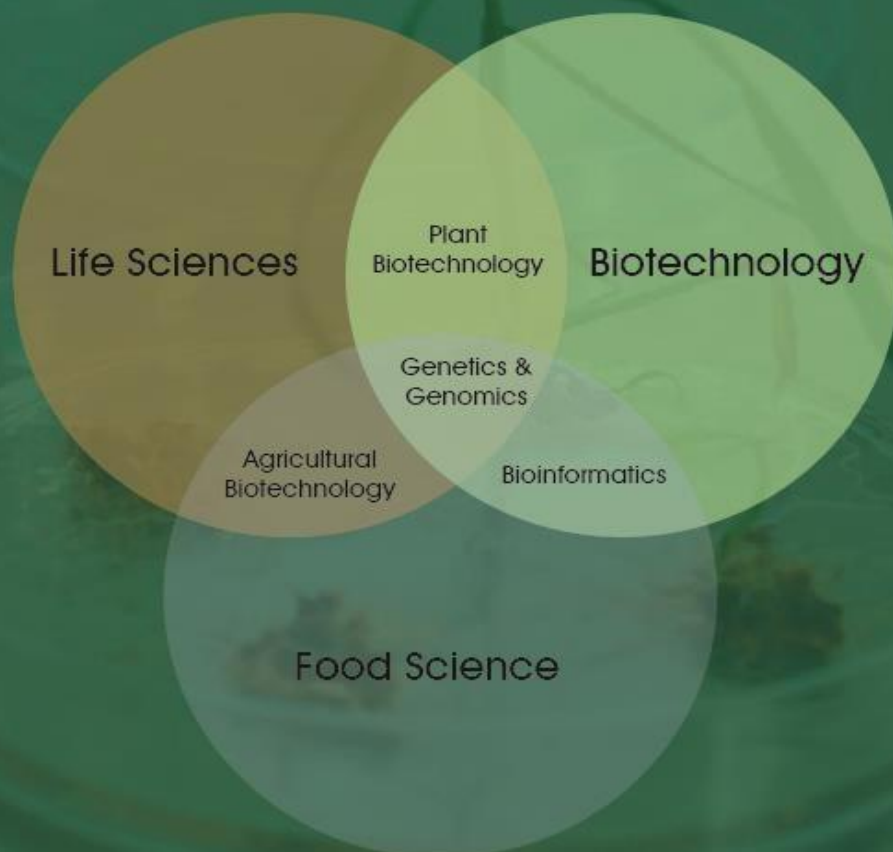


International Journal of Life Sciences and Biotechnology

e-ISSN:2651-4621



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

Ondokuz Mayıs University, Turkey

Section Editors / Bölüm Editörleri*

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

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

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

Prof. Dr. Hasan AKAN, PhD, Harran University

Prof. Dr. Nermin GOZUKİRMİZİ, PhD Istinye University

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

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

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

Editorial Board / Editör Kurulu

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

Prof. Dr. Kasim BAJROVIĆ, University of Sarajevo

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dr. Aliyu ADAMU, PhD, Kaduna State University

Dr. Abdulwali ABLAT, University of Malaya

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

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

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

Advisory Board / Danışma Kurulu

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

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

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

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

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

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

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

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

Language Editors/ Dil Editörleri

Assoc. Dr. Sevgi Maraklı, Amasya University, Turkey

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

Specialist Nurjamal Omurzakova, Kyrgyz - Turkish Manas University, Kyrgyzstan

Managing Editor / Yönetici Editör

Dr. Yunus Emre ARVAS, PhD, Yildiz Technical University

Yönetim Ofisi/ Management Office

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

Yasal Sorumluluk

Yazıların yasal ve hukuki sorumluluğu yazarlara aittir.

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

Legal Responsibility

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

Editörden;

Değerli okurlar ve yazarlar,

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

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

Bu düşüncelerle 2023 yılı birinci sayısını yayınladığımız “International Journal of Life Sciences and Biotechnology” dergisini, makaleleri ile onurlandıran akademisyenlere, Fikir / Görüş / Öneri / Katkı ve Eleştirileri ile değerlendirme süreçlerine katkılarından dolayı hakem ve yayın kurullarında yer alan kıymetli bilim insanlarına yürekten teşekkür ediyoruz. Bir sonraki sayıda görüşmek ümidiyle...

15.08. 2023
Editör
Dr. Öğrt. Üyesi Yılmaz KAYA

From The Editor;

Dear Readers and Authors,

As “International Journal of Life Sciences and Biotechnology”, we are pleased and honored to present the 16th issue of the journal. "International Journal of Life Sciences and Biotechnology" is an international double peer-reviewed open access academic journal published on the basis of research- development and code of practice.

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

With these thoughts, We are especially thankful to academicians honoring with the articles, valuable scientists involved in editorial boards and reviewers for their contributions to the evaluation processes with through their opinions/ideas/contributions/criticisms in the second issue of 2023 "International Journal of Life Sciences and Biotechnology". Hope to see you in the next issue...

15. 08. 2023

Editor in Chief

Assist. Prof. Dr. Yilmaz KAYA

Sayının Hakemleri / Reviewers of the Issue*

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

Prof. Dr. Ayşegül Koroglu, Ph. D.,
Prof. Dr. Cemalettin Saricoban, Ph. D.,
Prof. Dr. Haluk Caglar Kaymak, Ph. D.,
Prof. Dr. Hatice Bozoglu, Ph. D.,

Ankara University
Selcuk University
Ataturk University
Ondokuz Mayıs University

Assoc. Prof. Dr. Ş. Funda Arslanoğlu, Ph. D.,
Assoc. Prof. Dr. Sitki Ermis, Ph. D.,

Ondokuz Mayıs University
Eskisehir Osmangazi University

Assist. Prof. Dr. Firat Alaturk, Ph. D.,
Assist. Prof. Dr. Kübra Cinar Topçu, Ph. D.,
Assist. Prof. Dr. Muhammed Said Yolcu, Ph. D.,
Assist. Prof. Dr. Sedat Cam, Ph. D.,
Assist. Prof. Dr. Semra Cicek, Ph. D.,
Assist. Prof. Dr. Tugba Kilic, Ph. D.,
Assist. Prof. Dr. Firat Alaturk, Ph. D.,

Çanakkale Onsekiz Mart University
Bayburt University
Sakarya University of Applied Sciences
Harran University
Ataturk University
Kilis 7 Aralık University
Çanakkale Onsekiz Mart University

Dr. Berat Cinar Acar, Ph. D.,
Dr. Nurjamal Omurzakova, Ph. D.,
Dr. Onur Karaagac, Ph. D.,
Dr. Sureyya Kadioglu, Ph. D.,
Dr. Wafaa Hassan Muslem, Ph. D.,

Gazi University
Kyrgyz - Turkish Manas University
Samsun Seed Certification Test Directorate
Kyrgyzstan-Türkiye Manas University
Mustansiriyah University

İçindekiler/ Contents

Research Articles/ Araştırma Makaleleri

The Co-Isolation of Lactic Acid Bacteria (LAB) and A Related Pathogenic Strain from Pangasius Nasutus

Nur Hannah R. Haja Mohideen, Nurul Sakinah Alias, Nur Nazifah Mansor and Tengku Haziya Amin T. Abdul Hamid 143-154

Antibiotic susceptibility profiles of Escherichia coli strains and fecal contamination in Orontes River, Turkey

Cevher Karaca, Tahsin Hüner, Hatice Aysun Mercimek Takcı 155-165

Bazı Yerel Fasulye (Phaseolus vulgaris L.) Genotiplerinin Çimlenme Evresindeki Tuz Stresine Toleranslık Seviyelerinin Belirlenmesi

Enes Gökhan Yılmaz, Kezban Dinç, İskender Tiryaki 166-183

Phylogenetic Analysis of Some Wild Birds in Şanlıurfa (Türkiye)

Arif Parmaksız, Adil Uztemur, Cahit Çeçen 184-192

Lahanagil Sebze Türlerinin Kök Sistemi Mimarileri Yönünden Karşılaştırılması

Seda Atasoy, G. Tuğba Şahin, Ahmet Balkaya 193-207

Review Articles / Derleme Makaleler

Doronicum Cinsinin Taksonomisi, Geleneksel Kullanımı ve Terapötik Önemi: Derleme

Zeynep Busra Erarslan, Sukran Kultur 208-244

Ailevi Akdeniz Ateşi Hastalığı'nın Tedavisinde Kolşisin'in Yeri Ve Potansiyel Tıbbi Bitkiler

Tuba SERBETCI, Başak CEYLAN 245-261

The Co-Isolation of Lactic Acid Bacteria (LAB) and A Related Pathogenic Strain from *Pangasius Nasutus*

Nur Hannah Rashidah Haja Mohideen¹ , Nurul Sakinah Alias¹,  Nur Nazifah Mansor²  and Tengku Haziyaamin Tengku Abdul Hamid^{1*} 

ABSTRACT

Catfish species *Pangasius nasutus*, or locally known as *Patin Buah* is one of a popular aquaculture product in Malaysia. Probiotic strain is an attractive alternative to conventional antibiotics in managing aquaculture diseases. *Pangasius* can be a source of bacterial strain in developing suitable probiotic useful in *Pangasius* rearing. This study highlights on the isolation of Lactic Acid Bacteria (LAB) strains from the selected tissues from *P. nasutus* which are the heart, stomach, and intestines. These strains were subjected to morphological, biochemical, and genotypic characterisations. Three different strains were isolated from fish tissues, H-Hn from heart; S-Hn from stomach; and I-Sk from intestine. Biochemical characterisation were consistent with ribosomal rRNA sequencing, in which strain H-Hn (acc. No. MW504962) is highly similar (100%) to *Lactococcus lactis*, and both I-Sk (MW504964) and S-Hn (MW504963) are similar (99%) to *Lactococcus garvieae*. All strains appeared to be non-spore forming, non-motile, Gram-positive coccus, catalase and citrate negative, and fermenting sugar. Unlike H-Hn, both H-Sk and I-Sk strains were able to grow at 6.5% NaCl and at higher temperature (45°C). The antimicrobial properties were assessed using agar disk diffusion assay against several indicator organisms (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Vibrio parahaemolyticus*). These strains exhibited varying degree of inhibitory properties against the indicator organisms. Strain H-Hn inhibited *E. coli* and *V. parahaemolyticus*. Meanwhile, strains I-Sk and S-Hn showed a rather broad-spectrum inhibition. From *P. nasutus*, other *L. lactis* strain, a pathogenic species from *L. garvieae* could also be found especially in their gut tissues. The presence of *L. garvieae* in commercial *P. nasutus* should raise some concern to those who like to consume this fish. Meanwhile, the LAB strains isolated has probiotics potential that can be commercially used in the managing fish diseases in aquaculture.

ARTICLE HISTORY

Received
20 March 2023
Accepted
2 June 2023

KEYWORDS

Pangasius nasutus,
Lactococcus lactis,
Lactococcus garvieae,
aquaculture probiotic

Introduction

Pangasius nasutus is a ray-finned fishes belonging to shark catfish family *Pangasiidae* which can be found in freshwater habitat especially in South and Southeast Asia. In Malaysia, it is locally known as ‘Patin Buah’ and is popular when cooked with fermented durian called *tempoyak*, forming an important delicacy, especially in towns located along Pahang River. Increase in fish demand, traditional fish farming has moved

¹Department of Biotechnology, Kulliyah of Science, International Islamic University Malaysia, Jalan Istana, 25200 Kuantan, Malaysia

²Department of Marine Science, Kulliyah of Science, International Islamic University Malaysia, Jalan Istana, 25200 Kuantan, Malaysia

*Corresponding Author: Tengku Haziyaamin Tengku Abdul Hamid, e-mail: haziyaamin@iiu.edu.my

into commercially intensive farming. Like many other fishes, *P. nasutus* was also subjected to captive breeding. These results in overcrowding and poor water quality which make them vulnerable to diseases outbreaks. While the aquaculture industry has also suffered losses due to viral and microbial diseases [1], the diminishing quality of rivers or estuaries might bring this fish to inevitable extinction [2].

Antibiotic and chemical drugs have been a method of choice in aquaculture disease management. However, the frequent reliance on chemicals and antibiotics has resulted in the emergence of antibiotic-resistant pathogens making antibiotics no longer effective [3]. In addition, poor management of aquaculture waste has given rise to public health concern [4]. As a substitute, probiotic supplementations have been suggested as an effective and environmentally safe methods to combat diseases. Probiotic is a life microorganism that positively affects the host organisms, usually belongs to Lactic acid bacteria (LAB) [5]. Probiotics which inhabit the fish or animal gut, offers many advantages include enhancing the immune system, feed efficiency, providing nutrition and improving the digestive system of the host. Moreover, antimicrobial substances called bacteriocin commonly produced by probiotic microorganisms could inhibit bacterial infections in fishes by restricting the growth of pathogens [6].

Host associated probiotics are microorganism collected from healthy host which can be used as an effective probiotics for the same host organism [7]. In this study, LAB strains were screened from internal organs of *Pangasius nasutus*; heart, stomach and intestines. With the isolated LAB strains, their phenotypic and genotypic characterisation were carried out. Finally, the antimicrobial activities of the isolated LAB strains against several indicator organisms were conducted to determine their potential antagonisms against pathogenic strains. The LAB strain showing inhibition against selected human or fish pathogen is worth of further characterisation for future aquaculture use. Even though strains from Gram-positive non-spore forming of typical *Lactococcus lactis* was presence, and there was a co-presence of a related pathogenic strain *L. garvieae* from a commercial and healthy *P. nasutus*.

Materials and Methods

Sample preparation

A fish sample (*P. nasutus*) approximately ~1.1 m length and ~1.18 kg) was purchased from a local fish market near Peramu, near Pekan, Pahang, Malaysia (see **Fig 1**). The

fish was first dissected, and its internal organs (heart, stomach and intestines) were extracted, weighed and rinsed with sterile distilled water. The organs were homogenized in phosphate buffered saline (PBS). The mixtures were vortexed and left in shaker at 30°C overnight. The homogenized samples were serially diluted with 0.85% NaCl, and the fifth dilution (10^{-5}) was spread on de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar containing (in %w/v) 1.0% peptone, 1.0% beef extract, 0.4% yeast extract, 2.0% glucose, 0.5% sodium acetate trihydrate, 0.1% Tween 80, 0.2% dipotassium hydrogen phosphate, 0.2% triammonium citrate, 0.02% magnesium sulfate heptahydrate, 0.005% manganese sulfate tetrahydrate, and 1.0% agar (pH adjusted to 6.2 at 25 °C). The plates were left to incubate at 30°C for 48 h, the colonies formed were sub-cultured on MRS agar plates until single colonies; stock culture were prepared with 15 % (v/v) glycerol and stored at -80°C until further uses [8].



Fig 1 The fish *P. nasutus* sample used in this works

Phenotypic characterisation

For phenotypic characterisation, these isolates were subjected to Gram staining, catalase test, salt tolerance test, Simmon citrate test, temperature endurance test, and Triple Sugar Iron (TSI) test [9]. For the catalase test, a drop 30%(v/v) hydrogen peroxide was added to cell sample smeared onto a glass slide. The oxygen bubbles formation indicated a positive result. Simmons citrate test, Simmons citrate agar was used to test their capability to ferment citrate as their source of carbon [10]. TSI medium will test capability to ferment glucose, sucrose, and lactose and H₂S production. For salt tolerance test, Brain Heart Infusion (BHI) medium at 6.5% NaCl was used to select for

salt-tolerant microbes. Ability to grow at different temperatures was tested by inoculating the isolate into MRS broth and incubated at 10°C and 45°C for 72 h.

Antimicrobial activities

For antimicrobial activities, the disc diffusion method [11] was carried out with modification using the following indicator organisms: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and fish pathogen *Vibrio parahaemolyticus*. All these strains were derived from internal collection, kept at Kulliyah of Science, International Islamic University Malaysia. The indicator organisms were sub-cultured until single colonies on Mueller-Hinton (MH) agar (1.5 g starch, 17.5 g casein hydrolysate, 300 g dehydrated infusion from beef and 17.0 g agar per liter of water, pH 7.3), then cultivated on MH broth at 25°C for 24h. Then, an inoculum (at 0.5 McFarland standard; $\approx 1.5 \times 10^8$ CFU/ml) were streaked onto MH agar surface and incubated at 25°C for 12-24 h. Sterile paper discs pre-impregnated in liquid broth of the isolated LAB ($\approx 1.5 \times 10^8$ CFU/ml) were placed on the corresponding MH agar plates. The plates were incubated 37°C for 24 h before which the diameter inhibition zones formed surrounding the discs were measured from the edge of the paper disk. All tests were carried out in triplicates.

Genotypic characterisation

The genotypic identification for the isolates was carried out based on 16S rRNA sequencing [12]. The 1.5 gene fragment corresponds to 16S rRNA gene was amplified using universal primers, for Forward: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', and for Reverse: 5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3' [13]. PCR Amplification (reaction volume of 50 μ l) was carried out with DNA template (5 μ l), each primer (5 μ l, 10 pmol) and 5.0 μ l of a 10x PCR master-mix buffer at 50 mM each dNTP (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 3 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.3 and 0.1 U. μ l⁻¹ Taq polymerase. The amplification was set at 95 °C for 5 min, 30 cycles of 95 °C for 1 min, 55 °C for 40s, 72 °C for 1 min with a final extension at 72 °C for 5 min and holding at 4 °C for 1 h. After amplification, 5.0 μ l PCR products was subjected to agarose gel electrophoresis (1.0% agarose, 1x TAE buffer, 100 V) for 2 h and the 1 kb molecular size standard ladder (Fermentas, Lithuania) was used. The gel was prestained with ethidium bromide (1.0 μ g/ml) and analysed using gel imager (Alpha Imager). Each PCR

product was extracted, and the final sequencing was carried out using a local sequencing agency (Apical Scientific Laboratories Sdn. Bhd. Malaysia).

Sequence homology and analysis were performed using an on-line BLASTN tool program available at the National Centre for Biotechnology Information, NCBI, accessible at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. The sequences were also deposited to NCBI database of which each was then provided with a corresponding accession number: H-Hn for MW504962; S-Hn for MW504963; and I-Sk for MW504964. To construct a phylogenetic tree, an online tool *NGphylogeny.fr* was used which is available at <https://ngphylogeny.fr/> [14]. The 16S RNA sequences were aligned using Clustalw, and the phylogram was constructed using Maximum likelihood (approximate likelihood ratio test of SH-like), at bootstrapping of 100 and substitution rate of 4 (PhyML). The phylogram was viewed using interactive tree of life (iTOL v5).

Results and Discussion

Morphological and biochemical studies

The morphological and biochemical characterisation are shown in Table 1. They are all Gram positive, and all strains appeared coccus in shape (see Fig 2). All were recognized to be non-motile and catalase-negative for the lack of catalase activity. Simmons citrate agar test results suggested that all strains were citrate negative due to inability to use citrate as their carbon and energy source [15]. Moreover, all strains were also incapable of producing hydrogen sulphide (H₂S) that causes blackening. These strains belong to LAB as they are facultative anaerobes and do not require oxygen to grow. Lack of gas production indicated that these strains were homofermentative rather than heterofermentative [16]. Based on all these observations, these strains could belong to *Lactococcus sp.*

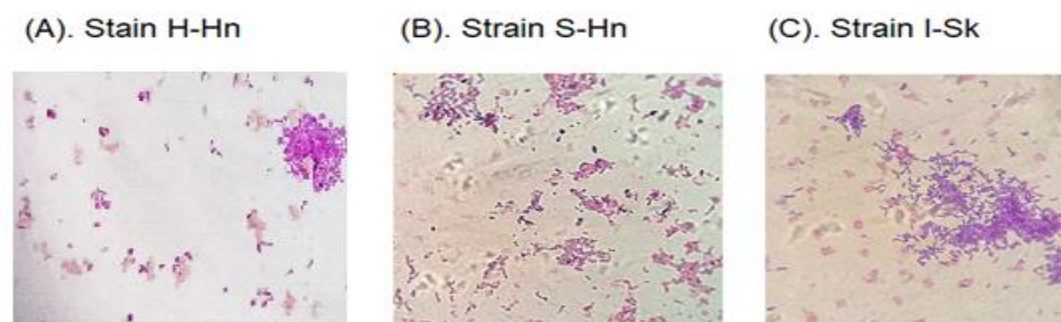


Fig 2 (Panel A-C) Morphology staining for the three LAB strains collected from *P. nasutus*; 100x, oil immersion (Nikon)

Temperature and salt tolerances

As for the salt tolerance and temperature endurance test, H-Hn strain could not tolerate 6.5% NaCl broth, confirming that it is salt intolerant and was not able to grow at either 10°C or 45°C. On the other hand, strain S-Hn and I-Sk were salt tolerant as they were able to thrive in 6.5% NaCl broth. For the temperature endurance test, strain S-Hn only grew at 45°C but not 10°C suggesting that it can tolerate higher, but not lower temperature. Meanwhile, strain I-Sk was able to tolerate both temperatures. Although, all strains could potentially belong to the *Lactococcus* genus, strain S-Hn and I-Sk are rather different from H-Hn. For instance, it was also reported that *L. lactis* strain isolated from Cuvier's beak whale could also grow at 7% salt and at 40°C. These observations were considered common for marine derived *L. lactis* [17], and recognized as the properties of so-called marine derived Lactic acid bacteria [18, 19]. Our subsequent 16S rRNA sequencing had confirmed they are not belonging to the same species.

Table 1 Phenotypic test results for three LAB strains

Test	H-Hn	S-Hn	I-Sk
Catalase test			
Gas bubbles	Negative	Negative	Negative
Simmon's Citrate test			
Medium Colour	Green	Green	No change
Triple Sugar Iron (TSI) test			
Slant colour/Reaction	Yellow/Acid	Yellow/Acid	Yellow/Acid
Butt colour/Reaction	Yellow/Acid	Yellow/Acid	Yellow/Acid
Gas bubbles	None	None	None
H ₂ S production	None	None	None
Motility	Non motile	Non motile	Non motile
Salt tolerance test			
6.5% NaCl	None	Yes	Yes
Temperature dependent test			
10°C	None	None	Yes
45°C	Negative	Positive	Positive

Antimicrobial properties

Based on result from disk diffusion as shown in Table 2, these strains demonstrated different level of inhibition zones against the indicator strains used (see also Fig. 3).

Strain H-Hn showed inhibition against *E. coli* and *V. parahaemolyticus*. On the other hand, strains S-Hn and I-Sk were able to show rather broad-spectrum inhibition against both Gram-positive and -negative strains. Strain S-Hn showed inhibition against almost all indicator strains, except for *P. aeruginosa*. Strain I-Sk showed quite similar profile except for *Salmonella typhimurium* and *P. aeruginosa*.

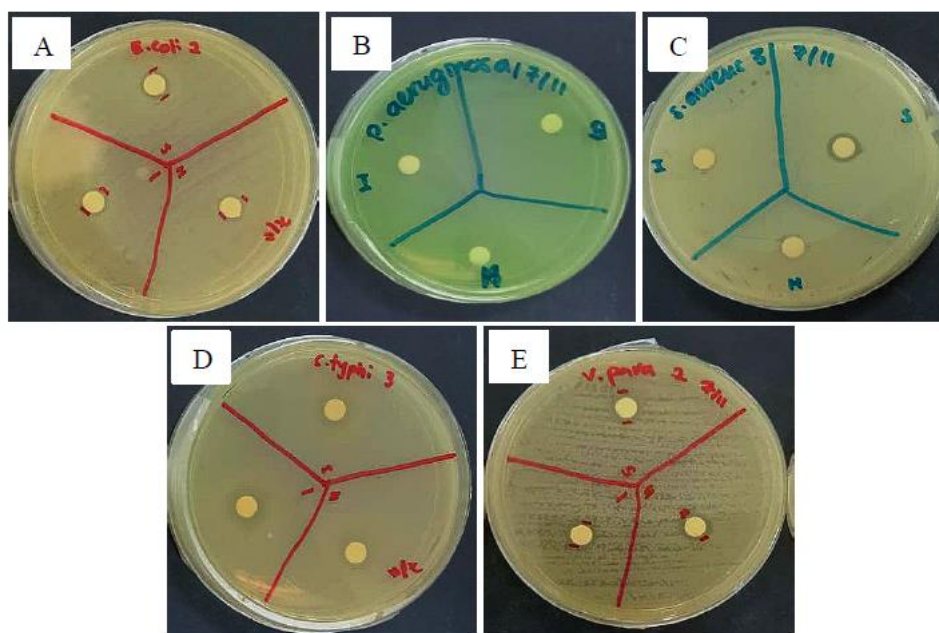


Fig 3 Antimicrobial activities based on disk diffusion method for three isolated LAB strains (H for Hn, S for S-Hn and I for I-Sk) on MH plates with different indicator organisms; (A) *Escherichia coli*, (B) *Pseudomonas aeruginosa*, (C) *Staphylococcus aureus*, (D) *Salmonella typhimurium*, and (E) *Vibrio parahaemolyticus*

The ability of S-Hn and I-Sk strains to inhibit both Gram-positive and negative bacteria indicated that it showed a broad-spectrum inhibition. Sensitivities of *P. aeruginosa* was however dependent on the type of assay being used [20]. Nevertheless, this observation is consistent with many observations that LAB inhibits Gram negative bacteria [21]. In one of our previous work, strain *L. lactis* strain isolated from black tip shark was able to produce a potent antimicrobial compound, bacteriocin [22]. With this antimicrobial action, for example, strain H-Hn has potential to be used in the *Pangasius* aquaculture. Furthermore, probiotic strains isolated from corresponding fish host are considered more efficient than those of from non-fish hosts, as the so-called ‘host-associated’ probiotics offers many benefits to the host organism [7, 23].

Presence of *Lactococcus garvieae* in *P. nasutus*

Within *Lactococcus* genus, there is a closely related pathogenic species belonging to *L. garvieae*. This is the first report on the presence of *L. garvieae* in *P. nasutus*. This species was reported to be found in other fishes and other aquatic species [24], and it was commonly associated with haemorrhagic sepsis outbreak in warm water fishes such as the rainbow trout [25]. Ability to grow at >4% salt and high temperatures (40°C) is consistent with other observations made elsewhere, however there were strains which cannot grow in these conditions [26]. The differences in temperature and salt tolerances between *Lactococcus* strains is not clearly distinguishable. Nevertheless, the close presence of *L. lactis* and its pathogenic counterpart *L. garvieae* in fish internal organs is an intriguing fact, but this is not that new. The occurrence of haemorrhagic sepsis due to Lactococcosis in fish should be a reason for concern. Therefore, its presence in fish food should be an alert as Lactococcosis is an emerging disease responsible for major economic losses in warm water aquaculture [27, 28].

Table 2 Disk diffusion test results for the 3 LAB strains against indicator organisms

Indicator organisms	Zone of inhibition (mm) \pm 0.1mm		
	H-Hn	S-Hn	I-Sk
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	10.7	9.5
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	12.0	-
<i>Escherichia coli</i>	7.3	9.2	8.0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7.5	11.0	9.3

Phylogenetic studies

Based on rRNA sequencing, the BLASTN hit search results as depicted in Table 3, strain H-Hn is similar to *L. lactis* (100%); meanwhile, strain S-Hn and I Sk are similar (>99%) to *L. garvieae*. This also supported that S-Hn and I-Sk are slightly different from H-Hn we observed during phenotypic tests. A phylogenetic tree, as shown in Fig 4, was also constructed to visualize how the relationship between all three strains radiate among other *Lactococcus sp.* strains. Strain H-Hn is clustered in *L. lactis* group, meanwhile S-Hn and I-Sk are clustered in a group that contains *L. garvieae*. The presence of *L. lactis* and *L. garvieae* in fish internal organ is intriguing, being the fact that these strains are of animal origin. This also could reveal the possible dietary source used by local farmers in rearing of *P. nasutus*. Due to costly fish meal, it is more

economical among local farmers to use chicken or broiler offal in fish feeding [29]. Thus, the consumption of commercially purchased *P. nasustus* can potentially lead to public health concern.

Table 3 Blast hit search for 16S RNA sequences of the three LAB strains

Strain	Top hits	Total score	Coverage (%)	E-value	Percentage identity	Accession number
H-Hn	<i>Lactococcus lactis</i>	2556	100	0.0	100.0	NR_040955.1
S-Hn	<i>Lactococcus garvieae</i>	2668	99	0.0	99.8	NR_113268.1
I-Sk	<i>Lactococcus garvieae</i>	2677	99	0.0	100.0	NR_113268.1

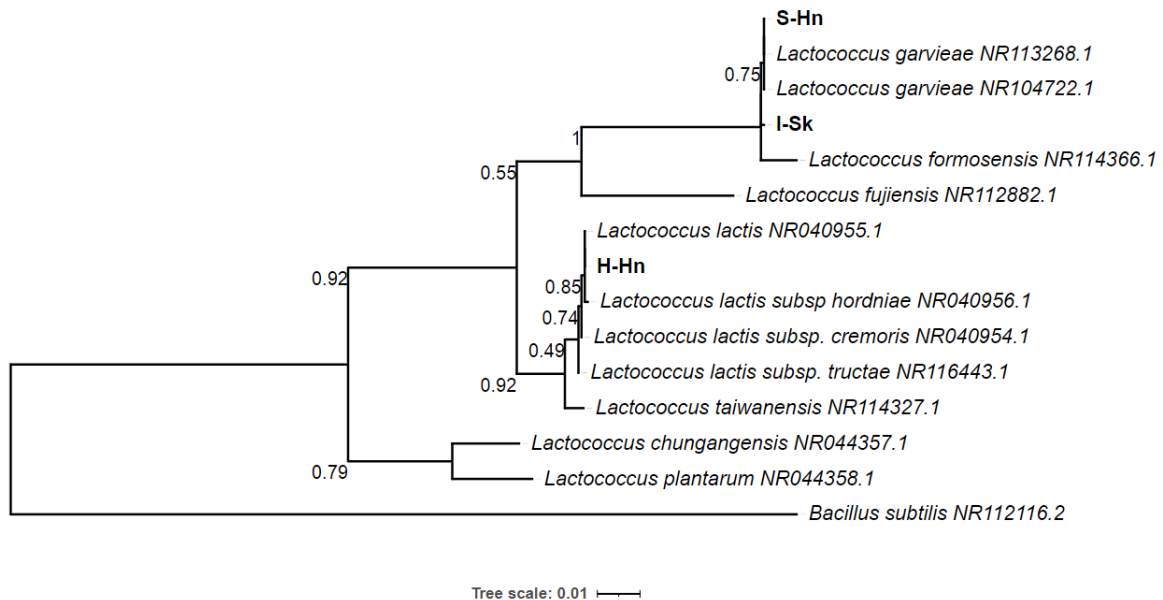


Fig 4 Phylogram for 16S rRNA genes sequences for the three LAB strains in relation to other *Lactococcus* sp. strains. This tree was constructed using Maximum likelihood at 100 bootstrapping and 4 substitution rates. The scale bar 0.01 is substitution number per nucleotide position, the number at each node is relative node height (base substitution per site). *Bacillus subtilis* represents as an Outgroup

Conclusions

Our work has isolated three LAB strains from different internal organs of *P. nasustus*. These strains are Gram positives coccus, catalase negative, non-motile and non-spore former. The phenotypic studies supported our genotypic studies, confirming the strain

H-Hn which was isolated from heart belongs to *L. lactis*. Meanwhile, both of strain S-Hn, isolated from stomach, and strain I-Sk, isolated from intestines, belong to *L. garvieae*. These strains showed different antagonisms against several indicator organisms. The presence of *L. lactis* and its pathogenic strain *L. garvieae* in the gastrointestinal organs of *P. nasutus* is an interesting phenomenon. The fish is likely to acquire these strains from dietary source, and thus, there is a safety implication in consuming this fish. Meanwhile, the isolation of *L. lactis* strain can potentially be used to develop host associated probiotic in *Pangasius* aquaculture.

Abbreviations

LAB: Lactic acid bacteria; CFU: Colony Forming Unit; *P. nasutus*: *Pangasius nasutus*; *L. Lactococcus*; MH: Mueller-Hinton; MRS: Man, Rogosa and Sharpe; rRNA: Ribosomal RNA; TSI; Triple Sugar Iron; BHI: Brain heart infusion; PCR: Polymerase Chain Reaction.

Acknowledgements

The author would like to thank International Islamic University Malaysia (under IIUM SDG Flagship 1.0 project) for enabling this work to be accomplished.

Funding

This work is partially funded by Sustainable Development Goal (SDG) flagship project which was conducted by International Islamic University Malaysia under theme 'Patin Buah as Sustainable Food Source' (August 2020-March 2021).

Data Availability statement

The author confirms that the data supporting this study are cited in the article.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethical standards

The study is proper with ethical standards.

Authors' contributions

In this work, the laboratory works were conducted by Nurul Sakinah and Nur Hannah. While Dr Abdul Hamid has supervised their works, Dr. Nur Nazifah as the co-supervisor assisted in sponsoring and overseeing the work on fish. The manuscript was edited and finalised by Dr Abdul Hamid.

References

1. Chiew, M.K.I., A.M. Salter, and Y.Z. Yin Sze Lim, The significance of major viral and bacterial diseases in Malaysian aquaculture industry. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 2019. 42(3): p. 1023-1047.
2. Alagesh, T., 'Ikan patin' at risk of becoming endangered. , in *New Straits Time*. 2017, NST Press (M) Sdn, Bhd.
3. Preena, P.G., et al., Antimicrobial resistance in aquaculture: a crisis for concern. *Biologia*, 2020. 75(9): p. 1497-1517.

4. Ee Lean, T., et al., Antibiotic residues from aquaculture farms and their ecological risks in Southeast Asia: a case study from Malaysia. *Ecosystem Health and Sustainability*, 2021. 7(1): p. 1926337.
5. Wang, C., et al., Beneficial bacteria for aquaculture: nutrition, bacteriostasis and immunoregulation. *J Appl Microbiol*, 2020. 128(1): p. 28-40.
6. Anjana and S. Tiwari, Bacteriocin-Producing Probiotic Lactic Acid Bacteria in Controlling Dysbiosis of the Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022. 12.
7. Hien Van, D., et al., Host-Associated Probiotics: A Key Factor in Sustainable Aquaculture. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*, 2019. 28(1): p. 16-42.
8. Pereira, W.A., et al., Bacteriocinogenic probiotic bacteria isolated from an aquatic environment inhibit the growth of food and fish pathogens. *Scientific Reports*, 2022. 12(1): p. 5530.
9. Goa, T., et al., Isolation and Characterization of Lactic Acid Bacteria from Fermented Milk Produced in Jimma Town, Southwest Ethiopia, and Evaluation of their Antimicrobial Activity against Selected Pathogenic Bacteria. *Int J Food Sci*, 2022. 2022: p. 2076021.
10. Wambui, J., P. Lamuka, and P. Njage, Lactic acid bacteria isolates from fermented camel milk (suusac) are potential protective cultures of raw camel meat. *International Journal of Agriculture and Environmental Research*, 2017. 3: p. 2960-2975.
11. Sandra, T.-S., et al., In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 2012. 18(5): p. 530-538.
12. Diop, M.B., et al., Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 2007. 11(4): p. 275.
13. Hamid, T.T.A.H. and N.F.A.M. Fuzi, Lactic acid bacterium with antimicrobial properties from selected malay traditional fermented foods. *International Journal of Life Sciences and Biotechnology*, 2021. 4(1-2): p. 11-34.
14. Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S. , & Gascuel, O., NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for non-specialists. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W260-W265. *Nucleic Acids Research*, , 2019. 47(W1): p. W260-W265.
15. Pulipati, S., et al., Fermented veggies: antibacterial efficacy of isolated lactic acid bacteria. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2019. 8(9): p. 270-283.
16. Haro, G., I. Iksen, and N. Nasri, Identification, characterization and antibacterial potential of probiotic lactic acid bacteria isolated from Naniura (a traditional batak fermented food from Carp) against *Salmonella typhi*. *Rasayan Journal of Chemistry*, 2020. 13: p. 464-468.
17. Suzuki, A. and M. Suzuki, Antimicrobial Activity of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Isolated from a Stranded Cuvier's Beaked Whale (*Ziphius cavirostris*) against Gram-Positive and -Negative Bacteria. *Microorganisms*, 2021. 9(2): p. 243.
18. Itoi, S., et al., Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *Int J Food Microbiol*, 2008. 121(1): p. 116-21.
19. Itoi, S., et al., The clam *Meretrix lamarckii* (Bivalvia: Veneridae) is a rich repository of marine lactic acid bacterial strains. *Annals of Microbiology*, 2014. 64(3): p. 1267-1274.
20. Cadirci, B. and S. Citak, Antagonistic Effects of Some Lactobacilli On Some Gram-Negative Bacteria. *Gazi Univ J Sci*, 2010. 23.
21. Noraphat, H., et al., Inhibition of food-spoilage and foodborne pathogenic bacteria by a nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L. *LWT - Food Science and Technology*, 2017. 82: p. 170-175.
22. Hamid, T.A.T.H., I. Khairil, and A. Mohammed, *Lactococcus Lactis* Strains from Intestinal Organ of Black Tips Shark *Carcharhinus Limbatus* Producing Nisin-Like Bacteriocin Active against Shrimp and Fish Pathogens (*Vibrio Parahaemolyticus* and *Vibrio Alginolyticus*). *Journal of Microbiology, Biotechnology & Food Science*, 2020. 10(3).

23. Van Doan, H., et al., Host-associated probiotics boosted mucosal and serum immunity, disease resistance and growth performance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 2018. 491: p. 94-100.
24. Meyburgh, C.M., R.R. Bragg, and C.E. Boucher, *Lactococcus garvieae*: an emerging bacterial pathogen of fish. *Dis Aquat Organ*, 2017. 123(1): p. 67-79.
25. Malek Alexandre, et al., *Lactococcus garvieae*, an unusual pathogen in infective endocarditis: case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*, 2019. 19(1): p. 301.
26. Varsha, K.K. and K.M. Nampoothiri, *Lactococcus garvieae* subsp. *bovis* subsp. nov., lactic acid bacteria isolated from wild gaur (*Bos gaurus*) dung, and description of *Lactococcus garvieae* subsp. *garvieae* subsp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2016. 66(10): p. 3805-3809.
27. Vendrell, D., Balcázar, J. L., Ruiz-Zarzuela, I., de Blas, I., Gironés, O., & Múzquiz, J. L., *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*,. 2006. 29(4): p. 177–198.
28. Soltani, M., et al., Lactococcosis a re-Emerging disease in aquaculture: disease significant and phytotherapy. *Vet Sci*, 2021. 8(9).
29. Ismail, S., M.S. Kamarudin, and E. Ramezani-Fard, Performance of Commercial Poultry Offal Meal as Fishmeal Replacement in the Diet of Juvenile Malaysian Mahseer, *Tor tambroides*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2013. 8: p. 284-292.

Karaca C., T. Huner, and H. A. M. Takci, Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains and fecal contamination in Orontes River, Turkey, International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2023. 6(2): p. 155-165. DOI: 10.38001/ijlsb.1262045

Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains and fecal contamination in Orontes River, Turkey

Cevher Karaca¹ , Tahsin Hüner¹ , Hatice Aysun Mercimek Takcı^{2*} 

ABSTRACT

This study was to evaluate the level of contamination of surface waters by coliform bacteria and *Escherichia coli*, as well as to detect the fecal pollution and the antibiotic resistance patterns of *E. coli* strains from recovered Asi (Orontes) River in the southern region of Turkey. Total and fecal coliform results were revealed as >1100 MPN/100 mL and 1100 MPN/100 mL for two stations, respectively. A total of 10 *E. coli* isolates were screened for antibiotic susceptibility by the Kirby Bauer method. Resistance to cefotaxime, tobramycin, streptomycin, trimethoprim, cefepime, cefazolin, and ampicillin was determined in 20%, 20%, 40%, 20%, 20%, 20%, and 40%, respectively. These findings point out a widespread distribution of *E. coli* strains produced antibiotic resistance genes in the surface waters in the southern region of Turkey, suggesting an aquatic reservoir for resistance genes. Multiple antibiotic resistance (MAR) rates of %30 of *E. coli* isolates were greater than 0.200. This high index indicates exceeding the permissible water quality limits for human use and consumption and is the primary source of contamination in the discharges from domestic, agricultural, and urban.

ARTICLE HISTORY

Received

9 March 2023

Accepted

5 June 2023

KEYWORDS

Orontes River, *Escherichia coli*, antibiotic resistance, coliform pollution.

Introduction

Surface water bodies, one of the important sources of drinking water, cover nearly half of the worldwide need. They are more vulnerable to various contamination sites than groundwater protected by the overlying soil parts trapping and attenuating pollutants [1]. The increase in the number of waterborne disease outbreaks like intestinal infections, dysentery, diarrhea, typhoid fever, cholera, and jaundice by contamination of surface freshwater sources constitutes a persistent problem for public health and the environment in developing countries [2, 3]. Thus, biological, chemical, and physical quality parameters of water sources become a major burden for public and regulatory authorities [1, 4]. Biologic diversity in aquatic environments contributes to the sustainability of natural water ecosystems by removing pathogenic contamination, balancing conditions, and playing key roles in nutrient cycling [5]. However, due to

¹Kilis 7 Aralık University, Institute of Science and Technology, 79000, Kilis, Turkey

²Kilis 7 Aralık University, Faculty of Sciences, Molecular Biology and Genetics Department, 79000, Kilis, Turkey

*Corresponding Author: Hatice Aysun Mercimek Takcı e-mail: mersimek@hotmail.com

diseases associated with pathogens carried by water bodies, the monitoring of the biological quality is the main strategy for controlling microbial pollution in terms of public health [6]. The World Health Organization (WHO) guidelines propose checking fecal contamination for assessing human health risks in surface water bodies [7]. The fecal contamination load in surface waters is changed based on anthropogenic/zoogenic origins, discharging of municipal/industrial/domestic wastewater, and agricultural/storm/urban/ water runoffs [1].

According to WHO criteria, fecal contamination representing a risk to the health, and environment is investigated by the presence of fecal indicator bacteria (FIB) such as *Escherichia coli* (*E. coli*), total coliforms, or thermotolerant coliforms [2, 8]. Among them, *E. coli* is the most common indicative parameter of fecal contamination in water bodies associated with human health [9]. Although the main source of fecal pollution is human and animal wastes, FIB, which may be reported in many environments, are not directly identify feces sources [8, 10]. Also, the indiscriminate use of antibiotics in agriculture applications and veterinary/human medicine provides the emergence of strains showing greater resistance to various antibiotics in water sources [9].

Beginning in Lebanon and flowing northwards through Syria before entering the Mediterranean Sea in Turkey, the Orontes (Asi) River is a length of 571 kilometers in Western Asia. Asi River, one of the most important rivers in southern Turkey, passes north of Hatay and falls 16 kilometers to the sea south of Samandag.

There has been an advance in the treatment of human and veterinary diseases, increasing feed efficiency, and maintaining good agricultural practices with the discovery of antibiotics. The global dissemination threat to the public health of antibiotic resistance among bacteria due to the developing strategies-based using antibiotics is becoming increasingly common via clinical specimens, foods of animal origin, and aquatic environments [11].

The emergence and dissemination of antibiotic-resistant bacteria (ARB) in water sources such as the Orontes River, which fell from other countries to Turkey, are not only a local and regional problem. Because river water can carry ARB into the Mediterranean basin by crossing borders. This can be caused the variation in the antibiotic resistance profile of bacteria in water and other environments in Turkey. For

this reason, the water quality of this kind of river should be continuously monitored for global water safety.

This study aimed to assess the rates of fecal contamination of surface water, and antibiotic resistance profiles among *E. coli* isolated from Orontes River in Hatay, Turkey, and to identify the possible sources of the pollution. It also researched antibiotic resistance profiles of *E. coli* strains isolated from this region when evaluating the risk of potential fecal pollution associated with the Orontes River. Our findings will contribute to a better understanding of how fecal contamination in natural water environments influences environmental and public health.

Material and Methods

Study site description

Asi (Orontes) River which originates from Labweh and Lebanon, locates in the south of Turkey. It pours finally into the Mediterranean Sea in Hatay province by flowing through for about 380 km within three countries (Lebanon, Syria, and Turkey). Due to the discharge of domestic, agricultural, and industrial wastewater in the province directly into the Orontes River without disinfection treatment, the river has been egregiously polluted. Also, it is the main source of fishing and agricultural irrigation. The contamination of enteric pathogens based on household and agricultural wastewater pouring into the river was previously reported [11]. Water samples were collected from two locations (St1; 36°11'23"N, 36°09'05"E) and St2; 36°11'48"N, 36°09'29"E) in which upstream of the Hatay city center and after the passing center. A map of study locations is shown in Fig 1. According to APHA (1998) and WHO (2006) [12, 13], they were collected using a sterile bacteriological sample vial (250 mL) in June (2021). The sample was immediately brought to the lab in an icebox within 2 hours of collection and stored at +4°C in a light-sensitive container until microbiological analyses.

Microbiological analysis

Enumeration of total mesophilic bacteria in surface water, 100 µL of the sample was spread on Plate Count Agar medium, and plates were incubated at 22°C for 72 h and 37°C for 48 h (TS EN ISO 6222-ISO Standards). After incubation, the colony count on agar was noted as colony-forming units per mL (CFU/mL).

The presence of total and fecal coliforms was tested using the most probable number method (MPN) illustrated by Prescott et al. (1996) [14]. The results were expressed as

the most probable number/mL comparing them with standard statistical tables. Typical growth of total coliforms (turbidity and bubbles in Durham tube) were monitored in Lauryl Sulfate Tryptose Broth (LST, Merck) at 37°C for 24-48 h. After that, 100 µL from each positive LST broth tube was transferred to an EC (*Escherichia coli*) medium and incubated at 44.5°C for 24-48 h for screening fecal coliform.

EndoC agar differentiated based on lactose fermentation was used for the isolation of *E. coli* strains from the water sample. Typical colonies with metallic green sheen were identified by applying morphological (Gram staining and cell morphology) and standard microbiological (indole, methyl red, Voges Proskauer, citrate, and MUG (4-Methylumbelliferyl β-D-Glucuronide) agar test systems) procedures.



Fig 1 Sampling stations (Google Earth)

Antibiotic susceptibility profile

The susceptibility of *E. coli* isolates was exhibited against the 12 standard antibiotics by disk diffusion method (Bauer et al. 1966) [15] on Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK) plate according to the guidelines and recommendations of Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI). The following 12 antibiotics that are important for the human healthcare system were Ampicillin (AMP; 10 µg), Tobramycin (TOB, 10 µg), Cefotetan (CTT; 30 µg), Cefepime (FEP; 30 µg), Cefotaxime (CTX; 30 µg), Chloramphenicol (C; 30 µg), Cefazolin (CZ; 30 µg), Streptomycin (S; 10 µg),

Ertapenem (ETP; 10 µg), Tetracycline (TE; 30 µg), Gentamycin (GEN; 30 µg), and Trimetopim (TR; 5 µg) (Bioanalyse). The results were interpreted by the CLSI standard. *E. coli* ATCC 25922 was used for quality control. The multiple antibiotic resistance (MAR) indexes of strains were evaluated based on the formula declared by Krumperman (1983) [16]. Resistance results were analyzed by using the software SPSS 22.0 for Windows (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results and Discussion

In the water samples, the concentrations of culturable mesophilic bacteria were enumerated on plate count agar. As summarized in Table 1, the average (n=3) bacteria counts in surface waters were 118×10^3 and 186×10^3 CFU/mL at 37°C. These values were numbered 375×10^1 and 142×10^1 at 22°C, respectively.

