soaring flight in raptors? A preliminary investigation in freely-flying vultures. *PLoS One*, 9(1), e84887. [https://doi: 10.1371/journal.pone.0084887](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084887).
- [13] Rayner, J.M.V. (1988). Form and function in avian flight, In: *Current Ornithology* (pp. 1-66.). Boston, MA: Springer.
- [14] Rayner, J.M.V. (1995). Dynamics of the vortex wakes of flying and swimming vertebrates, In CP Ellington and TJ Pedley (49eds.), *Symposia of the Society for Experimental Biology: Biological Fluid Dynamics* (131-155.). University of Leeds, UK: The Company of Biologists Ltd.
- [15] Pennycuik, C.J. (2008). *Modelling the Flying Bird*. The USA: Massachusetts Academic Press, Elsevier.
- [16] Tennekes, H. (2009). *The simple science of flight: from insects to jumbo jets*. The USA: MIT press.
- [17] Raab, R., Spakovszky, P., Julius, E., Schuetz, C., & Schulze, C. H. (2011). Effects of power lines on flight behaviour of the West-Pannonian Great Bustard *Otis tarda* population. *Bird Conservation International*, 21(2), 142-155. [https://doi: 10.1017/S0959270910000432](https://doi.org/10.1017/S0959270910000432).
- [18] Alerstam, T., Rosén, M., Bäckman, J., Ericson, P. G., & Hellgren, O. (2007). Flight speeds among bird species: allometric and phylogenetic effects. *PLoS biology*, 5(8), e197. [https://doi:10.1371/journal.pbio.0050197](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050197).
- [19] Karakaş, R., & Akarsu, F. (2009). Recent status and distribution of the Great Bustard, *Otis tarda*, in Turkey: (Aves: Otidae). *Zoology in the Middle East*, 48(1), 25-34. [https://doi:10.1080/09397140.2009.10638363](https://doi.org/10.1080/09397140.2009.10638363).
- [20] Güner, Ş. T., & Yücel, E. (2015). The relationships between growth of *Pinus sylvestris* ssp. *hamata* forests with ecological factors in Central Anatolia. *Biological Diversity and Conservation*, 8(3), 06-19.
- [21] Akos, Z., Nagy, M., & Vicsek, T. (2008). Comparing bird and human soaring strategies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4139-4143. [https://doi:10.1073/pnas.0707711105](https://doi.org/10.1073/pnas.0707711105).

(Received for publication 10 July 2019; The date of publication 15 December 2019)



Effect of vanillic acid against oxidative stress induced by glyphosate in *Saccharomyces cerevisiae*

Gözde ÖZCAN¹, Ersin DEMİR^{*1}, Ökkeş YILMAZ¹, Figen ERDEM ERİŞİR¹, Hatayi ZENGİN³
ORCID: 0000-0002-7676-5953; 0000-0002-8276-4498; 0000-0002-0499-9339; 0000-0002-8148-4056

¹ Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü, Elazığ, Türkiye

² Düzce Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Düzce, Türkiye

³ Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Matematik ve Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Sivas, Türkiye

Abstract

Glyphosate is a widely used broad-spectrum herbicide. Vanillic acid is a phenolic acid found naturally in many plants. In this study, the effect of vanillic acid against oxidative stress induced by glyphosate in *Saccharomyces cerevisiae* was investigated. *S. cerevisiae* was proliferated and developed in YEDP medium. Both glyphosate and vanillic acid were added to the development environment of *Saccharomyces cerevisiae* to be 200, 400 and 800 mg per liter. At the end of the experiment, *Saccharomyces cerevisiae* samples (Reduced glutathione (GSH), oxidized glutathione (GSSG), Malondialdehyd (MDA), fatty acid, E, D, K vitamins and phytosterol) were analyzed in HPLC and GC devices. Antioxidant potential of vanillic acid was also identified. In this study, the effect of vanillic acid against oxidative stress and toxicity caused by glyphosate in *S. cerevisiae* was investigated for the first time. In *S. cerevisiae* administered glyphosate, there were statistically significant changes in MDA, GSH, GSSG, protein, fatty acid, E, D, K vitamins and phytosterol levels, but the vanillic acid applied was detected statistically significantly reduced the changes in these parameters. As a result of analysis by gas chromatography, the yeast cell of octanoic acid (8: 0), lauric acid (12: 0), myristic acid (14: 0), palmitic acid (16: 0), palmitoleic acid (16:1 n-7), stearic acid (18: 0), oleic acid (18:1 n-9) and linoleic acid (18:2 n-6) acids were observed. Vitamin D, E and K were analyzed with HPLC device. As a result of this analysis, molecules such as K₂, δ-tocopherol, D₂, D₃, α-tocopherol, ergosterol, K₁, stigmasterol, β-sitosterol were identified. Biochemical analysis showed that cell density in culture medium containing 800 mg per liter of glyphosate decreased. It was found that vanillic acid showed beneficial effects against oxidative stress caused by glyphosate in *Saccharomyces cerevisiae*.

Key words: glyphosate, vanillic acid, oxidative stress, fatty acid and phytosterol, *Saccharomyces cerevisiae*

----- * -----

Glifosatın *Saccharomyces cerevisiae*'da indüklediği oksidatif strese karşı vanilik asidin etkisi

Özet

Glifosat, yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir herbisittir. Vanilik asit, pek çok bitkide doğal olarak bulunan fenolik asittir. Bu çalışmada, glifosatın *Saccharomyces cerevisiae*'da indüklediği oksidatif strese karşı vanilik asidin etkisi araştırılmıştır. *S. cerevisiae* YEDP besiyerinde çoğaltılmış ve geliştirilmiştir. Hem glifosat hem de vanilik asit *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına litrede 200, 400 ve 800 mg olacak şekilde eklendi. Deney sonunda *Saccharomyces cerevisiae* örneklerinin analizleri (İndirgenmiş glutatyon (GSH), yükseltgenmiş glutatyon (GSSG), Malondialdehyd (MDA), yağ asidi, E, D, K vitamin ve fitosterol) HPLC ve GC cihazlarında yapıldı. Ayrıca vanilik asidin antioksidan potansiyeli de tespit edildi. Bu çalışmada glifosatın *S. cerevisiae*'da oluşturduğu toksisite ve oksidatif strese karşı vanilik asidin etkisi ilk kez incelenmiştir. Glifosat uygulanan *S. cerevisiae*'da MDA, GSH, GSSG, protein, yağ asidi, E, D, K vitamin ve fitosterol düzeyinde istatistiksel olarak önemli değişikliklerin olduğu, fakat uygulanan vanilik asidin bu parametrelerde oluşan değişiklikleri istatistiksel olarak önemli ölçüde azalttığı tespit edildi. Gaz kromatografisi ile yapılan analiz sonucunda, maya hücrelerinde oktanoik asit (8:0), laurik asit (12:0), miristik asit (14:0), palmitik asit (16:0), palmitoleik asit (16:1 n-7), stearik asit (18:0), oleik asit (18:1 n-9) ve linoleik asit (18:2n-6) asitlerinin bulunduğu tespit

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903805412294/2637; Fax.: +903805412294; E-mail: ersncan.dmr@gmail.com

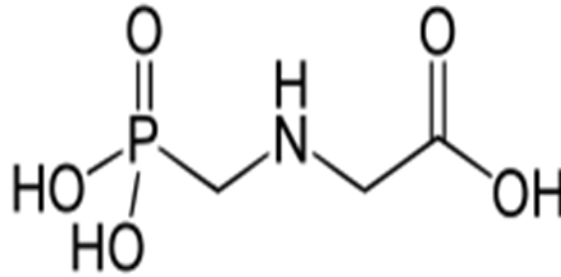
edildi. D, E ve K vitamin miktarlarının analizi ise HPLC Cihazı ile yapıldı. Bu analiz sonucunda, K₂, α-tokoferol, D₂, D₃, δ-tokoferol, ergosterol, K₁, stigmasterol, β-sitosterol gibi moleküller tanımlandı. Biyokimyasal analizler sonucunda litrede 800 mg glifosat içeren kültür ortamındaki hücre yoğunluğunun azaldığı belirlendi. Glifosatın *Saccharomyces cerevisiae*'de oluşturduğu oksidatif strese karşı vanilik asidin faydalı etkiler gösterdiği tespit edildi.

Anahtar kelimeler: glifosat, vanilik asit, oksidatif stres, yağ asidi ve fitosterol, *Saccharomyces cerevisiae*

1. Giriş

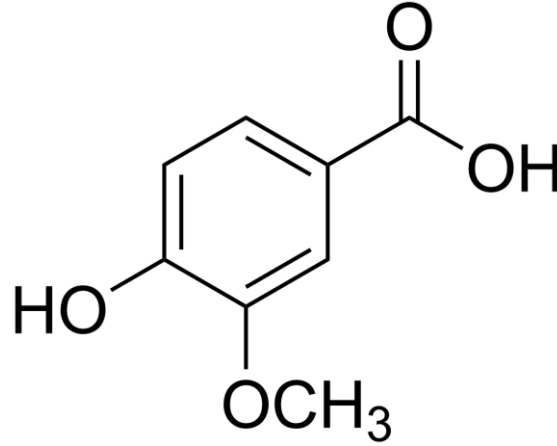
Tarım alanlarında yabancı ot kaynaklı verim kayıpları önemli bir sorundur. Bu sorunun çözümü için farklı alternatifler bulunmakla birlikte son yıllarda kimyasal savaş yöntemleri (herbisitler) kullanılarak yürütülen mücadele yöntemleri ön plana çıkmıştır [1]. Glifosat, dünya genelinde yaygın olarak kullanılan yabancı ot ilaçlarının en önemlisidir. Bu herbisit aynı zamanda kentsel ve evsel ortamlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanıma bağlı olarak yiyecek ve içme sularında glifosat kalıntıları tespit edilmiştir. Bu herbisit bu denli yaygın olarak kullanılması çevre ve insan sağlığı konusunda birtakım riskler hakkında endişelere yol açmıştır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, Avrupa genelinde toplanan insan idrar örneklerinin % 44'ünde glifosat izlerine rastlanılmıştır. Araştırmalar, glifosat'a maruz kalan organizmalarda, özellikle oksidatif strese bağlı olarak geniş bir yelpazede olumsuz biyolojik etkilerin oluşabileceği gösterilmiştir. Her ne kadar glifosatın hedef etki mekanizması bitkilere özgü olsa da, omurgalı ve omurgasız canlılarda da bir dizi toksikolojik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Hem glifosatın hem de Roundup'un (glifosatın ticari şekli), canlı sistemde reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu attırdığı ve antioksidan sistemin aktivitesini baskılayarak hücrel oksidatif stresi indüklediği rapor edilmiştir [2].

Pestisitler oksidatif hasar bağlı olarak dokularda hücre homeostazın bozulmasına neden olurlar. Canlı sistemde pestisitler, ROS üretimini teşvik ederek protein, nükleik asit ve lipid gibi biyomoleküllerde oksidatif hasara yol açarlar [3]. Sık kullanılan pestisitlerin birçoğu toksik etkilerini oksidatif stres mekanizmaları vasıtası ile ortaya koymaktadırlar [4]. Glifosat bazlı herbisitler, glifosata karşı genetiği değiştirilmiş ürünlerin geliştirilmesine paralel olarak geliştirilmişlerdir. Özellikle, tarımda artan kullanım ile birlikte bu kimyasalın canlı yaşamında önemli yeri olan hava, su ve besin maddelerinde kalıntı problemi kamuoyunda endişeleri arttırmıştır. Sonuçta, hedef olmayan organizmalar daha çok glifosata maruz kalmakta, buda canlılarda bir takım sağlık sorunlarına neden olmaktadır [5]. İnsanların glifosata maruz kalmaları neticesinde, karaciğerde mitokondriyal oksidatif fosforilasyonunun azaldığı, proton ve kalsiyum iyonları için mitokondriyal membran geçirgenliğinin arttığı ve süksinat dehidrojenazın inhibe edilmesiyle mitokondriyal fonksiyonunun etkilendiği bildirilmiştir. Glifosat özellikle eritrosit ve lenfosit hücre membranlarında, lipid, protein ve DNA'da oksidatif hasara neden olabilmektedir. Glifosat, süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi glutation, aromataz ve antioksidan enzim aktivitesini etkileyebilmekte ve asetilkolinesteraz aktivitesini inhibe edebilmektedir. Kemirgenlerde yapılan kısa süreli çalışmalarda glifosatın belirgin toksik etki göstermediği, lakin glifosata kronik maruz kalma sonucunda karaciğer ve böbrek fonksiyon bozukluğu ve toksisite, hamile sıçanlarda fetal ossifikasyondaki eksiklikler, büyük ölçüde artmış kanser riski ve kısa ömürlülük ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yine glifosata maruz kalan sıçanlarda idrar ve organ biyokimyasal parametrelerinin yanı sıra proteomik ve metabolomik profilde de değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir [39].



Glifosatın moleküler yapısı (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glyphosate>)

Antioksidanlar, serbest radikalleri temizleyebilen, oksidatif stres kaynaklı hasarın azaltmasına yardımcı olan ve ayrıca hücrel redoks dengesini koruyan maddelerdir. Son zamanlarda, pestisit kaynaklı oksidatif stres ve oksidatif hasarın önlenmesine yönelik antioksidanların terapötik kullanımına ilgi artmıştır. Vanilik asit (VA), antioksidan potansiyeli ön planda olan bir moleküldür. VA'nın serbest radikal temizleme ve lipid peroksidasyonunu engelleme özelliğinin bulunduğu ifade edilmiştir. Ayrıca vanilik asidin antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antioksidan özellikler gösterdiği tespit edilmiştir [6]. Vanilik asidin ayrıca anti-mutajenik ve anti-tümör özelliklerinin bulunduğu, bu nedenle nutrasötik bir molekül olduğu kabul edilmiştir. Yenilebilen birçok bitki ve meyvede bulunan vanilik asit, fenolik bir bileşiktir. Diyabet üzerinde de yararlı özellikler gösterdiği belirlenmiştir [7].



Vanilik asidin moleküler yapısı (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8468>)

Bu çalışmada;

- S. cerevisiae* (ekmek mayası), oksidatif stres, ksenebiyotik ve diğer toksik maddelerin etkilerinin incelenmesinde iyi bir ökaryotik hücre modeli olarak görülmektedir [18]. Bundan dolayı *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlarda glifosatın oluşturduğu oksidatif strese karşı vanilik asidin koruyucu etkisi incelenmiştir.
- Yine bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlarda glifosat ve vanilik asidin yağ asidi, fitosterol, D vitamini, α -tokoferol ve K vitamini biyosentezi üzerindeki etkileri de incelenmiştir.

Bu çalışmada *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlarda glifosatın oksidatif stres ve yukarıda belirtilen bazı biyokimyasal parametreler üzerindeki etkisi ile bu etkilere karşı vanilik asidin etkisi ilk kez değerlendirilmiştir..

2. Materyal ve yöntem

2. 1. Vanilik asidin DPPH Temizleme Aktivitesi

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. DPPH radikal süpürme kapasitesi analiz yöntemleri doğal ekstraktların antioksidan kapasitesini ölçmede çok sık kullanılan bir metottur. Bu yöntem de temel olarak antioksidan tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbansın azalmasına neden olur [36]. Vanilik asidin α,α -Diphenyl-b-picrylhydrazyl (DPPH) serbest radikal temizleme aktivitesi test edildi. DPPH, metanolde hazırlandı [8]. Vanilik asit (100 mg), 10 mL dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözünerek hazırlandı. Azalan absorbans değeri, DPPH serbest radikal giderme aktivitesi olarak kabul edildi. Sonuçlar aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Vanilik Asit}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

2. 2. In Vitro Maya Kültür Ortamlarının Hazırlanması

Bu amaçla; öncelikle deneyde kullanılacak olan *S. cerevisiae*'nin (Ekmek mayası) gelişimi ve çoğalması için YEDP (100 mL için 1 g maya ekstraktı, 2 g baktopepton, 2 g glukoz) besi yeri hazırlandı. Her grup için tekrar sayısı altıdır. Besi yeri hazırlandıktan sonra aşağıdaki gruplar oluşturuldu:

Kontrol grubu (K): *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2000 mg maya ekstraktı, 4000 mg baktopepton ve 4000 mg glikoz içeren besiyeri hazırlandı

Glifosat grubu (G): *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2000 mg maya ekstraktı, 4000 mg baktopepton ve 4000 mg glikoz içeren besiyeri hazırlandı. Sonra bu besiyerine 40, 80 ve 160 mg glifosat eklendi. Her doz ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü.

Vanilik asit Grubu (VA): *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2000 mg maya ekstraktı, 4000 mg baktopepton ve 4000 mg glikoz içeren besiyeri hazırlandı. Sonra bu besiyerine 40, 80 ve 160 mg VA eklendi. Her doz ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü.

Glifosat+Vanilik Asit Grubu (G+VA): Bu gruptaki *S. cerevisiae* hücreleri için, 200 mL saf su içinde 2000 mg maya ekstraktı, 4000 mg baktopepton ve 4000 mg glikoz içeren besiyeri hazırlandı. Sonra bu besiyerine 40, 80 ve 160 mg ayrı ayrı VA ve G eklendi. Her doz ayrı bir grup olarak belirlendi ve deneysel çalışmalar yürütüldü. *S. cerevisiae*'da hem G (40, 80 ve 160 mg) hem de VA'nın (40, 80 ve 160 mg) aynı miktardaki dozlarının etkisi araştırılmıştır.

Bütün gruplar 30 °C'de 72 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra, hücrelerin yoğunluğu 600 nm'de spektrofotometrede ölçülerek belirlendi. Daha sonra her kültür ortamındaki hücreler steril tüplere alınarak santrifüj edildi, hücre peletleri toplandı. Daha sonra hücre peletleri % 0,9'luk sodyum klorür (NaCl) çözelti ile yıkanarak kültür sıvısı atıklarından temizlendi. İşlem basamakları;

2. 3. *Protein, GSH, GSSG ve MDA Ölçümü için Hücre Peletinin Ekstraksiyonu*: Elde edilen hücre peletleri % 0,9'luk NaCl ile yıkandıktan sonra, yaş ağırlıkları belirlendi ve Tris-HCl, Trisbase ve EDTA (pH:7,4) tamponunda soğuk ortamda homojenize edildi. Sonra örnekler santrifüj edildi. Santrifüjden sonra süpernatant kısım total protein, GSH, GSSG ve MDA analizlerinde kullanıldı.

2. 4. *GSH ve GSSG Miktarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Cihazında Ölçümü*: GSH, GSSG ve MDA oksidatif stres çalışmalarında oksidatif stresin tespiti ile şiddetinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan parametrelerdir. Bu çalışmada, canlı sistemde glifosat, oksidatif stres aracılığı ile hasar oluşturduğu için MDA, GSH ve GSSG gibi oksidatif stres parametreleri çalışılmıştır. Analiz için elde edilen süpernatanttan 1,0 mL alınarak üzerine 1,0 mL % 10'luk perklorik asit ilave edilerek deprotenize edildi ve santrifüj edildikten sonra 1,0 mL numune alınarak Shimadzu marka HPLC'de analizi yapıldı [9,10]. Ölçümler 214 nm dalga boyunda yapıldı. Cihazda pompa olarak LC-10 AD VP, UV-visible detektör olarak SPD-M10A VP, PDA dedektörü, kolon firması olarak CTO-10AS VP, otosampler olarak SIL-10AD VP, degasser ünitesi olarak DGU-14A ve Class VP 6.26 işletim programı kullanıldı (Shimadzu, Kyota Japan). Mobil faz olarak % 0,1 mL trikloroasetik asit (TCA) ve metanol (%94/%6,v/v) karışımı kullanıldı. Ayırma işlemi ODS-3 HPLC kolonunda yapıldı. Hesaplama işlemi standart karışımlardan hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre Class VP 6,26 programı ile hesaplandı (Shimadzu, Kyota Japan).

2. 5. *Lipid Peroksidasyon(MDA) Düzeyinin Ölçümü*: Analiz için elde edilen süpernatanttan 1,0 mL alınarak % 10'luk perklorik asit ile muamale edilerek proteinler çöktürüldü ve karışım 5000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra 1,0 mL numune otosampler viallere alınarak Shimadzu marka HPLC'de analizi yapıldı [11]. Mobil faz olarak 30 mmol KH₂PO₄ ve metil alkol karışımı [12] (% 82,5-% 17,5, H₃PO₄ ile pH=4.0) kolon olarak da ODS-3 HPLC kolonu (150 mm x 4,6- 5 µm) kullanıldı. Mobil faz akış hızı 1 mL/dk ve PDA dedektörünün dalga boyu 254 nm'de belirlendi. Hesaplama işlemi standart karışımlardan hazırlanan kalibrasyon eğrisine göre Class VP 6,26 software ile hesaplandı (Shimadzu, Kyota Japan).

2. 6. *Lipidlerin Ekstraksiyonu*: Hücre peletinden lipidlerin ekstraksiyonu Hara ve Radin (1978) tarafından tanımlanan metoda göre yapıldı. Bunun için; hücre peleti 3/2, (v/v) heksan/izopropil alkol karışımında homojenize edildi ve daha sonra bu karışım santrifüj edilerek süpernatant elde edildi [13].

2. 7. *Yağ Asidi Metil Esterlerinin Hazırlanması*: Metil esteri hazırlamak için elde edilen süpernatant fazı içindeki lipid ekstraktının üzerine % 2'lik metanolik sülfürik asit ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Bu karışım 55 °C'de 15 saat süre ile metilasyona bırakıldı [14]. Daha sonra tüpler oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve % 5'lik sodyum klorür (NaCl) ilave edilerek karıştırıldı. Tüpler içinde oluşan yağ asidi metil esterleri n-heksan ile ekstre edildi ve heksan fazı üstten pipetle alınarak % 2'lik potasyum bikarbonat (KHCO₃) ile muamele edildi. Fazların ayrılması için bir süre bekletildi. Daha sonra metil esterini içeren bu karışımın, 45 °C'de ve azot gaz akımı altında çözücüsü uçurulduktan sonra kalan tortu 1,0 mL heptanda çözüldü (Christie, 1992) ve gaz kromatografisinde analizi yapıldı [14].

2. 8. *Yağ Asidi Miktarının Gaz Kromatografisi (GC) Cihazında Analizi*: Analizler, Shimadzu GC 17 gaz kromatografisinde yapıldı. Analiz için, SP-2560, 25m x 0,25mm i.d., 0,20 µm (Supelco, Sigma, USA) özelliklere sahip kapiller kolon kullanıldı. Analiz sırasında kolon sıcaklığı 120–220 °C, enjeksiyon sıcaklığı 240 °C ve dedektör sıcaklığı 280 °C olarak tutuldu ve kolon sıcaklık programı 120 °C'den 215 °C'ye kadar ayarlandı. Taşıyıcı gaz olarak azot gazı kullanıldı. Analiz sırasında örnekler için yağ asidi metil esterlerinin analizinden önce, standart yağ asidi metil esterlerine ait karışımlar enjekte edilerek, her bir yağ asidinin alıkonma süreleri belirlendi. Bu işlemden sonra gerekli programlama yapılarak örnekler için yağ asidi metil esterleri karışımlarının analizi yapıldı [15]. Yağ asidi metil esterlerinin hesaplaması Class GC 2.00 işletim programı ile her bir yağ asidinin toplam yağ asidi içindeki miktarı yüzde olarak (%) hesaplandı.

2. 9. *Alfa-Tokoferol ve Ergosterol'ün HPLC Yöntemi ile Analizi*: Analiz için ayrılan numunelere metanolde çözülmüş potasyum hidroksit (%5'lik KOH) çözeltisinden ilave edildi ve 85 °C'de 15 dk bekletildi. Oda sıcaklığına kadar soğuyan numunelere distile su ilave edilerek karıştırıldı. Sabunlaşmayan lipofilik moleküller 2x5 mL heksan ile ekstrakte edilerek azot gazı altında çözücü uçuruldu. Daha sonra 1,0 mL (%50+%50/v/v) asetonitril/metanol karışımında çözülmüş otosampler viallere alınıp analiz yapıldı. Mobil faz olarak asetonitril/metanol (%60+% 40/v/v) karışımı kullanıldı, mobil faz akış hızı 1,0 mL/dakika'dır. Analiz için PDA-UV dedektör kullanıldı ve kolon olarak da Supelcosil LC 18 (15x4,6 cm, 5 µm; Sigma, USA) kolonu kullanıldı. Analizler 202 nm dalga boyunda yapıldı [16,17].

2. 10. *İstatistiksel analizler:* Elde edilen verilerin istatistiksel analiz için, SPSS (IBM SPSS versiyon 15) paket programı kullanıldı. Gruplar arası farklılıkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Parametreler için grupların ikili karşılaştırmalarında *post hoc* analizi olarak LSD testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak kabul edildi. Veriler aritmetik ortalama ve standart hata olarak verildi.

3. Bulgular

Vanilik asidin, 4 mg konsantrasyonda en yüksek DPPH giderme aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (95,23), konsantrasyon 10 mg kadar çıkarıldığında DPPH temizleme aktivitesinde önemli değişimlerin olmadığı görülmüştür (Tablo 1).

Tablo 1. Vanilik asidin farklı konsantrasyonlarda DPPH radikalini temizleme aktivitesi

Konsantrasyon (mg)	DPPH temizleme etkisi (%)	ABS ortalamaları (λ)
0,5	56,98 \pm 4,42	0,29 \pm 4,42
1	76,45 \pm 1,60	0,15 \pm 1,60
2	91,24 \pm 0,55	0,05 \pm 0,55
4	95,23 \pm 0,29	0,02 \pm 0,29
6	94,19 \pm 1,60	0,03 \pm 1,60
8	94,44 \pm 0,42	0,03 \pm 0,42
10	94,78 \pm 0,38	0,03 \pm 0,38

Tablo 2. *Saccharomyces cerevisiae*'nın gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki Glifosat ve Vanilik asidin (40, 80 ve 160 mg) hücre peletinde total protein, MDA, GSH ve GSSG düzeyine etkisi (Gerekli açıklama materyal ve yöntem de 2.2. *In Vitro* Maya Kültür Ortamlarının Hazırlanması kısmında açıklanmıştır)

Gruplar	Total protein (mg/g hücre pelleti)	MDA (nmol/g hücre pelleti)	GSH	GSSG
Glifosat/ Vanilik asit 40 mg				
Kontrol	6,55 \pm 0,16 ^a	75.79 \pm 1.58 ^a	416.32 \pm 9.56 ^a	49.55 \pm 1.15 ^a
Glifosat	11,08 \pm 0,17 ^c	151.27 \pm 7.34 ^d	486.42 \pm 12.47 ^d	109.92 \pm 4.43 ^d
Vanilik asit	11,37 \pm 0,14 ^c	85.76 \pm 5.83 ^a	425.88 \pm 18.36 ^a	45.40 \pm 8.22 ^a
Glifosat+Vanilik asit	15,14 \pm 0,27 ^d	71.48 \pm 4.9 ^a	491.17 \pm 31.69 ^b	58.69 \pm 3.26 ^b
Glifosat/ Vanilik asit 80 mg				
Kontrol	6,41 \pm 0,22 ^a	76.53 \pm 1.14 ^a	503.00 \pm 7.70	39.19 \pm 0.97
Glifosat	8,10 \pm 0,15 ^b	198.64 \pm 11.66 ^d	800.91 \pm 45.61 ^d	108.46 \pm 2.11 ^d
Vanilik asit	10,43 \pm 0,11 ^c	99.61 \pm 6.99 ^b	541.12 \pm 47.28 ^b	41.29 \pm 4.08 ^a
Glifosat+Vanilik asit	12,35 \pm 0,15 ^d	181.01 \pm 23.67 ^d	648.57 \pm 61.33 ^c	108.03 \pm 15.77 ^d
Glifosat/ Vanilik asit 160 mg				
Kontrol	5,21 \pm 0,17 ^a	84.03 \pm 3.00 ^a	432.12 \pm 15.54 ^a	40.32 \pm 0.98 ^a
Glifosat	5,87 \pm 0,28 ^a	231.76 \pm 19.48 ^d	610.60 \pm 38.94 ^d	122.92 \pm 3.82 ^d
Vanilik asit	10,39 \pm 0,11 ^d	78.02 \pm 4.68 ^a	336.30 \pm 11.87 ^c	30.79 \pm 0.92 ^b
Glifosat+Vanilik asit	9,45 \pm 0,16 ^d	167.82 \pm 4.71 ^c	445.51 \pm 13.23 ^a	87.21 \pm 7.42 ^c

a: $p > 0.05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz

b: $p < 0.05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli

c: $p < 0.01$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan çok önemli

d: $p < 0.001$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan oldukça çok önemli

S. cerevisiae kültüründe (40 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda MDA artmıştır ($p < 0.001$). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda MDA azalmıştır ($p < 0.001$). K grubu ile karşılaştırıldığında G ve G+VA gruplarında total protein düzeyi artmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (80 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda MDA artmıştır ($p < 0,001$). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda MDA kısmen azalmıştır. Fakat MDA, K grubuna göre yüksektir ($p < 0,001$) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (160 mg), K grubuna göre G grubunda MDA artmıştır ($p < 0,001$). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda MDA azalmıştır. Fakat MDA, K grubuna göre yüksektir ($p < 0,001$) (Tablo 2). K grubu ile karşılaştırıldığında G ve G+VA gruplarında total protein düzeyi artmıştır ($p < 0,05$, $p < 0,01$) (Tablo 2).

S. cerevisiae kültüründe (40 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda GSH ve GSSG artmıştır ($p < 0.001$). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda GSSG düzeyi azalmış ($p < 0,05$), GSH artmıştır ($p > 0.05$) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (80 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda GSH ve GSSG artmıştır ($p < 0.001$). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda GSH azalmıştır ($p < 0.05$). GSSG düzeyinde istatistiksel farklılık yoktur ($p > 0.05$) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (160 mg), K grubu ile karşılaştırıldığında G grubunda GSH ve GSSG artmıştır ($p < 0,001$). G grubuna göre G+VA grubunda GSH ve GSSG azalmıştır ($p < 0.05$) (Tablo 2). *S. cerevisiae* kültüründe (80 mg), K grubuna göre G grubunda α -tokoferol artmıştır ($p < 0,05$). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda α -tokoferol artmıştır ($p < 0,05$). K grubuna göre G grubunda ergosterol azalmıştır ($p < 0,001$). G grubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda ergosterol artmıştır ($p < 0,001$). K grubuna göre G grubunda stigmasterol artmıştır ($p < 0,05$). G grubu

ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda stigmasterol artmıştır ($p<0,05$). K grubuna göre G grubunda β -sitosterol artmıştır ($p<0,01$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda β -sitosterol azalmıştır ($p<0,01$) (Tablo 3).

Tablo 3. *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki Glifosat ve Vanilik asidin (80 ve 160 mg) hücre peletinde vitamin D, vitamin E, vitamin K ve fitosterol düzeyine etkisi ($\mu\text{g/g}$ hücre peleti)

Glifosat/ Vanilik asit 80 mg				
Gruplar	Kontrol	Glifosat	Vanilik asit	Glifosat+Vanilik asit
Vitamin K ₁	0.15±0.04 ^a	0.35±0.06 ^d	0,20±0,01 ^b	0,27±0,02 ^c
Vitamin K ₂	0.11±0.03 ^a	0.08±0.01 ^a	0,26±0,04 ^c	0,56±0,04 ^d
α -Tokoferol	0.28±0.02	0.38±0.01 ^b	0,31±0,06 ^a	0,56±0,03 ^d
δ -Tokoferol	0.27±0.05 ^a	0.53±0.08 ^b	0,30±0,03 ^a	0,56±0,06 ^d
Vitamin D ₂	0.73±0.08	0.78±0.06 ^a	0,48±0,04 ^d	0,63±0,09 ^b
Vitamin D ₃	0.23±0.06	0.43±0.07 ^c	0,39±0,0 ^c	0,35±0,03 ^b
Ergosterol	53.61±2.11	16.70±2.76 ^d	77,90±4,56 ^b	41,17± 2,89 ^c
Stigmasterol(mg/g)	0.38±0.03	0.56±0.02 ^c	0,71±0,04 ^d	0,74±0,03 ^d
β -sitosterol	4.76±0.54	8.37±0.42 ^c	3,07±0,36 ^c	3,82±0,45 ^c
Glifosat/ Vanilik asit 160 mg				
Vitamin K ₁	0.46±0.04 ^a	0.88±0.06 ^d	0,44±0,03 ^a	0,60±0,03 ^c
Vitamin K ₂	0.11±0.01 ^a	0.08±0.01 ^a	0,16±0,01 ^a	0,15±0,02 ^a
α -Tokoferol	0.39±0.02 ^a	0.39±0.01 ^a	0,23±0,02 ^b	0,26±0,03 ^b
δ -Tokoferol	0.30±0.05 ^a	0.27±0.08 ^a	0,31±0,02 ^a	0,23±0,02 ^b
Vitamin D ₂	0.78±0.08 ^a	0.75±0.06 ^a	1,40±0,09 ^d	0,46±0,06 ^c
Vitamin D ₃	0.35±0.06 ^a	0.61±0.07 ^c	0,38±0,02 ^a	0,19±0,01 ^c
Ergosterol	84.88±10.11	16.63±2.76 ^d	47,95±3,67 ^c	63,11±367 ^b
Stigmasterol(mg/g)	0.41±0.03	0.38±0.02 ^a	0,38±0,02 ^a	0,32±0,03 ^b
β -sitosterol	5.77±0.44	2.87±0.32 ^d	4,26±0,34 ^b	7,16± 0,23 ^b

a: $p>0,05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz

b: $p<0,05$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli

c: $p<0,01$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan çok önemli

d: $p<0,001$ gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan oldukça çok önemli

S.cerevisiae kültüründe (160 mg), K grubuna göre G grubunda α -tokoferolde değişim yoktur ($p>0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda α -tokoferol azalmıştır ($p<0,01$). K grubuna göre G grubunda ergosterol azalmıştır ($p<0,001$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda ergosterol artmıştır ($p<0,001$). K grubuna göre G grubunda stigmasterol azalmıştır ($p<0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda stigmasterol azalmıştır ($p<0,05$). K grubuna göre G grubunda β -sitosterol azalmıştır ($p<0,01$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda β -sitosterol artmıştır ($p<0,01$) (Tablo 3).

S.cerevisiae kültüründe (40 mg), K grubuna göre G grubunda C16:0 azalmıştır ($p<0,001$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:0 azalmıştır. ($p<0,05$). K grubuna göre G grubunda C16:1 n-7 artmıştır ($p<0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:1 n-7 azalmıştır ($p<0,001$). K grubuna göre G grubunda C18:0 azalmıştır ($p>0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda azalmıştır ($p>0,05$). K grubuna göre G grubunda C18:1n-9 azalmıştır ($p<0,001$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:1n-9 artmıştır ($p>0,05$). K grubuna göre G grubunda C18:2 n-6 azalmıştır ($p<0,001$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:2 n-6 artmıştır ($p>0,05$) (Tablo 4).

S.cerevisiae kültüründe (80 mg), K grubuna göre G grubunda C16:0 azalmıştır ($p<0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:0 artmıştır ($p<0,05$). K grubuna göre G grubunda C16:1 n-7 artmıştır ($p<0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:1 n-7 artmıştır ($p<0,05$). K grubuna göre G grubunda C18:0 azalmıştır ($p<0,01$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda artmıştır ($p<0,01$). K grubuna göre G grubunda C18:1n-9 azalmıştır ($p<0,01$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:1n-9 artmıştır ($p<0,05$). K grubuna göre G grubunda C18:2 n-6 azalmıştır ($p>0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:2 n-6 artmıştır ($p<0,01$) (Tablo 4).

S.cerevisiae kültüründe (160 mg), K grubuna göre G grubunda C16:0 artmıştır ($p<0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:0 azalmıştır ($p<0,01$). K grubuna göre G grubunda C16:1 n-7 azalmıştır ($p>0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C16:1 n-7 artmıştır ($p<0,001$). K grubuna göre G grubunda C18:0 artmıştır ($p<0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda azalmıştır ($p<0,05$). K grubuna göre G grubunda C18:1n-9 azalmıştır ($p<0,05$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:1n-9 artmıştır ($p<0,01$). K grubuna göre G grubunda C18:2 n-6 azalmıştır ($p<0,01$). G gurubu ile karşılaştırıldığında G+VA grubunda C18:2 n-6 artmıştır ($p<0,01$) (Tablo 4).

Tablo 4. *Saccharomyces cerevisiae*'nin gelişme ortamına ilave edilen farklı konsantrasyonlardaki Glifosat ve Vanilik asidin (40, 80 ve 160 mg) hücre peletinde yağ asidi kompozisyonuna etkisi (%)

Glifosat/ Vanilik asit 40 mg				
Gruplar	Kontrol	Glifosat	Vanilik asit	Glifosat+Vanilik asit
Kaprilik asit C8:0	2.39±0.12	3.45±0.16 ^c	2.70±0.03 ^a	2.65±0.02 ^a
Kaprinik asit C10:0	1.07±0.01 ^a	0.93±0.01 ^a	0.94±0.01 ^a	1.03±0.01 ^a
Laurik Asit C12:0	5.79±0.15 ^a	6.56±0.12 ^b	5.71±0.09 ^a	6.94±0.06 ^b
Miristik asit C14:0	2.90±0.11 ^a	2.95±0.12 ^a	3.10±0.03 ^b	3.20±0.01 ^b
Palmitik asit C16:0	42.71±2.67	23.71±1.89 ^d	31.21±0.28 ^b	20.18±0.07 ^d
Palmitoleik asit C16:1n-7	4.63±0.11 ^a	5.03±0.13 ^b	2.61±0.12 ^d	2.52±0.25 ^d
Margarik asit C17:0	1.81±0.02	1.47±0.04 ^b	5.16±0.03 ^d	4.75±0.02 ^d
Stearik asit C18:0	25.38±2.15 ^a	23.94±2.22 ^a	24.77±0.23 ^a	21.39±1.34 ^a
Oleik asit C18:1n-9	9.71±0.87	3.24±0.67 ^d	8.29±0.08 ^b	4.27±0.09 ^d
Linoleik asit C18:2 n-6	3.61±0.04	1.68±0.08 ^d	1.48±0.01 ^d	1.80±0.01 ^d
Glifosat/ Vanilik asit 80 mg				
Kaprilik asit C8:0	3.53±0.13	8.13±0.27 ^d	2.77±0.05 ^b	4.04±0.15 ^b
Kaprinik asit C10:0	0.27±0.02 ^a	0.28±0.01 ^a	0.60±0.01 ^d	0.43±0.07 ^c
Laurik Asit C12:0	7.69±0.17 ^a	8.49±0.27 ^b	8.09±0.21 ^b	7.52±0.25 ^a
Miristik asit C14:0	4.33±0.17	4.75±0.21 ^a	3.59±0.16 ^b	4.15±0.20 ^a
Palmitik asit C16:0	43.61±1.37	41.58±1.45 ^b	42.34±0.84 ^a	43.37±0.83 ^a
Palmitoleik asit C16:1n-7	4.23±0.13	5.30±0.14 ^b	5.45±0.15 ^b	5.72±0.16 ^c
Margarik asit C17:0	3.18±0.16	2.41±0.13 ^b	2.62±0.13 ^b	2.29±0.30 ^b
Stearik asit C18:0	16.46±1.11	13.21±0.93 ^c	19.18±0.13 ^c	17.52±0.19 ^b
Oleik asit C18:1n-9	4.35±0.65 ^a	2.11±0.32 ^d	4.56±0.61 ^a	3.17±0.14 ^c
Linoleik asit C18:2 n-6	1.41±0.06	1.21±0.02 ^a	2.11±0.32 ^b	3.44±0.17 ^c
Glifosat/ Vanilik asit 160				
Kaprilik asit C8:0	3.49±0.11 ^a	3.35±0.08 ^a	3.98±0.01 ^b	4.43±0.10 ^b
Kaprinik asit C10:0	0.64±0.01 ^a	0.78±0.02 ^a	1.02±0.01 ^b	1.14±0.05 ^b
Laurik Asit C12:0	6.37±0.11	7.86±0.21 ^b	7.15±0.03 ^b	9.07±0.08 ^b
Miristik asit C14:0	3.51±0.18 ^a	3.68±0.15 ^a	2.81±0.03 ^b	3.04±0.02 ^b
Palmitik asit C16:0	40.35±1.18 ^a	42.60±1.05 ^b	38.32±0.11 ^a	37.13±0.41 ^a
Palmitoleik asit C16:1n-7	2.43±0.02 ^a	2.33±0.06 ^a	4.80±0.01 ^d	4.91±0.01 ^d
Margarik asit C17:0	1.19±0.08 ^a	1.33±0.02 ^a	1.87±0.02 ^b	1.86±0.02 ^b
Stearik asit C18:0	20.99±1.18 ^a	22.91±1.14 ^b	25.75±0.22 ^c	20.59±0.05 ^a
Oleik asit C18:1n-9	4.82±0.20	3.96±0.21 ^b	2.45±0.12 ^d	5.62±0.19 ^c
Linoleik asit C18:2 n-6	1.04±0.02	0.54±0.05 ^d	2.45±0.01 ^d	2.88±0.09 ^d

a: p>0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemsiz

b: p <0.05 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan önemli

c: p<0.01 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan çok önemli

d: p<0.001 gruplar arasındaki farklılıklar istatistiki açıdan oldukça çok önemli

4. Sonuçlar ve tartışma

Bu çalışmada, dünya genelinde yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir herbisit olan glifosatın farklı konsantrasyonlardaki toksik etkisine karşı vanilik asidin etkisi değerlendirildi. Bu çalışmada hem glifosat hem de vanilik asit için düşük, orta ve yüksek doz olmak üzere üç farklı konsantrasyonun etkisi *Saccharomyces cerevisiae* L. hücrelerinde test edilmiştir. *S. cerevisiae* (ekmek mayası), oksidatif stres, ksenebiyotik ve diğer toksik maddelerin etkilerinin incelenmesinde iyi bir ökaryotik hücre modeli olarak görülmektedir [18].

Aktif içeriği Glifosat olan Roundup, 1974'te piyasaya sürüldü. Roundup, şu anda en yaygın kullanılan herbisit olup, kalıntıları gıda maddelerinde, içme sularında bulunmuştur. Kalıntı tespiti ile birlikte, bu kalıntıların çevre ve insan sağlığı üzerinde olası olumsuz etkiler endişeye neden olmuştur. Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan rapora kadar, Roundup'un insanlar için güvenli olduğu düşünülüyordu fakat bu raporla birlikte Roundup ile kanser arasında bağlantı olduğu ortaya çıkmıştır. Roundup kullanan bazı tarım çalışanlarında, hamilelik sorunlarının olduğu belirlenmiştir. Yine Roundup'un, tarımsal uygulamalarda kullanılan dozundan daha düşük dozunun insan plasenta JEG3 hücreleri için toksik olduğu tespit edilmiştir. Son araştırmalar, insan idrarında bulunan düşük glifosat

seviyesinin, göğüs kanseri hücrelerinin büyümesini sağladığı ve bu herbisitın kanserojen potansiyele sahip olduğunu desteklediği ifade edilmiştir [19].

Oksidatif stres, canlı sistemde reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilme hızı ile onları ortadan kaldıran antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması ile oluşan bir durumdur. ROS düzeyi arttığında, antioksidan kapasite azaldığında canlı sistemi oluşturan biyomoleküllerde oksidatif hasar oluşmakta ve hücre ölümü gerçekleşmektedir. Ortaya çıkan bilgiler, herbisitlerin canlı sistemde ROS düzeyinin artmasını teşvik ederek canlı sistemde patolojik koşulların gelişimine zemin hazırladığını göstermektedir [19,20]. Glifosatın, canlı sistemin antioksidan aktivitesini bozduğu ve oksidatif stres parametrelerinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir [20,21]. Pestisitlerin glutatyon, sfingolipit ve sterol metabolizması üzerinde bozucu etkiler gösterdiği tespit edilmiştir [22]. Çalışmamızda glifosat uygulanan grupta GSH düzeyi artmıştır. Olasılıkla pestisitlerin glutatyon metabolizmasını etkilemesinden dolayı GSH düzeyi yükselmiş olabilir [22,23] (Tablo 2).

Çalışmamızda glifosatın oksidatif stres parametresinde artışa neden olduğu ve antioksidan sistemin aktivitesini bozduğu ortaya çıkmıştır. Günümüzde tarım kimyasallarının kullanım miktarının arttığı ve bunların kalıntılarının besin maddeleri, su ve havada bulunduğu ve bunların insan sağlığına kötü yansımalarının olacağı bilinmektedir. Bundan dolayı insan sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan aktif maddelerin, tarım kimyasallarının canlı sistemde oluşturduğu toksisite üzerindeki etkilerinin araştırılması günümüz koşullarında öncelikli bir hal almıştır. Bu çalışmada sağlık üzerinde olumlu etkileri olan vanilik asidin (antioksidan, antimikrobiyal, antienflamatuar, anti-tümör ve hepatoprotektif) [24,25] glifosat kaynaklı oksidatif strese, oksidatif stres parametrelerinden olan MDA ve GSSG (gerekli düzeltmeler yapıldı) düzeyinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda tarım kimyasallarının oluşturduğu toksisiteye karşı aktif bileşiklerin olumlu etkiler gösterdiği bildirilmiştir [26,21,5a]. Bu çalışma, vanilik asidin de bu özelliği taşıdığını göstermiştir. Çalışmalar vanilik asidin etkili bir antioksidan aktiviteye sahip olduğuna işaret etmektedir [7]. Bizim bulgularımızda bunu desteklemektedir (Tablo 1, Tablo 2). Bu çalışma glifosat toksisitesine karşı vanilik asidin etkisinin denendiği ilk çalışma özelliğini de taşımaktadır. Herbisitler kültür bitkileriyle simbiyotik olarak yaşayan mikorizal fungusların gelişimi ve faaliyetini olumsuz şekilde etkilediği bildirilmiştir [37]. Fare sıçanlarda yüksek doz glifosatın büyüme geriliğine, karaciğer ve böbrek hasarına, inflamasyona ve mide rahatsızlıklarına neden olduğu bildirilmiştir. Sucul bitkisel organizmalarda, glifosatın toksik etkiler gösterdiği, fotosentez, solunum ve esansiyel aromatik amino asitlerin sentezi ile ilgili hayati fonksiyonları değiştirerek etki ettiği ifade edilmiştir. Toprakta yaşayan bakterilerin, herbisitın olumsuz etkilerinden doğrudan etkilendiği düşünülmektedir. Yine glifosatın böcekler, kuşlar ve tozlaşma için oldukça önemli olan arılar üzerinde toksik etkiler gösterdiği ifade edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'nün uzmanlaşmış kanser ajansı (WHO, Cenevre, İsviçre) olarak adlandırılan bir kuruluş olan IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı, Lyon, Fransa), insanlar için glifosatu "muhtemel kanserojen" olarak sınıflandırmıştır. EFSA (Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu, Parma, İtalya), glifosatın insanlar için kanserojen olabileceğini ve insan sağlığı için riskler taşıdığını bildirmiştir [38].

Maya hücre zarının önemli bir bileşeni olan ergosterol, sadece bu canlıların büyüme ve gelişmesi için elzem olmasının yanında, aynı zamanda bu canlıların strese uyumu için de oldukça önemli hücrenel bir moleküldür [27]. Mayalarda ergosterol biyosentezinin inhibisyonu, membran akışkanlığı ve geçirgenliğini bozmaktadır. Aynı zamanda bu canlıların fermentasyon kabiliyetinin bozulmasına da sebep olmaktadır. Bu durum fermentasyon teknolojisine bağlı olarak besin maddelerinin üretimini olumsuz yönde etkilemektedir [22]. Ergosterol biyosentezi bozulan canlıların büyüme ve gelişmeleri olumsuz etkilenmekte sonuçta canlının ölmesi söz konusu olmaktadır [28]. Herbisitlerin maya hücrelerinde ergosterol sentezini bozduğu tespit edilmiştir [29]. Farklı tarım kimyasallarının mayalarda ergosterol biyosentezini bozduğu gösterilmiştir [22]. Çalışmamızda glifosat uygulamasının *S. cerevisiae* da ergosterol sentezini azalttığı, fakat yüksek doz vanilik asit uygulamasının *S. cerevisiae* da ergosterol sentezini artırarak fermentasyon kapasitesinde düzelmeye yol açtığı söylenebilir (Tablo 3).

Mayalarda 16:0, 18:0, 16:1, 18:1 ve 18:2 yağ asitlerinin yoğun olarak bulunduğu tespit edilmiştir [29]. Pestisitlerin mayalarda yağ asidi bileşiminde değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir [29]. Maya hücrelerinde herbisitlerin doymuş ve doymamış yağ asidi metabolizmasını etkilediği belirlenmiştir [30]. Çalışmamız da glifosat uygulaması yapılmış *S. cerevisiae* da hücrelerinde yağ asidi bileşiminde önemli değişimlerin olduğu görülmüştür. Glifosat uygulanmış *S. cerevisiae* da hücrelerinde, vanilik asidin yağ asidi bileşimi üzerinde farklı etkiler gösterdiği görülmektedir (Tablo 4). Bu çalışmada hem glifosatın hem de vanilik asidin yağ asidi biyosentezini düzenleyen enzimlerin aktivitesini etkilemesinden dolayı yağ asidi bileşiminin değiştiğini söyleyebiliriz [31,32]. Mayalar üzerinde kimyasal maddelerin etkilerine yönelik yapılan çalışmalarda bu tarz etkileri gözlemlemekteyiz [29]. Herbisitlerin yağ asidi metabolizması üzerinde inhibitif etkiler sergiledikleri görülmektedir [29,30]. Herbisit uygulanan sıçanlarda oksidatif stres ve yağ asidi bileşiminde değişimlerin olduğu, bu sıçanlara uygulanan zeytinyağının oksidatif stres ve yağ asidi bileşiminde oluşan değişikliklere karşı olumlu sonuçlar sergilediği belirlenmiştir. Zeytinyağında bulunan aktif bileşiklerin oksidatif stres ve yağ asidi bileşiminde oluşan değişikliklere karşı koruyucu özellikler gösterdiği ifade edilmiştir [33]. Bitkilerde bulunan aktif bileşiklerin tarım kimyasallarına bağlı olarak oluşan toksik etkilere karşı olumlu etkilere sahip olduğu ifade edilmiştir [34,35b].

Sonuç olarak tarımsal uygulamalarda yaygın olarak kullanılan bazı tarım kimyasallarının canlı sistemde yağ asidi, vitamin ve sterol biyosentezi üzerindeki etkilerine yönelik çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir. Bu çalışmada glifosatın *S. cerevisiae*'da oluşturduğu toksisite ve oksidatif strese karşı vanilik asidin etkisi ilk kez

incelenmiştir. Elde edilen verilere göre, glifosatın oluşturduğu oksidatif strese karşı vanilik asidin faydalı etkiler gösterdiği söylenebilir.

Teşekkür

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi tarafından desteklenmiştir. Katkılarından dolayı teşekkürler.

Kaynaklar

- [1] Yılmaz, S., Aslım, B., & Beyatlı, Y. (1997). Glifosat herbisidinin bazı laktik asit bakterilerinin gelişimi ve asit üretimine etkisi. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 3(3), 70-77.
- [2] Uren Webster, T.M., & Santos, E.M. (2015). Global transcriptomic profiling demonstrates induction of oxidative stress and of compensatory cellular stress responses in brown trout exposed to glyphosate and Roundup. *BMC Genomics*, 16:32. doi: 10.1186/s12864-015-1254-5.
- [3] Burella, P.M., Odetti, L.M., Simoniello, M.F., & Poletta, G.L. (2018). Oxidative damage and antioxidant defense in *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) exposed in ovo to pesticide formulations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 161, 437-443. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.06.006.
- [4] Gallegos, C.E., Baier, C.J., Bartos, M., Bras, C., Domínguez, S., Mónaco, N., ... & Minetti, A. (2018). Perinatal glyphosate-based herbicide exposure in rats alters brain antioxidant status, glutamate and acetylcholine metabolism and affects recognition memory. *Neurotox. Res.*, 34(3), 363-374. doi: 10.1007/s12640-018-9894-2.
- [5a] Turkmen, R., Birdane, Y.O., Demirel, H.H., Yavuz, H., Kabu, M., & Ince, S. (2019). Antioxidant and cytoprotective effects of N-acetylcysteine against subchronic oral glyphosate-based herbicide-induced oxidative stress in rats. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 26(11), 11427-11437. doi: 10.1007/s11356-019-04585-5.
- [6] Amin, F.U., Shah, S.A., & Kim, M.O. (2017). Vanillic acid attenuates A β ₁₋₄₂-induced oxidative stress and cognitive impairment in mice. *Sci. Rep.*, 7, 40753. doi: 10.1038/srep40753.
- [7] Vinothiya, K., & Ashokkumar, N. (2017). Modulatory effect of vanillic acid on antioxidant status in high fat diet-induced changes in diabetic hypertensive rats. *Biomed Pharmacother.*, 87, 640-652. doi: 10.1016/j.biopha.2016.12.134.
- [8] Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- [9] Klejdus, B., Zehnálek, J., Adam, V., Petrek, J., Kizek, R., Vacek, J.,... & Kubán, V. (2004). Sub-picomole high-performance liquid chromatographic/mass spectrometric determination of glutathione in the maize (*Zea mays* L.) kernels exposed to cadmium. *Analytica Chimica Acta*, 520, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.02.060>
- [10] Yılmaz, O., Keser, S., Tuzcu, M., Güvenç, M., Çetintaş, B., Irtegun, S.,... & Şahin, K. (2009). A practical HPLC method to measure reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione concentrations in animal tissues. *Journal of Animal Veterinary Advances*, 8, 343-347.
- [11] Karatas, F., Karatepe, M., & Baysar, A. (2002). Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 311(1), 76-9.
- [12] Karatepe, M. (2004). Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC/UV. *LC-GC North America*, 22(4), 362-365.
- [13] Hara, A., & Radin, N.S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.*, 90(1), 420-6.
- [14] Christie, W.W. (1989). *Gas chromatography and lipids*. Glasgow: The Oily Press Ltd.
- [15] Tvrzická, E., Vecka, M., Staňková, B., & Žák, A. (2002). Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography–flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analytica Chimica Acta*, 465, 337-350.
- [16] Katsanidis, E., & Addis, P.B. (1999). Novel HPLC analysis of tocopherols, tocotrienols, and cholesterol in tissue. *Free Radic. Biol. Med.*, 27(11-12), 1137-40.
- [17] López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., & Ríos-Vázquez, N.J. (2006). High-performance liquid chromatography method for the simultaneous quantification of retinol, alpha-tocopherol, and cholesterol in shrimp waste hydrolysate. *J. Chromatogr. A.*, 1105(1-2), 135-9.
- [18] Braconi, D., Bernardini, G., Fiorani, M., Azzolini, C., Marzocchi, B., Proietti, F.,... & Santucci, A. (2010). Oxidative damage induced by herbicides is mediated by thiol oxidation and hydroperoxides production. *Free. Radic. Res.*, 44(8), 891-906.
- [19] Luo, L., Wang, F., Zhang, Y., Zeng, M., Zhong, C., & Xiao, F. (2017). In vitro cytotoxicity assessment of roundup (glyphosate) in L-02 hepatocytes. *J. Environ. Sci. Health B.*, 52(6), 410-417. doi: 10.1080/03601234.2017.1293449.
- [20] de Souza, J.S., Laureano-Melo, R., Herai, R.H., da Conceição, R.R., Oliveira, K.C., da Silva, I.D.C.G.,... & Giannocco, G. (2019). Maternal glyphosate-based herbicide exposure alters antioxidant-related genes in the brain and serum metabolites of male rat offspring. *Neurotoxicology*, 74, 121-131. doi: 10.1016/j.neuro.2019.06.004.
- [21] Gehin, A., Guyon, C., & Nicod, L. (2006). Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of vitamins C and E. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 22(1), 27-34. doi: 10.1016/j.etap.2005.11.003.

- [22] Kong, Z., Li, M., An, J., Chen, J., Bao, Y., Francis, F.,... & Dai, X. (2016). The fungicide triadimefon affects beer flavor and composition by influencing *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Sci. Rep.*, 6, 33552. doi: 10.1038/srep33552.
- [23] Peters, L.P., Carvalho, G., Martins, P.F., Dourado, M.N., Vilhena, M.B., Pileggi, M.,... & Azevedo, R.A. (2014). Differential responses of the antioxidant system of ametryn and clomazone tolerant bacteria. *PLoS One*, 9(11), e112271. doi: 10.1371/journal.pone.0112271.
- [24] Dianat, M., Radmanesh, E., Badavi, M., Mard, S.A., & Goudarzi, G. (2016). Disturbance effects of PM₁₀ on iNOS and eNOS mRNA expression levels and antioxidant activity induced by ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart: protective role of vanillic acid. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, 23(6), 5154-65. doi: 10.1007/s11356-015-5759-x.
- [25] Anbalagan, V., Raju, K., & Shanmugam, M. (2017). Assessment of lipid peroxidation and antioxidant status in vanillic acid treated 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene induced hamster buccal pouch carcinogenesis. *J. Clin. Diagn. Res.*, 11(3), BF01-BF04. doi: 10.7860/JCDR/2017/23537.9369.
- [26] Avdatek, F., Birdane, Y.O., Türkmen, R., & Demirel, H.H. (2018). Ameliorative effect of resveratrol on testicular oxidative stress, spermatological parameters and DNA damage in glyphosate-based herbicide-exposed rats. *Andrologia*, 50(7), e13036. doi: 10.1111/and.13036.
- [27] Hu, Z., He, B., Ma, L., Sun, Y., Niu, Y., & Zeng, B. (2017). Recent advances in ergosterol biosynthesis and regulation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Indian J. Microbiol.*, 57(3), 270-277. doi: 10.1007/s12088-017-0657-1.
- [28] Kagan, I.A., Michel, A., Prause, A., Scheffler, B.E., Pace, P., & Duke, S.O. (2005). Gene transcription profiles of *Saccharomyces cerevisiae* after treatment with plant protection fungicides that inhibit ergosterol biosynthesis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 82, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.02.002>
- [29] Bernat, P., Nykiel-Szymańska, J., Stolarek, P., Słaba, M., Szweczyk, R., & Różalska, S. (2018). 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced oxidative stress: Metabolome and membrane modifications in *Umbelopsis isabellina*, a herbicide degrader. *PLoS One*, 13(6), e0199677. doi: 10.1371/journal.pone.0199677.
- [30] Viegas, C.A., Cabral, M.G., Teixeira, M.C., Neumann, G., Heipieper, H.J., & Sá-Correia, I. (2005). Yeast adaptation to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid involves increased membrane fatty acid saturation degree and decreased OLE1 transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330(1), 271-8.
- [31] Tehlivets, O., Scheuringer, K., & Kohlwein, S.D. (2007). Fatty acid synthesis and elongation in yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1771(3), 255-70.
- [32] Kieliszek, M., Błażej, S., Bzducha-Wróbel, A., & Kot, A.M. (2019). Effect of selenium on lipid and amino acid metabolism in yeast cells. *Biol. Trace Elem. Res.*, 187(1), 316-327. doi: 10.1007/s12011-018-1342-x.
- [33] Nakbi, A., Tayeb, W., Grissa, A., Issaoui, M., Dabbou, S., Chargui, I.,... & Hammami, M. (2010). Effects of olive oil and its fractions on oxidative stress and the liver's fatty acid composition in 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-treated rats. *Nutr. Metab. (Lond.)*, 7:80. doi: 10.1186/1743-7075-7-80.
- [34] Saxena, R., Garg, P., & Jain, D.K. (2011). In vitro anti-oxidant effect of vitamin e on oxidative stress induced due to pesticides in rat erythrocytes. *Toxicol. Int.*, 18(1), 73-6. doi: 10.4103/0971-6580.75871.
- [35b] Turkmen, R., Birdane, Y.O., Demirel, H.H., Kabu, M., & Ince, S. (2019). Protective effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress, biochemical and histopathological changes induced by sub-chronic oral glyphosate-based herbicide in rats. *Toxicol. Res. (Camb.)*, 8(2), 238-245. doi: 10.1039/c8tx00287h.
- [36] Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., & Deniz, İ. (2013). Antioksidan analiz yöntemleri ve doğu Karadeniz bölgesinde antioksidan kaynağı olarak kullanılabilir odun dışı bazı bitkisel ürünler. *Kastamonu Üni., Orman Fakültesi Dergisi*, 13(1), 48-59.
- [37] Kitiş, Y.E., Yazır, B., & Özkaya, H.Ö. (2016). The effects of some soil herbicides on root colonization and spore number of mycorrhizal fungi *Glomus intraradice*. *Biological Diversity and Conservation*, 9/2, 1-7.
- [38] Torretta, V., Katsoyiannis, I.A., Viotti, P., & Rada, E.C. (2018). Critical review of the effects of glyphosate exposure to the environment and humans through the food supply chain. *Sustainability*, 10, 950. doi:10.3390/su10040950.
- [39] Milić, M., Žunec, S., Micek, V., Kašuba, V., Mikolić, A., Lovaković B.T.,...& Želježić, D. (2018). Oxidative stress, cholinesterase activity, and DNA damage in the liver, whole blood, and plasma of Wistar rats following a 28-day exposure to glyphosate. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.*, 69, 154-168. doi: 10.2478/aiht-2018-69-3114

(Received for publication 25 September 2019; The date of publication 15 December 2019)



Biosorption of cadmium and copper by *Aspergillus* spp. isolated from industrial ceramic waste sludge

Elif HASGÜL¹, Semra MALKOÇ^{*1}, Alaettin GÜVEN³, Alper DEDE⁴, Kıymet GÜVEN⁴
ORCID: 0000-0002-0424-4470; 0000-0002-8092-411X; 0000-0003-2683-1008; 0000-0002-0707-9781;
0000-0001-6683-0419

¹ Eskişehir Osmangazi University, Graduate School of Sciences, Eskişehir, Türkiye

² Eskişehir Technical University, Engineering Faculty, Environmental Engineering Department, Eskişehir, Türkiye

³ Eskişehir Technical University, Science Faculty, Chemistry Department, Eskişehir, Türkiye

⁴ Eskişehir Technical University, Science Faculty, Biology Department, Eskişehir, Türkiye

Abstract

Under proper conditions, fungi can act as a good biosorbent for different heavy metals. In the present study, *Aspergillus* spp. have been isolated from ceramic industrial waste sludge and the tolerance of the fungi for copper and cadmium metals were examined. The experiments were carried out at 25 °C, pH=4-4.5 for Cu(II), pH=6 for Cd(II), biosorbent dose of 2.5 g, initial metal concentration of Cd (II) was 1 mM and Cu(II) was 5 mM. The removal efficiencies for cadmium and copper with two *Aspergillus* strains were found to be 90-95% and 85-90%, respectively. The sorption capacities of live and dead fungi for copper were 5.3676 mg g⁻¹, 18.661 mg g⁻¹ and for cadmium were 0.1977 mg g⁻¹, 0.1772 mg g⁻¹ respectively. FTIR analyses have showed that copper ions bound to vinyl compounds (950-900 cm⁻¹) and cadmium ions bound to primer amides (1420-1400 cm⁻¹), mostly. Considering biosorption results, Langmuir and Freundlich isotherm models have been described and it was clearly seen that none of the isotherm models have fitted the experimental data. The metal ion binding areas of the cell surface of fungi were determined by FTIR. SEM monitoring and EDX analysis were carried out. EDX results confirmed the biosorption of copper and cadmium.

Key words: *Aspergillus* spp., cadmium, copper, biosorption, ceramic industry

----- * -----

Seramik endüstrisi arıtma çamurundan izole edilen *Aspergillus* spp. ile kadmiyum ve bakır biyosorbsiyonu

Özet

Küfler uygun koşullar altında farklı ağır metaller için iyi bir biyosorban olabilir. Bu çalışmada, seramik sanayi atık çamurlarından *Aspergillus* spp. izole edilmiş ve bakır ve kadmiyum metallerine toleransı incelenmiştir. Deneyler 25 °C'de biyosorban miktarı 2,5 g, Cu (II) için pH = 4-4,5, Cd (II) için pH = 6 ve başlangıç metal konsantrasyonu Cd (II) için 1 mM ve Cu (II) için 5 mM olarak yapılmıştır. İki *Aspergillus* suşunun kadmiyum ve bakır uzaklaştırma etkinlikleri sırasıyla % 90-95 ve % 85-90 olarak bulunmuştur. Canlı ve ölü biyosorbanın bakır için emilim kapasiteleri sırasıyla 5,3676 mg g⁻¹, 18,661 mg g⁻¹ ve kadmiyum için ise sırasıyla 0,1977 mg g⁻¹, 0,1772 mg g⁻¹ olarak tespit edilmiştir. FTIR analizleri bakır iyonlarının vinil bileşiklere (950-900 cm⁻¹) ve kadmiyum iyonlarının primer amidlere (1420-1400 cm⁻¹) bağlandığını göstermiştir. Biyosorpsiyon sonuçları dikkate alındığında, Langmuir ve Freundlich izoterm modellerinden hiçbirinin deneysel verilere uymadığı açıkça görülmüştür. Hücre yüzeyinin metal iyon bağlama alanları FTIR ile belirlenmiştir. SEM izleme ve EDX analizi yapılmış, EDX sonuçları bakır ve kadmiyumun biyosorpsiyonunu doğrulamıştır.

Anahtar kelimeler: *Aspergillus* spp., kadmiyum, bakır, biyosorbsiyon, seramik endüstrisi

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905323358248; Fax.: +902223239501; E-mail: satik@eskisehir.edu.tr

1. Introduction

Advances in industrialization that connected with the increase of people's needs have increased the amount of wastewater and heavy metal pollutions. Mines, petroleum refineries, metal industry, galvanic processes, ceramic industry, paint and plastic material productions are some of the main sources that contributing to heavy metal pollution [1]. Due to their properties, heavy metal ions have been used in many different areas of industry. However, metal ions can accumulate in living tissues and cause toxic effects in metabolism, without getting noticed. This case adversely affects both the environment and the human health [2]. Even small amounts of these heavy metals such as antimony, lead, silver, arsenic, cadmium, copper, nickel, iron, aluminum, cobalt, chromium, manganese, mercury, zinc, barium etc. might be toxic [3]. For example, public health goal are 0.006 mg/L antimony, 2 mg/L barium, 0.005 mg/L cadmium, 0.1 mg/L chromium (total) 1.3 mg/L copper, 0.002 mg/L mercury (inorganic) and arsenic and lead zero [4].

Various chemical and physical processes have been applied to remove of heavy metals from the industrial wastes. However, these methods are not economical always; in that case, industries tend to using microorganisms that have significant potential for removal of heavy metals [5]. A variety of bacteria, fungi and algae has been used for this purpose. Some living or dead microorganisms can adsorb the heavy metal ions. The microorganism, which will be used for removal of metals, should be able to easily and economically produce in high quantities [6]. Almost all organisms have negatively charged surfaces and they capable to adsorb positively charged metal ions, such as Cu^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} etc. Some living organisms take and accumulate the metal ions into the cell. Removal of heavy metals by biosorption is the result of an interaction between the cell wall and metal ions [7].

In the composition of ceramics, there are different types of silicates, aluminates, water, metal oxides, alkali and alkaline earth compounds. Ceramic is obtained by mixing some ingredients as natural clay, kaolin, quartz and feldspar in specific proportions [8]. Production processes in the ceramic industry generally involve the parts as design, slurry preparation, foundry, drying, glazing and firing units. In this kind of industries, the major sources of waste arises from sludge unit, mold section, foundry, glaze preparation and washing part [9]. Wastes from slurry preparation unit contains high amounts of suspended solids and organic contents which resulting excessive pollution load [10].

The aim of this study was to perform biosorption processes for removal of copper and cadmium metals by using fungi isolated from local ceramic industrial waste sludge. The metal binding sites on fungal cell surfaces were identified for both metals by using FTIR. SEM monitoring and EDX analysis were also carried out for determination of the accumulations of metals on fungal cell.

The relationship between the amount of solute adsorbed at equilibrium onto the adsorbent and the amount of remaining solute can be described by adsorption isotherms. The Langmuir and Freundlich isotherm models are commonly used for the description of adsorption processes [11].

2. Materials and methods

2.1. Isolation and identification of fungi

Ceramic waste sludge sample was obtained kindly, from a ceramic factory located very close to Eskisehir. The subsamples were taken from different locations of waste sludge tank by using a plastic shovel. The working sample was a mixture of these subsamples. Analysis of heavy metals in the sludge was carried out by ICP-OES (VARIAN 720 ES). The sample was prepared according to EPA 3051A method [12]. Briefly, the sludge was dried for 3 hours in the drying oven (Nüve FN 500) at 105 °C. A sample of dried mud have been prepared and combusted in microwave heating unit (CEM Mars Express) for ICP analysis. For isolation of fungi, 5 grams of sludge samples were added (under sterile conditions) into three flasks containing 5 mL of 0.1% sterile tetra-sodium diphosphate decahydrate (pH 7.0) and then were shaken for 30 minutes at 180 rpm. The sludge suspensions were diluted by 10-fold and spread on the surface of PDA medium. The plates were incubated at 28 °C for 7-10 days [13] and then examined for colonies with different morphologies and colors. Different colonies of fungi were selectively re-cultivated on PDA and incubated at 28 °C temperature for 7-10 days.

Pure cultures of fungi were examined morphologically by microscopy (Olympus C011) and identified with the help of [14-17].

2.2. Screening of resistance to heavy metals and determination of MIC

Copper ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) and cadmium ($\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) [13] were used for determination of minimum inhibition concentrations (MIC) by fungi isolated from the ceramic industrial waste sludge. A general fungal growth medium (PDA) was prepared and amended with various amounts of heavy metals concentration ranging from 1 to 20 mM for screening the resistance to heavy metals. The mycelium disks of test fungi (10^6 CFU ml) were spotted in duplicate on heavy metal containing plates. Control plates used only PDA medium without heavy metals. To observe the growth of fungi on the spotted area, the plates were incubated at 28 ± 1 °C for 7 days. Heavy metal tolerance was determined as the heavy metal that inhibited visible growth of test fungus [18].

2.3. Biosorption assays

Cadmium and copper biosorption studies were carried out after screening tests by using the most resistant organism for each heavy metal. Both living and dead biomass were used in biosorption experiments. Two duplicates were prepared for each application. The fungi were firstly grown on PDA and then were transferred to PDB (potato dextrose broth) liquid medium for incubation by shaking incubator for 5-6 days (at 125 rpm, 25 °C). Fungal mycelia were filtered by vacuum filter (Diaphragm Vacuum Pump GM-0.5011) through 150 µm sterile filters. The biomass was absolutely washed with distilled deionized water to be in the clear residual growth medium and used immediately thereafter. Dead biomass was prepared by autoclaving 2.5 grams of biomass. Biosorption studies were carried out by adding either living or dead fungi into 50 mL of metal solutions by stirring at 125 rpm. The working concentrations of metals were chosen 5 mM for copper, 1 mM for cadmium. The studies were carried out by using different contact times as 24, 48, 72, 96, 120 and 168 hours. In each sampling time, 30 mL of the solution removed and centrifuged at 8000 rpm (Hettich Zentrifugen Universal 320-R) for 30 min to separate the biomass.

Following centrifugation, the supernatant was filtrated as above and then heavy metal concentrations of the supernatants was determined using a Varian 720 ES inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES). The pellets were used for FTIR analysis and SEM-EDX studies. The percentage removal were calculated by the following equation:

$$\text{Percentage removal} = \frac{(C_0 - C_e) \times 100\%}{C_0} \quad (1)$$

where C_0 and C_e were concentrations of metal ions (mg L^{-1}) in initial solutions and after biosorption [19]. The amounts of adsorbed metal ions per fungal biomass unit ($\text{mg metal ions/g biomass}$) were calculated by using the following equation [11]:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e) \times V}{m} \quad (2)$$

where q_e was biosorpted heavy metal amount per fungal biomass (mg g^{-1}), V was volume of aqueous phase (mL) and m was the amount of biomass (g).

2.4. Biosorption isotherms

Freundlich and Langmuir models were used for biosorption isotherm models. Freundlich isotherm model was used for describing the nonhomogeneous solid surface adsorptions [20].

$$\text{Log } q_e = \text{Log } K_f + \frac{1}{n} \text{Log } C_e \quad (3)$$

where K_f was Freundlich sorption constant about the capacity, n was Freundlich constant about the sorption density.

Langmuir isotherm model was used for describing the homogeneous monolayer adsorption assuming the adsorbent surface is similar in terms of energy [21].

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m K_L} + \frac{C_e}{q_m} \quad (4)$$

where C_e was metal concentration in solution after adsorption (mg L^{-1}), q_e was adsorpted heavy metal amount per fungal biomass (mg g^{-1}), q_m was adsorption capacity of monolayer adsorption (mg kg^{-1}), K_L was Langmuir sorption constant (L mg^{-1}).

2.5. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

Fungal biomass was dried vacuum evaporator. 1 mg sample/100 mg KBr in order to prepare translucent sample disk and was analyzed by FTIR (Perkin Elmer Spektrum 100) at Anadolu University Department of Chemistry. FTIR studies were carried out in the range of 800–2000 cm^{-1} at room temperature. The absorption spectrum of unadsorbed dry fungal biomass was used as control for comparison with leading adsorbed biomass to investigate the functional groups of fungi relation to biosorption of metal ions.

2.6. Scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive x-ray (EDX) analysis

SEM micrographs and EDX spectra were taken for both control groups and heavy metal treated fungi samples. The dried and powdered samples were glued onto the stubs with conductive carbon strips. The stubs have been coated with a thin layer of gold by lining machine (30 mA, 1 min) on the purpose of enhancing image resolution. The samples were monitorized by FE-SEM microscope (JEOL JSM-6335F) (20kV, 300X)..

3. Results

3.1. The heavy metal content of ceramic waste sludge

The ICP-OES analysis was carried out for determining the heavy metal content of the ceramic waste sludge. The ceramic sludge contained 0.69 mg kg⁻¹ cadmium, 7.89 mg kg⁻¹ chromium, 3.95 mg kg⁻¹ copper, 0.2 mg kg⁻¹ nickel, 9.38 mg kg⁻¹ lead, 8.29 mg kg⁻¹ manganese, 0.5 mg kg⁻¹ antimony, and 54464 mg kg⁻¹ iron. Maximum for any single composite sample-TCLP are 0.10 mg/l antimony, 0.50 mg/l arsenic, 7.6 mg/l barium, 0.010 mg/l beryllium, 0.050 mg/l cadmium, 0.33 mg/l chromium (total), 0.15 mg/l lead, 0.009 mg/l mercury, 1.0 mg/l nickel, 0.16 mg/l selenium, 0.30 mg/l silver, 0.020 mg/l thallium, and 70 mg/l zinc [22].

Traditional ceramic materials are made of clay, silica, feldspar and kuvars. Ceramic waste sludge were involving high amount of iron (54464 mg kg⁻¹) and some other heavy metals probably originate from these ingredients [23].

However, iron removal researches have needed high concentrations of metal. [24-25] Ujile and Joel (2013) and Karthikeyan et al. (2005) have worked on physical adsorption of iron and they have found that the physical adsorption was easier and cheaper than biosorption for iron. Physical sorption results from the electrostatic and van der Waals interactions (forces). Different adsorption substrates may be used for this reason [26]. Chromium and antimony weren't dissolved easily in water and changes on pH have caused to precipitation. Filtration with special resins have been referred against biosorption for manganese removal, by the reason of being cheaper and easier [27]. For these reasons, iron, chromium, antimony, and manganese have not been studied for biosorption and bioaccumulation.

3.2. Isolation and identification of fungi

Totally 10 species of fungi were isolated from ceramic waste and and these fungi were identified as *Aspergillus* sp. (2 strains), *Penicillium* sp. (5 strains), *Mucor* sp., *Rhizopus* sp. and *Trichoderma* sp.

3.3. Determination of resistance to heavy metals and minimum inhibition concentrations (MIC)

All the tested fungi grew on the metal containing media indicating their resistance to heavy metals. However, *Aspergillus* sp. (strain 2) had the highest copper (Cu²⁺) resistance as with *Aspergillus* sp. (strain 1) had the highest cadmium (Cd²⁺) resistance among fungi tested. These two *Aspergillus* sp. strains also showed highest lead (Pb²⁺) resistance. *Aspergillus* sp.1 and *Trichoderma* sp. were the most resistant fungi against Nickel (Ni²⁺). The experiment results for determination of resistance to heavy metals and MIC were given in Table 1.

Table 1. Determination of resistance to heavy metals and minimum inhibition concentrations (MIC)

Fungus	Minimum Inhibition Concentrations (mM)			
	Cu ²⁺	Pb ²⁺	Cd ²⁺	Ni ²⁺
<i>Aspergillus</i> sp.1	10	15	5	5
<i>Aspergillus</i> sp.2	15	15	1	1
<i>Penicillium</i> sp.1	<0.5	10	<0.1	1
<i>Penicillium</i> sp.2	<0.5	5	<0.1	5
<i>Penicillium</i> sp.3	<0.5	1	<0.1	<0.5
<i>Penicillium</i> sp.4	<0.5	5	<0.1	1
<i>Penicillium</i> sp.5	<0.5	5	<0.1	1
<i>Mucor</i> sp.	5	10	5	1
<i>Rhizopus</i> sp.	10	5	1	1
<i>Trichoderma</i> sp.	1	1	0.1	5

Acquired MIC results have been compared and initial metal concentrations for biosorption studies were determined as 5 mM for copper and 1 mM for cadmium. Biosorption experiments were carried out for only copper and cadmium removal since MIC values obtained for lead and nickel were quite low comparing to literature [28].

3.4. Biosorption

Aspergillus sp. strain 1 was used for cadmium and *Aspergillus* sp. strain 2 was used for copper bioremoval. The copper removal were found to be 89.6% (96 h) and 86.7% (168 h); the cadmium removal were found to be 97% (168 h) and 83.5% (72 h) by using living and dead biosorbents, respectively.

The sorption capacities of living and dead fungi were 5.36 mg g⁻¹ and 18.6 mg g⁻¹ for Cu²⁺; 0.19 mg g⁻¹ and 0.17 mg g⁻¹ for Cd²⁺. The biosorption capacities of copper and cadmium by different microorganisms on literature were given by Table 2.

Removals of Cu(II), Ni(II), Cd(II), Zn(II) and Cr(II) by using *Beauveria bassiana* results for maximum metal removals had found 74.13%, 75%, 63.4%, 67.8% and 61.13%, respectively [29]. Cu²⁺ removal by *Aspergillus niger* studies obtained 99.6% removal [30]. The cadmium toxicity in a cadmium-tolerant strain of *Aspergillus foetidus* had reported earlier that the living fungal biomass could remove 79% of Cd²⁺ from the liquid media at 100 µM Cd²⁺ concentration [31]. A research by dead *Aspergillus terreus* (strain ATCC-20516) as a biosorbent for copper removal from aqueous solutions and they could reach 72% removal ratio [19]. A study had reported about cadmium removal by living *Saccharomyces cerevisiae* that had observed 77% removal [32]. The yields of removal had found to be 81% and 94% in a research that had been involving copper and cadmium biosorption by dead *Geobacillus* spp. [33].

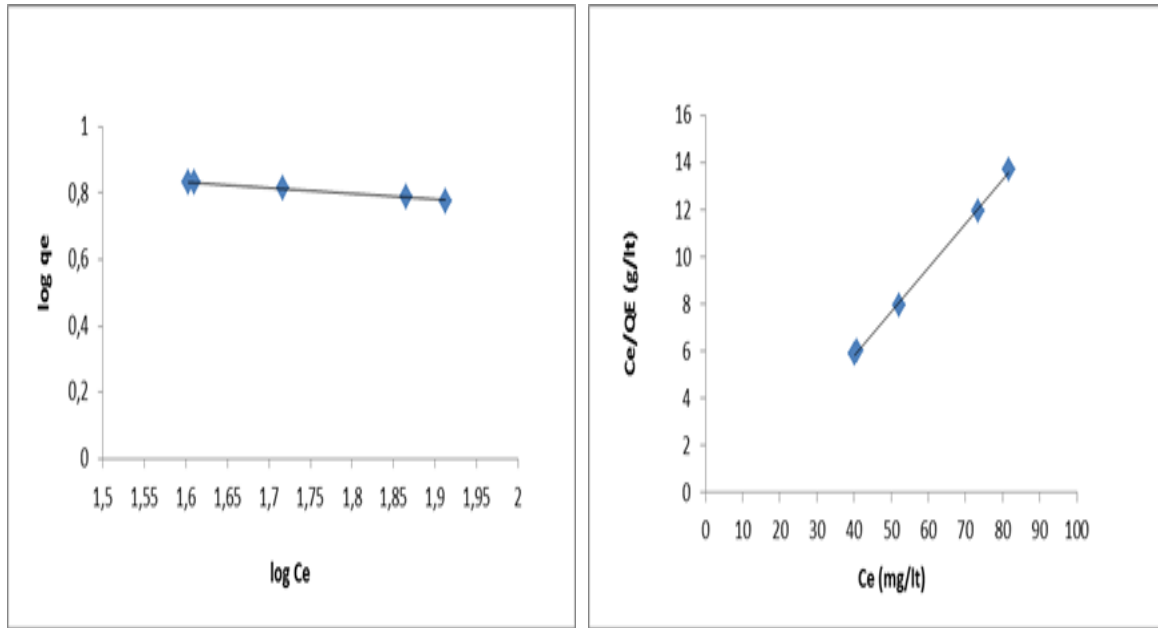
3.5. Biosorption isotherms

The sorption capacities have found for copper were 5.3676 mg g⁻¹, 18.661 mg g⁻¹ and for cadmium were 0.1977 mg g⁻¹, 0.1772 mg g⁻¹ in order of living and dead fungi. The Langmuir isotherm constants (K_L) have obtained in negative values. A negative value for the intercept of linear form of Langmuir model is physical nonsense, in other words it is impossible. As seen on Fig.1 and Fig.2, our Langmuir isotherms were considerably linear. Slopes of Freundlich isotherms (1/n) for Cu²⁺ and Cr²⁺ were also negative. For this reason, neither Langmuir nor Freundlich isotherm models were fitted our experimental data. The best way would be to perform a non-linear regression on our data, to use another isotherm model or work with higher initial metal concentrations. The sorption capacities (q_m), isotherm constants (K_L, K_F), coefficients of correlation (R²) of isotherm models were given in Table 3.

