

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

PHYTOCHEMICAL SCREENING, ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF SEVERAL STINGLESS BEE POLLENS PROCESSED USING DIFFERENT DRYING METHODS

Farklı Kurutma Yöntemleri Kullanılarak İşlenen, Çeşitli İğnesiz Arı Polenlerinin Fitokimyasal Taraması, Antioksidan ve Anti-inflamatuvar Özellikleri

Netty Maria NAIBAHO^{1,2,4}, Widya FATRIASARI^{3,4}, Irawan Wijaya KUSUMA^{2,4}, Enos Tangke ARUNG^{2,4}

¹Department of Plantation Processing Technology, State Agricultural of Polytechnic Samarinda, Jl. Samratulangi PO Box 75131 Samarinda, INDONESIA, E-mail: maria_nethy@yahoo.com, ORCID No: 0000-0003-4617-6100.

²Faculty of Forestry, Mulawarman University, Kampus Gunung Kelua, Jl Panajam Samarinda, East Kalimantan 75123, INDONESIA, E-mail: Kusuma_iw@yahoo.com, ORCID No: 0000-0002-0177-6615.

³Research Center for Biomass and Bioproducts, National Research and Innovation Agency (BRIN), Jl Raya Bogor KM 46 Cibinong Bogor 16911, INDONESIA, E-mail: widy003@brin.go.id, ORCID No: 0000-0002-5166-9498.

⁴Research Collaboration Center for Biomass-Based Nano Cosmetic, in Collaboration Mulawarman University and BRIN, Samarinda, East Kalimantan 75119 INDONESIA, Corresponding author E-mail: tangkearung@yahoo.com, ORCID No: 0000-0002-1979-6892.

Received / Geliş: 21.04.2023

Accepted / Kabul: 14.07.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1286430

ABSTRACT

Antioxidants play a crucial function in fighting free radicals that can harm biomolecules in the human body and damage cells, which can lead to immunological disorders including inflammation. In this research, we evaluated bee pollen extracts from six stingless bees (*Heterotrigona itama*, *Tetragonula reepeni*, *Tetragonula testaceitarsis*, *Tetragonula fuscobalteata*, *Tetragonula iridipennis*, and *Tetragonula pagdeni*) processed using different drying methods for antioxidant and anti-inflammatory activity. Each sample was divided into two specimens, where one was processed by oven-drying at 40°C and the second was chilled at 4 °C, then extracted by ethanol. The extracts of *T. fuscobalteata* had the highest antioxidant activity when dried in an oven with an IC₅₀ value of 36.47 µg/mL, while *T. reepeni* using a chiller was 41.30 mg/mL. The highest anti-inflammatory activity was for oven-dried *T. fuscobalteata* with an IC₅₀ of 39.70 mg/mL, while chilled *T. reepeni* was 34.30 µg/mL. Different drying techniques can affect the antioxidant and anti-inflammatory activity of bee pollen extracts as well as their potential as food, pharmaceutical and cosmetic ingredients.

Keywords: Antioxidant, Anti-inflammatory, Bee pollen, Drying method, Stingless bees

ÖZ

Antioksidanlar, insan vücudundaki biyomoleküllere zarar verebilecek ve hücrelere zarar verebilecek, iltihaplanma dahil dejeneratif hastalıklara yol açabilecek serbest radikallerle savaşmada çok önemli bir işlev oynamaktadır. Bu araştırmada, farklı kurutma yöntemleriyle işlenmiş altı iğnesiz arıdan (*Heterotrigona itama*, *Tetragonula reepeni*, *Tetragonula testaceitarsis*, *Tetragonula fuscobalteata*, *Tetragonula iridipennis* ve *Tetragonula pagdeni*) arı poleni ekstraktlarını antioksidan ve anti-inflamatuvar olarak değerlendirilmiştir. Arı polenleri, 40°C'de fırında kurutma yoluyla kurutulmuş ve

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

4°C'de soğutularak, ardından etanol ile özümlemişdir. Fırında *T. fuscobalteata* ekstraktları 36.47 µg/mL IC₅₀ değerleri ile en yüksek antioksidan değerine sahipken, soğutma grubu *T. reepeni* 41.30 mg/mL olarak bulunmuştur. En yüksek anti-inflamatuvar etki fırına göre *T. fuscobalteata*, IC₅₀ değeri 39.70 mg/mL ve soğutucuya göre *T. reepeni* 34.30 µg/mL belirlenmiştir. Bu bulgular, farklı kurutma tekniklerinin arı polenlerinin antioksidan ve anti-inflamatuvar özelliklerini etkilediğini ve gıda, ilaç ve kozmetik için güçlü bir malzemeye sahip olduğunu ileri sürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan, Anti-inflamatuvar, Arı poleni, Kurutma yöntemi, İğnesiz arılar

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Dejeneratif hastalıkların artan yaygınlığı, pahalı tedavi masrafları ve geleneksel ilaçların kullanımından kaynaklanan önemli yan etki riski, gıdanın ilaç olarak e konusunda halkın farkındalığını artırmıştır. Arıların yan ürünlerinden biri olan arı poleni, fenolik bileşikler ve protein, amino asitler, lipitler, makro-mikro bileşenler ve vücudun bağışıklık sistemini desteklemek için çok önemli olan diğer vitaminler gibi besinler içerdiğinden tam bir gıda olduğu düşünülmektedir. Arı poleni, büyük miktarda aktif madde içerdiğinden günlük yemek takviyeleri için alternatif bir kaynaktır. Ancak Kellut arı çiftçilerinin ürettiği arı poleni, bu arı çiftçilerinin arı polenini faydalı özelliklere sahip gıda ürünlerine nasıl dönüştüreceklerini anlamadıkları için sıklıkla israf edilmektedir. Bu çalışmanın amacı altı iğnesiz arıdan (*Heterotrigona itama*, *Tetragonula reepeni*, *Tetragonula testaceitarsis*, *Tetragonula fuscobalteata*, *Tetragonula iridipennis* ve *Tetragonula pagdeni*) elde edilen arı poleni ekstraktlarının farklı kurutma yöntemleri ile antioksidan ve anti-inflamatuvar olarak değerlendirilmesidir.

Gereç ve Yöntem: Doğu Kalimantan Eyaleti, Samarinda şehrinin Lempake ilçesindeki iğnesiz arı çiftçileri, iğnesiz arı poleni (*H. itama*, *T. reepenni*, *T. pagdeni*, *T. iridipennis*, *T. fuscobalteata* ve *T. testaceitarsis*), daha sonra Haziran 2022'de toplandı.

Bulgular ve tartışma: Ekstraksiyon öncesi arı poleninin verim değeri 14,89-61,29 % (40°C'de etüvde) ve 40,91-78,44 % (4°C'de soğutucu) arasında değişmektedir. Arı poleni ekstraktının verim değeri 12,00-47,11 % (40 °C'de fırın) ve 18,18-77,59 % (4°C'de soğutucu) arasında değişmektedir. Arı poleninin besin değeri, tüm arı polen türlerinin chiller 4°C ve fırın 40°C yönteminde nem içeriği, kül içeriği, lipid içeriği ve protein içeriği içerdiğini göstermektedir. İğnesiz arı poleni ekstraktlarının fitokimyasal taramasının sonuçları, altı iğnesiz arıdan 40°C etüvde kurutulan etanolik ekstraktın

alkaloidler, flavonoidler, kumarinler, tanenler içerdiğini ve soğutucu 4°C kurutma yöntemi ekstraktının alkaloidler, flavonoidler, triterpenoidler, steroidler içerdiğini göstermiştir, kumarinler, saponinler, tanenler. 40°C etüvde ve 4°C chiller kurutma yöntemi kullanılarak kurutulmuş arı poleninin antioksidan ve anti-inflamatuvar aktivitesi, 4°C chiller kurutma yönteminin IC₅₀'sinin 40°C etüvde kurutma yöntemine göre daha yüksek antioksidan ve anti-inflamatuvar aktivite değeri gösterdiğini göstermektedir. Antioksidan aktivitenin en yüksek oranı, 73,14 % 'lük bir inhibisyon yüzdesine ve 36,47 µg/mL'lik bir IC₅₀ değerine sahiptir. Böylece, en düşük IC₅₀ 34,30 µg/mL ve en yüksek anti-inflamatuvar inhibisyon yüzdesi 85,54 % olmuştur.

Sonuç: Altı iğnesiz arı ekstresi, 4°C'de soğutucular ve 40°C'de fırınlar kullanılarak kurutuldu ve her ikisi de çeşitli fitobileşenlerin varlığı nedeniyle çeşitli antioksidan sistemlere karşı potansiyel in vitro antioksidan aktivite gösterdi. Bu aktivite aynı zamanda güçlü membran stabilize edici ve anti-inflamatuvar etkiler göstermiştir. Tüm sonuçlara göre, altı arı poleni (iğnesiz arı) ekstraktının aktivitesi her iki kurutma işlemi için doza bağımlıdır. Bu nedenle gıda takviyesi, ilaç ve kozmetik kaynağı olarak kullanılmak üzere altı arı poleni müstahzarı önerilebilir.

INTRODUCTION

Several physiological processes in the body, including the activation of enzymes, the release of mediators, diapedesis, or the circulation of white blood cells through capillaries to areas of inflammation, are the body's natural protective response to injured tissue (Singh, et al. 2019). The earliest reaction to tissue injury is the acute inflammatory phase, which causes local vasodilation and increased capillary permeability, leading to fluid build-up in the affected area. If left unchecked, it might result in the progressive deterioration of tissue

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

or turn into a chronic phase that harms crucial body organs. Leukocyte and phagocytic infiltration into the area of inflammation can result in increased oxygen reception stimulation and the production of reactive oxygen species (ROS) like superoxide ion radicals ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl (OH^{\bullet}), hydroperoxyl (OOH^{\bullet}), peroxy (ROO^{\bullet}), and alkoxy (RO^{\bullet}) radicals as characteristics of chronic inflammation during cell metabolism (Tutun, et al. 2021). Primary cell molecules can be affected by excessive production of ROS, which can lead to the oxidation of proteins, amino acid changes, peptide chain disintegration, enzyme inactivation, denaturation and lipid peroxidation; and changes to membrane processes, glucose autooxidation, DNA filament fragmentation, base mutation, and modifications of gene expression (Martemucci, et al. 2022). Then, it can cause cell membrane damage. The role of antioxidant and anti-inflammatory molecules is important in neutralizing free radicals that can cause cell and biomolecule damage in the body.

Bee pollen is a functional food source that has strong nutrition and therapeutic properties (Rao 2020). It contains large numbers of compounds such as phytosterols, carbohydrates, enzymes, phenolic compounds, flavonoids, nucleic acids, triterpenes, and vitamins. These chemical components have various effects, including antioxidant and anti-inflammatory activity, thus showing considerable biological potential to be studied as new drug sources. However, the antioxidant and anti-inflammatory activity of these factors influences the antioxidant and anti-inflammatory activity of bee pollen, such as chemical composition, geographical conditions, botanical origin, and treatment methods (Kalaycıoğlu, et al. 2017) (Spulber, et al. 2018).

Traditional drying techniques are hardly standardized and mostly rely on pollen being exposed to hot air flow (Castagna, et al. 2020), which has a negative harmful effect on the nutritional quality of bee pollen (Dias, et al. 2016; Cinkmanis, Dimins and Mikelsone 2017; Barajas, Cortes-Rodriguez and Rodriguez-Sandova 2012). Recent studies have proposed novel techniques that operate at lower temperatures, such as 40°C ovens (Anjos, et al. 2019); and 4°C chillers (Rzepecka-Stojko, et al. 2014), to decrease the water content in bee-collected pollen and also to be acceptable to consumers in order to address these issues.

Hot air drying of bee pollen may lead to a decrease in the antioxidant and anti-inflammatory activity of

bee pollen extracts. On the other hand, the freeze-drying technique preserves total amino acid, proline, and rutin content, and only removes the water content of bee pollen (Ranieri, et al. 2017). In addition, freeze drying supports higher levels of total phenolic, total flavonoids, and antioxidant activity (Dias, et al. 2016). In vitro, anti-inflammatory testing using bee pollen extract from *Scaptotrigona affinis postica* (stingless bee), when first reported, showed antioxidant activity in all treatments and was able to block cyclooxygenase (COX) enzyme (Lopes, et al. 2020).

The extract of stingless bee *Tetragonula sarawakensis* has antioxidant activity with an inhibitory concentration value of 39% at 100 mg/mL (Sari, et al. 2021). However, to the best of the authors' knowledge, studies of the antioxidant and anti-inflammatory activity of bee pollen extracts (*H. itama*, *T. reepeni*, *T. pagdeni*, *T. iridipennis*, *T. fuscobalteata*, and *T. testaceitarsis* stingless bee) from East Kalimantan, Indonesia, processed using an oven drying method at 40°C and a chiller drying method at 4°C, have not been reported. Thus, the present study aims to determine the antioxidant and anti-inflammatory activity and conduct phytochemicals analyses of the extracts of six stingless bee pollen processed by oven drying at 40°C and chilling at 4°C.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and chemicals

Ethanol, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), phosphate buffer, potassium dihydrogen orthophosphate, sodium carbonate, sodium monohydrogen orthophosphate, ethanol, and sodium chloride were purchased from Sigma Aldrich, Germany. Distilled water was used to prepare all of the solutions, reagents, and buffers. Indomethacin, a standard non-steroidal anti-inflammatory drug, was obtained from the Faculty of Pharmacy at Mulawarman University, Indonesia.

Bee pollen material

Stingless bee pollen samples (*H. itama*, *T. reepenni*, *T. pagdeni*, *T. iridipennis*, *T. fuscobalteata*, and *T. testaceitarsis*) were collected in June 2022 from stingless bee farmers in the Lempake area, Samarinda city, East Kalimantan Province, Indonesia. Bee pollen (Fig. 1) was taken using a stainless-steel spoon, then put in polyethylene

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

plastic, and stored in the refrigerator for one day before the drying process. Then, the next day, the bee pollen was separated from the propolis, weighed, and dried in an oven (Memert UN 50, Germany) at a temperature of 40°C for 8–10 days or a chiller (Modenna SC 1303, Italy) at a temperature of 4°C for 15–22 days. Bee pollen samples were weighed to determine the yield (Eq.1). Then, they were stored in glass vials before further testing.

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{weight of the fresh bee pollen}}{\text{weight of dried bee pollen}} \times 100 \quad (1)$$

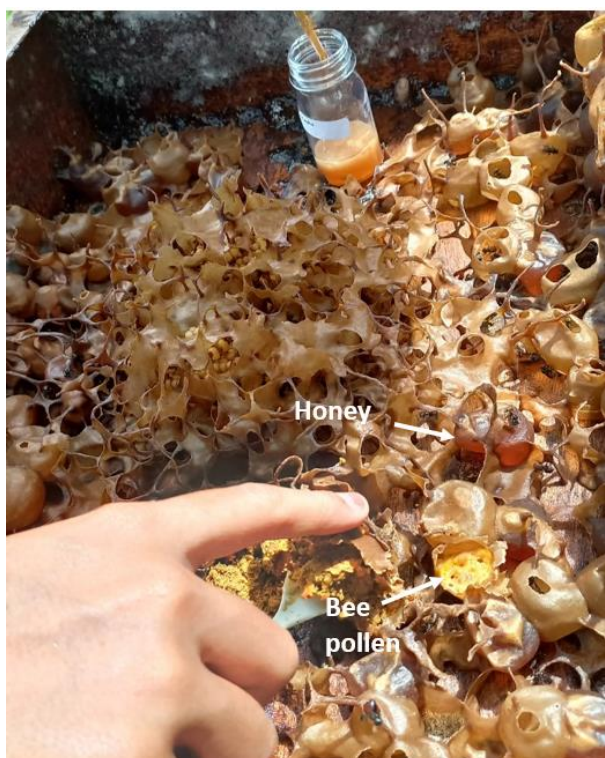


Figure 1. *H. itama* coloni (arrow: honey and bee pollen)

Blood Sample

Red blood samples of patient volunteers and healthy people were used in this study. They were collected by the Indonesian Red Cross Society (PMI). The venepuncture method was used for blood collection. Blood (5 mL) was taken from every healthy patient using a new syringe and needle, a spirit swab, and a tourniquet. The samples were collected in ethylene diamine tetra acetate (EDTA) and plain bottles and then gently inverted for mixing. All experiments were performed within 72 hours of blood collection.

Extraction

Dried bee pollen (30g dry weight) was extracted by a cold maceration (soaking) method using 96% ethanol (1:2 w/v ratios) as a solvent and shaking for 3 × 24 hours at room temperature. Then, the extract solution was filtered to get the filtrate from the solvent. The filtrate was then concentrated using a rotary vacuum evaporator to obtain a crude ethanolic extract of bee pollen. Furthermore, the crude extract was put into a sample bottle that had been weighed and put in an oven at 40°C for 3-4 days to produce a yield of the extracted sample, as presented in Eq.

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{weight of the bee pollen extract}}{\text{weight of dried bee pollen}} \times 100 \quad (2)$$

Proximate Analysis

The common method for determining the water content, ash content, lipid content, and protein of six bee pollen dried was utilized to estimate the samples' proximate composition using a different approach. Measurements were done in triplicate, and results were reported on a dry basis (AOAC 2006).

Phytochemical Analysis

To identify the phytochemicals present in all extracts, qualitative chemical analysis was used to evaluate each one.

Determination of alkaloids

Four drops of Dragendorff and diluted sulphuric acid (H₂SO₄) 2 N were added to a sample (5 mL), and the mixture was agitated. A prominent orange-red precipitate indicated the presence of alkaloids. A standard alkaloid, quinine, was used as a positive control (Harbone 1987).

Determination of flavonoids

Five drops of diluted sodium hydroxide (1% NaOH) were added to 1 mL of 96% ethanol with 1 mg of bee pollen extract. Flavonoids are indicated by the appearance of a yellow fluorescence color (Kokate 2001).

Determination of triterpenoid and steroid

Liebermann-Burchard reagent enables identifying these compounds, after boiling and cooling the bee pollen extract mixture with a few drops of acetic anhydride, concentrated H₂SO₄ was added via the

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

test tube's sides. At the intersection of two layers, a brown ring developed. Steroids were detected via the upper layer's shift to green, while triterpenoids were detected via the layer's deep red coloration (Harbone 1987).

Determination of coumarins

A total of 1 mg of bee pollen extract in 1 mL of ethanol extract was mixed with a few drops of 1% NaOH and then added to ethanol. The formation of a yellow color indicated the presence of coumarin (Senthilmurugan, Vasanthe and Suresh 2013).

Determination of saponins

Ten mL of distilled water was used to dilute a 1 mL sample of extract. The formation of a stable foam upon vigorously shaking of the mixture indicates the presence of saponins (Harbone 1987).

Determination of tannins

Ten mg of the extract solution was dissolved in 10 mL of ethanol 96% in a test tube and lead acetate (CH₃COO)₂Pb 1% w/v was added. Tannins were declared positive if the reaction caused an extract precipitate to form (Kokate 2001).

Determination of carotenoids

One mg of bee pollen extract dissolved in 1 mL of ethanol 96 % had 5 mL of chloroform added in a test tube, this was then shaken and filtered, and then 85% w/v H₂SO₄ was added. The formation of a blue color on the surface indicated the presence of carotenoids (Senthilmurugan, Vasanthe and Suresh 2013).

Antioxidant activity

The free radical scavenging activity of bee pollen extracts was measured by 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil (DPPH) according to Arung et al. (2008), with modification. Samples were prepared by adjusting the concentration of crude extracts to 100 ppm by diluting them in 98% v/v ethanol. 100 µL of each diluted sample was added to 3 mL of 0.1 mM DPPH ethanolic solution and shaken vigorously. The mixture of samples and DPPH was placed in dark conditions at room temperature for 30 min. The absorbance of the resulting solution was measured at 517 nm by a UV-visible spectrophotometer. Vitamin C was used as a positive control. The percentage of DPPH scavenging effect was calculated as follows (Eq.3):

$$\% \text{ DPPH Scavenging} = \frac{\text{control absorbance} - \text{sample absorbance}}{\text{control absorbance}} \times 100 \quad (3)$$

The inhibition concentration (IC₅₀ value, mg/mL) is the level at which the figure was obtained after 50% of the DPPH radicals were scavenged, with the aid of interpolation from a linear regression analysis.

Membrane stabilization activity as an anti-inflammatory Test

The technique of stabilizing the erythrocyte membrane was used to study anti-inflammatory efficacy *in vitro* according to Oyedapo et al. (2010) with modification. The reference sample, control, and different concentrations of extract (6.25–100 µg/mL) were each combined with 1 mL of phosphate

buffer, 2 mL of hyposaline, and 0.5 mL of hRBC suspension. The typical medication was indomethacin (100 µg/mL). All the assay solutions were centrifuged for 10 minutes at 5,000 rpm after 30 minutes of incubation at 37°C. A spectrophotometer operating at 560 nm was used to determine the haemoglobin concentration after the supernatant liquid was decanted. Assuming that 100% of the hemolysis produced in the control was created, the percentage of membrane hemolysis was estimated and calculated by the formula as follows (Eq. 4)

$$\text{Inhibition of hemolysis \%} = 100 \times \frac{100 - \{\text{Abs of test drug} - \text{Abs of drug control}\}}{\{\text{Abs blood control}\}} \quad (4)$$

For each sample, the maximal inhibitory concentration (IC₅₀) was determined by plotting the concentration against the percentage inhibition of hemolysis.

Statistical analysis

Assays for anti-inflammatory and antioxidant activity were performed in triplicate (n = 3), and the results were presented as mean and standard deviation.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ANOVA techniques were used to perform a one-way analysis of variance. A least significant difference (LSD) test was used to identify significant differences between means. Statistics were deemed to be "statistically significant" if $p < 0.05$.

RESULTS

Percentage yield of bee pollen

Table 1 shows the yield values of six types of bee pollen processed with the OD method at 40°C and

CH at 4°C and their ethanol extracts. This table shows that the highest bee pollen extract is found in the 4°C CH method for the bee pollen types *T. testaceitarsis* (78.44%) and *T. fuscobalteata* (77.59%). While the lowest yield value was found in the 40°C OD method for the bee pollen extracts *T. testaceitarsis* (14.89%) and *T. testaceitarsis* (12.00%). The yield value of bee pollen before extraction ranges from 14.89–61.29% (OD at 40 °C) and 40.91–78.44% (CH at 4°C). While the yield value of the extract of bee pollen ranges from 12.00–47.11% (OD at 40 °C) and 18.18–77.59% (CH at 4°C).

Table 1. Yields of stingless bee pollen processed by oven drying and chilling, and ethanol extracts.

Species	Yield of drying bee pollen (g)		Yield of ethanol extracts of bee pollen (g)	
	Oven 40°C	Chiller 4°C	Oven 40°C	Chiller 4°C
<i>H. itama</i>	1.21 (61.29%)	45.9 (70.59%)	0.93 (47.11%)	6.21 (53.23%)
<i>T. reepeni</i>	14.12 (33.71%)	17.8 (45.51%)	10.69 (25.42%)	5.50 (43.64%)
<i>T. pagdeni</i>	5.51 (44.84%)	45.3 (70.86%)	3.88 (31.58%)	6.21 (22.03%)
<i>T. iridipennis</i>	16.69 (28.48%)	41.5 (74.22%)	14.15 (24.15%)	6.60 (18.18%)
<i>T. fuscobalteata</i>	16.69 (29.15%)	13.2 (40.91%)	14.13 (24.69%)	5.81 (77.59%)
<i>T. testaceitarsis</i>	34.01 (14.89%)	37.1 (78.44%)	27.39 (12.00%)	6.42 (46.88%)

*The percentage value of the yield produced on a dry basis is shown by the numbers in brackets.

Proximate composition

Table 2 shows the water content, ash content, lipid content, and protein content using the CH drying method, which is higher than the OD method. The highest water content is found in bee pollen *T. testaceitarsis* at 46.2%, and the lowest is in bee pollen *T. reepeni* at 9.93%. The highest ash content is in bee pollen *T. reepeni* at 1.41% and the lowest is in *T. fuscobalteata* at 0.24%. The highest lipid content, in *T. testaceitarsis*, was 7.54%, and the

lowest was in bee pollen *T. fuscobalteata* at 3.37%. The highest protein content was in bee pollen *H. itama* with a value of 17.25% and the lowest was in *T. testaceitarsis* at 16.20%. With oven drying, bee pollen *T. testaceitarsis* has a higher moisture content of 10.05%, while there were higher levels of ash, lipid, and protein in *T. reepeni* bee pollen, with values of 2.37%, 7.06%, and 20.02 %, respectively. Meanwhile, the lowest values of water, ash, lipid, and protein content were found in *T. pagdeni*, *T. fuscobaltetata*, and *T. testaceitarsis*.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 2. Composition of the proximate value of dry bee pollen using two different methods

Bee pollen samples	Chiller 4°C				Oven 40°C			
	Water content (%)	Ash content (%)	Lipid content (%)	Protein content (%)	Water content (%)	Ash content (%)	Lipid content (%)	Protein content (%)
<i>H. itama</i>	41.8±0.12	1.36±1.07	4.97±0.91	17.25±0.09	32.4±1.20	1.60±1.24	4.55±0.88	8.42±0.02
<i>T. reepeni</i>	9.93±3.96	1.41±0.14	7.34±0.14	17.08±0.10	10.05±7.80	2.37±2.08	7.06±4.20	10.02±0.04
<i>T. pagdeni</i>	40.6±0.09	0.27±0.06	6.12±0.13	16.98±0.35	28.6±1.01	2.07±1.09	3.13±0.88	7.56±0.03
<i>T. iridipennis</i>	31.9±0.47	0.50±0.11	7.41±0.83	16.28±0.18	31.4±1.00	1.55±1.02	4.97±0.97	7.95±0.07
<i>T.fuscolbalteata</i>	29.1±0.48	0.24±0.01	3.37±0.07	16.55±0.26	28.7±0.99	0.45±0.09	2.12±0.83	7.39±0.04
<i>T. testaceitarsis</i>	46.2±0.09	1.34±1.05	7.54±2.35	16.20±0.09	39.9±0.04	2.17±0.21	2.93±0.84	5.84±0.06

*Data are presented as averages from triplicate experiments ± SD

Phytochemical screening

Table 3 shows the results for phytochemical screening of stingless bee pollen extracts. The results indicate that the ethanolic extract from six stingless bees (*H. itama*, *T. reepeni*, *T. pagdeni*, *T. iridipennis*, *T. fuscobalteata*, *T. testaceitarsis*) with

40°C OD contains alkaloids, flavonoids, coumarins and tannins; and the CH dried sample extracts contain alkaloids, flavonoids, triterpenoids, steroids, coumarins, saponins, and tannins. However, the extracts from the oven at 40°C do not show saponins and alkaloids for *H. itama* and *T. reepeni*.

Table 3. Phytochemicals of pollen from six stingless bees from East Kalimantan, Indonesia

Sample	Phytochemical screening															
	Oven 40°C								Chiller 4°C							
	Al	Fl	Tr	St	Ku	Sa	Ta	Ka	Al	Fl	Tr	St	Ku	Sa	Ta	Ka
<i>H. itama</i>	-	+	-	-	+	-	+++	-	+	+++	+	+	++	+	+++	-
<i>T. reepeni</i>	-	+	-	-	++	-	++	-	+	+++	+	+	+++	+	+	-
<i>T. pagdeni</i>	++	++	-	-	++	-	++	-	++	++	+	+	+	+	+	-
<i>T. iridipennis</i>	++	+	-	-	+	-	+	-	+++	++	+	+	++	-	++	-
<i>T.fuscolbalteata</i>	++	+++	-	-	++	-	+	-	++	+++	+	+	++	+	++	-
<i>T.testaceitarsis</i>	+	++	-	-	+++	-	+	-	++	+++	+	-	+++	+	++	-

Description: Al = Alkaloid, Fl =Flavonoid, Tr = Triterpenoid, St = Steroid, Ku = Coumarin, Sa = Saponin, Ta = Tannin, Ka = Karotenoid (-) = no compound, (+) = compound (weak), (++) = compound (medium), (+++) = compound (strong).

Antioxidant activity

Determination of the antioxidant activity of extracts from pollen from stingless bees was carried out by examining free radical scavenging activity using DPPH assays. Figure 2 shows that the antioxidant activity of dried bee pollen using the OD 40°C

method was significantly different ($p < 0.05$) from the CH 4°C treatment. Bee pollen from *T. fuscobalteata* and *T. pagdeni*, had no significant differences in the 40°C OD treatment, where the inhibition values were 93.95% and 93.87%, respectively. Bee pollen from *T. testaceitarsis*, *T. iridipennis*, *T. reepeni*, and *H. itama* are all quite different, with inhibition

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

percentages of 43.31%, 31.52%, 83.54%, and 51.70%, respectively. Thus, all varieties of bee pollen in the CH 4°C method were significantly different, with *T. reepenni* having the highest inhibition value (94.60%), followed by *H. Itama* (82.11%), *T. pagdeni* (73.14%), *T.fuscobalteata* (70.68%), *T.iridipennis* (58.31%), and *T.testaceitarsis* (45.70%). The vitamin C control in both drying methods was not significantly different from *T.pagdeni*, *T.fusbalteata*, and *T.reepenni*. However, it was significantly different from bee pollen from *T. testaceitarisis*, *T. iridipennis*, and *H. itama*. Table 4 shows the IC₅₀ of each sample, the OD 40°C method shows a lower IC₅₀ compared to the CH 4°C method. *T.fuscobalteata* bee pollen had

a concentration of 36.47 µg/mL using the 40°C OD technique, followed by *T. pagdeni* 47.93 µg/mL, *T. reepeni* 76.93 µg/mL, *T.itama* 92.33 µg/mL, *T. testaceitarsis* 116.83 µg/mL, and *T. iridipennis* 158.98 µg/mL. Bee pollen *T. reepeni* had a lower IC₅₀ in the CH 4°C method with a value of 41.30 µg/mL, followed by *H.itama* 53.64 µg/mL, *T.pagdeni* 60.10 µg/mL, *T.fuscobalteata* 66.72 µg/mL, and *T.iridipennis* 85.51 µg/mL. When comparing IC₅₀ values, the OD 40 °C approach yielded a lower antioxidant activity value than the CH 4°C method, despite the fact that, statistically, the two procedures have quite different effects on each type of bee pollen.

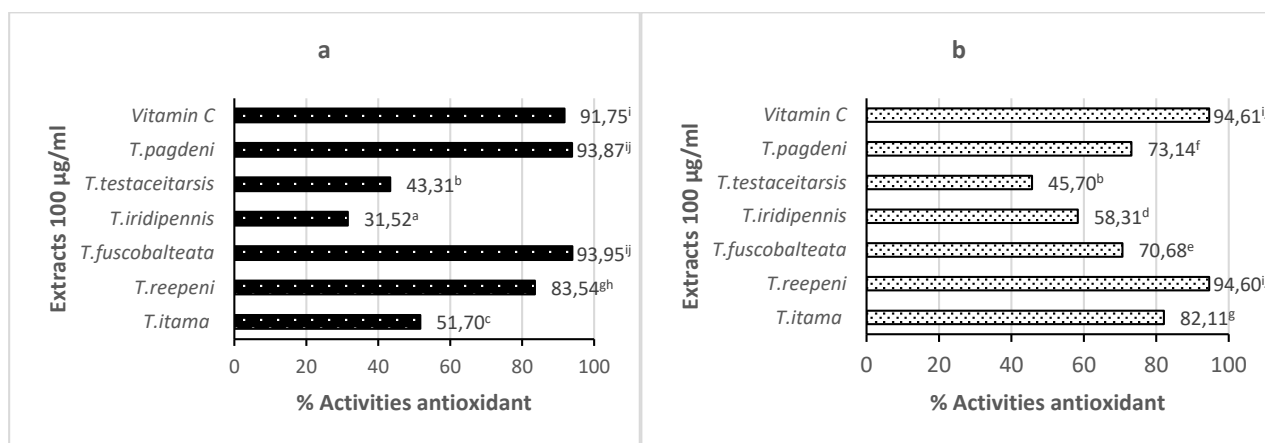


Figure 2. Antioxidant activity of dried crude extracts of bee pollen using different methods: (a) OD 40°C and (b) CH 4°C

Table 4. Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Dried Six Bee Pollen Extracts using Different Drying Methods

Species	Antioxidant activity IC ₅₀ (µg/mL)		Activity of anti-inflammatory IC ₅₀ (mg/mL)	
	Oven drying at 40°C	Chiller drying at 4 °C	Oven drying at 40°C	Chiller drying at 4 °C
<i>T. itama</i>	92.33 ⁱ ±0.768	53.64 ^d ±2.777	56.40 ^f ±7.182	44.10 ^d ±0.178
<i>T. reepeni</i>	76.93 ^g ±5.942	41.30 ^b ±4.155	54.13 ^{ef} ±1.272	34.30 ^c ±0.179
<i>T. pagdeni</i>	47.93 ^c ±0.712	60.10 ^e ±0.540	54.90 ^e ±8.997	54.76 ^f ±4.983
<i>T. iridipennis</i>	158.98 ^h ±1.832	85.51 ^h ±6.843	78.35 ^h ±0.844	115.23 ^h ±2.721
<i>T. fuscobalteata</i>	36.47 ^b ±0.708	66.72 ^f ±4.026	39.70 ^c ±0.850	68.25 ^g ±0.542
<i>T. testaceitarsis</i>	116.83 ^k ±1.804	102.24 ^j ±1.569	53.99 ^e ±0.823	78.53 ^{hi} ±2.268
Vitamin C	4.75 ^a ±0.099	-	-	-
Indomethacin	-	-	23.16 ^a ±2.391	-

Membrane stabilization profile (Anti-inflammatory activity)

Figure 3 shows the *in vitro* membrane stabilization of bee pollen extracts from six stingless bees (*H. itama*, *T.reepeni*, *T.pagdeni*, *T.iridipennis*, *T.fuscobalteata*,

and *T.testaceitarsis*) using OD 40°C and CH 4°C methods, and then indomethacin (standard drug) on human sickle erythrocytes exposed to hyposaline solution (induced lysis). The results show that the anti-inflammatory activity of the six types of bee pollen was significantly different ($p < 0.05$) in the two

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

drying methods. For method OD 40°C on bee pollen *T. itama* it was 81.36%, for *T. fuscobalteata* 76.24%, for *T. pagdeni* of 72.64%, and for *T. reepenni* of 71.68%, significantly different from *T. testaceitarisis* at 58.28%, *T. iridipennis* at 43.50% and indomethacin as treatment controls. While the CH 4°C method for bee pollen *T. itama* at 85.85%, *T. reepenni* at 86.54%, and indomethacin were not significantly different compared to bee pollen *T. testaceitarisis* at 61.86%, and *T. iridipennis* at 46.80%, which was significantly different from *T. pagdeni* at 73.83% and *T. fuscobalteata* at 74.62%. Table 4 shows the anti-inflammatory activity of six bee pollen extracts with half the maximum concentration (IC₅₀). *T. fuscobalteata* bee pollen

extract using the OD 40°C method showed the lowest IC₅₀ value of 39.70 µg/mL at a dose of 100 µg/mL, followed by *T. testaceitarisis* at 53.99 µg/mL, *T. reepenni* at 54.13 µg/mL, *T. Itama* at 56.40 µg/mL, and *T. iridipennis* at 78.35 µg/mL. Whereas in the CH 4°C method, the lowest stabilizing membrane was found in bee pollen *T. reepenni* with an IC₅₀ value of 34.30 µg/mL at a dose of 100 µg/mL, followed by *H. itama* at 44.10 µg/mL. *T. pagdeni* at 54.76 µg/mL, *T. fuscobalteata* at 68.25 µg/mL, *T. testaceitarisis* at 78.53 µg/mL, and *T. iridipennis* at 115 µg/mL. The absorbance results for indomethacin membrane stabilization show that the lowest positive control at a dose of 100 µg /mL was 23.16 µg/mL, with an inhibition percentage of 88.34%.

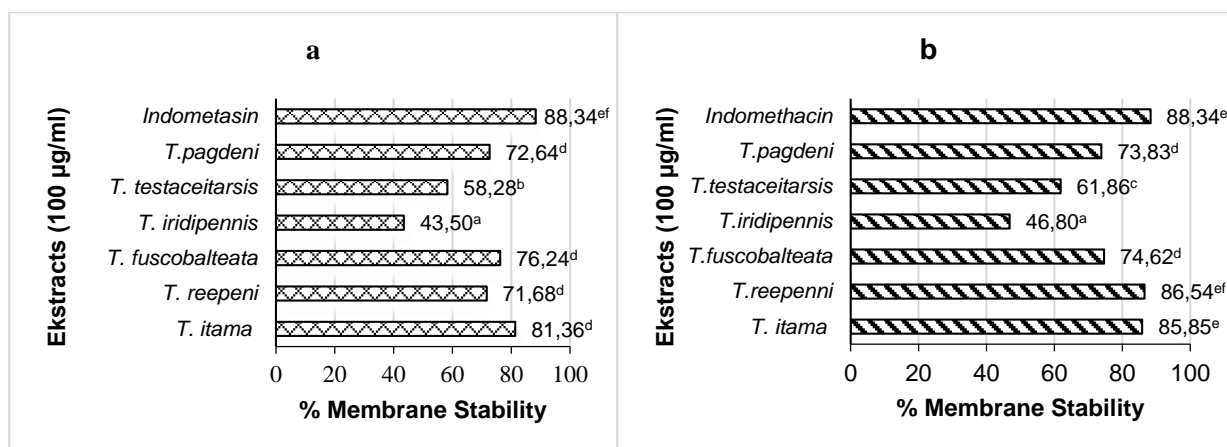


Figure 3. Effect of different dryer methods, (a) oven 40°C, and (b) chiller 4°C, on the stabilization membrane of crude extracts of bee pollen.

DISCUSSION

Percentage yield of bee pollen

All extracts in Table 1 were used to evaluate their phytochemical content and antioxidant activity on free radicals as well as anti-inflammatory activity on red blood cell membrane stabilization. The CH method at 4°C gave a higher yield value than the 40°C OD method, both before and after the extraction of bee pollen. This result is higher than that of Arung et al. (2021), who reported that the yield of bee pollen extract without the drying process ranged from 30.2–67.7%. The high yield value in this study is due to differences in the processing methods carried out before and after extraction, resulting in different residual water content (Ranieri, et al. 2017).

Proximate composition

The results show that six types of kelulut bee pollen contained nutritional value, such as moisture content, ash content, fat content, and protein content, when stored at 4°C and 40°C. The nutritional content of the chiller 4°C method with all types of bee pollen showed the highest value compared to the oven 40°C method. The chiller 4°C method uses a low temperature, where the cooling process occurs due to the release of heat in the bee pollen into the cooling room environment, and the release of heat from the cooling room environment to the outside of the cooling system until it reaches a certain desired temperature so that the bee pollen is dry and the nutritional content is little changed. In the

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

drying process with the chiller 4°C method, there is also no discernible heat exchange (heat to change the temperature without changing the phase), so the temperature of the drying room with the chiller method of 4°C can be used. In chiller drying, the water content component was between 9.93–46.20%, ash content 0.24–1.36%, lipid content 3.37–7.54%, and protein 16.20–17.25%; while for the oven method, water content was 10.05–39.9%, ash content 0.45–2.37%; lipid 2.12–7.06%, and 5.84–10.02% for protein. This is almost the same as in (Campos, et al. 2015), who found that protein and lipid range from 10–40% and 1–13%, respectively. The nutritional range of bee pollen originating from East Kalimantan in Indonesia has so far not been identified by the authors. However, in Brazil and Colombia, the nutritional composition of bee pollen was almost the same, namely in the range of 16.1–32.1% for protein (Almeida-Muradian, et al. 2005) and 2.8-9.7% for lipids (Fuenmayor, et al. 2014)..

Phytochemical screening

The results show that alkaloids, flavonoids, coumarins, and tannins were found in high concentrations in bee pollen extracts. This may be due to their diuretic role and early phytochemical analysis revealed the existence of antioxidant components or other bioactive chemicals that may explain bee pollen use in treating inflammatory diseases. The difference in the number of phytochemicals produced may be influenced by the drying factor, where the temperature can maintain the color and quality of the dried food product. The differences between treatments could depend on different residual water content, which negatively affected the content of flavonoid compounds (Ranieri, et al. 2017). Thus, each phytochemical will show its potential for biological action, such as flavonoids playing a role in antioxidant potential (Ranieri, et al. 2017), and alkaloids being important in other antimicrobial, analgesic, and antispasmodic processes (Hassan, Akmal and Khan 2020).

A recent study reported that the main compound in bee pollen, benzoic acid, might enhance its antibacterial, antifungal and antioxidant properties (Kahraman, et al. 2022). The presence of phytochemicals in extracts of bee pollen dried by the OD method at 40°C and the CH 4°C drying method might show novel biological behaviour that increases the possibility of discovering new compounds such as antioxidants and anti-inflammatories.

Antioxidant activity

Antioxidant testing of six dried bee pollen extracts from stingless bees with OD 40°C and CH 4°C methods showed significant differences. The lowest IC₅₀ value was found in the OD 40°C method, followed by the CH 4°C method, for *T. reepeni* bee pollen. It is suspected that the OD 40°C method can remove the water content contained in bee pollen, which might affect the antioxidant levels in *T. reepeni* bee pollen. Minarti et al. (2022) reported that the method of drying bee pollen at an oven temperature of 60°C can affect its chemical content. Additionally, Isik and Doymaz (2018) found that drying bee pollen at 40°C might preserve well its quality sensory attributes, and physicochemical properties. The findings of an Anova test on Vitamin C IC₅₀ values were substantially different from those of six bee pollen crude extracts. This is assumed to be a result of the six bee pollen extracts having varying antioxidant capabilities due to the various drying techniques. Antioxidant activity depends on the pollen content of various sites (Kocot, et al. 2018) (Saral, et al. 2019).

In this study, six types of bee pollen were used, which means that each type will show a different antioxidant capacity. The use of a cold temperature method is reported to be able to maintain the biological capacity of phytochemical compounds contained in bee pollen. In contrast, using heat and a temperature of 40°C will reduce the effectiveness of the compounds in bee pollen extracts. Even though hot air drying is one of the most popular techniques for preserving bee pollen quality, it can negatively impact on the food value of bee pollen (Cinkmanis, Dimins and Mikelsone 2017).

Bee pollen contains phytochemical compounds such as flavonoids, phenolic acids, phytoalexins, and vitamins, and these compounds are sensitive to heat, so that bee pollen is easily damaged (Tutun, et al. 2021). The findings of IC₅₀ calculations indicate that the extent of free radical inhibition by the extract decreases with decreasing test concentration. The IC₅₀ values indicate having very strong antioxidant activity if the IC₅₀ value is less than 50 ppm (Sukandar, et al. 2017).

The percentage of free radical scavenging and IC₅₀ in all bee pollen extracts was significantly different to the IC₅₀ of vitamin C. It is suspected that vitamin C is easily soluble, while bee pollen extract is rather difficult to dissolve, so that the compounds available in bee pollen extract may not dissolve completely.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

The free radical scavenging capacity of the six bee pollen extracts will increase depending on the concentration of the treatment. In the DPPH assay, the ability of crude extracts of the six bee pollens examined to act as hydrogen atoms or electron donors in the transformation of DPPH• to the reduced form of DPPH-H was investigated. All samples assessed were able to reduce purple stable radical DPPH to yellow DPPH. The in vitro test method with DPPH (Kocot, et al. 2018) (Özcan, et al. 2019) increased the antioxidant activity compared to the other methods (A. O. Lopes, et al. 2020)

In addition, this study also used ethanol as a solvent for bee pollen extract. Ethanol extract showed DPPH radical scavenging activity of 93.60% compared to other solvents (Mohammad, Mahmud-Ab-Rashid and Zawawi 2021). Thus, the relationship of percentage inhibition of the six crude extracts of bee pollen to the positive control of 100 µg/mL gave a high active capability comparable to that of the positive control.

Membrane stabilization profile (Anti-inflammatory activity)

Stabilization of blood membranes (erythrocytes) has been used as a method to determine anti-inflammatory activity in vitro. Anti-inflammatory activity in the OD 40°C and CH 4°C methods showed significantly different effects ($P < 0.05$) on the six bee pollen extracts. Figures 2a and 2b show the results of percentage tests on the activity of stabilizing the erythrocyte membrane of extracts of *T. reepeni* (CH 4°C) and *T. fuscobalteata* (OD 40°C), which had the lowest IC₅₀ values of 34.30 µg/mL and 39.70 µg/mL compared to the other bee pollens. And these values were higher than the positive control (Indomethacin), which had an IC₅₀ value of 23.16 µg/mL. The relationship between the percentage inhibition of the six crude extracts of bee pollen and the positive control of 100 µg/ml showed a high active capability comparable to that of the positive control. So the six crude bee pollen ethanol extracts may be able to inhibit completely at a concentration of 100 ppm in the CH 4°C and OD 40°C methods. These results indicate that the membrane stabilization activity of bee pollen extracts using the OD 40 °C drying method was significantly different compared to extracts using the CH 4°C method. This is presumably because the drying method with a low temperature and long time can maintain the characteristics and stability of bee pollen. (Ranieri, et al. 2017) explain that the use of a low temperature

and a long time can prevent a Maillard reaction, which in this case may affect anti-inflammatory activity. To the best of the author's knowledge, the anti-inflammatory activity of six varieties of bee pollen from East Kalimantan (*H. itama*, *T. reepeni*, *T. pagdeni*, *T. iridipennis*, *T. fuscobalteata*, *T. testaceitarsis*) has not previously been reported. Both the oven at 40°C and the chiller at 4°C drying methods demonstrate the presence of powerful flavonoids, which are expected to play a significant role in stabilizing red blood cells and are related to the results of phytochemical studies on the six bee pollen extracts (inflammation) as presented in Table 3. According to research by Denisow and Denisow-Pietrzyk (2016), quercetin, a type of flavonoid with anti-inflammatory characteristics, can inhibit the metabolism of arachidonic acid in bee pollen. When arachidonic acid levels drop, the acid level lowers the production of proinflammatory prostaglandins and has an anti-inflammatory impact. Thus, the effect is good for local pain elimination and the prevention of platelet aggregation after bee pollen administration. The alkaloid content in six bee pollen extracts with different drying methods also showed an influence on the inflammatory process, because alkaloids are secondary metabolites derived from the primary metabolites of amino acids, especially amino acids, through biosynthetic pathways (Bai, et al. 2021).

Alkaloids can act on leukocytes, neutrophils, and endothelial cells to block inflammation at the cellular level. In addition, coumarin content also affects the anti-inflammatory properties of cells, so that phytoconstituents such as umbelliferone, scopoletin, columbiatnetin, visniadin, marmin, and many others, derived from the coumarin nucleus, were found to have anti-inflammatory and antioxidant activity (Bansal, Sethi and Bansal 2012).

As a strong antioxidant, the coumarin nucleus has potential as a candidate for the development of anti-inflammatory drugs. This is in line with the results of testing the antioxidant activity of six bee pollen extracts with different drying methods showing a high percentage of free radical inhibition at 94.60% and a low IC₅₀ of 36.47 µg/mL (Table 2). Bee pollen extract shows a high antioxidant capacity, suggesting it is able to handle excess ROS that can cause imbalance processes, such as cell damage that causes inflammatory diseases and others. The highest percentage of anti-inflammatory inhibition was 85.54% and the lowest IC₅₀ was 34.30 µg/mL. This means that the value of the highest percentage

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

of erythrocyte membrane stabilization of the six bee pollen extracts is close to the value of indomethacin as a positive control.

Conclusion

With the presence of diverse phytoconstituents, both an oven at 40°C and a chiller at 4°C drying methods for six stingless bee extracts had potential for *in vitro* antioxidant activity in different antioxidant systems. Furthermore, this activity demonstrated strong membrane stabilization as an anti-inflammatory action. All of the findings presented indicate that the activity of both drying methods for six bee pollen (stingless bee) extracts is dosage-dependent. Thus, the six bee pollen extracts have potential as antioxidants and anti-inflammatory and can be recommended for use as a source of food supplements, drugs, and possibly cosmetics.

Acknowledgement: The fund was supported from the Ministry of Education, Culture, Research and Technology, the Republic of Indonesia in the scheme Doctoral Dissertation Research 2022 (Grant no 429/UN17.L1/HK/2022) and by the Deputy of Research and Innovation, National Research and Innovation Agency (BRIN) with Grant number: 398/II/FR/3/2022.

Author Contribution: Netty Maria Naibaho: investigation, analysis, writing—original draft, writing—review & editing; Irawan Wijaya Kusuma: research planning, writing—review & editing; Widya Fatriasari: research planning, writing—review & editing; Enos Tangke Arung: research planning, funding acquisition, writing—review & editing.

Data Availability: Data are available in Manuscript.

Declaration of interest: The authors declare that there is no conflict of interests.

Ethics: The Research was conducted in *in vitro* and not with animals or human.

Financial support: The Ministry of Education, Culture, Research and Technology, the Republic of Indonesia (Grant no 429/UN17.L1/HK/2022) and National Research and Innovation Agency (BRIN) (Grant number: 398/II/FR/3/2022).

REFERENCES

Almeida-Muradian LB, Pamplona LC, Coimbra S, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen

pellets. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2005;18(1):105–111. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>

Anjos, Ofélia VP, Delgado T, Estevinho L. Influence of the storage conditions on the quality of bee pollen. *Zemdirbyste-Agriculture*, 2019;106(1):87–94, doi:10.13080/z-a.2019.106.012

AOAC. *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Maryland: the Association of Official Analytical Chemists, 2006.

Arung ET, Shimizu K, Kondo R. Inhibitory effect of isoprenoid-substituted flavonoids isolated from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. *Planta Med*, 2008;72(9):847–850. <https://doi.org/10.1055/s-2006-931606>

Arung ET, Ramadhan R, Khairunnisa B, Amen Y, Matsumoto M, Nagata M, Wijaya IK, et al. Cytotoxicity effect of honey, bee pollen, and propolis from seven stingless bees in some cancer cell lines. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2021;28:7182-7189. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.017>

Bai R, Yao C, Zhong Z, Ge J, Bai Z, Ye X, Xie T, Xie Y. Discovery of natural anti-inflammatory alkaloids: Potential leads for the drug discovery for the treatment of inflammation. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2021;213:18–22 <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113165>

Bansal Y, Sethi P, Bansal G. Coumarin: a potential nucleus for anti-inflammatory molecules. *Med Chem Res*, 2012;1-12. doi:DOI 10.1007/s00044-012-0321-6

Barajas J, Cortes-Rodriguez M, Sandoval R. Effect of temperature on the drying process of bee pollen from two zones of Colombia. *Journal of Food Process Engineering*, 2012;35:134–148

Campos MGR, Bogdanov S, Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, Ferreira F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*, 2015;47(2):154–161. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2008.111101443>

Castagna A, Benelli G, Conte G, Sgherri C, Signorini F, Nicoletta C, Ranieri A, Canale A. Drying Techniques and Storage: Do They Affect the Nutritional Value of Bee-Collected Pollen?

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Molecules, 2020;25:4925.
<http://dx.doi.org/10.3390/molecules25214925>
- Cinkmanis I, Dimins F, Mikelsone V. Influence of Lyophilization and convective type drying. *Foodbalt*, 2017;201-203. doi:10.22616/foodbalt.2017.038
- Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. *Journal Science Food Agric*, 2016:1–8. doi:10.1002/jsfa.7729
- Dias LG, Tolentino G, Pascoal A, Estevinho LM. Effect of processing conditions on the bioactive compounds and biological properties of bee pollen. *Journal of Apicultural Research*, 2016;55(5):357–365. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2016.1248109>
- Diaz P, Chul SJ, Lee S, Khoo C, Rao SK. Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chinese Medicine*, 2012;7(26):2–9. <http://www.cmjournal.org/content/7/1/26>
- Fuenmayor C, Zuluaga CD, Díaz MC, Quicazán CM, Cosio M, Mannino S. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Rev MVZ Córdoba*, 2014;19(1):4003–4014. <https://revistamvz.unicordoba.edu.co/article/view/120/189>
- Harbone JB. *Metode Fitokimia (Terjemahan)*. 2. Bandung: ITB Bandung, 1987
- Hassan A, Akmal Z, Khan N. The Phytochemical Screening and Antioxidants Potential of *Schoenoplectus triqueter* L. Palla. *Journal of Chemistry*, 2020:1–8. doi:<https://doi.org/10.1155/2020/3865139>
- Isik A, Ozdemir M, Doymaz I. Effect of hot air drying on quality characteristics and physicochemical properties of bee pollen. *Food Science and Technology*, 2018;1-9. <https://doi.org/10.1590/fst.02818>
- Kahraman HA, Tutun H, Kaya MM, Usluer MS, Tutun S, Yaman C, Sevin S, Keyvan E. Ethanolic extract of Turkish bee pollen and propolis: phenolic composition, antiradical, antiproliferative and antibacterial activities. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2022;36(1):45–56 <https://doi.org/10.1080/13102818.2022.2045217>
- Kalaycioglu Z, Kaygusuz H, Doker S, Kolaylı S, Erim FB. Characterization of Turkish honeybee pollens by principal component analysis based on their individual organic acids, sugars, minerals, and antioxidant activities. *LWT – Food Science and Technology*, 2017;84:402–408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.003>
- Kocot J, Małgorzata K, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, Musik I. Antioxidant Potential of Propolis, Bee Pollen, and Royal Jelly: Possible Medical Application, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018;29:29. <https://doi.org/10.1155/2018/7074209>
- Kokate CK. *Pharmacognosy*. 16. Mumbai: Niali Prakasham, 2001
- Lopes AJO, Vasconcelos CC, Garcia JBS, Pinheiro MSD, Pereira FAN, Camelo DS, Morais SV, et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Pollen Extract Collected by *Scaptotrigona affinis postica*: in silico, in vitro, and in vivo Studies. *Antioxidant MDPI*, 2020;9 (103):1–16. doi:10.3390/antiox9020103
- Martemucci G, Costagliola C, Mariano M, Andrea L, Napolitano P, D'Alessandro AG. Free Radical Properties, Source and Targets, Antioxidant Consumption and Health. *Oxygen*, 2022;2: 48–78. <https://doi.org/10.3390/oxygen2020006>
- Minarti S, Junus M, Radiati LE, Jaya F, Fa'izah S, Landa F, Handayani I, Warasi DM, Fitriyono MA. Drying Methods Effect on Chemical Content of Pollen Study of Oil Palm Pollen as Honeybee Feed. *Proceedings of the International Conference on Improving Tropical Animal Production for Food Security (ITAPS 2021)*. Atlantis Press International, 2022;502–505
- Mohammad SM, Mahmud-Ab-Rashid NK, Zawawi N. Stingless Bee-Collected Pollen (Bee Bread): Chemical and Microbiology Properties and Health Benefits. *Molecules*, 2021;26 (957):1–29 <https://doi.org/10.3390/molecules26040957>
- Oyedapo O, Akinpelu B, Akinwunmi K, Adeyinka M, Sipeolu F. Red blood cell membrane stabilizing potentials. *International Journal of*

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Plant Physiology and Biochemistry, 2010;2: 46–5. <http://www.academicjournals.org/ijppb>
- Özcan MM, Aljuhaim F, Babiker EE, Uslu N, Ceylan DA, Ghafoor K, Mete MÖ, *et al.* Determination of antioxidant activity, phenolic compound, mineral contents and fatty acid compositions of bee pollen grains collected from different locations. *J. Apic. Sci.*, 2019;63:69–79. doi:10.2478/JAS-2019-0004
- Ranieri A, Benelli G, Castagna A, Sgherri C, Signorini F, Bientinesi M, Nicoletta C, Canale A. Freeze-drying duration influences the amino acid and rutin content in honeybee-collected chestnut pollen. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017;26(2):252–255. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.08.011>
- Rao GHR. Metabolic Disease Pandemic: Call for Action. *EC Endocrinology and Metabolic Research*, 2020;5(9):1–3
- Rzepecka-Stojko A, Drzal A, Stojko J, Buszman E. Effect of storage conditions on antioxidant activity of bee pollen extracts. *Med. Weter*, 2014;70(12):740–744
- Saral Ö, Kilicarslan M, Sahin H, Yildiz O, Dincer B. Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2019;43:41–447. doi:10.3906/vet-1901-3
- Sari AM, Rosamah E, Suwinarti W, Kusuma IW, Arung ET. Aktivitas antioksidan dan antibakteri dari ekstrak bee pollen lebah kelulut (*Tetragonula sarawakensis*). *Jurnal Riset Industri Hasil Hutan*, 2021;13(2):123–132. <http://dx.doi.org/10.24111/jrihh.v13i2.7050>
- Senthilmurugan G, Vasanthe VB, Suresh K. Screening and antibacterial activity analysis of some important medicinal plants. *International Journal of Innovation and Applied Studies*, 2013;2(2):146–152. <http://www.issr-journals.org/ijias/>
- Singh H, Sarkar BK, Arya JC, Pal S, Kumar R, Gupta V, Singh R, Verma SC. Phytochemical and Anti-Inflammatory Evaluation of Herbal Gel Prepared from Bark Extract of *Mesua Ferrea* Linn. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 2019;9(5-s):53–56. <http://dx.doi.org/10.22270/jddt.v9i5-s.3638>
- Spulber S, Raciti M, Dulko-Smith B, Lupu D, Rüegg J, Nam K, Ceccatelli S. Methylmercury interferes with glucocorticoid receptor: Potential role in the mediation of developmental neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2018;1–7. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2018.02.021>
- Sukandar D, Nurbayt S, Rudiana T, Husna TW. Isolation and Structure Determination of Antioxidants Active Compounds from Ethyl Acetate Extract of Heartwood *Namnam* (*Cynometra cauliflora* L.). *Kimia Terap. Indonesia*, 2017;19(1):11–17. <http://inajac.lipi.go.id>
- Tutun H, Kaya MM, Usluer MS, Kahraman HA. Bee Pollen: Its Antioxidant Activity. *U. Arı D. – U. Bee J.*, 2021;21(1):119–131. doi:10.31467/uluaricilik.896045

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

FORAGING ACTIVITY and ROLE OF STINGLESS BEE *Tetragonula iridipennis* Smith (Hymenoptera: Apidae) in BITTER GOURD

İğnesiz Arı *Tetragonula Iridipennis*'in Smith (Hymenoptera: Apidae) Acı Kabakta Yayılma Faaliyeti ve Rolü

Kamatchi Murali NARMADHA^{1*}, Pernamallur Ayyaswami SARAVANAN²,
Govindasamy UMAPATHY³, Muthusamy VELMURUGAN⁴

¹Department of Agricultural Entomology, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641-003, Tamil Nadu, INDIA, Corresponding author E-mail: narmadhakm@gmail.com, ORCID No: 0000-0002-2007-036X

²Tapioca and Castor Research Station, Yethapur, Salem 636-119, Tamil Nadu, INDIA, E-mail: entosaravanan@gmail.com, ORCID No: 0000-0001-8789-4497

³Department of Agricultural Entomology, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641-003, Tamil Nadu, INDIA, E-mail: umapathy@tnau.ac.in, ORCID No:0000-0002-5616-4544

⁴Department of Floriculture and Landscaping, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641-003, INDIA, E-mail: hortmrvelu@gmail.com, ORCID No: 0000-0002-4196-2877

Received / Geliş Tarihi: 23.06.2023

Accepted / Kabul Tarihi: 14.08.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1318736

ABSTRACT

In the bitter gourd cropping system, honey bees are the primary pollinators. In southern India, a field study was conducted at Coimbatore district at 10° 58' 46.164" N latitude and 76° 55' 53.562" E longitude, to record the foraging activity and pollination efficiency of the stingless bee *Tetragonula iridipennis* in bitter gourd. Bee foraging activity was recorded separately in male and female flowers, with the number of foragers/flower/min, and fruit set and yield were assessed under three different conditions: pollinator exclusion, bee pollination and open pollination. The abundance of pollinators and foraging rate of stingless bees observed on male flowers was 1.71 bees/ flower/ minute and flower handling time in seconds (37.86 sec) was higher than female flowers (1.22 bees / flower/ minute) and (25.73 sec), respectively. The peak foraging activity of stingless bees was observed between 08:00-10:00 hours with 3.30 bees/ 5 mins. The pollination efficiency index of stingless bees in bitter gourd flowers was 41600 pollen grains. The foraging activity of bees at the hive entrance was at its peak from 08:00 to 10:00 hours. *T. Iridipennis* colony growth parameters showed increased honey sealed area of 1464.5 g and brood development. The experiment results showed that yield was higher in the managed bee-pollinated condition in terms of the number of fruits/plant (18.2 fruits) and fruit yield per hectare (44.08 t/ha) than in the open-pollinated condition (16.5 fruits) and (38.30 t/ha), and with pollinators excluded, no fruit set was recorded.

Key words: Bitter gourd, *T. iridipennis*, Pollination efficacy, Foraging activity

ÖZ

Acı kabak yetiştirme sisteminde, bal arıları birincil tozlayıcılardır. Güney Hindistan'da, Coimbatore bölgesinde, 10° 58' 46.164" N enlem ve 76° 55' 53.562" E boylamında, acı kabakta arı *Tetragonula iridipennis*'in yiyecek arama aktivitesini ve tozlaşma verimliliğini kaydetmek için bir saha çalışması yapılmıştır. Arı tozlaşma aktivitesi erkek ve dişi çiçeklerde ayrı ayrı kaydedilmiş, tozlaşma sayısı/çiçek/dakika olarak belirlenmiş ve meyve tutumu ve verimi üç farklı koşul altında değerlendirilmiştir: tozlayıcıların dışlanması,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

arı tozlaşması ve açık tozlaşma. Erkek çiçeklerde gözlenen tozlayıcı bolluğu ve iğnesiz arıların yiyecek arama oranı sırasıyla 1,71 arı/çiçek/dakika ve saniye cinsinden çiçek taşıma süresi (37,86 sn) dişi çiçeklerden (1,22 arı/çiçek/dakika) ve (25,73 sn) daha yüksek olarak belirlenmiştir. Erkek arıların en yoğun yiyecek arama faaliyeti 3,30 arı/ 5 dakika ile 08:00-10:00 saatleri arasında gözlenmiştir. Acı kabak çiçeklerinde iğnesiz arıların tozlaşma etkinliği indeksi 41600 polen tanesi, kovan girişindeki arıların yiyecek arama aktivitesi 08:00-10:00 saatleri arasında en yüksek seviyede kaydedilmiştir. *T. Iridipennis* koloni büyüme parametreleri 1464.5 g bal sızdırmaz alan ve kuluçka gelişiminde artış göstermiştir. Deney sonuçları meyve/bitki sayısı (18,2 meyve) ve hektar başına meyve verimi (44,08 t/ha) açısından yönetilen arı tozlaşması koşulunda verimin açık tozlaşma koşuluna (16,5 meyve) ve (38,30 t/ha) göre daha yüksek olduğunu, tozlaştırıcılar olmadan ise meyve oluşmadığını göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Acı kabak, *T. iridipennis*, Tozlaşma etkinliği, Yayılma faaliyeti

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Çalışmanın amacı: Çalışmanın amacı, bal arısı *Tetragonula iridipennis*'in Hindistan'daki acı kabak yetiştirme sisteminde yiyecek arama davranışını ve tozlaşma etkinliğini değerlendirmektir.

Gereç ve yöntem: Tozlayıcı yiyecek arama davranışını incelemek için, her bitkide haftalık aralıklarla üç çiçek gözlemlenirken, güney Hindistan'ın Coimbatore bölgesinde 10° 58' 46.164" N enleminde ve 76° 55' 53.562" de rastgele seçilen on bitki çalışma için etiketlenmiştir.

Beş dakikalık bir süre boyunca ziyaret edilen/çiçek toplayıcı sayısı, en yüksek tozlayıcı faaliyeti sırasında toplayıcının çiçek/dakika sayısı (tozlayıcıların bolluğu) ve her bir arı tozlayıcı/çiçek/dakika (toplama hızı) tarafından harcanan zaman olarak haftalık aralıklarla bir kronometre ile kaydedilmiştir. Tozlaşma etkinlik indeksi, vücuttaki gevşek polen tanelerinin sayısı ile acı kabak çiçeklerindeki tozlayıcıların yiyecek arama oranı ve bolluğu çarpılarak hesaplanmıştır. Arıların vücutlarındaki gevşek polen taneleri ölçülmüştür.

Muamele başına 350 dişi çiçek, verim değerlendirmesi yapmak için çiçeklenme başlangıcından sonra etiketlenmiştir. Tozlayıcı dışlama (T1), arı tozlaşması (T2) ve açık tozlaşma durumu (T3), her bir tozlaşma modunda yönetilen arıların tozlaşma etkinliğini değerlendirmek için kullanılmıştır. 08:00–10:00, 12:00–13:00 ve 16:00–18:00 saatlerinde kovan girişindeki yiyecek arama faaliyetleri, koloni büyüme parametreleri, koloninin başlangıç ağırlığı ve son ağırlığı alınarak sayılmıştır.

Bulgular: Acı kabak mahsulünün monoecious doğası, doğal tozlayıcıların daha az aktivitesi nedeniyle açık tozlaşma koşullarında zayıf meyve tutumu ile sonuçlanmıştır. Bu çalışmanın bulguları, çiçek üzerindeki *T. iridipennis* aktivitesinin 8:00 ile

10:00 saatleri arasında zirve yaptığını ve 16:00 ile 17:00 saatleri arasında herhangi bir aktivite olmadığını göstermiştir. Verimi ve meyve tutumunu arttırdığı için *T. iridipennis* acı kabak ekosisteminde etkili bir tozlayıcı olarak kabul edilir. Kovan girişindeki aktivite, toplayıcı aktivitenin 8:00 ile 10:00 arasında zirve yaptığını göstermiştir. Deney süresi boyunca, kapalı bal alanı için koloni büyümesi %4,8 olmuştur. Yönetilen arı tozlaşma alanı, açık tozlaşma ile karşılaştırıldığında en yüksek meyve tutumuna (bitki başına 18,2), meyve ağırlığına (261,6 g/meyve) ve verime (44,08 t/ha) sahip olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Açık tozlaşma koşulları ve tozlayıcı dışlama gibi diğer tozlaşma modlarıyla karşılaştırıldığında, mevcut çalışmamız, *T. iridipennis* ile yönetilen arı tozlaşma koşullarının daha yüksek meyve tutumu ve meyve ağırlığı ürettiğini ortay koymuştur. Buna karşılık, tozlayıcı dışlama kullanıldığında hiçbir meyve tutumu gözlenmemiştir.

INTRODUCTION

Bitter gourd has been mainly cultivated for its unique bitter taste and its high nutrient content, but nowadays it is gaining importance as a medicinal plant in India. Which is majorly cultivated in states like Maharashtra, Tamil Nadu, Kerala, Karnataka, Andhra Pradesh, West Bengal, Uttar Pradesh and Gujarat. The cultivated area in India is 109 ha with a productivity is 1330 MT/ ha (Agricoop). Fruits and seeds have important pharmacological uses with antidiabetic anthelmintic, antimalarial, antiulcerogenic and immunomodulatory effects. It also contains vitamin A, vitamin C, vitamin B complex, minerals, iron, magnesium, potassium and flavonoids like β -carotene, α -carotene, zeaxanthin, and lutein (USDA). All these acts as protective

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

scavengers against oxygen-derived free radicals and reactive oxygen species (ROS) which act against cancer, aging and other diseases. It is effectively utilized in Ayurvedic medicines. It is a day-neutral plant, monoecious and herbaceous annual climber. It generally has male flowers more than the female flowers with a mean ratio of 19:1 or 25:1. Anthesis starts between 3.30 am to 7.30 am and receptivity of stigma lasts up to 24 h after anthesis (Deyto and Cervancia, 2019).

The Monoecious nature of bitter gourd crops requires pollinators for pollination and seed set. The presence of more staminate flowers favours efficient pollination. Pollinators are attracted by the bright yellow-colored flowers. Honey bees are the predominant pollinator in the bitter gourd cropping system. In successful pollinated condition, fruit development starts from second to fifth day and develops into an entire fruit. Insufficient pollination leads to flower drops or development of irregular shape fruits, which later turn yellow and fall off. Recent observations show that the fruit yield was 78% under open pollination and 80% in hand pollination conditions but higher fruit weight was reported in insect-pollinated condition (Deyto and Cervancia, 2009). Hence, the field study was conducted, to observe the foraging activity, pollination efficiency and colony growth parameters of the managed bee-pollinated condition of *T. iridipennis* in bitter gourd.

MATERIALS AND METHODS

Pollination potential of managed stingless bee, *T. iridipennis* in enhancing the yield of bitter gourd was conducted in farmer's field at Coimbatore district in Southern India, at an altitude of 430 m above the MSL, at 10° 58' 46.164" N latitude and 76° 55' 53.562" E longitude. Bitter gourd is a direct sown vegetable crop cultivated in pandal system. Surrounding crops in nearby fields were Coconut, Areca nut, Tomato. For this study, the observation of ten randomly tagged plants and three flowers per plant was monitored at weekly interval.

Foraging activity of *T. iridipennis* on bitter gourd

Pollinator abundance was recorded as number of foragers/ flower/ minute and foraging rate was recorded in both male and female flowers as average time spent by the individual bee pollinators/ flower/ minute (Fig. 1). Observations were taken at weekly intervals and the timings were recorded

using stop watch during peak activity of pollinator. Peak foraging activity was recorded at an hourly interval from 06:00-18:00 h number of foragers visited/flower for a period of five minutes at fortnightly intervals (Yogapriya *et al.* 2019).

Pollination efficiency index

The foraging bees visiting the bitter gourd flowers during peak foraging time between 08:00 and 10:00 h were collected using a sweep net and were transferred to a glass vial containing 70% alcohol, shaken vigorously to unload the pollen grains from their body (Fig. 2a). The volume made up to 5 ml by adding distilled water and from this aliquot 0.01 ml was taken and placed over a hemocytometer and observed under a stereo zoom microscope (Fig. 2b). A total of five observations were made and the total number of pollen grains in 5 ml of solution was calculated (Balina *et al.* 2012).

Pollination efficiency index= No. of loose pollen grains on the body × foraging rate × abundance of the pollinators on flowers.

Evaluation of pollination potential of managed stingless bees

The pollination potential of managed stingless bees in enhancing the yield of bitter gourd was assessed for *T. iridipennis*. The experiment was conducted in a randomized block design with three treatments and seven replications. In each replication, ten flowers from five plants were selected and observations were recorded at periodical intervals. The treatments are T1 pollinator exclusion, female flower buds were covered with sleeve net cages (Fig. 3) before blooming to prevent the entry of pollinators accessing the flowers and one week after flowering the cages were removed, T2 bee pollination, two colonies of stingless bees were shifted and placed in bitter gourd field selected (Fig. 4), at 10% of the flowering stage of the crop and T3 open pollinated condition was controlled.

Yield parameters

Number of fruits per plant, fruit weight and yield

In tagged plants, the number of fruits was counted, and the mean fruit set was noted. Randomly picked fruits from tagged plants were weighed separately using a weighing scale, and the weight of the fruits was noted. Each tagged plant's fruits were harvested, weighed, and the yield per hectare was computed.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Colony growth parameter of *T. iridipennis* in bitter gourd field.

Colony growth of stingless bees was taken by calculating the initial and final weight of the shifted colony at 15 days intervals (Fig. 5a & 5b).

Foraging activity at the hive entrance

The foraging activity of *T. iridipennis* at the hive entrance was counted as the number of returning foragers with nectar, pollen and the number of

outgoing bees for the day during 08:00-10:00, 12:00-13:00 and 16:00-18:00 for a period of five minutes was recorded (Fig. 6).

Statistical Analysis

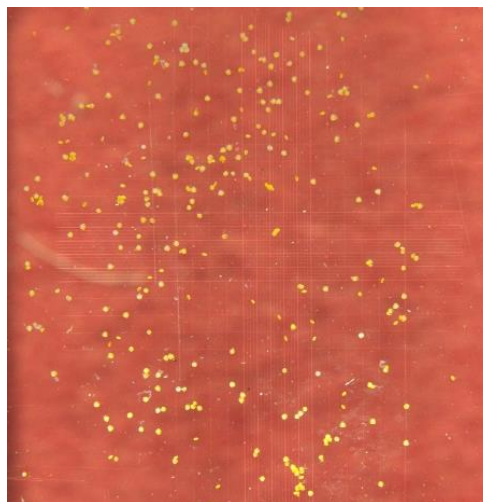
The recorded data were analyzed using the ANOVA (Analysis of Variance) and least significant difference (LSD) performed at $P=0.05$ levels of significance. Other calculations are computed using MS Excel.



Figure 1. Foraging activity of Stingless bee on bitter gourd



(2a) Bitter gourd pollen collected in corbicula



(2b) Loose pollen grains counted using hemocytometer

Figure 2. Pollination efficiency Index of stingless bee

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Figure 3. Sleeve cage



Figure 4: Stingless bee colony placed in bitter gourd field



(5a) Colony growth after 15 days



(5b) Colony growth after 30 days

Figure 5. Colony growth of stingless bees in bitter gourd field

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Figure 6. Foraging activity at the hive entrance



(7a) Pollinator exclusion



(7b) Bee pollination



(7c) Open pollination

Figure 7. Fruit set in different modes of pollination

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

RESULTS

The findings indicated that *T. iridipennis* activity was higher in bitter gourd male flowers (1.71 bees/ flower/ minute) than female flowers (1.22 bees/ flower/ minute). The stingless bee population was abundant on the 75th day in male flowers (2.53 bees/ flower/ minute) and female flowers (1.82 bees/ flower/ minute), and found minimum during the 15th day of the flowering period (1.05 bees/ male flower/ minute and 0.54 bees/ female flower/ minute) (Table 1).

The average time spent by a forager per male flower was 37.86 seconds and in female flowers was 25.73 seconds. The floral handling time for the collection of rewards by a forager per flower was maximum on the 75th day in male flowers (43.1 seconds) and female flowers (32.4 seconds) (Table 2).