Table 1 Indicator organism measurements in Orontes River water sample

	St1	St2
Total bacteria	118×10^3 CFU/mL at 37°C 375×10^1 CFU/mL at 22°C	186×10^4 CFU/mL at 37°C 142×10^1 CFU/mL at 22°C
Total coliform	1100+MPN/100 mL	1100+MPN/100 mL
<i>E. coli</i>	1100 MPN/100 mL	1100 MPN/100 mL

Concentrations of total coliforms in surface waters were >1100 MPN/100 mL, thus this situation indicating bacteriological pollution. Both stations were calculated rather higher values of fecal coliforms, 1100 MPN/100 mL. WHO (2017) [17] and TS 266 (2005) [18] guidelines indicate that total and fecal coliform bacteria (0/100 mL) should not contain in surface water sources that are overused for drinking water and intended for human consumption. Enteric pathogens (*Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Vibrio cholera*, and *E. coli*) going into the surface water supply lead to infectious waterborne diseases such as diarrhea, cholera, typhoid fever, and dysentery. These indicator bacteria are usually present in animal and human feces, so our findings are clearly emphasized that fecal coliforms reach the Orontes River through improperly treated sewage and leakage. This might show that the main source of contamination in the Orontes River is domestic sewage and solid residues from surrounding densely populated areas. There are many reports on the existence of fecal coliforms in various aquatic environments in Turkey [19-21]. The highest total coliform and fecal coliform levels were reported to be 13×10^7 and 14×10^6 CFU/100 mL for Cırpıcı River; higher than that of our bacterial and fecal pollution results [1]. The detected pollution levels (1100+MPN/100 mL) of Asi River

are similar to the results of Avsar (2019) who declared that high coliform contamination in the Karasu River (Sinop, Turkey) was 2400 MPN/100 mL for September [22]. Our coliform results are as high as those determined by Karabas et al. (2017) who highlighted that indicated the uncontrolled discharges with 940×10^3 CFU/100 mL total coliform value at Alibeykoy Creek [23]. Total coliform levels in Karacaoren I Dam Lake were detected to range from 500 to 100.000 CFU/100 mL and the presence of fecal coliform was also noted [24]. Akkan et al. (2019) reported high fecal coliform pollution (71.66)% in surface water bodies collected from Yaglidere Stream [25]. Although our coliform contamination rates were lower than those shown by Yalim et al. (2020) and Akkan et al. (2022), our study clearly emphasized the discharge of household and industrial wastewater systems into the surface water without control.

The difference in results between previous studies based on fecal contamination and bacterial load may be explained by changes in water quality, originating from biogeochemical cyclings such as the storage and release of nutrients and physicochemical characteristics in aquatic ecosystems. The sanitary status of the different water bodies such as lakes, rivers, and dams showing different hydraulic characteristics may be changed by seasonal changes, proximity to mineral extraction sites and settlements, and agricultural and industrial activities.

E. coli strains recovered on EndoC plates from the stations were included for further antibiotic susceptible study. A total of 10 bacteria were isolated in equal numbers from the water samples taken from 2 different regions. 5 of them were evaluated as *E. coli*. St1 (3 strains) and St2 (2 strains), respectively. Strains showing Gram-negative bacilli morphological character were identified by biochemical tests (indole, methyl red, Voges Proskauer, citrate; (IMVIC) and MUG test systems). Endo C reactions and results of biochemical tests of *E. coli* strains are shown in Fig. 2.

In addition to bacteriological load, the antibiotic resistance profiles of *E. coli* in water bodies were screened. While the low frequency of resistance to cefotaxime, tobramycin, streptomycin, cefepime, and cefazolin (20%) was determined, *E. coli* strains showed relatively high levels of resistance to Trimetropim and Ampicillin (40%) (Table 2).



Fig 2 Mug test, IMVIC, and Endo C reactions for distinguishing *E. coli* strains; (a: Mug; b: indole; c: citrate; d: methyl red and Voges Proskauer; e: Endo C)

For non-beta-lactam antibiotics, there was a high sensitivity of isolates to tetracycline, gentamycin, and chloramphenicol (100%). None of the *E. coli* strains recovered from river water samples were ESBL producers according to the recommended CLSI standards. By contrast, the obvious spatial homogeneity was exhibited in resistance with 20% cefotaxime, tobramycin, cefepime, and ceftazolin. This study indicates that there is no widespread distribution of antibiotic-resistance genes among *E. coli* strains in the water samples of the Asi River.

Table 2 Percentage of total *E.coli* isolates with antibiotic resistance

	Pattern	Resistance (%)
Ampicillin	R	40.0±0.5*
Tobramycin	R	20±0.25*
Cefotetan	S	0±0.0*
Cefepime	R	20±0.40*
Cefotaxime	R	20±0.30*
Chloramphenicol	S	0±0.0*
Ceftazolin	R	20±0.25*
Streptomycin	R	20±0.15*
Ertapenem	S	0±0.0*
Tetracycline	S	0±0.0*
Gentamycin	S	0±0.0*
Trimethoprim	R	40.0±0.25*

* $P < 0.05$ compared with the results.

The profile of antibiotic resistance of *E. coli* strains in many freshwater sources of Turkey has been previously reported. Kurekci et al., (2017) showed resistance against extended-spectrum β -lactam antibiotics of *E. coli* strains isolated from the Asi River (Turkey) [11]. For *E. coli* strains recovered from ten rivers in the northern-east coastal region of Turkey, Ozgumus et al. (2009) found resistance to ampicillin, streptomycin, and trimethoprim similar to our susceptibility results [26]. Buyukkaya Kayıs (2022) noted that *E. coli* isolated from 5 different stations in Ataturk Dam in Adıyaman was resistant to chloramphenicol, tetracycline, cefepime, and cefazolin antibiotics contrary to our findings [27]. Mercimek Takcı et al. (2023) pointed to the high-frequency resistance against cefotaxime (62.5%) and streptomycin (50%) antibiotics for *E. coli* strains obtained from Alleben pond (Gaziantep) by contrast with our results [28]. Similarly, Altug et al. (2020) reported the dissemination of high antibiotic resistance in surface water samples, Gulluk Bay [29].

The MAR index ranged from 0.083-0.5 for *E.coli* strains from Asi River water bodies. %30 of *E. coli* isolates showed a MAR index greater than 0.200. A MAR index of 0.200 is represented the difference between low- and high-risk degrees. Those multidrug-resistant bacteria having MAR indices >0.200 indicates the exposure of sewage effluents to high-risk contamination for water bodies with the increased distribution of possibly fecal microorganisms harmful to humans.

Conclusion

This research study provides insights into the abundance of FIB and the antibiotic resistance profile of *E. coli* strains in the surface water sources throughout the Asi River. The high prevalence of fecal indicator bacteria in these surface water sources highlights the risk of fecal contamination from both human and animal origins in built-up and agricultural areas. To prevent surface water contamination, it is necessary to focus more on the projects and public policies that ensured the treatment of wastewater, assuring higher environmental preservation, and reduced risks to public health.

Abbreviations

APHA: American Public Health Association; CFU: Colony Forming Unit; WHO: World Health Organization; LST: Lauryl Sulfate Tryptose Broth; MUG: 4-Methylumbelliferyl β -D-Glucuronide; CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute; MPN: Most Probable Number; *E. coli*: *Escherichia coli*; ESBL: Extended Spectrum Beta-Lactamase; IMVIC: Indole; Methyl Red; Voges Proskauer; Citrate; MAR: Multiple antibiotic resistance.

Acknowledgements

The author would like to thank Kilis 7 Aralık University.

Funding

The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript.

Data Availability statement

The author confirms that the data supporting this study are cited in the article.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethical standards

The study is proper with ethical standards.

Authors' contributions

In this work, the laboratory works were conducted by Cevher Karaca and Tahsin Huner. Dr Hatice Aysun Mercimek Takci has supervised their works. The manuscript was edited and finalised by Hatice Aysun Mercimek Takci.

References

1. Paruch, L., et al., Faecal Pollution Affects Abundance and Diversity of Aquatic Microbial Community in Anthro-Zoogenically Influenced Lotic Ecosystems. *Scientific Reports*, 2019. 9(1): p. 1-13. DOI: [10.1038/s41598-019-56058-x](https://doi.org/10.1038/s41598-019-56058-x)
2. Khan, K., et al., Prevalent Fecal Contamination in Drinking Water Resources and Potential Health Risks in Swat, Pakistan. *Journal of Environmental Sciences*, 2018. 72: p. 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.12.008>.
3. Salamandane, A., et al., High Fecal Contamination and High Levels of Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Water Consumed in The City of Maputo, Mozambique. *Biology*, 2021. 10(6): p.558. DOI: [10.3390/biology10060558](https://doi.org/10.3390/biology10060558).
4. Salim Dantas, M et al., Impact of Fecal Contamination on Surface Water Quality in The São Francisco River Hydrographic Basin in Minas Gerais, Brazil. *Journal of Water and Health*, 2020. 18(1): p. 48-59. DOI: 10.2166/wh.2019.153.
5. Zeglin, L.H., Stream Microbial Diversity in Response to Environmental Changes: Review and Synthesis of Existing Research. *Frontiers in Microbiology*, 2015. 6: 454. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00454> (2015).
6. Malla, B., et al., Identification of Human and Animal Fecal Contamination in Drinking Water Sources in the Kathmandu Valley, Nepal, Using Host-Associated Bacteroidales Quantitative PCR Assays. *Water*, 2018. 10(12): 1796. <https://doi.org/10.3390/w10121796>.
7. Genter, F., J. Willetts, and T. Foster, Faecal Contamination of Groundwater Self-Supply in Low- and Middle Income Countries: Systematic Review and Meta-Analysis. *Water Research*, 2021. 201: 117350. DOI: 10.1016/j.watres.2021.117350
8. Holcomb, D.A., et al., Human Fecal Contamination of Water, Soil, and Surfaces in Households Sharing Poor-Quality Sanitation Facilities in Maputo, Mozambique. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2020. 226: 113496. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113496>
9. Américo-Pinheiro, J.H.P., et al., Iqbal, Monitoring Microbial Contamination of Antibiotic Resistant *Escherichia coli* Isolated from the Surface Water of Urban Park in southeastern Brazil. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 2021. 15: 100438. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2021.100438>.

10. Okotto-Okotto, J., et al., A Longitudinal Study of Long-Term Change in Contamination Hazards and Shallow Well Quality in Two Neighbourhoods of Kisumu, Kenya. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015. 12: p. 4275–4291. DOI: 10.3390/ijerph120404275.
11. Kurekci, C., et al., Characterization of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* in Asi (Orontes) River in Turkey. *Journal of Water and Health*, 2017. 15(5): p. 788-798. DOI: 10.2166/wh.2017.257.
12. APHA, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, United Book Press, Inc., Baltimore, MD, USA, 1998.
13. World Health Organization, Guidelines for Drinking-Water Quality, Geneva, Switzerland, 2006. https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43428/9241546964_eng.pdf.
14. Prescott L.M., J.P. Harley, and A.K. Donald, Microbiology Laboratory Exercises. W.C. Brown Publishers, New York, 1996.
15. Bauer, A.W., et al., Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *American Journal of Clinical Pathology*, 1966. 45: p. 493-496. <https://asm.org/ASM/media/docs/105bauer.pdf>
16. Krumperman, P.H., Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to identify High-Risk Sources of Fecal Contamination of Foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 1983. 46(1): p. 165-170. <https://doi.org/10.1128/aem.46.1.165-170.1983>
17. World Health Organization, Guidelines for drinking water quality. Geneva, Switzerland, 2017. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>
18. TS266 2005. Sular-insani tüketim amaçlı sular. ICS 13.060. 20. TSE, Ankara. <http://infogroup.com.tr/media/files/sular.pdf>
19. Buyukkaya Kayis, F., et al., An Investigation of Multiple Antibiotic Resistance and Identification of Bacteria Isolated from Gölbaşı and Azaplı Lakes (Adıyaman). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2017. 5(1): p. 43-47. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i1.43-47.819>
20. Hulyar, O., and G. Altug, The Bacteriological Risk Transported to Seas by Rivers; The Example of Çırpıcı River, Istanbul, TR. *International Journal of Environment and Geoinformatics*, 2020. 7(1): p. 45-53. <https://doi.org/10.30897/ijegeo.704260>.
21. Mercimek Takci, H.A., S. Toplar, and M.S. Ozdenefe, Antibiotic and Heavy Metal Resistance of *Escherichia coli* Strains Isolated From the Seve Dam and Konak Pond, Kilis, Turkey. *Acta Aquatica Turcica*, 2021. 17(2): p. 290-297. <https://doi.org/10.22392/actaquatr.801564>
22. Avsar, C., Measurement of Antibiotic Resistance of Microbial Species in the Karasu River (Turkey) Using Molecular Techniques. *Water and Environment Journal*, 2019. 33(2): p. 179-191. <https://doi.org/10.1111/wej.12388>
23. Karabas, N., et al., A Research on Coliform Bacteria in The Golden Horn Estuary (Sea of Marmara, Turkey). *Desalination and Water Treatment*, 2018. 115: p. 199–206.
24. Yalım, F.B., et al., Karacaören I Baraj Gölü (Burdur) Mikrobiyolojik Kirlilik Düzeyinin Mevsimsel Değişimi. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 2020. 6(2): p. 120-126. DOI:10.17216/LimnoFish.633769
25. Akkan, T., S. Mehel, and C. Mutlu, Determining The Level of Bacteriological Pollution Level in Yağlıdere Stream, Giresun. *Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research*, 2019. 5(2): p. 83-88. <https://doi.org/10.17216/limnofish.450722>
26. Ozgumus, O.B., et al., Class 1 and Class 2 Integrons and Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in Coliforms Isolated From Ten Rivers in Northern Turkey. *Journal of Microbiology* 2009. 47(1), p. 19-27. <https://doi.org/10.1007/s12275-008-0206-z>.
27. Buyukkaya Kayis, F., Atatürk Baraj Gölünden (Adıyaman) İzole Edilen *Escherichia coli* Bakterilerinde Antibiyotik Dirençlilik Profili. *Commagene Journal of Biology*, 2022. 6(1): p. 105-109. <https://doi.org/10.31594/commagene.1110770>

28. Mercimek Takci, H.A., et al., Microbial Water Quality of Pond Alleben (Gaziantep, Turkey) in Winter and Climatic Changes in The Region. *Journal of Water and Climate Change*, (in press, 2023), 2023.
29. Altug, G., et al., Antibiotic And Heavy Metal Resistant Bacteria Isolated from Aegean Sea Water and Sediment in Gulluk Bay, Turkey. *Johnson Matthey Technology Review*, 64(4): p. 507-525. DOI: 10.1595/205651320x15953337767424.

Yılmaz, E. G., K. Dinc, I. Tiryaki, Bazı Yerel Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotiplerinin Çimlenme Evresindeki Tuz Stresine Toleranslık Seviyelerinin Belirlenmesi. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2023. 6(2): p. 166-183. DOI: 10.38001/ijlsb.1302613

Bazı Yerel Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotiplerinin Çimlenme Evresindeki Tuz Stresine Toleranslık Seviyelerinin Belirlenmesi

Enes Gökhan Yılmaz¹ , Kezban Dinç¹ , İskender Tiryaki^{1*} 

ÖZET

Bu çalışma Türkiye'nin çeşitli yerlerinden toplanan 18 yerel fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotipinin çimlenme dönemindeki tuz stresine tolerans düzeylerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Tesadüf blokları desenine göre 4 tekerrürlü olarak yürütülen çalışmada her tekerrürde 25 adet tohum olacak şekilde içinde çift kat filtre kağıdı bulunan kapaklı plastik kaplarına tek sıra halinde yerleştirilmiş ve 15 mL 200 mM NaCl eklenerek 28 ± 0.5 °C'de karanlık ortamda çimlenme denemesine alınmıştır. Her genotipin kontrol tohumları, aynı koşullar altında saf su (dH₂O) eklenerek test edilmiştir. Çimlenen tohumlarda son çimlenme oranı, çimlenme hızı ve çimlenme homojenite parametreleri hesaplanmıştır. Tuz stresi Pv-6, Pv-8 ve Pv-14 kodlu genotiplere ait tohumların çimlenme oranlarında herhangi bir gerilemeye neden olmazken, Pv-2 kodlu yerel genotipe ait tohumların çimlenme oranında %36.84'lik gerilemeye neden olmuştur. Tuz stresi koşullarında çimlenme hızı $G_{50} = 1.41$ gün (Pv-1) ile $G_{50} = 3.94$ gün (Pv-12) arasında değişirken, kontrol koşullarda 0.84 gün (Pv-1) ile 2.60 gün (Pv-18) arasında değişmiştir. Çimlenme homojenite süreleri Pv-1 kodlu genotipte en yavaş ($G_{10-90} = 3.03$ gün) olurken, Pv-13 kodlu genotipte en homojen çimlenme ($G_{10-90} = 1.59$) gerçekleşmiştir. Tohumların zamana bağlı çimlenme dinamiklerine ait değişimler kontrollü şartlarda erken dönemlerde var olan genetik varyasyonun çimlenme süresinin uzamasına bağlı olarak azaldığını buna karşın stres şartlarında genetik varyasyonun artan bir şekilde çimlenmenin sonraki zaman dilimlerinde ortaya çıktığını göstermiştir. Tohumların iki boyutlu yüzey alan ölçümleri ile belirlenen tohum iriliklerinin tuz stresi ile olan ilişkisinin ortaya konması amacıyla yapılan analiz sonuçları, tohum büyüklükleri ile tuz stresi şartlarındaki çimlenme oranları arasında doğrusal bir ilişkinin olmadığını, ancak hem kontrol hem de tuz stresi şartlarındaki çimlenme hızı (G_{50}) ve çimlenme homojenite (G_{10-90}) değerleri arasında sırasıyla pozitif ve negatif bir ilişkinin var olduğunu göstermiştir. Çalışma sonuçları, yerel fasulye genotiplerinin incelenen çimlenme parametreleri açısından tuz stresine karşı önemli farklılıklar gösterdiğini ve tuza tolerant olduğu belirlenen genotiplerin bu amaçla yapılacak ıslah çalışmalarında başarıyla kullanılabilmesine işaret etmektedir.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

26 Mayıs 2023

Kabul

15 Temmuz 2023

ANAHTAR

KELİMELER

Tuz stresi,
çimlenme,
çimlenme dinamiği,
iki boyutlu tohum yüzey
alanı,
tohum iriliği

¹ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Çanakkale

*Sorumlu Yazar: İskender Tiryaki, e-mail: tiryaki46@yahoo.com

Determination of Salt Stress Tolerance Levels of Some Local Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes at Germination Stage

ABSTRACT

This study was carried out to determine the tolerance levels of 18 local bean genotypes collected from various locations of Turkey at the germination stage. The germination test was conducted with 25 seeds with 4 replications by using a completely randomized block design. Seeds were placed on double filter paper in a covered plastic box and were incubated at 28 ± 0.5 °C in darkness. Control seeds of each genotype were treated with dH₂O and were germinated under the same conditions as described before. The germination percentage, germination rate, and homogeneity of the seeds were calculated. The highest reduction rate in the final germination percentage was determined in the Pv-2 (36.84%) local genotype, while no deleterious effect of salt stress was observed in genotypes Pv-6, Pv-8, and Pv-14. Germination speed varied between $G_{50} = 1.41$ days (Pv-1) and $G_{50} = 3.94$ days (Pv-12) in salt stress conditions, while it was changed between 0.84 days (Pv-1) and 2.60 days (Pv-18) under control conditions. The highest germination delay was determined in Pv-1 ($G_{10-90} = 3.03$ days), while the Pv-13 variety ($G_{10-90} = 1.59$ days) had the best germination homogeneity. The germination dynamics of seeds in time showed that the genetic variation existed in the early periods of germination in terms of genotype based performances in germination percentages decreased over time under controlled conditions while such genetic variation increasingly appeared in the later periods of time under salt stress conditions. The analysis to reveal the relationship between the seed size based on the two-dimensional surface area and salt stress tolerance levels of the seeds showed that there was no any linear relationship between the seed size and germination percentage of the genotype under salt stress conditions. However, it showed that there was a positive and negative relationship between rate (G_{50}) and span (G_{10-90}) of germination under both control and salt stress conditions, respectively. The results of the study revealed that the local bean genotypes showed significant variation for salt stress tolerance levels based on germination parameters determined and those genotypes which were determined as salt tolerant could be successfully used in such breeding programs.

ARTICLE HISTORY

Received

26 May 2023

Accepted

15 July 2023

KEYWORDS

Salt stress, germination, germination dynamics, two-dimensional seed surface area, seed size

Giriş

Tuz stresi küresel anlamda, tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen en önemli abiyotik stres faktörlerinden biridir [1, 2]. Günümüzde dünya genelindeki tarım arazilerinin %20'sinde görülen tuzluluğun, 2050 yılına kadar %50'ye çıkacağı tahmin edilmektedir [3, 4]. Bitkiler, kompleks fizyolojik ve moleküler mekanizmaları ile toprakta bulunan tuzlara karşı çeşitli seviyelerde yanıt verirler [5]. Tuz stresi bitkilerin farklı gelişim evrelerinde farklı etkiler göstererek bitki büyüme ve gelişimi olumsuz yönde etkilemekte ve sonuçta verimde önemli kayıplara neden olmaktadır [3, 6]. Topraktaki yüksek tuzluluk aynı zamanda fizyolojik kuraklık yaratarak tohumların su alımını engelleyen, hücre içi iyon dengesizliğine neden olarak devamında iyon toksisitesinin oluşmasına ve böylece çimlenmenin engellenmesine neden olmaktadır [5, 7, 8]. Bitkilerde tuza karşı toleranslık bitkinin gelişim dönemine, tuz stresinin şiddet ve süresine bağlı olarak büyük değişkenlik

gösterebilmektedir [9]. Ancak, genel olarak değerlendirildiğinde bitkilerin biyotik ve tuz stresinin dahil olduğu abiyotik stres faktörlerine karşı en hassas olduğu gelişim dönemi çimlenme ve erken fide evresi olduğu kabul edilmektedir [10]. Tohum çimlenmesi bitki büyüme ve gelişiminin ön koşulu olması nedeniyle [11] eldeki mevcut bitki materyallerinin tuz stresine olan toleranslık seviyelerinin belirlenmesi ve bunların ıslah programlarına dahil edilmesi büyük bir önem taşımaktadır [5].

Dünya ve ülkemizde ekim alanı ve üretim miktarı açısından önemli bir yeri olan *Fabaceae* familyası içerisinde yer alan fasulye bitkisi (*Phaseolus vulgaris* L.) protein, lif, karbonhidrat ve mineral maddeler yönünden zengin bir içeriğe sahip olup bitkisel proteinler yönünden önemli bir besin kaynağı olarak görülmektedir [12, 13]. Bu nedenle fasulye ve dahil olduğu yemeklik dane baklagiller artan dünya nüfusunun protein açığının hızlı ve ekonomik olarak giderilmesinde başvurulacak en önemli besin kaynaklarının başında gelmektedir [7]. Çoğu kültür bitkisinde olduğu gibi, baklagillerin tuz stresine karşı tepkisi büyük ölçüde değişkenlik göstermektedir [10]. Bununla birlikte fasulyenin dahil olduğu baklagiller diğer kültür bitkileri ile kıyaslandığında tuz stresine karşı daha hassas oldukları bilinmektedir [7, 13]. Ancak, her bitki türünde olduğu gibi *P. vulgaris* içerisinde de genetik varyasyonun bir sonucu olarak tuz ve diğer stres faktörlerini göreceli olarak daha iyi tolere edebilen hat ve genotiplerin var olduğu ve bu testlerin hedef genetik havuz kullanılarak ayrıca test edilmesi gerektiği bilinmektedir [14]. Bu çalışma ülkemizin çok farklı iklim ve toprak koşullarında yaygın olarak yetiştiriciliği yapılan yerel hat, köy popülasyonu, köy çeşidi ya da yerel genotip gibi farklı adlarla isimlendirilen ve büyük bir varyasyon gösteren yerel fasulye genotiplerinin çimlenme evresindeki tuz stresine toleranslık seviyelerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür.

Materyal ve Metot

Tohum materyali

Çalışmada kullanılan yerel fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) genotipleri ve temin edildikleri bölgeler Tablo 1’de sunulmuştur.

Yöntem

Yerel fasulye genotiplerinin tuz stresine karşı tolerans düzeylerini en iyi ortaya koyacak tuz konsantrasyonu (200 mM NaCl) yapılan ön denemeler ve ilgili literatür göz önüne alınarak belirlenmiştir [15]. Her yerel genotipe ait tohumlar çimlenme denemesine alınmadan önce kendi içinde tohum iriliği bakımından homojen hale getirilmiş ve

çimlenme denemesinde bu tohumlar kullanılmıştır. Her yerel genotipe ait 25'er adet tohum 4 tekerrürlü olacak şekilde içerisinde çift katlı kurutma kâğıdı üzerine, kapaklı plastik (10x11.5x5 cm) çimlendirme kaplarına alınmış ve devamında üzerlerine 15 ml 200 mM NaCl ilave edilerek $28 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de karanlık şartlarda çimlendirmeye bırakılmıştır. İklimlendirme kabini içerisindeki raflar arası ortaya çıkabilecek olası sıcaklık farklılıkları göz önüne alınarak çalışma tesadüf blokları deneme desenine göre tertip edilmiştir. Çalışmada 3-4 mm'lik radikula çıkışı çimlenmiş tohum olarak kabul edilmiş ve çimlenen tohumlar kaptan günlük olarak uzaklaştırılmıştır. Çimlenme denemesi çimlenme değerlerinin sabitlendiği güne kadar (5 gün) devam ettirilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan yerel fasulye genotiplerine ait kayıt kodu, yerel genotip adları ve tedarik yeri

Table 1. Registration codes of genotypes, names of genotypes and locations of seed supply

Kayıt kodu	Yerel Genotip Adı	Tedarik yeri
Pv-1	Karınca Fasulyesi	Konya/Akşehir
Pv-2	Oturak Fasulye	Konya/Akşehir
Pv-3	Boncuk Fasulye	Kütahya/Altıntaş (Yeşilyurt)
Pv-4	Hımıs Fasulyesi	Erzurum
Pv-5	Çalı Fasulyesi	Konya/Akşehir
Pv-6	Oturak Fasulye	Konya/Akşehir
Pv-7	Beyaz Şeker Fasulye	Konya/Akşehir
Pv-8	Oturak Fasulye	Bursa /Mustafakemalpaşa
Pv-9	Oturak Fasulye	Çanakkale
Pv-10	Ayşekadın Fasulye	Konya/Akşehir
Pv-11	İspir Fasulyesi	Erzurum
Pv-12	Çalı Fasulyesi	Van
Pv-13	Çil kız Fasulyesi	Konya/Akşehir
Pv-14	Barbunya Fasulye	Konya/Akşehir
Pv-15	Çapan Fasulye	Konya/Akşehir
Pv-16	Fıstık Fasulyesi	Konya/Akşehir
Pv-17	Sarıkız Fasulyesi	Konya/Akşehir
Pv-18	Siyah Şeker Fasulye	Konya/Akşehir

Çimlenen tohumlara ait son çimlenme yüzdesi (%), çimlenen tohumların %50'sinin çimlenmesi için geçen zaman (Çim_{50}) çimlenme hızı ve çimlenen tohumların %10 çimlenmeden %90 çimlenme oranına ulaşması için geçen zaman (G_{10-90}) ise çimlenme

homojenitesinin belirlenmesinde daha önce açıklandığı şekilde tespit edilmiştir [16]. Çalışmada kontrol olarak her genotipe ait tohumlar yukarıda açıklandığı şekilde 15 ml dH₂O varlığında çimlenme denemesine alınmış ve ilgili çimlenme parametreleri yukarıda belirtildiği şekilde tespit edilmiştir.

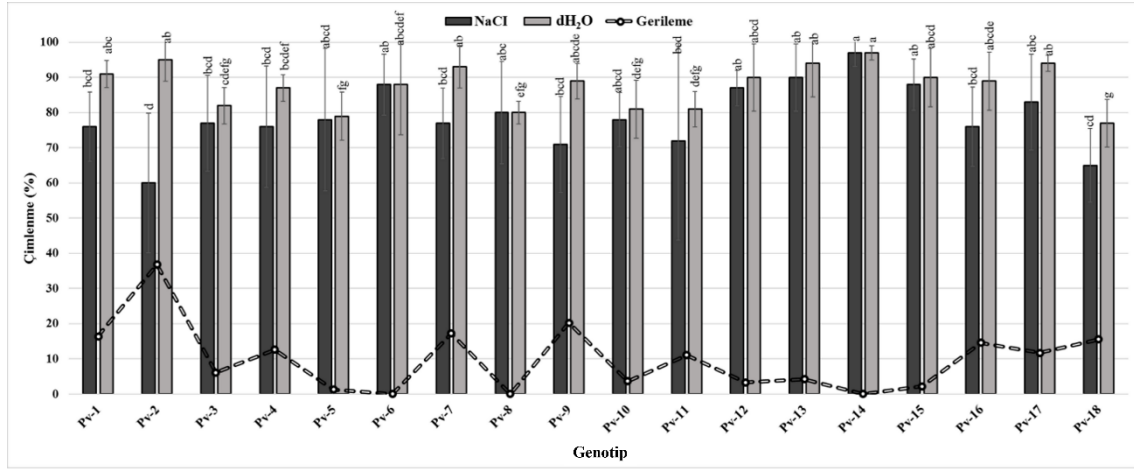
Veri Analizi

Son çimlenme yüzdesi verilerine açısal transformasyon ($\arcsin\sqrt{FGP}$) uygulanmış ve istatistiksel analizde kullanılmıştır [16]. Tuz stresinin tohumların son çimlenme oranlarında meydana getirdiği gerileme oranları daha önce açıklandığı şekilde hesaplanmıştır [11]. Her yerel genotipten rastgele seçilen 4 tohuma ait yüzey alanları ImageJ paket programı kullanılarak tespit edilmiş ve bu değerler yerel fasulye genotipleri arasında tohum iriliği bakımından gözlenen varyasyonun çimlenme parametreleri ile olan olası ilişkisini ortaya koymak amacıyla korelasyon analizlerinde kullanılmıştır.

Elde edilen tüm veriler SAS [17] paket programı ile analiz edilmiş ve ortalamalar arasındaki farklılıklar en küçük önemli fark (LSD) testi ile $p \leq 0.05$ seviyesinde test edilmiştir.

Bulgular

Tuz stresi, kontrol koşullarına kıyasla yerel fasulye genotiplerinin son çimlenme oranlarında önemli gerilemelere neden olmuştur (Şekil 1). Genotiplerin kontrol koşullarında son çimlenme oranları %77 ile %97 arasında değişirken, aynı genotiplerin tuz stresi koşulları altında son çimlenme oranları %60 ile %97 arasında değişiklik göstermiştir (Şekil 1). Pv-2 ve Pv-14 kodlu yerel genotipler, 200 mM NaCl tuz stresi altında sırasıyla en duyarlı (%60) ve tuz stresine en toleran (%97) genotipler olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Tuz stresine bağlı olarak son çimlenme oranlarındaki en yüksek gerileme %36.84 ile Pv-2 kodlu genotipte gerçekleşirken, Pv-6, Pv-8 ve Pv-14 kodlu genotiplerde tuz stresinin herhangi bir olumsuz etkisi tespit edilmemiştir (Şekil 1). Kontrole göre kıyaslandığında Pv-14 kodlu genotip hem kontrol hem de tuz stresi şartlarında da en yüksek çimlenme değerlerine (%97) sahip olmuştur (Şekil 1).

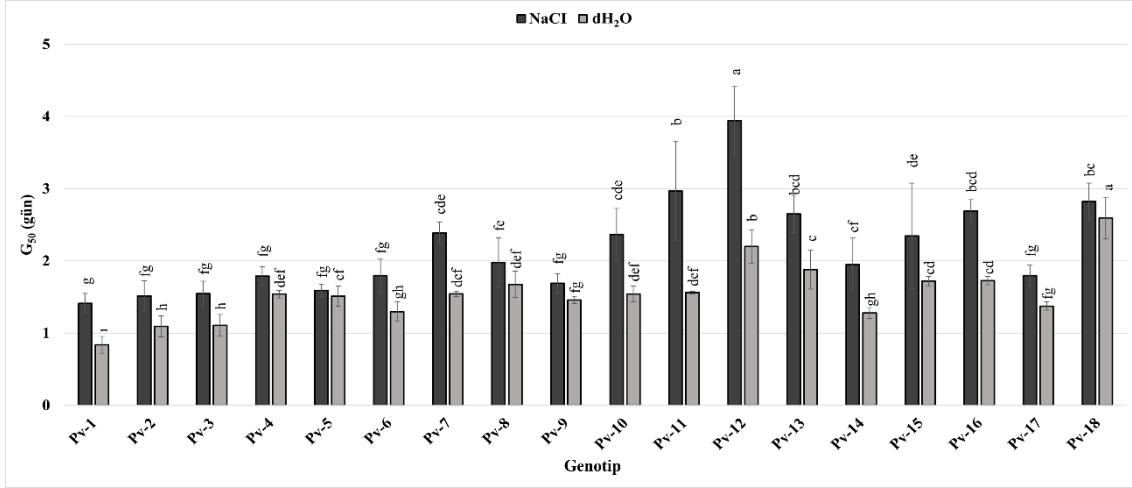


Şekil 1 200 mM NaCl tuz stresi ve kontrol koşullarında çimlendirilen yerel fasulye genotiplerinin son çimlenme oranları ile tuz stresine bağlı olarak çimlenme oranlarında meydana gelen gerileme değerleri (%). Bar üzerindeki çizgiler standart sapmayı göstermektedir (n=4). Aynı harfler $p \leq 0.05$ seviyesinde anlamlı değildir

Fig 1 Final germination percentage and reduction rates of local bean genotypes germinated under 200 mM NaCl salt stress and control conditions. The bar shows the standard deviation (n=4). The same letters are not significant at $p \leq 0.05$

Tuz stresi kontrol tohumları ile kıyaslandığında tohumların çimlenme hızlarında çok önemli gerilemelere neden olmuştur (Şekil 2). Çimlenme hız değerleri yerel genotipler arasında büyük bir varyasyon göstermiştir (Şekil 2). Tuz stresi varlığında en hızlı tohum çimlenmesi $G_{50} = 1.41$ gün ile Pv-1 kodlu genotipten elde edilirken Pv-12 kodlu genotipte bu değer 3.9 gün ile en yavaş olarak gerçekleşmiştir (Şekil 2). Buna karşın kontrol tohumlarında en hızlı ($G_{50} = 0.83$ gün) ve en yavaş ($G_{50} = 2.59$ gün) tohum çimlenme değerleri sırasıyla Pv-1 ve Pv-18 kodlu genotiplerden elde edilmiştir (Şekil 2).

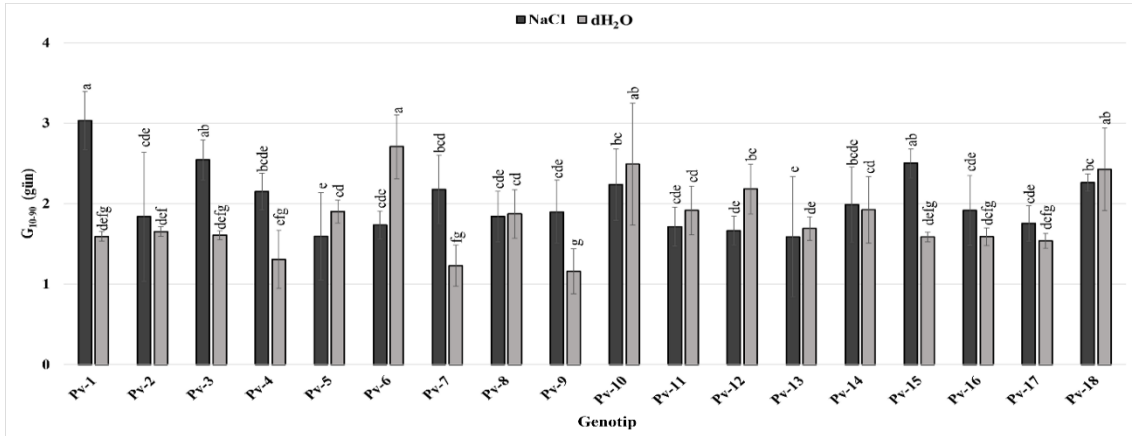
Tuz stresi tohumların çimlenme homojenitelerinde (G_{10-90}) genotipe bağlı olarak hem olumlu ve hem de olumsuz etkiler meydana getirmiştir (Şekil 3). Tuz stresi kontrol tohumları ile kıyaslandığında Pv-1 kodlu genotipe ait tohumların %10 çimlenmeden %90 çimlenme oranına ulaşması için geçen sürede 1.44 günlük bir gecikmeye neden olurken Pv-6 kodlu genotipe ait tohumlarda 0.97 günlük bir iyileşmeye neden olmuştur (Şekil 3).



Şekil 2 200 mM NaCl tuz stresi ve kontrol koşullarında çimlendirilen yerel fasulye genotiplerine ait çimlenme hızı (G_{50}) verileri. Bar üzerindeki çizgiler standart sapmayı göstermektedir ($n=4$). Aynı harfler $p \leq 0.05$ seviyesinde anlamlı değildir

Fig 2 Germination speed (G_{50}) of local bean genotypes germinated under 200 mM NaCl salt stress and control conditions. The bar shows the standard deviation ($n=4$). The same letters are not significant at $p \leq 0.05$

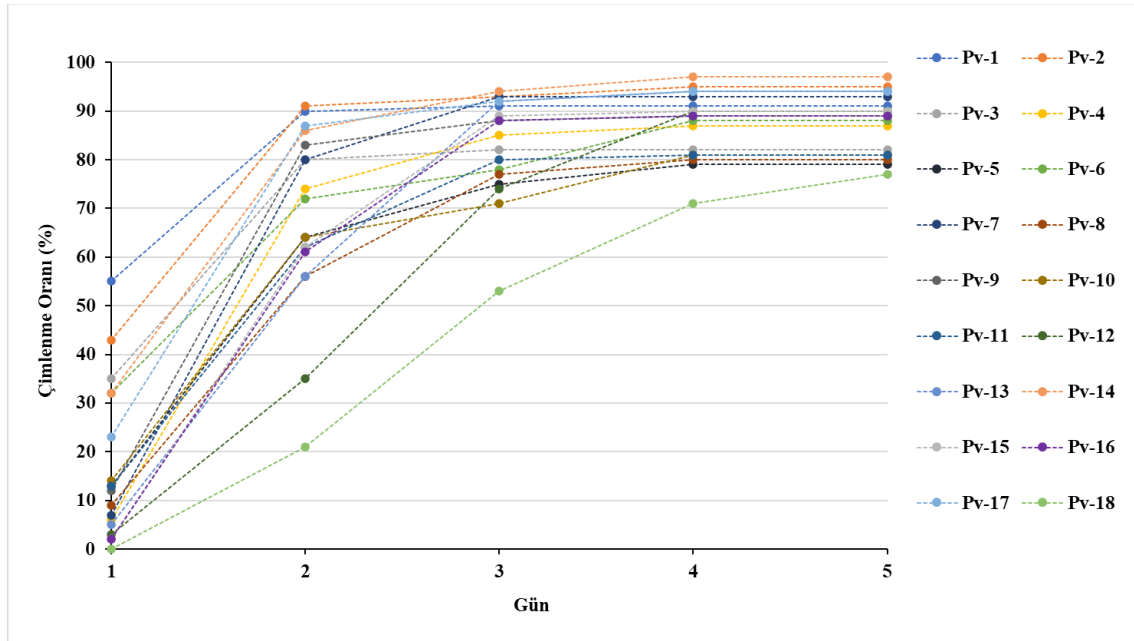
Tuz stresi varlığında en homojen tohum çimlenmesi $G_{10-90} = 1.58$ gün ve $G_{10-90} = 1.59$ gün ile sırasıyla Pv-13 ve Pv-5 kodlu genotiplerden elde edilmiştir (Şekil 3). Buna karşın kontrol tohumlarında en homojen tohum çimlenmesi $G_{10-90} = 1.16$ gün ve $G_{10-90} = 1.23$ gün ile sırasıyla Pv-9 ve Pv-7 kodlu genotiplerde tespit edilmiştir (Şekil 3). Pv-14 kodlu genotipe ait tohumlar tuz stresinden etkilenmeden kontrol şartlarına benzer bir çimlenme homojenitesi ($G_{10-90} = 1.9$ gün) göstermiştir (Şekil 3).



Şekil 3 200 mM NaCl tuz stresi ve kontrol koşullarında çimlendirilen yerel fasulye genotiplerine ait çimlenme homojenitesi (G_{10-90}) verileri. Bar üzerindeki çizgiler standart sapmayı göstermektedir ($n=4$). Aynı harfler $p \leq 0.05$ seviyesinde anlamlı değildir

Fig 3 Germination span (G_{10-90}) of local bean genotypes germinated under 200 mM NaCl salt stress and control conditions. The bar shows the standard deviation ($n=4$). The same letters are not significant at $p \leq 0.05$

Tohumların kontrol şartlarındaki zamana bağlı çimlenme dinamiklerine ait değişimler Şekil 4'te, aynı tohumların tuz stresi varlığında zamana bağlı çimlenme dinamiklerindeki değişimler ise Şekil 5'te verilmiştir. Sonuçlar kontrol şartlarında yerel genotiplerin çimlenme oranlarında çimlenmenin ilk iki gününde büyük bir varyasyon gösterdiklerini ancak bu varyasyonun sonraki günlerde azalarak sabitlendiğini göstermiştir (Şekil 4). Çimlenmenin ilk gününde en yüksek çimlenme oranları %55 ve %43 ile sırasıyla Pv-1 ve Pv-2 kodlu genotiplerden elde edilirken Pv-18 kodlu genotipte çimlenme meydana gelmemiştir (Şekil 4). Çimlenmenin ilk gününde %32 çimlenme oranına sahip Pv14 kodlu genotip çimlenmenin son gününde %97 ile en yüksek çimlenme oranına sahip olmuştur (Şekil 4). Buna karşın çimlenmenin birinci gününde en yüksek çimlenme oranlarına sahip Pv-1 ve Pv-2 kodlu genotiplerde son çimlenme oranları sırasıyla %91 ve %95 olarak gerçekleşmiştir. Diğer taraftan Pv-18 kodlu yerel genotip ilk gündeki çimlenme performansına paralel olarak tüm zamanlarda en düşük çimlenme performansı göstermiştir (Şekil 4).

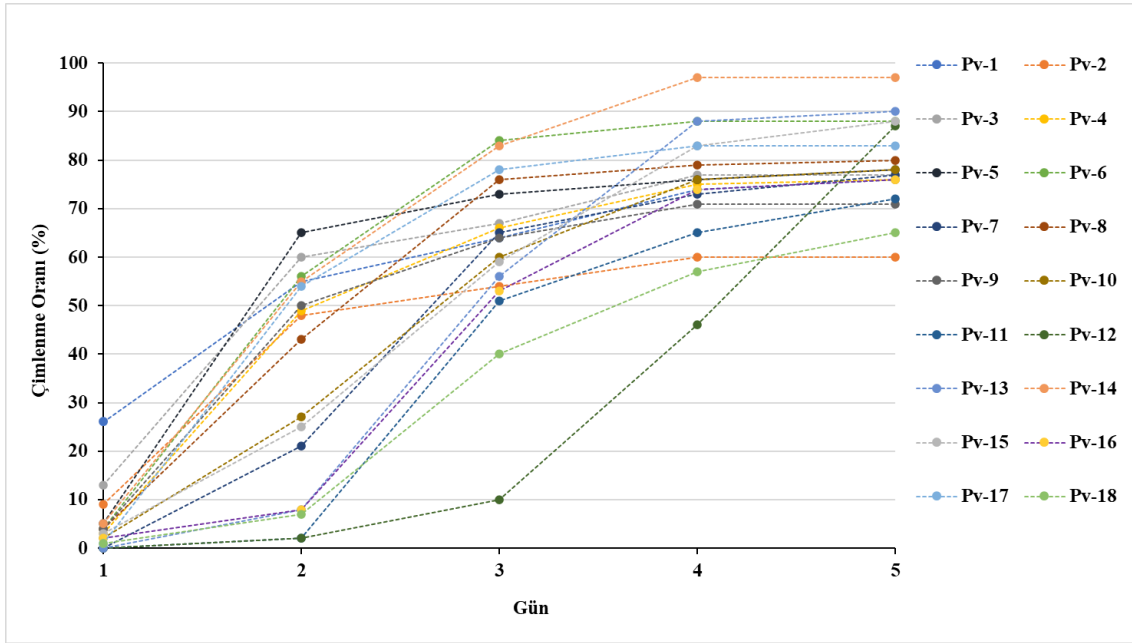


Şekil 4 Yerel fasulye genotiplerinin kontrol koşullarında günlük çimlenme oranları

Fig 4 Daily germination percentages of local bean genotypes under control conditions

Tuz stresi yerel genotiplere ait kontrol tohumlarının ilk gün(ler)de ortaya çıkan çimlenme oranlarındaki başlangıç varyasyonunun azalmasına neden olmuştur (Şekil 5). Tuz stresi şartlarında çimlenmenin ilk gününde en yüksek çimlenme oranları %26 ve %13 ile

sırasıyla Pv1 ve Pv3 kodlu genotiplerden elde edilirken Pv7, Pv11, Pv12 ve Pv13 kodlu genotiplerde hiç çimlenme meydana gelmemiştir (Şekil 5). Buna karşın ilk günde %5 oranında çimlenen Pv5 ve Pv14 kodlu genotipler, ikinci günde sırasıyla %65 ve %55 ile yüksek çimlenme oranlarına sahip olmuşlardır (Şekil 5). En yüksek son çimlenme oranı %97 ile Pv14 kodlu genotipten elde edilmiştir (Şekil 5). Buna karşın %90 ile ikinci en yüksek son çimlenme oranına sahip Pv13 kodlu genotip çimlenmenin ilk iki gününde sırasıyla %0 ve %8'lik çimlenme oranlarına sahip olmuştur (Şekil 5).