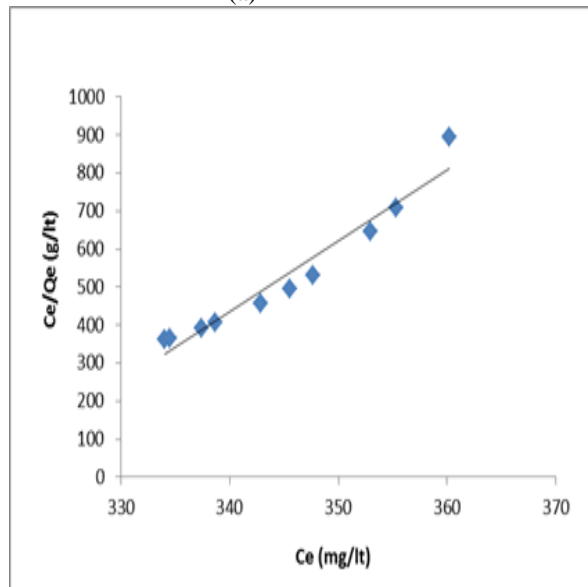
Table 2. Comparison the features of biosorption studies

Metal	Microorganism	pH	Temperature (°C)	Sorption Capacity	Reference
Cd ²⁺	<i>A. foetidus</i> *	5.0	32	73.46±10.75 mg g ⁻¹	[31]
Cd ²⁺	<i>S. cerevisiae</i> *	5.0	28	106.81 ± 3.71 µmol g ⁻¹	[32]
Cd ²⁺	<i>Z. rouxii</i> *	5.0	28	33.83 ± 1.25 µmol g ⁻¹	[32]
Cd ²⁺	<i>A. symbioticum</i> H8**	6.0	30	248.62 mg g ⁻¹	[34]
Cd ²⁺	<i>B. subtilis</i> **	5.92	45	251.91 mg g ⁻¹	[39]
Cd ²⁺	<i>A. sphaerica</i> **	5.5	25	111.1 mg g ⁻¹	[35]
Cd ²⁺	<i>P. lilacinus</i>	6-7*	30	36.46 mg g ⁻¹ *	[38]
Cd ²⁺		5-7**		41.99 mg g ⁻¹	
Cu ²⁺	<i>S. cerevisiae</i> **	6.0	28	28.8 mg g ⁻¹	[43]
Cu ²⁺	<i>Arthrobacter</i> ps-5**	5.0	28	169.15 mg g ⁻¹	[44]
Cu ²⁺	<i>B. subtilis</i> **	6.0	37	100.70 mg g ⁻¹	[40]
Cu ²⁺	<i>A. niger</i>	5.3	30	25.3 mg g ⁻¹	[30]
Cu ²⁺	<i>A. terreus</i> **	6.0	50	15.24 mg g ⁻¹	[19]
Cu ²⁺	<i>A. niger</i>	4.0-6.0	30	23.8 mg g ⁻¹	[36]
Cu ²⁺	<i>S. cerevisiae</i>	5.5	22	29.9 mg g ⁻¹	[37]
Cu ²⁺	<i>G. toebii</i> (G1) **	Cd=6.0	Cd=70	G1: Cd=29.2 mg g ⁻¹	[33]
Cd ²⁺	<i>G. thermoleovorans</i> (G2) **	Cu=4.0	Cu=60	Cu=48.5 mg g ⁻¹	
Cu ²⁺				G2: Cd=38.8 mg g ⁻¹	
Cd ²⁺				Cu=41.5 mg g ⁻¹	
Cu ²⁺	<i>P. chrysosporium</i> **	6.0	25	Cd= 27.79 mg g ⁻¹	[42]
Cd ²⁺				Cu= 26.55 mg g ⁻¹	
Cu ²⁺				Cu: 4.54 mg g ⁻¹	
Cd ²⁺	<i>B. bassiana</i>	6-8	30	Cd: 4.5 mg g ⁻¹	[29]
Cu ²⁺				(initial conc: 30 mg L ⁻¹)	
Cu ²⁺				Cu: LB=5.36	
Cd ²⁺	<i>Aspergillus</i> spp. 2	Cu: 4.0	25	DB=18.6 mg g ⁻¹	In this study
Cd ²⁺	<i>Aspergillus</i> spp. 1	Cd: 6.0		Cd: LB=0.19	
				DB=0.17 mg g ⁻¹	

*LB: Living Biomass, **DB: Dead Biomass



(a)



(b)

Figure 1. Isotherms for copper. (a) Freundlich and Langmuir isotherms for living fungus. (b) Langmuir isotherm for dead fungus

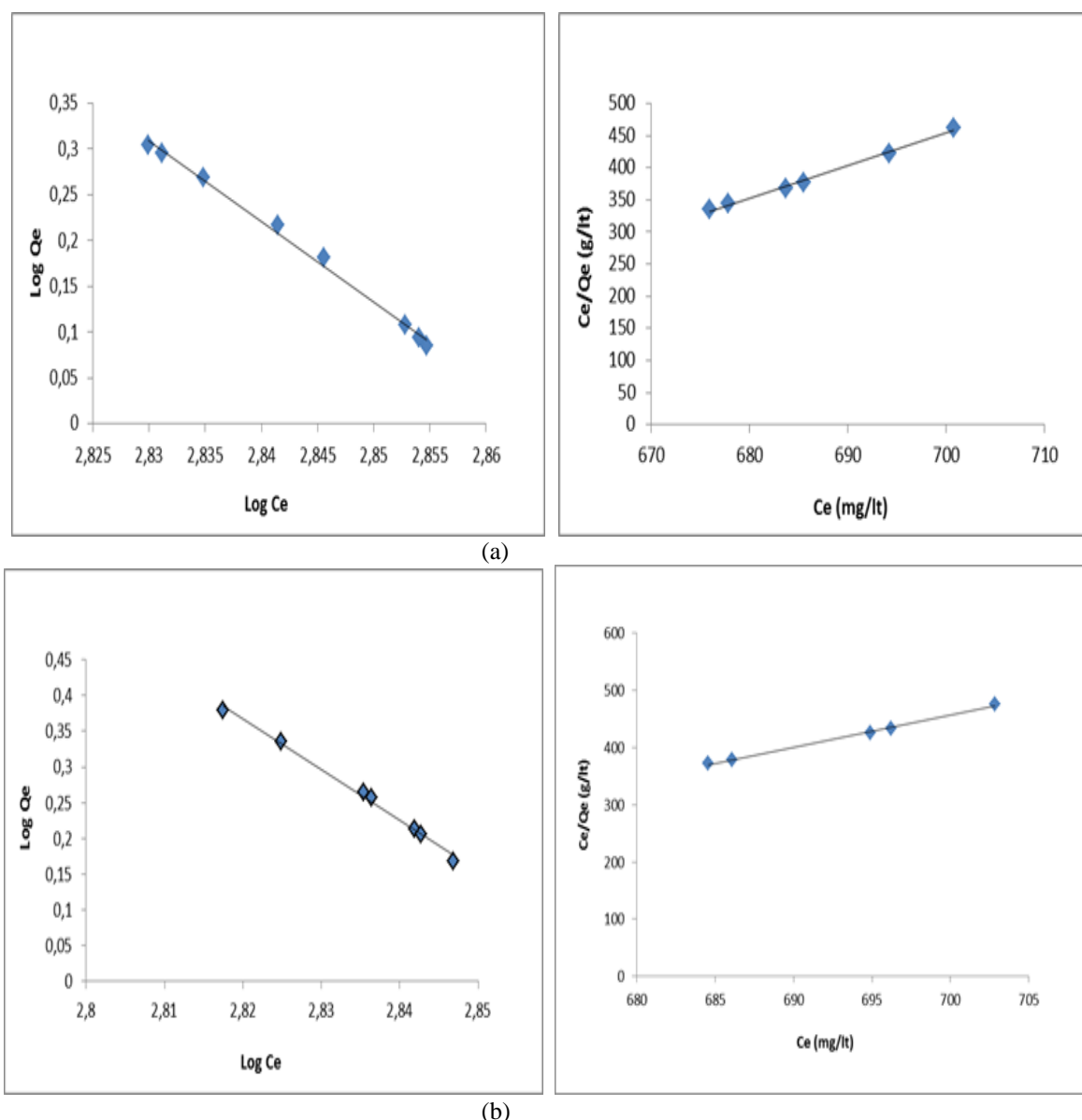


Figure 2. Freundlich and Langmuir isotherms for cadmium. (a) Bioaccumulation by living fungus. (b) Biosorption by dead fungus.

Table 3. Langmuir and Freundlich parameters for copper and cadmium biosorptions by *Aspergillus* spp.

		Langmuir			Freundlich		
		q_m (mg g ⁻¹)	K_L	R^2	$1/n$	K_f	R^2
Copper	Living biomass	5.3676	-0.1143	0.9993	-0.1796	13.231	0.9927
	Dead biomass	18.661	-0.0031	0.9446	-	-	-
Cadmium	Living biomass	0.1977	-0.00164	0.994	-8.8058	1.694×10^{25}	0.9955
	Dead biomass	0.1772	-0.00162	0.995	-7.0902	2.301×10^{20}	0.9939

A study about removal of Cu^{2+} by *Aspergillus niger* had found the biosorption capacity was 25.3 mg g⁻¹ [30]. Acidophilic, heterotrophic, gram-negative *Acidiphilium symbioticum* H8 had studied for establish the mechanism of Cd^{2+} ion sorption. The sorption capacity was 248.62 mg cadmium per gram biomass at pH 6.0 and the process had explained by Langmuir–Freundlich dual isotherm model [34]. The study [35] had presented the cadmium biosorption from aqueous solution by the blue green algae *Anabaena sphaerica*. To describe the biosorption isotherms, Freundlich, Langmuir, and Dubinin–Radushkevich (D–R) models had been applied and the experimental data had fitted to Freundlich and Langmuir

isotherms. The mean free energy value had been calculated from the D–R plot was 14.3 kJ mol^{-1} , had indicated that the biosorption type was chemisorption.

The biosorption of Cu^{2+} from aqueous solutions by *Aspergillus niger* which had treated by rice straw had investigated and the biosorption capacity was 23.8 mg g^{-1} [36]. The study [37] on copper and lead removal from aqueous solutions by using *Saccharomyces cerevisiae* had resulted in the way that the maximum biosorption capacity of Pb^{2+} had better than Cu^{2+} (72.5 mg g^{-1} and 29.9 mg g^{-1} , respectively). Cadmium biosorption of the high cadmium resistant fungus *Paecilomyces lilacinus* had investigated for living and dead biomass. Adsorbed cadmium amounts had determined was 36.43 mg g^{-1} and 41.99 mg g^{-1} for living and dead biomass respectively [38].

Biosorption capacity of immobilized *Bacillus subtilis* beads (IBSB) for cadmium ions had studied and the equilibrium biosorption capacity had found to be 251.91 and 188 mg g^{-1} at temperatures of 45°C and 25°C , respectively. The results had showed that the biosorption capacity increased with increasing temperature [39].

Immobilized *Bacillus subtilis* chitosan beads (BICB) had used for removal of copper ions from aqueous solution [40]. The equilibrium studies had described by four isotherm models as Langmuir, Freundlich, Temkin, Dubinin-Radushkevich and the Langmuir isotherm model had been the best description of the copper adsorption mechanism. The maximum adsorption capacity of copper had found 100.70 mg g^{-1} .

Micrococcus luteus DE2008 has the ability to absorb lead and copper. The microorganism had showed a greater tolerance for lead than copper. The biosorption capacities had found 408 mg g^{-1} for copper and 1965 mg g^{-1} for lead [41]. The biosorption of heavy metals (Cd(II), Pb(II) and Cu(II)) from artificial wastewaters onto the dry fungal biomass of *Phanerochaete chrysosporium* had studied. The Langmuir isotherm model had fitted well for the adsorption equilibrium data and the biosorption capacities had found to be 23.04 mg g^{-1} , 69.77 mg g^{-1} and 20.23 mg g^{-1} for cadmium, lead and copper, respectively [42]. According to study of on copper biosorption by a wild type (BY4741) and two engineered *S. Cerevisiae* biomass (Rim101 Δ , Och1 Δ) [43], maximum biosorption capacities of copper had found to be 28.8 , 8.0 , 7.5 mg g^{-1} at pH=6 for wild type, Rim101 Δ and Och1 Δ respectively. The bioaccumulation capacities of these three strains had not found significantly different.

3.6. FTIR analyses

FTIR analyses were carried out for determining the metal binding sites on fungal cell surface. As seen on Fig.3 the copper binding sites on living fungus cell surface were isopropyl group ($1380\text{--}1360 \text{ cm}^{-1}$), sulphones ($1335\text{--}1295 \text{ cm}^{-1}$), vinyl compounds ($950\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$). Upon dead fungus cell surface, the copper were binding on primer amides ($1420\text{--}1400 \text{ cm}^{-1}$), pridin N-oxydes ($1300\text{--}1200 \text{ cm}^{-1}$), ethers ($1240\text{--}1070 \text{ cm}^{-1}$), vinyl compounds ($950\text{--}900 \text{ cm}^{-1}$), vinylidenes ($900\text{--}865 \text{ cm}^{-1}$), triazine ($820\text{--}800 \text{ cm}^{-1}$) groups. Besides, the cadmium binding sites on living fungus cell surface were esters ($1750\text{--}1740 \text{ cm}^{-1}$), primer amides ($1420\text{--}1400 \text{ cm}^{-1}$), alkyl aril esters ($1285\text{--}1240 \text{ cm}^{-1}$). Upon dead fungus cell surface, the cadmium were binding on carbonyl compounds ($1870\text{--}1650 \text{ cm}^{-1}$), aliphatic nitro compounds ($1575\text{--}1545 \text{ cm}^{-1}$), primer amides ($1420\text{--}1400 \text{ cm}^{-1}$), 1,2,4-trisubst benzenes ($890\text{--}805 \text{ cm}^{-1}$) (Fig.4).

The biosorption behaviors for copper by a novel extracted exopolysaccharide (EPS) from *Arthrobacter ps-5* had studied and the biosorption capacity of copper had found 169.15 mg g^{-1} . Interactions between metal ions and O–H, C=O, C–O–C, C=O–C groups of the EPS had determined by FTIR [44]. The FTIR spectra of *Saccharomyces cerevisiae* had had several functional groups as carboxyl, hydroxyl, amino and carbonyl groups on the cell wall [45]. Results of the biosorption of Cu^{+2} ions by *Saccharomyces cerevisiae* verified that sorption was a combination of intracellular metal accumulation and metabolic-independent surface phenomenon [37].

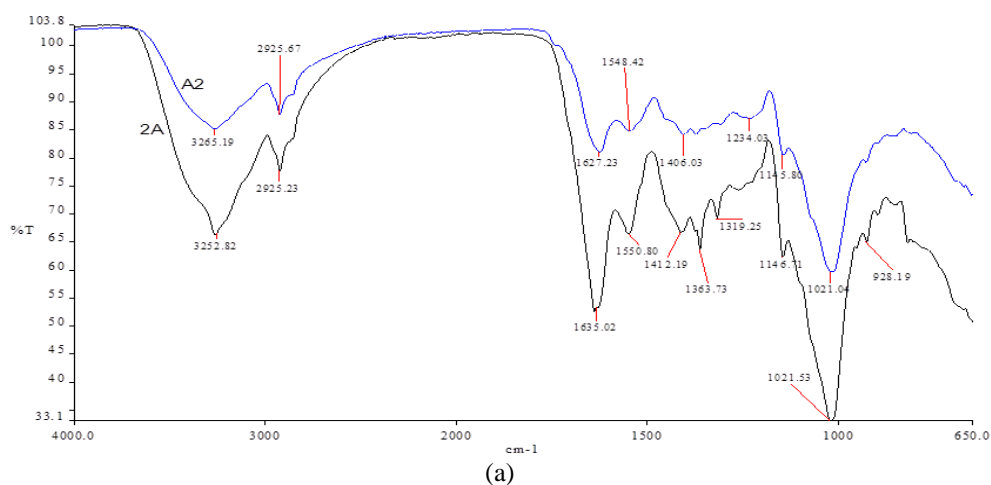
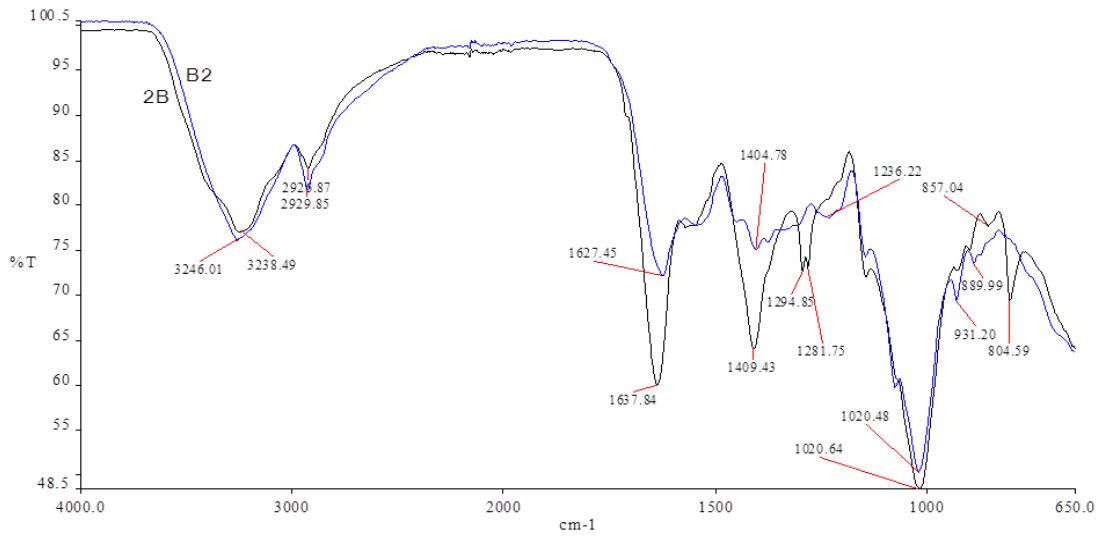
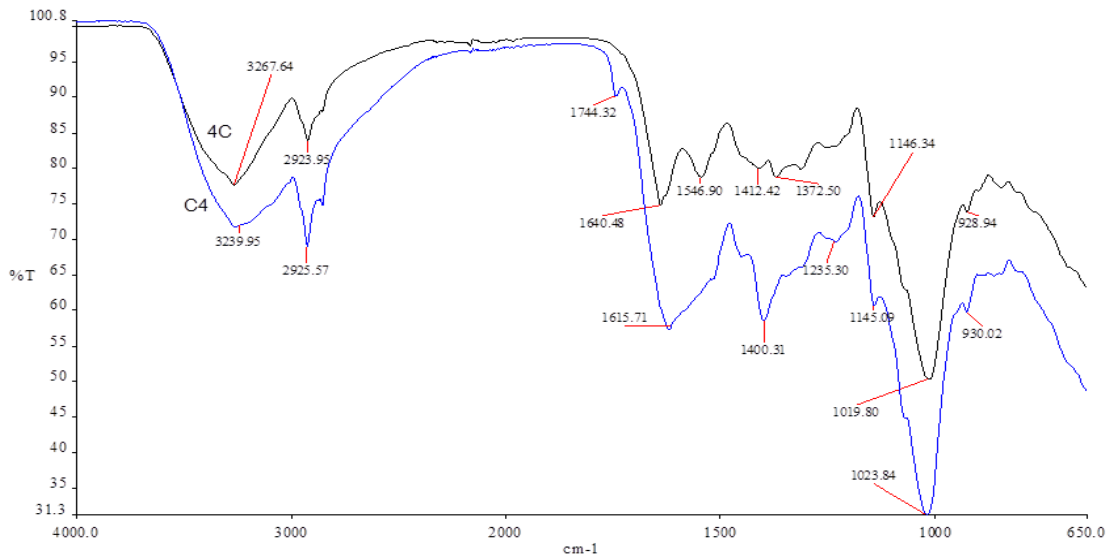


Figure 3. FTIR spectra of copper. (a) Bioaccumulation by living fungus. Blue lines in spectra presented control groups; black lines have indicated the metal-treated samples

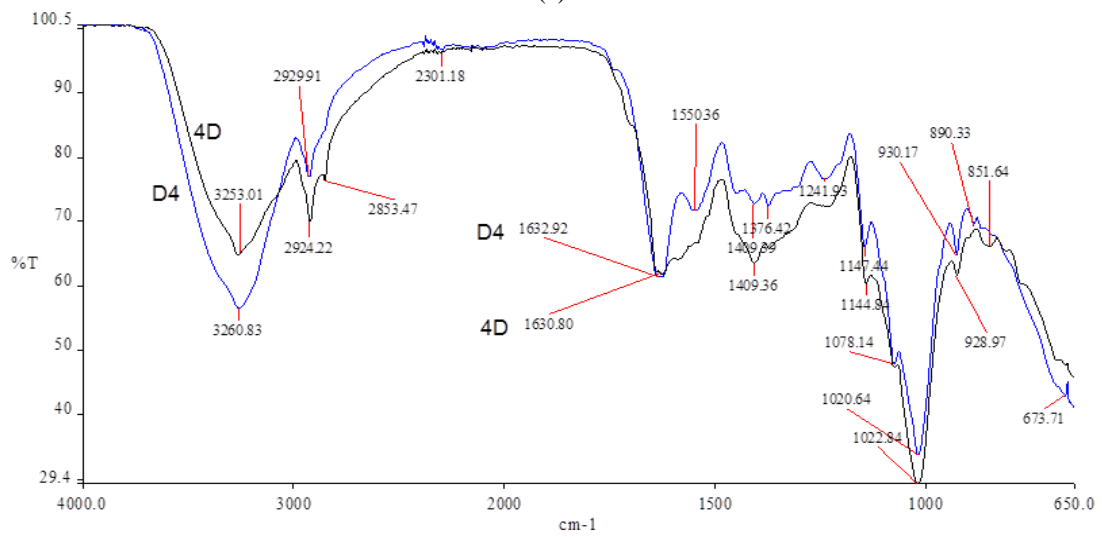


(b)

Figure 3. FTIR spectra of copper. (b) Biosorption by dead fungus. Blue lines in spectra presented control groups; black lines have indicated the metal-treated samples



(a)



(b)

Figure 4. FTIR spectra of cadmium. (a) Bioaccumulation by living fungus. (b) Biosorption by dead fungus. Blue lines in spectra presented control groups; black lines have indicated the metal-treated samples

3.7. SEM micrographs and EDX spectra

SEM micrographs (Fig.5) have shown that the metal absorbed filaments of dead fungus were more apparent than living fungus for Cu^{2+} . The exact opposite situation were observed for Cd^{2+} absorbed fungus filaments. Metal filled living fungus filaments were clearer than dead fungus filaments of living and dead biomass.

EDX determinate removal of cadmium were 97% and 95%; copper removal ratios were 90% and 88% for living and dead biomass respectively. EDX spectra have shown by Fig.6.

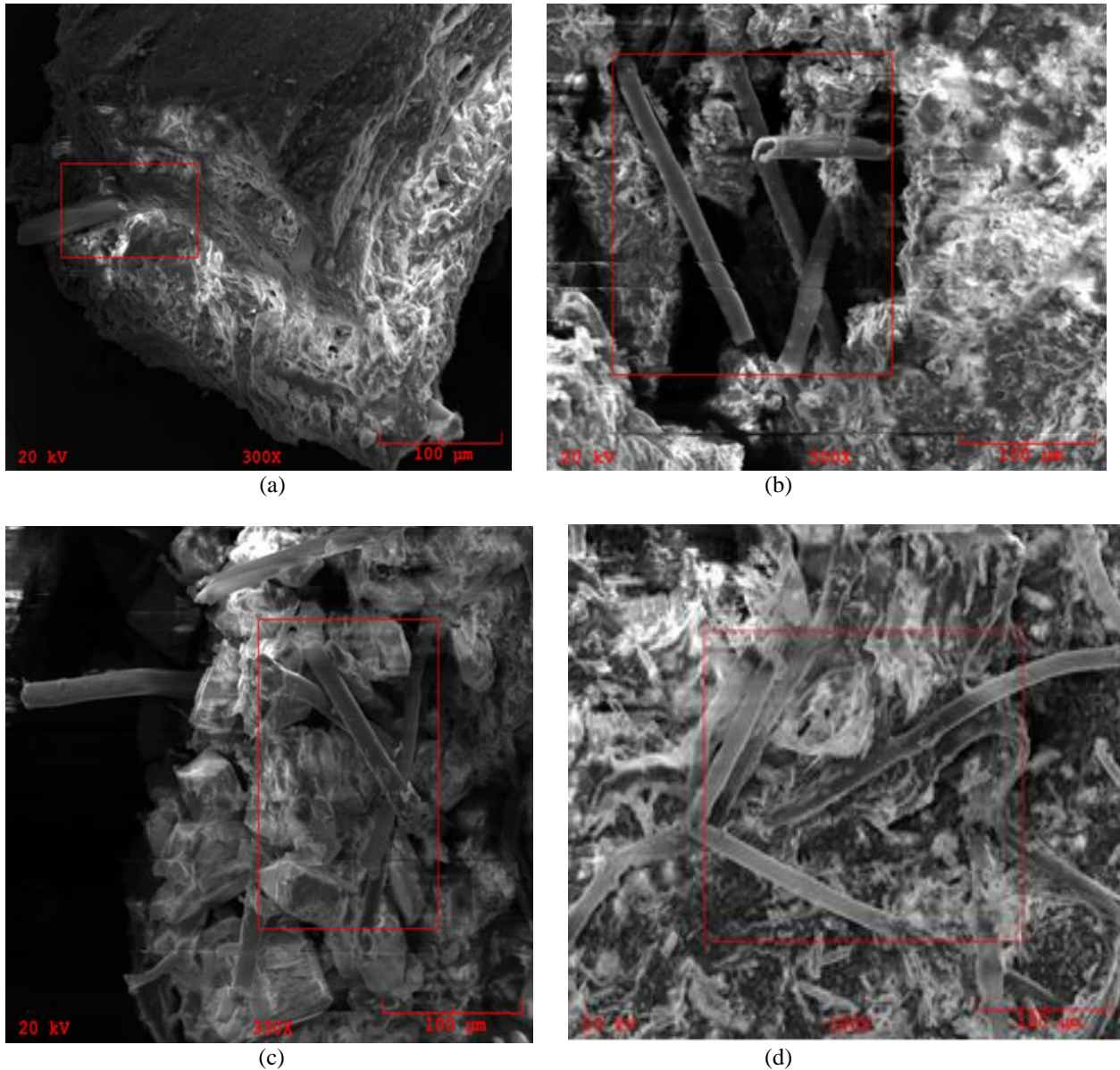


Figure 5. SEM micrographs of copper. (a) Bioaccumulation by living fungus. (b) Biosorption by dead fungus. SEM micrographs of cadmium. (c) Bioaccumulation by living fungus. (d) Biosorption by dead fungus.

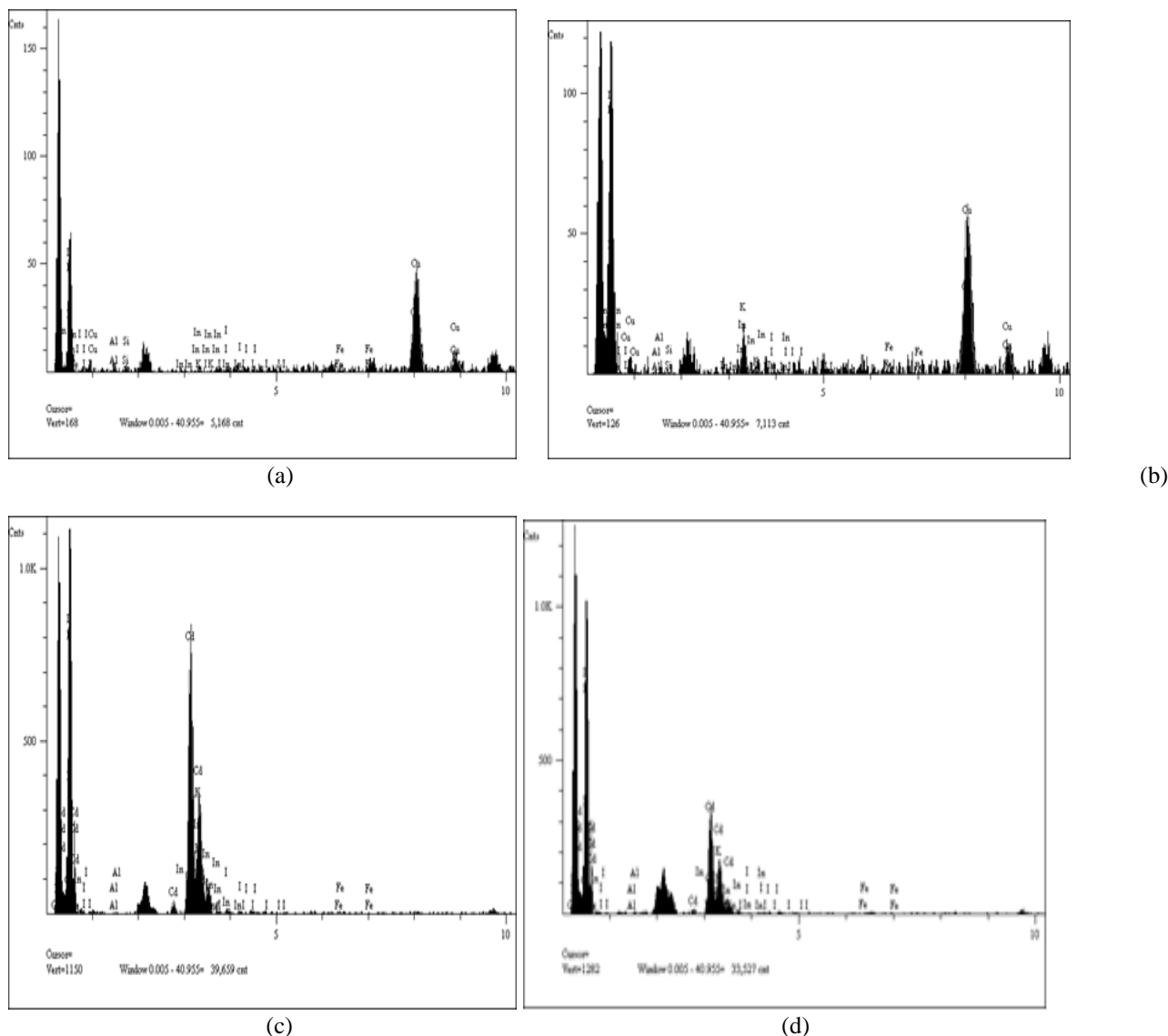


Figure 6. EDX spectra of copper. (a) Bioaccumulation by living fungus. (b) Biosorption by dead fungus. EDX spectra of cadmium (c) Bioaccumulation by living fungus. (d) Biosorption by dead fungus.

4. Conclusions and discussion

- Ceramic waste sludge revealed ten fungi strains in *Aspergillus* sp. (2 strains), *Mucor* sp., *Penicillium* sp. (5 strains), *Rhizopus* sp. and *Trichoderma* sp.). Regard to MIC values *Aspergillus* sp. strains were chosen for copper and cadmium bio removal experiments.
- The removal efficiencies for cadmium and copper with two *Aspergillus* strains were found to be 90-95% and 85-90%, respectively.
- The sorption capacities of live and dead fungi for copper were 5.3676 mg g⁻¹, 18.661 mg g⁻¹ and for cadmium were 0.1977 mg g⁻¹, 0.1772 mg g⁻¹ respectively. Negative values were obtained in Langmuir and Freundlich isotherm constants for copper and cadmium biosorption processes. According to that results, Langmuir and Freundlich isotherm models did not fit the experimental data of biosorption and bioaccumulation. The studies may continue by working higher initial concentration or using other isotherm models.
- FTIR analysis have shown that copper ions bound to vinyl compounds (950-900 cm⁻¹) and cadmium ions bound to primer amides (1420-1400 cm⁻¹) mainly.
- SEM micrographs were shown that the metal absorbed filaments of living fungus and dead fungus had different appearance for Cu²⁺ and Cd²⁺. EDX analyses have proven that *Aspergillus* spp. was a good biosorbent for cadmium and copper.
- As a result, the initial metal concentration was found to be significant and effective for biosorption capacity.

As a result, besides physical or chemical adsorption methods of heavy metals, it is possible to obtain high yields in removal by biosorption method. In experimental studies it was observed that initial concentration and fungus strain were effective in biosorption yield. If this work is to be continued; biosorption experiments can be performed with different heavy metals or different concentrations of the same metals. It is also possible to determine the optimum conditions for biosorption studies that can be performed by changing parameters such as pH, temperature, agitation speed, contact duration. Biosorption experiments with metal-resistant bacteria can also be performed.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Unit of The Scientific Research Projects of Anadolu University under grant no. 1203F055.

References

- [1] Ziemacki, G., Viviano, G. & Merli F. (1989). Heavy metals: Sources and environmental presence. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, 25(3), 531-535.
- [2] Chandra, R., Bharagava, R.N., Yadav, S. & Mohan, D. (2009). Accumulation and distribution of toxic metals in wheat (*Triticum aestivum L.*) and indian mustard (*Brassica campestris L.*) irrigated with distillery and tannery effluents. *Journal of Hazardous Materials*, 162 (2-3), 1514-1521.
- [3] Akpor, O. B. & Muchie, M. (2010). Remediation of heavy metals in drinking water and wastewater treatment systems: processes and applications. *International Journal of Physical Science*, 5(12), 1807-1817.
- [4] www.esdat.net national primary drinking water regulations (Accessed: September 2018)
- [5] Fomina, M. & Gadd, G. M. (2014). Biosorption: current perspectives on concept, definition and application. *Bioresource Technology*, 160, 3-14.
- [6] Bilal, M., Shah, J. A., Ashfaq, T., Gardazi, S. M. H., Tahir, A. A., Pervez, A., Haroon, H. & Mahmood, Q. (2013). Waste biomass adsorbents for copper removal from industrial wastewater-A review. *Journal of Hazardous Materials*, 263, 322-333.
- [7] Chojnacka, K. (2010). Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications, *Environment International*, 36, 299-307.
- [8] Turhan, S., Arıkan, I. H., Demirel, H. & Gungor, N. (2011) Radiometric analysis of raw materials and products in the turkish ceramics industry. *Radiation Physics and Chemistry*, 80 (5), 620-625.
- [9] Monfort, E., Mezquita, A., Vaquer, E., Celades, I., Sanfelix, V. & Escrig, A. (2014). Ceramic manufacturing processes: energy, environmental, and occupational health issues. *Comprehensive Materials Processing*, 8, 71-102.
- [10] Dincer, A. R. & Kargi, F. (2000). Seramik endüstrisi atıksularının özellikleri ve biyolojik arıtılabilirliği, *Çevre Bilim&Teknoloji* 1(1), 24-28.
- [11] Sepehr, M.N., Zarrabi, M. & Amrane, A. (2011). Removal of Cr(III) from model solutions by isolated *Aspergillus niger* and *Aspergillus oryzae* living microorganisms: Equilibrium and kinetic studies, *Journal of Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 43(3), 420-427.
- [12] <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3051a.pdf> (Accessed: March 2017).
- [13] Piotrowska-Seget, Z., Cycon, M. & Kozdroj, J. (2005). Metal-tolerant bacteria occurring in heavily polluted soil and mine spoil. *Applied Soil Ecology*, 28(3), 237-246.
- [14] Klich, M.A. (2002). Identification of common *Aspergillus* species. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht, Netherlands.
- [15] Dugan, F.M. (2006). The identification of fungi: an illustrated introduction with keys, glossary and guide to literature. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.
- [16] Watanabe, T. (2010). Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species. CRC Press/Taylor & Francis. Boca Raton.
- [17] Flannigan, B., Samson, R. A. & Miller, J. D. (2011). Microorganisms in home and indoor work environments: diversity, health impacts, investigation and control. Taylor&Francis. Boca Raton, Florida.
- [18] Zafar, S., Aqil, F. & Ahmad, I. (2007). Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil. *Bioresource Technology*, 98(13), 2557-2561.
- [19] Cerino-Cordova, F. J., Garcia-Leon, A. M., Soto-Regalado, E., Sanchez-Gonzalez, M. N., Lozano Ramirez, T., Garcia-Avalos, B. C. & Loreda-Medrano, J. A. (2012). Experimental design for the optimization of copper biosorption from aqueous solution by *Aspergillus terreus*. *Journal of Environmental Management*, 95, 77-82.
- [20] Subbaiah, M. V., Yuvaraja, G., Vijaya, Y. & Krishnaiah, A. (2011). Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies on biosorption of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution by fungus (*Trametes versicolor*) biomass. *Journal of the Taiwan Institute Chemical Engineers*, 42(6), 965-971.
- [21] Tay, T. & Keçili, R. (2016). Removal of Acid Blue 294 (AB294) dye from aqueous solutions by using lichen *Umbilicaria decussata* biomass, *Biological Diversity and Conservation*, 9/3, 189-197.

- [22] <https://www.epa.gov/rcra/resource-conservation-and-recovery-act-rcra-regulations#haz> (Accessed: September 2018).
- [23] <https://www.brighthubengineering.com/manufacturing-technology/56841-what-are-ceramic-materials-and-their-uses/> (Accessed: October 2018).
- [24] Ujile, A. A. & Joel, O. F. (2013). Adsorption process of iron(III) from borehole water on activated carbon from nigerian bamboo. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 5(6), 1321-1331.
- [25] Karthikeyan, G., Muthulakshmi, A. N. & Anbalagan, K. (2005). Adsorption studies of iron (III) on chitin, *Indian Academy of Sciences*, 117(6), 663-672.
- [26] Dange, S.S. & Dhoble, R.M. (2017). Iron Removal by Adsorption-A review, *International Journal of Science Technology & Engineering*, 3 (9), 603-606.
- [27] Hoyland, V. W., Knocke, W. R., Falkinham, J. O. 3rd., Pruden, A. & Singh, G. (2014). Effect of drinking water treatment process parameters on biological removal of manganese from surface water. *Water Research*, 66, 31-39.
- [28] Mishra, A. & Malik, A. (2012). Simultaneous bioaccumulation of multiple metal from electro plating effluent using *Aspergillus lentulus*. *Water Research*, 46, 4991-4998.
- [29] Gola, D., Dey, P., Bhattacharya, A., Mishra, A., Malik, A., Namburath, M. & Ahammad, S.Z. (2016). Multiple heavy metal removal using an entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana*. *Bioresource Technology*, 218, 388-396.
- [30] Wang, J. Y. & Cui, C. (2017). Characterization of the biosorption properties of dormant spores of *Aspergillus niger*: A potential breakthrough agent for removing Cu²⁺ from contaminated water. *RSC Advances*, 7, 14069–14077.
- [31] Chakraborty, S., Mukherjee, A., Khuda-Bukhsh, A.R. & Das, T.K. (2014). Cadmium induced oxidative stress tolerance in cadmium resistant *Aspergillus foetidus*: Its possible role in cadmium bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 106, 46-53.
- [32] Li, C., Jiang, W., Ma, N., Zhu, Y., Dong, X., Wang, D., Meng, X. & Xu, Y. (2014). Bioaccumulation of cadmium by growing *Zygosaccharomyces rouxii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 155, 116-121.
- [33] Ozdemir, S., Kilinc, E., Poli, A., Nicolaus, B. & Guven, K. (2009). Biosorption of Cd, Cu, Ni, Mn and Zn from aqueous solutions by thermophilic bacteria, *Geobacillus toebii sub. sp. decanicus* and *Geobacillus thermoleovorans sub. sp. stromboliensis*: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Chemical Engineering Journal*, 152(1), 195-206.
- [34] Chakravarty, R. & Banerjee, P.C. (2012). Mechanism of cadmium binding on the cell wall of an acidophilic bacterium. *Bioresource Technology*, 108, 176-183.
- [35] Abdel-Aty, A. M., Ammar, N. S., Abdel Ghafar, H. H. & Ali, R. K. (2013). Biosorption of cadmium and lead from aqueous solutions by fresh water alga *Anabaena sphaerica* biomass. *Journal of Advanced Research*, 4(4), 367-374.
- [36] Wang, J. Y., Cui, H., Cui, C. W. & Xing, D. F. (2016). Biosorption of copper(II) from aqueous solutions by *Aspergillus niger* treated rice straw. *Ecological Engineering*, 95, 793-799.
- [37] Amirnia, S., Ray, M. B. and Margaritis, A. (2015). Heavy metals removal from aqueous solutions using *saccharomyces cerevisiae* in a novel continuous bioreactor-biosorption system. *Chemical Engineering Journal*, 264, 863-872.
- [38] Zeng, X., Chai, L., Tang, J., Liu, X. & Yang, Z. (2013). Taxonomy characterization and cadmium biosorption of fungus strain. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 23, 2759-2765.
- [39] Ahmad, M. F., Haydar, S., Bhatti, A. A. & Bari, A. J. (2014). Application of artificial neural network for the prediction of biosorption capacity of immobilized *Bacillus subtilis* for the removal of cadmium ions from aqueous solution. *Biochemical Engineering Journal*, 84, 83-90.
- [40] Liu, Y., Liao, T., He, Z., Li, T., Wang, H., Hu, X., Guo, Y. & He, Y. (2013). Biosorption of copper (II) from aqueous solution by *Bacillus subtilis* Cells immobilized into chitosan beads. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 23(6), 1804-1814.
- [41] Puyen, Z. M., Villagrasa, E., Maldonado, J., Diestra, E., Esteve, I. & Sole, A. (2012). Biosorption of lead and copper by heavy-metal tolerant *Micrococcus luteus* DE2008. *Bioresource Technology*, 126, 233-237.
- [42] Say, R., Denizli, A. & Arica, M. Y. (2001). Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 76, 67-70.
- [43] Di Caprio, F., Altimari, P., Uccelletti, D. & Pagnanelli, F. (2014). Mechanistic modelling of copper biosorption by wild type and engineered *Saccharomyces cerevisiae* biomasses, *Chemical Engineering Journal*, 244, 561-568.
- [44] Shuhong, Y., Meiping, Z., Hong, Y., Han, W., Shan, X., Yan, L. & Jihui, W. (2014). Biosorption of Cu²⁺, Pb²⁺ and Cr⁶⁺ by a novel exopolysaccharide from *Arthrobacter ps-5*. *Carbohydrate Polymers*, 101(1), 50-56.
- [45] Wang, J. (2002). Biosorption of copper(II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*, *Process Biochemistry*, 37(8), 847-850.

(Received for publication 28 January 2019; The date of publication 15 December 2019)



Amylase Production of *Bacillus subtilis* Isolated from Soil by SmF Method

Veysi ORTAKAYA ¹, Sema AGÜLOĞLU FİNCAN ^{*2}
ORCID: 0000-0001-5850-3944; 0000-0003-0147-4411

¹ Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Diyarbakır, Turkey

² Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Diyarbakır, Turkey

Abstract

In our study, the isolation, identification and optimization of *Bacillus subtilis* from soil samples were performed and the ability to produce α -amylase of industrial importance was investigated. Bacteria identified as *B. subtilis* by 16S rRNA analysis, morphological and biochemical tests. Maximum growth was determined at 32 hour, 37°C and pH 7.0. Enzyme optimization was performed after determination of bacterial amylase in starchy medium. Optimum conditions for amylase production were determined as 37°C, pH 7.0 and 48 h. When the effect of metals on enzyme activity was examined, it was determined that Cu²⁺ increased enzyme activity, Zn²⁺, Hg²⁺ and Fe²⁺ were partially inhibited the enzyme activity, and Ca²⁺ was showed close activity to the control. It was observed that carbon sources had inhibitory effect on bacterial growth and enzyme production.

Key words: *Bacillus subtilis*, identification, α -, -amylase, production, characterization

----- * -----

SmF yöntemiyle topraktan izole edilen *Bacillus subtilis*'den amilaz üretimi

Özet

Çalışmamızda Ergani Makam Dağı'ndan alınan toprak örneğinden *Bacillus subtilis*'in izolasyonu, tanımlanması ve optimizasyonu gerçekleştirilerek endüstriyel öneme sahip α -amilaz üretme yeteneği araştırıldı. Morfolojik ve biyokimyasal testler ile 16S rRNA analizi yapılarak *B. subtilis* olarak tanımlanan bakterinin 32. saat, 37 oC ve pH 7.0' de maksimum üreme gösterdiği tespit edildi. Nişastalı besiyerinde bakterinin amilaz ürettiği tespit edildikten sonra enzim optimizasyonu yapıldı. Amilaz üretimi için optimum koşullar 37 oC, pH 7.0 ve 48. saat olarak belirlendi. Enzim aktivitesi üzerine metallerin etkisi incelendiğinde Cu²⁺' nın enzim aktivitesini artırdığı, Zn²⁺, Hg²⁺ ve Fe²⁺ enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği, Ca²⁺ ise kontrole yakın bir değer gösterdiği görüldü. Karbon kaynaklarının bakteri gelişimi ve enzim üretimi üzerine inhibisyon etkisi yapıldığı gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: *Bacillus subtilis*, tanımlama, α -, -amilaz, üretim, karakterizasyon

1. Giriş

Biyokimyasal reaksiyonları katalizleyen enzimlerin, hücrelerde çok önemli metabolik görevleri olup geniş endüstriyel uygulamalara sahiptirler. Aynı zamanda birçok biyoteknolojik süreç ve üründe anahtar olarak rol almaktadır [1]. Enzim teknolojisinin hızla gelişmesi, elde edilen ürünlerin uygulama alanlarının genişliği ve ayrıca ekonomik avantajı gibi nedenlerden dolayı bu yöndeki araştırmalar daha fazla önem taşımaktadır [2-4]. Özellikle düşük sıcaklıkta aktif olan enzimler; endüstriyel süreçleri sonunda doğallığını bozmazken aynı zamanda üretim maliyetlerini de düşürdüğü için birçok prosede tercih edilmektedir [5]. Termotabil enzimlere yoğun ilgi olsa da yakın gelecekte amilaz mühendisliğinin odak noktasında değişim olacaktır [6]. α -Nişasta ve glikojen moleküllerini hidrolize eden amilaz (EC 3.2.1.1), bilinen en eski endüstriyel enzim olup yiyecek, içecek, nişasta, deterjan, tekstil, tıpve analitik alanlarda geniş çapta kullanılmaktadır.

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905322678815; Fax.: +905322678815; E-mail: semaguloğlu@hotmail.com

Endüstriyel enzimlerin %90 civarı mikroorganizmalardan elde edilmektedir [7]. Bunun nedeni; mikrobiyal enzimlerin daha yüksek katalitik aktivite göstermesi, daha kararlı ve ekonomik olması, toksik olmaması ve yüksek miktarlarda üretilmeleridir [8]. Pek çok mikrobiyal enzimin doğada geniş bir yayılış alanına sahip olan *Bacillus* türleri ve alt türleri türler tarafından sentezlendiği bilinmektedir. [9,10]. 1970'lerden itibaren α -amilazların endüstriyel uygulamalarında, *B. subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *B.stearothermophilus* ve *B. licheniformis* türleri kullanılmaktadır [11].

Bu çalışmada topraktan izole edilerek *Bacillus subtilis* olarak tanımlanan mikroorganizmanın optimizasyonu ile a-amilazın üretimi ve karakterizasyonu gerçekleştirildi.

2. Materyal ve yöntem

Toprakтан izole edilen *B. subtilis* NBA kültür ortamında üretilip, gram boyama, nişasta hidroliz testi, üreaz testi, hareket testi, hemoliz testi gibi morfolojik ve biyokimyasal tanımlamaya yönelik testlere tabi tutuldu.

B. subtilis pH 7.0, 37 °C' de 48 saatlik inkübasyon sonrası kültür ortamı santrifüjlenerek Bernfeld metoduna göre enzim aktivitesine bakıldı [12]. Protein miktarı Lowry metoduyla tayin edildi [13]. Enzim substrat ile (%0.5' lik nişasta çözeltisi) 37 °C de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda reaksiyonu durdurucu olarak DNS (Dinitro salisilik asit) ilave edildi. DNS, sıcakta şekerlerin indirgen uçlarıyla reaksiyona girerek reaksiyonu durdurur ve renk oluşumunu sağlayarak spektrofotometrede ölçülmesini sağlar.

2.1 *B. subtilis* ve Amilaz Üretimine Sıcaklık, pH ve İnkübasyon Süresinin Etkisi

B. subtilis ekilerek 25 - 55 °C sıcaklıklarında üremeve amilaz üretimi için optimal değerleri belirlendi. Bakteri gelişimi ve enzim üretimi üzerine pH etkisini belirlemek amacıyla pH4.0 ile 11.0 arasındaki pH' larda bakteri üretildi enzim aktivitesi ölçüldü. Bakterinin gelişimi ve amilaz üretimine inkübasyon süresinin etkisini incelemek için 4-96 saatleri örnek alınarak ölçümleri yapıldı. Aktivite tayini için enzim kaynağı olarak üst sıvı kullanıldı.

2.2 *B. subtilis* ve Amilaz Üretimi Üzerine Karbon (C) ve Azot (N) Kaynakları Etkisi

Nişasta, glukoz, sükroz ve galaktoz, maltoz, laktoz ve fruktoz azot kaynağı olarak tercih edilirken, karbon kaynağı olarak ta pepton, tripton, üre, amonyum sülfat, amonyum klorür, amonyum nitrat ve sodyum nitrat kullanıldı.

2.3 Amilaz Aktivitesine Sıcaklık ve pH Etkisi

Amilaz aktivitesine sıcaklık ve pH etkisi deneyinde; 20 °C'den 60 °C'ye ve pH 4.0 ile 11.0'e kadar değişen değerlerde çalışıldı. Amilaz aktivitesi ölçülerek rölatif enzim aktivitesi hesaplandı.

2.4 Amilaz Aktivitesi Üzerine Deterjan ve Metal Etkisi

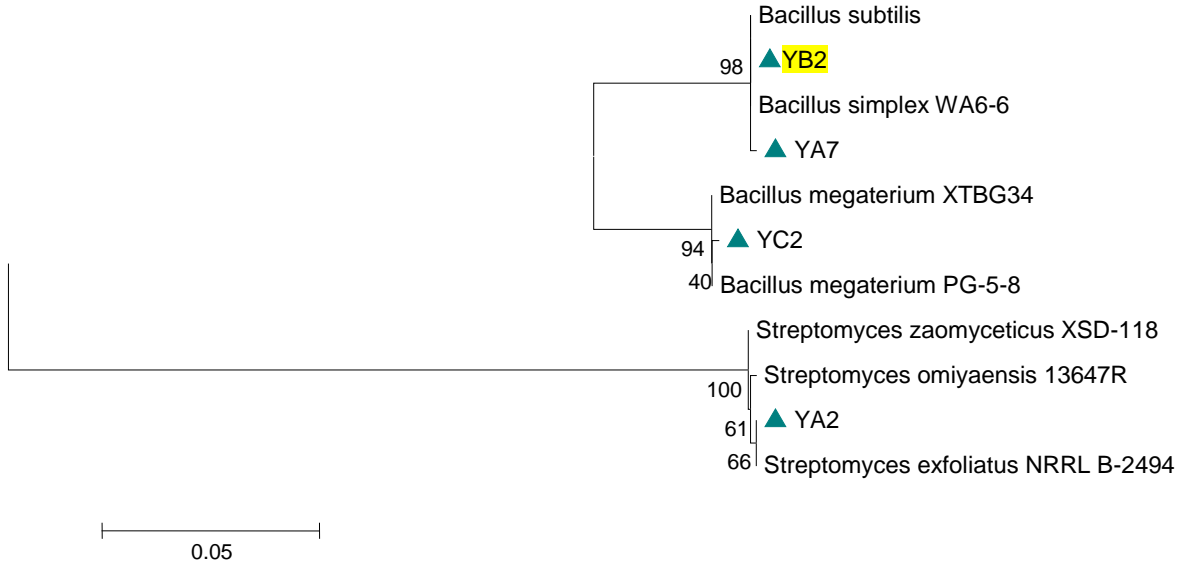
Amilaz aktivitesine CaCl₂, CuCl₂, ZnCl₂, MgCl₂, HgCl₂, MnCl₂ ve FeCl₂ etkisini saptamak için 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl tamponunda, final konsantrasyonu 1.5 mM olacak şekilde metal çözeltileri hazırlandı.

0.1 M pH 7.0Tris-HCl'de hazırlanan %0.5 oranında SDS, Tween-80, Triton X-100 ve Brij kullanılarak enzim aktivitesi üzerine deterjan etkisi deneyi gerçekleştirildi.

3. Bulgular

Tanımlamaya yönelik yapılan *B. subtilis*' e ait morfolojik ve biyokimyasal testler çizelge 1'de gösterilmiştir. Ergani Makam Dağı'ndan izole edilerek tanımlanan *B.subtilis*'in filogenetik ağacı Şekil 1'de verilmiştir.

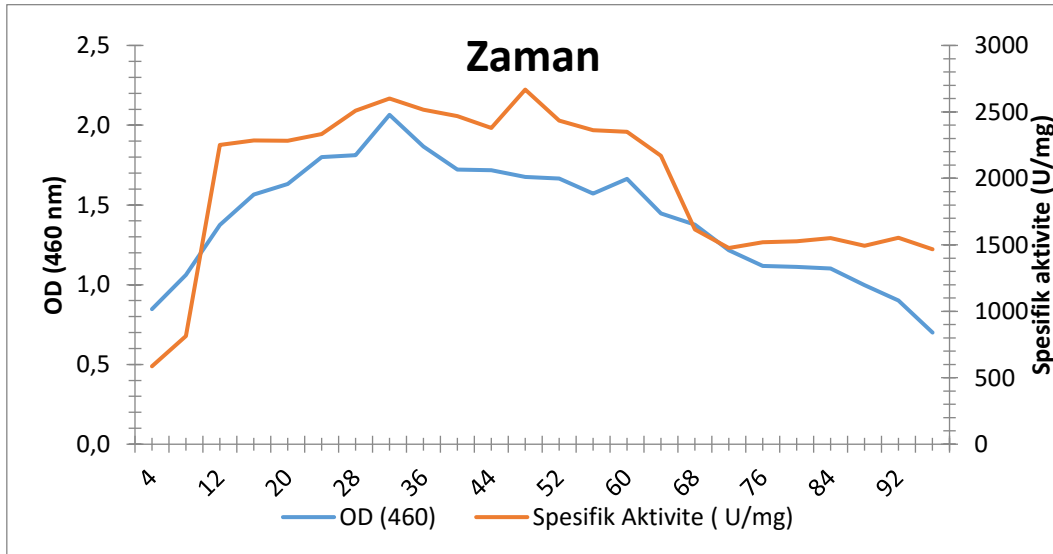
Tablo 1. <i>B. subtilis</i> 'in belirlenmesinde kullanılan morfolojik ve biyokimyasal test sonuçları		
Özellikleri	A8	Bacillus
Gram boyama	(-)	D
Koloni morfolojisi	Basil	Basil, Kok, virgül
Hareketlilik	Hareketsiz	Hareketli-Hareketsiz
Katalaz	(+)	(+)
Hemoliz	(+)	D
Üreaz	(+)	(+)
Nişasta+NBA	(+)	(+)
Şeker (Glukoz, laktoz Sukroz)	(-)	(-)
Sıcaklık aralığı	20-45	20-75
pH aralığı	10-4	4-10
(+) pozitif sonuç (-) negatif sonuç (D) değişken		



Şekil 1. *B. subtilis*'in filogenetik ağacı

3.1 İnkübasyon süresinin mikroorganizma gelişimi ve α -amilaz üretimi üzerine etkisi

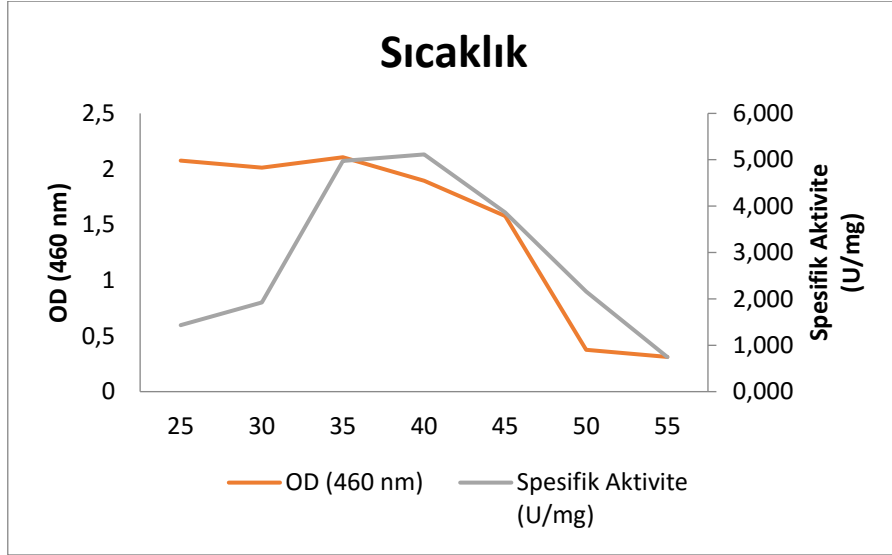
Farklı inkübasyon sürelerinin *B. subtilis*'in üremesi ve enzim üretimine olan etkisini incelemek amacıyla 4-96. saatleri arasında yapılan incelemede en iyibakteri üremesinin 32. saatte, enzim üretiminin ise 48. saat olduğu Şekil 2.'de gösterilmektedir.



Şekil 2. İnkübasyon Süresinin Mikroorganizma Gelişimi ve α -Amilaz Üretimi Üzerine Etkisi

3.2 Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi ve α -amilaz üretimi üzerine etkisi

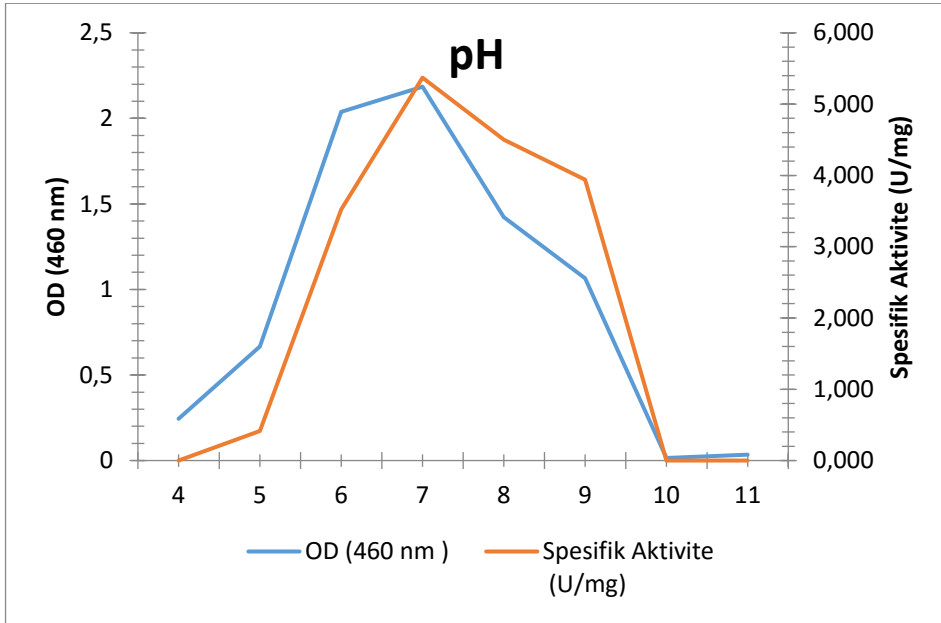
Sıcaklık etkisini araştırmak için; 25 °C 'den 55 °C 'ye kadar inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda gerek bakteri üremesi gerekse enzim üretimi için en iyi sıcaklık 37 °C olarak tespit edildi. (Şekil 3.)



Şekil 3. Sıcaklığın mikroorganizma gelişimi ve α -amilaz üretimi üzerine etkisi

3.3 pH'nın mikroorganizma gelişimi ve α -amilaz üretimi üzerine etkisi

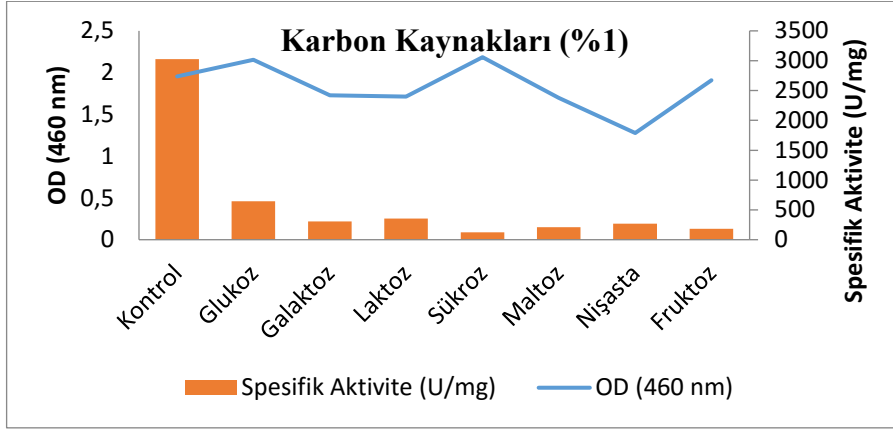
pH 4.0' den pH 11.0'e kadar değişik pH'larda inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda şekil 4'te görüldüğü gibi bakteri gelişimi ve enzim için optimum pH'sı 7.0 olarak belirlendi.



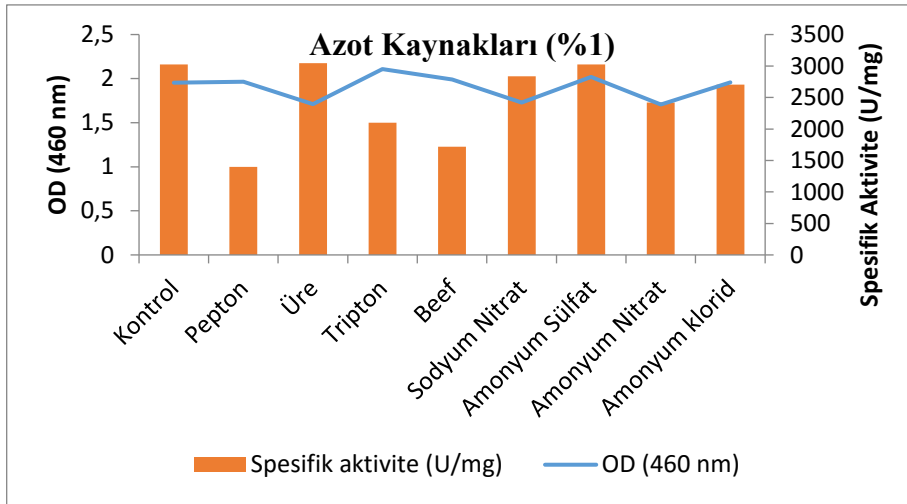
Şekil 4. pH'nın mikroorganizma gelişimi ve α -amilaz üretimi üzerine etkisi

3.4 B. subtilis ve α -amilaz üretimine üzerine c ve n kaynakları etkisi

NB besiyerine %1'lik karbon ve azot kaynakları (Şekil 5); %1'lik azot (Şekil 6) ayrı ayrı eklendi. Bu besiyerlerine ekim yapılarak 48 saat ve 37 °C'de inkübasyona bırakıldı ve enzim aktivite testi yapılarak protein miktarına bakıldı. Bu şekilde spesifik aktivite (U/mg) hesaplandı.



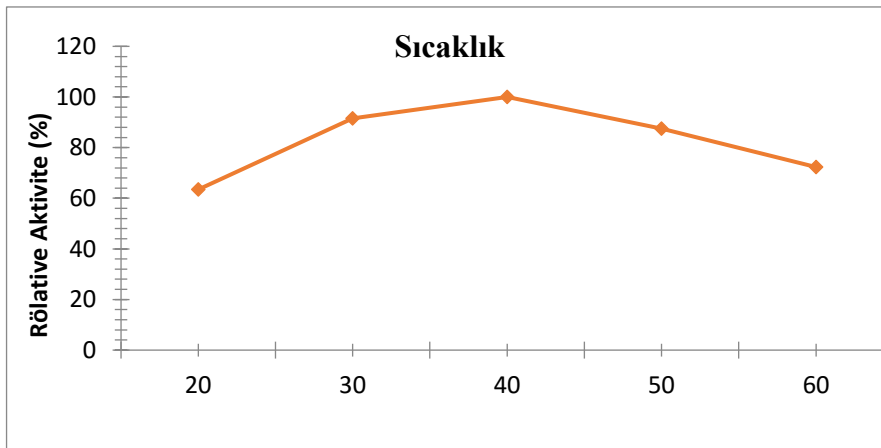
Şekil 5. *B. subtilis* ve α -Amilaz üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisi



Şekil 6. *B. subtilis* ve enzim üretimine azot kaynakları etkisi

3.5 α -Amilaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

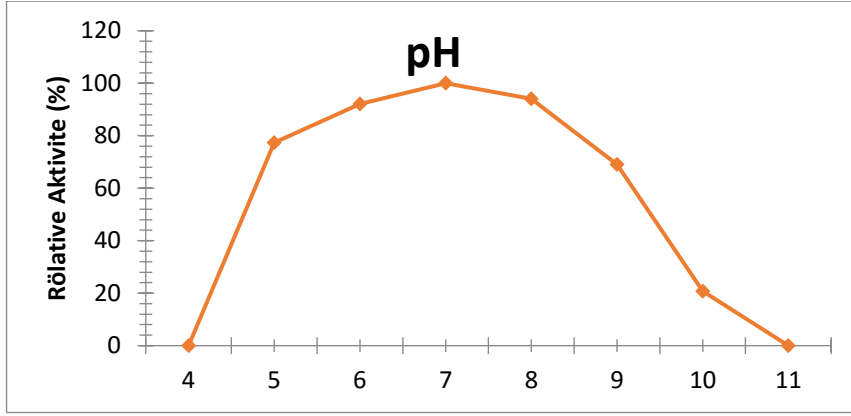
Optimum koşullarda üretilen mikroorganizmandan elde edilen üst sıvı kullanılarak 20-60 °C aralığında yapılan sıcaklık çalışmasında maksimum enzim aktivitesi için en iyi sıcaklık değeri 40 °C olarak bellirlendi (Şekil 7).



Şekil 7. α -Amilaz aktivitesine sıcaklık etkisi

3.6 Enzim aktivitesine pH etkisi

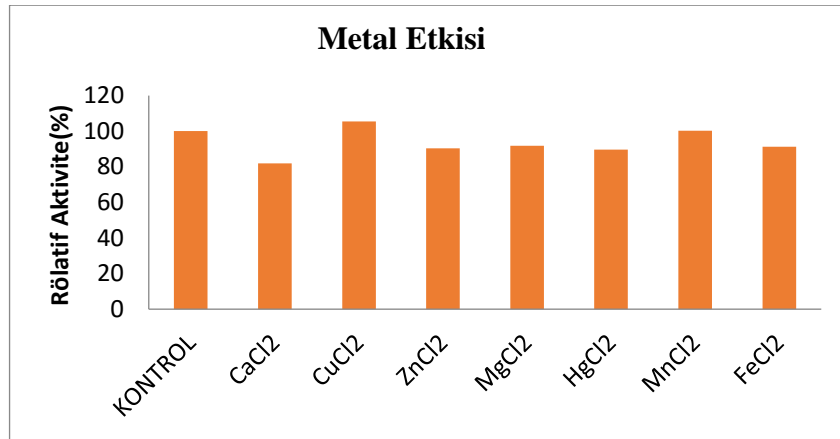
Optimum koşullarda üretilen mikroorganizmanın inkübasyon sonrasında; pH 4.0-11.0 aralığında yapılan pH deneylerinde amilaz aktivitesinin pH 7.0 de en yüksek değerde olduğu tespit edildi Şekil 8.



Şekil 8. α-Amilaz aktivitesine pH etkisi

3.7 Amilaz aktivitesine bazı metallerin etkisi

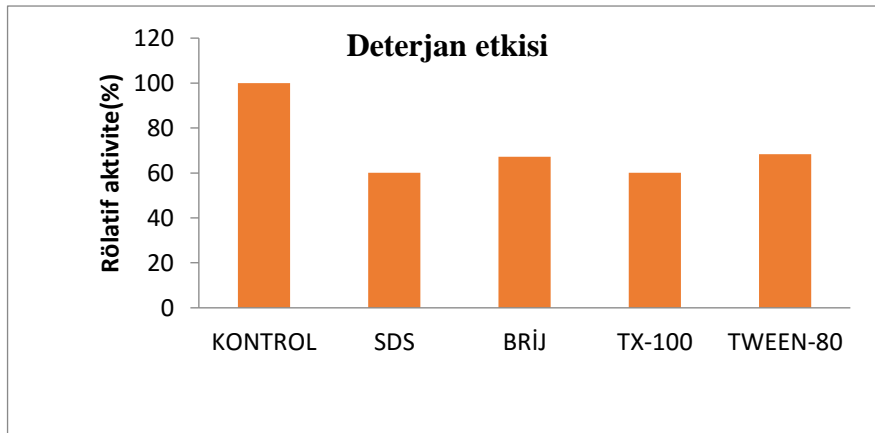
Amilaz aktivitesine metallerin etkisini saptamak için CaCl_2 , CuCl_2 , ZnCl_2 , MgCl_2 , HgCl_2 , MnCl_2 ve FeCl_2 0.1 M pH 7.0 Tris-HCl'de 1.5 mM konsantrasyonda olacak şekilde 30 dakika bekletildi ve enzim aktivitesini test edildi. Kontrolle kıyaslandığında enzimin tüm metallerle direnç gösterdiği tespit edildi Şekil 9.



Şekil 9. α-Amilaz aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisi

3.8 α-Amilaz aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisi

Optimum koşullarda üretilen *B. subtilis*'ten elde edilen enzim aktivitesi üzerine deterjan etkisi incelendiğinde deterjanların % 40 civarında azalmaya neden olduğu görüldü. Enzim aktivitesi üzerine deterjan etkisi Şekil 10.'da verilmiştir.



Şekil 10. α-Amilaz aktivitesi üzerine bazı deterjanların etkisi

4. Sonuçlar ve tartışma

α -Amilaz önemli ve en eski endüstriyel enzimlerden biridir. Doğada çoğu organizma amilaz üretir, fakat bunlardan çok azı doğal nişastayı parçalama yeteneğinde olan amilazları üretebildiğinden doğal nişasta hidrolizi için yeni enzim kaynaklarına ihtiyaç duyulmaktadır [14]. Çalışmamızda *B. subtilis*'den α -amilaz üretimi üzerine fiziksel parametrelerin etkisini araştırarak optimum koşulları belirleme yoluna gidildi. Toprakten izole edilen *B. subtilis*'in üremesi üzerine sıcaklığın, pH'nın ve inkübasyon süresinin etkisi çalışıldı. Bakterinin optimal değerleri 37 °C, pH 7.0 ve 32. saat olarak tespit edildi. Bakterilerin enzim üretim kapasiteleri buldukları ortama bağlıdır ve bu ortam şartlarının değiştirilmesi enzim üretimine etki etmektedir. Özellikle besiyerinin sıcaklığı, pH'ı, havalandırılması, inkübasyon miktarı, inkübasyon süresi gibi faktörler oldukça etkilidir [15]. Mikroorganizma, büyüme ortamındaki besin azalınca durağan evreye girerek sekonder metabolit üretir, enzim sentezinde azalış görülür [16]. Ayrıca besi ortamındaki diğer bileşikler ile etkileşir ve enzim denatürasyonundan dolayı aktivitesinde azalış görülür [17].

Al-Johani ve ark. [18] optimuminkübasyon süresini 48 saat, optimum pH 8.5 ve sıcaklığı 45°C belirtmişlerdir. Asgher ve ark. [19]. *B.subtilis JS-2004* için optimal üreme değerlerini 48 saat, 50°C ve pH 7.0 olarak ifade etmişlerdir. Ortamın fiziksel özellikleri enzimlerin aktiviteleri üzerinde büyük ölçüde etki etmektedir. Enzimler optimum sıcaklık ve pH sınırları içinde en iyi aktiviteyi gösterirler. Bu sınırlar arasında aktivitenin en iyi olduğu optimal değer belirlenir. Ayrıca mikroorganizmaların üremeleri için besiyeri pH'sının optimal sınırları içerisinde bulunması gerekmektedir. Mikroorganizmanın gelişme ortamının pH'sı morfolojik değişimlere yol açmakta ve buna paralel olarak enzim sentezini artırıcı etki yapmaktadır.

Çalışmamızda *B. subtilis*'den elde edilen amilaz için optimum sıcaklık değeri 40 °C, pH değeri ise 7.0 olarak bulunmuştur. 40 °C' nin altında ve üzerinde enzim aktivitesinde azalma olduğu gözlemlenmiştir. Diğer yandan pH değerlerine bakıldığında ise pH 7.0' nin altında ve üstünde enzim aktivitesinde azalmalar görülmüştür. Ekstraselüler α – amilaz için optimal pH değerleri 3.0 ile 10.0 arasındadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz ekstraselüler α -amilazın nötral koşullarda maksimum aktivite göstermesi endüstriyel işlemler için uygun olduğunu göstermektedir. Benzer bulgular başka araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir. Rezzukoğlu ve ark. [9] yaptığı çalışmada *Lactococcus sp.* PS-2A α -amilaz üretiminin; optimum 16. saatte, 35 °C ve pH 7.0' de gerçekleştirdiğini belirlemişlerdir. Ticari öneme sahip *Bacillus* suşlarının üremesive ekstraselüler α -amilaz için optimal pH 6.0- 9.0 olarak rapor edilmiştir. Femi-Ola ve ark. [20] izole ettikleri *Bacillus subtilis* BS5'ten ürettikleri α -amilazın optimal pH 6.0, sıcaklığını ise 50°C olarak belirlemişlerdir. Vidyalakshmi ve ark. [21] submerged fermantasyonla *Bacillus sp.*'den elde ettikleri ekstraselüler amilazı optimize etmişler, en iyi enzim aktivitesini 35 °C ve pH 7.0' de gösterdiğini belirtmişlerdir. Ray ve ark. [22] tuğla toprağından izole edilmiş *Bacillus brevis* MTCC 7521 suşu ile Ca^{+2} bağımsız α -amilaz üretimi çalışmaları yapmışlardır. Enzimin optimal sıcaklık 50°C, pH 6.0 ve inkübasyon süresi 36. saat olarak tespit edilmiştir. Sankaralingam ve ark. [23] yapmış oldukları bir çalışmada SmF yöntemiyle *Bacillus licheniformis*'ten α -amilaz üretimi üzerine inkübasyon süresi, sıcaklık ve pH'nın etkisini araştırmışlar. Çalışmada α -amilaz üretimi için optimum inkübasyon süresinin 48. saat, optimum sıcaklığın 30°C ve optimum pH'nın 7.0 olduğu saptanmıştır. Shafiei ve ark. [24] *Nesterenkonio sp.* F suşuna ait ekstraselüler amilazın biyokimyasal karakterizasyonunu yaparak enzimin optimum sıcaklık ve pH'sının 45°C ve pH 7.5 olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmada azot kaynaklarının enzim üzerine etkisini belirlemek için besiyerlerine % 1 oranında azot kaynaklarından eklenmiş olup daha sonra hazırlanan besiyerlerine bakteri ekimleri yapılarak inkübasyona bırakıldı. 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda yapılan aktivite tayini sonucunda kullanılan azot kaynaklarının amilaz üretimi üzerine etkisi araştırıldı. Araştırma sonucunda kontrol ile kıyaslandığında, azot kaynaklarında kontrole yakın amilaz aktivitesi elde edildi. Enzim üretimi üzerine karbon kaynaklarının etkisine bakıldığında, bütün karbon kaynaklarında kontrole göre daha düşük amilaz aktivitesi elde edildi. Ray ve ark. [22] *B.brevis* MTCC 7521 suşu ile amilaz üretimi çalışmasında azot kaynaklarından et özütünün, pepton, maya özütü ve kazein ile karşılaştırıldığında amilaz üretimini daha çok arttırdığını, asparajın, potasyum nitrat, amonyum sülfat, amonyum nitrat ve ürenin enzim üretimini azalttığını tespit etmişlerdir.

Enzim aktivitesi üzerine bazı metallerin etkisi incelendiğinde enzim aktivitesinin metallerden etkilenmediği metallere karşı oldukça dirençli olduğu gözlemlendi. Optimum koşullarda *B. subtilis*'ten üretilen amilaz aktivitesine deterjan etkisi araştırılığında ise deterjanların enzim aktivitesini kısmen inhibe ettiği tespit edildi. Shafiei ve ark. [24] Zn^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} ve Al^{+3} iyonları ile amilaz aktivitesinde inhibisyon meydana geldiğini, Ca^{+2} ile enzim aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir. %0.5 SDS, %0.2 Triton X-100, Tween 80, Tween 20'ye karşı stabilite gösterdiğini belirlemişlerdir. Ray ve ark. [22] amilaz aktivitesi üzerine Ca^{+2} veya surfaktanların (Tween 20, Tween 40, Tween 60, Tween 80, sodyum lauril sülfat % 0.02) enzim aktivitesine etki etmediğini belirtmişlerdir.

Endüstriyel alanlarda tercih edilen enzimlerin, ekonomik yönden kısa zamanda ve az maliyetle yüksek verimle üretilmesi, değişik uygulamalarda kullanılabilir özellikte olması gerekir. Yaptığımız çalışmada amilaz aktivitesine kısa sürede ve düşük sıcaklıkta ulaşıldığı görülmüş, bu fiziksel parametrelerin optimum değerlerinin kullanılmasıyla enzim aktivitesinde artış sağlanabileceği belirlenmiştir. □-Amilaz 40°C'de maksimum aktivite göstermesi özelliği ile düşük ısıda yıkama işlemini gerçekleştiren çamaşır ve bulaşık makinesi deterjanlarının içerisinde kullanılabilir. Bu konuda yapılacak kapsamlı çalışmalar sonucunda enzim verimi daha da artırılabilir ve endüstride yaygın kullanım alanı bulabilir.