The observations on the peak foraging activity of *T. iridipennis* revealed that the peak activity of stingless bees occurred from 06:00 to 12:00 h (number of foragers/flowers/5 minutes). Maximum activity was (3.30 bees) observed during 08:00–10:00 h followed by 06:00–08:00 h (3.04 bees) and at 10:00–12:00 h (2.77 bees) (Fig. 8). Overall activity of bees between 13.00-16.00 (0.55 bees). The number of foragers visiting per flower gradually declined during evening hours with a minimum activity at 16:00-17:00 h.

Pollination Efficiency Index (PEI)

The number of loose pollen grains adhering on a *T. iridipennis* collected while foraging on bitter gourd flowers was 41600 pollen grains. The pollination efficiency index of *T. iridipennis* was worked out by multiplying the number of loose pollen grains counted with the abundance of pollinator (1.71) and by foraging rate (37.86 seconds) (Table 3) Pollination Efficiency Index of *T. iridipennis* was 26,93,208.96 pollen grains.

Foraging activity of *T. iridipennis* at the hive entrance

The foraging activity of *T. iridipennis* was observed at the hive entrance in a day at different time intervals. The result showed that the mean number of outgoing bees was higher (38.76) and maximum during 08:00 – 10:00 h (Table 4). Among the incoming foragers, the nectar foragers were more (36.39), than pollen foragers (13.6). Forager movement was high at 08:00 to 10:00 h (41.16) followed by 12:00 to 13:00 h(25.4) and compared to evening hours 16:00 to 18:00 h(25.53).

Colony growth of *T. iridipennis*

The colony growth parameters of two *T. iridipennis* colonies placed in a bitter gourd field at Coimbatore district were periodically observed. The initial weight of the colonies before shifting to the bitter gourd field was 1397 g. After shifting the average weight of the colonies increased to 1464.5 g. The colonies gained 4.8% weight during the study period in bitter gourd (Table 5).

Effect of *T. iridipennis* on Pollination and Yield of bitter gourd

The observations on different treatments of pollination were given in Table 6. The bee pollination plot placed with two stingless bee colonies recorded significantly high fruit set of 18.2 fruits/plant while the open pollination plot recorded 16.5 fruits/plant (Fig. 7b &7c). The fruit weight was also higher (261.6 g/fruit) in the bee pollination plot compared to open pollination condition (250.7 g/fruit) and the fruits formed were 4.3 % heavier in weight under bee pollination than open pollination. The fruit yield recorded in the bee pollination plot was 44.08 t/ha compared to open pollination plot of 38.30 t/ha. The fruit yield obtained in the bee pollination plot was 15.09 % more than the open pollination plot. In pollinator exclusion treatment, no fruit set was observed under sleeve caged condition (Fig.7a).

Table 1. Abundance of *T. iridipennis* in bitter gourd flowers

	No. of foragers/flower/min								Mean
	15 th day	30 th day	45 th day	60 th day	75 th day	90 th day	105 th day	120 th day	
Male flower	1.05±0.02*	1.16±0.09	1.40±0.05	1.9±0.23	2.53±0.34	2.35±0.12	1.92±0.16	1.36±0.09	1.71
Female flower	0.54±0.01	0.72±0.14	1.19±0.17	1.16±0.02	1.82±0.23	1.70±0.23	1.32±0.4	1.28±0.19	1.22
Mean	0.80	0.94	1.30	1.53	2.18	2.03	1.62	1.32	1.46

Note: *Mean of 10 plant observations. Values followed by ± indicated standard deviation.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 2. Foraging activity of *T. iridipennis* in bitter gourd flowers

	Time spent by a forager/flower/min (seconds)								
	15 th day	30 th day	45 th day	60 th day	75 th day	90 th day	105 th day	120 th day	Mean
Male flower	33.2±1.6*	34.7±1.3	38.1±0.8	38.4±1.10	43.1±1.32	40.5±1.89	40.1±1.52	34.8±1.45	37.86
Female flower	19.3±1.5	22.6±2.5	25.2±2.6	31.31±1.1	32.4±1.98	29.4±2.3	25.3±0.52	20.39±0.6	25.73
Mean	26.23	28.64	31.65	34.86	37.75	34.95	32.72	27.6	31.80

Note: *Mean of 10 plant observations. Values followed by ± indicated standard deviation.

Table 3. Pollination efficiency index of *T. iridipennis* in bitter gourd

Bee species	Abundance (No. of foragers/min)	Foraging rate (Foraging activity in flower /seconds)	Number of loose pollen grains on the body*	Pollination index (Abundance × Foraging rate × Loose pollen grains)
<i>T. iridipennis</i>	1.71	37.86	41600	26,93,208.96

Note: *Mean of five observations under stereo zoom microscope

Table 4. Foraging activity of *T. iridipennis* at hive entrance

Foraging Time	0800-1000h	1200-1300h	1600-1800h	Mean
Incoming nectar forager	49.78* (7.049) ^a	23.7 (5.45) ^b	45.7 (6.75) ^a	36.39
Incoming Pollen forager	22 (4.68) ^a	14 (3.74) ^b	4.8 (2.17) ^c	13.6
Outgoing bees	51.7 (7.181) ^a	38.5 (6.203) ^b	26.1 (5.098) ^c	38.76
Mean	41.16	25.4	25.53	-

Note: *Mean of five observations; Figures in parentheses are $\sqrt{(x+0.5)}$ transformed values.

In rows means followed by different letters are significantly different at 5% level LSD

Table 5. Colony growth parameter of *T. iridipennis* colonies placed in bitter gourd field

Period of observations	Weight of the colony (g)*	Per cent increase in colony weight
Initial weight	1397.0	-
15 th day	1421.5	1.75
30 th day	1446.0	3.5
45 th day	1464.5	4.8

Note: *Mean of two colony observations

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 6. Effect of different mode of pollination on bitter gourd yield

Modes of pollination	No. of female flowers Observed	No. of picking /plant*	No. of fruits /plants*	Fruit weight (g)*	Per cent increase in fruit weight	Yield of 10 plants (kg)*	Yield (t/ha)	Per cent increase in yield (t/ha)
Pollinator Exclusion	350	0 (0.71) ^c	0 (0.71) ^c	0 (0.71) ^c	-	0 (0.71) ^c	0	-
Bee pollination <i>T. iridipennis</i>	350	14.77 (3.9) ^a	18.2 (4.34) ^a	261.6 (16.2) ^a	4.3	47.54 (68.96) ^a	44.08	15.09
Open pollinated condition	350	10.86 (3.55) ^b	16.5 (4.23) ^b	250.7 (15.8) ^b	-	41.36 (63.23) ^b	38.30	-
S.E (d)		0.013	0.026	0.055	-	0.69	-	-
C.D. (P=0.05)		0.03	0.060	0.13	-	0.314	-	-

Note: *Mean of five observations. Figures in parentheses are $\sqrt{(x+0.5)}$ transformed values.

In column, means followed by letters are significantly different at 5% levels of LSD.

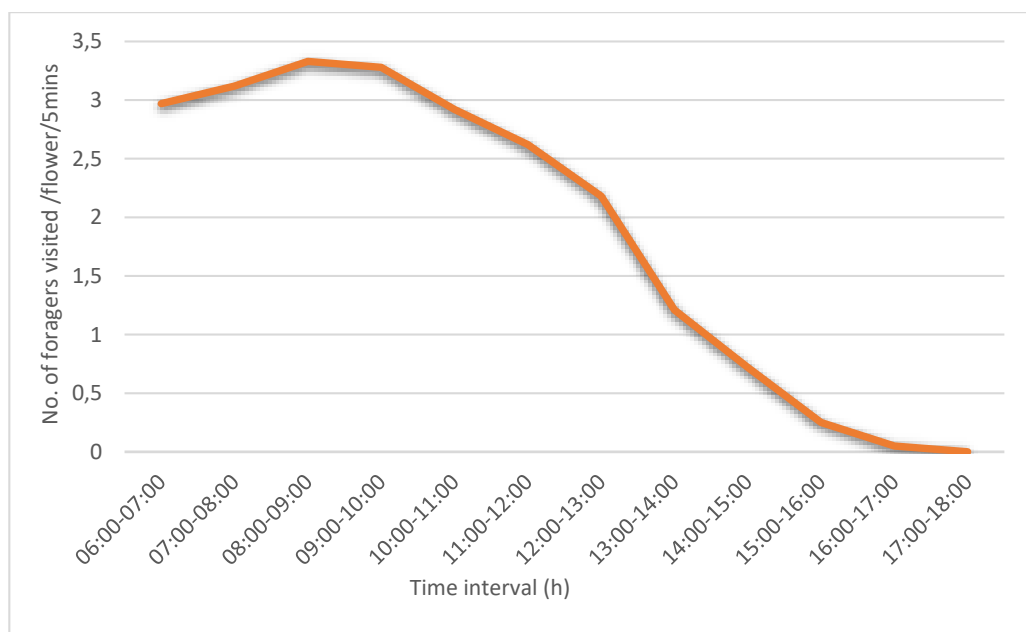


Figure 8. Peak foraging activity of *T. iridipennis*

DISCUSSION

The abundance and peak foraging activity of *T. iridipennis* on bitter gourd flowers was 2.18 bees/flower/minutes and 37.75 seconds respectively and it was recorded on the 75th day of the flowering period. *T. iridipennis* activity was higher in bitter gourd male flowers (1.71 bees/flower/minute) than female flowers (1.22 bees/flower/minute) are due to male flowers produce both pollen grains and nectar

whereas female flowers produce only nectar. Pollinator spent more time for pollen collection than nectar was reported by Bomfim *et al.* (2015) The present study exhibits the maximum activity of bees during peak flowering time which is in agreement with the results of Yogapriya *et al.* (2019) who also reported that the abundance of *T. iridipennis* in bitter gourd flowers was 2.78 individual/5mins/m². Subhakar and Sreedevi (2015) also stated that *T. iridipennis* was the most abundant flower visitor.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

The foraging activity of *T. iridipennis* was at its peak during 08:00–10:00 h (3.33–3.28 seconds) in accordance with Subhakar (2011) who reported that peak foraging activity of *T. iridipennis* occurred during 09:00 h (24.41bees/m²/5minutes) followed by 10:00 h with (21.40 bees/m²/5minutes). Yogapriya *et al.* (2019) also recorded that maximum foraging activity was observed at 08:00 – 10:00 h (6.26/ m²/ 5min). A similar observation was also reported by Deyto and Cervancia (2009) who recorded maximum foraging activity of *T. iridipennis* at 0630 h and the time spent per flower was 23.23 seconds. Similarly, Chauhan *et al.* (2021) also reported maximum activity at 08:00 h (31.66 bees) and minimum activity at 10:00 h (29.33 bees) in Nagaland.

The pollination efficiency index of *T. iridipennis* (26,93,208.96) was higher compared to *A. cerana indica*. Pangestika *et al.* (2017) also recorded similar observations that the pollination efficiency of three different species of stingless bees with a higher number of pollen grains in *Heterotrigona itama* (31392 pollen grains) followed by *Lepidotrigona terminate* (23017 pollen grains) and *T. laeviceps* (8015 pollen grains).

Stingless bee colonies placed in a bitter gourd field recorded a significant increase in the weight of the colonies from 1397 g to 1464.5 g. Previously Vasanthakumar *et al.* (2015) also reported that the colony growth of stingless bees placed in mango orchards has a substantial increase in colony weight from 1514.67 g to 1611.67 g in two months period of mango flowering.

Maximum activity of incoming nectar foragers, pollen foragers and outgoing bees was observed from 08:00 to 10:00 h (41.16) due to the synchronization of bees activity and flower opening time. Lintu *et al.* (2020) reported similar observations in cucumber where the incoming and outgoing foragers were maximum at 13:00 to 14:00 h (67.0 and 58.0 respectively).

Managed bee pollination with *T. iridipennis* resulted in an increased number of fruits per plant, fruit weight and yield in bitter gourd than in open pollination plots as Layek *et al.* (2021) also reported that managed bee pollination of *T. iridipennis* in water melon increased the fruit set by 14%. and fruit length 26.04 cm compared to open pollinated condition (24.48 cm), yield of watermelon also significantly increased (36.05%) after the introduction of stingless bee colonies for pollination. Bisui and Layek (2020)

reported that the number of fruit sets and the yield was a maximum of 86±11.74 in managed bee pollination with *T. iridipennis* compared to open pollinated condition (75±12.69).

Conclusion

The lower yield of bitter gourd is caused by a pollination deficit under open pollination conditions. The cross-pollination activity of *T. iridipennis* in bitter gourd, significantly improved the yield. During the experimentation period, *T. iridipennis* colony growth also increased. Therefore, managed bee pollination of *T. iridipennis* is a successful approach for farmers and beekeepers to increase the yields of bitter gourd and honey, respectively.

Acknowledgement: I would especially like to thank my chairman, Dr. P.A. Saravanan, and the other authors for their assistance in helping me finish my research. This research is a part of my thesis.

Contribution of authors: P A Saravanan and K M Narmadha planned, designed the work. G Umapathy and M Velmurugan helped in field layout preparation and yield analysis. K M Narmadha did field work, data collection and wrote the manuscript. P A Saravanan analyzed the collected data and edited it. All co-authors have read and approved the final manuscript.

Declaration of conflict of interest: Authors have no conflict of interest to declare and all the co-authors have accepted the content.

Data availability: Data available on request from the authors.

Ethical issue: The research on honey bees have no ethical issues.

Source of finance for the study: Not applicable because there is no funding source for this study.

REFERENCES

- Balina, PK, Sharma, SK, Rana, MK. Diversity, abundance and pollination efficiency of native bee pollinators of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) in India. Journal of Apicultural Research, 2012;51(3):227-231. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.02>
- Bisui, S, Layek, U. Utilization of Indian dammar bee (*Tetragonula iridipennis* Smith) as a pollinator of bitter gourd. Acta Agrobotanica, 2020;73(1). <http://dx.doi.org/10.5586/aa.7316>

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Bomfim, IGA, Bezerra, ADdM, Nunes, AC, Freitas, BM and Aragão, FASd. Pollination requirements of seeded and seedless mini watermelon varieties cultivated under protected environment. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2015;50(1):44-53. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015000100005>
- Chauhan, A, Singh, HK, Kumaranag, KM. Pollination Potential of Stingless Bee *Tetragonula iridipennis* Smith in Ash Gourd. *Indian Journal of Entomology*, 2019;81(4). doi: 10.5958/0974-8172.2019.00158.5
- Deyto, RC, Cervancia, CR. Floral biology and pollination of Ampalaya (*Momordica charantia* L.). *Philippine Agricultural Scientist*, 2009;92(1): 8-18
- Lintu, VV, Amirtha, VS, Paul, A. Foraging behaviour of *Tetragonula iridipennis* (smith) in cucumber under protected cultivation. *International Journal of Agriculture Sciences*, 2020;18 (12)
- Layek, U, Kundu, A, Bisui, S, Karmakar, P. Impact of managed stingless bee and western honey bee colonies on native pollinators and yield of watermelon: A comparative study. *Annals of Agricultural Sciences*, 2021;66(1):38-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aoas.2021.02.004s>
- Ministry of Agriculture & Farmer's Welfare, Area and production of Horticulture crops 2020 – 21. <https://agricoop.nic.in> 2022 (retrieved by: 20.11.2021)
- Pangestika, NW, Atmowidi, T, Kahono, S. Pollen load and flower constancy of three species of stingless bees (Hymenoptera, Apidae, Meliponinae). *Tropical life sciences research*, 2017;28(2):179. <http://dx.doi.org/10.21315/tlsr2017.28.2.13>
- Subhakar, G. Pollinator Diversity and Abundance in major Cucurbitaceous Crops. Acharya NG Ranga Agricultural University, 2011
- Subhakar, G, Sreedevi, K. Foraging ecology of insect pollinators in bitter gourd." *Indian Journal of Entomology*, 2015;77(2):189-192. <http://dx.doi.org/10.5958/0974-8172.2015.00036.X>
- USDA. United States Department of Agriculture-National Nutrient Datadase. <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/168393/nutrients> (retrieved by: 20.11.2021)
- Vasanthakumar, S, Srinivasan, M, Sowmiya, C. Pollinator management in mango orchard. M.Sc. Agriculture, Department of Agricultural Entomology, Tamil Nadu Agricultural University. Coimbatore, 2015
- Yogapriya, A, Usharani, B, Suresh, K, Vellaikumar, S., Chinniah, C. Foraging Behaviour of Major Pollinators in Bitter Gourd. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 2019;8(6):947-954. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2019.806.114>

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

FORAGING ECOLOGY AND ABUNDANCE OF NATIVE POLLINATORS IN BITTER GOURD

Acı Kabakta Yerel Tozlayıcıların Yayılma Ekolojisi ve Bolluğu

Kamatchi Murali NARMADHA^{1*}, Pernamallur Ayyaswami SARAVANAN²,
Govindasamy UMAPATHY² and Muthusamy VELMURUGAN³

¹Department of Agricultural Entomology, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641-003, Tamil Nadu, INDIA, Corresponding author E-mail: narmadahakm@gmail.com, ORCID No: 0000-0002-2007-036X, E-mail: umapathy@tnau.ac.in, ORCID No:0000-0002-5616-4544

²Tapioca and Castor Research Station, Yethapur, Salem 636-119, Tamil Nadu, INDIA, E-mail: entosaravanan@gmail.com, ORCID No: 0000-0001-8789-4497

³Department of Floriculture and Landscaping, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641-003, INDIA, E-mail: hortmrvelu@gmail.com, ORCID No: 0000-0002-4196-2877

Received / Geliş Tarihi: 24.07.2023

Accepted / Kabul Tarihi: 30.08.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1332072

ABSTRACT

An experiment is conducted in bitter gourd cropping system at Coimbatore district in India, to study bitter gourd floral character, the foraging ecology of native pollinators and their modes of pollination. Bitter gourd is a monoecious plant bears separate male and female flowers. Male flower blooms early followed by female flowers. Stigma receptivity of pistillate flowers was confirmed on 4th day old flower showed yellowish-green stigma with shining stigmatic exudation. The stigma receptivity lasts up to 24 hours after anthesis. Pollen viability test done with 2 per cent acetocarmine solution indicated that pollen collected during morning hours (06:00 h) were more viable and were deeply stained, whereas pollens collected at evening hours (17:00 h) remained unstained and considered as nonviable. The foraging activities of *Apis cerana indica* Fabricius and *Tetragonula iridipennis* begin at 06:00 h and 06:30 h respectively and ceased by evening 17:00 h. *T. iridipennis* foragers spent more time in pollen collection (31.1 seconds/ flower) and nectar collection (26.14 seconds/ flower) whereas, *A. cerana indica* spent less time in pollen collection (8.62 seconds/ flowers) and nectar collection (3.56 seconds/ flower) respectively. A total of 17 pollinator species belongs to four orders viz., Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera and Coleoptera have been documented and grouped based on their mode of foraging in bitter gourd flowers.

Key words: Abundance, Bitter gourd, Foraging ecology, Pollination

ÖZ

Acı kabak çiçek karakterini, yerli tozlayıcıların yiyecek arama ekolojisini ve bunların tozlaşma biçimlerini incelemek amacıyla Coimbatore Bölgesi'nde acı kabak yetiştirme alanında bir çalışma yapılmıştır. Acı kabak, ayrı erkek ve dişi çiçekler taşıyan monoik bir bitkidir. Erkek çiçek, dişi çiçekten daha erken açmaktadır. Stigmanın polen kabulü pistillat çiçekler 4 günlükken stigmatik eksüdasyon sonucu çiçek stigmaları sarımsı-yeşil hal aldığı başlanmaktadır. Stigma alıcılığı, antezden sonraki 24 saate kadar sürer. % 2'lik asetokarmin çözeltisi ile yapılan polen canlılığı testi, sabah saatlerinde (06:00 saat) toplanan polenlerin daha canlı ve derin boyanmış olduğunu, akşam saatlerinde (17:00

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

saat) toplanan polenlerin ise lekesez kaldığını ve cansız olarak kabul edildiğini göstermiştir. *A. cerana indica* ve *T. iridipennis*'in yiyecek arama aktivitesi sırasıyla 06:00 ve 06:30'da başlar ve akşam 17:00'de sona erer. *T. iridipennis* toplayıcıları polen toplama (31,1 saniye/çiçek) ve nektar toplama (26,14 saniye/çiçek) için daha fazla zaman harcarken, *A. cerana indica* sırasıyla polen toplama (8,62 saniye/çiçek) ve nektar toplama (3,56 saniye/çiçek) için daha az zaman harcamıştır. Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera ve Coleoptera olmak üzere dört takıma ait toplam 17 böcek türünün acı kabak çiçeklerini ziyaret ettiği belirlenmiş, bunların beslenme tarzları izlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Bolluk, Acı kabak, Yayılma ekolojisi, Tozlaşma

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Çalışmanın amacı: Çalışmanın amacı, Hindistan'daki acı kabak yetiştirme sistemindeki yerli tozlayıcıların çiçek karakterinin, yiyecek arama ekolojisinin ve tozlaşma biçimlerinin incelenmesidir.

Gereç ve yöntem: Bu çalışma acı kabak çiçek karakterini, polen canlılığını ve tozlayıcıların çeşitliliğini incelemek için Coimbatore, Telugupalayam bölgesinde yapılmıştır. Acı kabak çiçeklerini ziyaret eden tozlayıcılar 15 gün arayla kaydedilmiştir. Parlayan stigmatik salgıya sahip sarımsı-yeşil stigma, alıcılığın bir işaretiydi. Dört günlük (toplam 10 çiçek/gün) çiçeğin stigmatik yüzeyi el merceği ile görsel olarak incelenmiş ve gözlemler kaydedilmiştir. Açmadan bir gün önce 10 çiçek toplanmış ve laboratuvar koşullarında oda sıcaklığında bir petri kabında saklanmıştır. Polen canlılığı, %2 asetokarmin solüsyonu kullanılarak değerlendirilmiştir. Asetokarmin yalnızca sağlıklı canlı polen tanelerini boyayabilir.

Arıların acı kabak çiçeklerinde nektar ve polen toplama faaliyetleri gözlemlenmiştir. Tozlayıcı arıların anter veya stigma ile vücut teması üst çalışma ve yan çalışma olarak nitelendirilmiştir. Acı kabak çiçeğini ziyaret eden her türün bireyleri ve yiyecek arama biçimleri aşağıdakilere göre kaydedilmiştir: Üst işçi/yan işçi, Nektar toplayıcı veya polen toplayıcı, Hem nektar hem de polen toplayıcı. Çiçek işleme süresi, bireysel arı tozlayıcıları tarafından ürünlerin, yani polen ve nektarın toplanması için hem erkek hem de dişi çiçekler üzerinde harcanan süre, çiçek/dakika bir sayaç kullanılarak kaydedilmiştir. En yüksek çiçeklenme döneminde rastgele seçilen günde dört gözlem yapılmıştır.

Bulgular ve tartışma: Parlayan stigmatik salgıya sahip sarımsı-yeşil stigmalı dişi çiçekler, stigmanın polen kabul etmeye hazır olduğunu göstermektedir. Canlı ve cansız polenleri ayırt etmek için %2'lik asetokarmin solüsyonu ile yapılan polen canlılık testi

gözlemlenmiş ve canlı polenlerin koyu boyandığı canlı polenlerin ise ya hiç boyanmadığı ya da zayıf bir şekilde boyandığı gösterilmiştir. Toplayıcılık dönemi ve çiçek tutumuna ilişkin gözleme göre *A. cerana indica* ve *T. iridipennis* acı kabakta en fazla bulunan tozlayıcılar oldukları belirlenmiş olup *A. cerana indica* ve *T. iridipennis*'in yiyecek arama faaliyeti sabah 06.00 ve 06.30'unda başlamış ve akşam 17.00'de durmuştur. *T. iridipennis* işçi arıları polen toplamada (31,1 saniye/çiçek) nektar toplamadan (26,14 saniye/çiçek) daha fazla zaman harcamışlardır. Ancak *A. cerana indica*, polen toplama (8,62 saniye/çiçek) ve nektar toplama (3,56 saniye/çiçek) için *T. iridipennis*'ten daha az zaman harcamıştır. Coimbatore ilçesi, Telugupalayam köyünde yetiştirilen acı kabak bitkisinde toplam 17 böcek türünün bu bitkiyi ziyaret ettiği belirlenmiştir. Bu türler, Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera ve Coleoptera takımlarına ait 10 familyadan oluşmaktadır.

INTRODUCTION

Pollinators play a vital role in regulating the pollination services by transferring pollen grains from anther to stigma, which warrants productivity (Delaplane, et al., 2000). In cucurbits, pollination is a major problem due to the monoecious flowering habit and huge variance in male and female flower ratio. These factors lead to insufficient pollination and poor fruit set, which permits an agent as pollinator for fruit sets.

Bitter gourd (*Momordica charantia* L.) is grown well in tropical and subtropical regions of India, China, Japan, Thailand, Brazil, Central, and South America. *Momordica charantia* is often called Bitter melon, Ampalaya, Balsam pear and Karela (Walters and Decker-Walters, 1988; Shan et al., 2012) belongs to Cucurbitaceae family, which comprises of 130 genera and 900 species (Jeffrey, 1980). Apart from *Momordica dioica* wild species, all are monoecious

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

(Shrivastava, 1990). Male flower (staminate) blooms first followed by female flowers (Pistillate) in the ratio of 19:1 (Deyto and Cervancia, 2009) or 25:1 (Palada and Chang, 2003). Staminate flowers were bright yellow, solitary, perfect, actinomorphic, anthers are bell-shaped and sweetly scented at the time of anthesis. Pistillate flowers were confessed by the presence of an ovary that resembles the small fruit, a stronger scent than a staminate flower. The bright yellow color flower fascinates the pollinators

Cucurbit flowers were widely visited by insect pollinators like bees, butterflies, wasps, flies, beetles and bugs. Bees are the most reliable and exploited pollinators in bitter gourd. Bee pollinators observed in the bitter gourd cropping system were *Apis cerana indica* Fabricius, *Tetragonula iridipennis* Smith, *Apis mellifera* Linnaeus, *Apis florea* Fabricius, and *Apis dorsata* Fabricius. The most abundant non-apis pollinators were *Halictus* sp., *Xylocopa violacea* Linnaeus, *Amegilla cingulate* Fabricius, *Episyrrhus balteatus* De Geer, *Aulacophora* sp., and *Eristalinus tabanoides* Jaenicke observed (Yogapriya *et al.*, 2019). Present study was conducted to study the floral character of bitter gourd and to record the ecology and abundance of native pollinators in bitter gourd cropping system.

MATERIALS AND METHODS

Field research was conducted at Telugupalayam area of Coimbatore district, to study the bitter gourd floral character, pollen viability and diversity of pollinators

Floral character studies: The following floral characters were studied in both the field and laboratory condition (Fig. 1).

Stigma receptivity

Yellowish-green stigma with shining stigmatic exudation was a symbol of receptivity. The stigmatic surface of 4day aged flower, (totally 10 flowers/day) were visually inspected with a hand lens and observations recorded. Dull and dark brown colour stigma was considered as non-receptive.

Pollen viability-Preparation

Two percent acetocarmine solution was prepared by dissolving 2g of carmine powder in 95ml of Glacial acetic acid and volume make up to 100 ml by adding

distilled water. The solution was boiled, cooled, and filtered. Two to three drops of stain were placed on the centre of the slide and pollen grains were dusted and covered with coverslip and kept for 5 to 10 minutes (Fig. 3) and observed under stereo zoom leica microscope. Deeply stained were viable pollen and inadequately stained or unstained were considered as non-viable pollen.

Foraging ecology of pollinators

The foraging activity of pollinators was observed in 10 randomly selected plants. In each selected plants three flowers were tagged and observations documented.

Initiation and cessation time of foraging

Initiation and cessation time of foraging activity of bee pollinators were recorded on selected flowers and the total working hours of pollinators were calculated for 10 days daily during the peak flowering period and mean was worked out.

Flower handling time

The time spent by individual bee pollinators/ flower/ minute on both male and female flowers for collection of rewards *viz.*, pollen and nectar were recorded by means of a stopwatch. Four observations were recorded at randomly selected day during the peak flowering period.

Foraging modes of pollinators and flower visitors

Foraging activity of bees and flower visitors on flowers for nectar and pollen gathering was observed. The body contact of the pollinators with anther or stigma was documented as a top worker and side worker.

Top worker: Pollinators land on the anther of a flower and collect the pollen grains with the help of their foraging legs and body hairs.

Side worker: Pollinators stand on the petal with their meso and metathoracic legs and push their tongue towards nectarines to sip the nectar. Individuals of each species visiting bitter gourd flower and their modes of foraging were recorded based on:

1. Top worker/side worker
2. Nectar collector or pollen gatherer
3. Both nectar and pollen gatherer.



1a. Male flower



2b. Female flower



1c. Anther



1d. Stigma

Figure 1. Floral character of bitter gourd

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Receptive stigma - Yellowish-green
Stigma with shining stigmatic exudation

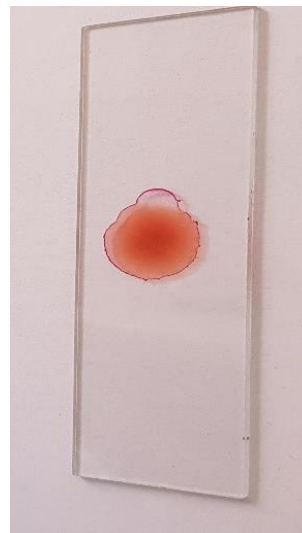


Non receptive stigma- Dark brown colour stigma

Figure 2. Stigma receptivity Test



3a. Preparation of 2% acetocarmine



3b. Drops of stain on glass slide dusted with pollen grains

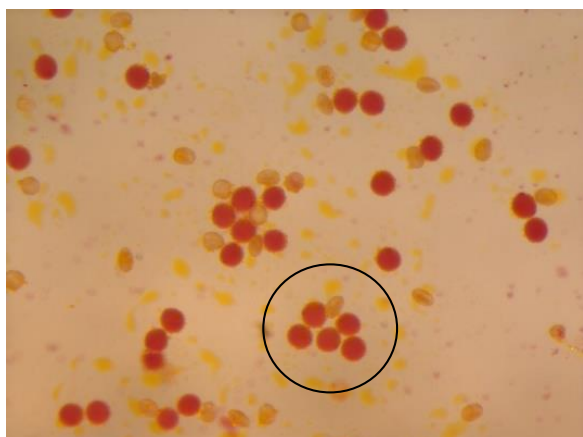
Figure 3. Preparation of acetocarmine for pollen viability test

Table 1. Initiation, cessation period and flower handling time of *A. cerana indica* and *T. iridipennis* in bitter gourd flowers.

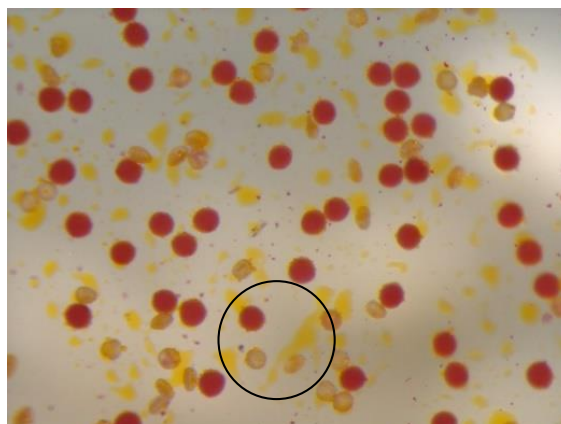
Species	Flower handling time*(sec)		Foraging time	
	Nectar	Pollen	Initiation	Cessation
<i>A. cerana indica</i>	3.56±1.05	8.62±1.47	0600 h	1700 h
<i>T. iridipennis</i>	26.14±4.5	31.1±2.70	0630 h	1700 h

Mean of 10 days observation, * time spent by a forager/ flower

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Deeply stained – viable pollen



Unstained – non-viable pollen

Figure 4. Pollen viability Test

Table 2. Pollinators in bitter melon crop and their foraging modes

Pollinators	Family	Role		Foraging mode
		Nectar	Pollen	
Hymenoptera				
<i>Apis dorsata</i>	Apidae	+	+	Top & Side worker
<i>Apis cerana indica</i>	Apidae	+	+	Top & Side worker
<i>Apis florea</i>	Apidae	+	+	Top & Side worker
<i>Tetragonula iridipennis</i>	Apidae	+	+	Top & Side worker
<i>Amegilla cingulate</i>	Apidae	+	+	Top & Side worker
<i>Nomia melandari</i>	Apidae	+	+	Top & Side worker
<i>Halictus sp.</i>	Halictidae	+	+	Top & Side worker
Diptera				
<i>Syrphus ribesii</i>	Syrphidae	-	+	Top worker
<i>Eristalinus tabanoides</i>	Syrphidae	-	+	Top worker
<i>Ischiodon scutellaris</i>	Syrphidae	-	+	Top worker
<i>Chrysomya sp.</i>	Calliphoridae	-	+	Top worker
Lepidoptera				
<i>Eurema hecabe</i>	Nymphalidae	+	-	Side worker
<i>Diaphania indica</i>	Pyrallidae	+	-	Side worker
<i>Pelopidas mathias</i>	Hesperiidae	+	-	Side worker
<i>Lampedes boeticus</i>	Lycaenidae	+	-	Side worker
Coleoptera				
<i>Aulacophora foveicollis</i>	Chrysomelidae	+	-	Side worker
<i>Henosepilachna vigintioctopunctata</i>	Coccinellidae	+	-	Side worker

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Apis cerana indica



Tetragonula iridipennis



Apis florea



Halictus sp

Figure 5. Foraging modes of bee pollinators, (Top workers)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Other flower visitors: Pollen gatherers



Amegilla cingulate (Side workers)



Nomia melandari



Apis cerana indica



Tetragonula iridipennis

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Apis florea



Halictus sp



Eristalinus tabanoides



Ischiodon scutellaris

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Chrysomya sp.



Aulacophora sp.



Henosepilachna vigintipunctata

RESULTS

Study on bitter melon floral character

a) Stigma receptivity

Female flowers exhibited that the yellowish-green stigma with shining stigmatic exudation facilitates the adhering of pollens as soon as the stigma becomes receptive which preceding for 24 h after anthesis (Fig.2).

b) Pollen viability

Pollen viability test conducted with 2% acetocarmine solution to distinguish the viable and non-viable pollen grains. The observation specified that viable pollen was deeply stained (Fig. 3), whereas non-viable pollen grains remained unstained or weakly stained. Pollen collected during morning hours 06:00 h were more viable than pollen collected in evening hours (17:00 h) (Fig. 4).

Foraging ecology of major pollinator in bitter melon.

Initiation and cessation time of foraging activity

The observation on the foraging period and flower handling are given in (Table 1). *A. cerana indica* and *T. iridipennis* are the most abundant pollinators in bitter melon. The foraging activity of *A. cerana indica* and *T. iridipennis* instigates at 06:00 h and 06:30 h of the day, and the foraging activity was totally stopped by evening 17:00 h.

The flower handling time of *A. cerana indica* and *T. iridipennis* depend on the type of floral rewards, they collect. Generally, bees spent more time in pollen collection than for nectar. The workers of *T. iridipennis* spent more time in pollen collection (31.1

seconds/ flower) than for nectar collection (26.14 seconds/ flower). But *A. cerana indica* spent less time than *T. iridipennis* for pollen collection (8.62 seconds/ flower) and nectar collection (3.56 seconds/ flower).

Foraging modes of pollinators and flower visitors

A total of 17 pollinator species have been recorded in bitter melon crop raised in Telugupalyam village, Coimbatore district (Table 2). These pollinators encompassing 10 families belongs to four orders viz., Hymenoptera, Diptera, Lepidoptera and Coleoptera. Based on their flower handling behaviour they were grouped as Side worker (nectar gatherer), Top worker (pollen gatherer) and Top side worker (both nectar and pollen gatherers) (Fig. 5).

Among these 17 pollinators *Apis dorsata*, *A. cerana indica*, *A. florea*, *Tetragonula iridipennis*, *Amegilla cingulate*, *Nomia melandari* and *Halictus* sp. were found collecting both nectar and pollen. whereas *Syrphus ribesii*, *Eristalinus tabanoides*, *Ischiodon scutellaris*, *Chrysomya* sp. were involved in pollen gathering alone and *Eurema hecabe*, *Diaphania indica*, *Pelopidas mathias* and *Lampedes boeticus*, *Aulacophora foveicollis* and *Henosepilachna vigintioctopunctata* were found gathering nectar from bitter melon flowers.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

DISCUSSION

Study on bitter gourd floral character - Stigma receptivity and pollen viability test in bitter gourd flower

The stigma receptivity was confirmed during morning hours with yellowish-green stigma and shining stigmatic exudation favours attachment of pollen grains. Delaplane *et al.* (2000) also described that the stigma receptivity of cucurbits observed during the time of anthesis (06:00 h to 14:00 h) of the day.

The pollen viability of bitter gourd was maximum in pollen collected during morning hours (06:00 h) than pollen collected in evening hours (17:00 h). Correspondingly, Nepi and Pacini (1993) recorded that pollen viability was higher in newly opened flower at 07:00h (92%) and very low (10%) during 12:00 h of the day.

Foraging ecology of *A. cerana indica* and *T. iridipennis* - Initiation and cessation time of foraging

The foraging activity of *A. cerana indica* and *T. iridipennis* in bitter gourd flowers started at 06:00 h and 06:30 h respectively and found declining from 12:30h and completely terminated by 17:00 h (Table 1). Peak activity of bees in morning hours might be due to the anthesis time of the bitter gourd flowers which commenced by 05:30h. The opened flower starts drying at 12:30 h and by evening anthers dried at 17:00 h and flowers partly curled and fell off. The findings are in accord with the results of Deyto and Cervancia (2009) who have reported that foraging activity of *A. cerana indica* and *T. iridipennis* starts at 0600h and 06:30 h respectively. In the same way, they recorded maximum foraging activity of *A. cerana indica* and *T. iridipennis* at 06:00 – 08:00 h and lasted upto 16:00 h in bitter gourd. Vijayan *et al.* (2018) and Lintu *et al.* (2020) also opined similar views that the foraging activity of *T. iridipennis* starts after anthesis of flowers by 07:50 h.

Bees spent more time in pollen collection than nectar foraging in bitter gourd. The nature and size of pollen grains of bitter gourd are suitable for insect foraging.

Foraging modes of pollinators and flower visitors

The bitter gourd flowers were recurrently visited by 17 pollinators during the study period and they were regarded as, based on their mode of foraging *viz.*, nectar gatherer, pollen gatherer and both pollen and

nectar gatherers (Table 2). These results are in agreement with the discoveries of Yogapriya *et al.* (2019) who has reported 11 species of pollinators in bitter gourd. Among them *A. cerana indica*, *A. dorsata*, *A. florea*, *T. iridipennis*, *Amegilla zonata*, *Xylocopa violacea*, *Halictus* sp. were nectar and pollen foragers. *Syrphus ribesii*, *Danaus chrysippus*, *Tirumala limniace* and *Aulacophora* sp. were nectar foragers.

Similarly, Bisui and Layek (2020) listed 21 species of flower visitors in bitter gourd flower found to collect both flower rewards and they belongs to four orders *viz.*, Hymenopteran, Diptera, Lepidoptera and Coleoptera. Balina *et al.* (2012) also observed that the peak activity of pollen foragers starts from 08:00 to 10:00h, higher population of *Halictus* sp. (21 bees) at 08:00 – 10:00 h followed by *A. dorsata* (16 bees) at 06:00 – 08:00 h and *Megachile* sp. (14 bees) at 08:00 – 10:00 h. The activity of nectar foraging was maximum in *Halictus* sp. was (9 bees) at 10:00 – 12:00 h and minimum in *A. dorsata* and *Megachile* sp. was (8 bees) at 10:00 – 12:00 h.

Conclusion

Monoecious nature of bitter gourd crop results in discrepancy yield. To overcome the issue of lower yield in bitter gourd our present research exposed that among 17 pollinators identified in bitter gourd cropping system *A. cerana indica* and *T. iridipennis* were the most active pollinators in bitter gourd. Hence, this research will help beekeepers in managing controlled bee pollinators in the ecosystem of bitter gourds, increasing crop yield and honey production.

Acknowledgement: I would especially like to thank my chairman, Dr. P.A. Saravanan, and the other authors for their assistance in helping me finish my research that is part of MS thesis.

Contribution of authors: P A Saravanan and K M Narmadha planned, designed the work. G Umopathy and M Velmurugan helped in field layout preparation and yield analysis. K M Narmadha did field work, data collection and wrote the manuscript. P A Saravanan analyzed the collected data and edited it. All co-authors have read and approved the final manuscript.

Declaration of conflict of interest: Authors have no conflict of interest to declare and all the co-authors have accepted the content.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Data availability: Data available on request from the authors.

Ethical issue: The research on honey bees have no ethical issues.

Source of finance for the study: Not applicable because there is no funding source for this study.

REFERENCES

- Balina, PK, Sharma SK, Rana MK. Diversity, abundance and pollination efficiency of native bee pollinators of bitter gourd (*Momordica charantia* L.) in India. Journal of Apicultural Research, 2012;51(3):227-231. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.51.3.02>
- Bisui, S, Layek U. Utilization of Indian dammar bee (*Tetragonula iridipennis* Smith) as a pollinator of bitter gourd. Acta Agrobotanica 2020;73 (1). <http://dx.doi.org/10.5586/aa.7316>
- Delaplane, KS, Mayer DR, Mayer DF. Crop pollination by bees: Cabi, 2000
- Deyto, RC, Cervancia CR. Floral biology and pollination of Ampalaya (*Momordica charantia* L.). Philippine Agricultural Scientist, 2009;92 (1):8-18
- Jeffrey, C. A review of the Cucurbitaceae. Botanical Journal of the Linnean Society, 1980;81 (3):233-247. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1095-8339.1980.tb01676.x>
- Lintu, Amirtha, Paul. Foraging behaviour of *Tetragonula iridipennis* (smith) in cucumber under protected cultivation. International Journal of Agriculture Sciences, 2020;18 (12)
- Nepi, M, Pacini E. Pollination, pollen viability and pistil receptivity in *Cucurbita pepo*. Annals of Botany, 1993;72(6):527-536. <https://doi.org/10.1006/anbo.1993.1141>
- Palada, M, Chang L. Suggested cultural practices for bitter gourd." Bangkok: The World Vegetable Centre (AVRDC). 2003, Available online at: <http://avrdc.org/LC/cucurbits/bittergourd.pdf>
- Shan, B, Xie J-H, Zhu J-H, Peng Y. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of flavonoids from *Momordica charantia* L. and its antioxidant activity. Food and Bioprocess Processing 2012;90 (3):579-587
- Shrivastava, U. Insect pollination in some cucurbits." VI International Symposium on Pollination 288
- Megha V, M, Saravanan PA, Srinivasan MR. 2018. "Effect of Season and Timings on the Foraging Behaviour of Stingless Bee, *Tetragonula iridipennis* Smith (Hymenoptera: Apidae). Madras Agricultural Journal, 1990;105(7-9):286-290. <http://dx.doi.org/10.29321/MAJ.2018.000147>
- Vijayakumar R, Behera TK, Munshi AD, Kumar D, Jat GS, Boopala KG, Neetu S. Pollen viability and *in vitro* pollen germination studies in *Momordica* species and their intra and interspecific hybrids. International Journal of Chemical Studies, 2018;6 (6): 32-40
- Walters, TW, Decker-Walters DS. Balsam-pear (*Momordica charantia*, Cucurbitaceae). Economic Botany, 1988;42 (2):286-288
- Yogapriya, A, Usharani B, Suresh K, Vellaikumar S, Chinniah C. Foraging Behaviour of Major Pollinators in Bitter Gourd. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2019a;8(6):947-954. <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2019.806.114>
- Yogapriya, A, Usharani B, Suresh K, Vellaikumar S, Chinniah C. Diversity of floral visitors in bitter gourd in Madurai district, Tamil Nadu."Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 2019b;81(4):805-810. <http://dx.doi.org/10.5958/0974-8172.2019.00165.2>

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

COMPARISON OF HONEY, POLLEN AND PROPOLIS AMOUNTS AND HONEY QUALITY OBTAINED FROM BEE PASTURE AND HIGHLAND

Arı Merası ve Yayladan Elde Edilen Bal, Polen ve Propolis Miktarları ile Bal Kalitesinin Karşılaştırılması

Erdal ÇAÇAN^{1*}, Mehmet Ali KUTLU¹, Rıdvan UÇAR², Selim ÖZDEMİR¹, Kağan KÖKTEN³, Sam MOKHTARZADEH⁴, Muammer EKMEKÇİ⁵

¹Department of Crop and Animal Production, Vocational School of Food, Agriculture and Livestock, Bingöl University, Bingöl, TÜRKİYE, Yazışma Yazarı / Corresponding author E-posta: ecaçan@bingol.edu.tr, ORCID No: 0000-0002-9469-2495, E-posta: makutlu@bingol.edu.tr, ORCID No: 0000-0003-0862-9690, E-posta: sozdemir@bingol.edu.tr, ORCID No: 0000-0003-1840-9907

²Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Pamukkale University, Denizli, TÜRKİYE, E-posta: rucar@pau.edu.tr, ORCID No: 0000-0001-6365-7200

³Department of Plant Production and Technologies, Faculty of Agricultural Sciences and Technology, Sivas University of Science and Technology, Sivas, TÜRKİYE, E-posta: kkokten@bingol.edu.tr, ORCID No: 0000-0001-5403-5629

⁴Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Düzce University, Düzce, TÜRKİYE, E-posta: sam.mokhtarzadeh@gmail.com, ORCID No: 0000-0002-3927-0855

⁵Agricultural Application and Research Center, Bingöl University, Bingöl, TÜRKİYE, E-posta: mekmekci@bingol.edu.tr, ORCID No: 0000-0002-0610-8552

Geliş Tarihi / Received:16.08.2023

Kabul Tarihi / Accepted: 07.10.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1344339

ABSTRACT

This study was carried out to determine the honey, pollen and propolis amounts and honey qualities obtained from the bee pasture established in Bingöl University between the years 2021-2022 and highland and to compare the bee pasture and the highland in terms of these characteristics. 10 beehives were used in the study. Five beehives were left in the bee pasture, and 5 of them were taken to the highland for comparison. The quantities of honey, pollen, and propolis per hive and the moisture, diastase, HMF, commercial glucose, C13 sugar, C4 sugar, and the difference between raw protein in honey and delta C13 sugar of honeys were determined for both locations. These quality parameters obtained were evaluated according to the Turkish Food Codex Honey Communiqué. As a result of the research, it was determined that there was no statistical difference between the amounts of pollen and propolis obtained from the bee pasture and the highland, and the amount of honey obtained from the highland was higher than the bee pasture. In addition, it has been determined that the honey obtained from both bee pasture and highland is at the "appropriate" level in terms of the limit values determined by the Turkish Food Codex Honey Communiqué in terms of quality criteria. In the light of these data, it has been understood that although the honey yield from bee pasture is low, it is sustainable and can be an alternative to migratory or highland beekeeping.

Keywords: Bee pasture, Honey yield, Honey quality, Settled beekeeping, Migratory beekeeping

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ÖZ

Bingöl Üniversitesi bünyesinde 2021-2022 yılları arasında kurulan arı merası ile yayladan elde edilen bal, polen ve propolis miktarları ile bal kalitesinin belirlenmesi ve bu özellikler açısından arı merası ile yaylanın karşılaştırılması amacıyla bu çalışma yürütülmüştür. Araştırmada 10 adet arı kovani kullanılmıştır. Arı kovanlarından 5 tanesi arı merasında bırakılmış, beş tanesi de karşılaştırma yapmak amacıyla yaylaya çıkarılmıştır. Her iki lokasyona ait kovan başına bal, polen ve propolis miktarları elde edilmiş ve yine her iki lokasyona ait balların nem, diastaz, HMF, ticari glikoz, C13 şekeri, C4 şekeri ve balda protein ile ham bal delta C13 şekeri arasındaki fark tespit edilmiştir. Elde edilen bu kalite parametreleri Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre değerlendirilmiştir. Araştırma sonucunda arı merası ve yayladan elde edilen polen ve propolis miktarları arasında istatistiksel bir fark olmadığı, yayladan elde edilen bal miktarının arı merasından daha yüksek olduğu ve yine hem arı merası hem de yayladan elde edilen balların kalite kriterleri açısından Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nin belirlediği sınır değerler açısından "uygun" seviyede oldukları belirlenmiştir. Bu veriler ışığında arı merasından elde edilen bal veriminin düşük olmasına rağmen sürdürülebilir olduğu ve yayla arıcılığına ya da gezginci arıcılığa alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Arı merası, Bal verimi, Bal kalitesi, Sabit arıcılık, Gezginci arıcılık

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Araştırmada gezginci arıcılık ile sabit arıcılıktan elde edilen bal, polen ve propolis miktarları ile bal kalitesinin belirlenmesi ve bu özellikler açısından gerek arı merasının gerekse de yaylanın karşılaştırılması amacıyla bu çalışma yürütülmüştür.

Gereç-Yöntem: Araştırma Bingöl Üniversitesi bünyesinde 2021-2022 yılları arasında kurulan arı merasında ve Bingöl il merkezi sınırları içerisinde yer alan Hasarek dağında (yayla) yürütülmüştür. Araştırmada 10 adet Langstroth tipi ahşap arı kovani kullanılmıştır. Kolonilerin ana arıları Anadolu ekotipi ana arıları ile değiştirilmiştir. 2021 ve 2022 yıllarında bu arı kovanlarından 5 tanesi arı merasında bırakılmış, beş tanesi de karşılaştırma yapmak amacıyla Haziran ayının ilk haftasında yaylaya çıkarılmıştır. Her iki lokasyonda ve her iki yılda da ağustos ayında bal hasadı yapılmıştır. Yayladan ve arı merasından elde edilen bal miktarları kg, polen ve propolis miktarları ise g olarak tartılarak koloni başına ortalama bal, polen ve propolis verimleri elde edilmiştir. Ayrıca yayladan ve arı merasından elde edilen balların kalite özelliklerinden nem, diastaz, HMF (hidroksimetilfurfural), ticari glikoz, C13 ve C4 şekerleri ile balda protein ve ham bal delta C13 şekeri arasındaki fark tespit edilmiştir.

Arı merasında elde edilen balların kalitesini belirlemeye yönelik bu analizler, Bingöl Üniversitesi Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapılmıştır. HMF analizi için IHC (Ch. 5.1), diastaz sayısı için TS 3036, nem içeriği için TS

13365, ticari glikoz için TS 3036, C13 ve C4 şekerleri ile balda protein ve ham bal delta C13 şekeri arasındaki fark için ise AOAC 998.12 analiz yöntemleri esas alınarak sonuçlar elde edilmiştir. Arı merası ve yayladan alınan ballarda tespit edilen nem, diastaz, HMF, ticari glikoz, C13 ve C4 şeker içerikleri ile balda protein ve ham bal delta C13 şekeri arasındaki fark, Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'ne göre "uygun" seviyelerde olup, olmadığı değerlendirilmiştir. Yayladan ve arı merasından elde edilen verilere varyans analiz uygulanmış ve aralarındaki fark 0.05 seviyesinde LSD testi ile karşılaştırılmıştır.

Bulgular ve Sonuç: Araştırma sonucunda arı merası ve yayladan elde edilen polen ve propolis miktarları arasında istatistiksel bir fark olmadığı, yayladan elde edilen bal miktarının arı merasından, 2022 yılında elde edilen bal miktarının ise 2021 yılına göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Bal verimi açısından yıllar arasında ortaya çıkan bu farklılığın, 2021 yılında yaşanan kuraklıktan ileri geldiği ön görülmektedir. Balın kalite kriterleri açısından ise sadece C13 şekerinin arı merası ve yayla ile yıllar arasında istatistiksel olarak bir farklılık gösterdiği, diğer parametrelerin ise istatistiksel bir farklılık göstermediği belirlenmiştir.

Hem arı merası hem de yayladan elde edilen balların kalite kriterleri açısından Türk Gıda Kodeksi Bal Tebliği'nin belirlediği sınır değerler açısından "uygun" seviyede oldukları belirlenmiştir. Elde edilen veriler ışığında arı merasından elde edilen bal veriminin düşük olmasına rağmen sürdürülebilir

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

olduğu ve yayla arıcılığına ya da gezginci arıcılığa alternatif olabileceği sonucuna varılmıştır.

INTRODUCTION

As in many parts of the world, beekeeping has been practiced in Bingöl province of Türkiye for thousands of years. Bingöl province has a rich plant species diversity (Iranian-Turanian flora) due to its geographical location and creates a suitable potential for beekeeping (Sandal and Kan, 2013).

Beekeeping activities in Bingöl and its surroundings are generally carried out in the form of migratory beekeeping. In order not to be affected by colony losses, beekeepers overwinter their bees in Çukurova and similar places, and they come back to Bingöl and its surroundings at the end of April and the beginning of May. Beekeepers who spend the month of May in and around Bingöl take their beehives to the highlands in early June, before the main nectar flow, and they harvest honey in August. In general, beekeeping activities in the region are shaped on this method. This structure makes it impossible to do beekeeping for hobby purposes, to carry out beekeeping activities that will provide a livelihood in the rural area where the producer lives, or to engage in beekeeping activities for women entrepreneurs who are disadvantaged in the region. Because people in this situation do not have the opportunity to spend the winter in the Çukurova region, the spring in Bingöl and its surroundings, and the summer in the highlands.

In a study carried out in Bingöl, it was reported that 84% of beekeeping activities are carried out by migratory and 16% are settled and 78% of beekeepers engaged in migratory beekeeping activities have accommodation problems (Söğüt et al. 2019). Therefore, when a solution is sought for the problems of beekeepers in the region, it comes to the fore that priority should be given to finding solutions to problems directly related to accommodation or creating alternatives to migratory beekeeping. It is also obvious that migratory beekeeping is much more costly than settled beekeeping, as beekeepers have to stay in multiple places throughout the year and eventually migrate. In order to offer a solution to these problems, a bee pasture was established in Bingöl University research area between 2019-2022 (Project No: PİKOM-Bitki.2019.001) and an example of settled beekeeping activities was created as an alternative

to migratory beekeeping. Within the scope of this study, bee products obtained from this bee pasture were compared with bee products obtained from migratory beekeeping.

According to 2022 statistics, there were 95.386 beekeeping enterprises in Turkey, and they produce 118.297 tons of honey annually with 8.984.676 hives. In the province of Bingöl, there were 1.033 beekeeping enterprises, and these enterprises produce 161.009 hives and 1.488 tons of honey annually (TUIK 2023). In the light of this information, when the amount of honey obtained was divided by the number of hives, it turns out that the honey yield per hive in Turkey was 13.16 kg, and the honey yield per hive in Bingöl was 9.24 kg. In a study conducted in Bingöl province, 87 beekeeping enterprises were handled, and it was reported that the average honey yield of the enterprises was 11.1 kg/colony (Söğüt et al. 2019).

It is seen that pH, moisture, acidity, HMF, diastase, proline, glucose, commercial glucose, fructose, sucrose, fructose/glucose, fructose + glucose, C4 sugar, protein in honey and "difference between raw honey delta C13 values" are considered as quality criteria of honey obtained in Türkiye (Çetin et al. 2011; Kutlu and Bengü, 2015; Karahan Yılmaz and Eskici, 2017; Bengü and Kutlu, 2018; Çiftçi and Parlat, 2018; Yaşar and Söğütlü, 2020; Gültekin Özgüven et al. 2020).

These previous studies generally focused on determining the quality characteristics of honey obtained from certain regions or organizations. The difference of current study from the other studies is that it presents a comparison between honey, pollen, propolis quantities and honey quality characteristics obtained from the traditional migratory beekeeping (highland beekeeping) in the region and honey, pollen, propolis quantities and honey quality characteristics obtained from bee pasture which is an alternative to migratory beekeeping.

In the light of this information, the aim of this study is to determine the honey, pollen and propolis yields and quality characteristics of honey obtained from bee pastures and highland and to compare migratory beekeeping and settled beekeeping in terms of these characteristics.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

MATERIALS AND METHODS

Materials

The research was carried out in the bee pasture (38°, 48', 46" N, 40°, 32', 26" E and 1078 meters altitude) located in the Bingöl University Agricultural Research and Application Center, and the highland area of the province of Bingöl, the Hasarek ski resort (38°, 53', 21" N, 40°, 17', 13" E and 1911 meters altitude) in 2021 and 2022.

The bee pasture consists of 10 decares and rapeseed, Hungarian vetch, sainfoin, thyme, basil, white clover, sage, buckwheat and lavender were sown and planted in the pasture area during the year. Rapeseed and Hungarian vetch were grown without irrigation and other plants were grown with irrigation conditions. When selecting the plants used in the bee pasture, care was taken to select species adapted to the region and to ensure a continuous flowering environment in the pasture from April to October. In addition, it was ensured that the plants were species that could be utilized after the flowering stage. For example, the residues of rapeseed, sainfoin and Hungarian vetch after flowering can be used as fodder plants, while other species can be used as medicinal and aromatic plants. In the research, 10 Langstroth type wooden beehives were used as material. The queen bees of the colonies were replaced with the Anatolian ecotype queens and the maintenance, control and fight against diseases/pests of the colonies were carried out periodically.

In the province of Bingöl, where the research was conducted, the annual average temperature value for many years is 12.3 °C. In January and February, the average temperature is below zero, and July and August are the hottest months. The average temperature was recorded as 14.2 °C in 2021 and 13.4 °C in 2022, when the research was conducted. The average annual total precipitation of Bingöl province for many years is 932 mm. The most precipitation is received during the winter months. July and August are the months with the least rainfall. The average precipitation amount was recorded as 668 mm in 2021 and 830 mm in 2022, when the research was conducted. It has been recorded that 2021 and 2022 are hotter and drier than the long-term average (MGM 2023).

Methods

Ten beehives were used in the study. In 2021 and 2022, five beehives were left in the bee pasture and five of them were taken to the highland in the first week of June in order to make comparisons. In both locations, honey harvest was done on 06.08.2021 in 2021 and on 15.08.2022 in 2022. The average honey yield per colony was determined by weighing the amount of honey obtained from the highland and bee pastures in kg. Pollen traps attached to the front of the hive were used to obtain pollen. Pollens obtained daily were stored on the hive basis and weighed. Propolis production was obtained with the help of a propolis grid attached to the colonies. Propolis production continued until October. In the last week of October, the propolis in the propolis grids were kept in the deep freezer for 12 hours, a large part of the plastic grid was bent, the remaining small part was excavated, and the colony yield was calculated by weighing.

The difference between moisture, diastase, HMF (hydroxymethylfurfural), commercial glucose, C13 and C4 sugars, protein in honey and delta C13 sugar in raw honey was determined from the quality properties of honey obtained from highland and bee pastures. These parameters were also used by Bengü and Kutlu (2018) to determine the quality criteria of honey. Analyses to determine the quality of honey obtained from bee pasture and highland were done at Bingöl University Central Laboratory Application and Research Center. IHC (Ch. 5.1) for HMF analysis, TS 3036 for diastase number, TS 13365 for moisture content, TS 3036 for commercial glucose, AOAC 998.12 to determine the difference between C13 and C4 sugars in honey and protein in honey and delta C13 sugar in raw honey, analysis methods used and the results were obtained.

Moisture, diastase, HMF, commercial glucose, C13-C4 sugar contents and "the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugar" detected in honey from bee pasture and highland were evaluated according to the Turkish Food Codex Honey Communiqué. According to the Turkish Food Codex Honey Communiqué, the quality criteria that flower honeys should have are given in Table 1 (TGKBT, 2020).

Statistical Evaluation

Variance analysis was applied to the data obtained from the highland and bee pasture, and the difference between them was compared with the Student's t-test at the 0.05 level (JMP 2018).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 1. According to the Turkish Food Codex Honey Communique, the quality criteria that flower honey must have

HMF (mg kg ⁻¹)	Max. 40 mg kg ⁻¹
Moisture (%)	Max. %20
Diastasis (piece)	Min. 8 number
Commercial Glucose (%)	Negative (Shouldn't be)
C4 sugar (%)	Max. %7
C13 sugar (%)	-23 and more negative
Difference between protein in honey and delta C13 sugar in raw honey	-1.0 or more positive

RESULTS

Honey, pollen and propolis yields from bee pasture and highland

The amounts of honey, pollen and propolis taken from beehives in bee pasture and highland were given in Table 2. In 2021 and 2022, the amounts of honey, pollen and propolis obtained from bee

pasture and highland did not show a statistical difference. However, in terms of years, only the amount of honey obtained in 2022 was statistically higher than in 2021, and in terms of bee pasture/highland, only the amount of honey obtained from the highland was statistically higher than the amount of honey obtained from the bee pasture.

Table 2. Amounts of honey, pollen and propolis per hive taken from beehives left on bee-pasture and highland in 2021 and 2022

	2021		2022		Year Average		Pasture/Highland Average	
	Pasture	Highland	Pasture	Highland	2021	2022	Pasture	Highland
Honey (kg)	5.41±0.4	5.58±0.8	6.46±1.1	13.98±3.4	5.50±0.6 B**	10.22±4.6 A	5.94±0.9 B*	9.78±5.0 A
Pollen (g)	272±38.3	293±19.8	282±45.4	316±39.1	283±30.8	299±43.8	277±10.1	305±31.6
Propolis (g)	17.4±4.3	21.3±6.4	16.3±2.1	17.3±2.5	19.4±5.6	16.8±2.28	16.9±3.3	19.3±5.1

The averages shown with the same letter are not different from each other within the error limits of *: P≤0.05 **: P≤0.01 according to the Student's t-test.

In this study, an average of 5.50 kg honey, 283 g pollen and 19.4 g propolis were taken per hive in the first year, while an average of 10.22 kg honey, 299 g pollen and 16.8 g propolis were taken per hive in the second year. As an average of two years, 5.94 kg of honey, 277 g of pollen and 16.9 g of propolis were taken from the bee pasture on average per beehive, while an average of 9.78 kg of honey, 305 g of pollen and 19.3 g of propolis were taken from the beehives brought to the highland. It has been observed that the amount of honey taken in 2022 is statistically higher than the amount of honey obtained from the

highland compared to 2021, and the amount of honey obtained from the bee pasture (Table 2).

Quality characteristics of honey obtained from bee pasture and highland

The difference between the quality criteria of moisture, diastase, HMF, commercial glucose, C13 sugar, C4 sugar, protein in honey and delta C13 in raw honey, which are among the quality criteria of honey taken from beehives in bee pasture and highland in the years 2021 and 2022, were given in

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 3. As seen in Table 3, it is evident that the “the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugar” content obtained from the bee pasture in 2022 is statistically higher than that in the highland. Regarding the years, it can be observed that the HMF content obtained in 2021 was higher

than that in 2022, while the C13 sugar content was statistically lower. In terms of bee pasture/highland, it is noticeable that the C13 sugar content obtained from the highland was statistically higher than that obtained from the bee pasture.

Table 3. The difference between moisture, diastase, HMF, commercial glucose, C13 sugar, C4 sugar and protein in honey and delta C13 sugar in raw honey detected in honey obtained from bee pasture and highland in 2021 and 2022

	2021		2022		Year Average		Pasture/Highland Average	
	Pasture	Highland	Pasture	Highland	2021	2022	Pasture	Highland
Moisture (%)	15.0±1.2	15.4±1.0	15.5±0.6	14.8±0.6	15.2±1.0	15.2±0.7	15.3±0.9	15.1±0.8
Diastase (Number)	18.2±6.5	18.3±4.0	23.5±11.4	24.6±4.3	18.3±5.1	24.1±8.1	20.9±9.2	21.5±5.1
HMF (mg kg⁻¹)	7.48±6.1	10.46±7.7	4.14±3.3	3.03±2.0	8.97±6.7 A*	3.59±2.6 B	5.81±4.9	6.75±6.6
Commercial Glucose (%)	-	-	-	-	-	-	-	-
Raw Honey Δ13C	-26.0±0.4	-25.7±0.4	-26.5±0.2	-26.1±0.2	-25.8±0.4 B*	-26.3±0.3 A	-26.3±0.4 B*	-25.9±0.3 A
C4 (%)	2.48±2.6	2.29±3.4	0.00±0.0	1.70±1.5	2.39±2.8	0.85±1.3	1.24±2.1	2.00±2.5
Δ13C Differ.	-0.28±0.6	-0.13±0.8	0.82±0.6 A*	-0.19±0.4 B	-0.21±0.6	0.32±0.7	0.27±0.8	-0.16±0.6

The averages shown with the same letter are not different from each other within the error limits of *: P≤0.05 according to the Student's t-test.

In this study, an average of 15.2% of moisture, 18.3 of diastase, 8.97 mg kg⁻¹ of HMF, negative of commercial glucose, -25.8 of C13 sugar, 2.39% of C4 sugar and -0.21 of the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugars were taken per hive in the first year, while an average of 15.2% of moisture, 24.1 of diastase, 3.59 mg kg⁻¹ of HMF, negative of commercial glucose, -26.3 of C13 sugar, 0.85% of C4 sugar and 0.32 of the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugars were taken per hive in the second year. As an average of two years, 15.3% of moisture, 20.9 diastase, 5.81 mg kg⁻¹ of HMF, negative of commercial glucose, -26.3 of C13 sugar, 1.24% of C4 sugar and 0.27 of the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugars were taken from the bee pasture on average per beehive, while an average of 15.1% of moisture, 21.5 of diastase, 6.75 mg kg⁻¹ of HMF, negative of commercial glucose, -25.9 of C13 sugar, 2.00% of C4 sugar and -0.16 of the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugars were

taken from the beehives brought to the highland. It has been observed that the amount of “the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugar” taken in 2022 was statistically higher than the amount of “the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugar” obtained from the highland compared to 2021, and the amount of “the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugar” obtained from the bee pasture (Table 3).

DISCUSSION

In general, it is seen that the average amounts of honey, pollen and propolis taken from both the bee pastures and the highland in the first year are close to each other. However, it was observed that the amounts of honey, pollen and propolis taken from the bee pasture in the second year were lower than the amounts obtained from the highland. It is seen that the amount of honey taken from the highland in the second year is about twice the amount of honey

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

taken from the pasture. In the first year, drought was experienced in the whole region due to insufficient rainfall. The effect of this drought was felt both in the bee pastures and in the highlands. For this reason, it has been observed that the honey yields obtained from both bee pastures and highland in the first year are close to each other and low. In the second year, the highland showed its potential and thus higher honey amounts were obtained compared to bee pastures. Pollen yield was also lower than expected. The drought experienced throughout the country in 2021 caused the bees to not be able to carry enough nectar and pollen to the colonies as a result of affecting the plants that are the food source. As in other beekeeping products, pollen production was below the expected level.

Pollen is the male reproductive unit of plants and is used to develop offspring in the colony. It contains protein, fat, minerals, vitamins and sugars. Pollen is a nutrient for the protein need of the bee, and it is used as a feeding tool with honey in the 3-6 days period of the larva, as well as the nutrient that the worker bees consume with honey to ensure muscle development until the 18th day after they emerge from the cells in the honeycombs (Korkmaz 2013). Propolis is an important bee product. Bees use propolis for closing holes and cracks in hives, repairing frames, colony defense, narrowing the hive entrance, covering the colony pests that enter the hive but cannot be thrown out by bees, disinfection of honeycomb cells which are the brood production area, and bees carry an average of 10 mg of propolis to hive each time and propolis yield per colony varies between 50-250 g (Kumova et al. 2002).

Nicodemo et al. (2014) reported that the annual propolis yield per hive varied between 300 g and 1450 g, Bankova et al. (1982) and Tutkun (2000) reported that propolis yield varied between 10 g and 300 g per hive, depending on the breeds. Similarly, Kutluca et al. (2008) reported that propolis yield varied between 10-300 g on average and pollen yield varied between 219-236 g/colony in a study.

Similar to this study; Kekeçoğlu et al. (2014) reported average honey yield per colony in Düzce province between 2010 and 2011 as 7.79-8.83 kg, Emir and Ceyhan (2016) reported average honey yield per hive in Turkey as 19.8 kg, pollen yield as 1.13 kg and propolis yield as 0.16 kg, Onuç et al. (2019) determined the average honey yield per hive as 19.27 kg, pollen yield as 135 g and propolis yield as 5.71 g in İzmir province, Kutlu (2019) determined the

average honey yield per hive as 10.4 kg in Şırnak province. Aktürk and Aydın (2019) reported that 1895 kg of honey, 64 kg of pollen and 2.14 kg of propolis were produced on average in Çanakkale province and honey yield per hive was 16.2 kg. Yıldız et al. (2022) determined the average honey yield per hive as 14.97 kg in Yozgat province and reported that other beekeeping products such as pollen and propolis are not produced enough to be commercially evaluated or recorded.

Although Turkey is among the leading countries in terms of the number of beehives and honey production, it is behind in terms of other beekeeping products such as pollen, propolis, bee venom and royal jelly (Kutlu 2019). It is seen that the amounts of pollen and propolis obtained in low amounts in our country, both from bee pastures and from the highland, are even lower when compared to other studies. Yavuz (2011) stated that factors such as climatic conditions, bee species and breed, plant source, and production and marketing are the factors affecting propolis production. Propolis yield increases or decreases in line with the suitability of these factors.

The importance of moisture content in honey is a quality criterion. High humidity causes the honey to ferment and shorten its shelf life. At the same time, high humidity gives an idea that honey is harvested before it matures in the comb, that is, early. The low humidity causes the honey to crystallize and a granular structure to form in the honey (Kaplan 2014). According to the Turkish Food Codex Honey Communique, the moisture content of honey is required to be at most 20%. In the first and second years of the study, the humidity rate was 15.2%, the moisture content of honey obtained from bee pastures was 15.3%, the moisture content of honey obtained from the highland was 15.1%, and the average moisture content of honey in general in the research was 15.2%. It is seen that the results regarding the humidity obtained from both the bee pastures and the highland are within the limit values determined by the Turkish Food Codex Honey Communique (Table 1, Table 3).

Previous studies determined that moisture content of flower honey offered for consumption in Turkey was 14.8%-21.6 (Çetin et al. 2011), moisture content of honeys from Eastern Anatolia and Eastern Black Sea Regions was 14.01-17.12% (Batu et al. 2013), moisture content of honey produced in Gaziantep was % 13.0-20.4 (Kutlu and Bengü 2015), moisture

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

content of honey produced in Erzincan province was 16.9-21.4% (Karahana Yılmaz and Eskici 2017), moisture content of honey from five different companies sold in markets in Konya region was 15.48-17.63% (Çiftçi and Parlat 2018), average moisture content of honey produced in Bingöl was 15.39% (Bengü and Kutlu 2018), moisture content of honey produced in Muğla was 14.6-20.9% (Belli 2019), moisture content of some honeys collected from 12 different regions was 16.4%-19.9% (Gültekin Özgüven et al. 2020), moisture content of honeys from Iğdır region was 13.55-16.75% (Yurt and Çakır 2020), moisture content of honeys from Çorum region was 14.5%-21.7% (Guzel and Bahçeçi 2020) and moisture content of honeys from Tokat region was between 13.0%-20.0% (Kara et al. 2022). It is understood that the results obtained from these previous studies are compatible with the current study findings and some of them were slightly above the limit values determined by the Turkish Food Codex Honey Communique.

Diastase is a natural enzyme found in honey. Diastase gives an idea about whether the honey is fresh or not. It is a parameter that helps to determine whether the honey is exposed to heat until it is packaged and reaches the consumer (Çiftçi 2014). According to the Turkish Food Codex Honey Communique, the number of diastases in honey should be at least 8. Diastase numbers were obtained as 18.3 in the first year of the study, 24.1 in the second year, 20.9 in bee pasture honeys, 21.5 in highland honeys and 21.2 in honeys as the general average of the research. It was determined that the results regarding the diastase numbers obtained from both bee pasture and highland were at an appropriate level according to the Turkish Food Codex Honey Communique (Table 1, Table 3).

Looking at the previous studies; diastase number of flower honeys offered for consumption in Turkey was 1.0-20.0 (Çetin et al. 2011), diastase number of honeys from Eastern Anatolia and Eastern Black Sea Regions was 8.30-17.9 (Batu et al. 2013), diastase number of honeys produced in Gaziantep was 2.5-38.5 (Kutlu and Bengü 2015), diastase numbers of honey produced in Erzincan province were 4.5-19.4 (Karahana Yılmaz and Eskici 2017), diastase numbers of honeys belonging to five different companies sold in markets in Konya region were 12.86-22.45 (Çiftçi and Parlat 2018), the average diastase number of honeys produced in Bingöl was 18.39 (Bengü and Kutlu 2018), the diastase number of honeys produced in Muğla

province was 3.38-13.18 (Belli 2019), the diastase number of honeys taken from the center and districts of Bingöl was 1-17.9 (Yaşar and Söğütü 2020), the diastase number of some honeys collected from 12 different regions was 9.0-25.4 (Gültekin Özgüven et al. 2020), the average diastase number in honey produced in Muş was 19.84 (Kutlu and Bengü 2020), the diastase number in honeys from Çorum region was 0.1-32.2 (Guzel and Bahçeçi 2020) and the diastase numbers of Tokat honeys were determined to be 0.0-10.9 (Kara et al. 2022). Some of the results obtained in these previous studies (Çetin et al. 2011; Kutlu and Bengü 2025; Karahana Yılmaz and Eskici 2017; Belli, 2019; Yaşar and Söğütü 2020; Güzel and Bahçeçi 2020; Kara et al. 2022) diastase numbers were found to be below the limit values determined by the Turkish Food Codex Honey Communique.

HMF (Hydroxy methyl furfural) content gives information about the temperature applied to honey. Heat treatment is applied to neutralize the microorganisms that contaminate honey. Newly produced honey generally does not contain HMF. However, over time, the amount of HMF increases depending on the storage conditions and the heat treatment used (Kaplan 2014; Ceylan 2016). According to the Turkish Food Codex Honey Communique, the amount of HMF in honey should be at most 40 mg kg⁻¹. The HMF content was 8.97 mg kg⁻¹ in the first year of the study and 3.59 mg kg⁻¹ in the second year. It was observed that the amount of HMF obtained in the first year was statistically higher than the amount of HMF obtained in the second year. The average HFM content of the honey obtained from the bee-pasture was 5.81 mg kg⁻¹, the HMF content of the honey obtained from the highland was 6.75 mg kg⁻¹, and the general average of the study was 6.28 mg kg⁻¹. It is seen that the results regarding HMF obtained from both bee pasture and highland are in accordance with the Turkish Food Codex Honey Communique (Table 1, Table 3).