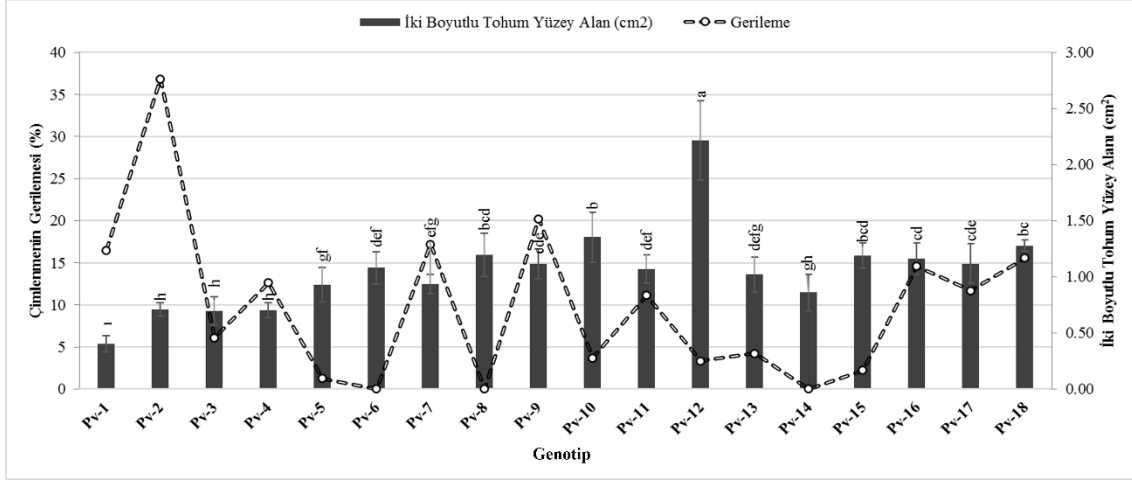


Şekil 5 Yerel fasulye genotiplerinin 200 mM tuz stresi koşullarında günlük çimlenme oranları

Fig 5 Daily germination percentages of local bean genotypes under 200 mM NaCl salt stress conditions

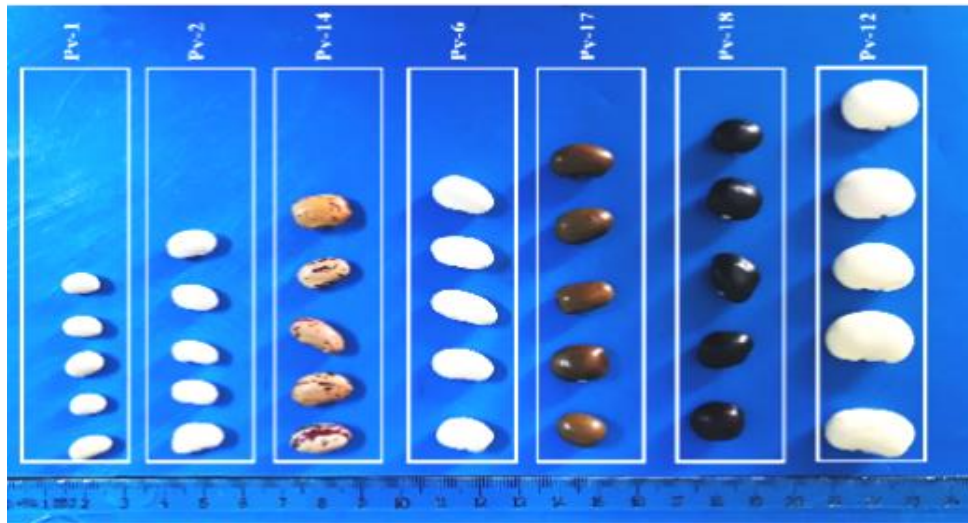
Yerel fasulye genotipleri arasında tohum iriliği bakımından gözlenen varyasyonun bir ölçü değeri olarak ele alınan iki boyutlu yüzey alan ölçümlerine ait veriler Şekil 6'da, tohumlara ait örnek görsel Şekil 7'de, tohumların iki boyutlu yüzey alan büyüklüğü ile kontrol ve tuz stresi şartlarındaki çimlenme parametreleri arasındaki ilişkiye ait korelasyon verileri sırasıyla Tablo 2 ve Tablo 3'te verilmiştir. İki boyutlu tohum yüzey alan ölçümlerine göre en iri tohum, 2.22 cm² ile Pv-12 kodlu genotip olurken en küçük tohum ise 0.40 cm² ile Pv-1 kodlu genotipin olduğu belirlenmiştir (Şekil 6). Tohum iriliği ile tohumların tuz stresine bağlı olarak çimlenme oranlarında meydana gelen gerileme oranları büyük bir varyasyon göstermiştir (Şekil 6). Pv-2 kodlu genotipte iki boyutlu tohum yüzey alanı 0.71 cm² ve tuz stresine bağlı çimlenme oranındaki gerileme %36.84

ile en yüksek olurken, Pv-6, Pv-8 ve Pv-14 kodlu genotiplerde iki boyutlu tohum yüzey alanları sırasıyla 1.08 cm², 1.20 cm² ve 0.86 cm² olurken tuz stresi bu genotiplerin çimlenme oranlarında herhangi bir gerilemeye neden olmamıştır (Şekil 6).



Şekil 6 Yerel fasulye genotiplerine ait tohumların iki boyutlu yüzey alan büyüklükleri ve tuz stresi şartlarında çimlenme oranlarında meydana gelen gerilemeler. Bar üzerindeki çizgiler standart sapmayı göstermektedir (n=4). Aynı harfler p ≤ 0.05 seviyesinde anlamlı değildir

Fig 6 Two-dimensional seed surface area of local bean genotypes and reduction rates on the germination percentages due to salt stress. The bar shows the standard deviation (n=4). The same letters are not significant at p ≤ 0.05



Şekil 7 Tohum iriliklerine ilişkin iki boyutlu tohum yüzey alan ölçümlerinde kullanılan bazı yerel fasulye genotiplerine ait örnek görsel

Fig 7 Example image of some local bean genotypes used to determine two-dimensional seed surface area measurements

Kontrol şartlarında çimlendirilen tohumların çimlenme parametreleri ile iki boyutlu tohum yüzey alan büyüklükleri arasında yapılan korelasyon analiz sonuçları çimlenme hız değerleri (G_{50}) ile iki boyutlu tohum yüzey alan büyüklükleri arasında çok önemli ($P < 0.001$) pozitif ($r = 0.65$) bir ilişkinin var olduğunu, buna karşın çimlenme homojenite değerleri (G_{10-90}) arasında ise çok önemli ($P < 0.0062$) negatif ($r = - 0.31$) bir ilişkinin var olduğunu göstermiştir (Tablo 2).

Tablo 2 Kontrol şartlarında tohum iriliğine ait yüzey alan büyüklüğü ile çimlenme parametreleri arasındaki korelasyon tablosu

Table 2 Correlation table between seed surface area and germination parameters under control conditions

	FGP	G_{50}	G_{10-90}	İki Boyutlu Tohum Yüzey Alanı (cm ²)
FGP	1,00000	-0,2726**	-0,2634**	0,10652
G_{50}		1,00000	0,28299**	0,65651**
G_{10-90}			1,00000	-0,31979**
İki Boyutlu Tohum Yüzey Alanı (cm ²)				1,00000

FGP: Son Çimlenme Yüzdesi, G_{50} : Çimlenen hızı, G_{10-90} : Çimlenme Homojenitesi. **: $P < 0.05$ seviyesinde farklı.

Tuz stresi şartlarında çimlendirilen tohumların çimlenme parametreleri ile iki boyutlu tohum yüzey alan büyüklükleri arasında yapılan korelasyon analiz sonuçları tohumların tuz stresi varlığındaki çimlenme hız değerleri (G_{50}) ile iki boyutlu tohum yüzey alan büyüklükleri arasında çok önemli ($P < 0.0001$) pozitif ($r = 0.70$) bir ilişkinin var olduğunu, buna karşın tohum yüzey alan büyüklüğü ile tohumların tuz stresi varlığındaki çimlenme homojenite değerleri (G_{10-90}) arasında ise çok önemli ($P < 0.0024$) negatif ($r = - 0.35$) bir ilişkinin var olduğunu göstermiştir (Tablo 3).

Tartışma

Baklagillerin tuz stresine karşı göstermiş oldukları tepkiler büyük değişkenlik göstermektedir [10]. Fasulyenin diğer kültür bitkileriyle kıyaslandığında tuz stresine karşı daha hassas olduğu bilinmektedir [7, 13]. Tohum çimlenmesi, bitki büyümesinin ve gelişiminin ilk başlangıç noktası olması nedeniyle, bitkilerin özellikle çimlenme ve erken fide evresinde tuz stresinden daha fazla etkilenebileceği bilinmektedir [11, 18]. Ancak fasulye gibi tuz stresine göreceli olarak daha hassas olarak kabul edilen bitki türleri de

dahil olmak üzere mevcut genetik materyalin barındırdığı genetik varyasyonlar dikkate alınarak eldeki materyalin her bir stres faktörüne karşı ayrıca test edilmesi gerektiği gözden kaçırılmaması gereken önemli bir gerçektir. Zira yapılan birçok çalışma her genetik materyalin amaca uygun olarak taranması ve ilgili stres faktörüne karşın olası genetik varyasyonun test edilmesinin bitki ıslahı uygulamalarında başvurulacak ilk yöntemsel yaklaşımlar olduğunu ortaya koymaktadır [19, 20].

Tablo 3 Tuz stresi şartları altında tohum iriliğine ait yüzey alan büyüklüğü ile çimlenme parametreleri arasındaki korelasyon tablosu

Table 3 Correlation table between seed surface area and germination parameters under salt stress conditions

	FGP	G ₅₀	G ₁₀₋₉₀	İki Boyutlu Tohum Yüzey Alanı (cm ²)
FGP	1,00000	-0,04948	-0,05904	0,16361
G ₅₀		1,00000	-0,16441	0,70387**
G ₁₀₋₉₀			1,00000	-0,35275**
İki Boyutlu Tohum Yüzey Alanı (cm ²)				1,00000

FGP: Son Çimlenme Yüzdesi, G₅₀: Çimlenen hızı, G₁₀₋₉₀: Çimlenme Homojenitesi. **: P <0.05 seviyesinde farklı.

Ülkemizde uzun yıllardan bu yana genelde yetiştirme sezonu sonunda hasat edilen tohumdan ayrılarak gelecek yılın tohumluklarının kullanılması şeklinde yapılan yerel fasulye yetiştiriciliği, kendi içerisinde genetik olarak durulmuş popülasyonları oluşturmuş ve devamında bu popülasyonlar zaman içerisinde yerel hat, köy popülasyonu, köy çeşidi, ata tohum ya da yerel çeşit gibi farklı isimler veya tamamen bölgeye özgün çeşit adlarıyla isimlendirilmişlerdir. Bu çalışma ülkemizin farklı bölgelerinden temin edilen 18 adet yerel fasulye genotipinin çimlenme evresindeki tuz stresine verdikleri tepkileri belirlemek ve bu anlamda olası genetik varyasyonu ortaya koymak amacıyla yürütülmüştür. On sekiz yerel fasulye genotipine ait tohumlar ön denemeler ve ilgili referans [15] dikkate alınarak belirlenen tuz stresi (200 mM NaCl) varlığında çimlenme denemesine alınmış ve sonuçlar tuz stresi olmadan çimlendirilen kontrol (dH₂O) tohumlarına ait çimlenme verileri ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonuçları kullanılan yerel fasulye genotipleri arasında tuz stresine toleranslık bakımından büyük bir varyasyonun var olduğunu göstermiştir (Şekil 1-3). Sonuçlar aynı zamanda tuz stresinin belirlenen çimlenme parametreleri üzerine olumlu ya da olumsuz etkilerinin yerel genotipe ve

kullanılan çimlenme parametresine bağlı olarak büyük oranda değiştiğini göstermiştir. Örneğin, tuz stresi Pv-2 genotipine ait tohumların son çimlenme oranlarında %36.8 gerilemeye neden olurken, Pv-6, Pv-8 ve Pv-14 genotiplerinde herhangi bir olumsuz etki göstermemiştir (Şekil 1). Diğer taraftan, tuz stresi Pv-12 genotipine ait tohumların çimlenme hızlarında önemli gerilemelere neden olmuş ancak aynı genotipin son çimlenme oranında göreceli büyük düşüşe neden olmamıştır (Şekil 1-2). Buna karşın tuz stresi Pv-12 genotipinin dahil olduğu bazı fasulye genotiplerinde (Pv-11, Pv-13 ve Pv-18) çimlenme homojenitelerinde ise iyileşmelere neden olmuştur (Şekil 5). Yapılan bir çalışmada en yüksek tuz konsantrasyonu olarak uygulanan 200 mM NaCl varlığında çimlendirilen fasulye genotiplerinde tohumların çimlenme oranlarında çok önemli gerilemeler meydana gelmiş [15] ve bu gerilemelerin %83'lere varabileceği rapor edilmiştir [21]. Farklı çalışmalarda aynı tuz konsantrasyonlarında ortaya çıkan farklılıklar bu çalışmanın yapılma amacını teyit eder şekilde tuza toleranslık seviyelerinin kullanılan genotipe bağlı olarak büyük oranda değişebileceğini, çalışma amacına yönelik olarak kullanılacak çeşit ya da genotiplerin her bir çalışmada ayrıca test edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Çalışma sonuçları aynı zamanda tuz stresinin tohumların çimlenme hız ve homojenite parametrelerinde önemli farklılıklar meydana getirebileceğini ve yapılacak taramalarda tohumların çimlenme oranları yanında bu parametrelerin de değerlendirmelere alınması gerektiğine işaret etmektedir. Zira, çimlenme oranlarında tuz stresine bağlı olarak ortaya çıkan gerileme oranları bakımından benzer olan çeşit adaylarının tespitinde çimlenme hızı ve homojenite verileri belirleyici bir faktör olarak ele alınabilecektir. Her ne kadar bu çalışmada Pv-6, Pv-8 ve Pv-14 genotipleri tuz stresinden etkilenmeden yüksek çimlenme oranları (sırasıyla %88, %80 ve %97) vermiş ve çimlenme hızı sırasıyla ($G_{50} = 1.79$ gün, $G_{50} = 1.97$ gün ve $G_{50} = 1.95$ gün) ve homojenite değerleri ($G_{10-90} = 1.73$ gün, $G_{10-90} = 1.84$ gün ve $G_{10-90} = 1.98$ gün) göreceli olarak iyi bir performans sergilemiş olsalar da bu durum diğer bazı genotipler için geçerli olmamıştır (Şekil 1-3). Nitekim tuz stresinde son çimlenme oranı %88 olan Pv-15 kodlu yerel genotipte çimlenme hızı ($G_{50} = 2.34$ gün) ve homojenite değerleri ($G_{10-90} = 2.50$ gün) kontrole göre önemli oranda gerilemiştir (Şekil 1-3). Diğer taraftan çalışmada kullanılan Pv-6, Pv-8 ve Pv14 kodlu genotiplerde uygulanan tuz konsantrasyonundan hiç etkilenmemiş, buna karşın tuz stresine bağlı olarak çimlenme oranında meydana gelen en yüksek gerileme oranı (%36.84) göreceli düşük kalmıştır [21]. Bu sonuçlar fasulyede

benzer amaçlı yapılacak çalışmalarda daha yüksek tuz konsantrasyonlarının denenmesi gerektiğini, ıslah ön materyallerinin oluşturulması amacıyla yapılacak taramalarda hassas ve tolerant genotiplerin belirlenmesinde bu durumun gerçek tolerant genotiplerin açığa çıkarılması için çok önemli olabileceğini göstermiştir. Ayrıca kontrollü şartlardaki tohum çimlenme dinamiğine ait analiz sonuçları çimlenmenin erken dönemlerinde var olan genetik varyasyonun çimlenme süresinin uzamasına bağlı olarak zaman içerisinde azaldığını ancak stres şartlarında bu genetik varyasyonun artan bir şekilde çimlenmenin sonraki zaman dilimlerinde ortaya çıktığını göstermiştir (Şekil 4-5). Nitekim kontrol tohumlarında çimlenmenin birinci gününde çimlenme oranları bakımında var olan genetik varyasyon zaman içinde azalmış ve neticede çimlenmenin 4. ve 5. günlerinde sabitlenmiştir (Şekil 5). Bunun nedeni kontrol tohumlarının su alım evresinde (Faz I) tohum kabuk kalınlığı, kabuk yüzey alan genişliği, kabuk sertliği yanında tohum kabuk yüzeyinde yer alan ve genotipe bağlı olarak doğrudan tohumun su ve oksijen alım hızını kontrol eden mikrofil ve strofil açıklık farklılıklarından kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir [22]. Buna karşın tuz stresi şartlarında çimlenmenin erken evrelerinde genotipler arasında daralmış bir genetik varyasyonun ortaya çıkmış olması, aynı zamanda ozmotik bir dengeleyici olan NaCl'ün çimlenmenin faz I evresinde tohum su alım hızının genotipten kısmen bağımsız olarak daha kontrollü bir şekilde gerçekleşmesine ve faz I evresini tüm genotiplerde uzatmasından kaynaklı olabileceğine işaret etmektedir [22-23]. Nitekim tuz stresi şartlarında gerçek genotip performanslarının çimlenmenin ikinci ya da üçüncü günlerinde ortaya çıkması buna işaret etmektedir (Şekil 5). Bu sonuçlar özellikle stres şartlarında tohum çimlenmesi için kullanılacak sürenin genotiplerin ilgili stres faktörüne karşı olan olası tepkilerinin ortaya konması ve çeşit ya da genotip ayrımlarının doğru bir şekilde yapılabilmesi açısından çok önemli olabileceğine işaret etmektedir.

Genellikle büyük tohumların küçük tohumlara göre daha uzun sürede çimlendikleri, ancak daha yüksek çimlenme oranına sahip oldukları rapor edilmiştir [24-27]. Çalışma sonuçları tohumların iki boyutlu yüzey alan ölçümleri ile belirlenen tohum irilikleri ile kontrol ya da tuz stresi şartlarında çimlenen tohumlara ait son çimlenme oranları (FGP) arasında doğrusal bir ilişkinin var olmadığını göstermiştir (Şekil 1, Tablo 2-3). Sonuçlar aynı zamanda tohum iriliği ile tuz stresine bağlı olarak çimlenme oranlarında meydana gelen gerileme oranları arasında da doğrusal bir ilişkinin var olmadığını göstermiştir

(Şekil 6, Tablo 3). Diğer taraftan tohum iriliklerinin gerek kontrol ve gerekse tuz stresi şartlarındaki çimlenen tohumlara ait çimlenme hızı (G_{50}) ve homojenite değerleri (G_{10-90}) arasında sırasıyla pozitif ve negatif bir ilişkinin var olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2-3, Şekil 2-3). Bu durum tohumların tuz stresi şartlarında çimlenme dinamik eğrilerinde de net olarak görülebilmektedir. Örneğin, en küçük tohum yüzey alanına sahip (0.40 cm^2) Pv-1 kodlu genotipe ait tohumlarda, çimlenen tohumların %50'sinin çimlenmesi için geçen süre $G_{50}=1.41$ gün olurken yüzey alanı en fazla olan (2.22 cm^2) Pv-12 kodlu yerel genotipte bu değer $G_{50}=3.94$ gün olarak gerçekleşmiştir (Şekil 5-6). Bu durum tohum kabuk oranı açısından daha fazla ve aynı zamanda ince kabuk yüzey alanına sahip olan küçük tohumların hızlı çimlenme performansı gösterdikleri literatür bildirimleri ile uyumlu bulunmuştur [25, 28].

Diğer taraftan yüzey alanı ile tohum çimlenme homojenite değerleri arasında istatistiksel açıdan ortaya çıkan önemli negatif ilişki ise genotiplerin tuz stresi şartlarındaki çimlenme performanslarının belirlenmesinde çimlenme homojenite değerlerinin (G_{10-90}) çimlenme hızı değerlerine (G_{50}) göre daha önemli ve belirleyici olabileceğine işaret etmektedir (Tablo 2, Şekil 2, 6). Nitekim tuz stresi şartlarında çimlenme dinamik eğrilerinde küçük tohumlu Pv-1 kodlu yerel genotipe ait homojenite değeri $G_{10-90}=3.03$ gün iken iri taneli Pv-12 kodlu genotipte bu değer $G_{10-90}=1.66$ gün olarak tespit edilmiştir (Tablo 2, Şekil 3, 6). Bu sonuçlar gerek kontrol şartlarında ve gerekse de tuz stresi şartlarında tohum iriliğine bağlı olarak çimlenme hızında meydana gelen gerilemeye karşın homojen çimlenme için geçen sürenin kısaldığını, iri fasulye tohumlarının daha homojen bir çimlenme performansı göstereceklerine işaret etmektedir (Şekil 3, Tablo 2-3). Sonuçlar aynı zamanda büyük fasulye tohumlarının kotiledonlar aracılığı ile daha fazla yedek besin maddesi bulundurmalarının stres şartlarından bağımsız olarak çimlenme hızından daha ziyade tohumların çimlenme gücü performansı açısından önemli olabileceğini göstermektedir [29]. Bu sonuçlar, iri fasulye tohumlarının sahip oldukları depo besin maddelerinin çimlenme sırasındaki kullanım ve taşınımının çimlenme oranlarının belirlenmesinde doğrudan etkili olmadığını ve çimlenme sırasındaki tuz stresi gibi olası stres şartlarının giderilmesinde de kullanılmadıklarına işaret etmektedir. Sonuçlar aynı zamanda genotiplerin tuz stresi şartlarına olan tepkilerinin genetik arka plana bağlı olarak ortaya çıkan hücre iyon denge şartlarında özel mekanizmalar tarafından kontrol edilebileceğini işaret etmektedir.

Sonuç

Bu araştırma 18 yerel fasulye genotipinin çimlenme evresindeki tuz stresine karşı toleranslık seviyelerinin belirlenmesi ve ilgili stres faktörüne karşı genetik varyasyonun ortaya konması amacıyla yürütülmüştür. Çalışma sonuçları 200 mM'ın üzerinde bir tuz stresinin benzer çalışmalarda kullanılabileceğini, kullanılan genotipler arasında tuz stresine toleranslık bakımından büyük bir genetik varyasyonun var olduğunu, Pv-14 kodlu yerel genotipin tuza toleranslık ıslahı çalışmalarında kullanılabileceğini göstermiştir. Çalışma sonuçları aynı zamanda benzer çalışmalarda genotiplerin ilgili stres faktörlerine karşı gerçek performanslarının belirlenmesinde çimlenme parametreleri yanında tohum irilikleri gibi fiziksel özelliklerin de ayrıca değerlendirmeye alınması gerektiğini ortaya koymuştur.

Abbreviations/Kısaltmalar

FGP: Son çimlenme oranı/ Final germination percentage, NaCl: Sodyum Klorür/ Sodium chloride, G₅₀: Çimlenme hızı/ Germination rate, G₁₀-G₉₀: Çimlenme homojenitesi/ Span of germination, mM : Milimolar/ Millimolar, LSD: En küçük önemli fark/ Least significant difference

Acknowledgments / Teşekkürler

Thank you to everyone who helped us on the collection of seeds.
Tohumların temini sırasında yardımlarını esirgemeyen herkese teşekkür ederiz.

Funding / Fon desteği

The author did not receive any support from any organization for the submitted work.
Yazarlar bu çalışma için herhangi bir kuruluştan destek almamıştır.

Data Availability statement / Veri Kullanılabilirliği bildirim

The author confirms that the data supporting this study are cited in the article.
Yazarlar, bu çalışmayı destekleyen verilere makalede atıfta bulunulduğunu onaylamaktadır.

Compliance with ethical standards / Etik standartlara uyum

Conflict of interest / Çıkar çatışması

The authors declare no conflict of interest.
Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Ethical standards / Etik standartlar

The study was conducted based on the ethical standards.
Çalışma etik standartlara uygundur.

Authors' contributions / Yazar katkıları

I.T conceived the idea, performed data analysis, enriched the concept and graphics, evaluated and approved the final manuscript, E.G.Y collected data, performed the numerical calculations and data analysis, drafted the manuscript, K.D. collected the seeds from suppliers and carried out experiments.

I.T fikri tasarladı, veri analizi gerçekleştirdi, konsepti ve grafikleri zenginleştirdi, son taslağı değerlendirdi ve onayladı, E.G.Y verileri topladı, sayısal hesaplamaları ve veri analizini gerçekleştirdi, taslağı hazırladı, K.D. tedarikçilerden tohumları topladı ve deneyler yaptı.

Kaynaklar

1. Gama, P.B.S., et al., Physiological response of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings to salinity stress. African Journal of Biotechnology, 2010. 6(2):p. 79–88.
2. Taïbi, K., et al., Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. South African Journal of Botany, 2016 105: p. 306-312.
3. Garcia, C. L., et al., Effect of salinity stress and microbial inoculations on glomalin production and plant growth parameters of snap bean (*Phaseolus vulgaris*). Agronomy, 2019. 9(9): p. 545
4. Tiryaki, I., Bazı tarla bitkilerinin tuz stresine gösterdikleri adaptasyon mekanizmaları. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi, 2018. 21(5): p. 800-808.
5. Tiryaki, I. and N. Isidogru, Determination of salt tolerance levels and genetic relationships of *Vicia sativa* cultivars using gene targeted functional markers. Acta Botanica Croatica, 2022. 81(1): p. 80-88.
6. Porcel, R., R. Aroca and J. M. Ruiz-Lozano, Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. Agronomy for Sustainable Development, 2012. 32(1): p. 181-200.
7. Farooq, M., et al., Effects, tolerance mechanisms and management of salt stress in grain legumes. Plant Physiology and Biochemistry, 2017. 188: p. 199-217.
8. Khayamim, S., et al., Seed germination, plant establishment, and yield of sugar beet genotypes under salinity stress. Journal of Agricultural Science and Technology, 2014. 16(4): p. 779-790.
9. Bu, Y., et al., Adverse effect of urease on salt stress during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. Febs Letters, 2015. 589(12): p. 1308-1313.
10. Hussain, N., et al., Salinity and drought management in legume crops, in Climate change and management of cool season grain legume crops, S. Yadav and R. Redden, Editors. 2010, Springer Netherlands. Dordrecht: Dordrecht. p. 171-191.
11. Yilmaz, E. G., I. Tiryaki and U. Sari, Genetic variation among einkorn genotypes based on gene targeted functional markers and its possible relationship with drought tolerance at seed germination stage. Molecular Biology Reports, 2022. 49(8): p. 7389–7398.
12. A. M. De Ron et al., Common bean, in grain legumes handbook of plant breeding, A. De Ron, Editor. 2015, Springer. New York: New York. p. 1–36.
13. Fidan, E. and A. Ekincialp, Investigation of responses of some bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes to different levels of salt stress. Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences, 2017. 27(4): p. 558–568.
14. Hiz, M. C., et al., Transcriptome analysis of salt tolerant common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under saline conditions. Plos one, 2014. 9(3): p. e92598.
15. Özkorkmaz, F. and N. Yilmaz, Farklı tuz konsantrasyonlarının fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) ve börülçede (*Vigna unguiculata* L.) çimlenme üzerine etkilerinin belirlenmesi. Ordu University Journal of Science Tecnology, 2017. 7(2): p. 196–200.
16. Tiryaki, I. and S. A. Kaplan, Enhanced germination performance of dormant seeds of *Eragrostis tef* in the presence of light. Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales, 2019. 7(3): p. 244–251.
17. SAS, SAS/STAT Software. 2019. SAS Institute Inc., Northern California.
18. Tiryaki, I., et al., Priming combined with plant growth regulators promotes germination and emergence of dormant *Amaranthus cruentus* L. seeds,” Seed science and technology, 2005. 33(3): p. 571–579.
19. Govindaraj, M., M. Vetriventhan, and M. Srinivasan, Importance of genetic diversity assessment in crop plants and its recent advances: An overview of its analytical perspectives. Genetics Research International, 2015. 2015(14): p. 1–14.
20. Ismael A., et al., Genetic variation in drought-tolerance traits and their relationships to growth in *Pinus radiata* D. don under water stress. Frontiers in plant science, 2022. 12: p. 3043.
21. Al-huraby A. I. and S. O. Bafeel, The effect of salinity stress on the *Phaseolus vulgaris* L. plant African Journal of Biological Sciences, 2022. 4(1): p. 94–107.

22. Bewley J. D., et al., *Seeds: Physiology of development, germination and dormancy*. 2013, Heidelberg, Germany: Springer Science Berlin.
23. Rajjou, L., et al., Seed germination and vigor. *Annual review of plant biology*, 2012. 63: p. 507–533.
24. Baskin C. C. and J. M. Baskin, *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. 1998, San Diego: Academic Press.
25. Souza, M. L. and M. Fagundes, Seed size as key factor in germination and seedling development of *Copaifera langsdorffii* (Fabaceae). *American Journal of Plant Sciences*, 2014. 2014(17): p. 2566–2573.
26. Harper, L. J., *Population biology of plants*. 1977, London: Academic Press.
27. Geritz, S. A., Evolutionarily stable seed polymorphism and small-scale spatial variation in seedling density. *The American Naturalist*, 1995. 146(4): p. 685–707.
28. Saeed, S. and S. S. Shaukat, Effect of seed size on germination, emergence, growth and seedling survival of *Senna occidentalis* Link. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2000. 3(2): p. 292–295.
29. He, Y., et al., Seed size effect on seedling growth under different light conditions in the clonal herb *Ligularia virgaurea* in Qinghai-Tibet Plateau. *Acta Ecologia Sinica*, 2007. 27(8): p.3091–3108.

Parmaksız, A., A. Uztemur and C. Cecen, Phylogenetic Analysis of Some Wild Birds in Şanlıurfa International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2023. 6(2): p. 184-192.
DOI: 10.38001/ijlsb.1297886

Phylogenetic Analysis of Some Wild Birds in Şanlıurfa (Türkiye)

Arif Parmaksız¹ , Adil Uztemur^{2,*} , Cahit Çeçen³ 

ABSTRACT

The increase in population worldwide causes an increase in anthropogenic effects such as agriculture and industry, and as a result, the habitat of many naturally living species is changing. Because of this change, species that adapt to the environment survive and those that cannot adapt to the environment either had to migrate in order to survive, or their numbers decreased and their generations were endangered. In Şanlıurfa, both the construction of dams and the increase in agricultural activities significantly affect bird diversity. Therefore, it is important to take precautions by investigating their phylogenetic origins and migration routes. The aim of the present study is to perform phylogenetic analysis using mtDNA COI marker for some wild bird species in Şanlıurfa. Muscle tissue was taken from nine wild bird species, DNA isolation was performed using a commercial kit, and the target gene region was amplified by using PCR method. The genetic structure of the species was determined by sequence analysis of the obtained target PCR products and a phylogenetic tree was drawn. The results were evaluated at haplotype level by comparing with the sequences in the gene bank. It was determined that the haplotypes determined for *Tyto alba*, *Ciconia ciconia*, and *Elanus caeruleus* species were new and not found in other countries.

ARTICLE HISTORY

Received

16 May 2023

Accepted

22 July 2023

KEYWORDS

Wild bird,
genetic variation,
protection,
mtDNA COI

Introduction

The dominance of steppe vegetation in Şanlıurfa's general vegetation creates suitable habitats for many bird species both for feeding and breeding. In addition, the formation of dam lakes with the construction of dams in recent years has also created different habitats and caused some aquatic bird species to settle in the region. Birds are a species-rich group of vertebrates and are unique in their adaptation to a wide variety of habitats [1]. Birds are generally key species in ecosystems as herbivores, predators, scavengers, seed dispersers and pollinators [1]. Therefore, biodiversity and population density are used as indicators to assess the root causes of biological diversity changes in ecosystems

¹ Harran University Faculty of Science and Literature, Department of Biology, General Biology Department, Türkiye

² Republic of Türkiye Ministry of Agriculture and Forestry General Directorate of Nature Conservation and National Parks, Şanlıurfa, Türkiye

³ Harran University Faculty of Science and Literature, Department of Biology, General Biology Department, Türkiye

*Corresponding Author: Adil Uztemur, e-mail: vet.hek.adiluztemur@gmail.com

around the world [3,4]. The rapid increase in the human population causes changes in the world and as this change causes a decrease in the feeding and breeding areas of many species, it can cause the populations belong these species to decrease or even disappear [1]. Although wild animals are protected by special laws, their numbers continue to decrease day by day. Bird species are threatened, as are many species, and 24% of all bird species are listed under the category of concern in the IUCN Red List [1]. Therefore, it is necessary to take precautions by investigating their phylogenetic origins and migration routes. Phylogenetic relationships of birds help to better understand the evolution of important anatomical and ecological traits [6].

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a very important tool in evolutionary and population genetics, including molecular ecology, and is commonly used as it provides rich data sources for sequence analysis and genetic diversity and phylogenetic analysis [7,8]. In this study, it was aimed to determine the phylogenetic analyzes of some wild winged bird species found naturally or through migration within the borders of Şanlıurfa by using the mtDNA marker and to compare the sequences in the gene bank to reveal the similarities and differences between them according to NCBI. In addition, it was aimed to create a wider data area for the species by registering different results in the NCBI gene bank.

Material and Methods

No field study was conducted within the scope of the research and no samples were collected from nature, all samples used as materials were made on wild bird species that were brought to Gölpınar Wildlife Rescue and Rehabilitation Center in Şanlıurfa Karaköprü district, which died naturally or were treated but could not be saved. Information about the samples is presented in Table 1. In order to can be made phylogenetic analysis of these samples, research permissions were obtained from the General Directorate of Nature Conservation National Parks, dated 02.08.2022 and numbered E-21264211-288.04-6454461.

For DNA isolation, an average of 1 gram of muscle tissue from each individual was taken by the Veterinarian and transferred to Harran University, Faculty of Science and Letters, Department of Biology, Zoology laboratory on the same day in cold chain.

DNA isolation was obtained from muscle tissue using Commercial Kit (GeneJET, Thermo Scientific). GeneJET and Thermo Scientific commercial kits used for DNA isolation were preferred because they are practical and economical. In order to control the

DNA quality and presence, DNA samples of each individual were loaded into the wells of 0.8% agarose gel with SYBR Green added, and electrophoresis was carried out at 120 Volts for 30 minutes and then visualized in a UV light device (Smart View Pro Imager System, Major Science). The primer pair used for duplication of the mtDNA COI gene region is taken from [9] study (LCO1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'; HCO2198; 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3').

Table 1 Information on the sample species used in the study

Order	Common name	Scientific name	Locality	Migrants statuses	IUCN Redlist
Gruiformes	Common Crane	<i>Grus grus</i>	Şanlıurfa-Akçakale	migrants	LC (Least Concern)
Accipitriformes	Common Buzzard	<i>Buteo buteo</i>	Şanlıurfa-Viranşehir	migrants	LC (Least Concern)
Accipitriformes	Eurasian parrowhawk	<i>Accipiter nisus</i>	Şanlıurfa-Haliliye	migrants	LC (Least Concern)
Strigiformes	Barn owl	<i>Tyto alba</i>	Şanlıurfa-Hilvan	not migrants	LC (Least Concern)
Ciconiiformes	White stork	<i>Ciconia ciconia</i>	Şanlıurfa-Siverek	migrants	LC (Least Concern)
Charadriiformes	Eurasian woodcock	<i>Scolopax rusticola</i>	Şanlıurfa-Siverek	migrants	LC (Least Concern)
Accipitriformes	Long-legged buzzard	<i>Buteo rufinus</i>	Şanlıurfa-Siverek	migrants	LC (Least Concern)
Pelecaniformes	Glossy ibis	<i>Plegadis falcinellus</i>	Şanlıurfa-Birecik	migrants	LC (Least Concern)
Accipitriformes	Black-winged kite	<i>Elanus caeruleus</i>	Şanlıurfa-Hilvan	not migrants	LC (Least Concern)

In the multiplication reactions with Polymerase Chain Reaction (PCR), the bonding temperature gradient processes of the primers were made in a Thermal Cycler (BIO-RAD T100™). PCR conditions; 3 min. at 95°C first denaturation, 30 sec. at 95°C denaturation, 45 sec. at 50°C connecting and 60 sec. at 72°C elongation, a total of 35 cycles were run, at the end of the samples were ended at keeping 72°C for 10 minutes. In the PCR mixture used for the replication for the target region; It is in the form 13.9 µl of dH₂O, 1x PCR buffer, 2.5mM MgCl₂, 1 µl of 0.5 mM primer (F and R), 0.2 mM dNTPs, 0.1 µl of Taq polymerase (the manufacturer should be given) and 90 ng/µl of template DNA, a total of 25 µl. 2% agarose gel was used to control the products formed after PCR. The products were loaded into the wells in the gel and run at 90V electric current for 40 minutes and monitorized on the device that emits ultraviolet light. Then, the PCR products were sent

to a commercial company and sequence analysis was made on the 3500 XL Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific).

Raw data of mtDNA sequences sent to us from the commercial company were evaluated using the ChromasPro v 2.0.1 (Technelysium Pty Ltd) program and converted to FASTA format. Sequences obtained were checked using BLAST and compared with species in the NCBI (www.ncbi.gov) database. Sequences in FASTA format all sequences were aligned using BioEdit software version 7.2.5. Phylogenetic analyzes between species were carried out in MEGA X program according to the Neighbor joining tree model using the K2 parameter and phylogenetic tree was created [10]. The bootstrap test (1000 replicates) was used to test the reliability of nodes (tree branches).

Results

Sequence analysis of an average of 630 base pairs of mtDNA COI regions was made for nine wild bird species that were sequenced. The chromatogram image of the FinchTV program belonging to the randomly selected *Plegadis falcinellus* species in the analyzes is shown in Figure 1. 175 polymorphic regions were detected in the target gene region of nine species analyzed for sequence analysis, which shows that it can be used in terms of distinguishing species from each other for phylogenetic analysis.

The sequences belonging to the species obtained in the study were aligned and phylogenetic analyzes were made in the MEGA X program and a Neighbor-joining tree was created. In Figure 2, the phylogenetic tree created by Neighbor-joining method using the sequences of the mtDNA COI region obtained in this study is visualized by adding photographs against each species.

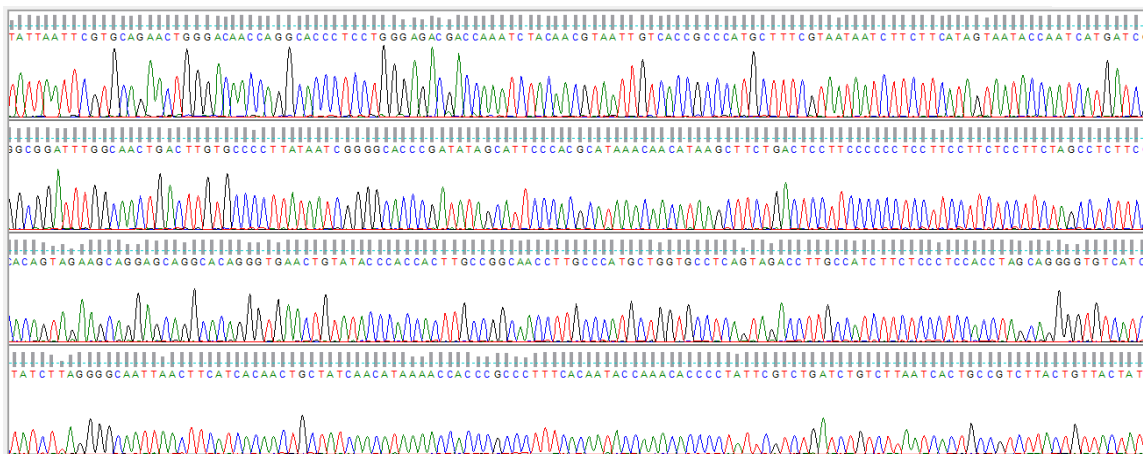


Fig 1 Chromatogram image of a sample sequence analysis of the mtDNA COI region

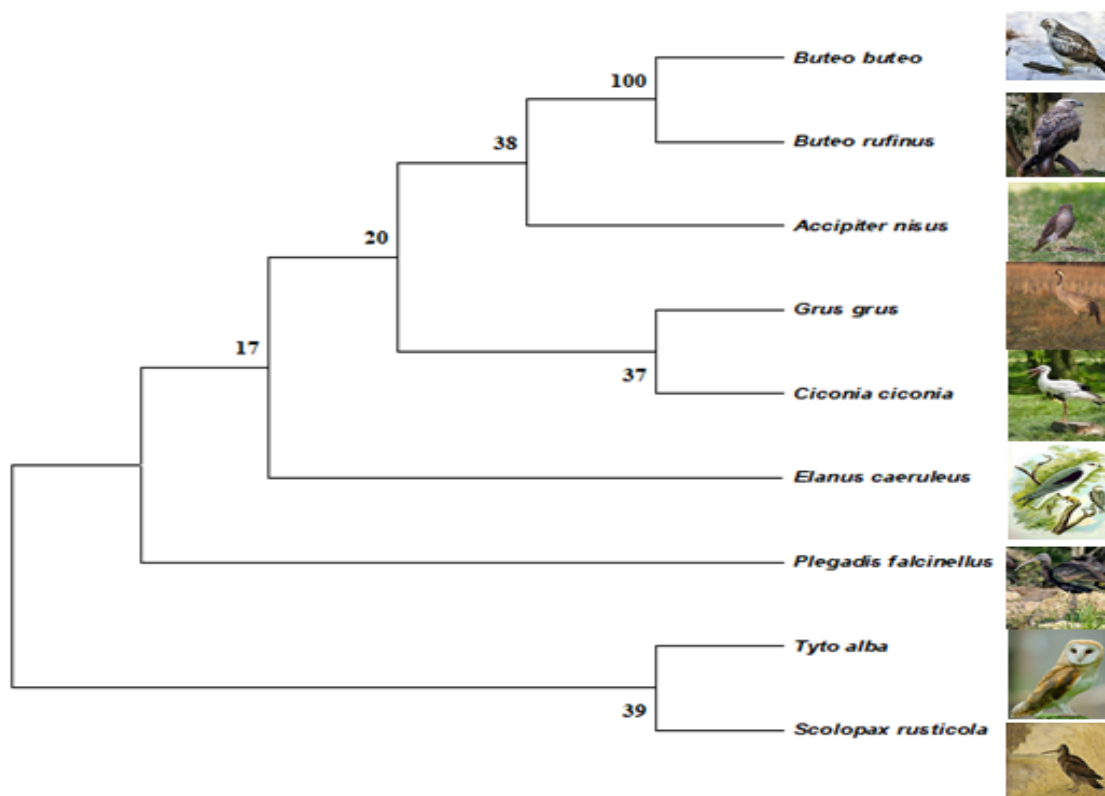


Fig 2 Tree model constructed according to the highest probability method based on mtDNA COI sequences

All of the photos are taken from the website <https://www.wikipedia.org>. On the phylogenetic tree, two species named *Tyto alba* and *Scolopax rusticola* were separated from the other species by being located on a separate branch. It is seen on the tree that *Buteo buteo* and *Buteo rufinus* species and *Grus grus* and *Ciconia ciconia* species are closely related to each other on the tree. In addition, the genetic distances of the species were calculated to take values between 0.00188 and 0.21137, and it was determined that the closest species to each other were *Buteo buteo* to *Buteo rufinus*, and the most distant species to each other were *Tyto alba* to *Accipiter nisus*.

Discussion

Birds are being affected more and more day by day due to biotic and abiotic factors in natural life. While the damages caused by natural enemies and natural disasters are repaired in time in natural balance, the dangers posed by humans cause the population of many bird species to shrink and their extinction to disappear from the World [11].

In particular, the decrease in individuals in the natural population may cause the disappearance of unique genotypes, and when this genetic information is lost, it is almost impossible to recover it [12,13]. Therefore, measures should be taken for all factors that reduce the genetic diversity of natural species so that the chances of survival of populations increase. Because genetic makeup directly reflects the ability of species or populations to adapt to unfamiliar or regenerated environmental conditions it [14,15].

Table 2 The haplotypes detected in the mtDNA COI gene in this study The similarity rates between the base sequences of the haplotypes in the NCBI database

Species name	Accession number	Similarity Rate (%)	Country
<i>Grus grus</i>	OQ345516	100	This study
	GU571916	100	Scandinavian countries
	GU571425	99.84	Scandinavian countries
	GU571917	99.68	Scandinavian countries
<i>Buteo buteo</i>	OQ345517	100	This study
	KT803616	100	Cyprus
	GU571769	100	Scandinavian countries
	KY754488	99.81	Central European
<i>Accipiter nisus</i>	OQ345518	100	This study
	GU571689	100	Scandinavian countries
	KF946553	100	Netherlands
	AB843328	100	Japan
<i>Tyto alba</i>	OQ345519	100	This study
	KF946926	99.52	Netherlands
	KF432222	99.67	Netherlands
	GU572154	99.68	Scandinavian countries
<i>Ciconia ciconia</i>	OQ345520	100	This study
	KY754495	99.84	European countries
	GU571816	99.84	Scandinavian countries
<i>Scolopax rusticola</i>	OQ345521	100	This study
	GU572087	100	Scandinavian countries
	AB843147	99.69	Japan
	AB843750	99.53	Japan
<i>Buteo rufinus</i>	OQ345522	100	This study
	KT803615	100	Cyprus
<i>Plegadis falcinellus</i>	OQ345523	100	This study
	GU572048	100	Scandinavian countries
	DQ433121	100	North American
<i>Elanus caeruleus</i>	OQ345524	100	This study
	MK932886	99.84	Thailand
	OK662584	99.84	China

In this study, the genetic structure of some bird species that naturally live in the Şanlıurfa region or use it as a migration route was evaluated phylogenetically by making sequence

analyzes of the mtDNA COI gene region. Sequences of all species obtained in this study were compared with similar sequences in the NCBI gene bank by applying the BLAST technique. The similarity rates between these sequences and information on the countries where the bird species live are given in Table 2.

All genetic data obtained as a result of this study were registered for the first time in the NCBI gene bank for Türkiye and their accession numbers (GenBank OQ345516-OQ345524) were obtained. The haplotypes of *Grus grus*, *Buteo buteo*, *Accipiter nisus*, *Scolopax rusticola*, *Buteo rufinus* and *Plegadis falcinellus* species seen in Şanlıurfa had found to be the same as those seen in other countries. However, for *Tyto alba*, *Ciconia ciconia*, and *Elanus caeruleus* species, the haplotypes detected in this study are seen to be new haplotypes not found in other countries. Due to the rapid increase in the world population, the spread of urbanization, the destruction of forests, agricultural areas and areas such as streams, the habitats of many living species, including birds, are destroyed and their species are endangered. [5]. It is estimated that genetic diversity will decrease faster than species diversity under increasing threats [16]. The discovery of new haplotypes is accepted in some population to be indicative of a unique genetic construction. Therefore, the protection of individuals with unique genotypes is important for the continuation of populations.

Conclusion

Changing ecological conditions will cause to the emergence of new haplotypes over time and increase the adaptation ability of individuals to the environment for the continuation of populations. For this reason, it is necessary to identify the feeding and breeding areas on the migration routes of bird species and to protect these areas without changing their natural characteristics. Taking samples from a large number of individuals from the same species in Şanlıurfa province will be able to better understand the genetic diversity and migration periods of the species. In addition, more comprehensive results can be obtained with studies to be carried out on samples to be obtained in different provinces.