Kaynaklar

- [1]. Saha, B.C., Jordan D.B., Bothast R.J. (2009). Enzymes, industrial (Overview), Encyclopedia of Microbiology. Academic Press, Oxford, 281-294.
- [2]. Ortakaya, V., Ağuloğlu Fincan, S., Enez, B. (2017). α -Amylase from *Bacillus simplex* production, characterization and partial purification, Fresenius Environmental Bulletin, 26, 4446-4455.
- [3]. Ağuloğlu, S., Enez, B. (2014). Purification and characterization of α -amylase from thermophilic *Geobacillus stearothermophilus*. Starch/Stärke 66, 182–189.
- [4]. Ağuloğlu Fincan, S., Enez, B. Ozdemir, S., Matman Bekler, F. (2014). Purification and characterization of thermostable α -amylase from thermophilic *Anoxybacillus flavithermus*. Carbohydrate Polymers, 102, 144-150.
- [5]. Ramya, L. N., Pulicherla, K. K.(2014). Molecular insight into cold active polygalacturonase enzyme for its potential application in food processing, Journal of food science and technology, 52 /9, 5484-5496.
- [6]. Nielsen, J. E., & Borchert, T. V. (2000). Protein engineering of bacterial α -amylases, Biochimica et Biophysica Acta, 1543, 253-274.
- [7]. Gupta, R., Gagra, P., Mohapatra, H., Goswami, V. K., Chauhan, B. (2003). Microbial α -amylase: biotechnological perspective. Enzyme and Microbial Technology, 38, 1599-1616.
- [8]. Wiseman, A. (1987) The Application of Enzymes in Industry, Handbook of Enzymes Biotechnology Second Edition. Chapter 3, 274-373.
- [9]. Rezzukoğlu, İ., Ağuloğlu Fincan, S., Enez, B., (2018) Production and characterization of α -amylase from lactic acid bacteria isolated with whey, Biological Diversity and Conservation, 11 /2, 115-122.
- [10]. Wolfgang, A. (2007). Enzyme in industry: Productions and applications. Third Completely Revised Edition. Wiley –VCH Pres., 489 pp.
- [11]. Sajedi, R.H., Naderi-Manesh, H., Khajeh, K., Ahmadvand, R., Ranjbar, B., Asoodeh, A., Moradian, F. (2005). A Ca-independent α -amylase that is active and stable at low pH from *Bacillus sp.* KR-8104. Enzyme and Microb. Technol., 36, 666-671.
- [12]. Bernfeld P. (1955). Enzymes carbohydrate metabolism, In Methods in Enzymology, Academic Press, 17, 149-158.
- [13]. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry, 193, 265- 275.
- [14]. Sasaki H., Kurosawa, K., Takao, S. (1986). Screening of microorganisms for raw starch saccharifying enzyme production. Agricultural Biology and Chemistry, 50, 1661-1664.
- [15]. Sarıkaya, E., Gürgün, V. (2000). Increase of the α -amylase yield by some *Bacillus* strains. *Turkey J. Biol.*, 24:299-308.
- [16]. Francis, F., Sabu, A., Nampoothiri, K. M., Szakacs, G., Pandey, A. (2002). Synthesis of α -amylase by *Aspergillus oryzae* in solid state fermentation. Journal of Basic Microbiology, 42, 320-326.
- [17]. Ramesh, M.V., Lonsane, B.K. (1987). Solid state fermentation for production of α - amylase by *Bacillus megaterium* 16M. Biotechnology Letters, 5, 323-328.
- [18]. Al-Johani N.B., Al-seeni M. N., Ahmed Y. M., (2017). Optimization of alkaline α -amylase production by thermophilic *Bacillus subtilis*, Afr J Tradit Complement Altern Med. 14/1, 288-301.
- [19]. Asgher, M., Javaid Asad, M., Rahman, S.U., Legge, R.L. (2007). A thermostable α - amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain for starch processing. Journal of Food Engineering, 79, 950–955.
- [20]. Femi-Ola, T.O., Olowe, B.M., (2011) Characterization of alpha-amylase from *Bacillus subtilis* BS5 isolated from *Amitermes evuncifer silvestri*. Research Journal of Microbiology, 6: 140-146.
- [21]. Vidyalakshmi, R., Paranthaman and J. Indhumathi, 2009. Amylase production on submerged fermentation by *Bacillus sp.* World Journal of Chemistry, 4: 89-91.
- [22]. Ray R. C., Kar S., Nayak S., Swain M. R. (2008). Extracellular α -amylase production by *Bacillus brevis* MTCC 7521, Food Biotechnology, Vol. 22, 234–246. No. 3.
- [23]. Sankaralingam, S., Kumar, C., Shankar, T., Ramasubburayan, R., Prakash, S. 2012. Optimization of culture conditions for the production of amylase from *Bacillus licheniformis* on submerged fermentation. American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci., 12(11): 1507-1513.
- [24]. Shafiei, M., Ziaee, A.A., Amoozegar, M.A. (2010). Purification and biochemical characterization of a novel SDS and surfactant stable, raw starch digesting and halophilic α - amylase from a moderately halophilic bacterium *Nesterenkonia sp strain F*. Process Biochemistry, 45, 694-699

(Received for publication 5 July 2019; The date of publication 15 December 2019)



Analysis of genomic stability and DNA damage in plants exposed to cement dust pollution using the RAPD analysis

Serap SUNAR^{*1}, Filiz AYGUN ERTURK², Guleray AGAR³
ORCID: 0000-0002-2011-1117; 0000-0002-9973-5669; 0000-0002-8445-5082

¹Erzincan Binali Yıldırım Univ., Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, Erzincan 24000, Turkey

²Bayburt University Faculty of Health Sciences Nutrition and Dietetics, Bayburt 69000, Turkey

³Ataturk University, Faculty of Science, Department of Biology, Erzurum 25240, Turkey

Abstract

One of the most important environmental pollutants is cement dust. In this study, RAPD technology was used to define the potential genotoxic impact of cement dust on plants. For this purpose, the DNA comparison of 12 plant species (*Convolvulus sepium*, *Astragalus christianus*, *Taraxacum androssovii*, *Medicago varia*, *Alyssum murale*, *Artemisia spisigera*, *Falcaria vulgaris*, *Anchusa strigose*, *Glaucium leiocarpum*, *Salvia syriaca*, *Cryciata taurica*, *Tragopogon albinervis*) collected from the areas of 10000 m (Control area) or 0-100 m away from Askale cement factory in Erzurum; was performed. 16 primers were used, and 390 bands were obtained. Important differences were observed in plant RAPD profiles collected from 0-100 m areas when compared to their respective controls (10000 m away from the factory). Some bands in control plants got lost, and new band formations were observed. The Genomic template stability (GTS) value decreased significantly in plants collected from 0-100 m area as compared to the controls (%56.20). Soil samples from 0-100 m and control area were collected and examined for their heavy metal contents. According to the analysis results, Nickel, Cadmium, Zinc, Lead and Copper concentrations were found to be dramatically high in the soil collected from 0-100 m as compared to the control area. These results indicate that the high heavy metal content in the soil causes the changes in RAPD profiles and GTS in plants. The data also indicated that RAPD and GTS assays are basic, effective and reproducible means of the genotoxicity control of environmental pollution.

Key words: Cement dust, Plants, Soil, Heavy Metals, Genotoxicity

----- * -----

Çimento tozu kirliliğine maruz kalan bitkilerde RAPD analizi ile genomik stabilite ve DNA hasarının analizi

Özet

En önemli çevre kirleticilerinden biri çimento tozudur. Bu çalışmada, çimento tozunun bitkiler üzerindeki potansiyel genotoksik etkisini tanımlamak için RAPD teknolojisi kullanılmıştır. Bu amaçla, Erzurum'da Askale çimento fabrikasına 10000 m (Kontrol alanı) ve 0-100 m uzaklıkta toplanan 12 bitki türünün (*Convolvulus sepium*, *Astragalus christianus*, *Taraxacum androssovii*, *Medicago varia*, *Alyssum murale*, *Artemisia spisigera*, *Falcaria vulgaris*, *Anchusa strigose*, *Glaucium leiocarpum*, *Salvia syriaca*, *Cryciata taurica*, *Tragopogon albinervis*) DNA karşılaştırması yapıldı. Çalışmada 16 RAPD primeri kullanılmış ve 390 bant elde edilmiştir. 0-100m alanlardan toplanan bitki RAPD profillerinde, kontrollerine göre (fabrikadan 10000 metre uzakta) önemli farklılıklar gözlenmiştir. Kontrol bitkilerinde bazı bantların kaybolduğu ve yeni bantların oluştuğu görülmüştür. Ayrıca, GTS (Genomic template stability) değeri, 0-100 m alandan toplanan bitkilerde, kontrollerinkilerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (%56.20). 0-100m ve kontrol alanından toprak örnekleri toplanmış ve ağır metal içerikleri bakımından incelenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, 0-100 m'den toplanan topraklarda Nikel, Kadmiyum, Çinko, Kurşun ve Bakır konsantrasyonlarının, çarpıcı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar topraktaki yüksek ağır metal içeriğinin bitkilerde RAPD profillerinde ve GTS'de değişikliklere neden olduğunu göstermektedir. Sonuçlar RAPD ve GTS testlerinin çevre

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +904462245344; Fax.: +904462245343; E-mail: ssunar@erzincan.edu.tr

kirliliğinin bitkiler üzerindeki genotoksik etkisini tanımlamak için temel, etkili ve tekrarlanabilir yöntemler olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: çimento tozu, bitki, toprak, ağırmetal, genotoksisite

1. Introduction

Environmental pollutants can have deleterious effects on living organisms. The cement dust contains some toxic substances like nickel, lead, cadmium, zinc, magnesium, copper, beryllium, fluoride and sulfuric acid and its dispersal in the environment leads to some deleterious effects [1; 2; 3; 4]. Wind, rain, etc. provide the dispersion of cement dust over a wide area, and it accumulates in soil, humans, animals and plants. Cement dust pollution has been reported to have negative effects on plant development and growth. It has been reported that the toxicity mechanisms of cement dust in the organism are associated with accumulation of high heavy metal concentrations in the soil [5; 6; 7]. When rats are exposed to inhalation of cement dust, symptoms, such as focal pulmonary emphysema and atrophy of elastic fibers, have been observed in the pulmonary tissue [8]. Another study has reported the widespread prevalence of bronchitis and higher respiratory symptoms, as well as bronchial asthma, in workers exposed to cement dust when compared to unexposed individuals [9]. An increase in the risk of stomach cancer has been observed in cement factory workers. The increased prevalence of lung cancer has been observed among masons working with cement [10]. Moreover, laryngeal cancer, colorectal cancer, and colorectal tumors have been observed in workers exposed to cement dust and engaged in Portland cement production [11; 12]. The prolonged exposure to it has been expressed as a risk factor in terms of right-sided colon cancer [13]. Additionally, the mutagenic potential and genotoxic effects of cement dust have been assessed by using the analysis of chromosomal aberrations [14]. However, the effect of cement dust on DNA damage and GTS has not been elucidated in plants, and genotoxic effects of pollutants are measurable. In the present article, our aim was to identify the genotoxic impacts of cement dust pollution in different plant species, growing around a cement factory using the RAPD molecular technique.

2. Materials and methods

2.1. Plant samples

The plants utilized in the present study were collected at flowering stage in July 2013 from areas near Askale cement factory, Erzurum, Turkey. 12 wild plant species were collected at a distance of 10000 meters from the external regions of the cement factory. The above-mentioned species were identified by comparing with the voucher specimens stored in Ata Herbarium at the Department of Biology, Faculty of Science, Atatürk University, Erzurum, Turkey. The specimens of the same plant species were then collected from a distance of 0-100 meters from the external region of the cement factory. Similar-aged leaves were collected and left in thermos containing ice for later use in the experiment. The leaf specimens were rapidly transported and stored in a deepfreeze (-80°C) until required for analysis. For the purpose of eliminating superficial contamination by cement dust, deionized water was used to wash all leaf specimens gathered from both sampling sites (10000 m and 0-100 m from the factory) before subjected to analysis.

Two soil samples were collected near Askale cement factory and from the control area (10000 m away from the factory) and transported to the laboratory. These samples were air dried in the laboratory. The grinding of the soil samples was done and these were sieved through a 2mm sieve. The analysis of the specimens for heavy metal contents was carried out by using “Inductive coupled plasma-optical emission spectroscopy (ICP-OES)”.

2.2. DNA extraction and RAPDs

Genomic DNA was isolated following the method described by Zeinalzadehtabrizi et al., [15] with small alterations. Standard 10-base primers provided by Operon for RAPD were utilized for screening the control (unexposed) groups. PCR reaction mix contents and PCR conditions are presented in Table 1. Screening of 40 oligonucleotide primers in total was performed, and 16 primers were chosen among them and utilized for further studies. PCR amplifications were carried out in a Bio-Rad thermocycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA). The reaction mixtures 30 microliter (µl) were fixed in the way described below: 100 ng of gDNA, 1× buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH=8.3), 2.5 mM of MgCl₂, 10 mM of dNTP, 5 U of Taq polymerase (Cinagen Co., Iran) and 5 of mM each primer.

The PCR products were separated with agarose (1.5% w/v) gel electrophoresis at 70 V for 150 min. The nanodrop spectrophotometer (Qiagen, Qiaxpert Instrument, Germany) was utilized for checking quality and quantity of the amplified DNA products.

The RAPD bands were assessed by means of Total Lab TL120 computer software program. Genomic template stability percentage (GTS, %) was computed as described below: $GTS = 100 - (100 \times a/n)$, where a represents the average number of polymorphic bands determined in every specimen treated, and n represents the number of total bands in the control. RAPD profile polymorphisms were manifested as, the disappearance of a normal band and the appearance of a new band in comparison with the control. The average value was counted up for every experimental group. For the purpose of computing the polymorphism value %, the $100 \times a/n$ formula was utilized.

Table 1. PCR reaction mix contents and conditions

PCR Reaction Mix Contents	
PCR buffer	1X
MgCl ₂	2.5 mM
Dntp	10 mM
gDNA	100 ng
Primer	5 mM
Taq DNA polymerase	5 U
Total volume of each sample	30 µL

PCR Conditions

2 min at 95°C; 2 cycles of 30 s at 95°C, 1 min annealing at 37°C, 2 min extension at 72°C; 2 cycles of 30 s at 95°C, 1 min at 35°C, 2 min at 72°C; 41 cycles of 30 s at 94°C, 1 min at 35°C, 2 min at 72°C; by a final 5-min extension at 72°C.

3. Results

Table 2 presents the RAPD profiles of plants collected from 0-100 m and 10000 m, generated from 16 primers. Differences were determined in the banding patterns upon examining the plant RAPD profiles, which were distinctly demonstrated by the appearance/disappearance of a number of bands when comparison of plants growing around the cement factory and from control sites was performed. All RAPD profiles showed the differences. All the bands formed varied in the range of 50 bp and 2000 bp. There were polymorphic bands in every plant for primers. The polymorphism value was determined as; $P (\%) = 0, 37.8, 33.3, 43.7, 33.9, 25.76, 40.8, 23.02, 24.39, 22.66, 31.07, 24.34$ and 21.31 for 12 wild plant species, respectively (Table 2). Polymorphism resulted from the loss and/or gain of amplified bands in the plants exposed to dust as compared to the controls under all conditions. Alterations in the RAPD patterns were recorded as decreases in GTS.

The results of the heavy metal analyses of soil samples collected from 0-100 m and 10000 m from the cement factory are presented in Table 3. The cadmium concentrations of the soil at 0-100 m and 10000 m from the factory were 0.024 ppm and 0.338 ppm respectively. The lead Copper nickel and zinc concentrations around the factory were approximately four times higher than the control soil. This situation can be attributed to the fact that the heavy metal contents of the soil around the cement factory increases due to dust emerging during cement production.

4. Conclusions and discussion

The cement industry is an important source of air pollution. Some authors have shown that the dust emerging during cement production causes negative impacts on the health of cement factory employees, plants and some animals [14; 16]. Earlier papers on the effect of cement dust indicate that it causes liver abnormalities, carcinogenesis, pulmonary disorders and affects chromosomal aberrations frequency in the cement factory workers [12; 13; 14]. In the present study, RAPD profile changes and a decrease in GTS were observed in the plants exposed to cement dust. Various polymorphic bands in RAPD band were acquired, and decrease in GTS demonstrated that cement dust is genotoxic (Table 2). A possible mechanism that can explain the effect observed in our study is the generation of reactive oxygen species (ROS). Some studies have demonstrated that exposure to cement dust causes the overproduction of ROS and suppresses the activity of enzymatic antioxidants in plant tissues, and leads to oxidative stress [3; 17; 18; 19; 20].

Deoxyribose, purine and pyrimidine bases in the DNA molecule may be attacked by ROS, which can lead to DNA strand break. As a result of this the possibility of chromosome/chromatid fragmentation may increase, and therefore RAPD band changes may take place. The heavy metal content analysis of the soil surrounding the cement factory has revealed that the concentrations of lead, cadmium, copper, nickel and zinc were generally observed low at a distance higher than 10000 m from the cement factory. Different scientists have obtained similar findings in relation to genotoxic impacts of the same heavy metals on various plants using RAPD [21; 22].

Although copper, nickel and zinc are very important for plant development and growth, high concentrations of these elements adversely affect organisms and may generate ROS in the cells. Nearly all cellular macromolecules, as well as DNA, may be damaged by free radicals [21; 23; 24]. Different genotoxic tests, including RAPD, comet, micronucleus, or chromosome aberration assays, have been employed in various studies to demonstrate the genotoxic impact of lead and cadmium on plants. Their genotoxic effects have been explained as affecting the DNA synthesis and their functioning as an enzymatic inhibitor of the enzyme system, which is necessary for the chain reaction of DNA synthesis and lesions caused by ROS [21; 22; 23; 25; 26].

In conclusion, it can be said that cement dust has a genotoxic effect and leads to DNA damage in different plant species, growing around cement factories without filters in the outlet chimneys, and this can be attributed to the presence of heavy metals in the soil surrounding the cement plant.

Table 2. Changes of GTS and polymorphism values of all used primers

Primers	Control	<i>Convolvulus sepium</i>	<i>Astragalus christianus</i>	<i>Taraxacum androssovii</i>	<i>Medicago varia</i>	<i>Alyssum murale</i>	<i>Artemisia spsigera</i>	<i>Falcaria vulgaris</i>	<i>Anchusa strigose</i>	<i>Glaucium leiocarpum</i>	<i>Salvia syriaca</i>	<i>Cryciata taurica</i>	<i>Tragopogon albinervis</i>
OPA-13 CAGCACCCAC	100	78.00	91.00	69.00	56.70	84.30	70.00	78.30	91.40	100.00	57.90	84.20	63.90
OPH-17 CACTCTCCTC	100	35.00	76.00	64.30	60.00	79.50	100.00	92.40	89.30	77.60	77.80	87.30	79.50
OPA-2 TGCCGAGCTG	100	43.00	62.80	47.90	70.00	50.70	82.00	100.00	67.50	79.40	43.90	76.10	59.30
OPA-1 CAGGCCCTTC	100	38.00	45.10	44.20	85.00	83.10	61.00	87.70	56.00	67.50	75.60	90.40	60.90
OPA-6 GGTCCCTGAC	100	75.90	31.00	79.00	100.00	55.60	72.70	91.30	100.00	91.70	71.80	75.30	84.70
OPH-14 ACCAGTTGG	100	83.00	42.40	87.00	71.00	93.20	47.00	67.90	60.10	49.80	89.40	64.10	91.90
OPH-18 GAATCGGCCA	100	42.00	100.00	40.00	67.00	60.50	59.00	71.70	64.30	87.30	85.70	56.30	87.80
OPY-6 AAGGCTCACC	100	86.00	39.50	35.90	78.00	78.00	36.00	93.40	71.90	65.80	64.30	82.90	73.50
OPY-1 GTGGCATCTC	100	59.00	74.00	61.00	65.90	94.00	48.00	65.00	74.80	54.60	80.00	64.80	69.60
OPY-8 AGGCAGAGCA	100	51.70	57.00	74.00	47.00	83.00	64.50	72.40	84.90	92.40	76.00	78.80	70.70
OPY-15 AGTCGCCCTT	100	60.00	81.00	39.80	80.00	91.00	54.00	87.30	79.90	75.50	67.00	69.30	55.00
OPY-16 GGGCCAATGT	100	44.00	94.20	48.90	63.80	72.00	57.00	88.00	86.50	56.80	67.80	60.80	74.90
OPW-1 CTCAGTGTCC	100	69.60	100.00	50.00	75.60	68.00	33.00	74.30	83.40	84.40	74.00	91.90	78.30
OPB-8 GTCCACACGG	100	72.00	44.40	54.00	64.00	89.00	55.70	43.20	66.60	79.00	60.00	77.60	86.40
OPW-7 CTGGACGTCA	100	81.00	71.00	72.00	42.90	52.00	67.00	74.00	73.40	82.70	90.20	70.90	60.70
OPW-5 GGCGGATAAG	100	76.10	89.00	42.00	36.50	54.00	39.00	44.80	59.80	93.00	89.30	80.00	66.00
GTS %	100	62.10	66.70	56.20	66.0	74.24	59.10	76.98	75.61	77.34	68.93	75.66	72.69
Polymorphism %	0	37.80	33.30	43.70	33.90	25.76	40.80	23.02	24.39	22.66	31.07	24.34	21.31

References

- [1] Isikli, B., Demir, T.A., Akar, T., Berber, A., Urer, S.M. et al. (2006). Cadmium exposure from the cement dust emissions: A field study in a rural residence. *Chemosphere*, 63, 1546-1552.
- [2] Ade-Ademilua, O.E., Umebese, C.E. (2007). The growth of *Phaseolus vulgaris* L. cv. Ife Brown (Leguminosae) in a cement site rich in heavy metals. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10,182-185.
- [3] Uysal,I.,Ozdilek,H.G.,Ozturk,M. 2012. Effect of kiln dust from a cement factory on growth of *Vicia faba* L. *J. Environ. Biol.*, 33, NO. 02 (Suppl.) pp: 525-530.
- [4] Ozturk, M., Ashraf, M., Aksoy,A.,Ahmad, M.S. A. (Eds.) 2015. *Plants, Pollutants & Remediation*. Springer Science+Business Media, NY, 407 pp. [5].Gupta, A.K., Mishra, R.M. (1994). Effect of lime kilns air pollution on some plant species. *Environmental Science and Pollution Research*,13, 1-9.
- [6] Iqbal, M.Z., Shafug, M. (2001). Periodical Effect of Cement Dust Pollution on the Growth of Some Plant Species. *Turkish Journal of Botany*, 25,19-24.
- [7] Sheikh, K.H., Ozturk, M., 1976. Secmen, O., Vardar, Y., Field studies of the effects of cement dust on the growth and yield of olive trees in Turkey. *Environmental Conservation*, 3, 117-121.
- [8] Cortez Pimental, J., Peixoto Menezes, A. (1978). Pulmonary and hepatic granulomatous disorders due to the inhalation of cement and micadust. *Thorax*, 33:219–227.
- [9] Malceva, L.M., Tatanov, L.A. (1974). Professional ‘nye zabolevanija organov dyhanija V uslovijah sovremennogo cementogo proizvodstva. *Gigiena Trudai professional ‘nye zabolevanija*, 3:14.
- [10] Rafnsson, V. and Johannesdottir, S.G. (1986). Mortality among masons in Iceland. *British Journal of Industrial Medicine*, 43, 522–525.
- [11] Albin, M, Jakobsson, K., Attewell, R., Johansson, L., Wellinder, H. (1990). Mortality and cancer morbidity in cohorts of asbestos cement workers and referents. *British Journal of Industrial Medicine* 47:602–610.
- [12] Jakobsson, K., Attewell, R., Hultgren, B., Sjoland, K. (1990). Gastrointestinal cancer among cement workers — a case referent study. *International Archives of Occupational and Environmental Health (Int Arch Occup Environ Health)*, 62, 337–340.
- [13] Jakobsson, K., Horstmann, V., Welinder, H. (1993). Mortality and cancer morbidity among cement workers. *The British Journal of Industrial Medicine*, 50,264–272.
- [14] Fatima, S.K., Aruna Prabhavathi, P., Padmavathi, P., Reddy, P.P. (2001). Analysis of chromosomal aberrations in men occupationally exposed to cement dust, *Mutation Research* 490,179–186
- [15] Zeinalzadehtabrizi, H., Hosseinpour, A., Aydin, M., Haliloglu, K. (2015). A modified genomic DNA extraction method from leaves of sunflower for PCR based analyzes, *Journal of Biodiversity and Environmental Sciences*, 7, 222-225.
- [16] Mutlu, S., Atıcı, O., Kaya, Y. (2009). Effect of cement dust on diversity and antioxidant enzyme activities of plants growing around a cement factory. *Fresenius Environmental Bulletin*,18(10),1823-1827.
- [17] Sharma, Y.K., Davis, K.R. (1997). The effects of ozone on antioxidant responses in plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 23:480-488.
- [18] Alscher, R.G., Erturk, N., Heath, L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *Journal Of Experimental Botany*, 53,1331-1341.
- [19] Verma, S., Dubey, R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants, *Plant Science*, 164,645-655.
- [20] Ahmad P., Ozturk, M., Gucel, S. (2012). Oxidative damage and antioxidants induced by heavy metal stress in two cultivars of mustard (*Brassica juncea* L.) plants. *Fresenius Environmental Bulletin*, 21 (10), 2953-2961.
- [21] Erturk, F., Agar, G., Arslan, E., Nardemir, G., Sahin, Z. (2014). Determination of genomic instability and DNA methylation effects of Cr on Maize (*Zea mays* L.) using RAPD and CRED-RA analysis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36(6),1529-1537.
- [22] Taspinar, M.S., Agar, G., Yildirim, N., Sunar, S., Aksakal, O., Bozari, S. (2009). Evaluation of selenium effect on cadmium genotoxicity in *Vicia faba* using RAPD. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 7(4), 857-860.
- [23] Samardakiewicz, S., Wozny, A. (2005). Cell division in *Lemna* minor roots treated with lead. *Aquatic Botany*, 83,289-295.
- [24] Ghori, N.H., Ghori, T., Hayat, M.Q., Imadi, S.R., Gul,A., Altay,V., Ozturk,M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16, 1807–1828.
- [25] Gichner, T., Znidar, I., Szakova, J. (2008). Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research*, 652, 186-190.
- [26] Yücel, E., Hatipoğlu, A., Güner, Ş.T. (2008). The Effects of the Lead (PbCl₂) on Mitotic Cell Division of Anatolian Black Pine (*Pinus nigra ssp. pallasiana*). *Biological Diversity and Conservation* 1(2), 124-129.

(Received for publication 11 June 2019; The date of publication 15 December 2019)



Pollen micromorphology of *Petrorhagia* (Ser.) Link taxa

İlham ERÖZ POYRAZ¹, Ebru ATAŞLAR^{*2}
ORCID: 0000000331708354; 0000000157554256

¹ Anadolu University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany, Eskişehir, Turkey

² Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Science and Literature, Department of Biology, Eskişehir, Turkey

Abstract

In this study, the pollen structure of species belonging to the genus *Petrorhagia* (Ser.) Link (Caryophyllaceae) in Turkey with micromorphological method which is scanning electron microscopy (SEM) were examined. The genus is represented by 12 species, 4 of which are endemic. Species examined in this study and their endemism status: *Petrorhagia lycica* (P.H.Davis) P.W.Ball. & Heywood (endemic), *P. cretica* (L.) P.W.Ball & Heywood, *P. alpina* (Hablitz) P.W.Ball. & Heywood subsp. *alpina*, *P. alpina* (Hablitz) P.W.Ball. & Heywood subsp. *olympica* (Boiss.) P.W.Ball. & Heywood, *P. saxifraga* (L.) Link, *P. pamphylica* (Boiss. & Balansa) P.W.Ball. & Heywood (endemic), *P. peroninii* (Boiss.) P.W.Ball. & Heywood (endemic), *P. prolifera* (L.) P.W.Ball. & Heywood, *P. dubia* (Raf.) G.López & Romo. *Petrorhagia* species, which generally spread in habitats such as stony areas, fields and road sides, were collected in the project between 2003-2007. As a result of the study, it was found that the pollen shape of the genus was spheroid and the pollen species were porous in all species. However, among the species; pollen sizes, number of pores, pollen and operculum ornamentations show differences.

Key words: Caryophyllaceae, *Petrorhagia* (Ser.) Link, pollen, micromorphology, SEM

----- * -----

Petrorhagia (Ser.) Link taksonlarının polen mikromorfolojisi

Özet

Bu çalışmada Türkiye’de yayılış gösteren *Petrorhagia* (Ser.) Link (Caryophyllaceae) cinsine ait türlerin polen yapıları mikromorfolojik yöntemle, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. Cins Ülkemizde 4 türü endemik olmak üzere 12 türle temsil edilmektedir. Bu çalışmada incelenen türler ve endemizm durumları: *Petrorhagia lycica* (P.H.Davis) P.W.Ball. & Heywood (endemik), *P. cretica* (L.) P.W.Ball & Heywood, *P. alpina* (Hablitz) P.W.Ball. & Heywood subsp. *alpina*, *P. alpina* (Hablitz) P.W.Ball. & Heywood subsp. *olympica* (Boiss.) P.W.Ball. & Heywood, *P. saxifraga* (L.) Link, *P. pamphylica* (Boiss. & Balansa) P.W.Ball. & Heywood (endemik), *P. peroninii* (Boiss.) P.W.Ball. & Heywood (endemik), *P. prolifera* (L.) P.W.Ball. & Heywood, *P. dubia* (Raf.) G.López & Romo. Genellikle taşlık alanlar, tarla ve yol kenarları gibi habitatlarda yayılış gösteren cinsin türleri 2003-2007 yılları arasında proje kapsamında toplanılmıştır. Çalışma sonucunda *Petrorhagia* cinsi polen şeklinin sferoid olduğu ve türlerin tamamında polenlerin porlu (poliporat) yapıda oldukları bulunmuştur. Ancak türler arasında; polen büyüklükleri, por sayıları, polen ve operkulum ornemantasyonları farklılıklar göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Caryophyllaceae, *Petrorhagia* (Ser.) Link, polen, mikromorfoloji, SEM

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902222393750; Fax.: +902222393578; E-mail: eataslar@ogu.edu.tr

1. Giriş

Caryophyllaceae familyasında yer alan *Petrorhagia* (Ser.) Link cinsi ile ilgili ilk çalışmalar 1890'lara kadar gitmektedir. Ancak o dönemlerde cinse ait türler *Tunica* auct. cinsi içerisinde tanımlanmış olup 'Synopsis of the genus *Tunica*' başlıklı makalede cinsin o güne kadar ki durumuna açıklık getirilmeye çalışılmış ve 27 *Tunica* türü verilmiştir [1].

Petrorhagia cinsi ilk olarak Link tarafından 1831 yılında 4 türü olan bir cins olarak oluşturulmuştur. Burada Link'in temel aldığı örnekler aslında Seringe tarafından 1824 yılında, *Gypsophila* cinsinin *Petrorhagia* seksiyonu olarak verilmiş olan türlerdir [2].

Petrorhagia'nın asıl olarak Ball ve Heywood [2] tarafından yapılan revizyonu, hem cinsin durumunu netleştirici, hem de o dönemlerde yazılmakta olan Avrupa Florası [3]'na hazırlayıcı bir bağlantı görevi üstlenmektedir. Araştırmacılar bu çalışmada *Tunica* L., *Dianthus* L., *Gypsophila* L. cinsleri başta olmak üzere farklı cinslere ait 50'nin üzerinde takson inceleyerek, *Petrorhagia* cinsinin 25 tür, 4 alt tür ve 4 varyeteyi içeren revizyonunu yayınlamışlardır. Bu çalışma, cinse ait o güne kadar yapılan en kapsamlı çalışma olup, birçok sorunun çözümünü sağlamıştır.

Petrorhagia dünya üzerinde 34 takson ile tanımlanmaktadır. Temel olarak doğu Akdeniz bölgesinde ve güneydoğu Avrupa'da yetişen cinsin yayılışı, Madeira'nın batısına ve Kanarya Adaları'na (biret tür) ve doğuda Pakistan ve Kaşmir'e ulaşmakta (biret tür), kuzey Afrika'da ise birkaç türü bulunmaktadır. *P. saxifraga*, *P. prolifera* ve *P. nanteuilii* dışında doğu, batı, orta ve kuzey Avrupa'da yayılış göstermemektedir. Tür sayısının en fazla olduğu ülkeler Türkiye (12 tür) ve Yunanistan (18 tür)'dir. 4 tür Türkiye, 8 tür Yunanistan ve Ege Adaları, 3 tür kuzey Afrika, 2 tür Girit, 1 tür İran için endemiktir. Dünyada kozmopolit olarak yayılış gösteren 4 yaygın türü mevcuttur. Bu türler: *P. saxifraga* (merkez ve güney Avrupa'dan güneybatı Asya'ya kadar); *P. prolifera* (merkez Avrupa ve güney Avrupa dağları, Kafkaslar, kuzey Anadolu ve kuzey Afrika'nın batısı); *P. alpina* (merkez ve batı Asya dağlarından Bulgaristan'ın güneyine kadar); *P. dubia* (Akdeniz havzası) [3-5].

Cins Ülkemizde 12 tür ile temsil edilmekte olup 4 tür endemiktir, endemizm oranı % 33'dür [6-9].

Petrorhagia, morfolojik olarak karakterize edilmesi zor bir cinstir. Çünkü bazı karakterlerinde değişkenlikler vardır ve bu değişken karakterler hem *Dianthus* hem de *Gypsophila* cinsleri için baskın taksonomik kriterlerdir [2]. Bu nedenle polen ve tohum gibi ayırt edici karakterlerin ayrıntılı olarak çalışılması cinsin baskın özelliklerinin belirlenmesinde önemli olacaktır.

Caryophyllaceae familyasının polen morfolojisi Bittrich [10]'de genel olarak verilmiştir. Chanda [11] tarafından İskandinavya'da yetişen Caryophyllaceae familyasının 9 cinsine ait 36 türün polen morfolojileri çalışılmış ve bu çalışmada polenlerin ayrıntılı betimleri ve polen anahtarı verilmiştir. Ayrıca Yıldız [12], Caryophyllaceae familyasından 15 cinse ait 45 türün polen yapısını mikromorfolojik özellikleri ile tanımlamıştır. Bu çalışmada *Petrorhagia alpina* subsp. *alpina* türü de yer almaktadır.

Petrorhagia cinsi ile ilgili yapılmış olan polen çalışmalarına bakıldığında; Candau [13], güney İspanya'dan Caryophyllaceae familyasının Silenoideae alt familyasından 7 cinse ait 19 türün polen yapılarını çalışmıştır. Bu çalışmada *P. prolifera*, *P. nanteuilii* ve *P. velutina* türleri de yer almaktadır. Ayrıca Aktaş ve ark. [14] cinse ait 10 taksonun polen morfolojisini karşılaştırmalı olarak çalışmışlardır. Bu çalışmada *P. dubia*'nın en büyük çaplı, *P. alpina* subsp. *alpina*'nın en küçük çaplı polenler olduğunu ve cinsin 12 ile 22 arasında değişen por sayıları bakımından *P. saxifraga* ve *P. dubia*'nın 12-14 porlu, *P. alpina* subsp. *alpina*, *P. alpina* subsp. *olympica* ve *P. hispidula*'nın ise 20-22 porlu olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmada mikromorfolojik görüntüler ve *Petrorhagia* polenlerinin kantitatif karakterlerine dayalı küme analizi sonuçlarını gösteren dendrogram da yer almaktadır.

Familyanın diğer cinslerine ait polen mikromorfolojisi çalışmaları incelendiğinde: *Bolanthus* (Ser.) Rchb. [15]; *Dianthus* L. [16-18]; *Gypsophila* L. [19]; *Minuartia* Loebl. [20]; *Paronychia* Mill. [21]; *Saponaria* L. [22-24]; *Scleranthus* L. [25]; *Silene* L. [26-31]; *Velezia* L. [32] ait farklı çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışma, *Petrorhagia* cinsine ait türlerin polen yapılarının mikromorfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla yapılmıştır.

2. Materyal ve yöntem

2003-2007 yılları arasında doğal yayılış ortamlarından toplanarak standart herbaryum tekniklerine göre [33] herbaryum örneği haline getirilmiş *Petrorhagia* türleri, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi herbaryumunda OUFÉ kayıt numaraları ile saklanılmaktadır (Tablo 1). Çalışmada kullanılan polenler bu herbaryum örneklerinin çiçeklerinden temin edilmiştir (Tablo 1'de ** ile işaretli).

Polen yapısının belirlenmesinde Elektron Mikroskobu (SEM) kullanılmıştır [34]. Her türün poleni, çift taraflı yapışkan bant kullanılarak inceleme stubları üzerine monte edilmiştir. Daha sonra her örnek 60 saniye boyunca Polaron SC7620'da 100-Å kalınlığında altın tabakası ile kaplanmıştır. Son olarak Jeol 5600 LV Scanning Electron Microscope'da incelenerek fotoğraflanmıştır.

Tablo 1. *Petrorhagia* türlerinin toplandığı lokaliteler

Türler	Toplandığı Lokaliteler
<i>P. lycica</i>	C2 Muğla: Fethiye, Babadağ, eşek bayıltan mevkisinin güneyi, 1525-1540 m, 21.07.2006, N 36° 31' 67.4'' E 29° 11' 76.6'', İEP 104, OUFE 13479**
<i>P. cretica</i>	B2 Balıkesir: Harmancık-Dursunbey arası, çeşme kenarı, 310 m, güney yamaç, 30.06.2006, N 39° 37' 55.7'' E 28° 46' 41.6'', İEP 96, OUFE 13482. Kütahya: Tunçbilek, Ömerler kömür ocağı girişi, 932 m, 25.06.2005, N 39° 40' 48.5'' E 29° 27' 16.4'', İEP 80, OUFE 13481**. C3 Isparta: Şarkıkaraağaç, Kızıldağ Milli Parkı, ca. 1200 m, 14.6.2004, İEP 24, OUFE 13480
<i>P. alpina</i> subsp. <i>alpina</i>	C4 Niğde-Aksaray: Hasan dağı, Taşpınar yaylası, 1730 m, 15.06.2006, İEP 95, OUFE 13483**
<i>P. alpina</i> subsp. <i>olympica</i>	A2 Bursa: Uludağ, Sarıalan, 1634 m, 06.07.2006, İEP 102, OUFE 13486. Dumlupınar, Oysu köyü çıkışı, <i>Juniperus-Pinus</i> ormanı, taşlık kuzey yamaç, 1090 m, 29.05.2006, N 38° 58' 20.2'' E 29° 51' 17.8'', İEP 91, OUFE 13485. C4 Konya: Kuruçay-Sarıot yaylası, 1730 m, 16.7.2004, kuzey doğu yamaçlar, <i>Cedrus-Abies</i> karışık orman altı, Karamikoğlu Oluğu kümesine 100 m kala, N 37° 13.402', E 32° 00.333', İEP 37, OUFE 13484**
<i>P. saxifraga</i>	A5 Samsun: Ladik, Hamamayağı-Ladik, kuzey doğu taşlık yamaç, 795 m, 28.06.2005, N 40° 58' 9.2'' E 35° 47' 14.8'', İEP 83a, OUFE 13493**; Ladik, Hamamayağı'na ca. 9 km kala, taşlık kuzey yamaç, 930 m, 28.06.2005, N 40° 55' 57.5'' E 35° 50' 24.3'', İEP 84, OUFE 13488
<i>P. pamphylica</i>	C2 Antalya: Korkuteli-Antalya, 33. km, 415 m, yolun güney doğusu, Düzlerçamı köprüsünden sonra, yol kenarı, İEP 105, OUFE 13489**. C3 Antalya: Gebiz, kuzey batı yönünde 20 m, yer yer <i>Quercus</i> ve <i>Pinus</i> altı, 23.07.2006, N 37° 07' 22.2'' E 30° 54' 74.9'', İEP 106, OUFE 13490
<i>P. peroninii</i>	C4 Antalya: Antalya: Alanya, Mahmutlar-Gözükküçüklü, biçilmiş tarla içi, güney-güney batı yamaç, 109 m, 06.09.2006, N 36° 29' 38.1'' E 32° 07' 24.9'', İEP 110, OUFE 13491**
<i>P. prolifera</i>	A3 Zonguldak: Devrek-Eğerci yolu, Özbağı'na 300 m kala, 190 m, 30.7.2004, çay kenarının üst kısmı, yol kenarı, İEP 43, OUFE 13492. A5 Samsun: Ladik, Hamamayağı-Ladik, kuzey doğu taşlık yamaç, 795 m, 28.06.2005, N 40° 58' 9.2'' E 35° 47' 14.8'', İEP 83b, OUFE 13487**
<i>P. dubia</i>	A1(A) Çanakkale: Çanakkale-Lapseki arası, 3-5. km, ekilmemiş tarla içi, 148 m, 20.05.2005, N 40° 09' 27.3'' E 26° 27' 36.3'', İEP 69, OUFE 13495**; Çanakkale-Lapseki yolu, kuzey yamaç, 120 m, 02.07.2006, N 40° 09' 55.4'' E 26° 28' 14.7'', İEP 100, OUFE 13497. 24.3'', İEP 84, OUFE 13488. B1 Çanakkale: Ayvacık'tan 3-4 km sonra, güney batı yamaç ve yol kenarı, 02.07.2006, N 39° 39' 42.1'' E 26° 23' 37.3'', İEP 98, OUFE 13496; Ayvacık'a 11 km kala, 392 m, 20.05.2005, N 39° 34' 17.7'' E 26° 35' 38.9'', İEP 98, OUFE 13498. Balıkesir: Hüseyinbeyobası'ndan 4.5 km sonra, Havran'a 25 km kala, ca. 400 m, 15.7.2003, İEP 5, OUFE 13470; Kaz Dağı, Sarkızıyaylası'na doğru, 195 m, 15.5.2004, İEP 14, OUFE 13474**; Akçay-Altınoluk arası, 3. km, 5 m, 15.5.2004, İEP 15, OUFE 13475; Behramkale'ye 10 km kala, 18 m, 15.4.2004, İEP 16, OUFE 13476; Behramkale, ca. 200 m, 15.5.2004, İEP 17, OUFE 13477; Balıkesir-Edremit yolu, 2.5 km, 405 m, doğu yönü, taşlık yamaç, <i>P. nigra</i> altı, 19.05.2005, N 39° 39' 19.1'' E 27° 48' 22.9'', İEP 66, OUFE 13478. Manisa: Turgutlu'ya 7 km kala, Derbent girişi, 220 m, 18.4.2004, İEP 9, OUFE 13500; Spil dağı, 312 m, 21.05.2005, N 38° 36' 16.6'', E 27° 26' 50.4'', İEP 71, OUFE 13502; Spil dağı, 700 m, batı yönü, yol kenarı, 21.05.2005, N 38° 35' 31.2'', E 27° 26' 01.1'', İEP 72, OUFE 13503**. İzmir: Emiralem-Muradiye arası, taşlık güney yamaç, 70 m, 21.05.2005, N 38° 27' 48.7'' E 27° 12' 18.7'', İEP 70b, OUFE 13506. B1/2 Manisa: Bozdağ, çamurbanyoları mevkii, yolun batısı, yamaç, 295 m, 21.05.2005, N 38° 27' 25.1'', E 28° 03' 07.6'', İEP 73, OUFE 13504; Bozdağ, Gökköy'den 8 km sonra, batı yamaç, 930 m, N 38° 25' 15.7'' E 28° 04' 59.4'', İEP 74, OUFE 13505. B2 Balıkesir: Dursunbey'e 20 km kala, 420 m, 14.5.2004, İEP 11, OUFE 13471; Dursunbey'e 10 km kala, 540 m, 14.05.2004, İEP 12, OUFE 13472; Dursunbey-Balıkesir yolu, Balıkesir'e 10 km kala, 540 m, 14.5.2004, İEP 13, OUFE 13473; Manisa: Selendi-İzmir yolu kavşağı, 508 m, 17.4.2004, İEP 8, OUFE 13499; Sart Harabeleri, 230 m, 18.4.2004, İEP 10, OUFE 13501. B3 Bilecik: Bozüyük-Bilecik girişi, 873 m, 21.6.2003, İEP 1, OUFE 10456**. C2 Denizli: Babadağ, 960 m, 10.7.2004, İEP 34, OUFE 13507. Muğla: Fethiye-Kaş, Minare'ye doğru, Çaykenarı-Arifler yolu, <i>P. nigra</i> altı, ca. 130 m, 23.04.2005, İEP 45, OUFE 13508; Fethiye, Minare köyüne giderken, güneybatı yamaç, zeytin altı, 190 m, 23.04.2005, N 36° 29' 27'' E 29° 16' 22'', İEP 46, OUFE 13509; Fethiye, Eşme Jandarma Karakolu önü, 80 m, 24.04.2005, N 36° 27' 48'' E 29° 17' 15'', İEP 47, OUFE 13510; Pınara Antik kenti, 330 m, 23.04.2005, N 36° 29' 36.7'' E 29° 15' 26.6'', İEP, OUFE 13511. Antalya: Kaş-Kale, Kekova kavşağından 5 km sonra, güney, <i>Quercus</i> altı, 420 m, 24.04.2005, N 36° 15' 46.4'' E 29° 57' 04.0'', İEP 48, OUFE 13516; Kaş-Kale, Kale girişi, Demre girişine 3 km kala, 30 m, 24.04.2005, N 36° 14' 09.9'' E 29° 58' 19.9'', İEP 49, OUFE 13517; Demre-Beymelek, yol kenarı, 2 m, 24.04.2005, İEP 50, OUFE 13518. C3 Antalya: Askeri havaalanı yanı, refüj, 27.05.2006, N 36° 56' 18.1'' E 30° 29' 11.5'', İEP 87, OUFE 13530; Abdurrahmanlar-Gebiz, Gebiz'e 12 km kala, yol kenarı, 71 m, 26.04.2005, N 37° 00' 16.9'' E 30° 57' 17.1'', İEP 61, OUFE 13527; Gebiz, Töngüşlü köyü, yol kenarı, 99 m, 26.04.2005, N 37° 03' 40.7'' E 30° 58' 04.7'', İEP 62, OUFE 13528; Çıralı'ya 1.5 km kala, güney batı yönünde, 261 m, 25.04.2005, N 36° 25' 58.7'' E 30° 26' 02.4'', İEP 55b, OUFE 13512; Kemer-Kumluca, Beycik sapağına 300 m kala, 390 m, 28.5.2004, İEP 18, OUFE 13513; Beldibi-Kuruçay köprüsüne ca. 40 m kala, 26 m, 28.5.2004, İEP 19, OUFE 13514; Düden çayı ılerisi, 6 m, 28.5.2004, İEP 20, OUFE 13515; Kumluca Otogarı karşısı, güney yamaç, 82 m, 25.04.2005, N 36° 21' 50.0'', E 30° 18' 22.5'', İEP 51, OUFE 13519; Mavikent-Çavuşköy arası, Mavikent çıkışı, güney yamaç, 40 m, 25.04.2005, N 36° 18' 01.7'', E 30° 21' 38.9'', İEP 52, OUFE 13520; Adrasan Plajına giderken, yol kenarı, batı yönünde, 25 m, 25.04.2005, N 36° 40' 55.0'' E 30° 27' 25.4'', İEP 53, OUFE 13521; Adrasan Turistik Dinlenme Tesisleri, 20 m, 25.04.2005, N 36° 18' 07.3'' E 30° 27' 58.1'', İEP 54, OUFE 13522; Çıralı sapağından 2 km sonra, yol kenarı, güney yön, 225 m, 25.04.2005, N 36° 25' 58.1'' E 30° 26' 11.7'', İEP 57, OUFE 13523; Kemer-Göynük arası, yol kenarı, zaman zaman <i>P. nigra</i> altı, güney batı yönünde, 65 m, 26.04.2005, N 36° 39' 04.3'' E 30° 32' 18.5'', İEP 58, OUFE 13524**; Beldibi, 40 m, 26.04.2005, N 36° 40' 55.0'' E 30° 34' 09.6'', İEP 59, OUFE 13525; Antalya-Aksu yolu, Düden çayı ılerisi, yol kenarı, 95 m, 26.04.2005, N 36° 56' 21.8'' E 30° 48' 53.0'', İEP 60, OUFE 13526; Mahmutlar-Gözükküçüklü, Kervansaray caddesi sapağından sonra, yol kenarı boyunca, 27.04.2005, N 36° 29' 36.5'' E 32° 06' 30.1'', İEP 63, OUFE 13529

İEP: İlham ERÖZ POYRAZ toplayıcı no; OUFE: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Herbaryum kayıt no; **: Çalışmada kullanılan herbaryum örnekleri.

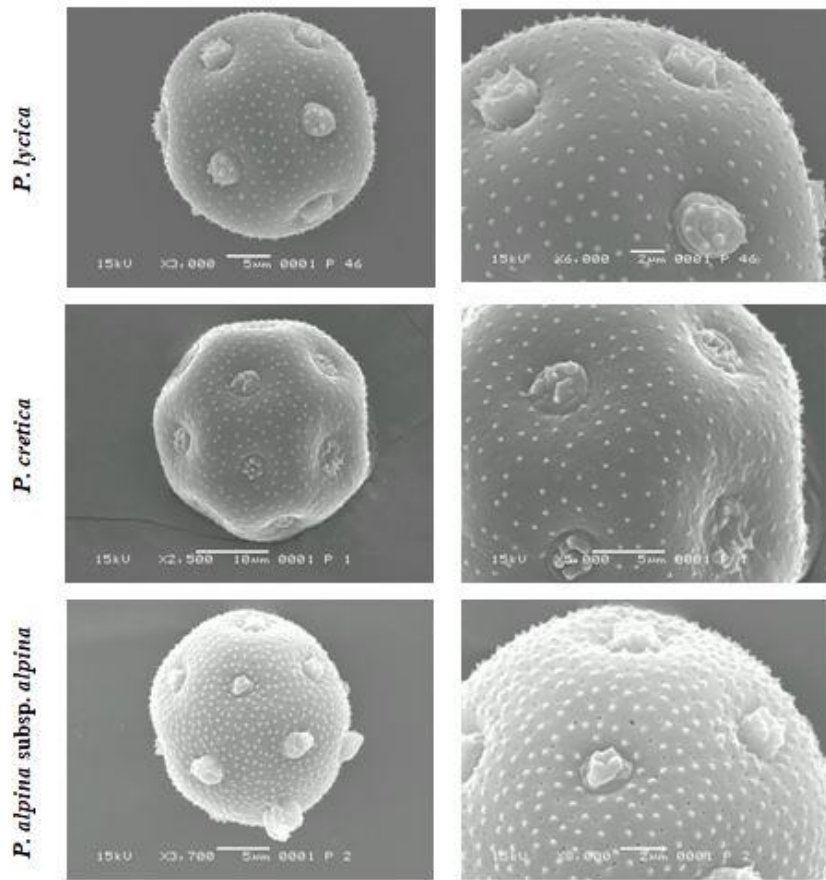
3. Bulgular

İncelenen *Petrorhagia* türlerinin polen özellikleri Tablo 2’de verilmiştir (Şekil 1-3).

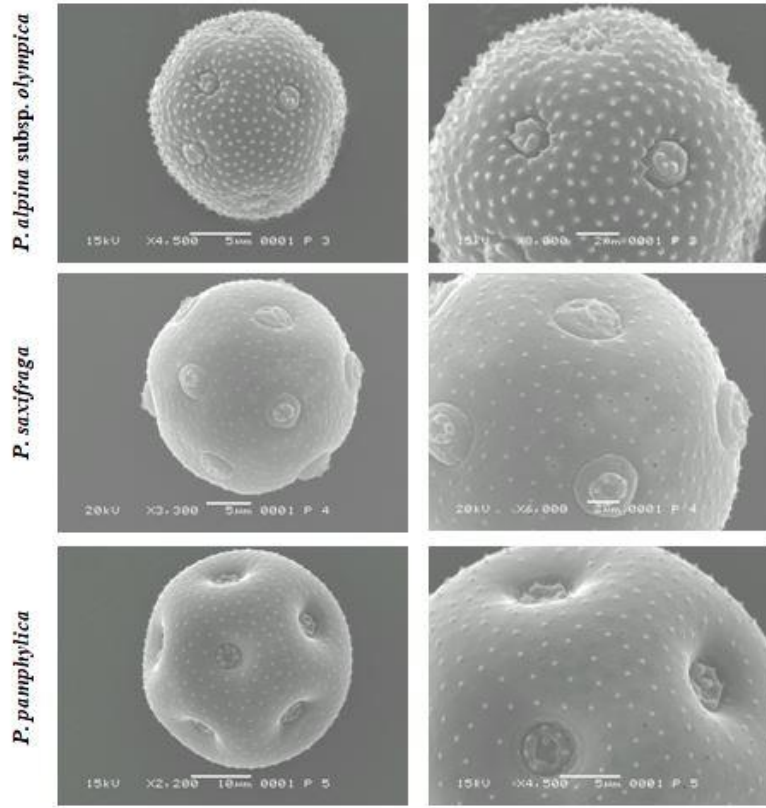
Tablo 2. *Petrorhagia* türlerinin polen özellikleri

Türler	Polen çapı (µm)		Polen şekli	Polen tipi	Por sayısı	Polen ornemantasyonu	Operkulum ornemantasyonu
	A	B					
<i>P. lycica</i> (E)	24,29	23,57	sferoid	poliporat	12-14	skabrat-perforat	skabrat
<i>P. cretica</i>	30,43	29,57	sferoid	poliporat	15-16	skabrat-mikroperforat	skabrat
<i>P. alpina</i> subsp. <i>alpina</i>	20,63	19,06	sferoid	poliporat	17-18	foveolat-granulat	skabrat
<i>P. alpina</i> subsp. <i>olympica</i>	16,42	15,71	sferoid	poliporat	10-12	skabrat-perforat	skabrat
<i>P. saxifraga</i>	25,00	22,86	sferoid	poliporat	12-14	foveolat-granulat	granulat
<i>P. pamphylica</i> (E)	37,89	34,74	sferoid	poliporat	12-14	skabrat-mikroperforat	skabrat
<i>P. peroninii</i> (E)	34,29	33,81	sferoid	poliporat	14-15	skabrat-mikroperforat	skabrat
<i>P. prolifera</i>	35,26	33,16	sferoid	poliporat	17-18	skabrat-perforat	psilat-rugulat
<i>P. dubia</i>	32,38	31,90	sferoid	poliporat	18-20	foveolat-granulat	skabrat

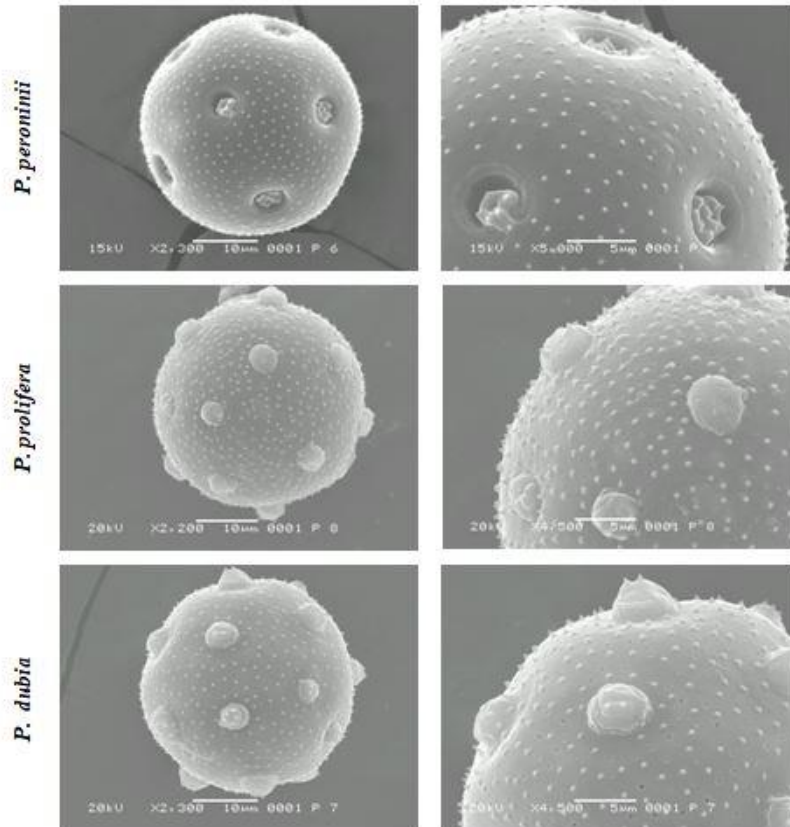
A: uzun eksen; **B:** kısa eksen; **E:** endemik türler



Şekil 1. *P. lycica*, *P. cretica*, *P. alpina* subsp. *alpina* türlerinin polen mikromorfolojileri



Şekil 2. *P. alpina subsp. olympica*, *P. saxifraga*, *P. pamphylica* türlerinin polen mikromorfolojileri



Şekil 3. *P. peroninii*, *P. prolifera*, *P. dubia* türlerinin polen mikromorfolojileri

4. Sonuçlar ve tartışma

Bu çalışmada *Petrorhagia* (Ser.) Link (Caryophyllaceae) cinsine ait türlerin polen yapıları mikromorfolojik yöntemle, taramalı elektron mikroskobu (SEM) kullanılarak incelenmiştir. İncelenen 9 türden 3'ü Ülkemiz için endemiktir [6-9].

İncelenen türlerin tamamı sferoid şekillidir ve porlu (poliporat) polen tipine sahiptir. Bu özellik hem Caryophyllaceae familyasının polen yapısı ile uygunluk göstermekte [10-12], hem de daha önce yapılan çalışmalarda belirtilen polen özellikleri ile uygunluk göstermektedir [13, 14] (Şekil 1-3, Tablo 2).

Polen büyüklükleri bakımından, *P. pamphylica* 37,89 µm çap ile en büyük, *P. alpina* subsp. *olympica* 16,42 µm çap ile en küçük polen yapısına sahip türlerdir (Şekil 2, Tablo 2). Aktaş ve ark. [14]'nın sonuçlarında *P. dubia* polen çapı en büyük (37,80 µm), *P. alpina* subsp. *alpina* polen çapı en küçük (18,57 µm) polenlerdir. Bu durum çalışmamız ile uygunluk göstermemektedir. Yıldız [12] *P. alpina* subsp. *alpina*'da polen çapının 20,68 µm olduğunu belirtmiştir. Bizim çalışmamızda bu taksonun polen çapı 20,63 µm olarak ölçülmüş olup Yıldız [12] ile uyum içerisindedir. Candau [13]'ünün çalışması ile ortak olan türlerimiz *P. prolifera* ve *P. velutina* (*P. dubia*'nın sinonimi)'dir. Araştırmacı *P. prolifera*'da polen çapını 40 µm, *P. velutina*'da polen çapını 32 µm olarak bulmuştur. Bizim çalışmamızda *P. prolifera* 35,26 µm, *P. dubia* 32,38 olarak bulunmuştur. Bu durumda *P. dubia*'da polen çapı Candau [13] çalışması ile uygunluk göstermektedir.

Por sayıları da türler arasında farklılık göstermektedir. *P. dubia* 18-20 por sayısı ile en fazla, *P. alpina* subsp. *olympica* 10-12 por sayısı ile en az por sayısına sahiptir (Şekil 2-3, Tablo 2). *P. alpina* subsp. *olympica* aynı zamanda en küçük çaplı polen olup por sayısı da en azdır. Por sayıları ile ilişkili sonuçlar diğer çalışmalar ile karşılaştırıldığında Aktaş ve ark. [14] ile tam tersi sonuçları elde etmiş bulunmaktayız. Çünkü, biz çalışmamızda *P. dubia* türünü en fazla pora sahip polen olarak bulurken, Aktaş ve ark. [14]'na göre en az porlu; tam tersi biz *P. alpina* subsp. *olympica*'yı en az por sayısına sahip bulurken Aktaş ve ark. [14] en fazla porlu bulmuşlardır. Candau [13] çalışmasında *Petrorhagia* türleri por sayısı için ortak bir değer vererek 18 porlu olduklarından bahsetmiştir. Biz çalışmamızda *P. alpina* subsp. *alpina* ve *P. prolifera* türleri için 17-18 por sayısını gözlemlemiş bulunmaktayız. Yıldız [12] çalışmasında *P. alpina* subsp. *alpina*'nın 'Dianthus type' içerisinde yer aldığını ve bu grupta da por sayılarının 11-20 arasında değiştiğini vurgulamıştır. Biz çalışmamızda *P. alpina* subsp. *alpina*'nın 17-18 porlu olduğunu bulduğumuz için Yıldız [12] ile uyum sağlamaktadır.

İncelenen türlerin polen ornemantasyonu, skabrat-perforat veya skabrat-mikroperforat yapı göstermektedir. Ancak *P. alpina* subsp. *alpina*, *P. saxifraga* ve *P. dubia*'da foveolat-granulat polen ornemantasyonu bulunmaktadır (Şekil 1-3, Tablo 2). Aktaş ve ark. [14] SEM ile elde ettikleri sonuçlarda inceledikleri türlerin tamamının microechinate ornemantasyon gösterdiğini belirtmişlerdir. Yıldız [12] 'Dianthus type' içerisinde yer alan türlerin mikroperforat, reticulate ornemantasyon gösterdiğini belirtmiştir. Candau [13] ise incelediği *Petrorhagia* türleri için spinüllerin düzenli dağılımından söz etmektedir.

Operkulum ornemantasyonları ise genel olarak skabrat yapıdadır. Ancak *P. saxifraga*'da granulat; *P. prolifera*'da ise psilat-rugulat operkulum ornemantasyonu görülmüştür (Şekil 1-3, Tablo 2). Aktaş ve ark. [14] çalışmalarında operkulum ornemantasyonu ile ilgili herhangi bir veriden bahsetmemişlerdir. Yıldız [12] ise 'Dianthus type' için özel bir operkulum ornemantasyonu belirtmeyip, genel veriler içerisinde, operkulum yapılarının spinüllü olduğunu belirtmiştir. Aynı şekilde Candau [13]'da çalışmasında genel olarak operkulumun ornemantasyonunun spinüllü olduğunu belirtmiştir.

Bu çalışmada *Petrorhagia* cinsine ait türlerin polen yapılarının mikromorfolojik özellikleri belirlenmiş olup türler arasındaki benzerlik ve farklılıklar daha önce yapılan çalışmalar ile de karşılaştırılarak, Caryophyllaceae familyası ile çalışan araştırmacıların bilgisine sunulmaktadır.

Ayrıca; Tejaswini [35], *Dianthus caryophyllus* ve *D. chinensis* türleri ve genotiplerine ait popülasyonlar arasında polen polimorfizmi gözlemlemiş, çimlenme kapasitesi ve polen tüpü büyümesinin polen büyüklüğü ile olan ilişkisini göstermiş ve farklı polen boyut sınıflarının varlığının bir hayatta kalma stratejisi olduğunu öne sürmüştür. Jürgens ve ark. [36] ise Caryophylloideae alt familyasındaki 53 türü; polen boyutu varyasyonu, polen sayısı, polen çapı ve stilus uzunluğu açısından incelemiş ve bu değerler ile türleri diurnal, nakturnal ya da kendi tozlaşan türler olarak sınıflandırmışlardır. Bu çalışmada; bir çok türün anterlerinde iki farklı, daha az bir kısmında ise üç farklı polen boyutu olduğu, ayrıca stilus uzunluğu ile polen çapı arasında pozitif bir ilişki bulunduğu gösterilmektedir. Bizim çalışmamız, *Petrorhagia* taksonlarına ait polen mikromorfolojisi ile ilgili sonuçların, benzer ya da farklı türlerin polenleri ile yapılmış çalışmalar ile polen boyutu, por sayısı, polen ve operkulum ornemantasyonları gibi polen morfolojik karakterleri açısından tür içi ya da türler arası farklılıkların olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, Caryophyllaceae familyası üyelerinin polen polimorfizmi ile ilgili olarak, türlerin farklı habitatlardan toplanmış olduğu göz önünde bulundurulduğunda, farklı tozlaşma ajanları, gece-gündüz ya da kendine tozlaşma tercihleri veya stilus uzunluğu ve ona bağlı olarak tozlaşma sonrası oluşacak polen tüpü uzunluğu gibi her çiçeğe özgü farklılıkların incelenmesi için yeni çalışmaların yapılması gereğini de desteklemektedir.

Teşekkür

Bu çalışmadaki *Petrorragia* türleri, 2003-2008 yılları arasında devam etmiş olan “Türkiye *Velezia* L., *Petrorragia* (Ser.) Link., ve *Saponaria* L. Cinsleri Üzerinde Taksonomik, Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar” başlıklı, 200319054 no’lu Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında toplanılmış ve polen çalışması Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Elektron Mikroskobu Laboratuvarı’nda gerçekleştirilmiştir.

Kaynaklar

- [1] Williams, F. N. (1890). Synopsis of the genus *Tunica*. *Journal of Botany*, 28, 193-199.
- [2] Ball, P. W. & Heywood, V. H. (1964). A revision of the genus *Petrorragia*. *Bulletin of the British Museum (Natural History) Botany*, 3(4), 121-172.
- [3] Tutin, T. G. (1980). *Flora Europaea*, Vol. 2. Cambridge: Cambridge University Press.
- [4] Davis, P. H. (1957). New Turkish Species of *Tunica*, *Velezia* and *Potentilla*. *Notes Royal Botanic Garden*, 22, 166.
- [5] Polunin, O. (1987). *Flowers of Greece and the Balkans, a field guide (2nd ed.)*. Oxford: Oxford University Press.
- [6] Davis, P. H. (Ed.) (1967). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol 2*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- [7] Davis, P. H., Mill, R. R. & Tan, K. (Eds.) (1988). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol 10*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- [8] Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, M. T. (Eds.) (2012). *Türkiye bitkileri listesi (Damarlı bitkiler)*. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
- [9] Dönmez, A. A., Açar, O. T., Uğurlu, Z., Mutlu, B. & Horasan, Ö. (2013). Taxonomic and biogeographic contributions to some genera of Caryophyllaceae family in Turkey. *Hacettepe Journal of Biology & Chemistry*, 41(2), 103-113.
- [10] Bittrich, V. (1993). Caryophyllaceae. In K. Kubitzki, J. G. Rohwer & V. Bittrich (Eds.), *The families and genera of vascular plants, Vol 2 - Flowering plants dicotyledons: Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families* (pp. 206-236). Germany: Springer.
- [11] Chanda, S. (1962). On the pollen morphology of some Scandinavian *Caryophyllaceae*. *Grana Palynologica*, 3, 67-89.
- [12] Yıldız, K. (2001). Pollen morphology of Caryophyllaceae species from Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 33(4), 329-355.
- [13] Candau, P. (1980). Palinologia en Caryophyllaceae del sur de Espana -subfamilia Silenoideae. *Lagascalía*, 9, 137-147.
- [14] Aktaş, K., Altan, Y., Özdemir, C., Baran, P. & Garnatje, T. (2010). Comparative pollen morphology of Turkish species of *Petrorragia* (Caryophyllaceae) and its systematic implications. *Biología*, 65(3), 444-450. <https://doi.org/10.2478/s11756-010-0038-2>
- [15] Pınar, M. & Oybak, E. (1997). Pollen morphology of Turkish *Bolanthus* (Ser.) Reichb. (Caryophyllaceae). *Hacettepe Bulletin of Natural Science and Engineering (A)*, 26, 1-9.
- [16] Sahreen, S., Khan, M. A., Meo, A. A. & Jabeen, A. (2008). Studies on the pollen morphology of the genus *Dianthus* (Caryophyllaceae) from Pakistan. *Biological Diversity and Conservation*, 1(1), 89-98.
- [17] Kızılpınar, İ., Özudoğru, B., Özmen, E., Erik, S. & Doğan, C. (2010). Morphological, palynological and ecological features of *Dianthus engleri* Hausskn. & Bornm. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 38(2), 139-147.
- [18] Mačukanović Jocić, M. P., Jarić, S. V. & Mladenović, M. A. (2015). Palynomorphological study of *Dianthus petraeus* Waldst. et Kit. (Caryophyllaceae). *Archives of Biological Sciences, Belgrade*, 67(3), 973-980. <https://doi.org/10.2298/ABS150116060M>
- [19] Ataşlar, E., Potoğlu Erkara, İ. & Tokur, S. (2009). Pollen morphology of some *Gypsophila* L. (Caryophyllaceae) species and its taxonomic value. *Turkish Journal Botany*, 33(5), 335-351.
- [20] Külköylüoğlu, G., Yıldız, K. & Minareci, E. (2009). *Minuartia anatolica* var. *anatolica* ve *M. pestalozzae* türleri üzerine morfolojik, karyolojik ve palinolojik bir çalışma. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi*, 2(2), 49-57.
- [21] Kaplan, A. (2008). Pollen morphology of some *Paronychia* species (Caryophyllaceae) from Turkey. *Biología*, 63(1), 53-60. <https://doi.org/10.2478/s11756-008-0016-0>
- [22] Arkan, O. & İnceoğlu, Ö. (1992). Türkiye'nin bazı *Saponaria* L. taksonlarının polen morfolojisi. *Doğa-Tr. Journal of Botany*, 16, 253-272.
- [23] Ataşlar, E. (2004). Morphological and anatomical investigations on the *Saponaria kotschy* Boiss. (Caryophyllaceae). *Turkish Journal Botany*, 28, 193-199.

- [24] Erdir, M. & Ataşlar, E. (2019, April 28). *Pollen structure of Saponaria L. (Caryophyllaceae) in Turkey*. Paper presented at the Internatioanl Marmara Science and Social Sciences Congress Spring-2019 Turkey, Science Symposium Proceeding, Vol 2, 2325-2331. ISBN: 978-605-69509-0-2.
- [25] Smissen, R. D. & Garnock-Jones, P. J. (2002). Relationships, classification and evolution of *Scleranthus* (Caryophyllaceae) as inferred from analysis of morphological characters. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 140, 15-29. <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2002.00081.x>
- [26] Sahreen, S., Khan, M. A., Meo, A. A. & Jabeen, A. (2008). Pollen morphology of the genus *Silene* (Sileneae-Caryophyllaceae) from Pakistan. *Biological Diversity and Conservation*, 1(2), 74-85.
- [27] Yıldız, K. (1996). Pollen morphology of some *Silene* L. (Caryophyllaceae) taxa distributed in northwest Anatolia. *Turkish Journal Botany*, 20, 231-241.
- [28] Yıldız, K. (2006). Morphological and palynological investigation on *Silene gigantea* L. var. *gigantea* and *Silene behen* L. (Caryophyllaceae) distributed in western Anatolia and northern Cyprus. *Turkish Journal Botany*, 30, 105-119.
- [29] Yıldız, K. & Minareci, E. (2008). Morphological, anatomical, palynological and cytological investigation on *Silene urvillei* Schott. (Caryophyllaceae). *Journal of Applied Biological Sciences*, 2(2), 41-46.
- [30] Yıldız, K., Çırpıcı, A. & Dadandı, M. Y. (2010). Pollen morphology of *Silene* taxa (Caryophyllaceae) in four sections from Turkey. *Phytologia Balcanica*, 16(1), 85-95.
- [31] Atasagun, B., Aksoy, A. & Martin, E. (2016). Anatomical, palynological and karyological remarks of *Silene brevicalyx* and *Silene ozyurtii* (Caryophyllaceae). *Phytotaxa*, 270(2), 116-126. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.270.2.4>
- [32] Eröz Poyraz, İ. & Ataşlar, E. (2010). Pollen and seed morphology of *Velezia* L. (Caryophyllaceae) genus in Turkey. *Turkish Journal Botany*, 34(3), 179-190.
- [33] Bridson, D. & Forman, L. (1999). *The herbarium handbook*. Kew: Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, 334 pp.
- [34] Faegri, K. & Iversen, J. (1975). *Textbook of pollen analysis (3th ed.)*. Oxford: Wiley-Blackwell.
- [35] Tejaswini (2002). Variability of pollen grain features: a plant strategy to maximize reproductive fitness in two species of *Dianthus*? *Sexual Plant Reproduction*, 14(6), 347-353. <https://doi.org/10.1007/s00497-002-0130-z>
- [36] Jürgens, A., Witt, T. & Gottsberger, G. (2012). Pollen grain size variation in Caryophylloideae: a mixed strategy for pollen deposition along styles with long stigmatic areas? *Plant Systematics and Evolution*, 298(1), 9-24. <https://doi.org/10.1007/s00606-011-0518-z>

(Received for publication 15 July 2019; The date of publication 15 December 2019)



Antimicrobial, antioxidant and DNA protective effects and phenolic content of *Lallementia canescens* (L.) Fisch. & C.A.Mey. and *Lallementia peltata* (L.) Fisch. & C.A.Mey

Yusuf ALAN ¹, Ahmet SAVCI ², Enver Fehim KOÇPINAR ^{*1}, Murat KURŞAT ⁴, Sıraç TOPDEMİR ⁵, Mizbah KARATAŞ ⁵, Birsen ÇAKMAK ⁶
ORCID: 0000-0003-0007-0212; 0000-0002-9609-785X; 0000-0002-6031-4664; 0000-0002-0861-4213; 0000-0003-4575-9216; 0000-0003-4649-6681; 0000-0001-7290-3784

¹ Department of Primary Education, Education Faculty, Muş Alparslan University, 49250, Muş, Turkey

² Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Muş Alparslan University, 49250 Muş, Turkey

³ Department of Medical Laboratory Techniques, Vocational School of Health Services, Muş Alparslan University, Muş, Turkey

⁴ Department of Biology, Faculty of Science, Bitlis Eren University 13000, Bitlis, Turkey

⁵ Institute of Science, Bitlis Eren University, 13000, Bitlis, Turkey

⁶ Institute of Science, Muş Alparslan University, 49250, Muş, Turkey

Abstract

The healing effects of plants are known to stem from the components in their contents. In today's science, the studies on plant contents and biological activities as well as the discovery or development of new therapeutic agents are very popular. In this study, the biological activities of *Lallementia canescens* (*L. canescens*) and *Lallementia peltata* (*L. peltata*) were investigated to provide valuable data for the literature in the treatment of various diseases and new active substance design. The corresponding plants, which benefits and contents have not been completely elucidated yet, were collected from the aerial parts (leaves) of the plants using the Soxhlet extraction method. Ethanol (EtOH) extracts were prepared from the aerial parts (leaves) of the plants using the Soxhlet extraction method. The concentrations of 17 phenolic compounds (antioxidants) were determined in these extracts by HPLC. Moreover, the *in vitro* antioxidant activities of such extracts were compared with the standard antioxidants: Butylated hydroxyanisole (BHA), Butylated hydroxytoluene (BHT) and Alpha tocopherol (α -Toc). Hollow agar and agarose gel electrophoresis methods were used to investigate the antimicrobial effects on various microorganisms and protective effects on pBR322 plasmid DNA, respectively. The results showed that some phenolics such as kaempferol, gallic acid, and salicylic acid could not be identified in EtOH extracts, while the extracts showed strong antioxidant and antimicrobial activity, particularly on the yeasts. On the other hand, DNA protective activities of the extracts were found to be very limited. It can be concluded that the plants are generally rich resources of phenolic compounds. The plants have potential to exhibit strong antioxidant antifungal activities as similar to the standards.

Key words: Antimicrobial; antioxidant; DNA protection; HPLC; *Lallementia*

----- * -----

***Lallementia canescens* (L.) Fisch. & C.A.Mey. ve *Lallementia peltata* (L.) Fisch. & C.A.Mey. fenolik içerikleri ve antimikrobiyal, antioksidan ve DNA koruyucu etkileri**

Özet

Bitkilerin iyileştirici etkilerinin içerdikleri bileşenlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Bugünün bilim dünyasında, yeni terapötik ajanların geliştirilmesi ve keşfinde olduğu gibi bitki içerikleri ve biyolojik aktiviteleri üzerine çalışmalar çok popülerdir. Bu çalışmada, çeşitli hastalıkların tedavisi ve yeni aktif madde dizaynında literatür için değerli data elde etmek amacıyla, *Lallementia canescens* (*L. canescens*) ve *Lallementia peltata* (*L. peltata*)'nın biyolojik aktiviteleri araştırıldı. Henüz yararları ve içerikleri tam aydınlatılmamış olan bu bitkiler Bitlis ilinden toplandı ve herbaryum materyaline çevrildi. Bitkilerin toprak üstü kısımları kullanılarak Soxhlet ekstraksiyon metodu ile etanol

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +95345456016; Fax.: +904362491022; E-mail: ef.kocpinar@alparslan.edu.tr

(EtOH) özleri hazırlandı ve HPLC kullanılarak bu özlerde 17 fenoliğin konsantrasyonları araştırıldı. Daha sonra standart antioksidan olarak bilinen bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve alfa tokoferol (α -Toc)'e karşı özlerin *in vitro* antioksidan aktiviteleri, oyuk agar metodu ile çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkileri ve agaroz jel elektroforezi ile pBR322 plazmid DNA'sı üzerindeki koruyucu etkileri araştırıldı. Kamferol (kaempferol), gallik asit (gallic acid) ve salisilik asit (salycilic acid) gibi bazı fenolikler saptanmasa da genel olarak özlerin zengin antioksidan içeriğe sahip olduğu belirlendi. Bu etkiye paralel olarak bitki özlerinin standartlara yakın *in vitro* antioksidan aktivite sergilediği belirlendi. Ayrıca özütlerin özellikle mantarlar üzerinde daha güçlü antimikrobiyal etki gösterdikleri ancak sınırlı derecede DNA koruyucu aktiviteye sahip oldukları saptandı.

Anahtar kelimeler: Antimikrobiyal; Antioksidan; DNA koruma; HPLC; *Lallemantia*

1. Introduction

The world health organization (WHO) has reported that the total amounts of medicinal plants used for treatment are approximately 20,000 based on the compilation of publications on pharmacy and medical plants from 91 different countries [18]. The plants, mainly used as a source of food and medicine in the past, have been used as tea and spice in the present day [3]. The studies on this topic have revealed that the healing properties of plants stem from various components such as essential oils [36], phenolic substances and various antioxidants [1; 16]. It is known that these components are important in the regulation of cellular ROS, antimicrobial protection and in the fight against several diseases such as cancer [20]. Increased ROS concentration in a cell by the effects of endogenous and exogenous agents can cause various neurodegenerative diseases by interacting with the many macromolecules such as DNA, lipid and protein [7; 8; 21]. Although excessive concentration of ROS is harmful to the cell, many plants can voluntarily produce the ROS in cellular metabolic pathways, which are essential both for pathogen defense and for progression of many mechanisms carrying with the signal transduction [25] and most scientists have stated that plants have antioxidants and antimicrobial properties [23].

The cosmopolitan family of *Lamiaceae*, which is a member of the flowering plants, includes mostly fragrant single or perennial herbaceous plants and several shrubs. The endemism rate in Turkey is 44% and it has got 250 genera and 6900-7200 species in the world [15; 34]. Furthermore, Turkey has got 45 genera, 546 species and 731 taxon including the other subspecies [2]. *Lallemantia* genera, which can be used as food and medicine, is represented by three species [26]. These are *L. peltata*, *L. iberica* and *L. canescens* [9]. The length of the *Lallemantia canescens* can be 20-45 cm and has an important distribution in Turkey. It blooms between May and July, and grows usually on the slopes, roadsides, volcanic and limestone ridges. The length of the *L. peltata* can be 10-40 cm and shows an important distribution in Turkey and grows on empty fields, worn slopes, roadsides, and on the creek beds in the inner parts of the north and south of Turkey.

This study focused on the biological activities of *Lallemantia canescens* and *Lallemantia peltata* and thus, it was aimed to expand the plant literature by providing important data for advance pharmacological studies. For this purpose the EtOH extracts were prepared from aerial parts of *L. canescens* and *L. peltata*, and then the concentrations of 17 phenolic and *in vitro* biological activities in this extracts were investigated.

2. Materials and methods

2.1. Plant collection and extract preparation

The plants collected from Bitlis province during vegetation period and stored in Science and Technology Application and Research Center Laboratory in Bitlis Eren University with herbarium codes (*L. canescens*: M.KURŞAT 6041; *L. peltata*: M.KURŞAT 6042). The aerial parts of the plants which were dried in the shade and pulverized by a mixer. Ethanol extracts were then prepared from 50 g of plants using the soxhlet extraction method and stored at -18 °C in dark glass bottles [1]. Soxhlet extraction method is one of the methods used to obtain extracts from plants in the simplest and cheapest way.

2.2. Quantitative analysis of phenolic compounds by HPLC

The phenolic contents of EtOH extracts were determined by HPLC. For this purpose, standard phenolics were prepared at 10 mg/mL concentrations and placed into 50 ml flasks and then 1% acetic acid and acetonitrile were then mixed (9:1 respectively) and a homogeneous solution was obtained. Stock solution was prepared by mixing the previous prepared homogeneous solution and methanol (1:1). Previous prepared 10 mg/mL phenolic standards were dissolved in stock solution and standard samples (100 mM, 75 mM, 50 mM, 25 mM, and 10 mM) were prepared to form the HPLC standard chromatograms [28]. EtOH extract samples were then prepared at 20 mg/mL concentration and filtered using the 0.45 μ m membrane filter. The experimental conditions followed in HPLC were shown in Table 1.

Table 1. HPLC operating conditions and gradient elution program

Model	HPLC operating conditions	Gradient elution		
		Time (min)	A (%)	B (%)
Colon	Agilent Technologies 1260 Infinity II	0	90	10
Colon Oven	ACE 5 C18 (250x4.6 mm id)	25	60	40
Detection	G7130A	39	40	60
Pump	1260 DAD WR	50	10	90
Mobile phase	1260 Quat Pump VL	55	90	10
Wavelength	A: 1% Acetic Acid / B: Acetonitrile			
Auto sampler	272, 280 and 310 nm			
Flow Rate	1260 Vialsampler			
Colon Temperature	1 mL/min			
Injection	28 °C			
	20 µl			

2.3. Sample preparation and antimicrobial activity assay

Nutrient Broth and Sabourand 2% Glucose Broth were used respectively in the production of bacteria and yeast. 1% of each microorganism developed in liquid media was again planted in the same media and incubated for 18 hours. The microorganisms were inoculated into the previous prepared Nutrient Broth and Sabourand 2% Glucose Broth media and the wells with a diameter of 10 mm were formed on the media. The 0.1 g of previous prepared extracts was dissolved in 1 mL of DMSO to prepare the extract solutions. The 5 µl, 10 µl, 20 µl, 40 µl and 80 µl of the extract solutions were inoculated into the wells and incubated at 4 °C for 1 hour. Bacteria and yeasts were inoculated into culture media and then incubated at 37 °C and 27 °C (bacteria and yeasts respectively) for 18-24 hours. The blurs (10^6 CFU s/mL) of bacteria and yeasts are adjusted according to the 0.5 standard of Mc Farland [17]. Antimicrobial activity assays were performed on 10 different microorganisms according to the method of [27]. According to this, EtOH extracts were prepared as 100 mg/mL and inoculated into hollow agar wells. The diameters of inhibition zones were measured and compared with the results of antibiotics used as control.

The microorganisms were obtained from the Central Research and Application Center in Muş Alparslan University and these are as follows; the seven of microorganisms are pathogenic bacteria; Gr⁺; *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Bacillus megaterium* DSM 32 and Gr⁻; *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 and *Klebsiella pneumonia* 13883 and three of organisms are fungi; pathogenic: *Yarrowia lipolytica* and *Candida albicans* ATCC 10231 and non-pathogenic: *Saccharomyces cerevisiae*. Antibiotics were purchased from OXOID and these are Erythromycin (E-15), Ampicillin/Sulbactam (SAM-20), Rifampicin (RD-5), Amikacin (AK-30) and Fluconazole (FCA-25).

2.4. Determination of in Vitro Antioxidant Activities

2.4.1 Total Antioxidant Activity assay

Total antioxidant activity assay was performed by ferric thiocyanate method of [24] using Shimadzu 1800 spectrophotometer. According to this, 1 mg/mL stock solutions were prepared and, by diluting the stock solutions, 100 µL samples were prepared at 25 µM, 50 µM and 100 µM concentrations. The volume of each sample was then completed to 2.5 mL by adding previous prepared buffer solution and 2.5 mL of linoleic acid was added to each tube and thus total volume was elevated to 5 mL. In this assay, control tube contains 2.5 mL of buffer solution, 2.5 mL of linoleic acid and 100 µL of distilled water, and blank tube contains 4.8 mL of ethanol and 100 µL of Fe²⁺ and SCN⁻. The samples, control, and blank tubes were incubated at 37 °C and then 4.7 mL of ethanol and 100 µL of Fe²⁺ and SCN⁻ were added on, respectively. Absorbance values were read at 500 nm and the inhibition percentages of linoleic acid emulsions were calculated at 40th hour when the control absorbance reached its maximum value.