The literature review showed that HMF amount of honeys from Eastern Anatolia and Eastern Black Sea Regions was 0.14-24.39 mg kg⁻¹ (Batu et al. 2013), HMF amount of honey produced in Gaziantep province was 14.3-51.5 mg kg⁻¹ (Kutlu and Bengü 2015), honey produced in Erzincan province HMF amounts were 1.54-47.81 m kg⁻¹ (Karahana Yılmaz and Eskici 2017), HMF content of honeys belonging to five different companies sold in markets in Konya region was 4.17-23.75 mg kg⁻¹ (Çiftçi and Parlat

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

2018), average amount of HMF in honey produced in Bingöl province was 36.37 mg kg⁻¹ (Bengü and Kutlu 2018), HMF content of honey produced in Muğla province was 0-93.8 mg kg⁻¹ (Belli 2019), HMF amount of honey taken from central and districts of Bingöl was 27.01-42.2 mg kg⁻¹ (Yaşar and Söğütü 2020), the HMF content of some honeys collected from 12 different regions was 0.1-1.22 mg kg⁻¹ (Gültekin Özgüven et al. 2020), the average amount of HMF in honey produced in Muş was 1.99 ppm (Kutlu and Bengü 2020), HMF amount in honeys of Iğdır region was 13.70-129.0 mg kg⁻¹ (Yurt and Çakır 2020), HMF amount in honeys from Çorum region was 0.3-36.5 mg kg⁻¹ (Guzel and Bahçeci 2020), HMF amounts in honeys from Tokat region was 0.05-8.69 mg kg⁻¹ (Kara et al. 2022). In some of the results obtained in these previous studies (Karahan Yılmaz and Eskici 2017; Belli, 2019; Yaşar and Söğütü 2020; Yurt and Çakır 2020), it was understood that the HMF amounts were above the limit values determined by the Turkish Food Codex Honey Communique.

Sugars constitute a large part of the composition of honey. The most proportional sugars in honey are fructose and glucose (Çetin et al. 2011). According to the Turkish Food Codex Honey Communique, it has been reported that the amount of fructose + glucose in flower honey should be at least 60% (TGKBT 2020). In a study, it was determined that the sum of fructose and glucose in honeys varied between 56.3% and 81.6% (Gültekin Özgüven et al. 2020). However, what is in question here is not the sugars that make up the natural structure of honey, but the commercial sugars or starches added to the honey afterwards. Commercial glucose or starches added to honey reduce the value of honey and endanger human health (Karadal and Yıldırım 2012).

According to the Turkish Food Codex Honey Communique, commercial glucose should not be present in honey (Table 1). Commercial glucose was not detected in honey obtained from bee pastures and highland in both years (Table 3). Similarly, in a study examining the physicochemical properties of some honeys collected from 12 different regions, it was reported that commercial glucose was not detected in the content of honey (Gültekin Özgüven et al. 2020).

In the past years, beet sugar (sucrose - tea sugar - granulated sugar) was used to feed honeybees, while in recent years, fructose and glucose syrups

obtained from invert syrup or corn starch have been fed. In addition, in order to increase the amount of naturally produced honey and reduce the cost; corn syrups, which can be produced cheaply and have a taste and fluidity close to honey, are added to honey and honey-like products are obtained. The most common and reliable method of detecting cheating with these methods is carbon isotope (C13) analysis and C4 sugar ratio analysis in honey (Padovan et al. 2003). By analyzing the C13/C12 isotope ratios in honey, the sugar syrup (C4 sugar) ratio likely to be added to the honey can be determined (White and Winters 1989).

C13/C12 value varies between -22 and -33 in C3 plants, and C13/C12 value varies between -10 and -20 in C4 plants. Since most of the nectar plants are in the C3 group, the C13/C12 value in honey is around -25. If corn syrup is added to honey, this ratio goes up to -10. When corn syrup is added to honey, the carbon isotope ratio of honey changes, but the carbon isotope ratio of protein in honey does not change. For this reason, by comparing the carbon isotope ratios of honey and protein in honey, it can be determined whether corn syrup is added to honey and if the difference between these two values is more than -1, it is understood that corn syrup is added to honey (Gürel 2015).

According to the Turkish Food Codex Honey Communique, the C13 sugar in honey should be -23 or more negative, the C4 sugar ratio calculated from the C13 value should be at most 7%, and the difference between the protein and raw honey delta C13 values in honey should be -1.0 or more (TGKBT 2020). In the first year of the study, the average C4 sugar was 2.39%, C13 sugar -25.8, and the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugars was -0.21, in the second year the average C4 sugar was 0.85%, C13 sugar -26.3, and the difference between protein in honey and raw honey delta C13 sugars was 0.32. Average C4 sugar was 1.24%, C13 sugar -26.3 in honey, the difference between protein and raw honey delta C13 values was 0.27, average C4 sugar in highland honey was 2.00%, C13 sugar was -25.9 and the difference between protein and raw honey delta C13 values in honey was -0.16. It was observed that the rate of C13 sugar was statistically higher in the second year compared to the first year, and the C13 sugar obtained from highland honey was statistically higher than the C13 sugar obtained from bee pasture. It was determined that the difference between C4 and C13 sugars obtained from both bee

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

pasture and highland and protein and delta C13 values in honey was at a suitable level according to the Turkish Food Codex Honey Communique (Table 1, Table 3).

The previous studies showed that, C4 sugar content of honey produced in Gaziantep province was 0.33-6.48% (Kutlu and Bengü 2015), the glucose ratio of the honeys sold in the markets in Konya region by five different companies was 29.65-35.22%, the C4 sugar ratio was 0.00-3.53%, the difference between protein and raw honey C13 value was -0.55 to -0.25 (Çiftçi and Parlat 2018), the average C4 sugar content of honeys produced in Bingöl was 1.37% (Bengü and Kutlu 2018), the C4 sugar content of honeys produced in Muğla was 0-16.8% and the difference between raw honey and C13 values was -0.28 to -2.52 (Belli, 2019) and the C4 sugar rate of the honeys of the Tokat region was 0.0-5.26%, the C13 sugar values of raw honey were -25.32 to -27.32, and the difference between the raw honey and C13 values was -0.84 to -1.23 (Kara et al. 2022). It has been observed that the difference between C4 sugar ratio and raw honey and C13 sugar in some honeys produced in Muğla province by Belli (2019) was high, and other honeys are within the limit values determined by the Turkish Food Codex Honey Communique.

Conclusion

The aim of the research is to determine the yield and quality of honey and other bee products obtained from bee pastures and highland. Five of the ten beehives used in the research were taken to the highland during the summer period, and five of them were left in the pasture for comparison purposes. Then, the amount of honey taken from both places and the quality of honey were determined. In addition, pollen and propolis amounts of ten beehives were determined. In this context, it has been determined that the average honey yields per colony obtained from the bee pasture and the highland in the first year are quite close to each other. However, the honey yield obtained from the bee pasture in the second year was lower than the honey yield obtained from the highland. Although honey yield is low, considering the transportation and housing costs, it has been understood that bee pasture is sustainable and an alternative to highland beekeeping. It was determined that the difference between HMF, moisture, diastase, commercial glucose, C4 and C13 sugar contents, protein in honey and delta C13 sugars in raw honey in honey

taken from both bee pastures and highland were at an "appropriate" level according to the Turkish Food Codex Honey Communique.

Acknowledgement: We would like to thank the Pilot University Coordination Central Unit for the support given.

Author Contribution: The authors contributed equally.

Conflict of Interest: Not conflict of interest was declared by the authors.

Data availability: If requested, the raw data set will be sent by me.

Ethical Issue: Not applicable.

Source of Finance: This study was supported by Bingöl University Pilot University Coordination Center Unit (Project No: PİKOM-Bitki.2019.001).

REFERENCES

- Aktürk D, Aydın B. Structural Characteristics of Beekeeping Enterprises and Beekeeping Activities in Çanakkale Province. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2019;7(10):1618-1628
- Bankova VS, Popov SS, Marekov NL. High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Flavonoids from Propolis. *J Chromatogr*, 1982;242:135-143
- Batu A, Küçük E, Çimen M. Determination of the Physicochemical and Biochemical Values of Flower Honeys Obtained from Eastern Anatolia and Eastern Black Sea Regions. *Electronic Journal of Food Technologies*, 2013;8(1):52-62.
- Belli T. Some Physical and chemical properties of the honeys produced in Muğla. Pamukkale University, Institute of Science, Department of Food Engineering, Master's Thesis, Denizli, 2019
- Bengü AŞ, Kutlu MA. Identification of Some Quality Criteria of Honey Produced in Bingöl. *Turkish Journal of Nature and Science*, 2018;7(1):7-10
- Ceylan DA. The effects of heating temperature, heating and storage time on the HMF level and diastase number of different honey types. Mustafa Kemal University, Institute of

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Science, Department of Zootechnics, Doctoral Thesis, Hatay, 2016
- Çetin K, Akin E, Uçurum H. Determination of Quality Parameters of Flower Honey Sold on the Market. *Journal of Food and Feed Science*, 2011;11:49-56
- Çiftci E. Comparison from the quality criteria terms of Konya highlands regional honey and pure honey. Selçuk University, Institute of Healthy, Department of Food Hygiene and Technology, Master's Thesis, Konya, 2014
- Çiftçi M, Parlat SS. The Conformity of Chemical Composition of Some Commercial Flower Honey Samples Sold in Markets in the City of Konya, Turkey with Turkish Food Codex, Honey Communique. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences*, 2018;32(1):38-42. <https://doi.org/10.15316/sjafs.2018.61>
- Emir M, Ceyhan V. Migration routes of beekeepers, productivity and prices of bee products in Turkey. XII. Ulusal Tarım Ekonomisi Kongresi, 25-27 Mayıs, 2016, p. 1615-1624
- Gürel F. Balda Taklit ve Tağşiş. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 2015;7(13):2-4.
- Gültekin Özgüven M, Demircan E, Özçelik B. Determination of Physicochemical Properties of Flower Honeys Produced in Various Locations and Their Compliance with the Turkish Food Codex. *European Journal of Science and Technology*, 2020;20:321-326. <https://doi.org/10.31590/ejosat.758399>
- Güzel N, Bahçeçi KS. Assessment of Some Chemical Quality Parameters of Honeys Produced in Çorum Province. *The Journal of Food*, 2020;45(2):230-241. <https://doi.org/10.15237/gida.gd19129>
- JMP. *Statistical Discovery from SAS*, USA, 2018
- TGKBT. *Turkish Food Codex, Honey Communique*, www.resmigazete.gov.tr, 2020
- TUIK. *Turkey Statistical Institute, Animal Production Statistics*, <http://www.tuik.gov.tr>, 2023
- Kaplan HB. Chemical properties of Aegean Region honeys. Pamukkale University, Institute of Science, Department of Food Engineering, Master's Thesis, Denizli, 2014
- Kara F, Kaya C, Esin Yücel E, Topuz S, Bayram M. Determination of Some Physicochemical Properties of Honeys from Tokat Region and Their Compliance with the Turkish Food Codex. *Uludag Bee Journal*, 2022;22(2):148-165. <https://doi.org/10.31467/uluaricilik.1092060>
- Karadal F, Yıldırım Y. The Quality Parameters and Nutritional and Health Effect of Honey. *J Fac Vet Med Univ Erciyes*, 2012;9(3):197-209
- Karahan Yılmaz S, Eskici G. Biochemical Aspects of Honey Produce in Erzincan. *Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpaşa University*, 2017;34(2):36-42. <https://doi.org/10.13002/jafag1120>
- Kekeçoğlu M, Göç Rasgele P, Acar F, Kaya ST. A Study on the Structure of Beekeeping and Beekeeping Activities in Düzce. *Düzce University Journal of Science and Technology*, 2014;2:1-15
- Korkmaz A. *Anlaşılabilir Arıcılık. Samsun Gıda Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü Yayınları*, Samsun, 2013
- Kumova U, Korkmaz A, Avcı BC, Ceyran G. An Important Bee Product: Propolis. *U Arı D. / U Bee J.*, 2002;2(2):10-24
- Kutlu MA, Bengü AŞ. Identification of the Quality Criteria of Honey Produced in Gaziantep. *Turkish Journal of Nature and Science*, 2015;4(1):48-53
- Kutlu MA. A Study on the General Structure of Beekeeping Buildings of Uludere District. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 2019;6(3):511-517. <https://doi.org/10.30910/turkjans.595369>
- Kutlu MA, Bengü AŞ. Determination of Antibiotic and Pesticide Residues and Some Quality Criteria in Honey Produced in Muş Province. *Bingöl University Health Journal*, 2020;1(1):1-6
- Kutluca S, Genç F, Korkmaz A. *Propolis. Samsun Provincial Directorate of Agriculture, Farmer Training and Extension Branch*, Samsun, 2006, p. 57
- MGM. *Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Meteorology*, <http://www.mgm.gov.tr>, 2023

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Nicodemo D, Malheiros EB, Jong DD, Helena R, Couto N. Increased Brood Viability and Longer Lifespan of Honeybees Selected for Propolis Production. *Apidologie*, 2014;45: 269-275
- Tutkun E. Teknik Arıcılık El Kitabı, TKV Yayın No: 6, Ankara, 2000, s.235
- Onuç Z, Yanar A, Saner G, Güler D. An Analysis on Economical Aspect of the Beekeeping Enterprise: A Case of Kemalpaşa District-İzmir/Turkey. *Ege Univ. Ziraat Fak. Derg.*, 2019;56(1):7-14.
<https://doi.org/10.20289/zfdergi.420370>
- Padovan GJ, De Jong D, Rodrigues LP, Marchini JS. Detection of Adulteration of Commercial Honey Samples by the ¹³C / ¹²C Isotopic Ratio. *Food Chemistry*, 2003; 82: 633-636
- Sandal EK, Kan C. Beekeeping Activities in Bingöl Province. *Turkish Geographical Review*, 2013;60:1-12
- Söğüt B, Seviş HE, Karakaya E, İnci H. A Research on Present Situation, Basic Problems and Solution Proposals in Beekeeping Enterprises (A Case Study Bingöl Province). *U Arı D – U Bee J* 2019;19(1):50-60
- Yaşar S, Söğütlü İ. Investigation of Acidity, Diastase Number, HMF, Insoluble Dry Matter and Ash Percentage Values of Some Honey Samples Produced in Bingöl and Districts. *Van Veterinary Journal*, 2020;31(1):42-46.
<https://doi.org/10.36483/vanvetj.631565>
- Yavuz C. Antimicrobial, antioxidant activities and the determination of bioactive components of propolis samples collected from some cities of Turkey. Ordu University, Institute of Science, Department of Biology, Master's Thesis, Ordu, 2011
- Yıldız AK, Ayyıldız M, Ayyıldız B, Arslan S. Technical and Socio-Economic Beekeeping Enterprises of Yozgat Province Investigation of Status. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2022;10(5):846-852
- Yurt B, Çakır S. Some Physicochemical Properties of Honey Produced in Iğdır and Region. *Turkish Journal of Nature and Science*, 2020;9(special issue):51-57.
<https://doi.org/10.46810/tdfd.761654>
- White JW, Winters K. Honey Protein as International Standard for Stable Isotope Ratio Detection of Adulteration of Honey. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 1989;72(6):907-911

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

DETERMINING THE QUALITY OF HONEY IN THE REGION OF KOSOVA WITH PHYSIOCHEMICAL ANALYSIS

Kosova Bölgesindeki Balın Kalitesinin Fizyokimyasal Analizle Belirlenmesi

Berat DURMISHI^{1,2}, Vesna KNIGHTS^{1*}, Ibrahim MEHMETI², Viktorija STAMATOVSKA¹, Demokrat NUHA², Smajl RIZANI², Pajtimi BYTYÇI², Veton HAZIRI², Valon SADIKU³

¹Faculty of Technology and Technical Sciences - Veles, University "St. Kliment Ohridski" - Bitola, Dimitar Vlahov, 1400 Veles, MACEDONIA, Corresponding author E-mail: vesna.knights@uklo.edu.mk, ORCID No: 0000-0003-1768-2231, E-posta: viktorija.stamatovska@uklo.edu.mk, ORCID No: 0009-0003-6255-4615

²UBT - Higher Education Institution, Lagjja Kalabria p.n., Prishtina, KOSOVA, E-mail: berat.durmishi@ubt-uni.net, ORCID No: 0000-0003-4487-1812, E-mail: Ibrahim.mehmeti@ubt-uni.net, ORCID No: 0000-0001-5653-2418, E-mail: demokrat.nuha@ubt-uni.net, ORCID No: 0000-0002-7271-6791, E-mail: smajl.rizani@ubt-uni.net, ORCID No: 0000-0002-0545-754X, E-mail: pajtim.bytyqi@ubt-uni.net, ORCID No: 0000-0002-1521-3370, E-mail: veton.haziri@ubt-uni.net, ORCID No: Orcid: 0000-0002-1666-4835.

³Kosovo Institute of Agriculture, Street, Adem Jashari 144, 30000 Pejë, KOSOVA, E-mail: valonsadiku@gmail.com, ORCID: 0000-0002-0984-3069.

Received / Geliş Tarihi: 25.08.2023

Accepted / Kabul Tarihi: 24.10.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1349616

ABSTRACT

This article examines the physicochemical and nutritional characteristics of honey produced in different regions of Kosovo. The aim of this study is to investigate the physicochemical properties and nutritional characteristics of honey from various regions in Kosovo, shedding light on the factors influencing its composition and quality. It also underscores the importance of local beekeepers in sustaining honey production and environmental preservation. A total of 26 samples were gathered from various locations, and beekeepers were interviewed about their honey-production techniques and bee-feeding practices. The samples underwent analysis to determine parameters such as moisture content, total solids, pH, acidity, ash content, proteins, electrical conductivity, and dissolved solids content %. Notably, the physicochemical properties of honey differed significantly across the regions. Moisture content ranged from 15.02% to 18.80%, with the lowest found in Ferizaji and the highest in Sharri. Dissolved solids content % concentration at 20°C varied from 79.50% to 82.60%, with Sharri exhibiting the lowest and Prishtina displaying the highest value. The acidity and pH levels of all honey samples were measured between 4.97 and 5.63, and 3.56 to 5.60, respectively. Additionally, the Pfund scale was employed to evaluate the color of the honey, indicating white hues for Sharri, extremely light white or white for Prishtina and Ferizaj, and exceptionally white for Skenderaj. This study concludes that geographical location, feeding systems, nectar sources, honey age, and beekeeper processing methods significantly impact the physicochemical and nutritional properties of honey, including its color.

Keywords: Honey, Kosovo region, Physicochemical composition, Nutritional aspects, Color grading

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ÖZ

Bu makale Kosova'nın farklı bölgelerinde üretilen balın fizikokimyasal ve besinsel özelliklerini incelemektedir. Bu çalışmanın amacı, Kosova'nın çeşitli bölgelerinden elde edilen balın fizikokimyasal özelliklerini ve besinsel özelliklerini araştırarak bileşimini ve kalitesini etkileyen faktörlere ışık tutmaktır. Ayrıca yerel arıcıların bal üretiminin sürdürülmesi ve çevrenin korunmasındaki önemini altını çizmektedir. Çeşitli yerlerden toplam 26 örnek toplanmış ve arıcılarla bal üretim teknikleri ve arı besleme uygulamaları hakkında görüşülmüştür. Numuneler nem içeriği, toplam katı madde, pH, asitlik, kül içeriği, proteinler, elektrik iletkenliği ve % çözülmüş katı madde içeriği gibi parametreleri belirlemek üzere analize tabi tutulmuştur. Balın fizikokimyasal özellikleri bölgeler arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Nem içeriği %15,02 ile %18,80 arasında değişmekte olup en düşük Ferizaj'de ve en yüksek Sharri'de bulunmuştur. 20°C'deki çözülmüş katı madde içeriği % konsantrasyonu %79,50 ile %82,60 arasında değişirken, en düşük değeri Sharri, en yüksek değeri ise Prishtina göstermiştir. Tüm bal örneklerinin asitlik ve pH seviyeleri sırasıyla 4.97 ile 5.63 ve 3.56 ile 5.60 arasında ölçülmüştür. Ayrıca, balın rengini değerlendirmek için Pfund ölçeği kullanılmış ve Sharri için beyaz tonlar, Prishtina ve Ferizaj için son derece açık beyaz veya beyaz ve Skenderaj için son derece beyaz tonlar belirlenmiştir. Bu çalışma, coğrafi konum, besleme sistemleri, nektar kaynakları, bal yaşı ve arıcı işleme yöntemlerinin balın rengi de dahil olmak üzere fizikokimyasal ve besinsel özelliklerini önemli ölçüde etkilediği sonucuna varmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Bal, Kosova bölgesi, Fizikokimyasal bileşim, Besinsel özellikler, Renk derecelendirmesi

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Bu kapsamlı çalışmanın amacı, gelişen arıcılık endüstrisi ile tanınan Kosova'ya odaklanarak balın çok yönlü dünyasını incelemektir. Çalışma, balın çeşitli özelliklerini ve kökenlerini ve hem mutfaktaki hem de geleneksel tıptaki rolünü keşfetmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca, özellikle Kosova'nın arıcılık endüstrisi bağlamında, balın metal kirliliğini tespit etmek için çevresel bir uyarıcı olarak önemini vurgulamayı amaçlamaktadır.

Gereç ve yöntem: Çalışmada, Kosova'nın 10 farklı bölgesinden 26 bal örneğini incelemek için titiz yöntemler kullanılmıştır. Bal örneklerinin çeşitli özelliklerini değerlendirmek için hem fiziksel hem de kimyasal analizler yapılmıştır. Fiziksel analizler nem içeriği, % briks konsantrasyonu, pH, titre edilebilir asitlik, kül içeriği, toplam proteinler, iletkenlik ve Pfund ölçeği kullanılarak bal rengini kapsamaktadır. Kimyasal analizler toplam protein, kül ve sodyum, manganez, potasyum, kalsiyum, magnezyum, bakır, demir ve çinko gibi mineral elementlerin konsantrasyonları incelenmiştir.

Bulgular: Çalışmanın sonuçları, bal örneklerinin fiziksel özelliklerinde coğrafi farklılıkları yansıtan önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Nem içeriği %15,02 ile %18,80 arasında değişirken, %briks konsantrasyonu %79,5 ile %82,6 arasında değişmiştir. pH, Titre edilebilir asitlik ve Pfund ölçeği

kullanılarak yapılan renk analizi de örnekler arasında farklılıklar göstermiştir. Ayrıca, kimyasal analizler, %0,03 ile %3,17 arasında değişen toplam protein içeriği ve %0,01 ile %0,78 arasında değişen kül içeriği ile farklı profiller ortaya koymuştur. Sodyum, manganez, potasyum, kalsiyum, magnezyum, bakır, demir ve çinko dahil olmak üzere mineral element konsantrasyonları bal örnekleri arasında önemli farklılıklar sergilemiştir.

Tartışma ve sonuç: Bu çalışma, Kosova'da gelişen arıcılık endüstrisine özel olarak odaklanarak balın çok yönlü dünyasına ilişkin değerli bilgiler sunmaktadır. Balın benzersiz özelliklerini, hem mutfak hem de geleneksel tıptaki rolünü ve metal kirliliğini tespit etmek için çevresel bir uyarıcı olarak önemini vurgulamaktadır. Bal örneklerinin fiziksel ve kimyasal özelliklerinde gözlemlenen farklılıklar, balın coğrafi kökenini anlamının önemini altını çizmektedir. Bu bulguların hem Kosova'daki arıcılık endüstrisi hem de daha geniş çevresel izleme alanı için etkileri vardır.

Sonuç olarak, Kosova'da yürütülen bu çalışma, ülkenin farklı yerlerinden toplanan balların fizikokimyasal özellikleri ve besinsel yönleri hakkında değerli bilgiler sağlamaktadır. Bulgular, balın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin arıların beslenişine ve o bölgenin coğrafi özelliklerine bağlı olarak değiştiğini göstermektedir. Çalışma, balın nem içeriği, çözülmüş katı madde içeriği %

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

konsantrasyonu, asitliği ve pH'sının bölgeden bölgeye değiştiğini ve Kosova'da balın rengini belirlemek için Pfund ölçeğinin kullanıldığını ortaya koymuştur. Balın rengi, nektar kaynağı, balın yaşı ve arıcının işleme yöntemleri de dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Çalışma ayrıca Sharri'den toplanan balın beyaz renkli olduğunu, Prishtina'dan toplanan balın ise özellikle açık beyaz ve ekstra beyaz olduğunu göstermektedir. Çalışmanın sonuçları, iyi besin değerine sahip yüksek kaliteli bal üretiminde yerel arıcıları desteklemek için kullanılabilir.

Bu çalışmanın bazı sınırlamalarını kabul etmek önemlidir. Örneklem büyüklüğü, Kosova'nın çeşitli bölgelerini temsil etse de nispeten küçüktür. Gelecekte daha büyük bir örneklem büyüklüğüyle yapılacak araştırmalar, bal özelliklerindeki coğrafi farklılıklar hakkında daha kapsamlı bilgiler sağlayabilir. Ayrıca, bu çalışma bal bileşimindeki bu farklılıklarla ilişkili potansiyel sağlık faydalarını araştırmamıştır. İleride yapılacak araştırmalar Kosova'nın farklı bölgelerinden elde edilen balların besleyici ve tıbbi özelliklerini inceleyebilir.

INTRODUCTION

Honey is a natural sweetener made by bees from floral nectar. It has been utilized for thousands of years because of its distinct flavor and several health benefits. Honey is a complex blend of sugars, enzymes, amino acids, vitamins, and minerals that contribute to its particular flavor and therapeutic benefits (Kasprzyk, et al. 2018, Bernolo 2020). Honey is available in a range of hues and tastes, depending on the type of floral nectar gathered by the bees. Clover honey, wildflower honey, and Manuka honey are some of the most prevalent varieties of honey. Each type of honey has a distinct flavor and nutritional value (Nascimento, et al. 2018, Bucekova, et al. 2018, Cheung, et al. 2019).

Honey is a common component in many different cuisines across the world. It is a natural sweetener that may be used in tea, coffee, and baked products. It may also be used as a meat glaze, a vegetable marinade, and a topping for yogurt and porridge (Magdalena Kunat-Budzyńska 2023, Gela, et al. 2021, Noiset, et al. 2022). Honey is well-known for its numerous health advantages in addition to its culinary applications. Honey has been used for generations in traditional medicine to cure a number of diseases, including sore throats, coughs, and

wounds (Karabagias, et al. 2014, Karabagias and Karabournioti 2018). It has a high concentration of antioxidants, which can help protect the body from free radical damage and lower the risk of chronic illnesses including cancer and heart disease. Honey is also recognized for its anti-inflammatory characteristics, which can aid in the reduction of inflammation in the body and the relief of symptoms associated with illnesses such as arthritis (Alaerjani, et al. 2022, Pauliuc, et al. 2022).

Overall, honey is a tasty and healthy natural sweetener with several health advantages. Honey is a flexible and pleasant complement to any diet, whether consumed raw or used in cooking and baking. Because of its unique qualities, it is an important element in both traditional and modern medicine (McLoone, et al. 2016, Pasupuleti, et al. 2017). Many studies have demonstrated that particular physicochemical characteristics and mineral content in various locations across the world, together with chemometric analysis, can be a valuable tool in determining the botanical or geographical origin of honey that enters the market. Moisture, sugar, hydroxy-methyl furfural (HMF), mineral composition, and a variety of other factors influence honey quality in terms of both sugar and microbiological qualities (Beretta, et al. 2007, Gasparrini, et al. 2017).

Kosovo is landlocked and located in the heart of the Balkan Peninsula in Southeast Europe, with a diverse climate and a high concentration of nectar-giving plants (Ibrahimi and Hajdari 2020). Kosovo offers good breeding circumstances; according to the Statistical Agency of Kosovo (ASK 2015), the number of beehives has steadily grown, resulting in higher production from year to year. In 2015, local output totaled 2,120 tons, an increase over the previous year's total of 1,568 tons (Rama, et al. 2022). Because bees collect nectar from flora within a 3-5 km radius, tracing the origin of honey can offer vital information about probable contamination of the region from where the honey production material derives is a useful indication for environmental pollution from hazardous metals. Honey can be utilized as an indication of metal pollution, particularly harmful contaminants, due to its bio accumulative capacity (Dizman, et al. 2020).

Honey is being promoted in Kosovo as a pure natural product. Although finding honey from the blooms of a single plant species, known as miofloral honey, is almost impossible, beekeepers understand the

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

major nectar sources of their region and frequently design crops to keep the really great ones distinct. As a consequence, chestnut honey, acacia honey, mountain honey, meadow honey, and other honeys may be found in markets (Mladenović and Simeonova 2014). The Codex Alimentarius standard (Codex Alimentarius Commission 2001) and the EU Honey Directive (Council Directive 2001/110 of the Council of the European Union, 2001) govern the standards for the identity and quality of honey. Kosovo wants to boost agri-food industry competitiveness in conformity with EU veterinary, phytosanitary, and food safety requirements. Consequently, the physicochemical and microbiological qualities of specific food items are evaluated in various ways (Rysha, et al. 2022, Kastrati, et al. 2021).

MATERIALS AND METHODS

Reagents and chemicals

Reagents and chemicals of analytical quality, as well as deionized distilled water, were employed throughout this investigation.

Sampling

A total of 26 samples of honey from semi-commercial producers were collected from 10 different towns in Kosovo between March and September 2022. Decan, Drenas, Skenderaj, Pristina, Peja, Obiliq, Fushe-kosove, Rahovec, Sharri, Ferizaji, and Shtime were chosen as example locations. The samples were collected in clean, washed plastic bottles and delivered to the laboratory for examination. A questionnaire was designed and filled during personal interviews with the owners to obtain information regarding herd size, geographical location, bees transportation, health state, honey numbers, and honey sell site. Honey samples were utilized in triplicate to create a valid and consistent data set, and their average results were assessed.

Physical analysis

The physical properties of several honey samples were evaluated soon after they arrived at the laboratory. All determinations were made using the AOAC (2000) procedures. In a nutshell, moisture content was calculated by subtracting the known weight of the honey sample from the determined weight of the whole solid after evaporating the liquid component of the honey sample on a hot plate. The

International Honey Harmonized Methodologies Commission was used to analyze the physicochemical parameters electrical conductivity (EC), free acidity (FA), moisture, ash, and dissolved solids content % (Juszczak, et al. 2009).

In summary, a digital pH-meter (HI 8314, Hanna Instruments, Italy) calibrated with pH 4 and 7 buffers was used to test pH and electric electrical conductivity. Titratable acidity was calculated as a percentage of lactic acid using the titrimetric technique. The conventional procedures were used to determine specific gravity, and electrical conductivity. Electric electrical conductivity is a characteristic that determines an ion's capacity to conduct an electric current between two electrodes. Titrimetric analysis was used to assess free acidity. The honey sample (10 g diluted with 75 mL of distilled water) is titrated with 0.1 N sodium hydroxide in the presence of phenolphthalein as an indicator in this procedure.

An ABBE refractometer 220 V BOE 32,400 Model RMT was used to evaluate moisture content. At a constant temperature of 20 °C, the refractive index of the sample was measured using a refractometer. The quantity of water (% m/m) was determined using a table based on the refractive index. If the index was not determined at 20°C, the temperature correction was applied, and the values were decreased to that temperature (JAOAC Official Method 52.729). Brix levels were calculated using the BRX Method using a Refractometer -AABE Atago at a temperature of 20°C, +/- 2°C, and the results were read immediately on the instrument.

The color of the honey samples was analyzed using a spectrophotometer according to the Pfund scale according to the USDA categorization by measuring the absorbance at 560 nm and multiplying it by the factor 3.15 compared to the procedures of the Codex Alimentarius Commission Standards (2001). As a control, honey samples were evaluated against deionized water. To compare to the Sample result range, the absorbance of the sample is measured at 560 nm and multiplied by a factor of 3.15.

Chemical analysis

The nitrogen concentration (N) in honey samples was determined using the Kjeldahl (1983) technique, and crude protein content was calculated as N6.25 using the AOAC 969.37 method using a Kjeldahl Apparatus (FOSS Kjeltac 8420 autosampler

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

systems) (Magida Tabbara 2022). Whereas, according to the AOAC 920.181 method, Ash is assessed by using 10 g of honey sample and adding 10 mL warm distilled water, evaporation (100-300 °C), and Ash in an electrical furnace (Protherm) at 550 °C until Ash is complete.

The honey samples were collected and digested with two liters of concentrated nitric acid for mineral analysis. After adding one volume of perchloric acid, the contents were gently cooked on a hot plate before being vigorously heated until dry (about 12 ml). This digestive method makes no attempt to dissolve any silicate-based substance found in the samples. The digested materials were quantitatively transferred to a flask after cooling and diluted to 100 ml with deionized double distilled water before being filtered. The collected samples are homogenized and placed in another 10.0mL of 65% HNO₃ and 1 mL of 35% H₂O₂ in the Teflon microwave tube (vessel) after mineralization and dilution, then placed in the microwave for mineralization of the samples. MPAES 4200 atomic absorption spectrophotometer (Microwave Plasma Atomic Emission) For mineral examination, spectroscopy with conventional burner, air-acetylene flame, and hollow cathode lamps was utilized as a radiation source.

Statistical analysis

The results were reported as the mean SD of three different determinations. The statistical tool SPSS 17.0 was used to analyze the data (SPSS Statistics for Windows, Version 17.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Physical characteristics

Kosovo has a varied geographical location with hilly mountains, grassland regions, and meadows and mountains. In total, 26 samples of honey were utilized in Kosovo from March to September 2022, and they were spread over 10 distinct locations of the country. All of the farmers were originally farmers who produced honey for the local market or for sale inside Kosovo (different regions or municipality). First, the farmers were interviewed and questioned about the health benefits of the bees as well as the location in which they fed the bees. Six farmers out

of the 26 interviewees had feed bees in difficult mountains, which are largely covered with tree and mountain flora. 7 out of 26 farmers are instructed that bees are always fed in grassland regions that dominate this sort of flower (*Vicia cracca*, *V. pannonica*, *Trifolium pratense*, *T. repens*, *T. medium*, *Medicago sativa*, *Robinia pseudoacacia*, *Helianthus tuberosus*, *Cardus crispus*, *Centaurea stoebe*, *Taraxacum officinale*, *Cirsium arvense*, *C. vulgare*, *Prunella vulgaris*, *Mentha longifolia*, *M. Aquatica*, *Ajuga reptans*, *Origanum vulgare*, *Teucrium montanum*, *T. chamaedrys*, *Sinapis alba*, *Malva sylvestris*, *Knautia arvensis*, *Verbascum thapsus*, *V. phlomoides*, *V. blattaria*, *Melampyrum pratensae*, *M. nemorosum*), however the remaining 13 out of 26 samples feed the bees in mixed areas such as grassland, steep mountains, and grasslands areas.

Moisture, total solids, pH, titratable acidity, Ash content, total proteins, electrical conductivity, and dissolved solids content % are significant metrics to consider while examining the physicochemical composition and nutritional aspects of honey. Table 1 displays the physical properties of the various honey samples gathered throughout Kosovo. The moisture content of the samples ranged from (15.0220%) to (18.802%). The lowest values were discovered in the Ferizaji municipality, where bees are departing between grassland areas and mountains, while the greatest values were discovered in the Sharri municipality, where the terrain is mountains with an ideal height of roughly 1200-1500 meters.

The dissolved solids content % concentration range at 20 °C ranged from (79.5±0.23 %) to (82.6±0.2 %), as shown in Table 1. The lowest values were observed in the Sharri area where the bees feed in the mountainous highlands (79.5±0.23)% followed by honey bees from the same places with the same feeding system, and the highest in the Prishtina municipality with a range of 82.6±0.2%.

The specific acidity and pH of all honey samples were determined to be 4.97±0.2 to 56.3±0.2 and 3.560±.2 to 5.60±.2, respectively (Table 1). All of the honey samples had minor differences in the two metrics. The changes in specific acidity and pH are considerable. The sample acidity and alkalinity of honey bees are determined by these two criteria.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 1. Chemical parameters of honeys in Kosovo.

Location	Moisture %	Brix % at 20°C	Acidity mmol/kg	pH at 20°C	Electrical conductivity $\mu\text{S cm}^{-1}$ 20°C	Total proteins (1g/100g)	Ash content (%)
SH-1	16.8±0.1	81.8±0.01	25.7±0.01	4.53	652.5±2.5	0.35±0.01	0.32±0.01
SH-2	18.8±0.1	79.5±0.01	27.0±0.01	4.57	607.8±2.5	0.4±0.01	0.51±0.01
SH-3	18.0±0.1	79.5±0.01	36.8±0.01	3.89	419.7±2.5	0.23±0.01	0.04±0.01
SH-4	17.8±0.1	80.7±0.01	14.6±0.01	5.18	645±2.5	0.11±0.01	0.2±0.01
SH-5	16.4±0.1	82.2±0.01	36.2±0.01	3.86	254.9±2.5	0.33±0.01	0.08±0.01
PE-1	16.2±0.1	82.3±0.01	26.4±0.01	4.35	713.2±2.5	0.51±0.01	0.39±0.01
PZ-1	17.0±0.1	81.5±0.01	25.3±0.01	4.06	580.4±2.5	0.67±0.01	0.41±0.01
DE-1	18.0±0.1	80.5±0.01	27.4±0.01	5.06	1375.0±2.5	0.49±0.01	0.78±0.01
PR-1	18.0±0.1	80.5±0.01	4.97±0.01	4.03	41.22±2.5	0.34±0.01	0.01±0.01
ST-1	16.0±0.1	82.5±0.01	43.1±0.01	4.07	509.1±2.5	0.49±0.01	0.28±0.01
SK-1	16.2±0.1	82.3±0.01	47.4±0.01	4.15	488.0±2.5	0.5±0.01	0.31±0.01
SK-1	15.8±0.1	82.7±0.01	48.1±0.01	4.32	690.4±2.5	0.75±0.01	0.34±0.01
DR-1	18.2±0.1	80.2±0.01	8.28±0.01	3.77	59.42±2.5	0.35±0.01	0.37±0.01
DR-3	17.2±0.1	81.2±0.01	14.0±0.01	4.01	206.9±2.5	0.28±0.01	0.1±0.002
PR-2	15.8±0.1	82.6±0.01	42.0±0.01	4.45	640.8±2.5	0.47±0.01	0.47±0.01
OB-1	16.8±0.1	81.7±0.01	33.5±0.01	3.8	412.0±2.5	0.62±0.01	0.13±0.001
OB-2	18.2±0.1	80.2±0.01	33.2±0.01	3.69	389.6±2.5	1.84±0.01	0.13±0.002
OB-3	17.2±0.1	81.3±0.01	29.8±0.01	3.78	341.5±2.5	0.63±0.01	0.12±0.01
DR-2	16.6±0.1	81.9±0.01	15.7±0.01	3.81	194.4±2.5	0.36±0.01	0.09±0.01
RV-1	16.2±0.1	82.3±0.01	17.6±0.01	3.63	169.6±2.5	0.41±0.01	0.07±0.01
FK-1	17.8±0.1	80.7±0.01	20.2±0.01	3.77	284.2±2.5	0.87±0.01	0.02±0.001
FK-2	16.6±0.1	81.9±0.01	18.1±0.01	3.56	57.58±2.5	0.03±0.01	0.01±0.001
FZ-1	15.0±0.1	79.6±0.01	56.3±0.01	4.07	733.8±2.5	3.17±0.01	0.68±0.01
FZ-2	16.0±0.1	82.4±0.01	37.2±0.01	4.54	620.8±2.5	1.75±0.01	0.29±0.01
FZ-3	17.6±0.1	81.0±0.01	14.5±0.01	3.81	171.6±2.5	0.19±0.01	0.35±0.01
FZ-4	16.8±0.1	81.7±0.01	13.9±0.01	4.29	181.5±2.5	0.24±0.01	0.27±0.01

SH-Sharri, PZ-Prizren; PR-Prishtina, FZ-Ferizaj; OB-Obiliq, FK-Fushë Kosova, SK-Skenderaj, DR-Drenas. Each reading represents the mean standard deviation of three replicate studies.

Color Determination

The Pfund scale is a color grading method for honey that is used to identify its color. Wilbur L. Pfund invented it in the early twentieth century, and it is still frequently used today. The scale goes from 0 to 140, with 0 being the lightest and 140 representing the darkest. A honey sample is placed in a Pfund color grader, which is a glass tube about 5 inches long and 1 inch in diameter, to determine the hue of honey

using the Pfund scale. The honey is next tested against a set of colored glass standards ranging from water white to dark amber.

The quantity of light that goes through the sample in relation to the colored glass standards determines the hue of the honey. The Pfund scale is based on the honey sample's light absorption, with darker honey absorbing more light than lighter honey. Water white or very light amber honey is honey that

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

falls between 0 and 34 on the Pfund scale. Honey in the 35-50 range is light amber, whereas honey in the 51-85 range is medium amber. Honey in the 86-114 range is dark amber, while honey in the 115-140 range is very dark amber or virtually black.

The color of honey may be impacted by a number of factors, including the nectar source, the age of the honey, and the beekeeper's processing processes. Lighter honey is often thought to have a gentler flavor, but darker honey is more powerful and may have a stronger flavour. Several color grading schemes, in addition to the Pfund scale, can be used to identify the hue of honey. The USDA color grading system, which goes from Grade A (light) to Grade C (dark), and the European Commission color grading system, which goes from Extremely White to Dark, are two examples.

The honey samples collected at Sharri had a Pfund interval of 24.58 - 33.129 mm. This signifies that the honey collected in Sharri is white in hue. The mean interval of the honey samples collected in Prishtina was a Pfund interval of 13.074 - 38.32 mm. This signifies that honey from the Prishtina region is particularly light white and extra white. The honey samples collected in the Prizren area are white in hue.

The honey samples collected at Ferizaj had a Pfund interval of 22.73 - 38.32 mm. This signifies that the honey gathered in the Ferizaj area is white or extremely light white in hue. The honey samples obtained at the Obiliq area had a Pfund interval of 28.3 - 30.53 mm. This signifies that the honey collected in the Obiliq area is white. The mean spacing of the honey samples collected in Fushe-Kosovo a Pfund interval of 30.52 - 35.72 mm. This signifies that the honey obtained in the Fushe-Kosovo region is white or extremely light white in hue.

The mean interval of the honey samples collected at Skenderaj had a Pfund interval of 13.074 - 30.158 mm. This signifies that the honey gathered from the

Skenderaj site is white and exceptionally white in hue. The honey samples collected in the Drena area had a Pfund interval of 33.87 - 36.1 mm. This signifies that the honey gathered in the Drena area is white or especially light white in hue.

Chemical components

The honey samples were analyzed for several chemical components, including total proteins, ash, and mineral elements (Na, Ca, K, Mg, Mn, Fe, Cu, and Zn), as shown in Table 3. We attempted to analyze Cr, As, Pb, and Cd but were unable to do so since the levels were below the detection limit. The chemical properties of the samples differed significantly, and each sample excelled in one or more areas. The amount of total protein was found to be in the range of (0.03±0.001%) to (3.17±0.02%). Most of the samples has the lowest range (17 samples) until 0.5, other groups until 1g/100g are 6 samples and 3 honey samples are more than 1g/100g and that are; 1.75, 1.84 and 3.17, respectively (Table 3).

Similarly, the ash content range are slightly significant and between (0.01±0.01%) to (0.78±0.02%). The lowest values are coming from Prishtina municipality 0.01±0.01% while the highest from Decani municipality 0.78±0.02%. The lowest level of ash contains are coming from are where bees located on the grasslands area (area combined with the meadows and several type of flowers) while the highest level are from the area which bees are feedings from hilly mountains (combined with mountains, grasslands area located with trees).

The concentration of Na is in range (170.03±0.001 mg/kg) to (600.00±0.02 mg/kg) and concentration of Mn it was differently. 3 out of 26 samples was not detected, 3 below 0.1 and others are in range (0.11±0.001%) to (18.2±0.02%).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 2. The determination color of honey based on a Pfund scale.

Location	USDA colour Standard designation	Color scale,Pfund (mm)
SH-1	White	33.129
SH-2	White	32.015
SH-3	White	30.27
SH-4	White	24.58
SH-5	White	31.272
PE-1	White	21.987
PZ-1	White	26.44
DE-1	White	32.75
PR-1	Extra light white	38.32
ST-1	White	22.73
SK-1	White	30.158
SK-1	Extra white	13.074
DR-1	Extra light white	36.1
DR-3	white	34.98
PR-2	Extra white	13.074
OB-1	White	28.67
OB-2	White	28.3
OB-3	White	30.53
DR-2	White	33.87
RV-1	Extra light white	41.67
FK-1	White	30.52
FK-2	Extra light white	35.72
FZ-1	white	22.73
FZ-2	white	33.129
FZ-3	Extra light white	38.32
FZ-4	White	29.043

SH-Sharri, PZ-Prizren; PR-Prishtina, FZ-Ferizaj; OB-Obiliq, FK-Fushë Kosova, SK-Skenderaj, DR-Drenas

Compared to Na and Mn, higher significant differences were found in K. The range of K are in range concentration of K was detected on honey and in range of (19.4±0.001 mg/kg) to (1898.00±0.02 mg/kg).

Concentration of Ca was found to be (89.2±0.001 mg/kg) to (295.7±0.02 mg/kg). The lower level was

shown from honey which bees has feed in grasslands are while highest are in Obiliq municipality indicated for grasslands and contaminated area. Level of Mg variate in range (5.05±0.001 mg/kg) to (97.9±0.02 mg/kg). There are significant differences between the lower level and the higher level, 92.85 mg/kg being the highest level.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 3. Concentration of heavy metals (mg/kg) in honey samples from Kosovo.

Location code	Zn 213.85 7 nm	Ca 430.25 3 nm	Fe 371.99 3 nm	Cu 324.75 4 nm	K 769.89 7 nm	Mg 383.82 9 nm	Mn 403.07 6 nm	Na 589.59 2 nm	Description
SH-1	2.44	183.2	0.4	0.28	1719	53.4	2.28	600	Hilly-mountainous
SH-2	3.24	227.3	n.d.	<0.1	1642	50.7	1.99	516	Hilly-mountainous
SH-3	3.19	207.5	n.d.	0.17	1050	37.6	1.34	446	Hilly-mountainous
SH-4	3.37	121.3	n.d.	0.55	1739	28.6	1.25	388	Hilly-mountainous
SH-5	4.05	217.6	n.d.	0.52	631	26.4	0.66	558	Hilly-mountainous
PE-1	5.34	289	1.19	0.44	1898	64.5	3.33	251	Hilly-mountainous
PZ-1	3.16	256	0.55	0.31	1406	57.1	3.53	366	Grassland
DE-1	6.17	459.7	1.06	0.2	3484	43.5	11.4	765	Hilly-mountainous
PR-1	2.24	145.8	n.d.	n.d.	19.4	5.81	n.d.	409	Grassland
ST-1	4.64	326.6	1.89	0.28	1197	82.3	7.29	554	Hilly-mountainous
SK-1	4.22	186.8	0.19	0.25	1201	43.1	3.15	415	Mixed
SK-1	3.45	136.4	0.39	0.39	1759	102	10	190	Mixed
DR-1	2.28	146.4	n.d.	n.d.	33.2	13.4	n.d.	298	Mixed
DR-3	5.09	127.8	1.89	n.d.	265	29.6	1.19	362	Mixed
PR-2	3.53	261.3	1.74	0.37	1764	76.2	3.66	345	Grassland
OB-1	3.64	144	2.8	n.d.	807	39.5	2.99	153	Grassland
OB-2	3.58	181.3	3.46	0.05	765	46.4	3.71	290	Grassland
OB-3	3.89	295.7	n.d.	n.d.	638	45.2	0.11	457	Grassland
DR-2	3.71	196.9	1.58	n.d.	278	43.3	1.04	428	Mixed
RV-1	4.51	112.4	n.d.	n.d.	293	9.98	<0.1	352	Grassland
FK-1	3.32	149.8	0.03	n.d.	429	19	<0.1	326	Grassland
FK-2	3.01	89.2	n.d.	n.d.	22.3	5.05	n.d.	171	Grassland
FZ-1	6.2	234.1	0.98	0.58	1739	97.9	13.4	469	Mixed
FZ-2	3.41	184	1.61	0.7	1532	139	18.2	321	Mixed
FZ-3	3.84	116	22.37	n.d.	356	10.5	<0.1	252	Mixed
FZ-4	3.44	166.1	n.d.	0.64	457	21.6	1.75	354	Mixed

Level of Cu in 10 out of 26 samples was not able to detect, 1 sample was below 0.1 and others are in range (0.17.03±0.001) to (0.58±0.02). Concentration of Fe in honey level it was different. Total 10 out of 26 samples not able to detect, while others are in range (0.19±0.001) to (22.37±0.02). The result indicates significant differences because differences level is 22.18mg/kg. Higher level of Fe is shown from

one sample in capital of Kosovo-Pristina, Ferizaj, Obilic and Peja.

The level of Zn is detected to all of the samples and significant differences it ranges from (2.44±0.001) to (6.2±0.02) mg/kg. highest level was from Decani municipality from where bees are feed from hilly mountains included different trees.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

DISCUSSION

The results of this study provide valuable insights into the physical characteristics and chemical composition of honey samples collected from various regions in Kosovo. The discussion section will delve into the implications of these findings, their significance in the context of honey production, and potential implications for consumer health. One of the noteworthy observations from this study is the geographical variation in honey characteristics across different regions of Kosovo. Kosovo's diverse topography, comprising hilly mountains, grassland regions, and meadows, significantly influences the composition of honey. This variation can be attributed to the differing flora and foraging patterns of bees in these regions.

The moisture content of honey is a crucial parameter as it impacts its shelf life and overall quality. In this study, honey samples from various regions of Kosovo exhibited moisture content ranging from 15.02% to 18.80%. Notably, honey from the Ferizaji municipality, characterized by bees foraging in grassland areas and mountains, had the lowest moisture content. Conversely, honey from the Sharri municipality, where bees forage in mountainous terrains, had the highest moisture content. The variation in moisture content can be attributed to environmental factors, such as humidity levels and temperature, which affect the rate of water evaporation in nectar. Lower moisture content is generally desirable as it contributes to the preservation of honey. However, excessively low moisture content can result in crystallization, impacting the honey's texture and appearance. Therefore, beekeepers in regions with higher moisture content may need to employ strategies to reduce moisture levels.

The standard moisture content in honey is around 17-18%, but it can vary based on several factors, including environmental conditions, floral sources, and harvesting methods. If the moisture content is too high (above 20%), the risk of fermentation and spoilage increases, leading to a reduced shelf life and undesirable flavor changes. On the other hand, honey with excessively low moisture content (below 16%) tends to crystallize rapidly, affecting its texture and making it less appealing to consumers (Keckes, et al. 2013).

The dissolved solids content of honey is closely related to its sweetness and nutritional value. In this study, the concentration of dissolved solids ranged

from 79.5% to 82.6%. Honey from the Sharri municipality had the lowest dissolved solids content, whereas honey from the Prishtina municipality had the highest. The variation in dissolved solids content may be attributed to the diversity of nectar sources available to bees in different regions. Bees foraging in areas with a wide variety of floral sources may produce honey with higher dissolved solids content, resulting in a richer flavor profile. Understanding these variations is essential for beekeepers seeking to market honey with specific taste profiles.

The pH and acidity of honey are critical parameters that influence its taste and stability. The honey samples in this study exhibited pH values ranging from 3.56 to 5.60 and specific acidity values ranging from 4.97 to 56.3. While these values remained within acceptable ranges for honey, it is essential to note that even minor differences in pH and acidity can significantly impact flavor and shelf life. The observed variations in pH and acidity can be attributed to differences in the nectar sources and bee foraging behaviors across the regions. Honey from areas with a prevalence of specific types of flowers may exhibit distinct pH and acidity profiles, leading to unique flavor characteristics. Beekeepers may consider these variations when marketing honey for specific culinary or medicinal purposes.

The pH of honey typically falls in the range of 3.2 to 4.5, making it acidic in nature. This low pH contributes to honey's long shelf life by inhibiting the growth of many microorganisms. Honey's natural acidity also lends to its distinct flavor profile. The specific pH value of a honey sample can vary based on several factors, including the floral sources bees forage from and the geographical region of production (Annamaria Perna 2013).

Honey color is a prominent attribute that influences consumer preferences and marketability. In this study, the Pfund scale was used to determine honey color, with the results indicating variations across different regions of Kosovo. Honey from the Sharri, Prishtina, and Prizren municipalities exhibited white to extra white hues, while honey from Ferizaj, Obiliq, and Fushe-Kosovo regions ranged from white to extremely light white. Skenderaj and Drena regions also produced honey with exceptionally light white hues. These variations in honey color can be attributed to several factors, including the types of flowers and plants visited by bees, the age of the honey, and the beekeeping practices employed. Consumers often associate lighter honey with milder

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

flavors, while darker honey is perceived as having a more robust taste. Beekeepers can leverage these color variations to cater to different consumer preferences.

The chemical composition of honey, including its total protein, ash content, and mineral elements, provides insights into its nutritional value and potential health benefits.

Total protein content in honey is relatively low, typically ranging from 0.03% to 3.17%. Most honey samples in this study fell within the lower end of this range, with 17 samples containing less than 0.5g of total protein per 100g of honey. Only six samples had protein content between 0.5g and 1g per 100g, while three samples had protein content exceeding 1g per 100g. The variation in total protein content can be attributed to the diversity of nectar sources. Honey produced from the nectar of certain plants may have higher protein content. While honey is not a significant source of dietary protein, it may still contribute to overall nutrient intake.

In the different studies, the total protein content in honey is relatively low compared to other components like sugars and water. The protein content typically ranges from 0.02% to 0.5% of honey's total composition, making it a minor but significant fraction (Pasupuleti, et al. 2017).

The ash content of honey, which ranged from 0.01% to 0.78%, reflects the presence of mineral elements in the honey. Honey from Prishtina had the lowest ash content, while honey from Decani exhibited the highest. The ash content is influenced by both the floral sources of nectar and the geographical characteristics of the regions. Honey produced in grassland areas, where mineral-rich soil may be more prevalent, could exhibit higher ash content. Understanding these variations can help beekeepers and consumers make informed choices based on their nutritional preferences. The ash content of honey is a significant aspect of its composition, representing the inorganic mineral and trace element content. Ash content typically accounts for a small fraction of honey, generally ranging from 0.02% to 0.5% (da Silva, et al. 2016).

The presence of various mineral elements in honey, including sodium (Na), manganese (Mn), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), copper (Cu), iron (Fe), and zinc (Zn), contributes to its nutritional value. Sodium content in honey ranged from 170.03mg/kg to 600.00mg/kg, reflecting differences

in the mineral composition of the regions. Similarly, manganese levels varied, with some samples exhibiting concentrations below 0.1mg/kg and others ranging from 0.11% to 18.2mg/kg. Potassium levels exhibited significant differences, with concentrations ranging from 19.4mg/kg to 1898.00mg/kg. These variations may be attributed to the types of plants and soil compositions in the respective regions. Calcium content ranged from 89.2mg/kg to 295.7mg/kg, with lower levels observed in honey produced in grassland areas and higher levels in honey from regions with hilly terrain.

Magnesium levels varied between 5.05mg/kg and 97.9mg/kg, with some regions exhibiting substantial differences. The highest magnesium levels were observed in a sample, highlighting the potential impact of geological factors on mineral content. Copper levels varied, with ten samples showing concentrations below detection limits and others ranging from 0.17mg/kg to 0.58mg/kg. Iron content displayed significant differences, with concentrations ranging from 0.19mg/kg to 22.37mg/kg. Higher iron levels were observed in several samples, with notable concentrations in the capital city of Pristina and other regions.

Zinc levels ranged from 2.44mg/kg to 6.2mg/kg, with the highest levels detected in honey produced in the Decani municipality. The variations in mineral elements can be attributed to the specific geological and environmental conditions in each region. Soil composition, mineral deposits, and plant diversity all play roles in influencing the mineral content of honey. Consumers seeking honey with specific mineral profiles can use this information to make informed choices.

It is important to acknowledge some limitations of this study. The sample size, while representative of various regions in Kosovo, is relatively small. Future research with a larger sample size could provide more comprehensive insights into geographical variations in honey characteristics. Additionally, the study did not investigate the potential health benefits associated with these variations in honey composition. Further research could explore the nutritional and medicinal properties of honey from different regions in Kosovo.

Conclusion

In conclusion, the study conducted in Kosovo provides valuable information on the physicochemical properties and nutritional aspects of honey gathered from different locations in the

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

country. The results indicate that the physical and chemical properties of honey vary depending on the region where the bees feed and the geographical characteristics of that area. The study found that the moisture content, dissolved solids content % concentration, acidity, and pH of honey vary from region to region, and the Pfund scale is used to determine the color of honey in Kosovo. The color of honey is affected by various factors, including the nectar source, age of the honey, and beekeeper's processing methods. The study also shows that honey collected from Sharri is white in color, while honey from Prishtina is particularly light white and extra white. The results of the study can be used to support local beekeepers in producing high-quality honey with good nutritional value.

Overall, the study highlights the importance of understanding the properties of honey from different regions to determine its nutritional value and quality. It also emphasizes the significance of local beekeepers who play a crucial role in maintaining the bee population, producing honey, and preserving the environment. By supporting these beekeepers, we can not only ensure the availability of high-quality honey but also contribute to environmental conservation efforts. The study provides a starting point for future research that can explore further the factors that affect the physicochemical properties and nutritional value of honey in Kosovo and other regions.

Authors' contributions: The authors made an equal contribution to this study. They collaborated on study design, data collection and analysis, manuscript composition, and revision.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflicts of interest to be reported.

Data availability: All data and materials utilized and/or analyzed during the current study are accessible within this manuscript.

Ethical issue: Not applicable, as this study pertains to honey and does not involve animals or humans.

Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Source of Finance: Not applicable, as there is no funding source for this study.

REFERENCES

- Alaerjani WMA, Abu-Melha S, Alshareef RMH, Al-Farhan BS, Ghramh HA, Al-Shehri BMA *et al.* Biochemical Reactions and Their Biological Contributions in Honey. *Molecules*, 2022;27 (15)
- Annamaria Perna AS, Intaglietta I, Gambacorta E. Antioxidant Properties, Polyphenol Content and Colorimetric Characteristics of Different Floral Origin Honeys from Different Areas of Southern Italy. *Journal of Life Sciences*, 2013;7(4):428-436
- Beretta G, Orioli, M, Facino RM. Antioxidant and radical scavenging activity of honey in endothelial cell cultures (EA.hy926). *Planta Med*, 2007;73(11):1182-1189
- Bernolo MCBOL. Honey as Functional Food and Prospects in Natural Honey Production. *Functional Foods and Nutraceuticals*, 2020;1(2):197-210
- Bucekova M, Buriova M, Pekarik L, Majtan V, Majtan J. Phytochemicals-mediated production of hydrogen peroxide is crucial for high antibacterial activity of honeydew honey. *Sci Rep*, 2018;8(1):9061
- Cheung Y, Meenu M, Yu X, Xu B. Phenolic acids and flavonoids profiles of commercial honey from different floral sources and geographic sources. *International Journal of Food Properties*, 2019;22(1):290-308
- da Silva PM, Gauche C, Gonzaga LV, Costa AC, Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chem*, 2016;196:309-323
- Dizman S, Hodolli G, Kadiri S, Aliu H, Makolli S. Radioactivity in Kosovo Honey Samples. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2020;29(2):1119-1127
- Gasparrini M, Forbes-Hernandez TY, Giampieri F, Afrin S, Alvarez-Suarez JM, Mazzoni L *et al.* Anti-inflammatory effect of strawberry extract against LPS-induced stress in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol*, 2017;102: 1-10
- Gela A, Hora ZA, Kebebe D, Gebresilassie A. Physico-chemical characteristics of honey produced by stingless bees (*Meliponula beccarii*) from West Showa zone of Oromia Region, Ethiopia. *Heliyon*, 2021;7(1): e05875

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- Ibrahimi H, Hajdari A. Phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Kosovo. *Journal of Apicultural Research*, 2020;59(4):452-457
- Juszczak L, Socha R, Rożnowski J, Fortuna T, Nalepka K. Physicochemical properties and quality parameters of herbhoneys. *Food Chemistry*, 2009;113(2):538-542
- Karabagias IK, Badeka A, Kontakos S, Karabournioti S, Kontominas MG. Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chem*, 2014;146:548-557
- Karabagias IK, Karabournioti S. Discrimination of Clover and Citrus Honeys from Egypt According to Floral Type Using Easily Assessable Physicochemical Parameters and Discriminant Analysis: An External Validation of the Chemometric Approach. *Foods*, 2018;7 (5)
- Kasprzyk I, Depciuch J, Grabek-Lejko D, Parlinska-Wojtan M. FTIR-ATR spectroscopy of pollen and honey as a tool for unifloral honey authentication. The case study of rape honey. *Food Control*, 2018;84:33-40
- Kastrati G, Pacarizi M, Sopaj F, Tasev K, Stafilov T, Mustafa MK. Investigation of Concentration and Distribution of Elements in Three Environmental Compartments in the Region of Mitrovica, Kosovo: Soil, Honey and Bee Pollen. *Int J Environ Res Public Health*, 2021;18 (5)
- Keckes S, Gasic U, Velickovic TC, Milojkovic-Opsenica D, Natic M, Tesic Z. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. *Food Chem*, 2013;138(1):32-40
- Magdalena Kunat-Budzyńska AR, Wiater A, Grąz M, Andrejko M, Budzyński M, Bryś MS, Sudziński M, Tomczyk M, Gancarz M, Rusinek R, Ptaszyńska AA. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of New Honey Varietals. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2023;20 (3):1-21
- Magida Tabbara SM, Eddine RZ, Abiad M, Saoud I. Bioprocessing post-consumer food waste for use as a fish feed ingredient. *Aquaculture Research*, 2022;1(2):1-10
- McLoone P, Warnock M, Fyfe L. Honey: A realistic antimicrobial for disorders of the skin. *J Microbiol Immunol Infect*, 2016;49(2),161-167
- Mladenović M, Simeonova VD. The Variability of Wing Nervature Angles of Honey Bee from the North Kosovo Area. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 2014;24 (sup1):427-432
- Nascimento KSD, Gasparotto Sattler JA, Lauer Macedo LF, Serna González CV, Pereira de Melo IL, da Silva Araújo E. *et al.* Phenolic compounds, antioxidant capacity and physicochemical properties of Brazilian Apis mellifera honeys. *LWT*, 2018;91:85-94
- Noiset P, Cabirol N, Rojas-Oropeza M, Warrit N, Nkoba K, Vereecken NJ Honey compositional convergence and the parallel domestication of social bees. *Sci Rep*, 2022;12(1):18280
- Pauliuc D, Dranca F, Ropciuc S, Oroian M.. Advanced Characterization of Monofloral Honeys from Romania. *Agriculture*, 2022;12(4)
- Pasupuleti VR, Sammugam L, Ramesh N, Gan S. Honey, Propolis, and Royal Jelly: A Comprehensive Review of Their Biological Actions and Health Benefits. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 1259510
- Rama A, Haziri I, Miftari I, Zuka A, Zhuri B, Latifi A. *et al.* Determination of streptomycin residues in imported and locally produced honey in Kosovo. *International Journal of Food Contamination*, 2022.9(1)
- Rysha A, Kastrati G, Biber L, Sadiku V, Rysha A, Zogaj F. *et al.* Evaluating the Physicochemical Properties of Some Kosovo's and Imported Honey Samples. *Applied Sciences*, 2022;12(2)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

PARASITISATION POTENTIAL OF EGG AND LARVAL PARASITIDS AGAINST LESSER WAX MOTH *Achroia grisella* F. (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) UNDER STORED CONDITION

Yumurta ve Larval Parazitoidlerinin Küçük Mum Güvesi *Achroia grisella* F. (Lepidoptera: Pyralidae) Karşısında Saklanmış Şartlarda Parazitlenme Potansiyeli

Paulraj SABATINA¹, Govindasamy UMAPATHY²,
Pernamallur Ayyaswami SARAVANAN³

¹Department of Agricultural Entomology, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641-003, Tamil Nadu, INDIA, Corresponding author E-mail: sabinajustin@gmail.com, ORCID No: 0000-0002-8398-7108

²Department of Agricultural Entomology, Centre for Plant Protection Studies, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641-003, Tamil Nadu, INDIA, E-mail: umaphy@tnau.ac.in, ORCID No: 0000-0002-5616-4544

³Tapioca and Castor Research Station, Affiliated to Tamil Nadu Agricultural University, Yethapur, Salem 636-119, Tamil Nadu, INDIA, E-mail: entosaravanan@gmail.com, ORCID No: 0000-0001-8789-4497

Received / Geliş Tarihi: 31.08.2023

Accepted / Kabul Tarihi: 30.09.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1353063

ABSTRACT

The study conducted to evaluate the parasitisation potential of egg (*Trichogramma chilonis* Ishii) and larval parasitoids (*Bracon brevicornis* Wesmael and *Apanteles galleriae* Wilkinson) on the developmental stages of lesser wax moth, *Achroia grisella* F. The results indicated that a maximum parasitisation of 46.67% was noticed on egg masses released with seven pairs of *T. chilonis*, with an overall mean of 28.89 % and also the adult emergence was recorded about 59.49 %. Among the two larval parasitoids taken, the per cent parasitisation of lesser wax moth larvae by *A. galleriae* was maximum (38.68% overall mean) than by *B. brevicornis* (33.14%) with a mean adult emergence of 71.16% and 64.78% respectively.

Key words: Lesser wax moth, *Achroia grisella*, Bio-control agents, Parasitisation

ÖZ

Yumurta (*Trichogramma chilonis* Ishii) ve larva parazitoidlerinin (*Bracon brevicornis* Wesmael ve *Apanteles galleriae* Wilkinson) küçük mum güvesi *Achroia grisella* F'nin gelişim evreleri üzerindeki parazitlenme potansiyelini değerlendirmek için yürütülen bir çalışma yapılmıştır. Sonuçlar maksimum parazitlenmenin %46,67 olduğunu göstermektedir. Yedi çift *T. chilonis* ile salınan yumurta kütlelerinde toplam ortalama %28.89 ile fark edilmiş ve ayrıca ergin çıkışı yaklaşık %59.49 olarak kaydedilmiştir. Alınan iki larva parazitoidi arasında, küçük mum güvesi larvalarının *A. galleriae* tarafından parazitlenme yüzdesi, *B. brevicornis*'e (%33.14) göre maksimum (toplam ortalama %38.68), sırasıyla ortalama %71.16 ve %64.78'lik bir ergin çıkış oranı belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Küçük mum güvesi, *Achroia grisella*, Biyo-kontrol ajanları, Parazitlenme

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Çalışmanın Amacı: Balmumu güvesi *Achroia grisella* Fabricius (Lepidoptera: Pyralidae), bal arısı kolonileri için ciddi tehditlerden biridir ve kolonilerin tamamen tahrip olmasına ve bal veriminin düşmesine neden olur. Daha küçük mum güvelerine karşı sentetik pestisitlerin kullanılması, balın kirlenmesine ve bal arısı kolonileri ve hedef olmayan organizmalar üzerinde zararlı etkilere neden olur. Bu sorunların üstesinden gelmek için, böcek zararlılarını kontrol etmek için biyolojik kontrol ajanları kullanılmaktadır. Bu amaçla, yumurta (*Trichogramma chilonis* Ishii) ve larva parazitlerinin (*Bracon brevicornis* Wesmael ve *Apanteles galleriae* Wilkinson) daha az çevre dostu ve uygun maliyetli mum güvesine karşı parazitlenme potansiyeli üzerinde deneyler yapılmıştır.

Gereç ve yöntemler: Küçük balmumu güvesinin ve olgunlaşmamış aşamalarının toplu kültürü, böcek kafeslerinde bir yıllık bal toplanmış peteklerde sürdürüldü. *T. chilonis*'in parazitlenme potansiyeli, farklı güçlerde (bir çift ila yedi çift) yetişkin parazitoidlerin replikasyon başına 50 yumurtadan oluşan mum güvesi yumurta kütleleri üzerine salınmasıyla değerlendirildi. Larva parazitoidlerinin potansiyelinin değerlendirilmesi için "sandviç yöntemi" izlendi; bu yöntemde gebe dişi parazitoidler, besin kaynağı görevi gören bal ve suya (1:1 oranında) batırılmış bir pamuklu çubukla plastik kaplara aktarıldı.

Bulgular: Toplam ortalama %28.89 ve %59.49 parazitoid ergin çıkış ile yedi çift *T. chilonis* ile salınan yumurta kütlelerinde %46.67'lik maksimum parazitlenme fark edildi. Yüzde parazitlenme ve ergin çıkışının salınan parazitoidlerin sayısına karşılık geldiği belirlendi. Denenen iki larval parazitoid arasında, küçük mum güvesi larvalarının *A. galleriae* tarafından parazitlenme yüzdesi, sırasıyla %71.16 ve %64.78'lik ortalama ergin çıkışıyla *B. brevicornis*'e (%33.14) göre maksimum (toplam ortalama %38.68) olarak bulunmuştur.

Sonuç: Mevcut çalışmamız, biyolojik kontrol ajanlarının, depolanmış durumda *Achroia grisella* Fabricius'u kontrol etmek için en iyi alternatif olabileceğini, çünkü hedef olmayan organizmalara ve insanlara zararlı bir etki oluşturmadığını ortaya koymaktadır.

INTRODUCTION

According to Steffan-Dewenter *et al.* (2006), honey bees (*Apis* sp.) are dependable pollinators who pollinate nearly 70% of the world's important crops. They are also resourceful insects who produce honey, wax, resin, royal jelly, and other products. According to Raina (2006), honey bees are essential for ecosystem stability, poverty reduction, and food security. Honey bee pests *viz.*, small hive beetle, *Aethina tumida* Murray (Coleoptera: Nitidulidae), large hive beetle, *Oplostomus haroldi* Witte (Coleoptera: Cetoniidae), the greater wax moth (GWM), *Galleria mellonella* Linnaeus (Lepidoptera: Pyralidae), lesser wax moth (LWM), *Achroia grisella* Fabricius and an invasive mite, *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Parasitiformes: Varroidae) have all been reported to cause significant economic losses in honey bee colonies (Shimanuki *et al.*, 1980).

Wax moths are the potential threat to bee keeping due to its prolific development of larvae which devour wax, pollen and larvae of bees. Similar to the greater wax moth *G. mellonella* L. the coexistence and invasion by lesser wax moth, *Achroia grisella* F. is an additional concern to the beekeepers due to their extensive damage, resulting in heap of webs (*Galleriasis*) both under field and stored conditions. Both chemical and non-chemical management strategies applied to lessen the losses associated with wax moths' infestation are limited by various challenges due to the high degree of sensitive nature of honey bees and hive environment (Flint and Merkle, 1983 and Jafari *et al.*, 2010).

An exploitation of synthetic pesticides against lesser wax moth results in the contamination of honey, and detrimental effects on honey bee colonies and non-target organisms. However, it's essential to note that pesticides are not the sole treatment option for managing the lesser wax moth. There are three primary alternative methods such as, Biological control: *Bacillus thuringiensis*, a bacterium with commercially available spore preparations can be applied using a hand sprayer through which bacteria effectively invade and eliminate all wax moth larvae. Physical control: Chilling or freezing can be employed by placing combs in a freezer or relying on winter frosts in cold regions. Chemical control: Fumes of sulfur and strong acetic acid can be placed above boxes containing drawn comb, which are then sealed. These fumes penetrate the combs and help control the wax moth population. Additionally,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

chemical volatile oils and gaseous treatments like carbon dioxide, ozone, and nitrogen have been explored as treatment options (Ellis *et al.*, 2013 and Ghimire and Phillips, 2010). Hence, in order to find a suitable alternative to contain lesser wax moth infestation under stored conditions, the parasitisation potential of egg parasitoid, *Trichogramma chilonis* Ishii and two larval parasitoids *Bracon brevicornis* Wesmael and *Apanteles galleriae* Wilkinson were evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Experimental location

An experiment was done at the Apiary of the Department of Entomology under Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, Tamil Nadu, India.

Mass culturing of lesser wax moth

Lesser wax moths were mass cultured, together with their embryonic stages, on honey harvest combs from a year prior in insect cages (Fig. 2a), in a lab setting with a constant temperature of 27°C. *A. grisella* was mass cultured in plastic insect rearing boxes (Fig. 2b). The several instars of the larvae were distinguished based on their size and length. According to Paddock (1918), the diameter and length of the larvae were 1-30mm and 0.12-7.0mm, respectively. The larvae of the later instar (Fig. 1d) start to spin the cocoon (Fig. 1e), which they afterwards pupate (Fig. 1f) inside the cocoon. Development of the larvae takes 6-7 weeks. The

plastic lid's edges were where the pupation was located. The last two instars were when growth and size increased most frequently. Throughout its development, the larva goes through seven moults (Ellis *et al.* 2013). Moths were moved into a separate plastic container for the purpose of mating after becoming adults (Fig. 1g&h). To offer a surface for egg laying in the mating cage, paper scraps were introduced. Clusters of eggs are laid (Fig. 1a&b). In order to determine the parasitisation capacity of parasitoids on the developmental phases of the lesser wax moth, the newly hatched larvae were cultured and allowed to grow continuously (Fig. 1c).