Abbreviations

IUCN: The International Union for Conservation of Nature ; NCBI: The National Center for Biotechnology Information ;DNA: Deoksiribo nukleik acid; BLAST: The Basic Local Alignment Search Tool; mtDNA COI: Mitochondrial Deoksiribo nukleik acid Cytochrome c oxidase ; MEGA X; Molecular Evolutionary Genetics Analysis ;SYBR Green: It is used as a dye for the quantification of double stranded DNA in some methods of quantitative PCR ;UV: ultraviole.

Acknowledgements

The author would like to thank the General Directorate of Nature Conservation and National Parks of the Ministry of Agriculture and Forestry for approve the necessary permits for the realization of this study.

Funding

No funding

Data Availability statement

The author confirms that the data supporting this study are cited in the article.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Ethical standards

The study is proper with ethical standards.

Authors' contributions

In this work, the laboratory works and analyze were conducted by Dr. Arif Parmaksız. Sampling and field work were done by Adil Uztemur. The manuscript was edited and finalised by Dr. Cahit Çeçen

References

1. Stiller, J. and G. Zhang, Comparative phylogenomics, a stepping stone for bird biodiversity studies. *Diversity*, 2019. 11(7): p. 115.
2. Whelan, C.J., D.G. Wenny and R.J. Marquis, Ecosystem Services Provided by Birds. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008. 1134(1): p. 25–60.
3. Pereira, H. and H.D. Cooper, Towards the global monitoring of biodiversity change. *Trends Ecol. Evol*, 2006. 21(3): p. 123–129.
4. Scharlemann, J., et al., Global biodiversity: Indicators of recent declines. *Science*, 2010. 328 (5982): p. 1164–1168.
5. Parmaksız, A., Genetic diversity and population structure analysis of *Capoeta trutta* (Heckel, 1843) in Turkey and Iraq based on mitochondrial d loop gene. *Gene Reports*, 2023. 31: p. 101761.
6. Brusatte S.L., J.K. O'Connor, and E.D. Jarvis, The origin and diversification of birds. *Current Biology*, 2015. 25(19): p. R888–98.
7. Ursing, B.M., and U. Arnason, The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). *Journal of Molecular Evolution*, 1998. 47(3): p. 302-306.
8. Gupta, A., et al., Mitochondrial DNA-a tool for phylogenetic and biodiversity search in equines. *J Biodivers Endanger Species*, 2015. 1: p.006.
9. Folmer, O., et al., DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994. 3(5): p. 294–299.
10. Kumar, S., et al., MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018. 35: p. 1547-1549.
11. Toprak, H. H. C., Gaziantep ili kuş (Classis: Aves) türlerinin sistematığı ve ekonomisi (Doctoral dissertation, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi, Gaziantep, 2004. p. 119.
12. Parmaksız, A., Population Genetic Diversity of Yellow Barbell (*Carasobarbus luteus*) from Kueik, Euphrates and Tigris Rivers Based on Mitochondrial DNA D-loop Sequences *Turk. J. Fish.& Aquat. Sci.*, 2020. 20(1): p. 79-86.
13. Parmaksız, A., Determination of genetic variations by using mitochondrial DNA cyt b sequences in populations of *Carasobarbus luteus* (Cyprinidae). *Aquatic Research*, 2021. 4(4): p. 313-320.
14. Frankham, R., D.A. Briscoe, and J.D. Ballou, *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press 2002.

15. Spielman, D., B. W. Brook, and R. Frankham, Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004. 101(42): p. 15261-15264.
16. Manel, S. et al., Global determinants of freshwater and marine fish genetic diversity. *Nature Communications*, 2020. 11(1): p. 692.

Atasoy, S., G. T. Sahin, and A. Balkaya, Lahanagil Sebze Türlerinin Kök Sistemi Mimarileri Yönünden Karşılaştırılması. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2023. 6(2): p. 193-207.
DOI: 10.38001/ijlsb.1291203

Lahanagil Sebze Türlerinin Kök Sistemi Mimarileri Yönünden Karşılaştırılması

Seda Atasoy^{1*}, G. Tuğba Şahin², Ahmet Balkaya¹

ÖZET

Kışlık sebzeler içerisinde lahanagil sebze türleri en önemli ürün segment grubunu oluşturmaktadır. Bu sebze türlerinde abiyotik stres faktörleri sonucunda büyüme ve gelişme olumsuz düzeyde etkilenmektedir. Bu nedenle bitkilerde, topraktan suyu ve besin maddelerini etkin bir şekilde kullanabilen kök sistemi mimarilerinin belirlenmesi büyük bir önem taşımaktadır. Bu çalışmada, WinRhizo kök görüntüleme sistemlerinden yararlanılarak yaprak lahanası, beyaz baş lahanası, kırmızı baş lahanası, karnabahar, Brüksel lahanası ve brokoli türlerinde kök sistemi mimarisini oluşturan fenotipik kök özelliklerinin (toplam kök uzunluğu (cm), kök yüzey alanı (cm²), kök hacmi (cm³), kök çapı (mm), kök çatallanma ve kesişme sayısı) ayrıntılı olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırma sonucunda dikimden itibaren 45. gün sonunda bitkilerde toplam kök uzunluğu, 856-1588 cm arasında değişim göstermiştir. En yüksek toplam kök yüzey alanı değerleri, yaprak lahanası ve brokoli çeşitlerinde 786 cm² ve 727 cm² olarak ölçülmüştür. Korelasyon analizinde tüm kök parametreleri birlikte değerlendirildiğinde, kök uzunluğu ile kök yüzey alanı arasında pozitif yönde ve çok önemli düzeyde ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kök uzunluğunun hem kök dallanması hem de kök kesişimi ile pozitif korelasyon gösterdiği ve ilişki düzeylerinin önemli olduğu tespit edilmiştir.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

2 Mayıs 2023

Kabul

15 Haziran 2023

ANAHTAR

KELİMELELER

Brassica,

kök,

fenotipik çeşitlilik,

korelasyon

Comparison of *Brassica* Vegetables in terms of Root System Architectures

ABSTRACT

Among winter vegetables, *Brassica* vegetable crops constitute the most important product segment group. The growth and development of these vegetable species are adversely affected due to abiotic stress factors. For this reason, it is of great importance to determine the root system architectures in plants that can effectively use water and nutrients from the soil. In this study, it was aimed to examine in detail the phenotypic root characteristics (total root length (cm), root surface area (cm²), root volume (cm³), root diameter (mm), root tip and fork number) that form the root system architecture of kale, white head cabbage, red head cabbage, cauliflower, Brussels sprout and broccoli by using WinRhizo root imaging systems. As a result of the research, at the end of the 45th day from planting, the total root length of the plants varied between 856-1588 cm. The highest total root surface area were measured as 786 cm² in leaf cabbage and 727 cm² in broccoli. When all root parameters were evaluated together in the correlation analysis, it was determined that there was a positive and very significant relationship between root length and root surface area. In addition, it was determined that the root length was positively correlated with both root branching and root intersection, and the relationship levels were significant.

ARTICLE HISTORY

Received

2 May 2023

Accepted

15 June 2023

KEYWORDS

Brassica,

root,

phenotypic diversity,

correlation

¹ Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Samsun / Türkiye

² Targen Tohum Tarım San. Tic. Ltd. Şti. Samsun / Türkiye

*Corresponding Author: Seda Atasoy, e-mail: bensedaatasoy@gmail.com

Giriş

Tarımın en karlı dallarından birisi olan sebze yetiştiriciliğinde son yıllarda kışlık sebze türlerine ve özellikle lahanagil grubu sebzelere olan ilgi ve talep her geçen gün giderek artmaktadır [1]. Bunun sonucu olarak bu türlerin, tarımsal üretimde ekiliş alanları ve üretim miktarları hızlı bir şekilde yükseliş göstermektedir. Geleneksel sebze yetiştiriciliğinde yüksek verim ve ürün kalitesinin artırılması; kaliteli tohum ve fide kullanımı ile kültürel uygulamaların (gübreleme, sulama vb.) ve tarımsal mücadelenin zamanında yeterli, düzenli ve kontrollü bir şekilde yapılması ile mümkün olur [2]. Lahana yetiştiriciliğinde yüksek verimli ve kaliteli ürün için toprağın derin, organik maddece zengin, pH'sının 6.0-6.5 arasında, nemli ve tınlı topraklar olması tercih edilmelidir [3]. Lahanalarda kalın, etli ve oldukça derine giden ana kazık kök ile bol miktarda saçak kök bulunmaktadır. Kazık kökler, 30-35 cm derinliğinde gelişirler. Brüksel lahanası bitkisinin kök yapısı, diğer lahanalara benzemektedir [4]. Kazık kök ile etrafından gelişen saçak köklere sahiptir. Karnabaharlarda, lahanalardaki gibi köklenme çabuk oluşur ve kazık köklüdür. Kökün diğer özellikleri lahanalara benzer. Brokolinin kök yapısı, karnabahara benzemektedir. Kazık kök yaklaşık 25-30 cm derinliğe ulaşır. Toprak yüzeyine yakın bölgede bol miktarda saçak kök oluşur [5].

İklimlerde meydana gelen değişimler ve sürekli yükselen kuraklık riski bitkilerde kök yapısı ve mimarisi üzerine yürütülen çalışmaların artmasına sebep olmuştur. Kök gelişimi ve toprak üstü aksamaların gelişimi üç boyutlu ve kompleks yapıları itibariyle benzerlik gösterir [6, 7]. Lahanagiller genellikle yüzlek köklü bitkilerdir ve kuraklığa oldukça hassastırlar. Bu tip bitkilerde düzenli sulama ve toprak neminin muhafazası yüksek verim ve ürün kalitesi için çok önemlidir [2]. Sulamada istenen sulama sıklığı; toprak yapısı, bitki kök yapısı, topoğrafya, evapotranspirasyon, yağış, bitki türü ve bitkinin gelişme aşaması gibi faktörlere bağlıdır [8]. Lahana, su stresine orta derecede duyarlı olarak sınıflandırılmıştır [9]. Kuraklığa dayanıklı bitkiler stoma direncini artırarak su kaybını azaltması, büyük ve derin kök sistemleri geliştirerek su alımını artırma ve ozmolitleri biriktirme gibi su stresine uyum sağlamak için çeşitli mekanizmalar geliştirirler [10]. Lahanagil sebzelerinde türler arasında kuraklık stres toleransı ve oluşturdukları mekanizmalar açısından belirgin farklılıklar görülmektedir [2]. Lahana bitkisinde fidenin 6-7 yapraklı olduğu ve baş oluşumunun başladığı dönem

sulama açısından en riskli dönemlerdir [11]. Bu dönemde bitkilerin güçlü bir kök yapısına sahip olmaları büyük önem taşır.

Lahanagil grubu sebze türlerinin yetiştiriciliğinde bitki gelişimi üzerine etkili başlıca kriterler kök yapısı ve stres koşulları altında topraktaki kök gelişimi ve köklenme yeteneğidir. Bitkinin toprak üstü aksamının büyümesine etki eden en önemli etmenlerden bir tanesi de köklerin elde ettiği su ve besin maddesi miktarlarıdır. Jung ve McCouch [12], kök yapısının bitkilerde gelişim, besin iletimi, çevresel koşullara uyum yeteneği ile abiyotik stres faktörlerine dayanıklılık ve verim artışı açısından mutlak bir öneme sahip olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca bitkilerde kök sisteminin yapısı, çevresel ve hormonal uyartılarla etkilenmektedir [13, 7]. Bitkilerde kök mimarisinin değerlendirilmesi için bitki kök kanopisini oluşturan temel parametrelerin birlikte değerlendirilmesi gereklidir. Kök parametreleri olarak kuru kök ağırlığı, kök sayısı, kök yüzey alanı, kök çapı ve kök uzunluğu gibi özelliklerin incelenmesi gereklidir [14, 15, 16]. Günümüzde kök mimarisinin belirlenmesinde, bitkilerde lateral kök gelişiminin düzenlenmesi önemli bir çözüm yolu olarak kabul edilmektedir [17]. Yapılan bir araştırmada, Çin lahanasında kök morfolojisini oluşturan parametrelerden primer kök uzunluğu, toplam kök uzunluğu, kök hacmi, kök yüzey alanı ve kök uç sayılarının $\text{NH}_4^+:\text{NO}_3^-$ oranı ve ışık yoğunluğundan etkilendiği belirlenmiştir [18].

Gelişen teknoloji yardımı ile dijital görüntüleme yöntemleri bitkilerin kök mimarilerini bütünsel şekilde inceleyebilme olanağı sağlamıştır. Lahanagil grubu sebze türlerinde, köklenme özellikleri ve kök mimarilerinin belirlenmesine yönelik çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışma ile dijital görüntüleme sistemlerinden yararlanarak lahanagil grubu sebze türlerinin (yaprak lahana, beyaz baş lahana, kırmızı baş lahana, Brüksel lahanası, karnabahar ve brokoli) kök mimarilerini oluşturan temel kök parametreleri yönünden karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Bu araştırmanın yetiştiricilik kısmı, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Araştırma ve Uygulama sitesinde yer alan sıcaklık kontrollü sebze çoğaltma serasında ($24^\circ\text{C} \pm 2$) gerçekleştirilmiştir. Bitki kök analizleri ise Bahçe Bitkileri Bölümü Fizyoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Araştırmada; ülkemizde lahanagil familyasında yaygın olarak yetiştirilen beyaz baş lahana (BBL), kırmızı baş lahana (KBL), yaprak lahana

(YL), Brüksel lahanası (BL), karnabahar (K) ve brokoli (B) türlerine ait ticari çeşitler kullanılmıştır (Tablo 1).

Tablo 1 Araştırmada kullanılan lahanagil türlerine ait çeşitler
Table 1 Varieties of *Brassica* vegetables included in this study

Tür	Çeşit	Firma
Brokoli	Atlantis	Arzuman Tohumculuk
Karnabahar	Igloo	Arzuman Tohumculuk
Brüksel lahanası	Brüksel	Agrokar Tohumculuk
Yaprak lahana	Karadere	Arzuman Tohumculuk
Beyaz baş lahana	BT-Bafra	Bursa Tohumculuk
Kırmızı baş lahana	Zencibaş	Paşa Tohumculuk

Lahanagil türlerine ait çeşitlerin, torf ve perlit karışımından (3:1 v:v) elde edilen harcın viyollere doldurulması ve tohum ekimi 01.11.2022 tarihinde yapılmıştır. Dört gerçek yaprağa ulaşan lahanagil fideleri; sıcaklık kontrollü sebze çoğaltma serasında 3 litrelik (19 x 17.5 cm) plastik saksılara harç (torf ve perlit) ile doldurulmuş ve 05.12.2022 tarihinde dikilmiştir. Deneme, tesadüf parselleri deneme desenine uygun olarak üç tekerrürlü ve her tekerrürde on iki bitki bulunacak biçimde düzenlenmiştir. Lahanagil türlerine ait fideler, dikiminden itibaren sıcaklık kontrollü sera bölümünde ($24^{\circ}\text{C} \pm 2$) 45 gün süreyle yetiştirilmiştir.

Bitkilerde kök sistemi yapısı, bitki köklerinde bulunan toplam kök uzunluğu, ana kök sayıları, yan kök dallanma sayısı, kök hacmi, kesişen kök sayıları ve kök yüzey kısımlarının sayısal yönden izdüşümleri tespit edilebilmektedir [7, 14]. Araştırmada, lahanagil türlerine ait bitkilerin kök sistemi mimarilerinin incelenmesinde WinRhizo kök analiz programı (ver. 2013) kullanılmıştır [19]. Çalışmada fide dikiminden itibaren tüm çeşitlerde 15, 30 ve 45. gün olmak üzere üç kez kantitatif kök analizleri yapılmıştır. Her bir dönemde bitki kökleri özenle yıkanarak torf ve perlit ortam materyallerinden arındırılmış ve kurutma kağıtları ile kurutulmuştur. Kurutulan kökler daha sonra asetat üzerine (A3 boyutu) konulmuş daha sonra cihazın algılayacağı şekilde ince uçlu pensler yardımıyla dikkatli bir şekilde ayırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kök tarama işlemine hazır hale getirilen kökler cihazın tarayıcı kısmına konularak 400 dpi çözünürlükte taranmış ve üç boyutlu bir şekilde görüntü bilgisayara kaydedilmiştir. Araştırmada, lahanagil grubunda yer alan sebze türlerine ait bitkilerde, kök mimarisini

oluşturan tüm çap sınıfındaki köklerin kılcal formda var olan saçak kökler de dahil olmak üzere toplam kök uzunlukları tespit edilmiştir. Yine üç boyutlu olarak taraması yapılmış olan tüm köklerin dış çeperleri, bitki kök yüzey alanı olarak hesaplanmıştır. Ayrıca lahanagil türlerine ait bitkilerde mevcut kök uzantıları WinRhizo programı vasıtasıyla ortalama kök çapları belirlenmiştir. Kantitatif analiz sonrasında ayrılan köklerde net kök hacim değerleri de belirlenmiştir. Lahanagil grubu bitki türlerine ait köklerde dallanma sayısı (ana kök ile birincil lateral köklerden gelişen yan dalların sayısı) ve lateral köklerin oluşumu ve uzaması sonucunda birbirleriyle kesiştiği kök kesişim sayıları da tespit edilmiştir. Deneme sonucunda incelenen tüm lahanagil türlerinde köklenme unsurlarını oluşturan verilere, varyans analizi (ANOVA) belirlenmiş ve sonrasında istatistiksel açıdan önem düzeyi yüksek bulunan parametreler Tukey testine yardımı ile gruplara ayrılmıştır. Ayrıca lahanagil grubu sebze türlerinde kök mimarisini oluşturan tüm parametreler arasında korelasyon analizi yapılarak istatistiksel ilişki durumları da incelenmiştir.

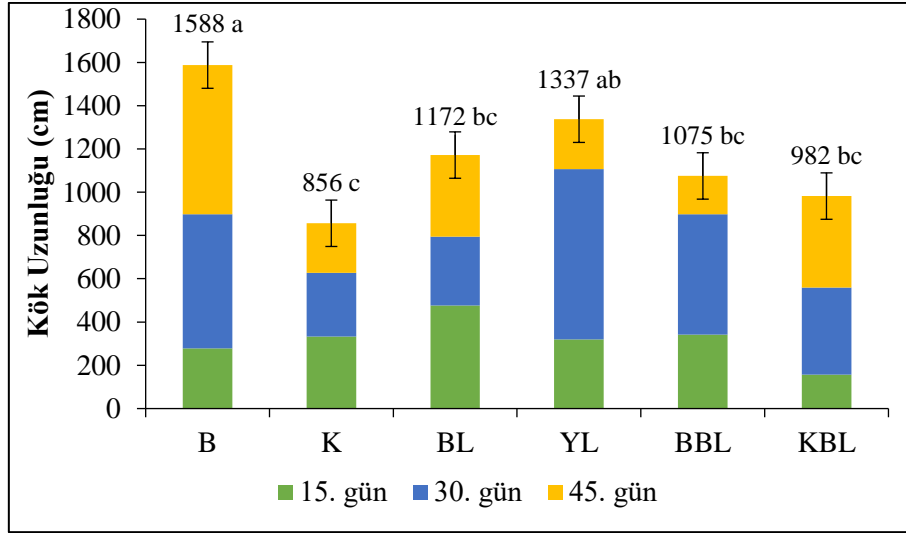
Bulgular ve Tartışma

Araştırmada lahanagil grubu sebze türlerine ait çeşitlerde, kantitatif analizler ve dijital kök tarama sonucunda kök yapısı ve mimarisini oluşturan parametrelerde üç farklı dönemde ortaya çıkan sonuçlar ve oluşan değişikliklerin sebepleri ayrıntılı olarak verilmiştir.

Toplam kök uzunluğu değerlerinin değişimi

Lahanagil grubu sebze türlerinde fide dikiminden itibaren 15'er gün aralıklarla 3 kez elde edilen kök tarama analizi verilerine göre ölçülen toplam kök uzunluğu sonuçları ve kantitatif oransal dağılımları Şekil 1'de sunulmuştur.

Lahanagil türlerinde toplam kök uzunluğu değerlerinin istatistiksel açıdan önemli seviyede farklılık ($p < 0.05$) gösterdikleri belirlenmiştir. Araştırma sonucunda 45. gün sonunda bitkilerde toplam kök uzunluğu değerleri, 856-1588 cm arasında dağılım göstermiştir. En yüksek değer, brokolide (1588 cm) ölçülmüştür. Bunu yaprak lahana (1337 cm) ve Brüksel lahanası (1172 cm) takip etmiştir. En düşük değerler ise karnabahar (856 cm) ve kırmızı baş lahanada (982 cm) tespit edilmiştir. Kantitatif kök analizlerinde 15. gün sonuçlarına göre karşılaştırma yapıldığında; 45. gün sonunda, kırmızı baş lahanada (6.25 kat) ve brokolide (5.71 kat) toplam kök uzunluğu değişiminin diğer türlere göre daha fazla olduğu saptanmıştır (Şekil 1).



Şekil 1 Lahanagil türlerinde dikimden sonra 15 gün periyotlar ile kaydedilen toplam kök uzunluğu (cm) değerlerinin değişimleri

Fig 1 Changes in total root length (cm) values saved at 15-day periods after planting in *Brassica* vegetables

Karnabaharda ise toplam kök uzunluğu değerlerinin en düşük artışı gösterdiği bulunmuştur. Marulda yapılan bir çalışmada; dikimden itibaren 60. gün sonunda toplam kök uzunluğu değerlerinin, kıvrıcık tip marullarda 2705.4-3086.4 cm ve Yedikule tipi marullarda 1902.6-2838.4 cm arasında farklılaşma görüldüğü belirlenmiştir [7]. Araştırmacılar, toplam kök uzunluğu değerleri yönünden Yedikule tipi marul çeşitleri arasında istatistiksel açıdan önemli seviyede değişimlerin olduğunu saptamışlardır. Benzer durum lahanagil türlerine ait çeşitler arasında da tespit edilmiştir.

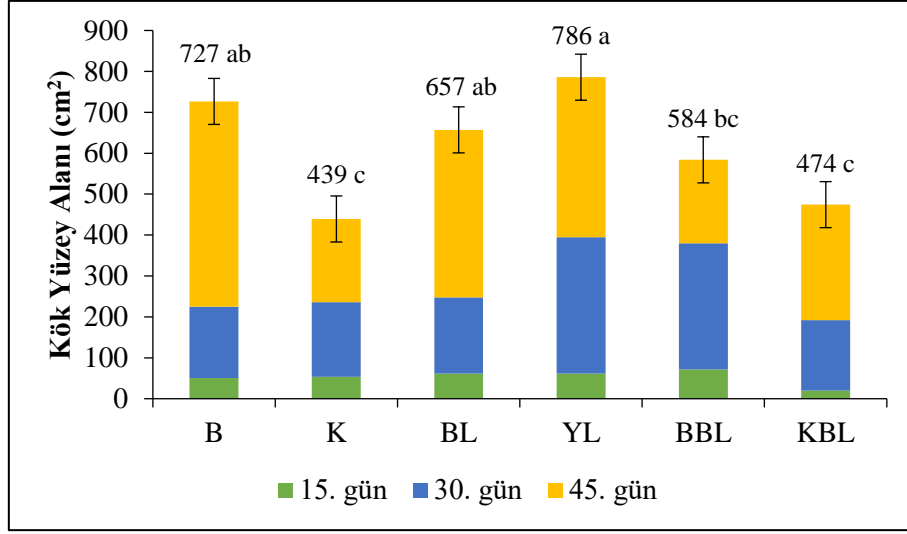
Bitkisel üretimde çeşit performansını, kalite ve verim üzerine etki eden en önemli faktörlerden bir tanesi kök yapılarından kaynaklanmaktadır. Değişik kök derinliğine sahip olan bitkilerin su ve besin maddesi teminindeki farklılıklar verim unsurları üzerinde belirgin olarak etkisini göstermektedir [20]. Bu nedenle bitkisel üretimde, besin noksanlığı ve su kısıntısı gibi stres şartları altında köklerin toprağın derinliklerine inerek su ve bitki besin maddesini elde etmesinin daha kolay bir hale gelmesi açısından toplam kök uzunluğunun yüksek olması gerekmektedir [21, 16]. Özgen [22], bitki besin elementlerinin azlığı veya fazlalığı toplam kök uzunluğu vasıtasıyla direkt olarak ilgili olduğunu belirtmiştir. Zhu ve ark. [23], karnabahar çeşitlerinde farklı düzeylerde tuzluluğa maruz kalan bitkilerde kök uzunluğunun etkilendiğini belirtmişlerdir. Johnson ve ark. [24], bitkilerde artan kök uzunluğunun, daha derin toprak strüktüründe kullanımını teşvik ettiğini ve daha uzun bir kök sistemine sahip olan çeşitlerin daha

derin toprak bölgelerine rahat bir şekilde erişebildiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle bitkisel üretimde özellikle stres koşullarında toplam kök uzunlukları yönünden yüksek değerlere sahip olan çeşitlerin seçilmesi daha büyük bir önem kazanmaktadır.

Toplam kök yüzey alanı yönünden değerlendirme

Bitkilerde topraktan su ve besin alımını etkileyen önemli kök mimarisi unsurlarından bir tanesi de toplam kök yüzey alanıdır. Kök yüzey alanı değerlerinin yüksek olması, bitkilerin özellikle kuraklık veya yüksek sıcaklık stresinde topraktan su ve besin alım düzeyini olumlu yönde artırmaktadır [14, 16]. Johnson ve ark. [24], toprak içerisinde yüksek kök dağılımının, topraktan verilen gübrelerin etkin bir şekilde kullanımı yönünden önemli bir fayda olabileceğini belirtmişlerdir. Araştırma verileri istatistiksel açıdan analiz edildiğinde lahanagil grubu türleri arasında kök yüzey alanı değerleri açısından çok önemli seviyede farklılıklar belirlenmiştir. En yüksek toplam kök yüzey alanı değerleri sırasıyla yaprak lahana ve brokolide 786 cm^2 ve 727 cm^2 olarak ölçülmüştür (Şekil 2). En düşük değer ise karnabaharda 439 cm^2 olarak belirlenmiştir.

Araştırmada 15'er gün aralıklarla yapılan kök analizleri sonucunda tespit edilen lahanagil çeşitlerinin kök yüzey alanı verileri açısından farklılıkları, Şekil 2'de ele alınmıştır. Kök yüzey alanı değerleri, bütün çeşitlerde 15. günden 30. güne kadar hafif düzeyde bir yükseliş takip etmiş, 30. günden itibaren hızlı bir artış eğilimi belirlenmiştir. Kantitatif analizlerde çeşitlere göre 45. gün sonunda kök yüzey alanı değerlerindeki artış miktarları oldukça yüksek değişkenlikler göstermiştir. En yüksek artış miktarı, kırmızı baş lahanada 23.7 kat ve brokolide 14.5 kat olarak hesaplanmıştır. En düşük artış miktarı ise karnabahar (8.1 kat) ve beyaz baş lahana (8.2 kat) çeşitlerinde tespit edilmiştir. Kandemir ve ark. [7], marul çeşitlerinde ürün tipine göre kök yüzey alanı değerlerinde farklı düzeylerde artışların meydana geldiğini bildirmişlerdir. Araştırma sonuçları, belirtilen literatür ile uyumluluk göstermiştir. Bu araştırma sonucunda yaprak lahana ve brokoli türlerinde hem toplam kök uzunluğu ve hem de kök yüzey alanı değerlerinin diğer türlere göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Johnson ve ark. [24], bitki çeşitlerinde köklerin yüzey alanı ve kök uzunluğunun yüksek bir değere sahip olmasının, daha derin ve geniş toprak yüzey alanından faydalanmaları açısından önemli olduğunu saptamışlardır.



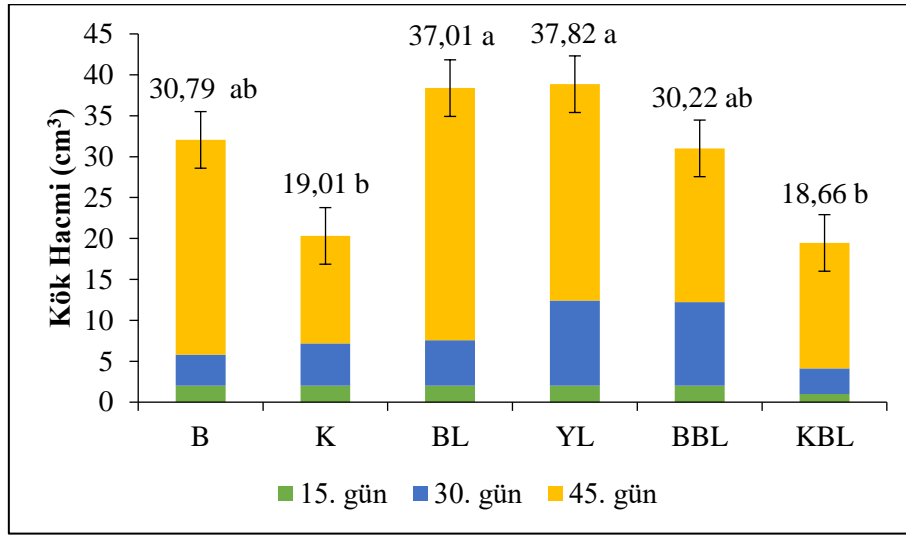
Şekil 2 Lahanagil türlerinde 15 gün aralıklarla ölçülen toplam kök yüzey alanı (cm²) değerlerinin değişimleri

Fig 2 Changes in total root surface area values (cm²) measured at 15-day intervals from planting in *Brassica* vegetables

Toplam kök hacmi değerlerinin değişimi

Üretimde göz önünde bulundurulması gereken bir diğer hususta kök hacmi miktarı olarak ön plana çıkmaktadır [16]. Karaağaç ve ark. [15], bitkilerin farklı stres koşullarında toplam kök uzunluğu ve kök hacminde değişiklikler yaparak farklı kök adaptasyonları gösterdiğini belirtmişlerdir. Araştırma sonucunda lahanagil grubu sebze türlerine ait çeşitler arasında kök hacmi değerleri yönünden istatistiksel açıdan önemli düzeyde değişimin olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). Ortalama kök hacmi değerleri, türlere göre 18.66 cm³ (kırmızı baş lahana) ile 37.82 cm³ (yaprak lahana) arasında değişim göstermiştir. Birçok araştırmacı tarafından yapılan farklı çalışmalarda sebze türlerinde toplam kök hacmi değerlerinin türlere ve genotiplere göre farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Li ve ark. [25], marulda genotipin, kök hacmi kriteri açısından çok önemli olabileceğini ve 45 günlük marul bitkilerinde kök hacminin 1.64-7.24 cm³ arasında farklılaştığını belirtmişlerdir. Sarıbaş ve ark. [19], patlıcan anaç adaylarında 50. gün sonunda kök hacmi değerlerini 40.5-96.8 cm³ olarak ölçmüşlerdir. Karaağaç ve ark. [15], *C. annuum* türüne ait biber genotiplerinde kök hacmi değerlerinin 33.15 cm³ ile 40.55 cm³, *C. baccatum* türünde 39.03 cm³ ile 73.91 cm³ ve *C. chinense* türüne ait biber genotiplerinde ise 39.05 cm³ ile 71.38 cm³ arasında dağılım meydana geldiğini

belirtmişlerdir. Çalışma sonuçları ile belirtilen bu literatürler arasındaki farklılıklar, kantitatif analizlerin yapıldığı gün sayısı ve tür farklılığından kaynaklanmaktadır.



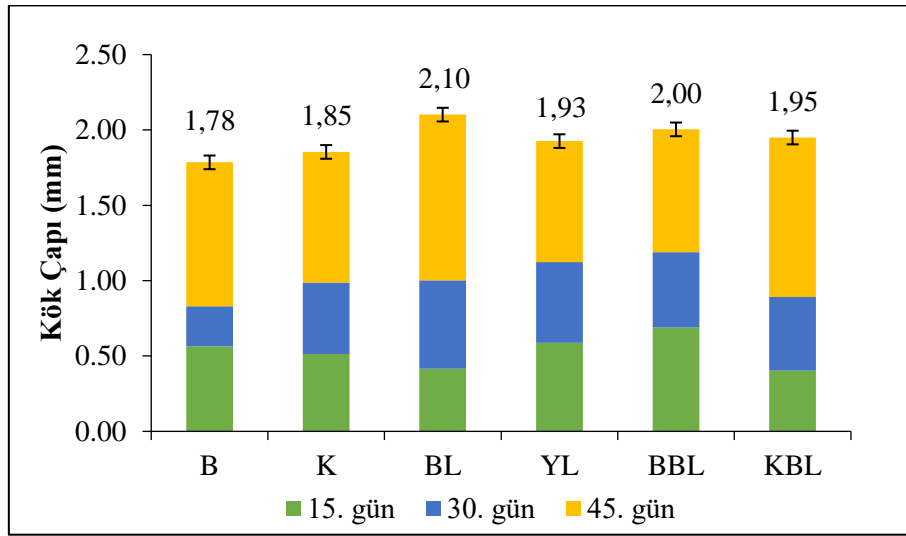
Şekil 3 Lahanağil türlerinde dikimden sonra 15 gün periyotlar ile ölçülen toplam kök hacmi (cm³) değerleri

Fig 3 Changes in total root volume values (cm³) measured at 15-day periods after planting in *Brassica* vegetables

Kök çapı değerlerinin değişimi

Saçak köke yatkınlığın önemli bir yansıması olan kök çapı değerinin düşük olması, kökün emme kabiliyetini arttırmaktadır [26, 19]. Araştırmada lahanana grubu sebze türlerinde 45. gün sonunda, ortalama kök çapının 1.78 mm (brokoli)- 2.10 mm (Brüksel lahanası) arasında dağılım gösterdiği saptanmıştır (Şekil 4). İncelenen türler arasında ortalama kök çapı değerleri bakımından istatistiksel olarak önemli düzeyde bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Diğer sebze türlerinde de kök çapı değerleri yönünden farklı sonuçlar elde edilmiştir. Peláez-Anderica ve ark. [27], *Capsicum* türlerine ait yabani, yerel ve ticari çeşitlerden meydana gelen 17 genotipte, yaklaşık kök çapı verilerinin 0.48 mm ile 0.75 mm aralığında belirlendiği saptanmıştır. Kandemir ve ark. [7], Yedikule tipi ve kıvrıkcık marul çeşitleri arasında kök çapı değerlerinin, 0.65-0.83 mm arasında dağılım gösterdiğini ve kök çapı değeri bakımından Yedikule marul çeşitleri arasında istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p < 0.01$) farklılık olduğunu, fakat Kıvrıkcık marul çeşitleri arasında ise belirgin düzeyde bir farklılığın olmadığını tespit etmişlerdir. Kantitatif kök analizlerinde dikimden itibaren ilk 15 günde lahanagil türlerinin kök çaplarının birbirlerine çok yakın değerlerde olduğu kaydedilmiştir. Araştırmada 45. gün

sonunda kök çapı artış hızı yönünden en yüksek artışlar; 5.0 kat artışla Brüksel lahanası ve 4.9 kat artışla kırmızı baş lahanada gerçekleşmiştir (Şekil 4). En düşük artış hızı 2.9 kat ile beyaz baş lahanada belirlenmiştir. Bu sonuç, lahanagil grubu türleri arasında kök çapları gelişimleri yönünden oluşan değişimlerin farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Lovelli ve ark. [28] ise kök uzunluk miktarının yükselmesi ile kök çapının düştüğünü dolayısıyla su tüketim verimliliğini yükselttiğini belirlemiştir.

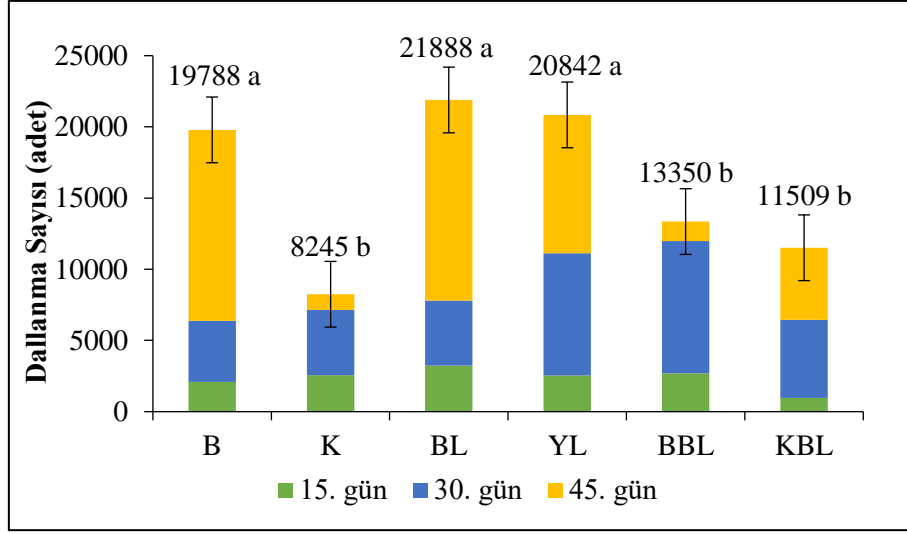


Şekil 4 Lahanagil türlerinde dikimden sonra 15 günlük periyotlarla belirlenen kök çapı (mm) değerleri

Fig 4 Changes in root diameter values (mm) measured at 15-day periods after planting in *Brassica* vegetables

Kök dallanma ve kök kesişim sayıları yönünden incelenmesi

Bitkilerde köklerde meydana gelen uç sayısı, dallanma ve kesişme oranları yükseldikçe bitki besin absorbe edebilme oranlarında önemli miktarda yükselmeler meydana gelmektedir [29, 19]. Lahanagil grubu sebze türlerinde, kök dal sayısı bakımından değerlendirme yapıldığında; çok önemli ($p < 0.05$) düzeyde farklılıkların ortaya çıktığı saptanmıştır (Şekil 5). Araştırmada en yüksek kök dallanma sayısı; sırasıyla Brüksel lahanası (21888 adet), yaprak lahana (20842 adet) ve brokoli (19788 adet) türlerinde belirlenmiştir. En düşük kök dal sayısı ise karnabahar (8245 adet) ve kırmızı baş lahanada (11509 adet) tespit edilmiştir.



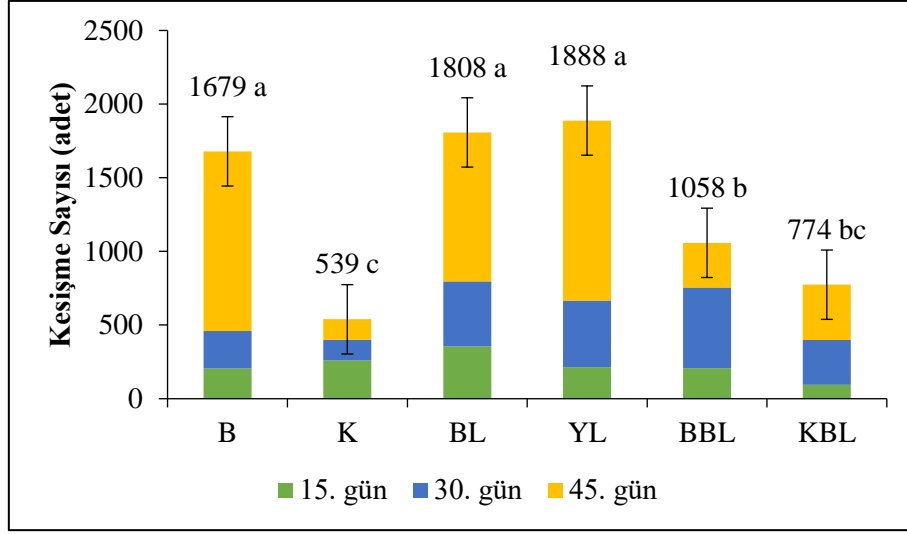
Şekil 5 Lahanagil türlerinde dikimden 15 gün aralıklarla kök dallanma sayısı (adet) değişimi

Fig 5 Changes in root forks (unit) measured at 15-day intervals from planting in *Brassica* vegetables

Araştırma sonucunda lahanagil grubu sebze türlerinde köklerde oluşan kesişim sayısı bakımından; türlerin kesişme sayısına önemli katkısının olduğu tespit edilmiştir (Şekil 6). En yüksek kök kesişim değerleri sırasıyla yaprak lahana (1888 adet), Brüksel lahanası (1808 adet) ve brokoli (1679 adet) türlerine ait olup istatistiksel olarak aynı grupta yer almışlardır. En düşük kök kesişme sayısı ise karnabaharda (539 adet) belirlenmiştir. Araştırma sonucunda; genel olarak Brüksel lahanası, yaprak lahana ve brokoli köklerinin; dallanma ve kesişim sayıları yönünden diğer lahanagil türlerinden daha fazla olduğu belirlenmiştir.

Köklenme parametreleri arasındaki korelasyon ilişkisinin incelenmesi

Çalışmanın son kısmında lahanagil türlerinde incelenen çeşitlerde fenotipik köklenme parametreleri arasında korelasyon analizi yapılmıştır. Kök uzunluğu ile kök yüzey alanı arasında pozitif yönde ve çok önemli düzeyde ilişkinin olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda kök uzunluğu parametresinin hem dallanma hem de kök kesişimi ile pozitif korelasyon gösterdiği ve ilişki düzeylerinin önemli olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2). Lahanagil bitkilerinde kök uzunluğu artıp, kök çapı azaldıkça; kök çeperleri artmakta buna rağmen, kök hacim değerleri azalış göstermiştir. Benzer ilişki, Sarıbaş ve ark. [19] tarafından patlıcan anaçlarında yapılan kök analiz çalışmasında ortaya konulmuştur.



Şekil 6 Lahanagil türlerinde dikimden 15 gün aralıklarla kök kesişim sayısı (adet) değişimi

Fig 6 Changes in crossing roots (unit) measured at 15-day intervals from planting in *Brassica* vegetables

Araştırma sonucunda kök yüzey alanı arttıkça, kök hacmi, dallanma ve kök kesişimi arasında pozitif yönde çok önemli düzeyde bir ilişkinin olduğu saptanmıştır. Kök çapı ile diğer kök özellikleri arasında istatistiki açıdan dikkate değer bir korelasyon ilişkisi tespit edilmemiştir. Ayrıca kök kesişimi parametresinin kök çapı ile negatif korelasyon gösterirken, kök hacmi unsuru ile istatistiki olarak az düzeyde önemli ilişkili olduğu bulunmuştur. Bütün kök verileri beraber incelendiğinde lahanagillerde kök uzunluğu ve kök yüzey alanı kriterlerinin diğer köklenme unsurları üzerine istatistiksel olarak çok önemli düzeylerde etkili olduğu belirlenmiştir.

Tablo 2 Lahanagil türlerinde kök mimarisi parametreleri arasındaki korelasyon ilişkisi

Table 2 Correlation relationship between root architecture parameters in *Brassica* vegetables

	Kök çapı (mm)	Kök yüzey alanı (cm ²)	Kök hacmi (cm ³)	Dallanma sayısı (adet)	Kök kesişme sayısı (adet)
Kök uzunluğu (cm)	-0.38	0.73**	0.51	0.78**	0.79**
Kök çapı (mm)		0.04	0.42	-0.05	-0.16
Kök yüzey alanı (cm ²)			0.85**	0.78**	0.75**
Kök hacmi (cm ³)				0.71**	0.64*
Dallanma sayısı					0.95**

**p<0.01

Sonuç

Bitkilerde var olan kök mimarisi yapısı, su ve besin alımı gibi farklı fizyolojik görevlere önemli miktarlarda tesir ederek, özellikle stres etmenleri altında bitki büyümesi, gelişmesi, verimliliği ve ürün kalitesi açısından önemli düzeyde etkili olmaktadır. *Brassicaceae* familyasında yer alan sebze türleri, suya orta derece duyarlı veya hassas olarak nitelendirilmektedir. Lahana grubu sebze türlerinin su ihtiyacı yüksektir, bu nedenle kuraklıktan önemli ölçüde etkilenmektedir. Toprakta nem seviyeleri düştüğünde büyüme fonksiyonunu durdururlar. Özellikle fide dönemindeki kuraklık stresi, bitki gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle bitkilerin strese girmesini önlemek için toprak analiz sonuçlarına göre sulama ve gübreleme uygulamalarının dikkatli bir şekilde uygulanması gereklidir. Ayrıca lahanagil sebze türlerinin yetiştiriciliğinde yüksek sıcaklık stresi, su kısıtı veya kuraklık durumunda bitkilerde topraktan suyu ve besin maddelerini etkin ve etkili bir düzeyde olabilen kök mimarilerinin belirlenmesi problemleri minimum seviyeye düşürecektir.

Araştırma sonucunda lahanagil sebzelerde türler arasında toplam kök uzunluğu, kök yüzey alanı, kök hacmi değerleri ile kökte dallanma ve kök kesişim sayıları yönünden fenotipik çeşitliliğin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlar, lahanagil grubu sebze türlerinin yetiştiriciliğinde toplam kök uzunluğu ve kök yüzey alanının diğer kök mimarisi parametrelerine göre daha önemli düzeyde etkili kök mimarisi unsurları olduğunu göstermiştir. Araştırma sonucunda elde edilen köklenme mimarisi sonuçlarının, gelecekte lahanagil grubu türlerin yetiştiriciliğinde su ve gübre kullanımının etkinlik durumuna ilişkin yapılacak bilimsel çalışmalarda önemli temel bilgiler ve kazanımlar sağlayacağı düşünülmektedir.

Abbreviations/Kısaltmalar

cm: Centimeter/Santimetre, cm²: Square centimeter/Santimetre kare, cm³: Cubic centimeter/Santimetre küp, mm: Millimetre/Milimetre, vb.: Et cetera/Ve benzeri, NH₄⁺: Ammonium/Amonyum, NO₃⁻: Nitrate/Nitrat, °C: Centigrade degrees/Santigrat derece, ver.: Version/Versiyon, dpi: Dot per inch/İnç başına nokta, ark.: Et al/Arkadaşları, *C. annuum*: *Capsicum annuum*, *C. baccatum*: *Capsicum baccatum*, *C. chinense*: *Capsicum chinense*.

Acknowledgments / Teşekkürler

We gratefully acknowledge the support of the Faculty of Agriculture at Ondokuz Mayıs University. Desteklerinden dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesine teşekkürlerimizi sunarız.

Funding / Fon desteği

The author did not receive support from any organization for the submitted work.

Yazar, gönderilen çalışma için herhangi bir kuruluştan destek almamıştır.

Data Availability statement / Veri Kullanılabilirliği bildirim

The author confirms that the data supporting this study are cited in the article.

Yazar, bu çalışmayı destekleyen verilere makalede atıfta bulunulduğunu onaylamaktadır.