2.4.2. Ferric iron (Fe³⁺) reduction assay

2.4.3. Cupric ion (Cu²⁺) reduction assay

The cupric cation (Cu²⁺) reduction capacity was carried out according to the CUPRAC method used by [37]. For this purpose, 0.1 mL of samples having the different concentrations (25 µg/mL, 50 µg/mL and 75 µg/mL) were prepared and their volumes were completed to 1 mL with the distilled water and then 0.25 mL of CuCl₂ solution (0.01 M), ethanolic neocuprin solution and 1M ammonium acetate buffer were added in the empty test tubes and briefly vortexed. Previous prepared samples at different concentrations were transferred to test tubes and incubated for 30 min. The increase in absorbance values at 450 nm shows the reduction capacity of cupric cation.

2.4.4. ABTS radical scavenging

ABTS^{•+} (2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) scavenging activity was performed according to the method of [35]. According to this, the same proportions of 2.45 mM potassium persulphate (K₂S₂O₈) and 7 mM ABTS solution were reacted and the samples were incubated for 16 hours to generate the ABTS^{•+}. The radical solution was

diluted with methanol until the absorbance value of them reach to control absorbance (1.660 ± 0.02) at 734 nm. 4 mL of ABTS⁺ solution and 2 mL of extracts having different concentrations were transferred into test tubes and the values of sample absorbance were measured against the blank (Phosphate Buffer pH: 7.4) at 734 nm.

2.4.5. DPPH free radical scavenging

The DPPH (1,1-Diphenyl 2-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity was performed according to the method of [5]. The different concentrations of extracts and standards (25 µg/µL, 50 µg/µL and 100 µg/µL) were prepared in test tubes and total volumes were completed to 3 mL by adding pure ethanol. 1 mM DPPH radical solution was prepared and transferred into test tubes. After the incubation for 30 min at room temperature and dark, absorbance values were measured against the blank (ethanol) at 517 nm. The following equation was used in the calculation of DPPH radical scavenging percentages.

$$\text{Scavenging Capacity of DPPH Radical (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}}\right) \times 10 \quad (1)$$

2.5. DNA protective activity study

Protective effects of the extracts on pBR322 plasmid DNA were imaged by agarose gel electrophoresis according to the [29] method. Stock extract solutions at 200 mg/mL concentration were prepared with the dissolution of extracts in DMSO. By the re-dilution of them in DMSO at different concentrations, fresh extracts were prepared and mixed with the different chemicals and materials (pBR322 DNA (200 ng), H₂O₂ and DMSO) according to the amounts given in Table 2 and loading samples at different concentrations (25 mg/mL, 50 mg/mL and 100 mg/mL) were obtained. These samples were incubated at 37 °C in dark for 3, 6, 12 and 24 hours and 5 µL of them were mixed with loading buffer. After loading the samples onto the agarose gel, Electrophoresis was performed in TBE buffer at 40 volts for 2 hours and agarose gel was viewed by Londershausen (1996) imaging system (Figure 2).

Table 2. The amounts and components of samples for electrophoresis

DNA (µL)	H ₂ O ₂ (µL)	DMSO (µL)	Extracts (10 µL) and Concentrations	PW (µL)	Total Volume (µL)
10	-	-	-	15	25
10	5	-	-	10	25
10	5	10	-	-	25
10	-	10	-	5	25
10	5	-	Leaf/ EtOH (100 mg/mL)	-	25
10	5	-	Leaf/ EtOH (50 mg/mL)	-	25
10	5	-	leaf/ EtOH (25 mg/mL)	-	25
10	-	-	Leaf/ EtOH (100 mg/mL)	5	25
10	-	-	Leaf/ EtOH (50 mg/mL)	5	25
10	-	-	Leaf/ EtOH (25 mg/mL)	5	25

2.6. Statistical Analysis

All experimental assays were repeated as three measurements. Statistical comparisons of both antioxidant activity results and antimicrobial activity results were performed by One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test using GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA. All data compared statistically were presented as Mean ± standard deviation and P values below 0.05 were considered significant. Fe³⁺ cation reduction study was performed according to the FRAP method proposed by [33], and BHA, BHT, and α-Toc were used as standard antioxidants. Extracts and standards at different concentrations were added in test tubes and total volume was completed to 1 mL with the distilled water. 2.5 mL of phosphate buffer (0.2 M, pH:6.6) and 2.5 mL of 1% potassium ferricyanide [K₃Fe(CN)₆] were added and incubated at 50 °C for 20 minutes. After the incubation, 2.5 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA) was added in the reaction mixture and centrifuged at 3000 RPM for 10 min. 2.5 mL from top phases of sample tubes was taken and transferred in empty tubes, and then 2.5 mL distilled water and 0.5 mL FeCl₃ were added on, respectively. The absorbance values of control and samples were read against the blank (pure water) at 700 nm.

3. Results

3.1. Quantitative Phenolic contents

Concentrations (µg/mL) of 17 phenolics were determined by HPLC (Table 3) and according to this, salicylic acid and gallic acid could not be detected in both extracts. Apigenin as the highest phenolic (504.710 µg/mL) and 3,4-Dihydroxybenzoic acid as the lowest phenolic (0.016 µg/mL) were found in the *L. canescens* extract. Besides catechol as the highest phenolic (112.701 µg/mL) and abscisic acid as the lowest phenolic (1.164 µg/mL) were detected in the *L. peltata* extract (Table 3). The phenolic chromatograms of plant extracts are given in supplemental data Figure 2 and Figure 3.

Table 3. The phenolic concentration ($\mu\text{g/mL}$) in the EtOH extracts of *L. canescens* ve *L. peltata*. The lowest and highest concentrations of phenolics in the both of extracts were written in bold type

Phenolics	<i>L. canescens</i>	<i>L. peltata</i>	Phenolics	<i>L. canescens</i>	<i>L. peltata</i>
Ascorbic acid	71.176	92.862	Curcumin	7.848	5.939
Gallic acid	N/A	N/A	Catechol	20.182	112.701
Myricetin	2.229	9.941	Vanillin	0.522	12.801
Abscisic acid	64.687	1.164	Caffeic acid	9.663	69.673
Quercetin	13.789	15.958	Cinnamic acid	3.661	2.837
Apigenin	504.710	72.485	Rosmarinic acid	21.012	31.435
Kaempferol	20.182	5.295	Salicylic acid	N/A	N/A
3,4-Dihydroxybenzoic acid	0.016	N/A	Trans-p-coumaric acid	3.99	1.589
4-Hydroxybenzoic acid	2.003	2.605			

3.2. Antimicrobial activities

Antimicrobial activity studies were performed by hollow agar method. The antimicrobial effects of the extracts were tested on 10 microorganisms at different volumes (50 μL , 100 μL , and 150 μL) and the most significant effect was observed at 150 μL (Table 4). The diameters of hollow agar wells treated with antibiotic and EtOH extracts were measured as mm and 150 μL results were compared statistically by One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test using GraphPad Prism version 7.00 for Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA. Statistical evaluation results were expressed as Mean \pm Standard Deviation in Table 4. According to this, the highest activity of *L. canescens* was observed on *Y. lipolytica* (30 mm) and the highest activity of *L. peltata* extract was observed on *C. albicans* (26 \pm 0.57 mm). The antimicrobial effects for 50 μL and 100 μL are given in supplemental data Table 1.

Table 4. The effects of 150 mg/mL EtOH extract and antibiotics on the microorganisms and statistical evaluation of results

Organism	Antibiotics □	Erythromycin	Ampicillin/ Sulbactam	Amikacin	Rifampicin	Fluconazole	
Gram positive	<i>B. subtilis</i>	Antibiotic results	20 \pm 0.00	14 \pm 1.15	11 \pm 1.00	21 \pm 0.00	—
		<i>L. canescens</i>	15 \pm 1.00	****	ns	+***	****
		<i>L. peltata</i>	—	N/A	N/A	N/A	N/A
	<i>S. aureus</i>	Antibiotic results	21 \pm 1.00	10 \pm 0.00	9 \pm 0.00	18 \pm 1.15	—
		<i>L. canescens</i>	—	N/A	N/A	N/A	N/A
		<i>L. peltata</i>	17 \pm 1.00	**	+****	+****	ns
Gram Negative	<i>B. megaterium</i>	Antibiotic results	25 \pm 0.00	—	10 \pm 1.00	16 \pm 0.00	—
		<i>L. canescens</i>	15 \pm 0.00	****	N/A	+****	ns
		<i>L. peltata</i>	16 \pm 1.00	****	N/A	+****	ns
	<i>E. aerogenes</i>	Antibiotic results	27 \pm 1.00	10 \pm 1.00	9 \pm 0.00	16 \pm 1.00	—
		<i>L. canescens</i>	15 \pm 0.57	****	+****	+****	ns
		<i>L. peltata</i>	18 \pm 1.15	****	+****	+****	ns
Fungus	<i>E. coli</i>	Antibiotic results	19 \pm 1.52	13 \pm 0.00	13 \pm 0.00	18 \pm 0.00	—
		<i>L. canescens</i>	16 \pm 1.52	*	+	+	ns
		<i>L. peltata</i>	17 \pm 0.57	ns	+**	+**	ns
	<i>P. aeruginosa</i>	Antibiotic results	19 \pm 0.00	—	14 \pm 1.15	8 \pm 0.00	—
		<i>L. canescens</i>	17 \pm 1.15	*	N/A	+**	+****
		<i>L. peltata</i>	15 \pm 1.00	-.***	N/A	ns	+****
Fungus	<i>K. pneumonia</i>	Antibiotic results	19 \pm 1.73	16 \pm 0.57	10 \pm 0.00	19 \pm 1.73	—
		<i>L. canescens</i>	—	N/A	N/A	N/A	N/A
		<i>L. peltata</i>	18 \pm 1.00	ns	ns	+****	ns
	<i>Y. lipolytica</i>	Antibiotic results	—	—	—	—	21 \pm 0.00
		<i>L. canescens</i>	30 \pm 1.00	N/A	N/A	N/A	+****
		<i>L. peltata</i>	23 \pm 1.00	N/A	N/A	N/A	+
Fungus	<i>C. albicans</i>	Antibiotic results	—	—	—	—	23 \pm 1.52
		<i>L. canescens</i>	26 \pm 1.73	N/A	N/A	N/A	ns
		<i>L. peltata</i>	26 \pm 0.57	N/A	N/A	N/A	ns
	<i>S. cerevisiae</i>	Antibiotic results	—	—	—	—	—
		<i>L. canescens</i>	19 \pm 0.57	N/A	N/A	N/A	N/A
		<i>L. peltata</i>	20 \pm 0.57	N/A	N/A	N/A	N/A

N/A; Not Available, —; Inhibition zone not formed, +; shows a higher antimicrobial effect than antibiotics. *; was used as a symbol of statistical significance in the comparison of antimicrobial effects, *P<0.05 (significant); **P<0.01 (very significant); ***P<0.001 and ****P<0.0001 (extremely significant); nsP>0.05 (not significant), All data are shown as Mean \pm SD (n=3); All p values are derived from Dunnett's multiple comparisons test, One Way ANOVA

3.3. *In vitro* antioxidant studies

Total antioxidant activities of the extract and standards were performed by measuring one time per 10 hours at 500 nm. The measurements were terminated with the maximum absorbance of control. The extracts showed the most important activity at a concentration of 100 µg/mL. The change in total antioxidant activity for 40 hours is shown in Figure 1a. The line graph of total antioxidant activity was given in supplemental data Figure 1a. The calculations were determined according to the following equation (2) and the definitions of the parameters used in the equation are as follows; A_{sample} : the value of sample absorbance when the control absorbance reached to maximum and $A_{control}$: the value of control absorbance when control absorbance reached the maximum.

$$\text{Lipid Peroxidation Inhibition (\%)} = 100 - \left(\frac{A_{sample}}{A_{control}} \times 100 \right) \quad (2)$$

The peroxidation percentages of linoleic acid emulsion for 100 µg/mL were as follows; *L. canescens* and *L. peltata*: 73.25% and 75.32%, respectively and standard antioxidants (BHT, BHA, and α -Toc) 72.76%, 72.34%, 57.87%, respectively (Figure 1a).

Iron reduction activity for different concentrations of extracts were tested and statistical analysis for 100 µg/mL having the most effect was performed (Figure 1b). Accordingly, iron reduction results were listed as follows; BHA > *L. peltata* > BHT > α -Toc > *L. canescens*. The other results were present in supplemental data Figure 1b.

Cupric reduction capacities for different concentrations of extracts and standards were determined at 505 nm. Consequently, cupric ion reduction capacity increased depending on the extract concentration and the statistical comparison was performed for 75 µg/mL concentration results having the most important effect. The results and statistical evaluation are present in Figure 1c. Eventually, the cupric reduction capacity of *L. peltata* EtOH extract was found to be particularly similar to α -Toc. However, the cupric ion reduction capacity of *L. canescens* EtOH extract was lower than all standards. The other concentration results were given in supplemental data Figure 1c.

ABTS radical scavenging activities for two concentration (50 µg/mL and 100 µg/mL) were measured. Although the results of both concentrations were close to the standards, statistical evaluation was performed for 100 µg/mL results due to the optimum dose in such studies. Accordingly, ABTS radical scavenging percentages and rankings for 100 µg/mL were as follows; BHT (96.16%) \geq α -Toc (96.15%) \geq BHA (96.04%) \geq *L. peltata* (95.86%) \geq *L. canescens* (95.50%) (Figure 1d). 50 µg/mL results are present in the supplemental data Figure 1d.

DPPH radical scavenging activities were tested for different concentrations (25 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL) and the best effects were observed for 100 µg/mL concentration known as optimum dose (Figure 1e). Statistical comparison was performed for 100 µg/mL concentration and especially the DPPH radical scavenging activity of *L. peltata* EtOH extract was found to be significantly close to the standards. However, DPPH radical scavenging activity of *L. canescens* EtOH extract was significantly lower than standards (Figure 1e). DPPH radical scavenging percentages were as follows; BHA (91.74%) \geq α -Toc (91.23%) \geq *L. peltata* (90.67%) \geq BHT (90.50%) > *L. canescens* (75.56%). The other concentration results were present in supplemental data Figure 1e.

3.4. DNA protection activity results

Protective effects of different concentrations of extracts on pBR322 plasmid DNA were tested using agarose gel electrophoresis (Figure 2). Contrary to the destruction of DNA in the samples with H₂O₂ alone, it was observed that form I and II structures were stabilized in the samples with only DMSO as pure DNA sample. As a result, *L. canescens* extract did not remove the harmful effect of H₂O₂ even when applied alone (Line 5, 6, 7) and did not have an important positive effect on DNA stabilization (Line 8, 9, 10). As seen in the results of the study, when H₂O₂ was applied alone, form I was erased (Figure 2 Line 2), but preserved when *L. peltata* extract was added on the same sample (Figure 2 Line 11).

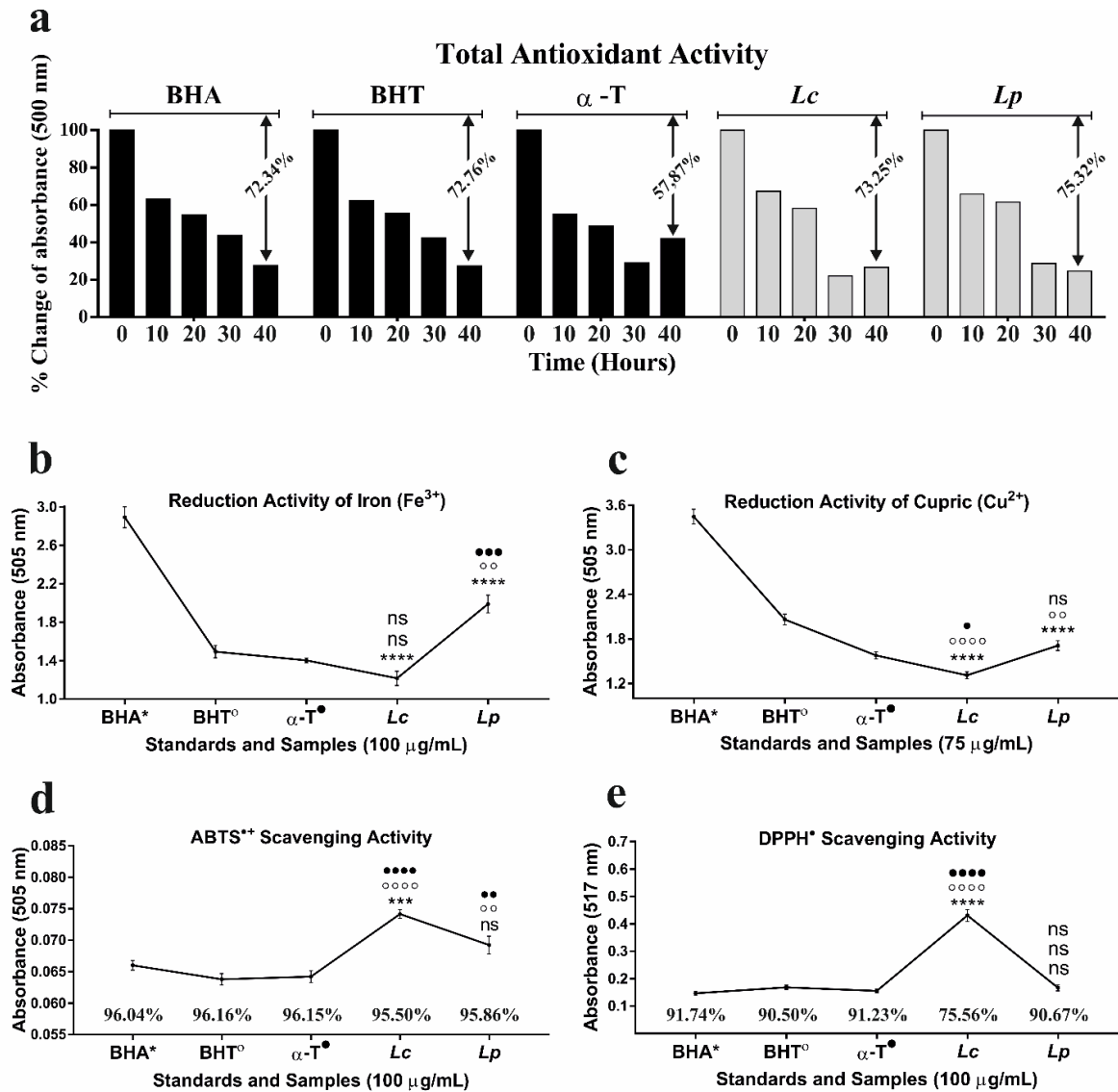


Figure 1. Graphs of *in vitro* antioxidant studies a) Total antioxidant activity by thiocyanate method, b) Fe³⁺ reducing power by FRAP, c) Cu²⁺ reducing power by CUPRAC, d) ABTS radical scavenging activity and percentages, e) DPPH radical scavenging activity and percentages. Standard antioxidants; BHA (Butylated hydroxytoluene), BHT (Butylated hydroxytoluene) and α-Toc (Alpha tocopherol) Extracts; *Lc* (*L. canescens*), *Lp* (*L. peltata*). All data are shown as Mean±SEM (n=3); All p values are derived from Dunnet's multiple comparisons test, One Way ANOVA *; Symbol of statistical significance in comparison of BHA and extracts; °; symbol of statistical significance in comparison of BHT and extracts; °; Symbol of statistical significance in comparison of α-T and extracts; *°/°P<0.05 (significant); **°/°°P<0.01 (very significant); ***°/°°°P<0.001 and ****°/°°°°P<0.0001 (extremely significant). The symbols are also shown as the exponent of standard antioxidants

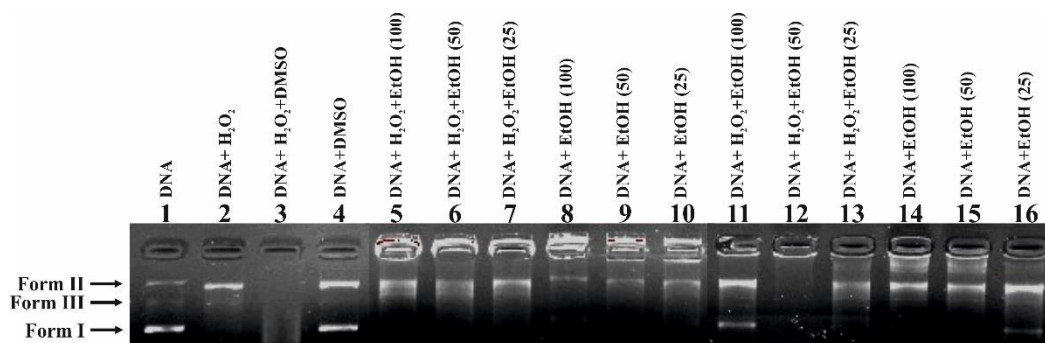


Figure 2. Visualization of the effects of *L. canescens* (Line 5-10) and *L. peltata* (Line 11-16) on DNA by Agarose Gel Electrophoresis, The numbers in parentheses are the concentrations of extracts used in the preparation phase of the electrophoresis solution, EtOH: Ethanol extract

4. Conclusions and discussion

4.1. Quantitative analysis of Phenolic contents

In total phenolic concentration, it is clear that *L. canescens* extract is richer than *L. peltata* extract. However, this result was not observed in several *in vitro* antioxidant activities and DNA protective activity results. Biological activity studies are of great importance in the scientific world as they are often a starting point for advance studies. A study performed emphasized that high concentration of rosmarinic acid (4.23 mg/g) and the presence of caffeic acid (0.19-0.62 mg/g) in the *Lamiaceae* family [6] and another study again emphasized the high concentration of rosmarinic acid and the absence of caffeic acid [10]. A study reported that phenolic contents and their concentration may vary according to the extract type [30]. The reason for the differences in phenolic and their concentrations in this study may be the differences in plant species and solvents used and this difference may allow the usage of the plants in different scientific fields, the production of new active substances, and the treatment of new diseases.

4.2. Antimicrobial activities of extracts

Both plant extracts were found to be more effective on fungal media than bacterial media. The antibiotics except for fluconazole were shown to be partially effective on fungal media. In addition, higher inhibition diameters were observed on fungal media treated with 150 μ L volume of the plant extracts. This data may be proof that plants can be used in the treatment of some fungal diseases or a new beginning point for pharmaceutical industry studying on the treatment of microbial disease. A study on a genus of *Lallementia* reported that the extracts other than water extract have antibacterial activity [22] and showed high antibacterial activity on *B. subtilis*, *B. sphaericus* and *P. aeruginosa* [19]. Similarly, a study on *Lamiaceae* family reported that extracts prepared by using solvents other than water showed antibacterial activity [37]. It is clear that both extracts are also power antimicrobial agents and this study provides important data for advance studies performed on this field when compared with the previous studies.

4.3. *In vitro* antioxidant studies

Similarity of total antioxidant activity with the standards or higher than them at 40th hours is remarkable data and supports previous studies (Figure 1a). As a matter of fact, in a previous study, it was stated that the extracts prepared from a member of *Lamiaceae* family showed higher activity than BHA and BHT [12]. Similarly, *L. peltata* extract showed higher iron (Fe^{3+}) reduction activity other than BHA. However, the iron reduction activity of *L. canescens* extract was lower than all standards (Figure 1b). It is well known that heavy metals such as iron and copper may increase H_2O_2 production through the fenton reaction [7; 8] or by causing cellular toxicity in the cell [13]. According to this data, the high activity of the extracts in cupric and iron reduction activities may be a proof to limit cellular H_2O_2 production and this shows that the extracts are antioxidants. *L. peltata* extract showed similar positive results in the other *in vitro* studies such as total antioxidant activity, DPPH and ABTS radical reduction activities (Figure 1), and especially antifungal activity (Table 4). Although *L. canescens* extract was generally weaker than *L. peltata* extract in antimicrobial and *in vitro* antioxidant activities, it is clear that the phenolic content of *L. canescens* was quite high (Figure 3). *L. peltata* may have undetermined rich phenolic content in this study, which causes this reverse effect. Although total antioxidant activity, ABTS radical scavenging activity, and phenolic content of *L. canescens* extract were quite good, it generally showed a weaker effect compared to *L. peltata* extract (Figure 1). As a result, both plants are good antioxidants, but *L. peltata* is better. Essential oils of *S. hortensis*, a member of the *Lamiaceae* family, have been reported to exhibit lower iron reduction activity than the standards used [37]. This result is on the line of the *L. canescens* results. A similar effect was observed in cupric ion reduction activity results. When the results of ABTS radical scavenging activity are examined, it can be said that both extracts are good radical scavengers. In the previous study, it was stated that methanol extract obtained from *Ajuga reptans* Briq and *Ajuga reptans* had 70% power in the ABTS radical scavenging capacity [31]. The reason for incompatibility in our results may be due to the different solvents and plant species used. Similarly, the DPPH radical scavenging activity of *L. peltata* extract was highly similar to the standards, but *L. canescens* extract was found to be weaker. A study performed on *Salvia steminea* extract emphasized that the plant extract have lower DPPH radical scavenging activity than standards [11] and the another study emphasizes that *Origanum marorana* extract exhibited lower DPPH radical scavenging activity than standards such as BHA, BHT and ascorbic acid [12]. It can be said that the results of *L. canescens* are similar to the literature, but the *L. peltata* results showed better activity than literature. According to the *in vitro* antioxidant results, we can say that both plants are a good source of antioxidants and good antimicrobial agents. Thus, we believe that our study can provide important basic data for advance studies focusing on active substance design and drug production.

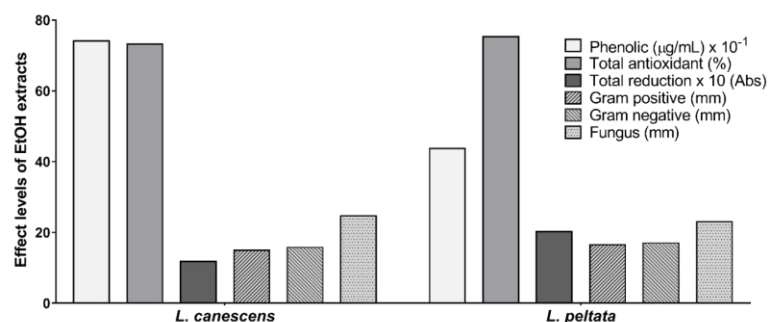


Figure 3. Various biological activity levels of EtOH extracts. The actual phenolic concentrations ($\mu\text{g/mL}$) were multiplied with 10^{-1} and actual total reduction results were multiplied with 10 to compare easily by displaying all graph columns clearly on graph. Total antioxidant results are shown as percent (%) and antibacterial effects are shown as diameter values of inhibition zones (mm).

4.4. DNA protection activity results

From the simplest compounds to the most complex molecules, many molecules can interact with DNA and disrupt its natural structure. As a result, form I structure by breaking the first strand of DNA and form II by breaking the second strand of the DNA can be occurred [38]. These construction forms were shown in Figure 2. Although these plants are expected to have power DNA protective activity due to their antioxidant properties, this effect was minimal. The reason for this may be due to insufficient antioxidant content in plants. As a data supporting this result, we have already mentioned that *L. peltata* extract was better than *L. canescens* extract in the DNA protective activity results. It may also be another molecule produced by the plant, which may inhibit the protective effect of the plants on DNA. As stated in many previous studies, plants can voluntarily produce reactive oxygen species to defend themselves against pathogens or other adverse conditions [25]. Despite the positive effect of *L. peltata* extract on the form I structure in the line 11, the absence of this effect in the line 14, 15 and 16th is quite ambiguous. Both *L. peltata* extract and H_2O_2 alone were observed to have deleterious effect on plasmid DNA, however, this effect was partially disappeared when they were added together. The minimal view of form I in Figure 2 line 16 supports to this. The phenolic content of *L. peltata* extract was observed to be dramatically lower than *L. canescens* extract (Figure 3). The reason for this may be due to the excessive height of undetermined phenolic content in *L. peltata* extract. As a matter of fact, the efficacy of *L. peltata* on form II stabilization supports this idea and both of the plants extracts did not show generally a significant protective effect on plasmid DNA damaged by H_2O_2 . This can be also attributed to an inhibitory molecule produced by plant or insufficient antioxidant content [32] reported that *Lamiaceae* family water extracts, depending on concentration, showed protective effect on the pBR322 plasmid DNA damaged by H_2O_2 and UV and essential oils of the same family were reported to have the stabilization of plasmid DNA [4]. In addition, *Leucas aspera* water extract was reported to have a protective effect on DNA [14]. In addition to the partial effect of our EtOH extracts on the stabilization of plasmid DNA, the form I was transformed into form II by an unknown effect of the high concentration of the extracts.

Acknowledgements

This study and / or authors did not receive any direct support or funding from any person or organization. We also appreciate to Muş Alparslan University Central Research and Application Center for providing laboratory facilities, Muş, Turkey.

References

- [1] Alan, Y., and Yilmaz, N. (2019). Phenolic substance contents and biological activities of verbascum insulare boiss. and heldr. Extracts. *J steroids*, 33, 35.
- [2] Baser, K. (1992). *Essential oils of Anatolian Labiatae: a profile*. Paper presented at the Wocmap I Medicinal and Aromatic Plants Conference: part 1 of 4 333.
- [3] Baytop, T. (1999). Treatment with plants in Turkey, in past and now. *J Istanbul University, Pharm. Faculty, Istanbul*, 550.
- [4] Belkhodja, H., Meddah, B., Touil, A. T., Şekeroğlu, N., and Sonnet, P. (2016). Chemical composition and properties of essential oil of rosmarinus officinalis and populus alba. *J World J. Pharm. Pharm. Sci*, 5041, 108-119.
- [5] Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *J nature*, 181(4617), 1199-1200.

- [6] Borrás-Linares, I., Stojanovic, Z., Quirantes-Pine, R., Arraez-Roman, D., Svarc-Gajic, J., Fernandez-Gutierrez, A., and Segura-Carretero, A. (2014). Rosmarinus Officinalis Leaves as a Natural Source of Bioactive Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 20585-20606. doi: 10.3390/ijms151120585
- [7] Budak, H., Gonul, N., Ceylan, H., and Kocpinar, E. F. (2014). Impact of long term Fe(3)(+) toxicity on expression of glutathione system in rat liver. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 37(1), 365-370. doi: 10.1016/j.etap.2013.12.007
- [8] Budak, H., Kocpinar, E. F., Gonul, N., Ceylan, H., Erol, H. S., and Erdogan, O. (2014). Stimulation of gene expression and activity of antioxidant related enzyme in Sprague Dawley rat kidney induced by long-term iron toxicity. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 166, 44-50. doi: 10.1016/j.cbpc.2014.07.002
- [9] Cao Shu, B. J. F. o. C., Lamiaceae. (1994). *Lallemantia L.* 17, 133-134.
- [10] Cocan, I., Alexa, E., Danciu, C., Radulov, I., Galuscan, A., Obistoiu, D., . . . Dehelean, C. A. (2018). Phytochemical screening and biological activity of Lamiaceae family plant extracts. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(2), 1863-1870. doi: 10.3892/etm.2017.5640
- [11] Colak, N. U., Yildirim, S., Bozdeveci, A., Yayli, N., Coskuncelebi, K., Fandakli, S., and Yasar, A. (2018). Essential Oil Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Salvia staminea. *Records of Natural Products*, 12(1), 86-94. doi: 10.25135/rnp.08.17.03.013
- [12] Duletic-Lausevic, S., Aradski, A. A., Kolarevic, S., Vukovic-Gacic, B., Oalde, M., Zivkovic, J., . . . Marin, P. D. (2018). Antineurodegenerative, antioxidant and antibacterial activities and phenolic components of Origanum majorana L. (Lamiaceae) extracts. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 91, 126-134. doi: 10.5073/Jabfq.2018.091.018
- [13] Fu, P. P., Xia, Q. S., Hwang, H. M., Ray, P. C., and Yu, H. T. (2014). Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22(1), 64-75. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.005
- [14] Guha, G., Rajkumar, V., Mathew, L., and Kumar, R. A. (2011). The antioxidant and DNA protection potential of Indian tribal medicinal plants. *Turkish Journal of Biology*, 35(2), 233-242. doi: 10.3906/biy-0906-64
- [15] Harley, R., Atkins, S., Budantsev, A., Cantino, P., Conn, B., Grayer, R., . . . Morales, R. (2004). The families and genera of vascular plants. *J Labiatae*, 6, 241-242.
- [16] Hashemi, S. A., Madani, S. A., and Abediankenari, S. (2015). The Review on Properties of Aloe Vera in Healing of Cutaneous Wounds. [Review]. *Biomed Res Int*, 2015, 714216. doi: 10.1155/2015/714216
- [17] Hindler, J. (1992). Tests to assess bactericidal activity. *J Clinical microbiology procedures handbook*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 5.16.
- [18] Kalaycıoğlu, A., and Öner, C. (1994). Investigation of Antimutagenic Effects of Some Plant Extracts using Ames-Salmonella Test System. *Turkish Journal of Botany*, 18, 117-122.
- [19] Karami, L., Ghahtan, N., and Habibi, H. (2017). Antibacterial Effect of Plantago Ovata and Lallemantia Iberica Seed Extracts against Some Bacteria. *J Research in Molecular Medicine*, 5(3), 32-36.
- [20] Khan, M. A., Khan, M., and Uslu, O. S. (2019). Caralluma tuberculata-An important medicinal plant to be conserved. *Biological Diversity and Conservation*, 12(1), 189-196.
- [21] Kocpinar, E. F., Gonul Baltaci, N., Ceylan, H., Kalin, S. N., Erdogan, O., and Budak, H. (2019). Effect of a Prolonged Dietary Iron Intake on the Gene Expression and Activity of the Testicular Antioxidant Defense System in Rats. *Biol Trace Elem Res*. doi: 10.1007/s12011-019-01817-0
- [22] Mahmood, S., Hayat, M. Q., Sadiq, A., Ishtiaq, S., Malik, S., and Ashraf, M. (2013). Antibacterial activity of Lallemantia royleana (Benth.) indigenous to Pakistan. *J African journal of microbiology research*, 7(31), 4006-4009.
- [23] Mantle, D., Anderton, J. G., Falkous, G., Barnes, M., Jones, P., and Perry, E. K. (1998). Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application to analysis of medicinal plant essential oils. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, 121(4), 385-391. doi: Doi 10.1016/S0305-0491(98)10120-7
- [24] Mitsuda, H. (1966). Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *J Eiyo to shokuryo*, 19, 210-221.
- [25] O'Brien, J. A., Daudi, A., Butt, V. S., and Bolwell, G. P. (2012). Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. *Planta*, 236(3), 765-779. doi: 10.1007/s00425-012-1696-9
- [26] Rivera Nunez, D., Obon, D., and Gastro, C. (1992). The ethnobotany of Lamiaceae of old world. *J Advances in Lamiaceae Science. Royal Botanical Gardens, Kew*, 455-473.
- [27] Sagdic, O., Karahan, A., Ozcan, M., and Ozkan, G. (2003). Note: effect of some spice extracts on bacterial inhibition. *J Food Science Technology International*, 9(5), 353-358.
- [28] Seal, T. (2016). Quantitative HPLC analysis of phenolic acids, flavonoids and ascorbic acid in four different solvent extracts of two wild edible leaves, Sonchus arvensis and Oenanthe linearis of North-Eastern region in India. *J Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 6(2), 157-166.

- [29] Siddall, T. L., Ouse, D. G., Benko, Z. L., Garvin, G. M., Jackson, J. L., McQuiston, J. M., . . . Weimer, M. R. (2002). Synthesis and herbicidal activity of phenyl-substituted benzoylpyrazoles. *Pest Manag Sci*, 58(12), 1175-1186. doi: 10.1002/ps.588
- [30] Skendi, A., Irakli, M., and Chatzopoulou, P. (2017). Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 62-69. doi: 10.1016/j.jarmap.2017.02.001
- [31] Sonmez, E., and Kose, Y. B. (2017). The Total Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Endemic Species *Ajuga reptans* Briq. and *Ajuga reptans* PH Davis (Lamiaceae) from Turkey. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 51(4), 700-705. doi: 10.5530/ijper.51.4.103
- [32] Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., and Sarikurku, C. (2011). Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. *Fitoterapia*, 82(2), 237-246. doi: 10.1016/j.fitote.2010.10.006
- [33] Turan, N., Savci, A., Buldurun, K., Alan, Y., and Adiguzel, R. (2016). Synthesis and Chemical Structure Elucidation of Two Schiff Base Ligands, Their Iron(II) and Zinc(II) Complexes, and Antiradical, Antimicrobial, Antioxidant Properties. *Letters in Organic Chemistry*, 13(5), 343-351. doi: 10.2174/1570178613666160422161855
- [34] Wagstaff, S. J., Olmstead, R. G., and Cantino, P. D. (1995). Parsimony analysis of cpDNA restriction site variation in subfamily Nepetoideae (Labiatae). *J American Journal of Botany*, 82(7), 886-892.
- [35] Wu, L. C., Chang, L. H., Chen, S. H., Fan, N. C., and Ho, J. A. A. (2009). Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of the acetonic extract of *Osmanthus fragrans*: A potential natural and functional food flavor additive. *Lwt-Food Science and Technology*, 42(9), 1513-1519. doi: 10.1016/j.lwt.2009.04.004
- [36] Yıldırım, H., and Bektaş, E. (2019). Antifeedant Effects of Essential oil of *Mentha longifolia* subsp. *longifolia* L. HUDSON (Lamiaceae) on *Subcoccinella vigintiquatuorpuntata* L.(Coleoptera: Coccinellidae). *Biological Diversity and Conservation*, 12(2), 103-108.
- [37] Yusuf, A., Savcı, A., ÇAKMAK, B., and Havva, K. (2016). Determination of The Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Satureja hortensis* Ingredients. *J Yüzüncü Yıl University, Institute of science journal*, 21(2), 167-177.
- [38] Zhang, H., Barcelo, J. M., Lee, B., Kohlhagen, G., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C., and Pommier, Y. (2001). Human mitochondrial topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(19), 10608-10613. doi: 10.1073/pnas.191321998

(Received for publication 23 September 2019; The date of publication 15 December 2019)



Fruit and seed morphology of some *Alyssum* (Brassicaceae) taxa from Anatolia

Emrah ŞİRİN*¹

ORCID: 0000-0003-3408-7186

¹ Department of Biology, Science Faculty, Selçuk University, Konya, Turkey

Abstract

The fruit and seed morphologies of five taxa (*Al. desertorum* Sapf., *Al. linifolium* Stephan ex. Willd. var. *teheranicum* Bornm., *Al. minus* (L.) Rothm. var. *minus*, *Al. strigosum* Banks & Sol. subsp. *cedrorum* (Schott & Kotschy) and *Al. strigosum* Banks & Sol. subsp. *strigosum*) belonging to *Alyssum* L. were investigated with scanning electron microscopy (SEM) in order to determine the significance of fruit and seed features as taxonomic characters. This study presents macro- and micromorphological characters, including seed shape, winged, measures, epidermal cell pattern and fruit shape, colour, measures, trichome morphology. Three epidermal cell patterns were observed; micro-reticulate, normal-reticulate, rugose-foveate and the same number trichome morphologies were distinguished; glabrous, monomorphic (stellate), dimorphic (bifurcate and stellate). The results showed that the morphological characteristics of fruit and seed could be used as criteria to distinguish taxa.

Key words: *Alyssum*, Brassicaceae, Fruit, Micromorphology Seed, Silicula

----- * -----

Anadolu'dan bazı *Alyssum* (Brassicaceae) taksonlarının meyve ve tohum morfolojisi

Özet

Alyssum L. cinsine ait olan beş taksonun (*Al. desertorum* Sapf., *Al. linifolium* Stephan ex. Willd. var. *teheranicum* Bornm., *Al. minus* (L.) Rothm. var. *minus*, *Al. strigosum* Banks & Sol. subsp. *cedrorum* (Schott & Kotschy) ve *Al. strigosum* Banks & Sol. subsp. *strigosum*) meyve ve tohum morfolojileri, taramalı electron mikroskobu (SEM) ile incelenerek taksonomik karakter olarak önemleri belirlendi. Makro- ve mikromorfolojik karakterleri, tohum şekli, kanatı, ölçüsü, epidermal hücre modeli ve meyve şekli, rengi, büyüklüğü, tüy morfolojisi incelendi. Üç epidermal hücre modeli; mikro-retikulat, normal-retikulat, rugoz-foveat gözlemlendi ve aynı sayıda tüy morfolojisi; tek morfolojili (stellat), çift morfolojili (bifurkat ve stellat) tespit edildi. Sonuçlar meyve ve tohumların morfolojik karakterlerinin taksonların ayırımında kullanılabileceğini göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Alyssum*, Brassicaceae, meyve, mikromorfoloji, silikula, tohum

1. Giriş

Brassicaceae familyası dünyada 372 cins ve 4060 tür, Türkiye'de ise 85 cins ve 567 takson içerir [1]. Ekonomik ve bilimsel açıdan önemlidir [2]. Brassicaceae'nin oymak (Tribus) düzeyinde sınıflandırılması problemlidir çünkü bu seviyede geleneksel olarak kullanılan karakterler çok az sayıdadır. Bu karakterler cins içerisinde değişkendir ve oymaklar ile cinsler arasındaki dağılım modelleriyle çatışır ve bundan dolayı doğal grupları desteklemez [3].

Alyssum cinsi özellikle Avrupa, Güneybatı Asya ve Kuzey Afrika'da yayılış gösterir [4,5]. Bununla birlikte birkaç tür Orta Asya, Sibirya ve Kuzey Amerika'da dağılmıştır [6,7]. Cins Türkiye Florası'nda 89 taksonla temsil edilirken [8] daha sonra bu sayı 99'a yükselmiş [9] ve *Alyssum amasianum* da tanımlanmasına [10] 100'e ulaşmıştır.

Sistematikçilerin çoğu Angiosperm taksonlarının sınıflandırılması için meyve ve tohumların makro- ve mikro yapılarıyla alakalı bilgilerin çok önemli oldukları konusunda hemfikirdir. Sistematik problemlerin çözümünde taramalı

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903322231881; Fax.: +903322231881; E-mail: emrahsirin@selcuk.edu.tr

elektron mikroskobu (SEM)'nin etki ve önemine dikkat çekilmiştir [11]. Son zamanlarda SEM'in meyve ve tohum yüzeyine uygulanışı oldukça yaygınlaşmıştır. Brassicaceae familyasıyla ilgili tohumların ekzo- ve endomorfik karakterleri ile ilgili çalışmalar mevcuttur [3, 12, 13, 14, 15, 16].

Tüy morfolojisi de ayrıca Brassicaceae'nin sınıflandırılmasında birçok yazar tarafından bir karakter olarak kullanılmıştır [17, 18,19].

2. Materyal ve yöntem

Çalışma materyalini 2018'de Türkiye'de doğal habitatlarından toplanan *Alyssum* cinsine ait 5 taksonun olgun tohum ve meyveleri oluşturmaktadır. Örnekler Konya Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumu (KNYA)'nda depolanmıştır. Çalışılan taksonların lokaliteleri ve toplayıcı numaraları Tablo 1'de verilmiş, tohum ve meyve mikromorfolojik karakterleri sırasıyla Tablo 2 ve Tablo 3'de gösterilmiştir. Çalışmalar esnasında her taksondan 100'er tohum ve meyve incelenmiştir.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizlerinde kullanılan örnekler öncelikle alkol serilerinden (sırasıyla %70, %80, %96 ve %100'lük ve her seride 20'şer dakika) geçirildi. Daha sonra altınla kaplanıp ZEISS EVO LS-10 model elektron mikroskobunda yüksek vakum modunda 30x, 1000x ve 2000x'lik büyütmelemlerle yüzey gözlemleri yapıp fotoğraflanmıştır.

Tohum mikromorfolojisi terminolojisi [20, 21, 22] çalışmalarına göre yapılırken, meyve mikromorfolojisinde ise [23,24] referans alınmıştır.

Tablo 1. Taksonlar ve toplandığı lokaliteler

Takson	Lokalite
<i>Al. desertorum</i>	C2 Antalya: Elmalı, Avlan Gölü kuzey tarafı, <i>Cedrus libani</i> açıklıkları, 1700 m, 19.04.2018, E. Şirin 712 & H. Günel (KNYA)
<i>Al. linifolium</i> var. <i>teheranicum</i>	C4 Konya: Selçuk Üniv. kampüsü, Ziraat Deresi kuzeydoğusu, <i>Pinus nigra-C. libani</i> fidanlığı içleri, 1050 m, 07.04.2018, E. Şirin 677 & H. Günel (KNYA)
<i>Al. minus</i> var. <i>minus</i>	C4 Konya: Seydişehir, Kuyucak Köyü'nün kuzeyi, kayalık alanlar, 1450 m, 11.04.2018, E. Şirin 700 & H. Günel (KNYA)
<i>Al. strigosum</i> subsp. <i>cedrorum</i>	C4 Konya: Çumra-Bozkır yolu 15. km, tarla kenarı, 1020 m, 08.04.2018, E. Şirin 680 & H. Günel (KNYA)
<i>Al. strigosum</i> subsp. <i>strigosum</i>	C4 Konya: Seydişehir, maden ocakları doğusu, <i>Abies cilicica</i> açıklıkları, 1550 m, 11.04.2018, E. Şirin 693 & H. Günel (KNYA)

3. Bulgular

Çalışılan beş taksona ait tohum ve meyve mikrografları Şekil 1 ve 2'de gösterilirken tohum ve meyveye ait makro- ve mikromorfolojik özellikler ise Tablo 2 ve 3'de verilmiştir.

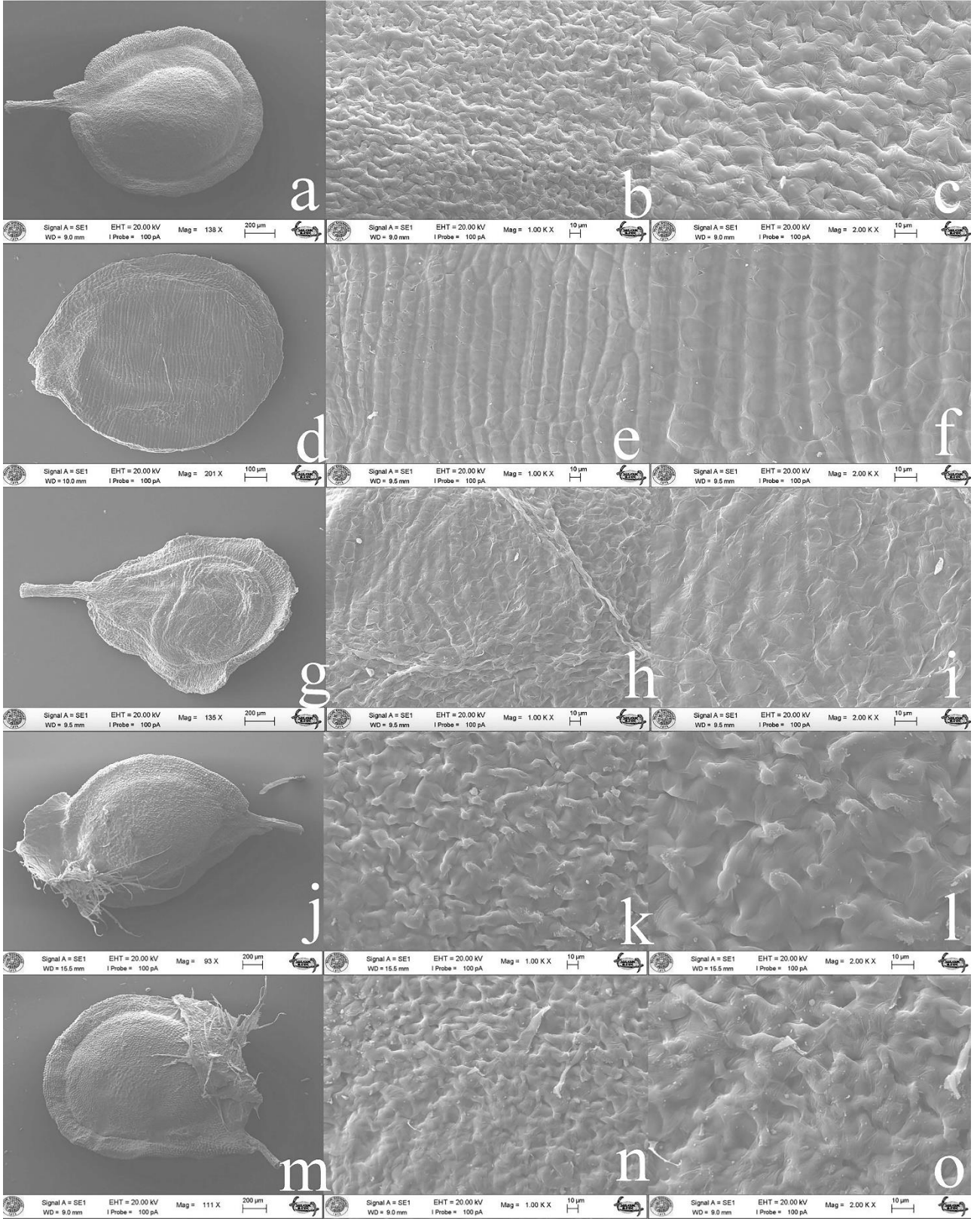
Al. desertorum Stapf.: Tohum orbikular, kanatlı, kahverengi, 1.1—1.3 x 0.9—1 mm ve mikro-retikulat (Tablo 2, Şekil 1). Meyve orbikular, koyu kahverengi, 2.9—3.5 x 2.7—3.1 mm ve tüysüz (Tablo 3, Şekil 2).

Al. linifolium Stephan ex. Willd. var. *teheranicum* Bornm.: Tohum orbikular, kanatsız, kahverengi, 0.9—1.1 x 0.7—0.8 mm ve normal retikulat (Tablo 2, Şekil 1). Meyve obovat, koyu kahverengi, 3.3—4.3 x 2.2—2.6 mm ve tüysüz (Tablo 3, Şekil 2).

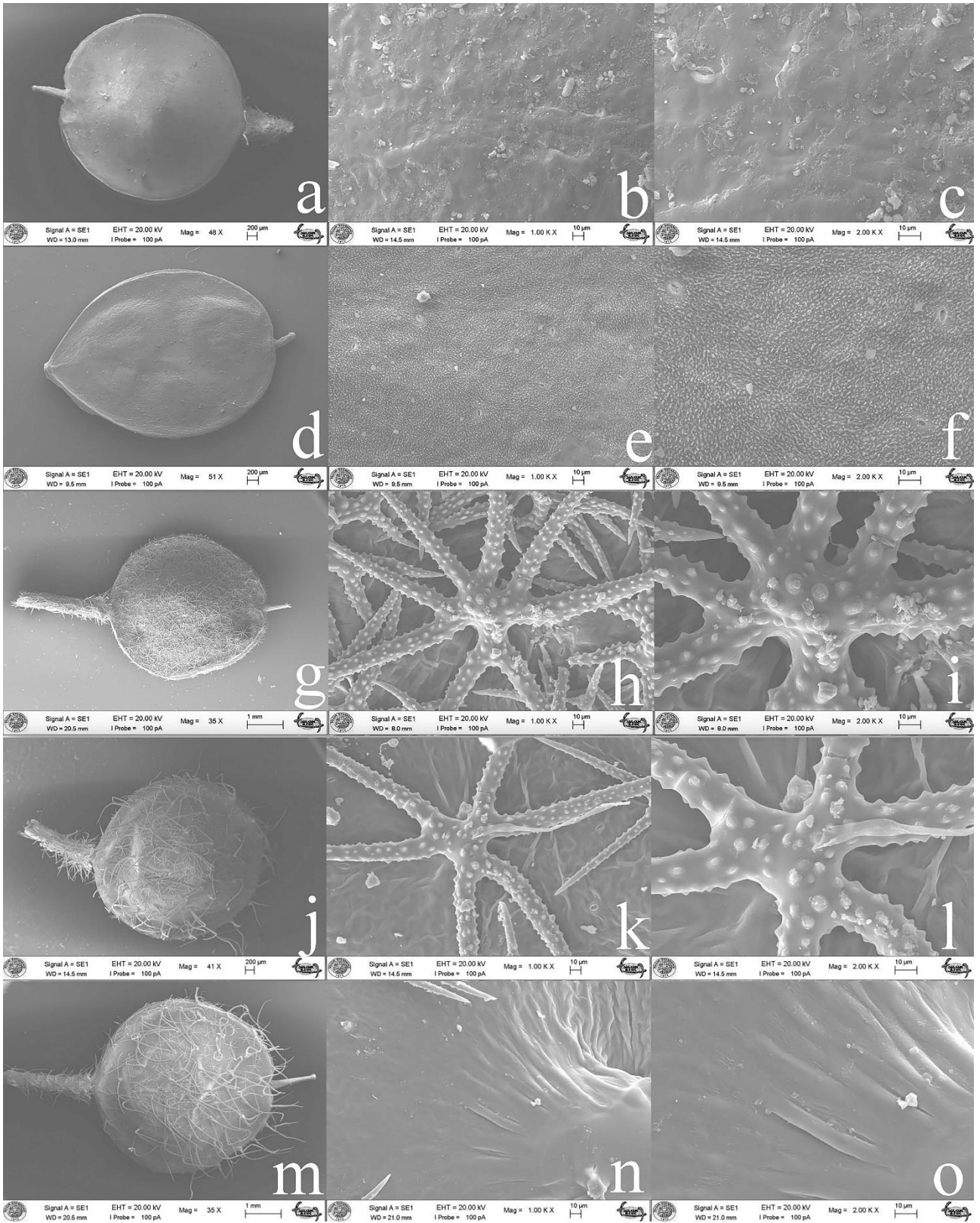
Al. minus (L.) Rothm. var. *minus*: Tohum ovat, kanatlı, kahverengi, 1—1.2 x 0.8—1 mm ve normal retikulat (Tablo 2, Şekil 1). Meyve orbikular, sarımsı kahverengi, 3—3.9 x 2.8—3.2 mm, eşit veya eşit olmayan 8—10 koluyla küçük veya büyük stellat tüylü (Tablo 3, Şekil 2).

Al. strigosum Banks & Sol. subsp. *cedrorum* (Schott & Kotschy) Dudley: Tohum ovat, kanatlı, kahverengi, 1.3—1.5 x 1.1—1.2 mm ve rugoz-foveat (Tablo 2, Şekil 1). Meyve orbikular, sarımsı kahverengi, 5.3—6 x 3.9—4.7 mm, tabanda tüberküllü ve kolları eşit olmayan bifurkat ve 6—8 kollu yatık stellat tüylü (Tablo 3, Şekil 2).

Al. strigosum Banks & Sol. subsp. *strigosum*: Tohum ovat, kanatlı, kahverengi, 1.5—1.6 x 1.2—1.4 mm ve rugoz-foveat (Tablo 2, Şekil 1). Meyve orbikular, sarımsı kahverengi, 3.7—4.2 x 3.3—3.9 mm, tabanda tüberküllü ve kolları eşit olmayan bifurkat ve 6—8 kollu yatık stellat tüylü (Tablo 3, Şekil 2).



Şekil 1. Taksonlara ait tohumların mikrografları: *Al. desertorum* (a-Genel görünüm, b-1000x'lik büyütme, c-2000x'lik büyütme), *Al. linifolium* var. *teheranicum* (d-Genel görünüm, e-1000x'lik büyütme, f-2000x'lik büyütme), *Al. minus* var. *minus* (g-Genel görünüm, h-1000x'lik büyütme, i-2000x'lik büyütme), *Al. strigosum* subsp. *cedrorum* (j-Genel görünüm, k-1000x'lik büyütme, l-2000x'lik büyütme) ve *Al. strigosum* subsp. *strigosum* (m-Genel görünüm, n-1000x'lik büyütme, o-2000x'lik büyütme)



Şekil 2. Taksonlara ait meyvelerin mikrografları: *Al. desertorum* (a-Genel görünüm, b-1000x'lik büyütme, c-2000x'lik büyütme), *Al. linifolium* var. *teheranicum* (d-Genel görünüm, e-1000x'lik büyütme, f-2000x'lik büyütme), *Al. minus* var. *minus* (g-Genel görünüm, h-1000x'lik büyütme, i-2000x'lik büyütme), *Al. strigosum* subsp. *cedrorum* (j-Genel görünüm, k-1000x'lik büyütme, l-2000x'lik büyütme) ve *Al. strigosum* subsp. *strigosum* (m-Genel görünüm, n-1000x'lik büyütme, o-2000x'lik büyütme)

Tablo 2. Taksonlara ait tohumların makro- ve mikromorfolojik karakterleri

Takson	Şekil	Kanat	Ölçü (mm)	Epidermal Hücre Modeli
<i>Al. desertorum</i>	Orbikular	Kanatlı	1.1—1.3 x 0.9—1	Mikro-retikulat
<i>Al. linifolium</i> var. <i>teheranicum</i>	Orbikular	Kanatsız	0.9—1.1 x 0.7—0.8	Normal retikulat
<i>Al. minus</i> var. <i>minus</i>	Ovat	Kanatlı	1—1.2 x 0.8—1	Normal retikulat
<i>Al. strigosum</i> subsp. <i>cedrorum</i>	Ovat	Kanatlı	1.3—1.5 x 1.1—1.2	Rugoz-foveat
<i>Al. strigosum</i> subsp. <i>strigosum</i>	Ovat	Kanatlı	1.5—1.6 x 1.2—1.4	Rugoz-foveat

Tablo 3. Taksonlara ait meyvelerin makro- ve mikromorfolojik karakterleri

Takson	Şekil	Renk	Ölçü (mm)	Tüy Morfolojisi
<i>Al. desertorum</i>	Orbikular	Koyu kahverengi	2.9—3.5 x 2.7—3.1	Tüysüz
<i>Al. linifolium</i> var. <i>teheranicum</i>	Obovat	Koyu kahverengi	3.3—4.3 x 2.2—2.6	Tüysüz
<i>Al. minus</i> var. <i>minus</i>	Orbikular	Sarımsı k.rengi	3—3.9 x 2.8—3.2	Stellat
<i>Al. strigosum</i> subsp. <i>cedrorum</i>	Orbikular	Sarımsı k.rengi	5.3—6 x 3.9—4.7	Bifurkat ve stellat
<i>Al. strigosum</i> subsp. <i>strigosum</i>	Orbikular	Sarımsı k.rengi	3.7—4.2 x 3.3—3.9	Bifurkat ve stellat

Not: Meyve ölçümlerine stilus boyu dahil değildir.

4. Sonuçlar ve tartışma

Tohum, meyve ve yaprak yüzeyi model karakterlerinin farklı familya ve cinsler için kullanışlı karakterler olduğunu SEM çalışmaları ortaya koymuştur [25, 26, 27]. Tohum yüzeyi modeli, tohum rengi ve tohum boyutları Brassicaceae'de taksonların ayırımında değerli karakterlerdir [20, 28, 29].

Yapılan çalışmada tohumlarda çoğunlukla ovat şekli gözlemlenirken, benzer durumu [30] *Alyssum* ile ilişkili olmayan *Lepidium* L. taksonlarında tespit etmiştir. *Al. linifolium* var. *teheranicum* tohumunun kanatsız oluşuyla diğer çalışılan taksonlardan kolaylıkla ayrılmaktadır. Aynı şekilde *Brassica juncea* (L.) Czern., *Eruca sativa* Mill., *Raphanus sativus* L. da kanatsız tohuma sahip türlerdir [31]. Tohum ölçülerine göre *Al. strigosum* subsp. *strigosum* en büyük tohumlara sahipken, *Al. linifolium* var. *teheranicum* en küçük tohumludur. İncelenen taksonlarda üç tip epidermal hücre modeli tespit edilirken sadece *Al. desertorum* mikro-retikulat tiptedir. *Raphanus raphanistrum* L., *Enarthrocarpus pterocarpus* (Pers.) DC., *Erucaria hispanica* (L.) Druce ve *Didesmus aegyptius* (L.) Desv. gibi bazı türlerin tohumlarının ise mikro-retikulat epidermal hücre modeline sahip olduğu belirtilmiştir [21].

Türkiye Florası'nda çalıştığımız taksonların tohumları sadece kanatlı olup olmaması yönünden incelenmişken [8] tohumların şekli, ebatları ve epidermal hücre modelleri ilk defa çalışılmıştır. Meyvelerin makro- ve mikromorfolojik karakterleri Türkiye Florası [8] ile uyumlu iken meyvedeki tüylerin kol sayıları ilk defa çalışılmıştır.

Taksonların çoğu orbikular tohum şekline sahipken *Al. linifolium* var. *teheranicum* obovat şekliyle farklılık gösterir. Bazı taksonların meyve rengi sarımsı kahverengiyken diğerleri ise koyu kahverengidir. *Al. strigosum* subsp. *cedrorum* en büyük meyvelere sahip olmasıyla diğerlerinden ayrılır. Meyvedeki tüy morfolojisi gözlemlerine göre taksonlar; tüysüz, tek morfolojili (stellat) ve çift morfolojili (bifurkat ve stellat) olmak üzere üçe ayrılmış olup sadece *Al. minus* var. *minus* tek morfolojili tüye sahiptir. [24] *Alyssum cuneifolium*'un ise tek morfolojili (stellat) meyve tüyüne sahip olduğunu gözlemlenmişlerdir

[32] *A. dasycarpum* Stephan ex. Willd., *A. turkestanicum* Regel & Schmalh. ve *A. szovitsianum* Fisch. & C. A. Mey.'un meyve boylarını 3.3–4 mm enlerini 3–3.7 mm, tohumların boylarını 1.6–2 mm enlerini ise 0.3–1.5 mm bulmuştur. *A. strigosum* subsp. *cedrorum* meyve büyüklüğü ile ayrılırken, çalıştığımız taksonların tohumları [32]'nin çalıştığı türlerin tohumlarından daha kısadır.

Sonuç olarak çalışılan karakterlerin *Alyssum* için cins bazında Brassicaceae içerisinde ayırt edici olmadıkları fakat tohumun; kanat yapısı, ölçüleri ve epidermal hücre modeli ile meyvenin; şekli, ölçüleri ve tüy morfolojisinin takson bazında ayırt edici karakterler olduğu tespit edilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışmaya 18401090 no'lu projeye maddi destek sağlayan Selçuk Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Kaynaklar

- [1] Gıdık, B., Önemli, F. & Cabi, E. (2016). Determination of wild plant species of Brassicaceae family in Turkish Thrace. *Biological Diversity and Conservation*, 9(3), 100–105.
- [2] Koch, M. A. & Mummenhoff, K. (2006). Evolution and phylogeny of the Brassicaceae. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2–4), 81–83.

- [3] Khalik, K. A., Van Der Maesen, L. J. G., Koopman, W. J. M., & Van den Berg, R. G. (2002). Numerical taxonomic study of some tribes of Brassicaceae from Egypt. *Plant Systematics and Evolution*, 233 (3-4), 207–221.
- [4] Al-Shehbaz, I. A. (1987). The genera of Alysseae (Cruciferae; Brassicaceae) in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 68(2), 185–240.
- [5] Al-Shehbaz, I. A., Beilstein, M. A. & Kellogg, E. A. (2006). Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): an overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259(2–4), 89–120.
- [6] Dudley, T. R. (1964a). Studies in *Alyssum*: near Eastern representatives and their allies, I. *Journal of the Arnold Arboretum*, 45(1), 57–100.
- [7] Dudley, T. R. (1964b). Synopsis of the genus *Alyssum*. *Journal of the Arnold Arboretum*, 45(3), 358–373.
- [8] Dudley, T. R. (1965). *Alyssum* L. In: Davis PH editor. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol. 1*. Edinburgh, UK: Edinburgh University Press, pp. 362–409.
- [9] Mutlu, B. (2012). *Alyssum* L. In: Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., Babaç, M. T. editors. *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. İstanbul: Turkey, Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını, pp. 249–256 (in Turkish).
- [10] Karabacak, O., Duran, A. & Celik, M. (2016). *Alyssum amasianum* (Brassicaceae), a new species from North Anatolia, Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 40, 402–411.
- [11] Heywood, V. H. (1971). *Scanning Electron Microscopy: Systematic and Evolutionary Applications*. London: Academic Press.
- [12] Murley, M. R. (1951). *Seeds of the Cruciferae of northeastern North America*. The American Midland Naturalist, 46, 1–81.
- [13] El-Naggar, S. M. (1996). Seed coat morphology of the Egyptian species of tribe Alysseae (Brassicaceae) and its taxonomic significance. *Bulletin of the Faculty of Science. Assiut University*, 25, 51–57.
- [14] Fayed, A. A. & El-Naggar, S. M. (1988). Taxonomic studies on Cruciferae in Egypt. 2 - Taxonomic significance of the seed sculpture in species of tribe Brassicaceae. *Tackholmia*, 11, 87–95.
- [15] Fayed, A. A. & El-Naggar, S. M. (1996). Taxonomic studies on Cruciferae in Egypt. 4. Seed morphology and taxonomy of the Egyptian species of Lepidieae. *Bulletin of the Faculty of Science. Assiut University*, 25, 43–50.
- [16] El-Naggar, S. M. & El-Hadidi, M. N. (1998). The tribe Alysseae Hayek (Brassicaceae) in Egypt. *J Union Arab Biol*, 6, 501–520.
- [17] Hayek, A. (1925). Cruciferae in Prodrum florae peninsulae balcanicae 1. *Repertorium specierum novarum regni vegetabilis*, 30(1), 370–485
- [18] Nyárády, E. I. (1955). *Alyssum* L. in: Savulescu, T. (ed.), Flora republicii populare Romîne. *București*, 3, 318–355.
- [19] Greuter, W. (1974). Note sur deux variétés grecques d'*Alyssum doerfleri* (Cruciferae) et sur la classification de quelques espèces vivaces de ce genre. *Candollea*, 29, 135–146.
- [20] Koul, K., Ranjna, N. & Raina, S. N. (2000). Seed Coat Microsculpturing in *Brassica* and Allied Genera Subtribes Brassicinae, Raphaninae, Moricandiinae). *Annals of Botany*, 86, 85–97.
- [21] El Naggar, S. M. (2005). Seed Coat Micro-Sculpturing and the Systematic of the Egyptian Brassicaceae (Magnoliopsida). *Flora Mediteranea*, 15, 581–598.
- [22] Zeng, C. L., Wang, J. B., Liu, A. H. & Wu, X. M. (2004). Seed Coat Microsculpturing Changes during Seed Development in Diploid and Amphiploid *Brassica* Species. *Annals of Botany*, 93, 555–566.
- [23] Stearn, W. T. (1992). *Botanical Latin*. David & Charles Pub, London.
- [24] Ančev, M. & Goranova, V. (2006). Trichome morphology of eleven genera of the tribe Alysseae (Brassicaceae) occurring in Bulgaria. *Willdenowia*, 36 (1), 193–204.
- [25] Kumar, V., Kodandaramaiah, J. & Rajan, M. V. (2012). Leaf and anatomical traits in relation to physiological characteristics in mulberry (*Morus* sp.) cultivars. *Turkish Journal of Botany*, 36, 683–689.
- [26] Shahi Shavvon, R., Saeidi Mehrvarz, S. & Golmohammadi, N. (2012). Evidence from micromorphology and gross morphology of the genus *Loranthus* (Loranthaceae) in Iran. *Turkish Journal of Botany*, 36, 655–666.
- [27] Akçin, Ö. E., Şenel, G. & Akçin, Y. (2013). Leaf epidermis morphology of some *Onosma* (Boraginaceae) species from Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 37, 55–64.
- [28] Vaughan, J. G. & Whitehouse, J. M. (1971). Seed structure and the taxonomy of the Cruciferae. *Botanical Journal of Linnean Society*, 64, 383–409.
- [29] Barthlott, W. (1981). Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordic Journal of Botany*, 1, 345–355.
- [30] Bona, M. (2013). Seed-coat microsculpturing of Turkish *Lepidium* (Brassicaceae) and its systematic application. *Turkish Journal of Botany*, 37(4), 662–668.
- [31] Gabr, D. G. (2018). Significance of Fruit and Seed Coat Morphology in Taxonomy and Identification for Some Species of Brassicaceae. *American Journal of Plant Sciences*, 9, 380–402.
- [32] Tursinbaeva, G. S. (2017). Morphology and Structure of Fruits of Some Desert Ephemerals of the Genus *Alyssum* L. *American Journal of Plant Sciences*, 8, 3443–3449

(Received for publication 24 January 2019; The date of publication 15 December 2019)



One health approach to decreasing biodiversity and the problem of emerging zoonotic diseases

Rüştü TAŞTAN¹, Ayşe AK CAN^{*1}
ORCID: 0000-0001-6585-1437; 0000-0002-1385-5847

¹ Kocaeli University, Kocaeli Vocational School of Health Services, Medical Laboratory Techniques Program, Kocaeli, Turkey

² Kocaeli University, Kocaeli Vocational School of Health Services, Medical Imaging Techniques Program, Kocaeli, Turkey

Abstract

In the last half century, decreasing biodiversity caused by anthropogenic factors turned into ecosystem health problem. With the decrease of biodiversity, the degradation of the ecological balance also poses a threat to public health. The damages caused by ecological and anthropogenic factors are the main triggers for the development of Emerging Zoonotic Diseases (EZDs). In this context, persistent EZDs due to multiple factors have reached more dangerous levels in terms of human, animal and environmental health. Increasing land-use changes, intensified agriculture and animal husbandry practices, global climate changes, changes in people's food consumption preferences, intensive migration from rural to urban areas, ecological distortions due to changing trade and tourism mobility are all human-induced dynamics, all of which lead to socioeconomic threats. In recent years, both ecosystem related problems resulting from the decline of biodiversity and the dynamic interactions between human, animal and environment (HAE) have made interdisciplinary cooperation more important than in the past. It has become an inevitable necessity to eliminate the accumulated Anthropocene remains in the last 150 years, to solve the health problems at the HAE-interface and to make the health and well-being of humanity sustainable. These accumulated problems of today can be solved with 'One Health' which is defined as multi-interdisciplinary understanding, joint effort and thought system which is worked on local, national, regional and global-scale in order to obtain the optimum health for humans, animals and our environment. As a result, interdisciplinary cooperation should be prioritized to solve common problems of complex health problems and threats. Therefore, the 'One Health' approach should be functionalized, institutionalized and expanded. Because exponentially growing ecological, anthropogenic disasters increase microbial threats. Therefore, in the 21st century, humanity has no more than 50 years to lose.

Key words: decreased biodiversity, emerging zoonotic diseases, one health, anthropogenic factors

----- * -----

Biyçeşitliliğin azalması ve yeniçikan zoonotik hastalıklar sorununa tek sağlık yaklaşımı

Özet

Son yarım yüzyılda antropojenik faktörlerin sebep olduğu biyçeşitliliğin azalması, ekosistem sağlığı sorununa dönüşmüştür. Biyçeşitliliğin azalmasıyla birlikte ekolojik dengenin bozulması halk sağlığı yönünden de tehdit oluşturmaktadır. Ekolojik ve antropojenik faktörlerin neden olduğu zararlar Yeniçikan Zoonotik Hastalıklar (YZH)'ı hazırlayan başlıca tetikleyicilerdir. Bu bağlamda, çoklu faktörlere bağlı olarak süregelen YZH'lar, insan hayvan ve çevre (İHÇ) sağlığı bakımından geçmişten daha tehlikeli boyutlara ulaşmışlardır. Artan oranda arazi kullanımı değişiklikleri, yoğunlaştırılmış tarım ve hayvancılık uygulamaları, küresel iklim değişiklikleri, insanların gıda tüketim tercihlerindeki değişim, kırsaldan kentlere yoğun göçler, değişen ticaret ve turizm hareketliliğine bağlı ekolojik bozulmalar insan kaynaklı dinamikler olup, bunların hepsi sosyoekonomik tehditlere yol açmaktadırlar. Son yıllarda, hem biyçeşitliliğin azalmasından kaynaklanan ekosistem ile ilgili sorunlar hem de insan hayvan çevre (İHÇ)-arayüzünde süregelen dinamik etkileşimler, geçmişten daha çok disiplinlerarası işbirliğini zorunlu hale getirmiştir. Son 150 yıllık süreçte birikmiş

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902623037842; Fax.: +902623037843; E-mail: ayse.ak@kocaeli.edu.tr

Antroposen kalıntılarını ortadan kaldırmak, İHC–arayüzündeki sağlık sorunlarını çözüme kavuşturmak ve insanlığın sağlık ve gönencini sürdürülebilir kılmak kaçınılmazdır. Günümüzün birikmiş bu sorunları, “insanlar, hayvanlar ve çevremiz için en uygun sağlık elde etmek amacıyla yerel, ulusal, bölgesel ve küresel ölçekte çalışılan çoklu disiplinlerarası anlayış, ortak çaba ve düşünce sistemi” olarak tanımlanan ‘Tek Sağlık’ ile çözümlenebilir. Sonuç olarak, devingen özellikteki karmaşık sağlık sorunları ve tehditleri “ortak düşünce ile çözmek” için disiplinlerarası işbirliği öncelenmelidir. Bu yüzden, ‘Tek Sağlık’ yaklaşımı işlevselleştirilmeli, kurumsallaştırılmalı ve yaygınlaştırılmalıdır. Çünkü katlanarak büyüyen ekolojik, antropojenik felaketler mikrobiyal tehditleri artırmaktadır. Bu yüzden, 21. yüzyılda, insanlığın kaybedecek bir 50 yılı daha kalmamıştır.

Anahtar kelimeler: biyoçeşitliliğin azalması, yeniçikan zoonotik hastalıklar, tek sağlık, antropojenik faktörler

1. Introduction

Biodiversity or biological diversity is a term that refers to the diversity of all biological systems at the molecular, organism, population, species and ecosystem levels, and includes diversity within and between species [1]. Although it may seem difficult to talk about the existence of a direct link between biodiversity and human health at first [2], studies has gained momentum about urbanization, industrial activities, climate changes, invasive species alone or their combinations that change the natural environment and biodiversity, and thus affect human health [3].

2. Biodiversity, loss of biodiversity and its effects on health

Biodiversity is potentially effective on health through 3 different mechanisms. These are positive / negative effects on physiological and psychological health values, effects on the course of chronic diseases and infectious diseases [2]. Allergy, autoimmune diseases, chronic inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease (IBD), the presence of cancer and psychiatric diseases are the main examples of these effects. Biologically diverse environments are reported to be capable of altering and enhancing the endogenous human microbiota, which is essential for the presence of a balanced and functional immune system, and thus affects human health [4-6].

Interacting with forests, urban parks and other semi-natural environments, even for a short time, improves self-confidence, mood and mental perception while reducing stress symptoms and attention deficiencies as well as physical health. Moreover, biodiversity has been suggested to be effective even in prenatal development and in the early stages of life and has a positive effect on the birth weight of infants. It should be noted that plant diversity has direct or indirect effects on reducing air pollution, which can cause allergies, asthma, cardiovascular diseases and premature births [6].

Various scientific studies on the positive effects of interacting with natural environment and biodiversity environments on human health and welfare are summarized in Table 1.

Table 1. Studies on the effects of natural environment / biodiversity on health effects

Relationship between biodiversity / natural environment and human health / welfare level	References
Physiological / Psychological / Psychiatric effects	7-11
Chronic disease and immune system effects	12-19
Infectious disease effects	20-23

In addition to the studies in Table 1, Ray and Jakubec (2014) reported in their meta-analysis that the survival of a nature-based life has therapeutic effects in cancer patients[24]. It should also be noted that the ethnobotanical-based drug development strategies still remain valid in the treatment of diseases such as cancer [25, 26]. Further animal modeling and epidemiological studies should be conducted to assess the health effects of biodiversity [6] and new strategies should be developed. On the other hand, the loss and / or reduction of biodiversity caused by various reasons leads to increased infectious disease agents in nature, transmission of pathogens at the HAE-interface, displacement of vectors and loss of our ability to fight infectious diseases [21-23].

Therefore, this review will focus on the increase of infectious disease agents due to loss and/or reduction of Biodiversity and their interactions at the HAE-interface.

3. Emerging zoonotic diseases

The concept of “emerging zoonoses” which entered the literature in the last quarter century; “An emerging zoonosis is a zoonosis that is newly recognized or newly evolved, or that has occurred previously but shows an increase in incidence or expansion in geographical, host or vector range.” [27].

In recent years, Emerging Zoonotic Diseases (EZD’s), which have caused serious problems in human and animal health, are important both in terms of clinical services and epidemiological features. In addition, EZD’s remain one of the most important health problems of the 21st century in terms of livestock economy, biosecurity and Global Health Safety [28].

Especially in the last quarter of the 150-year that is defined as the ‘Anthropocene Age’, ecological and anthropogenic factors have multiplied, the acceleration of latent potential has increased and threats have become globalized [29]. The degradation of the ecosystem and the increase in globalization due to anthropogenic reasons have accelerated the loss of species and the decrease of biodiversity. It has increased ecosystem degradation that alters infectious disease patterns, accumulation of toxic pollutants and invasion of wild species / pathogens [30].

In many areas of life, EZD’s caused by pathogens (Figure 1, Tables 3 and 4) pose a threat with dynamic interactions at the HAE-interface in the last 40-45 years. According to current data [29-35], there are two main causes of these multiple and complex threats namely ecological and anthropogenic factors.

3.1 Ecological and Anthropogenic Factors in Emerging Zoonotic Disease

In recent years, land use, climate change, human movements and animal-commodity transport are important factors that lead to regional and global spread of Re-emerging Disease and/or Emerging Zoonotic Disease [30-34]. As with all infections, it should not be ignored that the occurrence dynamics of EZDs or Re-Emerging Zoonotic Diseases are complex and involve many sectors in the prevention / protection process. In recent years, these have been the focus of increasing interest in infectious diseases, medical and veterinary services, and many other health institutions [35].

Examples of Emerging and Re-emerging Infectious Diseases

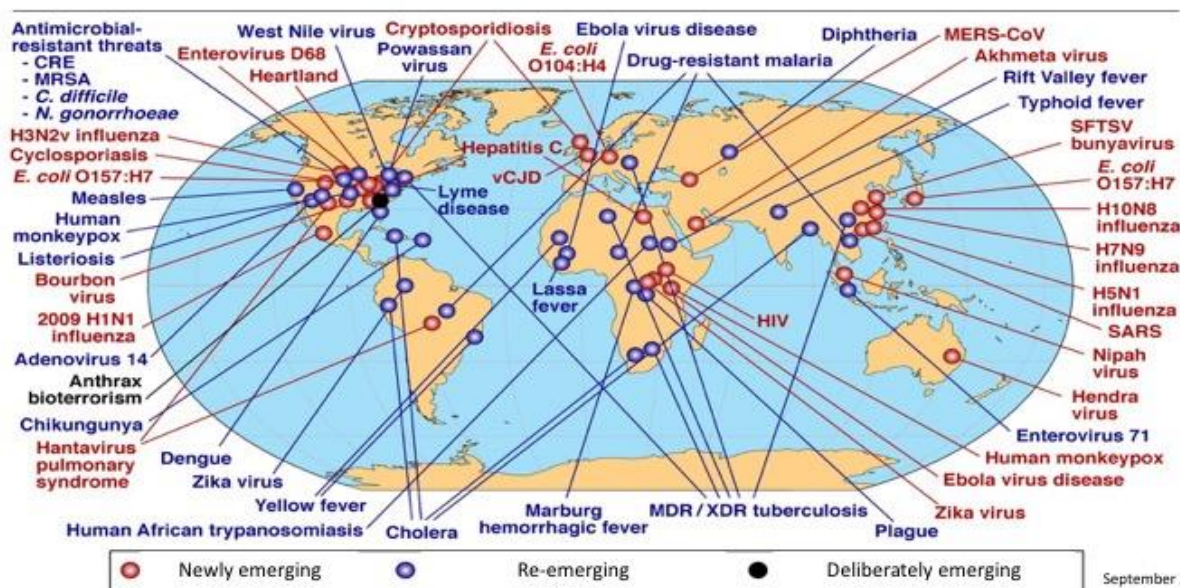


Figure 1. Emerging and Re-emerging Infectious Diseases defined by the world until 2017 (Adapted from Paules, C.I., 2017).

Most of the factors on the map are zoonotic. Red dots and blue dots respectively indicate newly identified, existing and redefined pathogens. Considering that only AIDS exists on the map in the 1980s, the identification of so many pathogens poses a serious threat to public and ecosystem health in the last 37 years. In addition, according to Morand et al. [32] report and Table 2, there is a positive relationship between the decrease of biodiversity and local / regional spread of pathogens and increase of Re-emerging disease. Therefore, as shown in the map in Figure 1 and in

Tables 2 and 3, when the effects of pathogens on human and animal health are reviewed, it is understood that there are many “preparatory factors” in the background of the increase and spread of EZD’s [33].

Table 2. Examples of reduced biodiversity and increased transmission of pathogens (Adapted from Morand, S. et al., 2014)

Host species	Location	Pathogens
Rodents	USA	Hantavirus (<i>Sin Nombre Virus</i>)
	Southeast Asia	Hantavirus (<i>Seoul Virus</i>)
	Belgium	Hantavirus (<i>Puumala Virus</i>)
	USA	<i>Bartonella spp.</i>
Rodents and other mammals	USA	<i>Borrelia burgdorferi</i> (Lyme disease)
Small mammals	USA	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>
Birds	USA	West Nile virus (BNV)
	Germany	<i>Himasthla elongata</i> (helmint)

Table 3. Some emerging pathogens endemicly located in different parts of the world (Adapted from Kilpatrick A.M., and Randolph S.E. 2012)

Pathogens	Regions at risk	Endemic region	Pathways
Japanese encephalitis virus	America	Asia	Infected livestock
Rift Valley Fever Virus	America, Mediterranean, Europe	Africa, Asia	Infected livestock
Chikungunya virus	Europe, America, Australia	Africa, Asia	Infected human
Mayaro virus	Africa, Asia, Europe	South America	Infected human
Zika virus	Europe, America	Africa, Asia	Infected human
Dengue virus	Southern Europe	Southern hemisphere	Infected human
West Nile virus	Central Europe, Turkey	Africa, Asia, Europe, Australia	Migratory birds

3.2 Ecological factors

Decreased biodiversity due to global climate change, land use and deforestation and Vector-borne Diseases (VBDs) due to disruption in the ecosystem are important issues for regional and global health [1, 2, 6, 32-36]. As shown in Figure 2, continuous and dynamic interactions at the IHC-interface in nature are important in terms of environmental changes and pathogen microorganism-host relationships. Meantime, the ongoing dynamism at the IHC-interface is valuable to predict risks arising from zoonoses.