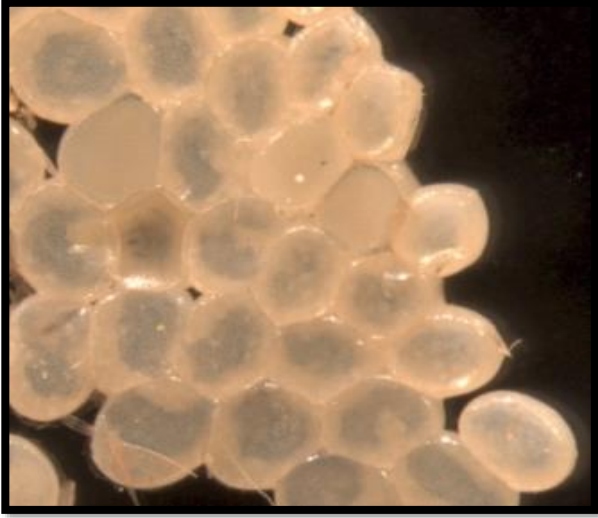
Experimental setup for Parasitisation potential assessment

The parasitisation potential of *T. chilonis* was assessed by releasing the adult parasitoids in different strengths (one pair to seven pairs) on the wax moth egg masses comprising of 50 eggs per replication and the observations on percent egg parasitized and mean adult parasitoids emerged from wax moth eggs were recorded.

For assessing the potential of larval parasitoids "sandwich method" (Fig. 3) was followed, in which gravid females parasitoids were transferred to plastic containers with a cotton swab soaked in honey and water (at 1:1 ratio) which acted as a food source. The container was covered with khada cloth and secured with the rubber bands and the wax moth larvae were placed above the khada cloth and then covered with another layer of khada cloth. This setup was kept undisturbed and observations were taken on third, fifth and seventh day after release.

$$\% \text{ Parasitisation} = \frac{\text{Number of larvae parasitized}}{\text{Total number of larvae taken}} \times 100$$

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



1a. Egg mass



1b. Egg mass (Magnified)



1c. Larval instars



1d. Larva (Magnified)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



1e. Pupal cocoon



1f. Pupa



1g. Adult moth



1h. Adult (Magnified)

Figure 1. Developmental stages of Lesser Wax Moth

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



2a. Wax moth culture under Rearing cage



2b. Lesser Wax Moth larvae feed on honey comb

Figure 2. Mass Culturing of Lesser Wax Moth



Figure 3. Sandwich method

Statistical Analysis

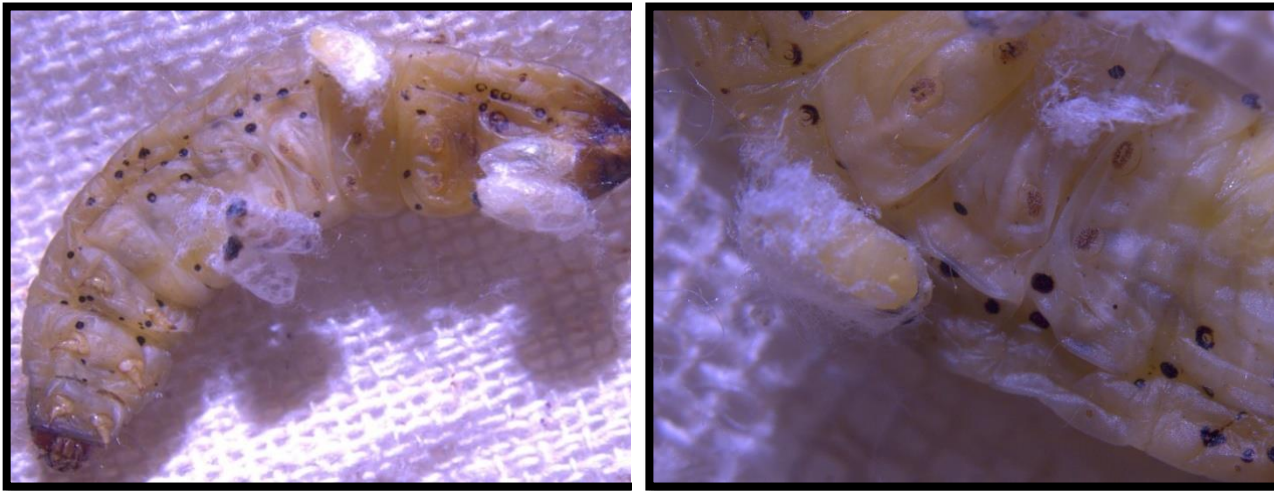
The experiments were set up using a Completely Randomised Block Design (CRBD) with three replications, and the means were sorted using Duncan's Multiple Range Test (DMRT) after the data were statistically analysed using Analysis of Variance (ANOVA) methods (Khan & Khanum,

1994). Furthermore, F test is used to compare the variance.

RESULTS

The results showed that when compared to the experimented strength of egg parasitoid, a maximum parasitisation of 46.67% was noticed on egg masses released with seven pairs of *T. chilonis*, with an overall mean of 28.89 % and 59.49 % of parasitoid adult emergence. It was noticed that the per cent parasitisation and adult emergence were corresponding to the number of parasitoids released (Table 1). Among the two larval parasitoids tried, the per cent parasitisation of lesser wax moth larvae by *A. galleriae* was maximum (38.68% overall mean) than by *B. brevicornis* (33.14%) (Fig. 4) with a mean adult emergence of 71.16% and 64.78% respectively (Fig. 5). Among different larval instars, the late instars (IV-VII) were preferred for higher level of parasitisation. There was nil per cent parasitisation in control which is maintained without the release of parasitoids. The study inferred the possible use of egg and larval parasitoids for the successful management of lesser wax moth under the storage conditions.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



4a. Pupae of *B. brevicornis* on host larva

4b. Parasitized wax moth larva with punctures

Figure 4. Parasitisation of Lesser Wax Moth larva by *Bracon brevicornis*

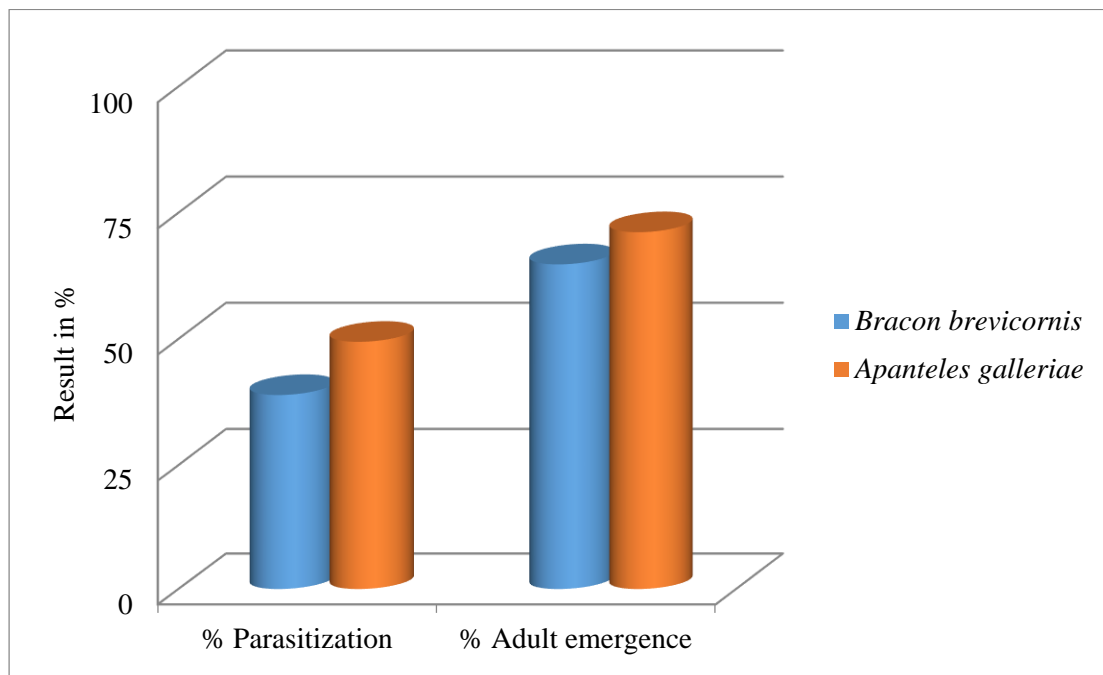


Figure 5. Evaluation of bio-control agents against lesser wax moth larvae

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 1. Parasitisation potential of parasitoids on egg and larvae of wax moths *A. grisella*

Egg parasitoid									
Treatment / larval instars	Per cent Larval parasitisation (<i>A. grisella</i>)*							Mean (% parasitisation)	Mean adult emergence (%)
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
Larval parasitoids									
<i>Bracon brevicornis</i>	0.00 (4.06)	10.00 (18.43) ^{ab}	30.00 (33.21) ^{ab}	43.33 (41.17) ^b	63.33 (52.73) ^{ab}	46.73 (43.13) ^{ab}	40.00 (39.23) ^{ab}	33.14	64.78
<i>Apanteles galleriae</i>	0.00 (4.06)	16.67 (24.09) ^a	40.00 (39.23) ^a	60.00 (50.77) ^a	70.00 (56.81) ^a	63.33 (52.73) ^a	46.67 (43.09) ^a	38.68	71.16
mean	4.06	21.26	36.22	45.97	54.77	47.93	41.16	-	
SD	0.00	4.72	7.07	11.79	4.72	11.74	4.72		
Egg parasitoid									
	1 pair	2 pairs	3 pairs	4 pairs	5 pairs	6 pairs	7 pairs	Mean parasitisation (%)	Mean adult emergence (%)
<i>T. chilonis</i>	4.23 (8.48) ^c	6.67 (10.71) ^c	23.33 (28.56) ^b	26.67 (30.79) ^b	33.33 (34.98) ^b	36.67 (43.02) ^{ab}	46.67 (43.05) ^a	28.89	59.49
F test for larval parasitoids Vs larval instars									
CD at 5%	Treatment (Larval parasitoids)							0.46	
	Larval instars							0.87	
	T * L							1.23	

Note: *Mean of five replications. Figures with brackets represent values that have undergone arc sine transformation; SD–Standard Deviation, CD–Critical Difference; those without the same alphabetical letters in the same column differ significantly from one another at $p < 0.05$. Here, alphabets used for DMRT test.

DISCUSSION

In general, reports on the application of bio-control agents against wax moths are sporadic and limited due to the fact that employing parasitoids in a live colony has least scope. However, attempts were made to evaluate the parasitisation efficiency of egg and larval parasitoids under storage conditions due to its practicality.

In addition, the present experiment exhibited a positive correlation between host size and per cent parasitisation by *B. brevicornis* which deposited supplementary eggs on superior hosts (later instar) than the smaller ones (early instar), which is in conformity with the findings of Taylor (1988). Presumably, the parasitoid adjusts their clutch size as per the nutritional value of the host insect, thereby avoiding larval competition among progeny (Taylor, 1988). The oviposition rate and percent emergence of *B. brevicornis* was observed to be maximum on 5th instar larvae of lesser wax moths (63.33%) and

the successful parasitisation decreased drastically with host age after 5th instar. Accordingly, the parasitisation by *A. galleriae* was observed to be minimum on early stage larvae (1st-3rd instar) as the parasitoids require long time to complete their larval development (Acevedo-Gonzalez *et al.*, 2019). The 5th larval instar of lesser wax moth was found to be most suitable for parasitisation due to its optimum size.

The parasitisation potential of *T. chilonis*, inferred that it could be a potential biological control agent against eggs of wax moths under storage conditions. The rate of parasitisation increased with respect to the enhanced number of pairs released on the target pest. Release of seven pairs of *T. chilonis* resulted in higher parasitisation of 46.67% on *A. grisella* eggs. The role of egg parasitoids for the pest management was well established and reported as a dependable and safer method (Hood *et al.*, 2003).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

The present study could be the best one among all other control measures when compared to the outcome of Kumar and Khan (2020) who stated that management of the wax moth in order to reduce losses in storage conditions, it is recommended that the combs should be treated with Neem oil (3%) or Sulphur fumigation. These control measure will lead to the detrimental effect on honey bee colonies in terms of inducing feeding deterrence.

Conclusion

Our present study revealed that biological control agents could be the best alternative to control *Achroia grisella* Fabricius when compared to chemical methods under stored condition as it does not pose any harmful effect to non target organisms and also human beings. Furthermore, *Trichogramma chilonis* (egg parasitoid) and *Apanteles galleriae* (larval parasitoid) which can be highly recommended as bio-control agents among other egg and larval parasitoids for the successful management of lesser wax moths under stored condition.

Acknowledgement: I express my sincere gratitude to my beloved chairman, Dr. G. Umaphy, Entomologist (TNAU) and my research co-guide Dr. P.A. Saravanan, Entomologist (TCRS, TNAU) for their immense guidance and valuable support throughout the research work which was the part of my master's thesis.

Author contribution: P. Sabatina: Data collection, analysis and result interpretation; Dr. G. Umaphy: Study conception and manuscript correction; Dr. P.A. Saravanan: Study design and manuscript editing.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Data availability: Not applicable

Ethical issues: Not applicable

Source of finance for the study: Not applicable

REFERENCES

Acevedo-Gonzalez JP, Galindo-Cardona A, Avalos A, Whitfield CW, Rodriguez DM, Uribe-Rubio JL, Giray T. Colonization history and population differentiation of the Honey Bees (*Apis mellifera* L.) in Puerto Rico. *Ecology and Evolution*, 2019;9(19), pp.10895-10902

Ellis JD, Graham JR, Mortenson A. Standard methods for Wax moth research. *J. Apic. Res.* 2013;52:1-17

Flint H, Merkle J. Mating behavior, sex pheromone responses, and radiation sterilization of the greater wax moth (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of economic entomology*, 1983;76(3): 67-472

Ghimire, MN, Phillips, TW. Suitability of different lepidopteran host species for development of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Environmental Entomology*, 2010;39(2):449-458

Hood WM, Horton PM, McCreadie JW. Field evaluation of the red imported fire ant (Hymenoptera: Formicidae) for the control of wax moths (Lepidoptera: Pyralidae) in stored honey bee comb. *Journal of agricultural and urban entomology*. 2003;20(2):93-103

Jafari R, Goldasteh S, Afrogheh S. Control of the wax moth *Galleria mellonella* L.(Lepidoptera: Pyralidae) by the male sterile technique (MST). *Archives of Biological Sciences*. 2010;62(2):309-313

Khan IA, Khanum A. *Fundamentals of Bio-statistics*. Vkaaz Publication, Hyderabad, India, 1994, pp. 3492-431

Kumar, G., & Khan, M.S. Ecofriendly Management of Greater Wax Moth (*Galleria mellonella*) Infesting Combs Under Storage, *Ind. J. Pure App. Biosci*, 2020;8(4):237-245

Paddock FB. *The Beemoth or Waxworm*; Texas Agricultural Experiment Stations: College Station, TX, US, 1918

Raina S. Role of the commercial insects program. *IDB/IFAD International Workshop on Promotion of income Generation Activities in the NENA Region Based on Sericulture and Apiculture*, 2006

Shimanuki H, Knox D, Furgala B, Caron D, Williams J. Diseases and pests of honey bees. *Beekeeping in the United States. Agriculture Handbook*, 1980, 335:118-128

Taylor CR. Speed, stride frequency and energy cost per stride: how do they change with body size and gait? *Journal of Experimental Biology*, 1988;138(1):301-318

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

PROPOLİS VE ARI SÜTÜ İÇEREN CİLT KREMİ: ANTIOKSİDAN, ANTI-HYALÜRONİDAZ VE ANTİMİKROBİYAL AKTİVİTELERİN DEĞERLENDİRMESİ

Propolis and royal jelly containing skin cream: The evaluation of antioxidant, anti-hyaluronidase, and antimicrobial activities

Gülsüm Merve BOYRACI^{1*}, Atiye DEĞİRMENCİ¹, Oktay YILDIZ^{2,3},
Zeynep Berin ÇELEBİ⁴

¹Gıda İşleme Bölümü, Maçka Meslek Yüksekokulu, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, TÜRKİYE, Yazışma yazarı/Corresponding author E-posta: mertveturkut@ktu.edu.tr, ORCID No: 0000-0002-6036-8072; E-posta: atiyeyaygaz@ktu.edu.tr, ORCID No: 0000-0003-4767-2667.

²Biyokimya Bölümü, Temel Eczacılık, Eczacılık Fakültesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, TÜRKİYE.

³Oktanatura Ar-Ge Mühendislik Hizmetleri Anonim Şirketi, Trabzon, TÜRKİYE, E-posta: oktayyildiz@ktu.edu.tr, ORCID No: 0000-0003-0436-682X.

⁴Eczacılık Fakültesi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon, TÜRKİYE, E-posta: zeynepberincelebi@gmail.com, ORCID No: 0009-0001-2606-8973.

Geliş Tarihi / Received: 04.09.2023

Kabul Tarihi / Accepted: 24.10.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1355264

ÖZ

Propolis ve arı sütü eski çağlardan beri geleneksel ve modern tıpta çeşitli biyolojik aktivitelerinden dolayı kullanılmıştır. Günümüzde yapılan son çalışmalar bu ürünlerin cilt tedavisi ve bakımı alanındaki potansiyel uygulamalarını ortaya koymuştur. Bu çalışmanın amacı, cilt kremi üretiminde propolis ve arı sütünün potansiyel kullanımını incelemek ve arı ürünleriyle zenginleştirilmiş cilt kremi formülasyonunun anti-hyaluronidaz, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmektir. Ayrıca kremlerin farklı depolama sıcaklığı ve süresindeki fiziksel stabilitesi de incelenmiştir. Krem formülasyonunda arı sütü oranı (%0,5) sabit tutulurken propolis özütü %0,5-1,0-1,5 oranlarında kullanılmıştır. Çalışmada üretilen kremlerin pH değerleri 5,56 ile 6,02 aralığında değişmekte olup cilt pH değerine uygun bulunmuştur. Krem formülasyonunda propolis oranı arttıkça antioksidan aktivite değerlerinin istatistiksel olarak arttığı görülmüştür ($p \leq 0,05$). Krem örneklerinin anti-hyaluronidaz aktivite analizi sonucu IC_{50} değerleri 0,1667-3,3460 g/mL krem olarak belirlenmiş ve en yüksek aktivite %1,5 propolis özütü ilaveli örnekte bulunmuştur. Propolis ve arı sütü ilaveli krem örneklerinin tamamı *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Candida albicans* mikroorganizmalarına karşı inhibisyon göstermiştir. Hızlandırılmış stabilite testleri krem formülasyonun tüm stres koşullarına karşı dikkate değer bir stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Bu çalışma kozmetik sektöründe doğal, sürdürülebilir ve güvenli cilt bakım ürünleri üretebilmek için krem formülasyonuna arı ürünlerini entegre etmenin uygulanabilirliğine dair kanıt sağlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Propolis, Arı sütü, Krem, Cilt yenileyici etki, Anti-hyaluronidaz aktivite

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

ABSTRACT

Propolis and royal jelly have been used in traditional and modern medical practices since earlier times, owing to their diverse range of biological activities. Recent studies have demonstrated the potential application of these products in the field of skin treatment and care. The purpose of this study is to examine the potential application of propolis and royal jelly in cream formulation and to evaluate the anti-hyaluronidase, antioxidant, and antimicrobial activities of skin cream formulation enriched with bee products. It was also investigated the physical stability of creams at various storage temperatures and durations. The cream formulation maintained a ratio of royal jelly at 0,5% while varying amounts of propolis extract ranging from 0,5% to 1,0% to 1,5% were utilized. The pH values of the creams examined in the study ranged from 5,56 to 6,02, indicating that they were compatible with the pH value of the skin. It was observed that the antioxidant activity values increased statistically as the propolis ratio increased in the cream formulation. As a result of the antihyaluronidase activity analysis of the cream samples, the IC₅₀ values were determined as 0,1667-3,3460 g/mL cream and the sample with 1,5% propolis extract showed the highest activity. The cream samples with propolis and royal jelly exhibited inhibitory activity against *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Candida albicans*. The results of accelerated stability testing indicate that the cream formulation exhibits exceptional stability when subjected to various stress situations. This study provides evidence of the feasibility of integrating bee products into cream formulation to produce natural, sustainable, and safe skin care products in the cosmetics industry.

Keywords: Propolis, Royal jelly, Cream, Skin regenerating effect, Anti-hyaluronidase activity

EXTENDED ABSTRACT

Aim: Today, there is a growing interest in cosmetics containing natural biologically active substances derived from bee products. Propolis and royal jelly, which are bee products, are utilized in numerous therapeutic and cosmetic skin products, including balms, creams, lotions, and lipsticks, due to their moisturizing, skin regenerating, and antiseptic properties.

The objective of this study is to investigate the potential utilization of propolis and royal jelly in the formulation of creams, as well as to assess the effects of these bee products on the anti-hyaluronidase, antioxidant, and antibacterial properties of the creams.

Material and Method: In present study developed a design of a cream formulation comprising various ratios (0,5%,1%, and 1,5%) of propolis extract combined with a fixed ratio (0,5%) of royal jelly. In order to assess the physicochemical and biochemical impacts of royal jelly and propolis on the cream formulation, a control sample was employed. Propolis extract was prepared with 70% glycol solvent and lyophilized royal jelly was used in this study. The Folin–Ciocalteu method was employed to measure the total phenols content, whereas the determination of total flavonoid content was conducted using the aluminum chloride colorimetric

method. The inhibition of the hyaluronidase enzyme was conducted with the methodology suggested by the Sigma protocol, and the results are reported as IC₅₀ values. The antibacterial activity of creams was tested with the disc diffusion method against *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis*, and *C. albicans*.

Results: The pH values of the creams containing propolis and royal jelly exhibited a range of 5,26 to 5,54. According to statistical analysis, the cream sample containing 1,5% propolis extract exhibited the greatest total phenolic content (TPC), total flavonoid (TF) content, and ferric-reducing antioxidant power (FRAP) values. The TPC, TF, and FRAP values were determined to be 0,786±0,101 mg GAE/g cream, 0,489±0,033 mg QE/g cream, and 4,004±0,378 µmol TE/g cream, respectively. All cream samples displayed antihyaluronidase activity, with Cream 3 having the lowest IC₅₀ value of 0,16672 g/mL. Furthermore, the IC₅₀ values of propolis and royal jelly were found to be 0,00632 and 0,00504 g/mL, respectively. A significant enhancement in the inhibitory effect against *S. aureus* and *S. epidermis* bacteria was seen when the concentration of propolis extract was raised from 0,5% to 1,5%. The cream formulations were subjected to storage at temperatures of 4, 25, and 40°C for a duration of 30 days. Throughout this period, the pH levels, color, and skin feel attributes of the creams exhibited

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

stability, with no observable phase separation occurring.

Conclusion: According to the current findings, the cream formulation enhanced with propolis and royal jelly contains bioactive components resulting in a range of beneficial effects such as antioxidant, antihyaluronidase, and antibacterial. The use of royal jelly, which can degrade and oxidize swiftly due to its structure, together with propolis has increased royal jelly's resistance to deterioration in cosmetics. The stability findings indicated that the emulsion structure and visual characteristics of the creams were consistent across various stress conditions, with no observable indications of phase separation. In addition, this study on the development of a cream formulation containing propolis and royal jelly is a preliminary study and has proven the usability of similar ingredients in skin rejuvenating and wrinkle-removing cosmetic products. Furthermore, these cream formulations have exhibited potential in the development of skin products intended for the treatment of diverse skin ailments caused by *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. Epidermis*, and *C. albicans*.

GİRİŞ

Son yıllarda, sanayileşmiş ülkelerde doğal kaynaklardan elde edilen ilaç ve kozmetik ürünlere yönelik eğilim artmaktadır. Birçok araştırmacı, kozmetik ürünlere çeşitli biyolojik kaynaklardan elde edilen doğal bileşiklerin potansiyel kullanımlarını araştırmaktadır (Lee ve Hyun 2023). Arı ürünleri yüzyıllardır gıda, tıbbi ve kozmetik amaçlarla kullanılmış olup, gün yüzüne çıkarılan yeni özellikleri sayesinde kullanımları her geçen gün artarak devam etmektedir (Kowalczuk vd. 2023). Bal, propolis, arı sütü, polen, arı zehri, bal mumu gibi arı ürünleri biyoaktif özellikleri nedeniyle ilaç ve kozmetik ürünlerinin önemli bileşenleri olarak değerlendirilmektedirler (Kurek-Górecka vd. 2020).

Propolis; yaprak tomurcukları, zamk, bitki salgıları ve çiçekler gibi çeşitli bitkisel unsurların bal arıları (*Apis mellifera*) tarafından toplanarak enzimler ile muamelesi sonucu dönüştürdüğü reçinemi bir maddedir (Sá vd. 2023; Turkut vd. 2019). Propolis, arı kovanlarında boşlukları kapatma, mikroorganizmaları ve böcekleri uzak tutma, hava akışını ve sıcaklığı düzenleme, su sızmasına karşı etkili bir bariyer oluşturma gibi amaçlarla kullanılmaktadır (Sá vd. 2023, Dizman vd. 2020).

Propolisin sahip olduğu zengin fenolik bileşenlerden kaynaklandığı düşünülen birçok biyolojik özelliğini değerlendirmek amacıyla sayısız *in vitro* ve *in vivo* çalışma yapılmıştır. Bu özellikler arasında antimikrobiyal, antioksidan, yara iyileştirici, antiparaziter, antiviral, anti-inflamatuar, antikanser ve antidiyabetik etkiler bulunmaktadır (Belmehti vd. 2023, Dizman vd. 2020; Kowalczuk vd. 2023, Rocha vd. 2023). Bu etkiler göz önüne alınarak propolis içeren birçok ürün üretilmiş ve ticarileştirilmiştir. Bunlar arasında sağlık odaklı gıda ve içecekler ile kozmetik ürünler de yer almaktadır (Bankova vd. 2016). Propolisin kozmetikte kullanımı, özellikle kolajen üretiminin uyarılması da dahil olmak üzere cilt üzerindeki yararlı bakteriyostatik ve yenileyici etkileriyle ilişkilidir (Olczyk vd. 2014).

Arı sütü (RJ), 5-15 günlük yaştaki işçi arıların üst çene ve boğaz bezleri tarafından üretilen bir maddedir ve bal arısı larvalarının diyetinin önemli bir bileşenidir. Bal arısı kolonisindeki kастların farklılaşmasında önemli bir rol oynamaktadır (Bărnuțiu vd. 2011; Pavel vd. 2011). Arı sütü hem geleneksel hem de modern tıpta yaygın olarak kullanılan bir gıda takviyesidir. İnsanlar için alternatif tıpta kullanılan en etkili ve faydalı arı ürünlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Çok sayıda serbest amino asit, protein, karbohidrat, lipit, vitamin, enzim, hormon, oligo-element ve doğal antibiyotik bulunması sayesinde arı sütü, antioksidan, antimikrobiyal, yaşlanma karşıtı, yara iyileştirici, antiinflamatuvar gibi çok çeşitli özelliklere sahiptir (Bărnuțiu vd. 2011, Civelek 2022 Pavel vd. 2011). Antioksidatif, antibakteriyel, antiinflamatuvar ve yara iyileştirici özelliklerin varlığı, arı sütünü kozmetik ve cilt bakımı formülasyonlarına dahil edilmek için oldukça uygun bir bileşen haline getirmektedir (Civelek 2022). Arı sütü, dokulardaki metabolizmanın uyarılması nedeniyle dokuların rejeneratif süreçlerini iyileştirme özelliğine sahiptir. Kremlerde, balzamlarda ve losyonlarda yenileyici, besleyici ve iyileştirici özellikleri nedeniyle kullanılmaktadır (Kurek-Górecka vd. 2020).

Hyalüronik asit (HA) bağ doku hücreleri tarafından membranda sentezlenen ve ekstrasellüler boşluğa salgılanan bir glikozaminoglikan türüdür. Hücre dışı matriksin ana bileşeni olarak atfedilmekte olup vücutta dokuları bir arada tutma fonksiyonuna sahiptir (Atagün 2022). HA, cildin nemlendirilmesi, yaşlanma karşıtı etkisi, cildin elastikiyetini iyileştirmesi gibi etkileri ile neredeyse tüm kozmetik ürünlerinde popüler bir bileşen olarak kullanılmaktadır (Yasin vd. 2022). Hyalüronidaz,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

vücuttaki HA'ı hidrolizleyen bir enzim olup HA üzerindeki kontrolsüz aktiviteleri ciltte nem kaybına yol açarak cilt yaşlanmasını ve çeşitli cilt bozuklukları tetikleyebilmektedir (Papaemmanouil vd. 2022). Doğadaki birçok bileşenin yapısında bulunan polifenoller, flavonoidler, sinamik asit türevleri ve lipid asitler doğal hyaluronidaz inhibitörleri olup antioksidan, antimikrobiyal, yaşlanma karşıtı ve kırışıklık karşıtı potansiyellere sahiptir (Girish vd. 2009; Papaemmanouil vd. 2022). Son yıllarda kozmetik endüstrisi, doğal bileşenlerden yapılmış yeni cilt bakım ürünleri geliştirmeye ve bu bileşenlerin kaynaklarını da içeren şekilde ekoloji dostu ürünleri desteklemeye ilgi duymaktadır. Bu ürünlerin doğal antioksidanlar, anti-inflamatuar ve yaşlanma karşıtı bileşenlerle zenginleştirilmiş bir formda piyasaya sunulması ile çevre dostu ürünlerin üretiminin teşvik edilmesi amaçlanmaktadır (Dini ve Laneri, 2021). Bu çalışmanın amacı, kozmetik olarak kullanılabilir cilt yenileyici etkiye sahip propolis ve arı sütü içeren stabil bir cilt kremi formülasyonunu geliştirmektir. Ayrıca geliştirilen krem formülasyonlarının antiyaluronidaz, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini değerlendirmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Propolis ekstraktlarının hazırlanması

Çalışmada kullanılan propolis ve arı sütü 2022 yılında Gümüşhane ilindeki yerel arıcılardan temin edilmiştir. Propolis ekstraktı, Yıldız (2020)'de belirtilen yöntemin modifiye edilmesi ile hazırlanmıştır. Ekstraksiyondan önce ham propolis laboratuvar tipi öğütücüde (Waring, HGB2WTG4, ABD) öğütülmüş ve 30 g ham propolis üzerine 70 mL glikol (%50'lik) ilave edilerek 60 °C'de 24 saat süre ile çalkalamalı inkübatörde (60 rpm) (Microtest, MC55, Ankara, Türkiye) ekstraksiyona tabi tutulmuştur.

Arı sütü ve propolis içeren kremler formülasyonunun hazırlanması

Propolis ve arı sütü içeren krem üretiminde üç farklı propolis oranı (%0,5-1-1,5) ve %0,5 sabit oranda arı sütü kullanılmıştır. Propolis ve arı sütünün krem örneklerinin biyolojik aktivite ve stabiliteyi üzerine etkilerinin kıyaslanması amacıyla propolis ve arı sütü içermeyen kontrol örneği ile çalışılmıştır. Krem formülasyonu Tanuğur Samancı ve Kekeçoğlu (2022)'nin çalışmalarında belirtilen yöntemin modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur. Krem üretiminde su fazı 60 °C'deki saf suya %0,1

oranında keçiyoynuzu zamkı ve %10 oranında gliserin eklenmesi ve 10 dk karıştırıldıktan sonra sıcaklığın 30 °C'ye düşürülmesi ve ardından %0,5 oranında arı sütü ilave edilmesi ile hazırlanmıştır. Yağ fazının oluşturulmasında ise stearyl alkol (%10), shea yağı (%10), balmumu (%7), avokado yağı (%6) ve zeytinyağı (%6) tartılarak ayrı bir beherde 60 °C'de karıştırılmıştır. Homojen hale gelen karışımın sıcaklığı 65 °C'ye düşürülerek E vitamini ve belirtilen oranlarda propolis eklenerek 10 dakika daha karıştırılmıştır. Son olarak su ve yağ fazı homojenizatör (IKA,T-18B, Ultra-Turrax, Almanya) kullanılarak birleştirilmiş ve ambalajlara alınmıştır. %0,5 propolis ilaveli krem örneği Krem 1, %1,0 ve %1,5 propolis özütü içerenler kremler ise sırasıyla Krem 2 ve Krem 3 olarak kodlanmıştır.

Biyokimyasal analizler ve antimikrobiyal analiz için 1 g krem örneği üzerine 10 mL metanol eklenip 15 dk karıştırılmıştır. Hazırlanan çözelti 3000 rpm'de 15 dk santrifüj edikten sonra çökelti dışındaki üst faz alınarak analizlerde kullanılmıştır (Dorken 2022).

Krem örneklerinin hızlandırılmış stabilite testleri

Kremlerin emülsiyon stabilitesinin belirlenmesi amacıyla üretimden 24 saat sonra +4 °C ± 0,1 °C, 25 °C ± 0,1 °C ve 40 °C ± 0,1 °C'de farklı sıcaklık stresi altında 30 gün süreyle hızlı yaşlandırmaya maruz bırakılmıştır. Takip sırasında pH, renk, toplam canlı ve maya-küf analizleri ve duyuşsal (görünüş, faz ayrımı, koku, ciltte his) analizleri yapılmıştır (Srisuksomwong vd. 2023).

Krem örneklerinin pH değerleri Ordu vd (2018)'de belirtildiği şekilde 0,5 g örnek alınarak 50 mL saf suda çözündürüldü ve pH değerleri ölçüldü (Hanna Instrument, pH 211, Romanya). Renk analizleri için kremler renk ölçüm kabına altına hiç hava kabarcığı kalmayacak şekilde ve ışığı geçirmeyecek kalınlıkta (1cm) yayılmıştır. Minolta marka renk ölçüm cihazı (Minolta, CR5, Japonya) kullanılarak ölçümler yapılmış ve L^* (parlaklık), a^* (+: kırmızı, -: yeşil) ve b^* (+: sarı, -: mavi) değerleri açısından değerlendirilmiştir (Muriel-Galet vd. 2015). Krem örneklerinden 1g alınıp 9 mL %0,1'lik steril peptonlu su ile karıştırıcıda 3 dk karıştırıldıktan sonra steril peptonlu su ile desimal dilüsyonları (10^{-9} 'a kadar) hazırlanarak dökme plak yöntemiyle çalışıldı. Örneklerin toplam mezofilik aerobik mikroorganizma sayımı için Plate Count Agar (PCA) besiyeri kullanılmış olup örnekler 35 °C'de 48 saat (FDA-BAM, 2001a) ve maya küf sayımı için Malt Extract Agar (MEA) besiyerinde 25 °C'de 5 gün inkübasyon

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

sonunda koloni sayımları yapılmıştır. Sonuçlar kob/g olarak ifade edilmiştir (FDA-BAM, 2001b).

RP-HPLC-PDA ile fenolik bileşenlerin tayini

Propolis ekstraktının fenolik bileşen kompozisyonunun belirlenmesi için 10 mL ekstraktın seyreltik HCl kullanılarak pH değeri 2'ye ayarlanmıştır. Sonrasında 10 mL dietil eter ilave edilerek oda sıcaklığında 15 dk 200 rpm hızda çalkalamalı su banyosunda (Nüve, ST-30, Ankara, Türkiye) çalkalanmıştır. Üst fazın alınmasından sonra aynı işlem 5 mL daha dietil eter ilavesi ile tekrarlanmıştır. Aynı prosedür etil asetat kullanılarak gerçekleştirilmiş ve çözücü 40 °C'de evaporatör yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Kalıntı 2 mL metanolde çözülüp 0,45 µM filtreden geçirilmiştir (Kara 2020).

Propolis ekstraktının fenolik kompozisyonun belirlenmesinde 25 standart fenolik madde (*m*-OH benzoik asit, protokatekuik asit, *p*-OH benzoik asit, ellagik asit, daidzein, rutin, gallik asit, epikateşin, şiringik asit, *t*-sinnamik asit, hesperetin, krisin, pinosembirin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, klorojenik asit, kafeik asit, apigenin, resveratrol, kafeik asit fenil ester (CAPE), myrisetin, luteolin, kuersetin, ramnetin ve kurkumin) ile çalışılmış olup analizler HPLC cihazında (Shimadzu Corporation, LC 20AT, Kyoto, Japonya) PDA dedektör kullanılarak yapılmıştır. Analizde ters faz C18 kolonu (150 mm x 4,6 mm, 5 µm; Fortis) kullanılarak ikili çözücü gradient programı (A: %2 asetik asit (saf suda); B: %70 asetonitril (saf suda)) uygulanarak gerçekleştirilmiştir (Yıldız ve Boyracı 2020). Kolon sıcaklığı 30 °C, akış hacmi 1,0 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 20 µL şeklindedir.

Toplam fenolik madde tayini

Krem örnekleri, propolis ve arı sütünün toplam fenolik madde (TFM) içeriği Folin Ciocalteu metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak gerçekleştirilmiştir (Slinkard ve Singleton 1977). Sırasıyla 20 µL örnek, 680 µL saf su ve 400 µL 0,2 N Folin Ciocalteu reaktifi karıştırılarak 3 dakika karanlıkta bekletilmiştir. Ardından %10'luk 400 µL Na₂CO₃ çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Karanlıkta ve oda koşullarında 2 saatlik inkübasyon sonucunda UV-Vis spektrofotometre (Biochrom Libra) ile 760 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda gallik asit kullanılmış olup sonuçlar mg gallik asit eş değeri (GAE) / g örnek olarak verilmiştir.

Alüminyum klorür yöntemi ile toplam flavonoid tayini

Örneklerin flavanoid içeriği Balkan vd. (2018)'de belirtilen alüminyum klorür metodunun modifiye edilmesi ile belirlenmiştir. Analizde 60 µL örnek üzerine 540 µL metanol ve 600 µL %2'lik metanolik AlCl₃ çözeltisi ilave edilerek karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dk inkübasyon sonrası spektrofotometrede 510 nm dalga boyunda absorbanslar ölçülmüştür. Standart olarak farklı konsantrasyonlarda (1-0,5-0,25-0,125-0,0625-0,03125 mg/mL) hazırlanan kuersetin çözeltileri kullanılmış ve sonuçlar mg KE (kuersetin eş değeri)/ g örnek olarak verilmiştir.

Demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) tayini

Örneklerin antioksidan kapasite tayini Troloks eşdeğeri olarak Benzie ve Strain (1999) tarafından geliştirilen yöntemin modifikasyonu ile belirlenmiştir. FRAP reaktifi sırasıyla 10:1:1 oranlarında 10 mM TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazin) (40 mM HCl ile hazırlanan), 0,3 M asetat tampon çözeltisi (pH 3,6) ve 20 mM FeCl₃ çözeltisinin karıştırılması ile taze olarak hazırlanmıştır. Test prosedürü 50 µL örnek ve 1,5 mL of FRAP reaktifinin karıştırılarak 37 °C'de 4 dakika inkübe edilmesi ve devamında spektrofotometrede 595 nm dalga boyunda ölçülmesi şeklindedir. Sonuçlar µmol Troloks eşdeğeri (TE) /g örnek olarak verilmiştir.

Hyaluronidaz enzim inhibisyonu

Hyaluronidaz enzim inhibisyonu tespiti Sigma tarafından önerilen yöntemde bazı modifikasyonlar yapılması ile gerçekleştirilmiştir (Yahaya ve Don 2012). Test tüpüne sırasıyla 100 µL enzim (1,67 ünite), 100 µL fosfat tamponu (pH 7) ve 25 µL örnek eklendikten sonra 37 °C'de 10 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Devamında reaksiyon, hyalüronik asit çözeltisi (sodyum fosfat içinde %0,01 hyalüronik asit, pH 5.35) formundaki substrattan 100 µL ilave edilerek başlatılmış ve 37 °C'de 40 dakika inkübasyon yapılmıştır. Süre sonunda 1 mL asetat tamponu (pH 3,75) ilave edilerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve reaksiyonu durdurmak için tüpler kaynar su banyosunda 1 dk tutulmuştur. 600 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülmüş ve IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Antimikrobiyal aktivite tayini

Propolis, arı sütü ve krem örneklerinin antimikrobiyal etkinliği *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 35218 *Bacillus cereus*,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Staphylococcus epidermis ve *Candida albicans* ATCC 10231 mikroorganizmalarına karşı agar kuyucuk yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Besi yeri olarak kullanılan Mueller Hinton agar (MHA) üzerine bakteriler için 0,5 ve maya için 2,0 Mc Farland bulanıklık standardı eşdeğeri kültürler steril eküvyon çubuğu kullanılarak sürüldü. Besi yeri üzerine steril mantar delici (6 mm çap) ile oyuklar açılarak her oyuğa 50 µL örnek ilave edilmiştir. 37 °C'de 24 saat inkübasyon sonunda oyukların etrafında oluşan zon çapları (mm) ölçülmüştür (Sönmez 2023).

İstatistiksel analiz

Çalışmadaki tüm analizlerin sonuçları SPSS 20.00 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) programı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Tüm analizler üç paralel halinde gerçekleştirilmiş olup sonuçlar ortalama ve standart sapması olarak ifade edilmiştir. Ortalama değerler arasındaki farkları belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile Duncan çoklu karşılaştırma testi yapıldı ($p \leq 0,05$).

BULGULAR

HPLC ile fenolik bileşen tayini sonuçları

Çalışmada kullanılan propolis ekstraktının (0,3 g/mL) fenolik bileşenleri Tablo 1'de verilmiştir. Glikolik propolis ekstraktında fenolik bileşenlerden en yüksek konsantrasyonda 14,6±0,13 mg/g CAPE ve en düşük konsantrasyonda 0,31±0,01 mg/g apigenin tespit edilmiştir.

Propolis ve arı sütü ilaveli kremlerin antioksidan potansiyelin değerlendirilmesi

Çalışmada kullanılan propolis ve arı sütünün toplam fenolik madde (TFM), toplam flavonoid (TF) ve FRAP analizi sonuçlarında istatistiksel olarak farklılık gözlenmiş ve en yüksek değerleri propolis ekstraktı (0,3 g/mL) göstermiştir. Propolis ve arı sütünün TFM değeri sırasıyla 364,488±8,387 ve 1,207±0,008 mg GAE/g örnek ve TF değerleri sırasıyla 62,037±8,021 ve 0,980±0,007 mg KE/g örnek şeklinde bulunmuştur. Demir indirgeme gücü değerleri ise propolis ekstraktının 429,842±5,770 µmol TE/g örnek ve arı sütünün 1,702±0,140 µmol TE/g örnek olarak tespit edilmiştir.

Tablo 1. Propolis ekstraktının fenolik madde kompozisyonu

Table 1. Phenolic composition of propolis extract

Bileşen	Konsantrasyon (mg/g)
Kafeik asit	2,17±0,03
Kumarik asit	1,41±0,01
Ferulik asit	1,83±0,05
Trans-sinamik asit	1,70±0,02
CAPE	14,6±0,13
Epikateşin	1,97±0,02
Apigenin	0,31±0,01

Üretilen krem örneklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde içerikleri ve antioksidan aktivite sonuçları Tablo 2'de verilmiştir. Kremlerin toplam fenolik madde miktarları 0,786±0,101 ile 0,089±0,035 mg GAE/g örnek aralığında bulunmuş olup istatistiksel olarak en yüksek değeri %1,5 oranında propolis ilaveli örnek (Krem 3) göstermiştir. Tüm analizler için propolis ve arı sütü ilaveli örnekler kontrol grubundan istatistiksel olarak farklılık göstermiştir ($p \leq 0,05$).

Tablo 2 Krem örneklerinin toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve antioksidan aktivite sonuçları

Table 2 Results of total phenolic content, total flavonoid content and antioxidant activity of cream samples

	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g örnek)	Toplam Flavonoid (mg KE/g örnek)	FRAP (µmol TE/g örnek)
Kontrol	0,089±0,035 ^a	0,244±0,006 ^a	1,548±0,251 ^a
Krem 1	0,317±0,066 ^b	0,257±0,041 ^b	2,143±0,262 ^b
Krem 2	0,576±0,124 ^c	0,341±0,032 ^c	3,008±0,348 ^c
Krem 3	0,786±0,101 ^d	0,489±0,033 ^d	4,004±0,378 ^d

^{a-d} Aynı sütunda yer alan farklı harfler örnekler arasındaki istatistiksel farklılığı simgelemektedir ($p \leq 0,05$)

^{a-d} Different letters in the same column indicate the statistical difference between the samples ($p \leq 0.05$)

Stabilite testleri

Krem formülasyonunda en önemli noktalarından biri de emülsiyon stabilitesinin sürekliliğidir. Üretilen

krem örneklerinin stabilite çalışmaları 4 °C, 25 °C ve 45 °C'de 30 gün boyunca gerçekleştirilmiş olup pH, TMAB, maya-küf, renk, koku, faz ayrımı ve ciltte his

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

gibi analitik ve organoleptik özellikleri değerlendirilmiştir (Srisuksomwong vd. 2023).

Stabilite sonuçları test edilen çeşitli saklama koşulları altında krem formülünün fiziksel özelliklerinin kararlı olduğunu gösterdi. Tüm krem örneklerinde faz ayrımı gözlenmemiş ve herhangi bir yabancı koku oluşmamıştır. Ciltte yumuşak ve kolay dağılılabılır yapı sergilemiştir.

pH analizi sonuçları

Üretilen propolis ve arı sütü içeren kremlerin tümünün pH değeri 5,25 ile 5,56 aralığında değişmiş ve kontrol grubundan istatistiksel olarak farklılık göstermiştir (Tablo 3). Tüm krem örneklerinde farklı sıcaklıklarda depolama periyodu boyunca pH

değerlerinde istatistiksel olarak stabilite sağlandığı belirlenmiştir.

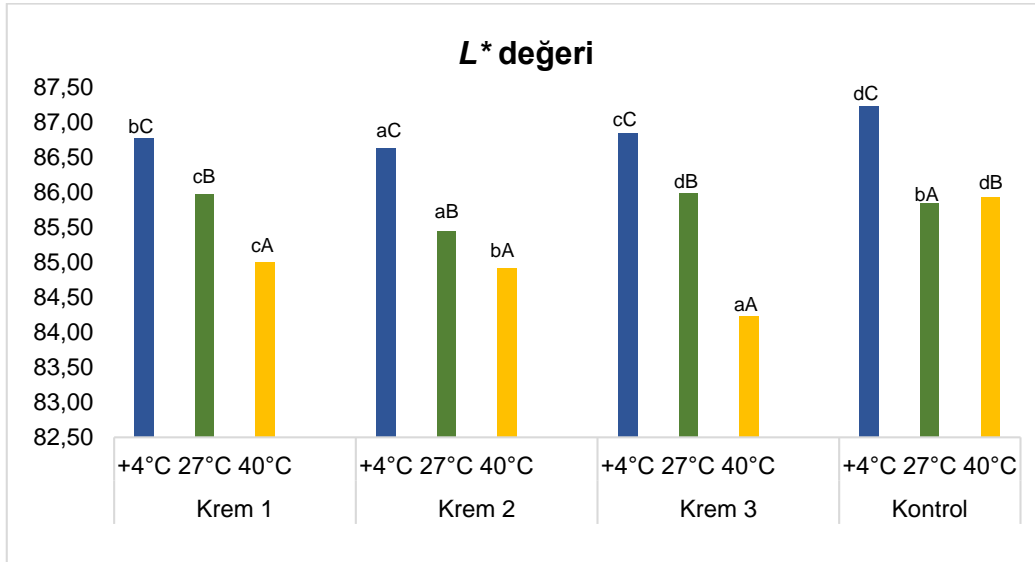
Renk analizi sonuçları

Propolis ve arı sütü ilaveli krem örneklerinin depolama günü sonunda farklı sıcaklıklarda ölçülen renk değerleri Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'te verilmiştir. Örneklerin üretildiği gün (0. Gün) L^* değeri 87,50-86,44, a^* değeri 0,33-0,24 ve b^* değeri 18,50-24,67 aralığında değişmiştir (veri verilmemiştir). Kremlerin +4, 25 ve 40 °C'deki L^* parlaklık değerleri sırasıyla 86,63-87,23; 85,44-85,983ve 84,22-85,92 aralığında değişmiş olup depolama sıcaklığı arttıkça L^* parlaklık değerlerinin istatistiksel olarak azaldığı (Kontrol grubu hariç) görülmüştür (Şekil 1).

Tablo 3. Krem örneklerinin farklı sıcaklıklarda depolama süresince pH değerleri

Table 3. pH values of cream samples during storage at different temperatures

Örnek	+4 °C		27 °C		40 °C	
	0. gün	30. gün	0. gün	30. gün	0. gün	30. gün
Kontrol	6,02	6,03	6,03	6,03	6,03	6,03
Krem 1	5,54	5,56	5,52	5,53	5,52	5,52
Krem 2	5,49	5,49	5,50	5,50	5,50	5,50
Krem 3	5,25	5,26	5,26	5,27	5,26	5,26



Şekil 1. Krem örneklerinin depolama sıcaklığına bağlı L^* değerleri

^{a-d} Küçük harfler farklı krem formülasyonlarının aynı sıcaklıktaki L^* değerlerinin istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ($p \leq 0,05$).
^{A-C} Büyük harfler aynı krem örneği için farklı sıcaklıklarda ölçülen L^* değerlerindeki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,05$)

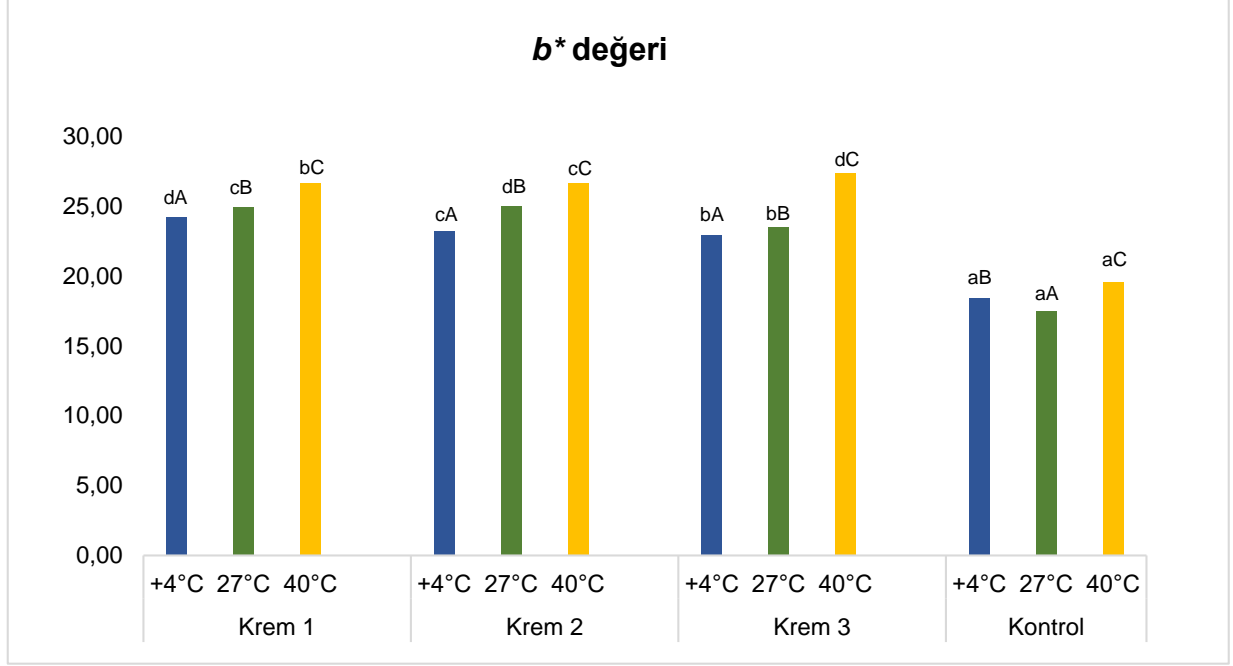
Figure 1. L^* values of cream samples depending on storage temperature

^{a-d} Lowercase letters indicate statistical differences in L^* values of different cream formulations at the same temperature ($p \leq 0,05$).
^{A-C} Capital letters indicate statistical differences in L^* values measured at different temperatures for the same cream sample ($p \leq 0,05$)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Örneklerin sarılık (+ b^*) değerlerinin depolama sıcaklığı ile arttığı tespit edilmiştir. Depolama sıcaklıklarının tümü için kontrol grubu en düşük

sarıklık değerini sergilemiş olup propolis ilaveli kremlerin + b^* değerlerinden istatistiksel olarak farklılık sergilemiştir ($p \leq 0,05$).



Şekil 2. Krem örneklerinin depolama sıcaklığına bağlı b^* değerleri

^{a-d} Küçük harfler farklı krem formülasyonlarının aynı sıcaklıktaki b^* değerlerinin istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ($p \leq 0,05$). ^{A-C}Büyük harfler aynı krem örneği için farklı sıcaklıklarda ölçülen b^* değerlerindeki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,05$)

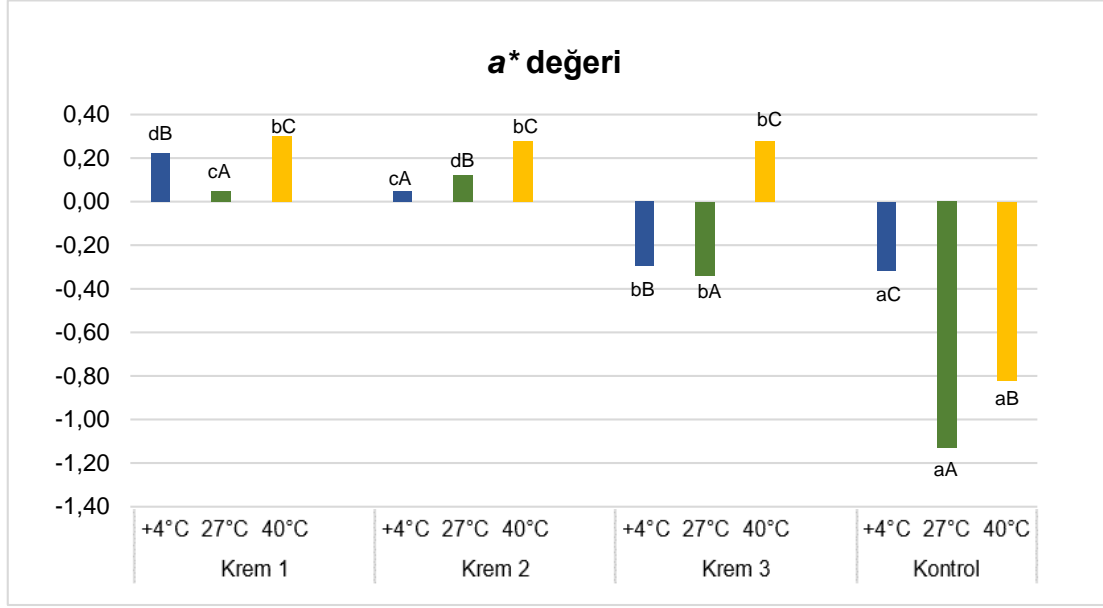
Figure 2. b^* values of cream samples depending on storage temperature

^{a-d} Lowercase letters indicate statistical differences in b^* values of different cream formulations at the same temperature ($p \leq 0,05$). ^{A-C} Capital letters indicate statistical differences in b^* values measured at different temperatures for the same cream sample ($p \leq 0,05$)

Krem örneklerinin a^* değerleri Şekil 3'te verilmiştir. Kontrol grubu dışındaki tüm örneklerde 40 °C sıcaklıkta depolama sonucu örneklerin kırmızılık

değerlerinde istatistiksel olarak artış olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0,05$).

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



Şekil 3. Krem örneklerinin depolama sıcaklığına bağlı a* değerleri

^{a-d} Küçük harfler farklı krem formülasyonlarının aynı sıcaklıktaki a* değerlerinin istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ($p \leq 0,05$). ^{A-C}Büyük harfler aynı krem örneği için farklı sıcaklıklarda ölçülen a* değerlerindeki istatistiksel farklılıkları göstermektedir ($p \leq 0,05$)

Figure 3. a* values of cream samples depending on storage temperature

^{a-d} Lowercase letters indicate statistical differences in a* values of different cream formulations at the same temperature ($p \leq 0,05$). ^{A-C} Capital letters indicate statistical differences in a* values measured at different temperatures for the same cream sample ($p \leq 0,05$)

Antimikrobiyal aktivite Sonuçları

Propolis, arı sütü ve krem örneklerinin antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesinde *B. cereus*, *E. coli*,

S. aureus, *S. epidermis* ve *C. albicans* mikroorganizmaları kullanılmış olup inhibisyon zon alanları mm cinsinden Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. Propolis, arı sütüne kremlere ait antimikrobiyal aktivite sonuçları

Table 4. Antimicrobial activity results of propolis, royal jelly and creams

	İnhibisyon zonu (mm)				
	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>C. albicans</i>
*Propolis	19,65 ± 0,21	4,95 ± 0,21 ^b	20,65 ± 0,21 ^b	22,05 ± 0,07 ^b	22,15 ± 0,91 ^b
*Arı sütü	-	3,00 ± 0,14 ^a	2,90 ± 0,14 ^a	3,90 ± 0,56 ^a	2,95 ± 0,21 ^a
Kontrol	15,35 ± 0,63 ^a	6,05 ± 0,35 ^a	12,25 ± 0,21 ^a	-	-
Krem 1	20,05 ± 0,77 ^b	9,85 ± 0,07 ^b	14,70 ± 1,13 ^b	11,05 ± 0,21 ^a	12,15 ± 1,14 ^a
Krem 2	20,55 ± 0,91 ^b	9,75 ± 0,07 ^b	22,15 ± 1,34 ^c	13,95 ± 0,14 ^b	12,20 ± 0,98 ^a
Krem 3	21,30 ± 0,14 ^{bc}	9,95 ± 0,21 ^b	24,55 ± 0,91 ^d	14,40 ± 0,98 ^b	12,55 ± 1,19 ^a

^{a-d}Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak farkı göstermektedir ($p \leq 0,05$). * Propolis ve arı sütünün inhibisyon çapları kendi aralarında değerlendirilmiştir.

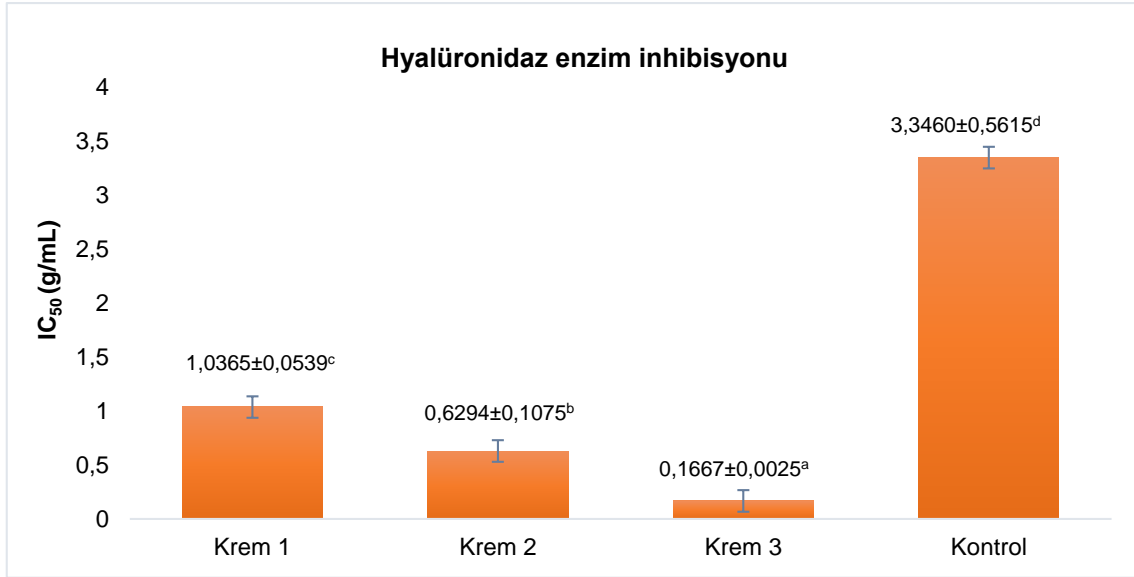
^{a-d} Different letters in the same column indicate statistical difference ($p \leq 0,05$). * The inhibition diameters of propolis and royal jelly were evaluated among themselves.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Propolis ekstraktının çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı inhibisyon sergilediği tespit edilmiştir. Çalışılan konsantrasyonda arı sütünün (0,3 g/ mL) *B. cereus* dışındaki test mikroorganizmalarına karşı etkili olduğu ve $3,90\pm 0,56$ mm zon çapıyla en yüksek *S. epidermis*'e karşı inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Propolis ve arı sütü ilaveli krem örneklerinin hepsinde antimikrobiyal etki gözlenmiş ve kontrol grubundan daha yüksek bulunmuştur. Tüm mikroorganizmalar için en yüksek antimikrobiyal etkiyi %1,5 propolis ilaveli Krem 3 örneği sergilemiştir.

Antihyalüronidaz aktivite sonuçları

Propolis ekstraktı, arı sütü ve üretilen kremlerin hyalüronidaz enzimine karşı inhibisyonu ölçülmüş ve sonuçlar IC_{50} (g/mL) olarak ifade edilmiştir. Propolis ve arı sütünün IC_{50} değeri sırasıyla $0,0063\pm 0,0002$ ve $0,0050\pm 0,0003$ g/mL örnek olarak bulunmuştur ve sonuçlar istatistiksel olarak farklılık göstermiştir. Krem örneklerinde en düşük aktiviteyi $3,3460\pm 0,5615$ g/mL örnek değeri ile kontrol kremi sergilerken propolis ve arı sütü ilaveli kremlerde en yüksek aktiviteyi $0,1667\pm 0,0025$ g/mL örnek değeri ile %1,5 propolis ekstraktı ilaveli Krem 3 örneği göstermiştir (Şekil 4).



Şekil 4. Krem örneklerinin hyalüronidaz enzim inhibisyonu sonuçları (a-d Farklı harfler istatistiksel farklılıklarını göstermektedir ($p\leq 0,05$))

Figure 4. Hyaluronidase enzyme inhibition results of cream samples (a-d Different letters indicate statistical difference ($p\leq 0,05$)).

TARTIŞMA

Kozmetik ürünlerinde çeşitli sıcaklıklarda depolama testi, geliştirilen formülasyonların stabilitesini ve etkinliğini belirlemek için kullanılabilir iyi bilinen test yöntemlerindedir (Sonika vd. 2014). Krem formülasyonlarında pH değerleri, etkinlikleri ve stabiliteleri düşünüldüğünde önemli bir parametredir ve insan cilt pH değeri ile uyumlu olması beklenmektedir. Cilt için kabul edilebilir pH aralığı 4,5- 6,5 şeklindedir (Fitzner vd. 2023, Nosheen ve Kaleem 2023, Tranggono ve Latifah 2007). Çalışmada formüle edilmiş krem örneklerinin pH

değerlerinin 5,25 ve 6,03 aralığında değiştiği gözlemlenmiştir. Propolis ve arı sütü ilave edilerek üretilen kremler istatistiksel olarak kontrol grubundan daha düşük pH değeri sergilerken, artan propolis oranı ürünlerin pH değerinde anlamlı bir fark oluşturmamıştır ($p\leq 0,05$). Ayrıca depolama periyodu boyunca farklı sıcaklıklar da dahil olmak üzere tüm krem örneklerinin pH değerleri stabil kalmıştır. Çalışma sonuçları değerlendirildiğinde farklı sıcaklık ve depolama süresi de dahil olmak üzere formülasyonun cilt pH değerine uyumlu olduğu tespit edilmiştir. Tanuğur Samancı ve Kekeçoğlu (2022)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

çalışmalarında %0,3 propolis ekstraktı, %1,0 arı sütü ve %0,1 oranında arı zehri içeren cilt kremi formülasyonu geliştirmiş ve oda sıcaklığı ve 40 °C'de sıcaklıkta 90 gün boyunca stabilite takibi yapmıştır. Oda sıcaklığında ve 40 °C'de muhafaza edilen kremlerin pH değerleri sırasıyla pH 6,4-7,6 ve 7,6-6,7 aralığında değişmiştir.

Bilindiği üzere propolis toplandığı bölgeye bağlı olarak kırmızımsı kahve, yeşil, sarı ve koyu kahverengi renklere sahiptir (Polat vd. 2023). Kremlerin stabilitesini değerlendirirken farklı depolama sıcaklıklarına bağlı renk değerleri ölçülmüş ve propolis ve arı sütü ilaveli kremlerin L^* , a^* ve b^* değerleri kontrol örneğinden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ($p \leq 0,05$). Krem formülasyonuna propolis ilave edilmesi ile $+a^*$ (kırmızılık) ve $+b^*$ (sarılık) değerlerinde artış, $+4$ °C ve 40 °C'deki parlaklık değerlerinde azalma gözlemlenmiştir. Bu etkinin propolis ve arı sütünün orijinal renklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı şekilde *Saccharina japonica* (alg türü) özütünün cilt üzerine nemlendirici aktivitesinin araştırıldığı çalışmada, kahverengi alg ekstraktı ilaveli kremlerin kontrol örneğine göre L^* ve a^* değerlerinde belirgin azalma görülmüştür.

Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik Kontrolüne İlişkin Kılavuz'unda 3 yaş altı çocuklara ve diğer bireylere uygulanan kozmetik ürünlerinin toplam canlı aerobik mezofilik mikroorganizma sayısının (bakteri, maya ve küf) sırasıyla maksimum 10^2 kob/g ve 10^3 kob/g olacağı belirtilmiştir (TİTCK 2023). Ayrıca yine bu kılavuzda kozmetik ürünlerinin mikrobiyal güvenliği için *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* ve *Escherichia coli* bulunmaması gerektiği bildirilmiştir. Çalışmada geliştirilen formüle kremlerinin tümünde toplam bakteri ve maya-küf analizinde koloni oluşumu gözlemlenmemiştir. Bu durumun antimikrobiyal etkinlik de gösterdiği bilinen propolis ve arı sütünden kaynaklı olduğu düşünülmektedir. Sonuçlarımız kozmetik ürünlerinin mikrobiyolojik kriterler kılavuzuna uygun olup geliştirilen vücut kremlerinin hem çocuklar hem de yetişkinler tarafından kullanılabilmesi görülmektedir.

Propolis fenolik asitlerce zengin olarak bilinen başlıca arı ürünüdür, bununla birlikte kimyasal içeriği toplandığı bölge, hasat zamanı, iklim, ekstraksiyon parametreleri gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir. Kolaylı vd (2023), çalışmalarında Karadeniz Bölgesinden toplanan 8 farklı ham

propolis örneğinin HPLC ile tespit edilen fenolik bileşen miktarları mg/ g cinsinden kafeik asit 1,107-2,073; kumarik asit 0,414-2,161; ferulik asit 0,681-3,612; *t*-sinnamik asit 0,455-1,811; CAPE 2,939-5,388, apigenin 0,288-1,132 mg/g olarak bulunmuştur. Çalışmamızda kullanılan propolis ekstraktının sergilemiş olduğu fenolik profil literatür ile uyumluluk göstermiştir. Bu durum her iki çalışmada kullanılan propolisin aynı bölgeden temin edilmesi ile doğrudan ilişkilendirilebilir.

Propolis özütü ve arı sütünün toplam fenolik madde içeriği sırasıyla $364,488 \pm 8,387$ ve $1,207 \pm 0,008$ mg GAE/g örnek olarak bulunmuştur. Can vd. (2022) tarafından 11 propolis örneğinin antioksidan özelliklerinin karşılaştırıldığı çalışmada TFM değerlerinin $52,9 \pm 0,1$ - $203,5 \pm 1,4$ mg GAE/g ve TF değerlerinin $13,6 \pm 0,3$ - $43,9 \pm 0,1$ mg KE/g olarak bulunurken, bir başka çalışmada glolik propolis ekstraktının TFM değerleri $61,91 \pm 1,62$ mg GAE/g olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda kullanılan propolis özütünün FRAP değeri $982,31 \pm 69,46$ μ mol FeSO₄.7H₂O/g propolis olarak bulunurken Marmara bölgesinden toplanan 11 örneğin değerlendirildiği çalışmada ortalama FRAP değerleri $325,4 \pm 131,8$ μ mol FeSO₄.7H₂O/g propolis olarak belirtilmiştir (Can vd. 2022). Sönmez (2023), Anadolu arı sütünün biyolojik aktivitesini değerlendirdiği çalışmada, arı sütünün TFM ve FRAP değerlerini sırasıyla $4,86 \pm 0,02$ mg GAE/g ve $2,00 \pm 0,03$ μ mol Trolox/g olarak belirtmiştir. Bu bağlamda propolis ve arı sütü örneklerinin antioksidan potansiyelleri diğer araştırma bulguları ile benzerlik göstermektedir.

Krem örneklerinin antioksidan potansiyeli değerlendirildiğinde propolis ve arı sütü içeren kremlerin toplam fenolik madde miktarı $0,317 \pm 0,066$ ile $0,786 \pm 0,101$ mg GAE/g krem aralığında değişmiştir. Mapoung vd. (2021) çalışmalarında 23 farklı fonksiyonel kozmetik kremlerin antioksidan özelliğini incelemiş ve kremlerin toplam fenolik madde içeriklerinin $0,015$ - $1,590$ mg GAE/g krem olarak tespit etmişlerdir. Havlıcan bitkisi ve mikroalg (*Chlorella vulgaris*) içerikli üretilen kremlerin antioksidan aktiviteye etkisinin araştırıldığı çalışmada kontrol kreminin toplam fenolik madde değeri $0,047 \pm 0,001$ mg GAE/g krem bulunurken havlıcan özütü ve *Chlorella vulgaris* içeren kremlerin değerleri sırasıyla $0,279 \pm 0,022$ ve $2,235 \pm 0,006$ mg GAE/g krem olarak belirlenmiştir (Dorken 2022). Farklı meyve ekstraktları kullanılarak hazırlanan kremlerin toplam flavonoid ve antioksidan özelliğinin değerlendirildiği çalışmada, kremlerin toplam flavonoid miktarı $0,0365$ - $0,0532$ mg KE/g krem

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

olarak bulunmuştur (Imam vd. 2015). Literatürdeki bulgular değerlendirildiğinde sonuçlarımız antioksidan zenginleştirilmiş kremler ile uyumluluk göstermiştir.

Propolis ve arı sütü ile formüle edilen kremlerin belirtilen konsantrasyonlarda çalışılan tüm mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu belirlenmiştir. Kremlerin inhibitör performanslarının, *S. aureus* ve *S. epidermis*'e karşı propolis oranındaki artışla arttığı görülmüştür. Sadece kontrol kremde *S. epidermis* ve *C. albicans*'a karşı aktivite gözlenmemiştir. *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis* ve *C. albicans* mikroorganizmalarına karşı krem örneklerinin ortalama zon çapları sırasıyla 19,31; 8,9; 18,41; 13,11 ve 12,30 mm'dir. Chaiwong vd. (2022), kremlerde karboksimetil kitosan ve mangosteen ekstraktının kullanımının antioksidan ve antibakteriyel özellikleri geliştirmesi üzerine yaptıkları çalışmada, *S. aureus* ve *E. coli* bakterilerine karşı kremlerin inhibisyon çaplarını sırasıyla 6,6-3,3 ile 6,07-12,4 mm aralığında bulmuştur. *Origanum onites*, *Mentha piperita*, *Eucalyptus globus* ve *Thymus vulgaris* uçucu yağlarının farklı oranlarda kullanılması ile hazırlanan kozmetik amaçlı krem formülasyonunun antimikrobiyal aktivitesi karşılaştırılmıştır (Yorgancıoğlu 2012). *Origanum onites* uçucu yağı *S. aureus* ve *C. albicans* mikroorganizmalarına karşı etki göstermiş ve sırasıyla 9-26 mm ve 11-16 mm zon çapı ölçülmüştür. Çalışmamızdaki formüle kremlerin antimikrobiyal etkinliği mevcut literatür bulgularıyla oldukça tutarlıdır.

Krem formülasyonunda kullanılan propolis ve arı sütünün IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.0063 ve 0.0050 g/mL olarak tespit edilmiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinden alınan propolislerin sulu ekstraktlarının anti-hyaluronidaz aktivitesinin incelendiği çalışmada kestane ve meşe propolislerinin hyaluronidaz enzim inhibisyonu IC₅₀ olarak hesaplanmış ve sonuçlar sırasıyla 5,0±0,01-5,54±0,02 µg/mL ve 3,26±0,01- 9,21±0,02 µg/mL aralığında bulunmuştur (Can 2018). Arı ürünlerinin hyaluronidaz enzim inhibisyonu üzerine yapılan bir başka çalışmada SC₅₀ değerleri Anzer balında 0,17 g/mL ve polende 0,07 g/mL olarak belirlenmiştir (Hotaman 2015). Kolaylı vd. (2016) çalışmalarında altı farklı botanik orjine sahip balların anti-hyaluronidaz aktivitesi değerlendirilmiş heterofloral ve çam balların IC₅₀ değeri sırasıyla 0,344-0,363 g/mL ve 0,255-0,287 g/mL aralığında bulunmuştur. Çalışmada ayrıca çam balının toplam

fenolik ve flavoid içeriğinin heterofloral ballardan daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Kremlerin hyaluronidaz enzimine karşı inhibisyon etkinliği değerlendirildiğinde propolis ve arı sütü ilavesinin kontrol kreminde kıyasla istatistiksel olarak farklılığa neden olduğu görülmüş ve artan propolis oranıyla inhibisyonda artış olduğu gözlemlenmiştir. IC₅₀ değerleri enzimin aktivitesini %50 oranında inhibe etmek için gereken inhibitör konsantrasyonu ifade etmektedir ve IC₅₀ değerinin küçük olması inhibisyon aktivitesinin o kadar büyük olması anlamına gelmektedir (Obob vd. 2015). Can (2018) bal, polen ve propolis örneklerinin, Kolaylı vd. (2016) ise farklı bal çeşitlerinin anti-hyaluronidaz aktivitesinin değerlendirildiği çalışmalarında arı ürünlerinde bulunan polifenolik ve flavonoidleri enzim inhibisyonu ile ilişkilendirmiştir. Çalışmalarda örneklerin fenolik içeriği ne kadar yüksekse hyaluronidaz enzim inhibisyonunun o kadar fazla olduğunu belirtilmiştir. Arı ürünlerinin biyoaktif özellikleri coğrafi/bölgesel kökene, iklim değişikliklerine ve/veya ekstraksiyon yöntemine göre değişiklik göstermektedir (Odunkiran vd. 2021, Sawicki vd. 2022). Bu nedenle literatürde aynı arı ürünleri için farklı değerler gözlenmesi olasıdır. Bu koşullar göz önüne alındığında, literatürdeki farklı arı ürünlerinin IC₅₀ değerlerinin çalışmamızdaki krem formülasyonları ile yakın sonuç verdiği görülmektedir.