Compliance with ethical standards / Etik standartlara uyum

Conflict of interest / Çıkar çatışması

The author declare no conflict of interest.

Yazar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Ethical standards / Etik standartlar

The study is proper with ethical standards.

Çalışma etik standartlara uygundur.

Authors' contributions / Yazar katkıları

The authors declare that they have contributed equally to the article.

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.



Kaynakça

1. Balkaya, A., O. Karaağaç, and S. Atasoy, Geçmişten Geleceğe Türkiye'de Lahanagil Sebzelelerinin Üretimi, Sorunları ve Çözüm Önerileri, in Farklı Yönleriyle Lahanagiller Üzerine Bilimsel Çalışmalar, F. Yaşar and Ö. Üzal, Editors. 2023, İksad Publishing House. Türkiye. p. 3-36.
2. Ekinci, M., S. Örs and E. Yıldırım, Lahanagil Sebze Türlerinde Sulama ve Su Stresi, in Farklı Yönleriyle Lahanagiller Üzerine Bilimsel Çalışmalar, F. Yaşar and Ö. Üzal, Editors. 2023, İksad Publishing House. Türkiye. p. 181-214.
3. Balkaya, A., "Bahçe Tarımı-II. Ünite 7. Lahana, Karnabahar, Brokoli, Yetiştiriciliği". II. Basım, 2016. Anadolu Üniversitesi Yayını No:2358. Açık Öğretim Fakültesi Yayını No:1355.
4. Kasım, M.U., and N. Sürmeli. Brüksel lahanası yetiştiriciliği. Atatürk Bahçe Kùltürleri Merkez Araştırma Enstitüsü, 2003. Yayın No: 87, Yalova p. 19.
5. Murat Doğru, Ş., and A. Çilingir, A. Balkaya, Brokoli yetiştiriciliği. Tarım Gündem, 2016. 6 (34): p. 20-24.
6. Bektaş, H., The effect of salt stress on root development and architecture in common grass pea (*Lathyrus sativus* L.). Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi, 2021. 23: p. 793-799.
7. Kandemir, D., et al., Kıvrıkcık ve yedikule tipi marul çeşitlerinin kök gelişimi ve kök sistemi mimarisi yönünden incelenmesi. Manas Journal of Agriculture Veterinary and Life Sciences, 2021. 11(2): p. 120-130.
8. Hanson, B.R., D.M. May, and L.J. Schwankl, Effect of irrigation frequency on subsurface drip irrigated vegetables, 2003. Department of Land, Air and Water Resources, University of California, Davis, CA.
9. Adeniran, K.A., et al., Water requirements of some selected crops in kampe dam irrigation project. Australian Journal of Agricultural Engineering, 2010. p. 119-125.
10. Bahadur, A., et al., Physiological and biochemical basis of drought tolerance in vegetables. Vegetable Science, 2011. 38 (1): p. 1-16.
11. Bute, A., et al., The most suitable irrigation methods in cabbage crops (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*): A review. Scientific Papers. Series B. Horticulture, 2021. 65(1): p. 399-405.
12. Jung, J. K., and S. McCouch, Getting to the roots of it: genetic and hormonal control of root architecture. Frontiers in Plant Science, 2013. 186(4): p. 1-32.
13. Lopez-Bucio, J., and A. Cruz-Ramirez, L. Herrera-Estella, The role of nutrient availability in regulating root architecture. Current Opinion in Plant Biology, 2003. 6: p. 280-287.

14. Sarıbaş, H.Ş., Aşılı patlıcan üretiminde genetik kaynakların anaç ıslah programında değerlendirilmesi ve yerli hibrit anaçların geliştirilmesi. 2019, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doktora Tezi.
15. Karaağaç, O., et al., *Capsicum* türlerinin kök yapılarının incelenmesi ve kök özellikleri yönünden karşılaştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 2020. 30 (2): p. 266-279.
16. Özgen, R., and A. Balkaya, Düşük sıcaklığa tolerant hibrit biber çeşit adaylarının kök mimarileri. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 2022. 12(3): p. 1213-1223.
17. Villordon, A.Q., and C.A. Clark, Variation in virus symptom development and root architecture attributes at the onset of storage root initiation in 'Beauregard' sweet potato plants grown with or without nitrogen. PLoS One, 2014. 9: e107384.
18. Hu, L., et al., Moderate ammonium: nitrate alleviates low light intensity stress in mini Chinese cabbage seedling by regulating root architecture and photosynthesis. Scientia Horticulturae, 2015. 186: p. 143-153.
19. Sarıbaş, H.Ş., et al., Yerli patlıcan anaçlarının (*Solanum melongena* x *Solanum aethiopicum*) köklenme potansiyeli ve fenotipik kök mimarisi. Black Sea Journal of Agriculture, 2019. 2 (3): p. 138-146.
20. Wiesler, F., and W.J. Horst, Root growth of maize cultivars under field conditions as studied by the core and method and relationships to shoot growth. Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde, 1994. 157 (5): p. 351-358.
21. Comas, L., et al., Root traits contributing to plant productivity under drought. Frontiers in Plant Science, 2013. 4: p. 442.
22. Özgen, T., Patlıcan (*Solanum melongena* L.) Genotiplerinin *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae*'ya dayanıklılık düzeylerinin ve kök yapılarının incelenmesi. 2019. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
23. Zhu, S., et al., Effects of NaCl stress on seed germination, early seedling growth and physiological characteristics of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.). African Journal of Biotechnology, 2011. 10(78), p. 17940- 17947.
24. Johnson, W.C., et al., Lettuce, a shallow rooted crop, and *Lactuca serriola*, its wild progenitor, differ at QTL determining root architecture and deep soil water exploitation. Theoretical and Applied Genetics, 2000. 101(7): p. 1066-1073.
25. Li, Q., et al., Growth responses and root characteristics of lettuce grown in aeroponics, hydroponics, and substrate culture. Horticulturae, 2018. 4(4): p. 35.
26. Eissenstat, D.M., Costs and benefits of constructing roots of small diameter. Journal of Plant Nutrition, 1992. 15(6-7): p. 763- 782.
27. Peláez-Anderica, E., et al., Root seedling morphology diversity in *Capsicum* spp. bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine Cluj-Napoca. Horticulture, 2011. 68 (1): p. 535-536.
28. Lovelli, S., et al., Specific root length and diameter of hydroponically-grown tomato plants under salinity. Journal of Agronomy, 2012. 11: p. 101-106.
29. Craine, J.M., Competition for nutrients and optimal root allocation. Plant and Soil, 2006. 285: p. 171-185.

Erarşlan, Z. B. and S. Kultur, *Doronicum* Cinsinin Taksonomisi, Geleneksel Kullanımı ve Terapötik Önemi: Derleme. J. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2023. 6(2): p. 208-244. DOI: 10.38001/ijlsb.1228983

Doronicum Cinsinin Taksonomisi, Geleneksel Kullanımı ve Terapötik Önemi: Derleme

Zeynep Busra Erarşlan^{1,2*} , Sukran Kultur³ 

ÖZET

Asteraceae familyası 485'i endemik olmak üzere içerdiği 1311 tür ile ülkemiz florasında bulunan tür sayısı bakımından en zengin familyadır. Familyanın Senecioneae tribusunda yer alan *Doronicum* L. cinsi son verilere göre ülkemizde 9 tür ve 1 alt tür ile temsil edilmekte olup endemizm oranı %40'tır. Ülkemizde bulunan türlerin genellikle yayılış alanları dardır. Çoğunlukla Kuzey ve Doğu Anadolu dağlarının nemli bölgelerinde yetişmektedir. Cins üzerinde en son kapsamlı çalışmalar 2000'li yılların başında gerçekleştirilmiş olup türler üzerinde yapılan bazı morfolojik ve moleküler çalışmalarla cinsin sistematigi aydınlatılmaya çalışılmıştır. Elde edilen veriler sonucunda Türkiye'de yer alan bazı türler sinonim seviyesine düşürülmüştür. Avrupa'da *Doronicum* türlerinden halk arasında kalp hastalıkları, epilepsi, malarya, sindirim sistemi hastalıkları ve akrep-yılan zehirlenmeleri gibi çeşitli sağlık sorunlarının tedavisinde yararlanılmaktadır. Ülkemizde *D. orientale* (Acımık, Baylıkotu, Kaplanotu, Sarı papatya, Sarı çiçek) türünün taze kökleri kısırlık tedavisinde kullanılırken, topraküstü kısımlarının dekoksasyonu dahilen diüretik olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca büyük ve gösterişli çiçeklerinden dolayı Avrupa'da süs bitkisi olarak yetiştirilmektedir. *Doronicum* türlerinin topraküstü kısımları ve kök ekstrelerinin pirolizidin alkaloidleri, flavonoidler, kumarinler, terpenler, benzofuranlar (tremeton türevleri) gibi bileşikler içerdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Uçucu yağın içeriğinde ise seskiterpen ve monoterpen bileşikler öne çıkmaktadır. Günümüze kadar türler üzerinde antienflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal, antitümoral, hepatoprotektif, üreaz inhibitör, α -amilaz inhibitör, α -glukozidaz inhibitor ve kolinesteraz inhibitör aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar zehirli bitkiler olarak bilinseler de *Doronicum* türlerinin kanıtlanmış biyolojik aktiviteleri ve içerdikleri biyoaktif bileşikler ile bitkisel ilaç olarak kullanılabilecek aday molekülleri içerdikleri düşünülmektedir. Türler üzerinde gerçekleştirilecek ileri çalışmalar ile özellikle Alzheimer hastalığı ve çeşitli kanser türleri için tedaviyi destekleyecek yeni bileşiklerin keşfedilebileceği ümit edilmektedir.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

03 Ocak 2023

Kabul

02 Şubat 2023

ANAHTAR KELİMELER

Asteraceae,
alzheimer,
Doronicum,
Senecioneae,
taksonomi

¹ Medical Promotion and Marketing Program, Hamidiye Vocational School of Health Services, University of Health Sciences, 34668, Istanbul, Turkey

² Institute of Health Sciences, Istanbul University, Istanbul University, 34116, Istanbul, Turkey

³ Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmacy, Istanbul University, 34116, Istanbul, Turkey

*Corresponding Author: Zeynep Büşra Erarşlan, e-mail: zeynepbusra.erarslan@sbu.edu.tr

Taxonomy, Traditional Use and Therapeutic Importance of Genus *Doronicum*: A Review

ABSTRACT

Asteraceae family is the richest family in terms of the number of species in our country's flora, with 1311 species, 485 of which are endemic. Genus *Doronicum* L., which is in the tribe Senecioneae, is represented by 9 species and 1 subspecies in our country according to the latest literature, with the 40% endemism rate. The distribution areas of the species grown in Turkey are narrow and they mostly found in the humid regions of the North and East Anatolian mountains. The last comprehensive studies on the genus were carried out in the early 2000s, and the systematics of the genus were tried to be clarified with some morphological and molecular studies on the species. As a result of the data obtained, some species in Turkey have been reduced to synonymous. *Doronicum* species are used in the treatment of health issues such as heart diseases, epilepsy, malaria, digestive system diseases and scorpion-snake poisonings in Europe,. In our country, the fresh roots of *D. orientale* (Bitter, Baywort, Tigergrass, Yellow daisy, Yellow flower) are used in the treatment of infertility, while the decoction of the above-ground parts is used as a diuretic. It is also grown as an ornamental plant in Europe due to its large and spectacular flowers. The aerial parts and root extracts of *Doronicum* species have been shown in many studies to contain bioactive compounds such as pyrrolizidine alkaloids, flavonoids, coumarins, terpenes, benzofurans (tremetone derivatives). Sesquiterpene and monoterpene compounds are prominent in the content of essential oil. Anti-inflammatory, antioxidant, antimicrobial, antitumoral, hepatoprotective, urease inhibitor, α -amylase inhibitor, α -glucosidase inhibitor and cholinesterase inhibitor activity studies have been conducted up to the present days. Although they are known as poisonous plants, *Doronicum* species are thought to contain candidate molecules that can be used as herbal medicine with proven biological activities and bioactive compounds. It is anticipated that future studies will discover new compounds effective in the treatment of Alzheimer's disease and various types of cancer.

ARTICLE HISTORY

Received

3 January 2023

Accepted

2 February 2023

KEYWORDS

Asteraceae,
alzheimer,
Doronicum,
Senecioneae,
taxonomy

Senecioneae Cass. Tribusu

Senecioneae tribusu Asteraceae familyasında yer alan en büyük tribuslardan biridir. Dünya'da içerdiği toplam 151 cins ve 3000'den fazla tür ile geniş yayılış gösterir. Özellikle Güney Afrika (25 cins), tribusta yer alan cins sayısı bakımından önde gelmektedir. Onu Meksika (18), Peru (17) ve Kolombiya (15) izlemektedir [1]. Ülkemizde ise Senecioneae tribusu 3 alt tribus ve 8 cins ile temsil edilmektedir [1]:

1- Alt tribus: Tussilagininae Dumort.

a) *Doronicum* L.

b) *Petasites* Mill.

c) *Tussilago* L.

d) *Ligularia* Cass.

2- Alt tribus: Tephroseridinae C.Jeffrey & Y.L.Chen

a) *Tephroseris* (Rchb.) Rchb.

3- Alt tribus: Senecioninae Dumort.

a) *Senecio* L.

b) *Crassocephalum* Moench

c) *Adenostyles* Cass.

Cassini'nin ilk çalışmasına göre Senecioneae tribusunda *Cacalia* L., *Cineraria* L., *Othonna* L. ve *Senecio* cinsleri yer almıştır [3]. Ancak son çalışmasında Cassini, tribusa *Arnica* cinsi ile birlikte *Doronicum* cinsini de ekleyerek tribusta yer alan toplam cins sayısını 35'e çıkarmıştır [4]. Bremer [1]'in çalışmasında tribusta toplam 120 cins yer almaktadır. Nordenstam [6] ise tribus altında toplam 151 cins olduğunu belirlemiştir. İlerleyen çalışmalarla birlikte Senecioneae tribusu altında çeşitli alt tribuslar tanımlanmıştır. Son verilere göre Blennospermatinae, Senecioninae ve Tussilagininae olmak üzere üç alt tribus bulunmaktadır [5,7]. Morfolojik açıdan bakıldığında tribusta yer alan türler kapitulumun etrafında yer alan braktelerin şekil ve pozisyonu bakımından karakteristiktir. Bu involukrum, genellikle şekil ve büyüklük bakımından aynı olan tek sıra braktelerden oluşmuştur. Buna karşın türler yaprak şekillerinde, tüy örtüsünde, çiçek durumunda ve çiçek renginde dikkat çekici bir morfolojik çeşitlilik göstermektedir [7]. Bremer [1] tribusun morfolojik çeşitliliğini ve tür sayısının fazlalığını türlerin zehirli pirolizidin alkaloidleri içermesine bağlamaktadır.

Yakın zamanda yapılan moleküler çalışmalarda *Doronicum* cinsinin Asteroideae alt familyasında Panero tarafından yeni tanımlanan *Doroniceae* Panero tribusu altında yer alması gerektiği önerilmiştir [8,9]. Hatta bazı çalışmalarda *Doronicum*'un Senecioneae tribusu altında yeni bir alt tribus olarak *Doronicinae*'ye yerleştirilmesi gerektiği önerilmiştir [1,9]. *Doronicum* cinsinin hangi tribusta yer alması gerektiği henüz kesinleşmemiş olmakla birlikte günümüzde Senecioneae tribusu altında değerlendirilmektedir [1].

***Doronicum* Cinsinin Genel Özellikleri**

Kısa ve genellikle yatay olan rizoma sahip çok yıllık otsu bitkilerdir. Taban yapraklar, eğer bulunuyorsa, ovat-kordat veya oblong, petiyollü; gövde yaprakları kısa petiyollü veya petiyolsüz, amplexikauldır. Kapitulum heterogam, radiattır. Bitki tek veya dallanmış gövdede genellikle 2-çok sayıda kapitulum taşır. İnvolutrum basık-yarı küremsi; fillariler 2-3 sıralı, hemen hemen birbirlerinin aynısı, otsudur. Reseptakulum

konveks, pilozdur. Kapitulumun çevresindeki çiçekler dilsî ve sarî renklidir. Kapitulumun ortasındaki çiçekler tüpsü ve sarî renklidir. Akenler oblong-turbinat, 10 adet çıkıntı bulunur. Dilsî çiçeklerin akenleri genellikle papus taşımazlar, tüpsü çiçeklerin akenleri ise genellikle ince skabrit tüylerden oluşan papus taşırlar [11]. *Doronicum* cinsinin sistematikteki yeri şu şekildedir [1,12,13]:

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Divisio: Magnoliophyta

Classis: Magnoliopsida

Subclassis: Asteridae

Superorder: Asterales

Order: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Tribus: Senecioneae

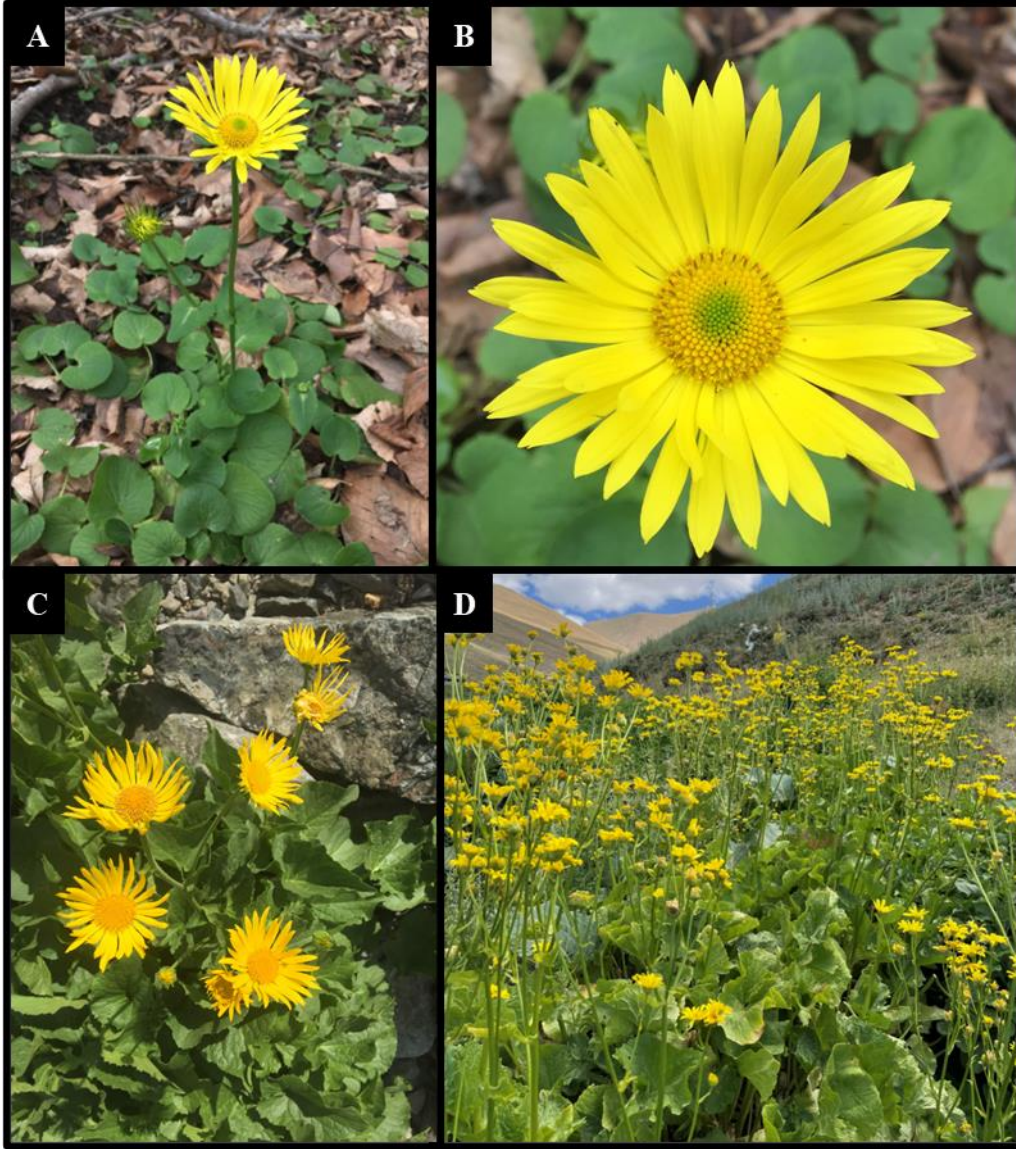
Genus: *Doronicum* (Şekil 1)

Doronicum türlerinde bulunan **rizomun** yapısı türler arasında ayırt edici karakter sağlamaktadır. Rizom etli veya odunsu veya bir miktar odunsu olabilir. Cavillier [14] tarafından türler rizom yapısına göre "tubèreux" (etli) ve "non tubèreux" (odunsu) olarak iki gruba ayrılmıştır. Avrupa'da yayılış gösteren türlerde etli rizom yapısı görülürken Asya'da yayılış gösteren türlerde genellikle odunsu rizom görülmektedir. Bazı türlerin rizomlarında kısa tüyler bulunabilir. *Doronicum orientale* Hoffm. gibi türlerde ise bu tüyler uzun, bol miktarda, karışık ve sarî-beyaz renkli olup rizomun büyük bir kısmını kaplamaktadır. Tüm *Doronicum* türlerinde **gövde** dik ve içi boş silindirik şeklindedir. Gövdede hafifçe boyuna yollar bulunur. *Doronicum austriacum* Jacq. gibi türlerde zikzaklı gövde görülebilmektedir. Bitkide eğer çok sayıda kapitulum bulunuyorsa gövde üst kısımlarda dallanma gösterir. Bitkide bulunan toplam kapitulum sayısı o tür için karakteristiktir [13].

Yapraklar basit ve alternan dizilişlidir. Her ne kadar Cavillier tarafından [14] yaprak karakterleri cinsin taksonomisinde kullanılmış olsa da türler arasındaki ayırımında sınırlı bilgi sağlamaktadır. Yaprak boyut ve şekli bazen tek bir türe ait bir örnekte bile değişiklik göstermektedir. Bu yüzden türlerin tayini için örneklerde hem taban yapraklarının hem

de gövde yapraklarının bulunması elzemdir. Gövde yaprakları gövdede buldukları yere göre alt, orta ve üst gövde yaprakları olarak ayırt edilmektedir. Bazı türlerde çiçeklenme zamanında taban yaprakları ve alt gövde yaprakları bulunmayabilir. Taban yaprakları petiyollü olup petiyollerin boyları ve enleri türlerde farklılık gösterebilir. Gövde yapraklarında üst gövdeye doğru petiyolsüz yapraklar görülmeye başlar. Orta ve üst gövde yaprakları genellikle panduriform şekillidir. En üstte yer alan yapraklar ise genellikle küçük ve brakte benzeridir. **Kapitulum** radiat ve yarı küremsidir. Çiçekler hepsi aynı renkte olup sarı veya yeşilimsi sarı renklidir. Kapitulum çapı 8-15 mm'den 7-8 cm'e kadar değişebilir. Dilsî çiçekler sadece dişî organ bulundururken tüpsü çiçekler hermafroditlerdir. **Fillariler** otsu ve 2-3 sıralıdır. Dışta yer alan fillariler içtekilerden daha geniştir. Fillari şekli, kenarı, tepesi ve tüylülüğü türler arasında farklılık gösterir. Fillarilerin üst yüzeyleri tüm türlerde tüysüzdür [13].

Bazı *Doronicum* türlerinde dimorfik **sipsela** (aken) (heterokarpi) görülmektedir. Türkiye'de doğal olarak yetişen tüm *Doronicum* türlerinde heterokarpi görülür. Bu durumda dilsî çiçeklerin meyvesinde papus bulunmaz ve tüpsü çiçeklerin meyvesinden daha büyüktürler. Heterokarpi durumu *Senecio*, *Crepis* L., *Erigeron* L. gibi Asteraceae familyasında bulunan bazı türlerde ve Apiaceae, Poaceae, Caryophyllaceae familyalarında görülebilir [13]. Bir bitkinin meyvelerinin dimorfizm göstermesi türlerin farklı habitatlara yayılmasını kolaylaştıran bir özellik olarak görülmüştür. Örneğin papus taşıyan akenler rüzgar yolu ile dağılabilirken papussuz akenler ana bitkinin yakınında yayılış gösterebilir. Sipselalar silindirik-obovat şekillidir ve 10 adet çıkıntı taşırlar. Eğer meyve üzerinde tüy örtüsü varsa bu genellikle çıkıntılı kısımlarda yoğunlaşmıştır [13]. Meyvede görülen tüyler ikiz tüyler olup iki paralel hücre ve daha küçük bir taban hücresi olmak üzere toplam üç hücrelidirler. Bu tüyler Senecioneae tribusunda bulunan türlerin akenlerinde de yaygındır [1]. **Tüy örtüsü** Cavillier [14] tarafından tür seviyesinde önemli bir taksonomik karakter olarak kabul edilmiştir. Türlerde bulunan tüylerin tipleri ve bitkide dağılımları özellikle *Macrophylla* Cavill. alt seksiyonunda bulunan türlerin tayini için önemlidir [15]. Ancak tüy örtüsünün yoğunluğu aynı türde farklı örneklerde bile değişebileceğinden tayinde göz önünde bulundurulmamalıdır. *Doronicum* türlerine ait örneklerde tüy örtüsü genellikle bitkinin üst kısımlarında, yaprakların alt yüzeyinde, damar bölgesinde ve kenarlarında ayrıca dıştaki fillarilerin taban kısımlarında daha yoğundur [13].



Şekil 1 Bazı *Doronicum* türleri. A-B. *D. orientale*; C. *D. macrophyllum* subsp. *macrophyllum*; D. *D. maximum*

Fig 1 Some *Doronicum* species. A-B. *D. orientale*; C. *D. macrophyllum* subsp. *macrophyllum*; D. *D. maximum*

***Doronicum* Cinsinin Taksonomik Tarihçesi**

İlk olarak Linnaeus [16] tarafından Species Plantarum'da *Doronicum* cinsi altında dört tür tanımlanmış ancak günümüzde bu türlerden sadece *Doronicum pardalianches* L. ve *Doronicum plantagineum* L. bu cinste kabul edilmektedir. Diğer iki tür ise *Senecio* ve *Aster* cinslerinde yer almaktadır. Ayrıca, Linnaeus [16] tarafından tanımlanan *Arnica scorpioides* L., Lamarck [17] tarafından *Doronicum* cinsi altında isimlendirilmiştir.

Linnaeus öncesi bazı yazarlar *Senecio*, *Aster* ve *Arnica* L. cinslerine ait bazı türleri *Doronicum* ile karıştırmışlardır. Özellikle *Arnica* ile *Doronicum* arasındaki genel morfolojik benzerlik 1970'lere kadar cinslerin birbirine yakın olduğunu düşündürmüştür [13].

Bazı *Doronicum* türlerinde görülen sipsela dimorfizmi, cinsin taksonomik tarihinde önemli rol oynamıştır. Lamarck [17] heterokarpik türleri "arniques", homokarpik türleri ise "doronics" olarak adlandırarak iki grup altında toplamıştır. Necker [18], homokarpik türleri *Aronicum* Neck. cinsi altında sınıflandırmayı önermiş ve bu sınıflandırma 19. yüzyılda geniş kabul görmüştür. Ancak bazı yazarlar *Aronicum*'u *Doronicum*'un bir alt seksiyonu olarak kabul etmişlerdir [13]. Bentham ve Hooker [1] ise *Aronicum*'u *Doronicum* cinsinin sinonimi olarak kabul etmiştir ve günümüzde bu sınıflandırma geçerliliğini korumaktadır.

Cassini [1]'nin *Grammarthron* Cass. cinsi altında tanımladığı *Grammarthron biligulatuma* Cass. ve *Grammarthron scorpioides* (L.) Cass. türleri daha sonraki çalışmalarla *Doronicum*'a dahil edilmiştir. Candolle [21] monotipik bir cins olan *Fullartonia* DC.'yi *Fullartonia kamaonensis* DC. türü ile tanımlamıştır. Ancak bu tür de günümüzde *Doronicum kamaonense* (DC.) Alv. Fern. olarak kabul edilmiştir [10,13]. 1838 yılında Candolle, *Doronicum* cinsini iki seksiyona ayırmayı önermiştir. Bunlardan biri bazı *Senecio* türlerini de içeren *Eudoronicum* DC. seksiyonu, diğeri ise günümüzde *Senecio* cinsi altında tanımlanan *Doronicum linifolium* (Wall.) DC. türünü içeren monotipik *Chromochaeta* DC. seksiyonudur [13].

İlerleyen yıllarda Türkiye [11,15], İran [22], Ermenistan [23], İber yarımadası [24] ve Belçika [25] dahil olmak üzere *Doronicum* cinsi hakkında çeşitli bölgesel taksonomik çalışmalar yapılmıştır. Ancak tüm *Doronicum* cinslerini kapsayan detaylı revizyon çalışması ilk defa Cavillier [14,26] tarafından gerçekleştirilmiştir. Cavillier *Doronicum* cinsine ilişkin çalışmalarının ilkinin homokarpik türlere [26], ikincisini heterokarpik türlere [14] ayırmıştır. Ancak daha sonra Cavillier [14], bu karakterin doğal grupları sınırlandırmak için kullanışlı olmadığı sonucuna varmıştır. Cavillier, *Doronicum* cinsinde yer alan toplam 34 türü 3 seksiyon ve 7 alt seksiyon altında gruplandırmıştır:

- 1- Seksiyon *Doronicastrum* Cavill.
 - a) Alt Seksiyon *Corsica* Cavill. (*D. corsicum* Poir.)

- b) Alt Seksiyon *Grandiflora* Cavill. (*D. altaicum* Pall., *D. briquetii* Cavill., *D. viscosum* Nym., *D. grandiflorum* Lam., *D. portae* Chab., *D. glaciale* Nym., *D. clusii* (All.) Tausch., *D. thibetanum* Cavill.)
- c) Alt Seksiyon *Austriaca* Cavill. (*D. austriacum* Jacq.)
- d) Alt Seksiyon *Macrophylla* Cavill. (*D. macrophyllum* Fisch., *D. dolichotrichum* Cavill., *D. haussknechtii* Cavill., *D. maximum* Boiss. Et Huet., *D. macrolepis* Freyn et Sint., *D. balansae* Cavill., *D. cacaliaefolium* Boiss. & Heldr.)
- e) Alt Seksiyon *Plantaginea* Cavill. (*D. plantagineum* L., *D. longifolium* Griseb. et Schenk, *D. oblongifolium* DC., *D. falconeri* Clarke, *D. turkestanicum* Cavill.)
- f) Alt Seksiyon *Pardalianchia* Cavill. (*D. roylei* DC., *D. thirkei* Sch.Bip. emend. Cavill., *D. reticulatum* Boiss., *D. pardalianches* L., *D. atlanticum* Chab.)
- g) Alt Seksiyon *Cardiophylla* Cavill. (*D. carpetanum* Boiss., *D. orientale* Hoffm., *D. carpaticum* Nym., *D. cordatum* Sch.Bip.)
- 2- Seksiyon *Soulieastrum* Cavill. (*D. souliei* Cavill., *D. stenoglossum* Maxim.)
- 3- Seksiyon *Hookerastrum* Cavill. (*D. hookeri* Clarke)

Cavillier alt seksiyonları tanımlarken esas olarak taban yapraklarının şekli, yaprakların boyutları ve sipsela dimorfizminin varlığından yararlanmıştır. *Hookerastrum* Cavill. seksiyonunda yer alan *D. hookeri* C.B.Clarke ex Hook.f. türü son çalışmalarda *Nannoglottis hookeri* (Hook.f.) Kitam. türü altında sinonime düşürülmüştür [10,27]. Cavillier'in çalışmasından sonra Rusya Florası'nda da Willkomm ve Lange [28] tarafından önerilen sınıflandırma Cavillier'in yaptığı sınıflandırmadan yola çıkılarak oluşturulmuştur. Böylece Flora'da türler seksiyon *Aronicum* Cavill. ve seksiyon *Pardalianches* Cavill. olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. Edmondson [22] da Cavillier'in sınıflandırmasını kabul ederek *Doronicum* seksiyonunda (= *Doronicastrum* seksiyonu) monotipik alt seksiyon olan *Isaurica* Edmondson'ı (*Doronicum cacaliifolium*) tanımlamıştır. Cavillier'in çalışmasında Türkiye'den toplam 11 adet *Doronicum* türü bulunmaktadır. Sonraki yıllarda Edmondson [15] tarafından *D. bithynicum* J. R. Edm., *Doronicum bithynicum* subsp. *sparsipilosum* J.R.Edm., *Doronicum tobeyi* J. R. Edm. ve

Doronicum hakkiaricum Edm. olmak üzere Türkiye’de doğal olarak yetişen 4 yeni takson tanımlanmıştır [15]. Türkiye'deki türlerin çoğunluğunu oluşturan alt seksiyon *Macrophylla* altında yer alan türlerin taksonomik açıdan kritik olduğu düşünülmüştür. Özellikle, tüy örtüsü bu alt seksiyonda yer alan türlerin teşhisi için önemli bir karakter olduğundan, Türkiye Florası’nda türler tanımlanırken tüylerin tipleri ve dağılımları ayrıntılı olarak açıklanmıştır [11]. Cavillier'in çalışmalarında da tüy örtüsünün önemi vurgulanmış olup türlerde bulunan tüylerin detaylı çizimleri verilmiştir [14,26].

Doronicum cinsindeki taksonomik problemi çözüme kavuşturmak amacıyla cins üzerinde 2000’li yılların başında morfolojik ve moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Alvarez Fernandez ve ark. [1] Cavillier’in alt seksiyonları tanımlamak için kullandığı karakterlerin cinsin sınıflandırmasında ayırt edici niteliğe sahip olmadığını düşünerek Avrupa ve Kuzey Afrika’da yayılış gösteren 26 tür ve 4 alt tür üzerinde üç farklı veri setine dayalı (morfoloji, ITS, trnL-F) filogenetik analiz gerçekleştirmiştir. Bu çalışma sonucunda *Doronicum* cinsinin Senecioneae tribusunda yer alması gerektiği kesinleştirilmiştir [1].

Alvarez Fernandez ve Nieto Feliner [27] morfometrik karakterlerin cinsin taksonomisindeki önemini değerlendirmek amacıyla Avrupa ve Kuzey Afrika’da yayılış gösteren 26 tür ve 4 alt tür üzerinde çok değişkenli varyans analizi ile cins, türlerin morfolojilerine ve coğrafik dağılımlarına göre 5 ana grup altında incelemiştir.

Cinsin sistematiğini aydınlatmaya yönelik en kapsamlı çalışmada ise Alvarez Fernandez [13] Dünya’da çeşitli herbaryumlarda yer alan *Doronicum* cinsine ait yaklaşık 4300 adet herbaryum örneğinin morfolojik karakterlerini stereomikroskop ve SEM yardımı ile inceleyerek türlerin son taksonomik durumlarını belirlemiştir. Bu çalışma ile Türkiyede’de yer alan bazı türler sinonime düşürülmüştür.

***Doronicum* Cinsinin Dünya’daki Yayılışı**

Son verilere göre *Doronicum* cinsi Dünya’da yaklaşık 40 tür ile temsil edilmektedir [29]. Bu türlerin yaklaşık yarısı Avrupa ve Kuzey Afrika’da yayılış göstermekte olup diğer türler Güneybatı Asya (İran, Irak, Kafkaslar ve Türkiye) ve Orta Asya’da (Türkistan, Altay, Çin, Himalayalar) doğal olarak yetişmektedir. *D. orientale* hariç cinste yer alan türlerin yayılışı genel olarak Avrupa, Güneybatı Asya veya Orta Asya olmak üzere üç bölgeden birinde sınırlanmıştır. *D. orientale* ise Avrupa ve Güneybatı Asya’da yayılış

göstermekle birlikte özellikle Doğu Akdeniz’de (Yunanistan, Türkiye’nin kuzeyi, İtalya’nın güneyi ve Lübnan-Suriye) görülme sıklığı artmaktadır (Şekil 2) [13,27]. *Doronicum* türlerinin ilk olarak Akdeniz havzasında görülmeye başlayarak Avrupa’daki nemli-ılıman habitatlara yayıldığı ve buradan Orta ve Doğu Asya’daki dağ habitatlarına dağıldığı düşünülmektedir [30]. Deniz seviyesinden 5000 m yüksekliğe kadar görülmekte olan *Doronicum* türlerinin yayılış alanını ormanların nemli alanları, açık kayalık yerler ve su kaynaklarına (dere, göl vs.) yakın yerler oluşturmaktadır [13].



Şekil 2 *Doronicum* cinsinin Dünya’daki yayılış alanları

Fig 2 Distribution areas of the genus *Doronicum*

***Doronicum* Cinsinin Türkiye Florası’ndaki Durumu**

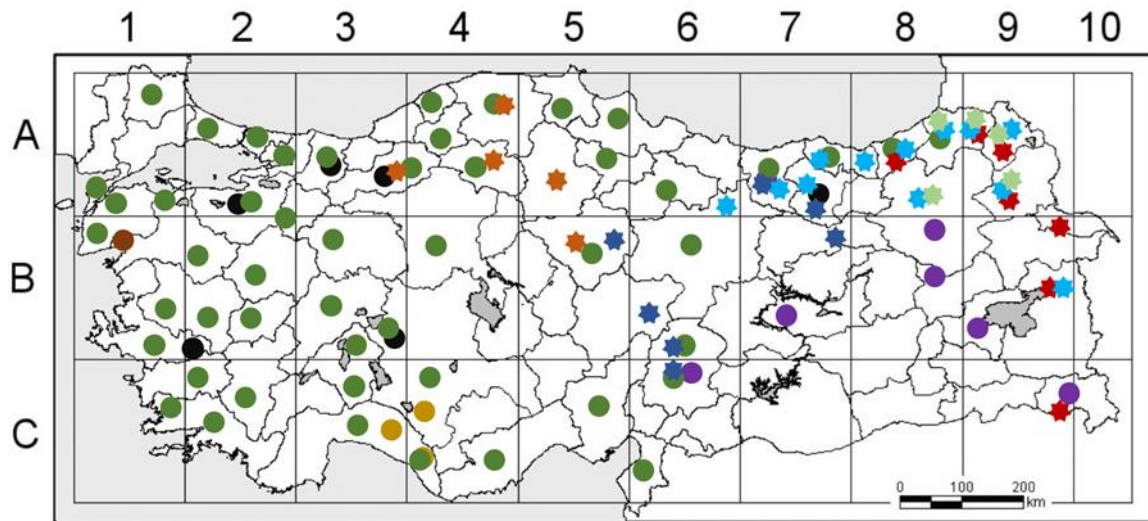
Flora of Turkey’de *Doronicum* cinsinin revizyonu Edmondson tarafından yapılmıştır. Edmondson [11]’a göre *Doronicum* cinsi Türkiye Florası’nda 14 tür (15 takson) ile temsil edilmektedir. Güney-Batı Asya’da büyük ölçüde dağınık bir dağılıma sahip olan *Doronicum* türleri en fazla Türkiye’nin doğusunda görülmektedir. Anadolu’da bulunan 15 taksondan 8’i endemiktir [31]. Endemizm oranının (%53) bu denli yüksek olması cinsin çeşitlilik merkezinin ülkemiz olduğunu düşündürmektedir. Flora of Turkey [11]’de türler seksiyonlara göre ayrılmamıştır. Ancak ülkemizde *Macrophylla* alt seksiyonunun yaygın olduğu belirtilmektedir. Bu alt seksiyonda yer alan türler morfolojik olarak birbirine çok benzemekle birlikte tüy örtüsü bu türlerin tayininde önem taşımaktadır. Ülkemizde bulunan türlerin genellikle yayılış alanları dar olup çoğunlukla Doğu Anadolu dağlarında nemli bölgelerde dağılım gösterirler. *D. orientale* türü ise diğer türlerden daha geniş yayılış alanına sahip olup ülkemizin özellikle batı ve kuzey kısımlarında yayılış

göstermektedir [11,15]. *Doronicum* cinsi üzerinde Alvarez Fernandez [13] tarafından gerçekleştirilen son sistematik çalışmada Türkiye’de doğal olarak yetişen bazı türler sinonime düşürülmüştür. Flora’da yer alan tür sayısı 14’den 9’a (takson sayısı 15’den 10’a) düşmüştür (Tablo 1). Buna göre ülkemizde 9 tür (10 takson) doğal olarak yetişmektedir ve endemizm oranı %40’tır (Şekil 3).

Tablo 1 Türkiye’de *Doronicum* cinsinin son durumu ve sinonime düşürülen taksonlar [13]

Table 1 The latest status of *Doronicum* genus in Turkey and synonymous taxa [13]

Takson	Sinonime Düşen Taksonlar
<i>Doronicum haussknechtii</i> Cavill. (Beritkaplanotu) - endemik	<i>Doronicum tobeyi</i> Edm. (Derekaplanotu)
<i>Doronicum maximum</i> Boiss. & A. Huet (Palankaplanotu)	
<i>Doronicum dolichotrichum</i> Cavill. (Ardahankaplanotu)	<i>Doronicum hakkiaricum</i> Edm. (Yaylakaplanotu)
<i>Doronicum macrophyllum</i> Fisch. subsp. <i>macrophyllum</i> (Kutulkaplanotu)	<i>Doronicum macrolepis</i> Freyn & Sint (Kocakaplanotu); <i>Doronicum balansae</i> Cavill. (Rizekaplanotu)
<i>Doronicum macrophyllum</i> Fisch. subsp. <i>sparsipilosum</i> (J. R. Edm.) Alv. Fern. (Ilgazdarınacı) - endemik	<i>Doronicum bithynicum</i> subsp. <i>sparsipilosum</i> J. R. Edm. (Ilgazdarınacı)
<i>Doronicum cacaliifolium</i> Boiss. & Heldr. (Kayakaplanotu) - endemik	
<i>Doronicum austriacum</i> Jacq. (Baylıkotu)	
<i>Doronicum orientale</i> Hoffm. (Kaplanotu)	
<i>Doronicum reticulatum</i> Boiss. (Egekaplanotu) - endemik	<i>D. bithynicum</i> J. R. Edm. subsp. <i>bithynicum</i> (Darınac)
<i>Doronicum oblongifolium</i> DC. (Kısakaplanotu)	



Şekil 3 *Doronicum* türlerinin Türkiye’deki yayılış alanları. *D. haussknechtii* (★); *D. maximum* (●); *D. dolichotrichum* (★); *D. macrophyllum* subsp. *macrophyllum* (★); *D. macrophyllum* subsp. *sparsipilosum* (★); *D. cacaliifolium* (●); *D. austriacum* (●); *D. orientale* (●); *D. reticulatum* (●); *D. oblongifolium* (★)

Fig 3 Distribution areas of *Doronicum* species in Turkey. *D. haussknechtii* (★); *D. maximum* (●); *D. dolichotrichum* (★); *D. macrophyllum* subsp. *macrophyllum* (★); *D. macrophyllum* subsp. *sparsipilosum* (★); *D. cacaliifolium* (●); *D. austriacum* (●); *D. orientale* (●); *D. reticulatum* (●); *D. oblongifolium* (★)

***Doronicum* Türleri Üzerinde Anatomik ve Mikromorfolojik Çalışmalar**

Yirminci yüzyılın başında anatomik çalışmaların ilerlemesiyle birlikte Asteraceae familyası, lateks kanalları ve reçine kanallarının taksonlar arası dağılımı açısından alt familyalara ayrıldı. Lateks kanalı içerenler Cichorioideae alt familyasında yer alırken lateks kanallarının nadiren görüldüğü fakat genellikle reçine kanalları taşıyanlar Asteroideae alt familyası altında gruplandırıldı [32]. Metcalfe ve Chalk [33] Asteraceae familyasında görülen salgı kanalları ve latisifer kanallar ile farklı tipte örtü ve salgı tüyleri ve sekonder kalınlaşma gibi bazı anatomik karakterlerin taksonomik değeri olduğunu vurgulamıştır. Ayrıca, Asteraceae familyasının öne çıkan anatomik özellikleri olarak değişik tipteki örtü ve salgı tüylerinin bulunması, yaprak alt epidermis yüzeyinde papillaların varlığı, anomositik, anizositik ve nadiren heliositik tip stoma görülmesi, hidatodların yer alması, hipodermisin bulunması, homojen veya heterojen mezofil, büyük hücrelerden oluşan parankimatik kınılı iletim demetleri bulunması sayılabilir [34]. Senecioneae tribusunda yer alan türler üzerinde yapılan anatomik çalışmalarda bazı türlerin gövde, yaprak ve köklerinde, bazen çiçek kısımlarında ve hatta kotiledonlarında reçine kanallarına sahip oldukları gösterilmiştir. Hem tussilaginoid hem de senecioid grupta bu özellik görülmektedir. Ayrıca akenlerin ovaryum duvarında sıklıkla kalsiyum oksalat kristalleri bulunur. Bu kristaller bazen prizmatik şekilde veya iğne şeklinde, bazen de druzlar şeklindedir [1].

Asteraceae familyasında, organların yüzeyinde bulunan salgı tüyleri ve organların iç kısmında yer alan salgı kanalları olmak üzere iki temel salgılama sistemi bulunmaktadır. Familyada bulunan salgı tüyleri genellikle iki sıralı (biseriat) bir sap ve bir veya çok hücreli bir baş kısmında oluşur. Salgı kanalları ise yaprak mezofilinde, gövde korteksinde ve genellikle kökte endodermis yakınında bulunur [33]. Tüyler ve kanallar salgı maddesi olarak uçucu yağlar, lipitler, reçineler, seskiterpen laktonlar, alkaloidler, pektin benzeri maddeler, tanenler ve flavonoidler içerebilirler. Salgı tüylerinin bitkileri otçul böcekler,

mantarlar, patojenler, yoğun ışık, UVB radyasyonu veya yüksek sıcaklık dahil olmak üzere çeşitli biyotik ve abiyotik faktörlerden koruma görevi bulunur. Hem salgı tüylerinin yoğunluğunun değişmesi hem de çeşitli kimyasal maddelerin sentezi ile bitki kendi savunmasını oluşturabilir [35].

Doronicum türleri üzerinde yapılmış az sayıda anatomik çalışma bulunmaktadır. Tibet’de yetişen *D. falconeri* türünün gövde, yaprak ve çiçek anatomisi çalışılmıştır [36]. Apiaceae, Asteraceae ve Lamiaceae gibi familyalarda meyve anatomisi birçok faydalı diagnostik ve taksonomik karakter sağladığı bilinmektedir [37]. *Doronicum* türlerinin sipselasının morfolojik, mikromorfolojik ve anatomik açıdan incelendiği çeşitli çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Sipsela (boyutu, yüzeyi, rengi, şekli), papus (yapısı, şekli, sayısı, rengi, boyutu) ve karpodyum (şekli, pozisyonu, çapı) yapılarının Senecioneae ve Anthemidae tribuslarında cins ve tür seviyesinde diagnostik karakterler sağladığı görülmüştür [38]. *D. falconeri* ve *D. kamaonense* meyveleri morfolojik ve mikromorfolojik [39], *D. austriacum* meyveleri morfolojik [40], *D. grandiflorum* meyveleri mikromorfolojik ve anatomik [41-43] açıdan incelenmiştir.

