



**Önceki Adı / Formerly**  
**Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**  
**Journal of the Faculty of Agriculture**



# Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi

Harran Journal of Agricultural and Food Science

## Yayınlayan (Publisher)

Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi

## Sahibi (Owner)

Prof. Dr. Ahmet YILMAZ

## Dekan (Dean)

## Baş Editör (Editor in Chief)

Prof. Dr. İbrahim BOLAT

Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Şanlıurfa

## Yayın Sekreteri (Publication Secretary)

Doç. Dr. Mehmet MAMAY

## Editörler Kurulu (Editorial Board)

Prof. Dr. İbrahim BOLAT

Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Şanlıurfa

Prof. Dr. David HIGGS

University of Hertfordshire, Hatfield, UK

Prof. Dr. Muhammad ASHRAF

University of Agriculture Faisalabad, Pakistan

Prof. Dr. Bernardo Murillo AMADOR

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, Mexican

Prof. Dr. Levent SON

Mersin Üniversitesi, Silifke Uygulamalı Teknoloji ve İşletmecilik Yüksekokulu, Mersin

Prof. Dr. Levent ÜNLÜ

Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Konya

Prof. Dr. Mustafa BAYRAM

Gaziantep Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Gaziantep

Prof. Dr. Saliha KIRICI

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Adana

Prof. Dr. Hikmet GÜNAL

Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Şanlıurfa

Prof. Dr. Sabri YURTSEVEN  
Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü, Şanlıurfa

Doç. Dr. Önder KAMILOĞLU  
Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Hatay

Doç. Dr. Mehmet MAMAY  
Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Şanlıurfa

Doç. Dr. Ali YILDIRIM  
Harran Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Şanlıurfa

Doç. Dr. Gökhan İsmail TUYLU  
Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü, Şanlıurfa

Doç. Dr. Ayşe Gülgün ÖKTEM  
Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Şanlıurfa

Doç. Dr. Ferhat KÜP  
Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Makinaları ve Teknolojileri Bölümü, Şanlıurfa

Dr. Öğr. Üyesi Remziye ÖZEL  
Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Ekonomisi Bölümü, Şanlıurfa

**Yabancı Dil Editörleri**  
**(Foreign Language Editors)**

Dr. Öğr. Üyesi Shahid FAROOQ  
Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü

Cilt (Volume): 28  
Sayı (Issue): 2  
Yıl (Year): 2024

**Danışma Kurulu**  
(Advisory Board)

**Prof. Dr. Hsin CHI**

National Chung Hsing University, Taiwan, Republic of China

**Assoc. Prof. Dr. Oleksiy Derkach**

Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic Univ., Faculty of Engineering and Tech., Ukraine

**Assoc. Prof. Dr. Roman Rolbiecki**

University of Tech. and Life Sciences in Bydgoszcz, Faculty of Agriculture and Biotech., Poland

**Prof. Dr. Abdalbaki BİLGİÇ**

Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Ekonomisi Bölümü

**Prof. Dr. Ayten NAMLI**

Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü

**Prof. Dr. Erhan AKKUZU**

Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü

**Prof. Dr. Geza HRAZDINA**

Cornell Univ., Collage of Agriculture and Life Sciences, Department of Food Science, USA

**Prof. Dr. Ladine BAYKAL ÇELİK**

Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü

**Dr. Jens D. BERGER**

The University of Western Australia, Ecophysiological, Australia

**Dr. Muhammed Nasir ROFIQ**

Agency for The Assessment and Application of Technology (BPPT), Jakarta, Indonesia

**Mizanpaj Editörleri**

Arş. Gör. Dr. Ali SARIOĞLU

Arş. Gör. Dr. Sabri AKIN

**Yazışma Adresi**

Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, 63040 Şanlıurfa

**Tel:** +90 (414) 318 3474 **Fax:** +90 (414) 318 3682

**e-posta:** ziraatdergi@harran.edu.tr

**Yayın Tarihi:** 21.06.2024

**Yılda dört kez yayınlanır**

Yayınlara erişim adresi: <http://dergipark.org.tr/harranziraat>

Yıl/year: 2024

Cilt/volume: 28

Sayı/number: 2

**Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi**  
Hakemli Olarak Yayınlanmaktadır

**Bu Sayıya Katkıda Bulunan Hakemler**  
(Alfabetik Sıraya Göre Yazılmıştır)

Prof. Dr. Ali Musa BOZDOĞAN  
Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarım Makineleri ve Teknolojileri  
Mühendisliği Bölümü

Prof. Dr. Aysun PEKŞEN  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

Prof. Dr. Ercan Ceyhan  
Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü

Prof. Dr. Fatih Kılıç  
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü

Prof. Dr. Hakan Çelik  
Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü

Prof. Dr. Hatice BOZOĞLU  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü

Prof. Dr. Hüseyin BOZKURT  
Gaziantep Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Prof. Dr. İbrahim Abdulhey HAYOĞLU  
Harran Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Prof. Dr. Mehmet Mert  
Hatay Mutafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü

Prof. Dr. Nabi Alper KUMRAL  
Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Prof. Dr. Onur KOLÖREN  
Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Prof. Dr. Osman GÖKDOĞAN  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Tarım Makineleri ve Teknolojileri  
Mühendisliği Bölümü

Prof. Dr. Recep AY  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Prof. Dr. Sibel UYGUR  
Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Prof. Dr. Sibel YAĞCI  
Balıkesir Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Prof. Dr. Yeşim AYSAN  
Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Doç. Dr. Atilla ŞİMŞEK  
Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Doç. Dr. Ayşe Nur YÜKSEL  
Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi Turizm Fakültesi Gastronomi ve Mutfak Sanatları  
Bölümü

Doç. Dr. Ayşe Nur YÜKSEL  
Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi Turizm Fakültesi Gastronomi ve Mutfak Sanatları  
Bölümü

Doç. Dr. Emrah KUŞ  
İğdır üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Biyosistem Mühendisliği Bölümü

Doç. Dr. Gökhan BAKTEMUR  
Sivas Bilim ve Teknoloji Üniversitesi Tarım Bilimleri ve Teknoloji Fakültesi Tarla  
Bitkileri Bölümü

Doç. Dr. Gülşah ÇALIŞKAN KOÇ  
Uşak Üniversitesi Eşme Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü Gıda Teknolojisi Pr.

Doç. Dr. Hilal SUSURLUK  
Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Doç. Dr. Mehmet DUMAN  
Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü  
Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü

Doç. Dr. Mustafa MİRİK  
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Doç. Dr. Ramazan GÜRBÜZ  
İğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Abdurrahman Sami KOCA  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Sabri ÜNSAL  
Harran Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Gaye Köse DEMİREL  
Karadeniz Teknik Üniversitesi Orman Fakültesi Orman Endüstri Mühendisliği Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Gülten ŞEKEROĞLU  
Gaziantep Üniversitesi Naci Topçuoğlu M.Y.O. Gıda İşleme

Dr. Öğr. Üyesi Hatice KAVUNCUOĞLU  
Düzce Üniversitesi Akçakoca Turizm İşletmeciliği ve Otelcilik Yüksekokulu  
Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Hicran UZUN KARKA  
Gaziantep Üniversitesi Naci Topçuoğlu Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme

Dr. Öğr. Üyesi Leyla Nesrin KAHYAOĞLU  
Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Mine ERDEM BÜYÜKKİRAZ  
Kapadokya Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Yüksekokulu, Gastronomi ve Mutfak  
Sanatları Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa YAŞAR  
Muş Alparslan Üniversitesi, Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Bitkisel Üretim ve  
Teknolojileri Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Şükran OĞUZOĞLU  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Orman Fakültesi Orman Mühendisliği Bölümü

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba DEDEBAŞ  
Afyon Kocatepe Üniversitesi Bolvadin Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü Gıda  
Teknolojisi Pr.

Dr. Öğretim Üyesi Emel ATMACA  
Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü

Dr. Öğretim Üyesi Fatma GÖKMEN  
Yılmaz Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü

Dr. Zeynep Tuğba ÖZASLAN  
Gaziantep Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Araş. Gör. Dr. Naciye ÜNVER  
Harran Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Dr. Selahattin Aygün  
Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü

İçindekiler / Contents

Araştırma Makaleleri / Research Articles

|   |                |
|---|----------------|
| <b>Isolation and identification of <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>, cotton bacterial blight disease agent and determination of the antibacterial activity of various plant essential oils</b><br><i>Pamuk bakteriyel yanıklık etmeni Xanthomonas citri subsp. malvacearum'un izolasyonu, tanılanması ve farklı bitki uçucu yağlarının antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi</i><br>Soner SOYLU, Merve KARA, Yusuf GÜMÜŞ, Emine Mine SOYLU | <b>180-191</b> |
| <b>New Approaches to the control of <i>Neodiprion sertifer</i> (Geoffroy, 1785) (Hymenoptera: Diprionidae)</b><br><i>Neodiprion sertifer (Geoffroy, 1785) (Hymenoptera: Diprionidae)'in mücadelesinde yeni yaklaşımlar</i><br>Hilal TUNCA COSIC, Damla ÇAYCI  | <b>192-200</b> |
| <b><i>Tetranychus urticae</i> Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae)'de pyridaben direnç oranı ve esterez, GST ve P450 monooksijenaz enzim ilişkileri</b><br><i>Relationships between pyridaben resistance ratio and esterase, GST and P450 monooxygenase enzyme in Tetranychus urticae Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae)</i><br>Gizem BERBER TORTOP, Sibel YORULMAZ   | <b>201-208</b> |
| <b>Weeds in the cotton growing areas in the Southeastern Anatolia Region</b><br><i>Güneydoğu Anadolu Bölgesi pamuk ekim alanlarında bulunan yabancı otlar</i><br>İslam Emrah SÜER, Nihat TURSUN   | <b>209-221</b> |
| <b>Does weed infestation alter the population density of harmful leafhopper species in second crop maize?</b><br><i>Yabancı otlar ikinci ürün mısırdaki zararlı yaprakpiresi türlerinin popülasyon yoğunluğunu değiştirir mi?</i><br>Emine Kaplan Yavuz, Hasan Tunaz, Çetin Mutlu   | <b>222-234</b> |
| <b>Effects of cultivation substrate composition on biological productivity and quality parameters of <i>Ganoderma lucidum</i></b><br><i>Yetiştirme substratı kompozisyonunun Ganoderma lucidum'un biyolojik verimliliği ve kalite parametreleri üzerine etkileri</i><br>Gülsüm İNCE, Mustafa Kemal SOYLU, Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU  | <b>235-247</b> |
| <b>Effect of Some Additional Ingredients on Quality and Sensorial Characteristics of Spreadable Carob Molasses</b>  | <b>248-257</b> |



|   |         |
|---|---------|
| <i>Bazı İlave Bileşenlerin Sürülebilir Keçiboynuzu Pekmezinin Kalite ve Duyusal Özelliklerine Etkisi</i><br>Mehmet Durdu Öner, Muhittin Durusoy, Manolya Eser Öner  |         |
| <b>The influence of anti-caking agents on powder flow properties of ready-to-drink coffee during storage</b><br><i>Topaklanma önleyici maddelerin içime hazır kahvenin depolama sırasında toz akış özelliklerine etkisi</i><br>Duygu ASLAN TÜRKER, Meryem GÖKSEL SARAÇ, Mahmut DOĞAN  | 258-266 |
| <b>Physicochemical and sensory properties of vegetarian pasta produced with pea (<i>Pisum sativum</i>) protein powder</b><br><i>Bezelye (<i>Pisum sativum</i>) protein tozu ile üretilen vejetaryen makarnanın fizikokimyasal ve duyuşsal özellikleri</i><br>Sena Nur DOĞAN, İlkey YILMAZ   | 267-279 |
| <b>Aljinat bazı hidrojelde enkapsüle edilmiş nar ekşisi antosiyaninlerinin fizikokimyasal özellikleri</b><br><i>Physicochemical properties of pomegranate sour anthocyanins encapsulated with alginate based hydrogel</i><br>Elif AYKIN DİNÇER, Cüneyt DİNÇER, Osman Kadir TOPUZ  | 280-292 |
| <b>Horoz Karası (<i>Vitis vinifera</i> L) kuru üzüm ve üzüm çekirdeği metanol ekstraktlarının antioksidan özellikleri ile fenolik bileşikleri</b><br><i>Antioxidant properties and phenolic compounds of methanol extracts of raisin and grape seed of Horoz Karası (<i>Vitis vinifera</i> L)</i><br>Gülcan KOYUNCU, Filiz UÇAN TÜRKMEN   | 293-303 |
| <b>Donmuş muhafaza edilen pişmiş sığır köftelerinde doğal antioksidan olarak kıvılcık (<i>Cornus mas</i>) ekstraktının kullanımı</b><br><i>The use of cornelian cherry (<i>Cornus mas</i>) extract as natural antioxidant in cooked beef patties during frozen storage</i><br>Şeyma ELGİN, Orhan ÖZÜNLÜ, Haluk ERGEZER  | 304-320 |
| <b>Salicylic acid improves cold and freezing tolerance in pea</b><br><i>Salisilik asit bezelyede soğuk ve donma toleransını artırır</i><br>Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY, Hande Nur KUMBUL, İbrahim Ertan ERKAN   | 321-334 |
| <b>Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit (NAA) uygulamalarının pamuğun (<i>Gossypium hirsutum</i> L.) verim ve bazı tarımsal özelliklerine etkisi</b><br><i>Effect of naphthalene acetic acid (NAA) applications at different periods and doses on the yield and some agricultural characteristics of cotton (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)</i><br>Hasan HALILOĞLU, Orhan ÇOKLU | 335-344 |

|  |                |
|--|----------------|
| <b>Comparison of various single-disc type furrow openers used in no-till seeders in terms of furrow properties and acting forces</b><br><i>Doğrudan ekim makinalarında farklı tek diskli tip gömücü ayakların çizi profili ve etki eden kuvvetler yönünden karşılaştırılması</i><br>Yusuf AYDIN, Ahmet ÇELİK, Mehmet Zahid MALASLI | <b>345-356</b> |
| <b>Solucan ve biyo-gübre uygulamalarının çilek bitkisinin kök ve gövdesinin besin elementi içeriğine etkisi</b><br><i>Effect of vermicompost and bio-fertilizer treatments on nutrient composition in strawberry roots and stems</i><br>Neslihan KILIÇ   | <b>357-373</b> |
|  |                |



# Isolation and identification of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, cotton bacterial blight disease agent and determination of the antibacterial activity of various plant essential oils

## *Pamuk bakteriyel yanıklık etmeni Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*'un izolasyonu, tanınması ve farklı bitki uçucu yağlarının antibakteriyel etkinliğinin belirlenmesi

Soner SOYLU<sup>1\*</sup>, Merve KARA<sup>2</sup>, Yusuf GÜMÜŞ<sup>3</sup>, Emine Mine SOYLU<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Hatay Mustafa Kemal University, Agriculture Faculty, Plant Protection Department 31034 Antakya, Hatay, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-1002-8958>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0001-7320-3376>; <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0001-7818-1831>; <sup>4</sup><https://orcid.org/0000-0001-5961-0848>

### To cite this article:

Soylu, S., Kara, M., Gümüş, Y. & Soyly, E.M. (2024). Isolation and identification of *xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, cotton bacterial blight disease agent and determination of the antibacterial activity of various plant essential oils. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 28(2): 180-191

DOI: 10.29050/harranziraat.1434729

### \*Address for Correspondence:

Soner SOYLU  
e-mail:  
soylu@mku.edu.tr

### Received Date:

10.02.2024

### Accepted Date:

17.04.2024

### ABSTRACT

Cotton is one of the most important industrial crops produced in large areas in Turkey. Cotton bacterial blight disease agent *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Syn. *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) is a seed-borne pathogen. Plant essential oils are natural antimicrobial compounds that have the potential to be used as an alternative to chemical control of seed-borne phytopathogens. In this study, the bacterial pathogen *X. citri* subsp. *malvacearum* was isolated from cotton plants showing typical disease symptoms during the 2023 growing season in Diyarbakır provinces and the antibacterial effect of essential oils obtained from 11 different medicinal plants (*Thymus serpyllum*, *Origanum syriacum*, *Thymus syriacus*, *Origanum onites*, *Cistus ladan*, *Salvia aramiensis*, *Laurus nobilis*, *Hypericum perforatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana* and *Thymbra spicata*) were determined by disk diffusion method. Bacterial isolates, obtained from cotton plants showing typical disease symptoms, were identified as *X. citri* subsp. *malvacearum* by biochemical and pathogenicity tests and also MALDI-TOF analysis. The essential oils used in the study showed antibacterial activity against the bacterial agent by forming an inhibition zone with a diameter of 6.33-46.33 mm in the nutrient media. *T. serpyllum* and *T. spicata* (43.33 mm), *O. syriacum* (43.00 mm), *T. syriacus* (38.33 mm) and *O. onites* (37.3 mm), were identified as the most effective essential oils respectively. The essential oils of *H. perforatum* (9.67 mm), *L. nobilis* (9.0 mm) and *S. aramiensis* (6.33 mm) showed relatively lower antibacterial activity against the disease agent. The results showed that essential oils of *Thymus* spp., *Thymbra* spp. and *Origanum* spp. have the potential to be used as an alternative to chemical control against seed-borne bacterial plant pathogens.

**Key Words:** Cotton, bacterial blight, *Xanthomonas*, essential oil, antibacterial

### ÖZ

Pamuk Türkiye'de geniş alanlarda üretimi yapılan önemli endüstri bitkilerin başında gelir. Pamuk bakteriyel yanıklık hastalığı etmeni *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Syn. *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) tohum kökenli bir patojendir. Bitki uçucu yağları tohum kökenli fitopatogen türlere karşı kimyasal



mücadeleye alternatif olarak kullanım potansiyeline sahip doğal antimikrobiyal bileşiklerdir. Bu çalışmada, Diyarbakır ilinde 2023 yetiştirme sezonunda tipik hastalık belirtileri gösteren pamuk bitkilerinden *X. citri* subsp. *malvacearum* bakteriyel etmenin izolasyonu, tanılanması ve 11 farklı tıbbi bitkiden (*Thymus serpyllum*, *Origanum syriacum*, *Thymus syriacus*, *Origanum onites*, *Cistus ladan*, *Salvia aramiensis*, *Laurus nobilis*, *Hypericum perforatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana* ve *Thymbra spicata*) elde edilen uçucu yağların antibakteriyel etkisi disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Tipik hastalık belirtileri gösteren pamuk bitkilerinden izole edilen izolatlar biyokimyasal ve patojenite testleri ve MALDI-TOF ile tür düzeyinde *X. citri* subsp. *malvacearum* olarak tanılanmıştır. Çalışmada kullanılan bitki uçucu yağları besi yerinde 6.33-46.33 mm çapında engelleme zonu oluşturmak suretiyle bakteriyel etmene karşı antibakteriyel etkinlik göstermiştir. En etkili uçucun yağlar sırasıyla *T. serpyllum* ve *T. spicata* (43.33 mm), *O. syriacum* (43.00 mm), *T. syriacus* (38.33 mm) ve *O. onites* (37.3 mm) olarak belirlenmiştir. *H. perforatum* (9.67 mm), *L. nobilis* (9.0 mm) ve *S. aramiensis* (6.33 mm) bitki uçucu yağları hastalık etmene karşı nispeten daha düşük oranlarda antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Elde edilen sonuçlar *Thymus* spp., *Thymbra* spp. ve *Origanum* spp.'ye ait bitki uçucu yağlarının tohum kökenli bitki patojeni bakteriyel hastalık etmenine karşı kimyasal mücadeleye alternatif mücadele yöntemi olarak uygulanma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Pamuk, bakteriyel yanıklık, *Xanthomonas*, uçucu yağ, antibakteriyel

## Introduction

Cotton (*Gossypium hirsutum*) is a significant industrial crop cultivated in various regions worldwide, contributing to substantial agricultural and economic potential in its producing countries. In Turkey, extensive cultivation of cotton plants in the Aegean, Mediterranean, South-eastern, and Eastern Anatolian regions is often plagued by fungal and bacterial diseases, leading to considerable losses in yield and quality. Bacterial angular leaf spot and boll rot, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (ex Smith) Schaad et al. (formerly known as *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*) is one of the prominent diseases that affect cotton plants (Verma and Singh, 1974). The pathogen typically spreads through infected seeds in cotton bolls, giving rise to various disease symptoms in the affected plants, including seedling blight, angular leaf spots, vein necrosis, black arm, and boll rot (Hillocks, 1981; Shenge 2001; Delannoy et al., 2005; Anmod et al., 2022). The manifestation of disease symptoms leads to a reduction in chlorophyll content in leaves and stems, ultimately causing significant damage to photosynthetic activity, yield, and fibre quality (Meshram and Raj, 1988). Yield losses in cotton were previously reported to range from 10% to 30%, reaching 50% or more in cotton grown in Africa or Asia (Verma, 1986; Thaxton and El-Zik, 2001; Mishra and Krishna, 2001; Delannoy et al., 2005; Raghavendra et al., 2009). While losses are less pronounced when disease symptoms are

confined to leaves, they can escalate to 90% when stem lesions develop (Singh et al., 2007). Under field conditions, bacterial blight can cause yield losses up to 50% (Watkins, 1981).

The bacterial blight disease caused by *X. citri* subsp. *malvacearum* has increasingly become a global impediment to cotton production. The most effective control approach against this disease is generally acknowledged to be the utilization of resistant cotton varieties. Geographical origins of cotton species exhibit variations in susceptibility to *X. citri* subsp. *malvacearum*, ranging from highly susceptible to highly resistant. It has been reported that resistance in cotton plants against *X. citri* subsp. *malvacearum*, with its broad host range, can be rapidly overcome (Verma, 1986; Wallace and El Zik, 1990; Hillocks, 1992; Shelke et al., 2012). Hunter et al. (1968) identified 19 physiological races of the pathogen using ten different cotton varieties, while Verma and Singh (1974) expanded this number to 32 races using only seven cotton varieties. The distribution of races varies from country to country (Oliveira et al., 2011). Different races of the pathogen (such as races 1, 2, 5, 6, 8, 12, 13, 16, and 18) have been reported to cause diseases in various cotton varieties grown in Australia, India, the United States, Nigeria, Zimbabwe, Africa, and Nicaragua (Ajene et al., 2014; Anmod et al., 2022). In addition to the six previously identified races (race 1, 2, 8, 21, 26, and 32) on different cotton varieties grown in Syria, four new races (race 3, 4, 11, 28) have been described (Abdo-Hasan, 2008). Epidemiological

studies conducted in Africa and other regions of the world have reported that some highly virulent (HV) races of the pathogen can overcome resistance in cotton varieties (El-Zik and Thaxton, 1994). Regarding the presence of the pathogen, limited studies have been conducted in Turkey on race characteristics, and the reactions of cotton varieties to the pathogen (Türkmenoğlu, 1969; Zachowski et al., 1989). The disease has recently re-emerged in the cotton cultivation areas in the South-eastern Anatolian Region of Turkey.

The utilization of resistant varieties against seed-borne bacterial pathogens presents a practical, environmentally friendly, and economical solution. However, there is a lack of highly resistant cotton varieties with high yield against cotton bacterial blight disease (Khan, 1996; Mondal et al., 2001). The most common method in combating plant diseases involves the use of chemical pesticides (Burr, 2001). In the control of cotton bacterial blight disease, some countries widely employ fungicides such as copper, Dithane M-45, and sulphur. However, it has been reported that systemic infection by the seed-borne pathogen does not yield the expected success (Sarker et al., 2017). The extended utilization of chemical pesticides may culminate in the attainment of effectiveness thresholds for these products, thereby yielding inadequate improvements in crop yield. Additionally, the over application of chemical pesticides can engender adverse, and frequently irreversible, alterations in agricultural ecosystems. (Zenelt et al., 2021). In the current era of heightened awareness of sustainability and the realization that soil is not an unlimited production resource, the adoption of good agricultural practices minimizing chemical use has become crucial (Eryılmaz et al., 2019). In this context, the use of volatile oils and extracts obtained from plants, which are naturally present, do not pose a risk of spreading toxic substances, rapidly decompose without causing environmental pollution, and do not carry residue risks, is seen as a promising alternative in the fight against plant diseases (Raghavendra et al., 2009; Sertkaya et al., 2010; Mbega et al., 2012; Atay and

Soylu, 2022; Atay and Soyly, 2023).

The antibacterial potentials of essential oils of medicinal plant species, which belong to *Thymus*, *Mentha*, *Achilla*, *Artemisia*, and *Salvia* genus, were previously reported to poses against certain phytopathogenic bacterial disease agents (Daferera et al., 2003; Soyly et al., 2009; Mengulluoglu and Soyly, 2012; Küçükbay et al., 2014; Ünlü and Elçi, 2019; Bozkurt et al., 2020; Ghavam et al., 2020; Dönmez et al., 2020; Orzali et al., 2020; Temtek, 2021). Among the plants used in antimicrobial studies, Thyme species stand out with their widespread distribution, economic significance, and health-related properties. The antimicrobial activities of plant extracts and volatile oils from these species are economically important and play a crucial role in disease control methods against important disease agents (Regnault-Roger et al., 2004; Pavela, 2006; Türkmen et al., 2022). Literature reviews have indicated that very few studies were conducted on the antibacterial activity of plant essential oils and extracts against the cotton bacterial blight disease agent (Kızıl et al., 2005; Naqvi et al., 2022).

In this study, the essential oils of different plant species (*Thymus serpyllum*, *Origanum syriacum*, *Thymus syriacus*, *Origanum onites*, *Cistus laden*, *Salvia aramiensis*, *Laurus nobilis*, *Hypericum perforatum*, *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana*, and *Thymbra spicata*) were investigated for their antibacterial effects against the seed-borne plant pathogen *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*.

## Materials and Methods

### *Isolation and identification of the bacterial pathogen*

The bacterial pathogen responsible for the disease was isolated from the leaves and unopened cotton bolls exhibiting typical disease symptoms, sent for diagnosis from Bismil district of Diyarbakır province to the Bacteriology Laboratory of the Department of Plant Protection at Mustafa Kemal University, Faculty of

Agriculture, Hatay (Figure 1). Visibly water-soaked lesion bearing green leaves were initially subjected to surface disinfection with 5% sodium hypochlorite for 2-3 minutes, followed by three rinses with sterile water. After surface disinfection, the tissues were macerated in sterile 50 mM MgCl<sub>2</sub> solution for 30 minutes and then spread onto King B (KB) Agar medium. The petri dishes were incubated at 28°C for 2 days. Bacterial isolates were also obtained directly from the water-soaked lesions on bolls, after surface disinfection with 70% ethanol, using the tissue imprinting method on King B (KB) agar medium (Aktan and Soyly, 2020). Pure isolates were obtained by transferring bacterial isolates from typical yellow colonies grown on KB agar to fresh KB agar plates. After applying classical biochemical tests (gram staining, oxidase test, motility, sporulation, pectolytic activity, gelatine

liquefaction, KOH test, catalase tests, etc.), the species identification of the isolates was confirmed using MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) methods (Lelliot and Stead, 1987; Schaad et al., 2001; Aktan and Soyly, 2020). The concentration of the bacterial suspension of obtained isolates was adjusted to 10<sup>6</sup> cfu ml<sup>-1</sup> by dilution, and pathogenicity tests were conducted on cotyledon leaves of three-week-old healthy cotton seedlings, including hypersensitive reaction (HR) tests on tobacco leaves. As a control, the cotyledon leaves of healthy seedlings were treated with sterile water. Inoculated plants were covered with transparent bags for 1 day in growth chambers at 26°C with high relative humidity, and then the covers were opened, and disease symptoms were daily monitored for 5 days.

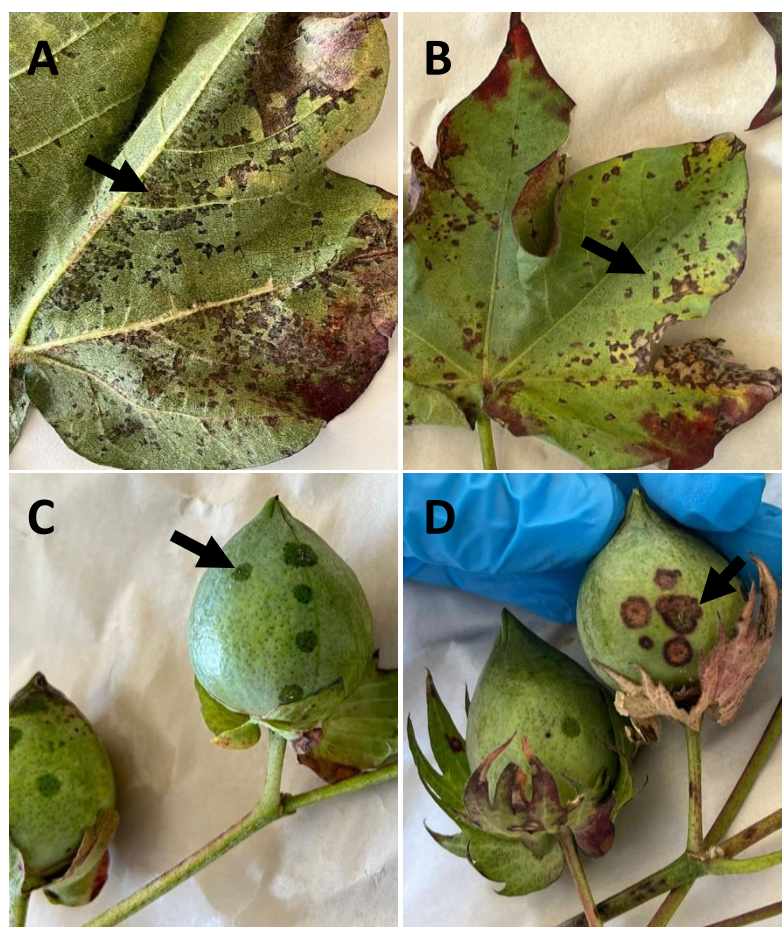


Figure 1. Typical symptoms (arrow) of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* on cotton leaf (A,B) and boll (C,D)

### Determination of the antibacterial activity of essential oils

The essential oils used in this study were obtained from existing essential oil stocks with previously demonstrated antimicrobial efficacy against various plant pathogenic bacteria and fungal agents in the Phytopathology Laboratory of the Department of Plant Protection at Mustafa Kemal University Faculty of Agriculture. The antibacterial effect of the essential oils used in the study was assessed using the disk diffusion method (Soylu et al., 2022). A bacterial suspension of the virulent bacterial isolate, prepared in sterile water with a concentration of  $OD_{620}=0.12$ , was spread on King B (KB) agar

medium using a spreader at a concentration of  $10^8$  cells/mL. Subsequently, sterile antimicrobial sensitivity test disks (6 mm diameter) were placed at the centre of each petri dish, and 5  $\mu$ l of essential oil was added to each disk. To prevent the evaporation of essential oils from the edges of petri dishes, dishes were wrapped with double-layered Parafilm, followed by incubation at 26°C for 2 days. Control plates were prepared using disks with sterile distilled water (Bozkurt et al., 2020). The antibacterial effect of the essential oils was evaluated by measuring the diameters of the inhibition zones formed beneath and around the disks after the removal of the disks (Figure 2).

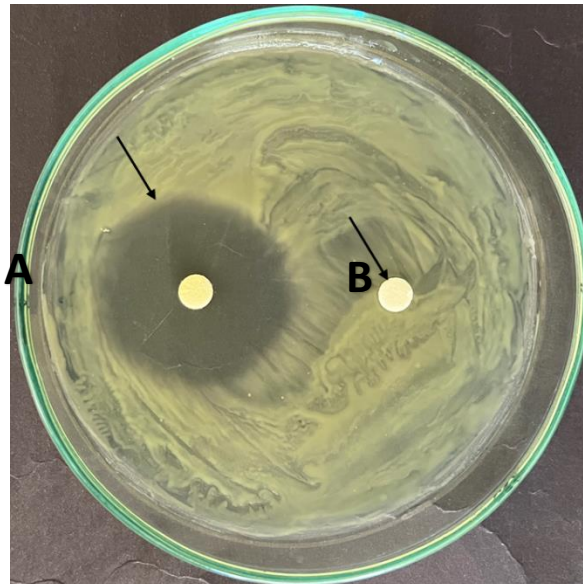


Figure 2. (A) Inhibitory effect of *Thymus serpyllum* essential oil, the most effective of the essential oils tested, on the growth of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*. The transparent inhibition zone (arrow) around the antimicrobial susceptibility test disk containing 5  $\mu$ l of the essential oil is clearly visible. (B) Indicates the absence of any inhibition zone around the disk containing sterile medium.

### Statistical analysis

*In vitro* antibacterial efficacy experiments were conducted for each essential oil according to a Randomized Complete Block Design in at least three different petri dishes, and the trial was repeated at two distinct time points. The values obtained in the experiments were subjected to analysis of variance (ANOVA) using the SPSS statistical program (SPSS Statistics 17.0). The differences between applications were compared using the Duncan Multiple Comparison Test ( $P \leq 0.05$ ).

### Results and Discussions

#### Isolation and identification of the pathogen

The causal agent of the disease was isolated from diseased plants sent for diagnosis by cotton growers in Bismil district of Diyarbakır province in September 2023 to the Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Hatay Mustafa Kemal University (Figure 1). Isolates, exhibiting clear yellow-coloured, sharply defined, non-

fluorescent colonies on King B medium, were purified from these colonies. Biochemical tests confirmed the isolates as gram-negative with positive reactions in starch hydrolysis (pectolytic activity), catalase, oxidase, and gelatine liquefaction tests. All representative isolates demonstrated an extreme hypersensitivity reaction (HR) in the form of tissue collapse 48 hours post-inoculation on tobacco leaves. Sprayed cotton cotyledon leaves showed water-soaked symptoms with a diameter of 2-4 mm five days after inoculation. The results of biochemical and pathogenic tests for the pathogen were consistent with previous study findings (Schaad et al., 2001).

Recent advancements in bacterial diagnostics have seen the increasing use of MALDI-TOF MS, a

next-generation method, as an alternative to chromatographic and DNA-based molecular methods for identification of plant pathogenic bacterial and fungal disease agents (Pulcrano et al., 2012; Uysal et al., 2019; Aktan and Soyly, 2020; Bozkurt et al., 2020; Soyly et al., 2023). The diagnostic results obtained through biochemical tests were also confirmed by MALDI-TOF MS, which has become a widely adopted method in recent years. The bacterium isolates obtained from infected cotton leaves and bolls, as well as those from pathogenicity tests, exhibited high similarity index values, matching reference isolates in the MALDI-TOF database such as *X. citri* pv. *malvacearum* DSM 3489, 1220, and *X. axonopodis* pv. *malvacearum* CFBP-2530 with values ranging from 2.066 to 2.175 (Figure 3).

Analyte Name: E1  
 Analyte Description:  
 Analyte ID: YY  
 Analyte Creation Date/Time: 2023-09-08T03:48:21.142  
 Applied MSP Library(ies):  
 Applied Taxonomy Tree: Projects, Bruker Taxonomy, Taxonomy

| Rank (Quality) | Matched Pattern   | Score Value | NCBI Identifier |
|----------------|---|-------------|-----------------|
| 1 (++)         | <i>Xanthomonas citri</i> pv <i>malvacearum</i> DSM 3849 DSM               | 2.175       | 346             |
| 2 (++)         | <i>Xanthomonas citri</i> pv <i>malvacearum</i> DSM 1220 DSM               | 2.149       | 346             |
| 3 (++)         | CFBP-2530_ <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i> _20160825 | 2.066       | 100134258       |

Figure 3. MALDI-TOF identification result of *X. citri* subsp. *malvacearum* MKUBK-Xcm YY isolate obtained from cotton bolls showing typical disease symptoms and used in pathogenicity test

#### *Antibacterial activity of different plant essential oils against Xanthomonas citri* pv. *malvacearum*

The antibacterial activities of essential oils were investigated by measuring the diameters of inhibition zones formed around the disks (Figure 2). The results obtained are presented in Table 1. Significant differences in the antibacterial effects of essential oils obtained from different plants against the bacterial isolate.

Essential oils from *Thymus*, *Thymbra*, and *Origanum* spp exhibited higher antibacterial activity compared to other essential oils used in

the experiment (Table 1). *In vitro* studies demonstrated that *T. serpyllum* (43.33 mm), *T. spicata* (43.33 mm), and *O. syriacum* (43.0 mm) exhibited the highest antibacterial activity against *X. citri* pv. *malvacearum*, and due to the similarity in their antibacterial effects, these oils were appeared in the same statistical group. These essential oils were followed by *T. syriacus* (38.33 mm) and *O. onites* (37.33 mm). The lowest antibacterial activities were displayed by the essential oils of *S. aramiensis* (6.33 mm) and *L. nobilis* (9.00 mm) (Table 1).



Table 1. Antibacterial activity<sup>a</sup> of plant essential oils on the development of the bacterial blight disease agent *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*

| Plant essential oils<br><i>Bitki Uçucu Yağları</i> | Diameter of inhibition zones (mm)<br><i>Engelleme zon çapıları (mm)</i> |
|--|---|
| <i>Thymus serpyllum</i>                            | 43.33 (±1.02) <sup>f</sup>  |
| <i>Thymbra spicata</i>                             | 43.33 (±0.88) <sup>f</sup>  |
| <i>Origanum syriacum</i>                           | 43.0 (±2.08) <sup>f</sup>   |
| <i>Thymus syriacus</i>                             | 38.33 (±2.02) <sup>e</sup>  |
| <i>Origanum onites</i>                             | 37.33 (±1.20) <sup>e</sup>  |
| <i>Rosmarinus officinalis</i>                      | 14.67 (±0.33) <sup>d</sup>  |
| <i>Origanum majorana</i>                           | 14.67 (±0.33) <sup>d</sup>  |
| <i>Cistus ladan</i>                                | 11.67 (±0.33) <sup>cd</sup>   |
| <i>Hypericum perforatum</i>                        | 9.67 (±0.33) <sup>c</sup>   |
| <i>Laurus nobilis</i>                              | 9.0 (±0.57) <sup>bc</sup>   |
| <i>Salvia aramiensis</i>                           | 6.33 (±0.33) <sup>b</sup>   |
| Kontrol  | 0.0 <sup>a</sup>  |

<sup>a</sup> The obtained values represent the average diameter of bacterial zones (mm) measured in three different petri dishes. Similar lowercase letters next to the mean values within the column indicate that there is no statistically significant difference between the essential oils (Duncan's Multiple Range Test,  $P < 0.05$ ).

The findings of this study clearly demonstrate the potential use of plant essential oils as antibacterial compounds against the seed borne pathogen causing leaf and boll blight in cotton. While the antibacterial effects of essential oils have been extensively researched against microorganisms causing issues in human and food contexts, limited number of studies exist in the literature regarding the determination of antibacterial activities of plant extracts and essential oils against plant pathogenic bacterial disease agents. *Thymbra spicata* var. *spicata* essential oil has been investigated for its antibacterial effects on economically important plant pathogenic bacteria (Basim et al., 2000). The antibacterial effects of the essential oil obtained from various plant species of Lamicaeae family (such as *Ocimum cillatum*, *Lippia gracilis* and those obtained from interspecific hybrids) were also evaluated against different plant bacterial disease agents belonging to *Ralstonia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Brenneria*, *Pantoea*, *Agrobacterium* and *Rhodococcus* genus (Moghaddam et al., 2014; Schollenberger et al., 2018; da Silva et al., 2019).

In contrast to numerous studies investigating the antibacterial activity of essential oils against different *Xanthomonas* spp., there is a limited number of studies focusing on *X. citri* subsp. *malvacearum*, the causal agent of cotton bacterial blight disease. Previous research by Kızıl et al. (2005) reported the ineffectiveness of essential oils from cumin (*Cuminum cyminum*), dill (*Anethum graveolens*), fennel (*Foeniculum vulgare*), spearmint (*Mentha spicata*), and anise (*Pimpinella anisum*) against *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. They found that coriander (*Coriandrum sativum*) and hyssop (*Hyssopus officinalis*) essential oils were effective against the pathogen. Kızıl and Uyar (2006) indicated that essential oils from *Thymbra spicata*, *Satureja hortensis*, *Origanum onites*, and *Thymus kotschyanus* had lower effectiveness against *X. campestris* pv. *malvacearum* compared to other tested plant pathogenic species. Shirsat (2008) reported that extracts from *Terminalia thorelii* leaves and fruits exhibited a high inhibition zone against *X. axanopodis* pv. *malvacearum* isolated from cotton plants.

A recent study by Mangalagiri et al. (2021)

investigated the antibacterial activity of essential oils from various plant species, including *Cymbopogon flexuosus*, *C. martini*, *Eucalyptus citridora*, *Tagetes minuta*, *Pelargonium sp.*, *C. winterianus*, and *Mentha arvensis*, against *X. citri* subsp. *malvacearum*. The results indicated varying levels of antibacterial efficacy among the tested essential oils, with *Cymbopogon flexuosus*, *C. martini*, and *Eucalyptus citridora* showing particularly high antibacterial activity. Similarly, Naqvi et al. (2022) investigated the antibacterial properties of essential oils from different plant species, such as *Syzygium aromaticum*, *Curcuma longa*, *Moringa oleifera*, *Azadirachta indica*, *Mangifera indica*, *Mentha piperita*, *Aloe vera*, *Syzygium cumini*, *Citrus limon*, and *Prosopis juliflora*, against *X. citri* subsp. *malvacearum*. Among the tested essential oils, *Mentha piperita*, *Syzygium cumini*, *Citrus limon*, *Moringa oleifera*, and *Syzygium aromaticum* were identified as the most effective essential oil bearing plants, forming inhibition zones ranging from 8.41 to 8.58 mm.

The essential oils used in this study from *Origanum*, *Thymbra*, and *Thymus* plant species were previously determined to contain high levels of carvacrol, thymol, and  $\gamma$ -terpinene (Bozkurt et al., 2020; Kara et al., 2022). Previous studies showed that these oils and their main components trigger rapid cell breakdown in fungal and bacterial pathogens (da Silva et al., 2019; Liu et al., 2019; Churklam et al., 2020; Kachur and Suntres, 2020). Antibacterial efficacies of plant extracts and essential oils from savory (*Satureja hortensis*), thyme (*Thymus spicigera*), oregano (*Origanum onites*), and round-leaved oregano (*Origanum rotundifolium*) were investigated against *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria*. Essential oils exhibited greater antibacterial activity compared to plant extracts (Dadaşoğlu et al., 2016).

Furthermore, antibacterial activity of essential oils of *Helichrysum italicum*, *Inula graveolens*, *Cistus creticus*, *Echinacea purpurea*, and *Hypericum perforatum* were tested against potato soft rot disease agent *Pectobacterium*

*carotovorum* subsp. *carotovorum* and halo blight of beans disease agent *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Gümüş et al., 2022). Amongst the tested essential oils, *Hypericum perforatum* essential oil demonstrated the highest antibacterial activity against *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* in comparison to *P. syringae* pv. *phaseolicola*.