Sonuç

Çalışma sonuçları propolis ve arı sütü ile zenginleştirilen krem formülasyonunun biyoaktif bileşenler içerdiği ve bu sayede antioksidan, anti-hyaluronidaz ve antimikrobiyal gibi çok amaçlı aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Yapısı nedeniyle hızlı bozulabilen ve okside olabilen arı sütünün propolis ile kullanılması, arı sütünün kozmetik ürünlerindeki bozulmaya karşı dayanımını artırmıştır. Stabilité sonuçları kremlerin emülsiyon yapısı ve görünümünün farklı depolama sıcaklık şartlarında değişmeden kaldığını ve hiçbir şekilde faz ayrımı belirtisi göstermediğini ortaya koymuştur. Ayrıca propolis ve arı sütü içeren krem formülasyonunun geliştirilmesine yönelik yaptığımız bu çalışma ön çalışma niteliği taşımakta olup benzer içeriğin cilt yenileyici ve kırışıklık giderici kozmetik ürünlerinde ve *B. cereus*, *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermis* ve *C. albicans*'in neden olduğu çeşitli deri hastalıklarının tedavisine yönelik cilt ürünlerinde kullanılabilirliğini kanıtlamıştır.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Teşekkür: Desteklerinden ötürü TÜBİTAK 2209-B Sanayiye Yönelik Lisans Araştırma Projeleri Destekleme Programına teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması: Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Etik Durumu: Bu araştırma için etik kurul belgesi gerekli değildir.

Mali Kaynak: Bu çalışma Zeynep Berin ÇELEBİ'nin lisans bitirme tezinden üretilmiş olup TÜBİTAK 2209-B Sanayiye Yönelik Lisans Araştırma Projeleri Destekleme Programı kapsamında desteklenmiştir.

Veri Sağlama: Mevcut çalışma sırasında kullanılan ve/veya analiz edilen tüm veriler ve materyaller bu makalede mevcuttur.

Yazar Katkıları: Yazar Zeynep Berin ÇELEBİ çalışmadaki analizlerin gerçekleştirilmesine katkı sağlamıştır. Diğer bütün yazarlar analizlerin gerçekleştirilmesi, verileri düzenlenmesi, makale yazımı ve revizyonuna eşit katkıda bulunmuşlardır.

KAYNAKLAR

Atagün ÖS. Periodontal hastalıkların tedavisinde hiyalüronik asit. Sağlık & Bilim: Medikal Araştırmalar, 2022;3:75

Balkan IA, Doğan HT, Zengin G, Colak N, Ayaz FA, Gören AC, Kırmızıbekmez H, Yeşilada E. Enzyme inhibitory and antioxidant activities of Nerium oleander L. flower extracts and activity guided isolation of the active components. Industrial Crops and Products, 2018;112:24-31

Bankova V, Popova M, Trusheva B. New emerging fields of application of propolis. Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering, 2016;35(1):1-11

Bărnuțiu LI, Mărghitaș LA, Dezmirean DS, Mihai CM, Bobiș O. Chemical composition and antimicrobial activity of Royal Jelly-review. Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies, 2011;44(2):67-72

Belmehti O, El Menyiy N, Bouyahya A, El Baaboua A, El Omari N, Gallo M vd. Recent advances in the chemical composition and biological activities of propolis. Food Reviews International, 2023 1-51

Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration, Ed. Packer L, "In Methods in enzymology" Academic press, Orlando, 1999, pp. 15-27

Can Z. Determination of in-vitro antioxidant, anti-urease, anti-hyaluronidase activities by phenolic rich bee products from different region of Turkey. Fresenius Environ. Bull, 2018;27:6858-6866

Can Z, Kara Y, Kolaylı S, Çakmak İ. Antioxidant activity and phenolic composition of propolis from Marmara region, Turkey. Journal of Apicultural Research, Published online DOI: 10.1080/00218839.2022.2157582

Chaiwong N, Phimolsiripol Y, Leelapornpisid P, Ruksiriwanich W, Jantanasakulwong K, Rachtanapun P vd. Synergistics of carboxymethyl chitosan and mangosteen extract as enhancing moisturizing, antioxidant, antibacterial, and deodorizing properties in emulsion cream. Polymers, 2022;14(1):178.

Civelek İ. Biological activities of royal jelly: a mini-review. Anatolian Journal of Biology.2022;3(1):1-8

Dini I, Laneri S. The new challenge of green cosmetics: Natural food ingredients for cosmetic formulations. Molecules, 2021;26(13):3921

Dizman S, Yıldız O, Boyracı GM, Kolaylı S. Determination of natural radioactivity levels and gamma radiation attenuation coefficients in propolis samples and the study of its antioxidant properties. Radiochimica Acta, 2020;108(10):829-837

Dorken EA. Bitkisel ve mikroalg içerikli kremlerin geliştirilmesi, antioksidan ve anti-tirosinaz enzim aktivitelerinin analitik yöntemlerle araştırılması. BUÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Bursa, 2022, (erişim tarihi:20.05.2023), <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp>

FDA-BAM. Aerobic plate count. In "FDA's Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3,

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count>. 2001a, (erişim tarihi:18.08.2023)
- FDA-BAM. Yeasts, moulds and mycotoxins. In "FDA's Bacteriological Analytical Manual, Chapter 18, <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-18-yeasts-molds-and-mycotoxins>.2001b. (erişim tarihi:18.08.2023)
- Fitzner A, Knuhr K, Brandt M, Bielfeldt S. Investigating the effect of the pH of foot care product formulations on pedal skin in diabetic and non-diabetic subjects. *International Journal of Cosmetic Science*, 2023
- Girish KS, Kemparaju K, Nagaraju S, Vishwanath BS. Hyaluronidase inhibitors: a biological and therapeutic perspective. *Current Medicinal Chemistry*, 2009;16(18):2261-2288
- Hotaman HE. Anzer bal ve polenin bazı biyoaktif özelliklerinin in vitro olarak incelenmesi. RTE Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi, Rize, 2015, (erişim tarihi:20.05.2023) <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSoRguSonucYeni.jsp>
- Imam S, Azhar I, Perveen S, Hussain SG, Mahmood ZA. Studies on in vitro antioxidant activity and total flavonoid contents of a cream formulation to correlate its anti-aging effect. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2015;4(1):1646-1655
- Kara Y. Fenolik bileşiklerin RP-HPLC-PDA ile analiz yöntemi geliştirilmesi, validasyonu ve etanolik propolis özütlerine uygulanması. KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Trabzon, 2020, (erişim tarihi: 20.08.2023), <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSoRguSonucYeni.jsp>
- Kolaylı S, Birinci C, Kara Y, Ozkok A, Samancı AET, Sahin H. vd. A melissopalynological and chemical characterization of Anatolian propolis and an assessment of its antioxidant potential. *European Food Research and Technology*, 2023;249(5):1213-1233
- Kolaylı S, Sahin H, Can Z, Yıldız O, Sahin K. Honey shows potent inhibitory activity against the bovine testes hyaluronidase. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 2016;31(4):599-602
- Kowalczyk I, Gębski J, Stangierska D, Szymańska A. Determinants of Honey and other bee products use for culinary, cosmetic, and medical purposes. *Nutrients*, 2023;15(3):737
- Kurek-Górecka A, Górecki M, Rzepecka-Stojko A, Balwierz R, Stojko J. Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 2020;25(3):556
- Lee J, Hyun CG. Natural Products for Cosmetic Applications. *Molecules*, 2023;28(2):534
- Mapoung S, Semmarath W, Arjsri P, Umsumarn S, Srisawad K, Thipraphan P, vd. Determination of phenolic content, antioxidant activity, and tyrosinase inhibitory effects of functional cosmetic creams available on the Thailand market. *Plants*, 2021;10(7):1383
- Muriel-Galet V, Cran MJ, Bigger SW, Hernández-Muñoz P, Gavara R. Antioxidant and antimicrobial properties of ethylene vinyl alcohol copolymer films based on the release of oregano essential oil and green tea extract components. *Journal of Food Engineering*, 2015;149:9-16
- Nosheen S, Kaleem M. Recovery optimization of plant waste derived antioxidants and their incorporation in cosmetic creams to enhance antioxidant potential: A cost-effective approach. *Research Square*, 2023, preprint
- Oboh G, Agunloye OM, Adefegha SA, Akinyemi AJ, Ademiluyi AO. Caffeic and chlorogenic acids inhibit key enzymes linked to type 2 diabetes (in vitro): a comparative study. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 2015;26(2):165-170
- Odunkiran A, Şengül M, Ufuk S. Some Characteristics of Honey and Propolis and Their Effects on Covid-19. *Journal of Apitherapy and Nature*, 2021;4(2):129-153
- Olczyk P, Komosinska-Vassev K, Wisowski G, Mencner L, Stojko J, Kozma EM. Propolis Modulates Fibronectin Expression in the Matrix of Thermal Injury. *Biomedical Research*. Int. 2014;748101
- Ordu JI, Sunday BR, Okafo SE. Evaluation of the activity of Garcinia kola seed oil and honey on

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

- skin cream formulation. *The Pharma Innovation*, 2018;7(5, Part J):675
- Papaemmanouil CD, Peña-García J, Banegas-Luna AJ, Kostagianni AD, Gerothanassis, IP, Pérez-Sánchez, H vd. ANTIAGE-DB: A database and server for the prediction of anti-aging compounds targeting elastase, hyaluronidase, and tyrosinase. *Antioxidants*, 2022;11(11):2268
- Pavel CI, Mărghitaş L A, Bobiş O, Dezmirean DS, Şapcaliu A, Radoi I, vd. Biological activities of royal jelly-review. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 2011;44(2):108-118
- Polat A, Akdeniz H, Turhan M. Arı ürünü olan propolis' in yapısı ve özellikleri. *Uluslararası Gıda Tarım ve Hayvan Bilimleri Dergisi*, 2023;3(1):55-63
- Rocha VM, Portela RD, dos Anjos JP, de Souza CO, Umsza-Guez MA. Stingless bee propolis: composition, biological activities and its applications in the food industry. *Food Production, Processing and Nutrition*, 2023;5(1):1-13
- Sá SHG, Mazzocato MC, Saliba ASM, Alencar SM, Favaro-Trindade, CS. Evaluation of the release, stability and antioxidant activity of Brazilian red propolis extract encapsulated by spray-drying, spray-chilling and using the combination of both techniques. *Food Research International*, 2023;164:112423
- Sawicki T, Starowicz M, Kłębukowska L, Hanus P. The profile of polyphenolic compounds, contents of total phenolics and flavonoids, and antioxidant and antimicrobial properties of bee products. *Molecules*, 2022;27(4):1301
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 1977;28(1):49-55
- Sonika P, Akanksha S, Rajesh T, Sunita S, Suman S. Development and evaluation of antimicrobial herbal cosmetic preparation. *African journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2014;8(20):514-528
- Sönmez E. Investigation of chemical content and antimicrobial activities of different plant sources of Anatolian propolis samples. *U. Arı D.-U. Bee J.*, 2023;23(1):37-48
- Srisuksomwong P, Kaenhin L, Mungmai L. Collagenase and tyrosinase inhibitory activities and stability of facial cream formulation containing cashew leaf extract. *Cosmetics*, 2023;10(1):17
- Tanuğur Samancı AE, Kekeçoğlu M. Development of a cream formulation containing bee venom and other bee products. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 2022;21(10):4913-4920
- TİTCK. Kozmetik ürünlerin mikrobiyolojik kontrolüne ilişkin kılavuz. <https://www.titck.gov.tr/mevzuat/kozmetik-urunlerin-mikrobiyolojik-kontrolune-iliskinkilavuz-surum-1-0-27122018172953>, 2023, (erişim tarihi: 15.08.2023)
- Tranggono RI, Latifah F. *Cosmetic Science Handbook*. PT Gramedia, Jakarta, Indonesia, 2007, p.11-32
- Turkut GM, Er M, Değirmenci A. Evaluating bioactivity and bioaccessibility properties of Turkish propolis extracts prepared with various solvents. *Journal of Apitherapy and Nature*, 2019;2(1):7-11
- Yahaya YA, Don MM. Evaluation of *Trametes lactinea* extracts on the inhibition of hyaluronidase, lipooxygenase and xanthine oxidase activities in vitro. *Journal of Physical Science*, 2012;23:1-15
- Yasin A, Ren Y, Li J, Sheng Y, Cao C, Zhang K. Advances in hyaluronic acid for biomedical applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022;10:910290
- Yıldız O. Tüketilebilir propolis ekstratlerinde kullanılan çözücülerin (menstrumların) değerlendirilmesi. *U. Arı D.-U. Bee J.* 2020;20(1):24-37
- Yıldız O, Boyracı GM. Production and some quality parameters of sugar beet sweets (Pestil and Köme). *Sugar Technology*, 2020;22(5):842-852
- Yorgancıoğlu A. Bazı uçucu yağlarla kollajen içerikli antimikrobiyal krem üretilebilirliği üzerine araştırmalar. *Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi*, İzmir, 2012, (erişim tarihi: 21.08.2023)

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

DETERMINATION OF SUITABLE BEEKEEPING PLACES BY WEIGHTED OVERLAY ANALYSIS: A CASE STUDY OF BOLU, TÜRKİYE

Weighted Overlay Analizi İle Uygun Arıcılık Yerlerinin Belirlenmesi: Bolu, Türkiye Örneği

Şule YAMAN^{1*}, Mustafa YAMAN²

¹Department of Geomatics Engineering, Faculty of Engineering, Karadeniz Technical University, 61080, Trabzon, TÜRKİYE, Yazışma Yazarı / Corresponding author E-posta: suleyaman98@hotmail.com, ORCID No: 0000-0002-7426-9358

²Department of Biology, Faculty of Arts and Science, Bolu Abant İzzet Baysal University, 14030, Bolu, TÜRKİYE, E-posta: muyaman@hotmail.com, ORCID No:0000-0001-5656-7266

Received / Geliş Tarihi: 13.09.2023

Accepted / Kabul Tarihi: 20.10.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1358531

ABSTRACT

Beekeeping is one of the main livelihoods of our country, and our country's rich geography, different climate and topography are quite suitable for beekeeping. The increase in interest in beekeeping activities has led to more income with less maintenance and expense compared to other agricultural activities. The increasing interest has also revealed the necessity of determining suitable places for beekeeping to increase beekeeping activities' efficiency. For this purpose, weighted overlay analysis, which is one of the Geographical Information Systems (GIS) techniques, was carried out using ArcGIS 10.7.1 in this study for the province of Bolu. Slope, aspect, elevation, precipitation, vegetation and distance to roads, streams and settlements were used for analysis. As a result of the analyzes made, it was determined that 90.95% of Bolu province is suitable for beekeeping activities. In addition, it has been determined whether the existing beekeeping locations are suitable for beekeeping.

Keywords: GIS, Beekeeping, Weighted overlay Analysis, Suitable beekeeping sites

ÖZ

Arıcılık ülkemizin temel geçim kaynaklarından biri olup, ülkemizin zengin coğrafyası, farklı iklimi ve topoğrafyası arıcılık için oldukça uygundur. artması, Diğer tarımsal faaliyetlere göre daha az bakım ve masrafla daha fazla gelir elde edilen arıcılık faaliyetlerine olan ilgi artmıştır. Artan ilgi, arıcılık faaliyetlerinde verimliliğin artırılması için arıcılık için uygun yerlerin belirlenmesi gerekliliğini de ortaya çıkarmıştır. Bu amaçla Bolu ili için bu çalışmada ArcGIS 10.7.1 kullanılarak Coğrafi Bilgi Sistemleri (CBS) tekniklerinden biri olan weighted overlay analizi yapılmıştır. Analiz için eğim, bakı, yükseklik, yağış, bitki örtüsü ve yollara, akarsulara ve yerleşim yerlerine olan mesafe kullanılmıştır. Yapılan analizler sonucunda Bolu ilinin %90.95 oranında arıcılık faaliyetleri için uygun olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca mevcut arıcılık konumlarının da uygun arıcılık yerlerinde olup olmadığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: CBS, Arıcılık, Ağırlıklı kaplama analizi, Uygun arıcılık yerleri

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Son zamanlarda mısır, buğday, fındık vb. gibi tarımsal faaliyetlere göre daha az bakım ve masrafla daha fazla gelir elde edilen arıcılık faaliyetlerine olan ilgi artmıştır. Artan ilgiyle beraber bilinçsiz arıcılıkta artmış ve elde edilen verim düşmüştür. Bu durum, arıcılık faaliyetlerinde verimliliğin artırılması için arıcılık için uygun yerlerin belirlenmesi gerekliliğini de ortaya çıkarmıştır. Bu nedenle, ülkemizin her köşesinde arıcılık için uygun lokasyonlar olsa da sahip olduğu zengin florası, iklimi, coğrafyasıyla Bolu ili için uygun arıcılık yerlerinin belirlenmesi ve mevcut arıcılık noktalarının uygun yerlerde olup olmadığının tespitinin yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Bolu ili uygun arıcılık yerlerinin belirlenmesinde, hızlı ve ekonomik bir yol olan CBS yöntemlerinden weighted overlay analizi kullanılmıştır. Weighted overlay analizi birden fazla tematik haritanın birbirine göre değerlendirilmesi ve çakıştırılmasıyla sonuç haritasının üretilmesini sağlayan bir çoklu kriter analizidir. Analiz için gerekli verilerden, il ve ilçe sınırı verisi, yerleşim, yol ve su kaynakları verileri, sayısal yükseklik modeli verisi, yağış verisi, flora verisi kriter olarak kullanılmıştır. Kriterlerin belirlenmesinde literatür ve uzman görüşleriyle beraber arıcılık yönetmeliğinden faydalanılmıştır. Her bir kriter için uygunluk haritası oluşturulmuş, kriterlerin ağırlık değerleri literatür yardımıyla belirlenmiş ve ArcGIS 10.7.1 programında weighted overlay analizi yapılarak Bolu ili için uygun arıcılık yerleri tespit edilmiştir. Üretilen sonuç harita üzerinde mevcut arıcılık lokasyonları işaretlenerek uygun yerlerde olup olmadığı analiz edilmiştir.

Bulgular ve Tartışma: Her bir kritere ait uygunluk haritası incelendiğinde yeşil renkli alanların arıcılık faaliyetleri için uygun lokasyonlar olduğu, kırmızı renkli alanların ise uygun lokasyonlar olmadığı görülmüştür. Bununla beraber bölgenin çok fazla bir eğime sahip olmadığı, ilin büyük çoğunluğunun güneşe baktığı ve oldukça yağış aldığı tespit edilmiştir. Bunların yanı sıra yüksek bölgelerinin fazla olduğu, akarsulardan uzak olduğu ve yerleşim yerlerinin dağınık ve yakın olduğu görülmüştür. Tüm bu kriterler weighted overlay analiziyle çakıştırıldığında elde edilen sonuç haritada da yine yeşil alanlar uygun lokasyonları temsil ederken kırmızı alanlar uygun olmayan lokasyonları temsil etmektedir. Uygun arıcılık yerleri haritası incelendiği zaman yüksek uygunluk ve çok yüksek uygunluk sınıfları baz alındığında çalışma bölgesinin %90.95

oranında arıcılık faaliyetleri için uygun olduğu görülmüştür. Arazi çalışmalarıyla elde edilen 34 mevcut arıcının konumu uygunluk haritası üzerinde işaretlenmiş ise 3 tanesinin yüksek uygunluk, 9 tanesinin orta uygunluk, 2 tanesinin düşük uygunluk yerinde olduğu ve 20 tanesinin florasız konumlarda arıcılık yaptığı tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen bu çalışma Bolu iline özgü olup, her ilin ekolojisi, florası, topoğrafyası ve iklimi birbiri ile aynı olmadığı için her uygunluk haritası kendi içerisinde oluşturulmalıdır. Bu nedenle yapılan çalışmaları birbiri ile kıyaslamak doğru bir yaklaşım olmayacaktır. Bolu ili gibi yaklaşık %90'ı arıcılık faaliyetlerini gerçekleştirmek için uygun olan bir şehirde mevcut arıcıların sadece %8'inin yüksek uygunluk yerinde arıcılık yapması çok düşük bir oran olup bu oran artırılmalıdır. Bunun içinde arıcılar gerekli kurumlarca, gerekli çalışmalarla bilgilendirilmelidir.

INTRODUCTION

Beekeeping, one of the important branches of modern agriculture, produces royal jelly, honey, pollen, beeswax, etc. It makes significant contributions to the country's economy with its products. In addition, these products contribute financially and to many fields such as health, cosmetics, paint, agriculture and food. At the same time, the place and importance of bees are great among the factors that play a role in pollination that ensures the continuity of nature. Bees need flower, plant and tree nectars to feed, and it is known that they travel around 100 flowers on average at their maximum speed during one flight to find these nectars. While this number is possible for a bee, the importance of bees in pollination can be seen when one considers the bees in a hive with even thousands of bees. Considering our country's favorable soils, suitable climate types and rich land cover, it is possible to practice beekeeping in almost every part of our geography. However, when the "2021 Product Report-Beekeeping" published by the General Directorate of Agriculture and Forestry is examined, it is seen that there is a decrease in annual honey production in Turkey despite the increase in the number of hives each. This is an indication that beekeeping activities are not sufficiently utilized. For this reason, determining suitable places to activate beekeeping activities, increasing honey production in parallel with the increasing number of hives, increasing the product yield obtained by these activities, and ensuring the

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

sustainability of the natural balance will offer practical solutions to these requirements. Knowing the environment and bees before determining suitable places for beekeeping is very important. In the experiments, it was seen that bees are very active at temperatures between 29-33°C; their activities stop at temperatures below 10°C, and above 36°C, they begin to lose their ability to fly around 10°C, and they become entirely inactive at 7°C (Öder, 1989; Yalçın et al., 2019).

The diversity and continuity of the flora and the primary food source for bees are also important for beekeeping. For this reason, flora is one of the critical criteria in choosing a suitable place for beekeeping activities. When looking for a suitable place to position the beehives, places that do not receive much wind, are closed to the wind if possible and are not exposed to direct sunlight, rain, etc., and places, where there is no precipitation should be preferred (Yalçın et al., 2019), in other words, the land's surface, slope, aspect, height, etc., where beekeeping will be done. It is also effective in beekeeping because it is suitable for topographic conditions. When determining suitable places for beekeeping, the proximity of the beehives to the stream, the distance of the beekeeping region to the settlement and roads, factories etc., nearby, meaning the presence of industrial areas is another important criterion. Considering these criteria, the use of Geographic Information Systems (GIS), which has spatial analysis capability, provides a visual presentation of verbal/textual data and has an important and effective decision-making mechanism to determine suitable and unsuitable places for beekeeping activities, and it is the right tool. GIS is an information system that enables data collection, storage, analysis and presentation. The origin of GIS, which consists of many data types such as vector and raster data, is based on the science of geography. It is possible to see GIS in every area of our lives. GIS organizes layers of information obtained from data by performing spatial location analysis and creating maps, 3D scenes, etc., and allows visualization with presentations. Thanks to this capability, GIS helps users to make more accurate and effective decisions. The literature review found studies on using GIS in beekeeping activities in Turkey and worldwide.

Arslan et al. (2015) included the distribution of bee colonies, the relationship between land use and seasonal distribution of the colonies, and GIS techniques to determine the routes and

accommodation places of the wandering beekeepers throughout the year while following the beekeeping activities and development in the Siverek district of Şanlıurfa. Ceylan and Sarı (2017) used GIS-based multi-criteria decision-making analysis to determine suitable beekeeping sites for Konya province. In another study to determine a suitable location for beekeeping activities in the Karaburun, Çeşme and Urla districts of İzmir province, Yalçın et al. (2019) used GIS's Weighted Overlay analysis. Sönmez and Gencal (2019) benefited from GIS in determining the potential honey forests that can be established within the Bursa General Directorate of Forestry borders. In their studies, after determining the criteria for potential honey forest areas, they created slope, elevation, wind, wetlands and settlement maps from the digitized map of the study area. They determined the potential honey forest areas that can be established by analyzing with Arc/Info program, a GIS interface.

Zoccali et al. (2017) used a GIS-based Analytical Hierarchy Method and Multi-Criteria Decision Making approaches while analyzing suitable sites for beekeeping in the Calabria region of Southern Italy. The data used in the study are temperature, water resources, road, land use and altitude data. GIS-based programs were also used to acquire, use and analyze these data. Abou-Shaara et al. (2013) utilized the Analytical Hierarchy Method, using criteria such as relative humidity, water resources, land cover, and temperature, to determine suitable places for bees in Saudi Arabia, where every region is not suitable for beekeeping. In this study, suitable places for beekeeping were determined by using Weighted Overlay Analysis, which is one of the GIS analyses, by using precipitation, flora, water resources, road, settlement, slope, aspect and elevation criteria for Bolu province and its districts and it was determined whether the existing beekeeping places are in suitable beekeeping areas. In addition, it is aimed that this study will lead future studies in this field.

MATERIALS AND METHODS

Study area

In order to determine suitable beekeeping areas, Bolu province, which is located between 30° 32' and 32° 36' east longitudes and 40° 06' and 41° 01' north latitudes and has a surface area of 8.323 km², was

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

chosen as the study area (Figure 1). Approximately 18% of the province's land comprises agricultural areas, 15% meadows and pastures, 64% forest areas and 8% non-agricultural areas (Url-1).

Material selection

In the study, analyses were performed using ArcGIS 10.7.1 Desktop software, and a suitability map was created. First of all, the necessary data were

provided for the analysis. Information on the data obtained and the sources from which it was obtained are given in Table 1. Weighted Overlay analysis was conducted to create a "suitability map" and flora, distance to water resources, road and settlement, slope, aspect, elevation and precipitation criteria were used.

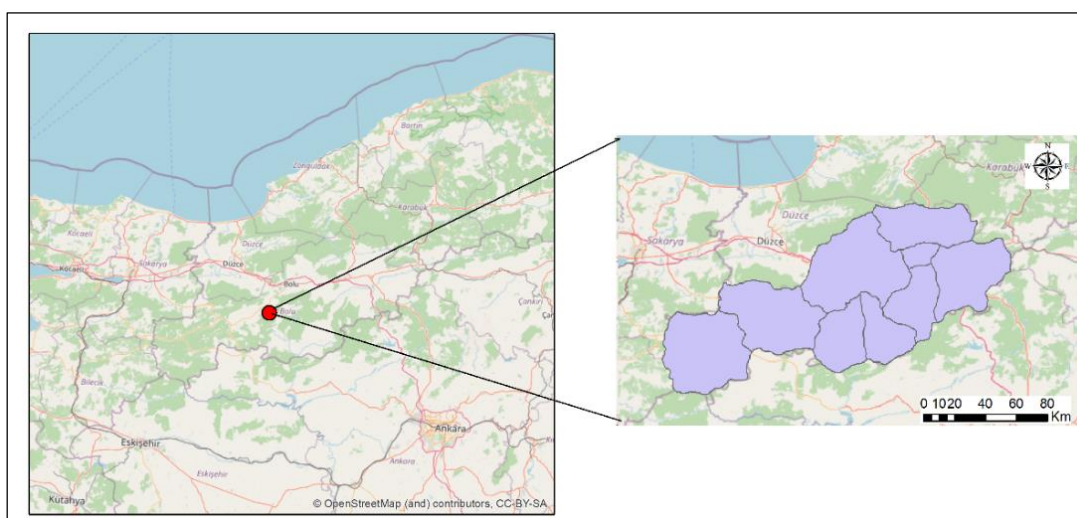


Figure 1. Study area

Table 1. Data and data sources used in the study

Data Name	Data Source
Provincial and District Boundary	General Directorate of Maps
Settlement, Road and Water Resources	Open Street Map
Digital Elevation Model	USGS Earth Explorer
Precipitation	General Directorate of Meteorology
Flora	CORINE 2018
Beekeeping Regulation	Official Newspaper

Criteria selection

Criteria selection was made by considering climatic, topographic and environmental conditions for suitable beekeeping activities. The selected criteria and their details are given below.

Slope: This criterion depends on topography and altitude and is very important for beekeeping activities. Less slope is more suitable for the beekeeping environment and yield.

Aspect: The north direction should be avoided while placing the beehives, and the south should be prioritized because the bees need light to be active.

Altitude: High places are not suitable for beekeeping as the air temperature drops at night in high places. Optimum hive positions should be determined.

Flora: Flora is one of the most important criteria for beekeeping activities as it affects honey yield and

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

quality. For this reason, flora selection should be made sensitively by paying attention to the plant species in the environment and the products in agricultural areas.

Precipitation: Since precipitation directly affects the flora, it is one of the criteria to be considered for appropriate beekeeping activities.

Distance to Roads and Settlement: The location of beehives is one of the most critical criteria for obtaining high efficiency from beekeeping activities. The hives should be away from roads, vehicles and the gases they produce, settlements, and air and noise pollution.

Distance to Water Resources: Another factor as important as roads and settlements in hive locations is the distance to water resources. The proximity of the hives to water sources increases the efficiency of beekeeping activities.

Methods

After the data were obtained from the necessary institutions and pages, analyses and maps were made using ArcGIS software. Water resources, road and settlement data were obtained from Open Street Map. Since the analysis was performed with raster data, criteria such as distance to water resources, distance to settlements and roads were converted to raster formats. Considering the suitable conditions for beekeeping activities, buffer zones of 500 meters for distance to the water resource and 1000 meters for distance from roads and settlements were created with the "multiple buffer" process. Digital Elevation Model (DEM) data was first downloaded from the USGS Earth Explorer page for slope, aspect and elevation data and made suitable for the study area. Slope, aspect and elevation maps were created from the DEM data. Flora data was obtained from CORINE 2018 data and prepared by the region. Precipitation data were obtained from the General Directorate of Meteorology, and areal precipitation data were obtained by the "Kriging interpolation" method. After making the data suitable for the study, Ceylan and Sarı (2017) and Yılmaz et al. (2021), class ranges were determined based on the studies. Then, since the singular value of the data is needed, not the interval value, the data were converted into singular values with the reclassification method. The criteria are given a value from 1 to 5 according to the degree of importance and the class ranges are assigned to the relevant class value. 5 represents the most suitable class for beekeeping and 1

represents the most unsuitable class. Intermediate values were classified according to the degree of importance depending on the studies and expert opinions. After this classification, the model was established for weighted overlay analysis. The weight value information of the criteria was entered into the established model, and the analysis was carried out. The mathematical algorithm behind the analysis is given below.

Suitability Assessment = (Flora * 0.440) + (Water Resources * 0.146) + (Aspect * 0.120) + (Elevation * 0.100) + (Precipitation * 0.076) + (Slope * 0.044) + (Roads * 0.039) + (Settlement* 0.033)

Weighted Overlay Analysis determined suitable places for beekeeping and whether the existing beekeeping places were in suitable beekeeping areas.

Determination of Criterion Weights

The importance and weight values of the criteria used were prepared concerning the study of Ceylan and Sarı (2017). The weights of the criteria used in the study are given in Table 2, and the class ranges and importance levels of the criteria are given in Table 3.

Table 2. Criteria and weight values

Criteria	Weight Value
Flora	0.44
Distance to Water Resources	0.15
Aspect	0.12
Height	0.10
Precipitation	0.08
Slope	0.04
Distance to Roads	0.04
Distance to settlement	0.03

Weighted Overlay Analysis

Weighted overlay analysis is a multi-layered and multi-criteria evaluation and decision-making tool. A new layer is obtained by weighting more than one raster layer relative to each other and within themselves and then overlapping, and the obtained

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

layer is evaluated by performing a conformity analysis according to the determined criteria.

Weighted overlay analysis is a multi-layered and multi-criteria evaluation and decision-making tool. A new layer is obtained by weighting more than one raster layer relative to each other and in within themselves and then overlapping, and the obtained layer is evaluated by performing a conformity analysis according to the determined criteria. Each of these criteria may have a different impact rate. Therefore, weighted overlay analysis helps beekeepers to determine their land selection and management strategy. For example, in their study, Yılmaz et al., (2021) used weighted overlay analysis to determine the most suitable places for

beekeeping in Şavşat district of Artvin province. Similarly, Yalçın et al., (2019) determined suitable places for beekeeping for the Karaburun, Çeşme and Urla districts of İzmir with multi-criteria decision analysis and weighted overlay analysis. Maris et al., (2008) discussed the applications of Geographic Information System (GIS) and Multi-Criteria Decision Analysis to locate beekeeping regions in the state of Selangor. Appropriate beekeeping locations determined by weighted overlay analysis were verified with actual data from existing beehives. A reasonable consistency was determined as a result of the study. Studies show that weighted overlay analysis can facilitate the selection of suitable beekeeping and contribute to the health and productivity of bees.

Table 3. Assignment of criteria class ranges and severity levels

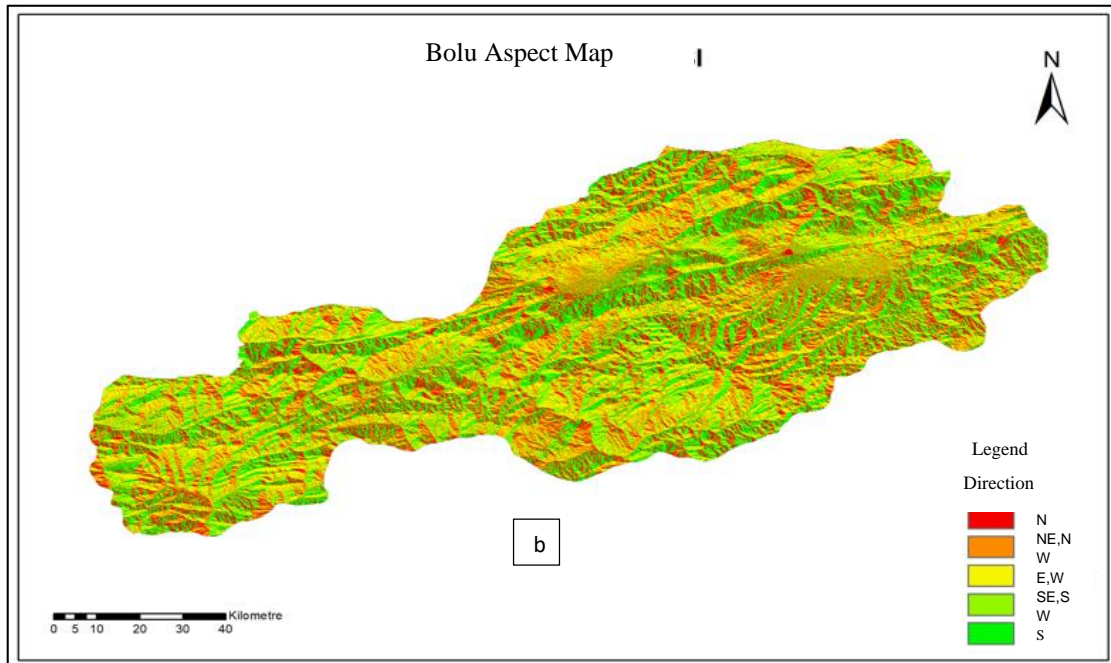
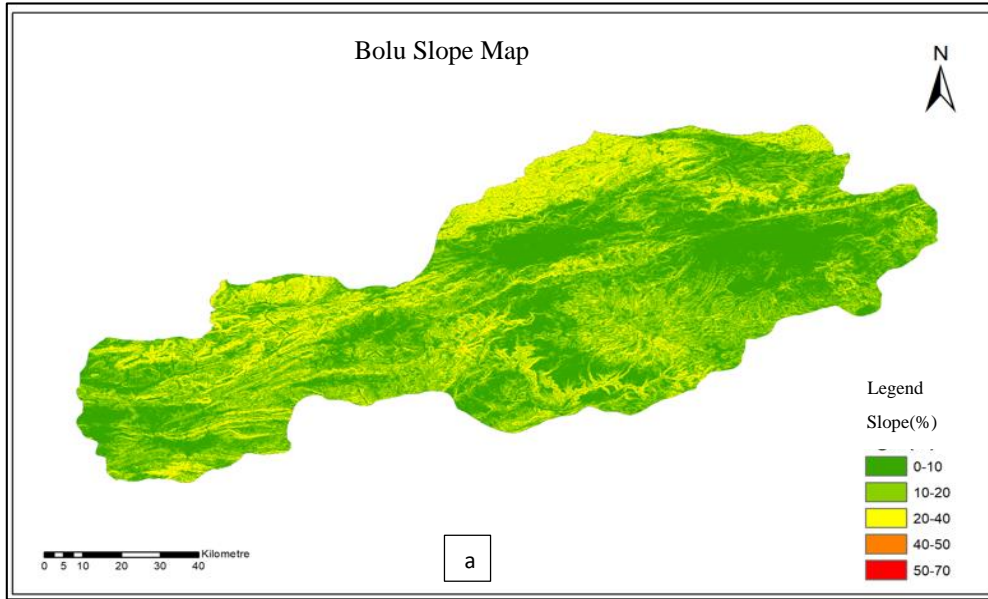
Criteria	1	2	3	4	5
Height	2500	2000	1500	1000	850
Slope	50-70	40-50	20-40	10-20	0-10
Aspect	North	NE, NW	West-East	SE, SW	South
Flora	Sparse Plant Areas	City Areas	Farming Areas	Meadows	Forests
Distance to Water Resources	2000	1500	1000	500	0
Distance to settlement	1000	2000	3000	4000	5000<
Distance to Roads	0	500	1000	1500	2000
Precipitation	400	600	8000	1000	1200

RESULTS

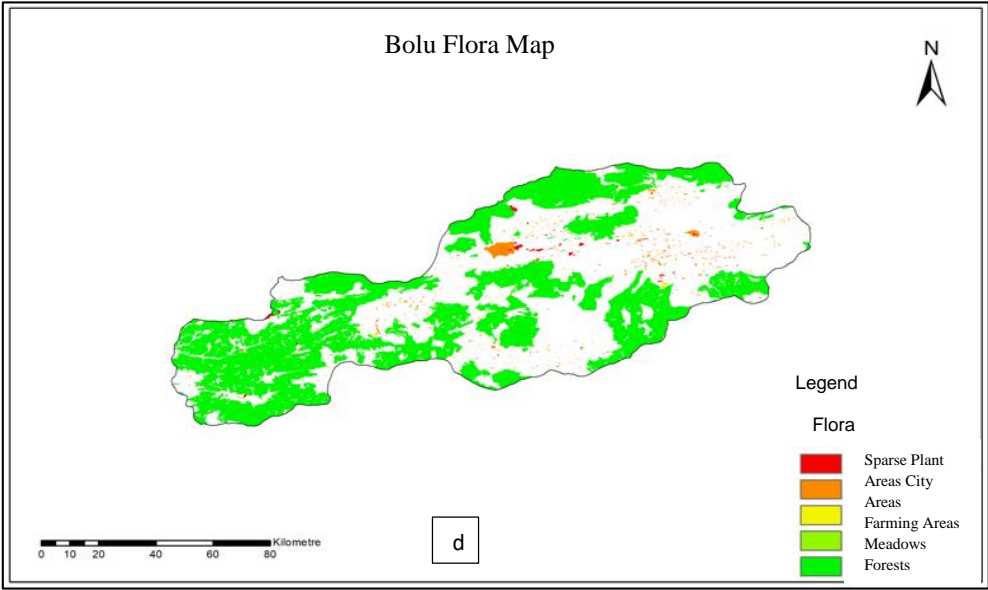
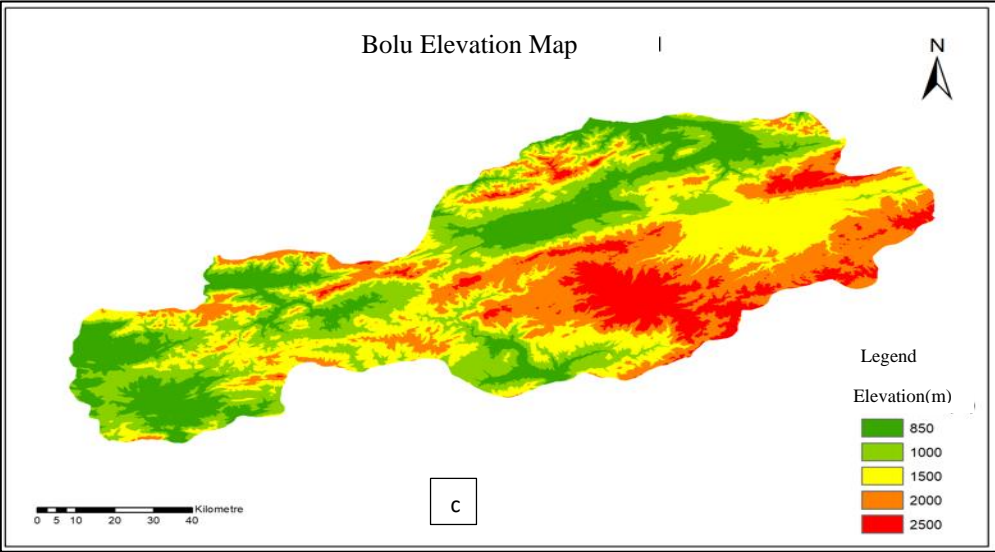
The resulting map obtained for each criterion for the weighted overlay analysis carried out to determine suitable beekeeping sites in Bolu province is shown in Figure 2. The red areas on the maps show suitable beekeeping areas, while the green areas show

unsuitable areas. When the maps of each criterion were examined, it was seen that the majority of the city was covered with mountains and forests. In addition, the existence of many lakes has been determined due to heavy rainfall, elevation differences and high slope.

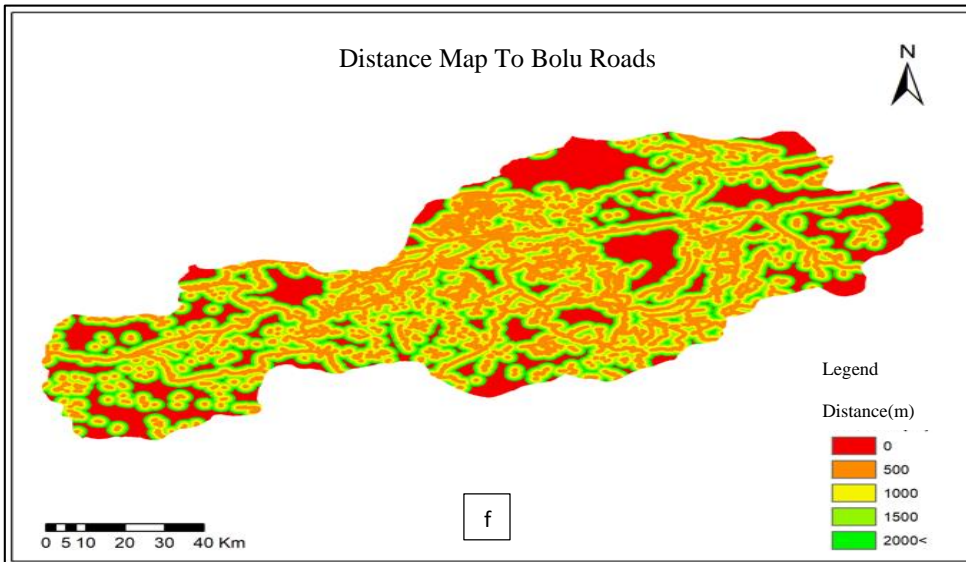
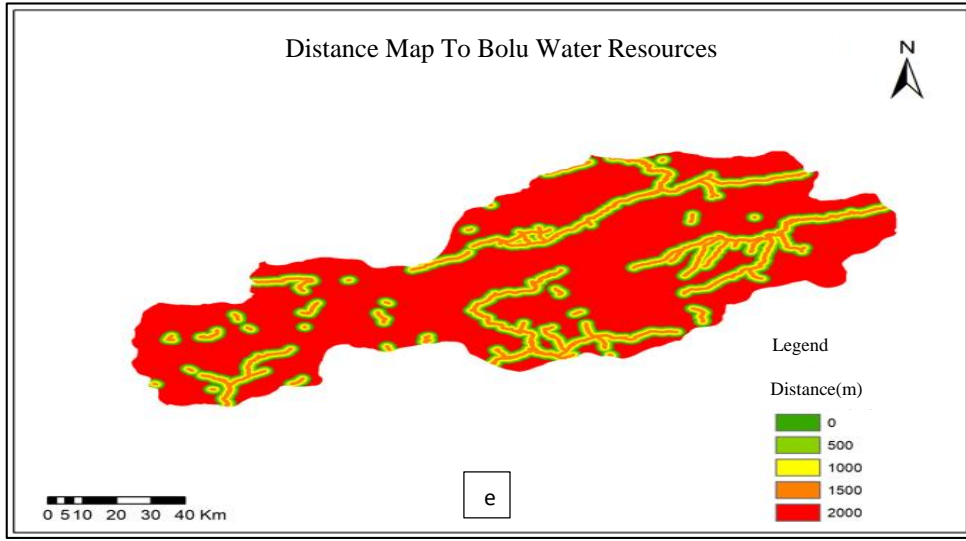
ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

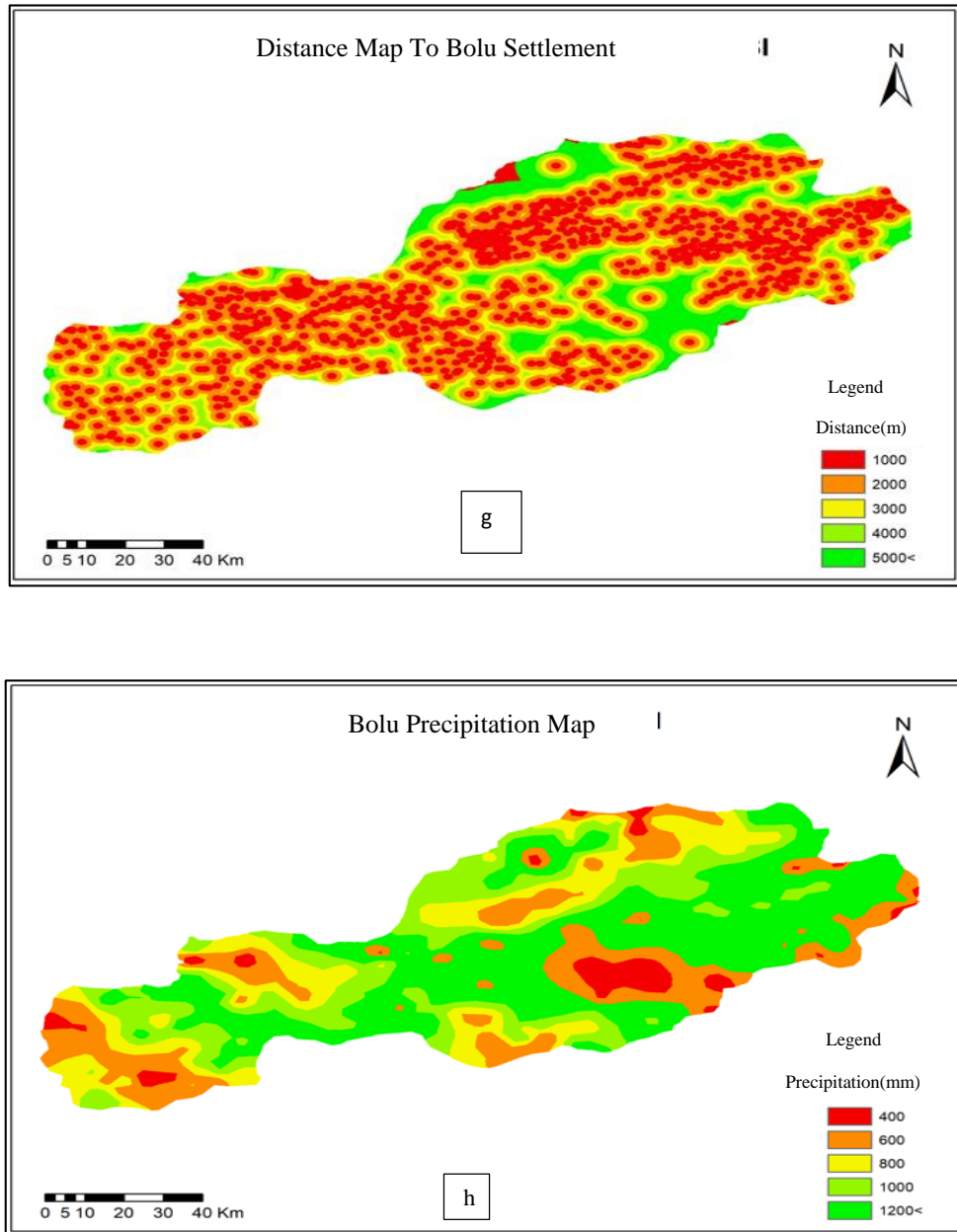


Figure 2. The class ranges and suitability map of the criteria (a: slope map, b: aspect map, c: elevation map, d: flora map, e: distance to water resources, f: distance to roads, g: distance to settlements map, h: precipitation map)

The map is divided into five classes according to the degree of suitability “very low, low, medium, high, and very high suitability”. Red areas represent low-

suitability areas, and green areas represent high-suitability areas. The suitability map formed as a result of the analysis is given in Figure 3.

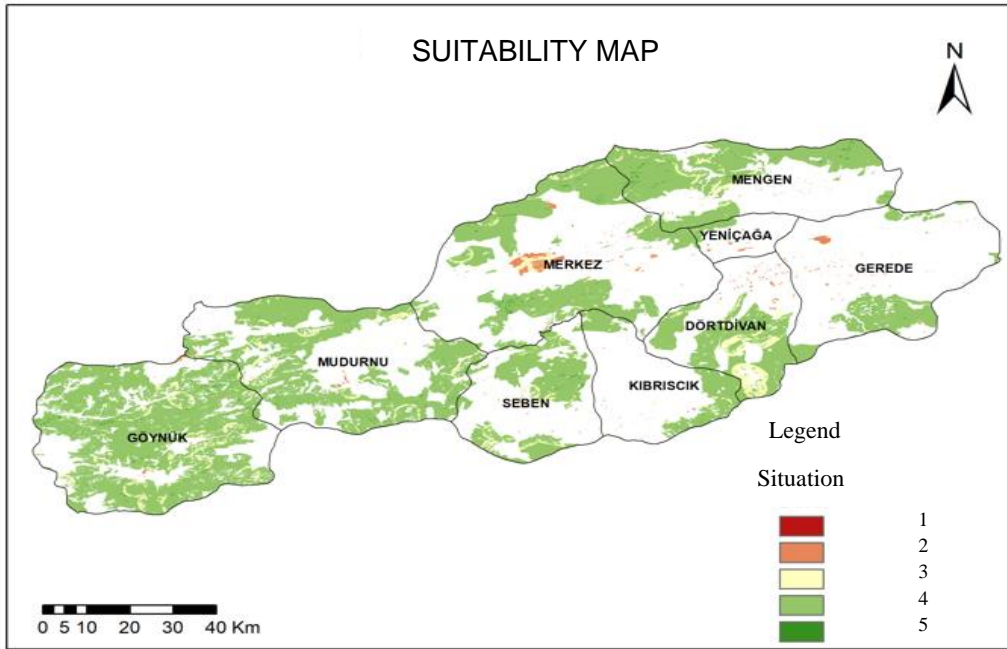


Figure 3. Map of suitable beekeeping places in Bolu province

After determining the suitable areas for the study, 34 beekeepers engaged in beekeeping in Bolu province were reached, and it was determined whether these beekeepers were in suitable beekeeping activities.

Coordinates were obtained from the locations of 34 beekeepers through field studies. The coordinates are overlapped with the conformity map, which is given in Figure 4.

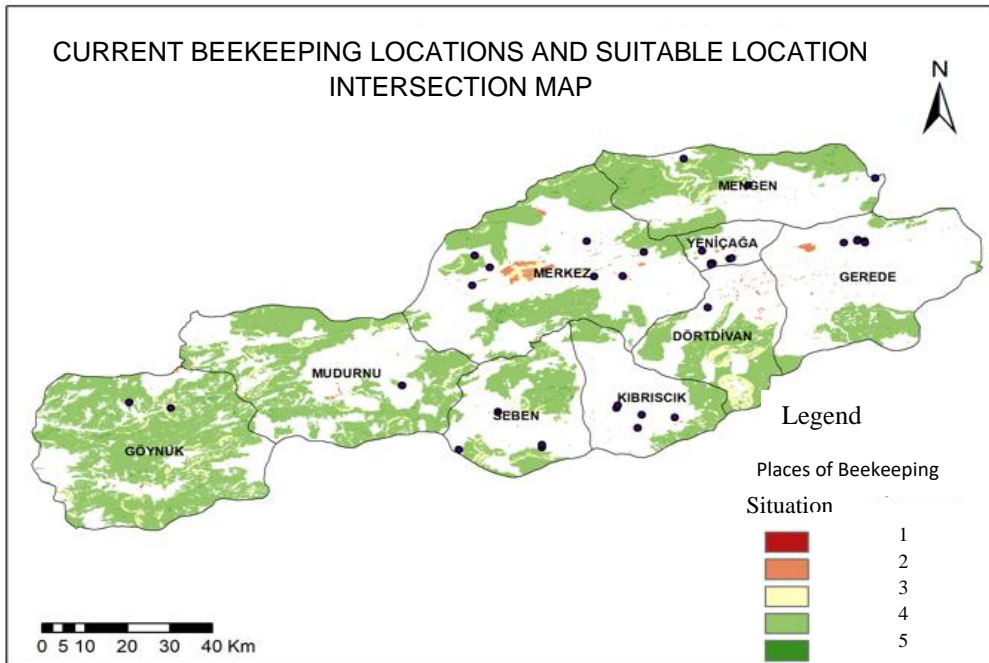


Figure 4. Existing beekeeping locations and intersection map of available locations

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

DISCUSSION

In order to continue beekeeping activities and increase the yield obtained from these activities, it is important to choose a suitable place and the success of the bee colony. Many factors affect success, such as the distance of the beehives to clean water sources, settlements and roads, the height of the hives location, precipitation, and flora. Each of these factors may have a different impact rate. Therefore, the use of Weighted Overlay Analysis in determining suitable beekeeping sites helps to determine the land selection and management strategies of the producers. In the studies, it is seen that weighted overlay analysis is widely used to determine suitable beekeeping sites (Maris et al., (2008); Yalçın et al., (2019); Yılmaz et al., (2021)). For example, Ceylan and Sarı (2017) used multi-criteria decision analysis to determine suitable beekeeping locations for Konya province. As a result of the study, it was determined that 82% of the existing bee areas intersect with the suitability map. In their study for the Montesinho Nature Park in Portugal, Fernandez et al., (2016) used multi-criteria decision-making analysis to determine potential beekeeping locations, and it was revealed that 60% of the existing bee sites in the study area were in suitable locations. In addition, it was emphasized that other bee sites that are not in suitable locations should be moved to suitable locations. Similar to these studies, weighted overlay analysis, one of the multi-criteria decision-making analysis methods, was used to determine suitable beekeeping areas in Bolu province and a suitability map of each criterion was created. Weighted overlay analysis was carried out by weighting the criteria and suitable beekeeping sites were determined. When the suitability map was examined, it was seen that 90.95% of the study area was suitable for beekeeping activities based on high suitability and very high suitability classes. Since the weight value of the flora criterion is high in forming the suitability map, it is one of the critical criteria affecting the map. When the unsuitable places are examined, it is seen that these areas are cemeteries, bushes, settlements, locations far from water sources, close to roads and on the north facade. When looking at suitable places, it has been determined that there are primarily forested and grassy areas, areas far from settlements, industrial areas and roads, areas close to water sources and in the southern regions. When the intersection of the 34 existing beekeepers' locations with the suitability map was examined, it was determined that 3 were in

high suitability, 9 were in medium suitability, 2 were in low suitability, and 20 were beekeeping in non-flora locations. Considering that flora is an important criterion, the fact that beekeeping activities are carried out away from flora explains why the yield is low and shows that beekeeping activities are not sufficiently utilized.

Conclusion

This study is specific to the province of Bolu, and the suitability map of each province should be created within itself since each province's ecology, flora, topography, and climate are different. For this reason, it is not the right approach to compare the studies. To increase the efficiency obtained from the study, the number of criteria can be increased by adding criteria such as temperature, wind and humidity. Keeping more detailed records on these criteria, suitable beekeeping sites, and their determination will provide great convenience and important information for this and similar studies. Data on critical criteria such as flora, such as biodiversity, bloom duration and density of flora, etc. and adding such details will increase the efficiency obtained from the study and shed light on many studies.

In a city like Bolu, 90% of which are suitable for beekeeping activities, only 8% of the existing beekeepers do beekeeping at a high availability place, which is a very low rate, and this rate should be increased.

Spatial analysis results show how critical the geographical conditions of the region are for the sustainability of beekeeping activities in Bolu province. At the same time, it should not be forgotten that spatial analyzes can be used for other sustainable activities besides beekeeping, and such studies can be an important tool to strengthen the local economy. This study may also help local beekeepers improve their businesses by focusing on sustainable beekeeping practices. Identifying suitable beekeeping areas in the region can contribute to the local economy by allowing beekeepers to work more efficiently and effectively. For this, beekeepers should be informed by the related institutions and studies.

Author contribution: The authors contributed equally in the study. They designed, performed, analyzed the data, wrote and revised the manuscript.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Conflict of Interest: No conflict of interests to be reported.

Data availability: All data and materials used and/or analyzed during the current study are available in this manuscript.

Ethical issue: No applicable requirement for the approval of ethics committee.

Source of Finance: The study was financially supported as a research project by the Scientific and Technological Research Council of Turkey (221O140).

REFERENCES

- Abou-Shaara HF, Al-Ghamdi AA, Mohamed AAA. suitability map for keeping honey bees under harsh environmental conditions using geographical information system. *World Appl. Sci. J.*, 2013;22:1099-1105
- Arslan H, Şıkoğlu E, Uçar M, Siverek'te (Şanlıurfa) arıcılığın gelişimi ve arıcılık faaliyetleri, *Turkish Studies–International Periodical for the Languages, Literature and History of Turkish or Turkic* Volume 10/6 Spring 2015. 2015;10(6):157-178.
<http://dx.doi.org/10.7827/TurkishStudies.8095>
- Bolu İl Kültür ve Turizm Müdürlüğü, Bolu. <https://bolu.ktb.gov.tr/TR-157477/bolu.html> (25.07.2023)
- Ceylan DA, Sarı F. Konya ili için çok ölçütlü karar analizleri ile en uygun arıcılık yerlerinin belirlenmesi. *U. Arı. D.- U. Bee. J.*, 2017;17(2):59-71. DOI: 10.31467/uluaricilik.373637
- Fernandez P, Roque N, Anjos O. Spatial multicriteria decision analysis to potential beekeeping assessment. Case study: Montesinho Natural Park (Portugal). In: Sarjakoski, T., Santos, M.Y., Sarjakoski, L.T. (Eds.), 19th AGILE International Conference on Geographic Information Science-Geospatial Data in a Changing World, Helsinki, Finland, 2016
- Maris N, Mansor S, Shafri H. Apicultural site zonation using GIS and Multi-Criteria Decision analysis. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 2008;31(2):147-162
- Öder E. Bal arılarının beslenmesi. İstanbul: Hasat Yayıncılık, 1989
- Sönmez T, Gencal B. Bursa Orman Bölge Müdürlüğü sınırlarında bulunan bazı odunsu bitki türleri ile kurulabilecek potansiyel bal ormanı alanlarının belirlenmesi. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi*, 2019;20(2):156-163. DOI: 10.17474/artvinofd.486880
- Yılmaz E, Sesli FA, Uzun ÖF. Arıcılık faaliyetleri için uygun yerlerin coğrafi bilgi sistemleri ile belirlenmesi: şavşat ilçesi örneği. *Black Sea Journal of Engineering and Science*, 2021;4(3):111-116. DOI: 10.34248/bsengineering.948181.
- Yalçın, H., Ağaçasapan, B., Çabuk, A., 2019. Coğrafi Bilgi Sistemleri ile Uygun Arıcılık Yerlerinin Belirlenmesi. *GSI Journals Serie C: Advancements in Information Sciences and Technologies*, 1 (2): 1-15.
- Zoccali P, Malacrinò A, Campolo O, Laudani F, Algeri GM, Giunti G, Strano CP, Benelli G, Palmeri V. A novel GIS-based approach to assess beekeeping suitability of Mediterranean lands. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2017;24(5):1045-1050. DOI: 10.1016/j.sjbs.2017.01.062.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

DIVERSITY OF STINGLESS BEES, *Tetragonula* sp. (HYMENOPTERA: APIDAE) IN TAMIL NADU, INDIA

Hindistan Tamil Nadu'da İğnesiz Arılar, *Tetragonula* Sp. (Hymenoptera: Apidae) Çeşitliliği

Paulraj SABATINA, Madapuji Rajagopalan SRINIVASAN*, Marimuthu MURUGAN, Vangili Ramasamy SAMINATHAN

Department of Agricultural Entomology, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore 641-003, Tamil Nadu, INDIA, E-mail: sabitinajustin@gmail.com, ORCID No: 0000-0002-8398-7108, *Corresponding author E-mail: mrsrini@tnau.ac.in, ORCID No: 0000-0002-5922-8208, E-mail: entomurugan@rediffmail.com, ORCID No: 0000-0002-7485-1153, E-mail: saminathanvr@tnau.ac.in, ORCID No: 0000-0002-6456-1814

Received / Geliş Tarihi: 08.10.2023

Accepted / Kabul Tarihi: 31.10.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1372973

ABSTRACT

The present study was conducted to find the diversity of stingless bees (*Tetragonula* sp.) in Coimbatore, Madurai, Dindigul, and Tiruchirappalli districts in Tamil Nadu, India. Adult worker bees were collected from feral stingless bee colonies from 16 locations, four from each district. The collected stingless bees were preserved in 70% alcohol (ethanol) and examined under a Leica stereo-zoom microscope. Seventeen morphometric key characteristics were measured to know the diversity of stingless bees. The results revealed that two species of stingless bees, *Tetragonula iridipennis* and *T. laeviceps* were prevalent in the four selected districts of Tamil Nadu. Four vital morphometric characteristics of the worker bees namely the head width, the forewing length, the hind tibial length, and the whole body length helped to distinguish the two *Tetragonula* species. Among all the locations, the bees collected from L1- Insectary, TNAU (Coimbatore) had much higher values of the above four morphometric characters ($1.67\text{mm} \pm 0.04$, $3.69\text{mm} \pm 0.02$, $1.53\text{mm} \pm 0.01$ and $3.98\text{mm} \pm 0.14$ respectively) and were identified to be *T. laeviceps* based on these key morphometric characters. The bees from the rest of the 15 locations which had the morphometric values 1.59 to 1.61 mm, 3.20 to 3.41mm, 1.34 to 1.43mm and 3.51 to 3.65mm respectively were categorized as *T. iridipennis*. As a result, *T. iridipennis* was the most commonly prevalent stingless bee species in Coimbatore, Madurai, Dindigul and Trichy districts while *T. laeviceps* was found only to be present in Coimbatore.

Key words: *Tetragonula* sp., Distribution, Morphometrics, Species categorization, PCA

ÖZ

Bu çalışma, Hindistan'ın Tamil Nadu kentindeki Coimbatore, Madurai, Dindigul ve Tiruchirappalli bölgelerindeki iğnesiz arıların (*Tetragonula* sp.) çeşitliliğini bulmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Yetişkin işçi arılar, her bölgeden dörder adet olmak üzere 16 lokasyondaki yabani iğnesiz arı kolonilerinden toplanmıştır. Toplanan iğnesiz arılar %70'lik alkol (etanol) içinde muhafaza edildi ve Leica stereo zoom mikroskobu altında incelenmiştir. İğnesiz arıların çeşitliliğini bilmek için on yedi morfometrik temel özellik ölçülmüştür. Sonuçlar, iki iğnesiz arı türünün, *Tetragonula iridipennis* ve *T. laeviceps*'in Tamil Nadu'nun seçilen dört bölgesinde yaygın olduğunu ortaya çıkarmaktadır. İşçi arıların dört önemli morfometrik karakteri (baş genişliği, ön kanat uzunluğu, arka bacak uzunluğu ve

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

tüm vücut uzunluğu), iki *Tetragonula* sp'.yi ayırt etmeye yardımcı olmuştur. Tüm lokasyonlar arasında L1- Insectary, TNAU, Coimbatore'den toplanan arılar yukarıdaki dört morfometrik karakterin çok daha yüksek değerlerine sahip olduğu belirlenmiş olup (sırasıyla 1,67 mm ± 0,04, 3,69 mm ± 0,02, 1,53 mm ± 0,01 ve 3,98 mm ± 0,14) ve bu önemli morfometrik karakterlere dayanarak *T. laeviceps* olduğu kaydedilmiştir. Morfometrik değerleri sırasıyla 1,59 ila 1,61 mm, 3,20 ila 3,41 mm, 1,34 ila 1,43 mm ve 3,51 ila 3,65 mm olan 15 lokasyonun geri kalanındaki arılar ise *T. iridipennis* olarak kategorize edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Tetragonula* sp., Dağılım, Tamil Nadu, Morfometri, Tür sınıflandırması, PCA.

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Çalışmanın amacı: Bu çalışma, Hindistan'ın Tamil Nadu kentindeki Coimbatore, Madurai, Dindigul ve Tiruchirappalli bölgelerindeki iğnesiz arıların (*Tetragonula* sp.) çeşitliliğini bulmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada iğnesiz arı örneklerinin tüm işçi sınıfı için standart morfometrik karakterleri incelenmiştir. Sonuçlar standart taksonomik anahtarlar ve önceki literatürle karşılaştırılmıştır.

Gereç ve yöntemler: İğnesiz arıların işçi sınıfı, 2023 yılında her bölge için dört konum olmak üzere Hindistan'ın Tamil Nadu, Coimbatore, Madurai, Tiruchirappalli ve Dindigul olmak üzere dört bölgesinde tanımlanan yabancı kolonilerden toplanıp her konum (L)1- L16 olarak kodlanmıştır. On altı farklı lokasyonun her birinden on iğnesiz arı örneği toplanmıştır. Morfometrik çalışmalar için örnekler %70'lik alkolde muhafaza edilerek numunelerden antenler, kanatlar, bacaklar, kafa, mesosoma ve metasoma disekte edilmiştir. Leica M205C yakınlaştırmalı stereomikroskop yardımıyla, anten uzunluğu, başın uzunluğu ve genişliği, hamuli sayısı, arka tibial uzunluk, ön, orta ve arka bacak uzunluğu, vücut uzunluğu, mesosoma ve metasoma uzunluk ve genişliklerine ilişkin ölçümler (mm) alınmıştır. Genel tanımlamalar, geçerli literatür ve taksonomik anahtarlar, örnekleri ayırt etmek için kullanılmıştır.

Bulgular: L1'den (Insectary, TNAU, Coimbatore) toplanan işçi iğnesiz arı örneklerinin *T. laeviceps* olduğu, geri kalan örneklerin ise *T. iridipennis* olduğu önceki literatürdeki morfometrik değerlerle karşılaştırılarak tespit edilmiştir. PCA'da fark edilen ayırt edici karakterler kafa genişliği ile ön kanadın ve arka bacağın uzunluğu olmuştur. Veri matrisi, 17 morfometrik karakter ve 16 konum içeren 272 ölçümden oluşmuştur. Ana bileşenler, L2'den L16'ya kadar olan konumlar arasında herhangi bir değişiklik göstermedi ancak tek başına L1'deki numuneler diğer konumlardan sapmıştır. Daha fazla doğrulama için moleküler çalışmalar yapılabilir.

Sonuç: Hindistan Tamil Nadu'nun farklı bölgelerinde iğnesiz arıların (*Tetragonula* sp.) çeşitliliği ve dağılımı üzerine yapılan araştırmada, Coimbatore, Madurai, Dindigul ve Tiruchirappalli bölgelerinde en yaygın iğnesiz arı türünün *T. iridipennis* olduğu, *T. laeviceps*'in ise sadece Coimbatore'da mevcut olduğu bulunduğu belirlenmiştir. Türleri ayırt etmek için iğnesiz arıların işçi sınıfının morfometrik analizi kullanıldı. Bununla birlikte, daha ileri moleküler karakterizasyon tür kimliğinin doğrulanmasında önemli bir rol oynayabilir.

INTRODUCTION

In the year 1999, Heard reported that Stingless bees (Hymenoptera: Apidae) eusocial insects belong to five different genera *Melipona*, *Trigona*, *Meliponula*, *Dectylurina*, and *Lestrimelitta* and have significant pollination function. However stingless bees belonging to many other genera have been reported subsequently including *Paratrigona*, *Nogueirapis*, *Oxytrigona*, *Scaptotrigona*, *Lestrimelitta*, *Friesella*, *Tetragonisca*, etc. (Rahman et al., 2015). Bees belong to these genera collect propolis, which they use in construction and sealing of their hives. Propolis is a combination of pollen, plant resins, and beeswax. Meliponini, usually form large colonies, attaining 10,000 to more than 100,000 individuals in number. (Michener, 2007). *Trigona iridipennis* was the type species of the subgenus *Tetragonula*, that contains 12 species which was the most prevalent (Rasmussen, 2013; Viraktamath and Roy 2022). *Tetragonula iridipennis*, a stingless bee species, was frequently observed in India (Raakhee and Devanesan, 2000; Swaminathan, 2000; Danaraddi and Viraktamath, 2009). Seven other *Tetragonula* species from India were also reported, in addition to *T. iridipennis* (Rasmussen, 2013). In the southern region of India, some research on the geographic distribution and morphometric analysis of *T. iridipennis* was conducted (Devanesan et al., 2013). One of the most used methods for classifying

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

organisms is morphometric taxonomy. Several previous attempts have been made to categorize stingless bees based on their body size, number of hamuli, length of forewing and hind wing, and cephalic characteristics (Vijaykumar and Jeyaraj, 2013). In southern regions of Tamil Nadu, there was no more report other than *T. iridipennis*. Hence, the study on diversity of *Tetragonula* sp. in these regions has to be crucial. The goal of the present research was based on their morphometric characteristics to explore and describe *Tetragonula* sp. and their distribution in Tamil Nadu.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Location

Worker caste of the stingless bees were collected from the identified feral colonies (Fig. 1) from four districts (Coimbatore, Madurai, Tiruchirappalli, and Dindigul) of Tamil Nadu, India with four locations for each district in 2023, and each location was named and denoted by the codes Location (L)1 to L16.

Table 1. GPS (Global Positioning System) data for sampling locations

District	Sampling location	Geographical position	
		Latitude	Longitude
Coimbatore	L1-Insectary, TNAU	11.016925°	76.929063°
	L2-Botanical garden	11.015313°	76.932123°
	L3-Thondamuthur	10.992892°	76.843539°
	L4-P. N. Pudhur	11.009005°	76.929158°
Madurai	L5-Narasingam	9.975217°	78.208031°
	L6-Vowal thottam	9.964481°	78.201628°
	L7-Melur	9.970307°	78.204831°
	L8-Insectary, AC&RI.	9.961482°	78.202803°
Dindigul	L9-Oddanchatram	10.475583°	77.733461°
	L10-Nilakottai	10.234328°	77.896929°
	L11-Athoor	10.320013°	77.902908°
	L12-Thadiyankudisai	10.296814°	77.708788°
Tiruchirappalli	L13-Navalurkottapattu	10.752106°	78.602454°
	L14-Woraiyur	10.828859°	78.691849°
	L15-Manapparai	10.609503°	78.423773°
	L16-Muthukulam	10.755965°	78.601856°

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE



a. Colony inside the wooden box



b. Colony inside the iron rod



c. Colony inside the tree trunk



d. Colony inside the mud wall



e. Colony inside the mud pot



f. Colony inside the bamboo cavity

Figure 1. Identified feral colonies of stingless bees, *Tetragonula* sp.

Preservation and Morphometric analysis

Ten stingless bee specimens were collected from each of the sixteen different locations. The specimens were preserved in 70% alcohol for morphometric studies. The antennae, wings, legs, head, mesosoma, and metasoma were dissected from the specimen. The measurements (mm) on antennal length, length and width of head, compound eyes, forewing, number of hamuli, hind tibial length, length of fore, middle and hind leg, body length, length and width of mesosoma and metasoma were taken with the help of Leica M205C zoom stereomicroscope. In total, seventeen morphometric key characteristics (Table 2) were measured to find out the distribution of stingless bees in different districts of Tamil Nadu.

The stingless bee specimens' morphometric measurements on the head include antennal length, length and width of the head and compound eyes. The antennal length was measured from the scape to the last flagellomere. The head length from the head's base to the mandibles' summit straight along the median lines and head width from the most significant distance across the eyes was measured. Measuring the compound eyes' length from the head's apex to the base and width at the most significant width point of compound eyes was done. Morphometric measurements on wings of stingless bee specimens include the length and width of the forewing and the number of hamuli on the hind wing. The length of the forewing from the wing base to the apex and the width at the greatest width of the forewing were measured. The number of hamuli present on the hind wing was recorded.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Morphometric measurements on legs include the length of the hind tibia, hind leg, middle leg, and foreleg. The hind tibial length was measured vertically, and the three pairs of legs were measured segment-wise. The mesosoma's length was recorded along the straight line from the cervix to the propodeum, the first segment of the metasoma, and the maximum width of the mesosoma was also measured. The metasoma's length was recorded

from the propodeum to the apical point, and the maximum width of the metasoma was measured. The total body length was measured from the tip of the head to the abdominal end. The overall descriptions were used to distinguish the specimen with the help of prevailing pieces of literature and taxonomic keys (Sakagami, 1978,; Rasmussen, 2013,; Rahman *et al.*, 2015).