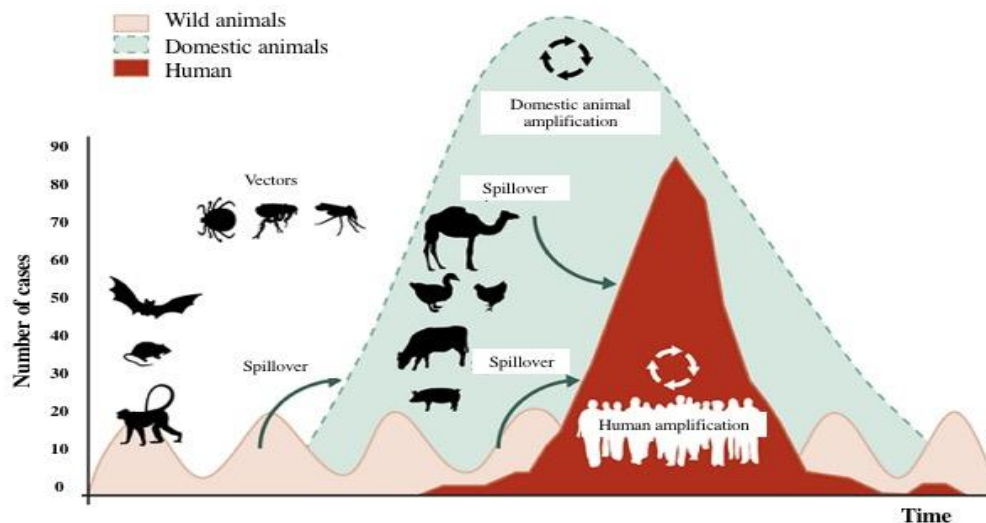


Figure 2. Ecology of emerging infectious and re-emerging infectious diseases (Adapted from Karesh, W.B., 2012)

Considering the relationships between wild animals, domestic animals and humans given in Figure 2; the ongoing dynamics of emerging infectious diseases are highly influenced by ecological factors. The red, pink and green colors in the figure represent respectively the transmission and multiplication of infections in humans, the transmission of a pathogen from wild animals to humans, the ability of the pathogen to contact and the outbreak [37].

These zoonotic risks may vary according to geography and seasons, and the results may depend on factors such as land use, weather, climate or environmental changes. Researches on the dynamics of zoonotic pathogens in wildlife reservoirs can be considered as an early warning system to report the risk of an outbreak in livestock or humans and reduce the number of human disease cases [34, 37]. In this context, characteristics of the host, pathogen and vector are largely influenced by environmental conditions. Interactions and complex health problems in Figure 2 are similar to the close relationship and interaction between human, animal and environmental health in “One Health”.

As seen in Figure 3 and Table 3, When Turkey's condition is evaluated by the data, West Nile Virus continues to be a regional problem in the European continent and the Mediterranean coastal countries in recent years. Based on the latest data, the West Nile Virus and *Sindbis virus*, which also spread with migratory birds, maintains the potential for regional risk [34, 36].

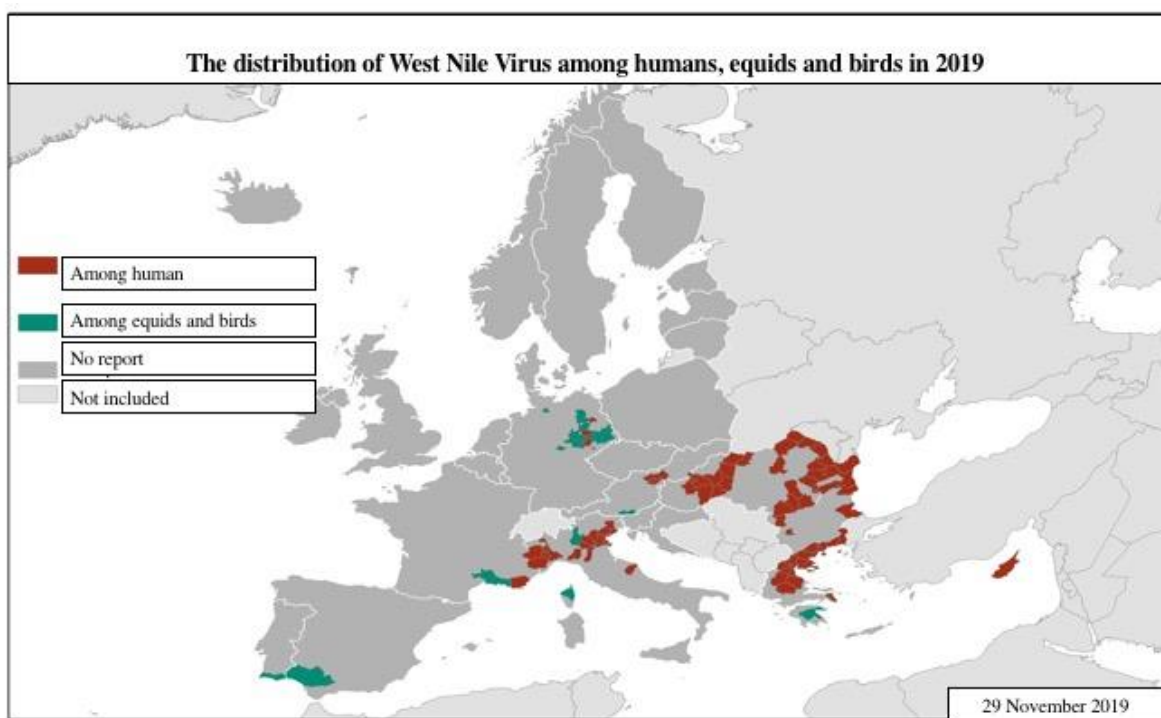


Figure 3. Outbreaks of West Nile virus between humans, equids and / or birds in European Union countries as of November 29, 2019 (Adapted from ECDC, 2019)

3.3. Anthropogenic Factors

Similar to ecological factors, humanity has caused unexpected changes in nature and the HAE-interface in the last half century. Intensified and industrialized agricultural practices, an increasing trend in tourism and travel [38] and anthropogenic factors such as expansion of trade volume, land use changes and rapidly increasing urbanization have led to the emergence of infectious diseases in certain countries or regions [39]. In this context, there is a correct relationship between the density of human population in cities and the spread of infections.

Traveling of 55% of the tourists with the aim of recreation across the continents increases the potential of the global threat of EVD pathogens such as SARS-CoV, MERS-CoV Ebola, Zika virus, and this dynamism makes unpredictable risks permanent and threatens global health safety [38, 40, 41]. A study about zoonoses problem with 'One Health' perspective reported the presence of at least more than 10 EVD pathogens in Turkey [42].

4. Emerging zoonotic diseases and “One Health” approach

Zoonotic outbreaks caused by old zoonotic pathogens (*Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella spp.*, *Rabies virus*) and emerging zoonotic pathogens (*Borrelia burgdorferi*, *Bartonella henselae*, *MERS-CoV*, *Ebola virus*, *Zika virus*) have threatened human health throughout history [33, 37, 39, 41]. The intellectual history of the idea of One Health, which protects public health from these threats, begins in the 1850s [43]. But in the current sense, the emergence of One Health concept coincides with the early years of the 21st century [2002-2004]. “One Health” is a multidisciplinary understanding and a common effort working at local, national, regional and global scale to achieve optimal health for people, animals and our environment [44]. With this comprehensive expression, “One Health” has gained importance as a transdisciplinary thinking system in order to produce solutions to “complex health problems” that arise from multifactorial reasons [40, 41, 43]. Instead of the traditional approach to health, it is recommended to functionalize the core competencies of One Health Education in the education processes to place and spread this thinking system, to take advantage of preventive and protective dynamics [45].

4. Conclusions and discussion

In the 21st century we live in, the “paradigm shift” is inevitable in order to solve the health problems related to EZDs and to avoid possible risks, which have accumulated by neglect [46]. In this context, taking into account the EZDs with ecological and anthropogenic factors, One Health does not only mean combating infections that are on the agenda in the 21st century. Based on the prediction of the future, the One Health approach includes health problems [47], Antimicrobial resistance-AMR [48], and AMR combating and surveillance systems [49] caused by global climate changes. Ecosystem health problems resulting from the rapid migration of people from rural to urban areas and distorted urbanization and the degradation / degradation of urban vegetation forced by other anthropogenic factors (reduction of green space, air pollution) affect urban ecology and lead to a decrease in biodiversity [50]. It also includes preventing the problem of anthropogenic factor-based obesity and obesogens, and preventing social threats from endocrine disrupting chemicals [51] and complex non-infectious health problems. Attempts to prevent all these health risks and reduce unforeseen infectious and non-infectious threats are possible through transdisciplinary thinking system, with interdisciplinary cooperation as a priority. This system is a ‘One Health’ thinking system and approach, which should be should functionalized, institutionalized and expanded and the system has vital importance as air and water. Today, ecological and anthropogenic disasters growing exponentially accelerate the decline of biodiversity and increase microbial threats caused by EZDs and the AMD crisis with climatic disasters. Therefore, in the 21st century, humanity has no more 50 years to lose in the 21st century. All humanity should see the coming hurricane of huge problems. The only way to prevent an impending hurricane is to institutionalize the “One Health” thought ve and transfer it to life immediately.

References

- [1] Stephens, C. & Renato, A. (2015). Focus on biodiversity, health and wellbeing, *Environ. Res. Lett.* 10, 120401. <https://doi:10.1088/1748-9326/10/12/120401>.
- [2] Sandifer, P.A., Sutton-Grier, A.E. & Ward, B.P. (2015). Exploring connections among nature, biodiversity, ecosystem services, and human health and well-being: Opportunities to enhance health and biodiversity conservation. *Ecosystem Services* 12: 1–15.
- [3] Mantler, A., Logan, A.C. (2015). Natural environments and mental health. *Advances in Integrative Medicine* (2), 5–12.
- [4] von Herten L., Beutler, B., Bienenstock, J., Blaser, M., Cani, P.D., Eriksson, J., ... M. de Vos W.(2015). Helsinki alert of biodiversity and health. *Annals of Medicine*, 47:3, 218-225.
- [5] Frumkin, H., Bratman, G.N., Breslow, S.J., Cochran, B., Kahn Jr, P.H., Lawler, J.J., Levin, P.S., ... Wood, S.A. (2017). Nature Contact and Human Health: A Research Agenda. *Environ Health Perspect.* 125(7): 075001.
- [6] Aerts, R., Honnay, O., Nieuwenhuysse, A.V. (2018). Biodiversity and human health: mechanisms and evidence of the positive health effects of diversity in nature and green spaces. *British Medical Bulletin*, 127:5–22 doi: 10.1093/bmb/ldy021.
- [7] Speldewinde, P.C., Cook, A., Davies, P., Weinstein, P. (2009). A relationship between environmental degradation and mental health in rural Western Australia. *Health & Place*, 15, 880–887.
- [8] Triguero-Mas, M., Donaire-Gonzalez, D., Seto, E., Valnetin, A., Martinez, D., Smith, G., Hurst, G., Carrasco-Turigas, G. (2017). Natural outdoor environments and mental health: Stress as a possible mechanism. *Environmental Research* 159, 629-638. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.048>.
- [9] Cryan, J.F., Dinan, T.G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behavior. *Nat Rev Neurosci.*, 13: 701–12.

- [10] Engemann, K., Pedersen, C.B., Arge, L., (2018). Childhood exposure to green space – a novel risk-decreasing mechanism for schizophrenia. *Schizophrenia Res.*, doi:10.1016/j.schres.2018.03.026
- [11] Lee, J., Park, B.-J., Tsunetsugu, Y., Kagawa, T., Miyazaki, Y. (2009). Restorative effects of viewing real forest landscapes, based on a comparison with urban landscapes. *Journal Scandinavian Journal of Forest Research*, 24: 227-234.
- [12] Mao, G., Wang, Y.C.B, Wang, S., Chen, Z., Wang, J., Xing, W., Ren, X., Lv, X., ... Yan, J., (2017). The Salutary Influence of Forest Bathing on Elderly Patients with Chronic Heart Failure. *Int. J. Environ. Res. Public Health* , 14, 368; doi:10.3390/ijerph14040368.
- [13] Kau, A., Ahern, P., Griffin, N., Goodman, A., Gordon, J. (2011). Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*, 474: 327–36.
- [14] Müller, G., Harhoff, R., Rahe C., (2018). Inner-city green space and its association with body mass index and prevalent type 2 diabetes: a cross-sectional study in an urban German city. *BMJ Open*, doi: 10.1136/bmjopen-2017-019062.
- [15] Wen, L., Ley, R.E., Volchov, P.Y., Stranges, P.B., Avanesyan, L., Stonebraker, A.C., Hu, C., Wong, S., Szot, G.L., Bluestone, J.A., Gordon, J.I., Chervonsky, A.V. (2008). Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature*, 455: 1109-1113.
- [16] Bodansky, H.J., Staines, A., Stephenson, C., Haigh, D., Cartwright, R. (1992). Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a trans migratory population. *BMJ*, 304: 1020-1022.
- [17] Barton, J., Pretty, J., (2010). What is the Best Dose of Nature and Green Exercise for Improving Mental Health? A Multi-Study Analysis. *Environ. Sci. Technol.*, 44, (10): 3947-3955. <https://doi.org/10.1021/es903183r>.
- [18] Li, Q., Morimoto, K., Kobayashi, M., Inagaki, H., Katsumata, M., Hirata, Y. (2008). Visiting a forest, but not a city, increases human natural killer activity and expression of anti-cancer proteins. *Int J Immunopathol Pharmacol.*, 21(1):117–27.
- [19] Ege, M.J., Mayer, M., Normand, A.-C., Genuneit, J., Cookson, W.O.C.M., Braun-Fahrlander, C., Heederik, D., Piarroux, R., von Mutius, E. (2011). Exposure to Environmental Microorganisms and Childhood Asthma. *N Engl J Med.*, 364:701-709, doi: 10.1056/NEJMoa1007302.
- [20] Civitello, D.J., Cohen, J., Fatima, H., Halstead, N.T., Liriano, J., McMahon, T.A., Ortega, C.N., Sauer, E.J., Sehgal, T., Young, S., Rohr, J.R. (2015). Biodiversity inhibits parasites: Broad evidence for the dilution effect. *PNAS*, 112, (28):8667-8671. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506279112>.
- [21] McCallum, H.I. (2015). Lose biodiversity, gain disease. *PNAS*, 112, (28):8523-8524. <https://doi.org/10.1073/pnas.151060711>.
- [22] Kilpatrick, A.M. (2017). Lyme disease ecology in a changing world: consensus, uncertainty and critical gaps for improving control. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160117. doi:10.1098/rstb.2016.0117.
- [23] Young, H.S., McCauley, D.J., Dirzo, R., Nunn, C.L., Campana, M.G., Agwanda, B., Otarola-Castillo, ..., Helgen, K.M., (2017). Interacting effects of land use and climate on rodent-borne pathogens in central Kenya. *Phil. Trans. R. Soc. B* 372, 20160116. (doi:10. 1098/rstb.2016.0116).
- [24] Ray, H., Jakubec, S.L. (2014). Nature-based experiences and health of cancer survivors. *Complement Ther Clin Pract.*, 20(4):188-92. doi: 10.1016/j.ctcp.2014.07.005.
- [25] Lloret, J. (2010). Human health benefits supplied by Mediterranean marine biodiversity. *Marine Pollution Bulletin*, 60: 1640-1646.
- [26] Butkus, M., (2015). All Health is Local: Biodiversity, Ethics, and Human Health. *Journal Ethics, Policy and Environment*, 18: 1-15.doi: 10.1080/21550085.2015.1016969.
- [27] World Health Organization. (2004). *Report of the WHO/FAO/OIE joint consultation on emerging zoonotic diseases / in collaboration with the Health Council of the Netherlands*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/68899>
- [28] Romanelli, C., Cooper, H.D. & de Souza Dias, B.F. (2014). The integration of biodiversity into One Health. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 33(2), 487-496.
- [29] Johnson, C.N., Balmford, A., Barry W. Brook, B.W. (2017). Biodiversity losses and conservation responses in the Anthropocene. *Science* 356, 270–275.
- [30] Aguirre, A.A., (2017). Changing Patterns of Emerging Zoonotic Diseases in Wildlife, Domestic Animals, and Humans Linked to Biodiversity Loss and Globalization. *ILAR Journal*, 1-4. doi: 10.1093/ilar/ilx035
- [31] Paules, C.I., Eisinger, R.W., Marston, H.D. & Fauci, A.S. (2017). What Recent History Has Taught Us About Responding to Emerging Infectious Disease Threats. *Ann Intern Med.* 167: 805-811. doi:10.7326/M17-2496

- [32] Morand, S., Owers, K. & Bordes, F. (2014). Biodiversity and Emerging Zoonoses. *In*. A. Yamada, L.H. Kahn, B. Kaplan, T.P. Monath, J. Woodall and L. Conti (eds.), *Confronting Emerging Zoonoses: The One Health Paradigm*. p. 27-41. Springer.
- [33] Kilpatrick, A.M. & Randolph, S.E.(2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet*,380(9857):1946–1955. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61151-9.
- [34] Jánová, E.(2019). Emerging and threatening vector-borne zoonoses in the world and in Europe: a brief update. *Pathogens and Global Health*, 113:2, 49-57.
- [35] Figuié, M. (2018). Collective action in response to emerging zoonotic diseases. *In*. S. Morand and M. Figuié(eds), *Emergence of infectious diseases, Risks and issues for societies* p.75-97, Matière.
- [36] ECDC (*The European Centre for Disease Prevention and Control*),(2019). West Nile virus in Europe in 2019 - infections among humans and outbreaks among equids and/or birds, updated 29 Nov 2019. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-virus-europe-2019-infections-among-humans-and-outbreaks-among-equids-7>
- [37] Karesh, W.B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J.O. et al., (2012). Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *Lancet*. 380(9857):1936-45.
- [38] Ala'a, A.K. & Albattat, A. (2019). Current Issue in Tourism: Disease Transmission as a Potential Risk for Travellers. *Rev Integr Business and Economics Research*, 8, Supl 4, 103-11.
- [39] Morse, S.S., Mazet, J.A.K., Woolhouse, M. et al.(2012). Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. *Lancet*, 380(9857):1956-65. doi: 10.1016/S0140-6736(12)61684-5.
- [40] Taştan, R., (2018). Yeniçikan Enfeksiyon Hastalıkları ve Turizm Ekonomisine Etkileri. *İçinde*. Karacan, S. (ed.) *Turizm Okumaları-2* s.163-196, Umuttepe Yayınları.
- [41] Bird, B.H & Jonna A.K. Mazet, J.A.K. (2018). Detection of Emerging Zoonotic Pathogens: An Integrated One Health Approach. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 6:121–39.
- [42] İnci A, Doğanay M, Özarendeli A, Düzlü Ö, Yıldırım A. (2018). Overview of Zoonotic Diseases in Turkey: The One Health Concept and Future Threats. *Türkiye Parazitoloj Derg* 42:39-80.
- [43] King L.J. (2013). Combating the triple threat: the need for a One Health approach. *Microbiol Spectrum* 1(1):OH-0012-2012.doi:10.1128/microbiolspec.OH-0012-2012. <http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.OH-0012-2012>
- [44] AVMA (*American Veterinary Medical Association*), (2008). One Health- a New Professional Imperative. June 15, 2008, Final Report. https://www.avma.org/KB/Resources/Reports/Documents/onehealth_final.pdf
- [45] Togami, E., Gardy, J.L., Hansen, G.R., Poste, G.H., Rizzo, D.M., Wilson, M.E. & Mazet, J.A.K. (2018). Core Competencies in One Health Education: What Are We Missing? <https://nam.edu/wp-content/uploads/2018/06/Core-Competencies-in-One-Health-Education-final.pdf>
- [46] Atlas, R.M, Maloy S. (2014). The future of One Health. *Microbiol Spectrum*. 2(1):OH-0018-2012. doi:10.1128/microbiolspec.OH-0018-2012.
- [47] Taştan, R. (2019). Zoonotik Tehditlerden İklimsel Afetlere Tek Sağlık Yaklaşımı Konferansı. 7 Kasım 2019, KOÜ Kocaeli Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Umuttepe. http://kshmyo.kocaeli.edu.tr/upload/etkinlikler/20-092019_11.23:07_200919071357d9cda.jpg
- [48] Taştan, R., Karadenizli, A. & Ak Can, A. (2019, November). Antimicrobial Resistance Problem at the Human Animal Environment Interface and One Health Approach. Paper presented at the International Marmara Sciences and Social Sciences Congress, Kocaeli, *Natural and Applied Sciences Proceedings E-Book*, p. 1263-1274. http://imascon.com/dosyalar/imascon2019guz/imascon_fen_bildiriler_guz_2019.pdf
- [49] Mor, S.M., Wiethoelter, A.K., Massey, P., & Eastwood, K. (2019). One Health surveillance: monitoring health risks at the human–animal–environment interface. *In*. Walton, M. (ed.) *One Planet, One Health*. (pp. 179-218). Sidney University Press.
- [50] Çakmak, M.H. & Aytaç, Z. (2018). Urban vascular flora and ecological characteristics of Mamak District (Ankara/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 11/2:123-13.
- [51] Yılmaz, O., Oymak, S. & Serpen, A. (ed), (2018). Zoonozlarla Mücadelede Veteriner Halk Sağlığı ve Tek Sağlık. TVHB İzmir Veteriner Hekimler Odası, Veteriner Halk Sağlığı Çalışma Grubu Yayını (pp. 1-64), Yayın No: 2018/1.

(Received for publication 31 November 2019; The date of publication 15 December 2019)



Economic Value Analysis of *Fritillaria imperialis* in Turkey

Aynur DEMİR^{*1}

ORCID: 0000-0002-7856-2789

¹ Aksaray University, Department of Urbanisation and Environmental Problems, Aksaray, Turkey

Abstract

In this research, economic value analysis was performed with determination of production, goods and service value functions of *Fritillaria imperialis* in Turkey. Economic valuation techniques, ecological and socio-cultural value criteria were used in the value analysis. In the study, the sum of the flow values for the service functions provided by *F. imperialis* is calculated as \$ 72.96 / year for a per unit *F. imperialis*. The total economic value of *F. imperialis* is \$ 14,592,000 / year for the 2000 000 unit which annual export quantity of *F. imperialis*. It has an annual export revenue of \$ 52,416 and this estimate value is considerably higher than the annual export revenue. When positive value added created by non-material values in the ecological and socio-cultural processes, wealth and inheritance value are added to this value, *F. imperialis*' economic value is significantly higher. In addition, biological control value of use from the value functions (\$13.6 / da / year), the conservation value (\$ 37 / da / year), the value of use as an ornamental plant (\$ 8.07 / unit/ year) and the value of use as a nutrient (\$ 3.6 /unit / year) was determined to be important. *Blue tits* have also been shown to be an extremely important pollinator for this species.

Key words: Economic valuation techniques, *Fritillaria imperialis*, biodiversity, sustainable development, Turkey

----- * -----

Türkiye'de *Fritillaria imperialis*' in Ekonomik Değer Analizi

Özet

Bu araştırmada Türkiye'de *Fritillaria imperialis*' in üretim, mal ve hizmet değer fonksiyonlarının saptanması ile ekonomik değer analizi yapılmıştır. Değer analizinde ekonomik değerlendirme teknikleri, ekolojik ve sosyokültürel değer kriterleri kullanılmıştır. Araştırmada *F. imperialis*' in sunduğu hizmet fonksiyonları için akım değeri toplamı, birim adet *F. imperialis* için 72,96 \$/yıl olarak hesaplanmıştır. *F. imperialis*' in toplam ekonomik değeri, yıllık ihracat miktarı olan 2000 000 adet *F. imperialis* için ise 14,592,000 \$/yıl'dır. Tahmin edilen bu değer *F. imperialis*' in yıllık ihracat geliri olan 52,416 \$'dan oldukça yüksektir. Bu değere, ekolojik ve sosyo-kültürel süreçlerde yer alan, maddi olarak ifade edilemeyen değerlerin yarattığı pozitif katma değer, servet ve miras değeri de eklendiğinde *F. imperialis*' in ekonomik değerinin önemli oranda yüksek olduğu görülür. Ayrıca değer fonksiyonlarından biyolojik kontrolde kullanım değeri (13,6 \$/da/yıl), koruma değeri (37\$/da/yıl), süs bitkisi olarak kullanım değeri (8,07 \$/adet/yıl) ve besin olarak kullanım değerinin (3,6 \$/adet/yıl) önemli olduğu tespit edilmiştir. *Blue tits*'in, bu tür için son derece önemli bir polinatör olduğu da ortaya konmuştur.

Anahtar kelimeler: Ekonomik değerlendirme teknikleri, *Fritillaria imperialis*, biyolojik çeşitlilik, sürdürülebilir gelişme, Türkiye

1. Giriş

Son yüzyılda sürdürülebilir gelişme politikaları kapsamında gerek ekologlar gerekse ekonomistler tarafından biyolojik çeşitliliğin ekonomik değerine yönelik çalışmaların gerekliliğine dikkat çekilmektedir. Özellikle biyolojik

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903822882505; Fax.: +903822882401; E-mail: aynurdemir_1@hotmail.com

çeşitliliğin kaynak olarak sürdürülebilir kullanımının sağlanması, tüm insanlığın bu kaynaklardan eşit ve adil olarak faydalanabilmesi ekolojik süreçlerin ekonomik süreçlerle birlikte değerlendirilmesiyle mümkündür.

Ekonomik açıdan kıt kaynaklar olarak ele aldığımız biyolojik çeşitlilikte küresel ısınma, iklim değişikliği, nüfus artışı, gıda yetersizliği gibi sorunlar hem ekolojik kayıplara hem de ekonomik değer kayıplarına neden olmaktadır. Küresel ekonominin %40'nın biyolojik süreçlerle ilgili olduğu [1] ve küresel biyolojik çeşitliliğin ekonomik değerinin 2,9 trilyon \$/yıl [2] olduğu göz önüne alınırsa biyolojik çeşitlilikteki olası bir kaybın ekonomik süreçleri ne şekilde etkilediği/etkileyeceği, olası ekonomik değer kayıpları açıkça görülebilir. Söz konusu değer kayıplarının rasyonel bir şekilde ortaya konması biyolojik çeşitliliğin ekonomik değer analizlerinin yapılması ile mümkündür.

Ekonomik değer biyolojik çeşitliliği tüm yönleriyle ele alan, biyolojik çeşitlilik ve bileşenlerinin sunduğu servis ve hizmetlerin kullanım ve kullanım dışı değerlerin toplamıdır [3]. Biyolojik çeşitliliğin kullanım değeri hammadde olarak kullanımı, gıda, tıp ve eczacılıkta kullanımı, doğa turizmi, havza ve toprak koruma, erozyonu önleme, su temini, karbon tutma vb aktivitelerden oluşurken kullanım dışı değeri ise varlık ve miras değerinden oluşur [4,5,6].

Bu yönüyle değerlendirildiğinde bitki çeşitliliğinin sunduğu hizmet ve servislerinin değeri piyasa mekanizmasında arz-talep ilişkisine göre şekillenecektir. Bitki türlerinin kamu malı niteliği taşıması, kamu mallarının da erişim kolaylığının olması, serbest mal özelliği taşıması bu türlere talebi artıracaktır. Bu durum biyolojik çeşitliliği, telafisi imkansız, geriye dönüşümü son derece güç olan tahribatla karşı karşıya bırakmakta, aynı zamanda zaman, ekolojik ve ekonomik kaynak kayıplarını da beraberinde getirmektedir.

Soğanlı bir bitki türü olan ve halk arasında “Ters lale, ağlayan gelin” olarak bilinen *Fritillaria imperialis* (*F. imperialis*) küresel olarak kuzey Irak, İran, Afganistan, Pakistan Keşmir bölgesi gibi geniş bir coğrafyada yayılış göstermektedir. Türkiye’de ise genel olarak Adıyaman, Bingöl, Bitlis, Elazığ, Gaziantep, Hakkari, Kahramanmaraş, Kayseri, Malatya, Muş, Siirt, Şırnak, Tunceli ve Van bölgelerinde yetişir [7,8]. Nisan- mayıs ayında çiçeklenir, sarıdan portakal rengine kadar değişen çiçeklerinin güzelliği nedeniyle çok sevilen ve aranan bir soğanlı bitkidir. Bu özelliği nedeniyle Avrupa’da park ve bahçelerde peyzaj uygulamalarında süs bitkisi olarak yaygın kullanılır. 1000-2500 m arasındaki kayalık yamaçlarda, çalılıklar arasında ve tarla kenarlarında yetişir [9,10,8]. Soğan ve diğer kısımlarında taşıdığı primer ve sekonder metabolitler nedeniyle de geleneksel tıpta ve modern ilaç endüstrisinde önemli ölçüde talep edilen bir bitkidir. Bu nedenle *F. imperialis*, hem süs bitkisi olarak hem de tıpta kullanılıyor olmasından dolayı piyasada arz ve talep yaratan bir “ekonomik değere” sahiptir. İktisadi açıdan metalaşan ve arz-talep ilişkisine bağlı olarak piyasada oluşan bu değer *F. imperialis*’ in gerçek değeri midir? Türün doğal habitatında ekosistemin ve ekolojik döngünün bir parçası olarak sunduğu hizmetler göz önüne alındığında oluşan piyasa değeri türün gerçek değerini karşılar mı? Bu araştırmada bu sorulara yanıt aranmıştır. Bu araştırma kapsamında *F. imperialis*’ in ekonomik ve ekolojik sistem içerisinde sunduğu mal ve hizmetler göz önüne alınarak, kullanım ve kullanım dışı değerleri doğrultusunda “toplam ekonomik değeri” belirlenmiştir. Elde edilen veriler ülke gen kaynaklarının sürdürülebilir kullanımı yönüyle rasyonel olarak değerlendirilmiştir. Bu yönüyle araştırma sonuçlarının literatüre önemli bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. Materyal ve yöntem

1.1. Verilerin Toplanması ve Analizi

Literatür verileri kullanılarak *F. imperialis*’ in öncelikli olarak ekolojik özellikleri belirlenmiştir. Ekolojik özellikleri ve bitkinin yaşadığı habitat göz önüne alınarak bitkinin ekosistem içindeki hizmet ve fonksiyonları tespit edilmiştir (Şekil 1). *F. imperialis*’ in belirlenen hizmet ve değer fonksiyonları; [11,5,12]’den uyarlanarak ve literatür bilgilerinden elde edilen veriler doğrultusunda üretim, bilgi, habitat ve ekosistem fonksiyonları, opsiyon, miras ve varlık değeri olmak üzere 7 ana kategoride ifade edilmiştir (Şekil 1). Bu kategorilerde kendi içinde alt kategorilerle temsil edilmiştir.

1.2. Verilerin Analizi

Verilerin analizinde, [11,5,12,6]’dan uyarlanarak geliştirilen, ekonomik değer yaklaşımı, ekolojik değer ve sosyokültürel değer yaklaşımları kullanılarak, *F. imperialis*’ e ait üretim, mal ve hizmetlerin nicel ve nitel olarak değer analizi yapılmıştır (Şekil 1). Niceliksel değerlemede *F. imperialis*’ in fonksiyonları parasal bir birim olarak USA \$/ha/yıl veya USA \$/Adet/Yıl olarak ifade edilmiştir. Nitel Değerleme ise, *F. imperialis*’ in ekosistem değeri, bilgi fonksiyonu değeri gibi spesifik ekolojik kriterleri belirlemede uygulanmış olup, + (Az değerli), ++ (Orta düzeyde değerli), +++ (Çok değerli) şeklinde, sözel olarak ifade edilmiştir.

1.2.1. Ekonomik değer yaklaşımı

Ekonomik değer yaklaşımında bitki türlerinin piyasa değeri, üretim fonksiyonu geliri ve koruma maliyeti göz önüne alınmıştır [11,5,12,6].

1.2.1.1. *Doğrudan piyasa analizi*: Bu yaklaşım mal ve hizmetlerin niteliksel ya da niceliksel değişim değerlerinin belirlenmesinde kullanılır [6,13]. Çevresel hasar veya gelişme, pazarlanan girdiler veya çıktılarının fiyatlarındaki değişiklik miktarı artış gösterdiği zaman, değişikliğin değeri toplam tüketici ve tüketici artanındaki değişikliklerle ölçülebilir [11,5,12]. Biyolojik kaynaklardan elde edilen mal ve hizmetlerin, özellikle piyasalarda ticareti yapılanlarının, belirli bir piyasa fiyatının olması beklenir. *F. imperialis*' de piyasada alınıp satılabilen bir ticari mal özelliği taşıdığından doğrudan pazarda oluşan parasal değeri temel alınarak ilgili ekosistem, mal ve hizmetlerin ekonomik analizi yapılmıştır.

1.2.1.2. *Koruma-önleme maliyeti*: Habitatların, biyolojik çeşitliliğin veya ekosistemlerin in-situ (alanda) veya ex-situ (alan dışı) korunmasına yönelik alınan önlemlerin ve korumanın sürdürülebilirliği için yapılan harcamaların tamamı olarak ifade edilir [12,6]. Bu bağlamda *F. imperialis*' in insitu ve exsitu koruma önlemlerinin maliyeti temel alınarak türün ilgili fonksiyonları ve hizmetleri analiz edilmiştir.

1.2.1.3. *Üretim fonksiyonu geliri*: Üretim süreci içindeki hava, su gibi piyasa dışı bir girdinin tedarikindeki değişimin fiyatı, çıktı ürünün karlılığındaki değişime gönderme yapılarak tahmin edilir. Bu yaklaşım düzenleyici ekolojik fonksiyonların ekonomik aktivitelere katkılarının tespiti ile, dolaylı kullanım değerlerinin elde edilmesi amaçlı kullanılır [12]. *F. imperialis* lokal olarak tarımsal üretimi yapılan bir ticari türdür. Bu nedenle üretime ilişkin girdi ve çıktılar göz önüne alınarak üretim fonksiyonu geliri hesaplanmıştır. Üretim fonksiyonu gelirin bireysel gelire ne kadar katkı sağladığı hane halkı geliri olarak tespit edilmiş olup, ekosistem fonksiyonları, mal ve hizmetleri değerlendirilmiştir. Bu yaklaşım iki aşamalı bir süreçten oluşur. İlk önce, çevrenin ekonomik aktiviteler üzerindeki fiziksel etkileri belirlenir. İkinci aşamada ise, ekolojik fonksiyonların parasal değeri tahmin edilir. Üretim fonksiyonu aşağıdaki gibi ifade edilir [14].

$$Q = f(K, L, N, E, \dots)$$

Üretim fonksiyonunda K,L,N,E terimleri sırası ile kullanılan sermaye, emek, toprak ve enerji miktarını gösterir. Q ise söz konusu girdilerin kullanılması ile elde edilen maksimum çıktı miktarını gösterir. Burada üretim fonksiyonu girdilerle çıktılar arasındaki parasal ilişkileri değil, fiziksel ilişkileri yansıtan bir kavramdır [14].

1.2.2. Ekolojik değer analizi yaklaşımı

Ekosistem fonksiyonlarının sürekliliğinin sağlanması ve kapasite kullanımı ekosistem bileşenlerinin sunduğu mal ve hizmet fonksiyonlarının açıklanması ile mümkündür. Bu servis akışlarının değerlendirilmesinde bütünlük, esneklik ve dayanıklılık gibi ekolojik kriterler belirleyici nitelik taşırlar. Ekolojik kriterler ekosistemlerin düzenleme ve habitat fonksiyonları ile ilişkilidirler. Bu fonksiyonların ölçümünde biyolojik kaynakların zenginliği, çeşitliliği ve kompleks yapısı kullanılır [11,5,12,6]. Bu çalışmada da ekolojik kriter olarak, endemik ve biyolojik çeşitlilik için uluslararası ve ulusal ekolojik değer kriterlerinin yer aldığı “Red Data Book of Turkish Plants - Kırmızı Kitap” [15], “Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanı - ÖBA” [16], verileri biyolojik çeşitliliğin korunmasındaki uluslararası sözleşmeler (Biyolojik çeşitlilik sözleşmesi, Bern sözleşmesi, CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora), Türkiye Doğal Çiçek Soğanları üretim ve ticaretine ilişkin yönetmelik (2018) [17] referans olarak kullanılmıştır. Bu veriler göz önüne alınarak nitel değerlendirme yapılmıştır.

1.2.3. Sosyo-kültürel değer analizi yaklaşımı

Birçok literatürde sosyal nedenlerin; ruhsal değerler ve özgürlük, kültürel çeşitlilik ve kimlik, eğitim, zihinsel ve fiziksel sağlığı vurgulamada, çevresel fonksiyonların ve biyolojik kaynakların önemini tanımlamada önemli bir rol oynadığından söz edilmektedir. Doğal sistemler ve biyolojik kaynaklar sürdürülebilir bir toplum için zorunlu ve maddi olmayan iyiliklerin önemli bir kaynağını oluşturur [6]. Bu çalışmada *F. imperialis*' in değer fonksiyonlarından bilgi fonksiyonunun değer analizinde, sosyo-kültürel değer yaklaşımdan faydalanılmıştır. İnsanların bu türe göstermiş olduğu sevgi, kurmuş olduğu duygusal bağlar ve duygusal olarak vermiş olduğu değerler göz önüne alınarak, kültürel zenginliğe, insanların tarihsel ve sanatsal birikimine katkısı, bilim ve eğitime katkısı, eko turizme olan katkısı sosyo-kültürel değer analizi kapsamında nitel olarak değerlendirilmiştir.

Şekil 1. *F. imperialis*' in değer fonksiyonları ve ekonomik değerlendirme metodları matrisi [11,5,12]'den uyarlanmıştır)

<i>F. imperialis</i> ' in Değer Fonksiyonları	Niceliksel Değerleme			Niteliksel Değerleme
	Doğrudan Piyasa analizi	Koruma maliyeti	Üretim fonksiyonu geliri	
Üretim fonksiyonu değeri				
Üretim geliri	X		X	
Biyoteknolojide kullanım değeri	X		X	
Geleneksel tıpta kullanım değeri	X		X	
Ticari kaynak değeri	X		X	
Süs bitkisi kullanım değeri	X		X	
Bilgi fonksiyonu değeri				
Estetik değerler	X			X
Kültürel değerler				X
Tarihi ve sanatsal değerler				X
Bilimsel ve eğitim amaçlı kullanım değeri				X
Eko turizm değeri				X
Habitat değeri				
Biyolojik çeşitlilik değeri				X
Endemik çeşitlilik değeri				X
Koruma değeri		X		
Ekosistem değeri				
Madde döngüsü değeri				X
Besin döngüsü değeri	X		X	
Polinasyon değeri	X		X	
Opsiyon değeri				X
Varlık değeri				X
Miras değeri				X

3. Bulgular

F. imperialis' e ait üretim, mal ve hizmet değer fonksiyonları için, nitel ve niceliksel değerlendirmelerle değer akım şeması elde edilmiştir. Bu akım şemasında, değer fonksiyonlarının nitel ve nicel değerlerinin toplamı ile şekil 2 de verilen *F. imperialis*' in toplam ekonomik değerine ulaşılmıştır.

Şekil 2'de görüldüğü üzere *F. imperialis*' in üretim, mal ve hizmet değer fonksiyonlarının, ölçülebilir faydalara yönelik toplam ekonomik değeri, birim adet *F. imperialis* için yıllık 72,96 \$ olarak tahmin edilmiştir. *F. imperialis*' in toplam ekonomik değeri, yıllık ihracat miktarı olan 200 000 adet *F. imperialis* için ise 14,592,000 \$/yıl dır. Tahmin edilen bu değer *F. imperialis*' in yıllık ihracat geliri olan 52.416 \$'ın [18] çok üzerindedir. Bu değere, ekolojik ve sosyo-kültürel süreçlerde yer alan, maddi olarak ifade edilemeyen değerlerin yarattığı pozitif katma değer, miras ve servet değeri de eklendiğinde *F. imperialis*' in ekonomik değerinin önemli oranda yüksek olduğu ortaya çıkar.

Toplam ekonomik değer içerisinde üretim geliri değeri, her bir *F. imperialis* soğanı için 0,18 \$/yıl olarak tahmin edilmiştir. *F. imperialis*' in üretimini yapan 5 kişilik bir aile için hane halk geliri 297 \$/da/yıl dır. Bununla birlikte önemli bir gen kaynağı ve hammadde değeri taşıyan *F. imperialis*' in Türkiye'de doku kültürü gibi biyoteknolojik yöntemler aracılığı ile üretiminin gerçekleştirilmesi ürün kalitesinde ve üretim miktarında artışa neden olacaktır. Biyoteknoloji aracılığı ile üretimde sağlanacak %10'luk bir artışın piyasa değeri yaklaşık 31 \$/kg/da/yıl ve 0,02 \$/adet/yıl olacaktır.

Bu bitkinin tarla kenarlarında yetiştirilmesi çiftçiye biyolojik kontrol konusunda, tarla fareleriyle mücadelede önemli katkı sağlamaktadır. Bu yönüyle bakıldığında biyolojik kontrolden sağlanan toplam faydanın değeri 13,6 \$/da/Yıl olarak hesaplanabilir. Bu bitkiyi çiftçi yetiştirmekle her yıl yaklaşık 14 \$ yıllık kar edecektir.

F. imperialis' in elde edilen "Bei Mu" adlı ilaç yüksek ateş, süt yetersizliği, apselerin tedavisinde, öksürük, astım, bronşit ve balgam giderici olarak yaygın kullanılmakta ve tek kullanımlık 1 paket Bei Mu'nun piyasa değeri 20 \$'dır [19,21].

Şekil 2. *F. imperialis*' in Ekonomik Değer Akım Şeması ve Analiz Tablosu

<i>F. imperialis</i> ' in FONKSİYONU	EKONOMİK DEĞER
	Ekonomik değeri
	US \$*/Adet /Yıl veya US \$ /da/yıl
Üretim Fonksiyonu Değeri	
Üretim geliri değeri/Hane halkı geliri	0,18 \$/Adet/Yıl / 297 \$/Da/Yıl
Biyoteknolojide Kullanım Değeri	0,02 \$/Adet/Yıl
Biyolojik Kontrolde Kullanım Değeri	13,6 \$/Da/Yıl
Geleneksel tıpta kullanım değeri	1,33 \$/Adet/Yıl
Ticari kaynak değeri	0,26 \$/Adet/Yıl
Süs bitkisi değeri	8,07 \$/Adet/Yıl
Bilgi Fonksiyonu Değeri	
Estetik değerler	8,07 \$/Adet/Yıl
Kültürel değerler	+++
Tarihi ve sanatsal değerler	+++
Bilimsel ve eğitim amaçlı kullanım değeri	+++
Eko turizm değeri	+
Habitat Fonksiyonu Değeri	
Biyolojik çeşitlilik değeri	+++
Endemik çeşitlilik değeri	+++
Koruma değeri	37,71
Ekosistem Fonksiyonu Değeri	
Madde döngüsü değeri	++
Besin döngüsü değeri	3,6 \$/Adet/Yıl
Polinasyon değeri	0,12 \$/Adet/Yıl
Opsiyon Değeri(Farmakolojik)	+++
Varlık Değeri	+++
Miras Değeri	+++
Toplam Değer	72,96 \$/Adet/Yıl

*2019, Haziran ayı Merkez Bankası kur düzenlemeleri kullanılmış olup, 1 US \$ 6, 30 TL olarak alınmıştır.

Tahmin edilen toplam değer içerisinde diğer önemli bir parametre ise koruma değeridir. Birim dekar alanda yetişen *F. imperialis*'in koruma proje gelirleri göz önüne alınarak tahmin edilen insitu ve exsitu korumanın toplam değeri 37,71 \$/yıl olarak tahmin edilmiştir.

Türkiye'de kota dahilinde yalnızca *Fritillaria*'nın 2 türün, *F. imperialis*'in ve *F. perscia*, ticaretine izin verilmekte olup, ticari değeri birim adet *F. imperialis*'in soğanı için 0,26 \$/Adet/Yıl olarak tahmin edilmiştir. Avrupa pazarlarında ise süs bitkisi olarak, *F. imperialis*'in piyasa değeri yaklaşık 8,07 \$/Adet/Yıl dır [22]. Anadolu insanı bu çiçeklerle iç içe yaşayarak, duygusal bağlar kurarak, tarihi, kültürel ve sanatsal eserlerinde bu çiçekleri yaşatarak, *F. imperialis*'i Anadolu kültürünün önemli bir parçası yapmıştır.

%75 oranında zengin aminoasit içeren nektar üreten *F. imperialis*'in günlük sabah saatlerinde ürettiği nektar miktarı ortalama 133.3 µl/çiçek dir. Eğer metabolik aktivitelerini gerçekleştirebilmek için ihtiyaç duyduğu enerjinin tamamını bu çiçekten karşılayacağı var sayılırsa günlük en az 5 ziyareti 45 gün süre ile yapmak zorundadır. Bu ziyaret sonucu elde ettiği nektarın besin olarak kullanımının değeri ise 3.6 \$/adet/yıldır. Ayrıca 10 çiçek poleni üzerine yapılan bir araştırmada *F. imperialis*'in kendi içine tozlaşmada veya arılarla tozlaşmada ürün oluşturmadığı, buna karşılık *Blue tits* (*Parus caeruleus*) gerçekleşen tozlaşmada 7 polenden 4' ünde ürün oluştuğu (%57), ve çapraz tozlaşmada ise 10 polenden 7' sin de ürün oluştuğu (%70) görülmüştür [26]. Bu durumda 10 polenin 7 tanesinin bitkiye dönüşmesinin polinasyon değeri 0,12 \$/adet/yıl olacaktır. Ötücü kuşlar bu bitkilerin usta bahçıvanlarıdır. Bu verilerle değerlendirildiğinde *F. imperialis*'in ekolojik süreçlerdeki rolü göz önüne alındığında, besin döngüsü ve polinasyon değerinin son derece önemli ve yüksek olduğu açıkça görülebilir.

4. Sonuçlar ve tartışma

Bu araştırma ile, *F. imperialis*'in ve tür çeşitliliğinin ekonomik, ekolojik ve sosyokültürel süreçlere olan katkısı ortaya konmuş ve bu katkı *F. imperialis*'in üretim, mal ve hizmet fonksiyonları akım değerleri olarak ifade edilmiştir. Bu kapsamda yapılan ekonomik değer analizinde; *F. imperialis*'in akım değerleri toplamının her bir adet *F. imperialis* soğanı için yıllık 72,96 \$ olduğu tahmin edilmiştir. *F. imperialis*'in toplam ekonomik değeri, yıllık ihracat miktarı olan 200 000

adet *F. imperialis* için ise 14,592,000 \$/yıl dır. Bu değere, nicel olarak hesaplanamayan, nitel verilerle değerlendirilen sosyokültürel değerler, miras ve servet değeri eklendiğinde, toplam ekonomik değer rasyonel olarak önemli oranda artacağı ve pozitif katma değer yaratacağı da açıkça görülmektedir.

F. imperialis' in üretimi genellikle aileler tarafından küçük alanlarda, bahçelerde, tarla kenarlarında yapılmaktadır. Bu bitkinin yetiştiği bölgelerde üretici ailelerin birey sayısı ortalama 5 kişi olup, işçilik faaliyetleri bedava işgücü olan bu aile bireyleri tarafından yapılmaktadır. *F. imperialis*' in üretimini yapan 5 kişilik bir aile için hane halk geliri 297 \$/da/yıl dır. İşçilik, gübreleme, sulama, yabancı ot kontrolü gibi üretim maliyetlerinin oldukça düşük olması üretim olanakları açısından büyük bir avantajdır. Söz konusu hane halkı üretim gelirinin, henüz her hangi bir ürünün metaya dönüşmediği bir dönemde peşin olarak çiftçiye ödenmesi ve çiftçi için bir ek gelir niteliği taşıması son derece önemlidir. Üretimin desteklenmesi, bu yönde üretici teşviklerinin uygulanması, profesyonel bitki yetiştiriciliği kültürünün benimsenmesi bitkinin sürdürülebilir üretiminin ve ticaretinin geliştirilmesinde önemli rol oynayacağı düşünülmektedir. *F. imperialis*' in doku kültürü gibi biyoteknolojik yöntemler aracılığı ile üretiminin gerçekleştirilmesi ürün kalitesinde ve üretim miktarında artışa neden olacaktır (yaklaşık 31 \$/kg/da/yıl). Bu durum piyasa arz-talep dengesi açısından değerlendirildiğinde piyasa talebinin yüksek olması hem hane halkı üretim gelirlerinde artışa neden olacak hem de *F. imperialis*' in akım değerlerinin tamamında artışa yol açacak ve pozitif katma değer yaratacaktır. Bu durum *F. imperialis*' in biyoteknolojide kullanım değeri ile ilişkilidir.

Üreticiler açısından bitkinin biyolojik kontrolde kullanım faydası da (13,6 \$/da/Yıl) son derece yüksektir. Tarla faresi tarım ürünlerine zarar veren, ortalama 15 gr/gün ürün tüketen ve çok hızlı üreme potansiyeli olan bir canlıdır. Bu nedenle üretimde önemli ürün kayıplarına yol açması nedeniyle tarla fareleriyle mücadele üreticiler için son derece önemlidir. Tarla faresiyle mücadele ya biyolojik yolla ya da kimyasal yolla yapılabilir. Kimyasal mücadelede 1 dönüm üretim alanı için yaklaşık 50 gr ilaca ihtiyaç vardır. Ve bunun maliyeti 4,67 \$/da/yıl dır. Buna karşılık biyolojik mücadele tercih edilirse herhangi bir maliyete yol açmayacaktır. *F. imperialis* yetiştiği bölgedeki çiftçiler için bir üretim materyali olmakla birlikte iyi bir biyolojik mücadele yöntemidir. Bitkinin salgıladığı, yaydığı koku tarla farelerini kaçırmaya yönde etkilemekte, böylece tarım zararlıları ile biyolojik mücadelenin doğal yöntemini teşkil etmektedir. Aynı zamanda bu bitki ticari nitelik taşıdığından bir sonraki yıl hasat edilerek yaklaşık 8,93 \$ üretim geliri elde edebilir. Bu da çiftçinin sağladığı/sağlayacağı diğer bir katma değerdir.

F. imperialis içermiş olduğu steroidal alkaloidler, saponinler, terpenoidler, glycosidler, impericine, forticine, delavine, edpetilidine, verticinone, isovorticine, cevanine steroidal alkaloid, imperialine vb etken maddelerden dolayı özellikle geleneksel tıpta halk arasında kullanılmaktadır [19, 20]. *F. imperialis* romatizma, boğaz ağrısı, öksürük, astım, kalp ilaçlarının yapımında, bronşit, adrenal tümörlerde, balgam sökücü, idrar söktürücü, yumuşatıcı ve çözücü madde olarak yaygın kullanılır [19]. *F. imperialis*' in kuru soğanlarından elde edilen "Bei Mu" adlı ilaç (piyasa değeri 20 \$'dır [19,21]) yüksek ateş, süt yetersizliği, apselerin tedavisinde, öksürük, astım, bronşit ve balgam giderici olarak yaygın kullanılmaktadır. Günlük kullanım dozu 3-9 gr dır. Bunun için 10-15 adet *F. imperialis*' in kurutulmuş soğanına ihtiyaç vardır [19,21]. Ayrıca Irak, Hindistan, Rusya vb. ülkelerde yumuşatıcı, çözücü, idrar söktürücü olarak, Türkiye' de ise romatizma hastalıklarında kullanımı son derece yaygındır. Yapılan araştırmalar bu bitkinin içerdiği primer ve sekonder metaloitlerin yakın bir gelecekte modern tıpta kullanılan ilaçların ana etken maddesini veya katkı maddesini oluşturma potansiyelinin de yüksek olduğunu göstermiştir.

Küresel olarak 167 türü bulunan *Fritillaria*'nın 43 türü Türkiye' de yetişmekte olup, bunun 19 türü endemik özellik göstermektedir. Türkiye doğasında yetişen bu türlerin IUNC kategorilerine göre sınıflandırılan 122 ÖBA [16] içinde 34 ÖBA da yetişme alanı bulması *F. imperialis*'in biyolojik ve endemik çeşitlilik değerinin de yüksek olduğunu göstermektedir. Söz konusu bu habitatların özel koruma alanları olarak değerlendirilmesi, *F. imperialis*'in koruma değerinde de artırıcı rol oynamaktadır. Ayrıca, *F. imperialis*'in CITES Ek II listede yer alması, Bern ve Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmelerinin bağlayıcı hükümlerinin olması ve ticaretinin üretimden serbest türler dahilinde, "Türkiye doğal çiçek soğanları üretim ve ticaretine ilişkin yönetmelikle" denetleniyor olması koruma değerini artıran diğer önemli bir etken olup, sürdürülebilir ekonomik politikalarla desteklendiğinin de göstergesidir.

Türkiye'de kota dahilinde yalnızca *Fritillaria*'nın 2 türün, *F. imperialis*'in ve *F. perscia*, ticaretine izin verilmekte olup, ticari değeri 0,26 \$/Adet/Yıl olarak tahmin edilmiştir. Süs bitkisi olarak, *F. imperialis*'in piyasa değeri ise yaklaşık 8,07 \$/Adet/Yıl olup oldukça yüksektir [22]. *F. imperialis*'in 70-80 cm kadar ulaşan boyu, sarıdan- kırmızıya kadar değişen çiçek rengi, çan şeklindeki çiçeği, üstünde dağınık bir şekilde duran parlak yeşil yaprak demetleriyle yetiştiği alana muhteşem bir görüntü ve canlılık kazandırmaktadır. Bu nedenle peyzaj düzenlemelerinde, yol kenarlarının, kaya bahçelerinin, bina girişlerinin, beton çiçekliklerin, balkonların ve pencere altlarının vazgeçilmez bitkisidir. Bu bitki çok yıllık ve yaprağını döken ağaç ve çalı türleriyle peyzaj uygulamalarında kullanılabilir, Bu bitki, ağaçlar yapraklanmadan erken ilkbaharda çiçek açtığından, ağaç altlarının daha canlı görünmesine ve muhteşem bir

kompozisyon oluşturmasına imkân verir. Ülkemizde peyzaj uygulamalarında kullanımı yaygın değildir. Bir diğer yönden bu bitki, üniversitelerin biyoloji, biyoteknoloji, peyzaj mimarlığı gibi alanlarda önemli araştırma konularından biri olması, birçok araştırma projeleri ve tezlerin konusu olması bilimsel açıdan değerin yüksek olduğunu göstermekte ve pozitif katma değer yaratmaktadır.

Çiçek yapraklarının iç tabanlarında bulunan nektar bezlerinden zaman zaman bal özü damlar. Bu nedenle Anadolu insanı *F. imperialis*'e "ağlayan gelin" adını vermiştir. Bitki bu özelliğinden dolayı doğu Anadolu bölgesinde mezar taşlarına motifi işlenmiştir. Mezarlıklarda yaygın olarak kullanılan bu bitki sevdiğini kaybetmenin arkasından gelen gözyaşını, acıyı, özlemi ifade etmektedir. Bir efsaneye göre Hz İsa çarımıha gerildiğinde Hz Meryem'in gözyaşları, bir diğer efsaneye göre Hz Hasan ve Hüseyin'in kerbelada şehit edilişinin üzüntüsüdür [23]. *F. imperialis* bir başka efsanede Ferhat'la Şirin'in aşkına konu olmuş, kederin güzelliğe dönüşmesini simgelemiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde sosyokültürel açıdan da önemli bir değer parametresi olarak karşımıza çıkmakta ve insanları sosyal açıdan olumlu yönde etkilemektedir.

Araştırma bulguları, *F. imperialis*'in mal ve hizmet akım değerlerinin ekolojik süreçler açısından da son derece önemli olduğunu ortaya koymuştur. Öncelikli olarak yetişme alanı buldukları habitat içinde var olmaları, diğer canlı türlerinin de var olmalarına ve varlıklarını sürdürmelerine katkı sağlamaktadır. Ekosistem içersinde biyotik etkiler aracılığı ile oluşturdukları mikro habitatlar birçok mikroorganizma türünün, böcek ve kuş türlerinin ve etkileşimde bulunduğu diğer canlı gruplarının yaşama alanıdır. Bu canlı grupları ile oluşturduğu muttaliyi yaşam, bir taraftan *F. imperialis*'in yaşamsal ve üreme fonksiyonlarının devamlılığını sağlarken, diğer taraftan da etkileşimde olduğu canlıların besin kaynağını oluşturarak varlıklarını sürdürebilmelerinin güvencesidir. *F. imperialis*'in tohumdan tekrar tohuma dönüşüm süresinin yaklaşık 120-160 gün /yıl olması ve çiçeklenme süresinin yaklaşık 45 gün/yıl olması ekosistemdeki ekolojik döngüdeki rolünü açıklayacaktır.

F. imperialis'in tozlaşması *Blue tits (Parus caeruleus)* gibi ötücü kuşlar aracılığı ile gerçekteşir. *F. imperialis*, ornitofilik çiçeklerin karakteristik kriterlerini yerine getirecek büyük ve bol miktarda üretilen, sakkaroz içermeyen, seyreltik nektarları üretir ve "ornithophilous flowers" olarak adlandırılırlar [24]. %75 oranında zengin aminoasit içeren nektar üreten *F. imperialis*'in günlük sabah saatlerinde ürettiği nektar miktarı ortalama 133.3 µl/çiçek dir. Bu nektarın polinatörü olan *Blue tits* sabah saatlerinde bu çiçeği ziyaret ettiğinde 76,65 µl nektar alır [25]. Bu miktar polinatörün günlük enerji ihtiyacının %20-25 ine karşılık gelmektedir. Eğer metabolik aktivitelerini gerçekteşirebilmek için ihtiyaç duyduğu enerjinin tamamını bu çiçekten karşılayacağı var sayılırsa günlük en az 5 ziyareti 45 gün süre ile yapmak zorundadır. Bu ziyaret sonucu elde ettiği nektarın besin olarak kullanımının değeri ise 3.6 \$/adet/yıldır.

Ülke gen kaynakları yönü ile rasyonel bir değerlendirme yapılacak olursa: yaylaları ve yüksek dağ yamaçlarını süsleyen *F. imperialis*'in doğal güzelliklerimiz yanında, biyolojik zenginliğimizin ve gen kaynaklarımızın önemli bir parçasını oluşturması, ilaç endüstrisinde kullanılması, hammadde kaynağı olması, modern biyoteknolojinin hammaddesini oluşturması vb. hizmet fonksiyonları ekolojik ve ekonomik açıdan *F. imperialis*'in gerçekte değerinin yüksek olduğunu göstermiştir. Görüldüğü üzere iktisadi anlamda yüksek değer taşıyan *F. imperialis*'in varlığını sürdürmesi ve bugünün koşulları ile gelecek kuşaklara aktarılması ekolojik, ekonomik ve sosyo-kültürel değerlerin devamlılığı açısından da önemlidir. Ayrıca, *F. imperialis*'in üretim mal ve hizmet fonksiyonlarının tespit edilmesi ve her bir hizmet fonksiyonunun değerinin belirlenmesi türün doğru kullanım alanların saptanmasında önemli rol oynayacak ve doğal kaynak tahribatı da engelleyecektir.

F. imperialis'de olduğu gibi, diğer gen kaynaklarının da mal ve hizmet akım fonksiyonlarının tespit edilerek, iktisadi süreçlere dahil edilmesi, ekonomik değer analizlerinin yapılması, sürdürülebilir kullanımın sağlanması önemli bir koşul olarak görülmelidir. Biyolojik ve endemik çeşitliliğin, tür temelinde korunması ve sürdürülebilir yönetiminin sağlanabilmesi için karar verme düzeyindeki analizlerde toplam iktisadi değerin bir bütün olarak ele alınmasının ve karar alma mekanizmaları içine dahil edilmesinin gerekliliği de bu çalışmayla ortaya konmuştur. Bu yönüyle değerlendirildiğinde yapılması gereken, biyolojik kaynakların iktisadi süreçlerle birlikte değerlendirilmesi, yerel yönetim planlarına dahil edilmesi ve buna uygun politikaların benimsenmesidir. Ancak bu şekilde etkin, sürdürülebilir kaynak kullanımının sağlanabileceği ve söz konusu biyolojik kaynakların gelecek kuşaklara aktarılması mümkündür.

Kaynaklar

- [1] Tekeli, İ., Güler, Ç., Yerli, V.S., Algan, N., Vaizoglu, A.S., Kaya, D.A., Öztürk, B., Mutlu, B., & Demirayak, F. (2006). *Dünya'da ve Türkiye'de Biyolojik Çeşitliliği Koruma*. Türkiye Bilimler Akademisi Raporlar, 13, Ankara.
- [2] Costanza, R., de Groot R., Sutton, P., van der Ploeg, S., Anderson, J.S., Kubiszewski, I., Farber, S. R., & Turner, K.R. (2014). Changes in the global value of ecosystem services. *Global Environmental Change*, 26,152–158.
- [3] Nunes, D.L.A.P, Van den Bergh, M.J.C.J., & Nijkamp, P. (2003). *The Ecological Economics of Biodiversity: Methods Application*. EE Pablişig.

- [4] Demir, A., & Arısoy, M. (2014). Economic Value Analysis of *Galanthus* Sp. In Turkey. *Bangladesh J. Bot.*, 43(1), 65-71.
- [5] Nunes, D.L.A.P., Van den Bergh, M.J.C.J., & Nijkamp, P. (2000). Ecological-Economic Analysis and Valuation of Biodiversity. *Tinbergen Institute, Web erişim*, 02.03.2008, <http://www.tinbergen.nl/discussion.papers/00100pdf>
- [6] De Groot, R. (2006). Function-Analysis and Valuation as a Tool to assess Land Use Conflicts in Planning for Sustainable, Multi-Functional Landscapes. *Landscape and Urban Planning*, 75, 175-186.
- [7] Alp, Ş. (2006). *Ters Lale Üreticileri için el kitabı*. Doğal Çiçek soğanları Derneği-Altınova, Yalova, 1-25.
- [8] Tekşen, M., & Aytaç, Z. (2014). The Revision of *Fritillaria L.* (Liliaceae) Genus in the Regions in Turkey, Except the Meterraneanregion. *Res. J. Biol. Sci.* 9,34-51.
- [9] Atay, S. (1996). *Soğanlı Bitkiler, Türkiye'den ihracatı yapılan türleri tanıtım ve üretim rehberi*. Doğal Hayatı Koruma Derneği, İstanbul, 56-57.
- [10] Alp, S, Arslan, N., & Koyuncu, M. (2009). Established forms of *Fritillaria imperialis* L. - A naturally growing species in Turkey. *Pak J Bot*, 41(4), 1573-1576.
- [11] Costanza, R., d'Arge, R., d'Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, V.R., Paruelo, J., Raskin, G. R., Sutton, P., & van den Belt, M. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature*, 387, 253-260.
- [12] De Groot, R., Wilson, A.M., & Boumans, J.M.R. (2002). A Typology for the Classification and Valuation of Ecosystem Functions, Goods and Services. *Ecological Economics*, 41, 393-408.
- [13] Freeman, A.M.III. (2003). *The Measurement of Environmental and Resource Values; Theory and Methods. Resources for the Future*. Washington D.C.
- [14] Özsubancıoğlu, H.İ. & Uğur, A.A. (2005). "Doğal Kaynaklar Ekonomi, Yönetim ve Politika", *İmaj Yayınevi*, 241, Ankara.
- [15] Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., & Adıgüzel, N. (2000). *Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı (Eğrelti ve Tohumlu Bitkiler)*. Türkiye Tabiatı Koruma Derneği Yayınları (TTKD), Ankara.
- [16] Özhatay, N., Byfield, A., & Atay, S. (2005). *Türkiye'nin 122 Önemli Bitki Alanı*. WWF- Türkiye (Doğal Hayatı Koruma Vakfı) Yayınları, İstanbul.
- [17] TÜGEM (2018). Doğal Çiçek Soğanları Sökümü, Üretimi ve Ticaretine İlişkin Yönetmelik. T.B.TÜGEM, Ankara
- [18] TÜİK (2018). Doğal Çiçek Soğanları ihracat verileri. *Acces date: 20.06.2019*. http://www.tuik.gov.tr/VeriBilgi.do?alt_id=52
- [19] Al-Snafi, A.E. (2019). *Fritillaria Imperialis*- A Review. *IOSR Journal of Pharmacy (IOSRPHR)*, 9 (03), 47-51.
- [20] Al-Snafi, A.E. (2018). Chemical constituents, pharmacological effects and therapeutic importance of *Hibiscus rosa-sinensis*- A review. *Journal of Pharmacy*, 8 (7), 101-119.
- [21] Bozkurt, E.A., Özkan, C.Z., & Saraç, U.D. (2019). The floristic structure of the Artvin-Soğanlı Village (Turkey) and the traditional usage of these plant taxa in this region. *Biological Diversity and Conservation*, 12(2), 109-118
- [22] RHS (2019). International Market Price of *Fritillaria imperialis*. *Accs date: 17.06.2019*, <https://www.rhs.org.uk/about-the-rhs/publications/plant-finder>
- [23] Zeylanov, Y., Kumlay, M.A., Koç, A., & Gökçek, B., (2012). Ters Lale (Fritillaria) Türlerinin Gaziantep Büyükşehir Belediyesi Botanik Bahçesine İntroduksiyonu. *Azerbeycan Milli Elmlar Akademiyası Merkezi Nebatat Bağının Eserleri*, X cild:86-95.
- [24] Roguz, K., Bajguz, A., Gołbiewska, A., Chmur, M., Hill, L., Kalinowski, P., Schönenberger, J., Stpiczyńska, M., & Zych, M. (2018). Functional Diversity of Nectary Structure and Nectar Composition in the Genus *Fritillaria* (Liliaceae). *Front Plant Sci.*, 24(9), 1246. <https://doi: 10.3389/fpls.2018.01246>
- [25] Fitzpatrick, S. (1994). Nectar-feeding by suburban Blue Tits: contribution to the diet in spring. *Bird Study*, 41(2), 136-145. <https://doi: 10.1080/00063659409477210>
- Burquez, A. (1989). *Blue tits, Parus caeruleus*, as pollinators of the crown imperial, *Fritillaria imperialis*, in Britain. *Oikos* 55, 335-340

(Received for publication 12 October 2019; The date of publication 15 December 2019)



**Morphological, anatomical and palynological investigations on endemic *Silene tunicoides* Boiss.
(Caryophyllaceae)**

Büşra DARICI¹, Hüseyin DURAL¹, Burcu YILMAZ ÇITAK^{*1}
ORCID: 0000-0003-3336-6466; 0000-0002-5579-5037; 0000-0003-3703-7731

¹ University of Selçuk, Faculty of Science, Department of Biology, Konya, Turkey

Abstract

The current study deals with anatomical, palynological and micromorphological aspects of endemic *Silene tunicoides* for the first time. With morphological analysis, the descriptions of species were enlarged as different from previous studies in point of calyx and corolla dimensions, androecium and gynoecium dimensions. With anatomical analysis, the shape of leaves of cross sections, presence of starch grains in pith cells are found different. Pollen and seed morphology can be useful to distinguishing species. Pollen dimensions, pore shape and structure, microechinae number, ornamentation are the most important were determined as pollen traits. Seed shape, suture structure, surface, teeth shape and dimensions are the most valuable seed characteristics.

Key words: anatomy, Caryophyllaceae, pollen, seed, *Silene*, SEM

----- * -----

Endemik *Silene tunicoides* Boiss. (Caryophyllaceae) üzerine morfolojik, anatomik ve palinolojik araştırmalar

Özet

Mevcut çalışma, endemik *Silene tunicoides*'i anatomik, palinolojik ve mikromorfolojik yönlerden ilk defa incelemektedir. Morfolojik analizler ile türün deskripsiyonu, kaliks ve korolla boyutları, erkek ve dişi organ boyutları açısından önceki çalışmalardan farklı olarak genişletilmiştir. Anatomik analizler ile yaprak enine kesitlerinin şekli ve öz hücrelerinde nişasta tanelerinin varlığı farklı bulunmuştur. Polen ve tohum morfolojisi türleri ayırmada faydalıdır. Polen boyutları, por şekli ve yapısı, mikroekina sayısı ve ornamentasyonu polen özelliği bakımından en önemli olarak belirlenmiştir. Tohum şekli, sutur, yapısı, diş şekli ve boyutları en önemli tohum karakterleridir.

Anahtar kelimeler: anatomi, Caryophyllaceae, polen, SEM, tohum

1. Introduction

Silene L., the largest genus in the family Caryophyllaceae with 700 species [1], is represented in Southwest Asia, with 119 species (34 endemic) in Turkey [2], about 139 species (48 endemic) in Iran, and 37 species in Iraq [3,4]. After Coode & Cullen's (1967) study, and with addition of new species the total number of *Silene* genus have been increased to 166 in Turkey [2,5,6,7,8].

Silene genus has been subjected many times in palynological and micromorphological studies but little times in anatomical ones [9,10,11,12,13,14,15,16,17]. The main consensus of these researches that the shape of leaf, starch in pith, the pore dimensions and numbers, microechinae structure, ornamentation, seed shape, testa cell types, ridge features can be useful to distinguish species in taxonomic levels.

Silene tunicoides is an endemic, distinct, semi-shrub plant only grows in Kemer, Antalya province which is its type locality from section Tunicoideae (Boiss.) Chowdhuri. This species can be distinguished from the other two relatives (*S. ozyurtii* and *S. brevicalyx*) by the shape of the capsule, calyx teeth and petal limbs, length of calyx and petal. It has been no study conducting the anatomy, palynology and micromorphology of this Turkish species. The aim of this paper

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +903322231886; Fax.: +903322231886; E-mail: burcuyilmaz@selcuk.edu.tr

to investigate the mentioned features of *Silene tunicoides* and to discuss these properties whether important for species taxonomy.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

The materials used in this study were collected from type locality of species (Kemer, Antalya) during the first author master thesis field excursion. These collected materials were stored as herbarium materials and some of them were put in 70% ethyl-alcohol as anatomical materials. The species were photographed in nature (Figure 1).

2.2. Morphological methods

2.2.1. Macro-morphological investigations

In macromorphological investigations, the collected plant materials were prepared according to standard herbarium techniques and were identified using Davis (1988) literature [18]. The herbarium materials were stored in KNYA herbarium. When the descriptions of the species were made, such as stem height, leaves and flowers dimensions were measured at least 20 times for each characters.

2.2.2. Micro-morphological investigations

In micromorphological investigations, the mature fruit and seed were selected under a stereomicroscope and were stored in paper bag. At least 20 samples of fruits and seeds were measured by several characteristics such as fruit length, and seed length. Then these fruits and seeds were transferred to the aluminium stab and, were covered with gold and were micro photographed aid of a Zeiss Jeol Evo LS 10 SEM.

2.3. Anatomical analysis

For anatomical investigations, the paraffin method were applied to root, stem and leaf of species. The cross sections were taken using a microtome [19]. The woody and herbaceous stems cross sections were taken by hand using a razor blade. The paraffin sections were stained with safranin-fast green and they were mounted with entellan. Slides were observed Leica DM1000 light microscope and were photographed with a Canon EOS 450D camera. Measurements were made with Cameram 21 programme.

2.4. Palynological analysis

The pollen slides were made according to Wodehouse (1935) technique [20]. The pollen grains were directly taken the glass-slides and were washed with ethyl-alcohol. A few drops glycerine-jelly with safranin were added the heated slides and they were left to dry [20]. The pollen slides were examined under a light microscope (Leica DM 1000) and were photographed with Canon EOS 450 D camera. For SEM investigations, non-acetolysis pollen grains were put aluminium stabs and were micro photographed at several magnifications using a Zeiss SEM. Punt et al. (2007) was followed for pollen terminology [21].

All of the measurements were given in minimum, maximum and mean values.

3. Results

3.1. Macro-morphological Results

Perennial, with many erect, slender stems arising from a very woody branched at base. Stems up to 40 cm, diameter 0.63-0.85 mm, with short, retrorse indumentum below, glabrous and viscid above. Cauline leaves linear, setaceous, callous, 7-13 mm, margins setose. Inflorescence paniculate, the branches wide-spreading and cymose. Calyx 5×1.5 mm, teeth 1.5×1 mm, glabrous, ovoid, bracts 0.4-0.8 mm, Petals cream-transparent with an entire limb. Anthophore 1.5 mm. Anther 1 mm, filaments 3.5 mm. Ovary 1 mm, style 0.2 mm, stigma capitate. Capsule 3-4 mm, included in the calyx. *Fl. 6. Cliffs, pine forests, c. 100 m.*



Figure 1. A. The general view of *Silene tunicoides* in nature conditions. B. Flowers and capsule

3.2. Micro-morphological Results

3.2.1. Fruit micromorphology

The fruits are capsule, 4.16-4.4 × 2.6-2.99 mm, globose-ovoid, tuberculate in ornamentation. Ovoid at base, carpels are not separated, narrowed and truncate in apex (Figs. 2-3).



Figure 2. The general view of fruits of *Silene tunicoides* (LM)

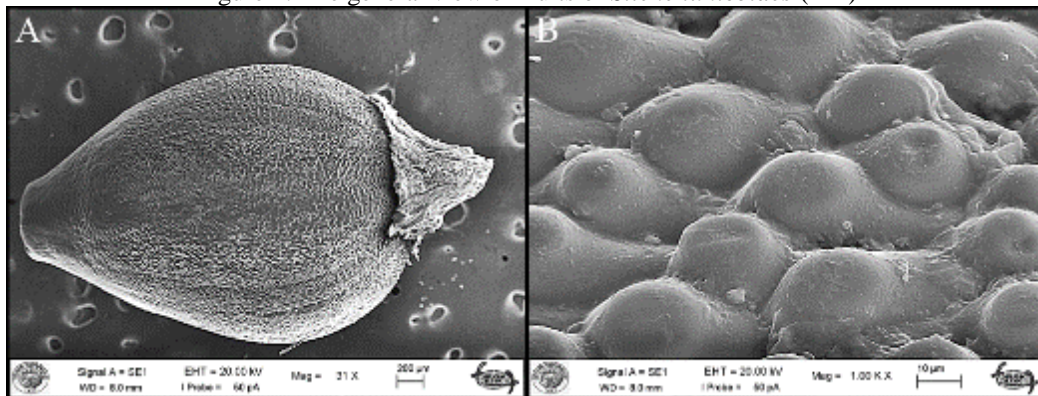


Figure 3. A. The general view of fruits of *Silene tunicoides* (SEM) B. Ornamentation

3.2.1. Seed micromorphology

The seeds of *S. tunicoides* are reniform, dark-brown and shiny, $0.81\text{--}1.2 \times 1.04\text{--}1.33$ mm, the ratio length-width being 1.18, seed outline is rectangular-orbicular, chalazal pole is obtuse, micropylar pole is emarginate, seed surface type convex-sometimes flat, shape of tubercle rounded, seed surface granulation fine, suture is sinuous, ridge is absent or indistinct, flat, the number of teeth is 10, teeth shape is rectangular, $8.21\text{--}10.85 \times 9.45\text{--}11.05$ μm , testa cells $117.08\text{--}146.22 \times 109.72\text{--}138.91$ μm , the ratio length-width of testa cells 1.05 (Figs. 4-5).



Figure 4. The general view of seeds of *Silene tunicoides* (LM).

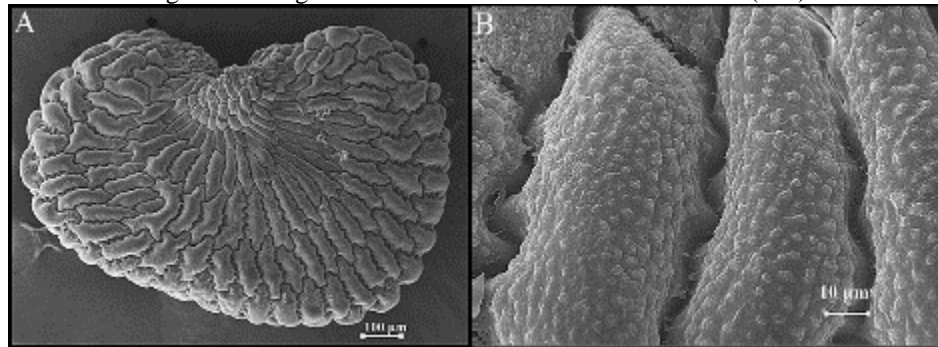


Figure 5. A. The general view of seeds of *Silene tunicoides* (SEM) B. Ornamentation

3.3. Anatomical Results

Root anatomy

Peridermis which is characterized many layered, partly broken with phellem cells is an outermost layer of roots in *S. tunicoides* (Figure 6-a). Cortex cells are parenchymatic and their shape is defined as rectangular-oval. The vascular tissue composed of phloem and xylem elements is well-developed. Trachea cells were measured as 47.16 μm in mean values. The centre of roots contains only sclerenchymatic cells (Figure 6-b).

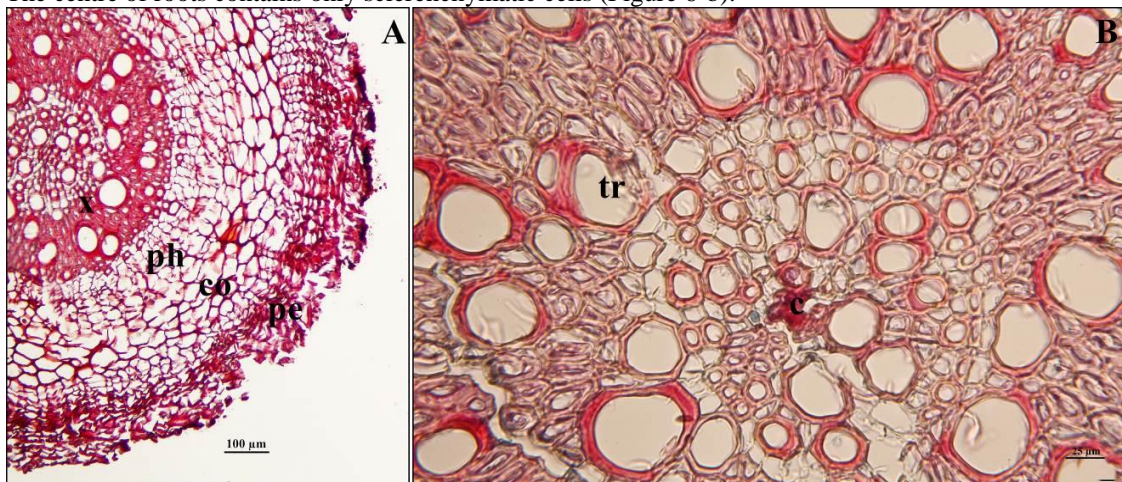


Figure 6. The root cross sections of *Silene tunicoides* A. General view of roots **pe**: peridermis, **co**: cortex, **ph**: phloem, **x**: xylem. B. the centre of roots **tr**: trachea, **c**: center of root.

Woody stem anatomy

The cross sections taken from woody stems of *S. tunicoides* were showed that secondary structure developed. The outermost surface of roots is limited by peridermis (Figure 7-a). Cortex is characterized with sclerenchymatic cells.

Endodermis is one layered. Phloem and xylem follow endodermis towards the centre. The centre of stem is covered with parenchymatic pith cells containing abundant starch grains (Figure 7-b).

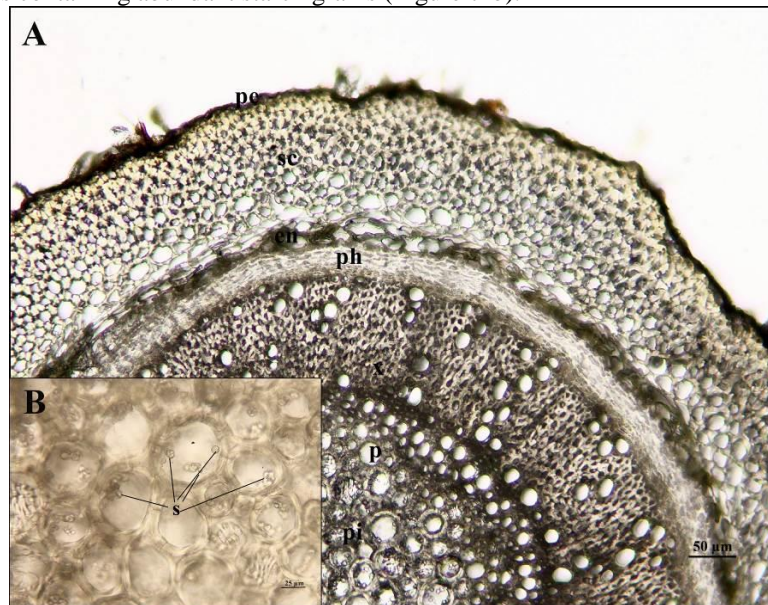


Figure 7. The cross sections of woody stem of *Silene tunicoides* **pe**: peridermis, **sc**: sclerenchyma, **en**: endodermis, **ph**: phloem, **x**: xylem, **p**: parenchyma cell, **pi**: pith region, **s**: starch.