In a study conducted in Sudan, the inhibitory effects of chitosan compounds at various concentrations (1, 3, 5, and 10 mg/ml), antagonist bacterial isolate *Paenibacillus* spp., and water extracts and oils from the barks of certain plants (*Syzygium aromaticum*, *Nigella sativa*, *Trigonella foenum graecum*, and *Allium sativum*) and camel urine were evaluated for their effectiveness in inhibiting the *in vitro* growth of *X. axonopodis* pv. *malvacearum*. All tested chitosan concentrations, except 1 mg/ml, exhibited inhibitory effects against bacteria. Chitosan at 10 mg/ml showed the highest inhibitory effectiveness with a 14 mm inhibition zone, followed by 5 mg/ml and 3 mg/ml, which produced 12 mm and 11 mm inhibition zones, respectively.

## Conclusions

This study focuses on isolating and identifying the cotton bacterial blight disease agent, *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, while also exploring the antibacterial activities of various plant essential oils. The investigation aims to contribute to the understanding of potential botanical agents against bacterial pathogens, thereby offering insights into novel strategies for disease management in agriculture. In consideration of the absence of cotton varieties resistant to bacterial blight disease, the potential use of plant essential oils exhibiting antibacterial activity against *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* becomes particularly intriguing. The results obtained from this study demonstrate the antibacterial potential of essential oils derived from plants such as *Thymus* spp., *Thymbra* spp., and *Origanum* spp. against *X. citri* subsp. *malvacearum*. This study contributes to the growing body of research on the antibacterial

activity of plant essential oils against *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, providing valuable insights into potential alternatives for the control of cotton bacterial blight disease. These findings open avenues for further research on the development of sustainable and environmentally friendly strategies for managing bacterial diseases in agriculture. However, for a more comprehensive understanding of the antibacterial effects of essential oils under *in vivo* conditions and their economic feasibility, further detailed investigations are warranted in future studies. This highlights the significance of exploring the *in vivo* antibacterial efficacy of these essential oils and assessing their economic viability.

### Conflict of interest:

The authors declare that they have no conflict of interest.

### Author contributions:

Setting up the experiments, methodology, interpretation of results, and writing of the original draft were provided by Soner Soylu; Merve Kara, Yusuf Gümüş performed the methodology including isolation, identification, pathogenicity and antibacterial assays; Emine Mine Soylu contributed to the methodology, reviewed and edited the manuscript. All authors critically reviewed and approved the final manuscript.

### References

Abdo-Hasan, M., Khalil, H., Debis, B., & Mir, A. N. (2008). Molecular characterisation of Syrian races of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *Journal of Plant Pathology*, 90, 431-439. DOI: <https://www.jstor.org/stable/41998535>

Ajene, I. J., Shenge K. C., & Akpa, A. D. (2014). Races of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*, the causal organism of bacterial blight of cotton in northern Nigeria. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(18), 2263-2269. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.873561>

Aktan, Z. C., & Soylu, S. (2020). Diyarbakır ilinde yetişen badem ağaçlarından endofit ve epifit bakterileri türlerinin izolasyonu ve bitki gelişimini teşvik eden

mekanizmalarının karakterizasyonu. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(3), 641-654. DOI: <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogava.vi.659802>

Anmod, A. B., Ingle, R. W., & Chormale, T.S. (2022). Pathological and cultural characteristics of different isolates of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*. *Journal of Plant Disease Sciences*, 17(1), 59-62. DOI: <https://doi.org/10.48165/jpds.2022.1711>

Atay, M., & Soylu, S. (2022). Biber meyvelerinde hasat sonrası çürümelere sebep olan bazı fungal hastalık etmenlerine karşı Isothiocyanate bileşiklerinin antifungal etkilerinin belirlenmesi. *Harran Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 26, 290-302. DOI: <https://doi.org/10.29050/harranziraat.1136632>

Atay, M., Soylu, S. 2023. Kurutmalık Biber meyvelerinde iç çürüklüğüne neden olan fungal etmenlere karşı bitki uçucu yağlarının in vitro antifungal etkileri. *KSU Tarım ve Doğa Dergisi*, 26, 76-89. DOI: <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogava.vi.1085859>

Basim, H., Yegen, O., & Zeller, W. (2000). Antibacterial effect of essential oil of *Thymbra spicata* L. var. *spicata* on some plant pathogenic bacteria. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 107(3), 279-284. DOI: <https://www.jstor.org/stable/43386995>

Bozkurt, İ. A., Soylu, S., Kara, M., & Soylu, E. M. (2020). Chemical composition and antibacterial activity of essential oils isolated from medicinal plants against gall forming plant pathogenic bacterial disease agents. *KSU Journal of Agriculture and Nature*, 23(6), 1474-1482. DOI: <https://doi.org/10.18016/ksutarimdogava.vi.723544>

Burr, T.J. (2001). Future development of chemical and biological controls for bacterial diseases of plants. *In Plant Pathogenic Bacteria: Proceedings of the 10th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, (pp. 19-23), Charlottetown, Prince Edward Island, Canada, July 23-27, Springer Netherlands.

Churklam, W., Chaturongakul, S., Ngamwongsatit, B., & Aunpad, R. (2020). The mechanisms of action of carvacrol and its synergism with nisin against *Listeria monocytogenes* on sliced bologna sausage. *Food Control*, 108, 106864. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106864>

da Silva, R. S., de Oliveira, M. M. G., de Melo, J. O., Blank, A. F., Correa, C. B., Scher, R., & Fernandes, R. P. M. (2019). Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 160, 40-48. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.06.014>

Dadasoglu, F., Kotan, R., Çakır, A., Karagöz, K., Dikbas, N., Ozer, H., Kordali, S., & Cakmakci, R. (2016). Use of essential oils and extracts from *Satureja* and *Origanum* species as seed disinfectants against

- Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* (Doidge) dye. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25, 5989-5998.
- Daferera, D. J., Ziogas, B. N., & Polissiou, M. G. (2003). The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*, 22(1), 39-44. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00095-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00095-9)
- Delannoy, E., Lyon, B. R., Marmey, P., Jalloul, A., Daniel, J. F., Montillet, J. L., Essenberg, M., & Nicole, M. (2005). Resistance of cotton towards *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*. *Annual Review of Phytopathology*, 43(1), 63-82. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140251>
- Dönmez, M. F., Şahin, B. U., & Bozhüyük, A. U. (2020). Antibacterial activities of essential oils and extracts of *Satureja* species against plant pathogenic bacteria in bean. *Journal of Agriculture*, 3(2), 57-70. DOI: <https://doi.org/10.46876/ja.825656>
- EL-Zik, K.M., & Thaxton, P.M. (1994). Breeding for resistance to bacterial blight of cotton in relation to races of the pathogen. Proceedings of the World Cotton Research Conference-1, CSIRO, Melbourne, pp. 236–241.
- Eryılmaz, G. A., Kılıç, O., & Boz, İ. (2019). Evaluation of organic agriculture and good agricultural practices in terms of economic, social and environmental sustainability in Turkey. *YYU Journal of Agricultural Science*, 29(2), 352-361. DOI: <https://doi.org/10.29133/yyutbd.446002>
- Ghavam, M., Manca, M. L., Manconi, M., & Bacchetta, G. (2020). Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils obtained from leaves and flowers of *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Scientific Reports*, 10(1), 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73193-y>
- Gümüş, Y., Soyulu, S., Kara, M., & Türkmen, M. (2022). Chemical compositions and antibacterial activities of essential oils of five aromatic plants against plant pathogenic bacterial disease agents. *Journal of Agricultural Food and Environmental Sciences*, 76(6), 18-23. DOI: <https://journals.ukim.mk/index.php/jafes/article/view/1899/1573>
- Hillocks, R. J. (1981). Cotton disease research in Tanzania. *Tropical Pest Management*, 27(1), 1-12. DOI: <https://doi.org/10.1080/09670878109414165>
- Hillocks, R. J. (1992). Bacterial Blight. In Hillocks R.J. (ed.) *Cotton Diseases*, pp. 38-85. CAB International, Wallingford, UK.
- Hunter, R. E., Brinkerhoff, L. A., & Bird, L. S. (1968). The development of a set of upland cotton lines for differentiating races of *Xanthomonas malvacearum*. *Phytopathology*, 58, 830-832.
- Kachur, K., & Suntres, Z. (2020). The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(18), 3042-3053. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1675585>
- Kara, M., Türkmen, M., & Soyulu, S. (2022). Chemical compositions and in vitro antifungal activities of essential oils obtained from different *Origanum* species against postharvest gray mold rot of persimmon fruit. *Acta Horticulturae*, 1338, 283-290. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2022.1338.41>
- Khan, M. A. (1996). Relationship of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* population to development of symptoms of bacterial blight of cotton. *Pakistan Journal of Phytopathology*, 8(2), 152-155.
- Kızıl, S., & Uyar, F. (2006). Antimicrobial activities of some thyme (*Tymus*, *Staureja*, *Origanum* and *Thymbra*) species against important plant pathogens. *Asian Journal of Chemistry*, 18(2), 1455-1461.
- Kızıl, S., Uyar, F., & Sağır, A. (2005). Antibacterial activities of some essential oils against plant pathogens. *Asian Journal of Plant Sciences*, 4(3), 225-228.
- Küçükbay, F. Z., Kuyumcu, E., Azaz, A. D., Arabacı, T., & Yüçetürk, S. Ç. (2014). Chemical composition of the essential oils of three *Thymus taxa* from Turkey with antimicrobial and antioxidant activities. *Records of Natural Products*, 8(2), 110-120.
- Lelliott, R. A., & Stead, D. E. (1987). Methods for the diagnosis bacterial diseases of plants. In: Preece, T.F., Ed., *Methods in Plant Pathology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Liu, Q. C., Qiao, K., & Zhang, S. A. (2019). Potential of a small molecule carvacrol in management of vegetable diseases. *Molecules*, 24(10), 1932. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24101932>
- Mangalagiri, N. P., Panditi, S. K., & Jeevignunta, N. L. L. (2021). Antimicrobial activity of essential plant oils and their major components. *Heliyon*, 7(4), e06835. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06835>
- Mbega, E. R., Mortensen, C. N., Mabagala, R. B., & Wulff, E. G. (2012). The effect of plant extracts as seed treatments to control bacterial leaf spot of tomato in Tanzania. *Journal of General Plant Pathology*, 78(4), 277-286. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-012-0380-z>
- Mengulluoglu, M., & Soyulu S. (2012). Antibacterial activities of essential oils from several medicinal plants against the seed-borne bacterial disease agent *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Research on Crops*, 13, 641-646. DOI: [https://www.researchgate.net/publication/287723650\\_Antibacterial\\_activities\\_of\\_essential\\_oils\\_extracted\\_from\\_medicinal\\_plants\\_against\\_seed-borne\\_bacterial\\_disease\\_agent\\_Acidovorax\\_avenae\\_subsp\\_citrulli](https://www.researchgate.net/publication/287723650_Antibacterial_activities_of_essential_oils_extracted_from_medicinal_plants_against_seed-borne_bacterial_disease_agent_Acidovorax_avenae_subsp_citrulli)

- Meshram, M. K., & Raj, S. (1988). Seed cotton yield and fiber quality as influenced by different grades of bacterial blight under rainfed conditions. *Indian Journal of Plant Pathology*, 16(2), 257-260.
- Mishra, S.P., & Krishna, A. (2001). Assessment of yield losses due to bacterial blight in cotton. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 31(2), 232-233.
- Moghaddam, M., Alymanesh, M. R., Mehdizadeh, L., Mirzaei, H., & Pirbalouti, A. G. (2014). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of *Ocimum ciliatum*, as a new source of methyl chavicol, against ten phytopathogens. *Industrial Crops and Products*, 59, 144-148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.05.006>
- Mondal, K., Dureja, P., & Prakash, V. J. (2001). Management of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum*-induced blight of cotton through phenolics of cotton rhizobacterium. *Current Microbiology*, 43, 336-339. DOI: <https://doi.org/10.1007/s002840010312>
- Naqvi, S. A. H., Iqbal, S., Hafeez-ur-Rehman, Farooq, U., Hassan, M. Z., Shahid, M. N., Noor Shah, A., Abbas, A., Mubeen, I., Farooq, A., Ghareeb, R. Y., Kalaji, H. M., Alrefaei, A. F., & Ahmed, M. A. A. (2022). Evaluation of bacterial perpetuation assays and plant biomolecules antimicrobial activity against cotton blight bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*; an alternative source for food production and protection. *Plants*, 11, 1278. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants11101278>
- Oliveira, J.C., Albuquerque, G.M.R., Xavier, A.S., Mariano, R.L.R., Suassuna, N.D., & Souza, E.B. (2011). Characterization of *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* causing cotton angular leaf spot in Brazil. *Journal of Plant Pathology*, 93, 707-712.
- Orzali, L., Valente, M. T., Scala, V., Loreti, S., & Pucci, N. (2020). Antibacterial activity of essential oils and *Trametes versicolor* extract against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and *Ralstonia solanacearum* for seed treatment and development of a rapid in vivo assay. *Antibiotics*, 9(9), 628. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9090628>
- Pavela, R. (2006). Insecticidal activity of essential oils against cabbage aphid *Brevicoryne brassicae*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 9(2), 99-106. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2006.10643479>
- Pulcrano, G., Roscetto, E., Iula, V. D., Panellis, D., Rossano, F., & Catania, M. R. (2012). MALDI-TOF mass spectrometry and microsatellite markers to evaluate *Candida parapsilosis* transmission in neonatal intensive care units. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31, 2919-2928. <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1642-6>
- Raghavendra, V. B., Siddalingaiah, L., & Prakash, H. S. (2009). Role of cultivars, physical, chemical and organic treatments in the management of bacterial blight of cotton. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 42(12), 1101-1108. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235400701622329>
- Regnault-Roger, C., Ribodeau, M., Hamraoui, A., Bareau, I., Blanchard, P., Gil-Munoz, M. I., & Barberan, F. T. (2004). Polyphenolic compounds of Mediterranean Lamiaceae and investigation of orientational effects on *Acanthoscelides obtectus* (Say). *Journal of Stored Products Research*, 40(4), 395-408. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(03\)00031-6](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(03)00031-6)
- Sarker, S., Sultana, N., & Aminuzzaman, F. M. (2017). Biochemical characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* isolated from infected cotton plant and its in vitro sensitivity against some selected chemicals. *Artificial Intelligence Review*, 11, 1-10. DOI: <https://doi.org/10.9734/AIR/2017/35626>
- Schaad, N. W., Jones, J. B., & Chun, W. (2001). *Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria*. 3rd ed.; The American Phytopathological Society: St. Paul, MN, USA.
- Schollenberger, M., Staniek, T. M., Paduch-Cichal, E., Dasiewicz, B., Gadomska-Gajadur, A., & Mirzwa-Mroz, E. (2018). The activity of essential oils obtained from species and interspecies hybrids of the *Mentha* genus against selected plant pathogenic bacteria. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 17(6), 167-174. DOI: <https://doi.org/10.24326/asphc.2018.6.17>
- Sertkaya, E., Kaya, K., & Soyly, S. (2010). Acaricidal activities of the essential oils from several medicinal plants against the carmine spider mite (*Tetranychus cinnabarinus* Boisdu.) (Acarina: Tetranychidae). *Industrial Crops and Products*, 31, 107-112. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.009>
- Shelke, G. V., Aurangabadkar, L. P., Kashikar, A. R., Wadyalkar, S. A., Phalak, M. S., Kharkarand, H. H., & Umlkarm, G. S. (2012). Identification of resistance source for bacterial blight disease caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* and its genetic inheritance in upland cotton. *Cotton Research Journal*, 3(2), 167-173.
- Shenge, K.C. (2001). Evaluation of plant extracts for the control of Bacterial Blight of Cotton induced by *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* [M.Sc thesis].
- Shirsat, R. P. (2008). Screening of anti-phytopathogenic activity of *Terminalia thorelii*. *Ethnobotanical Leaflets*, 12, 538-541.
- Singh, A., Srivastava, S., & Akram, M. (2007). Studies on bacterial leaf blight of cotton (*Gossypium* spp.). *International Journal of Sustainable Crop Production*, 2(3), 25-29.
- Soyly, S., Evrendilek, G.A., & Soyly, E.M. (2009). Chemical compositions and antibacterial activities of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* Mill. var. *vulgare*) and dill (*Anethum graveolens* L.) essential oils against the growth of food-borne and seed-borne plant

- pathogenic bacteria. *Italian Journal of Food Science*, 21, 347-355. DOI: <https://www.researchgate.net/publication/284790594>
- Soylu, S., Kara, M., Türkmen, M., & Şahin, B. (2022). Synergistic effect of *Foeniculum vulgare* essential oil on the antibacterial activities of Ag- and Cu-substituted ZnO nanorods (ZnO-NRs) against food, human and plant pathogenic bacterial disease agents. *Inorganic Chemistry Communications*, 146, 110103. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2022.110103>
- Soylu, S., Atay, M., Kara, M., Uysal, A., Soyulu, E.M., & Kurt, Ş. (2023). Morphological and molecular characterization of *Fusarium incarnatum* as a causal disease agent of pepper (*Capsicum annuum*) fruit rot. *Journal of Phytopathology*, 171, 688-699. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.13228>
- Temtek, E. (2021). Kavunda bakteriyel meyve lekesi hastalığına neden olan *Acidovorax citrulli*'nin bazı bitki uçucu yağları ile *in vitro* koşullarda kontrolü. Yüksek Lisans Tezi, Iğdır University.
- Thaxton, P. M., & El-Zik, K. M. (2001). Bacterial blight. In: Kirkpatrick T.L., Rothrock C.S. (eds) *Compendium of Cotton Diseases*. 2nd ed., pp. 34-35.
- Türkmen, M., Kara, M., Maral, H., & Soyulu, S. (2022). Determination of chemical component of essential oil of *Origanum dubium* plants grown at different altitudes and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46, e15787. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpp.15787>
- Türkmenoğlu, Z. (1969). Ege Bölgesi pamuklarında zarar yapan pamuk köşeli yaprak leke hastalığı (*Xanthomonas malvacearum* Erw. Smith)'na karşı tohum ilaçlama denemeleri. *Bitki Koruma Bülteni*, 9, 223-237.
- Uysal, A., Kurt, Ş., Soyulu, S., Soyulu, E.M., & Kara, M., (2019). Yaprağı yenen sebzelerdeki mikroorganizma türlerinin MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) tekniği kullanılarak tanınması. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 29, 595-603. DOI: <https://doi.org/10.29133/yyutbd.627850>
- Ünlü, N., & Elçi, E. (2019). Antibacterial effects of eucalyptus and some commercial plant essential oils on tomato bacterial canker disease (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*). *Plant Protection Bulletin*, 59(2), 39-47. DOI: <https://doi.org/10.16955/bitkorb.471162>
- Verma, J. P. (1986). *Bacterial Blight of Cotton*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Verma, J. P., & Singh, R. P. (1974). Recent studies on the bacterial diseases of fiber and oil seed crops in India. *Plant Pathology*, 134-145.
- Wallace, T.P., & El-Zik, K.M. (1990). Quantitative analysis of resistance in cotton to three new isolates of the bacterial blight pathogen. *Theoretical and Applied Genetics*, 79, 443-448. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00226150>
- Watkins, G. M. (1981). *Compendium of Cotton Diseases*, 2-40. St Paul, MN: American Phytopathology Society.
- Zachowski, M.A., Çınar, Ö., & Rudolph, K. (1989). Characterization of *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (angular leaf spot of Cotton) isolates from Turkey and resistance tests of Turkish cotton cultivars. *Phytopathologia Mediterranea*, 28, 10-15.
- Zenelt, W., Krawczyk, K., & Borodynko-Filas, N. (2021). Biodiversity and scope of endophytic and phytopathogenic bacterial species identified in plant samples investigated in the Plant Disease Clinic laboratory. *Journal of Plant Protection Research*, 61(1), 63-82. DOI: <https://doi.org/10.24425/jppr.2021.136274>



# New Approaches to the Control of *Neodiprion sertifer* (Geoffroy, 1785) (Hymenoptera: Diprionidae)

## *Neodiprion sertifer* (Geoffroy, 1785) (Hymenoptera: Diprionidae)'in Mücadelesinde Yeni Yaklaşımlar

Hilal TUNCA COSİC<sup>1\*</sup> Damla ÇAYCI<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, 06110, Ankara, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-3073-6628>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0003-2918-7609>

### To cite this article:

Tunca Cosic, H. & Çaycı, D. (2024). New approaches to the control of *Neodiprion sertifer* (Geoffroy, 1785) (Hymenoptera: Diprionidae). Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2): 192-200

DOI: 10.29050/harranziraat.1407990

### \*Address for Correspondence:

Hilal TUNCA COSİC  
e-mail:  
htunca@ankara.edu.tr

### Received Date:

21.12.2023

### Accepted Date:

13.05.2024

© Copyright 2018 by Harran University  
Faculty of Agriculture. Available on-line  
at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ABSTRACT

*Neodiprion sertifer* (Geoffroy) (Hymenoptera: Diprionidae) is a major pest on *Pinus* spp. in Europe. In this study, new control methods were tried to control *N. sertifer*. The effectiveness of *Bauveria bassiana* (Nostalgist, Bb %1.5 1 x 10<sup>8</sup> kob /ml min, 250 ml/100L), azadirachtin (Nimbecidine, 0.3g azadirachtin/l, 500 ml/da-100L; Nimiks4.5, 40g azadirachtin /l, 200 ml/100L; Neem Azal<sup>®</sup>-T/S, 10 g azadirachtin /l, 300ml/100L) and spinosad (Oread, 480 g spinosad/l, 10ml/100L) was tested on *N. sertifer* larvae. In addition, the effect of the idiobiont parasitoid *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) venom was evaluated. *Bauveria bassiana*, spinosad and azadirachtin were applied to the larvae by spraying method. Different numbers of *B. hebetor* females (1-5 females) were also tested on *N. sertifer* larvae. All experiments were carried out at 25 ± 1°C, 60-70% relative humidity and 16L:8D h photoperiod. After *B. bassiana* application, the survival rates were 71.66% and 61.66% at the 6th day and 7th day. The maximum efficacy was obtained with azadirachtin in Nimiks 4.5 (40 g azadirachtin/l). The highest mortality (100.0%) was found at 24 h after the application of spinosad (10ml/100l). The most effective combination of *B. hebetor* female venom on *N. sertifer* larvae is 5 females and 7 days duration. The study shows that spinosad, azadirachtin and *B. hebetor* female venom can achieve effective control of *N. sertifer* larvae.

**Key Words:** *Neodiprion sertifer*, *Bauveria bassiana*, spinosad, azadirachtin, *Bracon hebetor* venom

### ÖZ

*Neodiprion sertifer* (Geoffroy) (Hymenoptera: Diprionidae) Avrupa'da *Pinus* spp.'nin en önemli zararlısı konumundadır. Bu çalışmada *N. sertifer*'in mücadelesi için yeni mücadele yöntemleri denenmiştir. *Bauveria bassiana* (Nostalgist, Bb %1.5 1 x 10<sup>8</sup> kob /ml min, 250 ml/100L), azadirachtin (Nimbecidine, 0.3g azadirachtin, 500 ml/da-100L, Nimiks4.5, 40g azadirachtin /l, 200 ml/100L; Neem Azal<sup>®</sup>-T/S, 10 g azadirachtin /l,300ml/100L) ve spinosad'ın (Oread, 480 g spinosad/l, 10ml/100L) etkinliği *N. sertifer* larvaları üzerinde denenmiştir. Ayrıca idiobiont parazitoit *Bracon hebetor* (Say) (Hymenoptera: Braconidae)'un venomu da değerlendirilmiştir. *Bauveria bassiana*, spinosad ve azadirachtin larvalara püskürtme yoluyla uygulanmıştır. Farklı sayıdaki *B. hebetor* dişi de (1-5 dişi) *N. sertifer* üzerinde test edilmiştir. Bütün denemeler 25 ± 1°C, 60-70% orantılı nem ve 16:8 saat aydınlık:karanlık koşullarda gerçekleştirilmiştir. *Bauveria bassiana* uygulamasından sonra larvaların yaşam oranı 6. ve 7. günde %71.66 ve %61.66 olarak

bulunmuştur. Azadirachtinde maksimum etkinlik Nimiks 4.5 (40 g azadirachtin/l)'de elde edilmiştir. En yüksek ölüm oranı (%100) spinosad (10ml/100l) uygulamasından 24 saat sonra bulunmuştur. *B. hebetor* dişi venomunun *N. sertifer* larvaları üzerinde etkili olduğu kombinasyon 5 dişi ve 7 gün süredir. Bu çalışma spinosad, azadirachtin ve *B. hebetor* dişi venomunun *N. sertifer* larvaları üzerinde etkili bir kontrol sağlayabileceğini göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Neodiprion sertifer*, *Bauveria bassiana*, spinosad, azadirachtin, *Bracon hebetor* venom.

## Introduction

*Neodiprion sertifer* (Geoffroy) (Hymenoptera: Diprionidae) is a European diprionid species which is the most widely distributed in the world. It was recorded in New Jersey, USA in 1925 and in Ontario, Canada in 1939 (Lyons, 1964; Pschorn-Walcher, 1965; 1982, Griffiths et al., 1984). The larval stage feeds on the needles of pines such as *Pinus banksiana* (jack pine), *Pinus sylvestris* (Scots pine), *Pinus cembra* (Arolla pine), *Pinus contorta* (lodgepole pine) and *Pinus densiflora* (Japanese umbrella pine) (Baş, 1973; Tosun, 1975; Şimşek & Kondur, 2006; Aksu, 2010). *Neodiprion sertifer* can reach epidemic population levels in pine forests (Larsson & Tenow, 1984; Virtanen et al., 1996; Lyytikäinen-Saarenmaa & Tomppo, 2002).

Chemical insecticides have long been used for controlling *N. sertifer* population. However, they cause a many negative health and environmental problems (Yaman et al., 2001). The use of environmentally friendly control methods against *N. sertifer* have been started many years ago. It was first described by Escherich (1913) as natural nucleopolyhedrosis virus (NPV) (Baculovirus) that reduces *N. sertifer* populations. Cunningham & Entwistle (1981) noted that virus infection spreads rapidly in *N. sertifer* population via defecation of larvae. Nevertheless, due to the virus activity, the population of *N. sertifer* was decreased very rapidly. Göktürk & Tozlu (2019) applied different doses of *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki ABTS-35 and Natural-Pyrethrum (obtained from *Chrysanthemum cinerariaefolium*) to *Diprion pini* L. (Hymenoptera: Diprionidae) and *N. sertifer* larvae. Dipel (Bt) 500g/100 l dose was found to be the most effective dose on *N. sertifer*. However, it has been reported that a dose of 600 ml of Spruzit Neu (Pyrethrum) has a significant effect on *N. sertifer* larvae.

Azadirachtin is a tetranortriterpenoid obtained

from the seed of neem tree [*Azadirachta indica* A. Juss (Meliaceae)], is very known commercialized biopesticide and the most successful botanical pesticide that is used against agricultural pests in the scope of Integrated Pest Management programmes. Azadirachtin has an antifeeding, repellent, adult sterility and insect growth regulator effect on the pest. However, it is considered that it has low residual effect and low side-effect on biocontrol agents, predators, and parasitoids (Tunca et al., 2012; Biondi et al., 2013; Abedi et al., 2014, Cura et al., 2019; Kilani-Morakchi et al., 2021).

*Bauveria bassiana* was first obtained from silkworm cadavers, and it is effective on more than 200 insects (Nakahara et al., 2009). *B. bassiana* produces numerous toxins (beauvericin, bassianin, bassianolide, beauverolides, tenellin, oosporein, oxalic acid, calcium oxalate crystals, and many beauvericin analogs) that cause infection in insects (Chelico & Khachatourians, 2008; Naqqash et al., 2016; Wang et al., 2021).

Spinosad is a neurotoxic (effective on the nervous system) insecticide. *Saccharopolyspora spinosa*, an actinomycete bacterium of soil origin, naturally produces metabolites of Spinosyn A (85%, C<sub>42</sub>H<sub>67</sub>NO<sub>16</sub>) and Spinosyn D (15%, C<sub>41</sub>H<sub>65</sub>NO<sub>16</sub>) as a result of fermentation under airless conditions. Spinosad has demonstrated high levels of efficacy against lepidopteran larvae, as well as some Diptera, Coleoptera, Thysanoptera, and Hymenoptera, has a range of effects on insects including as a contact, stomach poison effect, repellent, antifeedant, and growth and mating inhibitor (Anastas et al., 1999; Copping & Menn, 2000; Cisneros et al., 2002; Williams et al., 2003; Mayes et al., 2003; Isman, 2006; Matthews, 2006; Joseph, 2020).

*Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) is a gregarious, idiobiont ectoparasitoid that attacks larvae of several



species of Lepidoptera (Brower et al., 1996; Hagstrum & Smith, 1997). *Bracon hebetor* females paralyze their host before oviposition and then may deposit a different number of eggs near or on the paralyzed hosts. Meanwhile, female parasitoid caused irreversible paralysis of the host insects. (Ghimire, 2008). There have been no studies on the effects of azadirachtin, *B. bassiana*, spinosad and *B. hebetor* venom on the *N. sertifer*. The objective of this study was to evaluate their potential efficacy for future IPM program options.

## Materials and methods

### Insect

Third instar larvae of *Neodiprion sertifer* were collected from Konya-Hüyük province (37.93023°Lat, 31.71091°Long) and transferred to the laboratory. Larvae were reared to the insect rearing box (25 x 35 x 17 cm) with fresh black pine needles and placed in the climate room (25 ± 1°C, RH 65 ± 5% and L : D 16 : 8 h photoperiod).

### Insecticides

In our study, three biorational insecticides, *Beauveria bassiana* (Nostalgist, Bb %1.5 1 x 10<sup>8</sup> kob /ml min, application of dose is 250 ml/100L), azadirachtin (Nimbecidine, 0.3g azadirachtin/l, application of dose is 500 ml/da-100L; Nimiks4.5, 40g azadirachtin /l, application of dose is 200 ml/100L; Neem Azal ®-T/S, 10 g azadirachtin /l, application of dose is 300ml/100L) and spinosad (Oread, 480 g spinosad /l, application of dose is 10ml/100L) were used. However, 1-5 females of *B. hebetor* were used to test the efficacy of *B. hebetor*'s venom.

### Bioassays

For this purpose, one third instar larvae were placed in petri dishes (6.5 cm) with blotting paper. Application doses of each insecticide were applied to 20 third instar larvae using the hand spray bottle. After treatment, the larvae were placed to the climate room (25 ± 1°C, RH 65 ± 5% and L: D 16: 8 h photoperiod) and provided with black pine needles. Each treatment was carried out in triplicate with 20 larvae. A total of 60 larvae were used for one application. 660 larvae were used for 11 treatments, including control. The alive larvae were checked daily during 7 days.

### Statistical analyses

Survival data was calculated as a percentage and were normalized using an arcsine transformation ( $p' = \arcsin \sqrt{p}$ , Zar, 1999). Transformed data were analysed using ANOVA ( $\alpha=0.05$ ) and Tukey's mean separation ( $\alpha=0.05$ ). Statistical analyses were carried out using MINITAB computer software Release 17.

## Results and Discussion

All biorational insecticides had adverse effects on *N. sertifer* at different incubation period after the treatment in this assay (Table- 1) (df=76; F=71.65; P≤0.05). Oread (Spinosad) induced 100% mortality and it was significantly greater than all other treatments (Fig. 1). The highest mortalities of this pest were obtained with Nimiks (40 g azadirachtin /l). The mortality rate increased with the increase of incubation period (Figure 1). The survival rates of *N. sertifer* larvae were found 63.33 %, 78.33 %, 90.00 % at seventh day, in Nimiks, Neem Azal (10g azadirachtin /l) and Nimbecidine (0.3g azadirachtin/l), respectively.

Table 1. Survival rate (%) caused by different treatments to third instar *Neodiprion sertifer* larvae after 1-7 day incubation at 25±1°C.

| Treatments                     | Days    |          |         |          |          |          |         |
|--------------------------------|---------|----------|---------|----------|----------|----------|---------|
|                                | 1       | 2        | 3       | 4        | 5        | 6        | 7       |
| Nostalgist 250 ml/100l         | 100A    | 100A     | 91.67AB | 86.67BC  | 85BC     | 71.67DE  | 61.66EF |
| Nimbecidineb500ml/100l         | 100A    | 100A     | 98.33A  | 95AB     | 95AB     | 91.66AB  | 90 ABC  |
| Nimiks 200 ml/100l             | 91.67A  | 86.67 BC | 85.00BC | 80 CD    | 80CD     | 70DE     | 63.33EF |
| Neem Azal 300ml/100l           | 100A    | 96.67 AB | 93.33AB | 91.66AB  | 88.33BC  | 85 BC    | 78.33D  |
| Oread 10 ml /100l              | 0       | 0        | 0       | 0        | 0        | 0        | 0       |
| <i>Bracon hebetor</i> (1 dişi) | 96.67AB | 93.33 AB | 88.33BC | 88.33 BC | 86.66BC  | 86.67 BC | 83.33BC |
| <i>Bracon hebetor</i> (2 dişi) | 93.33AB | 88.33 BC | 88.33BC | 88.33 BC | 88.33 BC | 83.33 BC | 78.33D  |
| <i>Bracon hebetor</i> (3 dişi) | 80CD    | 73.33DE  | 71.67DE | 66.67 EF | 65EF     | 63.33EF  | 58.33FG |
| <i>Bracon hebetor</i> (4 dişi) | 53.33FG | 48.33GH  | 46.67GH | 38.33HI  | 36.67HI  | 33.33 IJ | 33.33IJ |
| <i>Bracon hebetor</i> (5 dişi) | 30IJ    | 23.33JK  | 18.33KL | 13.33KL  | 11.66KL  | 10L      | 8.33L   |
| Control                        | 100A    | 100A     | 100A    | 100A     | 95AB     | 95AB     | 95AB    |

\*Means followed by a different uppercase letter are significantly different (P< 0.05, ANOVA, Tukey).

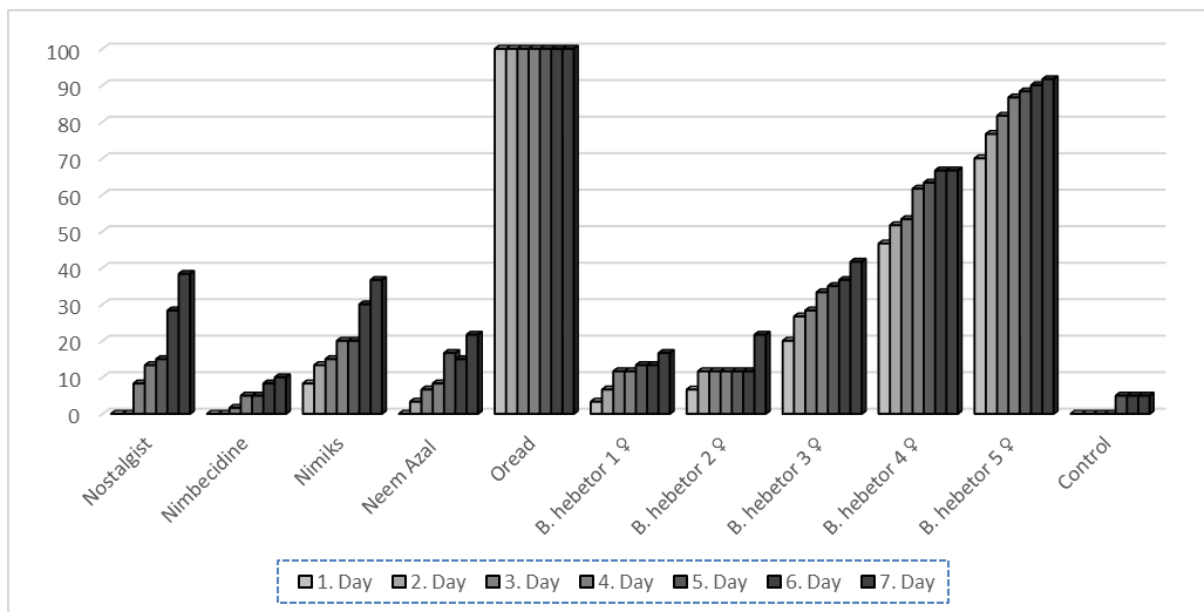


Figure 1. Percent mortality of *Neodiprion sertifer* larvae at different treatments and at 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 days interval.

The mortality induced by the *B. bassiana* after 144 h of incubation. The highest mortality level (38.34%) for the *N. sertifer* larvae was recorded after 7 days with treatment of *B. bassiana* (Figure 1). *Bracon hebetor* venom had a strong effect on the survival of larvae of *N. serifer* (Table 1). The mortality rate was found significantly higher with increased of the incubation period and the number of females. Mortality rates increased

with the treatment of 4 and 5 females (Figure 1). After Oread, *B. hebetor*'s venom has been found to be most effective treatment for *N. sertifer*. However, mortality rate never exceeded 5% in the control (Figure 1).

Biorational insecticides known as “third-generation insecticides” or “reduced-risk insecticides” are derived from natural compounds and have low or no side effects on the

environment or beneficial organisms (Hara, 2000; Horowitz & Ishaaya, 2004; Kapoor & Sharma, 2020). Studies on the impact of biorational insecticides on the *N. sertifer* are limited to baculovirus and pyrethrum (Cunningham & Entwistle, 1981; Podgwaite et al., 1984, Yaman et al., 2001; Göktürk & Tozlu, 2019). In this study, the most effective result was obtained with spinosad among the tested insecticides. All larvae were dead within the first 24 hours (Table 1, Figure 1). Spinosad treatments were also toxic to *Mamestra configurata* Walker (Lepidoptera: Noctuidae), *Phyllotreta cruciferae* Goeze (Coleoptera: Chrysomelidae) (Elliot et al., 2007). Kowalska (2008) noted that all concentrations of spinosad (0.2%, 0.1% and 0.05%) caused mortality both *Leptinotarsa decemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae) adults and larvae depending on the temperature. Maral (2021) reported that, the highest mortality rate of *Stefanitis pyri* (Fabricius) (Heteroptera: Tingidae) adults was found in spinosad after that azadirachtin and kaolin.

In this study, the effect of azadirachtin varied depending on the rate of active substance, dose and incubation period. Nimiks (40 g azadirachtin/l) was also found to be the more effective than the other azadirachtin insecticides (Table 1). It can be preferred in the control of *N. sertifer*. Kraiss & Cullen (2008) noted that two neem insecticides (neem seed oil and azadirachtin) were effective in causing nymphal mortality of *Aphis glycines* (Matsumura) (Heteroptera: Aphididae) (77% by neem oil and 80% by azadirachtin). Neem oil formulation also presented significant efficacy on *Idioscopus clypealis* (Lethierry,) (Hemiptera: Cicadellidae), a mango pest (Adnan et al., 2014). Lin et al. (2021) noted that azadirachtin was effective on *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera:Noctuidae) and *Rhopalosiphum maidis* (Fitch) (Heteroptera: Aphididae).

*Beauveria bassiana* is the most studied biorational insecticides. Like azadirachtin, *B. bassiana* was applied for the first time against *N. sertifer*. The highest mortality was obtained on the 7th day (38.34 %) (Table 1, Figure 1). A high

case mortality rate was not observed in *N. sertifer* larvae. Studies on *Beauveria* have focused especially on the order Lepidoptera. Wraight et al. (2010) reported that *Obstrinia nubilalis* (Hübner) (Pyralidae), *Helicoverpa zea* (Boddie) (Noctuidae) and *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Noctuidae) (Lepidoptera) are highly susceptible of *B. bassiana* strains. Mortality of *Galleria mellonella* (L.) (Lepidoptera: Pyralidae) was %0, %8 and %10 at 24, 72 and 120 h, respectively (Tunçsoy et al., 2020). Gao et al. (2022) reported that *B. bassiana*-PfBb can be used as a bio-insecticide to control young larvae of *S. frugiperda*. *B. bassiana* (BMAUM-M6-4) isolate was caused significant infection in early and late instar larvae of pine processionary (Gök et al., 2018). In another study, it was determined that nymphs and adults of *Palomena prasina* L. (Heteroptera: Pentatomidae) were susceptible to *B. bassiana* (Yiğit and Saruhan, 2022). Besides, side effect studies were mostly conducted on parasitoids in the Hymenoptera order, such as *Encarsia formosa* (Gahan) (Hymenoptera: Aphelinidae) (Labbé et al., 2009), *Trichogramma cacoeciae* (March) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) (Tunçsoy et al., 2020), *Coptera haywardi* (Oglobin) (Hymenoptera: Diapriidae) (Martínez-Barrera et al., 2020), *Trichogramma dendrolimi* (Mastumura) (Kandil, 2022). However, no study was found on a pest belonging to the order Hymenoptera.

Parasitoid venoms compose of a complex mixture of proteinaceous and non-proteinaceous components that thought as agrichemicals to improve pest management (Morreau & Asgari, 2015). The main effect of toxin (venom of ectoparasitoid) is the influence of short and long-term paralysis in the host during the larval and nymphal stages to start developmental block. On the other hand, toxin might have different roles during induction, such as restraining the immune system or disrupting development (Edwards et al., 2006; Price et al., 2009; Tian et al., 2010; Kryukova et al., 2011).

Idiobiont parasitoid *Bracon hebetor* causes paralysis of host (Quistad et al., 1994). Three proteins were determined in the venom, two of

them (Brh-I and -II) being insecticidal when injected into lepidopteran larvae (Ferber et al., 2001). The constituents of the venom, which comprise of proteins from 3.4–200 kDa have not been well characterized (Gnatzyet al., 2000). In this study, effect of *B. hebetor*'s venom was investigated on another Hymenoptera species, *N. sertifer*. It was found that *B. hebetor* paralyzed larvae of *N. sertifer* larvae but did not deposit eggs. The level of paralysis was increased by the number of parasitoid females. Mortality rates were found to be 66.67 % and 91.67%, respectively with application of 4 and 5 females at 7th day (Table1, Figure 1). Parasitoid female venom has a highly toxic effect on *N. sertifer*'s larvae.

## Conclusion

As a result, spinosad and *B. hebetor* female venom can offer effective control of *N. sertifer*'s larvae and prevent serious damage to *Pinus* spp. Azadirachtin and *B. bassiana* can be used with the combination of the *B. hebetor* venom of in an integrated pest management program.

**Acknowledgements:** All authors acknowledged the Konya General Directorate of Forestry, for their support in providing necessary facilities for the study.

**Conflict of Interest:** There is no conflict of interest.

**Author Contributions:** Hilal TUNCA COSİC contributed to investigations, writing, editing, and data analysis; Damla ÇAYCI helped in methodology and contributed to the rearing of insects. All authors have read and approved the final manuscript.