Table 2. List of morphometric characters examined

Morphometric key characters	Abbreviation
Head length	HL
Head width	HW
Antennal length	AL
Compound eye length	CL
Compound eye width	CW
Forewing length	FWL
Forewing width	FWW
Number of hamuli	NH
Hind tibial length	HTL
Hind leg length	HLL
Middle leg length	MLL
Foreleg length	FLL
Mesosomal length	MSL
Mesosomal width	MSW
Metasomal length	MTSL
Metasomal width	MTSW
Body length	BL

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Statistical Analysis

Mean and Standard deviation were calculated for the replicated samples. Principal Component Analysis (PCA) was done to study the variation in the morphometric values of *Tetragonula* sp. based on the covariance matrix. PCA was worked out by using Python programming software.

RESULTS

This study classified key characters (Fig.2) into head morphometry, wing morphometry, leg morphometry, mesosomal, and metasomal morphometry. These measurements were compared with standard taxonomic keys and the prevailing literature to identify the species variation among the collected specimens.

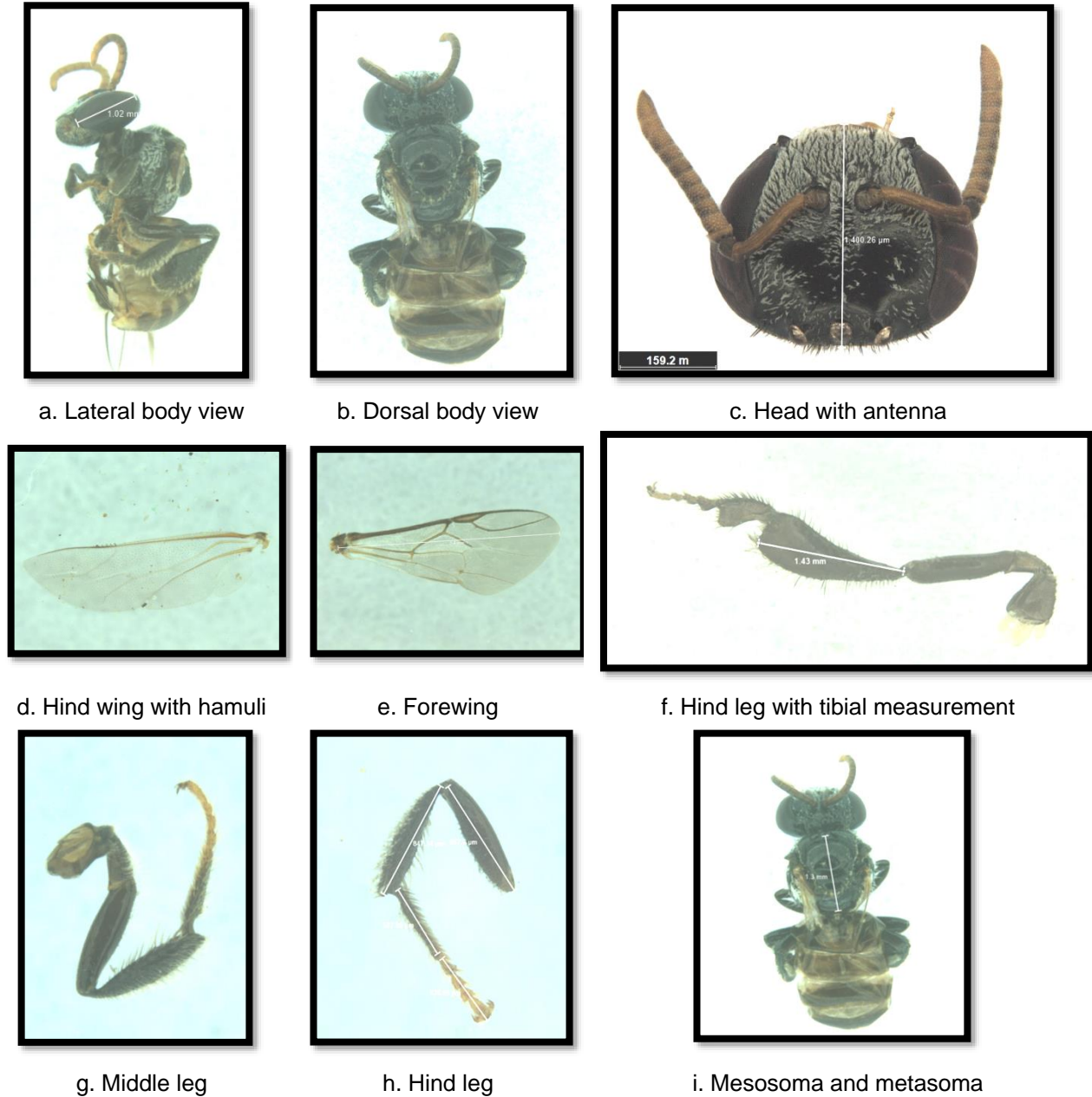


Figure 2. Magnified images of stingless bee species under Leica stereo zoom microscope

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Head morphometry (Table 3)

Among the 16 locations studied, the specimens collected from L1 (Insectary, TNAU, Coimbatore), measured with the most significant length of the head ($1.46\text{mm} \pm 0.05$) followed by L13 (Navalurkottapattu, Tiruchirappalli) ($1.38\text{mm} \pm 0.06$). In all other specimens, the head length ranged from 1.20 to 1.34 mm. The greatest width of the head was also recorded from L1 ($1.67\text{mm} \pm 0.04$) followed by L2 ($1.62\text{mm} \pm 0.09$), both belonging to the Coimbatore district. All other specimens ranged from

1.59 to 1.61mm of head width. The maximum antennal length was observed from L1 ($1.89\text{mm} \pm 0.02$), and others ranged from 1.80 to 1.86mm. The length of the compound eye was the greatest ($1.06\text{mm} \pm 0.05$) of the specimens collected from L1 and L5 (Narasingam, Madurai), and others ranged from 0.98 to 1.05mm in length of their compound eye. The width of the compound eye was also greater ($0.48\text{mm} \pm 0.03$) in L1, followed by L13 ($0.44\text{mm} \pm 0.03$), and for other specimens, ranged from 0.35 to 0.43mm.

Table 3. Head morphometric measurements of examined stingless bee specimens

Location/key characters	HL \pm SD	HW \pm SD	AL \pm SD	CL \pm SD	CW \pm SD
L1	1.46 ± 0.05	1.67 ± 0.04	1.89 ± 0.02	1.06 ± 0.05	0.48 ± 0.03
L2	1.32 ± 0.03	1.62 ± 0.09	1.81 ± 0.49	1.04 ± 0.60	0.38 ± 0.22
L3	1.29 ± 0.05	1.60 ± 0.01	1.83 ± 0.05	0.98 ± 0.02	0.37 ± 0.02
L4	1.30 ± 0.02	1.60 ± 0.04	1.82 ± 0.06	1.02 ± 0.04	0.35 ± 0.01
L5	1.32 ± 0.03	1.61 ± 0.05	1.86 ± 0.01	1.06 ± 0.05	0.35 ± 0.03
L6	1.30 ± 0.02	1.60 ± 0.07	1.81 ± 0.02	1.04 ± 0.03	0.41 ± 0.01
L7	1.29 ± 0.03	1.59 ± 0.04	1.86 ± 0.01	1.04 ± 0.02	0.39 ± 0.02
L8	1.32 ± 0.02	1.60 ± 0.05	1.84 ± 0.01	1.05 ± 0.04	0.35 ± 0.03
L9	1.20 ± 0.04	1.59 ± 0.01	1.81 ± 0.02	1.02 ± 0.04	0.43 ± 0.01
L10	1.25 ± 0.05	1.57 ± 0.03	1.86 ± 0.07	1.05 ± 0.02	0.38 ± 0.02
L11	1.20 ± 0.01	1.60 ± 0.01	1.80 ± 0.04	1.02 ± 0.01	0.39 ± 0.02
L12	1.29 ± 0.01	1.59 ± 0.03	1.81 ± 0.03	0.99 ± 0.03	0.41 ± 0.01
L13	1.38 ± 0.06	1.60 ± 0.04	1.82 ± 0.02	0.98 ± 0.02	0.44 ± 0.03
L14	1.30 ± 0.06	1.59 ± 0.03	1.80 ± 0.07	1.02 ± 0.01	0.42 ± 0.01
L15	1.32 ± 0.01	1.60 ± 0.02	1.86 ± 0.01	1.04 ± 0.31	0.39 ± 0.02
L16	1.34 ± 0.02	1.57 ± 0.06	1.82 ± 0.07	0.98 ± 0.02	0.41 ± 0.01

Note: Values are the mean of three replications for each location. SD: Standard Deviation. The mean values were measured in millimeters (mm).

Wing morphometry (Table 4)

Maximum length of forewing among all the examined specimens was recorded from L1 ($3.69\text{mm} \pm 0.02$), followed by L3 (3.41 ± 0.11), L12 ($3.41\text{mm} \pm 0.10$), and L14 ($3.41\text{mm} \pm 0.08$), belonged to Coimbatore, Dindigul and Tiruchirappalli districts respectively. Others measured from 3.20 to 3.40mm in their length

of forewings. The greatest width of forewing was observed from L1 ($1.67\text{mm} \pm 0.07$) followed by L5 ($1.38\text{mm} \pm 0.01$) and L7 ($1.38\text{mm} \pm 0.02$) which belonged to the locations of Narasingam (Madurai) and Melur (Madurai) respectively. The rest of the specimens measured from 1.27 to 1.35mm of the forewing width. The number of hamuli on their hind wing was 5 for all the examined specimens.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 4. Wing morphometric measurements of examined stingless bee specimens

Location/key characters	FWL \pm SD	FWW \pm SD	NH \pm SD
L1	3.69 \pm 0.02	1.67 \pm 0.07	5 \pm 0.00
L2	3.40 \pm 0.15	1.31 \pm 0.01	5 \pm 0.00
L3	3.41 \pm 0.11	1.32 \pm 0.01	5 \pm 0.00
L4	3.35 \pm 0.03	1.32 \pm 0.03	5 \pm 0.00
L5	3.29 \pm 0.15	1.38 \pm 0.01	5 \pm 0.00
L6	3.32 \pm 0.04	1.32 \pm 0.02	5 \pm 0.00
L7	3.20 \pm 0.04	1.38 \pm 0.02	5 \pm 0.00
L8	3.35 \pm 0.02	1.35 \pm 0.03	5 \pm 0.00
L9	3.40 \pm 0.01	1.27 \pm 0.04	5 \pm 0.00
L10	3.36 \pm 0.01	1.32 \pm 0.03	5 \pm 0.00
L11	3.32 \pm 0.02	1.28 \pm 0.01	5 \pm 0.00
L12	3.41 \pm 0.10	1.30 \pm 0.03	5 \pm 0.00
L13	3.35 \pm 0.03	1.29 \pm 0.05	5 \pm 0.00
L14	3.41 \pm 0.08	1.31 \pm 0.06	5 \pm 0.00
L15	3.38 \pm 0.15	1.32 \pm 0.05	5 \pm 0.00
L16	3.35 \pm 0.14	1.35 \pm 0.04	5 \pm 0.00

Note: Values are the mean of three replications for each location. SD: Standard Deviation. The mean values were measured in millimeters (mm).

Leg morphometry (Table 5)

The greatest hind tibial length was recorded on the specimens collected from L1 (1.53mm \pm 0.01), followed by L3 (Thondamuthur, Coimbatore), L5 (Narasingam, Madurai), and L8 (AC&RI, Madurai) and the measurements were 1.43mm \pm 0.02, 1.43mm \pm 0.10 and 1.43mm \pm 0.01 respectively. The remaining specimens varied from 1.34 to 1.42mm of their tibial length. The hind leg's length was the

maximum in L1 (3.72mm \pm 0.03), followed by L4 (P.N. Pudhur, Coimbatore) (3.69mm \pm 0.04). Other specimens ranged from 3.35 to 3.64mm of the hind leg's length. The maximum length of the middle leg (2.96mm \pm 0.03) and foreleg (2.82mm \pm 0.04) was recorded from L1. The other specimens recorded from 2.61 to 2.87mm of middle leg length and 2.74 to 2.81mm of foreleg length.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 5. Leg morphometric measurements of examined stingless bee specimens

Location/key characters	HTL ± SD	HLL ± SD	MLL ± SD	FLL ± SD
L1	1.53 ± 0.01	3.72 ± 0.03	2.96 ± 0.03	2.82 ± 0.04
L2	1.42 ± 0.03	3.64 ± 0.05	2.85 ± 0.04	2.79 ± 0.05
L3	1.43 ± 0.02	3.63 ± 0.01	2.81 ± 0.01	2.81 ± 0.07
L4	1.40 ± 0.04	3.69 ± 0.04	2.86 ± 0.07	2.76 ± 0.06
L5	1.43 ± 0.10	3.51 ± 0.05	2.69 ± 0.08	2.77 ± 0.12
L6	1.39 ± 0.06	3.49 ± 0.03	2.61 ± 0.10	2.74 ± 0.10
L7	1.35 ± 0.05	3.50 ± 0.08	2.66 ± 0.03	2.79 ± 0.09
L8	1.43 ± 0.01	3.48 ± 0.14	2.69 ± 0.02	2.77 ± 0.08
L9	1.36 ± 0.02	3.35 ± 0.02	2.73 ± 0.11	2.80 ± 0.03
L10	1.41 ± 0.01	3.41 ± 0.12	2.69 ± 0.08	2.79 ± 0.11
L11	1.38 ± 0.05	3.38 ± 0.05	2.71 ± 0.11	2.77 ± 0.10
L12	1.42 ± 0.01	3.44 ± 0.06	2.73 ± 0.05	2.79 ± 0.06
L13	1.34 ± 0.02	3.42 ± 0.11	2.72 ± 0.05	2.77 ± 0.09
L14	1.41 ± 0.02	3.48 ± 0.02	2.81 ± 0.07	2.74 ± 0.01
L15	1.38 ± 0.03	3.49 ± 0.01	2.87 ± 0.11	2.81 ± 0.10
L16	1.42 ± 0.05	3.42 ± 0.03	2.79 ± 0.02	2.79 ± 0.11

Note: Values are the mean of three replications for each location. SD: Standard Deviation. The mean values were measured in millimeters (mm).

Morphometry of mesosoma and metasoma (Table 6)

The maximum mesosomal length ($1.36\text{mm} \pm 0.02$) was recorded from L1, followed by L9 (Oddanchatram, Dindigul) and L14 (Woraiyur, Tiruchirappalli) measuring $1.30\text{mm} \pm 0.04$. Other specimens ranged from 1.19 to 1.29mm of mesosomal length. The specimens collected from L6 (Vowal Thottam, Madurai) measured the maximum mesosomal width ($1.31\text{mm} \pm 0.04$), and others ranged from 1.21 to 1.29mm. The maximum

metasomal length was measured by L5 ($1.24\text{mm} \pm 0.03$) and L15 ($1.24\text{mm} \pm 0.05$), and the remaining specimens ranged from 1.18 to 1.23mm. The width of metasoma was comparatively higher on the specimens collected from L1, measuring $1.17\text{mm} \pm 0.01$ followed by L16 ($1.16\text{mm} \pm 0.04$), and the rest ranged from 1.10 to 1.14mm. The body length was comparatively greater on the specimens collected from L1, measured at about $3.98\text{mm} \pm 0.14$ and other specimens varied from 3.51 to 3.65mm of body length.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 6. Morphometric measurements of examined stingless bee specimens on their mesosoma, metasoma and their body length

Location/key characters	MSL ± SD	MSW ± SD	MTSL ± SD	MTSW ± SD	BL ± SD
L1	1.36 ± 0.02	1.28 ± 0.05	1.18 ± 0.05	1.17 ± 0.01	3.98 ± 0.14
L2	1.21 ± 0.03	1.29 ± 0.01	1.20 ± 0.01	1.13 ± 0.02	3.65 ± 0.05
L3	1.24 ± 0.04	1.21 ± 0.02	1.23 ± 0.03	1.10 ± 0.02	3.58 ± 0.08
L4	1.22 ± 0.01	1.24 ± 0.01	1.20 ± 0.04	1.12 ± 0.01	3.51 ± 0.10
L5	1.20 ± 0.05	1.29 ± 0.02	1.24 ± 0.03	1.12 ± 0.03	3.59 ± 0.07
L6	1.22 ± 0.04	1.31 ± 0.04	1.19 ± 0.01	1.12 ± 0.01	3.61 ± 0.11
L7	1.19 ± 0.04	1.29 ± 0.05	1.19 ± 0.03	1.13 ± 0.02	3.56 ± 0.15
L8	1.20 ± 0.01	1.27 ± 0.01	1.21 ± 0.02	1.12 ± 0.03	3.58 ± 0.05
L9	1.30 ± 0.04	1.29 ± 0.02	1.18 ± 0.01	1.11 ± 0.02	3.56 ± 0.09
L10	1.22 ± 0.05	1.28 ± 0.06	1.21 ± 0.03	1.14 ± 0.03	3.59 ± 0.03
L11	1.24 ± 0.02	1.21 ± 0.02	1.19 ± 0.01	1.12 ± 0.03	3.62 ± 0.04
L12	1.20 ± 0.01	1.29 ± 0.01	1.20 ± 0.02	1.12 ± 0.01	3.65 ± 0.05
L13	1.24 ± 0.05	1.21 ± 0.01	1.21 ± 0.04	1.10 ± 0.02	3.56 ± 0.04
L14	1.30 ± 0.03	1.24 ± 0.05	1.18 ± 0.04	1.12 ± 0.04	3.61 ± 0.09
L15	1.22 ± 0.02	1.21 ± 0.02	1.24 ± 0.05	1.13 ± 0.01	3.59 ± 0.03
L16	1.29 ± 0.01	1.26 ± 0.05	1.21 ± 0.02	1.16 ± 0.04	3.65 ± 0.06

Note: Values are the mean of three replications for each location. SD: Standard Deviation. The mean values were measured in millimeters (mm).

DISCUSSION

The recorded values were correlated with standard taxonomic keys and prevailing literature. The key parameters which have significant difference in morphometric characteristics between the specimens were preferred to study the diversity of *Tetragonula* sp. Among the 17 morphometrics, HW, AL, FWL, NH, HTL, HLL, MSL, MTSW and BL were chosen for their significance. And some of the existing literature also accounted the key morphometrics which was in concurrence with Trianto *et al.* (2020) who reported that *T. laeviceps* on the basis of Head width, forewing length, hind tibial length and body length.

Based on the results (Fig. 3), the head width (1.67 ± 0.04) of specimens collected from L1 (Insectary, Coimbatore) was in line with Trianto *et al.* (2020), who reported that the head width of *T. laeviceps* was 1.68mm. Except for L1, all other specimens ranged from 1.59 to 1.61mm in head width, which concurs with Rasmussen (2013), who stated that the head width of *T. iridipennis* was 1.60mm. Also, the antennal length, which ranged from 1.80 to 1.86mm, is in concurrence with the results of Kishan *et al.* (2017), who found that the antennal length of *T. iridipennis* was from 1.78 to 1.87mm.

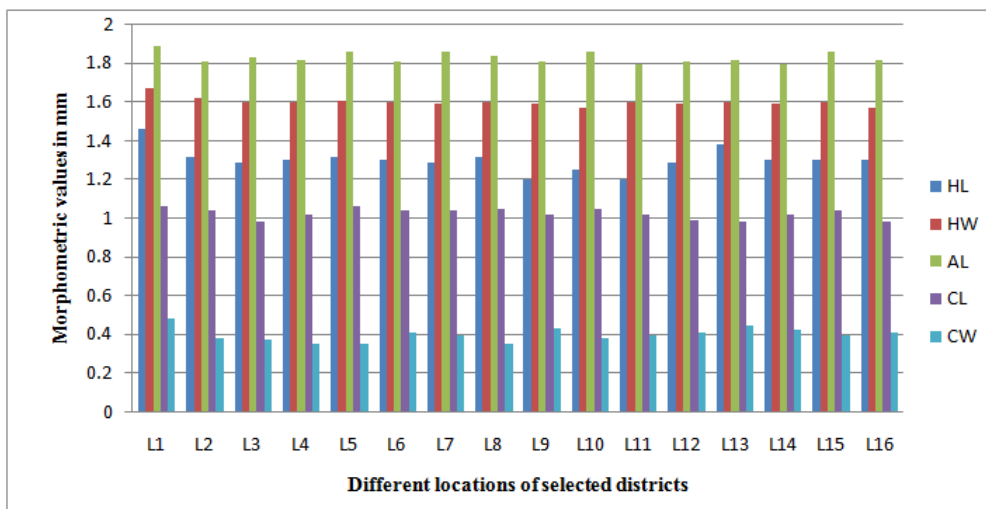


Figure 3. Head morphometry of stingless bee specimens

In the present study (Fig. 4), the length of the forewing was found to be $3.69\text{mm} \pm 0.02$ for the specimens collected from L1 (Insectary, Coimbatore) which is on par with Trianto *et al.* (2020) who reported the forewing length of *T. laeviceps* was

3.76mm. The number of hamuli for all the specimens was 5, which is in line with Smith (2012), Rasmussen (2013), and Trianto *et al.* (2020) who stated that the number of hamuli for *Tetragonula sp.* was 5.

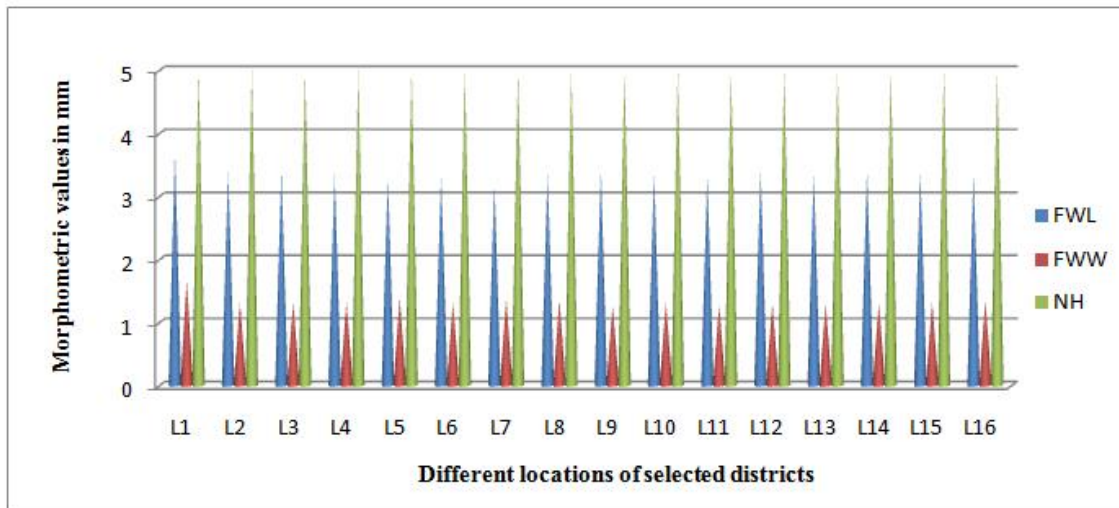


Figure 4. Wing morphometry of stingless bee specimens

According to the results of the present research (Fig. 5), the hind tibial length of L1 (Insectary, Coimbatore) specimens recorded about $1.53\text{mm} \pm 0.01$, which is in concurrence with Trianto *et al.* (2020) reported that the hind tibial length of *T. laeviceps* was measured about 1.55mm and Danaraddi and Viraktamath (2009) stated that the

hind tibial length of *T. iridipennis* was ranged from 1.32 to 1.39mm. The hind leg length of all the specimens except the Coimbatore district ranged from 3.41 to 3.51mm, which corroborates with Kishan *et al.* (2017), who reported that the length of the hind leg varied from 3.26 to 3.40mm in *T. iridipennis*.

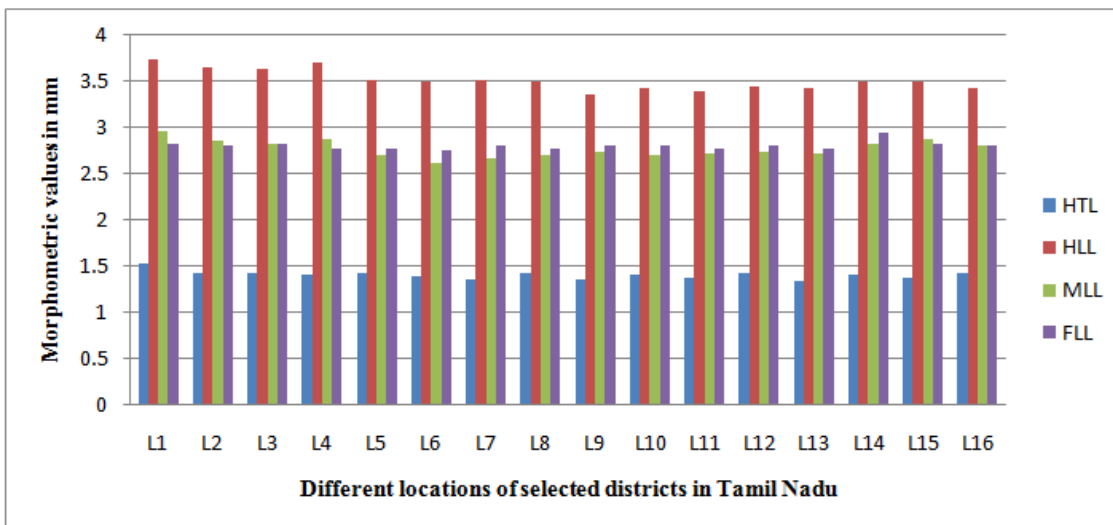


Figure 5. Leg morphometry of stingless bee specimens

Based on the present study (Fig. 6), the mesosoma length of L1 (Insectary, Coimbatore) was found to be $1.36\text{mm} \pm 0.02$, and that of other locations measured from 1.19 to 1.30 mm, which is in corroboration with Rahman *et al.* (2015) who reported that the mesosoma length of *T. iridipennis* was 1.24mm. The width of metasoma for the specimens collected from L1 was recorded at about $1.17\text{mm} \pm 0.01$, which is

in line with Rahman *et al.* (2015) who stated that the metasomal width of *T. laeviceps* was 1.16mm. The body length of all the specimens except L1 ranged from 3.51 to 3.65mm, and L1 was measured at about $3.98\text{mm} \pm 0.14$, which follows Rasmussen (2013), who reported that the whole body length of *T. iridipennis* was 3.55mm and Rahman *et al.* (2015) stated the body length of *T. laeviceps* was 4.04mm.

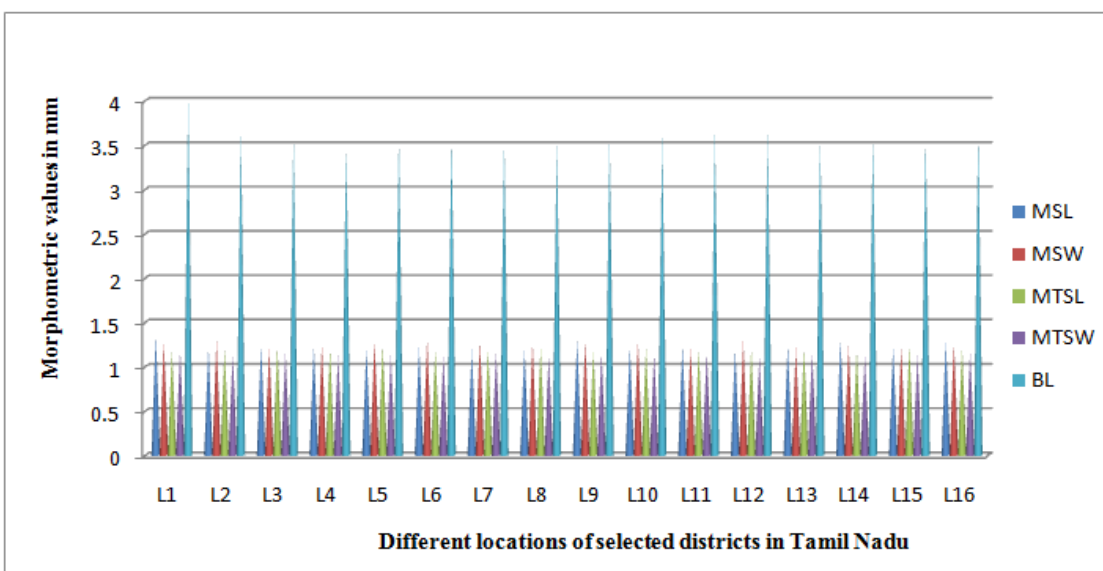


Figure 6. Morphometry of mesosoma and metasoma of stingless bee specimens

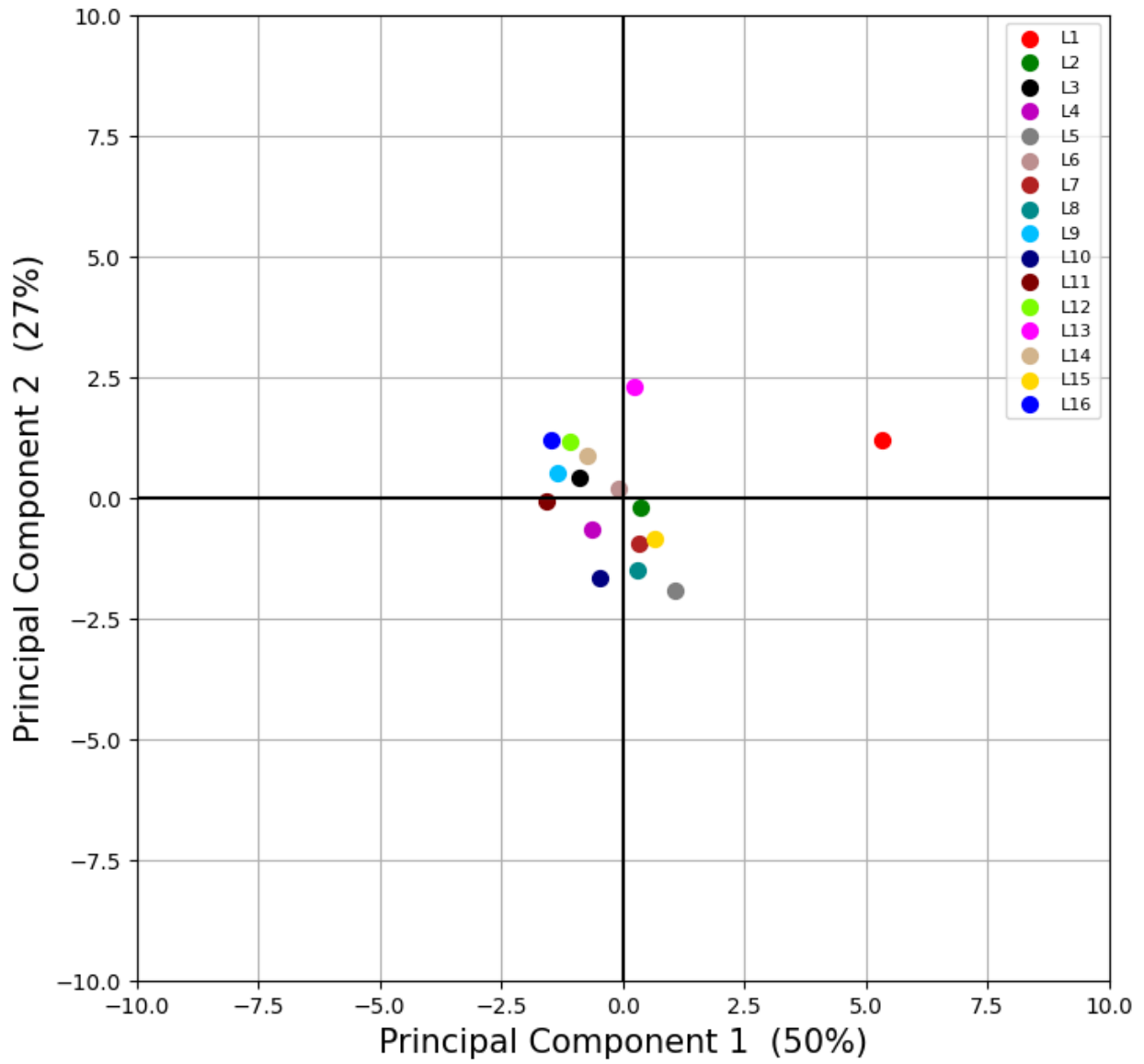


Figure 7. Principal Component Analysis (PCA) for the samples collected from 16 different locations

Principal Component Analysis

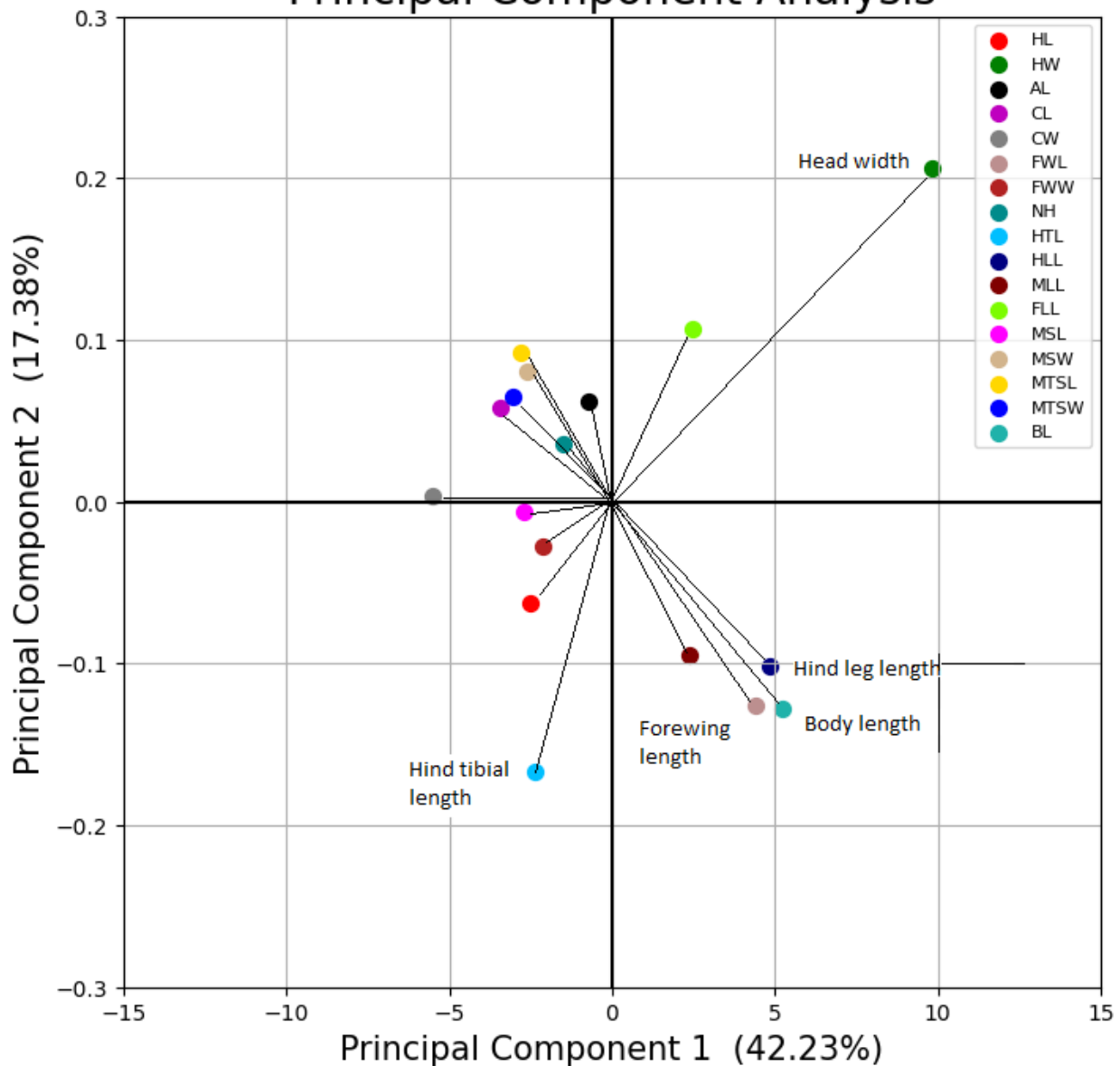


Figure 8. Discriminative characters recorded by Principal Component Analysis

The data matrix consisted of 272 measurements which include 17 morphometric characters and 16 locations. Based on the result of PCA (Fig. 7), the cumulative variance of principal components such as PC1 and PC2 were 50.0% and 27.0% respectively. The discriminative characters (Fig. 8) recorded 42.23% (PC1) and 17.38% (PC2) which

was noticed in PCA were the head width, body length, forewing length, hind leg length and hind tibial length. The principal components exhibited no variation among the locations from L2 to L16 but the specimens from L1 alone deviated from the other locations.

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Table 7. Key morphometric characters examined to distinguish two species of stingless bees, *Tetragonula* sp.

Morphometric characters (mm)	<i>T. iridipennis</i>	<i>T. laeviceps</i>
Head width	1.59 to 1.61 mm	1.67mm ± 0.04
Forewing length	3.20 to 3.41mm	3.69mm ± 0.02
Hind tibial length	1.34 to 1.43mm	1.53mm ± 0.01
Body length	3.51 to 3.65mm	3.98mm ± 0.14

The worker stingless bee specimens collected from L1 (Insectary, TNAU, Coimbatore) were found to be *T. laeviceps* and the rest of the specimens were found to be *T. iridipennis* by comparing with the morphometric values of previous literature. Further confirmation can be done through molecular studies.

Conclusion

The investigation on the diversity and distribution of stingless bees (*Tetragonula* sp.) in different districts of Tamil Nadu, India revealed *T. iridipennis*, the most commonly prevalent stingless bee species in Coimbatore, Madurai, Dindigul and Tiruchirappalli districts while *T. laeviceps* was found only in Coimbatore district. Morphometric analysis of the worker bee caste of the stingless bees was used to differentiate the species. Nevertheless, further molecular characterization can play an essential role in confirming the species identity.

Acknowledgement

I express my sincere gratitude to my chairman, Dr. M.R. Srinivasan and my advisory committee members Dr. M. Murugan, Dr. V.R. Saminathan for their immense guidance and consistent support throughout my research work. This is part of Ph.D dissertation.

Author contribution

Study design, data collection, analysis and result interpretation: P. Sabatina, Study conception and manuscript correction: Dr. M.R. Srinivasan, Dr. M. Murugan and V.R. Saminathan, Manuscript editing: Dr. M.R. Srinivasan, Dr. M. Murugan and V.R. Saminathan.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest to declare.

Data availability: Not applicable

Ethical issues: Not applicable

Source of finance for the study: Not applicable

REFERENCES

- Danaraddi CS, Viraktamath S. Morphometrical studies on the stingless bee, *Trigona iridipennis* Smith. Karnataka Journal of Agricultural Sciences 2009;22(4):796-797
- Devanesan S, Shailaja KK, Raakhee M, Bennet R and Premaila KS. Morphometric characters of the queen and worker of stingless bees, *Trigona iridipennis* Smith. Insect Environment 2003;9(4):154-155
- Kishan Tej M, Srinivasan MR, Vijayakumar K, Natarajan N, and Mohan Kumar S. Morphometry analysis of stingless bee *Tetragonula iridipennis* Smith. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. 2017;6(10):2963-2970
- Michener CD. The Bees of the World. John Hopkins University Press, Baltimore-London, 2007, s.953
- Raakhee M, Devanesan S. Studies on the behavior of the stingless bee, *Trigona iridipennis* Smith (Apidae: Meliponinae). Indian Bee Journal 2000;62:59-62
- Rahman A, Das PK, Rajkumari P, Saikia J, and Sharmah D. Stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): diversity and distribution in India. Apidologie, 2015;39:102-118
- Rasmussen C. Stingless bees (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) of the Indian subcontinent: Diversity, taxonomy and current status of knowledge. Zootaxa, 2013;3647(3):401-428
- Sakagami SF. *Tetragonula* Stingless Bees of the Continental Asia and Sri Lanka (Hymenoptera, Apidae). Zoology, 1978;21(2):165-247

ARAŞTIRMA MAKALESİ / RESEARCH ARTICLE

Smith DR. Key to Workers of Indo-Malayan Stingless Bees. For use in the Stingless Bees Workshop, 2012;1(1):1–42

Swaminathan T. Studies on stingless bees. M. Sc. (Ag) Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, 132 p. 2000

Trianto M, Marisa M and Kisman MD. *Tetragonula laeviceps* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini): Morphology, Morphometric, and Nest Structure. Bioeduscience, 2020;4(2):188-194

Vijayakumar K, Jayaraj R. Geometric morphometry analysis of three species of stingless bees in India. International Journal for Life Sciences and Educational Research, 2013;1(2):91-95

Viraktamath S, Roy J. Description of five new species of *Tetragonula* (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) from India. Biologia, 2022;77:1769–1793

DERLEME / REVIEW

IN VITRO SPERMATOLOGICAL PARAMETERS IN DRONES

Bal Arılarında In Vitro Spermatolojik Parametreler

Abdulkadir KAYA^{1,2,*}, Ongun UYSAL³

¹Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Kırıkkale University, Kırıkkale, TÜRKİYE. Yazışma Yazarı / Corresponding author E-posta: abdulcadirkaya@kku.edu.tr, ORCID No: 0000-0001-7903-4358

²Institute of Health Sciences, Ankara University, Ankara, TÜRKİYE

³Department of Reproduction and Artificial Insemination, Faculty of Veterinary Medicine, Ankara University, Ankara, TÜRKİYE, E-posta: ongun.uysal@veterinary.ankara.edu.tr, ORCID No: 0000-0001-5025-6512

Received / Geliş Tarihi: 09.04.2023

Accepted / Kabul Tarihi: 18.05.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1279779

ABSTRACT

Honey bees are an indispensable element of the ecosystem, as they provide an important part of plant pollination beyond food production. The queen bee, which forms the core of the bee colony, is at the center of bee production in the beekeeping sector. Undoubtedly, the production of high-quality queen bees primarily depends on suitable drones and therefore, quality sperm. In addition, artificial insemination of queen bees is a successful production method, as in other species, due to its superior characteristics compared to natural mating. In many apiaries and research centers, artificial insemination is used routinely for queen production. One of the advantages of this method is that the sperm can be preserved for the short or long term. In this respect, it is very effective in protecting genetic resources, preventing bee diseases and facilitating bee transportation. Today, spermatological studies and parameters used in drones are very few compared to other species. With the increasing importance given to the subject in recent years, many spermatological parameters have started to be used in honey bees. However, the morphological and physiological differences of drone semen require the development and standardization of these parameters with further studies. In this review, the spermatological parameters used in drone semen, together with the working principles and materials used, were examined in general terms and presented to the readers.

Keywords: Beekeeping, Artificial insemination, Drone, Honey bee, Sperm

ÖZ

Bal arıları, gıda üretiminin ötesinde bitki tozlaşmasının önemli bir bölümünü sağladıkları için ekosistemin vazgeçilmez bir unsurudur. Arı kolonisinin çekirdeğini oluşturan ana arı, arıcılık sektöründe arı üretiminin merkezinde yer almaktadır. Kuşkusuz kaliteli ana arı üretimi öncelikle uygun erkek arılara ve dolayısıyla kaliteli spermaya bağlıdır. Ayrıca suni tohumlama doğal çiftleşmeye göre üstün özellikleri nedeniyle diğer türlerde olduğu gibi başarılı bir üretim yöntemidir. Birçok arıcılık işletmesinde ve araştırma merkezinde ana arı üretimi için suni tohumlama rutin olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemin avantajlarından biri de spermanın kısa ya da uzun süreli saklanabilmesidir. Bu yönüyle genetik kaynakların korunmasında, arı hastalıklarının önlenmesinde ve arı taşımacılığının kolaylaştırılmasında oldukça etkilidir. Günümüzde erkek arılarda kullanılan spermatolojik çalışmalar ve uygulanan parametreler diğer türlere göre çok azdır. Son yıllarda konuya verilen önemin artmasıyla bal arılarında birçok spermatolojik parametre kullanılmaya başlanmıştır. Ancak erkek arı spermasının morfolojik ve fizyolojik farklılıkları, bu parametrelerin ileri çalışmalarla geliştirilmesini ve standardize edilmesini gerektirmektedir. Bu derlemede erkek arı spermasında kullanılan spermatolojik parametreler, çalışma prensipleri ve kullanılan materyaller genel hatlarıyla incelenmiş ve okuyucuların beğenisine sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Arıcılık, Suni tohumlama, Bal arısı, Erkek arı, Sperma

DERLEME / REVIEW

GENİŞLETİLMİŞ ÖZET

Amaç: Bal arıları, birçok bitki türünde tozlaşmayı sağlayıcı rolünden dolayı ekosistemin devamlılığını sağlayan önemli bir unsurdur. Bir meslek olarak arıcılık, düşük maliyetle yüksek kar getirisine sahip olması sebebiyle önemli bir hayvancılık koludur. Modern arıcılıkta ana arı üretimi kolonilerin çoğaltılması, devamlılığı ve verimini artırma amacıyla oldukça yaygın bir şekilde ve farklı metotlarla yapılmaktadır. Erkek arılardan uygun donanım ve metot ile toplanılan spermanın ana arıya nakli ile bal arılarında suni tohumlama yüz yıla yakın bir süredir uygulanmaktadır. Suni tohumlama tekniğinin kaliteli damızlık üretimi, islah çalışmalarının yaygınlaştırılması, spermanın muhafazası ve bulaşıcı hastalıkların önlenmesi gibi birçok faydası vardır. Bu sebeple suni tohumlamada kullanılan arı spermasının kalitesini belirlemeye yönelik ve spermanın muhafazasına yönelik çalışmalarda gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Yapılacak araştırmanın hedefleri doğrultusunda kullanılacak parametrelerin seçilmesi ve bu parametrelerin uygun metotla uygulanabilmesi önem arz etmektedir. Bu derlemede arı spermasında kullanılan spermatolojik parametreleri geniş bir yelpazede ele almaya çalıştık. Böylece hem arı spermasının daha efektif değerlendirilebilmesi hem de konuyla ilgilenen araştırmacılara yararlı olacağını düşünmekteyiz.

Tartışma: Arı spermasında kullanılan parametreler oldukça sınırlı kalmaktadır. Bu sebeple arı spermasının *in vitro* değerlendirilmesindeki yaşanan eksiklikler fertilizasyon yeteneğinin belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Bu konuda yapılan çalışmaların artması ve arı üretiminin yaygınlaşması konuya olan ilgiyi artırmıştır. Ancak halen birçok parametre arı spermasında kullanım alanı bulmamakla beraber bazı parametreler ile yalnızca birkaç çalışmaya rastlanılmaktadır. Örneğin spermatozoon hareket yeteneğinin belirlendiği motilite tayini ile ilgili farklı metotlar ve değerlendirme kıstasları kullanılmaktadır. Memeli türlerinde ilerleyici tarzda bir spermatozoon hareketine karşın arı spermasında sirküler bir hareketin olması, spermatozoon baş kısmının ayırt edilememesi ve spermatozoon uzunluğunun yaklaşık 10 kat büyük olması sebebiyle memeli spermasında yaygın kullanılan Bilgisayar Destekli Sperm Analizi yöntemi arı spermasında efektif bir biçimde kullanılamamaktadır. Benzeri bir durum sperma hacminin oldukça az olmasından kaynaklı olarak oksidatif stres parametrelerinin kullanımı ile alakalı da

yaşanmaktadır. Bunlar ve benzeri sebeple kullanılan spermatolojik parametrelerin geliştirilmesine de ihtiyaç duyulmaktadır. Böylece arı spermasının fertilizasyon yeteneği hakkında daha kapsamlı bir değerlendirme mümkün olabilecektir.

Sonuç: Bal arılarında *in vitro* spermatolojik parametreler fertilizasyonun önemli bir göstergesidir. Yapılan birçok çalışmada sperma kalitesinin belirlenmesinde farklı parametrelerden yararlanılmıştır. Ancak arı spermasının memeli spermasına kıyasla morfolojik ve fizyolojik açıdan farklılıkları diğer türlerde yaygın olarak kullanılan birçok parametrenin kullanımını sınırlandırmaktadır. Ayrıca başka türlerde başarıyla uygulanan parametrelerin birçoğu halen arı spermasında kullanım alanı bulamamıştır. Bal arılarında spermatolojik parametrelerin daha yaygın kullanımı ve yeni yöntemlerin ve modifikasyonlar ile birlikte arı spermasının daha efektif bir şekilde belirlenebileceği düşünülmektedir. Yapılan bu derlemede arı spermasında yaygın olarak kullanılan ve henüz birkaç çalışmada kullanım alanı bulmuş birçok spermatolojik parametre birlikte ele alınmıştır. Böylece konu ile alakalı araştırma yapacak bilim insanlarına faydalı olacağı düşünülmektedir.

INTRODUCTION

Honey bees are the only animal in the world that provides 80% of the pollination of flowering plants (Falencka-Jabłońska 2022). For this reason, the decline in the population of honey bees due to factors such as global warming, pollution of the natural environment and diseases affects the ecosystem significantly (Papa et al. 2022). In terms of animal husbandry, beekeeping in the world is a business with high profitability due to low input costs and obtaining valuable bee products.

Queen bee production, which ensures the continuity of the colony in beekeeping, is very important and many apiaries either produce or buy quality queens. Artificial insemination is an innovative method that can be used for quality queen production. Compared to natural mating, this method provides similar or higher quality reproductive efficiency. More importantly, the cryopreservation of semen plays an important role in the transportation of drone semen to distant regions, the protection of genetic resources and protection against bee diseases (Ghranh et al. 2022). With the widespread use of this technique, *in vitro* studies on reproductive

DERLEME / REVIEW

efficiency have increased. In recent studies, spermatological methods, which are widely used in many mammalian species, are also applied in drone semen. Evaluation of sperm is important because, after mating or artificial insemination in honey bees, the queen will use the semen obtained from the male individuals (polyandry) in the production of fertile eggs throughout her life. Therefore, changes in spermatological parameters are one of the important factors affecting the success of fertilization. There are many factors that affect spermatological parameters, for example; drone age (Hayashi and Satoh 2019), body weight (Schlüns et al. 2003), genetic factors (Rhodes et al. 2011), temperature (Morais et al. 2022), nutrition (Stürup et al. 2013), colony management (Abdelkader et al. 2014), seasonal changes (Morais et al. 2022), diseases (Collins and Pettis 2001), insecticides (Ben Abdelkader et al. 2021), microbial contamination (Johnson et al. 2013, Rajamohan et al. 2020), cryopreservation of semen (Wegener and Bienefeld 2012), semen collection method (Collins 2004) and semen physiology (den Boer et al. 2010).

For this reason, spermatological analyses for many purposes allow more effective determination of semen quality and fertility. While semen quality was determined by *in vivo* parameters (spermatozoa concentration in queen's spermatheca, brood area and queen acceptance rates) in the early periods (2000 and before), *in vitro* parameters have been used more widely with the development of many new and effective methods in recent years. This review aimed to comprehensively discuss the spermatological parameters used in drone semen. Thus, it is thought that it will help to provide information and develop procedures for future studies.

Spermatogenesis and struce of drone sperm

The reproductive organs of drones consist of testes, vas deferens, seminal vesicles, mucus glands, ductus ejaculatorius and endophallus (penis). Spermatogenesis in drones begins during the larval stage and takes place within the tubules of the testes. Spermatogonia cells, located at the upper end of approximately 200 tubules in the testes, divide through mitosis to produce more spermatogonia. Spermatogonia later divide to form primary spermatocytes, which in turn become secondary spermatocytes through meiosis. Since the germinal tissue of drones has haploid chromosomes, there is no reduction in the number

of chromosomes during the meiotic stage. Sharma et al. appropriately described honey bee spermatogenesis as "abortive meiosis I and abnormal meiosis II": no reduction division occurs. Secondary spermatocytes then produce spermatids through meiosis, which eventually develop into mature sperm cells known as spermatozoa. Spermatogenesis is completed during the pupal stage, and the storage of sperm in the seminal vesicle continues until approximately the 12th day after emergence as an adult drone. The spermatozoa then pass through the vas deferens and collect in the vesicula seminalis. In adult drones, these sacs are filled with active sperm, while the testes become rudimentary. The vesicula seminalis opens into an accessory mucous gland, which is filled with a thick, white liquid that mixes with the sperm before they are discharged through the median ejaculatory duct and out of the endophallus (Sharma et al. 1961; Snodgrass 1956).

The honey bee spermatozoon is long and filamentous, about 250-270 μm in length, with a conical acrosomal vesicle and a perforatorium. The nucleus is strongly electron dense, measuring 5 μm in length and has an eccentric nuclear cone. The tail consists of an axoneme, two mitochondrial derivatives, and two accessory bodies. The axoneme has the typical 9 + 9 + 2 arrangement of microtubules, and the mitochondrial derivatives are of unequal diameter and length. The spermatozoon also has two accessory bodies situated between the axoneme and each mitochondrial derivative (Lino-Neto et al. 2000).

Semen collection and diluting

In honey bees, drones that have reached the age of 14 days, which have become adults, are used for semen collection. Especially afternoon, it is preferred to collect drones returning from the flight. Eversion and ejaculation are stimulated by pressure on the abdomen with the hand, and semen is seen together with the mucus layer at the end of the endophallus. While artificial insemination device is used to obtain drone semen, Harbo and Scheley syringes are used in this regard. Before collecting the semen, the syringe should be filled with semen extender to facilitate the collection of semen (Cobey et al. 2013).

The diluent used has many benefits such as preventing the drying of the semen, creating an energy source for the semen, providing the ion balance and preventing oxidative stress. Many

DERLEME / REVIEW

extenders have been used to dilute semen until today. These are isotonic NaCl, Kiev solution, Hyes solution, Harbo solution, BSS (Bee Sperm Solution), Tris buffer, TL-Hepes and modifications of these extenders have been used successfully (Alçay et al. 2019; Cobey et al. 2013; Moritz 1984; Rajamohan et al. 2020; Wegener et al. 2014). Extenders are also used to preserve semen for short and long periods. Sperm can be stored at room temperature for a short time up to two weeks without any major changes. In a study, semen was preserved for up to 439 days without freezing (Hopkins et al. 2017). In addition, although many studies have been carried out on the cryopreservation of semen, the desired success has

not been achieved yet, and the preservation of the genetic source for many years has been successfully achieved (Alcay et al. 2019; Auth and Hopkins 2021; Rajamohan et al. 2020; Wegener et al. 2014).

Semen volume

Semen volume is determined by marking the glass tip and using a Gilmont micrometer. In the studies, it was determined that the volume of drone semen was related to the age of the drone, body weight, the rice of the drone and the season. In addition, it was stated that the semen volume in drones varies between 0.1 μ l and 3.6 μ l (Table 1).

Table 1: Sperm Volumes Obtained in Different Studies

References	Minimum Semen Volume (μ l)	Maximum Semen Volume (μ l)	Average Semen Volume (μ l)
(Woyke 1960)	0.7	3.0	1.5
(Woyke 1962)	1.5	1.7	1.7
(Collins and Pettis 2001)	-	-	0.9
(Rhodes et al. 2011)	0.1	3.6	1.0
(Gençer and Kahya 2011)	-	-	1.0
(Czekońska et al. 2013a)	-	-	0.8
(Czekońska et al. 2013b)	0.5	1.3	0.9
(Rousseau et al. 2015)	0.4	2.4	1.0
(Czekońska et al. 2015)	-	-	1.1
(Rousseau and Giovenazzo 2016)	-	-	1.0
(Kairo et al. 2016)	-	-	0.8
(Bratu et al. 2022)	0.5	0.9	0.7
(Kahya and Gençer 2023)	0.8	1.3	1.0

Spermatozoa concentration

The determination of spermatozoa concentration has been one of the most preferred spermatological parameters in drones for many years. This parameter is especially used in the in vitro evaluation of the effects that may occur in the process of semen production and drone maturation. Hematocytometric and spectrophotometric methods are generally used for determination of spermatozoa concentration (Ciereszko et al. 2017, Rhodes et al. 2011). Spermatozoa concentration was found to be 7-12 million per microliter in drones whose seminal vesicle was dissected. In addition, in many studies

where semen concentration was determined, a wide range of sperm density was obtained (Table 2). This is an indication that semen concentration can change under the influence of many factors.

In addition, spermatozoa concentration in spermatheca is among the frequently used spermatological parameters. This method is based on the dissection of the spermatheca after mating or artificial insemination and the determination of the spermatozoon concentration in the spermatheca by emptying it in a low-volume extender (Collins 2000, Moreira et al. 2022, Woyke 1971).

Table 2: Spermatozoa Concentration Obtained in Different Studies

References	Minimum Spermatozoa Concentration (million per μ l)	Maximum Spermatozoa Concentration (million per μ l)	Average Spermatozoa Concentration (million per μ l)
(Woyke 1960)	7.23	13.62	11.95
(Woyke 1962)	-	-	7.47
(Moritz 1981)	-	-	8.5
(Rinderer et al. 1985)	-	-	5.7
(Berg and Koeniger 1990)	-	-	7
(Rinderer et al. 1999)	-	-	8.6
(Collins and Pettis 2001)	-	-	9.15
(Duay et al. 2002)	-	-	7.54
(Schlüns et al. 2003)	1.09	30.31	9.18
(Taylor et al. 2009)	-	-	8.8
(Rhodes et al. 2011)	0	19.1	3.63
(Gençer and Kahya 2011)	-	-	7.25
(Rousseau et al. 2015)	0.008	7.77	1.8
(Czekońska et al. 2015)	-	-	5.45
(Rousseau and Giovenazzo 2016)	-	-	2.7
(Kaya ve Akyol, 2021)	1.9	8.5	5.9
(Bratu et al. 2022)	-	-	9.16
(Kahya and Gençer 2023)	5.19	8.28	7

Sperm motility

The method based on scoring drone semen between 1 and 5 with a method similar to mass movement as in ram and bull semen without any dilution was suggested by Kaftanoglu and Peng (Kaftanoglu and Peng 1984). In the following years, it has found use in a subjective method of individual observation of semen by diluting it at a certain rate (Wegener et al. 2012). However, the long flagellar structure of drone semen and its relatively low progressive movement compared to mammalian semen is one of the factors limiting this method.

In addition, there are some studies showing that drone semen has an ameboid movement contrary to the expected circular movement when it is taken into a narrow canal, and this may be effective during the transition from the spermatheca to the lateral oviduct (Tofilski 2014). In addition, the use of special preparations such as Leja slide and the use of anti-

aggregation agents such as Bovine Serum Albumin (BSA) were recommended in a study (Yániz et al. 2019). It has been shown that drone spermatozoa marked with fluorescent dyes can be analyzed more effectively with the help of the Computer-Assisted Sperm Analyzed Device (CASA) (Murray et al. 2022).

Abnormal sperm morphology

Morphologically abnormal spermatozoon ratio in mammalian semen is an important spermatological parameter that can be differentiated, as head, body and flagella anomalies. After diluting and immobilizing the semen with diluents such as Hancock, the abnormal spermatozoon ratio can be determined by counting them in a microscope with a 100 \times lens (Uysal and Bucak 2009). Abnormal spermatozoon types in drones were determined as curled, damaged and double-ended tails (Lodesani et al. 2004, Power et al. 2019). However, drone

DERLEME / REVIEW

spermatozoon has a long flagellum and it is very difficult to distinguish between the head and flagellum without cellular staining methods. For this purpose, staining techniques have been developed to determine the length of the intracellular parts with different staining procedures (Banaszewska and Andraszek 2023).

Ultrastructure of the spermatozoon

The visualization of the internal and external parts (such as acrosome, nucleus, axoneme and mitochondria) of the spermatozoon with the help of an electron microscope is called ultrastructure (Lensky et al. 1979). A few years later, differences in the spermatozoon structure of drones with haploid and diploid chromosomes were investigated (Woyke 1984). In a study, the mitochondrial apparatus in the flagellar region was determined in detail (Lino-Neto et al. 2000). In a recent study, useful information was obtained on the structural effects of freezing-thawing (Gulov and Bragina 2022).

Plasma membran integrity

This method is based on the evaluation of the permeability of the cell membrane (plasmalemma). In addition to the incubation of spermatozoa with fluorescent dyes, the morphological change of spermatozoa in a hypoosmotic solution can be determined by HOST (hypo-osmotic swelling test) method (Alçay et al. 2019). Among the mentioned staining techniques, the most common ones are SYBR-14/PI (Collins and Donoghue 1999), Hoechst/PI (Locke et al. 1990) (Figure 1), AO/PI (Yániz et al. 2020) and non-fluorescent Eosin/Nigroline (Peng et al. 1990). In research, plasma membrane integrity in drone semen was found to be in the range of 80-98% on average (Kaya ve Akyol 2021, Yániz et al. 2020).

Acrosome integrity

The acrosome part of the spermatozoa can be stained with the help of dyes containing fluorescently labeled lectin protein that can bind to spermatozoa acrosomal glycoproteins. In a study with *Pisum sativum* agglutinin (PSA) lectin fluorescence dye, spermatozoon acrosome integrity was determined (Alçay et al. 2019). However, this dye is less specific to the acrosome than the others among lectin preparations. Although we achieved successful results with the acrosome-specific *Arachis hypogaea* (Peanut) agglutinin (PNA) fluorescence dye in our studies, we did not find any changes in acrosomal structure in drone pure semen (Unpublished results).

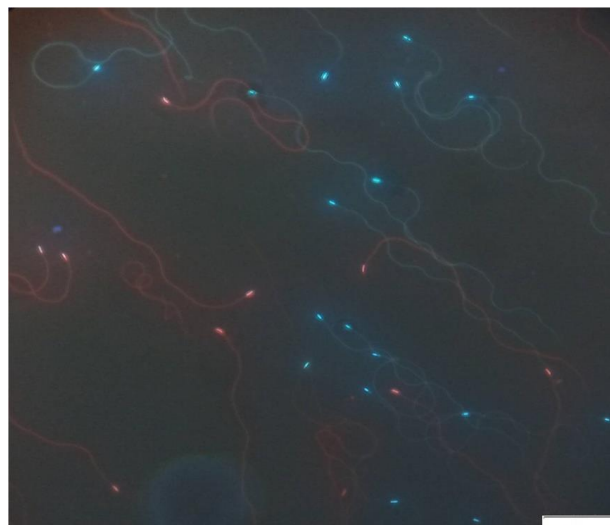


Figure 1: Assessment of plasma membrane integrity with Hoechst/PI dyes. (Red: Dead Spermatozoon, Blue: Live Spermatozoon, Scale bar: 50µm).

Mitochondrial membrane potential

Cell mitochondria have an important role in supplying the energy required to perform their glycolysis and oxidative phosphorylation functions and provide important clues about the continuity of motility. There are a few studies in which the mitochondrial membrane potential was stained with Rhodamine 123 and flow cytometric analysis was performed (Alçay et al. 2021, Ciereszko et al. 2017).

In our study, 45 different samples were stained with JC-1 dye, which can more specifically detect mitochondrial membrane potential (Figure 2). According to the results, an average of 78% high mitochondrial membrane potential was determined (Kaya ve Akyol 2021). In addition, Abdelkader et al., in a study, investigated a commercial kit that showed luminescence by reacting with intracellular ATP. In the study, a difference was obtained in terms of ATP levels in drone semen produced under different conditions (Ben Abdelkader et al. 2014).

Deoxyribonucleic acid (dna) fragmentation

Detection of spermatozoa DNA fragmentation provides important information about fertilization ability. For this purpose, sperm chromatin structure assay (SCSA), the terminal transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) test, sperm chromatin dispersion (SCD) test and single cell gel electrophoresis assay (SCGE-COMET) tests can be applied. In a study using the SCD test, DNA fragmentation was found in the spermatozoa of

DERLEME / REVIEW

drones infested with *Nosema cerenae* (Borsuk et al. 2018). In another study, the TUNEL method was used, but no significant fragmentation was found in the samples (Wegener et al. 2014). In addition, in a study, the effect of freezing and thawing semen with different extenders on DNA fragmentation was investigated and DNA fragmentation was found to be quite low (Range 0.53-0.71%) (Alçay et al. 2022).

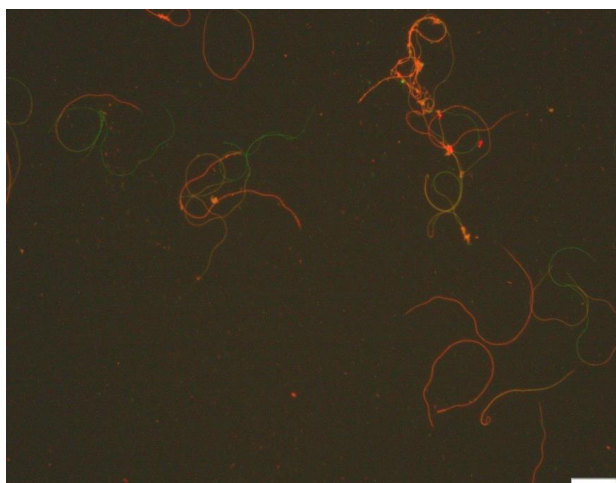


Figure 2: Assessment of mitochondrial membrane potential (Orange: High mitochondrial membrane potential, Green: Low mitochondrial membrane potential, Scale bar: 50µm).

Sperm apoptosis

Apoptosis is a mode of programmed cell death with a genetic mechanism that leads to a series of morphological and biochemical changes in the cell. The pushing of phosphatidylserine in the phospholipid structure found in the cell membrane structure to the outer part of the cell membrane, loss of mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation are considered important signs of apoptosis. Annexin-V fluorescent staining technique, which can bind phosphatidylserine, has been used for many years in mammalian spermatozoa for the determination of spermatozoa apoptosis (Glander and Schaller 1999, Muller et al. 1999, Peña et al. 2003). Apart from this, the rate of cellular apoptosis can be determined by the Hoechst 33342 fluorescent staining method (Rowland et al. 2003, Yu et al. 2005). In a study investigating the effect of insecticides on drone semen, the rate of apoptosis was determined by the Annexin V/PI staining method, but apoptic spermatozoa were not found (Ciereszko et al. 2017).

Oxidative stress parameters

Mitochondrial functions are highly developed for the continuity of sperm motility and vital activities. During the energy cycle, reactive oxygen species whose amount increases in the environment tend to interact with the phospholipids in the cell membrane. This results in oxidative damage and causes lipid peroxidation and DNA damage in the spermatozoon. There are very few studies that determine the effectiveness of antioxidant enzymes such as catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase, which are involved in the removal of reactive oxygen species by spermatozoa (Abdelkader et al. 2014, 2019). In another study, malondialdehyde level, which is one of the oxidative stress indicators, was determined (Alçay et al. 2021).

Microbial contamination of semen

During mating or artificial insemination, it is possible for the queen to receive bacterial, viral or parasitic agents from drones belonging to different colonies through semen and transmit the disease to the colony (Andere et al. 2011, Yue et al. 2006). In addition, contamination of semen with the feces of the drone during artificial insemination, sepsis and death can be seen in the queen bee if the necessary asepsis-antisepsis rules are not followed (Locke and Peng 1993, Mackensen 1951). Antibiotics added to semen extenders can adversely affect spermatological parameters (Rajamohan et al. 2020). In addition, it may not provide complete protection against viral, parasitic and fungal infections. In a study, it has been shown that *Nosema* spores can be transferred to the queen bee with semen (Borsuk et al. 2018). For these reasons, microbial contamination of semen is an important spermatological parameter.

Conclusion

Apart from the above-mentioned spermatological parameters, there are different parameters that are used more frequently in other species and that are likely to be applicable in drone semen. These include seminal fluid biochemicals, semen agglutination, intracellular organic and inorganic substances, spermatozoa surface proteins and spermatozoa endurance tests. In vitro parameters to be used can provide faster, cheaper and more comprehensive data than in vivo markers. Therefore, it is likely that these parameters will be developed and become widespread in future studies. Thus, it will be possible

DERLEME / REVIEW

to evaluate drone semen more effectively.

Authors' contributions: All authors contributed equally to the current manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Conflict of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethics approval/declarations: Not Applicable.

Funding: Not Applicable.