Herbaceous stem anatomy

The outermost surface of stem is limited with a single layered epidermis with a few cells gland-trichomes (Figure 8-a,b). The cortex which is characterized by parenchymatous cells is oval shaped with chloroplasts. Sclerenchyma is covered large area in stem. Phloem and xylem are well-developed. The pith is composed of parenchymatic cells with starch grains (Figure 8-a).



Figure 8. The cross sections of herbaceous stem of *Silene tunicoides* **ep**: epidermis, **co**: cortex parenchyma, **sc**: sclerenchyma, **ph**: phloem, **x**: xylem, **p**: parenchyma cell, **pi**: pith region, **s**: starch, **t**: trichome.

Leaf anatomy

The cross sections of leaves clearly show the three main parts: epidermis, mesophyll, and vascular tissue (Figure 989). The epidermis in a single layer is covered the leaf. Stomata occurs both upper and lower epidermis. Also, the hairs are positioned on epidermis of both sides. Mesophyll tissue is composed of two types of cells as palisade and sponge parenchyma. Druse crystals are present into the leaf mesophyll. Central vascular bundle is larger and collateral in type (Figure 9).

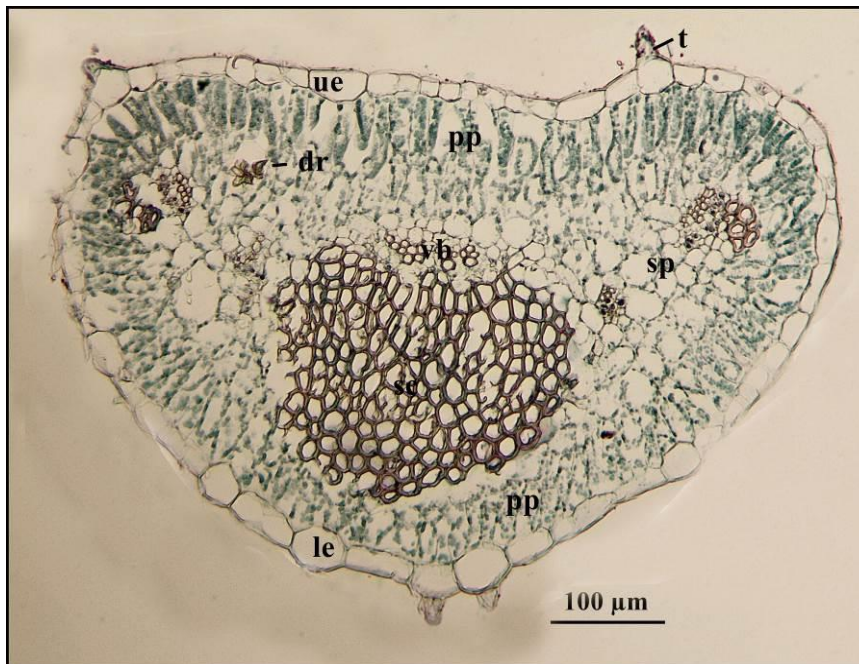


Figure 9. The cross sections of leaves of *Silene tunicoides* **ue**: upper epidermis, **le**: lower epidermis, **pp**: palisade parenchyma, **sp**: spongy parenchyma, **vb**: vascular bundle, **sc**: sclerenchyma, **dr**: druse crystal, **t**: trichome.

3.3. Pollen morphology

The pollen grains of *S. tunicoides* are monad, periporate, and spheroidal. The pollen diameter is 26.24-30.7 μm. The pore diameter is 5.1 × 5.6 μm with orbicular-shaped. The numbers of pore are 20-25, the distance between two pore is 1.92-2.12 μm. The pori is operculate with 14-17 microechinae which is triangular shaped. The microechinae dimensions 1-1.14 × 1.35-1.76 μm. The micro perforation is 1.74-2.17 μm. The exine structure is semitectate and the sculpturing is microechinate-microperforate. The exine and intine are 2.18 μm and 0.82 μm thick, respectively (Figs. 10-11).

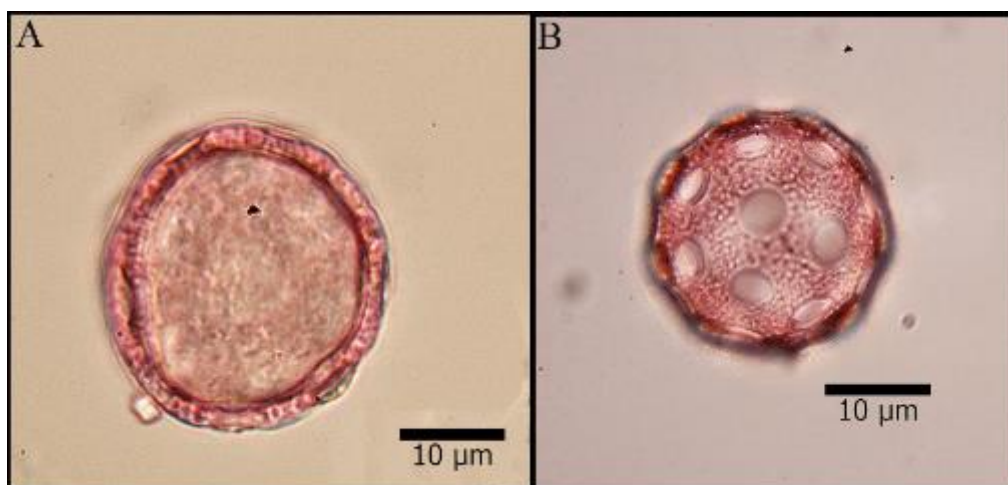


Figure 10. The light microscope (LM) photographs of *Silene tunicoides* **A**. The general view of pollen **B**. The sculpturing

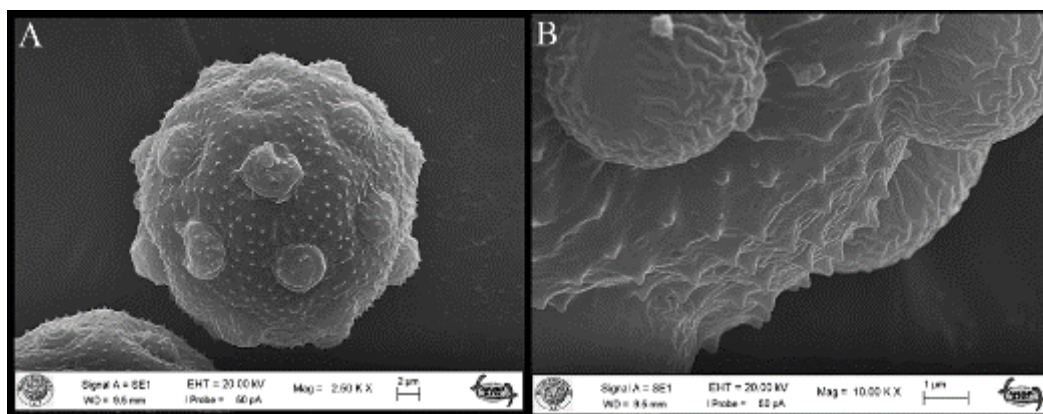


Figure 11. The scanning electron microscope (SEM) photographs of *Silene tunicoides* **A.** The general view of pollen **B.** The sculpturing of pollen

4. Conclusions and discussion

The measurements and observations of *Silene tunicoides* is congruent with the study of Coode and Cullen (1967) [2]. However, dimensions and properties of bracts, ovary, style, stigma, and stamen were presented for the first time as different from previous research.

In the root cross-section, *S. tunicoides* had filled with xylem elements in root centre. Atasagun et al. (2016) had declared that *S. brevicalyx* had parenchymatous cells in the root centre, whereas *S. ozyurtii* had a sclerenchymatic centre of root [16]. There are reports that *Silene* genus had calcium oxalate crystals in the endodermis of some species and multicellular hairs on the epidermis in the stem anatomy of *Silene* [16, 22,23,24]. These findings were consistent with our findings. In addition, *S. tunicoides* have starch grains inside its pith cells. However, *S. ozyurtii* didn't have any starch [16].

For the classification and identification of species in Caryophyllaceae family can use pollen and seed morphological traits [25]. The members of Caryophyllaceae family had usually medium size, ranging from 25-50 μm pollen grains [9,10,11,15,26,27]. We determined that the pollen grains of *S. tunicoides* has the same dimensions as above mentioned. Caryophyllaceae was included in polypantoporate group by Moore *et al.* (1997) [28]. Our findings are in agreement with their results. There were also some differences in pollen characters between *S. tunicoides* and *S. ozyurtii*. *S. ozyurtii* had the bigger pollen grains, little numbers of pore, the bigger pore diameters and the smaller exine thickness than the *S. brevicalyx* [16] also than *S. tunicoides*. Structure of pore was slightly receding in *S. ozyurtii*, whereas structure of pore was protuberant in *S. tunicoides*.

The seed morphology of the *Silene* species showed seed type was reniform, reniform-circular, orbicular, semi-orbicular, or flabellate [15,29,30]. *S. ozyurtii* and *S. brevicalyx* had identified as reniform seed shape [16] as the same in *S. tunicoides*. *S. ozyurtii* had serrate suture outline, coarsely medium surface, triangular teeth shape, with concave lateral surface but *S. tunicoides* and *S. brevicalyx* have sinuous suture outline, fine surface, rectangular teeth shape, with convex lateral surface.

As a conclusion, these three species can easily separate each other according to anatomic (leaf shape, presence of starch in stem), pollen (microechinae structure, pore number) and seed characteristics (shape, suture structure, teeth shape).

Acknowledgements

The authors are thankful to the Research Foundation of Selçuk University for financial support (Project number: 15201097).

References

- [1] Mabberley, D. J. (2008). *Mabberley's plant-book (3th ed.)*. Cambridge: Cambridge University Press.
- [2] Coode, M.J.E. & Cullen, J. (1967). *Silene* L. In P.H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands 2*. (1st ed., pp. 179–222). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
- [3] Melzheimer, V. (1988). Caryophyllaceae: *Silene* L. In K.H. Rechinger (Ed.) *Flora Iranica, Vol. 163*. (pp. 341-508). Graz, Austria.
- [4] Townsend C. C., Melzheimer V., Kandemir A., Ghazanfar S. A., Haloob A. (2016). 90. Caryophyllaceae A.L. de Jussieu. In S.A., Ghazanfar & J.R. Edmondson (Eds.), *Flora of Iraq 5(1)*, (pp. 6-123). Bagdad.
- [5] Aydın, Z., Ertekin, A.S., Långström, E. & Oxelman, B. (2014). A new section of *Silene* (Caryophyllaceae) including a new species from South Anatolia, Turkey. *Phytotaxa*, 178(2), 98-112. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.178.2.2>

- [6] Firat, M. & Yıldız, K. (2016). *Silene miksensis* (Caryophyllaceae), a new species from eastern Anatolia. *Phytotaxa*, 273(4), 283-292. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.273.4.4>
- [7] Güner, E.D. & Duman, H. (2016). A new species from Turkey, *Silene bilgilii* (Caryophyllaceae). *Phytotaxa*, 246(4), 293-299. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.246.4.5>
- [8] Budak, U., Koc, M. & Hamzaoglu, E. (2018). *Silene gokuensis* (Caryophyllaceae), a new species from south Turkey. *Phytotaxa*, 345(2): 170-174. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.345.2.9>
- [9] Yıldız, K. (2001). Pollen morphology of *Silene* L. (Caryophyllaceae) from Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 33(1), 13-25.
- [10] Yıldız, K. (2006). Morphological and palynological investigation of *Silene gigantea* L. var. *gigantea* and *Silene behen* L. (Caryophyllaceae) distributed in Western Anatolia and Northern Cyprus. *Turkish Journal of Botany*, 30(2), 105-119.
- [11] Yıldız, K., Dadandı, M.Y., Minareci, E. & Çırpıcı, A. (2011). Pollen morphology of sections *Siphonomorpha* and *Lasiostemones* of the genus *Silene* from Turkey. *Turkish Journal of Bot.*, 35(6), 631-642. doi:10.3906/bot-1010-119
- [12] Şen, H., Bağcı, Y. & Çıtak, B.Y. (2014). The investigation of morphological, anatomical and ecological properties of endemic *Silene anatolica* and *Silene lycaonica*. *Biological Diversity and Conservation*, 7(1), 47-60.
- [13] Keshavarzi, M., Mahdavejad, M., Sheidai, M. & Gholipour, M.A. (2014). Anatomical study of some *Silene* L. species of *Lasiostemones* Boiss. section in Iran. *Acta Biologica Szegediensis*, 58(1), 15-19.
- [14] Keshavarzi, M., Mahdavejad, M., Sheidai, M. & Gholipour, M.A. (2015). Seed and pollen morphology of some *Silene* species in Iran. *Phytologia Balcanica*, 21(1), 7-12.
- [15] Dadandı, M.Y. & Yıldız, K. (2015). Seed morphology of some *Silene* L. (Caryophyllaceae) species collected from Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 39, 280-297. doi:10.3906/bot-1307-35
- [16] Atasagun, B., Aksoy, A. & Martin, E. (2016). Anatomical, palynological and karyological remarks of *Silene brevicalyx* and *Silene ozyurtii* (Caryophyllaceae). *Phytotaxa*, 270(2), 116-126. <http://dx.doi.org/10.11646/phytotaxa.270.2.4>
- [17] Kuh, M., Yıldız, K. & Minareci, E. (2017). A taxonomic study of the *Silene* sections *Behenantha* and *Dichotomae* (Caryophyllaceae) in Turkey based on the micromorphology of their seed and pollen. *Turkish Journal of Botany*, 41(5), 493-504. doi:10.3906/bot-1610-23
- [18] Davis, P.H., Mill, R.R. & Tan, K. (1988). *Silene* L. In P.H., Davis, R.R. Mill, & Tan, K. (Eds.) *Flora of Turkey and the East Aegean Islands (Suppl.1), Vol. 10*. (1st ed., pp. 76-81). Edinburgh, UK: Edinburgh University Press.
- [19] Johansen, D.A. (1940). *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New-York.
- [20] Wodehouse, R.P. (1935). *Pollen grains*. Mc Grew Hill, New York.
- [21] Punt, W., Hoen, P.P., Blackmore, S., Nilsson, S. & Le Thomas, A. (2007). Glossary of pollen and spore terminology. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 143: 1-81.
- [22] Metcalfe, C.R. & Chalk, L. (1950). *Anatomy of the Dicotyledons*. Oxford, UK: Clarendon Press.
- [23] Yıldız, K., Minareci, E. (2008). Morphological, anatomical, palynological and cytological investigation on *Silene urvillei* Schott. (Caryophyllaceae). *Journal of Applied Biological Sciences*, 2(2), 41-46.
- [24] Kılıç, S. (2009). Anatomical and pollen characters in the genus *Silene* L. (Caryophyllaceae) from Turkey. *Botany Research Journal*, 2 (2-4), 34-44.
- [25] Sahreen, S., Khan, M.A., Meo, A.A. & Jabeen, A. (2008). Pollen morphology of the genus *Silene* (Sileneae Caryophyllaceae) from Pakistan. *Biological Diversity and Conservation*, 1-2, 74-85.
- [26] Yıldız, K., Çırpıcı, A. & Dadandı, M.Y. (2010). Pollen morphology of the *Silene* taxa (Caryophyllaceae) in four sections from Turkey. *Phytologia Balcanica*, 16(1), 85-95.
- [27] Çıtak, B.Y. & Dural, H. (2019). The palynological traits of four endemic *Silene* L. (Caryophyllaceae) species in Turkey. *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology*, 28(1), 35-42.
- [28] Moore, P.D., Webb, J.A. & Collinson, M.E. (1997). *An Illustrated guide to pollen analysis* (2nd ed.). Blackwell, Oxford.
- [29] Yıldız, K. & Çırpıcı, A. (1998). Seed morphological studies in *Silene* L. from Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 30, 173-188.
- [30] Fawzi, N.M., Fawzy, A.M. & Mohamed, A.H.A. (2010). Seed morphological studies on some species of *Silene* L. (Caryophyllaceae). *International Journal of Botany*, 6(3), 287-292.

(Received for publication 28 December 2018; The date of publication 15 December 2019)



Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies removal of silver from aqueous solution by the Mint extract

Mine YÜCEL * ¹ Ersin YÜCEL²
ORCID: 0000-0002-6595-8231; 0000-0001-8274-7578

¹ İstanbul Technical University, Metallurgical and Materials Engineering Department, Maslak/İstanbul, Turkey

² Eskişehir Technical University, Faculty of Sciences, Department of Biology 26470 Tepebaşı Eskişehir, Turkey

Abstract

At this study, it is aiming to biosorption of the silver from low concentration leach solution that is extracted from the hydrometallurgical processes and the waste solution which includes silver ions by using the mint (*Mentha x piperita*) extracts. With the help of biological processes, it is also aimed to clean the waste water that is polluted with silver ions.

The study was actualized under four main title as preparing the biosorbent, preparing the adsorbent, making the biosorption experiments and interpret the findings. In order to analyze the balance properties at removing the silver ions from the liquid solutions, Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich isotherms are used.

As a result of the performed statistical assessments, the highest correlation coefficient is obtained from Temkin isotherm ($R^2= 0,9736$). It is followed by Dubinin-Radushkevich ($R^2= 0,9665$), Langmuir ($R^2= 0,9174$) and Freundlich ($R^2= 0,9163$) respectively. It is determined that the mint extract bond the silver ion with %99,48 efficiency. Per these results, it is seen that the mint extract shows high biosorption capacity for silver ions and it has usage potential for immobilisation the silver from waste solutions.

The results of the experiments shows that it is possible to recycle the silver ions that is in leach solutions or wastes which are considered economic lost by using mint extract. Also, since the silver is an important pollutant factor in solutions, it is determined that mint can be used as full natural cleaning method the industrial wastes that come out from ore processing.

Key words: biosorption, silver, isotherms, removal, equilibrium, *Mentha piperita*

----- * -----

Langmuir, Freundlich, Temkin ve Dubinin-Radushkevich isotherms araştırmaları, Nane ektraktı ile gümüşün sulu çözeltilerden biyosorpsiyonu

Özet

Bu çalışmada Nane (*Mentha x piperita*) bitkisinden elde edilen ekstraktlar kullanılarak cevher işleyen hidrometalurjik proseslerden çıkan düşük konsantrasyonlu liç çözeltileri ile gümüş iyonları içeren atık çözeltilerden gümüşün biyosorpsiyonu amaçlanmıştır. Ayrıca araştırma konusu olan gümüş iyonları ile kirlenmiş atık suların biyolojik prosesler yardımıyla temizlenmesi hedeflenmiştir.

Çalışma biyosorbentin hazırlanması, adsorbat hazırlanması, biyosorpsiyon deneylerinin yapılması ve bulguların yorumlanması olmak üzere dört ana başlık altında gerçekleştirilmiştir. Gümüş iyonlarının sıvı çözeltilerden uzaklaştırmasında denge özelliklerini analiz etmek için Langmuir, Freundlich, Temkin ve Dubinin-Radushkevich izotermeleri kullanılmıştır. Yapılan istatistiksel değerlendirmeler sonunda en yüksek korelasyon katsayısı Temkin izoterminden ($R^2= 0,9736$) elde edilmiştir. Temkin modelini, Dubinin-Radushkevich ($R^2= 0,9665$), Langmuir ($R^2= 0,9174$) ve Freundlich ($R^2= 0,9163$) ve modelleri izlemektedir. Nane ekstraktını sıvı çözeltilerden Gümüş iyonları %99,48

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +902223350580; Fax.: +902223204910; E-mail: ebitki@gmail.com

verim düzeyinde bağladığı belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre Nane ekstraktının, gümüş iyonları için yüksek biyosorpsiyon kapasitesi göstermekte olup, gümüşün kirli çözeltilerden immobilizasyonu için kullanılabilme potansiyeli taşımaktadır.

Yapılan deneyler sonunda, liç çözeltilerinde veya atıklarda bulunan ve ekonomik kayıp olarak nitelenen gümüş iyonlarının Nane ekstraktı ile geri kazanımının mümkün olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sıvı çözeltilerde bulunan gümüş önemli bir kirlilik unsuru olduğundan, cevher işleme süreçlerinde ortaya çıkan endüstriyel atıkların temizlenmesinde tamamen doğal biyolojik bir yöntem olarak nane kullanılabileceği saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: biyosorpsiyon, gümüş, izoterm, giderme, denge, *Mentha x piperita*

1. Giriş

Gümüş (Ag); atom numarası 47 ve atom ağırlığı 107,87 g/mol ve özgül ağırlığı 10,5 g/cm³ olan bir elementtir. Gümüş; daha çok altın, bakır, civa ve diğer metallerle alaşımlar halinde veya saf olarak bulunur. En çok rastlanan filizleri; gümüş klorür (AgCl) ve argentit (Ag₂S) olmakla birlikte, arsenik veya antimonla karışmış sülfür filizleri de vardır.

Gümüş madenciliği Anadolu da antik dönemlerden günümüze kadar devam etmiştir. Amasya-Gümüşhacıköy ve Niğde-Bolkardağ gümüş madenciliğinin ilk yapıldığı yerlerdir. Günümüzde Türkiye'deki işletilen tek gümüş yatağı, Kütahya-Gümüşköy'dür. Türkiye' de birincil kaynaktan gümüş üretimi, Kütahya/Gümüşköy'de 1987 yılında kurulan tesislerde (Eti Holding Gümüş A.Ş.) yapılmaktadır. Bu tesis, % 99,9 saflıkta 85 ton/yıl gümüş üretmektedir [1]. Ayrıca Rize-Çayeli ve Kastamonu-Küre-Aşıköy bölgesinde bakır üretiminin yan ürünü olarak gümüş elde edilmektedir.

Gümüş'ün elektronik, takı süs eşyası yapımı, çeşitli alaşımlar, dişçilik, bilgisayar röle kontaklarında, ayna sırlarının yapımında, pil yapımı, kaplama, fotoğrafçılık, bazı ilaçların yapımında ve metal alaşımların hazırlanmasında kullanılır. Ayrıca saf gümüş, boyalar, asetik asit, ve toz halinde, cam ve ahşabı elektrik iletkeni yapmak için yeni seramik tipi kaplama işlerinde kullanılmaktadır. Diş hekimliğinde gümüş, civa ve kalay ile birlikte amalgam adı verilen restoratif bir materyal olarak kullanılmaktadır. Gümüş tüm bu faydalı kullanım biçimlerine karşın insan, hayvan, bitki ve mikroorganizmalarda kronik ve akut gümüş toksisitesine neden olmaktadır [2, 3].

Gümüş üretimi, genel olarak, cevherdeki gümüşün anyonik siyanür kompleksleri halinde çözündürülerek sulu faza özütleme (liç) ve sulu fazdan kazanılması proseslerini kapsamaktadır. Siyanürleme sonucu katı fazdan sıvı faza özütleme gümüşün sıvı fazdan geri kazanımı, gümüş derişimlerine ve çözünme kinetiklerine bağlı olarak, CIP (Carbon In Pulp), CIL (Carbon In Leach) ve CIC (Carbon In Column) gibi aktif karbona yüzey soğurma (adsorption) ve geri sıyırma (Desorption) işlemleriyle ön zenginleştirmeden sonra veya doğrudan çinko tozu ile çöktürme veya elektroliz (electrowinning) ve ergitme yoluyla gerçekleştirilmektedir [1, 4]. Uygulanan bu üretim prosesleri sonucu toz, asidik sular, gümüş iyonu salımı gibi sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bu süreçlerde kullanılan sular, kullanılan kimyasal çözücüler, askıda katı maddeleri ve düşük düzeyde çözülmüş gümüş iyonlarını içerebilir. Sularda bulunan metallerin artılarak izin verilebilir sınır değerler seviyesine düşürülmesi çevre sağlığı bakımından büyük önem taşımaktadır [3]. Metallerin elde edilmesinde kullanılan proseslerin çevre kirliliğine neden olması nedeniyle son yıllarda Biyoliç (Biyohidrometalurjik) yöntemi kullanılmaya başlanmıştır [5, 6]. Biyo-hidrometalurjik proseslerin daha az enerjiye ihtiyaç duyması, ayrılma seviyesinin iyi olması, geri kazanılan ürünlerin saflık derecesi yüksek olması gibi avantajları bulunmaktadır [7].

Bu çalışmada Gümüş içeren cevherlerin saflaştırılması veya ikincil ürünlerden geri kazanılması sürecinde endüstriyel atık sularda bulunan Gümüş iyonlarının nane ekstraktı ile doğal yolla, insan ve çevre sağlığına zarar vermeyecek bir şekilde geri kazanılması amaçlanmıştır.

2. Materials and methods

Çalışma dört işlem basamağından oluşmaktadır.

2.1. Biyosorbentin hazırlanması

Nane (*Mentha x piperita*) yaprakları laboratuvar koşullarında kurutulup öğütüldükten sonra total bitki ekstraktı çıkartılmıştır. Rotary evaporator'de filtrat konsantre edilerek liyofilize hale getirilmiştir. Deneyler için kullanılmak üzere, +4°C' de steril buzdolabı ortamında saklanmıştır. Biyosorbent miktarının biyosorpsiyondaki etkisini belirlemek için, 0.6, 1.6 ve 1.8 mg L⁻¹ miktarlarda liyofilize nane ekstraktı biyosorbent olarak kullanılmıştır.

2.2. Adsorbat

Biyosorpsiyon testleri için ticari olarak temin edilebilen Gümüş (I) iyon tuzları kullanılmıştır. İyonize su (4H₂O) ile 100 mg/L Gümüş stok çözeltiler hazırlanarak cam şişelere konmuş, deneylerde kullanılmak üzere +4°C' de steril ortamda muhafaza edilmiştir.

2.3. Batch experiments

Biyosorpsiyon deneyleri için 100 mL'lik ependorf tüp içine önceden hazırlanmış olan gümüş iyonlarını içeren stok çözeltilerden 50 ml konmuştur. Daha sonra ependorf tüplere farklı miktarlarda (0.6 mg, 1,6 mg ve 1.8 mg) liyofilize nane ekstraktı biyosorbent olarak ilave edilmiş, Ependorf tüpler 6000 rpm'de 80 dakika santrifüj edilmiş, dipte oluşan koyu renkli çökelti tüp içinde bırakılmış, üstte kalan sıvı kısım yeni tüpe aktarılmıştır. Yeni tüpe aktarılan sıvı ICP (Inductively Coupled Plasma) Spektroskopisi kullanılarak sıvıdaki kalıntı metal iyonu miktarı belirlenmiştir.

2.4. Biosorption isotherm models

The Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich isotherm models were employed to describe the uptake of **Ag** ions by *Mint* ekstrakt. Isotherm and correlation coefficients (R^2) were calculate from linearized equations of these isotherms in Microsoft Excel program [8, 9].

Langmuir isotherm

$$qe / q_{max} = KLCe / (1 + KLCe)$$

Freundlich isotherm

$$qe = KF Ce^{1/n}$$

Temkin isotherm

$$qe = B \ln A + B \ln Ce$$

$$B = RT/bt$$

Dubinin-Radushkevich isotherm

$$\ln qe = \ln qm - \beta \varepsilon^2$$

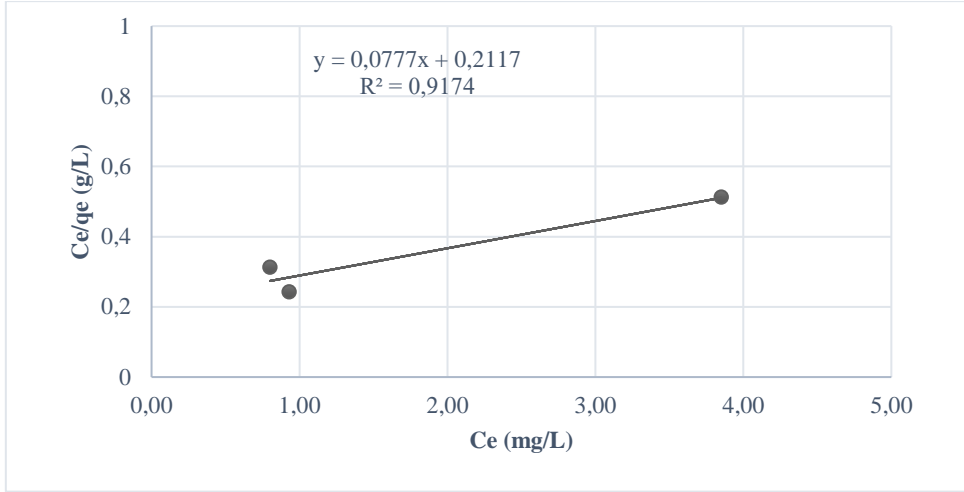
$$\varepsilon = RT \ln(1 + 1/ce).$$

3. Bulgular

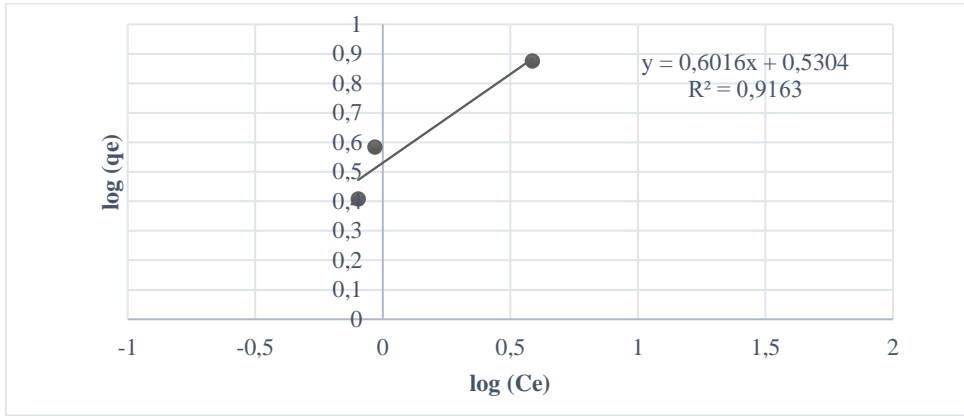
Gümüş metal iyonlarının sıvı çözeltilerden Nane ekstraktı ile biyosorpsiyonuna yönelik yapılan bu çalışmada başlangıç biyosorbent miktarı ve biyosorpsiyon parametreleri araştırılmış ve elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir. Yapılan deneylerde biyosorbent miktarının artışına bağlı olarak biyosorpsiyon miktarında doğrusal yönde bir artış olmuştur. Nane ekstraktı ile suda bulunan, Ag iyonlarını % 99,48 oranında geri kazanım sağladığı belirlenmiştir. Gümüş iyonlarının tamamına yakınının sıvılardan geri kazanılacak olması, bu sektördeki ekonomik kayıpların önlenmesi ve çevre sağlığı için büyük önem taşımaktadır.

Gümüş iyonlarının sorpsiyonunun denge özelliklerini analiz etmek için Langmuir, Freundlich, Temkin ve Dubinin-Radushkevich izotermleri kullanılmıştır. Sorbent miktarı 0,6; 1,2 ve 1,8 g olarak değiştirildiğinde izoterm modelleri tarafından elde edilen grafikler Şekil 1-4'de; tüm sabitler ve R^2 değerleri Tablo 1'de verilmiştir. En yüksek korelasyon katsayıları (R^2 değeri), gümüş uzaklaştırması için Langmuir izoterminden elde edilmiştir. Biyosorpsiyon verilerine göre Langmuir modelinin Freundlich modelinden daha uygun olduğu görülmektedir. Bu sonuç, liyofilize edilmiş nane ekstraktının gümüş giderimi için homojen biyosorpsiyon yolunu izlediğini göstermektedir.

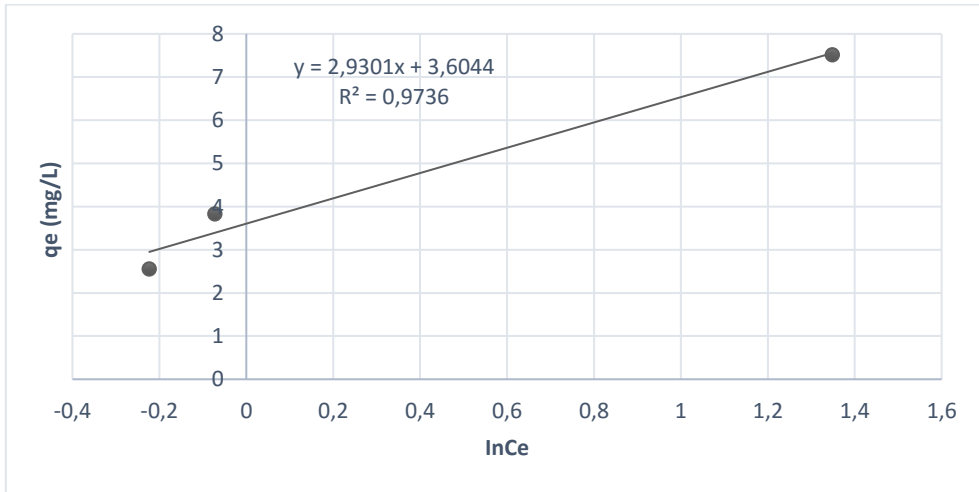
Temkin izotermi korelasyon katsayıları, Dubinin-Radushkevich izotermi katsayılarına göre daha yüksektir. Dubinin-Radushkevich izotermi için, ε değeri 8-16 kJ/mol arasında olması ve kimyasal biyosorpsiyonun, 8 kJ/mol'den daha az olması fiziksel biyosorpsiyonun gerçekleştiğini göstermektedir (Tablo 1). Dubinin-Radushkevich izotermi korelasyon katsayıları düşük olduğu için deneysel verilere iyi uymadığı belirlenmiştir (Tablo 1). Ayrıca, hesaplanan ε değeri de fiziksel biyosorpsiyonun gerçekleştiğini göstermesi bakımından önemlidir.



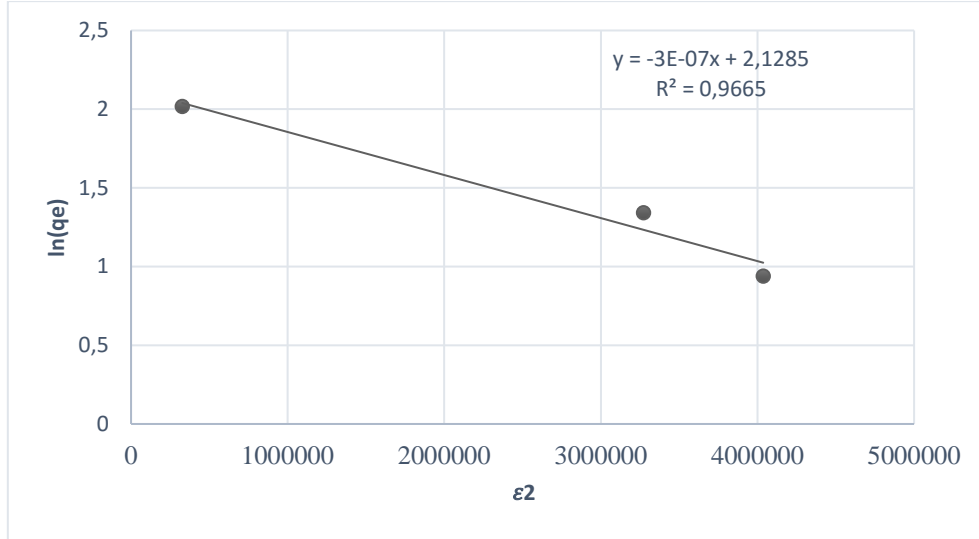
Şekil 1. Gümüşün *Mentha x piperita* ekstractı ile Langmuir modeli biyosorpsion izotermi



Şekil 2. Gümüşün *Mentha x piperita* ekstractı ile Freundlich modeli biyosorpsion izotermi



Şekil 3. Gümüşün *Mentha x piperita* ekstractı ile Temkin modeli biyosorpsion izotermi



Şekil 4. Gümüşün *Mentha x piperita* ekstraktı ile Dubinin–Radushkevich modeli biyosorpsiyon izotermi

Tablo 1. Gümüşün *Mentha x piperita* ekstraktı ile biyosorpsiyonu için Langmuir, Freundlich, Temkin ve Dubinin - Radushkevich modelinin izoterm sabitleri

Model	Parametreler	Ag
Langmuir modeli	R ²	0,9174
	q _{max} (mg/g)	12,8700
	KL (L/mg)	0,367028814
Freundlich modeli	R ²	0,9163
	n	1,6622
	KF	3,3916E+00
Temkin modeli	R ²	0,9736
	B	2,9301
	bt (J/mol)	0,001183
	A (L/g)	3,42167
Dubinin–Radushkevich modeli	R ²	0,9665
	q _m (mg/g)	8,402254
	β (mol ² /kJ)	3,00E-07
	E (KJ/mol)	1,290994

4. Sonuçlar ve tartışma

Türkiye’de yıllık 200 ton civarında gümüş kullanılmakta olup, bunun yaklaşık % 30’u Eti Holding Gümüş İşletmesi tarafından karşılanmaktadır. Resmi rakamlara göre ortalama 20 ton civarında gümüş ithalatı yapılmaktadır. Ayrıca tamamı ithal edilen röntgen filmlerindeki gümüşün değerlendirilmesi, hurda gümüş dönüşü, gümüş ithalatı ve gayri resmi gümüş girişi yıllık gümüş arzını oluşturmaktadır; gümüş üretimi Türkiye’de 85 ton/yıl, dünyada ise 16378,4 ton/yıl olarak bildirilmektedir [1]. Buna göre birincil ve ikincil kaynaklarda önemli miktarda gümüş üretimi yapılmaktadır.

Gümüş çevre kirliliğine neden olduğu bilinen ağır metallere biridir [2]. İnsanlar gümüş dermal, radyografik ve fotografik malzeme, diş amalgamı, gıda, su ve ilaçlar ile gümüş içeren ürünlerin kullanımı yoluyla maruz kalabilir. Gümüş insanlarda aşırı duyarlılık reaksiyonları, astım, kronik bronşit, tekrarlayan akıntular, karın ağrısı, deri ve göz yanması, gece görüşünde azalma gibi toksik ve akut zehirlenmelere neden olur. [10, 11]. Yerleşim yerlerinin atık sularında çeşitli patojenler ve hastalık etmeni mikroorganizmalar bulunmaktadır. İnsan veya hayvanlar tarafından idrar ve dışkı ile sulara atılan patojenler iyi yıkanmamış gıdalarla insanlara taşınmaktadır. Bu nedenle evsel ve endüstriyel atık suların yeterince arıtılmadan alıcı ortamlara deşarj edilmesi insan sağlığı açısından büyük riskler taşımaktadır. Nane uçucu yağının antimikrobiyal [12, 13] ve antioksidan [14] etkisinin olduğu yapılan bilimsel çalışmalar sonucuna göre açıkça kanıtlanmıştır [15]. Buna göre nane ekstraktı aynı zamanda kirli suların biyolojik olarak arıtılma potansiyeli de taşımaktadır.

Yapılan çalışmalar sonunda biyosorpsiyon verilerinin, Langmuir modelinin Freundlich modelinden daha uygun olduğunu göstermiştir. Buna göre, liyofilize edilmiş nane ekstraktının gümüş giderimi için homojen biyosorpsiyon yolunu izlediğini göstermektedir. Ayrıca Temkin izotermi modelinin Dubinin-Radushkevich izotermine göre daha uygun olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmada sulu bir çözeltilen gümüş iyonlarının maksimum çıkarılması için seçilebilir girdi parametreleri; biyosorbent 0.6 mg, 1,6 mg, 1.8 mg; pH 6.0; 25°C sabit sıcaklık; 180 dakika kontak zaman ve 6000rp santrifüj hızı kullanılmıştır. Ancak yapılacak yeni çalışmalarla adsorbat ile biyosorbent arasındaki biyosorpsiyon sürecinde değişik girdi parametreleri (temas süresi, pH, sıcaklık, biyosorbent miktarı vd.) kullanılarak yeni sonuçlar elde edilebilir.

Gümüş üretimi, genel olarak, cevherdeki gümüşün anyonik siyanür kompleksleri halinde çözündürülerek yapılmaktadır. Siyanürün çevresel, teknik ve ekonomik zorlukları göz önüne alınarak alternatif reaktif sistemleri üzerine uzun yıllardır çok sayıda çalışma yapılmıştır [16, 17, 18, 19]. Ancak yeni bir yöntem olarak nane ekstraktının kullanıldığına ilişkin yapılmış bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Sonuç olarak; *Mentha x piperita* bitkisinden elde edilen ekstraktlar kullanılarak, düşük konsantrasyonlu liç çözeltilerinden gümüş iyonlarının geri kazanımının mümkün olduğu belirlenmiştir. Gümüş iyonlarını içeren suların kimyasal olarak arıtılmasına yönelik, zararlı etkisi olmayan tamamen doğal bir reaktif olarak Nane bitkisinden elde edilen ekstraktların kullanılabilmesi saptanmıştır. Ayrıca arıtma sistemlerinde, kirli suların fiziksel kimyasal ve biyolojik olarak arıtılması ve koku kirliliğinin önlenmesi için ekolojik bir çözüm olarak, nane ekstraktının kullanımı mümkündür.

Acknowledgements

Bu araştırma KOSGEB Eskişehir Müdürlüğü tarafından Araştırma-Geliştirme, İnovasyon Ve Endüstriyel Uygulama Destek Programı kapsamında (PROJE NO: 2015/23) desteklenmiş olup, desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

References

- [1] Anonim 2001, Madencilik ÖİK Raporu Metal Madenler Alt Komisyonu Değerli Metaller Çalışma Grubu Raporu DPT: 2623 - ÖİK: 634, 34 s, Ankara.1763-1766.
- [2] Bianchini, A., Grosell, M., Gregory, S. M., & Wood, C. M. (2002). Acute silver toxicity in aquatic animals is a function of sodium uptake rate. *Environmental science & technology*, 36(8),
- [3] Prabhu, S., & Poulouse, E. K. (2012). Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *International nano letters*, 2(1), 32.
- [4] Kawatra S. K., & Natarajan K. A. 2001. Mineral Biotechnology, Society for Mining, Metallurgy and Exploration, Vol. 263.
- [5] Lewis, G., Gaydardzhiev, S., Bastin, D., & Bareel, P. F. (2011). Bio hydrometallurgical recovery of metals from Fine Shredder Residues. *Minerals Engineering*, 24(11), 1166-1171.
- [6] Abdel-Ghani, Nour T., & Ghadir A. El-Chaghaby. (2014). "Biosorption for metal ions removal from aqueous solutions: a review of recent studies." *Int J Latest Res Sci Technol* 3.1: 24-42.
- [7] Jadhav, U. U., & Hocheng, H. (2012). A review of recovery of metals from industrial waste. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, 54(2), 159-167.
- [8] Dada, A. O., Olalekan, A. P., Olatunya, A. M., & Dada, O. (2012). Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn²⁺ unto phosphoric acid modified rice husk. *IOSR Journal of Applied Chemistry*, 3(1), 38-45.
- [9] Balarak, D., Mostafapour, F. K., Azarpira, H., & Joghataei, A. (2017). Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of ampicilin unto montmorillonite nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 1-9.
- [10] Faust, R. A. (1992). Toxicity summary for silver. *Chemical Hazard Evaluation and Communication Group. Biomedical and Environmental Information Analysis Section Health and Safety Research Division. Oak Ridge Reservation Environmental Restoration Program. Tennessee.*
- [11] Yücel, M., & Yücel, E. 2013. On the ecotoxicological effects of heavy metal pollution of industrial origin determination of wheat varieties" *Biological Diversity and Conservation*,6/3 6-11.
- [12] Tyagi, A. K., & Malik, A. 2011. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food Control*, 22(11), 1707-1714.
- [13] Iscan, G., Kirimer, N. E. S. E., Kürkcüoğlu, M., Baser, H. C., & Demirci, F. 2002. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(14), 3943-3946.
- [14] Dorman, H. D., Kosar, M., Kahlos, K., Holm, Y., & Hiltunen, R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4563-4569.
- [15] Yadegarinia, D., Gachkar, L., Rezaei, M. B., Taghizadeh, M., Astaneh, S. A., & Rasooli, I. 2006. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry*, 67(12), 1249-1255.

- [16] Ahlatcı, F., Celep, O., & Deveci, H. 2017. Tiyosülfat İle Altın Ve Gümüş Liçinin Temelleri–Bölüm I. Bilimsel Madencilik Dergisi, 56(3), 117-130.
- [17] Aylmore, M.G., 2016. Thiosulfate as an Alternative Lixiviant to Cyanide for Gold Ores. In: M.D. Adams (Ed.), Advances in Gold Ore Processing. Elsevier Science, 485-523.
- [18] Gorain, B.K., Kondos, P.D., & Lakshmanan, V.I., 2016. Innovations in Gold and Silver Processing. In: V.I. Lakshmanan, R. Roy and V. Ramachandran (Eds.), Innovative Process Development in Metallurgical Industry. Springer, 393-428.
- [19] Puente-Siller, D. M., Fuentes-Aceituno, J. C., & Nava-Alonso, F. (2017). An analysis of the efficiency and sustainability of the thiosulfate-copper-ammonia-monoethanolamine system for the recovery of silver as an alternative to cyanidation. *Hydrometallurgy*, 169, 16-25.

(Bu çalışma “3th International Congress On Plant Science And Technology. 18-20 December 2019. Afyon-Turkey” de sözlü bildiri olarak sunulmuştur.)

(Received for publication 17 October 2017; The date of publication 15 December 2019)



Nest characteristics of Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) in Middle and Upper Sakarya Region, Turkey

Sunay BALABAN¹, Elif YAMAÇ^{*2}
ORCID: 0000-0002-6588-0139; 0000-0002-1203-6700

¹ Eskişehir Technical University, School of Science, Department of Biology, Eskişehir, Turkey

² Eskişehir Technical University, Faculty of Science, , Department of Biology, Eskişehir, Turkey

Abstract

Egyptian vulture is an endangered vulture species all over the World. Turkey holds the substantial amount of the global population of the species in Western Palearctic. Middle and Upper Sakarya Region is an important host for the breeding Egyptian vulture population in Anatolia. In total 37 occupied nests were recorded in 2013 and 2014 years. In order to determine the nest characteristics 11 nest variables and cliff features were evaluated in this study. Egyptian vulture nests were determined both in hollows (n= 24) and on ledges (n= 13) at the middle part of the small limestone cliffs in the study area. The mean \pm SD of cavity width and height are 2.0 ± 1.0 and 1.5 ± 0.6 , respectively. Nests were situated predominantly southwestern exposure. Although the first data is given in this study about nest characteristics in the region, detailed studies are required on the relationship between nest site quality and breeding parameters to undertake conservation strategies for Egyptian vulture in Turkey.

Key words: Anatolia, cave nesting, endangered vultures

----- * -----

Orta ve Yukarı Sakarya Bölgesi' nde dağılım gösteren Küçük Akbaba (*Neophron percnopterus*)' nın yuva özellikleri

Özet

Küçük akbaba soyu küresel ölçekte tehdit altında olan bir akbaba türüdür. Batı Palearktik bölgede dağılım gösteren populasyonun büyük bir kısmı Türkiye' de yer almaktadır. Anadolu' da Orta ve Yukarı Sakarya Bölgesi küçük akbabalar için önemli bir üreme alanına sahiptir. 2013 ve 2014 yıllarında gerçekleştirilen çalışmalar ile bölgede küçük akbaba tarafından kullanılan 37 yuva tespit edilmiştir. Bu çalışmada populasyonun yuva özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yuvaların yer aldığı kaya ve yuvalara ait 11 özellik değerlendirilmiştir. Küçük akbaba çalışma alanındaki kireç taşı oluşumlu kaya kütlelerinin orta kısımlarında yer alan oyuklara (n= 24) ve çıkıntı setlere (n= 13) yuva yapmaktadır. Yuva oyğunun genişlik ve yükseklik için ortalama değerleri sırasıyla 2.0 ± 1.0 ve 1.5 ± 0.6 m olarak belirlenmiştir. Yuvalar çoğunlukla kayaların güneybatı yönüne bakan yüzeylerinde konumlanmaktadır. Bu çalışmayla yuva özelliklerine ait bölgedeki ilk veriler elde edilmiştir. Ancak Türkiye' de küçük akbaba türünü korumaya yönelik yapılacak çalışmalarda, yuva alanı özelliklerinin üreme başarıları üzerine etkilerini detaylı bir şekilde değerlendirmek gerektiği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Anadolu, mağara tipi yuva, tehlike altındaki akbabalar

1. Introduction

Egyptian vulture is a medium sized Old World vulture species. Global populations mainly distribute in north of the equator in Africa, southern Europe, Middle East, Caucasus and in India easternmost. Some populations in northwest of Africa and Asia and all European populations are migratory while others are resident in Sahel Region, East Africa, Ethiopia, India and Spanish archipelagos [1]. Populations mostly concentrate below 2000 asl. except some resident populations such as Caucasian, Himalayan and Ethiopian [1; 2]. Egyptian vulture is found in high rocky plains, savannas,

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +9905545897708; Fax.: +902223204910; E-mail: sunaybalaban@gmail.com

semi-desert grasslands and croplands in wintering sites. However in the breeding season, it is seen in mountainous terrains, woodlands, plateaus, canyons and cultivated areas near human settlements [1; 3; 4; 5].

Species is one of the sixteen threatened vultures worldwide and classified globally endangered [6; 7]. The underlying reasons for this threat level of Egyptian vulture populations are reported as food source reduction, direct and indirect poisoning, illegal hunting, habitat degradation, electrocution and wind turbine collision both in wintering and breeding areas [8; 9; 10; 11; 12; 13; 14]. These threats have negative impacts on adult survival rate and accordingly viability of populations result in decrease of populations [15; 16; 17; 18].

Even though Turkey holds one of the largest breeding population in Europe [7; 19], only two detailed studies were performed [19; 20]. Apart from these studies, there are limited data on distribution of the species in Turkey [21]. Although it has been published records on the altitude, nest height and slope of the nests in Beypazarı [19], detailed information on the nest characteristics of the Egyptian vulture in Turkey remains unknown.

It is known that nest-site features have an important role to promote adult survival and breeding success which are crucial for population viability of threatened vulture species such as Egyptian vulture [22; 23; 24; 25; 19]. Cave type nests provide safer place and positive impact on breeding success for cliff nesting vulture species [26]. According to studies on nest characteristics, Egyptian vulture is a cliff nesting species typically nests in caves, sheltered or open ledges on limestone cliffs in Italy, Spain, Yemen, Bulgaria, Greece, Macedonia and Ethiopia, [2; 4; 5; 23; 26; 27; 28; 29]. They occasionally nest on large trees, electric pylons, buildings and even on the ground in Canary Islands and Bulgaria [30; 31; 32]. The goal of this study is to collect data about nest characteristics of the Egyptian vulture in Turkey and to contribute to national conservation activities of the species classified globally endangered.

2. Materials and methods

1.1. Study Area

The study was conducted in Upper and Middle Sakarya Region, in the western part of the Central Anatolia comprising 7970 km² area (Figure 1). Vegetation vary by the regions in the study area. Northern and southwestern parts are covered by fir, pine, oak and juniper forests. In contrast, cultivated areas, highland and lowland steppes, grassland and shrub vegetation are mostly found in central and eastern part [21].

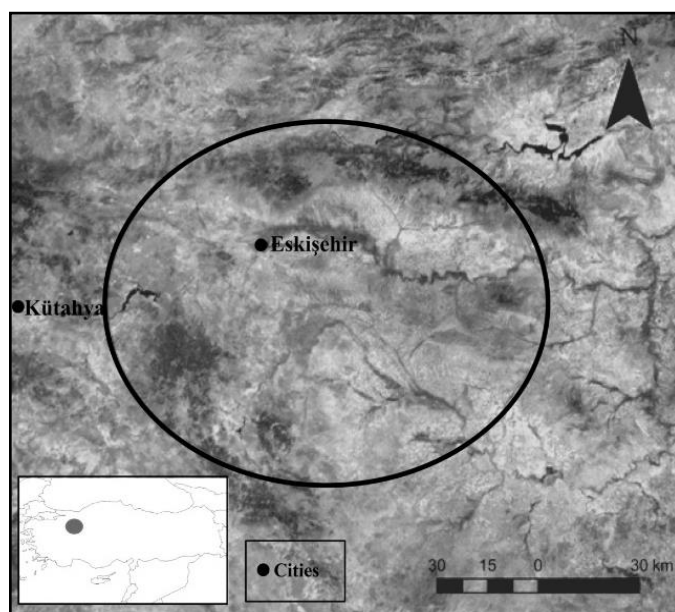


Figure 1. The study area

Climate is continental Central Anatolian thermal regime with the average temperature of 11 °C and annual rainfall 403.2 mm [33]. Besides there is Mediterranean climate in Sarıcakaya region which shows microclimatic features along the Sakarya river. Sakarya and Porsuk rivers are the main water resources in the region [21].

Alluvial plains, sand stone, clay stone, limestone, basalt, tufa and granite rocks are common geological formations. The highest and lowest altitudes are 1826 m and 190 m to asl in the study area [21].

Other than *Neophron percnopterus*; two vulture species, Bearded vulture (*Gypaetus barbatus*) and Cinereous vulture (*Aegypius monachus*), breed in the region. Some cliff nesting species breed in the study area such as Long-legged buzzard (*Buteo rufinus*), Black stork (*Ciconia nigra*), Peregrine (*Falco peregrinus*), Raven (*Corvus corax*) which have similar breeding habitat with Egyptian vulture [21; 34; 35].

1.2. Nest Survey and Measurements

The field surveys were carried out in 2013 and 2014 years to determine the nests occupied by Egyptian vulture at least for one breeding season. Occupied nests were located during the breeding season between April and August. In order to avoid disturbance, the measurement of the nest characteristics was conducted in September after birds left the area. Totally 37 occupied nests were determined and located by GPS. Because of the rough land structure, approaching to sufficient distance or climbing every occupied nest for measurements was not possible. To determine nest characteristics 11 variables were evaluated. In order to determine the dominant rock structure, geological formation of the nesting cliffs were identified based on database of general directorate of mineral research and exploration [36]. Study area include historical man made caves which is used for the nesting by the species. Thus, it was assessed whether the nest cave is natural formation or man-made based on the locational data of the ancient settlement [37; 38]. Also nests were classified as cave or ledge type. Furthermore Cliff Height (CH): Vertical distance between peak and base of the cliff, Nest Height (NH): Vertical distance between cliff base and nest, Nest Position (NP): Lower/middle/upper parts of each cliff, Cavity Length (CaL): Distance between entrance and end of the cave/ledge, Cavity Width (CaW): Distance between left and right side of the cave/ledge, Cavity Height (CaH): Distance between bottom and top of the cave/ledge, Altitude (A), Nest Aspect (NA) were also determined [39]. Measurements were performed by tapeline and Vertex IV altimeter. Altimeter device was used to measure the nest height and cliff height at a distance from the nest. To determine NP, it was hypothetically divided every single cliff in 3 parts as lower, middle and upper and classified each nest as where they situated on the cliff. In order to determine altitudes, it was used GPS and Google Earth programme. Nest aspects were recorded by using compass. Data were reported as minimum, maximum and mean \pm standard deviation for ratio variables (SD).

3. Results

Overall 37 Egyptian vulture nests were recorded in the area during the field surveys in 2013 and 2014 years. Geological formations of nesting cliffs vary by the region. But the dominant formation was limestone (n= 11) following by pyroclastic rocks (n= 8). The rest of the nesting cliffs were several different rock type such as granitoid, marble, schist and other clastic rocks. Other than the 31 nests on natural rock formations, 6 nests were found in hollows on ancient man-made structures. Twentyfour nests were found in hollow and thirteen on ledge. The minimum, the maximum, the mean and the standard deviation values of the cliff and nest measurements were presented in table (Table 1). NP and NA data of the nests were given as diagrams (Figure 2 and 3).

Table 1. Outcomes of cliff and nest measurements

	N	Min(m)	Max(m)	Mean \pm SD (m)
CH	25	3.5	37.7	11.8 \pm 6.7
NH	25	2.0	26.2	6.7 \pm 4.5
CaL	12	0.8	3.5	1.9 \pm 0.9
CaW	13	0.7	5.0	2.0 \pm 1.0
CaH	13	0.5	3.0	1.5 \pm 0.6
A	37	288.0	1292.0	858.0 \pm 236.0

CH: Cliff Height, NH: Nest Height, CaL: Cavity Length, CaW: Cavity Width, CaH: Cavity Height, A: Altitude

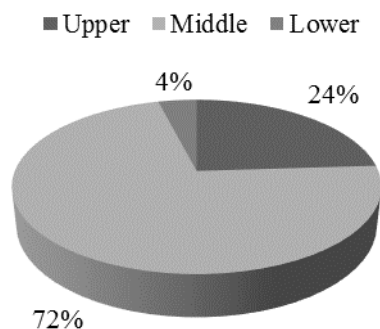


Figure 2. Nest positions in the cliff

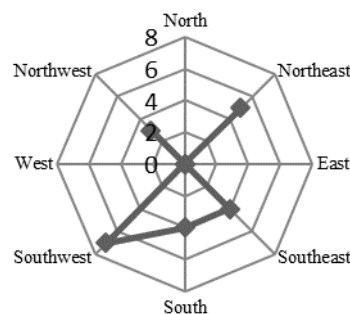


Figure 3. Aspects of the nests

4. Conclusions and discussion

In Middle and Upper Sakarya Region, the majority of the 37 Egyptian vulture nests were located on the limestone and pyroclastic cliffs. Similarly, limestone is the common rock formation of nesting cliffs in Europe and Africa, also [2; 26; 27]. Depends on the proportion of mineral composition, limestone and pyroclastic cliffs easily erodible and may provide many hollows and ledges. These natural formations offer a save shelter for Egyptian vultures to nest and raise their fledgelings [2; 23; 27; 40].

Other than natural formations some hollows carved by ancient civilizations were recorded as a nest site in our study area. These ancient settlements ruins such as symbolic tombs are from the Phrygians. Similar case was reported in different area in Turkey [41].

Egyptian vulture nests on small cliffs in the Middle and Upper Sakarya Region. This phenomenon has been reported in other breeding areas in Europe [4; 27; 29; 42; 43]. Nevertheless the mean cliff height (11.8 ± 6.7 m) is much more lower in our study area when compare to the other populations in European such as Balkan populations with 37 ± 38 m [29], Sicilian population with 78.1 ± 51 [4], Italian population with 135 ± 125 m [23] and the population in northern Spain with 53.6 ± 68.7 m [40].

The mean nest height (6.7 ± 4.5 m) is similar to the findings of populations in Bulgaria and Greece. Although the mean value is relatively higher in Balkan populations, most of the nests (53%) situated 1-10 m height [29]. However the mean nest height is quite high in other regions in Europe; Sicily with 47.3 ± 41.7 and Italian peninsula with 41.6 [4; 23].

The Egyptian vulture nests are mainly located at the middle part of the rocks in the Middle and Upper Sakarya Region (Figure 2.). Although some researchers report that nest are situated at the upper part of the rocks which is possibly the most inaccessible [23; 26] alternatively nesting at the base of the cliffs may minimise the energy consumption in carrying food to the nest [42] or provide good weather conditions to individuals [2]. These are also might be the possible explanations of the low cliff and nest height in our study area.

In addition, low pressure of being hunted by predators or lower human disturbance might have an impact on choice of small rocks. It has been emphasized in a study with another cliff nesting raptor species Bonelli's eagle (*Hieraaetus fasciatus*) that cliff height is effected by human related disturbance. Lower cliffs were preferred more when they are far from the paved road whereas higher cliffs were used in the case of heavy human pressure [44]. Raven *Corvus corax*, stone marten *Martes foina* and Eurasian eagle owl *Bubo bubo* are common possible predators and threats for Egyptian vulture among European populations [19; 29; 45]. There is a phenomenon which eggs or juveniles may be hunted by predators if the nest are easily accessible. Clutch replacement in order to tolerate this type of reproductive failures is less frequent among large size and single brooded raptors [46]. It has been recorded that Egyptian vulture successfully breed after clutch replacement in case of failure [22; 45]. Still prevalence of replacement is low. Alternatively constructing inaccessible nest seems required less energy comparing to cost of relaying process. Accordingly we expect the nest would be located high in our study area as well. However according to the results of measurement not only but one of the possible explanations of the low nest height may be associated with low pressure of predators in the study area.

The dominant nest type was cave form and the nests are deep (mean \pm SD= 1.9 ± 0.9 m) and wide (mean \pm SD= 2.0 ± 1.0 m) according to the outcomes of the nest measurements in Middle and Upper Sakarya Region (Table 1). Deep hollows may offer individuals a shelter to overcome unfavorable weather conditions during the breeding season. This argument also could explain the abundance of cave type nests in the study area. There are only few informations about the nest type, CaL, CaW and CaH for other Egyptian vulture populations. It has been reported that nests are approximately 1 m in width and depth in Greece and Yemen [26; 43]. Similar study has conducted with another cliff nesting vulture population (*Gyps fulvus*) in Gamla Nature Reserve and authors reported that the nest-sites in caves are more successful and productive than the nest-sites on open ledges [47]. However we did not analyze statistically whether the nest-site features are preference or not. Thus interpretations of nest-site preference remain limited.

The mean altitude value of nest sites is relatively higher than the one in Beypazari region where another significant population exist close to our study area. Unlike the elevation report of Beypazari population [19] the half of the nest sites (n:19) are above 900 m in our study area. Also the data of other European populations are consistent with the mean altitude in the study area in Middle and Upper Sakarya Region [1; 4].

It is known that Egyptian vulture's nests are predominantly southfacing [4; 19; 23; 28]. In our study area southwestern exposure was relatively higher which is identical to findings in Balkan populations [29]. Use of sunlight [29] or exploitation of potential good microclimatic features [28] might be related with preference of the southfacing nest. A study conducted with other cliff-nesting raptor Bonelli eagle *Aquila fasciata* reported that sunny orientation offers a dry environment thus decreases the number of ectoparasites in the nest [48]. This is also a strong argument considering the self protection of adults from arthropods and other parasites and the raising chicks in a healthier environment.

As a conclusion, Turkey holds one of the largest Egyptian vulture populations in Europe [10; 19]. Middle and Upper Sakarya Region population is an important constituent with 53 territorial pairs [20]. Individuals mainly use limestone rock formation and nests are located on small rocks and the mean nest height is low. Aspect of the nests is predominantly southwestern and the most abundant nest type is cave which provides individuals wider and safer breeding environment. Also ancient man-made constructions were alternative nesting fields in our study area. Middle and Upper

Sakarya Region is an important area where individuals may use different types of nesting areas. Although we did not evaluate the anthropogenic impacts on nest characteristics, low cliff and nest height may indicate the low predator stress and human disturbance in our study area. Contrary to this, abundance of the cave type nest in our study area which provides more inaccessible and invisible breeding environment may link to better protection against predators. In order to clarify these factors detailed researches are required on the nest-site quality and habitat use in relation to breeding parameters and stress factors as predators and human induced activities. Furthermore threats to the species should be determined both locally and throughout the country in order to undertake essential conservation actions for the Egyptian vulture in Turkey.

Acknowledgements

This study was supported financially by Anadolu University Research Fund (Grant number: 1303F050).

References

- [1] Ferguson-Lees J. & Christie D. A. (2001). Egyptian vulture. *Raptors of the World*. London, UK: Christopher Helm A and C Black Publications Ltd, pp. 417-424.
- [2] Mateo-Tomás P. & Olea P. P. (2009). Combining scales in habitat models to improve conservation planning in an endangered vulture. *Acta Oecologica*, 35 (4), 489–498.
- [3] Cramp S. & Simmons K. E. L. (1980). *The birds of western Palearctic*. Vol 2. Oxford UK: Oxford University Press. .
- [4] Sarà M. & Di Vittorio M. (2003). Factors influencing the distribution abundance and nest-site selection of an endangered Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) population in Sicily. *Animal Conservation*, 6 (4), 317-328.
- [5] Arkumarev V., Dobrev V., Abebe Y. D., Popgeorgiev G., & Nikolov S. C. (2014). Congregation of wintering Egyptian Vulture *Neophron percnopterus* in Afar Ethiopia present status and implications for conservation. *Ostrich*, 85 (2), 139-145.
- [6] Ogada D. L., Keesing F. & Virani M. Z. (2012). Dropping dead: causes and consequences of vulture population declines worldwide. *Annals of the New York Academy of Science*, 1249 (1), 57-71.
- [7] Birdlife International (2018). Species factsheet: *Neophron percnopterus* Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 14/03/2018.
- [8] Camina A. (2004). Consequences of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) on breeding success and food availability in Spanish Vulture populations. In: Chancellor R.D. and Meyburg B.U. (Ed.): *Raptors Worldwide*. World Working Group on Birds of Prey Berlin.
- [9] Cuthbert R., Green R. E., Ranade S., Saravanan S., Pain D. J., Prakash V. & Cunningham A. A. (2006). Rapid population declines of Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) and red-headed vulture (*Sarcogyps calvus*) in India. *Animal Conservation*, 9 (3), 349–354.
- [10] Iñigo A., Barov B., Orhun C. & Gallo-Orsi U. (2008). Action plan for the Egyptian Vulture *Neophron percnopterus* in the European Union. Birdlife International & European Commission, Brussels 62 p.
- [11] Zuberogoitia I., Zabala J., Martinez J. A., Martinez J. E. & Azkona A (2008). Effect of human activities on Egyptian vulture breeding succes. *Animal Conservational*, 11(4), 313-320.
- [12] Hernandez M. & Margalida A. (2009). Poison-related mortality effects in the endangered Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) population in Spain. *European Journal of Wildlife Research* 55 (4): 415-423.
- [13] Margalida A., Donázar J. A., Carrete M. & Sánchez-Zapata J. A. (2010). Sanitary versus environmental policies: fitting together two pieces of the puzzle of European vulture conservation. *Journal of Applied Ecology*, 47 (4), 931–935.
- [14] Angelov I., Hashim I. & Opper S. (2013). Persistent electrocution mortality of Egyptian Vultures *Neophron percnopterus* over 28 years in East Africa. *Bird Conservation International*, 23 (1), 1-6.
- [15] Carrete M., Grande J. M., Tella J. L., Sanchez-Zapata J. A., Donazar J. A., Diaz-Delgado R. & Romo A. (2007). Habitat human pressure and social behavior: Partialling out factors affecting large-scale territory extinction in an endangered vulture. *Biological Conservation*, 136(1), 143-154.
- [16] Cortes-Avizanda, A., Ceballos O. & Donázar J. A. (2009). Long Term Trends in Population Size and Breeding Success in the Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus*) in Northern Spain. *Journal of Raptor Research*, 43 (1), 43-49.
- [17] Grubac B., Veleviski M. & Avukatov V. (2014). Long-term population decrease and recent breeding performance of the Egyptian Vulture *Neophron percnopterus* in Macedonia. *North-Western Journal of Zoology*, 10 (1), 25-35.
- [18] Veleviski M., Nikolov S. C., Hallmann B., Dobrev V., Sidiropoulos L., Saravia V., V., ... Opper S. (2015). Population decline and range contraction of the Egyptian Vulture *Neophron percnopterus* in the Balkan Peninsula. *Bird Conservation International*, 25(4), 440-450.
- [19] Şen B., Tavares J. P. & Bilgin C. C. (2017). Nest site selection patterns of a local Egyptian Vulture *Neophron percnopterus* population in Turkey. *Bird Conservation International*, 27 (4), 568-581.
- [20] Balaban S. & Yamaç E. (2018). Breeding performance and diet of the Egyptian vulture (*Neophron percnopterus* L.) in Middle and Upper Sakarya Region, Turkey. *North Western Journal of Zoology*, 14 (1), 91-95.
- [21] Eken G., Bozdoğan M., İsfendiyaroğlu S, Kılıç D. T. & Lise Y. (2006). Türkiye'nin Önemli Doğa Alanları Ankara: Doğa Derneği. 639 p. (In Turkish).

- [22] Mundy P. J. (1982). The comparative biology of Southern African Vultures. Johannesburg, South Africa: Vulture Study Group.
- [23] Liberatori F. & Penteriani V. (2001). A long-term analysis of the declining population of the Egyptian vulture in the Italian peninsula: distribution habitat preference productivity and conservation implications. *Biological Conservation*, 101 (3), 381-389.
- [24] Moreno-Opo R., Fernandez-Olalla M., Margalida A., Arredondo A. & Guil F. (2012). Effect of Methodological and Ecological Approaches on Heterogeneity of Nest Site Selection of a Long-Lived Vulture. *Plos one*, 7(3), e33469 doi:10.1371/journal.pone.0033469.
- [25] Tauler H., Real J., Hernandez-Matias A., Aymerich P., Baucells J., Martorell C. ... Santandreu J. (2015). Identifying key demographic parameters for the viability of a growing population of the endangered Egyptian vulture *Neophron percnopterus*. *Bird Conservation International*, 25 (4),426-439.
- [26] Porter R. F. & Suleiman A. S. (2012). The Egyptian Vulture *Neophron percnopterus* on Socotra Yemen: population ecology conservation and ethno-ornithology. *Sandgrouse*, 34, 44-62.
- [27] Grubac R. B. (1989) The Egyptian Vulture *Neophron percnopterus* in Macedonia. In: Meyburg B. U. & Chancellor R. D. (Ed.) *Raptors in the Modern World*. London UK: WWGBP, pp. 331-334.
- [28] García-Ripollés C. & Lopez-Lopez P. (2006). Population size and breeding performance of Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus*) in Eastern Iberian Peninsula. *Journal of Raptor Research*, 40 (3), 217-221.
- [29] Dobrev V., Oppel S., Arkumarev V., Saravia V., Bounas A., Manolopoulos A. ...Nikolov S.C. (2016). Habitat of the Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) in Bulgaria and Greece (2003- 2014) Technical report under action A5 of the LIFE+ project “The Return.
- [30] Gangoso L. & Palacios C. J. (2005). Ground nesting by Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus*) in the Canary Island. *Journal of Raptor Research*, 39 (2), 187-188.
- [31] Naoroji R. (2006). Birds of prey of the Indian subcontinent. Om Books International, India.
- [32] Nikolov S., Nikolov C. & Angelov I. (2013). First record on ground nesting of Egyptian Vulture *Neophron percnopterus* (Aves:Accipitriformes) in Continental Europe. *Acta Zoologica Bulgarica*, 65 (2), 417-419.
- [33] Turkish State Meteorological Service (2018). Resmi İstatistikler. <http://www.meteor.gov.tr>. (In Turkish).
- [34] Kirazlı C. & Yamaç E. (2013). Population size and breeding success of the Cinereous Vulture *Aegypius monachus* in a newly found breeding area in western Anatolia (Aves:Falconiformes). *Zoology in the Middle East*, 59 (4), 289-296.
- [35] Yamaç, E. (2018).Current evaluation of the Cinereous vulture (*Aegypius monachus* L.) population in Türkmenbaba mountain (Turkey), *Biological Diversity and Conservation*, 11(3),190-196.
- [36] MTA (2018). Yerbilimleri Harita Görüntüleyici ve Çizim Editörü. <http://yerbilimleri.mta.gov.tr/anasayfa.aspx> (In Turkish).
- [37] Sivas T. T. & Sivas H. (2005). Eskişehir, Kütahya, Afyonkarahisar illerinin 2004 yılı arkeolojik envanteri ve yüzey araştırması. *Tuba-ar Turkish Academy of Science*, 4 (4) ,33-57. (In Turkish).
- [38] Eveim S. (2016). Frigya Bölgesi'nde Bizans Dönemi kaya mimarisi. *Ordu Üniversitesi Sosyal Bilimler Araştırma Dergisi*, 6(3), 861-876. (In Turkish).
- [39] Tapia L., Kennedy P. L. & Mannan R. W. (2007). Habitat Sampling. *Raptor Research and Management Techniques*. In: Bird D. M. & Bildstein K. L. (Ed.) Washington, USA: Hancock House Blaine, pp. 181-193.
- [40] Zuberogoitia I., Zabala J., Martinez J. A., Martinez J. E., Gonzalez-Oreja J.A. & Lopez-Lopez P. (2014). Effective conservation measures to mitigate the impact of human disturbances on the endangered Egyptian vulture. *Animal Conservation*, 17 (5), 410-4.
- [41] Kirwan M. K., Boyla K. A., Castell P., Demirci B., Özen M., WELCH H. & MARLOW T. (2008). *The Birds of Turkey*. Bloomsbury Publishing, London, UK.
- [42] Ceballos O. & Donazar J. A. (1989). Factors influencing the breeding density and nest-site selection of the Egyptian Vulture (*Neophron percnopterus*). *Journal of Ornithology*, 130 (3), 353-359.
- [43] Vlachos C. G., Papagerogiou N. K. & Bakaloudis D. E. (1998). Effects of the Feeding Station Establishment on the Egyptian Vulture in Dadia Forest North Eastern Greece. In: Chancellor R. D., Meyburg D. U. & Ferrero J.J. (Ed.) *Holarctic Birds of Prey*. ADEN.
- [44] Ontiveros, D. (1999). Selection of nest cliffs by bonelli's eagle (*Hieraetus fasciatus*) in southeastern Spain *Journal of Raptor Research*, 33(2), 110-116.
- [45] Martínez F. & Blanco G. (2002). Use of alternative nest for clutch replacement in the Egyptian vulture *Neophron percnopterus*. *Ardeola*, 49 (2), 297-299.
- [46] Newton I. (1979). *Population ecology of raptors*. Vermillion,SD, U.S.A: Buteo Books.
- [47] Freund M., Bahat O. & Motro U. (2017). Breeding Success and its Correlation with Nest-Site Characteristics:A Study of a Griffon Vulture Colony in Gamla Israel. *Journal of Raptor Research*, 51 (2), 136-144. .
- [48] Ontiveros D., Caro J. & Pleguezuelos J. M. (2008). Possible functions of alternative nests in raptors: the case of Bonelli's Eagle. *Journal of Ornithology*, 149 (2), 253-259

(Received for publication 18 September 2019; The date of publication 15 December 2019)



Synthesis of some new derivatives of tick pheromones and investigation of pheromone properties

Erkan YANARATES^{*1}, Yılmaz YILDIRIR², Ali DİŞLİ²
ORCID: 0000-0003-1378-5284, 0000-0001-9091-5324, 0000-0002-5409-8838

¹ Kastamonu University, Education Faculty, Mathematics and Science Education Department, Kastamonu, Turkey.

² Gazi University, Science Faculty, Chemistry Department, Ankara, Turkey

Abstract

In this study, the families *Ixodidae* (hard ticks) ticks of the species in Turkey pheromones of some derivatives were synthesized and their pheromone properties were investigated. In the first phase of the study, aniline derivatives of the pheromones to be used in the synthesis were obtained. By using hydrochloric acid or sulfuric acid with sodium nitrite, diazonium salts were produced from these aniline derivatives. The novel pheromone derivatives were synthesized by reacting to a series of diazonium salts with pyrrolidine, morpholine and piperidine bases separately. Structures of the synthesized compounds were determined by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR, ¹³C-NMR) and Mass Spectrometry (MS). Whether the synthesized compounds show pheromone feature has experimented on the live ticks under the supervision of an expert.

Key words: Tick, pheromone, the chemical structure of pheromones, triazene

----- * -----

Kene feromonlarının bazı yeni türevlerinin sentezi ve feromon özelliklerinin incelenmesi

Özet

Bu çalışmada, *Ixodidae* familyasına bağlı kenelerin Türkiye'de yaşayan türlerine ait bazı feromonların yeni türevleri sentezlenmiş ve feromon özellikleri incelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, sentezde kullanılan feromonların anilin türevleri kullanılmıştır. Bu anilin türevlerinden hidroklorik asit veya sülfürik asit beraberinde sodyum nitrit kullanılarak diazonyum tuzları elde edilmiştir. Bir dizi diazonyum tuzu piroldin, morfolin ve piperidin bazlarıyla ayrı ayrı tepkimeye sokularak yeni feromon türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR), Nükleer Manyetik Rezonans (¹H-NMR/¹³C-NMR) ve Kütle Spektrometresi (MS) yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Sentezlenen bileşiklerin feromonik özellik gösterip göstermedikleri uzman denetiminde canlı keneler üzerinde incelenmiştir.

Anahtar kelimeler: Kene, feromon, feromonların kimyasal yapısı, triazen

1. Giriş

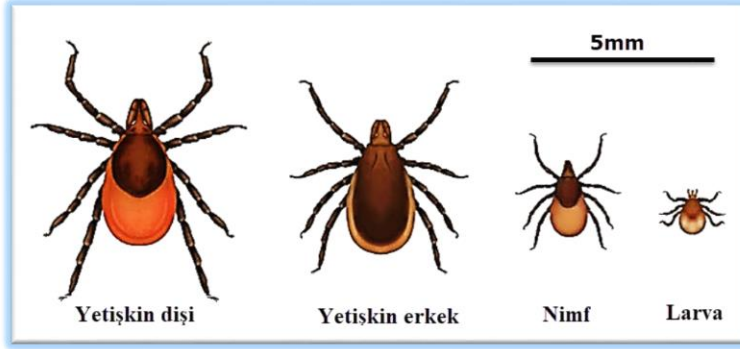
Son yıllarda yaygın olan Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) adında bir hastalık türü büyük bir problem olarak ciddiyetini korumaktadır. KKKA hastalığına sebep olan virüs vücuda kene tutunmasıyla yerleşmektedir. Bu virüsleri bulaştırmada ve taşımada etkin rol oynayan kene ülkemizin bazı bölgelerinde sıkça görülmektedir. Birçok canlının yaptığı gibi keneler de toplanmak veya karşı cinsi etkilemek amacıyla feromon adı verilen bazı kimyasal maddeler salgılamaktadırlar. Kenelerin kontrol edilebilmesi veya zararsız hale getirilebilmesi amaçlanarak yapılan bu çalışmada *Ixodidae* familyasına bağlı olan kenelerin Türkiye'de yaşayan türlerine ait feromonların bazı *piroldin*, *morfolin* ve *piperidin* türevleri sentezlenmiştir. On altı tanesi yeni olan bu bileşiklerin feromon özellikleri, uzman denetiminde canlı keneler kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca doğal feromonların çoğu uçucu olduğundan, sentezlenen bileşiklerin yeni feromon türevleri olarak doğada daha uzun süre kalabilmeleri önemlidir. Bu amaçla, sentezlenen bileşiklerin asidik

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905353015204; Fax.: +9003662801038; E-mail: eyanarates@kastamonu.edu.tr

koşullarda yavaş yavaş bozunarak tekrar feromonlara dönüşmesi ve sahada feromon tuzağı olarak kullanılması mümkün olabilir.

Sakırğa veya yavısı gibi isimlerle de bilinen kene insan ve hayvanlardan kan emerek beslenen bir böcektir. Dünyanın birçok bölgesinde yaşayabilen keneler açık arazide, ağaç, otların bol olduğu yerlerde bulunur. Keneler “Haller” adındaki duyu organı sayesinde ısı, hava koşulları, koku ve bazı kimyasalları tespit ederler [1, 2].

Başta yabani ve evcil memeliler olmak üzere birçok canlıya saldıran keneler, kuşlar da dahil birçok hayvana zarar vermektedirler. Bu zarar, kenenin hayvan vücuduna yapıştıktan sonra orada çoğalmasından tüm vücudu sararak hayvanın ölümüne kadar uzanmaktadır. İnsanlara ve hayvanlara bu denli zararı olan kenelerin dünyada birçok türü vardır. Bugün bilinen 907 kene türünün (Ixodidae: 720, Argasidae: 186 ve Nuttalliellidae: 1) ailelerine ait olduğu kabul edilmektedir. Ixodidae keneleri hem tür sayısının fazlalığı hem de hastalık etkenlerini taşımaları bakımından diğer türlerden çok daha önemlidirler. Bu türlerden 33'ünün insanı bir konak olarak tercih ettiği ve 28'inin de doğrudan hastalık etkenlerini bulaştırdığı bilinmektedir [2, 3, 4].



Şekil 1. Kenelerin yaşam evreleri

Ixodidae türleri, genellikle ilkbahar ve sonbahar mevsimleri arasında aktiftirler. Keneler hayatları boyunca her dönemde (larva-nimf-yetişkin) kan emmek zorundadırlar. Keneler kan emme esnasında çiftleşirler. Ortalama 3.000 ile 20.000 arasında yumurta yapabilen dişi keneler yumurtalarını taş, toprak ve merada yaprakların altına, toplu bir şekilde bırakırlar. Yumurta büyüklükleri yaklaşık 0,8 mm'dir. Dişiler yumurtladıktan sonra ölürler (Argasidae türleri ölmez). Keneler türlerine göre konaklardan farklı sürelerde kan emerler ve kan emdikten sonra yine gömlek değiştirerek nimf olurlar. Aç olan nimfler kan emer doyar ve gömlek değiştirdikten sonra aç olgun hale gelir. Bu döngü böyle devam eder [4, 5].

Türkiye iklimi, yüzey şekli ve bitki örtüsü bakımından kenelerin yaşayabilmesi için uygun şartlara sahip bir ülkedir. Kayıtlara göre bu güne kadar Türkiye'de 10 cinse ait 32 kene türüne rastlanmıştır. Ixodes, Hyalomma, Dermacentor, Haemaphysalis ve Rhipicephalus soylarına ait kene türlerine daha sık rastlanılmaktadır [2, 6, 7].

Kırım-Kongo kanamalı ateşi hastalığı

KKKA ilk kez 1944 yılında Batı Kırım'da Sovyet askerleri arasında görülmüş ve hastalığa Kırım Hemorajik Ateşi adı verilmiştir. Daha sonra 1956 yılında Kongo'da (Zaire) ateşli bir hastada tespit edilmiş ve Kongo virüsü denilmiştir. 1969'da ise bu iki virüsün aynı virüs olduğu belirlenmiş ve hastalığa Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi adı verilmiştir.