## References

- Abedi, Z., Saber, M., Gharekhani, G., Mehrvar, A., Kamita, S.G., 2014. Lethal and Sublethal Effects of Azadirachtin and Cypermethrin on *Habrobracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Journal of Economic Entomology*, 107(2):638-45. doi: 10.1603/EC13227.
- Adnan, S., Uddin, M., Alam, M., Islam, M., Kashem, M., Rafii, M, et al., 2014. Management of mango hopper, *Idioscopus clypealis*, using chemical insecticides and neem oil. *Science World Journal*, 709614. doi: 10.1155/2014/709614
- Aksu, Y., 2010. Ağaçlandırma Sahalarında *Pinus sylvestris*'lerde Önemli Zararlar Yapan *Neodiprion sertifer* (Geoff.) (Hymenoptera; Diprionidae) Üzerine Yapılan Araştırma. Çevre ve Orman Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü Orman Koruma ve Yangınla Mücadele Dairesi Başkanlığı Yayınları, Ankara
- Anastas, P., Kirchhoff, M., Williamson, T., 1999. Spinosad a new natural product for insect control. *Green Chemistry Award*, <http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/1999/GC/A906794I>
- Baş, R., 1973. Türkiye'de Orman Ağaçlarına Zarar Yapan Zar Kanatlılar (Hymenoptera) Üzerine Araştırmalar. Orman Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Biondi, A., Zappalà, L., Stark, J.D., Desneux, N., 2013. Do Biopesticides Affect the Demographic Traits of a Parasitoid Wasp and Its Biocontrol Services through Sublethal Effects? *PLoS ONE* 28(9): e76548. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076548>
- Brower, J.H., Smith, L., Vail, P.V., Flinn, P.W., 1996. Biological control In B. Subramanyam, & D.W. Hagstrum (Eds). *Integrated Management of Insects in Stored Products*. (pp. 223- 286) Marcel Dekker, New York, USA.
- Chelico, L., Khachatourians, G.G., 2008. Isolation and characterization of nucleotide excision repair deficient mutants of the entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98: 93–100. doi: 10.1016/j.jip.2007.10.006
- Cisneros, J., Goulson, D., 2002. Derwent LC, Penagos DI, Hernandez O, Williams T Toxic effects of spinosad on predatory insects. *Biological Control*, 23: 156-163. <https://doi.org/10.1006/bcon.2001.1000>
- Copping, L.G., Menn, J.J., 2000. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*, 56: 651-676. [https://doi.org/10.1002/1526-4998\(200008\)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/1526-4998(200008)56:8<651::AID-PS201>3.0.CO;2-U)
- Cunningham, J.C., Entwistle, P.F., 1981. Control of sawflies by baculovirus. In: Burges H.D., editor. *Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970–1980*. Academic Press, New York,. p. 379–407.
- Cura, M.S., Gençer, N.S., 2019. Side Effects of Azadirachtin on Some Important Beneficial Insects in Laboratory. *Journal of Biological & Environmental Sciences*, 13(37): 39-47.
- Edwards, J.P., Bell, H.A., Audsley, N., Marris, G.C., Kirkbride-Smith, A., Bryning, G., Frisco, C., Cusson, M., 2006. The ectoparasitic wasp *Eldophus pennicornis*

- (Hymenoptera: Eulophiidae) uses instar-specific endocrine disruption strategies to suppress the development of its host *Lacanobia oleracea* (Lepidoptera: Noctuidae) *Journal of Insect Physiology*, 52:1153–1162. doi: 10.1016/j.jinsphys.2006.08.003.
- Elliott, R., Benjamin, M., Gillott, C., 2007. Laboratory studies of the toxicity of spinosad and deltamethrin to *Phyllotreta cruciferae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Canadian Entomologist*, 139: (4) 534-544. <https://doi.org/10.4039/n06-070>.
- Escherich, K., 1913. Neves uber polyaderhrankheiten. *Naturut Z Land Forstwirtschaft*, 11: 86.
- Ferber, M., Horner, M., Cepok, S., Gnatzy, W., 2001. Digger wasp versus cricket: Mechanisms underlying the total paralysis caused by the predator's venom. *Journal of Neurobiology*, 47:207–222. doi: 10.1002/neu.1028.
- Gao, Y.P., Luo, M., Wang, X.Y., He, X.Z., Lu, W., Zheng, X.L., 2022. Pathogenicity of *Beauveria bassiana* PfBb and Immune Responses of a Non-Target Host, *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insects*, 13: 914. <https://doi.org/10.3390/insects13100914>.
- Ghimire, M.N., 2008. Reproductive Performance of the Parasitoid *Bracon hebetor* Say (Hymenoptera: Braconidae) On Various Host Species of Lepidoptera. Ph D Thesis.
- Gnatzy, W., Volkandt, W., 2000. Venom gland of the digger wasp *Liris niger*: Morphology, ultrastructure, age-related changes and biochemical aspects. *Cell and Tissue Research*, 302:271–284. <https://doi.org/10.1007/s004410000282>
- Gök, S., Güven, Ö., Karaca, İ., 2018. Entomopatojen fungus *Beauveria bassiana*'nın çam keşiböceği (*Thaumetopoea wilkinsoni* Tams)'nin farklı dönemlerine etkileri. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 9 (1): 7-19.
- Göktürk, T., Tozlu, G., 2019. The Effect of Pyrethrum and *Bacillus thuringiensis* Biopesticides on *Diprion pini* L. and *Neodiprion sertifer* (Geoffr.) (Hymenoptera: Diprionidae) Larvae. *Pakistan Journal of Zoology*, 51(3): 989-994. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.3.989.994>
- Griffiths, K.J., Cunningham, J.C., Otvos, I.S., 1984. *Neodiprion sertifer* (Geoffroy), European pine sawfly (Hymenoptera: Diprionidae). In: Kelleher JS, Hulme MA, editors. *Biological control programmes against insects and weeds in Canada 1969-1980*. Slough, UK: Commonwealth Agricultural Bureau, 1984, p. 331-340.
- Hara, A.H., 2000. Finding alternative ways to control alien pests - Part 2: New insecticides introduced to fight old pests. *Hawaii Landscape*, 4 (1): 5.
- Hagstrum, D.W., Smith, B.J., 1997. Host finding ability of *Bracon hebetor* and its influence upon adult parasite survival and fecundity. *Environmental Entomology*, 6: 437-439. <https://doi.org/10.1093/ee/6.3.437>
- Horowitz, A.R., Ishaaya I., 2004. Biorational Insecticides – Mechanisms, Selectivity and Importance in Pest Management Programs. In: A.R. Horowitz, & I. Ishaaya (Eds.) *Insect Pest Management- Field and Protected Crops* (pp.1-28) Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Isman, M.B., 2006. Botanical insecticides, deterrents and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review Entomology*, 51 (1): 45-66. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151146>
- Joseph, S.V., 2020. Repellent effects of insecticides on *Stephanitis pyrioides* Scott (Hemiptera: Tingidae) under laboratory conditions. *Crop Protection*, 127: 104985. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104985>
- Kandil, C., 2022. Researchs on the Effect of Some Biorational Preparations on the Biological Characteristics of *Trichogramma dendrolimi* (Matsumura) (Hymenoptera: Trichogrammatidae) Ankara University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Plant Protection, Master Thesis.
- Kapoor, B., Sharma, K., 2020. Biorational Pesticides: An Envirosafe Alternative to Pest Control. *Indian Farmer*, 7(08): 722-731.
- Kilani-Morakchi, S., Morakchi-Goudjil, H., Sifi, K., 2021. Azadirachtin-Based Insecticide: Overview, Risk Assessments, and Future Directions. *Frontiers in Agronomy*, 3:676208. <https://doi.org/10.3389/fagro.2021.676208>
- Kowalska, J., 2008. Laboratory Studies of the Activity of Spinosad against *Leptinotarsa decemlineata* (Say) Depending on Different Temperature. 16th IFOAM Organic World Congress, Modena, Italy, June 16-20.
- Kraiss, H., Cullen, E.M., 2008. Insect growth regulator effects of azadirachtin and neem oil on survivorship, development and fecundity of *Aphis glycines* (Homoptera: Aphididae) and its predator, *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Pest Management Science*, 64, 660–668. doi: 10.1002/ps.1541
- Kryukova, N., Dubovskiy, I., Chertkova, E., Vorontsova, Y., Slepneva, I., Glupov, V., 2011. The effect of *Habrobracon hebetor* venom on the activity of the prophenoloxidase system, the generation of reactive oxygen species and encapsulation in the haemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 57:769–800. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2011.03.008>
- Labbé, R.M., Gillespie, D.R., Cloutier, C., Brodeur, J., 2009. Compatibility of an entomopathogenic fungus with a

- predator and a parasitoid in the biological control of greenhouse whitefly. *Biocontrol Science Technology*, 19: 429–446. <https://doi.org/10.1080/09583150902803229>.
- Larsson, S., Tenow, O., 1984. Areal distribution of a *Neodiprion sertifer* (Hym, Diprionidae) outbreak on Scots pine as related to stand condition. *Ecography*, 7 (2):81-90. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.1984.tb01108.x>
- Lin, S., Li, S., Liu, Z., Zhang, L., Wu, H., Cheng, D., Zhang, Z., 2021. Using Azadirachtin to Transform *Spodoptera frugiperda* from Pest to Natural Enemy. *Toxins*, 13:541. <https://doi.org/10.3390/toxins13080541>
- Lyons, L.A., 1964. The European pine sawfly, *Neodiprion sertifer* (Geoff.)(Hymenoptera: Diprionidae). A review with emphasis on studies in Ontario. *Proceedings of the Entomological Society Ontario*, 94:5-37.
- Lyytikäinen-Saarenmaa, P., Tomppo, E., 2002. Impact of sawfly defoliation on growth of Scots pine *Pinus sylvestris* (Pinaceae) and associated economic losses. *Bulletin Entomology Resersearch*, 92: 137–140. DOI: 10.1079/BER2002154.
- Maral, H., 2021. Effect of spinosad, azadirachtin and kaolin on *Stephanitis pyri* (Fabricius, 1775) (Hemiptera: Tingidae) under laboratory conditions. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 45 (1): 87-97. <https://doi.org/10.16970/entoted.770859>
- Martínez-Barrera, O.Y., Toledo, J., Cancino, J., Liedo, P., Gómez, J., Valle-Mora, J., Montoya, P., 2020. Interaction Between *Beauveria bassiana* (Hypocreales: Cordycipitaceae) and *Coptera haywardi* (Hymenoptera: Diapriidae) for the Management of *Anastrepha obliqua* (Diptera: Tephritidae). *Journal Insect Science*, 20(2):6. doi: 10.1093/jisesa/ieaa010. PMID: 32186740; PMCID: PMC707178
- Matthews, G.A., 2006. *Pesticides: Health, Safety and the Environment*. Blackwell Publishing, Oxford, UK,
- Mayes, M.A., Thompson, G.D., Husband, B., Miles, M.M., 2003. Spinosad toxicity to pollinators and associated risk. *Environmental Contamination and Toxicology*, 179:37-71. doi: 10.1007/0-387-21731-2\_2. PMID: 15366583.
- Moreau, S.J., Asgari, S., 2015. Venom Proteins from Parasitoid Wasps and Their Biological Functions. *Toxins*, 7(7):2385-412. doi: 10.3390/toxins7072385
- Nakahara, Y., Shimura, S., Ueno, C., Kanamori, Y., Mita, K., Kiuchi, M., et al., 2009. Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry. *Dev. Comp. Immunol.* 33: 439–448. doi: 10.1016/j.dci.2008.09.005
- Naqqash, M.N., Gökçe, A., Bakhsh, A., Salim, M., 2016. Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. *Parasitology Research*, 115: 1363–1373. doi: 10.1007/s00436-015-48989
- Quistad, G.B., Nguyen, Q., Bernasconi, P., Leisy, D.J., 1994. Purification and characterization of insecticidal toxins from venom glands of the parasitic wasp, *Bracon hebetor*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 24: 955-961. doi: 10.1016/0965-1748(94)90132-5.
- Podgwaite, J.D., Rush, P., Hall, D., Walton, A.S., 1984. Efficacy of the *Neodiprion sertifer* (Hymenoptera: Diprionidae) Nucleopolyhedrosis Virus (Baculovirus) Product, Neoček-S. *Journal of Economic Entomology*, 77(2): 525-528. <https://doi.org/10.1093/jee/77.2.525>
- Price, D., Bell, H., Hinchliffe, G., Fitches, E., Weaver, R., Gatehouse, J.A., 2009. venom metalloproteinase from the parasitic wasp *Eulophus pennicornis* is toxic towards its host, tomato moth (Lacanobia oleraceae) *Insect Molecular Biology*, 18:195–202. doi: 10.1111/j.1365-2583.2009.00864.x.
- Pschorn-Walcher, H., 1965. The ecology of *Neodiprion sertifer* (Geoffr.)(Hym.: Diprionidae) and a review of its parasite complex in Europe. *Technical Bulletin, Commonwealth Institute of Biological Control*, 5:33-97.
- Pschorn-Walcher, H., 1982. Suborder Symphyta, sawflies. In: Schwenke W, editor. *Die Forstschädlinge Europas. 4. Hautflügler und Zweiflügler*. Hamburg, Germany: Paul Parey, 66-129.
- Şimşek, Z., 2006. Kondur Y. Çankırı Ormanlarının Zararlı Böcekleri ve Mücadele Yöntemleri. *Gazi Üniversitesi, Orman Fakültesi Dergisi*, 6(1): 105-107.
- Tian, C., Wang, L., Ye, G., Zhu, S., 2010. Inhibition of melanization by a *Nasonia defensin*-like peptide: Implications for host immune suppression. *Journal Insect Physiology*, 56:1857–1862. doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.08.004.
- Tosun, İ., 1975. Akdeniz Bölgesi İğne Yapraklı Ormanlarında Zarar Yapan Böcekler ve Önemli Türlerin Parazit ve Yırtıcıları Üzerinde Araştırmalar. *Orman Bakanlığı Orman Genel Müdürlüğü Yayınları*, İstanbul.
- Tunca, H., Kılınçer, N., Özkan, C., 2012. Side-effects of some botanical insecticides and extracts on the parasitoid, *Venturia canescens* (Grav.) (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 36 (2): 205-214.
- Tuncsoy, B.S., Bueno-Pallero, F., Dionisio, L., Neto, L., Ozalp, P., 2020. Effect of *Beauveria bassiana* on *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) and Its Parasitoid *Trichogramma cacoeciae*. *Karaelmas Fen ve Müh Dergisi*, 10(2):131-136.
- Virtanen, T., Neuvonen, S., Nikula, A., Varama, M., Niemela, P., 1996. Climate change and the risk of *Neodiprion sertifer* outbreaks on Scots pine. *Silva Fennica*, 30: 169–177.
- Wang, H., Peng, H., Li, W., Cheng, P., Gong, M., 2021. The Toxins of *Beauveria bassiana* and the Strategies to Improve Their Virulence to Insects. *Front*

- Microbiology, 12:705343. doi: 10.3389/fmicb.2021.705343
- Williams, T., Valle, J., Vinuela, E., 2003. Is the naturally derived insecticide spinosad® compatible with insect natural enemies? *Biocontrol Science Technology*, 13 (5): 459-475. <https://doi.org/10.1080/0958315031000140956>.
- Wraight, S.P., Ramos, M.E., Avery, P.B., Jaronski, S.T., 2010. Vandenberg JD. Comparative virulence of *Beauveria bassiana* isolates against lepidopteran pests of vegetable crops. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103: 186–199. doi: 10.1016/j.jip.2010.01.001
- Yaman, M., Nalçacıoğlu, R., Demirbağ, Z., 2001. Viral Control of the European Pine Sawfly, *Neodiprion sertifer* (Geoffroy) in Turkey. *Turkish Journal of Biology*, 25 419-425.
- Yiğit, Ş., Saruhan, İ., 2022. Entomopatojenik funguslar; *Beauveria bassiana*, *Isaria fumosorosea* ve *Metarhizium anisopliae*'nin *Palomena prasina* L. (Heteroptera: Pentatomidae)'ya karşı etkileri. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 25 (5): 1051-1060. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog. vi. 938399>
- Zar, J.H., 1999. Biostatistical analysis. – Prentice-Hall, upper Sadle River, NJ,.



# *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae)'de pyridaben direnç oranı ve estera, GST ve P450 monooksijenaz enzim ilişkileri

## *Relationships between pyridaben resistance ratio and esterase, GST and P450 monooxygenase enzyme in Tetranychus urticae Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae)*

Gizem BERBER TORTOP<sup>1\*</sup> , Sibel YORULMAZ<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi, Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bilecik, Türkiye

<sup>2</sup>Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Isparta, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-3090-3705>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0003-3836-5673>

### To cite this article:

Berber Tortop, G. & Yorulmaz, S. (2024). *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (acari: tetranychidae)'de pyridaben direnç oranı ve estera, gst ve p450 monooksijenaz enzim ilişkileri. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2): 201-208

DOI: 10.29050/harranziraat.1416292

### \*Address for Correspondence:

Gizem BERBER TORTOP

e-mail:

gizem.berber@bilecik.edu.tr

### Received Date:

08.01.2024

### Accepted Date:

16.05.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ÖZ

İki noktalı kırmızıörümcek [*Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae)], çeşitli bitki türlerinde beslenen ve tarım ürünlerinde ekonomik kayıp oluşturan zararlı organizmalardan biridir. Bu zararlının mücadelesinde sıklıkla sentetik kimyasalların kullanımı tercih edilmektedir. METI akarisitleri, yaygın olarak kullanılan kimyasal maddeler arasındadır. Yapılan çalışmada, *T. urticae* (GSS) popülasyonu pyridaben ile 10 kez selekte edilmiştir. Denemelerde LC<sub>50</sub> değerleri, 1 kontrol+7 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekerrür ve her tekerrürde 25 birey olacak şekilde belirlenmiştir. Ölü canlı sayımları 24 saat sonra yapılmıştır. Ayrıca, laboratuvar koşullarında pyridaben ile selekte edilmiş *T. urticae* bireylerinde mikro plaka okuyucu kullanarak estera, P450 monooksijenaz ve glutatyon S-transferaz (GST) enzim aktiviteleri belirlenmiştir. *T. urticae* (GSS) popülasyonunun pyridaben ile 10 kez selekte edilmesi sonucu direnç oranının 64.2 kat arttığı tespit edilmiştir. Başlangıç, Seleksiyon 5 (S5) ve Seleksiyon 10 (S10) popülasyonlarında estera aktiviteleri sırasıyla 10.38, 11.45, 17.82 mOD min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein; P450 monooksijenaz aktiviteleri 0.0018, 0.0033 ve 0.0068 mOD min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein; GST aktiviteleri ise 3.0, 3.1 ve 3.5 mOD min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, zararlının pyridaben etken maddesine karşı direnç geliştirmesinde estera ve monooksijenaz enzimlerinin rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Zararlı organizmaların duyarlılık düzeylerinin düzenli olarak izlenmesi ve direncin kontrol altına alınması, tarımsal üretimde verimliliği ve bitki sağlığını korumak adına oldukça önemli bir adımdır.

**Anahtar Kelimeler:** Detoksifikasyon enzimleri, direnç, kimyasal mücadele, METI akarisitleri, *Tetranychus urticae*

### ABSTRACT

The two-spotted spider mite [*Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae)] is a pest organism that feeds on various plant species and has become a serious problem in the agricultural sector. Chemical control methods are often preferred in the control against this pest. METI acaricides are among the commonly used chemicals. In the study, the *T. urticae* (GSS) population was selected 10 fold with pyridaben. In the experiments, LC<sub>50</sub> values were determined as 1 control + 7 concentrations, 3 replicates for each concentration and 25 individuals in each replicate. Dead live counts were determined after 24 hours. In addition, esterase, P450 monooxygenase and glutathione S-transferase (GST) enzyme activities were determined in pyridaben-selected *T. urticae* under laboratory conditions using a microplate reader. It was found that the resistance rate increased 64.2-fold when the *T. urticae* (GSS) population was selected 10 folds with pyridaben. The esterase activities were 10.38, 11.45, 17.82 mOD min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein; P450



monooxygenase activities were 0.0018, 0.0033 and 0.0068 mOD min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein; GST activities were 3.0, 3.1 and 3.5 mOD min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein, respectively, in the initial, Selection 5 (S5) and Selection 10 (S10) populations. These results suggest that esterase and monooxygenase enzymes may play a role in the pest's resistance to pyridaben. Regular monitoring of the susceptibility levels of pest organisms and controlling resistance is an important step to maintain productivity and plant health in agricultural production.

**Key Words:** Detoxification enzymes, resistance, chemical control, METI acaricides, *Tetranychus urticae*

## Giriş

İki noktalı kırmızıörümcek *Tetranychus urticae* Koch, 1836 (Acari: Tetranychidae), dünyada yaygın olarak görülen en önemli zararlı türlerden biridir. Geniş konukçu dizilimi ve küresel ölçekte yaygınlığı nedeniyle tarım sektöründe yüksek düzeyde ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Assouguem ve ark., 2022).

Sentetik kimyasallardan akarisitler, fitofag akar popülasyonlarının yönetiminde kritik bir rol oynayarak birçok tarımsal üründe ortaya çıkabilecek önemli verim kayıplarını azaltmada etkili olmaktadır (Van de Vrie ve ark., 1972; Jeppson ve ark., 1975; Nauen ve ark., 2001). METI (Mitokondriyal Elektron Taşıma İnhibitörü) akarisitler, fenazaquin, fenpyroximate, pyridaben ve tebufenpyrad gibi bileşenleri içerir ve bu akarisitler 1990'lı yıllarda geliştirilmiş olup tetranychid, tarsonemid ve eriophyid akar türlerinin tüm aşamalarına karşı etkili bir kontrol sağlamaktadırlar (Kim ve ark., 2006; Tomlin, 2003). METI-akarisitlerin özelliği, mitokondriyal solunum zincirinin kompleks I'ini (NADH: ubikinon oksidoredüktaz) engelleyerek çalışmalarıdır (Hollingworth ve Ahammadsahib, 1995; Wood ve ark., 1996). Bu etki, akarların enerji üretim mekanizmasını hedef alarak, popülasyonlarını kontrol etmek için etkili bir strateji sunmaktadır. Böylece, tarım ürünlerinde verim kaybını önlemek ve fitofag akarların olumsuz etkilerini azaltmak amacıyla METI-akarisitler yaygın olarak kullanılmaktadır. Pyridaben, 1984 yılında Nissan Chemical tarafından keşfedilen bir piridazin bileşiğidir. Ticarileştirilmesi ise 1991 yılında gerçekleşmiştir (Dekeyser, 2005). Ancak, pyridaben gibi METI akarisitlerinin yaygın kullanımı, bazı akar popülasyonlarında direnç gelişimine neden olmuştur. Bu direnç mekanizmalarının anlaşılması, etkili kontrol

stratejilerinin geliştirilmesi için önemlidir. Direnç yönetimi, sürdürülebilir tarım uygulamaları ve çeşitli pestisit kullanım stratejilerini içerir.

Tetranychidae üyelerinde pestisit direnci genellikle genetik olarak sabit mekanizmalar aracılığıyla ortaya çıkar. Bu mekanizmaların başında, pestisitleri etkisiz hale getiren metabolik detoksifikasyon enzimleri gelmektedir. Bu enzimler içerisinde sitokrom P450 monooksijenazlar (P450), esterazlar (EST) ve glutatyon-S-transferazlar (GST) yer almaktadır. Bunun yanı sıra, pestisitlerin etkilediği belirli hedef bölgelerdeki genetik mutasyonlar da direnç gelişimine katkı sağlamaktadır (Knowles, 1997; Van Pottelberge ve ark., 2009). Model organizmalarda METI I akarisitleri ile yapılan genetik çalışmalarda nokta mutasyonların PSST ve 49 kDa alt ünitelerinde meydana geldiği belirlenmiştir (Lümmen, 2007). Bajda ve ark., (2017) yaptıkları çalışmada ilk defa METI I (pyridaben, tebufenpyrad ve fenpyroximate) akarisit dirençli *T. urticae*'de PSST alt ünitesinde dirençten sorumlu olan H92R mutasyonunu belirlemişlerdir. Bu mutasyonun *T. urticae*'de artan METI direncinden sorumlu olduğu belirlenmiştir. *Tetranychus urticae*'de artan karboksil esteraz aktivitesinin pyridaben direnci ile ilişkili olduğu bildirilmiş (Van Pottelberge ve ark., 2009) olmasına rağmen genellikle P450 ile detoksifikasyonun pyridaben direncinin başlıca mekanizması olduğu sıklıkla rapor edilmiştir (Kim ve ark., 2006; Stumpf ve Nauen, 2001; Sugimoto ve Osakabe, 2014).

Direnç mekanizmaları, zararlı popülasyonunun pestisitlere karşı direncini artırarak, bu organizmaların kontrolünü zorlaştırır. Bu nedenle, pestisit kullanımıyla ilgili stratejiler geliştirilirken, direnç mekanizmalarının anlaşılması büyük bir önem taşır. Hedef akarların akarisitlere maruz

kalmayla ilgili güvenilir temel verilere sahip olmak, akarisit kullanımının düzenlenmesinde temel bir faktördür (Badawy ve ark., 2022). Bu yüzden seleksiyon çalışmaları yapılarak direnç mekanizmalarını araştırmak önem kazanmaktadır. Yapılan çalışmada, laboratuvar koşullarında pyridaben ile selekte edilmiş *T. urticae* bireylerinde duyarlılık düzeyi ile EST, GST ve P450 enzimleriyle ilişkileri değerlendirilmiştir.

## Materyal ve Yöntem

### *Tetranychus urticae* popülasyonunun orijini ve yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan hassas *T. urticae* German Susceptible Strain (GSS) popülasyonu Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü iklim odalarında 2001 yılından itibaren herhangi bir pestisite maruz kalmadan 26±1°C sıcaklıkta, %60-65 orantılı nem ve 16:8 saat ışıklandırma periyodunda yetiştirilmektedir.

### İnsektisit

Çalışmada pyridaben etken maddesi içeren PUZZLE 20 WP (Hektaş, Türkiye) ticari preparatı kullanılmıştır.

### Seleksiyon çalışmaları

Seleksiyon çalışmalarında Yorulmaz Salman ve Sarıtaş, (2014) tarafından uygulanan metot kullanılmıştır. *Tetranychus urticae*'nin hassas popülasyonu pyridaben seleksiyonu için başlangıç popülasyonu olarak kullanılmıştır. Seleksiyon işlemi için öncelikle *T. urticae* popülasyonunda pyridabene karşı LC<sub>50</sub> değeri belirlenmiştir. LC<sub>50</sub> denemeleri 1 kontrol+7 konsantrasyon, her konsantrasyon için 3 tekrür olacak şekilde kurulmuştur. Pyridaben uygulama konsantrasyonu belirlenirken ilk konsantrasyonda %90'dan az kontrol grubunda ise %10'dan fazla ölüm olmaması dikkate alınmıştır. Deneme süresinde yaprağın nem ihtiyacını karşılayabilmesi amacıyla Petri içerisindeki pamuklar düzenli olarak ıslatılmıştır. Pamuk üzerine ise 3 cm çapında fasulye yaprak diskleri konulmuştur. Her

tekrür için 9 cm çapındaki Petrilere içerisinde 25 adet *T. urticae* ergin dişi eklenmiştir. Her konsantrasyon için %50 seyreltilerek hazırlanan ilaç konsantrasyonları ile Petrilere ilaçlama kulesi (Burkard Scientific, İngiltere) yardımıyla 1 bar basınçta yaprak yüzeyine 2 mL (1,95 ± 0,05 mg akarisit çözeltisi/cm<sup>2</sup>) ilaç gelecek şekilde ilaçlama yapılmıştır. Ölü- canlı sayımları 24 saat sonra yapılmıştır. Bu verilerden yararlanılarak kırmızıörümcek popülasyonlarının LC<sub>50</sub> değerleri PoloPlus bilgisayar paket programında hesaplanmıştır. *T. urticae* popülasyonu için seleksiyon konsantrasyonu olarak LC<sub>60</sub> değerleri kullanılmıştır. Yine Yorulmaz Salman ve Sarıtaş (2014) tarafından uygulanan metota göre seleksiyon işlemi için, tabanında pamuk bulunan 9 cm çapındaki Petrilere üzerindeki yaprak disklere 50 adet *T. urticae* bireyi aktarılmıştır. LC<sub>60</sub> konsantrasyonu Petrilere ilaçlama kulesinde 1 bar basınç altında yaprak üzerine 2 mL olacak şekilde uygulanmıştır. Petrilere 26±1°C sıcaklıkta %60-65 nem ve 16:8 (A/K) fotoperiyot koşullarında 24 saat süreyle bırakılmıştır. Uygulamadan 24 saat sonra canlı kalan bireyler temiz fasulye bitkisi üzerine aktarılmıştır. LC<sub>60</sub> konsantrasyonu her seleksiyon popülasyonu için yeniden belirlenerek popülasyonlar seleksiyon baskısına maruz bırakılarak direnç kazandırılmıştır (Seleksiyon araları ortalama olarak 20-30 gün arasındadır).

### EST, P450 ve GST enzimlerinin belirlenmesi

EST aktivitesinin belirlenmesinde; Stumpf and Nauen (2002) yöntemi kullanılmış; 100 µL sodyum fosfat tampon (0.1M, pH7.5) hazırlanarak içerisinde % 1 oranında Triton X-100 eklenmiştir. Çözelti içerisinde 20 adet kırmızıörümcek dişi eklenerek homojenize edilmiştir. İçerisinde dişi bireylerin ezildiği çözelti daha sonra 10000 g ve +4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Su ile 10 kez seyreltilen supernatant ve fosfat tampondan (0.2 M, pH 6) ayrı ayrı olmak üzere 25'er µL mikropipetle hücrelerine konulmuştur. Çalışmada reaksiyon 200 µL substrat solüsyonunun (Substrat solüsyonu 30 mg fast blue RR tuzunun 50 ml 0.2 M sodyum fosfat buffer'da çözülmesi ve bu karışıma 500 µl 100 Mm α - naphthyl acetate'ın eklenmesiyle elde

edilmiştir) eklenmesiyle başlatılmıştır. EST enzim aktivitesi Versamax kinetik mikropilaka okuyucuda (Molecular Devices) 23°C'de ve 450 nm'de 10 dakika ölçülmüştür.

Stumpf and Nauen (2002) yöntemi kullanılarak GST enziminde ise öncelikle 300 µL Tris HCL tampon (0.05M, pH:7.5) hazırlanmıştır. Bu çözelti içerisine otuz adet dişi birey eklenmiştir. Dişi bireyler bu çözelti içerisinde homojenize edilmiştir. Karışım 10000g, +4°C'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Mikropilaka hücrelerine 100 µL supernatant, 100 µL 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) ve 100 µL glutathion (GSH) konulmuştur. Final konsantrasyonda hücrelerde 0.2 mM GSH ve 0.4 mM CDNB bulunmaktadır. GST enzimi aynı cihazda kinetik olarak 340 nm, 25 °C'de, 5 dakika belirlenmiştir.

P450 enziminin belirlenmesinde substrat olarak pnitroanisol (PNOD) ve (Rose ve ark., 1995) yöntemi uyarlanarak kullanılmıştır. Bu yöntem için öncelikle, 50 adet dişi birey 100 µl homojenizasyon tampon'da [0.05 M Tris-HCl + %1.15 KCl + 1mM EDTA pH (7.7)] plastik ezici ile ezilmiş ve homojenat +4°C 10000 g'de 20 dk santrifüj edilmiştir. Mikropilaka hücrelerine 45 µL homojenizasyon tampon + 45 µL homojenat +100 µL (2mM) PNOD eklenerek karışım 30 ° C'de 5 dk inkübe edilmiştir. En son aşamada mikropilaka hücrelerine 10 µL 9.6 mM NADPH eklenerek P450 enzim aktivitesi aynı cihazda 405 nm 30 ° C'de 15 dk süreyle ölçülmüştür.

Biyokimyasal çalışmalarda, kontrol hücreleri ise homojenatsız olarak okunmuştur. Enzim

okumaları dört tekerrürlü olarak yapılmıştır. Tüm enzim aktiviteleri Softmax PRO software programında analiz edilerek sonuçlar mOD min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> protein olarak verilmiştir. Örneklerin toplam protein miktarlarının belirlenmesinde (Bradford, 1976)'un total protein tayin yöntemi kullanılmış ve Bovine Serum Albumine (BSA) standart olarak alınmıştır.

#### *İstatistiksel değerlendirme*

*Tetranychus urticae* popülasyonlarının 24 saat sonra belirlenen ölüm verilerinden yararlanılarak POLO bilgisayar paket programında (LeOra, 1994) denenen insektisit/akarisit LC<sub>50</sub> ve LC<sub>60</sub> değerleri belirlenmiştir. Enzim sonuçlarından elde edilen veriler tek yönlü varyans analizi tekniği ile (Tek yönlü ANOVA) analiz edilmiş ve popülasyonlar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Tukey testi kullanılmıştır.

#### **Araştırma Bulguları ve Tartışma**

Pyridaben seleksiyonu sonucu elde edilen *T. urticae* popülasyonlarının LC<sub>50</sub> ve LC<sub>60</sub> değerleri ve direnç oranları çizelge 1'de verilmiştir. Başlangıç popülasyonunun LC<sub>50</sub> değerine göre ardışık seleksiyonlar sonrasında elde edilen direnç oranları sırasıyla 3, 4.1, 7.1, 9.5, 8, 15.1, 16.2, 24.7, 30.7 kat olarak belirlenmiştir. Son seleksiyon popülasyonunda 64.2 kat pyridaben direnci elde edilmiştir (bundan sonra S10 olarak ifade edilecektir).

Çizelge 1. *Tetranychus urticae*'de pyridabene karşı başlangıç ve seleksiyon popülasyonlarında belirlenen LC<sub>50</sub> ve LC<sub>60</sub> değerleri ve direnç oranları

Table 1. LC<sub>50</sub> and LC<sub>60</sub> values and resistance rates determined in the initial and selection populations against pyridabene in *Tetranychus urticae*

| Popülasyon<br>Population                          | n*  | Eğim±sh<br>Slope±se | LC <sub>50</sub><br>g / 100 ml<br>(Güven aralıkları<br>confidence limits) | LC <sub>60</sub><br>g / 100 ml<br>(Güven aralıkları<br>confidence limits) | df | χ <sup>2</sup> | Direnç Oranı<br>Resistance Rate |
|---|-----|---------------------|---|---|----|----------------|---------------------------------|
| Başlangıç<br>popülasyonu<br>Initial<br>population | 600 | 2.511±0.218         | 0.019<br>0.008 - 0.033  | 0.024<br>0.012 - 0.046  | 5  | 38.507         | -                               |
| S-1   | 600 | 2.825±0.220         | 0.058<br>0.048 - 0.069  | 0.071<br>0.059 - 0.086  | 5  | 5.7101         | <b>3</b>                        |
| S-2   | 600 | 2.426±0.191         | 0.078<br>0.067 - 0.090  | 0.099<br>0.086 - 0.115  | 5  | 2.234          | <b>4.1</b>                      |
| S-3   | 600 | 2.133±0.163         | 0.136<br>0.116 - 0.159  | 0.179<br>0.154 - 0.210  | 5  | 2.007          | <b>7.1</b>                      |
| S-4   | 600 | 2.142±0.157         | 0.181<br>0.155 - 0.210  | 0.237<br>0.204 - 0.277  | 5  | 3.187          | <b>9.5</b>                      |
| S-5   | 600 | 2.032±0.161         | 0.152<br>0.128 - 0.179  | 0.203<br>0.173 - 0.238  | 5  | 4.039          | <b>8</b>                        |
| S-6   | 600 | 2.490±0.181         | 0.287<br>0.238 - 0.346  | 0.363<br>0.302 - 0.443  | 5  | 5.2375         | <b>15.1</b>                     |
| S-7   | 600 | 2.315±0.170         | 0.308<br>0.266 - 0.355  | 0.396<br>0.344 - 0.460  | 5  | 3.040          | <b>16.2</b>                     |
| S-8   | 600 | 3.023±0.228         | 0.471<br>0.416 - 0.533  | 0.571<br>0.505 - 0.652  | 5  | 3.916          | <b>24.7</b>                     |
| S-9   | 600 | 3.424±0.328         | 0.585<br>0.477 - 0.706  | 0.694<br>0.574 - 0.850  | 5  | 6.8270         | <b>30.7</b>                     |
| S-10  | 600 | 1.884±0.142         | 1.221<br>0.827 - 1.922  | 1.664<br>1.127 - 2.853  | 5  | 16.231         | <b>64.2</b>                     |

n\*: Tekrar sayısı, sh: standart hata, df: serbestlik derecesi, χ<sup>2</sup>: ki-kare: S1: Seleksiyon 1, S2:Seleksiyon 2, S3: Seleksiyon 3, S4:Seleksiyon 4, S5: Seleksiyon 5, S6: Seleksiyon 6, S7: Seleksiyon 7 S8: Seleksiyon 8, S9: Seleksiyon 9: S10: Seleksiyon 10  
n\*: Number of replicates, se: standard error, df: degrees of freedom, χ<sup>2</sup>: chi-square :S1: Selection 1, S2: Selection 2, S3: Selection 3, S4: Selection 4, S5: Selection 5, S6: Selection 6, S7: Selection 7 S8: Selection 8, S9: Selection 9: S10 Selection 10

*Tetranychus urticae*'nin başlangıç, S5 ve S10 popülasyonları için EST, GST ve P450 enzimlerinin aktiviteleri Çizelge 2'de verilmiştir. EST enzim aktivitesi başlangıç ve S5 popülasyonlarında aynı istatistiksel grupta yer alırken S10 popülasyonu

farklı bir grupta yer almıştır. GST enzimi tüm popülasyonlarda (başlangıç, S5 ve S10) aynı grupta yer almıştır. P450 enziminin aktivitesi ise her bir popülasyonda istatistiksel olarak farklı gruplarda yer almıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. *Tetranychus urticae*'nin GSS, S5 ve S10 popülasyonlarında EST, GST ve P450 enzim aktiviteleri  
 Table 2. *EST, GST and P450 enzyme activities in GSS, S5 and S10 populations of Tetranychus urticae*

| Popülasyon<br>Population | n* | Spesifik aktivite<br>Specific activity<br>mOD min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein | Spesifik aktivite<br>Specific activity<br>mOD min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein | Spesifik aktivite<br>Specific activity<br>mOD min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> protein |
|--------------------------|----|--|--|--|
|                          |    | EST  | GST  | P450   |
| Başlangıç<br>Initial     | 4  | 10.38b**   | 3.0a**   | 0.0018c**  |
| S5                       | 4  | 11.45b   | 3.1a   | 0.0033b  |
| S10                      | 4  | 17.82a   | 3.5a   | 0.0068a  |

\* Tekerrür sayısı: \*\* Aynı sütünde yer alan aynı harfler istatistiksel olarak aynı grubu gösterir (P<0.05): S5: Seleksiyon 5, S10: Seleksiyon 10

\* Number of replicates: \*\*The same letters indicate the same group statistically (P<0.05): S5: Selection 5, S10: Selection 10

*Tetranychus urticae* popülasyonu ekonomik zarar eşiğinin altında tutulmadığı takdirde birçok üründe ciddi sorunlara neden olabilen, polifag ve kozmopolit bir zararlıdır (Jeppson ve ark., 1975). Bu sebeple yoğun akarisit kullanımına maruz kalmakta ve bunun sonucu olarak da direnç gelişimi görülmektedir. İnsektisit direncini yönetmek veya geciktirmek için direncin altında yatan mekanizmaların aydınlatılması gerekmektedir.

Bu çalışmada laboratuvar koşullarında pyridaben ile selekte edilmiş *T. urticae* popülasyonunun biyokimyasal mekanizmaları incelenmiş ve GSS (hassas popülasyon)'de pyridaben ile ardışık 10 seleksiyon sonucu 64.2 kat direnç gözlemlenmiştir. Literatür incelendiğinde, bir arazi popülasyonu olan *T. urticae*, 20 nesil boyunca art arda pyridaben ile seleksiyona maruz bırakılmış ve direnç oranını 240 olarak belirlemişlerdir (Kim ve ark., 2006). Koo ve ark. (2021)'i çalışmasında, *T. urticae*'nin pyridaben dirençli popülasyonunun duyarlı popülasyona göre 4109,6 kat daha yüksek direnç oranı bulunmuştur. Batı Avustralya'da, dört mevsim boyunca beş tebufenpyrad uygulamasına maruz bırakılan bir elma bahçesinden toplanan *T. urticae* popülasyonu, tebufenpyrad, pyridaben ve fenpyroximate'a karşı sırasıyla 63-, 210- ve 25 kat direnç göstermiştir (Herron ve Rophail, 1998). Belçika'da sıklıkla kullanılan tebufenpyrad, fenpyroximate, pyridaben ve fenazaquin ilaçlarına karşı *T. urticae*'nin arazi popülasyonu sırasıyla 184, 1547, 5971 ve 35 kat direnç göstermiştir (Van Pottelberge ve ark., 2009). Çin (Pinghe, Linhai ve Yidu)'den toplanan *Panonychus citri*

(McGregor) (Acari: Tetranychidae) popülasyonlarının, duyarlı bir popülasyonla karşılaştırıldığında pyridaben'e karşı sırasıyla 266,5-, 417,9- ve 601,5 kat dirence sahip olduğu bildirilmiştir (Hu ve ark., 2010). Çin'de 2017 yılında toplanan *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae) popülasyonu pyridaben'e karşı orta düzeyde bir direnç (31,9 kat) göstermiştir (Feng ve ark., 2020). Yapılan başka bir çalışmada, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae)'nin arazi popülasyonu METI-I akarisitlerinden tebufenpyrad, fenpyroximate ve pyridaben'e karşı sırasıyla 97-, 1,300- ve 130 kat direnç geliştirmiştir (Goka, 1998). Yapılan çalışmalar incelendiğinde pyridaben aktif maddesinin de içerisinde yer aldığı METI akarisitlerine karşı tetranychidlerde birçok direnç çalışması yayınlanmış ve popülasyonların genetik çeşitliliği, zararlı türü ve pestisitlerin yapısı gibi özelliklerin direnç gelişimini etkilediği bildirilmiştir.

*Tetranychus urticae*'de pestisit direnci, artan metabolik detoksifikasyon aktivitesi (Van Leeuwen ve Tirry, 2007); P450, GST, CarE ve üridin difosfat-glikoziltransferazlar (UGT'ler)'in aşırı ekspresyonu dahil olmak üzere çoklu direnç mekanizmalarıyla ilişkilendirilmiştir (Khalighi ve ark., 2016; Riga ve ark., 2014; Wang ve ark., 2020; Wei ve ark., 2019; Xu ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2022). 64.2 kat pyridaben dirençli popülasyonda (S10) GST enzim aktivitesinde başlangıca kıyasla az bir artış olmasına rağmen, iki popülasyonun enzim seviyeleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. EST ve P450 enzim seviyeleri arasındaki fark ise istatistiksel olarak

anlamli bulunmuştur. *Panonychus citri*'nin pyridaben direncinde P450 önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir (Alavijeh ve ark., 2020; Ding ve ark., 2013). Namin ve ark. (2020), yapmış oldukları çalışmada, yüksek seviyelerde pyridaben direncine ( $LC_{30} > 10.000$  mg/L), hedef bölge mutasyonları dışındaki mekanizmalar (özellikle P450'ler) aracılığıyla ulaşılabileceğini belirtmişlerdir. *Tetranychus cinnabarinus*'un pyridaben direnci üzerine yapılan çalışmada, P450'lerin aktivitesinin araziden toplanan popülasyonlarda hassasa göre önemli ölçüde daha yüksek bulunduğunu; ancak GST'lerin ve CarE'lerin aktivitesinin, önemli ölçüde farklı olmadığını belirtmişlerdir (Feng ve ark., 2020). Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre ve literatürde yer alan diğer çalışmalardan da yola çıkılarak *T.urticae*'nin pyridaben direncinde EST ve P450 enzimlerinin rol oynama potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

## Sonuçlar

Zararlılarla etkili bir kimyasal mücadele için duyarlılık düzeylerinin belirlenmesi önemlidir. Bu çalışmada, laboratuvar seleksiyonları ile *T.urticae*'de pyridaben direnç mekanizması üzerine incelemeler yapılmıştır. Laboratuvarda yapılan bu çalışmaların her zaman arazi koşullarındaki direnci yansıtmadığını belirtmek gerekir. Bu nedenle laboratuvar koşullarında yapay seleksiyon dışında da çalışmalara ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, sağlam direnç yönetimi programlarının uygulanabilmesi için çapraz direncin altında yatan mekanizmalar da incelenmelidir. Bu nedenle zararlıların duyarlılık düzeylerinin sık aralıklarla kontrol edilip belirlenmesi ve direncin önlenmesi veya geciktirilmesi için gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir.