REFERENCES

- Abdelkader F, Kairo G, Bonnet M, Barbouche N, Belzunces LP *et al.* Effects of Clothianidin on Antioxidant Enzyme Activities and Malondialdehyde Level in Honey Bee Drone Semen. *J. Apic. Res.* 2019;58 (5):740-745. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2019.1655182>
- Abdelkader F, Kairo G, Tchamitchian S, Cousin M, Senechal J *et al.* Semen Quality of Honey Bee Drones Maintained from Emergence to Sexual Maturity Under Laboratory, Semi-Field and Field Conditions. *Apidologie*, 2014;45(2):215-223. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-013-0240-7>.
- Alcay S, Cakmak S, Cakmak I, Aktar A, Yilmaz M *et al.* L-Carnitine Supplemented Extenders Improve Post-Thawing Quality of Honey Bee Drone (*Apis mellifera*) Spermatozoa. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2021;27(4):489-493. <http://10.9775/kvfd.2021.25756>
- Alçay S, Çakmak S, Cakmak I, Aktar A, Yılmaz M *et al.* Honey Bee Drone (*Apis mellifera*) Sperm Cryopreservation with Rainbow Trout Seminal Plasma Supplemented Extenders. *J. Hell. Vet. Medical Soc.* 2022;1(73):3745-3750. <http://dx.doi.org/10.12681/jhvms.25651>
- Alcay S, Cakmak S, Cakmak I, Mulkpınar E, Gokce E *et al.* Cryobiology Successful Cryopreservation of Honey Bee Drone Spermatozoa with Royal Jelly Supplemented Extenders. *Cryobiology*, 2019;87(October 2018):28-31. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.03.005>
- Alçay S, Çakmak S, Çakmak İ, Mülkpınar E, Toker MB *et al.* Drone Semen Cryopreservation with Protein Supplemented TL-Hepes Based Extender. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.* 2019;25(4):553-557. <http://10.9775/kvfd.2018.2131>.
- Andere CI, Monteavaro C, Palacio MA, Catena M, Rodríguez EM *et al.* *Apis mellifera* Semen: Bacterial Contamination and Susceptibility to Antibiotics. *Apidologie* 2011;42(5):551-559. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-011-0051-7>
- Auth CA, Hopkins BK. Nitrogen Vapor Immersion : An Accessible Alternative for Honey Bee (*Apis mellifera* L .) Semen Cryopreservation. *Cryobiology*, 2021;100(April):12-18. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2021.04.006>
- Banaszewska D, Andraszek K. Identification of Honey Bee Sperm Structures Following The Use of Various Staining Techniques. *J. Vet. Res.* 2023. <http://dx.doi.org/10.2478/jvetres-2023-0001>
- Ben Abdelkader F, Çakmak İ, Çakmak SS, Nur Z, İncebiyık E *et al.* Toxicity Assessment of Chronic Exposure to Common Insecticides and Bee Medications on Colony Development and Drones Sperm Parameters. *Ecotoxicology*, 2021;30(5):806-817. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-021-02416-3>
- Berg S, Koeniger N. Larger Drones (*Apis mellifera*) Have More Offspring. *Proc. German Zoological Society, 83rd Meeting, Frankfurt Am Main, Gustav Fischer Verlag, 1990;614*
- Borsuk G, Kozłowska M, Anusiewicz M, Paleolog J. *Nosema ceranae* Changes Semen Characteristics and Damages Sperm DNA in Honeybee Drones. *Invertebr. Surviv. J.* 2018;15:197-202. <https://doi.org/10.25431/1824-307X/isj.v15i1.197-202>
- Bratu IC, Igna V, Simiz E, Dunea IB, Pătruică S. The Influence of Body Weight on Semen Parameters in *Apis mellifera* Drones. *Insects* 2022;13(12):1141. <http://dx.doi.org/10.3390/insects13121141>
- Ciereszko A, Wilde J, Dietrich GJ, Siuda M, Bąk B *et al.* Sperm Parameters of Honeybee Drones Exposed to Imidacloprid. *Apidologie* 2017;48 (2):211-222 <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-016-0466-2>.
- Cobey SW, Tarpay DR, Woyke J. *Standard Methods*

DERLEME / REVIEW

- for Instrumental Insemination of *Apis Mellifera* Queens. J. Apic. Res., 2013;52(4):1-54. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.09>
- Collins AM. Relationship Between Semen Quality and Performance of Instrumentally Inseminated Honey Bee Queens. Apidologie, 2000;31(3):421-429. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2000132>
- Collins AM. Sources of Variation in The Viability of Honey Bee, *Apis mellifera* L., Semen Collected for Artificial Insemination. Invertebr. Reprod. Dev. 2004;45(3):231-237. <https://doi.org/10.1080/07924259.2004.9652594>
- Collins AM, Donoghue AM. Viability Assessment of Honey Bee, *Apis Mellifera*, Sperm Using Dual Fluorescent Staining. Theriogenology 1999;51(8):1513-1523. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00094-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00094-1)
- Collins AM, Pettis JS. Effect of Varroa Infestation on Semen Quality. Am. Bee J. 2001;141(8): 590
- Czekońska K, Chuda-Mickiewicz B, Chorbiński P. The Effect of Brood Incubation Temperature on The Reproductive Value of Honey Bee (*Apis Mellifera*) Drones. J. Apic. Res, 2013a;52(2):96–105. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.2.19>
- Czekońska K, Chuda-Mickiewicz B, Chorbiński P. The Influence of Honey Bee (*Apis mellifera*) Drone Age on Volume of Semen and Viability of Spermatozoa. J. Apic. Sci, 2013b;57:61–66. <http://dx.doi.org/10.2478/jas-2013-0007>
- Czekońska K, Chuda-Mickiewicz B, Samborski J. Quality of Honeybee Drones Reared in Colonies with Limited and Unlimited Access to Pollen. Apidologie, 2015;46(1):1-9. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-014-0296-z>
- Den Boer SPA, Baer B, Boomsma JJ. Seminal Fluid Mediates Ejaculate Competition in Social Insects. Science 2010;327(5972):1506-1509. <https://doi.org/10.1126/science.1184709>
- Duay P, De Jong D, Engels W. Decreased Flight Performance and Sperm Production in Drones of The Honey Bee (*Apis mellifera*) Slightly Infested By Varroa Destructor Mites During Pupal Development. Genet. Mol. Res, 2002;1(3):227-232
- Falencka-Jabłońska M. Bees in The City. Studia Ecologiae et Bioethicae, 2022;20(3):25–31. <http://dx.doi.org/10.21697/seb.2022.20>
- Gençer HV, Kahya Y. Are sperm traits of drones (*Apis mellifera* L.) from laying worker colonies noteworthy? J. Apic. Sci, 2011;50(2):130-137. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.50.2.04>
- Ghranh HA, Iqbal A, Rafique MK, Mahmood R, Ahmed AM et al. Instrumental Insemination: A Nontraditional Technique to Produce Superior Quality Honey Bee (*Apis mellifera*) Queens. J. King Saud Univ. Sci. 2022;34(5):102077. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2022.102077>
- Glander H-J, Schaller J. Binding of Annexin V to Plasma Membranes of Human Spermatozoa: A Rapid Assay for Detection of Membrane Changes After Cryostorage. MHR Basic Science of Reproductive Medicine 1999;5(2):109-115. <http://dx.doi.org/10.1093/molehr/5.2.109>
- Gulov AN, Bragina YE. Morphofunctional Changes in Frozen-Thawed Sperm of *Apis mellifera* Linnaeus Drones. Russ. Agric. Sci. 2022;48(6):512-520. <http://dx.doi.org/10.3103/S1068367422060040>
- Hayashi S, Satoh T. Sperm Maturation Process Occurs in The Seminal Vesicle Following Sperm Transition From Testis in Honey Bee Males. Apidologie, 2019;50(3):369-378. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-019-00652-5>
- Hopkins BK, Cobey SW, Herr C, Sheppard WS. Gel-Coated Tubes Extend Above-Freezing Storage of Honey Bee (*Apis mellifera*) Semen to 439 Days with Production of Fertilised Offspring. Reprod. Fertil. Dev. 2017;29(10):1944-1949. <https://doi.org/10.1071/RD16087>
- Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD. Effect of In-Hive Miticides on Drone Honey Bee Survival and Sperm Viability. J. Apic. Res. 2013;52(2):88-95. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA.1.52.2.18>
- Kaftanoglu O, Peng Y-S. Preservation of Honeybee Spermatozoa in Liquid Nitrogen. J. Apic. Res. 1984;23(3):157-163. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1984.11100625>

DERLEME / REVIEW

- Kahya Y, Gençer HV. Reproductive Quality in Drones Bred From Caucasian (*A. m. caucasica*) and Italian (*A. m. ligustica*) Honey Bee Colonies. *Apidologie*, 2023;54(1):1. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-022-00973-y>
- Kairo G, Provost B, Tchamitchian S, Ben Abdelkader F, Bonnet M *et al.* Drone Exposure to The Systemic Insecticide Fipronil Indirectly Impairs Queen Reproductive Potential. *Sci. Rep.* 2016;6(1):1-12. <http://dx.doi.org/10.1038/srep31904>
- Kaya A, Akyol N. Comparative Analysis of Spermatological and Morphometric Parameters in Honey Bee Samples Collected From Some Beekeeping Located in Kirikkale Region. MSc Thesis. Kirikkale University, Institute of Health Science, 2021
- Lensky Y, Ben-David E, Schindler H. Ultrastructure of The Spermatozoon of The Mature Drone Honeybee. *J. Apic. Res.* 1979;18(4):264-271. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1979.1109981>
- Lino-Neto J, B ao SN, Dolder H. Sperm Ultrastructure of The Honey Bee (*Apis mellifera*) (L)(Hymenoptera, Apidae) with Emphasis on The Nucleus-Flagellum Transition Region. *Tissue Cell*, 2000;32(4):322-327. <http://dx.doi.org/10.1054/tice.2000.0119>
- Locke SJ, Peng Y. The Effects of Drone Age, Semen Storage and Contamination on Semen Quality in The Honey Bee (*Apis mellifera*). *Physiol. Entomol.* 1993;18(2):144-148. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3032.1993.tb00461.x>
- Locke SJ, Peng Y, Cross NL. A Supravital Staining Technique for Honey Bee Spermatozoa. *Physiol. Entomol.* 1990;15(2):187-192. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3032.1990.tb00506.x>
- Lodesani M, Balduzzi D, Galli A. Functional Characterisation of Semen in Honeybee Queen (*A m ligustica*) Spermatheca and Efficiency of The Diluted Semen Technique in Instrumental Insemination. *Ital. J. Anim. Sci.* 2004;3(4):385-392. <https://doi.org/10.4081/ijas.2004.385>
- Mackensen O. Viability and Sex Determination in The Honey Bee (*Apis mellifera* L.). *Genetics* 1951;36(5):500. <http://dx.doi.org/10.1093/genetics/36.5.500>
- Morais LS, Araujo Neto ER, Silva AM, Marinho DEL, Bezerra LGP *et al.* Sperm Characteristics of Africanized Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Drones During Dry and Wet Seasons in The Caatinga Biome. *J. Apic. Res.* 2022;1-8. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2022.2113328>
- Moreira DR, de Souza THS, Galhardo D, Puentes SMD, Figueira CL *et al.* Imidacloprid Induces Histopathological Damage in The Midgut, Ovary, and Spermathecal Stored Spermatozoa of Queens After Chronic Colony Exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 2022;41(7):1637-1648. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5332>
- Moritz RFA. Der Einfluss der Inzucht auf die Fitness der Drohnen von *Apis mellifera carnica*. *Apidologie*, 1981;12(1):41-55. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19810104>
- Moritz RFA. The Effect of Different Diluents on Insemination Success in The Honeybee Using Mixed Semen. *J. Apic. Res.* 1984;23(3):164-167. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1984.11100626>
- Muller K, Pomorski T, Muller P, Herrmann A. Stability of Transbilayer Phospholipid Asymmetry in Viable Ram Sperm Cells After Cryotreatment. *J. Cell. Sci.* 1999;112(1):11-20. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.112.1.11>
- Murray JF, van der Horst G, Allsopp M, Kotz e RCM. A New Fluorescent Method to Determine Honey Bee Sperm Motility Parameters with Computer-Aided Sperm Analysis. *J. Apic. Res.* 2022;62(4):944-952. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2022.2090729>
- Papa G, Maier R, Durazzo A, Lucarini M, Karabagias IK *et al.* The Honey Bee *Apis mellifera*: An Insect at The Interface Between Human and Ecosystem Health. *Biology (Basel)*, 2022;11(2):233. <http://dx.doi.org/10.3390/biology11020233>
- Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodríguez-Martínez H. Assessment of Fresh and Frozen-Thawed Boar Semen Using An Annexin-V Assay: A New Method of

DERLEME / REVIEW

- Evaluating Sperm Membrane Integrity. *Theriogenology*, 2003;60(4):677-689. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00081-5)
- Peng Y, Locke SJ, Nasr ME, Liu TP, Montague MA. Differential Staining for Live and Dead Sperm of Honey Bees. *Physiol. Entomol.* 1990;15(2):211-217. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3032.1990.tb00509.x>
- Power K, D'Anza E, Martano M, Albarella S, Ciotola F et al. Morphological and Morphometric Analysis of The Italian Honeybee (*Apis mellifera ligustica*) Spermatozoa: A Preliminary Study in Campania Region. *Vet. Med. Sci.* 2019;6(2):0-61. <http://dx.doi.org/10.7243/2054-3425-6-2>
- Rajamohan A, Danka RG, Hopkins BK, Rinehart JP. A Non-Activating Diluent to Prolong in Vitro Viability of *Apis mellifera* Spermatozoa: Effects on Cryopreservation and on Egg Fertilization. *Cryobiology* 2020;92(September 2019):124–129. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2019.11.045>
- Rhodes JW, Harden S, Spooner-Hart R, Anderson DL, Wheen G. Effects of Age, Season and Genetics on Semen and Sperm Production in *Apis mellifera* Drones. *Apidologie*, 2011;42(1):29-38. <http://dx.doi.org/10.1051/apido/2010026>
- Rinderer TE, Collins AM, Pesante D, Daniel R, Lancaster V et al. Comparison of Africanized and European Drones: Weights, Mucus Gland and Seminal Vesicle Weights, and Counts of Spermatozoa. *Apidologie*, 1985;16(4):407-412. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:19850405>
- Rinderer TE, De Guzman LI, Lancaster VA, Delatte GT, Stelzer JA. Varroa in The Mating Yard: I. The Effects of Varroa Jacobsoni and Apistan on Drone Honey Bees. *Am. Bee J.* 1999;139:134-139. 134–139
- Rousseau A, Fournier V, Giovenazzo P. *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) Drone Sperm Quality in Relation to Age, Genetic Line, and Time of Breeding. *Can. Entomol.* 2015;147(6):702-711. <http://dx.doi.org/10.4039/tce.2015.12>
- Rousseau A, Giovenazzo P. Optimizing Drone Fertility with Spring Nutritional Supplements to Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Colonies. *J. Econ. Entomol.* 2016;109(3):1009-1014. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/tow056>
- Rowland SC, Jacobson JD, Patton WC, King A, Chan PJ. Dual Fluorescence Analysis of DNA Apoptosis in Sperm. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2003;188(5):1156-1157. <http://dx.doi.org/10.1067/mob.2003.295>
- Schlüns H, Schlüns EA, Van Praagh J, Moritz RFA. Sperm Numbers in Drone Honeybees (*Apis mellifera*) Depend on Body Size. *Apidologie*, 2003;34(6):577-584. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2003051>
- Sharma GP, Gupta BL, Kumbkarni CG. Cytology of Spermatogenesis in The Honey Bee, *Apis indica* (F.). *J. R. Microsc. Soc.* 1961;79(4):337-351. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2818.1961.tb05227.x>
- Snodgrass RE. *Anatomy of The Honey Bee*. Cornell University Press. 1956, p.130-134
- Stürup M, Baer-Imhoof B, Nash DR, Boomsma JJ, Baer B. When Every Sperm Counts: Factors Affecting Male Fertility in The Honeybee *Apis mellifera*. *Behav. Ecol.* 2013;24(5):1192-1198. <http://dx.doi.org/10.1093/beheco/art049>
- Taylor MA, Guzmán-Novoa E, Morfin N, Buhr MM. Improving Viability of Cryopreserved Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Sperm with Selected Diluents, Cryoprotectants and Semen Dilution Ratios. *Theriogenology*, 2009;72(2):149-159. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.02.012>
- Tofilski A. A Scientific Note on Amoeboid Movement of Honey Bee Semen. *Apidologie*, 2014;45:637–640. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-014-0269-2>
- Uysal O, Bucak MN. The Role of Different Trehalose Concentrations and Cooling Rates in Freezing of Ram Semen. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 2009;56(2):99-103. https://doi.org/10.1501/Vetfak_0000002176
- Wegener J, Bienefeld K. Toxicity of Cryoprotectants to Honey Bee Semen and Queens. *Theriogenology*, 2012;77(3):600-607. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.012>

DERLEME / REVIEW

1.08.036

- Wegener J, May T, Bienefeld K, Kamp N. New Methods and Media for The Centrifugation of Honey Bee (Hymenoptera: Apidae) Drone Semen. *J. Econ. Entomol.* 2014;107(1):47-53. <http://dx.doi.org/10.1603/EC13159>
- Wegener J, May T, Kamp G, Bienefeld K. A Successful New Approach to Honeybee Semen Cryopreservation. *Cryobiology* 2014;69(2):236-242. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.011>
- Wegener J, May T, Knollmann U, Kamp G, Müller K, Bienefeld K. In Vivo Validation of In Vitro Quality Tests for Cryopreserved Honey Bee Semen. *Cryobiology*, 2012;65(2):126-131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2012.04.010>
- Woyke J. Naturalne I Sztuczne Unasienianie Matek Pszczelich. *Pszczelnicze Zeszyty Naukowe*, 1960;4(3/4):183-275
- Woyke J. Natural and Artificial Insemination of Queen Honeybees. *Bee World*, 1962;43(1):21-25. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.1962.11096922>
- Woyke J. Correlations Between The Age at Which Honeybee Brood was Grafted, Characteristics of The Resultant Queens, and Results of Insemination. *J. Apic. Res.* 1971;10(1):45-55. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1971.11099669>
- Woyke J. Ultrastructure of Single and Multiple Diploid Honeybee Spermatozoa. *J. Apic. Res.* 1984;23(3):123-135. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1984.11100621>
- Yániz JL, Silvestre MA, Santolaria P. Sperm Quality Assessment in Honey Bee Drones. *Biology (Basel)*, 2020;9(7):1-16. <http://dx.doi.org/10.3390/biology9070174>
- Yániz J, Palacín I, Santolaria P. Effect of Chamber Characteristics, Incubation, and Diluent on Motility of Honey Bee (*Apis mellifera*) Drone Sperm. *Apidologie*, 2019;50(4):472-481. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-019-00659-y>
- Yu W-H, Li Z-H, Yang W-M, Li G-Z, Zhou X-M et al. Comparison Between Two Methods for Staining DNA of Apoptotic Spermatozoa. *Zhonghua nan ke xue = National Journal of Andrology*, 2005;11 (2):101-103
- Yue C, Schröder M, Bienefeld K, Genersch E. Detection of Viral Sequences in Semen of Honeybees (*Apis mellifera*): Evidence for Vertical Transmission of Viruses Through Drones. *J. Invertebr. Pathol.* 2006;92 (2):105-108. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2006.03.001>

DERLEME / REVIEW

ARI POLENİNİN BAZI FİZİKSEL, FONKSİYONEL VE KİMYASAL ÖZELLİKLERİ VE BİYOLOJİK ETKİLERİ

Some Physical, Functional and Chemical Properties and Biological Effects of Bee Pollen

Sude EŞERLER, Sevilay VARDARLI, Güliye SAVAŞ, Ceren MUTLU*

Gıda Mühendisliği Bölümü, Balıkesir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Balıkesir, TÜRKİYE, E-posta: eserlersude.3@gmail.com, ORCID No: 0009-0009-8328-5833, E-posta: sevilayvardarli299@gmail.com, ORCID No: 0009-0005-1484-126X, E-posta: savasgulye@gmail.com, ORCID No: 0009-0008-6957-9686, *Yazışma yazarı/Corresponding author E-posta: ceren.mutlu@balikesir.edu.tr, ORCID No: 0000-0003-4943-2798

Geliş Tarihi / Received: 23.06.2023

Kabul Tarihi / Accepted: 22.08.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1319365

ÖZ

Bal arıları çiçekli bitkilerden topladıkları polenleri ağız salgıları ve bitki nektarları ile karıştırarak arı poleni üretmektedir. Arı polenleri gelişiminin ilk dönemlerinde olan arı larvalarının beslenmesi amacıyla kullanılırken aynı zamanda arıcılar tarafından kovan girişlerine yerleştirilen polen tuzakları ile toplanıp işlenerek insanlar tarafından da tüketilmektedir. Bileşiminde su, karbonhidratlar, proteinler, aminoasitler, lipitler, yağ asitleri, karotenoidler, fenolik bileşikler, enzimler, vitaminler ve mineraller bulunan arı polenin sağlık açısından antimikrobiyal, antioksidan, antikanser ve antiinflamatuvar özellikler gibi birçok olumlu etkisinin bulunduğu belirtilmiştir. Zengin besinsel özellikleri ve sağlık etkileri nedeniyle doğrudan tüketilebilen arı poleni bunların yanı sıra çözünürlük, su ve yağ tutma kapasitesi ve emülsifikasyon gibi gıda teknolojisi açısından önemli fonksiyonel özellikleri nedeniyle de farklı gıdalara bileşim unsuru olarak ilave edilmektedir. Bununla birlikte giderek artan sağlıklı beslenme bilinci ve alternatif doğal ürünler arayışına olan eğilim diğer arıcılık ürünlerine olduğu gibi arı polenine olan ilgiyi de artırmaktadır. Buradan hareketle ilgili çalışma arı polenin bazı fiziksel, fonksiyonel ve kimyasal özellikleri ile metabolizma üzerindeki biyolojik etkileri ve gıdalarda kullanım imkanları hakkındaki bilgilerin derlenmesi amaçlanarak gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Arı poleni, Fenolik, Karotenoid, Antioksidan, Anti-inflamatuvar

ABSTRACT

Honeybees gather pollen grains from flowering plants and mix them with their own secretions and some nectar to form bee pollen pellets. Bee pollen is used for the nutrition of bee larvae in the early stages of their development. Besides, bee pollen is also consumed by humans after being collected by pollen traps placed at the hive entrance and processed by beekeepers. Bee pollen contains soluble sugars, proteins, carotenoids, phenolic compounds, vitamins, and minerals and has been reported to have several positive health effects such as antimicrobial, antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory activity. Bee pollen is added as an additive to various foods due to its nutritional value, positive effects on health, and functional properties such as solubility, water and fat retention capacity, and emulsification. Furthermore, the increasing awareness of healthy nutrition and the tendency to seek alternative natural products increase the interest in bee pollen as well as other beekeeping products. From this point of view, this study was carried out to review the knowledge of some physical, chemical, and functional properties of bee pollen, along with its biological effects and potential use in foods.

Keywords: Bee pollen, Phenolic, Carotenoid, Antioxidant, Anti-inflammatory

DERLEME / REVIEW

EXTENDED ABSTRACT

Purpose: Bee pollen is a beekeeping product that has become of interest due to its nutritional value, bioactive compounds, functional properties and health effects, and this bee product has frequently been the subject of research in recent years. From this point of view, it is aimed in this study to review information about some physical, functional, and chemical properties of bee pollen, its biological effects on metabolism, and its use as an ingredient in foods.

Discussion: Bee pollen is an important natural resource that has been used as a food supplement since ancient times because it contains almost all the nutritional elements necessary for humans. It has been reported that there are about 200 different compounds in bee pollen, such as water, proteins, amino acids, carbohydrates, lipids, fatty acids, phenolic compounds, enzymes, coenzymes, vitamins, and minerals. A significant amount of the carbohydrate content of bee pollen is composed of fructose, glucose, and sucrose, and it has also been noted that cellobiose, isomaltose, maltose, raffinose, stachyose, melezitose, trehalose, and erlose carbohydrates can be found in the bee pollen.

The main protein fractions in bee pollen consist of albumins, globulins, glutelins, prolamins, and other amino acids and enzymes. Besides, common amino acids in bee pollen have been stated to be glycine, aspartic acid, glutamic acid, alanine, leucine, valine, lysine, serine, and isoleucine. The lipids of bee pollen are fatty acids, carotenoids, and sterols. Bee pollen contains fat-soluble vitamins A, E, and D and water-soluble vitamins thiamine, riboflavin, nicotinic acid, pantothenic acid, pyridoxine, biotin, folic acid, and ascorbic acid.

Different types of phenolic compounds such as phenolic acids, flavonoids, leukotrienes, catechins, flavonol, and their glycosides, and also carotenoids like zeaxanthin, lutein, β -carotene, cryptoxanthin, antheraxanthin, violaxanthin, neoxanthin, flavoxanthin, and luteoxanthin have been reported in bee pollen. It has been stated that these compounds in bee pollen are responsible for the antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory, anticarcinogenic, and antimutagenic effects. Moreover, bee pollen shows important functional properties in terms of food technology such as solubility, water and oil holding capacity, and emulsification thanks to the various components in its structure.

In this regard, bee pollen has been used as a functional ingredient in various types of foods including cakes, cookies, and pasta, and it has been stated that it has improved the nutritional and biological activity of these products.

Conclusion: Bee pollen is a natural beehive product that exhibits biological and functional properties besides nutritional properties. Recently, interest and awareness in natural products such as bee pollen have increased due to concerns over synthetic food and foodstuffs. Overall, it has been evaluated that bee pollen has important potential in terms of its use in the development of product formulations in the food industry, and more research is needed on bee pollen.

GİRİŞ

Arıcılık insan beslenmesi ve sağlığın korunması amaçlarıyla uzun bir süredir gerçekleştirilen ve bal, polen, arı sütü, propolis ve arı zehri gibi ürünlerin elde edildiği önemli bir ekonomik faaliyettir (Parlakay vd. 2008). Arı poleni insan beslenmesinde gerekli olan besinlerin önemli bir kısmını içerdiği için eski zamanlardan beri gıda takviyesi olarak kullanılan doğal bir kaynak olarak ifade edilmektedir (Aylanc vd. 2021).

Arı polenin yapısında su, proteinler, aminoasitler, karbonhidratlar, lipitler, yağ asitleri, fenolik bileşikler, enzimler, koenzimler, vitaminler ve mineraller gibi yaklaşık 200 farklı bileşen bulunduğu rapor edilmiştir (Komosinska-Vassev vd. 2015). Arı polenin kimyasal bileşiminin botanik ve coğrafi kökenine, toprak tipine, iklime, toplanması sırasındaki mevsim ve hava koşullarına, arı ırkına ve uygulanan arıcılık yöntemine büyük ölçüde bağlı olduğu belirtilmiştir (Didaras vd. 2020).

Arı poleni yapısındaki biyoaktif bileşenlerden kaynaklanan antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser ve antiobezite özellikler gibi fonksiyonel biyolojik etkilere sahiptir. Bu etkilerden yararlanmak amacıyla arı polenin çeşitli gıdalara ilave edilmesi son zamanlarda giderek ilgi gören endüstriyel bir uygulamadır ve bu durum da arı poleni tüketimini artırmaktadır (Aylanc vd. 2022). Arı poleni doğrudan polen peletleri şeklinde tüketilebileceği gibi besin değerini geliştirmek ve bununla birlikte son ürün kalitesine katkı sağlamak için çeşitli işlenmiş ürünlere de ilave edilmektedir (Thakur ve Nanda 2020a).

DERLEME / REVIEW

Arı polenin kurabiye, kek, makarna ve sosis gibi farklı ürünlerde fonksiyonel özelliklerin geliştirilmesi amacıyla değerlendirildiği çeşitli çalışmalar rapor edilmiştir (Aljazy vd. 2021, Brochard vd. 2021, Dunder 2022, Novaković vd. 2021).

Doğal ürünlere olan tüketici bilgisinin ve ilgisinin giderek artmasının bir sonucu olarak arı poleni de hem doğal bir ürün olması hem de sahip olduğu zengin bileşen içeriği, fonksiyonel özellikleri ve sağlık üzerine etkileri nedenleriyle tüketimi tercih edilen bir arıcılık ürünü haline gelmiştir. Ayrıca yapılan literatür incelemesinde son yıllarda arı polenin bileşimsel özellikleri ve sağlık etkileri üzerine yapılan araştırmalarda da artış olduğu değerlendirilmiştir. Buradan hareketle bu çalışmada arı polenin bazı fiziksel, fonksiyonel ve kimyasal özellikleri ile metabolizma üzerindeki biyolojik etkileri ve gıdalarda kullanım imkanları hakkındaki bilgilerin derlenmesi amaçlanmıştır.

Arı Poleni Üretimi

Çiçekli bitkilerin erkek gametofitine polen adı verilmektedir. Arılar çiçekleri ziyaret ettikleri esnada çiçeğin bu bölümüne temas etmekte ve bu temas sonucu çiçek polenleri arının vücudunu kaplamaktadır (Campos vd. 2008). Arının temas ettiği çiçek negatif yükle, arının bedeni ise pozitif yükle yüklüdür ve bu ikili arasında oluşan zayıf elektrostatik alan sayesinde polenler arının vücuduna yapışmaktadır (Clarke vd. 2013, Thakur ve Nanda 2020b).

Arılar, bu polenleri ağız salgıları ile nemlendirip birbirlerine yapıştırmakta ve yaklaşık %10 kadar nektar ile karıştırarak pelet haline getirmektedir. Bal arılarının arka ayaklarında fizyolojisi itibarıyla polen sepetleri adı verilen uzuvlar bulunmakta ve pelet haline getirilen çiçek polenleri polen sepetlerinde (korkükül) biriktirmektedir. Arı poleni, bu peletlerin karışımından meydana gelen ve gelişiminin ilk dönemlerinde olan larvaların beslenmesi amacıyla bal arısı *Apis mellifera* tarafından oluşturulan bu polenleri ifade etmektedir (Campos vd. 2008).

Arı polenleri arıcılar tarafından kovan girişlerine yerleştirilen ızgara şeklindeki polen tuzakları ile toplanmaktadır. Bu tuzaklar boyutları, görünüşleri ve kovana kurulumlarına göre farklılıklar gösterebilmektedir. Tuzaklar arıların arka bacaklarında taşıdıkları polenleri ayırmak için içerisinden geçmesi gereken bir ızgara ve ayrılan polenlerin toplandığı bir kap olmak üzere iki temel bölümden oluşmaktadır. Arılar kovana girdiklerinde

polenler ayrılmakta ve altta bulunan çekmeceye düşerek toplanmaktadır (Bogdanov 2016).

Polenlerin arıcılar tarafından günlük olarak toplanması önerilmekle birlikte, bu işlemi haftalık olarak yapan cihazların da olduğu bildirilmiştir. Arı poleni hasadı için özel beceri ve belirli kurallar gerekmekte olup, en iyi hammadde eldesi için üretim planının yapılması, üretim, hasat, işleme, depolama ve taşıma gibi ana konulara dikkat edilmesi oldukça önemlidir (Campos vd. 2021).

Dünyada en büyük arı poleni üreticisi ülkenin Çin olduğu bildirilmiş olup (Li vd. 2019), arı poleni üretim miktarlarında son yıllarda artış olduğu ancak yıllık üretim miktarını hesaplamak için ayrıntılı veri elde edilemediği ifade edilmiştir (Çakmak ve Seven-Çakmak 2016).

Arı Polenin Fiziksel Özellikleri

Arı polenin fiziksel özellikleri polenlerin üretiminde kullanılacak ekipmanların tasarımı ve ürünlerin temizlenmesi, sınıflandırılması, işlenmesi, taşınması ve depolanması gibi proses aşamaları için oldukça önemlidir (Thakur ve Nanda 2020a). Kaynaklarına bağlı olarak arı polenleri şekil ve boyut özellikleri açısından oldukça farklı özelliklere sahip olabilirler (Komosinska-Vassev vd. 2019). Taze arı polenin silindirik, yuvarlak, üçgen veya çan şekillerinde ve kurutulmuş arı polenin ise genellikle küresel veya iğne şeklinde olabileceği belirtilmiştir (Thakur ve Nanda 2020b, Barene vd. 2015).

Thakur ve Nanda (2020a) tarafından yapılan bir araştırmada dört farklı botanik kökenli (Hindistan cevizi, kişniş, kolza ve multifloral) arı poleni örneği incelenmiş ve bu polen örneklerinin ortalama uzunluk, genişlik ve kalınlık değerlerinin sırasıyla 2.98-3.70 mm, 2.50-3.27 mm ve 1.26-1.74 mm aralıklarında bulunduğu ve kişniş arı polenlerinin diğer polenlere göre daha uzun ve geniş olduğu rapor edilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada *Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Papaver somniferum*, *Phacelia tanacetifolia*, *Robinia pseudoacacia* ve *Trifolium epens* arı polenlerinin uzunluklarının 2.66-3.45 mm ve genişliklerinin ise 3.34-3.77 mm aralıklarında olduğu bildirilmiştir (Bleha vd. 2019). Türk Standartları Enstitüsü tarafından hazırlanan TS 10255 Polen Standardı'na göre polen iriliğinin bitki kaynağına göre değişebileceği ancak çapının 10-100 µm arasında olması gerektiği belirtilmiştir (Anonim 2006).

Arı polenin ağırlığı kurutma, depolama ve nakliye ile ilgili ekipmanları tasarlamak için kullanılan bir

DERLEME / REVIEW

parametredir (Thakur ve Nanda 2020a). Arı poleni peletinin ortalama ağırlığının 7.50-8.00 mg olduğu belirtilmiştir (Thakur ve Nanda 2020b). Bleha vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada farklı bitki kaynaklarından (*Brassica napus*, *Helianthus annuus*, *Papaver somniferum*, *Phacelia tanacetifolia*, *Robinia pseudoacacia* ve *Trifolium epens*) toplanan arı poleni yüklerinin ağırlıklarının 8.40-15.32 mg aralıklarında bulunduğu bildirilmiştir. Bir diğer çalışmada ise arı poleni tanelerinin 1.000 adet ağırlığının ise 4.47-8.14 g olduğu, en ağır arı poleninini kişniş ve en hafif arı poleninini ise multifloral arı poleni örneği olduğu belirtilmiştir (Thakur ve Nanda 2020a).

Arı poleninini tekstürel özelliklerinin belirlenmesinin arı poleninini doğrudan tüketimi veya farklı gıda bazlı ürünlere eklenmesi açısından oldukça önemli olduğu ifade edilmiştir. Yapılan bir araştırmada farklı arı poleni örneklerinin sertlik, adhezyon, kohezyon, esneklik, sakızimsılık ve çiğnenebilirlik değerlerinin sırasıyla 3.66-39.88 N, -20.81-481.11 g.s, 0.09-1.00, 16.18-99.87, 33.70-1572.66 N ve 5.45-832.63 N olduğu bildirilmiştir. Tekstürel özelliklere ait bu sonuçlar arasındaki farklılıkların ise arı poleni örneklerinin yapısal bütünlükleri arasındaki farklılıklar ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Thakur ve Nanda 2020a).

Renk arı poleni için kalite göstergesi olan fiziksel bir parametredir ve arı poleninini ticari olarak pazarlanması açısından önemlidir (Thakur ve Nanda 2020a). TS 10255 Polen Standardı'na göre polen renginin genellikle sarı, kısmen kırmızı beyaz, açık veya koyu mor, değişik tonlarda pembe veya siyah renkte olması gerektiği belirtilmiştir (Anonim 2006).

Yapılan araştırmalarda arı poleni renklerinin açık sarı, altın sarısı, sarı, kahvamsi sarı, koyu sarı, turuncu, açık yeşil, koyu yeşil, kırmızimsı kahve, kahverengi ve lacivert gibi renklerde olabildiği rapor edilmiştir. Arı poleni tanelerinin renkleri botanik kaynağına ve olgunluk düzeyine göre farklılık göstermekte olup, arı polenindeki renkler karotenoidler, flavonoidler, konjuge hidrokarbonlar ve polar ve hidroksilik gruplar içeren aromatik bileşiklerden kaynaklanmaktadır (Bleha vd. 2021).

Yapılan bir araştırmada farklı arı poleni örneklerinin L^* , a^* ve b^* renk değerlerinin sırasıyla 48.37-55.56, 3.52-9.25 ve 10.53-32.06 olduğu bildirilmiştir. Bu araştırmada kişniş arı poleninini diğer polenlere göre daha kırmızimsı ve sarımsı olduğu ve multifloral arı poleninini ise farklı botanik kökenleri bir arada bulundurması nedeniyle siyah, kahverengi, gri, sarı

ve turuncu gibi çeşitli renk özellikleri gösterdiği rapor edilmiştir (Thakur ve Nanda 2020a).

Arı Poleninin Fonksiyonel Özellikleri

Arı poleni yapısında bulunan çeşitli bileşenler sayesinde çözünürlük, su tutma kapasitesi, yağ tutma kapasitesi ve emülsifikasyon gibi gıda teknolojisi açısından önemli fonksiyonel özellikler göstermektedir. Herhangi bir maddenin suda çözünmesi; ürünün ıslanması, partiküllerine ayrılması, partiküllerin sulu fazda çözünmesi ve tamamen parçalanması ile eş zamanlı olarak yüzey tabakasının ortadan kalkması ile tüm bileşenlerin tamamen çözünmesi süreçlerinin gerçekleşmesi ile olmaktadır (Mimouni vd. 2010, Thakur ve Nanda 2020b).

Arı poleninini çözünürlüğü; doğasına, yapısında bulunan protein ve karbonhidratlara ve bu bileşenlerin birbirleri ile interaksyonlarına bağlı olarak değişmekle birlikte %84.91-87.56 arasında bulunmaktadır. Çözünürlük ayrıca polen içeriğinde bulunan tükürük salgıları, basit şekerler ve düşük moleküler ağırlıklı proteinler gibi suda çözünür bileşenler ile selüloz, lignin, lipitler ve sporopollenin gibi suda çözünmeyen bileşenlerin oranından da etkilenmektedir (Kostić vd. 2015, Thakur ve Nanda 2020a, Thakur ve Nanda 2020b). Ayrıca arı poleninde bulunan protein çözünürlüğünün %2.80-25.90 ve karbonhidrat çözünürlüğünün ise %31.20-75.00 oranları arasında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Kostić vd. 2015, Thakur ve Nanda 2020b).

Arı poleni örneklerinin infrared ve sıcak hava ile kurutuldukları farklı çalışmalarda kurutulan örneklerin çözünürlük indekslerinin sırasıyla 8.00-8.50 (Isik vd. 2019) ve 6.90-8.80 (Isik vd. 2018) olduğu ve örneklerin suda kolayca çözünebildikleri rapor edilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise arı poleni örneklerinin suda ıslanabilirliklerinin 285.67-1909.46 saniye ve dağılılıklarının ise %34.10-51.06 arasında olduğu rapor edilmiştir (Thakur ve Nanda 2020a).

Su tutma kapasitesi ürünlerin nemliliği için önemli bir kalite parametresi olup, arı polenlerinin su tutma kapasitelerinin yapılarında bulunan protein ve karbonhidratların hidrofilik gruplarına ve kapiller etkileşimlere bağlı olduğu belirtilmiştir (Kostić vd. 2015, Thakur ve Nanda 2020a). Ayrıca arı polenlerinin su absorpsiyonuna lipitlerin polar ve yüklü bölgelerinin de katkı sağladığı ifade edilmiştir (Kostić vd. 2015).

DERLEME / REVIEW

Hindistan cevizi, kişniş, kolza ve karışık bitkilerden üretilen arı polenleri ile yapılan bir çalışmada arı poleni örneklerinin su tutma kapasitelerinin 0.47-0.72 g/g aralığında olduğu ve en düşük su tutma kapasitesinin kişniş ve en yüksek su tutma kapasitesinin ise Hindistan cevizi arı poleninde tespit edildiği rapor edilmiştir (Thakur ve Nanda 2020a). Bir diğer çalışmada ise 26 farklı arı poleni örneğinin su tutma kapasitesinin 0.92-2.25 g/g aralığında bulunduğu bildirilmiştir (Kostić vd. 2015).

Lipitlerin lezzet tutucu, kıvam ve ağız hissini artırıcı özellikleri nedeniyle yağ tutma kapasitesi gıdalar için önemlidir. Gıda bileşiminde çözünmeyen moleküllerde bulunan hidrofobik kısımlar yağ tutma kapasitesini etkilediği belirtilmiştir (Kostić vd. 2015). Arı poleninde yağ tutma kapasitesinden sorumlu ana bileşenin polenin ekzin tabakasında bulunan sporopollenin olduğu (Kostić vd. 2015, Thakur ve Nanda 2020b) ve yağ asidi-lignin interaksyonuna benzer bir yapıda olan sporopolleninin bu yapısı sayesinde yağın matriks içerisinde karışmasını sağladığı ifade edilmiştir (Thakur ve Nanda 2020b). Ayrıca sporopolleninin yanı sıra arı poleninde bulunan aminoasitlerin bileşimi, proteinlerin hidrofobik kısımları ile çözünmeyen diğer bileşenlerin hidrofobik kalıntılarından da yağ tutma kapasitesini etkilediği belirtilmiştir (Kostić vd. 2015, Thakur ve Nanda 2020b).

Yapılan bir çalışmada 26 farklı arı poleni örneğinin yağ tutma kapasitesinin 1.00-3.53 g/g aralığında değiştiği bildirilmiştir (Kostić vd. 2015). Bir diğer çalışmada ise arı poleni örneklerinin yağ tutma kapasitesinin 1.31-2.13 g/g aralığında bulunduğu ve Hindistan cevizi arı poleninin yağ tutma kapasitesinin diğer örneklerle göre daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Thakur ve Nanda 2020a).

Arı polenlerinin emülsifikasyon özelliklerinin sıvı damlacık boyutu ve dağılımına, yapısındaki proteinlerin konformasyonu, hidrofobikliği, çözünürlüğü ve konsantrasyonu gibi özelliklerine, faz-hacim oranına, sürekli fazın viskozitesine ve çözücünün sıcaklığı, pH değeri ve tuz içeriğine bağlı olarak değişebileceği belirtilmiştir (Avramenko vd. 2013, Thakur ve Nanda 2020a).

Yapılan bir çalışmada arı poleninin emülsifiye edici aktivitesi ve stabilitesinin sırasıyla %44.83-46.76 ve %21.62-26.32 aralıklarında değişim gösterdiği ve emülsiyon aktivite ve stabilitesinin Hindistan cevizi arı poleninde daha yüksek ve kolza arı poleninde ise daha düşük olduğu bildirilmiştir (Thakur ve Nanda 2020a).

Bir diğer çalışmada ise arı poleni örneğinin emülsiyon aktivite indeksinin 10.40-24.52 g/m³ ve emülsiyon stabilite indeksinin ise 19.60-49.30 dakika olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada protein çözünürlüğünün emülsiyon aktivitesi ve stabilitesi üzerinde önemli bir etkisinin olduğu ve protein çözünürlüğünün emülsiyon aktivitesi ile negatif, ancak emülsiyon stabilitesi ile pozitif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. Protein çözünürlüğünün ise örnekteki karbonhidrat, lipit ve mineral madde içeriği ile ilişkili olduğu ve lipit ve kül konsantrasyonlarının protein çözünürlüğünü olumsuz, karbonhidrat konsantrasyonunun ise olumlu yönde etkilediği ifade edilmiştir (Kostić vd. 2015).

Arı Poleninin Kimyasal Kompozisyonu

Su içeriği ve aktivitesi

Taze arı poleninin su içeriği %21.00-30.00 aralığında olup, bu su oranı mikroorganizmaların gelişimi için elverişli bir ortam oluşturduğundan ve bozulmaya neden olduğundan arı poleni nem içeriği %2.00-9.00 aralığında oluncaya kadar kurutulmaktadır (Kieliszek vd. 2018). TS 10255 Polen Standardı'na göre polen nem içeriğinin %10 düzeyinin altına düşürülerek daha dayanıklı hale getirilmesi gerekmektedir (Anonim 2006). Ancak arı poleninde renksizleşme ve bazı arzu edilmeyen Maillard reaksiyonu ve lipit oksidasyonu gibi kimyasal reaksiyonların oluşması nedeniyle nem içeriğinin %3.00 düzeyinin altında olması istenilmemektedir (Kieliszek vd. 2018).

Yapılan bir çalışmada Türkiye'nin beş farklı lokasyonundan temin edilen arı poleni örneklerinin nem içeriklerinin %17.30-23.00 aralığında olduğu rapor edilmiştir (Mayda vd. 2020). Bir diğer çalışmada ise sekiz farklı monofloral ve beş farklı multifloral arı poleni örneğinin nem içeriği ve su aktivitesi değerlerinin sırasıyla %6.62-9.99 ve 0.19-0.39 aralıklarında bulunduğu bildirilmiştir (Straumite vd. 2022).

Karbonhidrat içeriği

Karbonhidratlar arı poleni kuru ağırlığının yaklaşık %40.00-85.00 kadarını oluşturan ve arı poleninde en yüksek miktara sahip bileşenlerdir (Li vd. 2018). Arı poleninin karbonhidrat miktarının yüksek olması polen yükleri oluşumu sırasında bal veya nektarın polene ilave edilmesi ile ilişkili olup, karbonhidrat kompozisyonu ise botanik kaynağa ve hasat koşullarına bağlı olarak farklılık gösterebilmektedir (Thakur ve Nanda 2020b).

DERLEME / REVIEW

Yapılan bir çalışmada farklı arı polenlerinin karbonhidrat içeriğinin 23.31-48.63 g/100g aralığında olduğu rapor edilmiştir (Spulber vd. 2018). Arı poleninin karbonhidrat içeriğinin önemli bir kısmını fruktoz, glikoz ve sakkaroz oluşturmakta olup, bu bileşenlerin miktarları sırasıyla 7.20-22.40, 6.40-21.90 ve 0.60-19.80 g/100g olarak bildirilmiştir (Li vd. 2018). Bir araştırmada *Tetragonula biroi* Friese arı poleni örneklerinin ortalama sorbitol, mannitol, glikoz, fruktoz, sakkaroz, sellobiyoz, izomaltoz, maltoz, rafinoz ve stakiyoz içeriklerinin sırasıyla 0.15, 12.66, 1.04, 7.31, 12.77, 0.40, 0.05, 1.24, 0.37 ve 0.27 g/100g olduğu rapor edilmiştir (Belina-Aldemita vd. 2019). Ayrıca arı poleninin yaklaşık %3.72 düzeyinde ham selüloz içerdiği de bildirilmiştir (Anđelković vd. 2012). TS 10255 Polen Standardı'na göre polendeki ham selüloz içeriğinin %0.9 düzeyinin üzerinde olması gerekmektedir (Anonim 2006). Bu karbonhidratların yanı sıra melezitoz, trehaloz ve erloz gibi karbonhidratların da arı poleni yapısında bulunabildiği rapor edilmiştir (Li vd. 2018).

Arı poleninin in vitro sindirimi ile toplam glikoz ve fruktoz biyoerişilebilirliklerinin incelendiği bir araştırmada ağızdan bağırsak sindirimine doğru ortamdaki toplam glikoz ve fruktoz içeriğinin yükseldiği ve glikoz ve fruktoz için en yüksek biyoerişilebilirlik değerlerinin sırasıyla %37 ve %19 olduğu ifade edilmiştir. Yapılan değerlendirmede glikozun sindirilebilir oranının fruktozdan yüksek olmasının sindirim ortamlarının farklı pH düzeylerindeki stabiliteyi veya kimyasal bileşime bağlı olarak diğer bileşiklerle gösterdikleri sinerjik etkilerdeki farklılıklardan kaynaklı olabileceği belirtilmiştir (Aylanc vd. 2023).

Protein ve aminoasit içeriği

Polen arılar için birincil protein kaynağı olup (Gerçek vd. 2022), arı poleninin %10.00-40.00 aralığında protein içerdiği bildirilmiştir (Aylanc vd. 2021). TS 10255 Polen Standardı'na göre polendeki ham protein içeriğinin %7 düzeyinin üzerinde olması istenilmektedir (Anonim 2006). Arı polenindeki ana protein fraksiyonları albüminlerden (%35.40), globulinlerden (%18.90), glutelinlerden (%18.60), prolaminlerden (%21.80) ve diğer proteinler ve enzimlerden (%5.30) oluşmaktadır (Giampieri vd. 2022).

Arı poleninde esansiyel ve esansiyel olmayan toplam 20 farklı aminoasit bulunduğu ve esansiyel aminoasitlerin toplam aminoasit içeriğinin %12.00-45.00 kadarını oluşturduğu rapor edilmiştir (De-Melo

vd. 2018, Giampieri vd. 2022). Arı polenindeki yaygın aminoasitlerin glisin, aspartik asit, glutamik asit, alanin, lösin, valin, lizin, serin ve izolösin olduğu bildirilmiştir (Al-Kahtani vd. 2020). Ayrıca arı poleni treonin, fenilalanin, histidin, metiyonin, izolösin ve triptofan esansiyel aminoasitlerini de içermektedir (Gerçek vd. 2022).

Arı polenindeki protein ve aminoasit miktarının polenin botanik kaynağına, toplanma mevsimine ve toplanma metoduna göre değiştiği belirtilmiştir (Giampieri vd. 2022). İlkbaharda toplanan arı polenlerinin toplam protein ve aminoasit içeriklerinin ve özellikle de lösin, glutamik asit, valin, izolösin, treonin ve glisin miktarlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca sonbaharda toplanan arı poleni örneklerinin histidin, metiyonin ve serin; yazın toplanan arı poleni örneklerinin ise aspartik asit, prolin ve alanin içeriklerinin daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Al-Kahtani vd. 2020).

Arı poleninin in vitro sindirimi sırasında toplam protein biyoerişilebilirliğinin incelendiği bir araştırmada ağızdan bağırsak sindirimine doğru toplam protein miktarının arttığı, ortalama protein biyoerişilebilirliğinin ağız fazından sonra %24 ve bağırsak fazından sonra ise %69 değerine ulaştığı belirtilmiştir (Aylanc vd. 2023).

Lipit ve yağ asidi içeriği

Lipit içeriği botanik türe bağlı olarak değişmekle birlikte arı poleninin kuru ağırlığının %1.00-20.00 kadarı lipitlerden oluşmaktadır. TS 10255 Polen Standardı'na göre polendeki ham lipit içeriğinin %1.2 düzeyinin üzerinde olması gerekmektedir (Anonim 2006). Bal arısı tarafından toplanan arı poleninin toplam lipit fraksiyonu yağ asitleri, karotenoidler ve sterollerden oluşmaktadır (Ares vd. 2018).

Toplam lipitlerin yaklaşık %3.00 kadarını serbest yağ asitlerinin oluşturduğu rapor edilmiş olup (Gerçek vd. 2022), arı polenindeki doymamış yağ asitlerinin doymuş yağ asitlerine oranının ortalama 2.67 olduğu belirtilmiştir (Rzepecka-Stojko vd. 2015). Yapılan bir çalışmada arı poleninde kaprilik (%0.52), kaprik (%2.89), laurik (%1.53), miristik (%0.74), palmitik (%5.50), stearik (%1.72), oleik (%3.95), linoleik (%3.10), α -linolenik (%5.25), cis-11-aykosenoik (%7.27), erusik (%5.54), nervonik (%2.21) ve cis-4,7,10,13,16,19-dokosaheksanoik (%8.21) asitlerin tespit edildiği bildirilmiştir (Gerçek vd. 2022). Arı poleninde esansiyel yağ asitleri olan ve ω -3, 6 ve 9 olarak da bilinen linolenik, linoleik ve oleik asit miktarlarının sırasıyla %1.61-53.07, %4.88-34.65 ve

DERLEME / REVIEW

%1.95-27.81 aralıklarında değiştiği rapor edilmiştir (Salazar-González ve Díaz-Moreno 2016).

Arı poleninde ayrıca fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin ve fosfatidilinositol gibi fosfolipitler ile β -sitosterol ve kampesterol gibi fitosterollerin de bulunduğu rapor edilmiştir. Arı poleni lipotropik ajanlar olan fosfolipitlerin varlığı nedeniyle metabolik dönüşümlerde önemli rol oynarken, fitosterol içeriği arı polenine hem insan hem de hayvan vücudu için östrojen özelliği kazandırmaktadır (Rzepecka-Stojko vd. 2015).

Vitamin içeriği

Vitaminler canlı organizmalar için sağlıklı bir yaşam sürdürme, büyüme ve gelişim açısından gerekli bileşenler olup, organizmada çeşitli biyolojik işlevlere sahiptirler. Arı poleninin vitamin içeriği polen toplama, işleme ve depolama koşullarına göre değişiklik göstermekle birlikte %0.02-0.70 aralığında bulunmaktadır (Bayram 2021).

Arı poleni yağda çözünen A, E ve D vitaminlerini %0.10 ve suda çözünen B₁ (tiyamin), B₂ (riboflavin), B₃ (nikotinik asit), B₅ (pantotenik asit), B₆ (pidoksin), B₇ (biyotin), B₉ (folik asit) ve C vitaminlerini ise yaklaşık %0.60 oranında içermektedir (Komosinska-Vassev vd. 2015, Li vd. 2018, Szabat vd. 2019). Yapılan bir çalışmada monofloral *Rhododendron ponticum* arı poleninde β -karoten, retinol, B₁, B₂, B₅, B₆, B₇, B₁₂, C, E ve K₂ vitaminleri miktarlarının sırasıyla 264.0, 22.0, 315.0, 735.0, 1940.0, 455.0, 46.0, 0.86, 16240.0, 490.0 ve 1.51 μ g/100g olduğu tespit edilirken, K₁ vitamini ise tespit edilememiştir (Ecem Bayram 2021). Bir diğer çalışmada ise yedi farklı taze arı poleni örneğinin B₁, B₂ ve B₆ vitaminlerine ait miktarların sırasıyla 590.0-1090.0, 17300.0-24100.0 ve 500.0-790.0 μ g/100g aralıklarında olduğu ve vitamin konsantrasyonlarındaki farklılıkların botanik orijine, iklim koşullarına, toprak tipine ve işlemeye bağlı olarak değişiklik gösterebildiği bildirilmiştir (de Arruda vd. 2013).

Mineral içeriği

Mineraller insan metabolizmasında kullanılan ve sentezlenemedikleri için günlük diyetle alınması gereken bileşenlerdir. Arı poleni yapısında birçok mineral madde bulundurmakta olup, mineraller arı poleninin kalitesini belirlemede çok önemli bir rol oynamaktadır (Temizer ve Çobanoğlu 2022). Yapılan bir çalışmada Ürdün ve Çin'den toplanan arı poleni örneklerinin magnezyum (1575,19-641.39 mg/kg), çinko (77.02-25.24 mg/kg), bakır (11.34-

0.03 mg/kg), selenyum (3.03-<0.04 mg/kg), nikel (2.84-<0.01 mg/kg), kurşun (2.57-<0.03 mg/kg), kadmiyum (<0.01 mg/kg) ve arsenik (<0.02 mg/kg) minerallerini içerdiği rapor edilmiştir (Aldgini vd. 2019).

Türkiye'de yapılan bir çalışmada farklı lokasyonlardan toplanan arı poleni örneklerinde potasyum (4470.64-4751.46 mg/kg), magnezyum (440.50-910.50 mg/kg), kalsiyum (358.02-413.87 mg/kg), silisyum (288.19-501.40 mg/kg) ve demir (50.88-74.82 mg/kg) minerallerinin diğer minerallere göre daha yüksek miktarlarda buldukları rapor edilmiştir (Bay vd. 2021).

Bir diğer çalışmada ise Doğu Karadeniz Bölgesi'ne ait arı polenlerinin farklı miktarlarda manganez, demir, çinko, selenyum, krom, bakır, magnezyum, kalsiyum, sodyum, kurşun, kadmiyum, nikel ve arsenik gibi mineralleri içerdikleri bildirilmiştir. Ayrıca mineral içeriklerinden yola çıkılarak arı poleni örneklerinin belirli bir elementin kaynağını, kontaminasyonunu ve toksik metal kaynaklı çevre kirliliğini takip etmek için potansiyel bir biyoindikatör olarak değerlendirilebileceği belirtilmiştir (Erdoğan vd. 2023).

Fenolik bileşik içeriği

Arı poleni farklı bitki kaynaklarına bağlı olarak değişmekle birlikte ortalama %1.60 oranında fenolik asitler, flavonoidler, lökotrienler, kateşinler, flavonol ve flavonol glikozitler olmak üzere farklı fenolik bileşikler içeren bir arıcılık ürünüdür. Arı poleninin yapısında bulunan fenolik bileşiklerin arı polenindeki antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar ve antitumör özellikler gibi biyoaktif etkilerinden sorumlu olduğu belirtilmiştir (Nisbet ve Tabatabaei 2021). Arı polenindeki fenolik bileşiklerin çoğunlukla karbonhidratlarla glikozit formunda bulunduğu ve bu bileşiklerin biyoaktif özelliklerin yanı sıra tane rengi (sarı, kahverengi, kırmızı, mor vb.) ve arı poleninin karakteristik bitter tadı üzerinde de etkili olduğu rapor edilmiştir (Kieliszek vd. 2018).

Yapılan bir çalışmada farklı arı poleni örneklerinin toplam fenolik ve flavonoid madde içeriklerinin sırasıyla 26.69-43.42 mg GAE/g ve 2.62-4.44 mg KE/g olduğu bildirilmiştir (Mayda vd. 2020). Bir diğer çalışmada Brezilya'da toplanan 62 farklı arı poleni örneğinin toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarının sırasıyla 12.60-84.22 mg GAE/g ve 1.90-36.85 mg KE/g aralıklarında değiştiği rapor edilmiştir (Soares de Arruda vd. 2021). Arı poleni örneklerinin fenolik bileşik kompozisyonunun

DERLEME / REVIEW

araştırıldığı bir çalışmada ise örneklerde gallik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, protokatekuik asit, kafeik asit, salisilik asit, klorojenik asit, kateşin, rutin, *p*-kumarik asit, etil gallat, trans-ferulik asit, mirisetin, luteolin, kuersetin, izoramnetin ve kaempferol fenolik bileşiklerinin bulunduğu ve rutin (1225.54-12613.49 mg/100 g) fenolik bileşiğinin ise arı poleni örneklerindeki en yüksek miktara sahip fenolik bileşik olduğu bildirilmiştir (Ecem Bayram 2021).

Arı polenin in vitro sindirimi sırasında fenolik ve flavonoid bileşiklerinin biyoerişilebilirliklerinin incelendiği bazı çalışmalarda ise farklı sindirim aşamalarında toplam fenolik ve flavonoid bileşik miktarlarının ve kompozisyonlarının değiştiği, ham örneklerin sindirilmiş örneklere göre daha fazla fenolik bileşik içerdiği ancak fenolik madde miktarının bağırsak sindiriminde mide sindirimine göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Akpınar-Bayazit vd. 2023, Mutlu ve Erbaş 2023). Aylanc vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada arı polenin toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin ortalama biyoerişilebilirliğinin sırasıyla %31 ve %25 olduğu bildirilmiştir.

Karotenoid içeriği

Arı poleninde bulunan karotenoid bileşikler arı poleni renginin yanı sıra antioksidan aktivitesi, provitamin A aktivitesi ve bağışıklık sistemini güçlendirmesi gibi biyolojik fonksiyonlara katkı sağlaması bakımından önem taşımaktadır (Fernández-García vd. 2012, Zuluaga vd. 2016).

Yapılan bir çalışmada Kolombiya, İtalya ve İspanya'dan temin edilen ticari arı poleni örneklerinin toplam karotenoid içeriklerinin sırasıyla 207.00, 21.30 ve 51.30 µg zeaksantin/g olduğu ve bu örneklerin ester formunda olan zeaksantin, lutein ve β-karoten bileşiklerini içerdiği bildirilmiştir (Gardana vd. 2018).

Bir diğer çalışmada at kestanesi, söğüt, mahlep kirazı, ıhlamur ve aylandız bitkilerine ait arı poleni örneklerinde β-karoten, kriptoksantin, zeaksantin, anteraksantin, violaksantin, neoksantin, flavoksantin, lutein, 9/9-(Z)-lutein ve luteoksantin karotenoidlerinin bulunduğu rapor edilmiştir (Schulte vd. 2009). Farklı arı poleni örnekleri ile yapılan bir çalışmada da örneklerde fitoen, iki lutein izomeri, lutein, iki anteraksantin izomeri, zeaksantin, zeinoksantin, β-kriptoksantin ve β-karoten tespit edildiği, örnekler arasında botanik ve coğrafi köken ve çiçek türlerinin çeşitliliğine bağlı olarak büyük bir farklılık gözlemlendiği rapor edilmiştir. Örneklerdeki

fitoen, zeaksantin, zeinoksantin, β-kriptoksantin ve β-karoten miktarlarının ise sırasıyla 0.12-17.82, 12.86-256.48, 10.59-996.07, 2.17-16.39 ve 0.68-3.62 µg/g olduğu bildirilmiştir (Salazar-González vd. 2020).

Kolombiya'dan temin edilen örnekler ile yapılan bir çalışmada arı polenlerindeki temel karotenoidlerin 9Z-zeaksantin (65.15-104.98 µg/g polen), zeaksantin (35.29-354.30 µg/g polen), iki zeaksantin izomeri (18.23-227.69 µg/g polen) ve β-kriptoksantin (8.67-34.25 µg/g polen) olduğu rapor edilmiştir (Salazar-González vd. 2022).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada ise Karadeniz ve Marmara Bölgeleri'nden temin edilen 16 farklı kestane arı poleni örneğinde astaksantin, lutein, zeaksantin, β-kriptoksantin, α-karoten ve β-karoten bileşiklerinin sırasıyla 6.88, 3.88-33.42, 4.88-36.38, 7.55-44.67, 6.20-152.42 ve 2.42-395.02 mg/kg miktarlarında buldukları bildirilmiştir. Ayrıca tüm örneklerde β-karoten bulunmakla birlikte Karadeniz Bölgesi örneklerinin β-karoten içeriği açısından daha zengin olduğu rapor edilmiş ve günlük yaklaşık bir çay kaşığı kestane arı poleni tüketiminin bireylerin karotenoid ihtiyacının tamamından fazlasını karşılayabileceği belirtilmiştir (Karkar vd. 2021).

Arı Poleninin Biyolojik Etkileri

Antimikrobiyal etki

Arı polenin antibakteriyel, antifungal ve antiviral özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Saisavoey vd. 2021). Arı polenin biyolojik aktivitesinin içerdiği koenzimler, enzimler ve niasin, tokoferol, tiamin, polifenoller ve fitosteroller gibi çeşitli ikincil bitki metabolitlerinden kaynaklandığı belirtilmiştir (Gerçek vd. 2022). Arı polenin içeriğinde bulunan rutin, kuersitrin, izokuersitrin, naringenin, kaempferol ve luteolin gibi flavonoidlerin antibakteriyel ve antiviral etkilerinin olduğu bildirilmiştir (Duan vd. 2019).

Yapılan bir çalışmada arı poleni örneğinin farklı ekstraktlarının *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* ve *Candida glabrata* mikroorganizmaları üzerinde farklı düzeylerde antimikrobiyal etki gösterdiği rapor edilmiştir (Graikou vd. 2011).

Bir diğer çalışmada ise *Fabaceae*, *Cistaceae*, *Ericaceae* ve *Boraginaceae* familyalarına ait ticari arı

DERLEME / REVIEW

poleni örneklerinin *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *C. glabrata* mikroorganizmaları üzerine antimikrobiyal etki gösterdiği ve bu arı polenlerinin *S. aureus* üzerine antimikrobiyal etkilerinin diğer mikroorganizmalardan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Pascoal vd. 2014). Ayrıca farklı arı poleni örneklerinin patojenik mikroorganizmalar olan *S. pyogenes* (Bridi vd. 2019) ve *Bacillus cereus* mikroorganizmalarına karşı da antimikrobiyal etki gösterdikleri belirtilmiştir (Kizilpınar-Temizir vd. 2022).

Antioksidatif etki

Arı polenin biyoaktif bileşenler içermesi nedeniyle doğal bir antioksidan kaynağı olduğu (Tutun vd. 2021), arı polenindeki antioksidan bileşenlerin gıdada oluşan oksidasyon reaksiyonlarını yavaşlattığı ve hücredeki serbest radikallerin zararlı etkilerini azalttığı bildirilmiştir (Aličić vd. 2014). Arı polenindeki temel antioksidan bileşenlerin karotenoidler ve fenolik bileşikler olduğu (Aličić vd. 2014, Tutun vd. 2021) ve arı polenin antioksidan kapasitesinin arı polenin elde edildiği bitkiye, tedarik edildiği bölgenin iklimsel ve coğrafik özelliklerine bağlı olarak değişebildiği rapor edilmiştir (Gerçek vd. 2022). Ayrıca arı polenin antioksidan aktivitesine yapısında bulunan A, C ve E vitaminlerinin de katkı sağladığı belirtilmiştir (Asmae vd. 2021).

Yapılan bir çalışmada dokuz farklı arı poleni örneğinin ABTS ve DPPH yöntemleri ile elde edilen EC₅₀ antioksidan aktivite değerlerinin sırasıyla 0.91-5.73 ve 1.94-7.99 mg/mL olduğu ve antioksidan aktivitenin toplam fenolik madde içeriği ile pozitif bir ilişkisinin bulunduğu rapor edilmiştir (Araújo vd. 2017). Bir diğer çalışmada ise incelenen beş farklı arı poleni örneğinin ABTS ve DPPH antioksidan aktivite değerlerinin sırasıyla 1.80-5.98 ve 3.08-3.85 mg TE/g aralıklarında bulunduğu bildirilmiştir (Mayda vd. 2020). Saral vd. (2019) tarafından farklı lokasyonlardan temin edilen arı poleni örneklerinin FRAP ve CUPRAC antioksidan aktivite değerlerinin ise 8.69-84.89 µmol FeSO₄.7H₂O/g ve 0.02-0.24 µmol TE/g aralıklarında olduğu tespit edilmiş ve lokasyon farklılıklarının antioksidan aktiviteyi etkilediği belirtilmiştir.

Antiinflamatuvar etki

İnflamasyon nöronlardan veya hasarlı dokulardan aracı maddelerin üretilmesini, salınmasını ve ağrı oluşumunu içeren metabolik bir tepkidir (Pascoal vd. 2014). Antiinflamatuvar etki mekanizması, araşidonik

asidin prostaglandin ve lökotrienler gibi toksik bileşiklere dönüştürülmesinden sorumlu olan siklooksijenaz ve lipoksijenaz enzimlerinin inhibe edilmesi ile ilgilidir (Komosinska-Vassev vd. 2015).

Arı polenin antiinflamatuvar aktivitesinden yapısında bulunan fenolik asitler, yağ asitleri ve fitosteroller gibi bileşenlerinin sorumlu olduğu rapor edilmiş olup, kaempferol flavonoidinin inflamatuvar yanıtı baskılayan hyaluronidaz ve elastaz enzimlerini inhibe ettiği belirtilmiştir (Kurek-Górecka vd. 2020). Yapılan araştırmalarda arı poleninde bulunan polifenol bileşiklerin konakçının patojenlere ve inflamasyona karşı savunma mekanizmasında önemli rol oynayan makrofajlar, T hücreleri, B hücreleri, NK hücreleri, mast hücreleri, hepatositler, bazofiller, nötrofiller ve eozinofiller gibi çok sayıda hücre üzerinde yararlı etkiler gösterebileceği bildirilmiştir (Denisow ve Denisow-Pietrzyk 2016, Pascoal vd. 2014).

Farklı botanik kaynaklar ve coğrafi alanlardan temin edilen sekiz arı poleni örneğinin hyaluronidaz enzimi inhibisyon değerlerinin %12.20-25.17 aralığında olduğu ve *Ericaceae* ve *Fabaceae* familyalarına ait arı polenlerinin diğer örneklere göre daha yüksek bir antiinflamatuvar aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Pascoal vd. 2014). Bir diğer çalışmada ise arı polenin hasarlı dokuları yeniden oluşturabilme özelliği nedeniyle yanıkları tedavi etmek için kullanılan merhem içerisine ilave edilmesinin yanık yaralarının tedavisinde alternatif bir yöntem olabileceği rapor edilmiştir (Komosinska-Vassev vd. 2015).

Bağışıklık düzenleyici etki

Arı polenin bağışıklık sistemini güçlendirdiği bildirilmektedir (Denisow ve Denisow-Pietrzyk 2016). Bununla ilgili yapılan bir çalışmada arı poleni içerikli bir diyetle beslenen gruptaki piliçlerin bağışıklık sistemlerinin güçlendiği rapor edilmiştir (Wang vd. 2007). Bir diğer çalışmada ise arı polenin kuşlardaki bağışıklık sistemi hücrelerinin daha hızlı farklılaşmasını ve çoğalmasını uyardığı bildirilmiştir (Şarić vd. 2009).

Arı poleninde bulunan kaempferol, mirisetin, luteolin ve kuersetin gibi flavonoid bileşiklerin bir araya gelerek mast hücrelerinin aktivasyonunu engellediği ve ani oluşan alerjik reaksiyonları önleyebileceği rapor edilmiştir (Abdelnour vd. 2019, Farag ve El-Rayes 2016).

Ayrıca arı polenin içerdiği flavonoidlerin vücudun doğal savunma mekanizmaları olan makrofajlar, NK,

DERLEME / REVIEW

T, B lenfositleri ve granülositler gibi hücreler üzerinde pozitif etkileri olduğu rapor edilmiştir (Szabat vd. 2019). Bunun yanı sıra yapılan çalışmalarda *Taishan Pinus massoniana* arı poleninden elde edilen polisakkaritlerin de karbon tetraklorürün indüklediği histolojik dönüşüme karşı önemli düzeyde karaciğer koruması sağladığı ve splenosit hücrelerinde proinflamatuvar sitokin salgılanmasını teşvik edici etki gösterdiği tespit edilmiştir (Yang vd. 2015, Zhou vd. 2018).

Sinir sistemi üzerine etki

Arı polenindeki fenolik bileşiklerin önemli biyolojik aktivitelere sahip olduğu ve arı poleni yapısında bulunan hidroksisünamik asit amidlerinin antidepresan özellikler ile Parkinson karşıtı aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada Tayland arı poleninde tanımlanan 8-metoksikaempferol-3-O-(2"-*p*-kumaroil)-glikozit bileşiğinin Parkinson hastalığı ve depresyonda rol oynayan önemli bir nörotransmitter olan katekol-O-metiltransferaza karşı inhibe edici aktivitesinin bulunduğu rapor edilmiştir (Watanabe vd. 2023). Propiyonik asidin neden olduğu beyin toksikasyonu üzerine arı poleni-probiyotik karışımının koruyucu ve tedavi edici etkisinin incelendiği bir çalışmada, arı poleni-probiyotik karışımının IL-1 β , IL-8, IL-10 ve IFN- γ seviyelerinde önemli olmayan azalmayla birlikte propiyonik asidin neden olduğu nörotoksik etkileri azalttığı bildirilmiştir (Alonazi vd. 2022).

Bir diğer çalışmada ise arı polenin bir çevre kirleticisi olan ve sinir sisteminde nörotoksik etki gösteren metil cıvaya maruz bırakılmış farelerde magnezyum, potasyum, lipid peroksidasyonu ve glutasyon seviyelerini normalleştirdiği; katalaz, laktat dehidrojenaz ve kreatin kinaz aktivitelerini eski haline getirmede etkili olduğu ve böylece metal iyon kusurlarını ve nöronal ölümü iyileştirmek için güvenle kullanılabilmesi bildirilmiştir (Al-Osaimi vd. 2018). Ayrıca otizmin patogenezinde önemli bir rol oynayan nöroinflamasyonun iyileştirilmesi üzerinde arı polenin etkisinin incelendiği bir çalışmada, arı polenin farelerde disbiyozu iyileştirerek inflamatuvar yanıtı ve endotoksemiye azalttığı ve nöroinflamasyona karşı koruma sağladığı rapor edilmiştir (Aabed vd. 2019).

Antikanserojen etki

Arı polenin yapısında bulunan aldehitler, alkoller, yağ asitleri, fenolik bileşikler, terpenler ve esterlerin antikanser aktivite üzerinde etkili olduğu belirtilmiştir (Aylanc vd. 2021, Aylanc vd. 2023). Yapılan bir

çalışmada *Homotrigona fimbriata* arıları tarafından üretilen arı polenlerine ait ekstraktların meme adenokarsinom (MCF-7), servikal karsinom (HeLa) ve epitelyal kolorektal adenokarsinom (Caco-2) hücreleri üzerine sitotoksik aktivitelerinin sırasıyla %82.20, %55.50 ve %61.40 olduğu rapor edilmiştir (Arung vd. 2021).

Fas'ın çeşitli bölgelerinden toplanan sekiz farklı arı poleni örneğinin mide gastrik adenokarsinom (AGS), Caco-2, HeLa, MCF-7 ve akciğer karsinom (NCI-H460) hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş ve *Apiaceae* familyasına ait arı poleni örneğinin MCF-7 ve *Oleaceae* familyasına ait arı poleni örneğinin ise HeLa kanser hücresi üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir (Aylanc vd. 2023). Bir diğer çalışmada ise MCF-7, BT-20 ve Hs 578T olmak üzere üç farklı meme kanseri hücresine *Bidens pilosa* var. *radiata* arı polenin etkisi sonucunda MCF-7 hücrelerinin canlılıklarının %43.50 olduğu ve diğer hücrelerde ise canlılık gözlenmediği rapor edilmiştir (Nguyen vd. 2022).

Arı Polenin Gıdalarda Kullanımı

Arı poleni doğrudan tüketilebilen bir üründür ve sabahları kahvaltıda önce tüketilmesi tavsiye edilmektedir. Günlük tüketim miktarlarının yetişkinler için 15–20 g, 3-5 yaş arası çocuklar için 5–10 g ve 6-12 yaş arası çocuklar için ise 10–15 g kadar olabileceği belirtilmiştir (Anonim 2006). Arı poleni sahip olduğu biyoaktif ve fonksiyonel özellikleri nedeniyle farklı gıda ürünlerine de ilave edilmektedir.

Dundar (2022) tarafından yapılan bir çalışmada kurabiyelere farklı oranlarda (%5, %10 ve %15) arı poleni ilave edilerek örneklerin özelliklerindeki değişim incelenmiştir. Buna göre kurabiyelere ilave edilen arı poleni oranındaki artışa bağlı olarak örneklerin kül, yağ, protein ve polifenol içerikleri ile antioksidan aktivitelerinin arttığı, karbonhidrat içeriğinin önemli ölçüde azaldığı ve örneklerin duyuşsal olarak kabul edilebilir olduğu bildirilmiştir.

Aljazy vd. (2021) tarafından yapılan bir çalışmada arı poleni ilavesi ile gluten duyarlılığı olan bireyler için gluten içeriği azaltılmış bir kek üretimi yapılmıştır. Üretilen keklerde %50 oranında arı poleni unu kullanıldığında kekin süngerimsi yapısında bir değişim olmadığı ve arı poleninde bulunan antioksidan flavonoidlerin varlığı sayesinde kekte yağ oksidasyonu ve kalite bozulmalarının önlenerek daha uzun bir raf ömrü sağlanabileceği rapor edilmiştir. Makarna üretimi ile ilgili yapılan bir çalışmada ise arı poleni tozu ve kestane ununun

DERLEME / REVIEW

makarna formülasyonuna eklenerek makarnanın özellikleri üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre makarnaya %20 oranında arı poleni tozu ilavesi yapıldığında hem taze hem de kurutulmuş makarnanın pişme süresinde bir azalma olduğu ve makarna için en uygun formülasyonun %50 kestane unu ve %10 arı poleni ilavesi ile sağlandığı belirtilmiştir. Ayrıca kestane unu ve arı poleni ile zenginleştirilmiş makarnanın, artan protein ve lif içeriğinin yanı sıra çoklu doymamış yağ asitleri, vitamin ve mineral içeriklerindeki artışla birlikte beslenme açısından dengeli bir ürün olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (Brochard vd. 2021).

Arı poleninın gıdalarda fonksiyonel bir bileşen olarak kullanılması ile ilgili yapılan başka bir çalışmada farklı arı poleni tozları çeşitli konsantrasyonlarda (0.0, 0.5, 1.0 ve 1.5 g/100 g) sosislere ilave edilmiş ve bunun sonucunda sosislerin depolanması sırasında antioksidan aktivite değişimi, oksidatif stabilite düzeyi ve kalite üzerindeki farklılıklar incelenmiştir. Çalışmada arı poleninın ilave edildiği sosislerde arı poleninın sağladığı antioksidan etkiye bağlı olarak miyoglobinin metmiyoglobine okside olmasının engellenmesi sonucu kırmızılık renk değerlerinin daha yüksek olduğu ortaya konulmuştur. Ayrıca sosislere arı poleni ilave oranının artırılmasıyla depolama sırasında oksidatif stabilitenin de yükseldiği belirtilmiştir (Novaković vd. 2021).

Mutlu (2023) tarafından yapılan bir çalışmada arı poleninın taşıyıcı olarak kullanılması ile arı poleninden gelen biyoaktif bileşiklerle zenginleştirilmiş bal tozu üretilmesi amaçlanmış ve arı poleni içeren üründe düşük higroskopisite ve yapışkanlık, daha iyi akışkanlık, daha yüksek fenolik ve flavonoid içerikleri ve antioksidan aktivite sağlaması nedeniyle bal tozu üretiminde arı poleninın bir bileşen olarak kullanılabilirliği ve benzer özelliklerde yeni fonksiyonel ürünler geliştirilebileceği ifade edilmiştir.

SONUÇ

Arı poleni diğer arıcılık ürünleri gibi doğal bir üründür ve yapısında bulunan bileşikler nedeniyle birçok besinsel, fonksiyonel ve biyolojik özelliğe sahiptir. Arı poleni yapısında su, proteinler, aminoasitler, karbonhidratlar, lipitler, yağ asitleri, fenolik bileşikler, enzimler, koenzimler, vitaminler ve mineraller gibi birçok bileşen bulunan ve insanlar için eski zamanlardan beri gıda takviyesi olarak kullanılan bir

besin kaynağıdır. Bu bileşenler sayesinde arı poleni antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser ve antiobezite etkileri gibi sağlık üzerinde birçok olumlu özellikler göstermektedir.

Yapılan çeşitli araştırmalarla farklı bitkisel ve coğrafik orijinli arı polenlerinin kimyasal kompozisyonu ve sağlık etkileri ortaya konulmuş olup, bu konuda yapılan çalışmaların artmasına bağlı olarak arı poleninın toplum tarafından bilinirliği ve tercih edilirliliği de artış göstermiştir. Bu bakımdan arı poleni fonksiyonel bir bileşen olarak kek, kurabiye ve makarna gibi farklı gıdalarda kullanılmıştır. Arı poleninın çözünürlük, su ve yağ tutma kapasitesi, emülsifikasyon gibi gıda teknolojisi açısından önemli fonksiyonel özellikler göstermesinin çeşitli ürünlerin iyileştirilmesi veya geliştirilmesinde etkili olabileceği ifade edilmiştir.

Sonuç olarak arı poleninın sahip olduğu fonksiyonel, kimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle gıda sektöründe ürün formülasyonlarının geliştirilmesinde kullanımı açısından önemli bir potansiyelinin olduğu ve arı poleni ile ilgili daha çok araştırma yapılması gerektiği değerlendirilmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarların araştırma ile ilgili olarak bir çıkar çatışması yoktur.

Etik Belgesi: Bu çalışma için etik belgesi gerekmemektedir.

Mali Kaynak: Bu çalışmada herhangi bir mali kaynak kullanılmamıştır.

Veri Sağlama Durumu: Çalışmada bulunan bilgi ve veriler akademik etik kurallarına uygun bir şekilde verilmiştir. Derleme bir çalışma olduğu için kullanılan veriler literatüre atıf yapılarak kullanılmıştır.