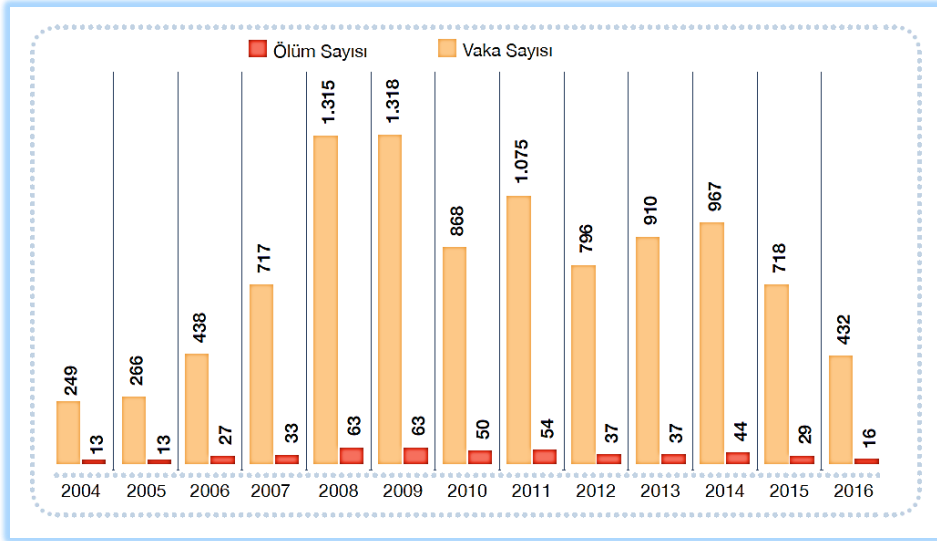
Kenelerin neden olduğu enfeksiyonlar sıklıkla belirli coğrafik bölgelerde ön plana çıkarken, KKKA Afrika, Asya, Orta Doğu ve Doğu Avrupa'da endemik olarak görülmektedir. Son yıllarda Kosova, Arnavutluk, İran, Pakistan ve Güney Afrika'dan sporadik (seyrek) ve epidemik (salgın) vakalar bildirilmiştir [1, 8, 9].

Türkiye'de bu hastalığa ilk defa 2002 yılında rastlanmıştır ve 2003 yılında tanımlanmıştır. Hastalığın görülmeye başladığı ilk yer Tokat yöresi olmasına rağmen, yapılan araştırmalara göre bu konuda halkın hala bilgi düzeyinin yetersiz olduğu görülmektedir. Aynı zamanda kene vakalarının yoğun olduğu yerlerde KKKA hakkında eğitimlerin tüm halka ulaşılarak verilmesinin önemli olduğu vurgulanmıştır [10]. En çok ilkbahar ve yaz mevsimlerinde rastlanan KKKA hastalığı genellikle İç Anadolu'nun kuzeyi, Karadeniz'in güneyi ve Doğu Anadolu'nun kuzeyinde görülmektedir. Hastalığın en çok görüldüğü iller Erzurum, Erzincan, Gümüşhane, Bayburt, Tokat, Yozgat, Sivas, Amasya, Çorum, Çankırı, Bolu, Kastamonu ve Karabük'tür [11, 12, 13].

KKKA'nın belirtileri: Ani yükselen ve 40 derece civarında gezen ateş, baş dönmesi, burun akıntısı, ishal ve kusma gibi belirtiler görülmektedir. Kırsal bölgelerde yaşayan insanlar hala bu hastalık yüzünden hayatlarını kaybetmeye devam ediyor [15]. Yüksek ateş, baş, karın, kol ve bacaklarda şiddetli ağrılar, yoğun halsizlik, ishal, kusma, yüzde kızarıklık, ileri aşamalarda burun ve vücudun farklı yerlerinde kanamalar, kol, bacak ve bedende morluklar, idrar ve dışkıda kan görülebilmektedir [11, 14].

KKKA'dan korunma yöntemleri: Ahır ve ağıllara, kırsal alanlara ve piknik alanlarına gidenler mümkün olduğunca vücutta açık kısım kalmamasına özen göstermeli kenelerin daha kolay fark edilmesi nedeniyle açık renkli

elbiseleri giymeyi tercih etmelidirler. **KKKA vaka ve ölüm sayıları:** Şubat 2017'de yayınlanan T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Faaliyet Raporu 2016 verilerine göre Türkiye’de son 13 yılda KKKA nedeniyle 479 kişi hayatını kaybetti. Bakanlığın KKKA vaka ve ölüm raporuna göre 2004-2016 yılları arasında 10.069 kene vakası yaşandı. 63’ü ölümlle sonuçlanan en fazla vaka 2009 yılında 1318 olarak tespit edildi. 2016 yılında 432 KKKA vakası ve 16 ölüm görülmüş olup KKKA vaka ve ölüm sayıları 2016 yılında son 10 yılın en düşük seviyelerinde seyretmiştir [15].



Şekil 2. KKKA vaka ve ölüm sayıları (2004-2016) [15]

Feromon: Feromonlar, böcekler, diğer hayvanlar ve insanlar tarafından kimyasal iletişimi sağlamak amacıyla dışarıya salınan ve o türün diğer bireyleri tarafından hissedilerek tepki göstermelerine sebep olan kimyasal maddelerdir. Örneğin cinsel çekici feromon, dişi böceğin erkeğini kilometrelerce uzaktan bulabilmesini sağlayacak kadar etkindir. Bu feromonlar, dişi böcekler tarafından çiftleşmeye hazır olduklarını belli etmek ve erkek bireylerin dişileri izleyerek bulabilmeleri için salgılanırlar.

Böcekler toplanma, alarm ve iz bırakma gibi feromonları da salgılamaktadırlar. Feromonların etkileri çok önceden beri bilinmektedir. Feromon ilk defa 1954 yılında ipek böceklerinin koku salgı bezlerinden elde edilerek tanımlanmış ve erkekleri çektiği belirlenmiştir [6, 16]. Feromonlar, çok uzak mesafelerden bile hava hareketleri ile taşınabilir ve erkek böceklerin antenleri aracılığıyla algılanırlar. Bu antenler molekül seviyesinde bile ayırt edebilecek duyarlıktadırlar [4].

Kene feromonlarının kimyasal yapıları

Kenelere ait feromonların çoğu fenol türevi olan kimyasal maddelerden oluşmaktadır. Bilinen kene feromonlarının türleri ve isimleri aşağıda görülmektedir.

Toplanma feromonları (çekici feromon):

Fenol [17, 18, 19], 2-klorofenol, 2-bromofenol, 2-nitrofenol [17, 18, 20], o-kresol, benzil alkol [20, 21], p-kresol [17, 18, 19], benzoik asit, benzaldehit, salisilik asit, salisilaldehit [18, 20, 21, 22, 23], metil salisilat [17, 18, 20, 21, 22, 23, 24, 25].

Çiftleşme feromonları (cinsel çekici feromon):

2,6-dibromofenol ve 2,6-diklorofenol [18, 19, 20, 23, 26].

Bu maddelerin feromon özelliği gösterebilmesi için ayrıca feromon aktifleştirici olarak bilinen ve genellikle uçucu olan bazı organik maddeler de bulunmaktadır [18, 20, 23, 25].

Bilinen bazı feromon aktifleştirici maddeler: Bütirik asit, izobütirik asit, miristik asit, palmitik asit, pelargonik asit, kaprik asit, limonen ve diğer orta zincirli yağ asitleridir. Yukarıdaki kimyasal bileşiklerin feromon özelliği gösterebilmeleri için feromon aktifleştirici maddelerle belirli oranlarda karışmış olmalıdırlar. Bu oran feromonların kimyasal yapılarına göre değişebilmektedir. Ancak feromonun uçuculuğu daha iyi olması için feromon aktifleştirici maddenin derişimi daha yüksek (örneğin 4-8 katı) olmalıdır [22, 24]. Feromon aktifleştirici madde olarak rol oynayan organik yağ asitlerine bazı bitki çekirdeklerinde ve özlerinde de rastlanmaktadır [27].

Bugüne değin akarlarda alarm, eşey, toplanma ve iz işaret feromonu olmak üzere, dört tip feromonun bahsi geçmiştir. Akar feromonları içerisinde, üzerinde en fazla çalışılan feromon alarm feromonu olmuştur. Genellikle bir akardan tek tip feromon elde edilmiştir. Fakat iki farklı feromona sahip olan türler de vardır. Hatta bazı türlerde alarm, eşey ve toplanma olmak üzere üç farklı feromon aktivitesi birden tespit edilmiştir. Bu farklı aktiviteler ya farklı bileşenlere sahip olunarak ya da tek bileşenin değişik şartlar altında farklı etkiler göstermesi ile sağlanmaktadır [28].

Kene feromonlarıyla ilgili yapılan bazı çalışmalar

Birçok kene türünde feromonla birlikte, farklı oranlarda *feromon aktifleştirici madde* bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca kenelerin çok küçük derişimlerdeki (ng/L) feromonlara bile tepki gösterebileceği bilinmektedir [17, 18, 22, 24].

Amblyomma variegatum türüne ait bir feromonun *o-nitrofenol*, *metil salisilat* ve feromon aktifleştirici olarak da küçük zincirli bir yağ asidi olan pelargonik asitten oluşan bir karışım olduğu bulunmuştur [24].

Kenelerde iletişimi veya fizyolojik ve ekolojik etkileşimleri sağlayan bazı fenolik ve aromatik bileşikler de vardır. Bunlar; *fenol*, *2,6-diklorofenol*, *p-kresol*, *salisilaldehit*, *metil salisilat*, *2-nitrofenol*, *benzaldehit*'tir. Birçoğu fenol türevi olan bu feromonların yanında; pürinler ve bazı steroidler ile izobütirik asit, pelargonik asit, miristik asit ve oleik asit gibi bazı yağ asitleri bulunmaktadır [18].

Dişi kenelerden elde edilen özütün *fenol* ve *p-kresol* içerdiği bulunmuştur. Aynı fenoller New York'ta Ixodidae familyasının 5 farklı sert kene (hard tick) türünde de bulunmuştur. Bu beş türün üçünün ayrıca *2,6-diklorofenol* de içerdiği gözlenmiştir [17].

Kenelerde seks feromonu olarak bilinen *2,6-diklorofenol*, farklı türlerde farklı miktarlarda bulunmuştur. Örneğin, Gaz Kromatografisi ile belirlenen, 1000 tane beslenmemiş *H. dromedarii* dişisinin heksan ekstraktında kene başına 35 ng *2,6-diklorofenol* bulunurken, 1100 tane beslenmemiş *Hyalomma anatolicum excavatum* dişisinin heksan ekstraktında kene başına 20 ng *2,6-diklorofenol* bulunmuştur. Beslenmiş 56 tane *Hyalomma dromedarii* erkek örneklerinde ise *2,6-diklorofenol* olduğuna dair hiçbir kanıt bulunamamıştır. Böylece *Hyalomma* türlerinin çiftleşme davranışları ile ilgili yapılan bu çalışmada dişi kenelerin uçucu bir feromon yaydıkları belirtilmiştir [19].

Ciddi hastalıklara ve hatta ölüme sebep olabileceği vurgulanan bir başka çalışmada aktarıldığına göre; keneler biyolojik vektör olarak rol alırlar ve kan emme sırasında tükürük bezlerindeki sporozoitleri konaklarına aktarırlar. Böylece kana geçen sporozoitler eritrositlere yerleşmekte ve konaktaki tüm süreç bu hücrelerde geçmektedir. Hastalığın klinik bulguları da yine söz konusu eritrositlerin yıkımı ile ilişkilidir. Muhtemel bulgular arasında ateş, sarılık, anemi ve ölüm vardır. Bazı kene türlerine ait etkenin sebep olduğu hastalığın ateş ve sarılık ile izlediği bildirilmiştir. Öte yandan yaşlı sığırlarda patojen olduğu ve akut olgularda birkaç gün içinde ölümün gündeme gelebileceği belirtilmiştir [29, 30].

Birincil arilaminlerin diazonyum tepkimeleri

Aminlerin nitroz asitle verdiği en önemli tepkime birincil aril aminlerle olanıdır. Bunun nedeni, elde edilen arendiazonyum tuzundan geniş yelpazeli (fenoller, aril halojenürler, aril siyanürler ve benzen türevleri) ürünlerin elde edilmesidir. Arendiazonyum tuzları çok kararlı olmamakla birlikte alifatik diazonyum tuzlarına göre çok daha kararlıdır. Tepkime karışımının 5°C'nin altında tutulduğunda çözelti içerisinde belirli bir süre karalı kalabilirler. Birincil aminlerin diazolama tepkimeleri oldukça önemlidir. Çünkü diazonyum grubu ($N\equiv N$) diğer fonksiyonel gruplarla yer değiştirebilirler [31, 32].

2. Materyal ve yöntem

Deneysel çalışmalarda kullanılan tüm kimyasallar Merck, Sigma-Aldrich, Acros ve Fluka firmalarından temin edilmiştir. Kullanılan kimyasal maddeler sentezler için yeterli saflıkta oldukları için ileri bir saflaştırma işlemi uygulanmamıştır.

2.1. Materyal

¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları;

Bruker 300 MHz NMR Spektrometresi (Gazi Ü. Fen Fakültesi)

Bruker 400 MHz NMR Spektrometresi (Hacettepe Ü. Fen Fakültesi)

IR spektrumları; Thermo Nicolet 6700 ATR cihazı ve Mattson-1000 FT IR cihazı

(First v1.60, 1992, Mattson Instruments Inc.) (Gazi Ü. Fen Fakültesi)

Kütle spektrumları; Waters LCT Premier XE LTOF (TOF MS) cihazı (Gazi Ü. Eczacılık Fakültesi).

Sentezlenen bileşiklerin erime ve kaynama noktaları için;

Elektrotermal 9100 Erime Noktası Cihazı (Gazi Ü. Fen Fakültesi)

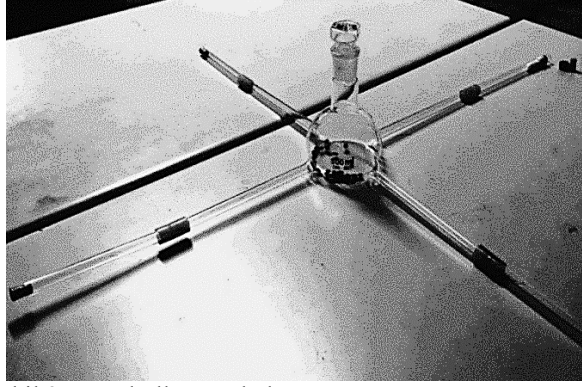
Melting Point Büchi M-560 Erime/Kaynama Noktası Cihazı (Kastamonu Ü. Eğitim Fakültesi)

Vakum pompası

Feromonik inceleme çalışmaları için Kastamonu ve çevresinden toplanan toplam 83 adet kene

Özel olarak yaptırılmış dört kollu cam balon;

Cam balonun (250mL) tabanına (1x30)cm boyutlarında 4 adet cam boru kaynatılarak hazırlanmıştır.



Şekil 3. Dört kollu cam balon

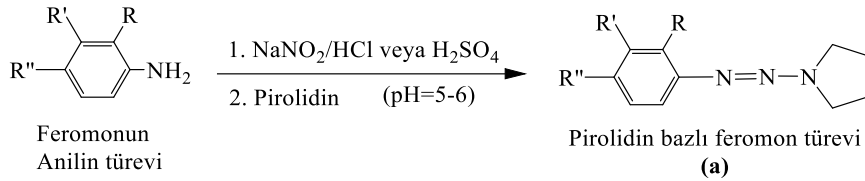
2.2. Yöntem

Bu çalışma üç aşamadan meydana gelmiştir. Bunlar;

- *Ixodidae* familyasına bağlı olan kenelerin Türkiye'de yaşayan türlerine ait feromonların kimyasal yapıları, literatür çalışmasıyla belirlenmiştir.
- On altısı yeni olan 28 tane feromon türevi sentezlenmiş ve bileşiklerin yapıları aydınlatılmıştır.
- Sentezlenen bileşiklerin canlı keneler üzerinde feromonik özellikleri incelenmiştir.

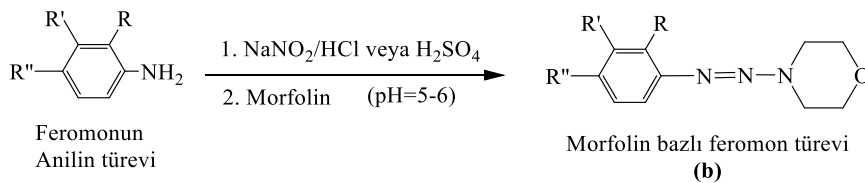
Feromonların kimyasal yapılarını belirleme çalışmaları önceki bölümlerde ayrıntılı olarak verilmiştir. Bu feromonların anilin türevleri kullanılarak, sentezlenen bileşiklerin çözünürlüğüne göre HCl veya H₂SO₄ ile süstitüeanilinyum tuz çözeltileri hazırlanmıştır. Elde edilen anilinyum tuzları NaNO₂'in sulu çözeltisi ile süstitüebenzendiazonyum tuzlarına dönüştürülmüştür. Diazonyum tuz çözeltileri, uygun pH aralıklarında (genellikle 5-6) ve belli oranlarda *pirolidin*, *morfolin* ve *piperidin* çözeltileri ile karıştırılarak triazen (-N=N-N<) şeklinde kenetlenmeleri sağlanmış ve *feromon türevi* oldukları düşünülen yeni bileşikler elde edilmiştir. Sentezlenen bu bileşiklerin tepkime mekanizmaları aşağıda verilmiştir.

Pirolidin bazlı feromon türevlerinin sentezi



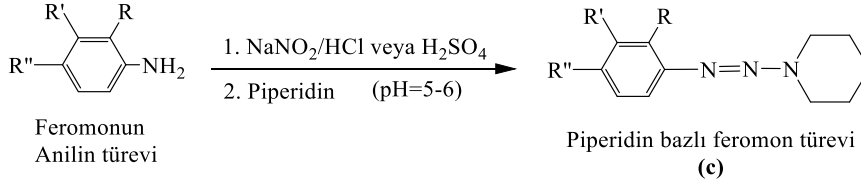
- a1) R=COOH, R', R''=H a7) R=H, R'=OH, R''=COOCH₃ (yeni)
a2) R, R''=H, R'=COOH (yeni) a8) R=H, R'=NO₂, R''=OH (yeni)
a3) R, R'=H, R''=COOH a9) R=H, R'=Cl, R''=OH (yeni)
a4) R=CH₂-OH, R', R''=H a10) R=OH, R', R''=H (yeni)
a5) R, R''=H, R'=CH₂-OH a11) R, R''=H, R'=OH (yeni)
a6) R, R'=H, R''=CH₂-OH (yeni) a12) R, R'=H, R''=OH (yeni)

Morfolin bazlı feromon türevlerinin sentezi



- b1) R=COOH, R', R''=H b4) R=CH₂-OH, R', R''=H (yeni)
b2) R, R''=H, R'=COOH b5) R, R''=H, R'=CH₂-OH (yeni)
b3) R, R'=H, R''=COOH b6) R, R'=H, R''=CH₂-OH (yeni)
b7) R=H, R'=OH, R''=COOCH₃ (yeni)

Piperidin bazlı feromon türevlerinin sentezi



- c1) R=COOH, R', R''=H c4) R=CH₂-OH, R', R''=H (yeni)
 c2) R, R''=H, R'=COOH c5) R, R''=H, R'=CH₂-OH (yeni)
 c3) R, R'=H, R''=COOH c6) R, R'=H, R''=CH₂-OH (yeni)
 c7) R=H, R'=OH, R''=COOCH₃ (yeni)

3. Bulgular

Feromonların anilin türevleri kullanılarak bir dizi süstitüe triazen bileşiği sentezlendi (a1-a12, b1-b7, c1-c7). Sentez basamakları ve bunlara ait karakterizasyon sonuçları aşağıda verilmiştir.

2-(Pirolidin-1-ildiazenil)benzoik asit sentezi (a1):

0,69 g (5 mmol) 2-Aminobenzoik asit üzerine 5 mL su ve 2 mL %37'lik HCl ile hazırlanmış asit çözeltisi ilave edildi ve oda sıcaklığında karıştırılarak çözüldü.

Çözelti manyetik karıştırıcı üzerinde tuz-buz banyosuna yerleştirilerek karıştırılmaya devam edildi.

Tepkime boyunca sıcaklığın 0-5°C arasında olmasına dikkat edildi. Buz banyosu üzerindeki çözelti üzerine 10 mL suda çözülmüş 0,42 g (6 mmol) NaNO₂ çözeltisi damla damla ilave edildi.

İlave işlemi tamamlandıktan sonra çözelti 30 dakika daha karıştırıldı. Bu karışım önceden hazırlanmış ve soğutulmuş olan 10 mL suda çözülmüş 3,3 mL (8 x 5 mmol) *pirolidin* çözeltisi üzerine yavaş yavaş ilave edildi. Yine tepkime sıcaklığının 0-5°C arasında kalması sağlandı.

Ürün oluşumu pH'ya bağlı olduğu için karışım üzerine *pH=5-6* civarına gelene kadar damla damla 3M HCl çözeltisi ilave edildi. Bu şekilde 20 dakika daha karıştırıldıktan sonra oluşan katı ürün süzülerek ayrıldı.

Elde edilen ürün vakum etüvünde kurutulduktan sonra Flash kromatografisi yöntemiyle silikajel dolgulu kolonda kloroform-metanol (3:1) çözücü çifti kullanılarak ayrıldı.

Döner buharlaştırıcı ile çözücüler uzaklaştırılarak ürün saflaştırıldı. Verim: %80, e.n: 121-123°C;

IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3520-2160 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970 (C-H), 1667 (C=O), 1594, 1573, 1466 (C=C);

¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 13.80-14.30 (yayvan, 1H), 7.98 (i, 1H), 7.65 (i, 1H), 7.57 (ü, 1H), 7.27 (ü, 1H), 3.55-4.10 (ç, 4H), 2.06 (ç, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 167, 149, 134, 132, 126, 122, 116, 53-48, 24; MS C₁₁H₁₃N₃O₂ (M⁺) (m/z): 220.11.

Diğer ürünler de benzer şekilde sentezlendi. Ancak, a1-a12 ürünlerinin sentezindeki pirolidin yerine, b1-b7 ürünlerinin sentezinde morfolin ve c1-c7 ürünlerinin sentezinde ise piperidin kullanıldı.

3-(Pirolidin-1-ildiazenil)benzoik asit (a2): Verim: 83%; e.n. 107-110°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3355-2160 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970 (C-H), 1670 (C=O), 1604, 1577, 1452 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 7.87 (i, 1H), 7.67 (i-i, 1H), 7.51 (i-i, 1H), 7.42 (ü, 1H), 3.50-4.00 (i, 2H), 1.98 (b, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 152, 133, 130, 126, 125, 121, 51-46, 24; MS, C₁₁H₁₃N₃O₂ (M⁺) (m/z): 220.11.

3-(Pirolidin-1-ildiazenil)benzoik asit (a3): Verim: 91%; e.n. 185-186°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3456 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970 (C-H), 1667 (C=O), 1598, 1575, 1450 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 12.7 (b, 1H), 7.37 (i, 4H), 7.89 (i, 2H), 3.80-4.00 (ç, 2H), 3.50-3.70 (ç, 2H), 1.90-2.06 (ç, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 155, 131, 127, 120, 52-47, 24; MS, C₁₁H₁₃N₃O₂ (M⁺) (m/z): 220.10.

2-(Pirolidin-1-ildiazenil)fenilmetanol (a4): Verim: 70%; e.n. 66-67°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3348 (-OH), 3069 (C=C-H), 2977, 2855 (C-H), 1580, 1480, 1444 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.49 (i, 1H), 7.19-7.27 (ç, 2H), 7.06-7.11 (ç, 1H), 4.80 (b, 2H), 4.10-4.50 (yayvan, 1H), 3.50-4.10 (i, 4H), 1.90-2.20 (b, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 149, 134, 132, 128, 125, 116, 65, 51-47, 24; MS, C₁₁H₁₅N₃O (M⁺) (m/z): 206.13.

3-(Pirolidin-1-ildiazenil)fenilmetanol (a5): Verim: oily; k.n. 148-150°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3336 (-OH), 3030 (C=C-H), 2970, 2870 (C-H), 1589, 1483, 1446 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.40 (i, 2H), 7.31 (i, 2H), 7.08 (i, 1H), 4.50-4.80 (ç, 2H), 3.60-4.00 (ç, 4H), 2.14 (yayvan, 1H), 2.02 (ç, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 151, 142, 129, 124, 119, 119, 65, 51-47, 24; MS, C₁₁H₁₅N₃O (M⁺) (m/z): 206.13.

4-(Pirolidin-1-ildiazenil)fenilmetanol (a6): Verim: 66%; e.n. 53-54°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3353 (-OH), 3026 (C=C-H), 2963, 2880 (C-H), 1604, 1500, 1442 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.37 (b, 1H), 7.24-7.33 (ç, 2H), 7.08 (i, 1H), 4.50-4.70 (b, 2H), 3.50-3.90 (ç, 4H), 2.60-3.00 (yayvan, 1H), 1.97 (ç, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 138, 128, 120, 65, 50-45, 24; MS, C₁₁H₁₅N₃O (M⁺) (m/z): 206.13.

Metil 2-hidroksi-4-(pirolidin-1-ildiazetil)benzoat (a7): Verim: 81%; e.n. 134-135°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3456 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2855 (C-H), 1667 (C=O), 1609, 1566, 1455 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 10.88 (b, 1H), 7.78 (i, 1H), 7.00-6.94 (ζ , 2H), 4.10-3.40 (ζ , 7H), 2.20-1.90 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 170, 162, 158, 31, 112, 109, 108, 52, 47, 24; MS, C₁₂H₁₅N₃O₃ (M⁺) (m/z): 250.12.

2-Nitro-4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a8): Verim: 64%; e.n. 97-98°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3456 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970 (C-H), 1581, 1524, 1477 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 7.73 (b, 1H), 7.52 (i, 1H), 7.06 (i, 1H), 3.65-3.85 (ζ , 4H), 1.90-2.10 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 151, 143, 129, 128, 120, 115, 45-46, 24; MS, C₁₀H₁₂N₄O₃ (M⁺) (m/z): 237.10.

2-Kloro-4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a9): Verim: 72%; e.n. 81-82°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3460 (-OH), 3016 (C=C-H), 2972 (C-H), 1604, 1503, 1455 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 9.70-10.20 (yayvan, 1H), 7.26 (i, 1H), 7.12 (i-i, 1H), 6.91 (i, 1H), 3.50-4.00 (yayvan, 4H), 1.94 (ü, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 151, 145, 127, 121, 120, 117, 53-43, 24; MS, C₁₀H₁₂ClN₃O (M⁺) (m/z): 226.07.

2-(Pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a10): Verim: 68%; e.n. 49-50°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3443 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970 (C-H), 1588, 1480, 1455 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 8.00-9.00 (yayvan, 1H), 7.39 (i-i, 1H), 7.04 (ζ , 1H), 6.88 (ζ , 2H), 3.60-4.10 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 136, 126, 121, 120, 116, 49-46, 24; MS, C₁₀H₁₃N₃O (M⁺) (m/z): 192.04.

3-(Pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a11): Verim: 61%; e.n. 99-101°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3650-2430 (-OH), 3062 (C=C-H), 2924 (C-H), 1604, 1504, 1462 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.18 (ü, 1H), 7.01 (i, 1H), 6.94 (ü, 1H), 6.63 (ζ , 1H), 3.50-4.10 (ζ , 4H), 4.30-5.50 (yayvan, 1H), 2.02 (ü, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 158, 151, 129, 112, 111, 106, 52.8-53.6, 24; MS, C₁₀H₁₃N₃O (M⁺) (m/z): 192.11.

4-(Pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a12): Verim: 71%; e.n. 106°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3650-2290 (-OH), 3020 (C=C-H), 2977 (C-H), 1605, 1503, 1450 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 9.10-9.40 (yayvan, 1H), 7.16 (ζ , 2H), 6.70 (ζ , 2H), 3.70-3.90 (ζ , 4H), 1.93 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 154, 141, 122, 115, 54-52, 24; MS, C₁₀H₁₃N₃O (M⁺) (m/z): 192.11.

2-(Morfolinodiazetil)benzoik asit (b1): Verim: 62%; e.n. 132-134°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3650-3340 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970 (C-H), 1680 (C=O), 1596, 1576, 1467 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 12.00-13.00 (yayvan, 1H), 7.75 (i, 1H), 7.46-7.56 (ζ , 2H), 7.57 (ü, 1H), 7.27-7.32 (ζ , 1H), 3.80 (b, 4H), 3.72 (ü, 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 169, 149, 133, 130, 126, 126, 118, 65, 48-44; MS, C₁₁H₁₃N₃O₃ (M⁺) (m/z): 236.10.

3-(Morfolinodiazetil)benzoik asit (b2): Verim: 57%; e.n. 93-95°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3650-3150 (-OH), 3015 (C=C-H), 2970 (C-H), 1681 (C=O), 1598, 1587, 1456 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 7.93 (b, 1H), 7.77 (i-i, 1H), 7.60 (i-i, 1H), 7.49 (ü, 1H), 3.70-4.00 (ζ , 8H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 150, 133, 130, 127, 125, 121, 66, 64; MS, C₁₁H₁₃N₃O₃ (M⁺) (m/z): 236.10.

4-(Morfolinodiazetil)benzoik asit (b3): Verim: 72%; e.n. 180-182°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3490-3330 (-OH), 3030 (C=C-H), 2966 (C-H), 1698 (C=O), 1603, 1577, 1457 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 12.50-13.50 (yayvan, 1H), 7.94 (i, 2H), 7.45 (i, 2H), 3.70-4.00 (ζ , 8H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 154, 131, 128, 121, 66, 63; MS, C₁₁H₁₃N₃O₃ (M⁺) (m/z): 236.10.

2-(Morfolinodiazetil)fenilmetanol (b4): Verim: 68%; e.n. 100-101°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3457 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2855 (C-H), 1509, 1479, 1465 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.52 (i, 1H), 7.17-7.23 (ζ , 2H), 7.30-7.33 (ζ , 1H), 4.70-5.00 (ζ , 2H), 3.90 (ζ , 4H), 3.81 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 148, 135, 129, 128, 127, 117, 66, 64, 48; MS, C₁₁H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 222.12.

3-(Morfolinodiazetil)fenilmetanol (b5): Verim: oily; k.n. 92-95°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3630-3080 (-OH), 3026 (C=C-H), 2969, 2859 (C-H), 1600, 1484, 1446 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.42 (b, 1H), 7.26-7.35 (ζ , 2H), 7.15 (i, 1H), 4.50-4.80 (ζ , 2H), 3.77-3.80 (ζ , 4H), 3.70-3.73 (b, 4H), 2.40-3.10 (yayvan, 1H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 142, 129, 125, 120, 119, 66, 65, 48; MS, C₁₁H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 222.12.

4-(Morfolinodiazetil)fenilmetanol (b6): Verim: 70%; e.n. 95-97°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3427 (-OH), 3020 (C=C-H), 2970, 2857 (C-H), 1606, 1504, 1456 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.44 (i, 2H), 7.36 (i, 2H), 4.60-4.80 (ζ , 2H), 3.86 (ζ , 4H), 3.79 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 139, 128, 120, 66, 65, 48; MS, C₁₁H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 222.13.

Metil 2-hidroksi-4-(morfolinodiazetil)benzoat (b7): Verim: 68%; e.n. 90-100°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3100 (-OH), 3012 (C=C-H), 2967, 2855 (C-H), 1665 (C=O), 1612, 1573, 1455 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 10.60-11.20 (yayvan, 1H), 7.80 (i, 1H), 7.03-6.96 (ζ , 2H), 4.04-3.86 (ζ , 7H), 1.50-2.10 (ζ , 4H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 169, 152, 133, 130, 128, 126, 122, 71, 52, 48; MS, C₁₂H₁₅N₃O₄ (M⁺) (m/z): 265.11.

2-(Piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c1): Verim: 68%; e.n. 173-174°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3457 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2855 (C-H), 1678 (C=O), 1587, 1485, 1450 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 12.90-13.10 (yayvan, 1H), 7.90 (ü, 1H), 7.72 (ζ , 1H), 7.57 (ζ , 1H), 7.43-7.49 (ζ , 1H), 3.70-3.90 (b, 4H), 1.50-1.80 (b, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 151, 132, 130, 127, 125, 121, 44, 25, 24; MS, C₁₂H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 234.12.

3-(Piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c2): Verim: 73%; e.n. 83-84°C; IR ν_{\max} (cm⁻¹) (ATR): 3458 (-OH), 3015 (C=C-H), 2970, 2855 (C-H), 1683 (C=O), 1593, 1496, 1467 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 13.20-13.50 (yayvan,

1H), 7.83 (ç, 1H), 7.54 (ç, 1H), 7.27 (ç, 1H), 3.70-4.00 (ç, 4H), 1.50-2.00 (ç, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 168, 149, 133, 131, 126, 124, 117, 53-44, 24; MS, C₁₂H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 234.12.

4-(Piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c3): Verim: 83%; e.n. 170-172°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3480-3130 (-OH), 3016 (C=C-H), 2968, 2858 (C-H), 1683 (C=O), 1594, 1550, 1440 (C=C); ¹H-NMR (DMSO-d₆), δ (ppm): 7.85 (i, 2H), 7.30 (i, 2H), 3.70-4.00 (ç, 4H), 1.50-1.90 (ç, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 170, 152, 135, 130, 120, 44, 25, 24; MS, C₁₂H₁₅N₃O₂ (M⁺) (m/z): 234.12.

2-(Piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c4): Verim: 73%; e.n. 81-83°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3456 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2852 (C-H), 1582, 1480, 1436 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.50 (ç, 1H), 7.24-7.29 (ç, 2H), 7.12 (ç, 1H), 4.70-4.90 (ç, 2H), 3.60-3.90 (ç, 4H), 1.73 (ç, 4H), 1.58 (ç, 2H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 149, 134, 128, 127, 126, 117, 64, 47, 25, 24; MS, C₁₂H₁₇N₃O (M⁺) (m/z): 220.15.

3-(Piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c5): Verim: Oily; k.n. 150-152°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3630-3115 (-OH), 3026 (C=C-H), 2970, 2854 (C-H), 1598, 1483, 1438 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.43 (ç, 1H), 7.34 (ç, 1H), 7.29 (ç, 1H), 7.14 (ç, 1H), 4.60-4.80 (ç, 2H), 3.76 (ç, 4H), 1.90-2.20 (yayvan, 1H), 1.60-1.90 (b, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 151, 142, 129, 124, 120, 119, 65, 48, 25, 24; MS, C₁₂H₁₇N₃O (M⁺) (m/z): 220.15

2-(Piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c6): Verim: 64%; e.n. 71-73°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3459 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2856 (C-H), 1600, 1502, 1439 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 7.42 (i, 2H), 7.33 (i, 2H), 4.50-4.70 (ç, 2H), 3.77 (ç, 4H), 1.50-1.90 (ç, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 150, 138, 128, 121, 65, 48, 25, 24; MS, C₁₂H₁₇N₃O (M⁺) (m/z): 220.14.

Metil 2-hidroksi-4-(piperidin-1-ildiazetil)benzoat (c7): Verim: 74%; e.n. 90-100°C; IR ν_{max} (cm⁻¹) (ATR): 3457 (-OH), 3016 (C=C-H), 2970, 2854 (C-H), 1665 (C=O), 1611, 1572, 1454 (C=C); ¹H-NMR (CDCl₃), δ (ppm): 10.60-11.00 (yayvan, 1H), 7.78 (i, 1H), 7.01-6.98 (ç, 2H), 4.10-3.89 (ç, 7H), 2.00-1.50 (ç, 6H); ¹³C-NMR, δ (ppm): 170, 162, 158, 131, 112, 109, 108, 52, 47, 24; MS, C₁₃H₁₇N₃O₃ (M⁺) (m/z): 263.13.

3.1. Sentezlenen bileşiklerin feromonik özelliklerinin incelenmesi

Feromonik özelliklerin incelenmesi üç aşamadan oluşmaktadır;

- Farklı bölgelerden değişik türlerde keneler toplandı,
- Sentezlenen bütün bileşiklere ait numuneler hazırlandı,
- Dört kollu cam balon ve vakum pompasından oluşan deney düzeneği kurularak kenelerin sentezlenen bileşiklere karşı davranışları gözlemlendi.

3.2. Kenelerin toplanması

Kastamonu, kene vakalarının yoğun olarak yaşandığı yerlerden biridir. Bu sebeple Kastamonu'nun bazı bölgelerinde belirli aralıklarla arazi çalışması yapıldı ve **bu çalışma kapsamında kullanılmak üzere toplam 83 adet kene toplandı.** Bunlar;

İlgaz dağı eteklerindeki Kuzyaka köyünden 12 adet **Ixodes ricinus** türü sığır kenesi, İhsangazi ilçesindeki bazı köylerden 13 adet, Araç ilçesindeki bazı köylerden 24 adet ve İlgaz yöresindeki Kadıdağı mevkiinden 16 adet **Hyalomma marginatum** türü koyun kenesi ve Kastamonu'nun Devrekâni ilçesine bağlı Kınık köyünden 18 adet **Dermacentor marginatus** türü koyun kenesidir.

Keneler konak üzerinden kene kartı veya ince pens yardımıyla çıkarıldı. Bu işlem yapılırken kenenin zarar görmemesi için dikkat edildi. **Toplanan keneler kapağına küçük delikler açılmış cam şişelere alındı** ve şişelerin üzerine numunenin alındığı tarih, yer ve konağa ait bilgilerin bulunduğu etiketler yapıştırıldı.

Tablo 1. Çalışma bölgeleri ve toplanan kenelere ait tür, adet ve konak bilgileri

Bölge (Yerleşim yeri)	Kene türü	Adet	Kaynak (konak)
İlgaz Dağı	<i>Ixodes ricinus</i>	12	Sığır
Araç	<i>Hyalomma marginatum</i>	24	Koyun
İhsangazi	<i>Hyalomma marginatum</i>	13	Koyun
Kadı dağı	<i>Hyalomma marginatum</i>	16	Koyun
Devrekâni	<i>Dermacentor marginatus</i>	18	Koyun

Tabloda belirtilen tarihlerde beş farklı bölgeden toplanarak Kastamonu Üniversitesi Eğitim Fakültesi araştırma laboratuvarına getirilen bu kenelerin *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus* ve *Ixodes ricinus* türlerine ait oldukları kene uzmanı tarafından tespit edildi. Bu türlerden ilk ikisi (özellikle de *Hyalomma marginatum*), Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığına sebep olmaktadır.

Sentezlenen bileşiklerin feromonik özellikleri bu kene türleri üzerinde incelendi ve bileşiklerin bu türlere karşı feromon özelliği gösterip göstermedikleri belirlenmeye çalışıldı.

Kenelerde feromonla birlikte, feromona oranla daha fazla miktarda (~ 1:10) *feromon aktifleştirici madde* bulunduğu bilinmektedir. Bu çalışmada da sentezlenen feromon türevlerinin yanında feromon aktifleştirici olarak 1:10 oranda pelargonik asit (nonanoik asit) kullanıldı.

3.3. Numunelerin hazırlanması

Sırasıyla 1×10^{-1} M'dan 1×10^{-10} M'a kadar (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} molar) şeklinde on farklı derişimde feromon çözeltileri hazırlandı. Bunun için 1 mmol feromon türevi ve 10 mmol nonanoik asit alındı ve 10 mL metanolde çözümlenerek 1×10^{-1} M çözeltiler hazırlandı. Daha sonra bu stok çözeltilerden 1'er mL alınarak 1×10^{-10} M olana kadar 10 farklı derişimde çözeltiler hazırlandı. Böylece, sentezlenen her bir bileşik için on farklı derişimde numuneler hazırlandı.

3.4. Feromonik inceleme çalışmaları

Çözeltilerinin her birinden sırasıyla bir parça pamuğa 0,2 mL numune damlatılarak çözücüsü uzaklaştırıldı (Tablo 2). Dört kollu cam balonun kollarından birinin ucuna numune damlatılmış pamuk, diğer uçlara ise temiz pamuk yerleştirildi. Toplanan keneler dört kollu cam balon içerisine bırakılarak numunelere karşı gösterdikleri davranışlar gözlemlendi. Farklı türlerdeki keneler için ayrı ayrı denemeler yapıldı. Gözlem sırasında vakum pompası yardımıyla çok düşük miktarda vakum uygulandı.

Tablo 2. Kenelerin sentezlenen feromon türevlerine karşı tepkilerinin incelenmesi

Bileşik Adı	Kene Türü	Kene Tepkisi
2-(pirolidin-1-ildiazetil)benzoik asit (a1)	Dermacentor marginatus	-
	Hyalomma marginatum	+
3-(pirolidin-1-ildiazetil)benzoik asit (a2)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
4-(pirolidin-1-ildiazetil)benzoik asit (a3)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
2-(pirolidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (a4)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
3-(pirolidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (a5)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (a6)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
Metil 2-hidroksi-4-(pirolidin-1-ildiazetil) benzoat (a7)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
2-kloro-4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a8)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
2-nitro-4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a9)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
2-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a10)	D.marginatus / H.marginatum	- / -
3-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a11)	D.marginatus / H.marginatum	- / -
4-(pirolidin-1-ildiazetil)fenol (a12)	D.marginatus / H.marginatum	- / -
2-(morfolinodiazetil)benzoik asit (b1)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
3-(morfolinodiazetil)benzoik asit (b2)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
4-(morfolinodiazetil)benzoik asit (b3)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
2-(morfolinodiazetil)fenil)metanol (b4)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
3-(morfolinodiazetil)fenil)metanol (b5)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
4-(morfolinodiazetil)fenil)metanol (b6)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
Metil 2-hidroksi-4-(morfolinodiazetil) benzoat (b7)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
2-(piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c1)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
4-(piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c2)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
3-(piperidin-1-ildiazetil)benzoik asit (c3)	D.marginatus / H.marginatum	- / +
2-(piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c4)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
3- piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c5)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
4-(piperidin-1-ildiazetil)fenil)metanol (c6)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +
Metil 2-hidroksi-4-(piperidin-1-ildiazetil) benzoat (c7)	D.marginatus / H.marginatum	+ / +

Tablodaki gözlem sonuçlarında kullanılan "Kene Tepkisi" ölçütlerinden; "+" kenelerin dört kollu cam balonun, numune bulunan ucuna gitmeleri veya burada bir müddet kalmaları (tepki verdikleri) şeklinde değerlendirilmiştir. "-" ise kenelerin numuneye hiç gitmemeleri (hiç tepki vermedikleri) şeklinde değerlendirilmiştir.

Her bir deney yaklaşık olarak 15-20 dakika sürdü. Kenelerin, kullanılan maddelere ait kokularının etkilerinden kurtulmaları için her denemeden sonra yaklaşık 1 saat ara verildi. Bu aralarda dört kollu cam balon asetonla temizlenerek kurutuldu ve bir sonraki deney için laboratuvar havalandırıldı.

Sentezlenen bileşiklerden 10 farklı derişimde hazırlanan çözeltilerin her biriyle keneler üzerinde denemeler yapıldı. İlk 9 deneyde kenelerin tepkilerinin giderek azaldığı hatta 10^{-8} M ve 10^{-9} M derişimlerdeki numunelerde yok denecek kadar azaldığı gözlemlendi. Son deneyde hazırlanan 1×10^{-10} M'lık feromon çözeltilisine karşı ise kenelerin tepkisi hemen hemen hiç gözlenmedi.

Özetle; yapılan gözlemlerde, 1×10^{-1} M'dan 1×10^{-9} M'a kadar olan derişimlerdeki feromon çözeltilerine karşı kenelerin tepkileri giderek azalsa da ilgi gösterdikleri gözlemlendi. Ancak daha düşük derişimlerde hazırlanan feromon çözeltilerinden oluşan numunelere karşı kenelerin tepki vermedikleri gözlemlendi.

Ilgaz Dağlarının eteklerinden toplanan *Ixodes ricinus* türü keneler hiçbir numuneye karşı ilgi göstermediler. Oleik asit ve izobütirik asit gibi farklı feromon aktifleştirici maddeler kullanılmasına rağmen sonuç değişmedi.

Ixodes ricinus türü kenelerin, sentezlenen feromon türevlerine karşı hiç ilgi göstermemeleri, konak, tür ve bölgesel farklılıklara bağlı olabilir. Çalışmanın önemi açısından zaten bu türle ilgili davranışlar fazla önemsenmemiştir. Çünkü *Ixodes ricinus* türü kenelerde Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi hastalığına sebep olan virüsün varlığı kanıtlanamamıştır [4, 5].

Diğer iki türe ait kenelerin (*Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus*), sentezlenen feromon türevlerine karşı gösterdikleri tepkiler aşağıdaki tabloda toplu olarak verilmiştir.

4. Sonuçlar ve tartışma

Ülkemizde son yıllarda yaygın olarak görülen KKKA hastalığına neden olan virüsü bulaştıran *Ixodidae* familyasına bağlı olan kene türlerinin feromonlarının kimyasal yapıları araştırılmış ve bu feromonların bazı türevleri sentezlenmiştir.

Sentezlenen bu yeni bileşiklerin feromonik özellikleri farklı türlerde keneler kullanılarak incelenmiştir. Yapılan feromonik inceleme çalışmalarında, sentezlenen bileşiklere karşı hem erkek hem de dişi kenelerin tepki verdikleri gözlenmiştir.

Ancak, yapılan deneylerde 1×10^{-10} M veya daha düşük derişimlerdeki feromon çözeltilerine karşı kenelerin hiçbir tepki göstermediği gözlenmiştir. Buradan, söz konusu deneylerde kullanılan feromon derişimlerinin, kenelerin tepki vermesi için yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Feromon çalışmaları Kastamonu'ya bağlı Devrekâni, İhsangazi ve Araç ilçeleri ile Ilgaz Dağı etekleri ve Kadıdağı mevki olmak üzere beş farklı yerleşim bölgesinden alınan üç farklı kene türü üzerinde yapılmıştır. Bu türler *Hyalomma marginatum marginatum*, *Dermacentor marginatus* ve *Ixodes ricinus*'tur.

Bunların ilk ikisi birçok hastalığı taşıyan kene türleridir. Özellikle *Hyalomma marginatum*; KKKA hastalığını bulaştırmada, insanlara tutunmada ve belirgin bir popülasyon artışında öne çıkmaktadır. Bu yönleriyle de en tehlikeli kene türü olarak bilinmekte ve hatta avcı kene şeklinde sınıflandırılmaktadır [3, 4].

Hyalomma marginatum türü bu çalışmada da belirgin bir şekilde öne çıkmıştır; Özellikle yapısında benzoik asit ve benzil alkol bulunan feromon türevlerine karşı diğer türler tepkisiz kalırken, bu *Hyalomma marginatum* türü bütün bu feromon türevlerine ilgi göstermiştir.

Ancak *Ixodes ricinus* ile yapılan deneylerde farklı aktifleştirici maddeler kullanılmasına rağmen kenelerin hiçbir feromona karşı ilgi göstermemiştir. Bu tür keneleri çalışmamızdaki diğer kenelerden ayıran bölge, tür ve konak (sığır) gibi parametreler bulunmaktadır. Kenelerin feromona karşı ilgi göstermemeleri bahsedilen parametrelere bağlı olabilir. Zaten bu tür kenelerin insana tutunmaması ve KKKA hastalığına sebep olan virüsü taşıdığı kanıtlanamamış olması bakımından diğer keneler kadar tehlikeli olmadığı bilindiği için bu türle yapılan deney ve gözlem sonuçları da çok önemli bulunmamıştır.

Bu çalışma kapsamında, sentezlenen bileşiklerden doğada daha uzun süre kalabilen yeni feromon türevleri elde edilmeye çalışılmıştır. Çünkü orijinal feromonların çoğu uçucu olduğundan dolayı doğada çok uzun kalamamaktadır.

Daha önce yapılan bir makalede çalışmada anilin türevlerinin piperazin ve pirolidin gibi bazlarla kenetlenmesi sonucu elde edilen triazen bileşiklerinin asidik ortamda çok yavaş bozulan maddeler olduğu bulunmuştu [31].

Bu çalışmada da benzer şekilde kenelere ait bazı feromonların anilin türevleri temin edilerek pirolidin, morfolin ve piperidin bazları ile kenetlenmesi sağlanmış ve triazen bileşikleri elde edilmiştir. Böylece elde edilen bileşiklerin doğada yavaş yavaş bozularak feromon özelliğini uzun süre devam ettirmesi ve feromonlu tuzak olarak kullanılması sağlanmış olacaktır.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen ve feromon türevi olduğu düşünülen maddeler kullanılarak kenelerin; insan ve evcil hayvanların yaşamadığı alanlara çekilmesi sağlanabilir ve kenelerin insan sağlığına zarar vermesi engellenebilir.

Ayrıca bu çalışma Türkiye'de yaşayan bu tür keneler üzerinde, yeni feromonların belirlendiği ilk çalışma olacaktır. Aynı zamanda literatüre yeni bileşikler (16 tane) kazandırma bakımından da önem taşımaktadır.

Feromon kullanılarak yapılan biyolojik mücadeleyi diğerlerinden farklı tutan en önemli özellik kitle imha yöntemine gerek kalmamasıdır. Sentezlenen çekici feromonlar sayesinde keneler daha zararsız olabilecekleri yerlere taşınmak üzere veya başka bilimsel çalışmalarda kullanılmak üzere toplanabilecektir.

Bu çalışma kapsamında sentezlenen bileşikler içerisinde feromon özelliği gösteren maddelerin daha sonra uzman denetiminde, kene bulunması muhtemel sahalarda feromonlu tuzak olarak kullanılması ve etkilerinin araştırılması planlanmaktadır.

Bu çalışmada elde edilen feromonların biyolojik mücadeleye kimyasal yönden destek vermesi beklenmektedir. Hatta veterinerlik, ziraat, biyoloji ve tıp alanlarında yapılan benzer çalışmalarda, birlikte hareket edilerek daha kapsamlı araştırmalar yapılabilir.

Ayrıca bu çalışmaya benzer şekilde, insanlar ve hayvanlar için rahatsız edici veya tehlikeli olabilen örümcek ve akrep gibi diğer akarların da feromonları incelenerek onlar için de yeni feromon türevleri sentezlenmesi düşünülebilir.

Kaynaklar

- [1] Bursalı, A., Keskin, A., & Tekin, S., (2013). Ticks (Acari: Ixodida) infesting humans in the provinces of Kelkit Valley, a Crimean-congo hemorrhagic fever endemic region in Turkey. *Experimental and Applied Acarology volume (59)*, 507-513.
- [2] Beyhan, Y., Mungan, M., & Babur, C. (2014). Yurtdışı Seyahat İlişkili Amblyomma spp. Olgusu. *Türkiye Parazitolojisi Dergisi*, 48-50.
- [3] Dumanlı, N., Altay, K., Aktaş, M. (2016). Keneler ve Kenelerle Taşınan Hastalıklar, *Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences, Vol.6, No.2*. 45-54.
- [4] Vatansver, Z. (2008). Vektör Kenelerin Ekolojisi, Kene Kaynaklı Enfeksiyonlar. *II. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu*, (s. 27-36). Ankara.
- [5] Vatansver, Z. (2014). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi: Hayvanlarda epidemiyoloji ve kene ile mücadele. *V. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- [6] Gargılı, A. (2009). Kenelerin Vektörlüğü ve Türkiye'de Durum. *Ankem Der.23.Ek2*, 249-252.
- [7] Orkun, Ö., Karaer, Z., Çakmak, A., & Nalbantoğlu, S. (2014). Spotted fever group rickettsiae in ticks in Turkey; Ticks and Tick-borne Diseases. *Elsevier*, 5, 8 (8), 213-218.
- [8] Ergönül, Ö. (2016). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi Tedavisi ve Ribavirin Kullanımı. *Klinik Dergisi 29(1)*, 2-9.
- [9] Fakoorziba, M., Naddaf-Sani, A., Moemenbellah-Fard, M., Azizi, K., Ahmadnia, S., & Chinikar, S. (2015). First phylogenetic analysis of a Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genome in naturally infected Rhipicephalus appendiculatus ticks (Acari: Ixodidae). *Springer-Verlag Wien, Arch Virol*, 60, 1197-1209.
- [10] Kazan, F.G, Sümer, H., (2019). Tokat İl Merkezinde Kırım Kongo Kanamalı Ateşi (KKKA) Ön Tanısıyla Hastanede Yatan Hastaların, KKKA Hastalığı Hakkında Bilgi Düzeyi. *Ankara Medical Journal*, 19(2), 381-395.
- [11] Aydın, M. F., & Coşkun, A. (2019). İnsanlarda Kene ile Bulaşan Hastalık Etkenleri ve Türkiye'deki Mevcut Durumu. *Journal of Advances in VetBio Science and Techniques*, 4(1), 26-32.
- [12] Keskin, A., Keskin, A., Bursalı, A., & Tekin, S. (2015). Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing humans in Corum and Yozgat provinces, Turkey. *Experimental and Applied Acarology*, 67, 607-616.
- [13] Özkan, S., & Erdoğan, A. (2012). *Vektörle Bulaşan Enfeksiyonlar, Türkiye Halk Sağlığı Raporu*, 108-122, 2012. Halk Sağlığı Uzmanları Derneği.
- [14] Elaldı, N. (2014). Kırım-Kongo Kanamalı Ateşi. *V. Türkiye Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu*. Erzurum: Atatürk Üniversitesi.
- [15] THSK. (2016). Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Faaliyet Raporu-2016, s.75-76, 27. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı.
- [16] Şener, H. F., & Kırkıncıoğlu, Z. (2014). Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Hastalığı Risk Gruplarının Koruyucu Giysi Tercihleri ve Model Tasarımı. *Vocational Education 9(4)*, 73-89.
- [17] Galun, R., Prestwich, G., Meinwald, J., Purnell, R., Payne, R., Wood, W., & Leahy, S. (1975). Phenols As Pheromones Of Ixodid Ticks: A General Phenomenon? *J.Chem.Ecol.*, Vol.1, No.4, 501-509.
- [18] Bruyne, M. d., & Guerin, P. (1994). Isolation of 2,6-Dichlorophenol From The Cattle Tick Boophilus Microplus: Receptor Cell Responses But No Evidence For A Behavioural Response. *Journal of Insect Physiology*, v. 40(2), 143-154.
- [19] Silverstein, R., West, J., Sonenshine, D., & Khalil, G. (1983). Occurrence of 2,6-dichlorophenol in hard ticks, Hyalomma dromedarii and Hyalomma anatolicum excavatum, and its role in mating. *Journal of Chemical Ecology*, Vol.9, No.12, 1543-1549.
- [20] Leonovich, S. (2004). Phenol and lactone receptors in the distal sensilla of the Haller's organ in Ixodes ricinus ticks and their possible role in host perception. *Experimental and Applied Acarology*, Vol.32, 89-102.
- [21] Lusby, W., Sonenshine, D., Yunker, C., Norval, R., & Burrige, M. (1991). Comparison of known and suspected pheromonal constituents in males of African ticks, Amblyomma hebraeum Koch and Amblyomma variegatum (Fabricius). *Experimental & Applied Acarology, Volume 13, Issue 2*, 143-152.

- [22] Diehl, P., Guerin, P., Vlimant, M., & Steullet, P. (1991). Biosynthesis, Production Site, and Emission Rates of Aggregation-Attachment Pheromone in Males of Two Amblyomma Ticks. *Published in Journal of Chemical Ecology* 17, issue 5, 833-847.
- [23] Kennedy, K., Carla, C., Lorena, L., Pedro, H., Andrea, C., & Ligia, M. (2012). Chemical composition and biological characterization of extracts of male-produced pheromone from *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) by GC/MS-SIM and behavioural responses. *International Journal of Acarology*, Vol. 38, No.5, 445-453.
- [24] Schöni, R., Hess, E., Blum, W., & Ramstein, K. (1984). The Aggregation-Attachment Pheromone Of The Tropical Bont Tick *A. variegatum* Fabricius (Acari, Ixodidae): Isolation, Identification And Action Of Its Components., *Journal of Insect Physiology*, Volume 30, Issue 8, 613-618.
- [25] Sonenshine, D. (2004). Pheromones And Other Semiochemicals of Ticks and Their Use In Tick Control. D. Sonenshine içinde, *Parasitology* (s. 129). Cambridge University Pres.
- [26] Khalil, G., Nada, S., & Sonenshine, D. (1981). Sex Pheromone Regulation Of Mating Behavior In The Camel Tick, *Hyalomma Dromedarii* (Ixodoidea: Ixodidae). *J. Parasitol.* 67(1), 70-76.
- [27] Özçelik Doğan, Ş., Özçelik H., (2017). Chemical composition analyses of fruit Roses/Rosehips (*Rosa* spp.) of Türkiye. *Biological Diversity and Conservation* (10/2), 122-140.
- [28] Akyazı, R., & Altunç, Y. E. (2018). Akarlarda Feromonlar. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, 185-205.
- [29] Kar, S., Güven, E., & Karaer, Z. (2008). Ankara'da Şubat Ayında Babesiosis Olgusu. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 32 (4):, 379-381.
- [30] Hoşgör, M., Bilgiç, H.B., Bakırcı, S., Ünlü, A. H., Karagenç, T., & Eren, H. (2015). Aydın Yöresinde Sığırlarda ve Kenelerde Anaplasma / Ehrlichia. *Turkiye Parazitol Derg.* 39, 291-8.
- [31] Yanarates, E., Disli, A., & Yildirir, Y. (1999). New N,N'-Bis (Substituted Phenylazo) Piperazines and Their Cleavage Reactions in Acetic Acid. *Organic Preparations and Procedures International*, 31: (4), 429-433.
- [32] Akar, A.; Çalışkan, Ö. A.; Ay, M.; Doğan, Ö.; Gülce, A.; Gümrükçüoğlu, İ., ... Yusuföğlu, A. (2014). Organik Kimya, "Yaşamın Kalbi", 2. Baskı, Editör: Yılmaz Yıldırım. Ankara: Bilim Yayıncılık.

(Bu çalışma Erkan YANARATEŞ'in doktora tezinden türetilmiştir.)

(Received for publication 20 November 2019; The date of publication 15 December 2019)



**Anatomy, morphology, palynology and micromorphology of Turkish endemic species
Cousinia cataonica Boiss. & Hausskn. and *Cousinia intertexta* Freyn & Sint.**

Sercan KARAGÖZ^{*1}, Osman TUGAY², Deniz ULUKUŞ³
ORCID: 0000-0002-4801-0094; 0000-0003-3980-7648; 0000-0002-9627-5492

¹ Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Konya, Turkey

² Selçuk Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Konya, Turkey

³ Selçuk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Konya, Turkey

Abstract

This study aims to contribute to the taxonomy of the genus *Cousinia*, by revealing anatomical, palynological and micromorphological properties of *Cousinia cataonica* Boiss. & Hausskn. and *C. intertexta* Freyn & Sint., which are part of sect. *Cousinia* in the family Asteraceae. Detailed descriptions and photographs of *C. cataonica* and *C. intertexta*, alongside their distribution as shown on the map are provided. Anatomical characteristics of the stem, leaf and midrib of *C. cataonica* and *C. intertexta* are studied in detail. Among the anatomical characters, the numbers of cortex parenchyma layers and of sclerantimatic layers were found to be significant. Pollen photographs were taken under light microscope and exin, intin, colpus and P/E measurements are provided in table format. A SEM microscope was used to observe pollen and achene surface ornamentation. While the pollen ornamentation of both investigated species is verrucose-perforate, the number of verrucose per μm^2 have proven different between the two species. In addition, *C. cataonica* and *C. intertexta* show clear differences in achene surface ornamentations.

Key words: Anatomy Asteraceae, *Cousinia*, palynology

----- * -----

Türkiye'ye Endemik *Cousinia cataonica* ve *Cousinia intertexta* Türlerinin Anatomik, Morfolojik, Palinolojik ve Mikromorfolojisi

Özet

Bu çalışmada Asteraceae familyasına ait *Cousinia* cinsi içerisinde yer alan *C. cataonica* Boiss. & Hausskn. ve *Cousinia intertexta* Freyn & Sint. türlerinin anatomik, morfolojik, palinolojik ve mikromorfolojik özellikleri ortaya çıkarılarak cinsin taksonomisine katkı sağlaması amaçlanmıştır. *C. cataonica* ve *C. intertexta* türlerinin geniş betimi, türlere ait fotoğrafları ve dağılış alanları harita üzerinde verilmiştir. *C. cataonica* ve *C. intertexta* türlerinin gövde, yaprak ve midrip özellikleri anatomik olarak çalışılmıştır. Anatomik karakterlerden korteks parenkima tabaka sayısı ve sklerantimatik tabaka sayısının önemli olduğu tespit edilmiştir. Işık mikroskobu altında polen fotoğrafları çekilerek ekzin, intin, kolpus ve P/E ölçümleri tablo halinde verilmiştir. Polen ve aken yüzey ornamentasyonunu tespit etmek için SEM mikroskobu kullanılmıştır. Her iki türün polen yüzey ornamentasyonu verrukoz-perforat iken, μm^2 başına düşen verrukoz sayısı her iki türde farklılık göstermiştir. Ayrıca *C. cataonica* ve *C. intertexta* türleri aken yüzey ornamentasyonlarında belirgin farklılıklar gözlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Asteraceae, *Cousinia*, anatomi, palinoloji

1. Giriş

Türkiye zengin ve ilginç bitki çeşitliliği açısından önemli bir ülkedir. Bu zenginlik ve ilginçlik; Anadolu'nun çeşitli iklim tipleri, jeolojik yapı, coğrafik durum, farklı topoğrafik yapılar, toprak grupları, üç farklı fitocoğrafik bölgenin kesişim noktası olması gibi faktörlerden kaynaklanır [1].

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +905358211046; Fax.: +905358211046; E-mail: karagozsercann@gmail.com

Asteraceae familyası dünyada yaklaşık olarak 1100 cins ve 25000 tür ile temsil edilmekte olup çiçekli bitkilerin en fazla türe sahip familyasıdır [2]. Bu familya Türkiye’de ise 152 cins, 1230 tür, 133 alt tür, 75 varyete olmak üzere toplam 1438 takson ile temsil edilmektedir [3]. *Cousinia* cinsi 1827 yılında Cassini tarafından *Carduus orientalis* Adams. türü esas alınarak tanımlanmıştır. Cinsin ilk kapsamlı sınıflandırması [4] tarafından yapılarak, cinsi 23 seksiyon içerisinde 126 tür ile temsil edildiğini ortaya koymuştur. [5, 6] “Flora Orientalis” adlı eserinde *Cousinia* cinsini 14 seksiyon içerisinde 141 türle temsil etmiştir. Türkiye Florası’nda [1] *Cousinia* cinsini Cassini yazmıştır. Türkiye’de bu cins 6 seksiyon içerisinde toplam 38 tür ile temsil edilmekte ve bunların 26’sı endemiktir [1]. Türkiye bitkiler listesine göre “Kızandikeni” olarak bilinen *Cousinia* ülkemizde 39 türle yayılış göstermektedir. [7]. Ayrıca son zamanlarda ülkemizde *Cousinia* cinsine ait taksonomik çalışmalar yanında, palinolojik çalışmalar da yapılmıştır [8, 9].

Bu çalışma *Cousinia* Cass. (Asteraceae) cinsi *Cousinia* seksiyonu içerisinde yer alan *C. cataonica* ve *C. intertexta* endemik türlerinin morfolojik, anatomik, palinolojik ve mikromorfolojik çalışmalarını yaparak cinsin taksonomik çalışmalarına katkı sağlaması amacıyla yapılmıştır.

2. Materyal ve yöntem

Endemik iki tür olan *Cousinia cataonica* ve *C. intertexta* türlerine ait örnekler Türkiye Florası’nda belirtilen yayılış gösterdiği tip lokalitelerinden fotoğraflanmış ve toplanmıştır. Toplanan bitki örnekleri preslenerek kurutulmuş ve morfolojik incelemeleri Türkiye Florası temel kaynak olarak kullanılarak mikroskop altında teşhisleri yapılmıştır. Alan çalışması sırasında anatomik çalışmalar için kullanılacak gövde ve yaprak kısımları % 70’lik alkol içerisine alınmıştır. Çalışmada parafine gömme metodu kullanılarak mikrotom ile kesitler alınmıştır. Kesitleri alınan örnekler Fastgreen-safranin boyama metoduyla boyanarak entellan ile sabit preparat haline getirilmiştir [10]. Hazırlanan preparatların ışık mikroskobu ve kamera altında fotoğrafları çekilmiştir. İki türün polenleri [11] tekniği kullanılarak preparat haline getirilerek ışık mikroskobu ile morfolojik özellikleri ortaya konulmuştur. Polen yüzey süsleri ise taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile fotoğraflanmıştır. Her iki türün akenlere ait ölçümler makromorfolojik olarak yapılmıştır. Aken yüzey süsleri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile fotoğraflanmıştır. Anatomik, palinolojik ve mikromorfolojik çalışmalar için iki türe ait tüm karakterler için 30’ar ölçüm yapılarak verilmiştir.

Yapılan çalışmalarda şu örnekler incelenmiştir;

C. cataonica; Malatya; Beytepe etekleri, step, 940 m, 27.07.2012, *O.Tugay* 7.839, *D.Ulukuş* & *M.A.Canbulat* (KNYA); Malatya; Doğu yamaçlar, step, 920 m, 25.07.2013, *O.Tugay* 8.487 & *D.Ulukuş* (KNYA); Malatya; Arapkir arası, step, 800 m, 25.07.2013, *O.Tugay* 8.488 & *D.Ulukuş* (KNYA); Malatya; Venk arası, taşlık step, 1400 m, 26.07.2013, *O.Tugay* 8.500 & *D.Ulukuş* (KNYA); Malatya; Doğu yamaçlar, step, 1000 m, 30.06.2014, *O.Tugay* 9.651 & *D.Ulukuş* (KNYA).

C. intertexta; Elazığ; Keban, batı yamaçlar, step, 1080 m, 26.07.2012, *O.Tugay* 7.805, *D.Ulukuş* & *M.A.Canbulat* (KNYA); Malatya; Hekimhan, step, 910 m, 27.07.2012, *O.Tugay* 7.850, *D.Ulukuş* & *M.A.Canbulat* (KNYA).

3. Bulgular

3.1. Morfolojik bulgular

Cousinia cataonica Boiss. & Hausskn. in Boiss., Fl. Or. 3: 483 (1875) (Şekil 2 A, B).

Tip: [Turkey B7 Malatya] in monte Begdagh (Bey Da.) prope Malatia, 1200 m, *Haussknecht* (holo. G!).

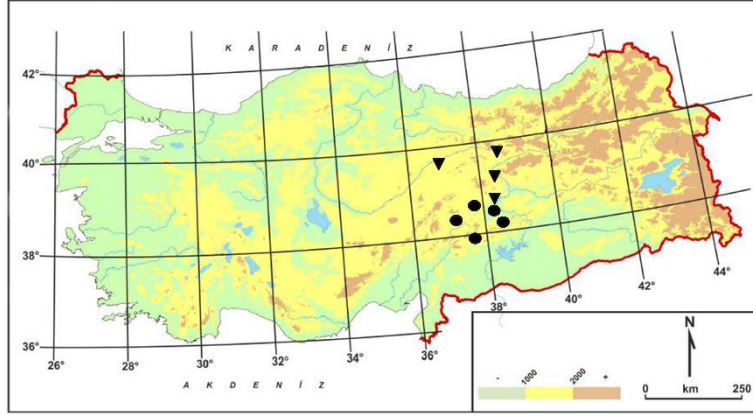
Betim: Çok yıllık, 18-52 cm, genellikle dikotom dallı. Gövde ince, silindirik, yoğun araknoid-tomentoz tüylü. Yaprak üst yüzeyi seyrek araknoid, alt yüzeyi yoğun tomentoz tüylü; taban yapraklar üstte gevşek araknoid, altta yünsü tomentoz, oblong, 4.5-15.9 × 2.3-5.1 cm, kısa petiyollü, pinnatipartit, lanseolat-linear segmentli, segmentler 4-6 çift; gövde yaprakları tedricen küçülür, dekurrent kanatlı, 1.2-3.8 cm uzunluğunda, gövde üst yaprakları geniş ve yırtıklı dişli. Kapitula yaklaşık 8-14 sayıda, kapitula 27-37 çiçekli. İnvolutrum globoz, dikenler dahil 1.9-2.4 cm genişliğinde; fillariler 113-134, tabandaki fillariler lanseolat kısa aküminat uçlu, üst kısımdaki fillariler yarı küresel geriye kıvrık yaklaşık 11.5 mm, dikenler araknoid-yünsü tüyler içinde gömülmüş; dış fillariler 4.1-5.2 x 1 mm, orta fillariler 11.2-12.3 x 1 mm, iç fillariler 14.1-15.3 x 1.1-1.4 mm. Reseptakulum bristleri düz; 10.4-12.1 mm. Çiçekler sarı, 13.1-14.2 mm. Aken açık kahverengi, oblong-obovat, 4.6-5.1 x 1.9-2.6 mm, belirgin boyuna çizgili, buruşuk, uç kısmında belirgin kenarlı ve açıkça dişli; pappus bristleri barbellat; 3.1-4.2 mm. Çiçeklenme Temmuz-Ağustos; Tarla kenarı ve step; 850-1500 m., İran-Turan elementi, Endemik, IUCN Tehlike Kategorisi; Tehlike altına girebilir (NT).

Cousinia intertexta Freyn & Sint. in Öst. Bot. Zeitschr. 42(5): 169 (1892) (Şekil 2 C, D).

Tip: [Turkey B7 Erzincan] Egin (Kemaliye) prope Kainartschar, in pascuis lapidosis, 13 vii 1890, *Sintenis* 2908 (holo. LD foto).

Betim: Çok yıllık, 23-42 cm, çok dallı, sıklıkla geniş çalı şeklinde. Gövde yuvarlak, uzunluğuna çizgili, araknoid-yünsü. Yaprak üst yüzeyi seyrek araknoid, alt yüzeyi beyaz yünsü-tomentoz tüylü; yapraklar az çok dikenli; taban yaprakları oblongtan genişçe obovata kadar, 19 × 13.5 cm, pinnatilobat, oblong-lanseolattan genişçe triangular segmentliye kadar,

4-6 çift, $2.3-6.1 \times 1.1-2$ cm; gövde yaprakları tedricen küçülür, üsttekiler az derin lobludan düz kenarlıya doğru, 6.9×2.1 cm kadar, hepsi geniş kuneat kanatlı, dekurrent kanatlar $1.2-3.6$ cm uzunluğunda. Kapitula 11-34, 14-25 çiçekli. İnvolutrum genişçe ovoïdden globoza kadar, dikenler dahil $2.2-3.1$ cm genişliğinde; fillariler 86-113, yoğun araknoid tüylü, alttaki kısım basık, 1.9 mm, lanseolat, üst kısımlar linear dan aküminata kadar, $4.1-7.9$ mm geriye doğru kıvrık-yaygın; dış fillariler $6.3-7.8 \times 1$ mm, orta fillariler $14-15.8 \times 1.1-1.6$ mm, iç fillariler $16.2-16.8 \times 0.9-1.6$ mm. Reseptakulum bristleri düz; $16.3-17.8$ mm. Çiçekler sarı, $15.2-16.1$ mm. Akenler açık kahverengi, enine koyu kahverengi dalgalı, obovat, $4.3-5.2 \times 2.4-3.1$ mm, belirgin boyuna çizgili, uç kısımda belirin kenarlı ve açıkça dişli; pappus bristleri barbellat; $2.4-3.1$ mm. Çiçeklenme Haziran-Temmuz, Taşlık yamaçlar ve step; $700-1650$ m., İran-Turan elementi, Endemik, IUCN Tehlike Kategorisi; Tehlike altına girebilir (NT).



Şekil 1. *Cousinia cataonica* (●) ve *Cousinia intertexta* (▼) türlerinin Türkiye dağılımı



Şekil 2. *C. cataonica* (A, B) habitat ve kapitula; *C. intertexta* (C, D) habitat ve kapitula görünümü (Foto: O. Tugay)

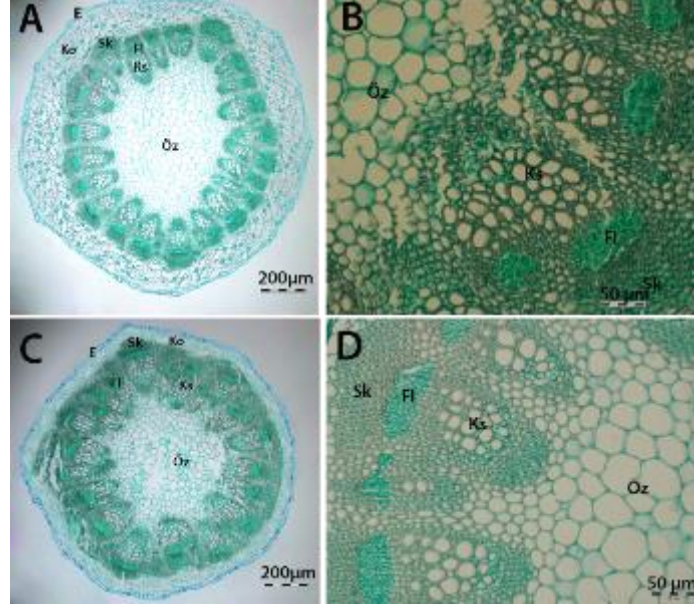
3.2. Anatomik bulgular

Gövde

C. cataonica türüne ait gövde enine kesitleri incelendiğinde gövde ince bir kutikula ile çevrelenmiş dairesel ve tek sıra halinde dizilmiş epidermis hücrelerinden oluşmaktadır. Epidermis hücreleri dikdörtgen şeklinde olup hücre boyutları $17.98-4.18 \times 10.88-4.71$ μm 'dır. Epidermis tabakasının hemen alt kısmında korteks parenkiması yer alıp 3-5 tabakalı hücrelerden oluşmaktadır. Korteks parenkima hücreleri düzensiz şekillere sahip olup parenkima hücre boyutları $16.22-6.7 \times 27.97-17.59$ μm arasındadır. Korteks tabakasının hemen altında 4-6 sıralı sklerankima hücreleri bulunmaktadır. Gövde bikollateral iletim demetine sahip olup en dışta sklerankima hücreleri hemen altında dış floem, kambiyum, ksilem, iç floem ve öz bölgesinden oluşmaktadır. Sırasıyla dış floem ve iç floem çevresindeki sklerankima lifleri $35-55$ μm ve $15-30$ μm kalınlığındadır. Ksilem iletim demetleri içerisinde yer alan trake hücre boyutları $6.27-14.72 \times 21.39-10.41$ μm arasındadır. Öz bölgesi çok sayıda dairesel şekilli parenkimatik hücrelerden oluşmaktadır. Parenkima hücre boyutları $39.9-13.11 \times 47.08-11.5$ μm arasındadır (Şekil 3 A, B).

C. intertexta türüne ait gövde enine kesitleri incelendiğinde gövde ince bir kutikula ile çevrelenmiş dairesel ve tek sıra halinde dizilmiş epidermis hücrelerinden oluşmaktadır. Epidermis hücreleri dikdörtgen şeklinde olup hücre

boyutları 6.09-3.23 x 10.81-5.2 µm arasında değişmektedir. Epidermis tabakasının hemen alt kısmında korteks parakimasi yer alıp 5-8 tabakalı hücrelerden oluşmaktadır. Korteks parenkima hücreleri düzensiz şekillere sahip olup parenkima hücre boyutları 31.58-8.99 x 47.5-8.16 µm arasındadır. Korteks tabakasının hemen altında 3-6 sıralı sklerankima hücreleri bulunmaktadır. Gövde bikollateral iletim demetine sahip olup en dışta sklerankima hücreleri hemen altında dış floem, kambiyum, ksilem, iç floem ve öz bölgesinden oluşmaktadır. Sırasıyla dış floem ve iç floem çevresindeki sklerankima lifleri 40-60 µm ve 20-30 µm kalınlığındadır. Ksilem iletim demetleri içerisinde yer alan trake hücre boyutları 26.6-13.3 x 23.27-8.16 µm arasındadır. Öz bölgesi çok sayıda dairesel şekilli parenkimatik hücrelerden oluşmaktadır. Parenkima hücre boyutları 54.39-14.19 x 53.47-20.03 µm arasındadır (Şekil 3 C, D).

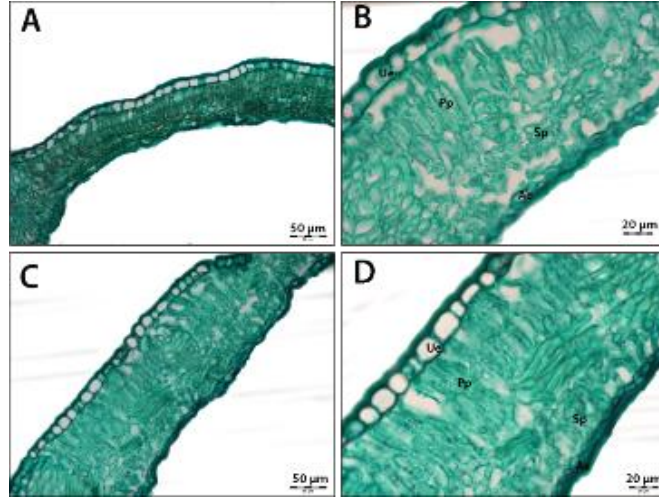


Şekil 3. *C. cataonica* (A,B) ve *C. intertexta* (C, D) gövde enine kesiti; Ep: Epiderma, Ko: Korteks tabakası, Sk: Sklerankima tabakası, Fl: Floem tabakası, Ks: Ksilem tabakası, Öz: Öz Bölgesi.

Yaprak

C. cataonica türüne ait yaprak enine kesiti incelendiğinde dışta ince bir kutikula tabakası, altta ve üstte tek sıralı oval ve dikdörtgen şeklindeki hücrelerden oluşan epidermis tabakası bulunmaktadır. Mezofil tipi bifasiyal olup palizat, palizat ve sünger, sünger tabakalarından meydana gelmiştir. Ana damar enine kesitinde biri diğer ikisine göre büyük 3 iletim demeti gözlenmiştir. Floem ve ksilemin etrafı alt ve üstte geniş, yanlarda ise dar şekilde sklerankimatik lifler tarafından desteklenmektedir. Demetlerin hem alt tarafında hem de üst tarafında parenkimatik hücreler gözlenmektedir. Yapılan ölçümlere göre üst epiderma boyutları 16.09-6.67 x 21.56-5.53 µm, alt epiderma boyutları 14.26-3.27 x 18.18-3.99 µm, palizat parenkiması boyutları 49.01-16.80 x 10.22-4.31 µm, sünger parenkiması boyutları 11.38-3.25 x 20.58-3.63 µm olarak tespit edilmiştir (Şekil 4 A, B).

C. intertexta türüne ait yaprak enine kesiti incelendiğinde dışta ince bir kutikula tabakası, altta ve üstte tek sıralı oval ve dikdörtgen şeklindeki hücrelerden oluşan epidermis tabakası bulunmaktadır. Mezofil tipi bifasiyal olup palizat, palizat ve sünger, sünger tabakalarından meydana gelmiştir. Ana damar enine kesitinde biri diğer ikisine göre büyük 3 iletim demeti gözlenmiştir. Floem ve ksilemin etrafı alt ve üstte geniş, yanlarda ise dar şekilde sklerankimatik lifler tarafından desteklenmektedir. Demetlerin hem alt tarafında hem de üst tarafında parenkimatik hücreler gözlenmektedir. Yapılan ölçümlere göre üst epiderma boyutları 17.94-9.01 x 24.5-8.74 µm, alt epiderma boyutları 9.81-4.50 x 19.55-5.57 µm, palizat parenkiması boyutları 43.48-13.64 x 17.02-4.38 µm, sünger parenkiması boyutları 8.16-2.60 x 14.89-7.39 µm, olarak tespit edilmiş (Şekil 4 C, D) ve (Tablo 1) verilmiştir.

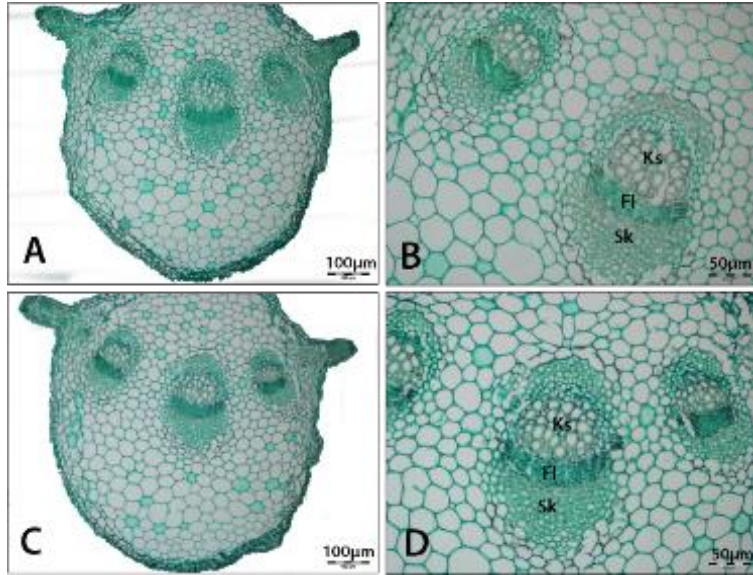


Şekil 4. *C. cataonica* (A, B) ve *C. intertexta* (C, D) yaprak enine kesiti. Üe; Üst epidermis, Pp: Palizat parenkiması, Sp: Sünger parenkiması Ae: Alt epidermis

Orta Damar

C. cataonica ana damardan alınan enine kesitlerle hazırlanan preparatlar incelendiğinde yarı orbikular şekilde olup, biri büyük 2 tanesi küçük olmak üzere 3 iletim demeti gözlenmiştir. Floem ve ksilemin etrafı alt ve üstte geniş, yanlarda ise dar şekilde sklerankimatik lifler tarafından desteklenmektedir. Demetlerin hem alt tarafında hem de üst tarafında parenkimatik hücreler gözlenmektedir. Orta damar parenkima hücre boyutları 23.07-5.67 x 34.42-5.43 µm olarak belirlenmiştir. Ksilem trake hücre boyutları 18.53-6.82 x 19.8-7.21 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 5 A, B).