**Çıkar Çatışması:** Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması bulunmadığını beyan ederler.

**Yazar Katkısı:** Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

## Kaynaklar

- Alavijeh, E. S., Khajehali, J., Snoeck, S., Panteleri, R., Ghadamyari, M., Jonckheere, W., Bajda, S., Saalwaechter, C., Geibel, S., Douris, V., Vontas, J., Van Leeuwen, T., & Dermauw, W. (2020). Molecular and genetic analysis of resistance to METI-I acaricides in Iranian populations of the citrus red mite *Panonychus citri*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 164, 73–84.
- Assouguem, A., Kara, M., Mechchate, H., Korkmaz, Y. B., Benmessaoud, S., Ramzi, A., Abdullah, K. R., Noman, O. M., Farah, A., & Lazraq, A. (2022). Current Situation of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) in Northern Africa: The Sustainable Control Methods and Priorities for Future Research. *Sustainability*, 14(4), Article 4.
- Badawy, M. E. I., Mahmoud, M. S., & Khattab, M. M. (2022). Toxicity, joint action effect, and enzymatic assays of abamectin, chlorfenapyr, and pyridaben against the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 83(1), 22.
- Bajda, S., Dermauw, W., Panteleri, R., Sugimoto, N., Douris, V., Tirry, L., ... & Van Leeuwen, T. (2017). A mutation in the PSST homologue of complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) from *Tetranychus urticae* is associated with resistance to METI acaricides. *Insect biochemistry and molecular biology*, 80, 79-90.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248–254.
- Dekeyser, M. A. (2005). Acaricide mode of action. *Pest Management Science*, 61(2), 103–110.
- Ding, T.-B., Niu, J.-Z., Yang, L.-H., Zhang, K., Dou, W., & Wang, J.-J. (2013). Transcription profiling of two cytochrome P450 genes potentially involved in acaricide metabolism in citrus red mite *Panonychus citri*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 106(1), 28–37.
- Feng, K., Ou, S., Zhang, P., Wen, X., Shi, L., Yang, Y., Hu, Y., Zhang, Y., Shen, G., Xu, Z., & He, L. (2020). The cytochrome P450 CYP389C16 contributes to the cross-resistance between cyflumetofen and pyridaben in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Pest Management Science*, 76(2), 665–675.
- Goka, K. (1998). Mode of inheritance of resistance to three new acaricides in the Kanzawa spider mite, *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari: Tetranychidae). *Experimental & Applied Acarology*, 22(12), 699–708.
- Herron, G. A., & Rophail, J. (1998). Tebufenpyrad (Pyranica®) resistance detected in two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) from apples in Western Australia. *Experimental & Applied Acarology*, 22(11), 633–641.
- Hollingworth, R. M., & Ahammadsahib, K. I. (1995). Inhibitors of respiratory complex I. Mechanisms, pesticidal actions and toxicology. *Reviews in pesticide toxicology (USA)*.
- Hu, J., Wang, C., Wang, J., You, Y., & Chen, F. (2010).

- Monitoring of resistance to spirodiclofen and five other acaricides in *Panonychus citri* collected from Chinese citrus orchards. *Pest Management Science*, 66(9), 1025–1030.
- Jeppson, L. R., Keifer, H. H., & Baker, E. W. (1975). *Mites injurious to economic plants*. Univ of California Press.
- Khalighi, M., Dermauw, W., Wybouw, N., Bajda, S., Osakabe, M., Tirry, L., & Van Leeuwen, T. (2016). Molecular analysis of cyenopyrafen resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 72(1), 103–112.
- Kim, Y., Park, H., Cho, J., & Ahn, Y. (2006). Multiple resistance and biochemical mechanisms of pyridaben resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of economic entomology*, 99(3), 954–958.
- Knowles, C. O. (1997). Mechanisms of Resistance to Acaricides. İçinde V. Sjut (Ed.), *Molecular Mechanisms of Resistance to Agrochemicals* (ss. 57-77). Springer.
- Koo, H.-N., Choi, J., Shin, E., Kang, W., Cho, S.-R., Kim, H., Park, B., & Kim, G.-H. (2021). Susceptibility to Acaricides and the Frequencies of Point Mutations in Etoxazole- and Pyridaben-Resistant Strains and Field Populations of the Two-Spotted Spider Mite, *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insects*, 12(7), Article 7.
- LeOra, S. (1994). Polo-PC: Probit and Logit Analysis. *Berkeley, CA: LeOra Software*.
- Lümmen, P. (2007). "Mitochondrial electron transport complexes as biochemical target sites for insecticides and Acaricides", *Insecticides design using advanced technologies*, 197-215.
- Namin, H. H., Zhurov, V., Spenler, J., Grbić, M., Grbić, V., & Scott, I. M. (2020). Resistance to pyridaben in Canadian greenhouse populations of two-spotted spider mites, *Tetranychus urticae* (Koch). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 170, 104677.
- Nauen, R., Stumpf, N., Elbert, A., Zebitz, C. P. W., & Kraus, W. (2001). Acaricide toxicity and resistance in larvae of different strains of *Tetranychus urticae* and *Panonychus ulmi* (Acari: Tetranychidae). *Pest Management Science*, 57(3), 253–261.
- Riga, M., Tsakireli, D., Ilias, A., Morou, E., Myridakis, A., Stephanou, E. G., Nauen, R., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., & Paine, M. (2014). Abamectin is metabolized by CYP392A16, a cytochrome P450 associated with high levels of acaricide resistance in *Tetranychus urticae*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 46, 43–53.
- Rose, R. L., Barbhuiya, L., Roe, R. M., Rock, G. C., & Hodgson, E. (1995). Cytochrome P450-associated insecticide resistance and the development of biochemical diagnostic assays in *Heliothis virescens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 51(3), 178–191.
- Stumpf, N., & Nauen, R. (2001). Cross-resistance, inheritance, and biochemistry of mitochondrial electron transport inhibitor-acaricide resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Journal of Economic Entomology*, 94(6), 1577–1583.
- Stumpf, N., & Nauen, R. (2002). Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72, 111–121.
- Sugimoto, N., & Osakabe, M. (2014). Cross-resistance between cyenopyrafen and pyridaben in the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Pest management science*, 70(7), 1090–1096.
- Tomlin, C. (2003). The e-Pesticide Manual, Version 3.0., BCPC. *Crop Protection Publication: Cambridge, UK, CD-ROM*.
- Van de Vrie, M., McMurtry, J., & Huffaker, C. (1972). Ecology of tetranychid mites and their natural enemies: A review: III. Biology, ecology, and pest status, and host-plant relations of tetranychids. *Hilgardia*, 41(13), 343–432.
- Van Leeuwen, T., & Tirry, L. (2007). Esterase-mediated bifenthrin resistance in a multiresistant strain of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae*. *Pest Management Science*, 63(2), 150–156.
- Van Pottelberge, S., Van Leeuwen, T., Nauen, R., & Tirry, L. (2009). Resistance mechanisms to mitochondrial electron transport inhibitors in a field-collected strain of *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Bulletin of entomological research*, 99(1), 23–31.
- Wang, M., Liu, X., Shi, L., Liu, J., Shen, G., Zhang, P., Lu, W., & He, L. (2020). Functional analysis of *UGT201D3* associated with abamectin resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Insect Science*, 27(2), 276–291.
- Wei, P., Li, J., Liu, X., Nan, C., Shi, L., Zhang, Y., Li, C., & He, L. (2019). Functional analysis of four upregulated carboxylesterase genes associated with fenpropathrin resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval). *Pest Management Science*, 75(1), 252–261.
- Wood, E., Latli, B., & Casida, J. E. (1996). Fenazaquin acaricide specific binding sites in NADH: Ubiquinone oxidoreductase and apparently the ATP synthase stalk. *Pesticide biochemistry and physiology*, 54(2), 135–145.
- Xu, D., Zhang, Y., Zhang, Y., Wu, Q., Guo, Z., Xie, W., Zhou, X., & Wang, S. (2021). Transcriptome profiling and functional analysis suggest that the constitutive overexpression of four cytochrome P450s confers resistance to abamectin in *Tetranychus urticae* from China. *Pest Management Science*, 77(3), 1204–1213.
- Yorulmaz Salman, S., & Sarıtaş, E. (2014). Acequinocyl resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae): inheritance, synergists, cross-resistance and biochemical resistance mechanisms. *International Journal of Acarology*, 40(6), 428–435.
- Zhang, Y., Xu, D., Zhang, Y., Wu, Q., Xie, W., Guo, Z., & Wang, S. (2022). Frequencies and mechanisms of pesticide resistance in *Tetranychus urticae* field populations in China. *Insect Science*, 29(3), 827–839.



# Weeds in the cotton growing areas in the Southeastern Anatolia Region

## Güneydoğu Anadolu Bölgesi pamuk ekim alanlarında bulunan yabancı otlar

İslam Emrah SÜER<sup>1\*</sup>, Nihat TURSUN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Diyarbakır, Türkiye,

<sup>2</sup>Malatya Turgut Özal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Malatya, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-3297-6860>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-8765-0326>

### To cite this article:

Süer, İ. E. & Tursun, N. (2024). Weeds in the cotton growing areas in the southeastern anatolia region. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2):209-221

DOI: 10.29050/harranziraat.1406951

### \*Address for Correspondence:

İslam Emrah SÜER

e-mail:

islamemrah.suer@tarimorman.gov.tr

### Received Date:

19.12.2023

### Accepted Date:

23.02.2024

© Copyright 2018 by Harran University  
Faculty of Agriculture. Available on-line  
at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative  
Commons Attribution-Non  
Commercial 4.0 International License.

### ABSTRACT

The Southeast Anatolia Region plays an important role, as it accounts for around sixty percent of Türkiye's cotton production. One of the most important factors limiting cotton cultivation is weeds. The aim of this study was to determine the weed species, their frequency and population density in the cotton growing areas of the Southeast Anatolia region. For this purpose, surveys were conducted in 152 cotton growing areas in Diyarbakır, Mardin and Şanlıurfa provinces in 2020 and 2021. The surveys were conducted using the segmented sampling method. As a result of the studies, 43 weed species belonging to 16 families were identified. When the weed species found in cotton are evaluated by family, the Poaceae family ranks first with 7 species, followed by Asteraceae with 6 species, Euphorbiaceae and Amaranthaceae with 5 species. redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.), field bindweed (*Convolvulus arvensis* L.), purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.), jungle rice (*Echinochloa colonum* (L.) Link), ground cherry (*Physalis* spp.), common purslane (*Portulaca oleracea* L.), black night shade (*Solanum nigrum* L.), johnson grass [*Sorghum halepense* (L.) Pers] and common cocklebur (*Xanthium strumarium* L.) were identified as the most common weed species. These weeds are widespread in many summer crops, especially in cotton. The development of effective management methods against these weeds in cotton will contribute to higher yields.

**Key Words:** Cotton, weeds, frequency, Southeast Anatolia Region

### Öz

Güneydoğu Anadolu Bölgesi Türkiye'nin pamuk üretiminin yaklaşık yüzde altmışını karşılaması nedeni ile önemli bir yere sahiptir. Pamuk üretimini sınırlayan önemli faktörlerden biri de yabancı otlardır. Bu çalışmada Güneydoğu Anadolu Bölgesi pamuk ekim alanlarındaki yabancı ot türleri, yaygınlık ve yoğunluklarının belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla 2020 ve 2021 yıllarında Diyarbakır, Mardin ve Şanlıurfa illerinde 152 adet pamuk ekim alanlarında sürveyler gerçekleştirilmiştir. Sürveyler bölümlü örnekleme yöntemine göre yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda 16 familyaya ait 43 yabancı ot türü tespit edilmiştir. Pamukta bulunan yabancı ot türleri familyalara göre değerlendirildiğinde Poaceae familyası 7 tür ile ilk sırada yer alıp bu familyayı 6 tür ile Asteraceae, 5 tür ile Euphorbiaceae ve Amaranthaceae familyaları takip etmiştir. Yapılan sürveylerde; kırmızı köklü tilki kuyruğu (*Amaranthus retroflexus* L.), tarla sarmaşığı (*Convolvulus arvensis* L.), topalak (*Cyperus rotundus* L.), benekli darıcan [*Echinochloa colonum* (L.) Link], fener otu (*Physalis* spp.), semiz otu (*Portulaca oleracea* L.), it üzümü (*Solanum nigrum* L.), kanyaş [*Sorghum halepense* (L.) Pers] ve domuz pıtrağı (*Xanthium strumarium* L.) türleri en yaygın yabancı ot türleri olarak belirlenmiştir. Bu yabancı otlar pamuk başta olmak üzere birçok yazlık kültür bitkisinde yaygın olarak görülmektedir. Pamukta bu yabancı otlara karşı etkili mücadele yöntemlerinin geliştirilmesi daha yüksek verim elde edilmesine katkı sağlayacaktır.

**Anahtar Kelimeler:** Pamuk, Yabancı ot, Yaygınlık, Güneydoğu Anadolu Bölgesi

## Introduction



Cotton (*Gossypium hirsutum* L.), native to India, is an industrial plant from the Malvaceae family. In cotton processing, it is the basic raw material for the ginning industry, for the oil and animal feed industry with its seeds, for the textile industry with its fibers and for the paper industry with its linters. With these aspects, cotton has become a strategic product of economic importance in the world. However, with population growth and the rise in living standards, the demand for cotton plants is increasing day by day. In particular, the cotton plant has become an important economic product for some countries as it creates high added value (Keskinılıç, 2014).

Cotton, the most important natural raw material in the textile industry, was grown on an average of 32.01 million hectares of land in the world in the 2023 production season and around 24.6 million tons of cotton products were obtained. Türkiye ranks seventh in the world in terms of cotton production, and fourth and fifth in terms of import and consumption, respectively. (Anonymous, 2023a). In addition, Türkiye has the most efficient and highest quality cotton production among non-GMO cotton producing countries (Anonymous, 2023b). Cotton cultivation in Türkiye generally takes place in the Mediterranean, Aegean and Southeastern Anatolia regions. Approximately 59% of Türkiye's cotton production takes place in the Southeast Anatolia Region, 24% in the Aegean Region and 17% in the Mediterranean Region (TÜİK, 2023).

There are many factors that limit cotton production, and one of the most important factors is weeds. Weeds compete with crops in terms of light, water and nutrients, and by reducing their effectiveness; they significantly reduce crop yield and quality (Özer et al., 1998). In this context, it has been found that cotton yield losses are 34-61% if weeds are not controlled regularly (Ahmad et al., 2003), and that this percentage can even rise to 90% (Beltrao, 1994). To prevent weed-induced yield losses in cotton, it is important to carry out weed control in the critical period between the first 1-2 weeks and 7-10 weeks after cotton emergence (Vargas et al.,

1996; Bükün and Uygur, 1997; Tursun et al., 2016). Furthermore, weeds compete with cotton in the early stages, hindering its development and significantly reducing its yield. In addition to direct yield losses, *Convolvulus arvensis* L., *Datura stramonium* L., *Solanum nigrum* L., *Xanthium strumarium* L. and *Setaria viridis* (L.) P. Beauv. occur especially after irrigation. Weeds such as these adhere to the fibers of the cotton plant, which reduces fiber quality and makes harvesting more difficult (Bükün and Uygur, 1997; Özer et al., 1998; Boz and Doğan, 2004; Güncan and Karaca, 2014). For this reason, weed control is necessary to achieve high-quality and efficient cotton production. In order to prevent the damage caused by weeds, their occurrence and density must be determined.

With the expansion of irrigation areas as part of the Southeastern Anatolia Project (GAP), cotton cultivation began in a large agricultural area of the region. Irrigation provides a suitable growing environment not only for the grown cotton but also for water-loving weeds, which compete with cotton (Bükün et al., 2005). In addition, the irrigation of cotton fields enables the transportation of weed seeds and the infection of other areas, which particularly promotes the reproduction and spread of invasive weeds.

It is stated that weed species in cotton growing areas may change due to increasing agricultural irrigation in the GAP region, changing crop patterns, changing weed control methods and global warming (Doğanoğlu, 2010; Arslan, 2018). For this reason, it is important to constantly monitor the spread and density of weeds in cotton fields and to develop strategies against these weeds by developing effective control methods. For this purpose, the frequency and density of weeds in the cotton fields of Diyarbakır, Şanlıurfa and Mardin provinces were determined and studied.

## Material and Method

In this study, surveys were conducted in 2020

and 2021 to determine the frequency and density of weeds in the cotton growing areas of Şanlıurfa, Diyarbakır and Mardin provinces in Türkiye (Table 1). The surveys were conducted using the segmented sampling method (Bora and Karaca, 1970). Samples were taken during the surveys to represent the field and to ensure that there was a distance of at least 3 km between the cotton fields. To avoid the edge effect, sampling began 10-15 m inside the edge of the field in a diagonal direction. Counts were made at each sampling point by randomly throwing 10 frames from a 0.25 m<sup>2</sup> (50 x 50 cm) frame in the fields with ≤10 da., 15 frames in the fields with 11-50 da., 20

frames in the fields with 51-100 da. and 25 frames in the fields with >100 da. (Özkil et al., 2019).

In the surveys conducted in the cotton growing areas of the Southeastern Anatolia Region in June, July and August in 2020 and 2021, sampling was carried out in 48 fields in 5 districts in Diyarbakır, 19 fields in 4 districts in Mardin and 85 fields in 8 districts in Şanlıurfa. Accordingly, counts were conducted in a total of 1 558 173 da. (TÜİK, 2020) and 152 fields in the survey studies (Table 1).

Table 1. Cultivated areas of the provinces where surveys were conducted in the cotton fields in the Southeast Anatolia Region and the number of fields where sampling took place.

| Provinces            | Districts  | Cultivation areas (da) | Number of fields surveyed |
|----------------------|------------|------------------------|---------------------------|
| Şanlıurfa            | Akçakale   | 207 000                | 14                        |
|                      | Bozova     | 27 959                 | 6                         |
|                      | Eyyübiye   | 176 670                | 14                        |
|                      | Haliliye   | 156 500                | 10                        |
|                      | Harran     | 174 600                | 13                        |
|                      | Hilvan     | 36 181                 | 6                         |
|                      | Siverek    | 121 413                | 9                         |
|                      | Viranşehir | 212 150                | 13                        |
| <b>Total</b>         |            | <b>1 112 473</b>       | <b>85</b>                 |
| Diyarbakır           | Bismil     | 200 000                | 18                        |
|                      | Çınar      | 115 720                | 12                        |
|                      | Eğil       | 30 000                 | 4                         |
|                      | Sur        | 38 000                 | 7                         |
|                      | Yenişehir  | 26 368                 | 7                         |
| <b>Total</b>         |            | <b>383 088</b>         | <b>48</b>                 |
| Mardin               | Artuklu    | 48 710                 | 2                         |
|                      | Derik      | 13 360                 | 4                         |
|                      | Kızıltepe  | 40 000                 | 10                        |
|                      | Nusaybin   | 650                    | 3                         |
| <b>Total</b>         |            | <b>58 881</b>          | <b>19</b>                 |
| <b>General Total</b> |            | <b>1 558 173</b>       | <b>152</b>                |

In the surveys to determine the weed species in the cotton fields, the identification of weed species was carried out according to Davis (1965-1988).

The density of weeds (number/m<sup>2</sup>), frequency of occurrence (%), special and general weed cover areas (%) were calculated (Odum, 1971; Uygur, 1984). The formulas for determining the frequency of occurrence, density (number/m<sup>2</sup>), general cover area and specific cover area are

given below.

$$\text{Density (weed/m}^2\text{)} = y/n$$

y = Number of weed species included in the frame

$$n = \text{Total number of frames thrown}$$

Occurrence Frequency (O.F.): It is the value that shows the percentage of a weed species encountered within the surveyed areas.

$$\text{O.F.(\%)} = (n/m) \times 100$$

n = Total number of fields where a species is found

m = Total number of fields measured

General Covering Area (G.C.A.): It is the amount that a species covers in the total area measured as a percentage.

$$G.C.A.(%) = T.C.A./m$$

T.C.A.(%)=Coverage of a weed species in surveyed weed species in surveyed fields

m= number of total surveyed fields

Specific Covering Area (S.C.A): It is the amount that a species covers only in the area where it is found, in %.

$$S.C.A. (%) = T.C.A/n$$

T.C.A.= Coverage of a weed species where a species occurred

n= number of total surveyed fields

## Results and Discussion

During the surveys in Diyarbakır, Mardin and

Şanlıurfa provinces, where cotton is intensively cultivated in the Southeastern Anatolia Region, 43 weed species belonging to 16 families were identified. It was found that 7 of the identified weed species were monocotyledonous and 36 were dicotyledonous species. Looking at the weed species found in cotton by family, the Poaceae family ranked first with 7 species, followed by the Asteraceae with 6 species, the Euphorbiaceae and the Amaranthaceae family with 5 species (Figure 1). Similar to our study, in studies conducted in cotton growing areas in Türkiye, most of the weed species found in cotton were found to belong to the Poaceae family (Uludağ and Katkat, 1991; Boz et al, 1995; Arslan, 2012; Arslan, 2021; Özaslan and Bükün, 2013; Özkil , 2019; Kaya and Nemli, 2002; Pala and Mennan, 2019; Şahin et al, 2020; Tursun et al, 2004). It was found that most of the species identified during surveys in cotton growing areas in Ethiopia, China, Kenya and Greece in the world belonged to the Poaceae family (Kimunye, 2011; Tena, 2012; WeiHua et al, 2014; Taye, 2019 and Issayev, 2023).

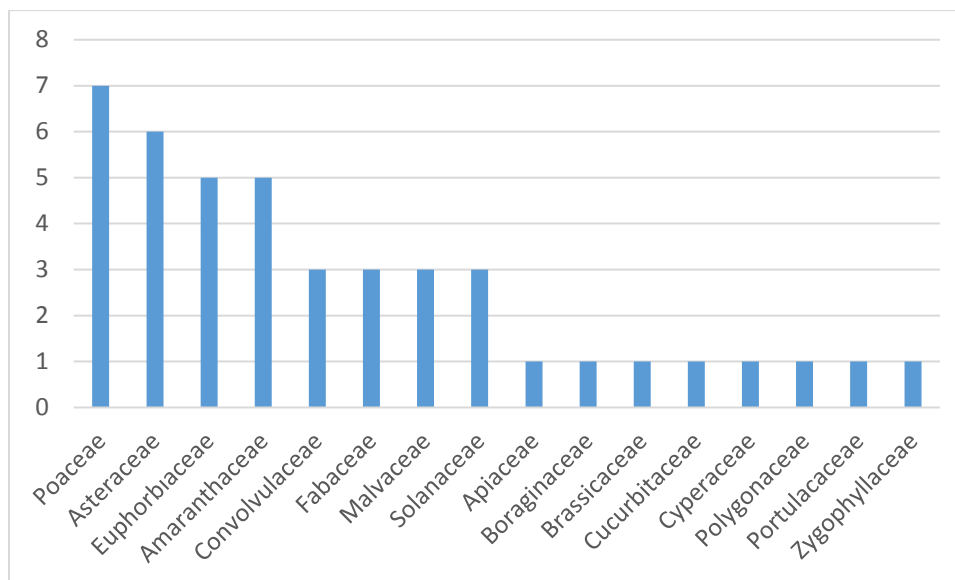


Figure 1: Families and their numbers identified during surveys in cotton fields in the southeast Anatolia Region.

Weed density (number/m<sup>2</sup>), frequency of occurrence (%), specific and general cover areas (%) were calculated based on the average of the surveys conducted in 2020 and 2021 in the cotton fields of Diyarbakır, Mardin and Şanlıurfa

provinces (Table 2).

As a result of the surveys conducted in the provinces with intensive cotton cultivation in the Southeastern Anatolia Region, the top 10 weed species in terms of frequency of occurrence were:

*Sorghum halepense* (L.). Pers, *Physalis* spp., *Xanthium strumarium* L., *Portulaca oleracea* L., *Amaranthus retroflexus* L., *Convolvulus arvensis* L., *Solanum nigrum* L., *Tribulus terrestris* L., *Echinochloa colonum* (L.) Link and *Cyperus rotundus* L. Similar to the species identified in our study, various researchers have conducted studies in different years in Southeastern Anatolia, Aegean and Mediterranean regions where cotton production is intensive in Türkiye: *A. retroflexus*, *A. albus*, *C. arvensis*, *C. dactylon*, *C. tinctoria*, *C. rotundus*, *E. colonum*, *P. oleracea*, *Physalis* sp, *Prosopis farcta*, *S. halepense*, *S. nigrum*, *T. terrestris* and *X. strumarium* weed species were among the most common species (Uludağ and Katkat, 1991; Boz et al, 1995; Uludağ

and Üremiş, 2000; Özaslan and Bükün, 2013; Arslan, 2018; Pala and Mennan, 2019, Kadioğlu et al, 1993; Uygur, 1997; Gönen, 1999; Boz, 2000; Kaya and Nemli, 2002; Gözcü and Uludağ, 2005; Tursun et al, 2004; Basal et al, 2019; Özkil et al, 2019).

In surveys carried out in cotton fields in various countries around the world, *Amaranthus* spp., *C. album*, *C. rotundus*, *C. arvensis*, *C. tinctoria*, *C. dactylon*, *D. stramonium*, *E. crusgalli*, *H. trionum*, *P. oleracea*, *Setaria glauca*, *S. halepense*, *S. nigrum*, *X. strumarium* and *X. spinosum* weed species were detected and were similar to the species detected in our study (Taye et al, 2019; Tena et al, 2012; Issayev, 2023; Economou et al, 2005).

Table 2. Density of weed species (number/m<sup>2</sup>), frequency of occurrence (%), specific and general cover areas (%) in surveys in cotton growing areas in Diyarbakır, Mardin and Şanlıurfa provinces in 2020 and 2021.

| Family         | Scientific name  | Diyarbakır |                                |            |            | Mardin   |                                |            |            | Şanlıurfa |                                |            |            |
|----------------|--|------------|--------------------------------|------------|------------|----------|--------------------------------|------------|------------|-----------|--------------------------------|------------|------------|
|                |  | O.F. (%)   | Density (weed/m <sup>2</sup> ) | G.C.A. (%) | S.C.A. (%) | O.F. (%) | Density (weed/m <sup>2</sup> ) | G.C.A. (%) | S.C.A. (%) | O.F. (%)  | Density (weed/m <sup>2</sup> ) | G.C.A. (%) | S.C.A. (%) |
| Amaranthaceae  | <i>Amaranthus albus</i> L.                                   | 14.58      | 0.08                           | 0.79       | 5.43       | 11.76    | 0.09                           | 0.99       | 8.43       | 1.20      | 0.04                           | 0.32       | 26.67      |
|                | <i>Amaranthus blitoides</i> S. Watson                        | 22.92      | 0.14                           | 1.78       | 7.78       | 23.53    | 0.10                           | 1.69       | 7.19       | 2.41      | 0.02                           | 0.29       | 11.94      |
|                | <i>Amaranthus palmeri</i> S. Watson                          | -          | -                              | -          | -          | 11.76    | 0.32                           | 1.17       | 9.93       | 8.43      | 0.24                           | 1.23       | 14.64      |
|                | <i>Amaranthus retroflexus</i> L.                             | 60.42      | 1.82                           | 10.15      | 16.81      | 82.35    | 5.10                           | 23.18      | 28.15      | 45.78     | 0.79                           | 4.03       | 8.81       |
|                | <i>Chenopodium album</i> L.                                  | 14.58      | 0.05                           | 0.54       | 3.67       | 5.88     | 0.01                           | 0.44       | 7.50       | 2.41      | 0.02                           | 0.19       | 7.71       |
| Asteraceae     | <i>Centaurea</i> sp.   | 2.08       | 0.01                           | 0.23       | 10.91      | -        | -                              | -          | -          | -         | -                              | -          | -          |
|                | <i>Conyza canadensis</i> (L.) Cron.                          | -          | -                              | -          | -          | -        | -                              | -          | -          | 1.20      | 0.00                           | 0.05       | 3.75       |
|                | <i>Lactuca serriola</i> L.                                   | 2.08       | 0.02                           | 0.32       | 15.29      | 5.88     | 0.01                           | 0.22       | 3.75       | 2.41      | 0.01                           | 0.12       | 5.00       |
|                | <i>Sonchus</i> sp.   | 2.10       | 0.02                           | 0.47       | 22.35      | -        | -                              | -          | -          | 2.41      | 0.01                           | 0.12       | 5.00       |
|                | <i>Xanthium spinosum</i> L.                                  | 4.17       | 0.07                           | 0.49       | 11.82      | 5.88     | 0.01                           | 0.81       | 13.75      | 3.61      | 0.02                           | 0.52       | 14.42      |
|                | <i>Xanthium strumarium</i> L.                                | 83.33      | 2.25                           | 23.66      | 19.71      | 79.00    | 1.93                           | 20.33      | 16.05      | 84.70     | 2.21                           | 19.96      | 16.91      |
| Apiaceae       | <i>Daucus carota</i> L.                                      | 2.08       | 0.02                           | 0.23       | 10.91      | -        | -                              | -          | -          | -         | -                              | -          | -          |
| Boraginaceae   | <i>Heliotropium europaeum</i> L.                             | 6.25       | 0.03                           | 0.56       | 8.95       | 5.88     | 0.01                           | 0.15       | 2.50       | 1.20      | <0.01                          | 0.05       | 3.75       |
| Brassicaceae   | <i>Sinapis arvensis</i> L.                                   | -          | -                              | -          | -          | -        | -                              | -          | -          | 1.20      | <0.01                          | 0.03       | 2.67       |
| Convolvulaceae | <i>Convolvulus arvensis</i> L.                               | 54.17      | 0.78                           | 8.94       | 16.50      | 64.71    | 0.83                           | 7.86       | 12.14      | 56.63     | 1.80                           | 14.19      | 25.05      |
|                | <i>Convolvulus stachydifolius</i> Choisy                     | 2.08       | 0.02                           | 0.16       | 7.50       | -        | -                              | -          | -          | -         | -                              | -          | -          |
|                | <i>Ipomea purpurea</i> (L.) Roth                             | 14.58      | 0.09                           | 1.17       | 8.00       | -        | -                              | -          | -          | 21.69     | 0.14                           | 1.50       | 6.93       |
| Cucurbitaceae  | <i>Cucumis melo</i> sub sp. <i>agrestis</i> (Naudin) Pangalo | 35.42      | 0.22                           | 2.49       | 7.03       | 11.76    | 0.07                           | 1.47       | 12.50      | 24.10     | 0.15                           | 1.32       | 5.46       |
| Cyperaceae     | <i>Cyperus rotundus</i> L.                                   | 33.33      | 2.06                           | 7.92       | 23.77      | 17.65    | 2.07                           | 3.85       | 21.81      | 48.19     | 8.91                           | 17.59      | 36.49      |
| Euphorbiaceae  | <i>Euphorbia aleppica</i> L.                                 | -          | -                              | -          | -          | -        | -                              | -          | -          | 1.20      | <0.01                          | 0.05       | 3.75       |
|                | <i>Euphorbia helioscopia</i> L.                              | 4.17       | 0.02                           | 0.23       | 5.63       | -        | -                              | -          | -          | 1.20      | <0.01                          | 0.05       | 3.75       |
|                | <i>Euphorbia serpens</i> Kunth.                              | 4.17       | 0.02                           | 0.23       | 5.63       | -        | -                              | -          | -          | 1.20      | <0.01                          | 0.05       | 3.75       |
|                | <i>Euphorbia</i> sp.   | 4.17       | 0.03                           | 0.10       | 2.50       | 5.88     | 0.08                           | 1.08       | 18.35      | 2.41      | 0.07                           | 0.29       | 12.21      |
|                | <i>Chrozophora tinctoria</i> (L.) Rafin.                     | 33.33      | 0.25                           | 2.60       | 7.80       | 35.29    | 0.30                           | 3.61       | 10.22      | 14.46     | 0.11                           | 0.69       | 4.79       |
| Fabaceae       | <i>Alhagi pseudalhagi</i> (Bieb) Desv.                       | 2.08       | 0.06                           | 0.57       | 27.50      | 17.65    | 0.19                           | 2.58       | 14.60      | 7.23      | 0.08                           | 0.87       | 12.07      |
|                | <i>Prosopis farcta</i> (Banksand Sol.) Macbride              | 12.50      | 0.07                           | 0.84       | 6.74       | 17.65    | 0.12                           | 0.98       | 5.56       | 8.43      | 0.07                           | 0.83       | 9.84       |
|                | <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.                                 | 6.25       | 0.03                           | 0.42       | 6.75       | -        | -                              | -          | -          | 2.41      | 0.01                           | 0.08       | 3.13       |
| Malvaceae      | <i>Hibiscus trionum</i> L.                                   | -          | -                              | -          | -          | -        | -                              | -          | -          | 4.82      | 0.08                           | 0.39       | 8.16       |
|                | <i>Malva</i> sp.   | 4.17       | 0.17                           | 0.66       | 15.84      | 5.88     | 0.02                           | 0.21       | 3.64       | 2.41      | 0.01                           | 0.12       | 5.00       |

|                       |   |       |      |       |       |       |      |       |       |       |      |       |       |
|-----------------------|---|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|-------|------|-------|-------|
|                       | <i>Malvella sherardiana</i> (L.) Jaub. And Spach. | 14.58 | 0.34 | 2.04  | 14.02 | -     | -    | -     | -     | 4.82  | 0.01 | 0.15  | 3.13  |
| <b>Poaceae</b>        | <i>Cynodon dactylon</i> (L.) Pers                 | 41.67 | 0.70 | 4.86  | 11.66 | 23.53 | 0.39 | 2.13  | 9.07  | 31.33 | 0.30 | 2.08  | 6.64  |
|                       | <i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.           | 8.33  | 0.06 | 0.62  | 7.47  | 5.88  | 0.02 | 0.09  | 1.54  | 16.87 | 0.20 | 1.02  | 6.08  |
|                       | <i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link              | 33.33 | 0.78 | 3.71  | 11.12 | 17.65 | 0.95 | 2.52  | 14.31 | 49.40 | 1.30 | 9.04  | 18.31 |
|                       | <i>Echinochloa crus-galli</i> (L.) P.B.           | 27.08 | 0.33 | 2.07  | 7.66  | 11.76 | 0.49 | 1.32  | 11.25 | 27.71 | 0.57 | 2.95  | 10.65 |
|                       | <i>Elymus repens</i> (L.) Gould                   | 4.2   | 0.03 | 0.42  | 10.00 | -     | -    | -     | -     | 4.8   | 0.02 | 0.52  | 10.82 |
|                       | <i>Setaria verticillata</i> (L.) P. Beauv.        | 2.08  | 0.02 | 0.47  | 22.35 | -     | -    | -     | -     | 2.41  | 0.05 | 0.13  | 5.33  |
|                       | <i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers                | 95.83 | 2.59 | 28.50 | 29.74 | 82.35 | 1.70 | 20.44 | 24.82 | 95.18 | 2.15 | 24.87 | 26.13 |
| <b>Polygonaceae</b>   | <i>Polygonum aviculare</i> L.                     | 2.08  | 0.01 | 0.10  | 5.00  | -     | -    | -     | -     | 2.41  | 0.01 | 0.09  | 3.85  |
| <b>Portulacaceae</b>  | <i>Portulaca oleracea</i> L.                      | 66.67 | 1.83 | 11.50 | 17.26 | 58.82 | 3.20 | 14.88 | 25.30 | 81.93 | 3.26 | 18.61 | 22.72 |
| <b>Solanaceae</b>     | <i>Datura stramonium</i> L.                       | 2.08  | 0.01 | 0.17  | 8.00  | 11.76 | 0.06 | 0.71  | 6.06  | 12.05 | 0.12 | 0.78  | 6.48  |
|                       | <i>Physalis</i> spp.                              | 91.67 | 1.56 | 14.27 | 15.57 | 82.35 | 1.91 | 18.38 | 22.31 | 95.18 | 2.34 | 16.39 | 17.22 |
|                       | <i>Solanum nigrum</i> L.                          | 52.10 | 0.85 | 5.75  | 11.05 | 64.70 | 0.70 | 6.90  | 10.77 | 45.78 | 0.67 | 3.43  | 7.50  |
| <b>Zygophyllaceae</b> | <i>Tribulus terrestris</i> L.                     | 45.83 | 0.46 | 5.32  | 11.60 | 41.18 | 0.55 | 8.69  | 21.11 | 39.76 | 0.51 | 3.94  | 9.92  |

The weed species with a frequency of more than 50 % in the provinces where the survey was conducted were *S. halepense* (95.83 %), *Physalis* spp. (91.67 %), *X. strumarium* (83.33 %), *P. oleracea* (66.67 %) and *A. retroflexus* (60.42 %) in Diyarbakır; *S. halepense* (82.35 %), *Physalis* sp (82.35 %), *A. retroflexus* (82.35 %), *X. strumarium* (79.0 %) and *C. arvensis* (64.71 %) in Mardin and *S. halepense* (95.18 %), *Physalis* sp (95.18 %), *X. strumarium* (84.70 %), *P. oleracea* (81.93 %) and *C. arvensis* (56.63 %) in Şanlıurfa (Table 3).

In the cotton growing areas of Diyarbakır, *X.*

*strumarium* (89.30 %), *Physalis* spp. (61.90 %) and *S. nigrum* (58.60 %) of Özasan (2011), *S. halepense* (73 %), *X. strumarium* (67 %), *S. nigrum* (60 %) and *Physalis philadelphica* Lam. (53 %) in Şanlıurfa by Arslan (2018), *X. strumarium* (85.99 %), *Physalis* sp (84.07 %) and *S. halepense* in Mardin (85.99 %) and *Physalis* spp. (92.13 %), *X. strumarium* (89.33 %) and *A. retroflexus* (73.3 %) in Şanlıurfa by Özasan and Bükün (2013) were the most common species and were similar to the species found in our study.

Table 3. Weed species with a frequency of over 50% in surveys of cotton fields in the provinces of Diyarbakır, Mardin and Şanlıurfa

| Weeds                               | Occurrence Frequency (%) |        |           |
|-------------------------------------|--------------------------|--------|-----------|
|                                     | Diyarbakır               | Mardin | Şanlıurfa |
| <i>Amaranthus retroflexus</i> L.    | 60.42                    | 82.35  | -         |
| <i>Convolvulus arvensis</i> L.      | -                        | 64.71  | 56.63     |
| <i>Sorghum halepense</i> (L.). Pers | 95.83                    | 82.35  | 95.18     |
| <i>Physalis</i> spp.                | 91.67                    | 82.35  | 95.18     |
| <i>Portulaca oleracea</i> L.        | 66.67                    | -      | 81.93     |
| <i>Xanthium strumarium</i> L.       | 83.33                    | 79.00  | 84.70     |

When analysed according to their density in the studied fields, it was found that the densest species were *S. halepense* with 2.59 weeds/m<sup>2</sup> in Diyarbakır, *A. retroflexus* with 5.10 weeds/m<sup>2</sup> in Mardin and *C. rotundus* with 8.91 weeds/m<sup>2</sup> in Şanlıurfa (Table 4). ). After these species, the weed species with the highest density in the studied fields were: *P. oleracea*, *Physalis* spp., *X. strumarium*, *C. arvensis* and *E. colonum*, and their densities varied between 1 and 4 weeds/m<sup>2</sup>.

Considering the survey studies in the Southeastern Anatolia region with weed densities  $\geq 1$  piece/m<sup>2</sup>; Uludağ and Katkat (1991) reported that the densities of *C. dactylon*, *S. halepense* and *P. oleracea* species in the GAP region were 2 to 3 weeds/m<sup>2</sup>, and Özasan (2011) reported that *A. retroflexus*, *C. rotundus*, *P. oleracea*, *Physalis* sp, *S. halepense*, *S. nigrum* and *X. strumarium* in Diyarbakır had densities between 1 and 3 weeds/m<sup>2</sup>. Özasan and Bükün (2013) reported that the most abundant species in Mardin and Şanlıurfa provinces were determined to be *A. retroflexus*, *Physalis* spp. and *X. strumarium* with 1 to 3 weeds/m<sup>2</sup>. In addition, in the studies

conducted by Arslan (2018) in Şanlıurfa, the densities of *A. retroflexus*, *C. arvensis*, *C. rotundus*, *C. dactylon*, *P. oleracea*, *Physalis* sp, *S. halepense*, *S. nigrum* and *X. strumarium* were 1 to 10 in per m<sup>2</sup>. Pala and Mennan (2019) found that the density of *A. retroflexus*, *C. arvensis*, *Physalis* spp., *S. halepense* and *X. strumarium* in the Karacadağ basin was between 1 and 1.5 weeds/m<sup>2</sup>.

Similar to our results in the southeastern Anatolia region, the Aegean and the Mediterranean, where cotton production is intensive; Kadioğlu et al. (1993) *Alhagi pseudalhagi*, *Cyperus* spp., *C. rotundus*, *E. colonum*, *H. trionum*, *P. oleracea*, *S. verticillata*, *S. nigrum*, *S. halepense*, *X. strumarium*, *C. arvensis*, *Prosopis farcta*, Boz (2000) *A. retroflexus*, *C. rotundus* and *X. strumarium*, Kaya and Nemli (2002) *C. dactylon*, *C. rotundus*, *C. album*, *P. oleracea*, *S. halepense*, Tursun et al. (2004) *S. halepense*, *C. arvensis* L., *S. nigrum*, *X. strumarium*, *P. oleracea*, *Setaria* spp., *Cyperus rotundus* and *E. cruss-galli*, Özkil et al. (2019) *C. rotundus* and *Ipomoea triloba* species were determined with more than 1 weed/m<sup>2</sup>.