Yazar Katkıları: Bu araştırmanın gerçekleştirilmesinde ve makalenin yazılmasında yazarlar eşit olarak katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

Aabed K, Bhat RS, Al-Dbass A, Moubayed N, Algahtani N, Merghani NM, Alanazi A, Zayed N, El-Ansary A. Bee pollen and propolis improve neuroinflammation and dysbiosis induced by propionic acid, a short chain fatty acid in a rodent model of autism. *Lipids Health Dis*, 2019;18(1):1-8

Abdelnour SA, Abd El-Hack ME, Alagawany M, Farag MR, Elnesr SS. Beneficial impacts of

DERLEME / REVIEW

- bee pollen in animal production, reproduction and health. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2019;103(2):477-484
- Akpınar Bayazit A, Bekar E, Unal TT, Celik MA, Acoglu Celik B, Koc Alibasoglu E, Sahin Dilmenler P, Yolci Omeroglu P, Copur OU, Kamiloglu, S. Investigating the effect of harvest season on the bioaccessibility of bee pollen polyphenols by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Eur Food Res Tech*, 2023;1-14
- Aldgini HM, Al-Abbadi AA, Abu-Nameh ES, Alghazeer RO. Determination of metals as bio indicators in some selected bee pollen samples from Jordan. *Saudi J Biol Sci*, 2019;26(7):1418-1422
- Aličić D, Šubarić D, Jašić M, Pašalić H, Ačkar Đ. Antioxidant properties of pollen. *Hrana u Zdravlju i Bolesti: Znanstveno-Stručni Časopis za Nutricionizam i Dijetetiku*, 2014;3(1):6-12
- Aljazy NAS, Abdulstar AR, Alrakabi JMF. Analytical study of phytochemicals and antioxidant activity of pollen (*Typha domingensis* Pers.) extracted from the papyrus plant and its use in cake enrichment. *Al-Qadisiyah J Agric Sci*, 2021;11(2):126-136
- Al-Kahtani SN, Taha EK, Khan KA, Ansari MJ, Farag SA, Shower DM, Elnabawy ESM. Effect of harvest season on the nutritional value of bee pollen protein. *PloS One*, 2020;15(12):e0241393
- Alonazi M, Ben Bacha A, Al Suhaibani A, Almnazel AT, Aloudah HS, El-Ansary A. Psychobiotics improve propionic acid-induced neuroinflammation in juvenile rats, rodent model of autism. *Transl Neurosci*, 2022;13(1):292-300
- Al-Osaimi M, El-Ansary A, Al-Daihan S, Bhat RS, Ben Bacha A. Therapeutic and protective potency of bee pollen against neurotoxic effects induced by prenatal exposure of rats to methyl mercury. *J Mol Neurosci*, 2018;65:327-335
- Anđelković B, Jevtić G, Mladenović M, Marković J, Petrović M, Nedić N. Quality of pollen and honey bee bread collected in spring. *J Hyg Eng Des*, 2012;1:275-277
- Anonim. Türk Standartları Enstitüsü TS 10255 Polen Standardı. ICS 65.140, 2006, Ankara
- Araújo JS, Chambó ED, Costa MAPDC, Cavalcante da Silva SMP, Lopes de Carvalho CA, Estevinho LM. Chemical composition and biological activities of mono- and heterofloral bee pollen of different geographical origins. *Int J Mol Sci*, 2017;18(5):921
- Ares AM, Valverde S, Bernal JL, Nozal MJ, Bernal J. Extraction and determination of bioactive compounds from bee pollen. *J Pharm Biomed*, 2018;147:110-124
- Arung ET, Ramadhan R, Khairunnisa B, Amen Y, Matsumoto M, Nagata M, Kusuma IW, Paramita S, Yadi S, Tandirogang N, Takemoto N, Kim Y, Shimizu K. Cytotoxicity effect of honey, bee pollen, and propolis from seven stingless bees in some cancer cell lines. *Saudi J Biol Sci*, 2021;28(12):7182-7189
- Asmae EG, Nawal EM, Bakour M, Lyoussi B. Moroccan monofloral bee pollen: botanical origin, physicochemical characterization, and antioxidant activities. *J Food Qual*, 2021;2021:8877266
- Avramenko NA, Low NH, Nickerson MT. The effects of limited enzymatic hydrolysis on the physicochemical and emulsifying properties of a lentil protein isolate. *Food Res Int*, 2013;51(1):162-169
- Aylanc V, Falcão SI, Ertosun S, Vilas-Boas M. From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. *Trends Food Sci Technol*, 2021;109:464-481
- Aylanc V, Ertosun S, Russo-Almeida P, Falcão SI, Vilas-Boas M. Performance of green and conventional techniques for the optimal extraction of bioactive compounds in bee pollen. *Int J Food Sci Technol*, 2022;57(6):3490-3502
- Aylanc V, Larbi S, Calhelha R, Barros L, Rezouga F, Rodríguez-Flores MS, Seijo MC, El Ghouzi A, Lyoussi B, Falcão SI, Vilas-Boas M. Evaluation of antioxidant and anticancer activity of mono- and polyfloral Moroccan bee pollen by characterizing phenolic and volatile compounds. *Molecules*, 2023;28(2):835

DERLEME / REVIEW

- Aylanc V, Falcão SI, Vilas-Boas M. Bee pollen and bee bread nutritional potential: Chemical composition and macronutrient digestibility under in vitro gastrointestinal system. *Food Chem*, 2023;413:135597
- Aylanc V, Tomás A, Russo-Almeida P, Falcão SI, Vilas-Boas M. Assessment of bioactive compounds under simulated gastrointestinal digestion of bee pollen and bee bread: Bioaccessibility and antioxidant activity. *Antioxidants*, 2021;10(5):651
- Barene I, Daberte I, Siksná S. Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medikinos Teorija ir Praktika*, 2015;21:16-22
- Bay V, Topal E, Çakıcı N, Yıldızdal İ. Palynological analyses, chemical and mineral composition of some honeybee pollen pellets. *U Arı D - U Bee J*, 2021;21(2):187-197
- Belina-Aldemita MD, Opper C, Schreiner M, D'Amico S. Nutritional composition of pot-pollen produced by stingless bees (*Tetragonula bironi* Friese) from the Philippines. *J Food Compost Anal*, 2019;82:103215
- Bleha R, Shevtsova TV, Živčáková M, Korbářová A, Ježková M, Saloň I, Brindza J, Synytsya A. Spectroscopic discrimination of bee pollen by composition, color, and botanical origin. *Foods*, 2021;10(8):1682
- Bleha R, Shevtsova T, Kruzik V, Brindza J, Sinica A. Morphology, physicochemical properties and antioxidant capacity of bee pollens. *Czech J Food Sci*, 2019;37(1):1-8
- Bogdanov S. Pollen: collection, harvest, composition, quality. *The Pollen Book, Bee Product Science*, Chapter 1, 2016;1-16
- Bridi R, Atala E, Pizarro PN, Montenegro G. Honeybee pollen load: phenolic composition and antimicrobial activity and antioxidant capacity. *J Nat Prod*, 2019;82(3):559-565
- Brochard M, Correia P, Barroca MJ, Guiné RP. Development of a new pasta product by the incorporation of chestnut flour and bee pollen. *Appl Sci*, 2021;11(14):6617
- Campos MG, Anjos O, Chica M, Campoy P, Nozkova J, Almaraz-Abarca N, Carreck NL. Standard methods for pollen research. *J Apic Res*, 2021;60(4):1-109
- Campos MG, Bogdanov S, de Almeida-Muradian LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, Ferreira F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J Apic Res*, 2008;47(2):154-161
- Clarke D, Whitney H, Sutton G, Robert D. Detection and learning of floral electric fields by bumblebees. *Science*, 2013;340(6128):66-69
- Çakmak İ, Seven-Çakmak S. Beekeeping and recent colony losses in Turkey. *U Arı D - U Bee J*, 2016;16(1):31-48
- de Arruda VAS, Pereira AAS, de Freitas AS, Barth OM, de Almeida-Muradian LB. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *J Food Compost Anal*, 2013;29(2):100-105
- De-Melo AAM, Estevinho LM, Moreira MM, Delerue-Matos C, de Freitas ADS, Barth OM, de Almeida-Muradian LB. A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Biosci*, 2018;25:91-110
- Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: A review. *J Sci Food Agric*, 2016;96(13):4303-4309
- Didaras NA, Karatasou K, Dimitriou TG, Amoutzias GD, Mossialos D. Antimicrobial activity of bee-collected pollen and beebread: State of the art and future perspectives. *Antibiotics*, 2020;9(11):811
- Duan H, Dong Z, Li H, Li WR, Shi SX, Wang Q, Cao WG, Fang XM, Fang AD, Zhai KF. Quality evaluation of bee pollens by chromatographic fingerprint and simultaneous determination of its major bioactive components. *Food Chem Toxicol*, 2019;134:110831
- Dundar AN. Total phenolic and antioxidant bioaccessibilities of cookies enriched with bee pollen. *J Food Process Preserv*, 2022;46(6):e16085
- Ecem Bayram N. Vitamin, mineral, polyphenol, amino acid profile of bee pollen from *Rhododendron ponticum* (source of "mad honey"): nutritional and palynological approach. *J Food Meas Charact*, 2021;15(3):2659-2666

DERLEME / REVIEW

- Erdoğan A, Şeker ME, Kahraman SD. Evaluation of environmental and nutritional aspects of bee pollen samples collected from East Black Sea region, Turkey, via elemental analysis by ICP-MS. *Biol Trace Elem Res*, 2023;201(3):1488-1502
- Farag SA, El-Rayes TK. Effect of bee-pollen supplementation on performance, carcass traits and blood parameters of broiler chickens. *Asian J Anim Vet Adv*, 2016;11:168-177
- Fernández-García E, Carvajal-Lérida I, Jarén-Galán M, Garrido-Fernández J, Pérez-Gálvez A, Hornero-Méndez D. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Res Int*, 2012;46(2):438-450
- Gardana C, Del Bo C, Quicazán MC, Correa AR, Simonetti P. Nutrients, phytochemicals and botanical origin of commercial bee pollen from different geographical areas. *J Food Compost Anal*, 2018;73:29-38
- Gerçek YC, Celik S, Bayram S. Screening of plant pollen sources, polyphenolic compounds, fatty acids and antioxidant/antimicrobial activity from bee pollen. *Molecules*, 2022;27(1):117
- Giampieri F, Quiles JL, Cianciosi D, Forbes-Hernández TY, Orantes-Bermejo FJ, Alvarez-Suarez JM, Battino M. Bee products: An emblematic example of underutilized sources of bioactive compounds. *J Agric Food Chem*, 2022;70(23):6833-6848
- Graikou K, Kapeta S, Aligiannis N, Sotiroudis G, Chondrogianni N, Gonos E, Chinou I. Chemical analysis of Greek pollen-Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chem Cent J*, 2011;5:1-9
- Isik A, Ozdemir M, Doymaz I. Effect of hot air drying on quality characteristics and physicochemical properties of bee pollen. *Food Sci Technol*, 2018;39:224-231
- Isik A, Ozdemir M, Doymaz I. Infrared drying of bee pollen: effects and impacts on food components. *Czech J Food Sci*, 2019;37(1):69-74
- Karkar B, Şahin S, Güneş ME. Evaluation of antioxidant properties and determination of phenolic and carotenoid profiles of chestnut bee pollen collected from Turkey. *J Apic Res*, 2021;60(5):765-774
- Kieliszek M, Piwowarek K, Kot AM, Błażej S, Chlebowska-Śmigiel A, Wolska I. Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends Food Sci Technol*, 2018;71:170-180
- Kizilpınar-Temizler I, Guder A, Candan ED, Yolcu U. Antioxidant properties, element contents and antimicrobial activities of bee pollen collected by *Apis mellifera* L. in Türkiye. *Span J Agric Res*, 2022;20(4):e0506-e0506
- Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kasperczyk J, Piława B, Krzyminiewski R, Dobosz B, Ramos P, Stojko J, Stojko M, Ivanova D, Olczyk K. EPR spectroscopic examination of different types of paramagnetic centers in the blood in the course of burn healing. *Oxid Med Cell Longev*, 2019,7506274
- Komosinska-Vassev K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. *Evid-Based Compl Alt*, 2015,297425
- Kostić AŽ, Barać MB, Stanojević SP, Milojković-Opšenica DM, Tešić ŽL, Šikoparija B, Radišić P, Prentović M, Pešić MB. Physicochemical composition and techno-functional properties of bee pollen collected in Serbia. *LWT-Food Sci Technol*, 2015;62(1):301-309
- Kurek-Górecka A, Górecki M, Rzepecka-Stojko A, Balwierz R, Stojko J. Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 2020;25(3):556
- Li F, Guo S, Zhang S, Peng S, Cao W, Ho CT, Bai N. Bioactive constituents of *F. esculentum* bee pollen and quantitative analysis of samples collected from seven areas by HPLC. *Molecules*, 2019,24(15):2705
- Li QQ, Wang K, Marcucci MC, Sawaya ACHF, Hu L, Xue XF, Wu LM, Hu FL. Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *J Funct Foods*, 2018;49:472-484
- Mayda N, Özkök A, Ecem Bayram N, Gerçek YC, Sorkun K. Bee bread and bee pollen of

DERLEME / REVIEW

- different plant sources: Determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. *J Food Meas Charact*, 2020;14:1795-1809
- Mimouni A, Deeth HC, Whittaker AK, Gidley MJ, Bhandari BR. Rehydration of high-protein-containing dairy powder: Slow-and fast-dissolving components and storage effects. *Dairy Sci Technol*, 2010;90(2-3):335-344
- Mutlu C. Bee pollen usage as carrier material in the drying of honey and some properties of honey-bee pollen powders. *Brit Food J*, 2023;125(10:3734-3747
- Mutlu C, Erbas M. Turkish bee pollen: Composition, regional discrimination and polyphenol bioaccessibility. *Food Biosci*, 2023,102805
- Nguyen HC, Liang-Chih L, Ming-Cheng W, Tai-Pei L, Chiou-Ying Y, Meng-Yuan H. Chemical constituents, antioxidant, and anticancer activities of bee pollen from various floral sources in Taiwan. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2022;50(2):12644-12644
- Nisbet C, Tabatabaei P. Investigation of phenolic compounds and antioxidant capacity of bee pollen collected from different geographical regions in Turkey. *Kocatepe Vet J*, 2021;14(3):359-365
- Novaković S, Djekic I, Pešić M, Kostić A, Milinčić D, Stanisavljević N, Radojević A, Tomasevic I. Bee pollen powder as a functional ingredient in frankfurters. *Meat Sci*, 2021;182:108621
- Parlakay O, Yılmaz H, Yaşar B, Seçer A, Bahadır B. Türkiye'de arıcılık faaliyetinin mevcut durumu ve trend analizi yöntemiyle geleceğe yönelik beklentiler. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2008;22(2):17-24
- Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem Toxicol*, 2014;63:233-239
- Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Kurek-Górecka A, Górecki M, Kabała-Dzik A, Kubina R, Moździerz A, Buszman E. Polyphenols from bee pollen: structure, absorption, metabolism and biological activity. *Molecules*, 2015;20(12):21732-21749
- Saisavoey T, Sangtanoo P, Chanchao C, Reamtong O, Karnchanatat A. Identification of novel anti-inflammatory peptides from bee pollen (*Apis mellifera*) hydrolysate in lipopolysaccharide-stimulated RAW264. 7 macrophages. *J Apic Res*, 2021;60(2):280-289
- Salazar-González CY, Rodríguez-Pulido FJ, Stinco CM, Terrab A, Díaz-Moreno C, Fuenmayor C, Heredia FJ. Carotenoid profile determination of bee pollen by advanced digital image analysis. *Comput Electron Agric*, 2020;175:105601
- Salazar-González CY, Stinco CM, Rodríguez-Pulido FJ, Díaz-Moreno C, Fuenmayor C, Heredia FJ, González-Miret ML. Characterization of carotenoid profile and α -tocopherol content in Andean bee pollen influenced by harvest time and particle size. *LWT*, 2022;170:114065
- Salazar-González C, Díaz-Moreno C. The nutritional and bioactive aptitude of bee pollen for a solid-state fermentation process. *J Apic Res*, 2016;55(2):161-175
- Saral Ö, Kilicarslan M, Şahin H, Yildiz O, Dincer B. Evaluation of antioxidant activity of bee products of different bee races in Turkey. *Turk J Vet Anim Sci*, 2019;43(4):441-447
- Šarić A, Balog T, Soboćance S, Kušis B, Šverko V, Rusak G, Likić S, Bubalo D, Pinto B, Reali D, Marotti T. Antioxidant effects of flavonoid from *Crotalaria incanus* L. rich bee pollen. *Food Chem Toxicol*, 2009;47:547-554
- Schulte F, Mäder J, Kroh LW, Panne U, Kneipp J. Characterization of pollen carotenoids with in situ and high-performance thin-layer chromatography supported resonant Raman spectroscopy. *Anal Chem*, 2009;81(20):8426-8433
- Soares de Arruda VA, Viera dos Santos A, Figueiredo Sampaio D, da Silva Araujo E, de Castro Peixoto AL, Estevinho LM, de Almeida-Muradian LB. Brazilian bee pollen: phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *J Apic Res*, 2021;60(5):775-783
- Spulber R, Dogaroglu M, Babeanu N, Popa O. Physicochemical characteristics of fresh bee

DERLEME / REVIEW

- pollen from different botanical origins. Rom Biotechnol Lett, 2018;23:13357-13365
- Straumite E, Bartule M, Valdovska A, Kruma Z, Galoburda R. Physical and microbiological characteristics and antioxidant activity of honey bee pollen. Appl Sci, 2022;12(6):3039
- Szabat P, Poleszak J, Szabat M, Boreński G, Wójcik M, Milanowska J. Apitherapy-the medical use of bee products. J Phys Educ Sport, 2019;9(8):384-396
- Temizer İK, Çobanoğlu DN. Farklı botanik kaynaklı arı polenlerinin element analizi ile değerlendirilmesi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi, 2022;9(4):1114-1122
- Thakur M, Nanda V. Exploring the physical, functional, thermal, and textural properties of bee pollen from different botanical origins of India. J Food Process Eng, 2020a;43(1):e12935
- Thakur M, Nanda V. Composition and functionality of bee pollen: A review. Trends Food Sci Technol, 2020b;98:82-106
- Tutun H, Kaya MM, Usluer MS, Kahraman HA. Bee pollen: Its antioxidant activity. U Arı D - U Bee J, 2021;21(1):119-131
- Wang J, Li S, Wang Q, Xin B, Wang H. Trophic effect of bee pollen on small intestine in broiler chickens. J Med Food, 2007;102:276-280
- Watanabe C, Miyata R, Wakayama S, Kumazawa S. New acylated flavonoid isolated from Thai bee pollen using molecular networking analysis and determination of its catechol-O-methyltransferase inhibitory activity. Phytochem Lett, 2023;53:239-244
- Yang S, Wei K, Jia F, Zhao X, Cui G, Guo F, Zhu R. Characterization and biological activity of *Taishan Pinus massoniana* pollen polysaccharide in vitro. PloS One, 2015;10(3):e0115638
- Zhou CM, Yin SJ, Yu ZF, Feng YX, Wei K, Ma WM, Ge LJ, Yan ZG, Zhu RL. Preliminary characterization, antioxidant and hepatoprotective activities of polysaccharides from *Taishan Pinus massoniana* pollen. Molecules, 2018;23:281
- Zuluaga C, Martínez A, Fernández J, López-Baldó J, Quiles A, Rodrigo D. Effect of high pressure processing on carotenoid and phenolic compounds, antioxidant capacity, and microbial counts of bee-pollen paste and bee-pollen-based beverage. Innov Food Sci Emerg Technol, 2016;37:10-17

DERLEME / REVIEW

TÜRKİYE'DE YETİŞTİRİLEN ANA ARILARIN FİZİKSEL KALİTE KRİTERLERİ VE TÜRKİYE ARICILIĞI İÇİN ÖNEMİ

Physical Quality Criteria of Queen Bees Reared in Türkiye and Their Importance for Turkish Beekeeping

Mahir Murat CENGİZ^{1*} Servet ARSLAN²

¹Atatürk Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Erzurum, TÜRKİYE, Yazışma Yazarı / Corresponding author E-posta: mcengiz@atauni.edu.tr, ORCID No: 0000-0002-9844-4229

²Akdeniz Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Organik Tarım Bölümü, Antalya, TÜRKİYE, E-posta: servetarslan@akdeniz.edu.tr, ORCID No: 000-0003-3892-8130

Geliş Tarihi / Received: 07.08.2023

Kabul Tarihi / Accepted: 19.09.2023

DOI: 10.31467/uluaricilik.1339186

ÖZ

Derleme, ana arıların fiziksel kalitesini etkileyen hayati parametreleri incelemektedir. Beslenme, çevre koşulları ve yetiştirme teknikleri gibi faktörlere odaklanan çalışma, bu kriterlerin bal arısı kolonilerinin genel sağlığı ve üretkenliği üzerindeki doğrudan etkisinin altını çiziyor. Gelişmiş koloni performansı ve hastalıklara karşı direnç sağlamak için sağlam ve genetik olarak çeşitli ana arıların seçilmesinin önemini vurgulamaktadır. Ticari işletmelerde yüksek kaliteli ana arıların benimsenmesini teşvik ederek, Türkiye'deki bal arısı popülasyonlarının canlılığını ve sürdürülebilirliğini artırmayı amaçlamaktadır. Bu çalışma sayesinde, Türk arıcılık endüstrisindeki arıcılar ve paydaşlar, ana arı üretiminde fiziksel kalite standartlarına bağlı kalmanın önemine dair önemli bilgiler edinmektedir. Arıcılar önerilen kriterleri uygulayarak bal üretimini artırabilir, tozlaşma hizmetlerini iyileştirebilir ve ülke florasının korunmasına katkıda bulunabilir. Sonuç olarak, bu çabalar Türkiye'de sağlam ve sürdürülebilir bir arıcılık sektörünün büyümesini destekleyecektir.

Anahtar Kelimeler: Bal arısı, Ana arı, Ana arı yetiştirme, Üreme özellikleri, Kalite kriterleri

ABSTRACT

The review, investigates the vital parameters that influence the physical quality of queen bees. Focusing on factors like nutrition, environmental conditions, and breeding techniques, the study underscores the direct impact of these criteria on the overall health and productivity of honeybee colonies. It highlights the importance of selecting robust and genetically diverse queens to ensure improved colony performance and disease resistance. It aims to increase the viability and sustainability of honey bee populations in Türkiye by encouraging the adoption of high-quality queen bees in commercial enterprises. Through this study, beekeepers and stakeholders in the Turkish beekeeping industry gain crucial insights into the importance of adhering to physical quality standards in queen bee production. By implementing the recommended criteria, beekeepers can boost honey production, improve pollination services, and contribute to preserving the country's flora. Ultimately, these efforts will support the growth of Türkiye's robust and sustainable beekeeping sector.

Keywords: Honeybee, Queen bee, Queen rearing, Reproductive features, Quality criteria

DERLEME / REVIEW

EXTENDED ABSTRACT

Purpose: Queen bees are the heart of every honeybee colony, playing a crucial role in ensuring its productivity and sustainability. Queen bee quality is influenced by various factors that can significantly impact the overall health, productivity, and longevity of honeybee colonies. Understanding these factors is essential for beekeepers to ensure the acquisition and maintenance of high-quality queens. The quality of queen bees is affected by genotype, breeding methods, breeding season, feeding, larval age and number of grafted larvae. A queen's quality can be determined by measuring her morphological features and reproductive organs. As the Turkish beekeeping industry continues to grow, the quality of queens becomes an essential factor in maintaining healthy and thriving bee colonies. This review explores the critical quality criteria in queens reared by commercial queen enterprises and their significance for Turkish beekeeping.

Discussion: Queen weight is a physical characteristic critical to evaluating the quality of honeybee queens. The starting weight of egg-laying in queen bees; has a significant effect on the queen acceptance rate, the diameter of spermathecae, the number of spermatozoon in spermatheca and egg laying rate. The size of spermathecae in a queen is also affected by the queen's genetic source and rearing conditions. Queens reared from newly hatched larvae have larger spermathecae. Honey bee queens can mate with 6 to 26 drones, averaging 12-14.

The quality of mating plays a critical role in determining queen bee quality. Queens mated with a diverse range of drones tend to exhibit higher genetic diversity, contributing to stronger colonies with improved disease resistance and adaptability. Adequate access to drone populations and optimal mating conditions are essential for maximizing genetic diversity and enhancing queen quality. Genetic makeup plays a crucial role in determining queen bee quality. The genetic traits inherited by the queen bee can influence her behavior, productivity, disease resistance, and overall performance. Beekeepers should prioritize selecting queens from genetically diverse and healthy stock to enhance the resilience and productivity of their colonies. The longevity of the queen bee/queen bee's longevity is inextricably linked with a sufficient number of viable enough viable stored sperm in the spermatheca. Therefore, insemination success is very important.

Conclusion: Understanding and addressing these factors that affect queen bee quality empower beekeepers to make informed decisions and take proactive measures to ensure the acquisition and maintenance of high-quality queens. By prioritizing genetics, proper queen-rearing practices, mating diversity, nutrition, health, and environmental considerations, beekeepers can contribute to the strength and productivity of their honeybee colonies.

GİRİŞ

Türkiye, uygun iklimi, bitki örtüsü, 8 milyondan fazla bal arısı kolonisi ve 100.000 tonun üzerinde bal üretimi ile dünyada arıcılıkta önde gelen ülkelerden biridir (Tuik 2023). Türkiye'de ana arı ihtiyacı koloni varlığı esas alındığında yaklaşık yıllık dört milyon adet olarak görülmektedir. Türkiye'de Tarım Bakanlığı'ndan ana arı üretim izni almış toplam 526800 adet ana arı üretim kapasitesine sahip 157adet işletme ve diğerleri bu ihtiyacın, en iyimser şartlarda %10-15'ini karşılamaktadırlar (Anonim 2023). Arıcılık faaliyeti içerisinde genç ve kaliteli ana arının önemli bir faktör olarak kabul edildiği modern arıcılıkta, ana arı açığının çok fazla olduğu açıkça görülmektedir. Ana arı üretiminin geriye kalan büyük kısmı ise (doğal oğul ve bölme) doğal yollarla ve kontrolsüz olarak yapılmaktadır. Bu durum ise hem miktar hem de kalite açısından yetersiz ana arı üretimine neden olmaktadır. Ana arı üretiminin nicelik ve nitelik olarak gerekli seviyelere çıkarılması, arıcılık faaliyetinin gelir artışını yüksek düzeyde etkilemekle birlikte ana arı üretim faaliyetine dair yeni bir gelir ve istihdam alanı oluşacaktır.

Koloninin yumurtlama yeteneğine sahip tek bireyi olan ana arı, koloninin hayatta kalmasını sağlamak ve sosyal yapısını korumaktan sorumludur. Kaliteli ana arılar üretmek bal arısı kolonilerinin performansını artırabilir (Cengiz vd. 2019) Koloninin hayatta kalması ana arıya ve onun üreme yeteneğine bağlıdır (Villar vd. 2019; Amiri vd. 2020). Ana arı, hem sosyal hem de genetik nedenlerle koloni içindeki en önemli bireydir. Ana arıların üreme kapasitesinin değerlendirilmesi, koloni verimliliğini etkileyen faktörler hakkında yararlı bilgiler sağlayabilir (De Souza vd. 2019). İşçi arılar, yaşlı, sakat ve performansı düşen ana arıları veya koloni ana arısını herhangi bir nedenle kaybettiğinde yeni ana arılar yetiştirir (Genç ve Cengiz 2019).

Bir ana arının kalitesine etki eden faktörlerden olan üreme organları ve morfolojisi hakkındaki özellikler

DERLEME / REVIEW

ölçülerek belirlenebilir (Tarpy vd. 2011, Gąbka vd. 2014). Bir ana arıyı üreme bakımından üstün kılan fiziksel özellikleri; metabolizma, daha iri ve uzun yumurtalıklar, büyük ve spermatozoonlarla dolu spermateka şeklinde sıralayabiliriz (Tarpy vd. 2000, Arslan vd. 2021). Aşılardan larvaların yaşı arttıkça spermatekanın boyutu, yumurtalıklardaki yumurtalıkların sayısı ve ana arının vücut ağırlığı azalır (Okuyan ve Akyol 2018, Ozbakır 2021). Ayrıca, ana arının çıkış ağırlığı, spermatekanın boyutu ve yumurtalıkların sayısı ile ilişkilidir (Woyke 1971). Fiziksel kalite açısından en iyi ana arı yetiştirme mevsimi nektar ve polenin bol olduğu nektar akım dönemidir (Genç ve Cengiz 2019).

Yeni çıkan ana arıların kalitesi genellikle göğüs genişliği, kanat uzunluğu ve çıkış ağırlığı dahil olmak üzere çeşitli dış morfolojik özelliklerle ölçülür (Delaney vd. 2011, De Souza vd. 2013). Göğüs genişliği, kanat uzunluğu ve çıkış ağırlığı gibi morfolojik ölçümler, çiftleşme başarısı (Tarpy vd. 2011) ve çiftleşme uçuşlarında erkek arılara ana arı çekiciliği ile yüksek oranda ilişkili olan genel vücut yapısını değerlendirmek için uygun verilerdir (Rangel vd. 2016). Ana arının büyüklüğü ve bununla ilişkili fenotipler, neredeyse tamamen larva yetiştirme ortamı, özellikle de larvaların gelişimleri boyunca aldıkları arı sütü diyetine bağlı olarak değişim gösterir (Njeru vd. 2017).

Ana arının damızlık değeri koloni performansına etki etmektedir. Bazı saha araştırmaları, yumurtadan yeni çıkmış larvalardan üretilen ve ergin çıkış ağırlığı 200 mg'dan daha ağır olan yüksek kaliteli ana arıların, yaşlı larvalardan üretilen ve ergin çıkış ağırlığı 180 mg'dan daha hafif olan düşük kaliteli ana arılara göre önemli ölçüde daha büyük koloniler oluşturduğunu göstermiştir. Vücut ağırlığı 200 mg'dan daha fazla olan ana arılar, daha yüksek kuluçka etkinliğine, daha fazla arı ekmeğine ve daha büyük popülasyonlar ile en verimli kolonileri oluşturmuştur (Akyol vd. 2008, De Souza vd. 2013, Rangel vd. 2013).

Ana arının gözden çıkış ağırlığının çiftleşme öncesi süre, ana arı kabul oranı, spermatekadaki spermatozoa sayısı, spermatekanın çapı ve yumurtlama kapasitesi üzerinde önemli bir etkisi vardır (Akyol vd. 2008). Ana arı kalitesini ifade etmek için baş genişliği, göğüs genişliği ve kanat uzunlukları gibi bazı morfolojik özellikler incelenmiştir (Dedej vd. 1998, Gilley vd. 2003).

Ana arıların göğüs genişliği, hem çiftleşme sayısı hem de depolanan sperm sayısı ile pozitif olarak

ilişkili bulunmuştur (Delaney vd. 2011). 0 ve 2 günlük larvalardan yetiştirilen ana arıların morfolojik ve üreme özelliklerinin incelendiği bir çalışmada, iki grup arasında çıkış ağırlığı ve göğüs genişliği açısından fark bulunurken, baş genişliği açısından fark bulunmamıştır (Tarpy vd. 2000). Ana arıların kanat uzunlukları farklı yaşlarda larva transferinden ve ek beslenmeden etkilenmemiştir (Mahbobi vd. 2012).

Ana arılarla ilgili olarak "kalite" terimi, belirli niceliksel fiziksel ve davranışsal karakterleri ifade eder. Genellikle yüksek kaliteli bir ana arının aşağıdaki fiziksel özelliklere sahip olması gerektiğine inanılır: yüksek canlı ağırlık; çok sayıda yumurta tüpü; büyük boyutta spermateka; spermatekada yüksek sayıda spermatozoa; ve hastalık ve zararlılardan arınmış olmak (Hatjina vd. 2014). Bununla birlikte, bir bal arısı kolonisinin performansının, ana arının yanı sıra onunla çiftleşen erkek arıların işlevinin bir sonucu olduğu da bilinmektedir. Bu iki yaklaşım genellikle birlikte ele alınır ve ana arı üretim tekniği ve seçiminin genel bir resmini verir (Amiri vd. 2017).

Ana arılar her bal arısı kolonisinin kalbidir ve üretkenliğini ve sürdürülebilirliğini sağlamada çok önemli bir rol oynar (Genç ve Cengiz 2019). Türkiye arıcılık endüstrisi büyümeye devam ettikçe, ana arıların kalitesi sağlıklı ve gelişen arı kolonilerinin sürdürülmesinde önemli bir faktör haline gelecektir. Bu derlemede, ticari ana arı işletmelerinde yetiştirilen ana arılarda yer alan kilit kalite kriterlerini ve bunların Türkiye arıcılığı için önemini irdelemeyi amaçlamaktadır.

ANA ARIDA FİZİKSEL KALİTE KRİTERLERİ

Ana arılar, bal arısı kolonisinin temel üyeleridir, yumurtlamaktan ve kovanın hayatta kalmasını sağlamaktan sorumludur. Ana arıların fiziksel kalitesini değerlendirmek söz konusu olduğunda, araştırmacılar birkaç özel kriter ararlar. Bu kriterler, ana arının genel sağlığını, üretkenliğini ve üreme potansiyelini gösterebilir. Ana arıları değerlendirmek için kullanılan temel fiziksel kalite kriterlerinden bazıları şunlardır; İyi kalitedeki bir ana arının 200 mg ve üzeri çıkış ağırlığına, çok sayıda yumurta tüpü sayısına ve yaklaşık 1.2 mm çapında spermatekaya sahip olması gerekir. Bunların yanı sıra, ana arının başarılı bir çiftleşme yaparak spermateka kesesinde yeterli miktarda spermatozoa depolaması (5 milyon civarında) ve hastalık ve zararlılardan arı olması gerekir (Hatjina vd. 2014).

FİZİKSEL KALİTE

Ana Arı Ağırlığı ve Vücut Büyüklüğü

Ana arı ağırlığı, ana arı kalitesini değerlendirmek için kritik olan fiziksel bir özelliktir (Kahya vd. 2008, Tarpy vd. 2012). Yaygın olarak kullanılan ölçüler, çiftleşmeden sonraki ağırlık ve yumurtlamanın başlangıcındaki ağırlık olmuştur (Jackson vd. 2011). Çoğu zaman, ana arı çıkış ağırlığı, büyük ölçüde değişen bir ölçü olan ana arı kalitesinin bir göstergesi olarak kullanılır (Akyol vd. 2008). Bu varyasyon, genetik arka plan, transfer edilen larva yaşı, sezon ve koloninin yetiştirme koşulları dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenir (Collins and Pettis 2013). Bir ana arının ağırlığı, yaşamının farklı dönemlerinde değişir (Hatjina vd. 2014).

Çiftleşmemiş ana arılarda canlı ağırlık, ilk 36 saatte en hızlı kayıpla birlikte, çıkıştan çiftleşmeye kadar kademeli olarak azalır. Ağır ana arılarda ise ağırlık kaybı orta ve hafif ana arılardan daha fazladır (Skowronek vd. 2004). Çiftleşmeden sonra, ana arılar ağırlıklarını çıkış sonrası seviyelere geri kazanmaya başlarlar (Harano vd. 2007). Bu beklenen bir durumdur, çünkü çiftleşme uçuşu yeterli kaldırma ve uçuş süresi için daha hafif bir gövde gerektirir, aksi takdirde çiftleşme başarısını azaltabilir (Hayworth vd. 2009). Ana arı çiftleştikten ve yumurtlamaya başladıktan sonra, ana arının yumurtalıkları gelişmeye başlar ve bu da vücut ağırlığının artmasına önemli ölçüde katkıda bulunur (Shehata vd. 1981).

Ana arının ağırlığı, ana arının işçi arılar için çekiciliği, çiftleşme ve üreme başarısı ile önemli bir kriterdir (Delaney vd. 2011). Ayrıca vücut ağırlığı, anasız bir koloniye yeni bir ana arı verildiğinde kabul oranını pozitif yönde etkiler (Moretto vd. 2004). Ana arı ağırlığı, çiftleşme uçuşu sayısı ve genel çiftleşme başarısı arasında pozitif bir ilişki olduğu yönünde bir çok araştırma vardır (Kahya vd. 2008, Delaney vd. 2011, Tarpy vd. 2012). Ana arı çıkış ağırlığı çiftleşme ile ilişkili görünmesede (Kahya vd. 2008), çıkıştaki daha ağır ana arılar, yapay olarak tohumlandıktan sonra daha düşük ağırlığa sahip ana arılara göre yumurtlamayı daha geç başlatma eğilimindedir (Skowronek vd. 2004).

Diğer taraftan, ana arı ağırlığının yumurtalık ağırlığı, yumurta tüpü boyutu ve sayısı, spermatekanın çapı ve depolanan spermatozoa sayısı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Woyke 1971, Tarpy vd. 2011). Ağırlık, boyut ve fizyolojik durumun bütüncü bir ölçüsüdür.

Bu nedenle, canlı ağırlığın ana arı kalitesinin en bilgilendirici göstergesi olduğu kabul edilebilir (Amiri vd. 2017).

Üreme Organları

Yumurtlayan bir ana arıda, yumurtalıklar karın boşluğunun büyük çoğunluğunu işgal eder (Winston, 1987). Yumurtalıkların ağırlığı, ana arıların üreme potansiyelini değerlendirmek için fiziksel kriterlerden biri olarak araştırılmıştır (Kahya vd. 2008; Gregorc ve Škerl 2015). Çiftleşmemiş ana arıların yumurtalıkları morfolojik olarak farklıdır ve yumurtlayan ana arılara göre daha küçüktür (Shehata vd. 1981, Gilley vd. 2003). Yumurta üretimi için iyi gelişmiş yumurtalıklar gerektiğinden, yumurtlayan ana arıların yumurtalıkları çiftleşmemiş ana arıların yumurtalıklarından yaklaşık sekiz kat daha büyüktür (Shehata vd.1981).

Yumurtalık gelişimi, çiftleşmeden hemen sonra meydana gelir ve ana arıda fizyolojik ve davranış değişiklikleri ile ilişkilidir (Richard vd. 2007, Niño vd. 2013). Yumurtlayan bir ana arıda yumurtalıkların ağırlığı, yalnızca yumurta tüpü sayısına değil, aynı zamanda içlerindeki yumurtaların sayısına ve gelişim aşamasına da bağlıdır. Kış aylarında, ana arıların yumurtlama kapasitesi azalır veya durur, bu da ana arının daha küçük ve daha az gelişmiş yumurtalıklara sahip olmasına neden olur (Shehata vd. 1981). Yumurtalık boyutu ve fertilité genellikle pozitif olarak ilişkilidir (Tarpy vd. 2000). Bununla birlikte, belirli koşullar altında, belki de stres veya hastalık nedeniyle, bu ilişki geçerli olmayabilir (Kahya vd. 2008).

Yumurta tüpü sayısı, bir ana arının yaşamı boyunca herhangi bir zamanda değerlendirilebilir, ancak en güvenilir şekilde çiftleşmeden birkaç ay sonra değerlendirilmesidir (Carreck vd. 2013). Yumurta tüpü sayısına ek olarak, bir ana arının yumurtalığının boyutu, ana arının yaşamı boyunca daha esnek olan ve onun fizyolojik durumunu yansıtan yumurtalıkların uzunluğu ile belirlenir. Sol ve sağ yumurtalıklar arasındaki simetri olup olmaması ana arıya veya ırklara göre değişim gösterebilir (Jackson vd. 2011, Hatjina vd. 2014). Ana arı yumurtalığının boyutu ve simetrisi larva beslenmesinden etkilenir ve ana arı üretimi sırasında ana arı hücrelerine aktarılan larvaların yaşı kritik öneme sahiptir (Woyke 1971: Dedej vd. 1998).

Çiftleşmeden sonra spermatozoa, ana arının kalan ömrü boyunca spermatekada saklanır (Winston 1987). Depolanan sperm sayısı ve canlılığı, ana

DERLEME / REVIEW

arının üreme kapasitesinin ve yaşam süresinin iki kritik ölçüsüdür (Al-Lawati vd. 2009). Bu nedenle, spermateka boyutu, fiziksel ana arı kalitesinin başka bir geçerli ölçüsüdür, çünkü daha büyük spermateka daha fazla sperm depolayabilir. Spermateka duvarı, dahili olarak kalın bir müsinöz kütikül ile kaplanmış ve geniş bir trakeal ağ ile kaplanmış tek bir kolumnar epitel tabakasından oluşur (Carreck vd. 2013). Spermateka boyutu trakeal ağ ile veya ağ olmadan ölçülebilir ve yüksek kaliteli ana arılar için çapı 1,2 mm'den büyük olmalıdır (Hatjina vd. 2014).

Bir ana arıdaki spermatekanın boyutu, ana arının yetiştirme koşullarından ve genetik kaynağından da etkilenir ve ana arının başlangıçta larva olarak yetiştirildiği yaşla ters orantılıdır (Tarpy vd. 2000, Tarpy vd. 2012). Yumurtadan çıkmış larvaların transferiyle yetiştirilen ana arıların daha büyük spermateka çapına sahip olduğu bildirilmiştir (Gilley vd. 2003). Bu ölçüm, hacmin doğrudan bir tahmini olarak ve spermateka'da depolanan teorik maksimum spermatozoa sayısının dolaylı bir tahmini olarak kullanılmıştır (Tarpy vd. 2012, Collins ve Pettis 2013). Bununla birlikte, deneysel çalışmalarda spermatekanın nadiren tamamen dolu olduğu gözlenmiştir (Tarpy vd. 2012).

Ana Arının Çiftleşme Sayısı ve Kalitesi

Bal arısı ana arıları hayatlarının çok erken dönemlerinde (1-2 haftalık), erkek arılarla çiftleşmek için bir veya birkaç çiftleşme uçuşuna çıkarlar (Al-Lawati vd. 2009). Çiftleşme genellikle, muhtemelen akrabalı çiftleşmeyi önlemek için kendi arılığındaki kolonilerinden çok daha uzakta olan erkek arı toplanma alanlarında gerçekleşir (Koeniger vd. 2014). Ana arılar, ortalama 12-14 olmak üzere 6 ila 26 arasında değişen erkek arıyla çiftleşebilir (Kraus vd., Delaney vd. 2011).

Bu tür tahminler tipik olarak, alt ailelerin sayısını ve dolayısıyla çiftleştiği erkek arıların sayısını belirlemek için bir ana arının işçi yavrularına uygulanan genetik belirleyici analiz yöntemi kullanılarak elde edilmiştir (Tarpy ve Nielsen 2002, Delaney vd. 2011). Böcekler arasındaki çok eşliliği açıklamak için düzinelerce teori vardır (Boomsma and Ratnieks 1996, Palmer and Oldroyd 2000). Bireysel düzeyde çoklu çiftleşmenin zindelik maliyetleri kesinlikle olsa da (Amiri vd. 2016), çok eşliliğin birkaç karşı dengeleyici faydası mevcuttur. Belki de en önemlisi, çoklu çiftleşme, koloni içindeki genetik çeşitliliği artırarak, koloni içinde yeni biyotik veya abiyotik tehditlere dayanacak genetik

kaynakların var olma olasılığının artmasına yol açar (Rueppell vd. 2008).

Daha spesifik olarak, çoklu çiftleşmenin, depolanan sperm sayısında artış da dahil olmak üzere faydalar sağladığı gösterilmiştir (Delaney vd. 2011). Daha spesifik olarak, ana arının çok sayıda erkek arıyla çiftleşmesi, depolanan sperm sayısında ve ana arı çekiciliğinde artış, koloni içinde gelişmiş iş bölümü, kuluçka sıcaklığının stabilizasyonu, işçi arılar arasında gelişmiş iletişim, azalan hastalık insidansı gibi koloni büyümesini ve hayatta kalmasını olumlu yönde etkileyen faydalar sunduğu gösterilmiştir (Delaney vd. 2011, Carr-Markell vd. 2013).

Çiftleşme sayısının genellikle genetik çeşitlilik için bir yöntem olarak kullanıldığına dikkat edilmelidir. Eğer erkek arıların akrabalık düzeyleri yüksekse veya düşük genetik çeşitlilik sergiliyorsa, ana arı ve koloni için çoklu çiftleşme avantajı ortadan kalkacaktır. Bununla birlikte, genel olarak, artan çiftleşme sayısı ve bunun sonucunda koloni içi genetik çeşitlilik, ana arıların üreme kalitesini belirlemek için bir başka önemli kriterdir (Seeley and Tarpy 2007).

Başarılı çiftleşme, genetik çeşitliliği ve genel koloni performansını sağlamak için çok önemlidir. Ticari işletmeler, ana arıların damızlık değeri yüksek erkek arılarla uygun şekilde çiftleşmesini sağlamalıdır. Çiftleşme alanları üzerinde kontrolü sürdürmek ve akrabalı çiftleşmeyi önlemek, genetik çeşitlilik ve dayanıklı bal arısı kolonileri üretmek için çok önemlidir.

Tohumlama Başarısı

Ana arının uzun ömürlü olması, spermatekada yeterli sayıda canlı depolanmış sperm ile önemli şekilde bağlantılıdır. Çünkü ana arılar genellikle sperm tükenmesinin bir sonucu olarak işçi arı gözlerine döllememiş erkek arı yumurtaları bırakmaya başladıklarında değiştirilirler (Winston, 1987). Sperm depolamanın kritik aşaması, çiftleşmeden hemen sonra bir ana arı, genital sistemindeki yumurta kanallarında ortalama 10–20 µL semen (100 milyon spermatozoa) ile kovana döndüğünde gerçekleşir (Woyke, 1983).

Bu semenin büyük çoğunluğu boşaltılır ve her erkek arının sperminin yalnızca %3-%5'i aktif olarak depolandığı spermateka'ya göç eder (Woyke, 1962). Bir ana arının spermatekasında depolanan tahmini sperm sayısı, üreme kalitesini değerlendirmek için kullanılmaktadır (Delaney vd. 2011). Woyke (1962), üç milyondan az sperm taşıyan ana arıları yetersiz çiftleşmiş olarak değerlendirmesine rağmen, farklı

DERLEME / REVIEW

araştırmalar ticari olarak üretilen ana arıların %13,6-%19,0'ının bu eşiğin altında olduğunu göstermiştir (Camazine vd. 1998, Tarpy vd. 2012). Spermatozoanın canlılığı aynı zamanda çiftleşme ve üreme başarısı için çok önemli bir parametredir ve çiftleşme ve depolama boyunca yüksek seviyede muhafaza edilmelidir (Den Boer vd. 2009). Sperm depolandıktan sonra, sperm hücreleri hareketsiz kalır ve ana arı spermi birkaç yıl boyunca canlı tutmak için onlara spermatekal bezden salgılar sağlar (King vd. 2011). Ticari olarak üretilen ana arılarda sperm canlılığı, ortalama %83,7 ile ana arı üreticileri arasında önemli farklılıklar göstermiştir (Hatch vd. 1999). Genel olarak, daha yaşlı ana arıların spermatekalarında daha yüksek sperm ölümleri gözlenir (Lodesani vd. 2004). Yaşlı ana arıların spermatekalarında depolanan spermatozoanın hareket modelleri bile genç ana arılardan daha yavaştır (Al-Lawati vd. 2009).

Ana arı Sağlığı

Ana arılar işçilere göre enfeksiyonlara karşı daha az duyarlı olduğu bilinmektedir (Rueppell vd. 2016). Ana arılar, onları enfeksiyondan korumak için fiziksel ve sosyal engeller sağlayabilen genç işçi arılar tarafından sürekli olarak bakılır ve beslenir (Amiri vd. 2014). Bu tür sosyal bağışıklık mekanizmalarına ek olarak, ana arılar ayrıca bireysel bağışıklık savunmaları ile doğal olarak daha iyi donatılmış olabilir (Chen vd. 2012).

Bununla birlikte, ana arılar, bir koloninin diğer üyeleri gibi, hem *N. apis* hem de *N. ceranae* tarafından enfekte olabilir (Traver and Fell 2012). Nosema ile enfekte olmuş ana arılar, yumurtlama kapasitelerinde bir düşüş yaşayabilir. Hastalık ilerledikçe, enfeksiyon ana arının üreme sistemini bozarak günde bırakabileceği yumurta sayısında azalmaya yol açar. Yumurtlamadaki bu azalma, işçi arı popülasyonlarının daha yavaş oluşmasına ve potansiyel olarak zayıflamış kolonilere yol açar (Botías vd. 2012).

Varroa nadiren ana arı kuluçkasında görünmesine rağmen, koloninin diğer üyelerinde, ağırlık kaybı, uçuş kabiliyetinde azalma, yaşam süresinin kısalması ve bağışıklığı zayıflatarak koloniyi hastalıklara açık hale getirmekte (Martin vd. 2012) ve dolaylıda olsa ana arıyı besin zinciri yoluyla etkileyebilir Trakeal akar istilasının ana arılarda çiftleşme, hayatta kalma ve ana arıların performansını bozup bozmadığı henüz bilinmemesine rağmen, bu akara karşı oldukça hassas oldukları bilinmektedir (Amiri vd. 2017).

Deforme kanat virüsü (DWV), varroa akarı istilası ile ilişkili, neredeyse her yerde bulunan ve kalıcı bir virüstür. Çiftleşme yoluyla ana arıya geçer (Amiri vd. 2016).

Diğer taraftan, üreme organlarında yüksek bir virüs yoğunluğu, yumurtalık dejenerasyonuna yol açabilir veya muhtemelen depolanmış sperm canlılığını etkileyebilir (Yañez vd. 2012). Bu nedenle, üreme performansında DWV kaynaklı ciddi bir düşüş ana arının değiştirilmesine sebep olabilir. Besin yoluyla geçtiği sanılan tulumusu yavru çürüklüğünün ana arıların yumurtalıklarında tespit edildiği bildirilmiştir (Chen vd. 2012). Yine kronik arı felci işçi arıları etkilediği gibi ana arıyı da etkilemekte hareketlerin yavaşlaması ve bacaklarda titremeye neden olmaktadır (Amiri vd. 2014).

SONUÇ

Ticari ana arı işletmeleri tarafından yetiştirilen ana arıların kalitesi Türkiye'de arıcılık sektörü için büyük önem taşımaktadır. **İşte bazı nedenler;**

- 1. Bal Üretimini artırılması:** Yüksek kaliteli ana arılar, artan bal üretim kapasitesini artıran koloniler oluşturabilir ve bu da arıcılar için bal verimini olumlu yönde etkiler.
- 2. Yerli Genetik Kaynakların Korunması:** Bölge şartlarına yüz yıllardır uyum sağlamış yerli genotipler çevresel streslere ve hastalık salgınlarına karşı daha dirençlidir. Yerli genotipler ile çalışmak koloni kaybı riskini azaltır ve Türkiye arıcılık sektörünün sürdürülebilirliğini artırır. Bu konuda ilgili bakanlığın ticari ana arı üreticileri için yerli üretime yapacağı teşvikler hem yerli genotiplerin kullanımını yaygınlaştıracak, hem de kaçak yollarla ülkeye sokulan farklı genotipten ana arıların önüne geçilmiş olacaktır.
- 3. Polinasyon Hizmetleri:** Güçlü ve üretken koloniler, etkili tozlaşma hizmetlerine önemli ölçüde katkıda bulunur, Türk tarımına fayda sağlar ve ürün verimini artırır.
- 4. Ekonomik Faydalar:** Geliştirilmiş koloni verimliliği ve genel sağlık, Türk arıcıları için ekonomik faydalara dönüşerek arıcılık endüstrisinin büyümesini teşvik eder.

Ticari ana üretim işletmelerine tavsiyelerimiz ise;

1. Ticari ana arı işletmeleri, yetiştirme programlarında genetik çeşitliliğe öncelik vermelidir. Farklı bir genetik havuz, bal arılarının

DERLEME / REVIEW

çeşitli çevresel faktörlere ve hastalıklara karşı uyum sağlama kabiliyetini ve direncini artırır. İşletmeler, arı ürünleri üretimi, sakinlik, hijyenik eğilimleri ve zararlılara ve patojenlere karşı direnç gibi özelliklerin seçilmesine odaklanan iyi planlanmış yetiştirme programlarından yararlanabilirler.

2. Ticari işletmeler tarafından yetiştirilen ana arılar, hastalık ve patojenlerden arınmış olduklarından emin olmak için sıkı bir sağlık taramasından geçmelidir. Amerikan yavru çürüklüğü, Avrupa yavru çürüklüğü ve Varroa akarları gibi hastalıklar arı kolonilerini önemli ölçüde etkileyebilir. Hastalığa dayanıklı ana arılar, ülke arıcılığının sürdürülebilir gelişimi için çok önemli olan, gelişen ve hastalığa dayanıklı arı kolonilerinin oluşturulması için güçlü bir temel sağlar.
3. Bir koloninin kuluçka düzeni, ana arının sağlığının ve üretkenliğinin bir göstergesi olabilir. Elips şeklinde ve boşluksuz bir kapalı yavru düzeni, sağlam ve doğurgan bir ana arıyı gösterir. Ticari işletmelerin, yüksek kaliteli kolonileri sürdürmek için ana arıların yumurtlama performansını izlemesi çok önemlidir. Güçlü yumurtlama yeteneklerine sahip sağlıklı ana arılar, koloninin genel gücüne ve büyümesine katkıda bulunur.
4. Bir ana arının uzun ömürlü olması, koloni üretkenliğinde önemli bir faktördür. İdeal olarak, ana arılar uzun süre etkili bir şekilde yumurtlayabilmelidir. Ayrıca, iyi bir ticari işletme, üretimde kritik kontrol noktalarını oluşturarak ana arılar izlemelidir.

Ticari ana üretim işletmeleri konusunda Bakanlığa öneriler ise;

1. **Kayıt ve Ruhsatlandırma:** Ticari ana arı yetiştirme işletmelerinin kayıt ve ruhsatlandırılması denetlenmeli. Bu işletmelerin ilgili yasa, yönetmelik ve standartlara uyması sağlanmalıdır. Damızlık ana arı üretimi ülkemiz arıcılığının ihtiyacına cevap verecek şekilde teşvik edilmeli ve uygulanabilir belli esaslara bağlanmalıdır.
2. **Kalite Kontrol ve Standartlar:** Ana arı arılar ve ilgili ürünler için kalite standartlarını oluşturulmalı ve sıkı bir şekilde uygulanmalı. Bu standartlara uygunluğun sağlanması için zaman zaman denetimler yapılmalı standartlara uygun olmayan işletmeler ifşa edilmelidir.
3. **Araştırma ve Geliştirme:** Ana arı yetiştiriciliği ve yetiştirme teknikleriyle ilgili araştırma ve geliştirme çalışmalarına öncelik verilmeli. Yerli

ırklarda verime yönelik ıslah çalışmaları süratle desteklenmelidir. Aksi takdirde yerli ırklarımızın ıslah edilmiş ırklara karşı tercih şansları her geçen gün azalmaktadır. Diğer taraftan, ana arı arı üretiminin kalitesini ve verimliliğini artırmak için sektörde yenilikler teşvik edilmelidir. Sektörde üretim işletmelerinde alınan arı örnekleri moleküler genetik testlere tabi tutularak genotipler için sonuçları istenen seviyede olan işletmelere teşvik ödemesi yapılmalıdır.

4. **Hastalık Kontrolü ve Biyogüvenlik:** Ana arı üretim kolonilerinde hastalık ve zararlıların yayılmasını önleyici tedbirlerin uygulanmalı. Bunun için kolonilerden arı, bal, bal mumu örneği alınarak akredite olmuş laboratuvarlarda hastalık ve parazit testleri yapılmalıdır. Önemli arı hastalık ve parazitlerine karşı devlet mücadelesi uygulanmalı; koloni imhasını gerektirecek durumlar için arıcıya tazminat ödenmelidir. Hastalık salgınları veya biyogüvenlik tehditleri yakından izlenmeli ve gereken önlemler alınmalıdır. Kaçak yollardan ülkeye girmiş ana arılarla üretim yapan işletmelere idari cezalar uygulanmalıdır.
5. **Veri Toplama ve Raporlama:** Ana arı üretimi, satışları ve pazar eğilimlerine ilişkin verileri toplamalı. Gerek damızlıklar gerekse kulanma melezlemesi ana arılar için genotipin ismi ve niteliğini belirten kimlik kartları düzenlenmeli; satışları mutlaka fatura karşılığında yapılmalıdır. Bakanlık zaman zaman ana arı endüstrisinin sağlığı ve durumu hakkında hükümet yetkililerine ve paydaşlara rapor sunmalıdır.
6. **Çatışma çözümü:** Ana arı yetiştirme endüstrisindeki anlaşmazlıklara ve çatışmalara aracılık etmeli. Ana arı ürünleriyle ilgili tüketici şikayetleri veya endişeleri ele alınarak ilgili işletmeler şikayetler konusunda uyarılmalıdır.
7. **Çevresel sürdürülebilirlik:** Ülke genelinde ağaçlandırma faaliyetlerinde arıcılıkta önem taşıyan orman ağaçlarının plantasyonuna öncelik verilebilir. Bakanlık tarafından ana arı yetiştiriciliğinde doğal çiftleştirme ve kimyasal kullanımının azaltılması gibi sürdürülebilir uygulamaları teşvik edilebilir. Yine, bal arısı sağlığını desteklemek için habitatın korunmasını ve pestisitlerin azaltılması teşvik edilebilir.
8. **İşbirliği ve Koordinasyon:** Ticari ana arı yetiştirme işletmeleri için destekleyici bir ortam geliştirmek amacıyla diğer devlet kurumları, araştırma kurumları ve sektör dernekleriyle işbirliği yapılmalı. Sektördeki zorlukları ve fırsatları

DERLEME / REVIEW

ele almak için ilgili paydaşlarla koordinasyon sağlamalıdır.

9. Acil müdahale: Ana arı endüstrisini etkileyebilecek hastalık salgınları veya doğal afetler gibi acil durumlara müdahale etmek için acil durum planları ve protokolleri geliştirmelidir.

10. Politika Geliştirme: Ticari ana arı yetiştirme sektörünün sürdürülebilir büyümesini destekleyecek politika ve düzenlemeleri formüle etmeli. Mevcut politikaların gözden geçirilmesi ve gerektiğinde güncellenmesini yapmalıdır.

Sonuç olarak, ticari ana arı işletmelerinde yetiştirilen ana arılarda kalite kriterleri Türkiye arıcılığının başarısı ve büyümesi için çok önemlidir. Ticari işletmeler, genetik çeşitliliğe, koloni sağlığına, yumurtlama performansına, çiftleşme başarısına ve uzun ömürlülüğe öncelik vererek, güçlü ve dayanıklı bal arısı kolonileri oluşturmak için çok önemli olan yüksek kaliteli ana arıları üretebilirler. Ülke arıcıları, arılıklarının geleceğini ve ülkedeki daha geniş arıcılık endüstrisini güvence altına almak için birinci sınıf kaliteli ana arılara yatırım yapmanın önemini anlamalıdır.

Çıkar Çatışması: Yazarların çalışma ile ilgili olarak bir çıkar çatışması yoktur.

Etik Belgesi: Bu çalışma için etik belgesi gerekmemektedir.

Mali Kaynak: Bu çalışmada herhangi bir mali kaynak kullanılmamıştır.

Veri Sağlama Durumu: Çalışmada bulunan bilgi ve veriler akademik etik kurallarına uygun bir şekilde verilmiştir. Derleme bir çalışma olduğu için kullanılan veriler literatüre atıf yapılarak kullanılmıştır.

Yazar Katkıları: Bu çalışmanın gerçekleştirilmesine yazarlar eşit olarak katkı sağlamıştır.

KAYNAKLAR

Akyol E, Yeninar H, Kaftanoğlu O. Live weight of queen honey bees (*Apis mellifera* L.) predicts reproductive characteristics. J. Kans. Entomol. Soc, 2008;81(2):92-100. DOI: 10.2317/JKES-705.13.1

Al-Lawati H, Kamp G, Bienefeld K. Characteristics of the spermathecal contents of old and young honeybee queens. J. Insect Physiol., 2009;55(2):117-122. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2008.10.010

Amiri E, Meixner M, Büchler R, Kryger P. Chronic bee paralysis virus in honeybee queens: Evaluating susceptibility and infection routes. Viruses 2014;6:1188–1201. DOI:10.3390/v6031188

Amiri E, Meixner MD, Kryger P. Deformed wing virus can be transmitted during natural mating in honey bees and infect the queens. Sci. Rep., 2016;6(1):33065. DOI:1038/srep33065

Amiri E, Strand MK, Rueppell O, Tarpay DR. Queen quality and the impact of honey bee diseases on queen health: potential for interactions between two major threats to colony health. Insects, 2017;8(2):48. DOI:10.3390/insects8020048

Amiri E, Strand MK, Tarpay DR, Rueppell O. Honey bee queens and virus infections. Viruses, 2020;12(3):322. DOI:10.3390/v12030322

Anonymous, Türkiye Tarım ve Orman Bakanlığı verileri. www.tarimorman.gov.tr/Konular/Hayvancilik/Arıcılık, 2023

Arslan S, Cengiz MM, Gül A, Sayed S. Evaluation of the standards compliance of the queen bees reared in the Mediterranean region in Turkey. Saudi J. Biol. Sci. 2021;28(5):2686-2691. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.03.009

Boomsma JJ, Ratnieks FL. Paternity in eusocial Hymenoptera. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. 1996;351(1342):947-975. DOI:10.1098/rstb.1996.0087

Botías C, Martín-Hernández R, Días J, García-Palencia P, Matabuena M, Juarranz Á, Barrios L, Meana A, Nanetti A, Higes M. The effect of induced queen replacement on *Nosema* spp. infection in honey bee (*Apis mellifera iberiensis*) colonies. Environ. Microbiol. 2012;14:845–859. DOI:10.1111/j.1462-2920.2011.02647.x

Camazine S, Cakmak I, Cramp K, Finley J, Fisher J, Frazier M, Roza A. How healthy are commercially-produced US honey bee queens? Am. Bee J. 1998;138(9) 677-680

Carreck NL, Andree M Brent CS, Cox-Foster D, Dade HA, Ellis JD, Hatjina F, vanEnglesdorp D. Standard methods for *Apis mellifera* anatomy and dissection. J. Apic. Res. 2013;52:1–40. DOI:10.3896/IBRA.1.52.4.03

DERLEME / REVIEW

- Carr-Markell MK, McDonald KM, Mattila HR. Intracolony genetic diversity increases chemical signaling by waggle-dancing honey bees, *Apis mellifera*. *Insectes Soc.* 2013;60:485-496. DOI:10.1007/s00040-013-0315-5
- Cengiz M, Yazici K, Arslan S. The effect of the supplemental feeding of queen rearing colonies on the reproductive characteristics of queen bees (*Apis mellifera* L.) Reared from egg and different old of larvae. *Kafkas Univ. Vet. Fak.* 2019;25(6):849-855
- Chen X, Hu Y, Zheng H, Cao L, Niu D, Yu D, Sun Y, Hu S, Hu F. Transcriptome comparison between honey bee queen- and worker-destined larvae. *Insect Biochem. Mol.* 2012;42:665–673. DOI: 10.1016/j.ibmb.2012.05.004.
- Collins AM, Pettis JS. Correlation of queen size and spermathecal contents and effects of miticide exposure during development. *Apidologie*, 2013;44:351-356. DOI:10.1007/s13592-012-0186-1
- De Souza DA, Bezzera-Laure M, Franco T, Gonçalves L. Experimental evaluation of the reproductive quality of Africanized queen bees (*Apis mellifera*) on the basis of body weight at emergence. *Genet. Mol. Res.* 2013;12(4):5382-5391. DOI: 10.4238/2013.November.7.13
- De Souza DA, Huang MH, Tarpy DR. Experimental improvement of honey bee (*Apis mellifera*) queen quality through nutritional and hormonal supplementation. *Apidologie*, 2019;50:14-27. DOI: 10.1007/s13592-018-0614-y
- Dedej S, Hartfelder K, Aumeier P, Rosenkranz P, Engels W. Caste determination is a sequential process: effect of larval age at grafting on ovariole number, hind leg size and cephalic volatiles in the honey bee (*Apis mellifera carnica*). *J. Apic. Res.* 1998;37(3):183-190. DOI:10.1080/00218839.1998.11100970
- Delaney DA, Keller JJ, Caren JR, Tarpy DR. The physical, insemination, and reproductive quality of honey bee queens (*Apis mellifera* L.). *Apidologie*, 2011;42:1-13. DOI: 10.1051/apido/2010027
- Den Boer SPA, Boomsma JJ, Baer B. Honey bee males and queens use glandular secretions to enhance sperm viability before and after storage. *J. Insect Physiol.* 2009;55:538–543. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2009.01.012
- Gaþka J, Zajdel B, Skorupka M, Ostaszewska T, Kamaszewski M. Effect of honey flow on acceptance of bee eggs at different age in rearing colonies. *Med. Weter.* 2014;70(12):760
- Genç F, Cengiz MM. *Bal Arısı (Apis mellifera L.) Anatomisi, Genetik ve Islahı ile Ana Arı Yetiştiriciliği*. Gece Kitaplığı, Ankara. 2019, ISBN: 978-605-288-857-5. s 203
- Gilley DC, Tarpy DR, Land BB. Effect of queen quality on interactions between workers and dueling queens in honeybee (*Apis mellifera* L.) colonies. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2003;55:190-196. DOI 10.1007/s00265-003-0708-y
- Gregorc A, Škerl M. Characteristics of honey bee (*Apis mellifera carnica*, Pollman 1879) queens reared in Slovenian commercial breeding stations. *J. Apic. Sci.* 2015;59(2):5-12. DOI:10.1515/jas-2015-0016
- Harano KI, Sasaki M, Sasaki K. Effects of reproductive state on rhythmicity, locomotor activity and body weight in European honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera, Apini) queens. *Sociobiology*, 2007;50(1):189-200
- Hatch S, Tarpy RD, Fletcher C. Worker regulation of emergency queen rearing in honey bee colonies and the resultant variation in queen quality. *Insect Soc.* 1999;46:372–377. DOI:10.1007/s000400050159
- Hatjina F, Bienkowska M, Charistos L, Chlebo R, Costa C, Drazđić MM, Wilde J. A review of methods used in some European countries for assessing the quality of honey bee queens through their physical characters and the performance of their colonies. *J. Apic. Res.* 2014;53:337–363. DOI: 10.3896/IBRA.1.53.3.02
- Hayworth MK, Johnson NG, Wilhelm ME, Gove RP, Metheny JD, Rueppell O. Added weights lead to reduced flight behavior and mating success in polyandrous honey bee queens (*Apis*

DERLEME / REVIEW

- mellifera*). Ethology, 2009;115(7):698-706. DOI:10.1111/j.1439-0310.2009.01655.x
- Jackson TJ, Tarpy RD, Fahrbach ES. Histological estimates of ovariole number in honey bee queens, *Apis mellifera*, reveal lack of correlation with other queen quality measures. J. Insect Sci. 2011;11:1–11. DOI: /10.1673/031.011.8201
- Kahya Y, Gençer HV, Woyke J. Weight at emergence of honey bee (*Apis mellifera caucasica*) queens and its effect on live weights at the pre and post mating periods. J. Apic. Res. 2008;47(2):118-125. DOI:10.1080/00218839.200
- King M, Eubel H, Millar AH, Baer B. Proteins within the seminal fluid are crucial to keep sperm viable in the honeybee *Apis mellifera*. J. Insect Physiol. 2011;57:409–414. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2010.12.011
- Koeniger G, Koeniger N, Ellis J, Connor LJ. Mating Biology of Honey Bees (*Apis mellifera*); Wicwas Press: Kalamazoo, MI, USA, 2014
- Kraus FB, Neumann P, Moritz R. Genetic variance of mating frequency in the honeybee (*Apis mellifera* L.). Insectes Soc. 2005;52:1-5. DOI:10.1007/s00040-004-0766-9
- Lodesani M, Balduzzi D, Galli A. A study on spermatozoa viability over time in honey bee (*Apis mellifera ligustica*) queen spermathecae. J. Apic. Res. 2004;43(1):27-28. DOI: 10.1080/00218839.2004.11101105
- Mahbobi A, Farshineh-Adl M, Woyke J, Abbasi S. Effects of the Age of Grafted Larvae and the Effects of Supplemental Feeding on Some Morphological Characteristics of Iranian Queen Honey Bees (Skorikov, 1929). J. Apic. Sci. 2012;56(1):93-98. DOI:10.2478/v10289-012-0010-1
- Martin SJ, Highfield AC, Brettell L, Villalobos EM, Budge GE, Powell M, Nikaido S, Schroeder DC. Global honey bee viral landscape altered by a parasitic mite. Science, 2012;336:1304–1306. DOI: DOI: 10.1126/science.1220941
- Moretto G, Guerra J, Kalvelage H, Espindola E. Maternal influence on the acceptance of virgin queens introduced into Africanized honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Genet. Mol. Res. 2004;3(3):441-445
- Niño EL, Tarpy DR, Grozinger CM. Differential effects of insemination volume and substance on reproductive changes in honey bee queens (*Apis mellifera* L.). Insect Mol. Biol. 2013;22(3):233-244. DOI: 10.1111/imb.12016
- Njeru LK, Raina SK, Kutima HL, Salifu D, Cham DT, Kimani J, Muli EM. Effect of larval age and supplemental feeding on morphometrics and oviposition in honey bee *Apis mellifera scutellata* queens. J. Apic. Res. 2017;56(3):183-189. DOI:10.1080/00218839.2017.1307714
- Okuyan S, Akyol E. The effects of age and number of grafted larvae on some physical characteristics of queen bees and acceptance rate of queen bee cell. TURJAF. 2018;6(11):1556-1561. DOI:10.24925/turjaf.v6i11.1556-1561.1955
- Ozbakir GO. Effects of rearing method on some morphological and reproductive organ characteristics of queen honey bees (*Apis mellifera* L.). Med. Water, 2021;77(2):89-94. DOI: dx.doi.org/10.21521/mw.6496
- Palmer KA, Oldroyd BP. Evolution of multiple mating in the genus *Apis*. Apidologie, 2000;31(2):235-248. DOI:10.1051/apido:2000119
- Rangel J, Keller JJ, Tarpy DR. The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth. Insect. Soc. 2013;60:65–73. DOI:10.1007/s00040-012-0267-1
- Rangel J, Böröczky K, Schal C, Tarpy DR. Honey bee (*Apis mellifera*) queen reproductive potential affects queen mandibular gland pheromone composition and worker retinue response. PLoS One, 2016;11(6):e0156027. DOI:10.1371/journal.pone.0156027
- Richard FJ, Tarpy DR, Grozinger CM. Effects of insemination quantity on honey bee queen physiology. PloS One, 2007;2(10):e980. DOI:10.1371/journal.pone.0000980
- Rueppell O, Aumer D, Moritz RF. Ties between ageing plasticity and reproductive physiology in honey bees (*Apis mellifera*) reveal a positive relation between fecundity and

DERLEME / REVIEW

- longevity as consequence of advanced social evolution. *Curr. Opin. Insect Sci.* 2016;16:64-68. DOI:10.1016/j.cois.2016.05.009
- Rueppell O, Johnson N, Rychtář J. Variance-based selection may explain general mating patterns in social insects. *Biol. Lett.* 2008;4:270–273. DOI:10.1098/rsbl.2008.0065
- Seeley TD, Tarpy DR. Queen promiscuity lowers disease within honeybee colonies. *Proc. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2007;274(1606):67-72. DOI: doi.org/10.1098/rspb.2006.3702
- Shehata SM, Townsend GF, Shuel RW. Seasonal physiological changes in queen and worker honeybees. *J. Apic. Res.* 1981;20(2):69-78. DOI:10.1080/00218839.1981.11100475
- Skowronek W, Bieńkowska M, Kruk C. Changes in body weight of honey bee queens during their maturation. *J. Apic. Sci.* 2004;48(2):61-68
- Tarpy DR, Nielsen D. Sampling error, effective paternity, and estimating the genetic structure of honey bee colonies (*Hymenoptera: Apidae*). *Ann. Entomol. Soc.* 2002;95(4):513-528. DOI:10.1603/0013-8746(2002)095[0513: SEEPAE]2.0.CO;2
- Tarpy DR, Hatch S, Fletcher DJ. The influence of queen age and quality during queen replacement in honeybee colonies. *Anim. Behav.* 2000;59(1):97-101. DOI:10.1006/anbe.1999.1311
- Tarpy DR, Keller JJ, Caren JR, Delaney DA. Experimentally induced variation in the physical reproductive potential and mating success in honey bee queens. *Insectes Soc.* 2011;58:569-574. DOI:10.1007/s00040-011-0180-z
- Tarpy DR, Keller JJ, Caren JR, Delaney DA. Assessing the mating 'health' of commercial honey bee queens. *J. Econ. Entomol.* 2012;105(1):20-25. DOI: 10.1603/EC11276
- Traver BE, Fell RD. Low natural levels of *Nosema ceranae* in *Apis mellifera* queens. *J. Invertebr. Pathol.* 2012;110:408–410. DOI:10.1016/j.jip.2012.04.001
- Villar G, Hefetz A, Grozinger CM. Evaluating the effect of honey bee (*Apis mellifera*) queen reproductive state on pheromone-mediated interactions with male drone bees. *J. Chem. Ecol.* 2019;45:588-597. doi.org/10.1007/s10886-019-01086-0
- Winston ML. *The Biology of the Honey Bee*; Harvard University Press: London, UK, 1987
- Woyke J. Natural and artificial insemination of queen honeybees. *Bee World*, 1962;43(1):21-25. DOI:10.1080/0005772X.1962.11096922
- Woyke J. Correlations between the age at which honeybee brood was grafted, characteristics of the resultant queens, and results of insemination. *J. Apic. Res.* 1971;10(1):45-55. DOI: 10.1080/00218839.1971.11099669
- Woyke J. Dynamics of entry of spermatozoa into the spermatheca of instrumentally inseminated queen honeybees. *J. Apic. Res.* 1983;22(3):150-154. DOI: 10.1080/00218839.1983.11100579
- Yañez O, Jaffé R, Jarosch A, Fries I, Moritz R, Paxton R, Miranda J. Deformed wing virus and drone mating flights in the honey bee (*Apis mellifera*): Implications for sexual transmission of a major honey bee virus. *Apidologie*, 2012;43:17–30. DOI:10.1007/s13592-011-0088-7