C. intertexta ana damardan alınan enine kesitlerle hazırlanan preparatlar incelendiğinde yarı orbikular şekilde olup, biri büyük 2 tanesi küçük olmak üzere 3 iletim demeti gözlenmiştir. Floem ve ksilemin etrafı alt ve üstte geniş, yanlarda ise dar şekilde sklerankimatik lifler tarafından desteklenmektedir. Demetlerin hem alt tarafında hem de üst tarafında parenkimatik hücreler gözlenmektedir. Midrip parenkima hücre boyutları 24.26-8.17 x 49.13-13.96 µm olarak belirlenmiştir. Ksilem trake hücre boyutları 13.42-3.68 x 16.61-3.73 µm olarak ölçülmüştür (Şekil 5 C, D).



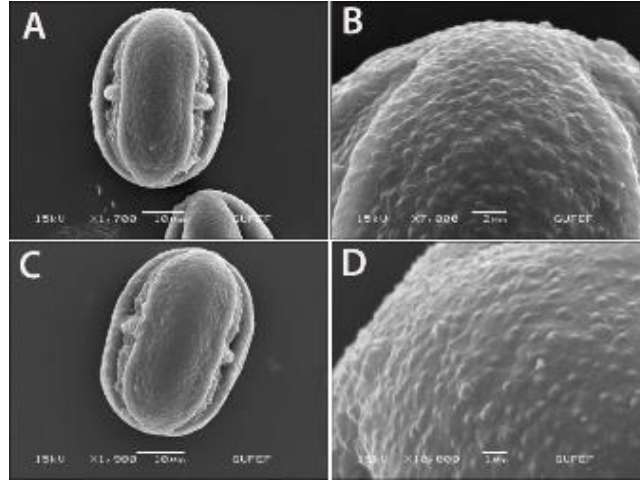
Şekil 5. *C. cataonica* (A, B) ve *C. intertexta* (C, D) midrip enine kesiti Sk: Sklerankima, Ks: Ksilem, Fl: Floem

3.3. Palinolojik Bulgular

C. cataonica poleni monad, strüktür tektat, apertür tipi trikolporattır. Polen şekli subprolattır (P/E: 1.39 µm). Polar eksen 29.85-24.36 µm ve ekvatoral eksen 21.83-16.69 µm'dur. Kolpus sınırları belirgin olup kutup uçlarına kadar uzanmamaktadır. Kolpus uzunluğu 25.47-20.97 µm, ve kolpus genişliği 4.9-1.94 µm'dir. Ekzin 0.97-0.33 µm, intin 0.51-0.11 µm'dur. Ekzin ornamentasyonu verrukoz-perforattır. İki verrukoz arası ortalama mesafe 0.8-1.5 µm olup her 25 µm² başına ortalama 15-23 verrukoz bulunmaktadır (Şekil 6 C, D).

C. intertexta poleni monad, strüktür tektat, apertür tipi trikolporattır. Polen şekli subprolattır (P/E: 1.37 µm). Polar eksen 33.66-23.69 µm ve ekvatoral eksen 24.07-23.69 µm'dur. Kolpus sınırları belirgin olup kutup uçlarına kadar uzanmamaktadır. Kolpus uzunluğu 29.85-20.97 µm ve kolpus genişliği 7.34-2.61 µm'dur. Ekzin 0.68-0.25 µm, intin 0.66-

0.16 μm 'dur. Ekzin ornamentasyonu verrukoz-perforattır. İki verrukoz arası ortalama mesafe 0.9-1.3 μm olup her 25 μm^2 başına ortalama 28-37 verrukoz bulunmaktadır (Şekil 6 A, B).



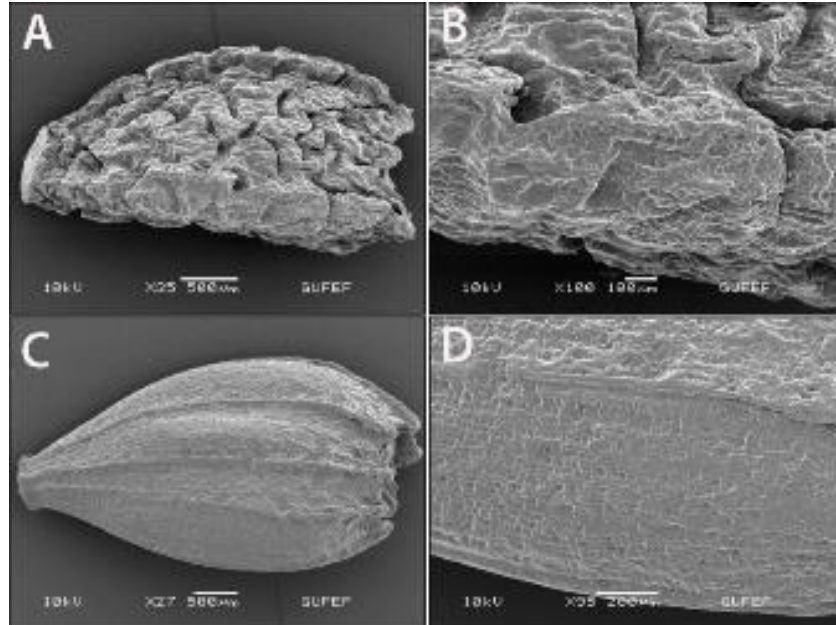
Şekil 6. *C. cataonica* (A, B) ve *C. intertexta* (C, D) polen SEM fotoğrafları

3.4. Aken morfoloji ve mikromorfolojisi

C. cataonica akenleri açık kahverengi, oblong-obovat olup belirsiz çizgili, buruşuk uç kısmında belirgin kenarlı ve açıkça dişlidir. Akenler 4.6-5.1 mm uzunluğunda ve 1.9-2.6 mm enindedir. Yüzey ornamentasyonları retikulat-sitriattır. Retikülasyonlarda muriler geniş ve 6-8 μm kalınlığında; luminalar, 15-25 μm uzunluğunda ve 8-20 μm genişliğindedir. Pappus bristleri barbellat olup 3.1-4.2 mm'dir (Şekil 7 A, B).

C. intertexta akenleri açık kahverengi, enine koyu kahverengi dalgalı ve belirgin obovattır. Boyuna çizgili belirgin kenarlı ve dişlidir. Akenler 4.3-5.2 mm uzunluğunda ve 2.4-3.3 mm enindedir. Yüzey ornamentasyonu belirsiz retikulat-sitriattır. Retikülasyonlarda muriler geniş ve 8-10 μm kalınlığında; luminalar, 15-25 μm uzunluğunda ve 8-20 μm genişliğindedir. Pappus bristleri barbellat olup 2.4-3.1 mm'dir (Şekil 7 C, D).

Yapılan çalışmalarda türlerle ilgili Türkiye Florası'nda verilen tanımlamalardaki eksiklikler giderilmiş ve tablolar halinde verilmiştir (Tablo 4, Tablo 5).



Şekil 7. *C. cataonica* (A, B) ve *C. intertexta* (C, D) aken SEM fotoğrafları

Tablo 1. Çalışılan türlerin karşılaştırmalı olarak gövde, yaprak ve orta damar anatomik özelliklerinin ölçüm değerleri; minimum, maksimum ve ortalama

		<i>C. cataonica</i>				<i>C. intertexta</i>			
		Boy (µm)		En (µm)		Boy (µm)		En (µm)	
		min-max	ortalama	min-max	ortalama	min-max	ortalama	min_max	ortalama
GÖVDE	Epidermis hücre	4.18-17.98	6.14	4.71-10.88	6.83	5.2-10.81	7.79	3.23-6.09	4.69
	Korteks hücre	6.7-16.22	11.14	17.59-27.97	22.66	8.99-31.58	19.25	8.16-47.5	28.78
	Trake hücre	14.72-26.27	19.46	10.41-21.39	15.05	13.3-26.6	20.49	9.03-23.27	17.47
	Öz hücre	13.11-39.9	27.43	11.15-47.08	32.83	14.19-54.39	32.83	20.03-53.47	38.39
YAPRAK	Üst epidermis hücre	6.67-16.09	11.88	5.53-21.56	12.96	9.01-17.94	12.17	8.74-24.51	15.98
	Alt epidermis hücre	3.27-14.26	5.09	3.99-18.8	8.33	4.5-9.81	7.18	5.27-19.55	11.75
	Palizat par. hücre	16.80-49.01	33.51	4.31-10.22	7.92	13.64-43.48	25.95	4.38-17.02	8.7
	Sünger par. hücre	3.25-11.38	7.36	3.63-20.58	10.26	2.6-8.16	5.03	7.39-14.89	10.21
	Korteks hücre	5.67-23.07	12.97	5.43-34.42	22.06	3.68-24.26	15.13	13.96-49.13	26.97
ORTA DAMAR	Trake hücre	6.82-18.53	11.86	7.21-19.8	11.67	3.68-13.42	8.24	3.73-16.61	8.40
	Floem dokusu	36.97-17.48	26.58	125.97-57.92	76.46	30.16-25.46	28.32	65.12-130.84	94.37
	Epidermis hücre	4.18-17.98	6.14	4.71-10.88	6.83	5.2-10.81	7.79	3.23-6.09	4.69

Tablo 2. Çalışılan türlerin polen özelliklerinin ölçüm değerleri; minimum maksimum ve ortalama değerleri

Türler	Polar (P)	Ekvatorial (E)	P/E	Kolpus Uzunluk	Kolpus Genişlik	Ekzin Kalınlık	İntin Kalınlık
<i>C. cataonica</i>	24.36-29.85 (Ort. 27.34)	16.59-21.83 (ort. 19.53)	1.39	20.97-25.7 (ort. 22.95)	1.94-4.9 (ort. 3.09)	0.33-0.97 (ort. 0.55)	0.16-0.51 (ort. 0.31)
<i>C. intertexta</i>	23.69-33.66 (Ort. 28.34)	17.11-24.07 (ort. 20.63)	1.37	20.97-29.85 (ort. 24.93)	2.61-7.34 (ort. 4.59)	0.25-0.68 (ort. 0.48)	0.16-0.66 (ort. 0.34)

Tablo 3. *Cousinia cataonica* Türü Türkiye Florası verileri ile çalışma verilerinin karşılaştırması

	Türkiye Florası	Çalışma verileri
Tür adı	<i>Cousinia cataonica</i>	<i>Cousinia cataonica</i>
Bitki boyu	10-20 cm	18-52 cm
Taban yaprakları	5-15 x 2.5-5 cm	4.5-15.9 x 2.3-5.1 cm
Gövde yaprak kanatları	1-2.5 (-4) cm	1.2-3.8 cm
Kapitula	10-25	8-14
Fillariler	100-140	113-134
Dış fillariler	?	4.1-5.2 x 1 mm
Orta fillariler	?	11.2-12.3 x 1 mm
İç fillariler	?	14.1-15.3 x 1.1-1.4 mm
Çiçekler	14-16 mm	13.1-14.2 mm
Aken	5x2 mm	4.6-5.2 x 1.9-2.6 mm

Tablo 4. *Cousinia intertexta* Türü Türkiye Florası verileri ile çalışma verilerinin karşılaştırması

	Türkiye Florası	Çalışma verileri
Tür adı	<i>Cousinia intertexta</i>	<i>Cousinia intertexta</i>
Bitki boyu	25-40 cm	23-42 cm
Taban yaprakları	20x13 cm	19 x 13.5 cm
Gövde yaprak kanatları	1-4 cm	1.2-3.6 cm
Kapitula	30'a kadar	11-34
Fillariler	80-160	86-113
Dış Fillariler	?	6.3-7.8 x 1 mm
Orta Fillariler	?	14-15.8 x 1.1-1.6 mm
İç Fillariler	?	16.2-16.8 x 0.9-1.6 mm
Çiçekler	13-16 mm	15.2-16.1 mm
Aken	5x2 mm	4.3-5.2 x 2.4-3.1 mm

4. Sonuçlar ve Tartışma

Yapılan çalışma sonucunda *C. cataonica* ve *C. intertexta* türlerinin morfolojik özellikleri değerlendirilmiş, anatomik karakterleri ortaya konulmuş, polen özellikleri ve akenlere ait karakterleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Morfolojik çalışmalar sonucunda *C. cataonica* ve *C. intertexta* türlerinin morfolojik özellikleri türlerin birbirinden ayrılmasında rol oynamıştır. *C. cataonica* bitki boyu açısından 52 cm'ye varan örnekleri bulunurken *C. intertexta* türünde 45 cm'ye kadar uzanan örnekler bulunmaktadır. *C. cataonica* gövdesi ince, silindirik yoğun araknoid-tomentoz tüylü, *C. intertexta* gövdesi ise yuvarlak uzunluğuna çizgili araknoid-yünsüdür. *C. cataonica* türü yaprak parçalarının linear ve kapitulasının daha yuvarlak iken *C. intertexta* türü yaprak parçaları lanseolat ve kapitula ovoid şekillidir.

Anatomik çalışmalar sonucunda *C. cataonica* ve *C. intertexta* türlerinin anatomik özelliklerinin birbirinden ayrılmasında gövde anatomisi korteks hücreleri ve sklerankimatik tabakaları sayısı bakımından önemlidir. *C. cataonica* korteks parenkiması hücre sayısı 3-5 ve sklerankimatik tabaka sayısı ise 4-6 iken *C. intertexta* korteks parenkiması hücre sayısı 5-8 ve sklerankimatik tabaka sayısı ise 3-6'dır (Şekil 3, Tablo 1). Ayrıca *C. cataonica* ve *C. intertexta* yaprak orta damarı her iki türde de biri büyük 2 tanesi küçük olmak üzere 3 adet iletim demeti gözlemlenmiş olup farklılık göstermemiştir.

Palinolojik incelemeler sonucunda her iki *Cousinia* türünde polen tipi monad olup polenlerinde trikolporat olmak üzere tek tip apertür tipi gözlemlenmiştir. Polen ölçümleri sonunda P/E oranına göre sub-prolat polen şekli belirlenmiştir. Polen yüzey ornamentasyonu her iki türde de verrukoz-perforat olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla palinolojik özellikler tür ayrımında farklılık göstermemiştir (Şekil 6, Tablo 2). İki türe ait 25 µm²'ye düşen verrukoz sayısı farklılık göstermiştir.

Asteraceae familyasının taksonomisinde ve filogenisinde palinolojik veriler önemli olarak kabul edilir [12, 13, 14, 15, 16]. [17] yapmış olduğu çalışma sonucunda polen ekzin ornamentasyonunu verrukoz-perforat olarak belirlemiştir. Yapılan bu çalışmada da polen ekzin ornamentasyonu verrukoz-perforat olarak tespit edilmiştir. [18] yapmış oldukları polen morfolojisi çalışmasında *C. eriobasis* türünde polen şeklini subprolat olduğunu belirtmiştir. Bu sonuç yapılan bu çalışmadaki bulgularla örtüşmektedir. [19] *C. boissieri* üzerine yapılan çalışmada polen ekzin ornamentasyonu retikulat olarak verilmesine rağmen tarafımızdan yapılan çalışmada polen ekzin ornamentasyonu verrukoz-perforat olarak tespit edildi.

Aken makro ve mikromorfolojik özellikleri önemli taksonomik farklılıklar ortaya koymaktadır. Aken şekli ve aken boyutları dikkate alındığı zaman *C. cataonica* ve *C. intertexta* akenleri birbirinden ayrılabilir. İki türün taramalı elektron mikroskobu aracılığıyla çekilen fotoğraflar incelendiğinde *C. cataonica* aken yüzeyi belirsiz çizgili ve buruşuk iken, *C. intertexta* aken yüzeyi belirgin çizgili ve daha düzdür. Her iki aken yüzey ornamentasyonu retikulat-striat olmasına rağmen *C. cataonica*'da daha belirgin, *C. intertexta*'da ise açıkça belirgin değildir (Şekil 7).

Taksonomik karakterlere ek olarak elde edilen bu verilerin *C. cataonica* ve *C. intertexta* türlerinin ayrılmasında yardımcı olabileceği kanaatindeyiz.

Teşekkür

Bu çalışmaya maddi destek sağlayan Selçuk Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü'ne (Proje No: 17201022) ve TÜBİTAK-TBAG'na (Proje No: 111T364) teşekkür ederiz.

Kaynaklar

- [1] Davis, P. H. ve Hedge, I. C., 1975, Flora of Turkey: Past, present and future, *Candollea*.
- [2] Seçmen, Ö., Gemici, Y., Gork, G., Bekat, L. ve Leblebici, E., 2000, Tohumlu Bitkiler Sistematığı, EU Fen Fak, *Kitap Serisi* (116).
- [3] Yıldırım, S., 1999, The chorology of the Turkish species of Asteraceae family, *Ot Sist. Bot. Dergisi*, 6 (2), 75-123.
- [4] Bunge, A., 1865, Übersichtliche Zusammenstellung der Arten der Gattung *Cousinia* Cass, Eggers et Comp, p.
- [5] Boissier, E., 1875, Flora orientalis, 3-255, Genève.
- [6] Boissier, E., 1888, Flora orientalis, Рипол Классик, p.
- [7] Johansen, D. A., 1940, Plant microtechnique, McGraw-Hill Book Company, Inc.; London, p.
- [8] Wodehouse, R. P., 1935, Pollen grains, McGraw-Hill Book Company, Inc; New York; London, p.
- [9] Hansen, H. V. 1991: SEM-studies and general comments on pollen in tribe Mutisieae (Compositae) sensu Cabrera. -Nord. J. Bot, 10: 607-623.
- [10] Urtubey, E. & Telleria, M. C. 1998: Pollen morphology of the subfamily Barnadesioideae (Asteraceae) and its phylogenetic and taxonomic significance. -Rev. Palaeobot. Palynol, 104: 19-37.
- [11] Scotland, R. W., Olmstead, R. G. & Bennett, J. R. 2003: Phylogeny reconstruction: the role of morphology. Syst. Biol, 52: 539-548.
- [12] Wortley, A. H., Funk, V. A., Robinson, H., Skvarla, J. J. & Blackmore, S. 2007: A search for pollen morphological synapomorphies to classify rogue genera in Compositae (Asteraceae). -Rev. Palaeobot. Palynol, 146: 169-181.
- [13] Lundberg, J. 2009: Asteraceae and relationships within Asterales. -In: Funk, V. A., Susanna, A., Stuessy, T. F. & Bayer, R. J. (eds.), Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae, Pp. 157-169. IAPT, Vienna, Austria.
- [14] Ahmad-Khanbeygi, Z., Sheidai, M. & Attar, F. 2011 12 31: Morphometry and palynological study of the genus *Cousinia* sect. *Cousinia* (Asteraceae) in Iran. -Iran. J. Bot. 17 (2): 158-166. Tehran.
- [15] Jafari, E. & G. H. Ghanbarian. (2007). Pollen morphological studies on selected taxa of Asteraceae. Journal of Plant Sciences 2.2 195-201.
- [16] İlçim, A., Özçelik, H., & Çenet, M. (2013). A new natural hybrid of *Cousinia* Cass. (Asteraceae) from Türkiye. *Biological Diversity and Conservation*, 6(1), 71-75.

(Received for publication 23 March 2019; The date of publication 15 December 2019)



Isolation, Identification and Evaluation of Enzyme Production Capacity of CGTase Producing Bacteria from Lakes Salda and Van/Turkey

Eda KABACAOĞLU PAAKKANEN¹, Barçın KARAKAŞ BUDAK ^{*1}
ORCID: 0000-0001-9668-6091, 0000-0002-1426-3667

¹ Akdeniz University, Faculty of Engineering, Department of Food Engineering, 07059, Antalya, Turkey

Abstract

The aim of this study was isolation of CGTase positive microorganisms from lakes Salda and Van, both being extreme environments unique in character with high alkalinity pH>9.7. Four bacterial strains designated as SD5, SG2, SG3 and V3 were isolated by cultivation on selective Horikoshi agar and confirmed as CGTase producers. Microscopic inspection showed the four isolates to be Gram positive rods. Strains were identified as *Bacillus* based on DNA sequences of 16S rDNA region. Only the V3 and SG2 isolates could be resolved at species level identified as *B. agaradhaerens* and *B. patagoniensis*, respectively. Growth and CGTase production capacity of the strains were evaluated under shake flask conditions. All isolates achieved extracellular CGTase levels of 6-8 U/mL within 24 h of incubation. Growth curves of *Bacillus* sp. SG3, *Bacillus* sp. SD5, *B. agaradhaerens* V3 showed the bacteria to reach a plateau phase within 24-30 h however, extended fermentation up to 168 h showed *B. patagoniensis* SG2 to continue the growth cycle until the end of this period with higher CGTase activity observed. These four strains isolated which have thus been confirmed as CGTase positive bacteria can potentially be exploited as genetic sources for the synthesis of CGTase in industrial scale.

Key words: *Bacillus* sp., bacterial identification, cyclodextrin glycosyltransferase, alkaliphilic

----- * -----

Salda ve Van Göllerinden SGTaz Üreten Alkalifilik Bakterilerin İzolasyonu, Tanılanması ve Enzim Üretim Kapasitelerinin Değerlendirilmesi

Özet

Bu çalışmanın amacı, CGTase pozitif mikroorganizmaların Salda ve Van göllerinden izolasyonudur. Her iki göl de yüksek seviyede bazik (pH> 9,7) özellikle benzersiz ekstrem ortamlardır. Çalışmada SD5, SG2, SG3 ve V3 olarak kodlanan dört bakteri suşu, seçici Horikoshi katı besiyeri üzerinde yetiştirilerek izole edilmiş ve CGTase üreticileri olarak doğrulanmıştır. Mikroskopik inceleme, dört izolatın Gram pozitif çubuk şeklinde bakteriler olduğunu göstermiştir. Suşlar, 16S rDNA bölgesinin DNA dizilerine dayanarak *Bacillus* cinsi bakteriler olarak tanılanmıştır. Bunlardan sadece V3 ve SG2 izolatları tür seviyesinde, sırasıyla *B. agaradhaerens* ve *B. patagoniensis* olarak tanılanabilmiştir. Suşların büyüme ve CGTase üretim kapasiteleri çalkalamalı inkübatör koşullarında değerlendirilmiştir. Tüm izolatların, 24 saatlik inkübasyon sonrasında hücre dışı ortamda 6-8 U/mL CGTase üretebildiği tespit edilmiştir. *Bacillus* sp. SG3, *Bacillus* sp. SD5 ve *B. agaradhaerens* V3 suşlarının büyüme eğrileri 24-30 saat içerisinde durağan faza ulaşmış ancak 168 saate kadar uzatılmış fermentasyon süresince *B. patagoniensis* SG2'nin yavaş ancak istikrarlı şekilde çoğaldığı ve CGTase aktivitesinin yükselerek devam ettiği gözlemlenmiştir. Hücre dışı CGTase salgılama kapasitesi olduğu doğrulanmış bu dört bakteri suşu gelecekte CGTase'in endüstriyel ölçekte üretilebilmesi için yürütülecek araştırmalarda potansiyel gen kaynakları olarak değerlendirilebilecektir.

Anahtar kelimeler: *Bacillus* sp., bakteriyel tanılama, siklodekstrin glikosiltransferaz, alkalifilik

* Corresponding author / Haberleşmeden sorumlu yazar: Tel.: +9xxxxxxxxxxxxx; Fax.: +9xxxxxxxxxxxxx; E-mail: xxxxxxxx

1. Introduction

CGTase (EC 2.4.1.19) has the systematic name 1,4- α -D-glucan 4- α -D-(1,4- α -D-glucano)-transferase and is also persists in literature as cyclodextrin glycosyltransferase, cyclomaltodextrin glucanotransferase or cyclomaltodextrin glycosyltransferase. CGTase is a hexosyltransferase that can catalyze four different types of reactions, namely, cyclization, disproportionation, coupling, and hydrolysis. In the coupling reaction a cyclodextrin ring is cleaved and transferred to an acceptor maltooligosaccharide substrate, and in the disproportion reaction a linear maltooligosaccharide is cleaved and the reducing sugar end is transferred to an acceptor maltooligosaccharide substrate. In cyclization, which is the main reaction of CGTases, transglycosylation reaction transforms α -1,4-glucans (i.e. starch) to cyclic non-reducing oligosaccharides, composed of six, seven, or eight glucose units, respectively named, α -, β -, and γ -cyclodextrins (CD) [1, 2]. CD are used for the encapsulation of a wide range of molecules or molecular parts, particularly those having hydrophobic properties. Encapsulation provides added stability, solubility, reactivity and bio-availability to the included molecule. Thus, CD have found numerous applications in many fields including agriculture, food, chemical and pharmaceutical industries [3, 4].

Microorganisms have constituted the main source for the production of CGTases, many of which have been isolated from extreme alkaliphilic environments [5, 6]. Alkaliphilic microorganisms can be isolated from alkaline environments, such as soda lakes, soda deserts, alkaline soils and carbonate springs and require pH values of 9 or more for growth. These environments owe their high basic pH values to the presence of high concentrations of sodium carbonate salts. Alkaliphiles have attracted much interest because of their ability to produce extracellular enzymes that are active and stable at high pH values [7]. For the synthesis of CD, it is important that the CGTase used is functional at alkaline conditions. The use of alkaline CGTase has markedly reduced production costs for CD and opened new markets for CD use in foodstuffs, chemicals, and pharmaceuticals [8].

Lake Salda (37°33'N; 29°41'E) is a mid-size crater lake located in a closed basin within Yeşilova (Burdur province) in south-western Anatolia at an altitude of 1180 m above sea level. Salda lake water has been reported to be rich in magnesium ions and has pH 9.5-9.6 [9]. Russel et al. [9] have in their study emphasized the unique character of Lake Salda in establishing an analogy of this crater lake with a crater formation on Mars. Lake Van is the largest lake in Turkey (3755 km²) and 3rd largest soda lake in the world with on average 2.17% salinity and pH 9.7-9.8 [10, 11]. Previous studies have investigated the archeal and bacterial diversity of Salda and Van Lakes [10, 12, 13, 14]. Aygan and Arıkan [15] and Aygan et al. [16] have studied the alfa-amylase and endoglucanase activities of Bacterial isolates from Van lake.

Extreme environments contain natural niches harboring organisms that have adapted to the prevailing conditions and thus, novel microorganisms isolated from these environments have evolved to express proteins which are able to function at the same extreme conditions. These novel isolates are therefore potential sources of proteins or genes encoding proteins that may be of interest to industrial producers of enzymes. The objective of this study is the isolation and identification of CGTase producing bacteria from these two alkaline environments in Turkey, and the determination and comparison of their enzyme production capacity.

2. Materials and methods

2.1. Collection of environmental samples and strain isolation

A total of 20 mud samples were collected from 5 different locations around Lake Salda. Additionally, 7 mud samples from 2 locations at the periphery of Lake van were obtained. Sampling locations are indicated in Figure 1. These samples were transported and stored at 4 °C until use. Samples were briefly shaken and left to settle and 100 μ L sample of water was plated on modified Horikoshi medium II [17] containing 1.0% soluble starch, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄·7H₂O, 1% Na₂CO₃, 1.5% agar, 0.03% phenolphthalein and 0.01 % methyl orange (pH 10.3). Plates were incubated at 37 °C for 4 days. Strains were selected based on the appearance of yellowish zones at colony periphery and sub-cultured by streaking on the same medium. Strains were also cultivated in Horikoshi broth containing 1.0% soluble starch, 0.5% polypeptone, 0.5% yeast extract, 0.1% K₂HPO₄, 0.02% MgSO₄ · 7H₂O and 1% Na₂CO₃ prepared as described by [18]. Culture samples were diluted with a 50% aliquot of 50% glycerol-water solution and stored at -80 °C.

The color, morphology, size, surface characteristics of the colonies were observed. Gram staining was performed on the isolated strains and they were observed under a light microscope (Leica DM750, Wetzlar, Germany) at 1000x magnification in oil immersion for the shape and size of the cells.

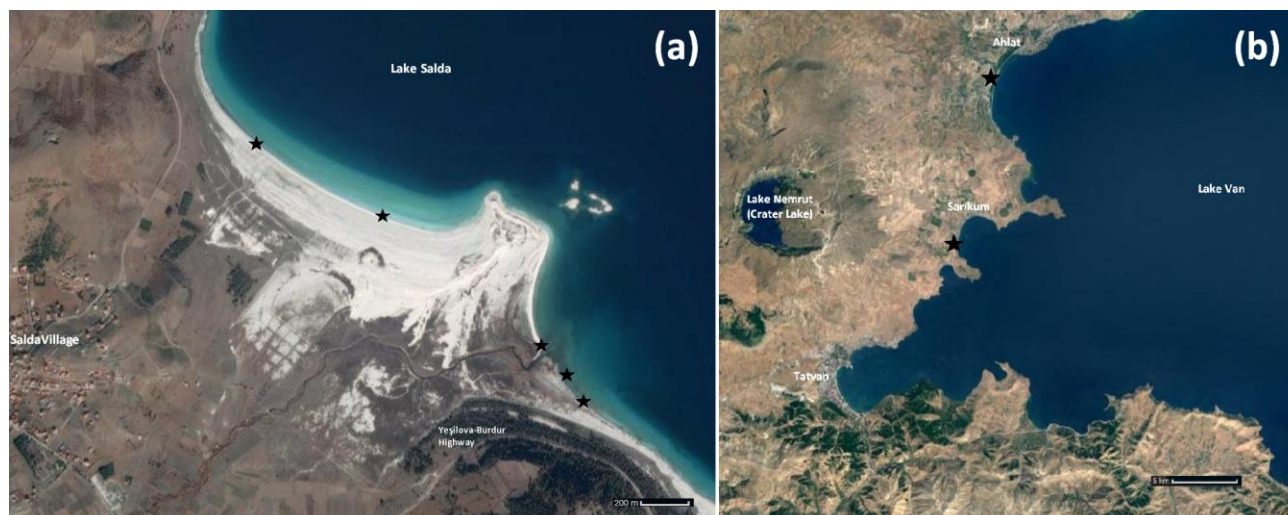


Figure 1. Satellite images of southeastern banks of lakes Salda (a) and Van (b). Stars indicate sampling locations. (Original images courtesy of Google Maps, <https://maps.google.com>)

2.2. Identification of the isolated strains

The color, morphology, size, surface characteristics of the colonies were observed. Gram staining was performed on the isolated strains and they were observed under a light microscope (Leica DM750, Wetzlar, Germany) at 1000x magnification in oil immersion for the shape and size of the cells. Along with these observations, bacterial identification was performed with 16S rDNA sequencing. For genomic DNA isolation bacteria were cultured in LB Lennox broth and isolation of DNA was performed using the MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit (Epicentre® Biotechnologies, WI, ABD). DNA amplification was performed using the universal primer set 27F and 1492R to amplify an approximately 1400 bp fragment [19]. Sequencing was performed using Sanger dideoxy sequencing and the sequences obtained were analyzed comparing to sequences in the GenBank BLASTN database [20].

Multiple sequence alignments were performed using DNAMAN (DNAMAN 5.2.2, Lynnon Corporation, Quebec, Canada) and SnapGene (GSL Biotech LLC, USA) software. FinchTV (version 1.4.0, Geospiza, USA) and Sequencher 5.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, USA) were used for inspecting the sequence chromatograms. Phylogenetic analyses were performed using the MEGA6 program [21] (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013).

2.3. CGTase activity assays

The four bacterial isolates were cultured in baffled Erlenmeyer flasks containing 100 mL of liquid media consisting of Horikoshi broth supplemented with 1% soluble starch. Fermentations were performed in duplicate flasks using a shaker incubator (Certomat IS, Sartorius Stedim, Germany) at 37 °C and 250 rpm. Optical density (OD) of the cell cultures were determined spectrophotometrically (Libra S50, Biochrom, UK) measuring the absorbance at 600 nm. Culture supernatants were obtained by centrifugation of 1 mL of samples at 5500 × g for 10 min using a microcentrifuge (Eppendorf, Germany). CGTase activity was determined based on the reduction of color intensity of phenolphthalein after complex formation with β-CD according to [18] with slight modifications. A 250 μL volume of reaction mixture containing 4% soluble starch and 50 mM K₂HPO₄ adjusted to pH 6 was mixed with 25 μL cell supernatant. The mixture was incubated at 50 °C for 10 min in a block heater (Thermo Scientific, USA). The reaction was stopped by adding 875 μL 30 mM NaOH solution and 125 μL of 0.02% (w/v) phenolphthalein in 5 mM Na₂CO₃ solution was added. The mixture was left to stand for 15 min at room temperature and the reduction in absorbance was measured spectrophotometrically at 550 nm against a blank prepared using sterile culture medium. Activity values were obtained using a standard curve obtained with 0-2.5 μmol of β-CD (C4767, Sigma) solubilized in 2.5 mL volume. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme forming 1 μmol β-CD per min. OD and CGTase activity measurements were performed in duplicate and the mean values and standard deviations were calculated using GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results and discussion

3.1. Strain isolation and identification

Three CGTase producing bacterial strains were isolated from Lake Salda and one strain from Lake Van. The isolates labeled as SD5, SG2, SG3 and V3 formed colonies on selective HM agar which had pale yellow zones

surrounding them. The colony morphologies of strains isolated from Lake Salda had some common properties that were not found in the Lake Van isolate (V3). Strains from Lake Salda formed medium to large sized flat elevation circular colonies with undulate margins. These were characteristically glossy in appearance and had a yellow tinge which was especially visible along the raised colony edges. The strain isolated from Lake Van on the other hand, had an irregular and filamentous form with a flat opaque surface, opaque and creamy in color. Observed under the microscope, the strains were all identified as Gram positive rod shaped bacteria. The macromorphology and Gram dyed cell micrographs are presented in Figure 2. Although not apparent in Figure 2, the SD5 strain was confirmed as a sporulating microorganism upon microscopic observation. The size and spread of the colonies are possible indications that these are motile bacteria, as are most of the species belonging to the genus *Bacillus* [22].

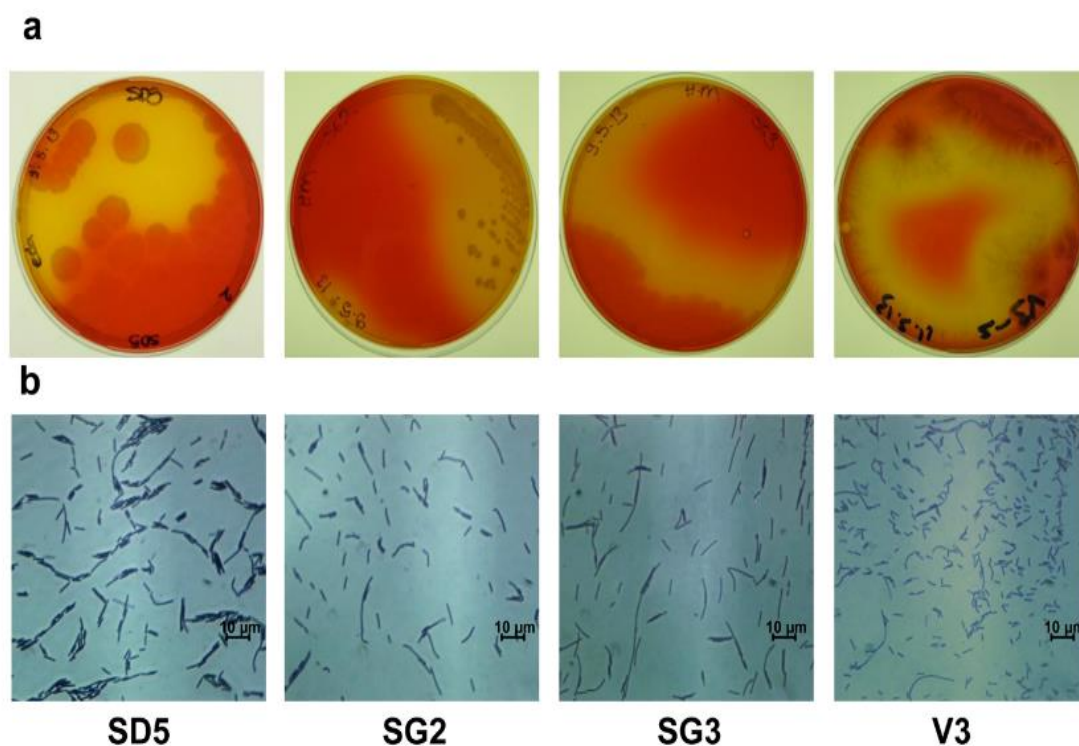


Figure 2. Colonies formed on Horikoshi agar incubated for 72 h (a) and micrographs of Gram stained cells obtained at 1000× using a light microscope (b)

The 16S rDNA of bacterial isolates was amplified, sequenced and analyzed. Sequences of 1082-1399 bp were obtained and submitted to GenBank. Accession numbers assigned were KU851858 for V3, KU851857 for SD5, KU686705 for SG2, KX037370 for SG3. The phylogenetic tree constructed using the sequence data is shown in Figure 3. All four isolates were identified as belonging to the genus *Bacillus*. Two of the isolates, SD3 and SG5, procured from different locations around Lake Salda were genetically more closely related, with sequences sharing >99% identity with 16S rDNA sequences of *B. oshimensis*, *B. lehensis* and *B. hunnanensis* strains made available on the NCBI Blast database. In another study performed in our laboratory, the CGTase gene of *Bacillus* sp. SD5 has been isolated and sequenced, yielding the information that the CGTase sequence has a maximum 98% identity to the CGTase cDNA of related *Bacillus* strains [23]. This finding provided a confirmation that *Bacillus* sp. SD5 was more closely related to the three mentioned strains. Hence, the taxonomy for the *Bacillus* sp. SD3 and SD5 could not be resolved on species level. On the other hand, *Bacillus* sp. SG2 was identified as *B. patagoniensis*. This species of bacteria was among those isolated and confirmed to be CGTase producer by Gomes et al. [24]. The isolate from Lake Van (V3) was identified as *B. agaradhaerens* and was identified as being distinctly different than the other three isolates obtained from Lake Salda. The CGTase production capacity of other novel isolates of *B. agaradhaerens* from different global locations have been demonstrated [25, 26, 27].

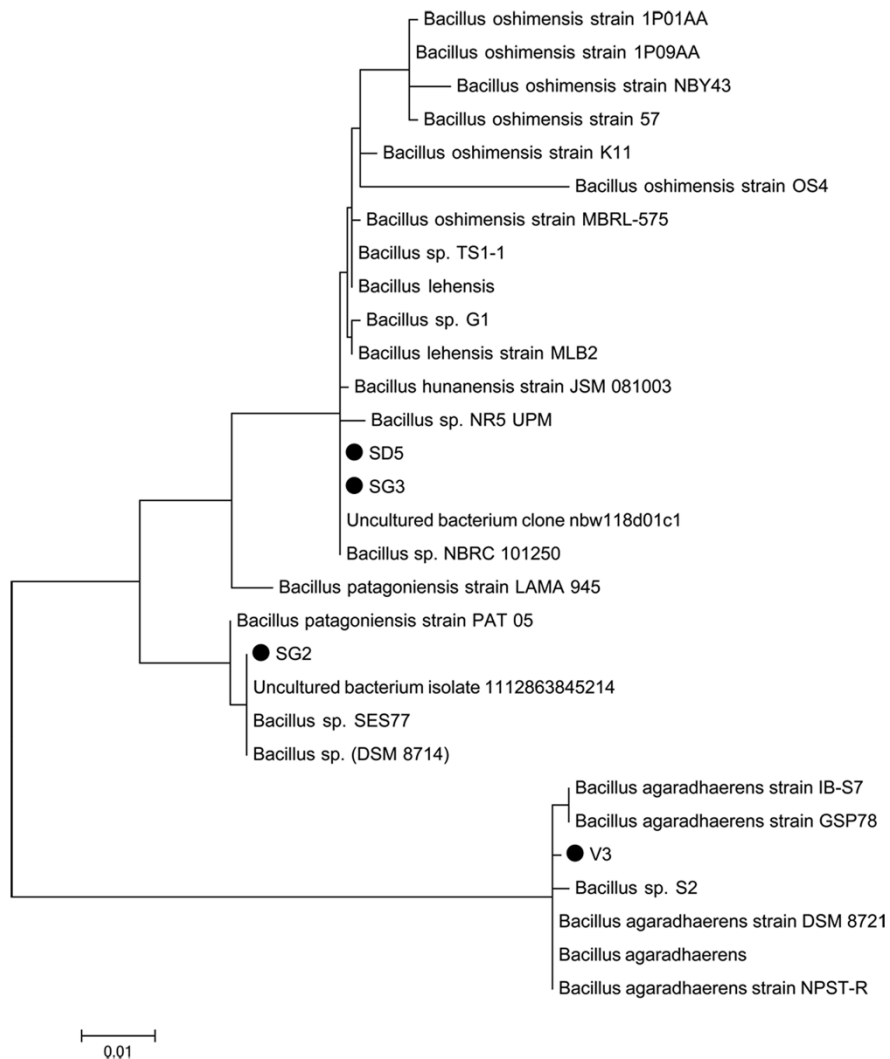


Figure 3. Phylogenetic tree showing genetic relatedness of isolated bacteria

3.2. Liquid culture and CGTase production

The CGTase production potential of cultures was further investigated with shake flask fermentation trials in 50 mL volume (Figure 4a). OD measurements indicated that all four strains exhibited logarithmic growth within the first 12 hours into incubation (Figure 4b). Cultures of strains SD5, SG3 and V3 proliferated at a higher rate reaching OD values four fold higher than strain SG2 by the 24 h into fermentation. The non-fastidious nature of SG2 was also evident from the colony morphology in Figure 2 where the colonies were small and covered a relatively less area than those of other strains. This observation may be attributable to the deficiency of the media used for a certain component or condition that the strain requires for optimum growth. Although the growth rate of *Bacillus* sp. SD5, SG3 and *Bacillus agaradhaerens* V3 seemed to be higher than *Bacillus patagoniensis* SG2, all four isolates reached CGTase activities in the range of 6-8 U/mL within 24 h. Fermentation was endured for 168 h to observe that the slow growing strain *Bacillus patagoniensis* SG2 increased in cell concentration, reaching a peak CGTase activity of 9.2 U/mL at the 96th hour (data not shown). Peak extracellular CGTase activities for the other strains were 8 U/mL at 24 h for *Bacillus* sp. SG3, 7.6 U/mL for *Bacillus* sp. SD5 at 84 h and 7.6 U/mL for *Bacillus* sp. V4 at 12 h. Among these four isolates *Bacillus* sp. SD5 was utilized as a genetic source for the heterologous expression of CGTase in *Pichia pastoris* [23].

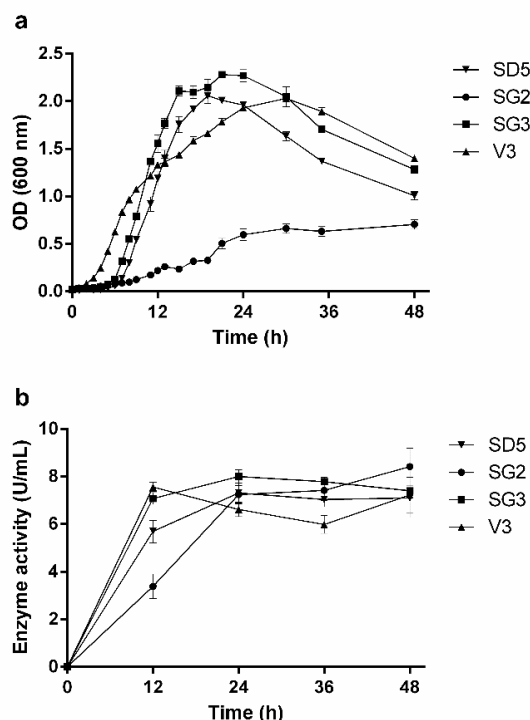


Figure 4. OD (a) and extracellular CGTase production (b) of bacterial isolates from lakes Salda and Van cultured under shake flask conditions

4. Conclusions

Wild type microbial isolation and characterization is a key step in research endeavors geared at biotechnological production. Furthermore, challenged with environmental threats, the identification and investigation of microbial communities are of paramount importance providing documentation of the existing microflora. In this context, this is the first report of isolation of bacteria which are capable of producing CGTase from two major soda lakes in Turkey. In doing so, four strains have been obtained which can be utilized for CGTase production as well as for exploitation as genetic sources for production of CGTase or other alkaliphilic enzymes. It is anticipated that this study has added to our understanding of the microbial communities that reside in these local environments and the necessity of protection of these ecosystems from the impact of human activity to conserve these unique microbial habitats.

Acknowledgements

This study was partially funded by Akdeniz University, Scientific Research Projects Management Unit under project No. 2011.01.0102.008.

References

- [1] Tonkova, A. (1998). Bacterial cyclodextrin glucanotransferase. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(8), 678–686. [https://doi:10.1016/S0141-0229\(97\)00263-9](https://doi:10.1016/S0141-0229(97)00263-9)
- [2] Van der Veen, B. A., Uitdehaag, J. C. M., Dijkstra, B. W., & Dijkhuizen, L. (2000). Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1543(336), 336–360. [https://doi:10.1016/S0167-4838\(00\)00233-8](https://doi:10.1016/S0167-4838(00)00233-8)
- [3] Del Valle, E. M. M. (2004). Cyclodextrins and their uses: a review. *Process Biochemistry*, 39(9), 1033–1046. [https://doi:10.1016/S0032-9592\(03\)00258-9](https://doi:10.1016/S0032-9592(03)00258-9)
- [4] Szejtli, J. (2013). *Cyclodextrin technology - topics in inclusion science* (Vol. 1). Netherlands: Springer Science & Business Media. <https://doi:10.1007/978-94-015-7797-7>
- [5] Biwer, A., Antranikian, G., & Heinzle, E. (2002). Enzymatic production of cyclodextrins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), 609–617. <https://doi:10.1007/s00253-002-1057-x>
- [6] Han, R., Li, J., Shin, H.-D., Chen, R. R., Du, G., Liu, L., & Chen, J. (2014). Recent advances in discovery, heterologous expression, and molecular engineering of cyclodextrin glycosyltransferase for versatile applications. *Biotechnology Advances*, 32(2), 415–428. <https://doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.004>

- [7] Atanasova, N., Petrova, P., Ivanova, V., Yankov, D., Vassileva, A., & Tonkova, A. (2008). Isolation of novel alkaliphilic bacillus strains for cyclodextrin glucanotransferase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 149(2), 155–167. <https://doi:10.1007/s12010-007-8128-5>
- [8] Horikoshi, K. (2011). Introduction and history of alkaliphiles. In K. Horikoshi (Ed.), *Extremophiles handbook* (pp. 19–26). Japan: Springer. https://doi:10.1007/978-4-431-53898-1_1.1
- [9] Russel, M. J., Ingham, J. K., Zedef, V., Maktav, D., Sunar, F., Hall, A. J., & Fallick, A. E. (1999). Search for signs of ancient life on Mars: expectations from hydromagnesite microbialites, Salda Lake, Turkey. *Journal of the Geological Society*, 156(5), 869–888. <https://doi:10.1144/gsjgs.156.5.0869>
- [10] Berber, İ., & Yenidünya, E. (2005). Identification of alkaliphilic Bacillus species isolated from Lake Van and its surroundings by computerized analysis of extracellular protein profiles. *Turkish Journal of Biology*, 29(3), 181–188.
- [11] Kempe, S., Kazmierczak, J., Landmann, G., Konuk, T., Reimer, A., & Lipp, A. (1991). Largest known microbialites discovered in Lake Van, Turkey. *Nature*, 349(6310), 605–608. <https://doi.org/10.1038/349605a0>
- [12] Berber, İ., & Berber, Ş. (2006). Numerical analysis of SDS-PAGE protein patterns of facultative alkaliphilic Bacillus species isolated from lake Van, Turkey. *Fresenius Environmental Bulletin*, 15(5), 409–416.
- [13] Ozcan, B., Cokmus, C., Coleri, A., & Caliskan, M. (2006). Characterization of extremely halophilic Archaea isolated from saline environment in different parts of Turkey. *Microbiology*, 75(6), 739–746. <https://doi:10.1134/s002626170606018x>
- [14] Poyraz, N., & Mutlu, M. B. (2017). Alkaliphilic bacterial diversity of Lake Van/Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 10(1), 92–103.
- [15] Aygan, A., & Arikan, B. (2008). A new halo-alkaliphilic, thermostable endoglucanase from moderately halophilic Bacillus sp. C14 isolated from Van Soda Lake. *International Journal of Agriculture & Biology*, 10(4), 369–374.
- [16] Aygan, A., Arikan, B., Korkmaz, H., Dinçer, S., & Çolak, Ö. (2008). Highly thermostable and alkaline α -amylase from a halotolerant-alkaliphilic Bacillus sp. AB68. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(3), 547–553. <https://doi:10.1590/S1517-83822008000300027>
- [17] Park, C. S., Park, K. H., & Kim, S. H. (1989). Screening method for glucanotransferase using. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(4), 1167–1169.
- [18] Kaneko, T., Kato, T., Nakamura, N., & Horikoshi, K. (1987). Spectrophotometric determination of cyclization activity of β -cyclodextrin-forming cyclomaltodextrin glucanotransferase. *Journal of the Japanese Society of Starch Science*, 34(1), 45–48.
- [19] Lane, D. J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115–175). Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons Ltd.).
- [20] Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389–3402.
- [21] Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), 2725–2729. <https://doi:10.1093/molbev/mst197>
- [22] Fraser, G., Hughes G. (1999) Swarming motility. *Current Opinion in Microbiology*, 2(6): 630-635. [https://doi:10.1016/S1369-5274\(99\)00033-8](https://doi:10.1016/S1369-5274(99)00033-8)
- [23] Kabacaoğlu, E., & Karakaş Budak, B. (2017). Heterologous expression of β - γ -type cyclodextrin glycosyltransferase of newly isolated alkaliphilic Bacillus sp. SD5 in Pichia pastoris. *Starch/Staerke*, 69(9–10), 1600365. <https://doi:10.1002/star.201600365>
- [24] Gomes, A. C. S. M., Dos Santos, S. R., Ribeiro, M. C., Cravo, P. V. L., Vieira, D. G., De Souza, K. M. C., & Amaral, A. C. (2018). Is there still room to explore cyclodextrin glycosyltransferase-producers in Brazilian biodiversity? *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 90(2), 1473–1480. <https://doi:10.1590/0001-3765201820170670>
- [25] Hao, J.-H., Huang, L.-P., Chen, X., Sun, J.-J., Liu, J.-Z., wang, W., & Sun, M. (2017). Identification, cloning and expression analysis of an alpha-CGTase produced by stain Y112. *Protein Expression and Purification*, 140, 8–15. <https://doi:10.1016/J.PEP.2017.07.015>
- [26] Abdelnasser, S. S. I., Mohamed, A. E. T., & Ali, A. A. S. (2010). Characterization of immobilized alkaline cyclodextringlycosyltransferase from a newly isolated Bacillus agaradhaerens KSU-A11. *African Journal of Biotechnology*, 9(44), 7550–7559. <https://doi:10.5897/AJB10.644>
- [27] Martins, R. F., & Hatti-Kaul, R. (2002). A new cyclodextrin glycosyltransferase from an alkaliphilic Bacillus agaradhaerens isolate: purification and characterisation. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(1), 116–124. [https://doi:10.1016/S0141-0229\(01\)00461-6](https://doi:10.1016/S0141-0229(01)00461-6)

(Received for publication 06 April 2019; The date of publication 15 December 2019)

Biological Diversity and Conservation

Cilt / Volume 12, Sayı / Issue 3, Aralık / December 2019

Contents / İçindekiler

Yayın/Page No.-Sıra/Order No.

01. 01 Antioxidative effects of tannic acid, cacao oil and st. john's wort oil on the oxidative stress induced by cadmium in packed human erythrocytes
02. 07 The effect of different harvest dates on the yield and quality properties of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) plant
03. 14 Physicochemical soil properties of genus *Origanum* (Lamiaceae) L. grown in Turkey
04. 20 Contributions to the records of *Dysmachus praemorsus* (Loew, 1854) (Diptera, Asilidae) in Turkey and some notes on its seasonal activity
05. 28 Effects of wing loading on take-off and turning performance which is a decisive factor in the selection of resting location of the Great Bustard (*Otis tarda*)
06. 34 Effect of vanillic acid against oxidative stress induced by glyphosate in *Saccharomyces cerevisiae*
07. 44 Biosorption of cadmium and copper by *Aspergillus* spp. isolated from industrial ceramic waste sludge
08. 57 Amylase Production of *Bacillus subtilis* Isolated from Soil by SmF Method
09. 65. Analysis of genomic stability and DNA damage in plants exposed to cement dust pollution using the RAPD analysis
10. 70 Pollen micromorphology of *Petrorhagia* (Ser.) Link taxa
11. 78 Antimicrobial, antioxidant and DNA protective effects and phenolic content of *Lallementia canescens* (L.) Fisch. & C.A.Mey. and *Lallementia peltata* (L.) Fisch. & C.A.Mey
12. 89 Fruit and seed morphology of some *Alyssum* (Brassicaceae) taxa from Anatolia
13. 95 One health approach to decreasing biodiversity and the problem of emerging zoonotic diseases
14. 103 Economic Value Analysis of *Fritillaria imperialis* in Turkey
15. 111 Morphological, Anatomical and Palynological Investigations on Endemic *Silene tunicoides* Boiss. (Caryophyllaceae)
16. 119 Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin–Radushkevich isotherms studies removal of silver from aqueous solution by the Mint extract
17. 126 Nest characteristics of Egyptian vulture (*Neophron percnopterus*) in Middle and Upper Sakarya Region, Turkey
18. 132 Synthesis of some new derivatives of tick pheromones and investigation of pheromone properties
19. 144 Anatomic, morphologic, palynologic and micromorphologic features investigation of Turkish endemic *Cousinia cataonica* and *Cousinia intertexta* species
20. 152 Isolation, Identification and Evaluation of Enzyme Production Capacity of CGTase Producing Bacteria from Lakes Salda and Van/Turkey

Dergiyi tarayan veri tabanları / Abstracted-Indexed in: EBSCO; Genamics JournalSeek Database; InfoBaseIndex; International Institute of Organized Research, IZOR; Google Scolar, OhioLINK Databases-OPC4-Online-Katalog der Bibliothek der Fachhochschule Anhalt; Online-Katalog der UB Clausthal; Turkey Citation Index; Ulakbim; Clarivate Analytics Thomson Reuters Zoological Record.

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

Clarivate Analytics Thomson Reuters Zoological Record Impact Factor, 5.00

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

Dergide yayınlanan makalelere" [http:// www.biodicon.com](http://www.biodicon.com)" adresinden ulaşabilir.

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

© 2019 Tüm hakları saklıdır/All rights reserved

ISSN 1308-5301 Print / ISSN 1308-8084 Online

ISSN 1308-5301



9 771308 530001

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

“Biodiversity and Conservation (BioDiCon)” is an international, peer-reviewed scientific journal published in online and printed form, in accordance with the principles of independency and impartiality. This journal is a peer reviewed journal on the topics of biological diversity and conservation that uses independent, unbiased double-blinded peer review principles.

“Biological Diversity and Conservation” publishes experimental studies, compilations on current issues, case reports, editorial comments and editorial letters prepared in accordance with the ethical guidelines, about on all areas of biological diversities. Descriptive or experimental studies presenting clear research questions are accepted. The journal’s publication language are English and Turkish.

The manuscripts submitted to Biological Diversity and Conservation will go through a double-blind peer-review process. Each submission will be reviewed by at least two external, independent peer reviewers who are experts in their fields in order to ensure an unbiased evaluation process. The editorial board will invite an external and independent editor to manage the evaluation processes of manuscripts submitted by editors or by the editorial board members of the journal.

An approval of research protocols by the Ethics Committee in accordance with international agreements is required for experimental, clinical, and drug studies and for some case reports. If required, ethics committee reports or an equivalent official document will be requested from the authors.

A declaration text including the written consent should be added in the manuscripts concerning experimental research on humans related to that the patients and the volunteers were informed about the procedures of the performed and to be performed studies on them. In addition, information about patients’ approval, the name of the ethics committee, and the ethics committee approval number should be addressed in the Materials and Methods section of the manuscript. In the studies carried out on animals, the precautions taken to prevent pain and suffering of the animals should be clearly indicated.

Authorship Contribution Form

The journal of Biological Diversity and Conservation, in order to protect the rights of the authors and to prevent such situations as ghost / honorary authorship, requires the author to submit a signed and a scanned copy of the **Authorship Contribution Form** (which can be downloaded from <http://www.biodicon.com>).

Policy of Screening for Plagiarism

All submissions are checked by a similarity detection software iThenticate program for determination of plagiarism and non-ethical situations. In cases where the application is alleged or suspected as plagiarism, citation manipulation and data forgery/production, the Editorial Board will follow and act in accordance with the COPE rules.

If the editorial board gets suspicious about a case of ‘gift authorship’, the application will be rejected without being reviewed. As a part of article submission the responsible author should send a short statement text affirming that s/he takes all the responsibility of the article during the submission and review stages of the manuscript.

ICMJE Conflict of Interest form

Biological Diversity and Conservation journal asks and encourages its authors and submitted articles to disclose any existing or potential conflicts of interests, including financial, consultant and institutional ones, that may lead to potential bias or conflicts among individuals involved in the evaluation process. Any material grants or other support received for a study sent from individuals or institutions should be reported to the Editorial Board. In order to disclose a potential conflict of interest, **The Potential Conflict of Interest Disclosure Form (ICMJE)** must be signed by all contributing authors and forwarded to the journal editorial board.

Appeals and Complaint

All appeals and complaint cases are dealt with in the framework of the COPE trial rules by The Editorial Board of the journal. In such cases, the authors should directly make a contact with the editorial office in relation to their appeal and complaints.

Copyright

When submitting an article to the journal of Biological Diversity and Conservation, the authors agree to give the copyright of their articles to the journal. If the publication is rejected, the copyright of the article will be assigned back to the authors. Biological Diversity and Conservation requires each article application to be carried out together with the **Copyright Transfer Form** (which can be downloaded from <http://www.biodicon.com>).

When using previously published content, permission from the copyright owner must be obtained by the authors.

The statements or opinions contained in the articles published in the Journal of Biological Diversity and Conservation reflect the views of the author(s); the editors, the editorial board, and the publisher don’t accept any responsibility or liability for such materials. All the responsibility belongs to the authors about the published content.

PREPARATION OF MANUSCRIPT

Authors are required to prepare manuscripts in accordance with the STROBE guidelines for observational original research studies, STARD guidelines for studies on diagnostic accuracy, PRISMA guidelines for systematic reviews and meta-analysis, ARRIVE guidelines for experimental animal studies, TREND guidelines and CONSORT guidelines for randomized research studies for non-randomized public behaviour. The manuscripts should be prepared in accordance with ICMJE-Recommendations for the Conducting (<http://www.icmje.org/icmje-recommendations>).

Manuscripts can only be submitted through the journal’s online manuscript submission and evaluation system, available at <http://www.biodicon.com> . Submissions that do not comply with the rules of the journal will be returned to the submitting author with the requests of correction requests.

Authors are required to submit the following

- a) Copyright Transfer Form,
- b) Author Contributions Form,
- c) ICMJE Potential Conflict of Interest Disclosure Form (should be filled in by all contributing authors) during the initial submission. These forms are available for download at <http://www.biodicon.com>
- d) Similarity Form (iThenticate: According to the Plagiarism Detection Software programme the similarity index of the article should not exceed 20% after all references and less than 1% matches have been removed.)

Preparation of the Manuscript (General rules for all manuscript types)

Title page: The first page of the article should include the title of manuscript, authors' names and institutions, an abstract, and keywords. Title, abstract, and keywords must be provided both in English and Turkish. The corresponding author should be indicated by a footnote and besides his/her full open mail address, and an e-mail address should also be provided.

A separate title page should be submitted for all submissions and this page should include:

- ❖ Full title of manuscript as well as a short title of up to 50 characters (title)
- ❖ Name(s) , address and highest academic degree of the author (s),
- ❖ Providing information about supporting institutions (if any),
- ❖ Name, address, telephone, fax numbers and e-mail address of the corresponding author,
- ❖ Acknowledgment of the individuals who contributed to the preparation of the manuscript.

Abstract: The abstract of Original Articles should be structured with subheadings (Objective, Methods, Results, and Conclusion). Abstract should be written both in English and in Turkish up to 300 words. First the English name of the article, then the English abstract should be written. After that the Turkish name of the article and a summary in Turkish should be written. If the article is written in English and sent from outside Turkey, Turkish abstract it is not necessary. Please check Table 1 below for word count specifications.

Keywords: Key words should not exceed 3-5 words. Keywords should start with lowercase letters except for italic words and special names.

MANUSCRIPT TYPES

Original Research

The first page of the article should include the title of manuscript, authors' names and institutions, an abstract, and keywords. Title, abstract, and keywords must be provided both in English and Turkish. . If the article is written in English and sent from outside Turkey, Turkish Title, abstract and Keywords it is not necessary. The corresponding author should be indicated by a footnote and besides his/her full open mail address, and an e-mail address should also be provided.

Title: Must be provided both in English and Turkish.

Abstract: It should not include subheadings and should be limited to 350 words

Keywords: This section should contain at least three and at most six items and should be provided just below the abstract.

Main Text: The text should start with the Introduction, and be divided into appropriate sections. Sections must be numbered consecutively. Section headings must be written minisculely flush left and bold with their numbers (as, 1. Introduction, 2. Material and method, 3. Results, 4. Conclusions and discussion). Subsections must be numbered as "1.1", "1.2", etc., using the section number and must be written minisculely flush left. All acronyms and abbreviations used in the manuscript should be defined at first use, both in the abstract and in the main text. In the final section there must be Acknowledgements (if any) , References and Appendices (if any). Please check Table 1 for the limitations. It should include Introduction, other subheadings and Conclusion sections and should be limited to 5000 words except for the references.

References: The reference list should be placed just below the main text and the number of references should not exceed 50.

Tables, Figures and Images: The appearance of Tables, Figures and Images should be provided in the text. The visuals should be original or the written permission obtained from the copyright holder should be sent to the Editor-in-Chief's Office.

Review

Reviews prepared by the authors who have a broad knowledge in a specific area and represented in the international literature by a high number of publications and citations, are evaluated.

Title: Must be provided both in English and Turkish.

Abstract: Abstract shouldn't include subheadings and should be limited to 350 words.

Key words: This section should include at least three and at most six items and should be provided just below the abstract.

Main Text: It should include Introduction, other subheadings and Conclusion sections and should be limited to 5000 words excluding the references.

References: The reference list should be placed below the main text and the number of references should not exceed 55.

Tables, Figures and Images: Tables, Figures and Images: The appearance of Tables, Figures and Images should be provided in the text. The visuals should be original or the written permission obtained from the copyright holder should be sent to the Editor-in-Chief's Office. Please check Table 1 for the limitations.

Research note, Case Reports, Case Series and Literature Review

The text should include Introduction, Case reports, Discussion and Conclusion subheadings. Please check Table 1 for the limitations for Research Note.

Letters to the Editor

Discusses important parts, unobserved aspects or missing parts of a previously published article. Letters to the Editor should not include Abstract, Keywords and Tables, Figures, Images, and other media. The text should be unstructured. The commented article must be properly identified in the letter to the editor (Table 1).

Table 1. Limitations for each manuscript type

Type of manuscript	Word limit	Abstract word limit	Reference limit	Table limit	Figure limit
Original Research	5000	350	35	7	maximum 20 images
Review Article	5000	350	55	7	maximum 20 images
Research note, Case Report	1000	250	15	No tables	maximum 15 images
Case Series	1500	250	20	maximum 15 images	maximum 15 images
Literature of Review	3500	250	35	maximum 15 images	maximum 15 images
Letter to the Editor	500	No abstract	7	No tables	No figure

Tables

Tables should be included in the main document, and they should be numbered consecutively in the order they are referred to within the main text. Their appearance in the text should be provided. A descriptive title must be placed above the tables. Abbreviations used in the tables should be defined below the tables by footnotes. Tables should be created using the “insert table” command of the word processing software.

Figures, Graphics and Photographs

Figures, graphics, and photographs should be submitted as separate files (JPEG format) through the submission system. The files should not be embedded in a Word document or in the main document. Any information within the images that may indicate an individual or institution should be blacked out. The minimum resolution of each submitted figure should be 300 DPI. All submitted figures should be clear in resolution and large in size. Figures, tables and illustrations should be inserted to the appropriate positions where they are mentioned in the text. All drawings, graphics, photographs, etc. should be regarded as figures. Figures should be numbered consecutively (as Figure 1.).

References

While citing publications, the latest and the most current publications should be preferred. At least half (50%) of the references should be published within the last 10 years. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. Journal titles should be abbreviated in accordance with the journal abbreviations in Index Medicus/MEDLINE/PubMed. When there are 6 or fewer authors, all authors should be listed. If there are 7 or more authors, the first 6 authors should be written, the space should be “...” left behind and the last author should be written. In the main text of the manuscript, references should be cited by using numbers in parentheses [as 3]. Authors are responsible for the accuracy of references. The reference styles for different types of publications are presented in the following examples. Reference must be made according to APA 6th. Please refer to the details; <https://libguides.library.curtin.edu.au/referencing/apa> ; <https://www.apastyle.org/>

Reference form

Reference form

No author

[1] *Regional perspectives on aid for trade*. (2014). Paris, FR: Organisation for Economic Cooperation and Development.

Journal article with DOI

- [1] Sengün, Y. (2012). The wild plants consumed as a food in Afyonkarahisar. *Biological Diversity and Conservation*, 5(2), 95-105. <https://doi:10.1242/jeb.103937>
- [2] Yücel, E., & Ezer, T. (2018). The bryophyte flora of Eskisehir Province (Turkey). *Arctoa* 27, 164–171. <https://doi:10.15298/arctoa.27.16>
- [3] Author, A. (year). Title of article: *Title of Journal*, volume(issue), page range. Doi:xx xxxxxxxxxx.

Journal article with DOI

- [1] Eroğlu, G., Kaşık, G., & Öztürk, C. (2015). Three new myxomycete records from Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 8(1), 16-18.
- [2] Brown, L. F., Yeo, K., Berse, B., Yeo, T. K., Senger, D. R., Dvorak, H. F., & Van De Water, L. (1992). Expression of vascular permeability factor. *The Journal of Experimental Medicine*, 176(5), 1375-1379.

Journal article published in a supplement

- [1] Lock, M. (2015). Eclipse of the gene and the return of divination. *Current Anthropology*, 46(Suppl. 5), S47-S70. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/10.1086/432452>

Books

- [1] Fleer, M. (2015). *Science for children*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
 [2] Berkes, F. & Kışlalıoğlu, M. (1990). *Ekoloji ve çevre bilimleri*. İstanbul: Remzi Kitabevi.
 [3] Langlais, B., Reckhow, D. A., & Brink, D. R. (1991). *Ozone in water treatment*. London: UK: CRC Press.
 [4] Brown, M., Shields, J., Kaine, S., Dolle-Samuel, C., North-Samardzic, A., McLean, P., ... O'Leary, P. (2016). *Managing employee performance and reward: Concepts, practices, strategies (2nd ed.)*. Port Melbourne, VIC: Cambridge University Press.

eBook

- [1] Bull, M. (2015). *Punishment and sentencing: Risk, rehabilitation and restitution*. Retrieved from <http://CURTIN.ebib.com.au/patron/FullRecord.aspx?p=1985996>

Chapter in an edited print book

- [1] Petermann, E. (2015). Monster mash-ups: Features of the horror musical. In L. Piatti-Farnell & D. L. Brien (Eds.), *New directions in 21st century gothic: The gothic compass* (4th ed., pp. 71-83). New York, NY: Taylor and Francis.

Conference paper

- [1] Novak, D., & Verber, D. (2015, July 21). *Assessment of the influence caused by random events within real-time strategy game engine on a game bot gameplay*. Paper presented at the 8th Annual International Conference on Computer Games, Multimedia and Allied Technology, Singapore. https://doi.org/10.5176/2251-1679_CGAT15.27



Hakem Değerlendirme Formu / Reviewer Evaluation Form

Makale adı / **Article Title:**

Makale No / **Article No:**

Lütfen sizin için uygun olan seçeneği “**X**” koyarak işaretleyiniz / **Please indicate your answer with an “X”.**

1. Makale orijinal mi? / **Is the article original?**
 - Evet / **Yes**
 - Hayır / **No**
2. Problem uygun şekilde belirlenmiş mi? / **Is the problem properly stated?**
 - Evet / **Yes**
 - Hayır / **No**
3. Problem uygun şekilde ele alınmış mı veya çözülmüş mü? / **Is the problem adequately treated or solved?**
 - Evet / **Yes**
 - Değişiklikler veya ekler gerekli / **Changes or elaborations required**
 - Hayır / **No**
4. Belgeleme / **Documentation:**
 - Tablolar / **Tables:**
 - İyi / **Good**
 - Zor anlaşılır (Tablo no:) / **Unclear (Table no:)**
 - Gereksiz (Tablo no:) / **Unnecessary (Table no:)**
 - Doğru değil (Tablo no:) / **Incorrect (Table no:)**
 - Grafikler / **Graphs:**
 - İyi / **Good**
 - Zor anlaşılır (Şekil no:) / **Unclear (Figure no:)**
 - Gereksiz (Şekil no:) / **Unnecessary (Figure no:)**
 - Doğru değil (Şekil no:) / **Incorrect (Figure no:)**
 - Diğer çizimler / **Other illustrations:**
 - İyi / **Good**
 - Değişiklik gerekli (Şekil no:) / **Change needed (Figure no:)**
 - Gereksiz (Şekil no:) / **Unnecessary (Figure no:)**
 - Düşük kalitede (Şekil no:) / **Poor quality (Figure no:)**
 - İstatistikler / **Statistics:**
 - Uygun / **Suitable**
 - Uygun değil / **Unsuitable**
5. Sonuçların yorumu / **Interpretation of results:**
 - Doğru veya uygun / **Correct or appropriate**
 - Düzeltilmeli / **Should be amended**
 - Bulunamadı / **Not found**
6. Literatür alıntısı / **Literature cited:**
 - Uygun / **Appropriate**
 - Çok geniş / **Too broad**
 - Tam değil / **Incomplete**
7. Dil ve üslup / **Language and style:**
 - İyi yazılmış / **Well written**
 - Daha kısa ve öz olmalı / **Should be made more concise**
 - Tekrar yazılmalı veya düzenlenmeli / **Should be rewritten or edited**
8. Makale başlığı / **Article title:**
 - Uygun / **Appropriate**
 - Çok uzun / **Too long**
 - Çok genel / **Too general**

9. Özet / **Abstract**:
- Uygun / **Appropriate**
 - Çok uzun / **Too long**
 - Çok genel / **Too general**
 - Makalenin içeriğini yansıtmıyor / **Does not reflect the paper's content**
10. Anahtar kelimeler / **Key words**:
- Uygun / **Appropriate**
 - Uygun değil / **Inappropriate**
11. Makale hakkında genel fikir / **General opinion about the paper**:
- Yeni bulgular sağlıyor / **Provides new findings**
 - Yeni bulgular sağlıyor ama az etkili / **Provides new findings but is of marginal interest**
 - Önceki bulguların gerekli bilgisini sağlıyor / **Provides needed confirmation of previous findings**
 - Önceden bilinen çalışmaların tekrarı / **Repeats already known work**
12. Öneriler / **Recommendations**:
- Değiştirilmeden basılmalı / **Should be published without changes**
 - Değişikliklerden sonra basılmalı / **Should be published after changes**
 - Yeniden yazım veya düzeltme sonrasında bir karar için yeniden sunulmalı / **Should be resubmitted for a decision after rewriting or editing**
 - Basılmamalı / **Should not be published**
13. Detaylı işaretlemeler (Lütfen eğer gerekliyse sayfaları ekleyin) / **Detailed remarks (Please attach pages if necessary)**:

Belirtmek istediğiniz diğer ayrıntılar (varsa) / **Other details wanted to be indicated (if exist)**

Hakemin adı / **Name of reviewer**:

Adres / **Address**:

Tel / Fax no:

e-mail:

(Hakem adı gizli tutulur / Reviewer name is kept secret)

Telif Hakkı Devir Formu/ The Copyright Agreement FormBiyolojik Çeşitlilik ve Koruma/*Biological Diversity and Conservation*

ISSN 1308-5301 Print; ISSN 1308-8084 Online

Prof. Dr. Ersin YÜCEL, P.K. 86, İki Eylül PTT Merkez, 26000 Eskişehir / Türkiye

Derginin Adı / *Journal Title*: Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma/*Biological Diversity and Conservation*Makalenin Adı / *Manuscript title*:

.....

.....

Yazarların Adı / *Full Names of All Authers*:

.....

Yazışmaların Yapılacağı Yazarın Adı ve Adresi / *Name, Adres Of Corresponding Author*:

.....

TC Kimlik No. / *ID Number*: e-posta:**Yazar(lar) / The Author(s) warrant(s) that:**

Sunulan makalenin orijinal olduğunu; makalenin başka bir yerde basılmadığını veya basılmak için sunulmadığını; diğer şahıslara ait telif haklarını ihlal etmediğini taahüt eder. /

The manuscript submitted is his own orijinale work; the manuscript has not been published and is not being submitted or considered for publication elsewhere; the manuscript do not infringere upon any existing copyright.“Telif Hakkı Devir Formu” tüm yazarlarca imzalanmalıdır. / *This copyright form must be signed by all authors.*TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: İmza / *Signature*.....TC Kimlik No. / *ID Number*:.....Adı Soyadı / *Full name*:.....Tarih / *Date*: İmza / *Signature*.....**Address:**

Prof. Dr. Ersin YÜCEL

İki Eylül PTT Merkez, P.K. 86; 26000 Eskişehir / Turkey

Phone: +90364189988; E-mail: biodicon@gmail.com



www.biodicon.com

ISSN: 1308-8084 Online

Biological Diversity and Conservation

Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma

ISSN: 1308-5301 Print

ABONE FORMU / SUBSCRIPTION FORM

Adı / Name :
 Soyadı / Surname :
 Adres / Address :
 Semt – İlçe / City- State :
 Posta kodu / Postal Code :
 İl / Country :
 Telefon / Telephone :
 Faks / Fax :
 e-posta / e-mail :

* Yurtiçi Abone Ücreti, **Yıllık 3 Sayı 150TL / Annual Subscription Rate for Outside Turkey is 70 USD or 60 EUR for 3 issues.**

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

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

Vol. 1/1.....(), Vol. 1/2 ()
 Vol. 2/1(), Vol. 2/2 (), Vol. 2/3..... ()
 Vol 3/1.(), Vol. 3/2..... (), Vol .3/3.....()
 Vol 4/1.(), Vol. 4/2..... (), Vol .4/3.....()
 Vol 5/1.(), Vol. 5/2..... (), Vol .5/3..... ()
 Vol 6/1.(), Vol. 6/2..... (), Vol .6/3..... ()
 Vol 8/1.(), Vol. 8/2..... (), Vol .8/3..... ()
 Vol 9/1.(), Vol. 9/2..... (), Vol .9/3..... ()
 Vol 10/1.(), Vol. 10/2..... (), Vol .10/3..... ()
 Vol 11/1.(), Vol. 11/2..... (), Vol .11/3.....()

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

..... () 2019.....() 2020

Dergi aboneliğiniz ile ilgili ücreti

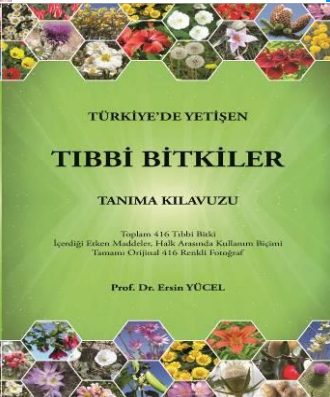
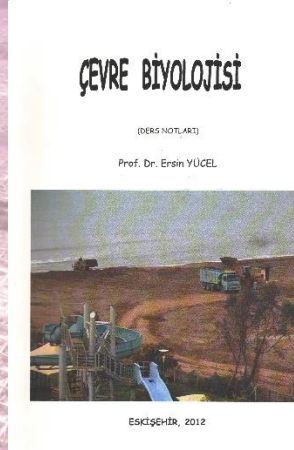
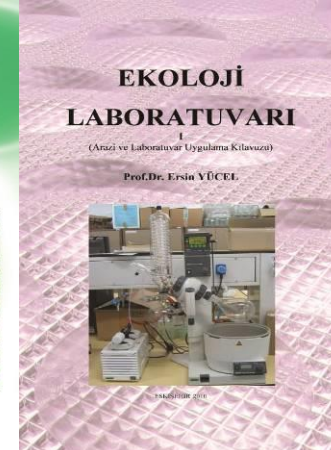
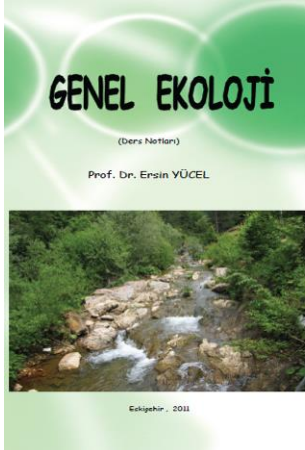
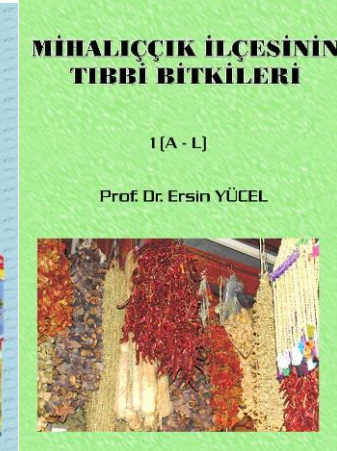
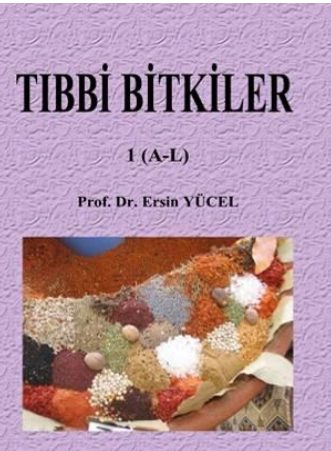
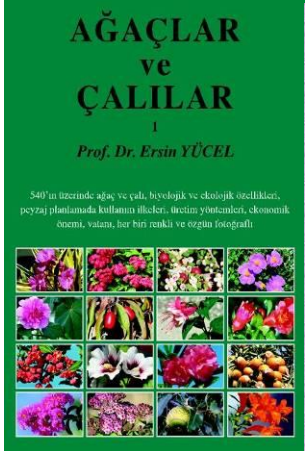
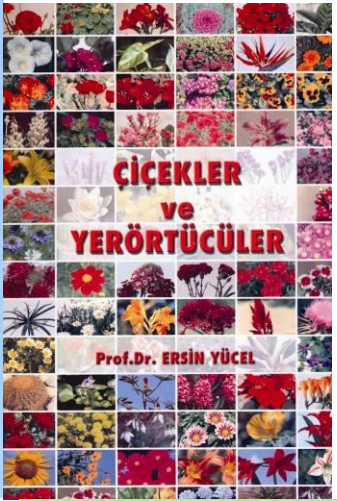
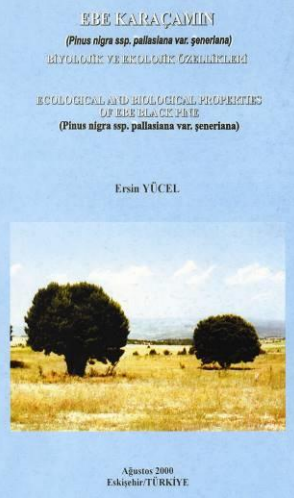
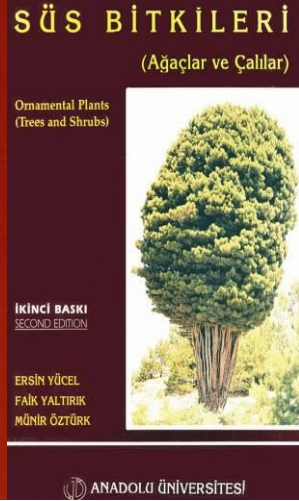
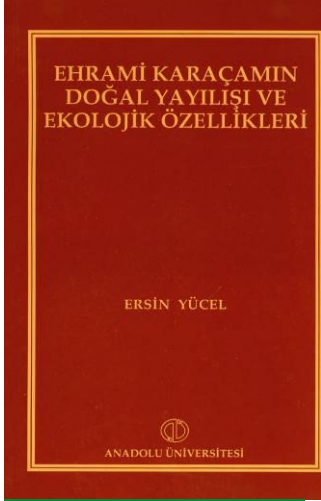
“Vakıfbank, Ersin YÜCEL, IBAN: TR17 0001 5001 5800 7308 0978 79” numaralı hesaba yatırdıktan sonra bu formu **“biodicon@gmail.com”** adresine ulaştırınız. Dergi adresinize posta ile adresinize gönderilecektir.

The payment of the article offering, please transfer total amount to the following bank account: **“Vakıfbank, Ersin YÜCEL, IBAN: TR17 0001 5001 5800 7308 0978 79”**. After that, this form is going to be sent the following address **“biodicon@gmail.com”**. The journal with cash on delivery will be sent your address.

Tarih / Date:/...../2020

İmza / Signature:

(Abone formunu Word belgesi olarak gönderiniz/Please send subscription form as a Word document)



İletişim Adresi: ebitki@gmail.com
<http://www.bitkilerim.com>