Table 4. Weed species with a density of more than 1 weed/m<sup>2</sup> in surveys of cotton fields in the provinces of Diyarbakır, Mardin and Şanlıurfa

| Weeds                                | Density (weed/m <sup>2</sup> ) |        |           |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------|-----------|
|                                      | Diyarbakır                     | Mardin | Şanlıurfa |
| <i>Amaranthus retroflexus</i> L.     | 1.82                           | 5.10   | -         |
| <i>Convolvulus arvensis</i> L.       | -                              | -      | 1.80      |
| <i>Cyperus rotundus</i> L.           | 2.06                           | 2.07   | 8.91      |
| <i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link | -                              | -      | 1.30      |
| <i>Sorghum halepense</i> (L.) Pers   | 2.59                           | 1.70   | 2.15      |
| <i>Physalis</i> spp.                 | 1.56                           | 1.91   | 2.34      |
| <i>Portulaca oleracea</i> L.         | 1.83                           | 3.20   | 3.26      |
| <i>Xanthium strumarium</i> L.        | 2.25                           | 1.93   | 2.21      |

When the weeds found in the studied cotton fields were evaluated according to their specific and general cover area, it was found that *S. halepense* in Diyarbakır and *A. retroflexus* in Mardin had the highest specific and general cover area, while the highest specific cover area was found in *C. rotundus* and the highest general cover area was found in *S. halepense* in Şanlıurfa (Table 2). Similar to our study, Boz et al. (1995) found *S. halepense* in the GAP Region, Şahin et al. (2020) determined *C. arvensis*, *P. oleracea*, *S. halepense* and *X. strumarium* in Iğdır, Özkil et al. (2019) found *C. rotundus*, *I. tribola* and *S. halepense* species had the highest coverage area in Antalya.

During the surveys in the cotton growing areas in the region where our study was conducted, it was found that the prevalence rates of *S. halepense*, *X. strumarium* and *Physalis* spp., which are the most common species, were of over 80%.

Comparing these species with the surveys conducted in the Southeast Anatolia region in the last 30 years. In the study conducted by Bükün (2005) in 1996 and 2004 to determine the changes in weed flora in the last decade after irrigation in the cotton growing areas of Harran Plain, it was found that the frequency of occurrence of *S. halepense* increased from 23.63% to 60.00% and *X. strumarium* from 56% to 72%. Arslan (2018) stated that the most common species in the changes in weed flora in Şanlıurfa and Southeastern Anatolia Region were *S. halepense*, *X. strumarium* and *Physalis* spp. and found that the prevalence rates of these weeds were over 60, 70 and 80%, respectively, in the last twenty years. Pala and Mennan (2019), in their

surveys of cotton fields in the Karacadağ Basin, found that the prevalence of *S. halepense* was 72%, *X. strumarium* 86% and *Physalis* spp. 56%, and the results of the study showed that the prevalence of these weed species is increasing in the region.

During the surveys in the cotton fields of Diyarbakır, Mardin and Şanlıurfa provinces in the Southeast Anatolia region, it was found that weed species and densities vary depending on the province. The reason for this variation is that the dominance level of weed species varies according to location and cultivated product, and some weed species that are heavily infested in some regions may not have the same level in other locations (Tena et al., 2012). In addition, the surveys have shown that the occurrence and density of some important species and other species vary across the region. It is assumed that the main reasons for this variability are irrigation and control methods (Bükün, 2005).

It is predicted that the prevalence of *S. halepense*, *X. strumarium* and *Physalis* spp. will increase when agricultural land is opened to irrigation under the GAP project. Studies have shown that the density of these species increases in agricultural areas due to the effects of irrigation and that these species develop faster in a humid environment (Mennan and Işık, 2003; Bükün and Uygur, 2003; Bükün, 2005). It has been reported that the occurrence and density of *Physalis* spp. increased compared to before, especially after 1995 and 1996 when the Harran Plain was irrigated, and that the increase of this species may have been contaminated with seed material in the Harran Plain and spread rapidly to



fields that were not contaminated with irrigation water (Bükün and Uygur 2003; Bükün, 2005; Arslan, 2018). Another factor that plays an important role in weed flora is crop rotation. Different crops can be grown in crop rotation and the adaptation of certain species can be prevented by using different herbicide applications and different cultural control methods in the control of weeds in different crops (Bükün and Uygur, 2003; Bükün, 2005; Serim et al., 2023).

When comparing the results of our survey studies with the survey results carried out in the region over the last 30 years, it was found that there were significant changes in weed species and densities. In the cotton field surveys, it was found that the frequency of occurrence of *Amaranthus palmeri* L., one of the invasive weed species, was 11.76% in Mardin and about 10% in Şanlıurfa. *A. palmeri* is a weed species of American origin and was first sighted in Türkiye in 2014 in the east of Adana, Hatay and Osmaniye (Eren et al., 2016). In the Southeastern Anatolia region, it was first sighted in 2017 by Özaslan et al. (2017) in cotton and maize fields in Mardin, and in the surveys conducted by Turan (2019) in cotton and maize fields, it was found that the frequency of occurrence was 16.29%. It has been determined that the prevalence of this invasive species is increasing every year in agricultural and non-agricultural areas and will cause problems in certain regions (Özaslan et al., 2017; Turan, 2019; Sirri, 2022). In our study, the prevalence of this invasive species was found to have increased in Şanlıurfa cotton fields. It was found that the prevalence of *Ipomoea* spp., one of the other invasive species identified in the region, was over 10% in Diyarbakır and Şanlıurfa, while *C. melo* species was found in all three provinces where the survey was conducted and prevalence rates varied between 11% and 36%. In the surveys conducted by Arslan (2018) in cotton fields in Şanlıurfa, it was found that these two species were identified for the first time in the Southeastern Anatolia Region and their prevalence rate was below 10%. It has been

reported that studies should be conducted on the spread, distribution and control of the weed species *Ipomoea triloba* L., *Amaranthus palmeri* L. and *Cucumis melo*, which pose a threat to cotton fields, and measures should be taken to prevent the spread of these species (Yazlık et al, 2014; Yazlık et al. , 2018; Özkil et al, 2019; Serim et al., 2023).

One of the factors causing changes in the weed flora is global climate change. It is said that the basic climate variables, the increase in CO<sub>2</sub> levels and the resulting changes in global temperature and precipitation will increase the invasion success of many weed species due to their proliferation, spread and development (Sorte et al, 2013; Manea et al, 2016; Varanasi et al, 2016; Fernandino et al, 2018). In our study, the weed species *C. tintoria* and *P. farcta* were found to have increased in the Southeastern Anatolia region. It is thought that this increase may be influenced by both climate change and other factors. Similar to our results, Serim et al. (2023) found that changes in the weed flora in cotton fields in the eastern Mediterranean region of Türkiye caused an increase in the average temperature of *C. tintoria*, *P. farcta* and *S. halepense* species.

## Conclusion

Surveys carried out in the cotton growing areas of the Southeast Anatolia Region revealed that the occurrence and density of weed species have increased. With the increase in irrigable agricultural land in the region, cropping patterns and the crop rotation system have changed. Changes in the crop rotation system and changes in cultural, mechanical and chemical weed control can lead to differences in the weed flora. The use of post-emergence herbicides against broadleaf weeds in cotton is limited but not effective. It is therefore predicted that the incidence of broadleaf weeds such as *A. palmeri*, *Physalis* spp. and *X. strumarium* will increase. Effective control methods need to be developed to prevent the damage caused by invasive species that are

spreading rapidly on agricultural land, pastures, dams and biodiversity. During the observations in the cotton fields, it was found that irrigation and planting methods had a significant impact on the weeds and that the weed problem decreased in the areas where drip irrigation and ridge planting were applied. It has been shown that drip irrigation is more successful than flood irrigation method in all weed control applications (Hakoomat et al. 2017). It is believed that the use of sprinkler and drip irrigation systems instead of overhead irrigation, especially in cotton cultivation, can reduce the spread of weed species.

As a result of the study, it is necessary to continuously monitor the occurrence and density of weed species in the cotton growing areas of the region and conduct detailed studies on the biological characteristics of these species, alternative control methods, determination of the economic level threshold and the critical period.

### Acknowledgements

We would like to thank the General Directorate of Agricultural Research and Policies for providing financial support within the scope of the project numbered TAGEM/BSAD/A/20/A2/P1/2028. This study includes a part of the doctoral thesis.

### Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest in this study.

### Author Contributions

N. T. planned to work, İ. E. S. carried out the field studies. N. T. examined the data obtained from the study and the article was written by İ. E. S.

### References

Ahmad I. M., Ansar M., Iqbal M., & Minhas N. (2003). Effect of planting geometry ve mulching on moisture conservation, weed control ve wheat growth under rainfed conditions. *Pakistan Journal of Botany*, 4: 1189-1195.

Anonymous, (2023a). Cotton: World Markets and Trade, <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/cotton.pdf>. Access date: 16.12.2023.

Anonymous, (2023b). Cotton Sector Report, National Cotton Council. [http://www.upk.org.tr/User\\_Files/kitaplik/ulusal-pamuk-konseyi-pamuk-sektor-raporu-2017.pdf](http://www.upk.org.tr/User_Files/kitaplik/ulusal-pamuk-konseyi-pamuk-sektor-raporu-2017.pdf) Access date: 17.12.2023.

Arslan, Z. F. (2018). Changes, problems and solution of weeds in cotton fields after irrigation in Şanlıurfa province. *Harran Journal of Agricultural and Food Science*, 22(1): 109-125.

Basal, H., Karademir, E., Goren, H. K., Sezener, V., Dogan, M. N., Gencsoylu, I., & Erdogan, O. (2019). Cotton production in Türkiye and Europe. In *Cotton Production* (pp. 297–321). John Wiley & Sons, Ltd.

Beltrao N.E., 1994. Weed Management in Cotton. In R.Labrada, R. Caseley & C. Parker (Ed.), *Weed Management for Developing Countries* (pp. 340-345). Rome: FAO

Bora, T., & Karaca, İ. (1970). Kültür bitkilerinde hastalığın ve zararın ölçülmesi. Ege Üniv. Ziraat Fakültesi Ders Kitabı No: 167, s. 43.

Boz, Ö. (2000). Determination of weed flora, distribution and density of weeds species occurring in cotton growing areas in Aydin. *Turkish Journal of Weed Science*, 3(1): 10-16.

Boz, Ö., & Doğan, M.N. (2004). Weed species and their control in cotton growing areas in Aydin province. *Journal of Adnan Menderes University Agricultural Faculty*, 1(2): 13-16.

Boz, Ö., Uygur, S., Kadioğlu, İ., & Uygur, F.N. (1995). Weeds or cotton fields and their distribution in GAP Area. *GAP Region Plant Protection Problems and Solution Suggestions Symposium*, (pp. 329-335), 27-29 Nisan, Şanlıurfa, Türkiye.

Bükün, B., & Uygur, F., N. (1997). The weeds found in cotton growing areas of Harran plain and the determination of critical period for the most appropriate time of their control. 2. *Turkish Weed Science Congress*, (pp. 25-30), 1-4 Setember, İzmir, Türkiye.

Bükün, B., & Uygur, F.N. (2003). The impact of irrigation on weed species composition and density in cotton plantations of Harran Plain Türkiye. *Proceedings of the 7th EWRS Mediteranean Symposium*, (pp. 143-144), 6-9 Mayıs, Adana, Türkiye.

Bükün, B. (2005). Weed flora changes in cotton growing areas during the last decade after irrigation of Harran plain in Sanliurfa, Türkiye. *Pakistan Journal of Botany*, 37(3): 667-672.

Doğanoğlu, M. (2010). *The environmental impacts of Southeast Anatolian Project and environmental consciousness: The case of Şanlıurfa province Çamlıdere village* (Unpublished doctoral thesis). Ankara University Social Sciences Institute, Ankara, Türkiye.

Economou, G., Avgoulas, C., & Travlos, I. (2005). Weed flora distribution in greek cotton fields and its possible

- influence by herbicides. *Phytoparasitica*, 33(4): 406-419. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02981309>
- Eren, Ö., Doğan, M.N., Boz, Ö., Türkseven, S., & Özcan, R. (2016). *Amaranthus palmeri* L. [In: Raab-Straube, E. von & Raus, T. (Ed.), Euro+Med-Checklist Notulae, 6], Willdenowia. 423-424: 437-441.
- Fernandino, G., Elliff, C.I., & Silva, I.R., (2018). Ecosystem-based management of coastal zones in face of climate change impacts: challenges and inequalities. *Journal of Environmental Management*, 215: 32–39.
- Gönen, O. (1999). *Determination of germination biology and morphologic characteristic to use practical identification with computer of summer growing weed species in Çukurova region of Türkiye* (Unpublished doctoral thesis). Cukurova University, The Insititute of Natural and Applied Sciences, Adana, Türkiye.
- Gözcü, D., & Uludağ, A. (2005). Weeds and their importance in cotton fields in Kahramanmaraş province of Türkiye. *Turkish Journal of Weed Science*, 8(1): 7-15.
- Güncan, A., & Karaca, M. (2014). *Weed Control*. Konya: Selcuk University Press, 3rd Edition.
- Hakoomat, A., Arooj, M., Sarwar, N., Areeb, A., Shahzad, A. N., & Hussain, S. (2017). Application of pre and post emergence herbicide under improved field irrigation system proved a sustainable weed management strategy in Cotton Crop. *Planta Daninha*, 35. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-83582017350100052>.
- Issayev, G., & Baimuratova, S. (2023). Species composition of companion weeds of cotton culture Of Turkestan region and patterns of their distribution. *Icontech International Journal*, 7(1), 34–38. DOI: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7950991>
- Kadioğlu, İ., Uluğ, E., & Üremiş, İ. (1993). Investigation of weeds in cotton fields in Mediterranean region of Türkiye. 1. *Turkish Weed Science Congress*, (pp. 151-156), 3-5 February, Adana, Türkiye,
- Kaya, İ., & Nemli, Y. (2002). Determination of weed species which are problem in important cotton growing areas in Aydın. *Yuzuncu Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 12 (1): 37-40.
- Keskinkılıç, K. (2014). *Developments in Türkiye's Cotton Situation*. Izmir Commodity Exchange, Reports, Izmir, Türkiye.
- Manea, A., Sloane, D.R., & Leishman, M.R. (2016). Reductions in native grass biomass associated with drought facilitates the invasion of an exotic grass into a model grassland system. *Oecologia*. 181: 175–183.
- Mennan, H., & Işık, D. (2003). Invasive weed species in onion production systems during the last 25 years in Amasya, Türkiye. *Pakistan Journal of Botany*, 35(2): 155-160.
- Odum, E.P. (1971). *Fundamentals of ecology*. Third Edition, Philadelphia: W.B. Saunders Company.
- Özaslan, C., & Bukun, B. (2013). Determination of weeds in cotton fields in Southeastern Anatolia Region of Türkiye. *Soil and Water Journal*, 2 (2): 1777-1784.
- Özaslan, C., Farooq, S., & Önen, H. (2017). Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S.Watson): A new addition to the alien flora of South Eastern Anatolia. *26 th Asian-Pacific Weed Science Society Conference*, (pp. 293), 19-22 September, Kyoto, Japan.
- Özaslan, C. (2011). *Determination of weed species creating problem in cotton and wheat fields of Diyarbakir with fungal factors they host and research on their bio-activity potentials* (Ph. D. Thesis). Selçuk University, The Insititute of Natural and Applied Sciences, Konya, Türkiye.
- Özer Z., Kadioğlu İ., Önen H., & Tursun N. (1998). *Herbology (Weed Science)*, 2nd Expanded Edition. Tokat: Gaziosmanpaşa Universtiy Faculty of Agriculture publishers.
- Özkil, M., Serim, A. T., Torun, H., & Üremiş, İ. (2019). Determination of weed species, distributions and frequency in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fields of Antalya Province. *Turkish Journal of Weed Science*, 22(2):185-191.
- Pala, F., & Mennan, H. (2019). Determination of Weeds in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) Fields of Karacadag Basin. *5th International Regional Development Conference*, (pp. 660-675) 26-28 September, Malatya, Türkiye.
- Salimi, H., Atri, A., & Rahimian mashhadi, H. (2006). Determination of the critical period of weed control in cotton fields. *Applied Entomology and Phytopathology*, 74(1), 47–64.
- Serim, T. A., ÖZKİL, M., Uremis, I., & Uludag, A. (2023). Changes in the weed flora of cotton fields in the Eastern Mediterranean region of Türkiye. *Mustafa Kemal University Journal of Agricultural Science*. 28(3), 633–648. DOI: <https://doi.org/10.37908/mkutbd.1325888>
- Sırrı, M. (2022). A new risk for the Southeastern Anatolia Region *Amaranthus palmeri*. *MAS Journal of Applied Sciences*, 7(4), 1072–1090.
- Sorte, C.J.B., Ibáñez, I., Blumenthal, D.M., Molinari, N.A., Miller, L.P., Grosholz, E.D., Diez, J.M., D'Antonio, C.M., Olden, J.D., Jones, S.J., & Dukes, J.S. (2013). Poised to prosper? A cross-system comparison of climate change effects on native and nonnative species performance. *Ecology Letters*, 16, 261–270.
- Şahin, S., Gürbüz, R., & Çoruh, İ. (2020). The performance of various herbicides on weed control in cotton fields and productivity of cotton in Iğdir province. *Journal of Agriculture*, 3(2): 40-48. DOI: <https://doi.org/10.46876/ja.822131>
- Taye, W., Abate, S., Belay, Z., Yesuf, N., & Getahun, S. (2019). Survey of cotton weeds in Middle Awash of

- Ethiopia. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 9, 259–267. DOI: <https://doi.org/10.15580/GJAS.2019.2.032819057>
- Tena, E., Hiwet, A., & Dejene, M. (2012). Quantitative and qualitative determination of weeds in cotton-growing areas of Humera and Metema, Northwestern Ethiopia. *Ethiopian Journal of Applied Science Technology*, 3, 57–69.
- Turan, R. 2019. Mardin ili pamuk ve mısır ekim alanlarındaki istilacı yabancı ot türlerinin (*Physalis* spp., *Amaranthus* spp. ve *Echinochloa* spp.) yaygınlık ve yoğunluğunun araştırılması (Yüksek lisans tezi). Dicle Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, Türkiye.
- Tursun, N., Tursun, Ö., & Kaçan, K. (2004). Determination of weeds in cotton fields in Kahramanmaraş, Türkiye. *KSU Journal of Science and Engineering*, 7(1): 92-95.
- Tursun, N., Budak, S., & Kantarci, Z. (2016). The Effects of row spacing on determination of critical period for weed control in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Journal of Field Crops Central Research Institute*, 25 (special issue-2):100-105.
- TÜİK, (2020). Turkish Statistical Institute. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. Access date: 04.05.2020.
- TÜİK, (2023). Turkish Statistical Institute. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&locale=tr>. Access date: 15.12.2023.
- Uludağ, A., & Katkat, M. (1991). Güneydoğu Anadolu Bölgesinde pamuk ekim alanlarındaki yabancı otların yayılış alanları ve yoğunluklarının belirlenmesi üzerinde araştırmalar, *The Fourth Turkish Phytopathology Congress*, (pp. 125-131), 7-11 October, İzmir, Türkiye.
- Uludağ, A., & Üremiş İ. (2000). A perspective on weed problems of cotton in Türkiye. *The Inter-Regional Cooperative Research Network on Cotton, A Joint Workshop and Meeting of the All Working Groups*, (pp. 194-199), 20-24 September, Adana, Türkiye.
- Uygur, F.N., Koch, W., & Walter, H. (1984). Introduction to Weed Science. *PLITS*, Stuttgart: Verlag Josef Margraf.
- Uygur, S., (1997). Research on possibilities to identify weed population and distribution in Çukurova region, and to determine and distribution of diseases that could be used in biological control of weeds (Ph. D. Thesis). Cukurova University, The Institute of Natural and Applied Sciences, Adana, Türkiye.
- Varanasi, A., Prasad, P. V. V., Jugulam M. (2016). Impact of climate change factors on weeds and herbicide efficacy. *Advances in Agronomy*, 135: 107-146.
- Vargas, R.N., Fischer, W.B., Kempen, H.M. & Wright S.D. (1996). Cotton weed management. In: Cotton Production Manual, edited by S.J. Hake, T.A. Kerby, K.D. Hake. University of California, *Division of Agriculture ve Natural Resources*, 187-202.
- Yazlık, A., Üremiş, İ., Uludağ, A., Uzun, K., Şenol, S.G., & Keskin, İ. (2014). A new alien plant species in Türkiye: *Ipomoea triloba* L. *8th International Conference on Biological Invasions from understanding to action* (p.174), 3-8 November, Antalya, Türkiye.
- Yazlık A., Üremiş İ., Uludağ A., Uzun K., & Şenol S.G. (2018). *Ipomoea triloba*: an alien plant threatening many habitats in Türkiye. *EPPO Bulletin*, 48 (3) 589-594.
- WeiHua, L., Dan, L., Zhen, Z., Fang, H., HongXiang, H., & JieYing, H. (2014). Effects of different planting patterns on weeds community. *Guizhou Agricultural Sciences*, 42 (1): 89-93.



# Does weed infestation alter the population density of harmful leafhopper species in second crop maize?

## *Yabancı otlar ikinci ürün mısırdaki zararlı yaprakpiresi türlerinin popülasyonu yoğunluğunu değiştirir mi?*

Emine Kaplan Yavuz<sup>1</sup>, Hasan Tunaz<sup>2</sup>, Çetin Mutlu<sup>3\*</sup>

<sup>1,2</sup>Sütçü İmam University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, KAHRAMANMARAŞ

<sup>3</sup>Harran University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, ŞANLIURFA

<sup>1</sup><https://orcid.org/0009-0001-5261-7008>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0003-4942-6056>; <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0003-4962-5506>

### To cite this article:

Kaplan Yavuz, E., Tunaz, H. & Mutlu, Ç. (2024). Does weed infestation alter the population density of harmful leafhopper species in second crop maize?. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2): 222-234

DOI: 10.29050/harranziraat.1465501

### \*Address for Correspondence:

Çetin Mutlu

e-mail:

cetinmutlu21@hotmail.com

### Received Date:

05.04.2024

### Accepted Date:

10.06.2024

© Copyright 2018 by Harran University  
Faculty of Agriculture. Available on-line  
at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ABSTRACT

Weed-insect interaction has been studied for decades to determine the role of weeds in insect infestation. This study investigated the impact of weed density on the population density of important leafhopper species (Cicadellidae: Hemiptera) and their egg parasitoid *Anagrus atomus* (L.) (Hymenoptera: Chalcidoidea) in maize (*Zea mays* L.) planted as second crop in Şanlıurfa province, Türkiye during 2022 and 2023. Population densities of harmful leafhopper species, i.e., *Zyginidia sohrab* (Zachvatkin), *Empoasca decipiens* (Paoli), *Asymmetrasca decedens* (Paoli), *Psammotettix striatus* (Linnaeus), and their parasitoid, i.e. *A. atomus* were monitored by yellow sticky traps (RAL-1016) under weedy and weed-free conditions. Three traps were hung in each experimental unit and the densities of target species were recorded weekly. The population densities of leafhopper species feeding on *Sorghum halepense* (L.) (Johnsongrass) and the effect of *A. atomus* on their population density were also determined in weedy treatment. A total 15 maize leaves were taken from both weedy and weed-free treatments, and *S. halepense* leaf tissues containing leafhopper eggs parasitized by *A. atomus* were counted weekly.

Weed density had non-significant effect on the population density of *Z. sohrab* during both years. Contrastingly, increasing weed density increased the population density of *E. decipiens* & *A. decedens* complex in 2022. Nevertheless, weed density had non-significant effect on the population density of *E. decipiens* & *A. decedens* complex during 2023. Weedy treatment recorded higher population density of *P. striatus* (140 and 100 adults, respectively); however, both weedy and weed-free treatments recorded similar density (125 and 97 adults) during 2023. Weed density proved a significant factor in increasing *A. atomus* density. A total of 2935 parasitized eggs were recorded from the weedy treatment, whereas 1609 parasitized eggs were recorded from weed-free treatment. Although direct relationship between leafhoppers and weed density remains uncertain, integrated pest management strategies must consider phytophagous insects feeding on weeds at field edges and within fields and the natural enemy complex.

**Key Words:** Sticky trap, density, pest, parasitoid, johnsongrass

### ÖZ

Yabancı otlar ile zararlı böcekler arasındaki etkileşim yıllardır yabancı otların böcek istilasındaki rolünü belirlemek için incelenmektedir. Bu çalışma ikinci ürün mısırdaki (*Zea mays* L.) yabancı ot yoğunluğunun önemli yaprakpireleri (Cicadellidae: Hemiptera) ile bunların yumurta parazitoiti *Anagrus atomus* (L.) (Hymenoptera: Chalcidoidea)'un popülasyonu yoğunluğuna etkisinin belirlenmesi amacıyla Şanlıurfa ilinde 2022 ve 2023 yıllarında yürütülmüştür. Çalışmada zararlı yaprakpireleri, *Zyginidia sohrab* (Zachvatkin), *Empoasca decipiens* (Paoli), *Asymmetrasca decedens* (Paoli), *Psammotettix striatus* (Linnaeus.), ile *A. atomus*'un popülasyonu yapışkan tuzaklar (RAL-1016) ile yabancı otlar ve yabancı ot içermeyen koşullarda izlenmiştir. Her deneme alanına 3'er adet sarı yapışkan tuzağı asılarak

hedef türlerin yoğunlukları haftalık olarak kaydedilmiştir. Yabancı otlu deneme alanında *Sorghum halepense* (L.) (Kanyaş) üzerinde beslenen yaprakpıresi türleri ve *A. atomus*'un popülasyon yoğunluğuna olan etkiside ayrıca belirlenmiştir. Toplamda her iki deneme alanından haftalık olarak 15 adet mısır yaprağı ve *S. halepense* yaprağı alınarak yaprak dokusu içinde *A. atomus* tarafından parazitlenmiş yaprakpıresi yumurtaları sayılmıştır.

Yabancı ot yoğunluğunun her iki yılda *Z. sohrab*'ın popülasyon yoğunluğu üzerinde anlamlı bir etkisinin olmadığı, buna karşın *E. decipiens* & *A. decedens* kompleksi popülasyonunu artırdığı görülmüştür. Ancak, 2023 yılında yabancı ot yoğunluğunun *E. decipiens* & *A. decedens* kompleksi popülasyon yoğunluğu üzerinde anlamlı bir etkisi bulunmadığı kaydedilmiştir. *Psammotettix striatus* popülasyonu 2022 yılında yabancı otlu deneme alanlarında daha fazla bulunmuş (sırasıyla 140 ve 100 ergin), buna karşın 2023 yılında ise önemli bir fark görülmemiştir (125 ve 97 ergin). Yabancı ot yoğunluğunun *A. atomus*'un yoğunluğunu önemli ölçüde artıran bir faktör olduğu kaydedilmiştir. Yabancı otlu deneme uygulamasından toplamda 2935 adet parazitlenmiş yumurta kaydedilmiş, buna karşın yabancı otsuz alanda toplamda 1609 adet parazitlenmiş yumurta kaydedilmiştir. Yabancı ot yoğunluğu ile yaprakpireleri arasındaki doğrudan ilişki belirsiz olsa da, tarla kenarında ve içinde bulunan yabancı otlar üzerinde beslenen fitofag böcekler ile doğal düşman kompleksine göre entegre zararlı yönetim stratejilerinin uygulanmasının doğru olacağı düşünülmektedir

**Anahtar Kelimeler:** Yapışkan tuzak, yoğunluk, zararlı böcek, parazitoit, kanyaş

## Introduction

Pests are a significant hurdle to the productivity and quality of agricultural crops. (Manosathiyadevan et al., 201). The Cicadellidae (Hemiptera) family consisting of leafhoppers is prominent among these pests infesting various crops (Maramorosch and Harris, 1979). The Cicadellidae species are either monophagous or polyphagous and cause significant economic crop losses by damaging different phenological stages of maize plants (Mutlu et al., 2008a). The damage primarily results from the insect feeding on plant sap and the clogging of the vascular tissues by toxic substances secreted by insects into the plant, which obstruct the transport of nutrients within the plant. Additionally, some species act as vectors for plant virus diseases, resulting in significant economic losses (Nielson, 1985; Nault and Ammar, 1989; Backus et al., 2005; Paradel et al., 2014). Leafhoppers are regarded as an important pest group in agricultural production and require effective management measures (Mutlu and Sertkaya, 2015a; Ersin et al., 2017).

Several studies have investigated the bioecology, biology, and economic damage thresholds of species belonging to the Cicadellidae family in Türkiye (Mutlu et al., 2008b; Yılmaz and Karsavuran, 2010; Mutlu and Sertkaya, 2015b; Kılıç and Sertkaya, 2019; Akmeşe and Sertkaya, 2021, Baran Yazıcı et al., 2023). More than 27 species of leafhoppers have been identified in the Southeastern Anatolia region of the country,

where maize is intensively cultivated as main and second crop (Mutlu et al., 2008b). The most abundantly observed species are *Zyginidia sohrab* (Zachvatkin), *Empoasca decipiens* (Paoli), *Asymmetrasca decedens* (Paoli), and *Psammotettix striatus* (Linnaeus) (Mutlu et al., 2008a; Atmaca et al., 2021). *Zyginidia sohrab* is prevalent during the initial phenological stage (2-4 leaf) of second crop maize, leading to significant damages to seedlings (Mutlu et al., 2008a; Mutlu and Sertkaya, 2015a). It has been emphasized that some narrow-leaved weed species (i.e., Johnsongrass, cockspur grass, bermuda grass, and nutgrass) found along the edges and inside field of main and second crop maize significantly increase in leafhopper populations (Mutlu et al., 2008a; Mutlu and Sertkaya, 2015a; Baran Yazıcı et al., 2023).

Weed-insect interaction has been a rich topic of interest for decades. Weeds infesting cultivated fields serve as hosts for harmful insects, and simultaneously play a crucial role in supporting the populations of beneficial insect species (Norris and Kogan, 2000). Andow (1983) reported that higher plant diversity in agricultural ecosystems increases the densities of phytophagous insect species and their natural enemies (parasitoids and predators). Weeds continuously persist in agroecosystems and could not be eradicated; therefore, harmful insect species continuously persist on the weeds. Hence, harmful insect populations prevailing on the weeds should be considered while designing pest management

programs (Schellhorn and Sork, 1997). A complex relationship exists between leafhoppers and weeds (Van Emden, 1981). Weeds can increase the population density of harmful leafhoppers (Oloumi-Sadeghi et al., 1987; Paradel et al., 2014), nevertheless this relationship is not precisely symbiotic (Van Emden, 1981). Leafhoppers can damage several plants, including weeds and higher densities of leafhoppers are recorded in the areas with higher weed infestation (Mutlu and Sertkaya, 2015b). Weeds provide feeding habitat to leafhoppers, leading to a significant increase in their density (Oloumi-Sadeghi et al., 1987; Marques et al., 2012)

The interaction between leafhoppers and weed density has not been directly studied. However, some studies have investigated the interactions between weeds, arthropod pests, and their natural enemies (Altieri and Whitcomb, 1979; Sadeghi et al., 1989; Norris ve Kogan, 2000; Barbercheck and Wallace, 2021). It is suggested that weeds can serve as alternative hosts for beneficial insects, which indirectly affects the density and distribution of arthropod pests, including leafhoppers (Altieri and Whitcomb, 1979; Sadeghi et al., 1989; Norris and Kogan, 2000).

Although the direct relationship between leafhoppers, weed species and their densities remains uncertain, weeds and other environmental factors can affect the abundance and distribution of leafhoppers and their egg parasitoids in agricultural ecosystems. Hence, the major objective of the current study was to investigate the impact of narrow-leaved weeds (present along the edges and within second crop maize fields) on the population density of important leafhopper species and their egg parasitoid, *A. atomus*, in maize plants.

## Materials and Methods

### Materials

The materials used in the study consisted of second crop maize plants, leafhopper species (*Z. sohrab*, *A. decedes* & *E. decipiens*, *P. striatus*), egg

parasitoid *A. atomus*, plexi glas yellow sticky traps with RAL code 1016 (20×25 cm dimension), insect adhesive glue (Tangle-Trap), magnifying glass with light and stand, 1.5 m iron rods, microscope, and other laboratory equipment.

## Methods

### *The effect of weeds on leafhopper populations and their parasitoid Anagrus atomus in second crop maize*

This study was conducted at Büyükördek village situated in the central district of Şanlıurfa province. The village is well known for widespread cultivation of both main and second-crop maize. The experimental field (coordinates: 37.373164 °N, 38.662934 °E) covered a 50-decare planted with second crop maize during 2022 and 2023. The experiments were set up according to randomized complete block design with two treatments, i.e., weedy, and weed-free. The experimental blocks (50m × 10m) were divided into two parts, i.e., weedy, and weed-free. At least 50-meter distance was maintained between the blocks. Herbicide Ghibli (Syngenta) (220 g/L Dicamba & 50 g/L Nicosulfuron active ingredients) was applied at the rate of 1200 ml per hectare in weed-free treatment with a field sprayer during the 2-4 true leaf stage of maize plants. Furthermore, weeds emerging after irrigation were manually eliminated from the weed-free treatment. It was observed that the inter-row spaces of maize plants were mostly occupied by Johnson grass (*Sorghum halepense* (L)), purslane (*Portulaca oleracea* L.), and nutgrass (*Cyperus rotundus* L.) in weed-free treatment.

Three yellow sticky traps coated with insect adhesive glue (Tangle-Trap) were hung on iron rods at a height of ~1 meter above the ground in both treatments (Mutlu and Sertkaya, 2015a). The sticky traps were replaced weekly with new ones, and the leafhoppers (*Z. sohrab*, *A. decedens* & *E. decipiens* and *P. striatus*) stuck to both sides of the traps were counted using magnifying glass with light and stand.

Additionally, the number of adult *A. atomus*

individuals adhered to the yellow sticky traps was carefully counted to determine the weekly population density of the parasitoid. Moreover, 15 leaves were collected from maize plants in each treatment, and the leafhopper eggs parasitized by *A. atomus* within the leaf tissue were counted (Mutlu and Sertkaya, 2015b). Simultaneously, 15 leaf samples from *S. halepense* were randomly collected from weedy treatment, and the presence of parasitized eggs within the leaf tissue was determined. The weekly collected data were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) technique (Steel et al., 1997) to infer the differences between weedy and weed-free treatments for leafhopper and parasitoid density. The means were compared by the least significant

difference (LSD) post-hoc test. The analyses were conducted on SPSS statistical software version 20.0 (IBM SPSS Inc., 2012). The graphical representation of the data was performed using Microsoft Excel program in Office 365 version.

## Results and Discussion

*The effect of weed infestation on leafhopper populations and their parasitoid Anagrus atomus in second crop maize*

The population densities of important leafhopper species recorded from weedy and weed-free treatments during 2022 and 2023 are presented in Figures 1-4.

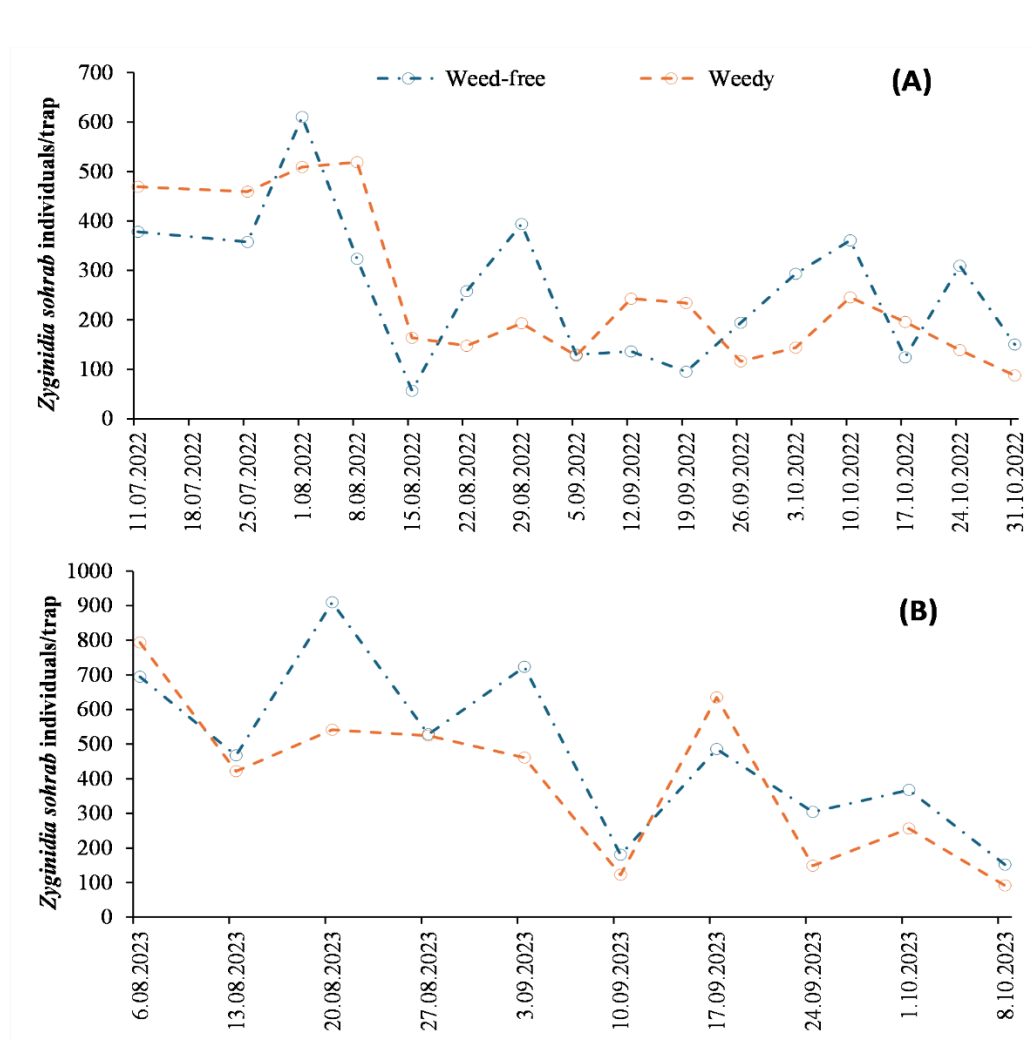


Figure 1. The influence of weed infestation on population density of *Zygynidia sohrab* in second crop maize during 2022 (A) and 2023 (B).

A total of 469 and 378 *Z. sohrab* adults were trapped by yellow stick traps from weedy and weed-free treatments, respectively during the second week of July 2022. The population density

in weedy treatment was significantly higher than weed-free treatment until the third week after hanging of traps (August 1, 2022). Afterwards, higher population density of *Z. sohrab* was



recorded in weed-free treatment than weedy plots. Population density of *Z. sohrab* in weed-free plots was 243 and 234.3 adults/trap, respectively during the second and third weeks of September (12.09.2022-19.09.2022). However, the density in weedy plots was 136 and 95.3 adults/trap during the second and third weeks, respectively. Subsequently, higher *Z. sohrab* density was noted in weed-free treatments than in weedy plots (Figure 1).

The monitoring started in early August during 2023 because the trials were established later than 2022. A total of 793 and 694 *Z. sohrab* individuals were recorded from weedy and weed-free treatments during first week. Afterwards, higher *Z. sohrab* was noted in weed-free plots than weedy plots. A higher number of *Z. sohrab* individuals were recorded in weedy treatments only in mid-September (17.09.2023) than weed-free treatment (Figure 1).

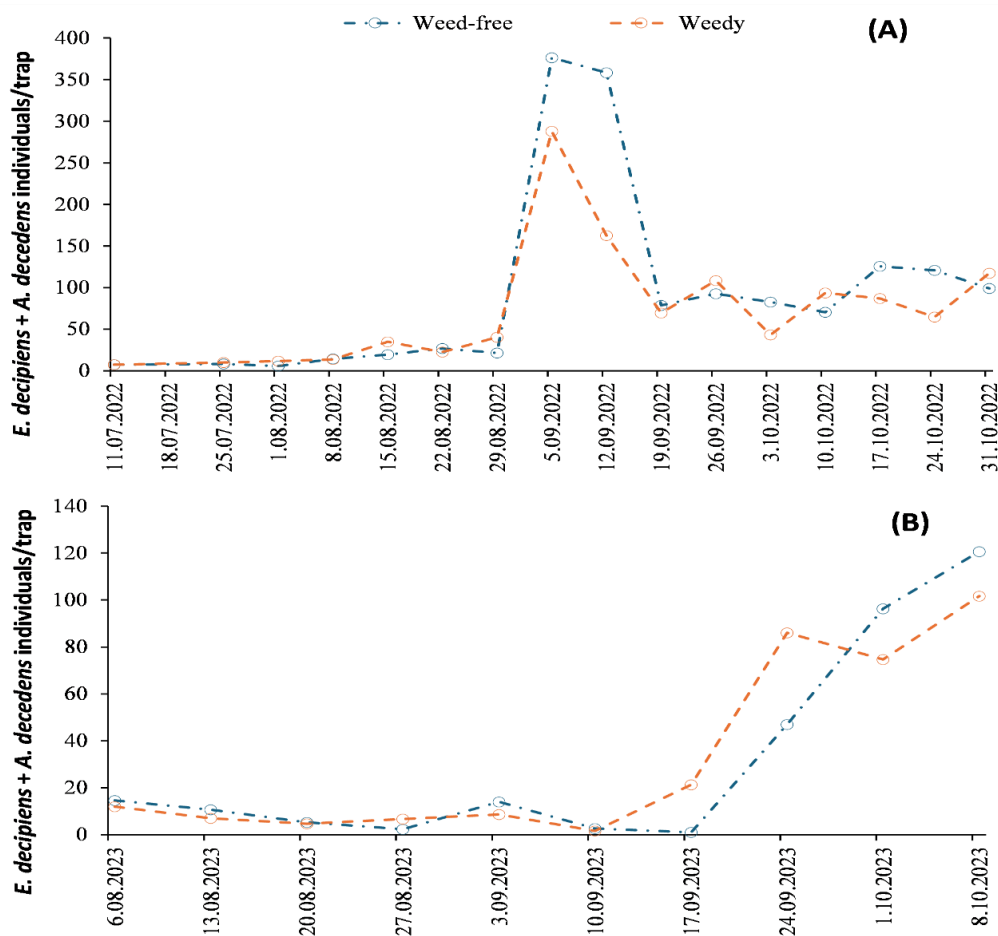


Figure 2. The influence of weed infestation on population density of *Empoasca decipiens* & *Asymmetrasca decedens* complex in second crop maize during 2022 (A) and 2023 (B)

A similar number of *E. decipiens* & *A. decedens* adults (7 individuals per trap) were observed in the traps placed in weedy and weed-free plots during second week of July (11.07.2022). Afterwards, the population density in weedy plots was significantly higher than in weed-free plots until the third week after trap installation (01.08.2022). The population of *E. decipiens* & *A. decedens* in the weed-free plots during the 7<sup>th</sup>, 11<sup>th</sup>, 13<sup>th</sup>, and 16<sup>th</sup> weeks was 40, 108, 93, and 117 adults/trap, respectively, while the density in weedy plots was 21, 92, 70, and 99 adults/trap,

respectively during the same weeks (Figure 2).

The population density of *E. decipiens* & *A. decedens* was lower in 2023 compared with 2022. On average, 15 individuals were captured in the traps from the weedy treatments, while 12 individuals of *E. decipiens* and *A. decedens* were found in the traps from the weed-free plots. Subsequently, population density of *E. decipiens* & *A. decedens* was greater in weed-free compared to weedy treatment. A greater number of *E. decipiens* & *A. decedens* individuals were found in weed-free treatments than weedy treatments

during first and second weeks of October (Figure 2).