Türler üzerinde yapılmış anatomik ve mikromorfolojik çalışmalar özellikle *Doronicum* cinsi için tür seviyesinde en önemli taksonomik karakterlerden biri olan tüy örtüsü üzerinde yoğunlaşmıştır [13]. İlerleyen yıllarda *Doronicum* türlerinin tüy örtüsü araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bu çalışmalardan birinde *D. orientale* ve *D. macrophyllum* türlerinin pedonkul ve fillarilerindeki tüyler morfolojik, anatomik ve histokimyasal olarak incelenmiştir. Üç tip salgı tüyü belirlenmiş olup bu tüyler iki sıralıdır. Birinci tip salgı tüyünün başı tek tabaka oluşturan 3-5 hücreden meydana gelir. İkinci tip salgı tüyünün başı tek tabaka oluşturan 2-3 hücreden; üçüncü tip salgı tüyünün başı ise 2 hücreden oluşur. Bu tüylerden birinci tip olanlar en uzun olup üçüncü tip salgı tüyleri en kısadır. *D. orientale*’de üç tip tüy bulunurken *D. macrophyllum*’da sadece 2 hücreli başa sahip uzun saplı salgı tüyleri görülmüştür. Basit örtü tüyleri de tespit edilmiştir [44]. Başka bir çalışmada ise *D. pardalianches* topraküstü kısımlarının yüzeyini kaplayan 3 tip salgı tüyü morfolojik, anatomik ve histokimyasal açıdan incelenmiştir [45]. Son olarak *D. orientale*, *D. pardalianches* ve *D. macrophyllum* türlerinin gövde yapraklarındaki tüyler morfolojik, anatomik ve histokimyasal olarak çalışılmıştır. İki tip salgı tüyü belirlenmiştir. Birinci tip salgı tüyü iki hücreli bir baş ve 8-10 hücre tabakasından oluşan uzun bir sap içerir. İkinci tip salgı tüyü ise iki hücreli bir

baş ve 5-6 hücre tabakasından oluşan kısa bir sap içerir. İki tip tüy de silindirik şekilli olup genellikle iki sıralıdır. Üç türde de aynı tip salgı tüyleri olmasına karşın tüylerin boyutlarında ve dağılımlarında türler arası farklılıklar bulunmuştur. Aynı zamanda türlerde ucu konik şekilli hücrelerden oluşmuş iki sıralı örtü tüyler ve kısa tek sıralı örtü tüyler tespit edilmiştir [46].

***Doronicum* Türleri Üzerinde Palinolojik Çalışmalar**

Angiosperm polenlerine ait en eski görüntüler Nehemiah Grew tarafından yazılan *Anatomy of Plants* adlı kitapta yer almaktadır [47]. Polen ilk olarak 1811'de Robert Brown tarafından ayırt edici bir taksonomik karakter olarak kabul edilmiştir, ancak Asteraceae familyası için ilk kullanımı 1864 yılındadır [48,49]. Polen morfolojisi alanında ilk önemli çalışmaları gerçekleştiren Wodehouse [50-52] ışık mikroskobu kullanarak günümüzün taramalı elektron mikroskobu görüntülerini anımsatan Asteraceae polen çizimleri sunmuş ve Asteraceae polenlerini üç grup altında toplamıştır: Psilat, ekinat ve lofat [49]. Wodehouse'dan sonra en önemli çalışma Stix [53] tarafından yapılmıştır. Dünyanın her yerinden Asteraceae familyasına ait 235 türün polenlerini incelemiştir. Bu çalışmaya göre Asteraceae poleni genel olarak izopolar (ekvator çevresinde simetrik) ve radyal simetrik olup, üç bileşik apertüre sahiptir [53]. Skvarla ve Larson [54] ve Skvarla ve Turner [55] Asteraceae familyası polenlerini ekzin tabakalarına göre Anthemoid, Helianthoid ve Senecioid olarak gruplara ayırmışlardır. 1970'lerden itibaren ise taramalı elektron mikroskobunun (SEM) yaygın olarak kullanılması yoluyla yüksek büyütme ve çözünürlükte üç boyutlu görüntülerin elde edilmesi palinolojik çalışmaların hızla artışına neden olmuştur [49]. Asteraceae familyasında bulunan taksonlara ait diğer polen morfolojisi çalışmalarının başlıcaları Erdtman ve ark. [56], Wagenitz [57], Perveen [58] ve Punt ve Hoen [59] tarafından gerçekleştirilmiştir.

Senecioneae tribusunda polen şekli oblat, prolat veya sferoidal, polar görünüşte yuvarlak veya üçgenimsi, ekvatorial görünüşte yuvarlak veya eliptik şekillidir. Polen trikolporat, kolpuslar birleşik değil, kolpus dardan geniş, ucu akut; tektum mikroperforat, ekinat; spinler az-çok sayıda, seyrek-yoğun, eşit dağılmış, konik ve künt (obtus) veya sivri uçlu, 2-7 µm, tabanı düz veya hafif şişkin, katı veya delikli (perforat); tektum kabarık değil, yuvarlak granüllü, striat (çizgili), retikulat (ağsı) veya areolat (adacıklı); lofat değil; internal foramina bulunur veya bazen bulunmaz; tamamen veya yer yer kavea bulunur. Senecioneae tribusundaki polen tanelerinde genellikle ekzin tabakasında internal

foramina bulunmaz. İnternal foramina bulunmayan polenler senecioid (senecionoid) polen tipi olarak adlandırılır. Küçük internal foramina bulunan helianthoid tipi polen ise Senecioneae tribusunda yer alan bazı cinslerde, özellikle *Doronicum*, *Farfugium* Lindl., *Gynura* Cass., *Pericallis* Webb & Berthel. ve *Packera* Á.Löve & D.Löve cinslerinde bulunur [49].

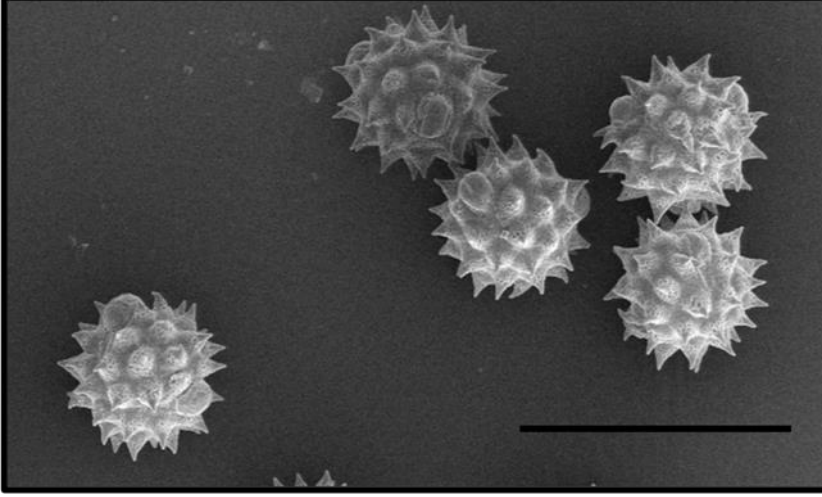
Doronicum türlerine ait polenler üzerinde yapılan az sayıda çalışma bulunmaktadır (Şekil 4). İnceoğlu ve Karamustafa [60] tarafından Ankara Beypazarı'ndan toplanan *D. orientale* polenleri ışık mikroskobu altında çalışılmıştır. Senecioneae tribusuna ait türlerin polenlerinin genel morfolojik özellikleri trikolporat, oblat-sferoidal, sferoidal, polar görünüşü sirkular, spinler konik veya konkav-konik olarak verilmiştir [60]. Pakistan'dan *D. hookeri* polenleri ışık mikroskobu altında incelenmiştir [61]. Punt ve Hoen [59] tarafından gerçekleştirilen *D. austriacum*, *D. pardalianches* ve *D. plantagineum* türlerinin polenlerinin morfolojik çalışmasında *Doronicum* polenleri *D. pardalianches* tipi ve *D. austriacum* tipi olmak üzere iki grup altında toplanmıştır. Ekin belirgin kubbe şeklinde ve üzerinde küçük kavite bulunuyor veya bulunmuyorsa; enine kesitte spin tabanında kolumella sayısı 4'den fazlaysa *D. pardalianches* tipi olarak tanımlanmıştır. Eğer ekin konik veya sadece hafifçe kubbe şeklinde ve üzerinde büyük üçgen kavite bulunuyor; enine kesitte spin tabanında kolumella sayısı 4 veya daha azsa *D. austriacum* tipi (*D. austriacum*, *D. plantagineum*) olarak tanımlanmıştır [59].

***Doronicum* Türleri Üzerinde Karyolojik Çalışmalar**

Nordenstam [62] tarafından tribus içerisinde morfolojik ve karyolojik karakterlere dayanan gruplandırma önerilmiştir. Buna göre Senecioneae tribusunda yer alan cinsler "senecioid" ve "cacalioid" olarak iki gruba ayrılmıştır. Daha sonra cacalioid adı yerine "tussilaginoid" ifadesi kullanılmaya başlanmıştır. Senecioneae tribusunda temel kromozom sayısı $x = 10$ olarak kabul edilmektedir. Senecioid grubu için temel kromozom sayısı $x = 10$ iken tussilaginoid grubu için $x=30$ veya katlarıdır [1]. *Doronicum* cinsi için de önerilen temel kromozom sayısı $x=30$ 'dur [5,13,63]. Fakat önceki çalışmalarda bazı araştırmacılar cins için temel kromozom sayısını $x=10$ olarak kabul etmişlerdir [13,64]. Günümüze kadar karyolojik açıdan çalışılan *Doronicum* taksonları ve kromozom sayıları Tablo 2'de verilmiştir.

Cins üzerinde ilk karyolojik çalışma 1950 yılında Lindqvist tarafından gerçekleştirilmiştir. Lindqvist'e göre *Doronicum* türleri, kromozom sayıları yüksek ve

kromozomları küçük olduğu için sitolojik çalışma için elverişli değildirler. Kök uçlarında mitotik bölünmede bulunan kromozom sayıları sırasıyla *D. cordatum*'da $2n=60$, *D. pardalianches*'de $2n=60$ ve *D. plantagineum*'de $2n=\pm 120$ 'dir. *D. plantagineum* kromozom boyları diğer iki türe göre daha kısa olduğu görülmüştür. Aynı zamanda *D. plantagineum* kromozomlarının 4 tanesinde satellit bulunduğu bildirilmiştir [65].



Şekil 4 *D. macrophyllum* subsp. *sparsipilosum* polenleri (SEM) skala: 50 μm

Fig 4 Pollens of *D. macrophyllum* subsp. *sparsipilosum* (SEM) scale: 50 μm

Alvarez Fernandez [13] tarafından yakın zamanda gerçekleştirilen ve materyal olarak rizomlardan elde edilen sekonder kök uçları ve olgunlaşmamış tüpsü çiçeklerin kullanıldığı çalışmada *D. carpetanum* subsp. *diazii* (Pérez Morales ve Penas) Alv.Fern. ve *D. carpetanum* subsp. *kuepferi* Alv.Fern. taksonlarında kromozom sayısı $2n=60$ olarak belirlenmiştir.

Peruzzi ve ark. tarafından gerçekleştirilen karyolojik çalışmada İtalya'dan *D. columnae*, *D. x minutilloi* Peruzzi ve *D. orientale* türlerinin idiyogramları sunulmuştur. Üç türün de aynı kromozom sayısına ($2n=60$) ve aynı ploidi düzeyine sahip oldukları görülmüştür [66]. Türkiye'den toplanan taksonlar üzerinde yapılan tek ve en güncel karyolojik çalışmada ise *D. haussknechtii*, *D. dolichotrichum*, *D. macrophyllum* subsp. *macrophyllum*, *D. maximum*, *D. oblongifolium*, *D. orientale* ve *D. reticulatum* taksonlarının somatik kromozom sayıları $2n=60$ olarak bildirilmiştir [67].

Doronicum taksonlarının çoğunda bilinen kromozom sayılarının 30'un katları ($2n = 60$) olması $x = 30$ temel kromozom sayısını desteklemektedir (Tablo 2). Bazı taksonlarda ise her iki ploidi seviyesi de görülmektedir ki bu cinste poliploidinin yaygın olduğunu

gösterir. Bu taksonlar, *D. carpetanum* 2n=60, 120 [24,68]; *D. clusii* 2n=60, 120 [69-71]; *D. altaicum* 2n=30, 60 [72-75]; *D. macrophyllum* 2n=30, 60 [67,72,76]; *D. oblongifolium* 2n=40, 60 [67,72,77]. Gürcistan'dan *D. oblongifolium* kromozom sayısı 2n=40 olarak bildirilmiştir [77], ancak bu veri x=30 ile tutarsız olan tek çalışmadır ve yeniden sayılması gereklidir [13]. Alpin vejetasyonda ekstrem koşullara artan adaptasyon nedeniyle poliploid türlerin bu ortamlarda yaygın olduğu düşünülmektedir. *Doronicum* cinsinde poliploidi ve hibridizasyon yaygındır. Bu durum türlerin yüksek morfolojik varyasyonu ve sınırlı yayılışlarından kısmen sorumlu olabilir [71].

***Doronicum* Türlerinin Halk Arasında Kullanımı ve Etnobotanik Çalışmalar**

Cins ismine etimolojik olarak bakıldığında *Doronicum* isminin kökeni Arapça darânaj, darûnaj kelimelerine dayanmaktadır [98,99]. Theophrastus'un Historia Plantarum, IX isimli eserinde Skorpios isimli *Doronicum* cinsinde yer alan bitkiden bahsedilmektedir. Bitkinin kökleri akrebe benzediği için akrep sokmalarına karşı etkili olacağı bildirilmiştir [1]. İbn-i Sina tarafından yazılan "Kitab-ul-Adviyah-Qalbiyah" isimli eserde kalp hastalıklarının tüm yönleri anlatılmıştır ve kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılan toplam 63 drog ismi verilmiştir. Eserde yer alan ve drog olarak kullanılan bitkilerden biri de *D. hookeri* (yöresel isim=Daroonaj) türüdür [101]. Aynı eserde *D. grandiflorum* (= *D. scorpioides* Lam.) kökleri güçlü kardiyotonik, canlandırıcı ve çarpıntıyı giderici olarak rapor edilmiştir [102]. İbn-i Sina'nın El-Kanun fi't-Tıb isimli eserinde bulunan ve duyuusal nöropatide analjezik etkili yağ olarak kullanılan bir bitki karışımı formülünde *D. pardalianches* türü de yer almaktadır [103].

Orta Çağ döneminde Doğu Akdeniz, Azerbaycan ve Şam'da *Doronicum* türlerinin kullanımı bulunmaktadır. Doğu Akdeniz'de *D. scorpioides* (yöresel isim=Leopard's-bane, Panther strangler) türünün köklerinin göz rahatsızlıkları ve cinsel arzuyu baskılayıcı olarak kullanıldığı kayıtlıdır [104]. Azerbaycan'da ise *D. macrophyllum* türünün kökleri tonik olarak kullanılmıştır. Bu toniğin karaciğer, kalp, sindirim ve duyu organlarını güçlendirdiğine inanılmıştır. Köklerinin dekoksasyonu aritmiye karşı reçete edilmiştir [105]. Osmanlı döneminde Şam'da *D. scorpioides* türünün göz hastalıkları, hayvan ısırıkları ve zehirlenmeleri, iç hastalıklar, ağrılar ve cilt hastalıkları için kullanıldığı bildirilmektedir [106].

Tablo 2 *Doronicum* taksonları üzerinde gerçekleştirilen karyolojik çalışmalar ve kromozom sayıları

Table 2 Karyological studies on *Doronicum* taxa and chromosome numbers

Takson	Kromozom Sayısı	Lokalite	Kaynak
<i>D. altaicum</i>	2n=30 2n=60	Rusya	[72-75]
<i>D. austriacum</i>	2n=60	Bulgaristan, Yunanistan, Ukrayna, İsviçre	[70,78-80]
<i>D. bargusiense</i> Serg.	2n=60	Rusya	[81]
<i>D. carpaticum</i>	2n=60	Ukrayna	[69,80]
<i>D. cordatum</i>	2n=60	Avrupa	[65]
<i>D. carpetanum</i>	n=30 2n=60, 120	İspanya	[68] [24]
<i>D. carpetanum</i> subsp. <i>diazii</i>	2n=60	İspanya	[13]
<i>D. carpetanum</i> subsp. <i>kuepferi</i>	2n=60	İspanya	[13]
<i>D. cataractarum</i> Widder	2n=60	İsviçre	[70]
<i>D. clusii</i>	2n=60 2n=120	İsviçre, İtalya Ukrayna	[69-71]
<i>D. columnae</i>	2n=60	Bulgaristan, Yunanistan, Almanya, İtalya, Bosna Hersek	[66,79,82-89]
<i>D. dolichotrichum</i>	2n=60	Türkiye	[67]
<i>D. glaciale</i> subsp. <i>glaciale</i>	2n=60	Slovenya, Avusturya	[71,90]
<i>D. glaciale</i> subsp. <i>calcareum</i>	n=30	Almanya	[91]
<i>D. grandiflorum</i>	2n=60	Alpler	[71]
<i>D. grandiflorum</i> var. <i>pyrenaicum</i>	n=30	Fransa	[92]
<i>D. haussknechtii</i>	2n=60	Türkiye	[67]
<i>D. hungaricum</i>	2n=60	Bulgaristan, Slovakya	[82,93]
<i>D. macrophyllum</i>	2n=30 2n=60	Gürcistan, Türkiye	[67,72,76]
<i>D. maximum</i>	2n=60	Türkiye	[67]
<i>D. x minutilloi</i>	2n=60	İtalya	[66]
<i>D. oblongifolium</i>	2n=40 2n=60	Gürcistan, Türkiye	[67,72,77]
<i>D. orientale</i>	2n=60	Yunanistan, İtalya, Türkiye	[66,67,94]
<i>D. pardalianches</i>	2n=60	Avrupa	[65]
<i>D. plantagineum</i>	2n=±120, 120	Avrupa, İspanya	[65,95]
<i>D. reticulatum</i>	2n=60	Türkiye	[67]
<i>D. roylei</i>	2n=60	Hindistan	[96,97]
<i>D. stiriacum</i> (Vill.) Dalla Torre	2n=120, c. 120	Slovakya, Avusturya	[71,93]

Geleneksel İran tıbbında *D. pardalianches* (yöresel isim=Daronaj, Daroanj Aghrabi) köklerinin kardiovasküler sistem hastalıklarının tedavisinde ve midevi olarak kullanıldığı bilinmektedir [107,108]. Yine geleneksel İran tıbbında *Doronicum* türleri dismenorede ve rahim ağrılarında kullanılmıştır [109]. İran'da *D. pardalianches* türünün kökleri halk arasında diüretik, yılan-akrep ısırılmalarının tedavisinde ve sinir toniği olarak

kullanılmaktadır [110]. İnan'da kardiyak şikayetlerde halk arasında kullanılan bir bitki karışımının içerisinde 20 g *D. grandiflorum* (= *D. scorpioides*) türünün rizom tozu yer almaktadır. Karışımında ayrıca 20 g *Anchusa italica* Retz. çiçekleri ve 10 g *Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm. topraküstü kısımları bulunmaktadır. Karışımın bal ile karıştırılarak her gün bir kaşık dolusu tüketildiği belirtilmektedir [111].

Geleneksel Hint tıbbında *D. pardalianches* sinir sistemi depresyonunda, melankolide, akrep ısırıklarına karşı ve kardiyak tonik olarak kullanılmıştır. *D. roylei* kökleri ise baş dönmesini önleyici olarak [112], *D. pardalianches* türü Hindistan'da yılan sokmalarına karşı kullanılmıştır [113]. Hindistan'da *D. falconeri* kökleri kardiyotonik olarak kullanılmaktadır [114]. Hindistan Nanda Devi Ulusal Parkı (biyosfer rezervi)'nda yapılan bir etnobotanik çalışmada *D. kamaonense* (= *D. roylei*) (yöresel isim=Buti) türünün sindirim sistemi rahatsızlıkları ve yılan-akrep sokmalarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmektedir [115]. Geleneksel Hint tıbbında *D. hookeri* (yöresel isim=Darunaj-aqrabi) köklerinin kardiyak, sinir toniği, canlandırıcı, midevi ve gaz giderici olarak kullanıldığı bilinmektedir [116].

Bolivya'da eski zamanlarda *D. pardalianches*'in kaynatılmış yapraklarının gargara olarak, yaprak suyunun frengide görülen ülserleri yıkamak için ve taban yapraklarının lapa halinde ülserlere ve kangrenli yaralara uygulandığı kayıtlıdır. Çiçeklerinin *Arnica* çiçeği yerine kullanıldığı, köklerinin ise pişirildikten sonra akciğerlerde ve beyinde görülen damar tıkanıklıklarında kullanıldığı bildirilmiştir [117].

D. grandiflorum ve *D. pardalianches* türlerinin 16. ve 17. yy'da epilepsi ve malarya tedavisinde dahilen kullanıldıkları Avrupa herballerinde kayıtlıdır [118,119]. İspanya'da halk arasında *D. grandiflorum* (yöresel isim=Arnica) türünün çiçek başı losyon halinde haricen analjezik ve antienflamatuvar olarak palyatif ve semptomatik tedavide, çiçek başının çayı ise dahilen hipotansif olarak palyatif tedavide kullanılmaktadır [120]. Avrupa'da *D. orientale* türünden süs bitkisi olarak yararlanılmaktadır [121].

Ülkemizde ise sadece *D. orientale* türünün geleneksel tedavide kullanımı bulunmaktadır (Tablo 3). Halk arasında Acımık, Kaplanotu, Sarı papatya, Sarı çiçek isimleri ile bilinen bu türün taze kökleri kısırlık tedavisinde kullanılırken [31,122-124] topraküstü kısımlarının dekoksyonu dahilen diüretik olarak kullanılmaktadır [125-127]. Hayvan hastalıklarında bitkinin topraküstü kısımları ezilir ve hayvanlarda görülen yaraların üzerinde serpilir. Fakat bitkinin zehirli olduğu ve ilkbahar ekinoksundan (22 Temmuz)

önce bitkiyi yiyen hayvanların hastalandığı veya öldüğü belirtilmiştir [128]. Bununla birlikte bitkinin taze çiçek ve yaprakları hayvan yemi olarak kullanımı da kayıtlıdır [129]. Ayrıca bitki Batı Karadeniz bölgesinde peyzaj amaçlı olarak kullanılmaktadır [130].

Tablo 3 *Doronicum* taksonlarının ülkemizde geleneksel kullanımı

Table 3 Traditional use of *Doronicum* taxa in our country

Tür	Yerel Ad	Kullanılan Kısım	Hazırlanış	Kullanım Şekli	Kullanım Amacı	Bölge [2]
<i>D. orientale</i>	Acımık, Kaplanotu, Sarı papatya, Sarıçiçek	Taze kökler	-	-	Kısırlık tedavisi	İzmir ve çevresinde [122]
		Topraküstü kısımları				Erzurum (Uzundere) [124]
			Dekoksiyon	Dahilen	Diüretik	Manisa (Yunt dağı) [126]
			Dekoksiyon	Dahilen	Diüretik	Isparta (Eğirdir-Göktaş) [125]
			Dekoksiyon	Dahilen (7-8 gün boyunca günde 1 çay bardağı içilir)	Diüretik	İzmir [127]
			Ezilmiş	Haricen	Hayvan hastalıkları (yaralar)	Denizli [128]
	Çiçek, yaprak	Taze	Dahilen	Hayvan yemi olarak	Afyonkarahisar [129]	

***Doronicum* Türleri Üzerinde Yapılmış Biyolojik Aktivite Çalışmaları**

Doronicum türlerinin antienflamatuar, antioksidan, antimikrobiyal, antitümoral, hepatoprotektif, üreaz inhibitör, α -amilaz inhibitör, α -glukozidaz inhibitör, kolinesteraz inhibitör aktiviteleri *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile araştırılmıştır (Tablo 4). Günümüze kadar yapılan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

***In vitro* çalışmalar**

D. austriacum metanol ekstresi fare fibroblast hücre kültürlerinin çoğalmasını tamamen inhibe etmiştir [131]. Kök diklorometan ekstresinin *in vitro* enzim testinde (Ellman'ın metodu) asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör etkisi gösterilmiştir [132]. *D. austriacum*

köklerinin diklorometan ekstresi ve ana bileşiklerinin antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitesinin değerlendirilmesi makrofajlar J774A.1 ve C6 astrositlerde gerçekleştirilmiştir. Nitrik oksit (NO) ve reaktif oksijen türleri (ROS) salınımının yanı sıra nitrotirozin oluşumu değerlendirilmiştir. Ekstre ve izole edilen 3 ana bileşiğin (tremeton-türevleri) (6,12-dihidroksil(--)-2S-tremeton, (S)-2-(5-asetil-6-hidroksi-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)allilisobutirat, 2-((S)-5-asetil-6-hidroksi-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)allil (S)-2-metilbutanoat) makrofajlardaki ve astrositlerdeki NO ve ROS salınmasını inhibe edebildikleri görülmüştür. Çalışmada *D. austriacum* ekstresinin antiinflamatuvar ve antioksidan aktivitesi *in vitro* yöntemlerle kanıtlanmıştır [133].

Helicobacter pylori tarafından salgılanan üreaz enzim aktivitesi üzerine inhibisyon etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, *D. bracteatum* Edm. topraküstü kısımları metanol ekstresi düşük seviyede üreaz inhibitör aktivitesi göstermiştir [134].

D. glaciale köklerinin farklı ekstreleri (petrol eteri, diklorometan ve etanol) antifungal ve antibakteriyel aktivite yönünden 0,5-256 µg/mL konsantrasyonlarda test edilmiştir, fakat mantarlara veya bakterilere karşı kabul edilebilir MİK (Minimum inhibitör konsantrasyonu) veya MFK (Minimum fungusit konsantrasyonu) değeri elde edilmemiştir [135].

D. hookeri kök diklorometan:metanol (1:1, v/v) ekstresi agar dilüsyon yöntemi kullanılan antimikrobiyal aktivite testinde *Streptococcus faecalis*, *Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae*'i inhibe etmiştir. *Bacillus subtilis* ve *Bordetella bronchiseptica*'a karşı ise zayıf inhibisyon göstermiştir [136]. Kök uçucu yağı inhibisyon zon çapları ölçülerek antibakteriyel (*Bacillus subtilis*) ve antifungal (*Ganoderma lucidum*) açıdan değerlendirilmiş fakat aktivite göstermediği saptanmıştır [137]. Kök metanol ve diklorometan ekstresinin *in vitro* antioksidan özellikleri karşılaştırılmıştır. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), ABTS (2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit), Süperoksit ve Nitrik oksit radikal süpürücü aktiviteleri, metal iyonu şelat aktivitesi, demir iyonu indirgeyen antioksidan gücü (FRAP) ve total antioksidan kapasitesi değerlendirilmiştir. Metanol ekstresi daha yüksek total fenol içeriği ile daha güçlü serbest radikal süpürücü ve azaltıcı aktivite göstermiştir. Total antioksidan kapasite ve FRAP değerleri de metanol ekstresinde yüksek bulunmuştur. Diklorometan ekstresi ise yüksek flavonoid içeriği ile güçlü metal iyonu şelat aktivitesi, süperoksit ve nitrik oksit radikal süpürücü aktiviteleri göstermiştir [138]. *D. hookeri* kök petrol eteri, metanol

ve diklorometan ekstralarının farklı mikroorganizmalar üzerinde (*Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida albicans*, *Aspergillus flavus*, *Phanerochaete chrysosporium*) antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda disk difüzyon testinde 0.1 mg ekstreye eşdeğer 10 µl kök petrol eteri ekstresi ve diklorometan ekstresi güçlü antimikrobiyal etki gösterirken metanol ekstresi zayıf antimikrobiyal etki göstermiştir. Petrol eteri ekstresi *Escherichia coli* hariç diğer bakterilere zayıf-orta derece etki göstermiştir, *Shigella flexneri*'yi ise güçlü şekilde inhibe etmiştir. *Candida albicans*'a karşı petrol eteri ve metanol ekstresi zayıf etki göstermiştir, diklorometan ekstresi ise etki göstermemiştir. Diklorometan ise *Bacillus subtilis* hariç tümüne karşı inhibisyon gösterirken en güçlü etkiyi *Micrococcus luteus*'e karşı göstermiştir. Metanol ekstresi ise *Micrococcus luteus*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter aerogenes*'a karşı zayıf etki göstermiştir. MİK testinde ise diklorometan ekstresi 0.25 mg/ml konsantrasyonda diğer ekstralardan güçlü antimikrobiyal etki göstermiştir (*Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri*). Metanol ekstresi ise 0.25 mg/ml konsantrasyonda *Bacillus subtilis* ve *Shigella flexneri*'yi güçlü inhibe etmişlerdir. Petrol eteri ekstresi ise sadece *Micrococcus luteus* (MİK 0.25 mg/ml) ve *Bacillus subtilis*'e (MİK 0.5 mg/ml) karşı inhibisyon göstermişlerdir. Üç ekstre de antifungal etki göstermemiştir (MİK \geq 1.25 mg/ml) [139].

D. macrolepis türünün gövde, kök ve çiçeklerinin 3 farklı çözücü ile ekstralarının (etanol, metanol, etil asetat) antioksidan, enzim inhibisyon (α -amilaz, α -glukozidaz ve kolinesteraz) ve antimikrobiyal (MİK) aktiviteleri araştırılmıştır. Uçucu yağın kimyasal içeriği ve antimikrobiyal etkisi de değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivite ABTS and DPPH testleri ile belirlenirken antimikrobiyal aktivite 19 adet mikroorganizmaya karşı mikrodilüsyon yöntemi ile değerlendirilmiştir. Enzim inhibisyon aktivitesi ise kolorimetrik metod ile ölçülmüştür. Çiçeklerin antioksidan aktivitesinin diğer bitki kısımlarından daha güçlü olduğu görülmüştür. Aynı zamanda total fenolik ve flavonoid içeriğinin çiçeklerde daha yüksek olduğu görülmüştür. En yüksek enzim inhibisyon aktiviteleri α -amilaz (221.54 mmol ACAE/g ekstre) çiçek etilasetat ekstresinde, α -glukozidaz (15.32 mmol ACAE/g ekstre) çiçek etanol ekstresinde, ve kolinesteraz (AChE: 2.4 ve BChE: 22.35 mg GALE/g ekstre) gövde etilasetat ekstresinde olarak

saptanmıştır. Uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesi ekstrelerinkinden daha yüksek bulunmuştur [140].

D. orientale toprak üstü kısımlarının su, etanol ve metanol ekstrelerinin antibakteriyel (disk difüzyon ve agar well difüzyon metod) ve antitümoral (*Agrobacterium tumefaciens* ile indüklenen patates disk tümör metodu) aktiviteleri değerlendirilmiştir. Tüm ekstreler *Streptococcus pyogenes* ve *Staphylococcus aureus*, su ve etanol ekstreleri *Staphylococcus epidermidis*, etanol ve metanol ekstreleri *Escherichia coli* üzerinde antibakteriyel etki göstermiştir. Ekstreler çok az derecede antitümoral etki göstermiştir [141]. *D. orientale* bitkisinin sulu ekstresinin antioksidan aktivitesi gösterilmiştir. Çalışmada DPPH, Süperoksit ve Nitrik oksit radikal süpürücü aktivite testleri sonucunda IC₅₀ değerleri sırasıyla 66.34 µg mL⁻¹, 219.70 µg mL⁻¹, 436.14 µg mL⁻¹ olarak bulunurken toplam fenolik madde içeriği 47.26 mg GAE mL⁻¹ olarak hesaplanmıştır [142]. Topraküstü kısımlarının etanol ve metanol ekstreleri disk difüzyon testinde balık patojenlerine (*Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Yersinia ruckeri*, *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus garvieae*, *Streptococcus agalactia*) karşı antibakteriyel aktivite göstermemiştir [143]. *D. orientale* yaprak metanol ekstresinin antioksidan aktivitesi DPPH ve ABTS testleri, CUPRAC (bakır(II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite) yöntemi, FRAP yöntemi ve demirli iyon şelat aktiviteleri ile gösterilmiştir [144]. Topraküstü ve kök ekstreleri (heksan, etil asetat, etanol, etanol/su, su) antioksidan aktivitesi DPPH ve ABTS testleri ile gösterilmiştir. Bununla birlikte tüm ekstrelerin asetilkolinesterazı inhibe ettiği, su ekstreleri hariç diğer ekstrelerin butirilkolinesteraz inhibisyonu gösterdiği bulunmuştur [145].

D. pardalianches kök metanol ekstresi, modifiye edilmiş Ellman'ın metoduyla kolinesteraz (ChE) inhibe edici aktivitelerini değerlendirmek için n-heksan, kloroform ve etil asetat ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Sadece etil asetat fraksiyonunun asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör etki gösterdiği (IC₅₀: 172.21 µg/mL), hiçbir fraksiyonun butirilkolinesteraz (BChE) inhibe edici aktivite göstermediği saptanmıştır [146].

***In vivo* çalışmalar**

D. austriacum metanol ekstresi daha önce homolog meme karsinom hücreleri ile aşılansmış farelere enjekte edildiğinde hayvanların yaşam süresini önemli ölçüde uzatmayı başarmıştır [131].

D. hookeri kök etanol ekstresi 500 mg/kg dozda ratlarda karbon tetraklorür (CCl₄) toksisitesine karşı doza bağımlı kısmi karaciğer koruyucu etki (hepatoprotektif) göstermiştir. Aynı zamanda etanol ekstresinin *in vitro* ve *in vivo* antioksidan aktivitesinin sulu ekstreden daha güçlü olduğu görülmüştür [147]. *D. macrophyllum* köklerinden izole edilen kumarinler (umbelliferon ve glikoziti) ratlerde antiaritmik etki göstermiştir [148].

***Doronicum* Türlerinin Fitokimyasal İçeriği**

Doronicum türlerinin topraküstü kısımları ve kök ekstrelerinin pirolizidin alkaloidleri, flavonoidler, terpenler (timol türevleri) ve benzofuranlar (tremeton türevleri) gibi bileşikler içerdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Tiyofen türevleri ve kumarinler de bazı türlerde bulunmuştur [133, 145, 146, 149-167]. Uçucu yağı ise seskiterpenler ve monoterpenler bakımından zengindir [142, 168-171].

Bitkiler aleminde en çok Asteraceae, Boraginaceae ve Fabaceae familyaları bitkilerinde bulunan pirolizidin alkaloidleri (PA), bitkiler tarafından üretilen en toksik bileşiklerden biridir. Bu alkaloidleri bulunduran bitkiler otçul hayvanlara karşı kimyasal bir savunma mekanizmasına sahip olur. Özellikle hepatoksik etki gösteren bileşiklerle uzun süreli maruziyet durumunda kalp, akciğerler ve böbreklerde ciddi hasar görülebilir, hatta ölüme yol açabilir. Komisyon E tarafından izin verilen maksimum PA dozu oral olarak uygulanan bitkisel ürünlerde (infüzyonlar ve çaylar) günde 10 µg, bitki ekstresinde ise 1 µg'dır [172].

Avusturya gibi bazı ülkelerde ise senesionin veya senkirkin içeren herhangi bir bitkisel ürün onay alamaz. Pirolizidin alkaloidleri, pirolizidin halkası içeren büyük bir alkaloid grubunu oluşturur. Senecioneae tribusu aminoasit ornitinden türeyen makrosiklik senesionin tip pirolizidin alkaloidleri ile karakterizedir [1,149]. Yapılan çalışmalarda *Doronicum* türlerinden otosenin, floridanin, doronin ve senkirkin izole edilmiştir [149]. Poliasetilenler Asteraceae familyasında yaygın olarak bulunmasına karşın Senecioneae tribusunda görülmez. Ancak istisna olarak *Doronicum* türlerinde varlığı gösterilmiştir [1]. *Doronicum* türlerinde ve Asteraceae familyasının birçok üyesinde bulunan poliasetilenlerin fototoksik etkiden sorumlu olduğu bilinmektedir [150]. *Doronicum* türleri, seski- ve triterpenler, timol ve tremeton türevleri (bazı *Senecio* türleri gibi) ve özellikle pirolizidin alkaloidleri içermesiyle fitokimyasal olarak tribusta yer alan diğer türlere yakınlık göstermektedir [1].

Tablo 4 *Doronicum* türleri üzerinde gerçekleştirilen biyoaktivite çalışmaları

Table 4 Bioactivity studies on *Doronicum* species

Tür	Kullanılan kısım/ekstre	Çalışma tasarımı	Aktivite [2]
<i>D. austriacum</i>	Köklerin diklorometan ekstresi	<i>In vitro</i>	Antiinflamatuvar ve antioksidan aktivite [133]
	Bitkinin tamamının metanol ekstresi	<i>In vitro/In vivo</i>	Antitümoral aktivite [131]
	Kök diklorometan ekstresi	<i>In vitro</i>	Asetilkolinesteraz (AChE) inhibitör etkisi [132]
<i>D. bracteatum</i>	Topraküstü metanol ekstresi	<i>In vitro</i>	Üreaz inhibitör aktivitesi [134]
<i>D. glaciale</i>	Kök petrol eteri, diklorometan ve etanol ekstreleri	<i>In vitro</i>	Antifungal ve antibakteriyel aktivite (-) [135]
<i>D. hookeri</i>	Kök uçucu yağı	<i>In vitro</i>	Antifungal ve antibakteriyel aktivite (-) [137]
	Kök metanol ve diklorometan ekstresi	<i>In vitro</i>	Antioksidan aktivite [138]
	Kök petrol eteri, metanol ve diklorometan ekstreleri	<i>In vitro</i>	Antifungal (-) ve antibakteriyel aktivite [139]
	Kök diklorometan:metanol ekstresi	<i>In vitro</i>	Antimikrobiyal aktivite [136]
	Kök etanol ekstresi	<i>In vivo</i>	Hepatoprotektif etki [147]
<i>D. macrolepis</i>	Gövde, kök ve çiçeklerinin etanol, metanol, etil asetat ekstreleri, uçucu yağ	<i>In vitro</i>	Antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite, α -amilaz, α -glukozidaz, kolinesteraz inhibitör etkisi [147]
<i>D. macrophyllum</i>	Köklerinden izole edilen kumarinler	<i>In vivo</i>	Antiaritmik aktivite [148]
<i>D. orientale</i>	Bitkinin tamamının sulu ekstresi	<i>In vitro</i>	Antioksidan aktivite [148]
	Topraküstü su, etanol ve metanol ekstreleri	<i>In vitro</i>	Antibakteriyel aktivite Antitümoral aktivite [141]
	Yaprak metanol ekstresi Kök ve topraküstü heksan, etil asetat, etanol, etanol/su, su ekstreleri	<i>In vitro</i>	Antioksidan aktivite [144,145] Asetilkolinesteraz inhibitör etkisi Butirilkolinesteraz inhibitör etkisi (-) [145]
	Topraküstü etanol ve metanol ekstreleri	<i>In vitro</i>	Antibakteriyel aktivite (-) [143]
<i>D. pardalianches</i>	Kök metanol ekstresi	<i>In vitro</i>	Kolinesteraz (ChE) inhibitör etkisi [146]

Seskiterpen laktonlar tribus için çok önemli fitokimyasal belirteçler olarak kabul edilir. Çok çeşitlilik göstermeleri ve kimyasal yapılarındaki varyasyonlar tribus içindeki ve cinsler arasındaki sınıflandırma içinde yararı olabileceklerini düşündürmektedir [1]. *D. orientale* ve *D. macrophyllum* pedonkul ve fillarilerindeki salgı tüylerinin fenolik

maddeler, terpenoidler ve seskiterpen laktonlar taşıdığı floresan mikroskobu ile gösterilmiştir [44]. *Doronicum* türlerinin ve uçucu yağlarının üzerinde yapılan çalışmalar aşağıda verilmiştir.

D. austriacum köklerinden benzofuranlar ve timol türevleri izole edilmiştir [151]. *D. austriacum* kök diklorometan ekstresinden bilinen 3 dihidrobenzofuran türevi 6,12-dihidroksitremeton-12-*O*-isobutirat; 6,12-dihidroksitremeton-12-*O*-(2-metil)butirat ve 6,12-dihidroksitremeton izole edilmiştir. Aynı zamanda kök metanol ekstresinden iki bilinmeyen tremeton türevi 12-*O*- β -D-glukopiranosil-6,12-dihidroksitremeton, 12-*O*- β -D-[6-(3-hidroksi-3-metil-glutaril)-glukopiranosil]-6,12-dihidroksi-tremeton ve 3 yeni diterpen asit türevi 4-karboksi-2-*O*- β -D-[2-(3-isopropil-malat-1-metil-ester)-glukopiranosil]-atraktiligenin, 4-karboksi-2-*O*- β -D-[2-(3-isopropil-malat-1-metil-ester)-isoramnosil]-atraktiligenin ve 2-*O*- β -D-[2-(3-isopropil-malat-1-metil-ester)-glukopiranosil]-atraktiligenin elde edilmiştir [132]. *D. austriacum* kök diklorometan ekstresinde tremeton türevleri olarak 6,12-hidroksi(-)-2*S*-tremeton, (*S*)-2-(5-asetil-6-hidroksi-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)allil isobutirat ve 2-((*S*)-5-asetil-6-hidroksi-2,3-dihidrobenzofuran-2-il)allil (*S*)-2-metilbutanoat tespit edilmiş ve bileşiklerin antioksidan ve antiinflamatuvar etkileri gösterilmiştir [133]. Tremeton türevleri toksik maddeler olarak bilinmekte ve süte geçebilmektedir. Ancak kurutulmuş bitki ve bitki ekstraktlarında tremeton kararsızdır ve toksik olmayan dehidrotremetona dönüşmektedir [152]. *Doronicum columnae* Ten. yapraklarından pirolizidin alkaloidlerinden senkirkin izole edilmiştir [153]. *D. grandiflorum* gövde ve yapraklarından p-hidroksiasetofenon türevi olarak bilinen iki bileşik ilk defa izole edilmiştir. Birinci bileşik 2-senesioil-4-(1-hidroksietil)-fenol, ikinci bileşik ise 2,2 dimetil-6-(1-hidroksietil)-kroman-4-on'dur [154]. *D. grandiflorum* flavonoitlerinden kersetin 3-*O*-(6"-*O*-asetilglukozit) [155,156] 8-hidroksiapigenin ve 8-hidroksiluteolin türevleri saptanmıştır [157-159]. *D. grandiflorum* yaprak ve çiçeklerinin flavonoit içeriği ile *D. 6corsicum*, *D. pardalianches* ve *D. orientale* türlerinin flavonoit içeriği karşılaştırılmıştır [157].

D. hookeri çiçeklerinin metanol ekstresinden flavon glikozit yapısında bileşikler 5,7,4'-trihidroksi-6-metoksiflavon, 5-hidroksi-3,7,4'-trimetoksi flavon ve 7,3'-dihidroksi-5,4',5'-trimetoksi isoflavon izole edilmiştir [159]. *D. hungaricum* köklerinden benzofuranlar ve timol türevleri izole edilmiştir. Timol ve benzofuranların cins için karakteristik olduğu düşünülmektedir [160].

D. macrophyllum köklerinden otosenin, floridanin ve doronin olarak isimlendirilen yeni bir pirolizidin alkaloidi ilk kez izole edilmiştir [161]. Kök metanol ekstresinden yeni bir diterpen glikozit olan doronikozit D izole edilmiştir [162]. *D. macrophyllum* köklerinden tremeton türevleri elde edilmiştir [163]. Yine köklerinden kumarinlerden umbelliferon ve 7-O- α -D-glukopiranosil kumarin izole edilerek antiaritmik etkileri gösterilmiştir [148]. *D. macrophyllum* topraküstü kısmından flavonoidlerden apigenin, kersetin, astragalın, isokersitrin, rutin izole edilirken *D. oblongifolium* topraküstü kısmından kersetin ve isokersitrin izole edilmiştir [165].

D. orientale bitkisinin topraküstü ve kök ekstrelerinde (heksan, etil asetat, etanol, etanol/su, su) ortak olarak 5-kafeoil kinik asit (2.52–337.05 $\mu\text{g/g}$), 3,5-dikafeoil kinik asit (3.12–299.36 $\mu\text{g/g}$), rutin (0.03–114.77 $\mu\text{g/g}$), hiperozit (0.04–66.74 $\mu\text{g/g}$), kersitrin (0.03–9.53 $\mu\text{g/g}$) ve kersetin (0.04–1.17 $\mu\text{g/g}$) bulunduğu bildirilmiştir [145]. *D. pardalianches* kök ve topraküstü kısımlarından timol ve tremeton türevleri ile p-hidroksiasetofenon türevi yeni bir bileşik izole edilmiştir. Seskiterpen alkol yapısında yeni bir bileşik daha bulunmuştur [165]. Rajagopalan ve Negi [166] tarafından *D. pardalianches* köklerinden pirolizidin alkaloidlerinden otosenin izole edilmiştir. *D. pardalianches* kuru drogunda yüksek seviyede toksik tiyofen türevleri tespit edilmiştir [167]. *D. pardalianches* köklerinden formononetin 7-O- β -D-glukopiranozit (ononin) izole edilmiştir [146].

Yapılan çalışmalara göre *Doronicum* türlerinin uçucu yağında seskiterpenler öne çıkmaktadır. *D. altaicum* topraküstü kısmının uçucu yağında major bileşikler olarak benzopiran türevlerinden öpatoriokromen (%38.02), 8-asetil-7-hidroksi-2,2-dimetil-2H-kromen (%8.2), ödesma-4(15),7-dien-1-ol (%6.0), ve heksahidrofarnesil aseton (%3.4) bulunduğu bildirilmiştir. Seskiterpenlerin de %24.9 oranında bulunduğu ve çoğunlukla oksijenlenmiş halde bulunduğu, monoterpenlerin (%5.4) ve az miktarda hidrokarbonlar, asitler ve esterlerin (%11.0) uçucu yağın bileşiminde yer aldığı saptanmıştır [168].

D. austriacum Jacq. subsp. *giganteum* (Griseb.) Stoj. et Stef. topraküstü kısımları uçucu yağında majör bileşikler olarak germakren D (%50.8), β -karyofillen (%9.1), α -humulen (%5.5) ve (Z,E)- α -farnesen (%5.2) bulunmuştur. Uçucu yağda başlıca terpenoidlerden (%93.6) seskiterpen hidrokarbonların (%81.6) olduğu görülmüştür [169].