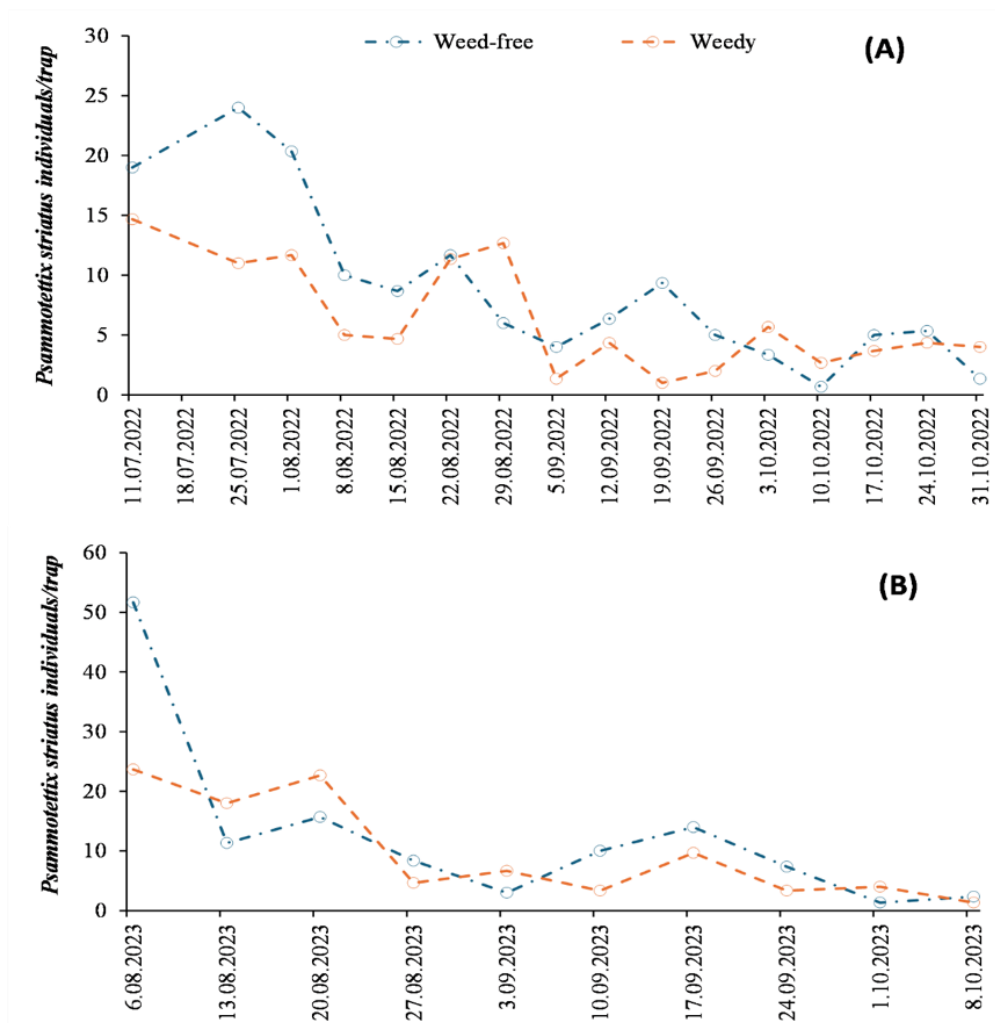


Figure 3. The influence of weed infestation on population density of *Psammotettix striatus* in second crop maize during the 2022 (A) and 2023 (B)

An average of 19 *P. striatus* adults were recorded from weed-free treatments, while 15 *P. striatus* adults were recorded from weedy treatments during the second week of July in 2022. Afterwards, the population density in the weed-free plots was significantly higher than weedy plots until the 7<sup>th</sup> week (22.08.2022). The population density of *P. striatus* in weedy treatment (13 adults/trap) on August 29, 2022 was higher than weed-free treatment (6 adults/trap). Likewise, population density of *P. striatus* in the weedy plots was 6 and 3 adults/trap, respectively,

while it was 3 and 1 adults/trap in weed-free plots during the first and second weeks of October (03.10.2022-10.10.2022).

Population density of *P. striatus* in 2023 was higher than 2022. However, its density was considerably lower than other leafhopper species. A total 52 adult *P. striatus* were recorded from the weed-free treatments during the first week (6.8.2023), while 24 adults were determined in weedy plots. Subsequently, *P. striatus* density was higher in weed-free plots than weedy during 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup>, and 10<sup>th</sup> sampling weeks (Figure 3).

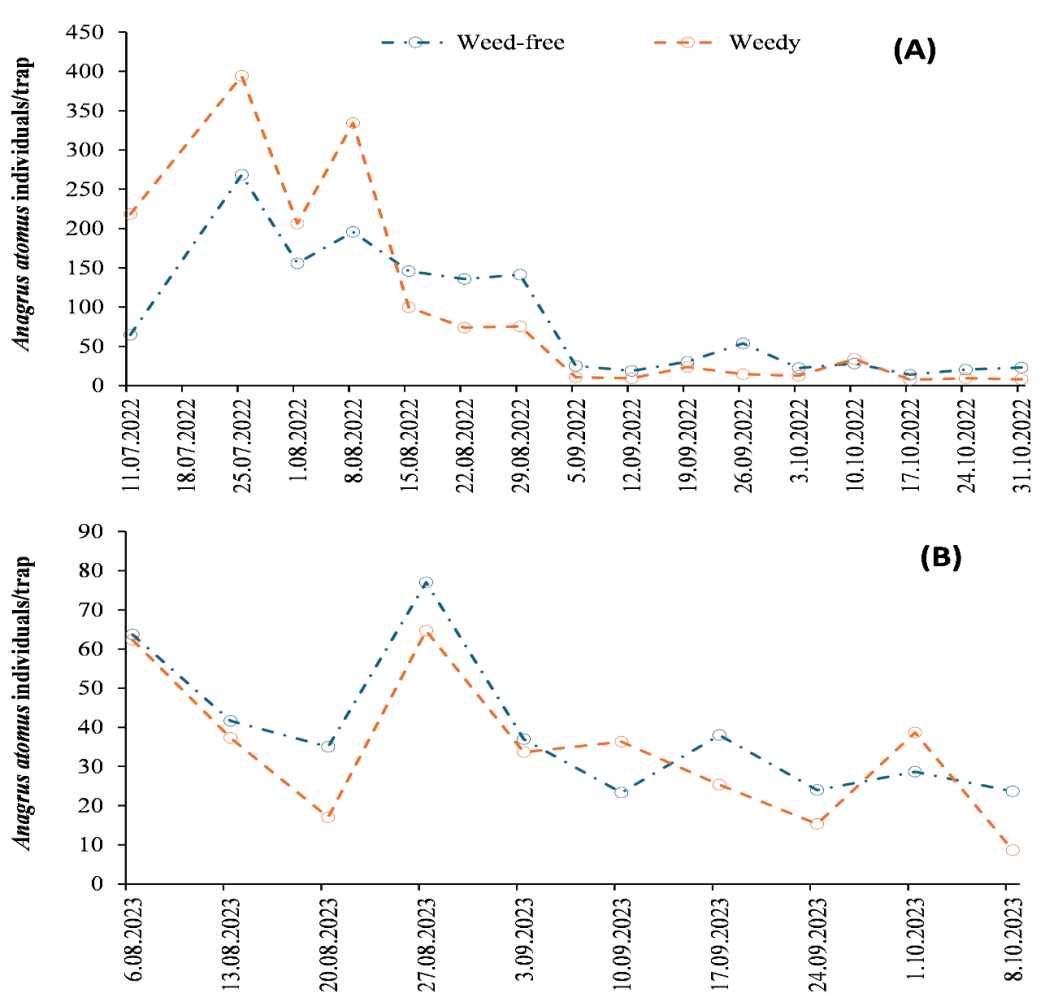


Figure 4. The influence of weed infestation on population density of *Anagrus atomus* in second crop maize during 2022 (A) and 2023 (B)

An average of 218 *A. atomus* adults were recorded from weedy treatment, whereas 65 *A. atomus* adults were recorded from the weed-free treatments during second week of July 2022. Population density of *A. atomus* in weedy plots was substantially greater than weed-free plots during 5<sup>th</sup> week (August 15, 2022). Afterwards, population density was higher in weed-free treatments than in weedy treatments except for the 13<sup>th</sup> week (10.10.2022) (Figure 4). A total 4596 *A. atomus* adults were recorded from weedy treatment, while 4030 adults were noted from weed-free treatment during the whole study period.

Unlike 2022, 62 individuals were recorded from

weedy treatment during first week after trap installation in 2023, while 64 *A. atomus* individuals were noted from weed-free treatments. Subsequently, *A. atomus* density was higher in the weedy plots than in the weed-free plots. A higher density was recorded in weedy treatment than weed-free treatment only at the beginning of October (01.10.2023) (Figure 4). A total of 1018 *A. atomus* adults were noted from weedy treatment, while 1176 adults were recorded from weed-free treatment during 2023. The number of leafhopper eggs parasitized by *A. atomus* sampled from maize and *S. halepense* leaves within the weedy and weed-free treatments are presented in Figure 5.

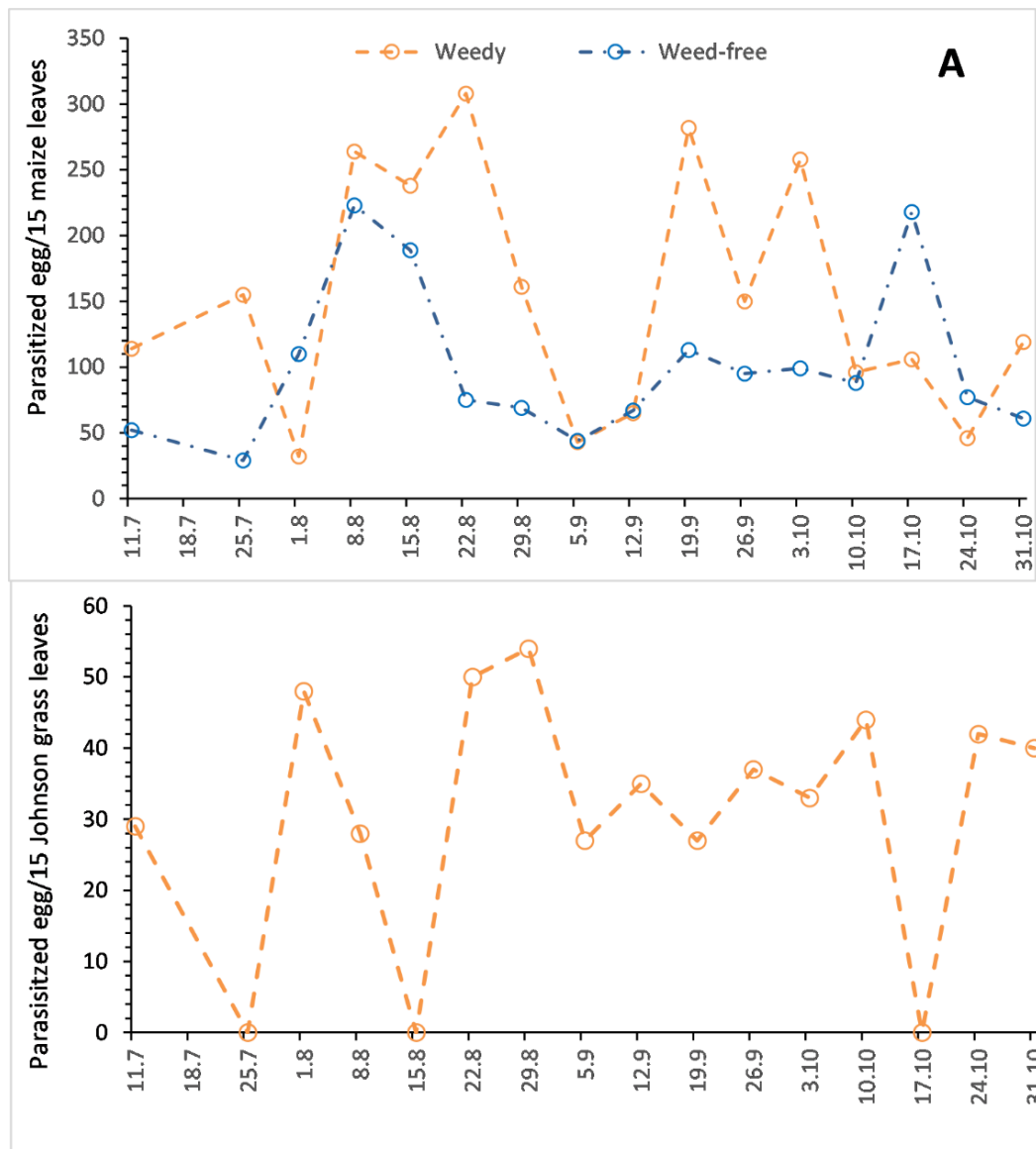


Figure 5. The influence of weed infestation on number of parasitized leafhopper eggs by *Anagrus atomus* in second crop maize in weedy and weed free treatments (A), and the number of parasitized leafhopper eggs in *Sorghum halepense* leaves (B) during 2022

A total of 114 parasitized eggs (with an average of 7.6 parasitized eggs per leaf) were identified in the weedy treatments in the first week, whereas 52 eggs (with an average of 3.5 parasitized eggs per leaf) were observed from weed-free treatments. The number of parasitized leafhopper eggs in the weedy treatments was generally higher than in the weed-free plots. However, a higher number of leafhopper eggs parasitized by *A. atomus* were recorded in the weed-free treatments compared to the weedy plots during the first week of August 14<sup>th</sup> week close to harvest (17.10.2022) and 15<sup>th</sup> week (24.10.2022) (Figure 5A).

A significant number of parasitized leafhopper

eggs were determined from *S. halepense* leaves in weedy treatment. A total of 29 parasitized eggs were recorded in the leaves of *S. halepense* in the first week of study, which increased in the following weeks. No parasitized leafhopper eggs were found in leaf samples collected in the second, third, and fifth weeks of counting (Figure 5B). A total of 494 parasitized eggs were recorded during the study. A total of 2437 *A. atomus* individuals were detected from in the weedy treatments, whereas this number was 1609 in weed-free plots.

The analysis of variance table for the weekly population densities of leafhoppers and *A. atomus* in both trial field is provided in Table 1.

Table 1. Analysis of variance (p values) for the effect of weed infestation (weedy and weed-free) on population densities of *Zyginidia sohrab*, *Empoasca decipiens* & *Asymmetrasca decedens* and *Psammotettix striatus* in second crop maize.

| Weeks           | <i>Zyginidia sohrab</i> |       | <i>E. decipiens</i> & <i>A. decedens</i> |        | <i>Psammotettix striatus</i> |      | <i>Anagrus atomus</i> |       |
|-----------------|-------------------------|-------|--|--------|------------------------------|------|-----------------------|-------|
|                 | 2022                    | 2023  | 2022                                     | 2023   | 2022                         | 2023 | 2022                  | 2023  |
| <i>P</i> değeri |                         |       |  |        |                              |      |                       |       |
| Hafta 1         | 0.38                    | 0.66  | 1.00                                     | 0.39   | 0.71                         | 0.05 | 0.03                  | 0.97  |
| Hafta 2         | 0.10                    | 0.58  | 0.47                                     | 0.48   | 0.10                         | 0.21 | 0.26                  | 0.51  |
| Hafta 3         | 0.44                    | 0.16  | 0.03*                                    | 0.68   | 0.03*                        | 0.23 | 0.22                  | 0.03* |
| Hafta 4         | 0.17                    | 0.99  | 0.71                                     | 0.13   | 0.08                         | 0.06 | 0.05                  | 0.62  |
| Hafta 5         | 0.00*                   | 0.12  | 0.00*                                    | 0.52   | 0.02*                        | 0.08 | 0.28                  | 0.59  |
| Hafta 6         | 0.03*                   | 0.30  | 0.35                                     | 0.47   | 0.96                         | 0.08 | 0.06                  | 0.12  |
| Hafta 7         | 0.03*                   | 0.48  | 0.35                                     | 0.00*  | 0.21                         | 0.24 | 0.03*                 | 0.03* |
| Hafta 8         | 0.97                    | 0.13  | 0.15                                     | 0.00** | 0.16                         | 0.13 | 0.04*                 | 0.06  |
| Hafta 9         | 0.24                    | 0.34  | 0.04*                                    | 0.34   | 0.49                         | 0.12 | 0.01                  | 0.23  |
| Hafta 10        | 0.10                    | 0.02* | 0.61                                     | 0.56   | 0.00*                        | 0.51 | 0.22                  | 0.03* |
| Hafta 11        | 0.19                    | -     | 0.76                                     | -      | 0.02*                        | -    | 0.01*                 | 0.97  |
| Hafta 12        | 0.14                    | -     | 0.00*                                    | -      | 0.32                         | -    | 0.04*                 | -     |
| Hafta 13        | 0.31                    | -     | 0.28                                     | -      | 0.10                         | -    | 0.47                  | -     |
| Hafta 14        | 0.40                    | -     | 0.33                                     | -      | 0.33                         | -    | 0.01*                 | -     |
| Hafta 15        | 0.06                    | -     | 0.02*                                    | -      | 0.65                         | -    | 0.00*                 | -     |
| Hafta 16        | 0.02*                   | -     | 0.56                                     | -      | 0.04*                        | -    | 0.02*                 | -     |
| Total           | 0.52                    | 0.27  | 0.01                                     | 0.73   | 0.04                         | 0.05 | 0.08                  | 0.08  |

\*The differences between weedy and weed-free treatments were statistically significant during the relevant sampling week ( $P < 0.05$ )

\*\*Sampling weeks started from 11 July and 16 August during 2022 and 2023, respectively

Statistically significant variations were recorded in the numbers of leafhoppers and the parasitoid recorded from weedy and weed-free treatments during different sampling weeks. *Zyginida sohrab* had a notable population density during the 5<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup>, 7<sup>th</sup>, and 16<sup>th</sup> weeks of 2022. However, non-significant differences were recorded between weedy and weed-free treatments for population density in other weeks. No statistical difference

was observed during all weeks except for the last week of 2023. A similar data was observed for other leafhopper species and *A. atomus*.

Table 2 presents the total number of leafhopper and parasitoid individuals recorded from weedy and weed-free treatments during 2022 and 2023.

Table 2. The influence of weed infestation (weedy and weed-free) on population densities of *Zyginidia sohrab*, *Empoasca decipiens* & *Asymmetrasca decedens*, and *Psammotettix striatus* in second crop maize during 2022 and 2023

| Weed status   | 2022    | 2023   |
|---|---------|--------|
| <b><i>Zyginidia sohrab</i></b>                                      |         |        |
| Weed-free   | 4172 a* | 4811 a |
| Weedy   | 3994 a  | 3996 a |
| <b><i>Empoasca decipiens</i> &amp; <i>Asymmetrasca decedens</i></b> |         |        |
| Weed-free   | 1508 a  | 324 a  |
| Weedy   | 1175 b  | 315 a  |
| <b><i>Psammotettix striatus</i></b>                                 |         |        |
| Weed-free   | 140 a   | 125 a  |
| Weedy   | 100 b   | 97 a   |
| <b><i>Anagrus atomus</i></b>  |         |        |
| Weed-free   | 1343 a  | 392 a  |
| Weedy   | 1532 a  | 339 a  |

\* The means followed by similar letters within a column do not differ significantly from each other ( $P > 0.05$ ).

The study revealed that weed infestation did not have a significant impact on the population density of *Z. sohrab* in both years (Table 2). The

presence of weeds was associated with a notable increase in the population density of *E. decipiens* & *A. decedens* species. However, it was

documented that there was no notable impact observed in 2023 (Table 2). Similarly, more *P. striatus* individuals were recorded from weedy treatments than weed-free treatment in 2022. Statistical analysis also revealed that *A. atomus* belonged to the same group in both years, and that the density and type of weeds did not have a major role in increasing the parasitoid's population.

The study findings indicated that weed infestation in second crop maize did not lead to an increase in the population of significant harmful leafhoppers. Contrastingly, Mutlu et al. (2016) observed that weeds increased the population of cicadellids in rice fields as 71.4% of individuals were recorded from weedy fields, whereas 28.6% were noted from weed-free fields. On the other hand, Paradell et al. (2014) reported that weeds resulted in significantly higher leafhopper species from rice fields. Similar studies in different crops have reported that certain weeds (such as Johnson grass, purslane, nutgrass and common cocklebur) significantly increase the population of Cicadellidae, indicating the necessity of weed control (Andow, 1992; Oloumi-Sadeghi et al., 1989; Margues et al., 2012; Mutlu and Sertkaya, 2015a). In contrast, Sadeghi et al. (1989) noted that winter herbicide application in potatoes had no effect on the density of the potato leafhopper, *Empoasca fabae* (Harris), whereas summer herbicide application increased the density of *E. fabae*.

The direct interaction between leafhoppers and weed infestation has not been investigated in these studies, but some studies examined the interactions between weeds, arthropod pests, and their natural enemies in managed ecosystems (Way 1977; Perrin and Phillips, 1978; Altieri and Whitcomb, 1979; Norris and Kogan, 2000). It is well-known that a region's weed species and population not only serve as food sources, shelter, overwintering grounds, and reproductive sites for phytophagous and other insects, but also enhance their population (Southwood and Way, 1970; Altieri, 1999). Nevertheless, weed-free plots had a lower population density of the most widespread

species, i.e., *Z. sohrab* in the current study.

It is thought that adult females of *Z. sohrab* feeding on *S. halepense* deposit eggs into the tissue of *S. halepense* leaves and subsequently these eggs are parasitized by *A. atomus* which suppress *Z. sohrab* density. Mutlu and Sertkaya (2015a) have stated that both the adults and nymphs of *Z. sohrab* intensively feed and lay eggs in *S. halepense* leaves, which increases population density of *Z. sohrab*. Additionally, *Z. sohrab* eggs were parasitized by *A. atomus* on *S. halepense* leaves; however, parasitism rate was not reported. In the current study, a significant number of *Z. sohrab* eggs parasitized by *A. atomus* were found within the leaf tissue of *S. halepense* sampled from weedy treatment. It is thought that the population density of *Z. sohrab* is higher in the weedy plots than in weed-free plots. However, parasitoid suppresses leafhoppers population in weedy plots. The total numbers *Z. sohrab* individuals recorded on weedy and weed-free treatments were quite similar. Nevertheless, *A. atomus* density recorded weedy treatment and parasitoid obtained from *S. halepense* was significantly higher than weed-free plots. The parasitoid has a negative impact on the *Z. sohrab* population in weedy plots because it parasitizes many eggs, where the population of *Z. sohrab* is high. Supporting our hypothesis, Blaix et al. (2018) stated that the most common contribution of weeds to reducing pest insect populations occurs by providing resources to natural enemies in agricultural areas.

Several studies have demonstrated that the egg density of leafhoppers in a crop has a significant impact on parasitism rate, with higher egg densities leading to increased parasitism rates (Segoli and Rosenheim, 2013; Mutlu and Sertkaya, 2015b; Li et al., 2018; Torres-Moreno and Moya-Raygoza, 2020). According to reports, *A. atomus* attempts to suppress *Z. sohrab* by parasitizing its eggs at a high rate (50.2% to 93.7%) in second crop maize (Mutlu and Sertkaya, 2015b). Parasitization of eggs within the leaf tissue of *S. halepense* by *A. atomus* reduced the population density of *Z. sohrab*, even though an increase in

the population of *Z. sohrab* adults feeding and laying eggs on *S. halepense* was expected in the weedy treatment in the current study. Andow (1983) has suggested that the diversity and density of plant cover in agricultural ecosystems tend to increase populations of herbivorous insects and their natural enemies. It has been mentioned that weeds a greater threat to harmful insect species than beneficial ones and that weeds cannot be completely eradicated (Schellhorn and Sork, 1997).

Similar results have been obtained in other leafhopper species besides *Z. sohrab*. A higher density of *E. decipiens* & *A. decedens* complex was recorded from weed-free treatments in the first year. These species are generally reported to feed on cocklebur (*Xanthium strumarium* L.), a weed commonly found within and on the edges of fields, apart from maize and cotton (Mutlu et al., 2008a). However, in this study, the absence of cocklebur in the weedy treatment has strengthened the assumption that *E. decipiens* & *A. decedens* complex density was higher in weed-free plots. *Psammotettix striatus* has been recorded as having the lowest population density on the maize plants in the current study. Previous studies conducted in different areas revealed that this species exhibits a comparably small population in maize fields when compared to other leafhopper species (Mutlu et al., 2008a; Akmeşe and Sertkaya, 2021; Atmaca et al., 2021; Baran Yazıcı et al., 2023). Additionally, it has been reported that *P. striatus* carries some phytoplasma diseases as well as Wheat Blue Dwarf Virus (WBD) and Russian Mosaic Virus of Winter Wheat (WWRMV) in wheat (Mutlu et al., 2023). It is known that this species is generally abundant in cotton fields and migrates to second-crop maize later (Mutlu et al., 2008a). Therefore, the population of *P. striatus* was very low as in 2022, and weed infestation had a positive effect on its population density.

Although direct relationship between leafhoppers and weed infestation remains elusive, it is believed that weeds and other environmental factors may indirectly influence the density and

distribution of leafhoppers and their natural enemies in agricultural ecosystems. Even though the association of weeds with phytophagous insects may pose a disadvantage in terms of pest management, it is essential not to overlook the significant role of weeds in preserving biodiversity. Therefore, it is believed that identifying phytophagous insect species feeding on weeds both within and around crop fields, along with their natural enemies, and effective weed management strategies are essential for maintaining pest control and promoting biological control in agricultural ecosystems.

## Conclusions

The study concludes that weed infestation (especially johnsongrass) in second-crop maize fields had non-significant effect on population densities of harmful leafhoppers. It was noted that the most abundant species (*Z. sohrab*) has a lower density in the weedy treatment. Furthermore, *Z. sohrab* eggs are effectively parasitized by *A. atomus* in weed treatment. As a result, this leads to a decrease in the population of leafhoppers in the weedy treatment. The densities of *E. decipiens* & *A. decedens* and *P. striatus* varied between years, and higher densities were recorded in weedy treatment during 2022. Besides, diversity of weed species have a positive effect on the population of *A. atomus*, and parasitoid population was higher in weedy treatment than weed-free plots. Understanding the complex interactions between weeds and leafhoppers is important for developing effective pest management strategies. It is concluded that weed control should be designed considering the weeds providing food, shelter, alternative prey, and hosts for beneficial insects.

## Declarations

This study is part of the doctoral dissertation of the first author. The authors would like to thank Mr. Beşir YAZAR, a producer from Büyükördek village in Şanlıurfa province, for providing the study area and for his valuable support.

## Conflict of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the subject of this study.

## Author Contributions

Hasan Tunaz and Çetin Mutlu conceived the idea and designed the experiments, Çetin Mutlu and Emine Kaplan Yavuz conducted the experiments and collected data. Çetin Mutlu analyzed the data and wrote the initial draft of the manuscript. Hasan Tunaz and Emine Kaplan Yavuz edited and approved the final draft.

## References

- Akmeşe, V., & Sertkaya, E. (2021). Doğu Akdeniz Bölgesi'ndeki Mısır Alanlarında Cicadellidae (Hemiptera) Türleri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 26(2), 497-505.
- Altieri, M. A., & Whitcomb, W. H. (1979). The Potential Use of Weeds in the Manipulation of Beneficial Insects. *HortScience*, 14(1), 12-18.
- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. In *Invertebrate biodiversity as bioindicators of sustainable landscapes* (pp. 19-31). Elsevier; Newyork.
- Andow, D. (1983). Effect Of Agricultural Diversity On Insect Populations. In: Lockeretz W (ed) *Environmentally Sound Agriculture* (pp 91-115), Praeger: New York.
- Andow, D. A. (1992). Population density of *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae) in weedy beans. *Journal of Economic Entomology*, 85(2), 379-383.
- Atmaca, A., Mamay, M., & Mutlu, Ç. (2021). Population dynamics and parasitism rate of leafhopper species (Hemiptera: Cicadellidae) in maize (*Zea mays* L.) crop. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 12(2), 448-457.
- Backus, E., Serrano, M., & Ranger, C. (2005). Mechanisms of hopperburn: An overview of insect taxonomy, behavior and physiology. *Annual Review of Entomology*, 50, 125-151.
- Barbercheck, M. E., & Wallace, J. (2021). Weed–insect interactions in annual cropping systems. *Annals of the Entomological Society of America*, 114(2), 276-291.
- Blaix, C., Moonen, A. C., Dostatny, D. F., Izquierdo, J., Le Corff, J., Morrison, J., Von Redwitz, C., Schumacher, M., & Westerman, P.R. (2018). Quantification of regulating ecosystem services provided by weeds in annual cropping systems using a systematic map approach. *Weed Research*, 58, 151–164.
- Ersin, F., Yılmaz, E., Kaya, E., İlker, E., & Turanlı, F. (2017). Ege Nault, L., & Ammar, E.D. (1989). Leafhoppers and Bölgesinde İkinci Ürün Mısırdaki Zararlı Zyginidia pullula (Boherman, 1845) Hemiptera: Cicadellidae'nın Neden Olduğu Ürün Kaybı ve Ekonomik Zarar Eşiği Üzerinde Araştırmalar. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 54(3), 285-292.
- IBM, C., (2012). IBM SPSS Statistics for Windows. IBM Corp. Released 2012 Version 20, 1–8.
- Kılıç, M., & Sertkaya, E. (2019). Hatay ilinde yetiştirilen Solanaceae familyasına ait sebzelerde zararlı Cicadellidae, Cixiidae ve Delphacidae (Hemiptera) türleri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 24(3), 217-231.
- Li, Q., Hu, H., Triapitsyn, S. V., Yi, L., & Lu, J. (2018). *Anagrus dmitrievi* sp. (Hymenoptera, Mymaridae), an egg parasitoid of *Zyginidia eremita* (Hemiptera, Cicadellidae), a pest of maize in Xinjiang, China. *ZooKeys*, 736, 43-57.
- Manosathiyadevan, M., Bhuvaneshwari, V., & Latha, R. (2017). Impact of insects and pests in loss of crop production: a review. *Sustainable Agriculture Towards Food Security* (pp. 57-67), Springer; Newyork.
- Maramorosch, K., & Harris, K. (1979). *Leafhopper Vectors And Plant Disease Agents*. New York: Academic Press.
- Marques, R. N., Teixeira, D. C., Yamamoto, P. T., & Lopes, J. R. S. (2012). Weedy hosts and prevalence of potential leafhopper vectors (Hemiptera: Cicadellidae) of a phytoplasma (16srix group) associated with huanglongbing symptoms in citrus groves. *Journal of Economic Entomology*, 105(2), 329-337.
- Mutlu, Ç., Sertkaya, E., & Güçlü, Ş. (2008a). Diyarbakır ili ikinci ürün mısır alanlarında Cicadellidae (Homoptera) familyasına bağlı önemli türlerin popülasyon değişimleri. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 32 (1): 21-32.
- Mutlu, Ç., Sertkaya, E., & Güçlü, Ş. (2008b). Diyarbakır ili ikinci ürün mısır alanlarında bulunan Cicadellidae (Homoptera) türleri ve yayılış alanları. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 32 (4): 281-301.
- Mutlu, Ç. & Sertkaya, E. (2015a). Diyarbakır ilinde mısırdaki zararlı *Zyginidia sohrab* Zachvatkin (Hemiptera: Cicadellidae)'ın biyoekolojisi. *Bitki Koruma Bülteni*, 55(1): 15-30.
- Mutlu, Ç. & Sertkaya, E. (2015b). Yumurta parazitoiti *Anagrus atomus* (Hymenoptera: Mymaridae)'un mısırdaki zararlı önemli yaprakpisesi türlerini parazitlenme oranları. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 6(1), 25-40.
- Mutlu, Ç., Duman, M., Karaca, V., Bayram, Y., & Süer, İ. E. (2016). Karacadağ çeltiğinde Cicadellidae, Cixiidae ve Delphacidae (Hemiptera) türleri ile bunların popülasyonuna yabancıotların etkisi. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 6(4), 279-289.
- Mutlu, Ç., Karaca, V., Tonga, A., & Zeybekoğlu, Ü. (2023). Diversity of Cicadellidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha) Species in Various Field Crops in Southeastern Anatolia, Turkey. *Entomological News*, 130 (5), 397-415.



- planthoppers transmission of plant viruses. *Annual Review of Entomology*, 34,503–529.
- Nielson, M.W. (1985). Leafhopper systematic. In: Nault LR, Rodriguez JG, editors. *The Leafhoppers and Planthoppers* (pp. 11–39). New York: Wiley & Sons.
- Norris, R. F., & Kogan, M. (2000). Interactions between weeds, arthropod pests, and their natural enemies in managed ecosystems. *Weed Science*, 48(1), 94-158.
- Oloumi-Sadeghi, H., Zavaleta, L. R., Kapusta, G., Lamp, W. O., & Armbrust, E. J. (1989). Effects of potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) and weed control on alfalfa yield and quality. *Journal of Economic Entomology*, 82(3), 923-931.
- Paradell, S. L., Maciá, A., Asbornio, M., Catalano, M. I., Brentassi, M. E., Varela, G., & de Remes Lenicov, A. M. M. (2014). Diversity of leafhoppers (Hemiptera: Cicadellidae) in experimental rice lots and associated weeds in Buenos Aires province, Argentina. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 49(3), 213-221.
- Perrin, R. M., & Phillips, M. L. (1978). Some effects of mixed cropping on the population dynamics of insect pests. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24(3), 585-593.
- Schellhorn, N. A. & Sork, V. L. (1997). The impact of weed diversity on insect population dynamics and crop yield in collards, Brassica oleraceae (Brassicaceae). *Oecologia*, 111 (2), 233–240.
- Segoli, M., & Rosenheim, J. A. (2013). The link between host density and egg production in a parasitoid insect: comparison between agricultural and natural habitats. *Functional Ecology*, 27(5), 1224-1232.
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., & Dickey, D.A. (1997). Principles and procedures of statistics. *A biometrical approach*, 3rd ed. McGraw Hill Book Co., Inc.; New York.
- Southwood, T. R. E., and M. J. Way. 1970. Ecological background to pest management. Pages 6-28 in R. L. Rabb and F. E. Guthrie (Eds.), *Concepts of Pest Management*. North Carolina State Univ., Raleigh.
- Oloumi-Sadeghi, H., Zavaleta, L. R., Lamp, W. O., Armbrust, E. J., & Kapusta, G. (1987). Interactions of the potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) with weeds in an alfalfa ecosystem. *Environmental Entomology*, 16(5), 1175-1180.
- Oloumi-Sadeghi, H., Zavaleta, L. R., Kapusta, G., Lamp, W. O., & Armbrust, E. J. (1989). Effects of potato leafhopper (Homoptera: Cicadellidae) and weed control on alfalfa yield and quality. *Journal of Economic Entomology*, 82(3), 923-931.
- Torres-Moreno, R., & Moya-Raygoza, G. (2020). Response of egg parasitoids (Hymenoptera: Mymaridae and Trichogrammatidae) to the density of *Dalbulus maidis* (Hemiptera: Cicadellidae) eggs in maize habitats. *Biological Control*, 150, 104344.
- Van Emden, H. F. (1981). Wild plants in the ecology of insect pests. In J. M. Thresh, ed. *Pests, Pathogens and Vegetation* (pp. 251-261). London: Pitman Books
- Way, M. J. (1977). Integrated control-practical realities. *Outlook on Agriculture*, 9(3), 127-135.
- Yazıcı, A. B., Mutlu, Ç., & Zeybekoğlu, Ü. (2023). Determination of leafhopper (Hem.: Cicadellidae) species and population dynamics of important species in second crop maize in Şırnak province, Türkiye. *Harran Journal of Agricultural and Food Sciences*, 27(3), 372-386.
- Yılmaz, E., & Karsavuran, Y. (2010). İzmir ili mısır tarlalarında *Asymmetrasca decedens* (Paoli, 1932) ve *Zyginidia pullula* (Boheman, 1845) (Homoptera: Cicadellidae) türlerinin populasyon değişimi. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 34(2), 241-250.



# Effects of cultivation substrate composition on biological productivity and quality parameters of *Ganoderma lucidum*

## Yetiştirme substratı kompozisyonunun *Ganoderma lucidum*'un biyolojik verimliliği ve kalite parametreleri üzerine etkileri

Gülsüm İNCE<sup>1</sup> , Mustafa Kemal SOYLU<sup>2</sup> , Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU<sup>3\*</sup> 

<sup>1</sup>Eskişehir Osmangazi University, Institute of Science, Eskişehir, Türkiye

<sup>2</sup>Atatürk Horticultural Central Research Institute, Yalova /Türkiye

<sup>3\*</sup>Eskişehir Osmangazi University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Eskişehir, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-3596-6134>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0003-3492-0043>; <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0001-7189-613X>

### To cite this article:

İnce, G., Soyulu, M. & Çömlekçioğlu, N. (2024). Effects of cultivation substrate composition on biological productivity and quality parameters of *Ganoderma Lucidum*. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2):235-247

DOI: 10.29050/harranziraat.1440438

### \*Address for Correspondence:

Nuray ÇÖMLEKÇİOĞLU

e-mail: [ncomlekcioglu@ogu.edu.tr](mailto:ncomlekcioglu@ogu.edu.tr)

### Received Date:

20.02.2024

### Accepted Date:

12.05.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ABSTRACT

A substrate composition experiment was carried out to utilize the waste parts of certain plants for cultivation of *Ganoderma lucidum*, a medicinal mushroom. *Ganoderma* mycelium (millet spawn) provided by the Atatürk Horticultural Central Research Institute (Yalova, Türkiye). Nine (9) different substrate recipes were used in this study; S1: 40% sawdust + 40% chickpea stalk + 20% bran, S2: 60% sawdust + 20% chickpea stalk + 20% bran, S3: 40% sawdust + 40% pea stalk + 20% bran, S4: 60% sawdust + 20% pea stalk + 20% bran, S5: 40% sawdust + 40% poppy stalk + 20% bran, S6: 60% sawdust + 20% poppy stalk + 20% bran, S7: 40% sawdust + 40% corn cob + 20% bran, S8: 60% sawdust + 20% corncob + 20% bran and S9 (Control): 80% sawdust + 20% bran. Mushroom fruiting bodies were obtained from all substrates. Biological efficiency (BE) was varied between 7.84 and 17.92%. BE in S2, S5, S6, S7, S8 and S9 was higher than S4, S3 and S1. The highest total yield was recorded in S6 with 88.38 g 1.5 kg bag<sup>-1</sup>. The earliest mushroom was harvested from corncob (S8) and sawdust (S9) recipes within 51 days. The protein content of fruiting bodies ranged from 31.51% to 51.4%. Nitrogen, potassium, calcium, magnesium and iron content of fruiting bodies were increased by mixing 40% corncob to substrate and zinc was enriched by adding 20% chick pea stalk. Adding corncob to the substrate may enrich the *Ganoderma* fruiting body protein and mineral content without decreasing the yield and biological efficiency.

**Key Words:** Medicinal mushroom, substrate, reishi, protein, biological efficiency

### ÖZ

Tıbbi bir mantar olan *Ganoderma lucidum*'un yetiştirilmesi için bazı bitkilerin atık kısımlarını değerlendirmek amacıyla bir substrat bileşimi deneyi gerçekleştirilmiştir. *Ganoderma* tohumluk miselleri (dariya sardırılmış) Atatürk Bahçe Bitkileri Merkezi Araştırma Enstitüsü'nden (Yalova, Türkiye) sağlanmıştır. Bu çalışmada dokuz (9) farklı substrat reçetesi kullanılmıştır; S1: %40 talaş + %40 nohut sapı + %20 kepek, S2: %60 talaş + %20 nohut sapı + %20 kepek, S3: %40 talaş + %40 bezelye sapı + %20 kepek, S4: %60 talaş + %20 bezelye sapı + %20 kepek, S5: %40 talaş + %40 haşhaş sapı + %20 kepek, S6: %60 talaş + %20 haşhaş sapı + %20 kepek, S7: %40 talaş + %40 mısır koçanı + %20 kepek, S8: %60 talaş + %20 mısır koçanı + %20 kepek ve S9 (Kontrol): %80 talaş + %20 kepek. Tüm substratlardan mantar elde edilmiştir. Biyolojik verimlilik (BE) %7.84 ile %17.92 arasında değişmiştir. S2, S5, S6, S7, S8 ve S9'daki BE, S4, S3 ve S1'den daha yüksek bulunmuştur. En yüksek toplam verim 88.38 g 1.5 kg torba<sup>-1</sup> ile S6'da kaydedilmiştir. En erken hasat edilen mantar 51 gün ile mısır koçanı (S8) ve talaş (S9) substratlarından elde edilmiştir. Mantarların protein içeriği %31.51 ile 51.4 arasında değişmiştir. Mantarların nitrojen, potasyum, kalsiyum, magnezyum ve demir içeriği

substrata %40 mısır koçanı karıştırılarak arttırılmış, %20 bezelye sapı eklenerek çinko zenginleştirilmiştir. Substrata mısır koçanı eklenmesi, verimi ve biyolojik etkinliği azaltmadan *Ganoderma* mantarının proteini ve mineral içeriğini zenginleştirmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Tıbbi mantar, substrat, reishi, protein, biyolojik etkinlik

## Introduction

*Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P Karsten is a species belonging to the genus *Ganoderma*, family Ganodermataceae. *Ganoderma* species are found throughout the world, and different characteristics such as cap shape and color, host specificity, and geographical origin are used to identify individual members of the species. *G. lucidum* (reishi in Japan, Ling zhi in China) is a fungus with a distinctive appearance with a shiny, reddish-brown cap and woody texture. However, morphological characteristics are subject to variation resulting from differences in cultivation under different climatic conditions and in different geographical regions, and from the natural genetic evolution of individual species (Wachtel-Galor et al., 2011).

*G. lucidum* is a medicinal mushroom with a long history of use in traditional Chinese medicine (Zhou, 2017; Amiri-Sadeghan et al., 2022). Due to its potential health benefits, it is in great demand. It contains various bioactive compounds, including triterpenoids, polysaccharides, anti-inflammatory and antioxidants, which are believed to contribute to health benefits (De Silva et al., 2012; Bishop et al., 2015; Taofiq et al., 2017; Khatian and Aslam, 2018; Liu and Tie, 2019). In their detailed reviews, Cao et al. (2018) and Cör et al. (2018) reported that reishi contains triterpenoids and polysaccharides with high-grade biological activity, proven by animal and clinical studies, which enhance immunity and show antitumor, antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant activity. It also contains high amounts of various compounds such as proteins, lipids, phenols, sterols, etc.

*G. lucidum* is commercially cultivated in many countries, including Asia (China, Japan, and Korea) United States of America and Europe. It is the most popular and widely traded medicinal

mushroom in the world. Many commercial products derived from *G. lucidum* mushrooms, mycelia or spores are sold in various (dried mushrooms, powdered extracts, tea, coffee, syrups, capsules, toothpastes, soaps, and lotions, and even as ingredients in some food and beverage products) forms (Atila, 2022).

*Ganoderma* species are saprophytic or parasitic fungi that feed on trees. They can grow on substrates sterilized sawdust and agricultural waste. Thus, they greatly help the cycling of plant and animal waste by converting plant waste into food (Hall et al., 2003). This is also very important for food sustainability.

During the process of cultivating reishi mushrooms, several researchers have added numerous additives (such as wheat and corn and rice bran, soybean meal, cottonseed meal, malt, sugarcane bagasse, sunflower meal or molasses) to corncobs and straw (Veena and Pandey, 2011; Rashad et al., 2019; Yuliana et al., 2020), sawdust of oak, mango, acacia, tuni, paddy straw, wheat straw, and soybean waste (Jandaik et al., 2013), sawdusts of sheesham, mango, and poplar (Mehta et al., 2014), sunflower seed husks (Gonzalez-Matute et al., 2002), paddy husk and plant waste (Yang et al., 2003; Rashad et al., 2019; Yuliana et al., 2020), tea waste (Peksen and Yakupoğlu, 2009), sawdust of various trees (Erkel, 2009; Nguyen et al., 2019; Atila, 2020; Adongbede and Atoyebi, 2021), olive plant residues (Koutrotsios et al., 2019), broad bean stalks, cotton stalks and wheat straw (Rashad et al., 2019; Atila, 2020), soybean straw and bean straw (Atila, 2020), hazelnut shells (Puliga et al., 2022) and found differences among the substrates. Growers generally prefer to use the best and cheapest substrate materials available locally (Özçelik and Pekşen, 2007). Researchers and producers have focused on using locally available agricultural waste materials and their economic

output to search for substrates for mushroom growing, to achieve more sustainable management and improve efficiency. Substrate selection and cultivation methods may vary depending on local conditions and available resources. Therefore, different substrate options should be investigated regionally for successful reishi cultivation.

Cultivation of *G. lucidum* has become increasingly widespread in Turkey in recent years, but its commercial production is extremely limited (Eren and Pekşen, 2019). For this reason, studies on substrate formulation using various plant wastes locally are also limited. This study aimed to evaluate some locally available agricultural wastes (chickpea, pea, corncob and poppy plant wastes) for formulation of the substrate in *Ganoderma* cultivation and to determine their effects on yield and quality characteristics.

## Material and Methods

The millet spawn of *G. lucidum*, used in this

experiment, was provided by Atatürk Horticultural Central Research Institute (Yalova, Türkiye). Pea (*Pisum sativum*) stalk, poppy (*Papaver somniferum*) stalk and chickpea (*Cicer arietinum*) stems, corncob (*Zea mays*), beech (*Fagus orientalis*) sawdust and wheat (*Triticum aestivum*) bran were used for substrate formulations. Nine (9) different substrates, including control, were compared in the experiment (Table 1).

The agricultural wastes used in the experiment were grounded to appropriate sizes (1-2 cm) by using a feed crushing machine. According to the substrate recipe, plant wastes were weighed, moistured and taken into containers. For pH measurement, 50 ml of distilled water was added to 20 g of substrate of each treatment, the mixture was filtered after 2-3 hours and measured with a pH meter. pH values were measured and lime/gypsum were added to bring the pH to 5.5-6.5 before sterilization. The mixed substrates as 1.5 kg was filled into the heat resistant polypropylene bags. The plastic stick was placed in the middle of the bags for sowing and the bags were closed with plastic caps.

Table 1. Substrates composition (as substrate dry weight ratio)

| Substrate    | Formulation  |
|--------------|--|
| S1           | 40% beech sawdust + 40% chickpea stalks + 20% wheat bran |
| S2           | 60% beech sawdust + 20% chickpea stalks + 20% wheat bran |
| S3           | 40% beech sawdust + 40% pea stalks + 20% wheat bran      |
| S4           | 60% beech sawdust + 20% pea stalks + 20% wheat bran      |
| S5           | 40% beech sawdust + 40% poppy stalks + 20% wheat bran    |
| S6           | 60% beech sawdust + 20% poppy stalks + 20% wheat bran    |
| S7           | 40% beech sawdust + 40% corncob + 20% wheat bran         |
| S8           | 60% beech sawdust + 20% corncob + 20% wheat bran         |
| S9 (control) | 80% beech sawdust + 20% wheat bran                       |

Many bacterial, fungal, and viral diseases and pests cause significant yield losses in mushroom cultivation. In cultivation, the substrate is the main source of some of the microbial diseases. Therefore, disinfection of the substrate at appropriate temperatures is extremely important (Öztürk et al., 2017; Öztürk et al., 2017b; Aydoğdu and Kurbetli, 2021). For these reasons, the

prepared bags were sterilized at 121 °C and 1.2 atm pressure for 120 min. When the substrate temperature decreased to room temperature, the plastic stick was removed, and 75 g of spawn was inoculated in each bag and the bags were placed in the incubation room. The incubation room was set to 25-26 °C and humidity to 65-70%. After the substrates were completely covered with

mycelium, the bags were taken into the cultivation room and the cap of the bags opened. The growing room is set to 70-80% humidity, 25-26 °C temperature, and 400 lux for 10 hours a day lighting. The mushrooms were harvested once the white part on the edges turned red and reached the appropriate size.

In the dried and ground substrate samples, nitrogen (N) % according to Kjeldahl method (Kacar, 1972) moisture % and ash ratio were determined according to the modified (AOAC, 2019). Carbon (C) content was calculated as 50% of the organic matter by subtracting ash content from 100% (Cormican and Staunton, 1991). C:N ratio was calculated. The incubation period, pin formation, and fruiting body formation duration were determined in days.

The amount of product collected from two flashes was evaluated as total yield per bag (g bag<sup>-1</sup>). Percent biological yield (% BE) was determined by dividing the fresh mushroom yield by the dry weight of the substrate (Bernabe-Gonzalez et al., 2015).

Fruiting body weight and cap diameter, protein and nitrogen content, dry matter and ash content (AOAC, 2019) were determined. For mineral matter analysis, mushroom samples were dried in an oven at 65 °C until constant weight was reached and ground in a mill to a fineness of 20 mesh. For the analysis of phosphorus, potassium, calcium, magnesium, iron and zinc, 0.5 g samples were taken, 10 ml HNO<sub>3</sub> (nitric acid) was added and wet digestion was carried out in a microwave oven under high temperature. These samples then transferred to a 50 ml container, the volume filled with deionized water and filtered through blue band filter paper. The amount of elements in the obtained filtrates measured by ICP-OES (Kacar and Inal, 2008).

The experiment was conducted according to the Randomized Plot Experiment Design with six replications. The data obtained was analyzed in Tarist (Açıkgöz et al., 2004) statistical program. Percentage values converted to angle values and analysis of variance applied. The means compared by the Least Significant Difference (LSD) test.

## Results and Discussion

The chemical properties of the substrates are given in Table 2. pH value (5.67-6.30) of substrates was slightly acidic after sterilization. The pH of the substrate has a significant effect on fungal growth and development. Suitable pH management can directly affect mushroom yield and quality (Bellettini et al., 2019). Most mushroom species tend to grow best in the pH range of about 5.5 to 7. If the pH of the substrate is too low or too high, mycelial growth can be inhibited. This can lead to slow colonization and potential contamination problems (Erkel, 2009; Renu and Brij, 2015; Gurung et al., 2012; Kara et al., 2021; Atila, 2020; Carrasco et al., 2018; Nguyen et al., 2023).

Significant differences were also found in the moisture contents of the substrates (Table 2). The moisture contents of substrates were ranged from 63.74 to 58.14%. Suitable moisture levels are important for *Ganoderma* to form fruiting body. The moisture contents of the substrates should be kept relatively around 60-75% (Aghajani et al. 2018). Sufficient humidity prevents the mycelia from drying out and promotes fungal growth. Yakupoğlu and Pekşen (2011) reported the humidity range as 60.93-63.01% in substrates created with different plant wastes. Jeewanthi et al. (2017) adjusted the substrate moisture to 65%.

The highest C was 48.13% in S8 and the lowest value was 45.59% in S1 medium. According to the substrate composition, N content varied between 0.77% and 1.52%. The S3 medium, using pea stalks, had the highest N content, while the S9 medium (control) consisting of beech sawdust and wheat bran had the lowest N content. Accordingly, the C/N ratio was highest in S9 (62.12) and lowest in S3 (30.14).

The C contents of substrates were ranged from 45.59 to 48.13%. The C content of S8 formulation was the highest and S1 was the lowest. The N contents of substrates were varied between 0.77 to 1.52%. The calculated C/N ratios were ranged

from 30.14 to 62.19 (Table 2).

Table 2. pH, moisture, carbon, nitrogen, C/N and ash rate of substrates

| Substrat      | pH     | Moisture (%) | Carbon-C (%) | Nitrogen- N (%) | C/N     | Ash (%) |
|---------------|--------|--------------|--------------|-----------------|---------|---------|
| S1            | 5.75 f | 58.14 ı      | 45.59 ı      | 1.18 b          | 38.63 d | 8.82 a  |
| S2            | 5.68 g | 63.74 a      | 47.17 f      | 1.02 c          | 46.24 c | 5.65 d  |
| S3            | 6.30 a | 62.10 d      | 45.79 h      | 1.52 a          | 30.14 e | 8.41 b  |
| S4            | 5.95 d | 58.76 h      | 47.10 g      | 1.21 b          | 38.93 d | 5.80 c  |
| S5            | 5.94 d | 63.24 b      | 47.24 e      | 1.06 c          | 44.62 c | 5.53 e  |
| S6            | 5.88 e | 61.34 e      | 47.73 c      | 0.86 d          | 55.32 b | 4.54 g  |
| S7            | 6.16 b | 62.74 c      | 47.66 d      | 1.02 c          | 46.71 c | 4.69 f  |
| S8            | 5.67 g | 61.26 f      | 48.13 a      | 0.83 d          | 58.33 b | 3.74 ı  |
| S9            | 5.98 c | 61.25 g      | 47.86 b      | 0.77 e          | 62.12 a | 4.28 h  |
| LSD<br>p≤0.01 | 0.014  | 0.271        | 0.001        | 0.046           | 3.756   | 0.040   |

Mean values marked with a different letter in each column are statistically different from each other

*Ganoderma* mushrooms are lignin and cellulose-degrading fungi (Cheureuil et al., 2022). C and N are the two main macronutrients needed by fungi for their structural and energy requirements (Carrasco et al., 2018). The C content of fungal substrates plays an important role as a nutrient source in their growth and development. Carbon is essential for energy production and biomass synthesis. Nitrogen is important for protein synthesis and various enzymatic reactions. Carbon-rich substrates provide the necessary energy for efficient proliferation of mycelia and products (Hu et al., 2020). Lonardo et al. (2020) reported that the concentration and availability of N affect the activity and growth efficiency of saprotrophic fungi. When the N of substrates is scarce, growth efficiency may decrease. They found that low C:N ratio resulted in the highest biomass production as well as the highest growth efficiency. While carbon content is important, the overall composition and nutrient balance of the substrate, including nitrogen, minerals, and other organic compounds, also play important roles in *Ganoderma* mushroom cultivation (Atoji-Henrique et al., 2017). The C/N ratio of mushroom substrate is a critical factor in

mushroom cultivation. A favorable C/N ratio provides the necessary nutrients to sustain strong mycelial growth and maintain healthy fungal metabolism. A balanced C/N ratio promotes the breakdown of organic compounds in the substrate such as lignin and cellulose. The ideal C/N ratio for *Ganoderma* mushrooms varies depending on the species, substrate composition and cultivation method. In general, a C/N ratio of approximately 20:1, 30:1, 40:1 to 60:1 is considered suitable for reishi cultivation (Atoji-Henrique et al., 2017; Atila, 2022; Amiri-Sadeghan et al., 2022; Bellettini et al., 2019; Fraga et al., 2014; Kumla et al., 2020). Hsieh and Yang (2004) reported that C/N ratio is a very important factor for mycelial growth rate and cap formation for reishi. They found that the fastest mycelial growth (16-18 days) in test tubes occurred in the medium with a C/N ratio of 70-80. The fungus formed only in the medium with a C/N ratio of 70 and 80.

Significant differences in ash ratios were determined depending on the substrate composition. The highest ash rate was determined as 8.82% in S1 (containing 40% chickpea stalks). Ash rate was 8.41% in S2 (containing 20% chickpea stalks). On the other

hand, the ash ratio was the lowest in S8 (containing 20% corncob) as 3.74%.

Mycelia, primordium, and mushroom formation duration are presented in Table 3. The fastest mycelial development was 18 days in S7, S8 and S9 substrates. The latest mycelial growth was 26.50 days in S1, 25.50 and 25.83 days in S2 and S3, respectively. According to the substrate content, mycelial development duration, pin and mushroom formation duration can give very different results (Atila, 2022; Gurung et al., 2012; Thiribhuvanamala and Krishnamoorthy, 2021). Yakupoğlu and Pekşen (2011), Jeewanthi et al. (2017) and Atila (2020) reported mycelial development duration as 55 to 59, 25.4 to 34.2 and 14.2 to 18.2 days, respectively.

The differences among the substrates in terms of primordium formation duration were found to be statistically significant. The shortest primordium formation duration was 36.66 days in

S4 and the longest duration was 41.66 days in S3. Substrate composition significantly affected the duration of fruiting body formation. In S8 and S9, where mycelial development was the fastest, fruiting body formation was also the earliest with 51 days. The latest fruiting body formation duration was observed as 63 days in S2. Bernabe-Gonzalez et al. (2015) reported the mushroom formation duration as 70-72 days and Gurung et al. (2012) reported the harvest duration of different substrates as 60-66 days.

Among the substrates, the highest mushroom yield was obtained from substrates with a high C/N ratio. Yields were low in substrates with C/N ratio lower than 40/1 (S1, S3 and S4). The yield per bag was statistically in the same group in S2, S6, S7, S8 and S9 and varied between 88.38 g (S6) and 70.31 g. The lowest yield was 17.25 g bag<sup>-1</sup> in S3 medium (Table 4).

Table 3. Mycelial growth, primordium and fruiting body formation duration according to substrate

| Substrat   | Mycelial development growth duration (days) | Primordium formation duration (days) | Fruiting body formation duration (days) |
|------------|---|--------------------------------------|---|
| S1         | 26.50 a                                     | 40.33 abc                            | 55.33 c                                 |
| S2         | 25.50 a                                     | 39.50 bc                             | 63.00 a                                 |
| S3         | 25.83 a                                     | 41.66 a                              | 55.00 c                                 |
| S4         | 23.33 b                                     | 38.66 c                              | 55.00 c                                 |
| S5         | 22.50 b                                     | 41.50 a                              | 60.33 b                                 |
| S6         | 20.33 c                                     | 40.66 ab                             | 56.00 c                                 |
| S7         | 18.33 c                                     | 40.83 ab                             | 55.33 c                                 |
| S8         | 18.83 c                                     | 39.33 bc                             | 51 d                                    |
| S9         | 18.66 c                                     | 39.50 bc                             | 51 d                                    |
| LSD p≤0.01 | 2.010                                       | 1.746                                | 2.069                                   |

Mean values marked with a different letter in each column are statistically different from each other

Atila (2020) reported the highest total yield of *Ganoderma lucidum* as 86.1 g kg<sup>-1</sup> and the lowest as 28.6 g kg<sup>-1</sup>. Baktemur et al. (2022) determined the highest yield as 53.90 g kg<sup>-1</sup> from 2 groundnut + 1 wheat bran substrate and the lowest yield value as 14.63 g kg<sup>-1</sup> from oak sawdust medium.

As seen from the Table 4 biological efficiency (BE) was the highest in S2 (17.61%), S5 (17.92%) and S9 (17.91%) and the lowest in S3 (7.84%) and S1 (11.01%). Yield and BE in *Ganoderma* cultivation can vary depending on several factors, including substrate composition, environmental conditions,

strain selection and cultivation practices (Amiri-Sadeghan et al., 2022; Atila, 2022; Erkel 2009; Jeewanthi et al., 2017; Renu and Brij, 2015). The C content of the substrate can affect the yield and quality of *Ganoderma* mushrooms. The availability of sufficient carbon compounds in the substrate ensures that the mushrooms have sufficient nutrient supply for optimum growth. Insufficient C content can result in slower growth, reduced yield, and poor quality of harvested mushrooms. BE is an indicator of how effective the substrate is in mushroom production. A high

BE percentage indicates an efficient conversion process. In the study of Pekşen and Yakupoğlu (2009) on tea waste substrate, the BE range was between 31.0-34.9%. Atila (2020) reported that the BE calculated from reishi grown on substrate containing cottonseed meal and oak sawdust was changed from 8.9 to 24.2%. Increasing BE increases the profit in production. Thus, it can be considered as the first item examined in commercial production.

The composition of the growing medium significantly affected the average mushroom weight. The highest average mushroom weight was 71.08 g in S2 medium and the lowest was 17.25 g in S3 medium (Table 4). Yakupoğlu and Pekşen (2011) and Bernabe-Gonzalez et al. (2015) reported that the mushroom weight was in the range of 31.19 to 7.99 g and 40.9 to 47.9 g, respectively.

Table 4. Mushroom yield and certain quality parameters according to substrate formulation

| Substrate  | Yield (g bag <sup>-1</sup> ) | Biological efficiency-BE (%)* | Mushroom Weight (g) | Fruiting body Diameter (mm) |
|------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------|
| S1         | 32.14c                       | 11.01 d                       | 32.09c              | 93.62b                      |
| S2         | 87.46 a                      | 17.61 a                       | 71.08a              | 122.29a                     |
| S3         | 17.25 d                      | 7.84 e                        | 17.25d              | 85.05d                      |
| S4         | 45.39b                       | 13.11c                        | 45.39b              | 91.70c                      |
| S5         | 75.65 a                      | 16.40 b                       | 56.78a              | 97.21b                      |
| S6         | 88.38a                       | 17.92 a                       | 67.75a              | 109.30a                     |
| S7         | 72.62 a                      | 16.12 b                       | 72.62a              | 116.47a                     |
| S8         | 70.31 a                      | 16.24 b                       | 70.39a              | 126.03a                     |
| S9         | 87.43a                       | 17.91 a                       | 62.22a              | 111.38a                     |
| LSD p<0.01 | 26.229                       | 0.326                         | 16.012              | 23.241                      |

Mean values marked with a different letter in each column are statistically different from each other

\* Percentage values converted to angle values and analysis of variance applied.

There is a positive correlation between yield and C/N and C, and a negative correlation between N.

The correlation between yield and moisture and pH was not significant (Table 5).

Table 5. Relationship between various parameters measured in substrates and yield

| Variable | by Variable | Correlation | Signif Prob | Plot Corr |
|----------|-------------|-------------|-------------|-----------|
| Yield    | C/N         | 0,8259      | P<0,0061    |           |
| Yield    | C           | 0,8410      | P<0,0045    |           |
| Yield    | N           | -0,8770     | P<0,0019    |           |
| Yield    | pH          | -0,3925     | 0,2961      |           |
| Yield    | Moisture    | 0,5088      | 0,1619      |           |

The regression curve between yield and C/N, C and N is given in Figure 1 below.

Cap diameter differed significantly according to substrate composition. The highest value was recorded in S8 (126.03 mm) and the lowest in S3 (85.05 mm) (Table 4). Hal et al. (2021) recorded the cap diameter of reishi mushroom in the range of 50.63 - 45.23 mm. Veena and Pandey (2011) found cap diameter in the range of 73 to 93 mm. In a study comparing the reishi mushrooms, the

average cap width of mushrooms collected from nature was 14.2 cm, while the average cap width of mushrooms cultivated on orange stumps was found to be 13.6 cm (Turfan et al., 2016). The size of the fruiting bodies of Ganoderma can vary depending on the species and environmental conditions. Typically, the upper part, the cup, is circular to semicircular, fan-shaped or kidney-shaped, 2-20 (35) cm wide (Vishwakarma et al., 2011).



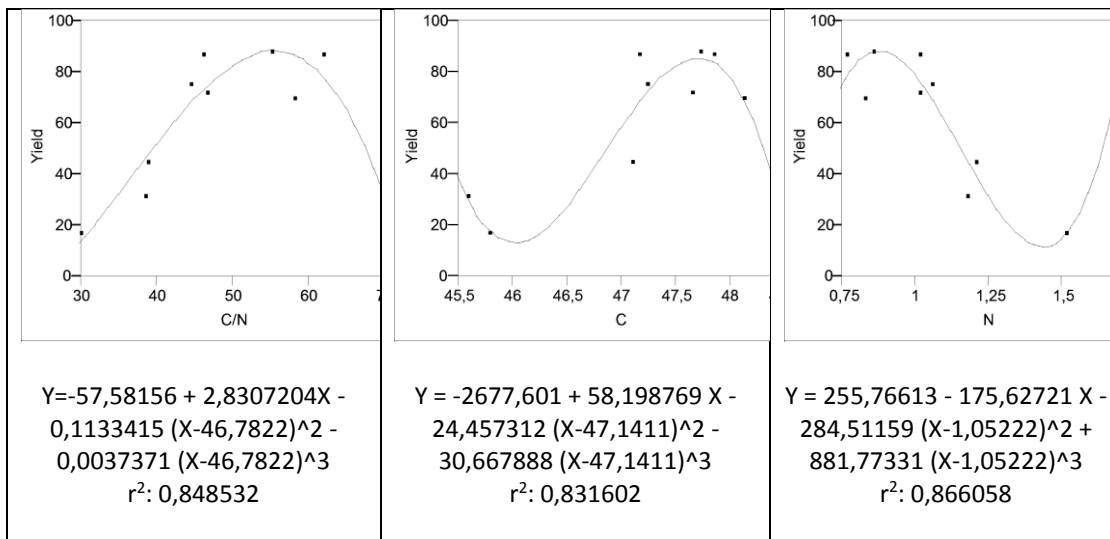


Figure 1. Regression graph between Yield-C/N, Yield-C and Yield-N

The protein and dry matter contents of mushrooms harvested from different substrates are given in Table 6. The highest protein content was 51.41% in S7 medium, the lowest value was 31.51% in S3 medium and the differences between the media were found to be significant. The protein content of *Ganoderma* mushrooms varies according to the substrate composition (Hsieh and Yang, 2004; Fraga, 2014; Osunde et al.; 2019; Hal et al. 2021). Although protein content is very important in most edible mushrooms, it loses its significance in medicinal mushrooms. It was determined that the differences between the dry matter ratios were significant. The highest dry matter was calculated as 34.07% in S1 medium. The lowest value was found as 27.72% in S6 medium. Baktemur et al. (2022) measured

the dry matter content of mushrooms harvested from different media between 20.29% to 17.97% and Hal et al. (2021) measured it between 25.24 to 22.13%.

Mineral matter contents of mushroom harvested from different substrates compositions are presented in Table 7. The mushrooms showed significant differences in terms of mineral matter content according to the substrate composition. S1 medium (chickpea stalk 40%) had the highest Zn content (10.75 mg 100 g dry mushroom<sup>-1</sup>). S9 medium had the highest value with 0.42% P, followed by S7 with 0.40%. The mushrooms obtained from S7 medium, containing 40% corncobs, were higher than the mushrooms obtained from other substrates in terms of N, K, Mg, Fe and Ca.

Table 6. Some quality characteristics of harvested mushrooms according to substrate composition

| Substrate  | Protein Content % | Total Dry Matter % |
|------------|-------------------|--------------------|
| S1         | 44.08 c           | 34.07a             |
| S2         | 39.14 e           | 29.61b             |
| S3         | 31.51 h           | 29.67b             |
| S4         | 47.60 b           | 30.22b             |
| S5         | 42.26 d           | 28.92b             |
| S6         | 34.01 g           | 27.72e             |
| S7         | 51.41 a           | 27.94c             |
| S8         | 44.66 c           | 28.39b             |
| S9         | 36.74 f           | 29.72b             |
| LSD p<0.01 | 1.303             | 1.968              |

Mean values marked with a different letter in each column are statistically different from each other.

Researchers often conduct studies on medicinal mushrooms mainly to analyze their bioactive components. Although the mineral contents of mushrooms are generally relatively low compared to other food sources, mushrooms in general are a good source of various minerals and can contribute to the diet. Specific mineral contents of mushrooms vary with strains, growing

conditions, cultivation methods and substrate composition. The previously findings in terms of N, P, K, Ca, Mg, Zn and Fe contents were in agreement to each other (Hoa et al., 2015; Sharif et al., 2016; Chiu et al., 2000; Ahmad et al., 2021; Zinnah et al., 2020; Ijimbili and Adenipekun, 2023).

Table 7. Mineral matter contents of mushrooms according to the substrates used in production

| Substrate  | %        |            |           |         |           | mg/kg    |         |
|------------|----------|------------|-----------|---------|-----------|----------|---------|
|            | Nitrogen | Phosphorus | Potassium | Calcium | Magnesium | Iron     | Zinc    |
| S1         | 7,05 bc  | 0,25 ef    | 1,38 c    | 2,63 bc | 0,85 bc   | 7,31 abc | 10,75 a |
| S2         | 6,26 de  | 0,23 f     | 1,28 c    | 2,15 de | 0,64def   | 6,77 abc | 5,25 ab |
| S3         | 5,04 g   | 0,21 f     | 0,98 d    | 1,78 f  | 0,49 g    | 5,84 c   | 4,49 b  |
| S4         | 7,62 b   | 0,33 bcd   | 1,63 b    | 2,86 ab | 0,93 ab   | 7,89 ab  | 6,99 ab |
| S5         | 6,76 cd  | 0,31 cde   | 1,63 b    | 2,35 cd | 0,70 cde  | 7,32 abc | 7,45 ab |
| S6         | 5,44 fg  | 0,28 def   | 1,29 c    | 1,94 ef | 0,53 fg   | 6,31 bc  | 6,55 ab |
| S7         | 8,23 a   | 0,40 ab    | 2,06 a    | 3,11 a  | 1,02 a    | 8,53 a   | 6,30 ab |
| S8         | 7,31 bc  | 0,37 abc   | 1,92 a    | 2,55 bc | 0,77 cd   | 7,90 ab  | 7,09 ab |
| S9         | 5,88 ef  | 0,42 a     | 1,39 c    | 2,11 de | 0,58 efg  | 6,82 abc | 7,74 ab |
| LSD p≤0.01 | 0.576    | 0.072      | 0.212     | 0.325   | 0.144     | 1.772    | 5.884   |

Mean values marked with a different letter in each column are statistically different from each other.

## Conclusion

The substrate plays a crucial role in the cultivation of *Ganoderma*. Nine different substrate formulations were to cultivate *Ganoderma lucidum* using available agricultural wastes. The quality and composition of the substrate, including moisture content and nutrient availability, C/N ratio of substrate significantly affected yield and quality characteristics. A balanced substrate that meets the nutritional requirements of the fungi will contribute to their successful cultivation. The evaluation of a substrate formulation should be evaluated by both the cost of the substrate and the yield and profitability obtained. Supplementing the corncob of 40% to sawdust substrate could be alternative material for *Ganoderma* growers since it enriched the nutrition components of fruitbody and high yield and biological efficiency and early harvesting time as well as sawdust.

Typically used for its medicinal properties, the active part of *Ganoderma lucidum* is the fruiting body or the mushroom itself. This part of the mushroom contains bioactive compounds

believed to have various health benefits, including potential immune system support and anti-inflammatory effects. While more research is needed to understand its potential benefits and mechanisms of action, it remains a popular choice for those seeking natural remedies and wellness support.

## Acknowledgement

This study was prepared from Gülsüm İNCE's Master's Thesis. Scientific Research Projects Coordination Unit of Eskisehir Osmangazi University supported this study. Project no: FYL-2022-2274. Special thanks to Atatürk Horticultural Central Research Institute for supplying the *Ganoderma lucidum* spawn.

NÇ and MKS designed the study and set up the experiments, Gİ conducted the study, data collection, analysis, analyzed the data, and wrote the article. All authors contributed equally to the article.

## References

Aghajani, H., Bahmani, M., Tajick Ghanbary, M. A., Zahedian, E., 2018. Influence of relative humidity and temperature on cultivation of *Pleurotus*

- species. *Maderas. Ciencia y tecnologia*, 20(4) 571-578. Universidad del Bio-Bio.
- A.O.A.C. (2019). Official Methods of Analysis of AOAC International [www Document]. 21<sup>st</sup>Ed. [https://www.aoac.org/aoac\\_prod\\_imis/AOAC/Publications/Official\\_Methods\\_of\\_Analysis/AOAC\\_Member/Pubs/OMA/AOAC\\_Official\\_Methods\\_of\\_Analysis.aspx](https://www.aoac.org/aoac_prod_imis/AOAC/Publications/Official_Methods_of_Analysis/AOAC_Member/Pubs/OMA/AOAC_Official_Methods_of_Analysis.aspx)
- Açıkgöz, N., İlker, E., & Gökçöl, A. (2004). Biyolojik araştırmaların bilgisayarda değerlendirilmeleri, Ege Üniversitesi Tohum Teknolojisi Uyg. ve Araş. Merkezi yayınları No:2, Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Atölyesi, Bornova-İzmir, 202s.
- Adongbede, E.M., & Atoyebi, A.F. (2021). Isolation of *Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst. From the wild in Lagos through tissue culture techniques and cultivation on sawdust of six Nigerian hardwoods. *Jasem* 25 (8), 1329–1335. <https://doi.org/10.4314/jasem.v25i7.32>
- Ahmad, R., Riaz, M., Khan, A., Aljamea, A., Algheryafi, M., Sewaket, D., & Alqathama, A. (2021). *Ganoderma lucidum* (Reishi) an edible mushroom; a comprehensive and critical review of its nutritional, cosmeceutical, mycochemical, pharmacological, clinical, and toxicological properties. *Phytotherapy Research*, 35(11), 6030–6062. <https://doi.org/10.1002/ptr.7215>
- Amiri-Sadeghan, A., Aftabi, Y., Arvanagh, R.A., Shokri, E., Khalili, M., Seyedrezazadeh, E. & Kuhar, F. (2022). A Review of substrates for solid-state fermentation of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Agaricomycetes), for basidiome production and effect on bioactive compounds. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 24(4): 15-29.
- Atila, F. (2020). Comparative study on the mycelial growth and yield of *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) Karst. *Acta Ecologica Sinica*, 40:153-157. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2018.11.007>
- Atila, F. (2022). Utilization of agricultural and forestry by-products in *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst production. *The Journal of Fungus*. 13 (Special issue)1-8, 3rd International Eurasian Mycology Congress.
- Atoji-Henrique, K., Henrique, D.S., Gloria, L.S., Mazaro, S.M., & Casagrande, M. (2017). Influence of substrate composition on beta-glucans production and growth of *Ganoderma lucidum*. *The Journal of Agricultural Science*, 9, 190.
- Aydoğdu, M., & Kurbetli, İ. (2021). Biotic interactions of cultivated mushroom and green mold disease in compost and casing soil. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 25(1), 13-22. <https://doi.org/10.29050/harranziraat.795177>
- Baktemur, G., Kara E., Yazar M., Soylu, M.K., & Taşkın, H. (2022). Use of different agricultural wastes in *Ganoderma carnosum* Pat cultivation. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*: Vol. 46: No. 3, Article 8.
- Bellettini, M. B., Fiorda, F. A, Maieves, H. A., Teixeira, G. L., Ávila, S., Hornung, P. S., Júnior, A. M., & Ribani, R. H. (2019). Factors affecting mushroom *Pleurotus* spp. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 26, 633–646
- Bernabe-Gonzalez, T., Cayetano-Catarino, M., Bernabe, G., Romero Flores, A., Angel-Rios, M.D., & Perez, P. (2015). Cultivation of *Ganoderma lucidum* on agricultural by-products in Mexico. *Micologia Aplicada International*, 27(2):25-30.
- Bishop, K.S., Kao, C.H.J., Xu, Y., Glucina, M.P., Paterson, R.R.M., & Ferguson L.R. (2015) From 2000 years of *Ganoderma lucidum* to recent developments in nutraceuticals. *Phytochemistry*, 114: 56–65
- Cao, Y., Xu, X., Liu, S., Huang, L. & Gu, J. (2018). *Ganoderma*: A Cancer immunotherapy review. *Front. Pharmacol.* 9:1217. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01217>
- Carrasco, J., Zied, D.C., Pardo, J.E. Preston G.M. & Pardo, A. (2018). Supplementation in mushroom crops and its impact on yield and quality. *AMB Expr* (2018) 8:146. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0678-0>
- Cheureuil, L. R., Oliveira Junior, S. D. de, Vasconcelos, A. dos S., Binda, V. da S., Pessoa, V. A., Nascimento, L. B. de B. do, Gouvea, P. R. dos S., & Sales-Campos, C. (2022). Screening of ligninolytic enzymes produced by *Ganoderma lucidum* in solid residues from the Amazon. *Research, Society and Development*, 11(14). <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i14.36257>
- Chiu, S. W. Wang, Z. M. Leung T. M. & Moore D. (2000). Nutritional value of *Ganoderma* extract and assessment of its genotoxicity and anti-genotoxicity using comet assays of mouse lymphocytes. *Food and Chemical Toxicology* 38, 173-178.
- Cormican, T., & Staunton, L. (1991). Factors in mushroom (*Agaricus bisporus*) compost productivity, In: *Science and Cultivation of Edible Fungi*, Maher (Ed.), Balkema, Rotterdam. 4: 221-224.
- Cör, D., Knez, Z., & Hrnčić M.K. (2018). Antitumour, antimicrobial, antioxidant and antiacetylcholinesterase Effect of *Ganoderma lucidum* Terpenoids and Polysaccharides: A Review. *Molecules*. 23, 649; [doi:10.3390/molecules23030649](https://doi.org/10.3390/molecules23030649)
- De Silva, D.D., Rapior, S., Fons, F. Bahkali A. H. & Hyde K. D. (2012). Medicinal mushrooms in supportive cancer therapies: an approach to anti-cancer

- effects and putative mechanisms of action. *Fungal Diversity* 55, 1–35. <https://doi.org/10.1007/s13225-012-015>
- Eren, E., & Pekşen, A. (2019). Türkiye’de kültür mantarı üretimi ve teknolojik gelişmeler. *Mantar Dergisi*, 10(3), 225-233.
- Erkel, I.E. (2009). Yield performance of *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst cultivation on substrates containing different protein and carbohydrate sources. *African Journal of Agricultural Research*, 4(11):1331-1333.
- Fraga, I., Coutinho, J., Bezerra, R.M., Dias, A.A., Marques, G., & Nunes, F.M. (2014). Influence of culture medium growth variables on *Ganoderma lucidum* exopolysaccharides structural features, *Carbohydrate Polymers*, V:111, 936-946, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.05.047>
- Gonzalez-Matute, R., Figlas, D., Devalis, R., Delmastro, S., Curvetto, N. (2002). Sunflower seed hulls as a main nutrient source for cultivating *Ganoderma lucidum*. *Micologia Aplicada International*, 14(2):19-24.
- Gurung, O.K., Budathoki, U. and Parajuli, G. (2012). Effect of different substrates on the production of *Ganoderma lucidum* (Curt: Fr) Karst. *Our Nature*, 10, 191- 198.
- Hal, Y.B., Yarar, M., Kara, E., Baktemur, G., & Taşkın, H. (2021). Effect of Different Agricultural Wastes on Yield and Quality in Cultivation of *Ganoderma lucidum* (Reishi mushroom). *Çukurova J. Agric. Food Sci.* 36(1):275-288
- Hall, I.R., Stephenson, S., Buchanan, P., Wang, Y. & Cole, A.L.J. (2003). *Edible and poisonous mushrooms of the world*. Timber Press, Portland. 371 p
- Hoa, H. T., Wang, C. L. & Wang, C. H. (2015). The effects of different substrates on the growth, yield, and nutritional composition of two oyster mushrooms (*Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*). *Mycobiology*. 43:423–434.
- Hsieh, C., & Yang, F. (2004). Reusing soy residue for the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Bioresource Technology*, 91:105-109.
- Hu, Y., Xu, W., Hu, S., Lian, L., Zhu, J., Shi, L., Ren, A., & Zhao, M. (2020). In *Ganoderma lucidum*, Glsnf1 regulates cellulose degradation by inhibiting GICreA during the utilization of cellulose. *Environ Microbiol.* 22(1):107-121. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14826>.
- Ijimbili, S.B., & Adenipekun, O.C. (2022). Comparative study on growth parameters, proximate analysis and mineral composition of *Ganoderma lucidum* cultivated on different substrates. *Advances in Food Sciences*, Volume 44(1), 5-14.
- Jandaik, S., Singh, R., & Sharma, M. (2013). Comparative growth characteristics and yield attributes of lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) on different substrates in India. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 15(5): 497–503 (2013)
- Jeewanthi, L.A.M.N., Ratnayake, K., & Rajapakse, P. (2017). Growth and yield of reishi mushroom [*Ganoderma lucidum* (Curtis) P. Karst] in different sawdust substrates. *Journal of Food and Agriculture*, 10(1&2):8-16. <https://doi.org/10.4038/jfa.v10i1-2.5208>
- Kacar, B. (1972). Bitki ve toprağın kimyasal analizleri, II. Bitki Analizleri. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, Ankara, No: 453. Uygulama kılavuzu 155, A.Ü.Basımevi, Ankara.
- Kacar B., İnal A., 2008. Bitki Örneklerinin Alınması ve Analize Hazırlanması. Bitki Analizleri Nobel Yayın No: 1241 ISBN:978-605-395-036-3. s. 115-144, Ankara.
- Kara, E., Baktemur, G., Yarar, M., & Taşkın, H. (2021). Farklı yetiştiricilik ortamlarının maitake mantarı (*Grifola frondosa*) yetiştiriciliğinde verim ve kalite üzerine etkisi. *Akademik Ziraat Dergisi*. 10(2): 201-218. <http://dx.doi.org/10.29278/azd.831748>
- Khatian N, & Aslam M. (2018). A Review of *Ganoderma lucidum* (Reishi): A Miraculous Medicinal Mushroom. *Inventi Rapid: Ethnopharmacology*, 2018(4), 1-6.
- Koutrotsios, G., Marianna P., Evdokia K. M., Georgios B., Maria K., Petros A. T., Vasiliki P., Adamantini K., & Georgios I. Z. (2019). Valorization of olive by-products as substrates for the cultivation of *Ganoderma lucidum* and *Pleurotus ostreatus* mushrooms with enhanced functional and prebiotic properties. *Catalysts*, 9(6): 537.
- Kumla, J., Suwannarach, N., Sujarit, K., Penkhrue, W., Kakumyan, P., Jatuwong, K., Vadthanasat, S., & Lumyong, S. (2020). Cultivation of mushrooms and their lignocellulolytic enzyme production through the utilization of agro-industrial waste. *Molecules*, 25, 2811. <https://doi.org/10.3390/molecules25122811>
- Liu, Q. & Tie, L. (2019). Preventive and therapeutic effect of ganoderma (lingzhi) on diabetes. In: Lin, Z., Yang, B. (eds) *Ganoderma and health*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1182. Springer, Singapore. [https://doi.org/10.1007/978-981-32-9421-9\\_8](https://doi.org/10.1007/978-981-32-9421-9_8)
- Lonardo D. P. Di, van der Wal, A. Harkes P. & de Boer W. (2020). Effect of nitrogen on fungal growth efficiency. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154:4, 433-437, <https://doi.org/10.1080/11263504.2020.1779849>
- Mehta, S., Jandaik, S., & Gupta, D. (2014). Effect of cost-effective substrates on growth cycle and yield of

- lingzhi or reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (Higher Basidiomycetes) from northwestern Himalaya (India). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 16(6): 585–591 (2014)
- Nguyen, L.T., Van Le, V., Nguyen, B.T.T., Nguyen, H.T.T., Tran, A.D., & Ngo, N.X. (2023). Optimization of mycelial growth and cultivation of wild *Ganoderma sinense*. *BioTechnologia (Pozn)*. 104(1):65-74. <https://doi.org/10.5114/bta.2023.125087>
- Nguyen, N.X.N., Van Le, V., Nguyen, L.T., Kana, R., & Nguyen, H.D. (2019). Optimal culture conditions for mycelial growth and fruiting body formation of Ling Zhi mushroom *Ganoderma lucidum* strain GA3. *Bich Thuy Thi*. 61(1), 62-67. [https://doi.org/10.31276/VJSTE.61\(1\).62-67](https://doi.org/10.31276/VJSTE.61(1).62-67)
- Osunde, M.O., Olayinka, A., Fashina, C.D. & Torimiro, N. (2019). Effect of Carbon-Nitrogen Ratios of Lignocellulosic Substrates on the Yield of Mushroom (*Pleurotus pulmonarius*). *Open Access Library Journal*, 6: e5777. <https://doi.org/10.4236/oalib.1105777>
- Özçelik, E., & Pekşen, A. (2007). Hazelnut husk as a substrate for the cultivation of shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). *Bioresource technology*, 98(14), 2652-2658.
- Öztürk, N., Basım, E., & Basım, H. (2017a). Yemeklik Kültür Mantarında (*Agaricus bisporus* (J. Lge) Imbach) Yaygın Görülen Mikrobiyal Hastalıklar. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(1), 112-125. <https://doi.org/10.29050/harranziraat.303179>
- Öztürk, N., Basım, E., & Mamay, M. (2017b). Yemeklik Kültür Mantarı Üretim Alanlarında Görülen Genel Mantar Zararlıları ve Mücadelesi. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 21(4), 507-523. <https://doi.org/10.29050/harranziraat.319808>
- Pekşen, A., & Yakupoglu, G. (2009). Tea waste as a supplement for the cultivation of *Ganoderma lucidum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4):611-618.
- Puliga, F., Pamela L., Francesco M., Alessandra Z., & Ornella F. (2022). Valorization of Hazelnut Shells as Growing Substrate for Edible and Medicinal Mushrooms. *Horticulturae*, 8,3: 214.
- Rashad, F. M., El Kattan, M. H., Fathy, H. M., Abd El-Fattah, D. A., El Tohamy, M., & Farahat, A.A. (2019). Recycling of agro-wastes for *Ganoderma lucidum* mushroom production and *Ganoderma* post mushroom substrate as soil amendment. *Waste Management*, 88, 147–159.
- Renu, T. & Brij, M.S. (2015). Deployment of indigenous wild *Ganoderma lucidum* for better yield on different substrates. *Afr J Agric Res*. 2015;10(33):3338–41.
- Sharif, S., Mustafa, G., Munir, H., Weaver, C.M., Jamil, Y. & Shahid, M. (2016). Proximate composition and micronutrient mineral profile of wild *ganoderma lucidum* and four commercial exotic mushrooms by ICP-OES and LIBS. *Journal of Food and Nutrition Research*, 4,(11), 703-708. <https://doi.org/10.12691/jfnr-4-11-1>
- Taofiq, O., Heleno, S.A., Calhelha, R.C., Barros, L., Gonzalez-Paramas, A M., Barreiro, M.F., & Ferreira, I.C.F.R. (2017). The potential of *Ganoderma lucidum* extracts as bioactive ingredients in topical formulations, beyond its nutritional benefits. *Food and Chemical Toxicology*, 108, Part A, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.051>
- Thiribhuvanamala G. & Krishnamoorthy A.S. (2021). Evaluation of different lignocellulosic substrates for cultivation of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*. *J. Environmental Biology*, 42, 1313-1319.
- Turfan, N., Karadeniz, M., & Ünal, S. (2016). *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 4(3): 158-162.
- Veena, S.S., & Pandey, M. (2011). Paddy straw as a substrate for the cultivation of Lingzhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W.Curt.:Fr.) P. Karst. in India. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 13(4):397- 400. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v13.i4.100>
- Vishwakarma M.P., Bhatt, R.P., & Gairola, S. (2011). Some medicinal mushrooms of Garhwal Himalaya, Uttarakhand, India *Int. J. Med. Arom. Plants*, 1(1), 33-40
- Wachtel-Galor S., Yuen, J., Buswell, J.A., & Benzie, I.F.F. (2011). *Ganoderma lucidum* (Lingzhi or Reishi): A Medicinal mushroom. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; Chapter 9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92757/>
- Yakupoğlu G., & Pekşen A. (2011). Çay atığından hazırlanan farklı kompost ve partikül büyüklüğünün *Ganoderma lucidum* mantarının verimi ve bazı morfolojik özellikleri üzerine etkisi. *Ekoloji* 20 (78): 41- 47.
- Yang, F., Chienyan, H., & Chen, H. (2003). Use of stillage grain from a rice-spirit distillery in the solid-state fermentation of *Ganoderma lucidum*. *Process Biochemistry*, 39: 21-26.
- Yuliana, T., Putri, N.Z., & Komara, D.Z. (2020). Study of *Ganoderma lucidum* in laccase production using corncob and paddies straw substrates on submerged fermentation system. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*. 23(8):1060-1065.