Doronicum corsicum (Loisel.) Poir. topraküstü kısmı uçucu yağı seskiterpen hidrokarbonlar (%38.2) ve oksijenlenmiş monoterpenler bakımından zengindir. Ana

bileşenler olarak modhefen (%11.6), (E)- β -karyofillen (%9.8), 10-isobutiriloksi-8,9-epoksitimil anjelat (%9.9) ve timil anjelat bulunmuştur (%8.7). Aynı zamanda yeni timol türevlerinin yapısı aydınlatılmıştır [170]. *D. macrolepis* çiçek, gövde ve kök ekstralarının (etil asetat, etanol, metanol) total fenolik ve flavonoit içeriklerinin yüksek olduğu görülmüştür. Uçucu yağında ise yüksek oranda (E,E)- α -farnesen (%21.5), *trans*- β -osimen (%12.8), δ -kadinen (%9.5), karyofillen oksit (%8.2) ve timol (%4.4) bulunduğu bildirilmiştir [147].

D. orientale, *D. bithynicum* subsp. *sparsipilosum* ve *D. macrolepis* taksonlarının çiçek, yaprak ve gövdesinden elde edilen uçucu yağlarda seskiterpenlerin ana bileşikler olduğu görülmüştür. *D. orientale* ve *D. bithynicum* subsp. *sparsipilosum*'da (E)- β -farnesen; *D. macrolepis*'de ise (E)-karyofillen öne çıkmaktadır [171].

Sonuç ve Öneriler

Birçok araştırmacı tarafından sistematik açıdan problemlili bir cins olarak kabul edilmesi, ülkemizde bulunan türler ile alakalı kapsamlı bir revizyon çalışmasının bulunmaması ve türler üzerinde anatomik, mikromorfolojik ve palinolojik çalışmaların yapılmamış olması gibi nedenlerden ötürü Türkiye'de yayılış gösteren *Doronicum* türleri üzerinde güncel çalışmalar yapılarak cinsin taksonomisinin aydınlatılması gerektiği düşünülmüştür. *Doronicum* türleri her ne kadar pirolizidin alkaloidleri ve tremeton türevleri gibi toksik etkili bileşikler içeriyor olsa da türler üzerinde gerçekleştirilen biyolojik aktivite çalışmalarında özellikle antitümoral ve antibakteriyel etkiler dikkat çekicidir. Bununla birlikte asetilkolinesteraz inhibitör etkileri nedeniyle Alzheimer hastalığını önleyici aday ilaç moleküllerinin bu türlerden izole edilebileceği umulmaktadır. Türkiye'de halk arasında kullanımının kısıtlı olması ancak özellikle Avrupa'da geleneksel tedavide kullanılan türlerin bulunması ve çeşitli aktivite çalışmaları ile tıbbi kullanımının destekleniyor olması nedeniyle farklı ekstreler ve saf bileşikler üzerinde yapılacak olan araştırmaların artarak devam etmesinin farklı bilim alanlarına katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Birçok araştırmacı tarafından sistematik açıdan problemlili bir cins olarak kabul edilmesi, ülkemizde bulunan türler ile alakalı kapsamlı bir revizyon çalışmasının bulunmaması, güncel yayılış alanlarının saptanmasının gerekliliği ve özellikle sinonime düşürülen türlerin taksonomik durumlarının kesinleştirilmesinin gerekmesi gibi nedenlerle *Doronicum* türleri üzerinde güncel çalışmalar yapılarak cinsin sistematik durumunun çözüme kavuşturulması gerekmektedir. Türler üzerinde

gerçekleştirilecek olan anatomik, mikromorfolojik, palinolojik ve kemotaksonomik incelemeler cinsin sistematğine katkıda bulunacaktır.

Acknowledgments / Teşekkürler

We are grateful to the Istanbul University Scientific Research Projects Fund for financial support. İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimine mali destekleri için teşekkürlerimizi sunarız.

Funding / Fon desteği

This study was financially supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University funds, Project No: (2019-35458).

Bu çalışma T.C. İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Proje No: (2019-35458) ile desteklenmiştir.

Data Availability statement / Veri Kullanılabilirliği bildirim

The authors confirm that data supporting the findings of this study are available in the article.

Yazarlar, bu çalışmanın bulgularını destekleyen verilerin makalede mevcut olduğunu onaylamaktadır.

Conflict of interest / Çıkar çatışması

The authors declare no conflict of interest.

Yazarlar, çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Ethical standards / Etik standartlar

The study is proper with ethical standards.

Bu çalışma etik standartlara uygundur.

Authors' contributions / Yazar katkıları

Zeynep Büşra ERARSLAN conceived and designed the study. All authors contributed to the preparation of the manuscript.

Çalışma Zeynep Büşra ERARSLAN tarafından planlanmış ve tasarlanmıştır. Tüm yazarlar makalenin hazırlanmasına katkıda bulunmuşlardır.

Kaynakça

1. Nordenstam, B., et al., Senecioneae, in Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae, V.A. Funk, et al., Editors. 2009, International Association for Plant Taxonomy. Vienna: Austria. p. 503-526.
2. Budak Ü., "Türkiye *Senecio* L. (Asteraceae) Türlerinin Taksonomisi" PhD diss., Erciyes Üniversitesi, 2009.
3. Cassini, H., Troisième mémoire sur les Synanthérées. Journal de Physique, de Chimie, d'Histoire Naturelle et des Arts, 1816. 82: p. 116-146.
4. Cassini, H., Tableau synoptique des Synanthérées. Annales des Sciences Naturelles, 1829. 17: p. 387-423.
5. Bremer, K., Asteraceae: Cladistics and Classification. 1994, Oregon, USA: Timber Press.
6. Nordenstam, B., Senecioneae, in The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. 8, Flowering Plants, Eudicots, Asterales, J.W. Kadereit and C. Jeffrey, Editors. 2007, Springer. Berlin: Germany. p. 208-241.
7. Pelsner, P.B., et al, An ITS phylogeny of tribe Senecioneae (Asteraceae) and a new delimitation of *Senecio* L. Taxon, 2007. 56: p. 1077-1104.
8. Panero, J.L., New combinations and infrafamilial taxa in the Asteraceae. Phytologia, 2005. 87: p. 1-14.
9. Fu, Z.X., et al., A comprehensive generic-level phylogeny of the sunflower family: Implications for the systematics of Chinese Asteraceae. Journal of Systematics and Evolution, 2016. 54(4): p. 416-437.
10. Alvarez Fernandez, I., et al., A phylogenetic analysis of *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae) based on morphological, nuclear ribosomal (ITS), and chloroplast (trnL-F) evidence. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001. 20(1): p. 41-64.

11. Edmondson, J.R., *Doronicum* L., in Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol 5, P.H. Davis, Editor. 1975, Edinburgh Press. Edinburgh. p. 137-145.
12. Cronquist A., An Integrated System of Classification of Flowering Plants. 1981, New York, USA: Columbia University Press.
13. Alvarez Fernandez, I., Systematics of Eurasian and North African *Doronicum* (Asteraceae: Senecioneae). Annals of the Missouri Botanical Garden, 2003. 90(3): p. 319-389.
14. Cavillier, F., Nouvelles études sur le genre *Doronicum*. Annuaire du Conservatoire & du Jardin Botaniques de Geneve, 1911. 13-14: p. 195-368.
15. Edmondson, J.R., Notes on *Doronicum* L. in SW Asia. Notes From The Royal Botanic Garden, 1973. 32: p. 255-258.
16. Linnaeus, C., *Species Plantarum*. 1753, Stockholm, Sweden: Holmiae, Impensis L. Salvii.
17. Lamarck, J.B.A.P., Encyclopédie Méthodique. Botanique. 1786, Paris, France: Liège, Panckoucke.
18. Necker, N.J., *Elementa Botanica*. 1790, Neuwied, Germany: Apud Societatem Typographicam.
19. Bentham, G. and J.D. Hooker, Genera Plantarum, Vol. 2. 1873, London, England: A. Black
20. Cassini, H., Aperçu des genres ou sous-genres nouveaux forms par M. Henri Cassini dans la famille des Synanthérées. Bulletin des sciences de la Société Philomatique de Paris, 1817. 1817: p. 151-154.
21. Candolle, A.P., Prodrômus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis, Vol. 5. 1836, Paris, France: Sumptibus Sociorum Treuttel et Würtz.
22. Edmondson, J.R., The genus *Doronicum* L. in Iran. Notes From The Royal Botanic Garden, 1978. 32: p. 67-73.
23. Avetisyan, V.E., Rod *Doronicum* L. v Armenii (*Doronicum* L. genus in Armenia). Biologicheskii Zhurnal Armenii, 1980. 33: p. 532-534.
24. Chacón Aumente, R., Contribución al estudio taxonómico del género *Doronicum* L. (Compositae) en la península Ibérica. Anales del Jardín Botánico de Madrid, 1987. 43: p. 253-270.
25. Duvigneaud, J., Le genre *Doronicum* L. en Belgique et dans les régions voisines. Natura Mosana, 1992. 45: p. 81-92.
26. Cavillier, F., E'tude sur les *Doronicum* a'fruits homomorphes. Annuaire du Conservatoire & du Jardin Botaniques de Geneve, 1907. 10: p. 177-251.
27. Alvarez Fernandez, I., and G. Nieto Feliner, A multivariate approach to assess the taxonomic utility of morphometric characters in *Doronicum* (Asteraceae, Senecioneae). Folia Geobotanica, 2001. 36: p. 423-444.
28. Willkomm, H.M. and J.M.C. Lange, Prodrômus Florae Hispanicae, Vol 2. 1870, Stuttgart, Germany: Schweizerbart.
29. Kadereit, J.W. and C. Jeffrey, The Families and Genera of Vascular Plants, Vol. 8, Flowering Plants, Eudicots, Asterales. 2007, Berlin, Germany: Springer.
30. Skof, S., et al., Phylogeny and biogeography of the narrowly endemic *Doronicum cataractarum* (Asteraceae) from the eastern European Alps: Pleistocene origin from Alpine ancestors rather than Tertiary relic with southwest Asian affinity. Plant Systematics and Evolution, 2019. 305(2): p. 139-149.
31. Güner, A., et al., *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. 2012, İstanbul, Turkey: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
32. Bonifacino J.M., et al., A history of research in Compositae: early beginnings to the Reading Meeting (1975), in Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae, V.A. Funk, et al., Editors. 2009, International Association for Plant Taxonomy. Vienna: Austria. p. 3-38.
33. Metcalfe, C.R. and L. Chalk, Anatomy of the Dicotyledons. Vol. 2. 1957, Oxford, England: Clarendon Press.
34. Metcalfe, C.R. and L. Chalk. Anatomy of Dicotyledons: Systematic Anatomy Of The Leaf And Stem, With A Brief History Of The Subject, Vol 1. 1979, Oxford, England: Clarendon Press

35. Muravnik, L.E., The structural peculiarities of the leaf glandular trichomes: A review, in *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites*, K.G. Ramawat, H.M. Ekiert, and S. Goyal, Editors. 2021, Springer. India. p. 63-97.
36. Kletter C. and N. Kriechbaum, *Tibetan Medicinal Plants*. 2001, Stuttgart, Germany: Medpharm Sci. Publs.
37. Cutler, D.F., T. Botha, and D.W. Stevenson, *Plant Anatomy: An Applied Approach*. 2007, Australia: Blackwell Publishing Ltd.
38. Janačković, P., A. Susanna, and P.D. Marin, Micromorphology and anatomy in systematics of Asteraceae An old-fashioned approach?. *Biologica Nyssana*, 2019. 10(2): p. 77-85.
39. Abid, R., and N. Ali, Cypselar morphology and its taxonomic significance for the tribe Senecioneae (Asteraceae) from Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 2010. 42: p. 117-133.
40. Idu, M. and A.C. Omonhinmin, Seed morphology of some taxa of Asteraceae. *Journal of Economic & Taxonomic Botany*, 2001. 19: p. 1-30.
41. Jana, B.K. and S.K. Mukherjee, Cypselar characters of some species of the tribe-Senecioneae (Asteraceae), on the basis of morphological study. *International Journal of Pharmaceutical Research and Bio-Science*, 2013. 2(1): p. 261-266.
42. Jana, B.K. and S.K. Mukherjee, Pappus structure of some species of Compositae. *Journal of Economic and Taxonomic Botany*, 2013. 37(3): p. 480-493.
43. Jana, B.K. and S.K. Mukherjee, Distribution of trichomes on the mature cypselar surface of some species of Compositae. *Journal of Economic and Taxonomic Botany*, 2014. 38(2): p. 369-383.
44. Kostina, O.V. and L.E. Muravnik, Structure and chemical content of the trichomes in two *Doronicum* species. *Modern Phytomorphology*, 2014. 5: p. 167-171.
45. Mosina, A.A., O.V. Kostina, and L.E. Muravnik, Morphology and ultrastructure of the glandular trichomes of vegetative and reproductive organs in *Doronicum pardalianches* (Asteraceae). XIV. *Modern Dünyada Botanik Kongresi, Rusya*, 2018: p. 188.
46. Muravnik, L.E., O.V. Kostina, and A.A. Mosina, Glandular trichomes of the leaves in three *Doronicum* species (Senecioneae, Asteraceae): morphology, histochemistry, and ultrastructure. *Protoplasma*, 2019. 256(3): p. 789-803.
47. Grew, N., *The Anatomy of Plants With an Idea of a Philosophical History of Plants and Several Other Lectures Read Before the Royal Society*. 1682, London, England: W. Rawlins.
48. Steetz, J., *Crystallopollen and Ambassa*, in *Naturwissenschaftliche Reise nach Mossambique auf Befehl seiner Majestät des Königs Friedrich Wilhelm IV*, W.C. Peters, Editor. 1864, Georg Reiner. Berlin: Germany. p. 363-367.
49. Blackmore, S., et al., Evolution of pollen in Compositae, in *Systematics, Evolution and Biogeography of Compositae*, V.A. Funk, et al., Editors. 2009, International Association for Plant Taxonomy. Vienna: Austria. p. 101-130.
50. Wodehouse, R.P., Pollen grain morphology in the classification of the Anthemideae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 1926. 53: p. 479-485.
51. Wodehouse, R.P., The phylogenetic value of pollen grain characters. *American Journal of Botany*, 1928. 42: p. 891-934.
52. Wodehouse, R.P., *Pollen grains. Their Structure, Identification and Significance in Science and Medicine*. 1935, New York, USA: Mc.Graw-Hill.
53. Stix, E., *Pollen morphologische untersuchungen an Compositen*. Grana, 1960. 2(2): p. 41-104.
54. Skvarla, J.J. ve D. A. Larson, An electron microscopic study of pollen morphology in the Compositae with special reference to the Ambrosiinae. *Grana Palynologica*, 1965. 6: p. 210-269.
55. Skvarla, J.J. ve B.L. Turner, Systematic implications from electron microscopic studies of Compositae pollen—a review. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1966. 53: p. 220-256.
56. Erdtman, G., B. Berglund, and J. Praglowski, *An introduction to a Scandinavian pollen flora*. Grana Palynologica, 1961. 2(2): p. 3-92.

57. Wagenitz, G., Systematics and phylogeny of Compositae (Asteraceae). *Plant Systematic and Evolution*, 1976. 125: p. 29-46.
58. Perveen, A., Contributions to the pollen morphology of the family Compositae. *Turkish Journal of Biology*, 1999. 23: p. 523-535.
59. Punt, W. And P.P. Hoen, The Northwest European Pollen Flora, 70. Asteraceae - Asteroideae. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 2009. 157(1-2): p. 22-183.
60. İnceoğlu, Ö. and F. Karamustafa, The pollen morphology of plants in Ankara region I: Compositae. *Faculté de Sciences de l'Université d'Ankara, Ankara-Turquie, Série C2, Botanique, Tome*, 1977. 21: p. 77-100.
61. Meo, A.A., Palynological studies of selected genera of the tribes of Asteraceae from Pakistan. 2005, Quaid-i-Azam Universitesi, Biyoloji Bölümü, Doktora Tezi, Islamabad, Pakistan.
62. Nordenstam, B., Senecioneae and Liabeae-systematic review, in *The Biology and Chemistry of the Compositae*, Vol. 2., V.H. Heywood, J.B. Harborne and B.L. Turner, Editors. 1977, Academic Press. London: England. p. 799-830.
63. Robinson, H., et al., Chromosome numbers in Compositae, XVII: Senecioneae III. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 1997. 84(4): p. 893-906.
64. Ornduff, R., et al., Chromosome numbers in Compositae. III. Senecioneae. *American Journal of Botany*, 1963. 50(2): p. 131-139.
65. Lindqvist, K., Some results of a cytological investigation of *Doronicum*. *Hereditas*, 1950. 36: p. 94-102.
66. Peruzzi, L., G. Bedini, and A. Andreucci, Homoploid hybrid speciation in *Doronicum* L. (Asteraceae)? Morphological, karyological and molecular evidences. *Plant Biosystems*, 2012. 146(4): p. 867-877.
67. Güven, S., Ü. Umdu Topsakal, and O. Beyazoğlu, Chromosome counts of some *Doronicum* (Asteraceae: Senecioneae) taxa from Turkey. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, 2020. 4: p. 605-610.
68. Löve, Á., IOPB chromosome number reports. XXII. *Taxon*, 1969. 18(4): p. 433-442.
69. Tasenkevitch, L.A., E.I. Vysotskaja, and N.K. Vorobetz, N.K., Chromosome numbers in rare and endemic species of vascular plants from the Ukrainian Carpathians. *Botanicheskii Zhurnal (Moscow & Leningrad)*, 1989. 74: p. 1669-1670.
70. Huber, W. and M. Baltisberger, IOPB chromosome data 4. *International Organization of Plant Biosystematists Newsletter*, 1992. 18: p. 6-8.
71. Pachschwöll, C., et al., Polyploidisation and geographic differentiation drive diversification in a european high mountain plant group (*Doronicum clusii* aggregate, Asteraceae). *PLoS ONE*, 2015. 10(3): p. 1-30.
72. Zhukova, P.G., Karyology of some plants, cultivated in the Arctic-Alpine Botanical Garden, in *Plantarum in Zonam Polarem Transportatio II.*, N.A. Avrorin, Editor. 1967, Nauka. Leningrad: Russia. p. 139-149.
73. Rostovtseva, T.S., Chromosome numbers of some species of the family Asteraceae Dumort. *Botanicheskii Zhurnal SSSR*, 1979. 64(4): p. 582-589.
74. Stepanov, N.V., Chromosome numbers of some higher plants taxa of the flora of Krasnoyarsk region. *Botanicheskii Zhurnal (Moscow & Leningrad)*, 1994. 79(2): p. 135-139.
75. Marhold, K. and J. Kučera, IAPT chromosome data 28. *Taxon*, 2018. 67(6): p. 1235-1245.
76. Davlianidze, M.T., *Investigatio cytogeographics speciorum nonnullarum altimontanarum e Caucaso*. *Notas Systematic Georgia Institute Botany Tbilissi*, 1984. 40: p. 56-66.
77. Davlianidze, M.T., Chromosome numbers in the representatives of the flora from Georgia. *Botanicheskii Zhurnal SSSR*, 1985. 70(5): p. 698-700.
78. Löve, Á., IOPB chromosome number reports XLI. *Taxon*, 1973. 22(4): p. 459-463.
79. Strid, A. and R. Franzen, Chromosome numbers in flowering plants from Greece. *Willdenowia*, 1983. 13: p. 329-333

80. Pashuk, K.T., Chromosome numbers in species of subalpine belt of Chernogora (Ukrainian Carpatians). *Botanicheskii Zhurnal*, 1987. 72: p. 1069-1074.
81. Belaeva, V.A. and V.N. Siplivinsky, Chromosome numbers and taxonomy of some species of Baikal flora. *Botanicheskii Zhurnal* (Moscow & Leningrad), 1975. 60(6): p. 864-872.
82. Kuzmanov, B.A., S.B. Georgieva, and V.A. Nikolova, Chromosome numbers of Bulgarian flowering plants. I. Fam. Asteraceae. *Fitologia*, 1986. 31: p. 71-74.
83. Löve, Á., Chromosome number reports LXIX. *Taxon*, 1980. 29(5-6): p. 703-730.
84. Löve, Á., IOPB Chromosome number reports LXXV. *Taxon*, 1982. 31(2): p. 342-368.
85. Lippert, W. and G.R. Heubl, Chromosomenzahlen von Pflanzen aus Bayern und angrenzenden Gebieten: [Teil 1]. *Berichte der Bayerischen Botanischen Gesellschaft*, 1988. 59: p. 13-22.
86. Baltisberger, M., Numeri cromosomici per la flora Italiana: 1208-1230. *Informatore Botanico Italiano*, 1990. 22: p. 216-226.
87. Baltisberger, M., Cytological investigations of some Greek plants. *Flora Mediterranea*, 1991. 1: p. 157-173.
88. Garbari, F., P. Miceli, and G. Monti, Numeri cromosomici per la Flora Italiana, 676-682. *Informatore Botanico Italiano*, 1980. 12: p. 107-111.
89. Aquaro, G., L. Peruzzi, and G. Cesca, Chromosome numbers of 20 flowering plants from ex-Yugoslav countries. *Bocconea*, 2007. 21: p. 303-312.
90. Löve, Á., IOPB chromosome number reports XXXVI. *Taxon*, 1972. 21(2): p. 333-346.
91. Polatschek, A., Cytotaxonomische Beiträge zur Flora der Ostalpenländer, II. *Österreichische Botanische Zeitschrift*, 1966. 113(1): p. 101-147.
92. Löve, Á. And O.T. Solbrig, IOPB chromosome number Reports II. *Taxon*, 1964. 13(6): p. 201-209.
93. Murin, A., Index of chromosome numbers of Slovakian flora. Part 6. *Acta Facultatis Rerum Naturalium Universitatis Comenianae, Botanica*, 1978. 26: p. 1-42.
94. Strid, A. and I.A. Andersson, Chromosome numbers of Greek mountain plants. An annotated list of 115 species. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 1985. 107: p. 203-228.
95. Ruíz de Clavijo, E., Números cromosómicos para la flora Española 664-690. *Lagascalia*, 1993. 17: p. 161-172.
96. Jee, V., U. Dhar, and P. Kachroo, Cytogeography of some endemic taxa of Kashmir Himalaya. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 1989. 55: p. 177-184.
97. Mehra, P.N. and P. Remanandan, Cytological investigations on Indian Compositae. IV. Tribes Senecioneae, Eupatorieae, Vernonieae, and Inuleae. *Nucleus*, 1975. 18: p. 6-19.
98. Kong, Y.C. and D.S. Chen, Elucidation of Islamic drugs in Hui Hui Yao Fang: A linguistic and pharmaceutical approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 1996. 54(2-3): p. 85-102.
99. Mikaili, P., et al., A Review on pharmacognotic and pharmaceutical terms originated from islamic sources. *Journal of Basic and Applied Scientific Research*, 2012. 2(4): p. 3235-3241.
100. Scarborough, J., Theophrastus on herbals and herbal remedies. *Journal of the History of Biology*, 1978. 11(2): p. 353-385.
101. Naseer, M., M. Anwar, and M.Y. Siddiqui, Cardioprotective drugs with especial reference to Kitab Al-Adwiyah Al-Qalbiyah : A review. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016. 5(9): p. 2453-2462.
102. Sobhani, Z., et al., Medicinal plants targeting cardiovascular diseases in view of Avicenna. *Current Pharmaceutical Design*, 2017. 23(17): p. 2428-2443.
103. Setayesh, M., et al., New candidates for treatment and management of carpal tunnel syndrome based on the Persian Canon of Medicine. *Integrative Medicine Research*, 2018. 7(2): p. 126-135.
104. Lev, E., Botanical view of the use of plants in medieval medicine in the Eastern Mediterranean according to the Cairo Genizah. *Israel Journal of Plant Sciences*, 2015. 62(1-2): p. 122-140.
105. Alakbarov, F.U., Medicinal plants used in medieval Azerbaijan phytotherapy. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 2001. 1(3): p. 35-49.

106. Lev, E., Reconstructed materia medica of the Medieval and Ottoman al-Sham. *Journal of Ethnopharmacology*, 2002. 80(2-3): p. 167-179.
107. Babaeian, M., et al., Herbal remedies for functional dyspepsia and traditional Iranian medicine perspective. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 2015. 17(11): p. 1-8.
108. Zarshenas, M.M., S. Jamshidi, and A. Zargarani, Cardiovascular aspects of geriatric medicines in traditional Persian medicine; a review of phytochemistry and pharmacology. *Phytomedicine*, 2016. 23(11): p. 1182-1189.
109. Ghafari, S., et al., The Herbal medicine proposed by Iranian traditional medicine (Persian Medicine) for treatment of primary dysmenorrhea: A review. *Traditional and Integrative Medicine*, 2018. 3(1): p. 30-42.
110. Amiri, M.S., and M.R. Joharchi, Ethnobotanical investigation of traditional medicinal plants commercialized in the markets of Mashhad, Iran. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 2013. 3(3): p. 254-271.
111. Miraldi, E., S. Ferri, and V. Mostaghimi, Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *Journal of Ethnopharmacology*, 2001. 75(2-3): p. 77-87.
112. Khare, C.P., *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary*. 2007, Berlin, Germany: Springer.
113. Houghton, P.J. and I.M. Osibogun, Flowering plants used against snakebite. *Journal of Ethnopharmacology*, 1993. 39(1): p. 1-29.
114. Kala, C.P., Medicinal plants of the high altitude cold desert in India: Diversity, distribution and traditional uses. *International Journal of Biodiversity Science and Management*, 2006. 2(1): p. 43-56.
115. Rana, C.S., et al., An ethnobotanical study of plant resources in the Nanda Devi Biosphere Reserve (a world heritage site), Uttarakhand, India. *The Journal of Ethnobiology and Traditional Medicine*, 2013. 120: p. 591-601.
116. Bharti, R., et al., A review on medicinal plants having antioxidant potential. *Journal of Pharmacy Research*, 2012. 5(8): p. 4278-4287.
117. La Barre, W., *Materia Medica of the Aymara: Lake Titicaca Plateau, Bolivia*. Webbia, 1959. 15(1): p. 47-94.
118. Adams, M., et al., Malaria in the renaissance: Remedies from European herbals from the 16th and 17th century. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011. 133(2): p. 278-288.
119. Adams, M., et al., Epilepsy in the Renaissance: A survey of remedies from 16th and 17th century German herbals. *Journal of Ethnopharmacology*, 2012. 143(1): p. 1-13.
120. Agelet, A., and J. Vallès, Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part III. Medicinal uses of non-vascular plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003. 84(2-3): p. 229-234.
121. Vogl-Lukasser, B. and C.R. Vogl, Ethnobotanical research in homegardens of small farmers in the alpine region of Osttirol (Austria): An example for bridges built and building bridges. *Ethnobotany Research and Applications*, 2004. 2: p. 111-137.
122. Baytop, T., *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. (2nd ed.). 1999, İstanbul, Turkey: Nobel Tıp Kitabevleri- In Turkish.
123. Tuzlacı, E., *Türkiye Bitkileri Sözlüğü*, (Genişletilmiş 2. baskı). 2011, İstanbul, Turkey: Alfa Yayınları- In Turkish.
124. Başaran, M.A., et al., Natural and aromatic plants that make natural distribution in some forest recreation sites in Erzurum province. *International Congress on Medicinal and Aromatic Plants*, 2017. p: 354-365.
125. Tuzlacı, E. and M.K. Erol, Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta). *Fitoterapia*, 1999. 70: p. 593-610.
126. Uğurlu, E. and O. Seçmen, O., Medicinal plants popularly used in the villages of Yunt Mountain (Manisa-Turkey). *Fitoterapia*, 2008. 79(2): p. 126-131.
127. Uğulu, I., et al., The investigation and quantitative ethnobotanical evaluation of medicinal plants used around Izmir province, Turkey. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2009. 3(5): p. 345-367.







128. Kargioğlu, M., et al., Traditional uses of wild plants in the middle Aegean region of Turkey. *Human Ecology*, 2010. 38: p. 429-450.
129. Ari, S., et al., Ethnobotanical survey of plants used in Afyonkarahisar-Turkey. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2015. 11: p. 1-15.
130. Sarıbaş, M., et al., The use of some natural plant species from the Western Black Sea Region of Turkey for landscape design. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2007. 16(2): p. 193-205.
131. Petricic, J., et al., Alkaloid concentrate from *Doronicum austriacum* inhibits the growth of mouse fibroblasts in vitro and the growth of mouse mammary carcinoma *in vivo*. *Acta Pharmaceutica Jugoslavica*, 1991. 41(2): p. 169-173.
132. Schwaiger, et al., New results on the phytochemistry and pharmacology of *Doronicum austriacum* Jacq. *Planta Medica*, 2008. 74(9): p. 90.
133. Marzocco, S., et al., Anti-inflammatory and anti-oxidant potential of the root extract and constituents of *Doronicum austriacum*. *Molecules*, 2017. 22(6): p. 1-13.
134. Nabati, F., et al., Large scale screening of commonly used Iranian traditional medicinal plants against urease activity. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012. 20: p. 1-9.
135. Hamed, A., K. Zomorodian, and F. Safari, Antimicrobial activity of four medicinal plants widely used in Persian folk medicine. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2015. 2(1): p. 25-33.
136. Kumar, V.P., et al., Search for antibacterial and antifungal agents from selected Indian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006. 107(2): p. 182-188.
137. Hanif, M.A., et al., Antibacterial and antifungal activities of essential oils extracted from medicinal plants using CO₂ supercritical fluid extraction technology. *Asian Journal of Chemistry*, 2010. 22(10): p. 7787-7798.
138. Gupta, D., B. Bleakley, and R.K. Gupta, Phytochemical analysis and antioxidant activity of herbal plant *Doronicum hookeri* hook F. (Asteraceae). *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011. 5(13): p. 2736-2742.
139. Gupta, D., Phytochemical investigation & pharmacological evaluation of medicinal plants for anti-microbial, anti-oxidant, anti-inflammatory activities & nephrotoxicity. 2011, Guru Gobind Singh Indraprastha Üniversitesi, Biyoteknoloji Bölümü, Doktora Tezi, Hindistan.
140. Özcan, K., Antibacterial, antioxidant and enzyme inhibition activity capacities of *Doronicum macrolepis* (FREYN&SINT): An endemic plant from Turkey. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2020. 28(1): p. 95-100.
141. Usta, C., A.B. Yıldırım, and A.U. Türker, Antibacterial and antitumour activities of some plants grown in Turkey. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2014. 28(2): P. 306-315.
142. Karadeniz, A., et al., Antioxidant activity of some Turkish medicinal plants. *Natural Product Research*, 2015. 29(24): p. 2308-2312.
143. Türker, H. ve A.B. Yıldırım, Screening for antibacterial activity of some turkish plants against fish pathogens: A possible alternative in the treatment of bacterial infections. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2015. 29(2): p. 281-288.
144. Arumugam, R., C. Sarıkürkçü, and M.S. Özer, Comparison of methanolic extracts of *Doronicum orientale* and *Echium angustifolium* in terms of chemical composition and antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2021. 33: p. 1-6.
145. Zengin, G., et al., A comparative study of chemical profiling and biological effects of *Doronicum orientale* extracts. *Chemistry & Biodiversity*, 2022. 19(4): p. 1-11.
146. Manayi, A., et al., Phytochemical investigation and biological activity of *Doronicum pardalianches* L. roots against Alzheimer's disease. *Natural Product Research*, 2021. p. 1-5.
147. Syed, S., Study to evaluate the antioxidant and hepatoprotective activities of roots extracts of *Doronicum hookeri* in CCl₄ treated rats. *European Journal of Medicinal Plants*, 2014. 4(6): p. 675-685.
148. Aбышев, A.Z., et al., Coumarins of roots of *Doronicum macrophyllum* Fisch. ex Horten and their antiarrhythmic activity. *Rastitel'nye Resursy*, 1982. 18(2): p. 249-252.

149. Badalamenti, N., et al., Chemical constituents and biological properties of genus *Doronicum* (Asteraceae). *Chemistry & Biodiversity*, 2021. 18(12): p. 1-18.
150. Towers, G.N.H., et al., Phototoxic polyacetylenes and their thiophene derivatives [effects on human skin]. *Contact Dermatitis*, 1979. 5(3): p. 140-144.
151. Bohlmann, F. and C. Zdero, Neue benzofuranderivate aus *Doronicum austriacum* Jacq. *Tetrahedron Letters*, 1970. 11(41): p. 3575-3576.
152. Lee, S. T., et al., Tremetone and structurally related compounds in white snakeroot (*Ageratina altissima*): a plant associated with trembles and milk sickness. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2010. 58(15): p. 8560-8565.
153. Mroczek, T., K. Glowniak, and A. Wlaszczyk, Simultaneous determination of N-oxides and free bases of pyrrolizidine alkaloids by cation-exchange solid-phase extraction and ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2002. 949(1-2): p. 249-262.
154. Reynaud, J., M. Becchi, and J. Raynaud, p-Hydroxyacetophenone derivatives from *Doronicum grandiflorum*. *Journal of Natural Products*, 1985. 48(2): p. 331-331.
155. Reynaud, J., M. Becchi, and J. Raynaud, Présence de (6"-O-acétyl) glucosyl-3-quercétine chez *Doronicum grandiflorum* Lam. (Compositae). *Pharmazie*, 1985. 40(2): 132-133.
156. Reynaud, J. and J. Raynaud, Les flavonoïdes de *Doronicum grandiflorum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1986. 14(2): p. 191-193.
157. Reynaud, J. and J. Raynaud, Sur la présence d'Onopordum chez *Doronicum grandiflorum* Lam. (Compositae). *Die Pharmazie*, 1984. 39: p. 126.
158. Reynaud, J., J. Raynaud and B. Voirin, Sur la présence de deux flavone méthoxyles rares chez *Doronicum grandiflorum* Lam. (Compositae). *Die Pharmazie*, 1983. 38: p. 628-629.
159. Clarke, C.B., R.N. Yadava, and G. Patil, Isolation and characterization of a new allelochemical from flower of *Doronicum hookeri*. *Research Journal of Chemistry and Environment*, 2013. 17: p. 22-25.
160. Bohlmann, F., A.K. Dhar, and M. Ahmed, Thymol derivatives from *Doronicum hungaricum*. *Phytochemistry*, 1980. 19(8): p. 1850-1851.
161. Alieva, S.A., et al., Alkaloids of *Doronicum macrophyllum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1976. 12(2): p. 173-175.
162. Alieva, S.A., et al., A diterpene glycoside - Doronicoside D - from *Doronicum macrophyllum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 1978. 13(5): p. 546-549.
163. Bohlmann, F. and M. Grenz, Neue tremeton-derivate aus *Doronicum macrophyllum*. *Phytochemistry*, 1979. 18: p. 179-181.
164. Alieva, S.A., V.B. Omurkamzinova, and Glyzin, V.I., Flavonoids of *Doronicum macrophyllum* and *D. oblongifolium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1979. 91(2): p. 498-501.
165. Bohlmann, F. and W.R. Abraham, Ein neuer sesquiterpenalkohol und andere inhaltsstoffe aus *Doronicum pardalianches*. *Phytochemistry*, 1979. 18(4): p. 668-671.
166. Rajagopalan, T.R. and R.K.S. Negi, Alkaloids from *Doronicum pardalianches* Linn. *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry*, 1985. 24(8): P. 882-882.
167. Tosi, B., et al., Screening for toxic thiophene compounds from crude drugs of the family compositae used in Northern Italy. *Phytotherapy Research*, 1991. 5(2): p. 59-62.
168. Shaimerdenova, Z.R., et al., Volatile Constituents of *Doronicum altaicum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2019. 55(5): p. 968-969.
169. Lazarević, J., et al., Chemical composition of the essential oil of *Doronicum austriacum* Jacq. subsp. *giganteum* (Griseb.) Stoj. Et Stef. (Compositae) from Serbia. *Journal of Essential Oil Research*, 2009. 21(6): p. 507-510.
170. Paolini, J., et al, Thymol derivatives from essential oil of *Doronicum corsicum* L. *Flavour and Fragrance Journal*, 2007. 22(6): p. 479-487.
171. Akpınar, K., et al., Volatile constituents of the flowers and leaves-stems of three *Doronicum* taxa from Turkey. *Asian Journal of Chemistry*, 2009. 21(2): p. 1225-1229.

172. Nedelcheva, A., N. Kostova, and A. Sidjimov, Pyrrolizidine alkaloids in *Tussilago farfara* from Bulgaria. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2015. 29: p. 1-7.

Yuceer, M., et al., Sıvı Yumurta Akından Lizozimin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Sprey Kurutucu ile Kurutulması: Güncel Gelişmeler ve Uygulamaları. International Journal of Life Sciences and Biotechnology, 2023 6(1): p. 245-261. DOI: 10.38001/ijlsb.1227391

Sıvı Yumurta Akından Lizozimin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Sprey Kurutucu ile Kurutulması: Güncel Gelişmeler ve Uygulamaları

Muhammed Yuceer^{1*} , Cemre Çelikten² , Rukiye Mavuş² , Ebubekir Dişli² ,
Şeyma Ağırıl Akgün² , Emre Sarı² 

ÖZET

Gıdalarda doğal koruyucu olarak kullanılan lizozim, ticari açıdan önemli bir doğal enzim olup, farklı gıda mamullerinin (peynir, bira ve şarap) imalatında kullanılan bir antimikrobiyal ajan (koruyucu katkı maddesi) veya mikrobiyal prosesleri kontrol etmek amacıyla da tercih edilmektedir. Ayrıca lizozim doğal ve güvenli biyolojik antiseptik olup, tıp, ilaç gibi farklı uygulamalarda değerlendirilmektedir. Lizozimin moleküler büyüklüğü (14,3 kDa) göz önüne alındığında moleküler boyuta göre ayırım yapan ultrafiltrasyon prosesinin lizozimin ayrıştırılmasında kullanılması son zamanlarda çokça çalışılan bir konu haline gelmiştir. Ultrafiltrasyon yöntemi ile protein fraksiyonu işletme şartları ve fizikokimyasal koşullardan oldukça etkilenmektedir ve bu nedenle proses ihtiyaçlarının açıkça belirlenmesi gerekmektedir. Bu derleme çalışması ile lizozim ekstraksiyon, saflaştırma ve kurutma proseslerindeki güncel gelişmeler ve uygulamaları ele alınmıştır.

MAKALE GEÇMİŞİ

Geliş

9 Ocak 2023

Kabul

14 Haziran 2023

ANAHTAR

KELİMELELER

Yumurta,
albumin,
lizozim,
proses
membran filtrasyon,
püskürtmeli kurutucu

Extraction, Purification and Dehydration with Spray Drying of Lysozyme from Egg White: Current Developments and Applications

ABSTRACT

Lysozyme is used as a natural preservative in foods and currently used as a natural antimicrobial agent in various foods to control microbial processes or preservative agent-additive in the production of cheese, beer and wine. In addition, lysozyme is accepted as a natural and safe biological antiseptic and is widely preferred in fields such as medicine and pharmaceuticals. Considering the molecular size of the lysozyme (14.3 kDa), the use of ultrafiltration process that distinguishes according to molecular size in the separation of lysozyme has recently become widely studied. Ultrafiltration method used in the protein fraction and the process is highly affected by the operating conditions and physicochemical conditions, and therefore the process needs to be clearly documented. In this review, current developments and applications in lysozyme extraction, purification and drying processes are discussed.

ARTICLE HISTORY

Received

09 January 2023

Accepted

14 June 2023

KEYWORDS

Egg,
albumin,
lysozyme,
process
membrane filtration,
spray drying

¹ Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Çanakkale Teknik Bilimler MYO, Gıda İşleme Bölümü, Çanakkale, Türkiye

² Gemak Gıda Endüstri Makinaları ve Tic. A.Ş., Ar-Ge Merkezi, Ankara, Türkiye

*Corresponding Author: Muhammed Yuceer, e-mail: myuceer@comu.edu.tr

Giriş

Yumurta fonksiyonel bir gıda olarak toplumun sağlıklı beslenmesi yönünden mükemmel bir besindir. Mükemmel fonksiyonel özelliklere ve birçok biyolojik aktiviteye sahip olan yumurta ekonomik değerinin yanı sıra bir insanın ihtiyacı için gereken tüm makro ve mikro besin öğelerini yapısında bulunduran temel bir besindir [1, 2]. Geçtiğimiz on yılda yumurta bilimi araştırmalarında, yumurtanın doğası, biyolojik, kimyasal ve fiziksel özellikleri hakkındaki anlayışımızı tamamlayan çalışmalarla önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Ülkemiz kabuklu yumurta üretimindeki sıralamada dünyada ilk 10'da yer almasına rağmen, işlenen ürün ve katma değere sahip ürün portföyü ile işlenmiş ürünlerin ihracatı konusunda çok ilerleme kaydedilmemiştir [3].

Yumurta; yumurta kabuğu ve zarı (%9-12) ile yumurta akı (%60) ve yumurta sarısı (%30-33) olmak üzere 3 ana bileşenden oluşmaktadır. Yumurtanın ana bileşenlerini ise su (%75), proteinler (%12), lipidler (%12) ve karbonhidratlar ve mineraller (%1) oluşturmaktadır [4, 5].

Günümüzde gelişen yeni uygulama trendleri ile gıda endüstrisinde doğal ve doğal kaynaklardan elde edilen antimikrobiyal bileşenlerin kullanıldığı yeni yöntem ve ürünlere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Gıdalarda doğal koruyucu olarak kullanılan lizozim enzimi mikrobiyal yükü kontrol altına almak amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca lizozim doğal ve güvenli biyolojik antiseptik olarak kabul edilmekte ve tıp, ilaç gibi alanlarda da uygulanmaktadır [3, 6, 7].

Lizozim (Muramidaz veya N-asetil muramik-hidrolaz, EC 3.2.1.17), yumurta beyazında bulunan bir enzim olup, yumurta albümini (beyaz-ak) ise bu enzimin en uygun ticari kaynağıdır [8, 9]. Lizozim günümüzde biyoteknolojik metotlarla bazı bitkilerden, bakterilerden ve bakteriyofajlardan da izole edilmektedir. Ancak yumurtanın içerisinde bulunan lizozim en yüksek çözünürlüğe ve aynı zamanda en kararlı stabiliteye sahip olanıdır.

Lizozimin molekül ağırlığı 14.3 kDa olup, izoelektrik noktası 10.7'dir ve 129 aminoasit kalıntısından oluşmaktadır. Aralarında enzimin aktif bölgesi bulunan uzun bir α -sarmal ile birbirine bağlanan iki alandan oluşmaktadır [Products, #1694]. Lizozimin yüksek pH değerine sahip olması bakterilerin gelişimini sınırlandırılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle Gram negatif bakterilere karşı bakteriyostatik, bakteriyolitik ve bakterisidal aktivite gösterir [11]. Gram pozitif (+) bakterilere karşı antimikrobiyal etkiye

sahip olup hücre duvarına karşı bakteriyostatik, bakterisidal ve bakteriyolitik aktivitesi bilinmektedir [12]. Lizozimin enzimatik hidrolizinin, proteinin antibakteriyel kısımlarını açığa çıkararak ve antibakteriyel aktiviteye sahip peptitler üreterek aktivitesini arttırdığı bulunmuştur [13, 14]. Lizozimin antibakteriyel özellikleri, periodontite neden olan bakterilere karşı korunmak ve ağız mukozasındaki enfeksiyonları önlemek için diş macunu, gargara ve sakız gibi ağız sağlığı bakım ürünlerinde kullanılmasında da etkili olmuştur [15]. Gıda ambalaj malzemelerine de dahil edilen lizozim, mikroorganizmaların kontaminasyonunu veya büyümesini önleyerek steril olmayan veya minimum düzeyde işlenmiş gıdaların raf ömrünü uzatma potansiyeline sahiptir. Yenilebilir filmler ayrıca potansiyel antimikrobiyal paketlenme sistemleri olarak da araştırılmıştır [16].

Peynir yapımında, özellikle preslenmiş ve pişirilmiş lorlardan yapılan peynirlerde istenmeyen tatlara ve geç “üfleme” (istenmeyen fermantasyon) neden olan *Clostridium tyrobutyricum*'un büyümesini önlemek için lizozim kullanılmıştır [17]. Lizozim ayrıca, starter bakterilerin lizizi, peynir olgunlaşması sırasında proteolizden önemli rol oynayan sitoplazmik enzimlerin salınmasına neden olduğu için peynir olgunlaşmasının hızlandırılmasında da kullanılmıştır [18]. Lizozim enziminin *Clostridium tyrobutyricum*, *Clostridium thermosaccharolyticum* ve *Bacillus stearothermophilus* gibi mezofilik ve termofilik spor oluşturan bakterilerin gelişimi üzerine inhibisyonu etkisi söz konusudur. Ayrıca *Yersinia enterocolitica*, *Clostridium jejuni*, *Clostridium botulinum* ve *Listeria monocytogenes* üzerindeki litik aktivitesi bilinmektedir [Products, #1694]. Ayrıca lizozimin nisin ve EDTA ile kompleks oluşturarak ile gram negatif (-) bakterilere karşı da inhibe edici özelliği bulunmaktadır [20, 21].

Lizozim, gıda endüstrisinde sorun yaratan 2 ana patojen olarak kabul edilen *Listeria monocytogenes* ve *Clostridium botulinum* gibi gıda kaynaklı patojenleri kontrol etme kabiliyetine sahiptir. Lizozim, balık, kümes hayvanları ile çeşitli sebzelerde *Clostridium botulinum* kaynaklı enterotoksin oluşumunu kontrol etmektedir. Lizozimin kimyasal ve termal işlemlerle modifikasyonlarının antimikrobiyal özelliklerini arttırdığı bildirilmektedir. Lizozim mikrobiyal gelişme üzerindeki inhibisyon etkisi yanında antiviral, antiinflamatuvar ve terapötik etkilere de sahiptir [22-24].

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve birçok ülke lizozimin gıdalarda koruyucu olarak kullanılmasına izin vermektedir ve şu anda kimuchi turşusu, suşi, Çin eriştesi, taze balık ve et muhafazasında, peynir ve şarap üretiminde kullanılmaktadır. Lizozim ayrıca bazı

veteriner ilaçlarında, diş ve dişeti rahatsızlıklarının tedavisi ile göz damlalarında kullanıldığı bilinmektedir [Products, #1694].

Lizozimin WHO ve FAO tarafından 1993 yılında toksik olmadığı bildirilmesinin ardından lizozim günümüzde yapay antimikrobiyal koruyucuların yerini alarak doğal koruyucu olarak gıdalarda kullanılmaya başlanmıştır ve Japonya, İngiltere, Fransa, İtalya, Almanya ve Avusturya gibi birçok ülke lizozimi gıdalarda doğal koruyucu olarak kullanmaya başlamıştır. Ticari bir değere sahip olan lizozim sıklıkla peynir, bira ve şarap üretiminde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Ülkemizde lizozim üretimi yapan bir tesis bulunmamakta olup Çin, Hindistan, Belçika, Almanya, İtalya ve Hollanda'dan ithal edilmektedir. Lizozim, gıdalarda kullanım için düzenleyici kurumlar tarafından onaylanan birkaç doğal antimikrobiyal ajanlardan biridir. Lizozim, hücre duvarlarında N-asetilmuramik asit ve peptidoglikanın N-asetilglukozamin arasındaki bağları ayırarak gram-pozitif bakteriler üzerinde esas olarak antimikrobiyal aktivite gösterir; bununla birlikte, gram negatif bakterilerin peptidoglikan tabakasını çevreleyen koruyucu dış zarı destabilize eden EDTA ile birleştirildiğinde, lizozimin antimikrobiyal etkisi önemli ölçüde artar [6, 20, 25, 26].

Gıda uygulamalarında, istenmeyen bakterilerin büyümesini önlemek için gıda ürünlerine doğrudan lizozim eklenir. Örneğin, Avrupa'da enzim, Edam ve Gouda gibi peynirlerde ve *Clostridium tyrobutyricum*'un neden olduğu gaz üfleminin önlenmesinde kullanılmaktadır [20, 27]. Lizozim et ve ürünlerinin muhafazasında nisin veya EDTA ile kombine edilerek ve ayrıca şaraplarda malolaktik fermantasyon kontrolü için tek başına kullanımına ilişkin kapsamlı çalışmalar bulunmaktadır [24, 28-30]. Gıda teknolojisinde lizozimin başka bir kullanımı, antimikrobiyal ambalaj malzemelerinin imalatı için lizozimin plastik-film/yenilebilir filmlere dahil edilmesini içerir. Farklı çalışmalarda, lizozim, polivinil alkol (PVOH) ve selüloz asetat gibi plastik malzemeler için ve zein, peynir altı suyu proteinleri, aljinat, karragenan ve kitosan gibi yenilebilir ve biyolojik olarak parçalanabilen malzemeler için antimikrobiyal filmlerin üretiminde kullanılmıştır [22, 31-36].

Lizozimin izolasyonunda kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Bunlardan bazıları ise; kristalizasyon, iyon değiştirme (reçine ekstraksiyonu), ultrafiltrasyon, çift fazlı ayırma, ters misel ekstraksiyon, afinite membran kromatografi, farklı boyaarla biyoafinite ve N-asetil glukozamin prensipleridir. Çalışma kapsamında bunlar arasında

günümüzde güncel olarak kullanılan teknikler ele alınacaktır. Güçlü bir bazik protein olarak kabul gören lizozimin izolasyonu için çeşitli birçok ayırma yöntemleri kullanılsa da bunların sadece bir kısmı günümüzde ticari ölçekte uygulanabilmektedir [37]. Çalışmalarda lizozimin yumurta akından eldesinde genellikle seyreltilmiş yumurta akı başlangıç malzemesi olarak kullanılmakta ve bu uygulama ürünün ticari açıdan değerlendirilmesini güçleştirmektedir. Lizozim enziminin doğal kaynağından ve niteliklerini koruyarak ekstraksiyonu ticari ve endüstriyel yönüyle de büyük önem taşımaktadır [3, 37-39].

Günümüzde kullanılan geleneksel yöntem reçine ekstraksiyonudur. Farklı kristallendirme ve çöktürme işlemlerinin uygulandığı bu yöntemde ürün farklı kimyasallar ve organik çözücülerle işlem görerek pH değerine göre ayırım sağlanmaktadır. Bu yöntemde teknik olarak lizozim iyon değişim reçineleri kullanılarak çözünürlük, iyonik yük, polarite ve reçineye spesifik bağlanma karakterine göre ayırım gerçekleştirilmektedir.

Geleneksel yöntem yerine kullanılmaya başlanan yenilikçi bir yöntem ise membran filtrasyonu tekniğidir. Membran ayırma yöntemlerinden biri olan ultrafiltrasyon yönteminin lizozimin yumurta akından ayrıştırılmasında kullanılması üzerine çalışmalar gerçekleştirilmektedir [6, 40, 41]. Geleneksel yöntemlere kıyasla birçok alanda uygulanabilen filtrasyon yöntemleri arasında ise; saflaştırma, arıtma ve ürün geri kazanımı gibi işlemler ön plana çıkmaktadır. Filtrasyon yöntemlerini geleneksel yöntemlere göre avantajlı kılan bazı durumlar vardır. Bu yöntemin yüksek seçicilik özelliğinden dolayı uygulama alanları fazladır. Ayırma sırasında faz ayırımı gerçekleşmediği için yüksek ısı uygulamasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Birçok prosese göre karşılaştırıldığı zaman karmaşık değildir ve düşük bakım ve onarım imkânı sunmaktadır. Ayrıca çevre dostu yeşil bir proses olup, sürekli ve otomatik olarak üretim sağlayabilmektedir. Bunlara ek olarak kapasite artırımına olanak sağlarlar ve başka bir üretim hattına adapte edilmeleri de kolaydır. Bu avantajlarının yanı sıra yüksek üretim ve pazarlama maliyeti, polimer membranlarda kirlenme ve düşük sıcaklık dayanımı gibi dezavantajları da söz konusudur. Filtrasyon yöntemlerinde kullanılan membranlar seçici bir şekilde moleküler veya fiziksel boyuta göre bileşenlerin geçişini sınırlayarak iki fazı birbirinden ayıran ve bariyer görevi gören bir zardır. Membranlar basınç, sıcaklık, konsantrasyon, elektriksel iletkenlik, potansiyel farkı gibi sürücü kuvvetler sayesinde

ayrım sağlar. Biyoteknoloji alanındaki hızlı büyüme ile büyük ölçekli protein saflaştırma proseslerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır [42].

Çöktürme, kristalleştirme ve santrifüjleme gibi geleneksel tekniklerin, zayıf ayırma seçiciliği söz konusudur. Kromatografi ve elektroforez gibi yüksek çözünürlüklü teknikler daha yüksek bir maliyetle düşük ürün verimi sağlamaktadır. Ultrafiltrasyon işlemleri, çok yüksek bir ürün verimi sağlamakta ve protein fraksiyonasyonunda yüksek seçicilik sunmaktadır. Lizozimin moleküler büyüklüğü (14,3 kDa) göz önüne alındığında moleküler boyuta göre ayırma yapan ultrafiltrasyon prosesinin lizozimin ayrıştırılmasında kullanılması son zamanlarda çokça çalışılan bir konu haline gelmiştir. Ultrafiltrasyon yöntemi ile protein fraksiyonu proses koşulları ve fizikokimyasal karakterizasyondan etkilenmektedir ve bu nedenle de proses ihtiyaçlarının açıkça belirlenmesi gerekmektedir [43].

Lizozim eldesi için geleneksel yöntem olan reçine ekstraksiyonu yerine filtrasyon yöntemi kullanıldığında daha az su, tuz ve kimyasal kullanımının yanında ısıl işlem ve reçine ihtiyacı da ortadan kalkmaktadır. Ayrıca üretim süresi de düşmektedir. Tavuk yumurtasının beyazındaki düşük lizozim içeriği (yaklaşık %3,5), bunun saflaştırılmasını teknolojik bir zorluk haline getirmektedir çünkü az miktarda lizozim elde etmek için önemli miktarda proteinin işlenmesi gerekir. Böyle bir durumda ultrafiltrasyon, kromatografi ve elektroforez sistemine göre avantajlı olmaktadır. Ultrafiltrasyon prosesinin bir diğer önemli avantajı, ürünün yabancı parçacıklardan arınmış olmasıdır. Eğer işlem steril koşullarda yapılırsa bakteri veya partikül madde içermeyen (eczacılıkta kullanıma uygun) saf lizozim solüsyonu üretilebilir. Diğer biyo-ayırma işlemlerinde, ek bir membran filtrasyon aşaması gerekli olmaktadır [44].

Chang ve ark. [45] yaptıkları bir çalışmada yumurta akı iki kat konsantre edildiğinde 30 kDa'lık bir ultrafiltrasyon membranından sınırlı miktarda lizozimin (%2-4) geçirildiğini bulmuştur. Durance [46] ise yaptığı bir çalışmada ultrafiltrasyon ile düşük bir lizozim verimine ulaşabilmiştir. Ehsani ve ark. [47] ise, 50 kDa modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş polisülfon membranlar kullanarak doğal yumurta akı solüsyonlarının fraksiyonasyonunu incelemiştir. Hem ovalbumin hem de lizozim geçişinin, çözeltinin pH'ı ve tuz konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilendiğini ve dolayısıyla permeattaki bileşimi etkilediğini bulmuşlardır. Ghosh ve ark. [48] ise, 30 kDa içi boş fiber polisülfon membranlar kullanarak yumurta akından lizozim ayırımı üzerine çalışmışlar ve optimize

edilmiş koşullar altında yüksek lizozim aktarımı (>%90) ve orta derecede saf lizozim (%80-90) elde edilebileceğini bulmuşlardır. Lizozimin yumurta akından etkili bir şekilde ayrılmasını sağlamak için, Ghosh and Cui [44] tarafından yapılan çalışmada 50 kDa Molecular weight cut-off (MWCO) membranın yüksek akışını 25 kDa MWCO membranın yüksek seçiciliği ile birleştiren iki aşamalı bir ultrafiltrasyon işlemi geliştirilmiştir. Bu süreç, lizozimin yumurta akından ayrılmasındaki düşük verim ve zayıf seçiciliğin üstesinden gelmiştir. Oldukça karmaşık olan bu sistemde çalışmalarda doğal yumurta akı çözeltileri yerine kurutulmuş yumurta akı kullanılmıştır. Farklı araştırmacılar tarafından bildirilen bu deneysel sonuçlardaki tutarsızlık, kullandıkları ayırma sistemlerindeki farklılıktan, yani farklı membranlar ve farklı çalışma koşullarından kaynaklanmaktadır. Bu durum aynı zamanda kullanılan ultrafiltrasyon membranlarının yanı sıra proses optimizasyonunun önemini de ortaya koymaktadır [43].

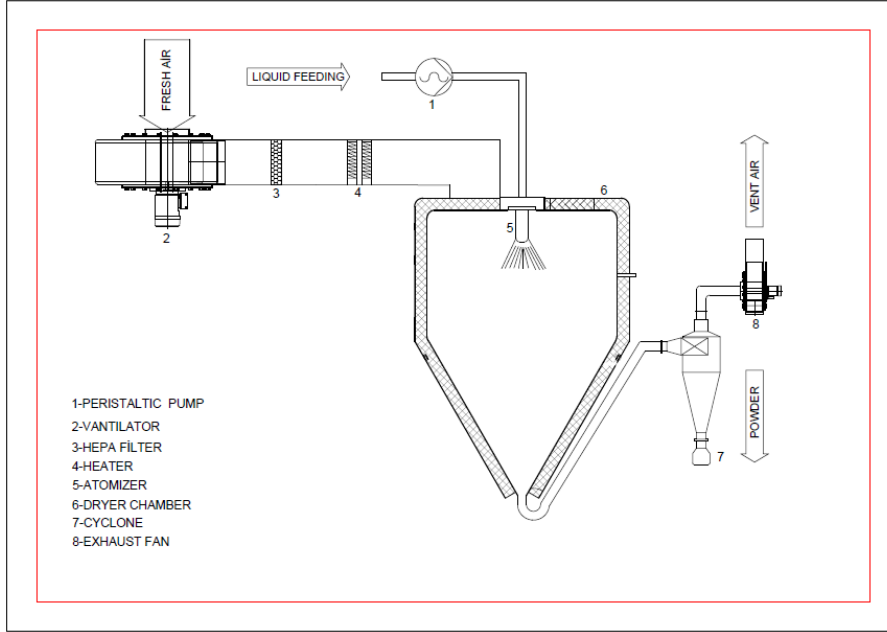
Lizozimin sıvı yumurtadan ayrılmasında denenen bir diğer yöntem olarak kromatografik tekniklerde ise farklı araştırmacılar çalışmıştır. Cibacron Blue 3GA (CB) ve CB ile modifiye edilmiş Streamline jel (CB- Streamline) ile özelleştirilmiş bir Nd-Fe-B alaşımı yoğunlaştırılmış agaroz (NFBA) jelinin genişletilmiş yatak kromatografisi yoluyla lizozimin saflaştırılmasını çalışan bir araştırmacı, iki boya-ligand adsorban için aynı statik kapasite gösterilmesine rağmen, CB-NFBA jelinin dinamik bağlama kapasitesi, CB-Streamline jelinin neredeyse iki katı olarak kaydetmiştir. Sonuçlar, küçük boyutlu yoğun ortam CB-NFBA jelinin çok daha büyük saflaştırma faktörü sağladığını, dolayısıyla daha etkili olduğunu ortaya koymuştur [41].

Poliakrilamid jel gibi farklı bileşenler kullanılarak yumurta akından lizozim ekstraksiyonu ile ilgili yapılan bir diğer çalışmada ise; gözenek oluşturucu bir madde olarak nano-silika parçacıklarından gözenekli yapıda ve lizozimi tutabilen poliakrilamid polimerlerini sentezlenmiştir. Gözenek oluşturucu madde içeren polimerlerin, silika ilave edilmeyenlere (7,54 mg/g) göre çok daha yüksek adsorpsiyon kapasitesine (17,1 mg/g) sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmada polimerlerin şişmesini ve yumuşaklığını ortadan kaldırmak için, mekanik güce sahip olan ve lizozimin büyük ölçekli saflaştırılması ve izolasyonunda uygulanabilen "yığın" şekilli polimer kullanılabileceği ifade edilmiştir [41].

Nem içeriği yüksek olan gıdaların yapısında bir bozulma meydana gelmemesi için bünyesinde bulunan nem içeriğinin azaltılması gerekmektedir. Yüksek nem içeriği olan

gıda maddelerinin kurutulması ile hem gıda ürünlerin raf ömrü artmakta hem de ürün hacmi azalmaktadır. Kurutma, katı-toz ürünler elde etmek için gıdalarda bulunan suyu buharlaştırma yoluyla uzaklaştırmak için kontrollü koşullar altında ısı uygulaması olarak tanımlanmaktadır. Kurutmanın temel amacı, gıdaların su içindeki aktivitelerini azaltarak raf ömürlerini uzatmaktır. Gıdaların bozulmasına ve çürümesine neden olan mikroorganizmalar ve gıdanın kimyasal bileşiminde istenmeyen değişikliklere neden olan enzimlerin çoğu, yeterli su olmadığında gelişemez, çoğalamaz veya işlev göremez. Endüstride püskürtme ile kurutma ve dondurarak kurutma ve tepsilerde kurutma gibi farklı kurutma metotları kullanılmaktadır [45]. Püskürtmeli kurutma, gazlı sıcak kurutma ortamından yararlanarak sıvı bir malzemenin kurutulmuş parçacıklara dönüştürülmesini içeren iyi bilinen bir parçacık üretimi yöntemidir. Aslında taşıyıcı sistemler için tasarlanmış mikroküre ve mikrokapsüllerin üretimi oldukça yaygındır. Püskürterek kurutma işleminin mekanizması farklı aşamalarda açıklamaktadır: ilk olarak atomizasyon sonrasında ise damlacıkların parçacığa dönüşmesi ve parçacık toplama şeklinde süreç ilerlemektedir. Bu adımlar aynı zamanda atomizasyon, damlacık ve sıcak gaz arasındaki temas ve gaz-toz ayrımı şeklinde de adlandırılabilmektedir [46, 47]. Püskürtmeli kurutucular konsantre çözeltilerin içerisindeki sıvının buharlaştırma yoluyla uzaklaştırılması için kullanılan sistemlerdir. Sıvının uzaklaştırılması sonucu toz halinde kurutulmuş ürün elde edilir. Kurutma havası ise doğrudan atmosfere bırakılmaktadır [48]. Besleme çözeltisinin hazırlanmasından sonra püskürtmeli kurutma işlemi üç ana basamakta gerçekleşmektedir. Sıvı beslemenin atomizasyonu aşamasında sıvı partiküllerin toza dönüşmesi ve toz ürünün siklon altında veya kollektörde toplanması gerçekleşmektedir. Atomizasyon işleminde, sıvı besleme bir perisaltatik pompa yardımıyla atomizere gelmekte ve atomizerde yüzey alanı artırılarak kurutma çemberine gönderilmektedir. Atomizasyon işleminin amacı: etkin ve verimli kurutma sağlayabilmek için sıvı beslemenin küçük damlacıklara ayrıştırılarak kurutma havası ile temas edecek maksimum yüzey alanının yaratılmasıdır. Sıvı damlacıkların sıcak hava ile etkileşimi kurutma haznesinde gerçekleşmektedir. Sıcak hava ile temas eden sıvı damlacıkların sıcaklığı artmakta, buharlaşma sıcaklığına ulaştıkça ise su buharlaşmaktadır. Püskürtülen partiküllerin nem içeriği kritik nem içeriğine ulaştığında, damlacık yüzeyinde kuru tabaka oluşmakta ve aniden toz formuna dönüşmektedir. Oluşan toz partiküller besleme özelliklerine ve kurutma koşullarına bağlı olarak küresel, delikli mikro kürecikler ya da

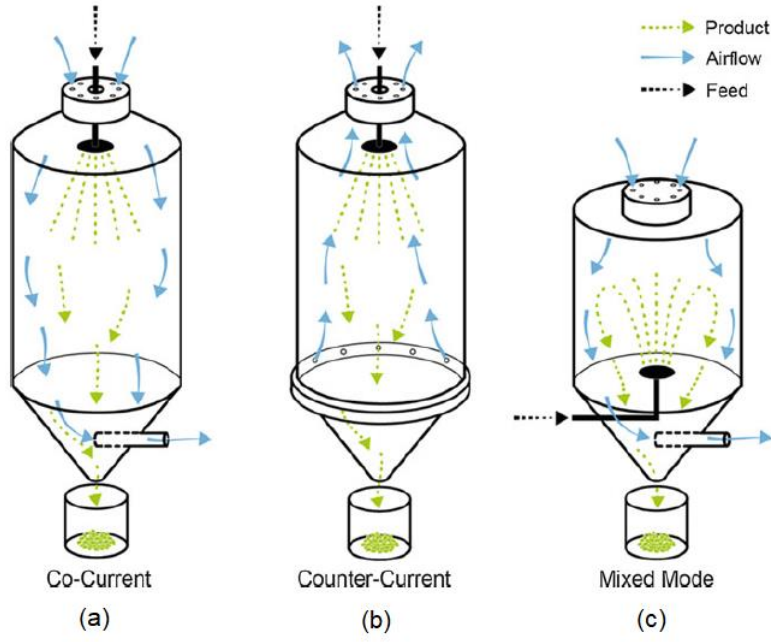
düzensiz şekillerde olabilmektedir. Kurutma işlemi tamamlandığında oluşan toz partiküller hava ile birlikte siklon separatöre taşınmakta ve siklon seperatörün tabanında birikmektedir [49]. Şekil 1’de kurutma prosesine ait ekipmanlar ve örnek bir tasarım paylaşılmıştır.



Şekil 1 Püskürtmeli Kurutma Prosesi ve ekipmanları

Fig 1 Spray drying process and equipments

Sıcak havanın kurutma haznesine girişi paralel yön (a), karşıt yön(b) ve karışık yön (c) gibi farklı şekillerde olabilmektedir (Şekil-2). Hava ve sıvı besleme giriş yönünün aynı olduğu sistemler paralel akımlı sistemler olarak adlandırılmakta olup paralel akımlı akışlarda ani buharlaşma sonucunda oluşan kuru partiküller termal degradasyon limiti olan orta derecede sıcaklığa maruz kalmaktadır. Karşıt akımlı sistemlerde ise; sıvı besleme ve hava akımı ters yönden sağlanmakta olup; kuru partiküller doğrudan çok yüksek sıcaklıklara maruz kaldığı için ısıya duyarlı ürünlerin kurutulmasında tercih edilmemektedir [50]. Karşıt akımlı sistemler paralel akımlılara göre daha ekonomiktir. Isıya duyarlı bileşenlerce zengin gıdalar için paralel yönde beslenen sıcak hava tercih edilmektedir [51]. Yüksek sıcaklıkta beslenen hava siklona doğru soğumakta ve böylece toz ürün yüksek olmayan sıcaklıktaki havayla temas ederek termal bozulma azaltılabilmektedir.



Şekil 2 Püskürtmeli kurutucu şematik gösterimi (a) paralel yön, (b) karşıt yön ve (c) karışık yön [52]

Fig 2 Schematic representation of the spray dryer (a) parallel direction, (b) opposite direction and (c) mixed direction [52]

Kurutma İşlemine Etki eden Parametreler

Püskürtmeli kurutucu işleminde son ürün kalitesini etkileyen işlem koşulları arasında; atomizer dönüş hızı, hava giriş sıcaklığı, hava giriş hızı, hava çıkış sıcaklığı ve sıvı besleme akış hızı gibi faktörler yer almaktadır.

a) Hava giriş sıcaklığı

Hava giriş sıcaklığı püskürtülerek kurutulmuş toz ürünün kalite özelliklerine etki eden en önemli faktörlerden biridir. Püskürtmeli kurutma işlemi genellikle 150-300 °C hava sıcaklıkları arasında olup besleme sıvısının özelliklerine bağlı olarak bu sıcaklık değişiklik göstermektedir [53, 54]. Yüksek hava giriş sıcaklıkları kuruma hızını ve verimini artırarak; işlem süresini, toz ürünün nem içeriğini ve yığın yoğunluğunu azaltmaktadır [55]. Hava giriş sıcaklığı püskürtmeli kurutucuda kurutulmuş tozların partikül boyutları üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Yüksek hava giriş sıcaklıklarında damlacıklarda bulunan suyun hızlı buharlaşması sonucunda yeterli miktarda büzüşme olmamakta ve büyük partikül boyutlu parçacıklar oluşmaktadır. Yapılan çalışmalarda yüksek sıcaklıklarda kurutulan örneklerin partikül boyutunun, düşük sıcaklıkta kurutulanlara göre daha büyük olduğu belirtilmiştir [56].

Pigmentler, C vitamini karotenler ve fenolik bileşenler gibi ısıya duyarlı bileşenler hava giriş sıcaklığından önemli ölçüde etkilenmektedir. Hava giriş sıcaklığı arttıkça oksidasyona ve termal bozulmaya bağlı olarak ısıya duyarlı bileşenlerde kayıplar meydana gelmektedir [57].

b) Atomizasyon işlemi

Sistemde kurutulacak sıvının bir nozuldaki (püskürtme ucu) geçirilerek sprey haline gelmesi sağlanır. Püskürtme ucundan püskürtülerek toz halinde kurutulacak olan sıvının yüzey alanı artırılır, sonrasında sıcak hava ile karşı karşıya getirilir. Püskürtme ucunun büyüklüğü, kurutucunun boyutuna göre farklılık arz etmektedir. Püskürtmeli sistemlerde temel amaç ısı ve kütle transferini optimize etmek için kuru hava ile sıvı arasında en yüksek düzeyde ısı transfer yüzeyinin sağlanmasıdır [58, 59].

Atomizerin dönüş hızındaki artış ise besleme sıvısının daha küçük damlacıklar halinde sisteme girmesi sağlamaktadır. Bu durumda hava ile damlacıkların temas yüzeyi artmakta ve nem içeriği düşük toz ürün elde edilmektedir. Bununla birlikte yüksek atomizer hızı sağladığı geniş yüzey alanı sayesinde kurutma hızını artırmanın yanı sıra damlacık yüzeyinde kabuk oluşumunu engellemekte ve sonuç olarak partikül boyutunun küçülmesine neden olmaktadır. Ayrıca yüksek atomizer hızında, yığın yoğunluğunun yüksek olduğu belirtilmiştir [53]. Ticari olarak satılan atomizerler sistemde kullanılan enerji tipine göre ayrılmakta olup, bunlar kinetik enerji nozulu, sonikasyon atomizeri, santrifüj atomizer ve basınçlı nozul türleridir [60-62].

c) Kurutma hava akış hızı

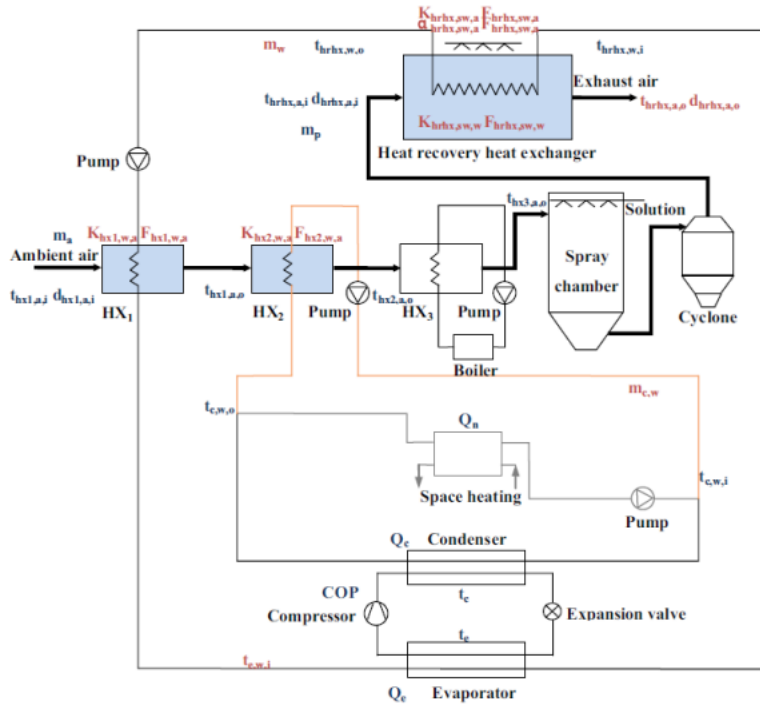
Püskürtmeli kurutucuda kullanılan kurutma hava akış hızı, kurutma kabine beslenen hava akış hızını temsil etmekte olup; sıvı beslemeden buharlaştırılması gereken su miktarı için gereken enerjiyi sağlamaktadır. Kurutma havasının akış hızı, suyun buharlaşma hızını etkilemektedir.

d) Besleme Akış Hızı

Püskürtmeli kurutma işleminde yüksek besleme akış hızı pompa hızı ile ilişkili olup besleme sıvısının giren hava ile temas etme süresini kısaltmaktadır. Temas süresine bağlı olarak ısı transfer verimliliği ve buharlaşan su miktarı azalmaktadır. Bu durum elde edilen toz ürünün nem içeriğinde artışa neden olmaktadır. Yüksek besleme hızı, ısı ve kütle transferini azalttığı için oluşan yüksek nemli toz ürünler kuruma kabine yapışmaktadır. Ayrıca yüksek besleme hızında sıvı besleme atomizerde yeterince kalamadığı için

damlacıklar oluşmamakta ve doğrudan kuruma kabineine geçen bir kısım sıvı besleme verimi düşürmektedir [63].

Ai ve ark.[64] yaptıkları çalışmada, proteinin kurutulmasında vakumla dondurarak kurutmanın püskürteli kurutmaya nazaran ürüne daha çok zarar verdiğini göz önünde bulundurarak protein tozu eldesinde püskürtmeli kurutma tercih etmişlerdir. Şekil 3'te görülen bu sistemin atık havasının değerlendirilip havanın ön ısıtması veya ısınma ihtiyacı şeklinde kullanılabileceği öngörülmektedir. Protein çözeltisinin yeterince kurutulmasını garanti etmek için püskürtme odası, sıcak hava 190°C'ye ısıtılmakta ve oda bu sıcaklıkta sabit tutulmaktadır. Püskürtmeli kurutma işlemi sırasında tesisin sürekli çalışma koşulları; proteinin kütle akışı 2,78 kg/s, sıcaklığı 65°C ve kütle konsantrasyonu ise %10 olarak düzenlenmiştir. Bu nedenle, çıkış havası sıcaklığı ve nemi, kütle ve enerjinin korunumu ilkelerine kapsamaktadır. Sonuç olarak tasarlanan sistem ile elde edilen enerji sayesinde geri ödemesi süresi 2,4 yıldır. Ayrıca ortam ve giriş havası sıcaklığı eşanjörünün ısı geri kazanım miktarını belirlemektedir.

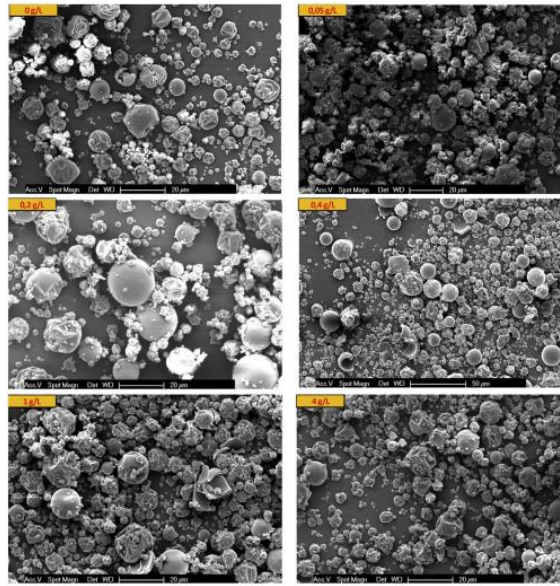


Şekil 3 Isı geri kazanımı için sistematik diyagram [64]

Fig 3 Schematic diagram for heat recovery [64]

Amara ve ark. [65] yapmış oldukları bu çalışmanın amacı, püskürterek kurutma yoluyla Şekil 4'te görüldüğü gibi kapsüllenmiş lizozimin (0.714 g/L konsantrasyonda)

özelliklerinin yanı sıra artan pektin konsantrasyonları (0,4 g/L) ile kompleksleştirmenin lizozim yapısının korunması üzerindeki etkisini değerlendirmektir. Lizozim ve lizozim-pektin komplekslerinin püskürtülerek kurutulması, artan pektin konsantrasyonları ile oluşturulan farklı polisakkarit ağlarında antimikrobiyal enzimin kapsüllemesi ile sonuçlanmıştır. Çalışmada elektrostatik biyopolimer komplekslerinin oluşumu, çözeltinin bulanıklığını arttırmış ve lizozim antimikrobiyal aktivitesini azaltmıştır. Püskürterek kurutmanın uygulanması üzerine, ara pektin konsantrasyonunda daha düşük agregasyona sahip daha fazla bireysel kompleksler oluşturulmuştur. Püskürterek kurutulmuş lizozim ürünüde, antimikrobiyal aktivitede yaklaşık %36,5'lik bir azalma görülmüştür. Bununla birlikte, ara pektin konsantrasyonları ile kompleks oluşturmanın, spreyle kurutma işlemi sırasında lizozim aktivitesini koruduğu gösterilmiştir.



Şekil 4 Püskürtülerek kurutulmuş lizozim kapsülleri [65]

Fig 4 Spray-dried lysozyme capsules [65]

Sonuç

Bu çalışmada, lizozimin adsorpsiyon ve saflaştırma performansı üzerinde farklı tekniklerin kullanımı ele alınarak kurutma prosesi detaylandırılmıştır. Membran filtrasyon tekniklerinin yüksek saflaştırma verimliliği nedeniyle lizozim ekstraksiyonunda yaygın bir uygulama olarak kullanıldığı görülmektedir. Gelecekte lizozim eldesine etki eden farklı çalışma parametrelerinin lizozimin kinetik adsorpsiyonu

üzerindeki etkilerinin sistematik olarak araştırılması gerekmektedir. Lizozim çözeltilerinin kurutulmasında ise püskürtmeli kurutucuların verimlilik avantajları göz önünde bulundurularak uygulayıcılar arasında tercih sebebi olduğu belirlenmiştir.

Gıda Sanayinde yapay antimikrobiyal koruyucu katkı maddelerinin yerini artık doğal gıda koruyucuları almaktadır. Günümüzde tüketici talepleri doğrultusunda biyo-koruma tekniklerine olan ilgi artmaktadır. Bu kapsamda lizozim gibi doğal antimikrobiyal bileşenler tercih edilmektedir. Artan rekabet ile lizozim gibi doğal kaynaklardan elde edilebilen enzimlerin çiğ veya işlenmiş gıdalardaki kullanım alanı da artmıştır. Lizozim, kabuklu yumurta gibi bazı ürünlerin dış yüzeyinin kaplanmasına yönelik bilimsel çalışmalara da konu olmuştur [31, 33, 66, 67]. Ülkemizde daha az işlenmiş ve az katkı maddesi içeren yeni ve fonksiyonel gıda ürünlerinin üretilmesine yönelik çalışmalara yön verilebilmesi açısından yumurta ve yumurta ürünlerinde daha fazla bilimsel çalışmanın ve uygulama pratiklerinin yapılması ve sonrasında ticarileştirilmesi önem arz etmektedir.

Teşekkür

3200782 numaralı projeye destekleri için TÜBİTAK, Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Funding / Fon desteği

The author did not receive support from any organization for the submitted work.

Yazar, gönderilen çalışma için herhangi bir kuruluştan destek almamıştır.

Data Availability statement / Veri Kullanılabilirliği bildirimi

The author confirms that the data supporting this study are cited in the article.

Yazar, bu çalışmayı destekleyen verilere makalede atıfta bulunulduğunu onaylamaktadır.

Compliance with ethical standards / Etik standartlara uyum Conflict of interest / Çıkar çatışması

The author declare no conflict of interest.

Yazar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Ethical standards / Etik standartlar

The study is proper with ethical standards.

Çalışma etik standartlara uygundur.

Kaynaklar

1. Yüceer, M., R. Temizkan, and C. Caner, Fonksiyonel Gıda Olarak Yumurta: Bileşenleri ve Fonksiyonel Özellikleri. Akademik Gıda, 2012. 10(4): p. 70-76.
2. Wu, J., Eggs and Egg Products Processing, In Food Processing: Principles and Applications, S. Clark, S. Jung, and B. Lamsal, Editors. 2014, John Wiley & Sons, Ltd. p. 437-455.
3. Yüceer, M., Yumurta ve Yumurta Ürünleri İşleme Teknolojisi ve Uygulamaları 2019: Sidas Medya Ltd.Şti.
4. Kovacs-Nolan, J., M. Phillips, and Y. Mine, Advances in the Value of Eggs and Egg Components for Human Health. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005. 53: p. 8421-8431.

5. Vaclavik, V.A. and E.W. Christian, Egg and Egg Products, in *Essentials of Food Science*, Second. Ed., V.A. Vaclavik and E.W. Christian, Editors. 2003, Kluwar Academic / Plenum Publishers. p. 187-213.
6. Yüceer, M., Yumurta Biyoaktif Bileşenleri (2): Lizozim. *Yumurta Üreticileri Merkez Birliği Dergisi*, 2022. 58: p. 30-33.
7. Yüceer, M., Yumurta ve Türevlerinin Bazı Katma Değerli Uygulamaları. *Catering Guide*, 2022. 18(98): p. 44-45.
8. Anton, M., F. Nau, and Y. Nys, Bioactive Egg Components and their Potential Uses. *World's Poultry Science Journal*, 2006. 62(03): p. 429-438.
9. Abeyrathne, E.D., H.Y. Lee, and D.U. Ahn, Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents-a review. *Poultry Science*, 2013. 92(12): p. 3292-9.
10. Young, A.C.M., R.F. Tilton, and J.C. Dewan, Thermal expansion of hen egg-white lysozyme: Comparison of the 1.9 Å resolution structures of the tetragonal form of the enzyme at 100 K and 298 K. *Journal of Molecular Biology*, 1994. 235(1): p. 302-317.
11. Cegielska-Radziejewska, R., G. Leśniewski, and J. Kijowski, Properties and Application of Egg White Lysozyme and Its Modified Preparations - A Review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 2008. 58(1): p. 5-10.
12. Huopalahti, R., et al., *Bioactive Egg Compounds*, ed. R. Schade. 2007, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
13. Ibrahim, H.R., U. Thomas, and A. Pellegrini, A helix-loop-helix peptide at the upper lip of the active site cleft of lysozyme confers potent antimicrobial activity with membrane permeabilization action. *Journal of Biological Chemistry*, 2001. 276(47): p. 43767-74.
14. Pellegrini, A., et al., Identification and isolation of a bactericidal domain in chicken egg white lysozyme. *Journal of Applied Microbiology*, 1997. 82(3): p. 372-8.
15. Tenovuo, J., Clinical applications of antimicrobial host proteins lactoperoxidase, lysozyme and lactoferrin in xerostomia: efficacy and safety. *Oral Disease*, 2002. 8(1): p. 23-9.
16. Appendini, P. and J.H. Hotchkiss, Immobilization of Lysozyme on Food Contact Polymers as Potential Antimicrobial Films. *Packaging Technology and Science*, 1997. 10(5): p. 271-279.
17. Danyluk, B. and J. Kijowski, The effect of lysozyme monomer on the growth of *Clostridium tyrobutyricum*. *Przemysł Spożywczy*. 12: p. 16-19.
18. Roos, A.L., P. Walstra, and T.J. Geurts, The Association of Lysozyme with Casein. *International Dairy Journal*, 1998. 8: p. 319-324.
19. Johnson, E.A. and A.E. Larson, Lysozyme, in *Antimicrobials in Food*, P.M. Davidson, A.L. Branen, and J.N. Sofos, Editors. 2005, CRC Press: Boca Raton, USA.
20. Khorshidian, N., et al., An Overview of Antimicrobial Activity of Lysozyme and Its Functionality in Cheese. *Frontiers in Nutrition*, 2022. 9: p. 833618.
21. Ferraboschi, P., S. Ciceri, and P. Grisenti, Applications of Lysozyme, an Innate Immune Defense Factor, as an Alternative Antibiotic. *Antibiotics (Basel)*, 2021. 10(12).
22. Nawaz, N., et al., Lysozyme and Its Application as Antibacterial Agent in Food Industry. *Molecules*, 2022. 27(19).
23. Leśniewski, G. and T. Yang, Lysozyme and its modified forms: A critical appraisal of selected properties and potential. *Trends in Food Science & Technology*, 2021. 107: p. 333-342.
24. Pilevar, Z., et al., Antimicrobial properties of lysozyme in meat and meat products: possibilities and challenges. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 2022. 44: p. e55262.
25. Padgett, T., I.Y. Han, and P.L. Dawson, Incorporation of food-grade antimicrobial compounds into biodegradable packaging films. *Journal of Food Protection.*, 1998. 61(10): p. 1330-1335.
26. Branen, J.K. and P.M. Davidson, Enhancement of nisin, lysozyme, and monolaurin antimicrobial activities by ethylenediaminetetraacetic acid and lactoferrin. *International Journal of Food Microbiology*, 2004. 90(1): p. 63-74.

27. van den Berg, G., et al., Gouda and related cheeses, in *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, P.F. Fox, et al., Editors. 2004, Academic Press. p. 103-140.
28. Mastromatteo, M., et al., Use of lysozyme, nisin, and EDTA combined treatments for maintaining quality of packed ostrich patties. *Journal of Food Science*, 2010. 75(3): p. M178-86.
29. Chung, W. and R.E.W. Hancock, Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2000. 60: p. 25-32.
30. Nattress, F.M., C.K. Yost, and L.P. Baker, Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 2001. 70: p. 111-119.
31. Yuceer, M. and C. Caner, Antimicrobial Lysozyme-Chitosan Coatings Affect Functional Properties and Shelf Life of Chicken Eggs during Storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2014. 94(1): p. 153-62.
32. Su Cha, D., et al., Antimicrobial Films Based on Na-alginate and κ -carrageenan. *LWT - Food Sci. and Tech.*, 2002. 35(8): p. 715-719.
33. Yuceer, M. and C. Caner, Lisozim-Kitosan Bazlı Antimikrobiyal Kaplama Uygulamasının Taze Yumurthanın Mikrobiyolojik Kalitesi Üzerine Etkisi. *Akademik Gıda*, 2013. 11(1): p. 40-45.
34. Buonocore, G.G., et al., Modeling the Lysozyme Release Kinetics from Antimicrobial Films Intended for Food Packaging Applications. *Journal of Food Science*, 2003. 68(4): p. 1365-1370.
35. Park, S.I., M.A. Daeschel, and Y. Zhao, Functional Properties of Antimicrobial Lysozyme–Chitosan Composite Films. *Journal of Food Science*. 69(8): p. M215—221.
36. Min, S., L.J. Harris, and J.M. Krochta, Antimicrobial Effects of Lactoferrin, Lysozyme, and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157H7. *Journal of Food Science*, 2005. 70(7): p. M332-338.
37. Li, Z., et al., Functional Properties and Extraction Techniques of Chicken Egg White Proteins. *Foods*, 2022. 11(16).
38. Chiu, H.-T., et al., Direct purification of lysozyme from chicken egg white using weak acidic polyacrylonitrile nanofiber-based membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, 2012. 125(S2): p. E616-E621.
39. Show, P.L., et al., Purification of lysozyme from chicken egg white by high-density cation exchange adsorbents in stirred fluidized bed adsorption system. *Food Chemistry*, 2021. 343: p. 128543.
40. Yao, X., et al., Extraction and Characterization of Lysozyme from Salted Duck Egg White. *Foods*, 2022. 11(22): p. 3567.
41. Shahmohammadi, A., Lysozyme separation from chicken egg white: a review. *European Food Research and Technology*, 2017. 244(4): p. 577-593.
42. Banani, S.F., et al., Biomolecular condensates: Organizers of cellular biochemistry. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2017. 18(5): p. 285-298.
43. Wan, Y., J. Lu, and Z. Cui, Separation of lysozyme from chicken egg white using ultrafiltration. *Separation and Purification Technology*, 2006. 48(2): p. 133-142.
44. Ghosh, R. and Z.F. Cui, Purification of Lysozyme Using Ultrafiltration. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000. 68(2): p. 191-203.
45. Fazaeli, M., et al., Effect of process conditions and carrier concentration for improving drying yield and other quality attributes of spray dried black mulberry (*Morus nigra*) juice. *International Journal of Food Engineering*, 2012. 8(1): p. 1-20.
46. Liu, W., X.D. Chen, and C. Selomulya, On the spray drying of uniform functional microparticles. *Particuology*, 2015. 22: p. 1-12.
47. Boel, E., et al., Unraveling Particle Formation: From Single Droplet Drying to Spray Drying and Electrospraying. *Pharmaceutics*, 2020. 12(7): p. 625.
48. Patel, S.K. and M.H. Bade, Energy analysis and heat recovery opportunities in spray dryers applied for effluent management. *Energy Conversion and Management*, 2019. 186: p. 597-609.

49. Khaire, R.A. and P.R. Gogate, Novel approaches based on ultrasound for spray drying of food and bioactive compounds. *Drying Technology*, 2021. 39(12): p. 1832-1853.
50. Cal, K. and K. Sollohub, Spray drying technique. I: Hardware and process parameters. *J Pharm Sci*, 2010. 99(2): p. 575-86.
51. Okuyama, K.A., M. Lenggoro, I. W. and F. Iskandar, Preparation of functional nanostructured particles by spray drying. *Advanced Powder Technology*, 2006. 17(6): p. 587-611.
52. Wong, T.W. and P. John, Advances in spray drying technology for nanoparticle formation, in *Handbook of Nanoparticles*, M. Aliofkhaezai, Editor. 2016, Cham: Springer.
53. Ehsani, N., S. Parkkinen, and M. Nyström, Fractionation of natural and model egg-white protein solutions with modified and unmodified polysulfone UF membranes. *Journal of Membrane Science*, 1997. 123(1): p. 105-119.
54. Cao, C., et al., Effect of inlet temperature on the physicochemical properties of spray-dried seed-watermelon seed protein powder. *Journal of Food Science*, 2020. 85(10): p. 3442-3449.
55. Ghosh, R., S.S. Silva, and Z. Cui, Lysozyme separation by hollow-fiber ultrafiltration. *Biochemical Engineering Journal*, 2000. 6(1): p. 19-24.
56. Kha, T.C., M.H. Nguyen, and P.D. Roach, Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, 2010. 98(3): p. 385-392.
57. Murali, S., et al., Encapsulation of black carrot juice using spray and freeze drying. *Food Science and Technology International*, 2015. 21(8): p. 604-12.
58. Francia, V., et al., Agglomeration in counter-current spray drying towers. Part A: Particle growth and the effect of nozzle height. *Powder Technology*, 2016. 301: p. 1330-1343.
59. Patel, R.P., M.P. Patel, and A.M. Suthar, Spray drying technology: an overview. *Indian Journal of Science and Technology*, 2009. 2(10): p. 44-47.
60. Singh, S. and D. Dixit, A Review on Spray Drying: Emerging Technology in Food Industry. *International Journal of Applied Engineering and Technology*, 2014. 4(1): p. 1-8.
61. Sivamma, M.E. and R. Sneetha, Atomization techniques in spray drying: A Review. *The Pharma Innovation Journal*, 2021. 10(5): p. 454-461.
62. Francia, V., et al., Agglomeration in counter-current spray drying towers. Part B: Interaction between multiple spraying levels. *Powder Technology*, 2016. 301: p. 1344-1358.
63. Tonon, R.V., C. Brabet, and M.D. Hubinger, Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae Mart.*) powder produced by spray drying. *Journal of Food Engineering*, 2008. 88(3): p. 411-418.
64. Ai, S., et al., Analysis of a heat recovery system of the spray-drying process in a soy protein powder plant. *Applied Thermal Engineering*, 2016. 103: p. 1022-1030.
65. Amara, C.B., et al., Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. *Journal of Food Engineering*, 2016. 183: p. 50-57.
66. Çelikten, C., R. Mavuş, and M. Yüceer, Separation of Lysozyme from Liquid Egg White by Membrane Filtration, in III. International Agricultural, Biological & Life Science Conference (AGBIOL 2021). 2021: Edirne, Turkey.
67. Yüceer, M., Effect of Ultrasound Pre-treatment on Separation of Lysozyme from Liquid Egg White in MEMTEK-2019. 6th MEMTEK International Symposium on membrane Technologies and Applications. 2019. Istanbul, Turkey.

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

Author Guidelines

General Principles

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

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

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

Names Section

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

Abstract

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

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

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

Introduction

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

Figures and Tables

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

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

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

Examples;

Table 1 Possible effects of genetically modified organisms

Table 2 Methods of tissue culture in tomato plants

Fig. 1 Amount of GMO products in the world

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

Citation Inside the Text

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

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

References

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

Examples

Example of an article with 1 author;

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

Example of an article with 2 authors;

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

Example of an article with 3 authors;

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

Example of articles with 4 or more authors

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

Example for the book;

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

Example for Book Chapter;

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

Ethical Principles and Publication Policy

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

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

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

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

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

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

Plagiarism

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

Manuscripts are checked by Ithenticate Plagiarism System.

Duplicate Submission

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

Citation Manipulation

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

Data Fabrication and Falsification

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

Improper Author Contribution or Attribution

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

Redundant Publications

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

Sanctions

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

Immediate rejection of the infringing manuscript.

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

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

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

Publication Charge

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

Aim and Scope

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

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

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

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

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

Gulfidan Kuyumcu^{1*}, Muhammed Majed Abed²

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

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

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

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

Author 1 mail and Orcid ID:

Author 2 mail and Orcid ID:

Author 3 mail and Orcid ID:

Ethics Committee Report

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

1.REVIEWER SUGGESTION

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

2.REVIEWER SUGGESTION

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

3.REVIEWER SUGGESTION

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