<https://doi.org/10.3923/pjbs.2020.1060.1065>

- Zhou, X.W. (2017). Edible and medicinal mushrooms: Technology and application. First edition. Ed. Zied D.C. & Pardo-Gimenez, A. John Wiley & Sons Ltd. p. 385-409.
- Zinnah, M. A., Shelly, N. J., Ahmed K. U. & Nuruddin M.M. (2020). Comperative study on the proximate composition of reishi mushroom (*Ganoderma lucidum*) Grown on different sawdust substrates. Int J of Advance Research and Innovative Ideas in Education. 6(4), 1744-1754. ISSN(O)-2395-4396.



# Effect of Some Additional Ingredients on Quality and Sensorial Characteristics of Spreadable Carob Molasses

## Bazı İlave Bileşenlerin Sürülebilir Keçiboynuzu Pekmezinin Kalite ve Duyusal Özelliklerine Etkisi

Mehmet Durdu Öner<sup>1</sup> , Muhittin Durusoy<sup>2</sup> , Manolya Eser Öner<sup>3\*</sup> 

<sup>1,2</sup> Department of Gastronomy and Culinary Arts, Faculty of Arts and Design, Alanya University, 07400, Alanya, Antalya, Turkey

<sup>3</sup>Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, Alanya Alaaddin Keykubat University, 07425 Alanya, Antalya, Turkey

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-1334-983X>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-5736-8602>; <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0003-4237-437X>

### To cite this article:

Öner, M. D., Durusoy, M. & Öner, M. E. (2024). Effect of some additional ingredients on quality and sensorial characteristics of spreadable carob molasses. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 28(2):248-257

DOI: 10.29050/harranziraat.1472726

### \*Address for Correspondence:

Manolya Eser ÖNER

e-mail:

manolya.oner@alanya.edu.tr

### Received Date:

25.04.2024

### Accepted Date:

12.05.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ABSTRACT

Carob (*Ceratonia siliqua* L.) is a nutritious fruit that has been grown in Mediterranean region. Carob holds an important place in various cultures, which has been used in baked goods, confectionery, chocolate milk products, snacks, tea, and coffee. The objective of this study was to produce spreadable carob molasses (CM) with different proportions of locust bean gum (LBG), crystallized honey (CH), cocoa oil (CO), egg white (EW), additive mixture (AM) and evaluate pH, total soluble solids (TSS), color, viscosity, density, volume increase, and sensorial properties. The darkest color was obtained in sample consisting of LBG and CO while the lightest color was determined in sample with LBG, EW, AM, indicating EW and AM enhanced lightness with bleaching effect. The highest volume increase, about 145%, was observed in sample with LBG and EW. The LBG addition significantly increased the viscosity in all spreadable carob molasses samples ( $p < 0.05$ ). Adding CO reduced the volume and increased the density of samples, which is probably due to lubricating effect of CO on the carob molasses. According to the sensory evaluation, the highest value of color, taste, consistency, spreadability and overall acceptability was determined in sample including CM, LBG, EW, CH, and AM. Consumer preference test was confirmed that same sample was the first choice with 20.77% preference score. Sensorial values of color and consistency had significant effect on overall acceptability with a correlation coefficient of 0.93 ( $p < 0.05$ ). With its appealing physical and sensorial property, spreadable carob molasses can be a healthy option.

**Key Words:** Carob molasses; Spreadable; Color; Viscosity; Sensory analysis

### ÖZ

Keçiboynuzu (*Ceratonia siliqua* L.) Akdeniz bölgesinde yaygın olarak yetiştirilen oldukça besleyici bir meyvedir. Çeşitli kültürlerde geleneksel tatlar arasında önemli bir yere sahip olan keçiboynuzu, unlu mamullerde, şekerlemelerde, çikolata süt ürünlerinde, atıştırmalıklarda, çay ve kahvede kullanılmaktadır. Bu çalışmanın amacı keçiboynuzu pekmezini (CM) keçiboynuzu sakızı (LBG), kristalize bal (CH), kakao yağı (CO), yumurta akı (EW), katkı karışımı (AM) gibi çeşitli bileşenlerle farklı oranlarda kullanarak sürülebilir keçiboynuzu pekmezi üretmek ve pH, toplam çözünür katı madde (TSS), renk, viskozite, yoğunluk, hacim artışı ve duyusal özelliklerdeki değişiklikleri değerlendirmektir. Renk değerleri karşılaştırıldığında, en koyu renk LBG ve CO içeren numunede elde edilirken, en açık renk LBG, EW ve AM içeren numunede belirlenmiştir; bu da EW ve AM'nin ağartma etkisine sahip olduğunu ve sürülebilir pekmez ürününde renk açıklığını arttırdığını göstermektedir. Numuneler arasında, %145'e varan en yüksek hacim artışı LBG ve EW içeren numunede gözlenmiştir. LBG ilavesi tüm sürülebilir

keçiboynuzu pekmezi örneklerinde viskoziteyi önemli ölçüde artırmıştır ( $p<0.05$ ). CO'nun bir bileşen olarak eklenmesi hacmi azaltmış ve böylece örneklerin yoğunluğunu artırmıştır, bu da muhtemelen CO'nun keçiboynuzu pekmezi üzerindeki kayganlaştırıcı etkisinden kaynaklanmaktadır. Duyusal değerlendirme analizine göre, en yüksek renk, tat, kıvam, sürülebilirlik ve genel kabul edilebilirlik değerleri CM, LBG, EW, CH ve AM formülasyonundan yapılan numunede tespit edilmiştir. Tüketici tercih testi de aynı numunenin %20.77 tercih puanı ile ilk tercih olduğunu doğrulamıştır. Renk ve kıvamın duyuşal değerleri, 0.93 korelasyon katsayısı ile genel kabul edilebilirlik üzerinde önemli bir etkiye sahiptir ( $p<0.05$ ). Sürülebilir keçiboynuzu pekmezi ürünleri, fiziksel ve duyuşal özelliklerinin albenisi ile tüketiciler için sağlıklı bir seçenek olabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Keçiboynuzu pekmezi; Sürülebilir; Renk; Viskozite; Duyusal analiz

## Introduction

In recent years, the high demand on natural healthy foods makes food processors to consider plant-based alternative products. Carob (*Ceratonia siliqua* L.) is a highly nutritious crop which is rich in phenolics (gallic, cinnamic, o and p-coumaric, ferulic, and ellagic) and flavonoids (rutin, catechin, apigenin, and naringenin) (Batu, 2005; Chait et al., 2020). It has positive effect on health issues such as diabetes, cholesterol, obesity, and digestion (Valero-Muñoz et al., 2014). In the world, the Mediterranean region is the main carob production area with 135,000 tons per year and Turkey is the fifth major carob producer after Spain, Portugal, Italy, and Morocco (FAO, 2021). Its chemical composition may vary based on species, harvesting season, soil, and climate (Brassesco et al., 2021). The carob pod has over 50% of sugar which mainly consists of sucrose, fructose, and glucose ranges between 34 and 42%, 10 and 12%, and 7 and 10%, respectively (Nasar-Abbas et al., 2016). Traditionally, carob pod has been consumed as fruit and in the form of food and beverage products. Meanwhile, there has been an extensive carob powder and molasses production in the food industry (Tounsi et al., 2017). The carob seeds consists of protein, ash, fat, sucrose, fructose, glucose, and significant amounts of potassium and calcium, which are primarily used for locust bean gum production (Papaefstathiou et al., 2018). The locust bean gum has been widely used as a constituent in food industry including yogurt, pudding, cheese, fish products, and ketchup.

With the functional properties and proven health benefits, scientific research towards the discovery of carob processing into different food

products is one of the most interesting and innovative area for food industry. Carob products fulfill the criteria's of allergic consumers by providing gluten-free, caffeine-free and bromine-free food products with natural chocolate like sweetness (Rodríguez-Solana et al., 2021). Several researchers have been carried out the product development including gluten free pastry products (Ceylan and Muştu, 2017), low-fat ice-cream (Badem and Alpkent, 2018), kefir (Sarica et al., 2021), confectionery (Ibrahim et al., 2020), halva (Tounsi et al., 2022), and snack bar (Donmez et al., 2022).

Spreadable food products look bright for the future by offering convenient, tasty, and nutritional properties. Sensorial properties, mainly color, flavor and taste, are the major factors affecting quality perception and consumer acceptance. Spreadable carob cream has been studied by several researchers in order to investigate healthier alternatives to hazelnut spreads with cocoa. Different formulations have been tested and Memiş and Tontul (2021) found that 25% carob flour, 39.3% sugar syrup, and 24% fat was convenient to produce spreadable carob cream with higher phenolic content and sensorial properties. In other research study, Shiehzadeh (2019) replaced sugar powder and cocoa with carob flour, which affected the sensorial property of the carob cream negatively. In this current study, the objective was to produce spreadable carob molasses by using various ingredients including locust bean gum (LBG), crystallized honey (CH), cocoa oil (CO), egg white (EW), and additive mixture (AM) in different proportions and evaluate changes in pH, TSS, color, viscosity, density, volume increase, and sensorial properties.



## Materials and Methods

### Materials

Carob molasses (CM) (Aksuvital, Istanbul, TR), Locust bean gum (LBG) (E410, Benosen, Istanbul, TR), Egg white (EW) (Dr. Gusto Pastry Inc. Istanbul, TR), Cocoa oil (CO) (Aksuvital, Istanbul, TR), Crystal honey (CH) (Gazipaşa, Antalya, TR) and additive mixture (AM) (Ovalette Bakery Mixture, Katsan, Istanbul, TR) were used in spreadable carob molasses (SCM) formulations.

### Sample Preparation

Spreadable carob molasses sample formulations were listed in Table 1. Each sample was prepared by using mixer (5L, 1400W, Schafer Prochef XL, Istanbul) for 30 min. Depending on the formulation (Table 1), CM has been mixed with LBG, EW, CO, and CH. In some formulations, commercially available AM was used, which consists of emulsifier, stabilizer, humectant, and carrier. Prepared samples were stored at 4°C until analysis.

Table 1. Formulations of carob molasses samples.

| Sample | Formulation <sup>1</sup>     | Amount (g) |     |    |     |    |    |
|--------|------------------------------|------------|-----|----|-----|----|----|
|        |                              | CM         | LBG | EW | CO  | CH | AM |
| 1      | CM                           | 300        | -   | -  | -   | -  | -  |
| 2      | CM + LBG + EW                | 300        | 6   | 3  | -   | -  | -  |
| 3      | CM + LBG + CO                | 300        | 6   | -  | 1.5 | -  | -  |
| 4      | CM + LBG + CH                | 300        | 6   | -  | -   | 6  | -  |
| 5      | CM + LBG + EW + AM           | 300        | 6   | 3  | -   | -  | 3  |
| 6      | CM + LBG + CO + AM           | 300        | 6   | -  | 1.5 | -  | 3  |
| 7      | CM + LBG + CH + AM           | 300        | 6   | -  | -   | 6  | 3  |
| 8      | CM + LBG + EW + CO           | 300        | 6   | 3  | 1.5 | -  | -  |
| 9      | CM + LBG + EW + CH           | 300        | 6   | 3  | -   | 6  | -  |
| 10     | CM + LBG + CO + CH           | 300        | 6   | -  | 1.5 | 6  | -  |
| 11     | CM + LBG + EW + CO + AM      | 300        | 6   | 3  | 1.5 | -  | 3  |
| 12     | CM + LBG + EW + CH + AM      | 300        | 6   | 3  | -   | 6  | 3  |
| 13     | CM + LBG + CO + CH + AM      | 300        | 6   | -  | 1.5 | 6  | 3  |
| 14     | CM + LBG + EW + CO + CH      | 300        | 6   | 3  | 1.5 | 6  | -  |
| 15     | CM + LBG + EW + CO + CH + AM | 300        | 6   | 3  | 1.5 | 6  | 3  |

<sup>1</sup>CM: Carob Molasses; LBG: Locust Bean Gum; CO: Cocoa Oil; CH: Crystal Honey; AM: Additive Mixture, EW: Egg White

### pH, TSS, and Color Analysis

Measurement of sample pH was carried out using a digital pH meter (Orion MI 151, Milwaukee Instruments Inc. Rocky Mount, NC USA) and the samples were diluted with distilled water 1/10 (v/v) before measurement (Ozbey et al., 2013).

The total soluble solids (TSS) content of carob molasses (CM) was determined using a refractometer (ATAGO PAL-1 Digital, Japan), which was diluted with distilled water 1/1 (v/v) and measured at room temperature (Ozbey et al., 2013).

A Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Tokyo, Japan) was used to measure the color of samples using the  $L^*a^*b^*C^*h^\circ\Delta E^*$  system, where  $L^*$  is lightness, ranging from 0 (absolute black) to 100 (absolute white);  $a^*$  is ranging from -60

(green) to 60 (red);  $b^*$  is ranging from -60 (blue) to 60 (yellow);  $C^*$  is chroma, ranging from 0 (least saturation) to 60 (full saturation); and  $h^\circ$  is hue angle, ranging from 0° to 360°, where 0° or 360° is red, 90° is yellow, 180° is green, and 270° is blue.  $\Delta E^*$  indicates color difference between reference and sample. A white ceramic plate was used for calibration of the instrument. During the measurement, 20 grams of samples were placed into the petri plate and color values were recorded by measuring three different locations (Ozmen et al., 2023).

### Viscosity

The viscosity of spreadable carob molasses was measured by using designed apparatus (Alanya/Antalya, TR), which consists of probe (5.48 g) with a base area of 1.12 cm<sup>2</sup>. At the certain time period (15 s), the distance (in cm) probe traveled through the samples were measured. The

spreadable carob molasses samples were kept in the refrigerator (570463 MB, Eskisehir, TR) for 24 hours before measurement.

#### *Density and Volume Increase Analysis*

The volume of 100 g of untreated and treated

$$\text{Volume Increase (\%)} = \frac{[(\text{Volume of 100 g sample} - \text{Volume of 100 g untreated carob molasses}) / \text{Volume of 100 g untreated carob molasses}] \times 100}{(1)}$$

#### *Sensory Evaluation*

Sensory attributes including color, taste, consistency, spreadability, and overall acceptability were evaluated by a semi-trained panel of twenty-six people from students, academic and administrative staff of Alanya University (Alanya/Antalya, TR) by using a nine-point hedonic rating scale (1 = dislike extremely to 9 = like extremely) (Meilgaard et al., 2006). Samples were randomly coded and served to sensory panelists inside the transparent packaging materials with water and crackers.

#### *Statistical Analysis*

The results were presented as mean  $\pm$  standard deviation. One-way analysis of variance (ANOVA) was performed using JMP package program (JMP 13.0; Cary, NC, USA) at 95% ( $\alpha=0.05$ ) confidence interval and the difference between carob molasses samples was determined by Tukey's multiple range test. All experiments were replicated two times. Also, correlation coefficients between some sensory and physical attributes were calculated using Excel (2016).

## **Results and Discussion**

#### *Effect of ingredients on pH and color*

The TSS value of carob molasses used was determined as  $78.4 \pm 0.1$  °brix. The pH values of spreadable carob molasses varied from 5.70 to 5.91, but there was no significant difference between pH values of samples ( $p > 0.05$ ). pH values of samples indicated that there was no significant acid production by microbial fermentation or enzymatic digestion during the preparation of the samples.

carob molasses samples were measured. Volume increase percentages were calculated using Eq. 1 (Badilli, 2020). The density ( $\text{g ml}^{-1}$ ) was calculated dividing 100 g of samples by their corresponding volume.

Color values of spreadable carob molasses samples were listed in Table 2. The lightness ( $L^*$ ) value of the carob molasses (CM) was determined as  $25.87 \pm 0.09$ . Throughout the samples,  $L^*$  values were varied from  $23.83 \pm 0.26$  to  $69.49 \pm 1.16$ , in which the darkest color was obtained in sample 3 while the lightest color determined in sample 5; indicating egg white (EW) and additive mixture (AM) enhanced lightness in the spreadable molasses product. In consistent with our results, other researcher has reported that EW had bleaching effect on liquid and solid molasses production (Batu, 2005). However, in the current study, there was no significant difference observed in  $L^*$  values of sample 5, 7, and 12, which illustrated replacing EW with crystal honey (CH) and/or addition of both EW and CH did not affect the lightness when there is an AM in the formulation ( $p > 0.05$ ). Furthermore, lighter color was found in samples of 6, 11, 13, and 15 indicating AM was an important ingredient in the formation of light color. Whereas replacement of cocoa oil (CO) with CH significantly reduced the lightness of the samples ( $p < 0.05$ ). When  $a^*$  and  $b^*$  values were compared, the lowest values of  $a^*$  ( $0.59 \pm 0.03$ ) and  $b^*$  ( $0.50 \pm 0.05$ ) was observed in sample 1 consisting of CM, only. With the highest  $a^*$  value, reddish color was evaluated in samples of 2 and 9; which includes EW and/or EW and CH in the formulation; however, with the higher  $b^*$  values, contribution of AM increased yellowness in the samples significantly ( $p < 0.05$ ). The usage of EW formed air bubbles and refracted more light in the product which might resulted in yellow color in the product. In terms of chroma value ( $C^*$ ), the higher saturation was obtained in samples with AM

ingredient. With the EW, CO, CH, and AM ingredients, the brightest color was determined in samples of 11, 13, and 15. The results confirmed that color values were parallel to the other described color parameters. In hue angle ( $h^\circ$ ) values, yellowish color was obtained in samples of 5, 6, 7, 11, 12, 13, and 15. There was no significant difference determined in samples of 1, 4, and 10

( $p>0.05$ ); indicating addition of CO and/or CO and CH did not affect  $h^\circ$  value. Total color change ( $\Delta E$ ) in spreadable carob molasses samples varied from  $34.63\pm 0.56$  to  $69.87\pm 0.26$ . There was no statistical difference observed between sample 1, 8, 10, and 14 ( $p>0.05$ ). When compared to sample 1, lower color change value was observed in samples of 5, 7 and 8 ( $p<0.05$ ).

Table 2. Color values of spreadable carob molasses samples<sup>1</sup>.

| Sample | L*                       | a*                      | b*                       | C*                       | $h^\circ$                 | $\Delta E$               |
|--------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 1      | 25.87±0.09 <sup>g</sup>  | 0.59±0.03 <sup>l</sup>  | 0.50±0.05 <sup>f</sup>   | 0.77±0.01 <sup>h</sup>   | 40.49±3.79 <sup>ef</sup>  | 67.88±0.08 <sup>bc</sup> |
| 2      | 34.49±0.06 <sup>f</sup>  | 11.83±0.24 <sup>a</sup> | 14.57±0.58 <sup>d</sup>  | 18.76±0.60 <sup>d</sup>  | 50.92±0.56 <sup>bcd</sup> | 61.39±0.31 <sup>d</sup>  |
| 3      | 23.83±0.26 <sup>h</sup>  | 1.90±0.27 <sup>l</sup>  | 2.32±0.12 <sup>f</sup>   | 3.00±0.08 <sup>g</sup>   | 50.86±5.33 <sup>cd</sup>  | 69.87±0.26 <sup>a</sup>  |
| 4      | 32.78±0.23 <sup>f</sup>  | 9.65±0.02 <sup>b</sup>  | 10.03±0.01 <sup>e</sup>  | 13.92±0.02 <sup>e</sup>  | 46.08±0.02 <sup>de</sup>  | 61.93±0.22 <sup>d</sup>  |
| 5      | 69.49±1.16 <sup>a</sup>  | 3.59±0.10 <sup>h</sup>  | 28.93±0.35 <sup>c</sup>  | 29.15±0.36 <sup>c</sup>  | 82.92±0.11 <sup>a</sup>   | 34.63±0.56 <sup>k</sup>  |
| 6      | 59.66±1.24 <sup>d</sup>  | 8.05±0.14 <sup>c</sup>  | 33.13±1.25 <sup>ab</sup> | 30.82±2.03 <sup>bc</sup> | 79.55±3.48 <sup>a</sup>   | 45.30±0.11 <sup>f</sup>  |
| 7      | 68.06±1.46 <sup>ab</sup> | 3.95±0.09 <sup>gh</sup> | 29.93±0.02 <sup>bc</sup> | 30.15±0.05 <sup>bc</sup> | 82.49±0.17 <sup>a</sup>   | 36.38±1.03 <sup>j</sup>  |
| 8      | 26.46±0.24 <sup>g</sup>  | 1.50±0.09 <sup>j</sup>  | 2.41±0.47 <sup>f</sup>   | 2.85±0.45 <sup>g</sup>   | 57.62±3.55 <sup>b</sup>   | 67.23±0.23 <sup>bc</sup> |
| 9      | 37.12±0.23 <sup>e</sup>  | 11.89±0.01 <sup>a</sup> | 16.40±0.03 <sup>d</sup>  | 20.26±0.02 <sup>d</sup>  | 54.06±0.08 <sup>bc</sup>  | 59.05±0.23 <sup>e</sup>  |
| 10     | 25.47±0.11 <sup>gh</sup> | 1.10±0.07 <sup>k</sup>  | 1.16±0.02 <sup>f</sup>   | 1.60±0.03 <sup>gh</sup>  | 46.57±2.31 <sup>de</sup>  | 68.26±0.12 <sup>b</sup>  |
| 11     | 63.15±0.28 <sup>c</sup>  | 6.25±0.08 <sup>e</sup>  | 32.79±0.15 <sup>ab</sup> | 33.37±0.17 <sup>a</sup>  | 79.21±0.07 <sup>a</sup>   | 42.15±0.08 <sup>h</sup>  |
| 12     | 68.66±0.68 <sup>a</sup>  | 4.44±0.05 <sup>f</sup>  | 35.18±4.23 <sup>a</sup>  | 31.00±0.27 <sup>b</sup>  | 81.76±0.02 <sup>a</sup>   | 36.55±0.27 <sup>j</sup>  |
| 13     | 62.39±0.31 <sup>c</sup>  | 6.78±0.10 <sup>d</sup>  | 33.73±0.18 <sup>a</sup>  | 34.40±0.19 <sup>a</sup>  | 78.64±0.09 <sup>a</sup>   | 43.44±0.09 <sup>g</sup>  |
| 14     | 26.98±0.28 <sup>g</sup>  | 4.15±0.08 <sup>fg</sup> | 2.86±0.07 <sup>f</sup>   | 5.05±0.03 <sup>f</sup>   | 34.59±1.19 <sup>f</sup>   | 66.82±0.27 <sup>c</sup>  |
| 15     | 66.30±0.81 <sup>b</sup>  | 5.99±0.12 <sup>e</sup>  | 33.70±0.40 <sup>a</sup>  | 34.23±0.41 <sup>a</sup>  | 79.93±0.08 <sup>a</sup>   | 40.55±0.24 <sup>l</sup>  |

<sup>1</sup>The values in the same column shown with different letters are statistically different from each other ( $p<0.05$ ).

#### *Effect of ingredients on viscosity, volume increase and density*

The viscosity (plunge depth, cm), volume increase (%), and density ( $g\ ml^{-1}$ ) values of the samples produced from carob molasses in accordance with the experimental design were given in Table 3. The lowest viscosity with a highest plunge depth of  $9.95\pm 0.05$  cm and the highest density with  $1.43\pm 0.00$   $g\ ml^{-1}$  was determined in sample 1 (CM only) ( $p<0.05$ ). Since no treatment was applied to sample 1 (as control sample) volume increase was 0%. Addition of LBG and EW

to CM significantly increased the volume to  $144.74\pm 2.80$  % ( $p<0.05$ ), which was the highest volume increase throughout the other spreadable carob molasses samples. In addition, significant volume increases were observed mostly in EW added samples, indicating that EW had significant effect on air incorporation and thus volume increase of the product ( $p<0.05$ ). Whereas, it is important to highlight that CH and AM had also significant contribution in volume increase of the samples ( $p<0.05$ ).

Table 3. Viscosity, volume increase and density values of spreadable carob molasses<sup>1</sup>.

| Sample | Viscosity<br>plunge depth, cm | Volume Increase (%)      | Density (g mL <sup>-1</sup> ) |
|--------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| 1      | 9.95±0.05 <sup>a</sup>        | 0.00±0.00 <sup>h</sup>   | 1.43 <sup>a</sup>             |
| 2      | 2.00±0.20 <sup>d</sup>        | 144.74±2.80 <sup>a</sup> | 0.59 <sup>j</sup>             |
| 3      | 2.90±0.10 <sup>c</sup>        | 22.86±0.09 <sup>g</sup>  | 1.17 <sup>bc</sup>            |
| 4      | 2.60±0.10 <sup>c</sup>        | 113.49±2.22 <sup>c</sup> | 0.67 <sup>h</sup>             |
| 5      | 0.55±0.25 <sup>e</sup>        | 110.50±2.17 <sup>c</sup> | 0.68 <sup>h</sup>             |
| 6      | 1.00±0.20 <sup>e</sup>        | 84.67±0.52 <sup>e</sup>  | 0.78 <sup>f</sup>             |
| 7      | 0.60±0.20 <sup>e</sup>        | 102.02±0.68 <sup>d</sup> | 0.71 <sup>g</sup>             |
| 8      | 3.55±0.05 <sup>b</sup>        | 23.87±0.92 <sup>g</sup>  | 1.16 <sup>c</sup>             |
| 9      | 1.80±0.30 <sup>d</sup>        | 129.79±2.52 <sup>b</sup> | 0.62 <sup>i</sup>             |
| 10     | 2.95±0.05 <sup>c</sup>        | 23.87±0.92 <sup>g</sup>  | 1.16 <sup>c</sup>             |
| 11     | 0.60±0.20 <sup>e</sup>        | 80.24±0.48 <sup>e</sup>  | 0.80 <sup>e</sup>             |
| 12     | 0.95±0.35 <sup>e</sup>        | 74.00±1.58 <sup>f</sup>  | 0.82 <sup>d</sup>             |
| 13     | 0.65±0.25 <sup>e</sup>        | 84.67±1.75 <sup>e</sup>  | 0.78 <sup>f</sup>             |
| 14     | 2.75±0.05 <sup>c</sup>        | 21.87±0.90 <sup>g</sup>  | 1.18 <sup>b</sup>             |
| 15     | 0.55±0.25 <sup>e</sup>        | 110.50±2.17 <sup>c</sup> | 0.68 <sup>h</sup>             |

<sup>1</sup>The values in the same column shown with different letters are statistically different from each other ( $p < 0.05$ ).

Locust bean gum affects viscosity due to its molecular weight, concentration, and solubility. Even though, it is generally considered less viscous than guar gum and taro gum, it forms a highly viscous gel structure over a wide pH range (4-9); thereby it is used as a stabilizer and thickener in many foods (Barak and Mudgil, 2014). Based on viscosity analysis results, LBG addition significantly increased the viscosity in all spreadable carob molasses samples compared to sample 1 ( $p < 0.05$ ). Similar results were obtained when LBG used in different products. Researchers have reported that LBG had been used to improve dough rheology and product texture in the absence of gluten by forming emulsions and stabilizing dispersion with its enhancement ability of viscosity (Topaloglu, 2019). Other researchers have found similar effect of LBG on yogurt, this carbohydrate-based hydrocolloid increased the clot tightness, viscosity, dry matter and also reduced serum separation of the product (Peker, 2012). Furthermore, it was determined that the addition of 0.7% LBG increased the consistency, enhanced the structure and thereby prevented water separation of pudding (Derazshamshir, 2017). In the present study, findings confirm that addition of AM as an ingredient increased the viscosity of samples of 5, 6, 7, 11, 12, 13, 15 and there was no

significant difference observed between these samples ( $p > 0.05$ ).

Sample 1 (CM) had the highest density of 1.43 g mL<sup>-1</sup> ( $p < 0.05$ ). Addition of CO as an ingredient reduced the volume increase and thereby increased the density of samples 3, 8, 10, 14, which is probably due to lubricating effect of CO on the carob molasses. However, addition of AM reduced the density of the spreadable carob molasses samples of 5, 6, 7, 11, 12, 13, and 15. It is important to highlight that addition of CH had effect on density reduction of samples 4 and 9. These findings confirmed that increase in volume reduced density of spreadable carob molasses samples as expected.

#### *Effect of ingredients on sensorial quality*

Product development has been carried out in order to improve the physical structure, appearance, and function of the product in turn to increase its overall quality. Sensory analysis is an essential method to measure the perception of reactions to different characteristics of foods through the senses of taste, smell, touch, hearing and sight (Stone and Sidel, 2004). In the present study, sensory analysis was used to determine reaction of consumers on the color, taste, consistency, spreadability, and overall

acceptability of spreadable carob molasses samples obtained by adding different ingredients. The scores of the sensory evaluation analysis of 15 products were listed in Table 4. According to the 9-point hedonic scale, overall acceptability scores varied between  $5.38 \pm 2.06$  and  $7.58 \pm 1.45$ ,

indicating panelists had a positive approach to all the features of the products. The findings confirmed that the highest overall acceptability was found in sample 12 with  $7.58 \pm 1.45$  and there was no significant difference observed between sample 12 and samples of 5, 6, 7, 11, 13 ( $p > 0.05$ ).

Table 4. Sensory evaluation of spreadable carob molasses samples<sup>1</sup>.

| Sample | Color                            | Taste                          | Consistency                   | Spreadability                  | Overall Acceptability           |
|--------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| 1      | $6.50 \pm 2.16$ <sup>abcd</sup>  | $6.31 \pm 1.89$ <sup>ab</sup>  | $6.12 \pm 2.08$ <sup>bc</sup> | $5.38 \pm 2.21$ <sup>d</sup>   | $6.31 \pm 1.74$ <sup>bcde</sup> |
| 2      | $5.31 \pm 2.07$ <sup>f</sup>     | $5.69 \pm 2.20$ <sup>bc</sup>  | $5.50 \pm 2.02$ <sup>c</sup>  | $5.96 \pm 2.05$ <sup>cd</sup>  | $5.38 \pm 2.06$ <sup>e</sup>    |
| 3      | $6.31 \pm 1.09$ <sup>abcde</sup> | $6.04 \pm 1.75$ <sup>abc</sup> | $6.35 \pm 1.55$ <sup>bc</sup> | $6.27 \pm 1.66$ <sup>bcd</sup> | $6.04 \pm 1.25$ <sup>bcde</sup> |
| 4      | $6.23 \pm 1.73$ <sup>bcdef</sup> | $5.69 \pm 1.93$ <sup>bc</sup>  | $6.15 \pm 1.69$ <sup>bc</sup> | $6.35 \pm 1.92$ <sup>bcd</sup> | $5.88 \pm 1.70$ <sup>cde</sup>  |
| 5      | $6.62 \pm 1.79$ <sup>abcd</sup>  | $6.35 \pm 1.60$ <sup>ab</sup>  | $6.35 \pm 2.06$ <sup>bc</sup> | $7.15 \pm 1.67$ <sup>ab</sup>  | $6.81 \pm 1.50$ <sup>abc</sup>  |
| 6      | $6.73 \pm 1.73$ <sup>abc</sup>   | $6.35 \pm 1.87$ <sup>ab</sup>  | $6.77 \pm 2.14$ <sup>b</sup>  | $7.12 \pm 2.08$ <sup>ab</sup>  | $6.88 \pm 1.68$ <sup>ab</sup>   |
| 7      | $6.81 \pm 1.65$ <sup>ab</sup>    | $6.42 \pm 2.28$ <sup>ab</sup>  | $6.54 \pm 2.18$ <sup>bc</sup> | $6.85 \pm 1.99$ <sup>abc</sup> | $6.62 \pm 2.19$ <sup>abcd</sup> |
| 8      | $5.35 \pm 1.98$ <sup>ef</sup>    | $5.42 \pm 2.23$ <sup>bc</sup>  | $5.88 \pm 2.08$ <sup>bc</sup> | $5.88 \pm 1.93$ <sup>cd</sup>  | $5.65 \pm 1.94$ <sup>de</sup>   |
| 9      | $5.73 \pm 1.82$ <sup>def</sup>   | $5.50 \pm 2.20$ <sup>bc</sup>  | $5.62 \pm 1.92$ <sup>c</sup>  | $5.85 \pm 1.59$ <sup>cd</sup>  | $5.50 \pm 1.82$ <sup>e</sup>    |
| 10     | $5.81 \pm 1.98$ <sup>cdef</sup>  | $5.50 \pm 2.35$ <sup>bc</sup>  | $5.69 \pm 1.74$ <sup>c</sup>  | $5.92 \pm 1.85$ <sup>cd</sup>  | $5.65 \pm 1.87$ <sup>de</sup>   |
| 11     | $6.85 \pm 1.32$ <sup>ab</sup>    | $6.00 \pm 2.02$ <sup>abc</sup> | $6.46 \pm 1.63$ <sup>bc</sup> | $7.08 \pm 1.92$ <sup>ab</sup>  | $6.73 \pm 1.54$ <sup>abc</sup>  |
| 12     | $7.27 \pm 1.64$ <sup>a</sup>     | $6.96 \pm 1.71$ <sup>a</sup>   | $7.73 \pm 1.66$ <sup>a</sup>  | $7.85 \pm 1.49$ <sup>a</sup>   | $7.58 \pm 1.45$ <sup>a</sup>    |
| 13     | $6.38 \pm 2.00$ <sup>abcd</sup>  | $6.42 \pm 1.96$ <sup>ab</sup>  | $6.50 \pm 2.23$ <sup>bc</sup> | $6.77 \pm 1.90$ <sup>bc</sup>  | $6.73 \pm 1.80$ <sup>abc</sup>  |
| 14     | $5.35 \pm 2.10$ <sup>ef</sup>    | $5.15 \pm 2.09$ <sup>c</sup>   | $5.65 \pm 1.72$ <sup>c</sup>  | $5.85 \pm 1.83$ <sup>cd</sup>  | $5.58 \pm 2.12$ <sup>e</sup>    |
| 15     | $6.65 \pm 1.96$ <sup>abcd</sup>  | $6.35 \pm 2.04$ <sup>ab</sup>  | $6.15 \pm 2.31$ <sup>bc</sup> | $6.46 \pm 2.25$ <sup>bc</sup>  | $6.58 \pm 1.88$ <sup>bcd</sup>  |

<sup>1</sup>The values in the same column shown with different letters are statistically different from each other ( $p < 0.05$ ).

Color is essential attribute in food products to give a positive impression on the consumer acceptance. Without appealing color, the product will receive negative score even if the other sensorial properties are good. Even though having dark color of samples were appreciated, lighter colors were preferred in spreadable molasses samples of 1, 3, 5, 6, 7, 11, 12, 13, and 15. The highest score with  $7.27 \pm 1.64$  was obtained in sample 12 which consist of CM, LBG, EW, CH, and AM in its formulation. Results indicated that lighter color samples (5, 6, 7, 11, 12, 13, and 15) with high color score were contained AM in their formulation. Even though traditionally carob molasses is not commonly consumed in lighter and yellowish color, these findings indicated that there is a potential in these new formulations. As reported in previous studies, addition of LBG (2%) in new generation snack design from carob fruits

was acceptable in terms of taste, aroma, flavor, texture and general preference (Donmez et al., 2022). In this study samples with AM had higher taste scores. However, scores of samples of 1 and 3 with no AM were acceptable. Similar results were obtained in consistency values of sensory analysis. The highest taste and consistency score was determined in sample 12 as  $6.96 \pm 1.71$  and  $7.73 \pm 1.66$ , respectively. In terms of spreadability values, the samples with AM ingredient received higher values ranging from  $6.46 \pm 2.25$  to  $7.85 \pm 1.49$  and sample 12 received the highest value with  $7.85 \pm 1.49$  within all the samples. According to the consumer preference test, sample 12 (20.77%), sample 15 (11.92%), and sample 7 (10.77%) were preferred as first, second and third choice, respectively. The least favorite sample was sample 2 with ingredients of LBG and EW. Results indicated that sample 12 (with all ingredients

except CO) was the most preferred sample.

Correlation coefficients between some physical and sensory analysis results of spreadable carob molasses samples were given in Table 5. A correlation of 0.69 was found between sensorial quality of spreadability and physical quality of viscosity values. Even though this correlation value was at acceptable level, it was not high due to the efficacy of other factors on spreadability. The stronger positive correlation at  $\rho = 0.86$  was observed between spreadability and consistency. Additionally, sensorial values of spreadability and consistency had a significant effect on overall

acceptability with a correlation coefficient of 0.86 and 0.93, respectively. Similar result was obtained between taste on overall acceptability scores. The correlation coefficient between physical color values of  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C^*$ ,  $h^\circ$ ,  $\Delta E$  and sensorial overall acceptability was 0.83, 0.78, 0.70, 0.81, -0.82 respectively; however, correlation coefficient of sensorial color value and overall acceptability was 0.93. These results indicated that sensorial quality parameters of spreadability, consistency, taste and color are correlated with sensorial quality parameter of overall acceptability.

Table 5. Correlation coefficients ( $\rho$ ) between some physical and sensory values of spreadable carob molasses samples.

| Values        | Values                | Correlation ( $\rho$ ) |
|---------------|-----------------------|------------------------|
| Spreadability | Viscosity             | 0.69                   |
| Spreadability | Consistency           | 0.86                   |
| Spreadability | Overall acceptability | 0.86                   |
| Consistency   | Overall acceptability | 0.93                   |
| Taste         | Overall acceptability | 0.92                   |
| Color         | Overall acceptability | 0.93                   |
| $L^*$         | Overall acceptability | 0.83                   |
| $b^*$         | Overall acceptability | 0.78                   |
| $C^*$         | Overall acceptability | 0.70                   |
| $h^\circ$     | Overall acceptability | 0.81                   |
| $\Delta E$    | Overall acceptability | -0.82                  |

## Conclusions

There was no significant difference between pH values of spreadable carob molasses samples ( $p > 0.05$ ). Throughout the samples,  $L^*$  values were varied from  $23.83 \pm 0.26$  to  $69.49 \pm 1.16$ , in which the darkest color was obtained in sample 3 (with CM, LBG, and CO) while the lightest color determined in sample 5 (with CM, LGB, EW, and AM), which indicated EW and AM enhanced lightness in the spreadable molasses products. The addition of CO increased  $a^*$  value which indicates redness, while addition of EW and AM increased  $b^*$  value which is yellowness. Based on  $C^*$  values, the brightest color was determined in samples 11, 13, and 15 with EW, CO, CH, and AM ingredients. Based on the viscosity analysis, usage of LBG as an ingredient significantly increased the viscosity of all spreadable carob molasses compared to sample

1 (carob molasses only). Addition of CO as an ingredient reduced the volume and thereby increased the density of samples of 3, 8, 10, and 14. However, addition of AM reduced the density of the spreadable carob molasses samples of 5, 6, 7, 11, 12, 13, and 15. In all parameters, the highest sensory evaluation score was obtained in sample 12 (with CM, LBG, EW, CH, and AM). Based on the consumer preference test, sample 12 (20.77%), sample 15 (11.92%) and sample 7 (10.77%) were preferred as first, second and third choice, respectively. Results indicated that sample 12 (with all ingredients except CO) was the most preferred sample. Sensorial quality parameters of spreadability, consistency, taste and color were highly correlated with sensorial quality parameter of overall acceptability. The highest positive and significant correlations were observed between the overall sensory ratings and consistency, color

and taste, with  $p$  values of 0.93, 0.93, and 0.92, respectively ( $p>0.05$ ).

**Acknowledgements:** This article has been produced from Muhittin Durusoy's MSc. Thesis, named as "A research on production of spreadable carob molasses". (YOK Thesis No: 829446)

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

**Author contributions:** M.D. methodology, data collection, writing; M.E.Ö. conceptualization, methodology, analysis and writing; M.D.Ö. conceptualization, methodology, analysis, writing, review and editing.

## References

- Badem, D. A., & Alpkent, D. Z. (2018). Production of Ice Cream with Carob Bean Pekmez (Molasses). *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, 3(1), 28–32. <https://doi.org/10.22161/ijeab/3.1.5>
- Badilli, A.G. 2020. *Investigation of Possibilitires of Chickpea Flour Usage Opportunities instead of Milk Powder in Reduced Fat Functional Ice Cream Production*. Harran University, Sanliurfa, TR.
- Barak, S., & Mudgil, D. (2014). Locust bean gum: Processing, properties and food applications—A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 66, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.017>
- Batu, A. (2005). Production of Liquid and White Solid Pekmez in Turkey. *Journal of Food Quality*, 28(5–6), 417–427. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4557.2005.00045.x>
- Brassescio, M. E., Brandão, T. R. S., Silva, C. L. M., & Pintado, M. (2021). Carob bean (*Ceratonia siliqua* L.): A new perspective for functional food. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 310–322. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.037>
- Ceylan, V., & Muştu, Ç. (2017). Development of Carob Flour Based Gluten Free Cookie Formulation. *Aydin Gastronomy*, 5(1), 1–12. [https://doi.org/10.17932/IAU.GASTRONOMY.2017.016/gastronomy\\_v05i1001](https://doi.org/10.17932/IAU.GASTRONOMY.2017.016/gastronomy_v05i1001)
- Chait, Y. A., Gunenc, A., Bendali, F., & Hosseinian, F. (2020). Simulated gastrointestinal digestion and in vitro colonic fermentation of carob polyphenols: Bioaccessibility and bioactivity. *LWT*, 117, 108623. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108623>
- Derazshamshir, M. (2017). *Development of Formulation of Pudding Containing Caseinomacropeptide*. Istanbul Technical University, Istanbul, TR.
- Donmez, A., Cikrikci Erunsal, S., & Sahin, S. N. (2022). Impact of locust bean gum / xanthan gum addition on new generation snack design from carob fruit byproducts. *Gıda*, 47(4), 690–704. <https://doi.org/10.15237/gida.GD22034>
- FAO (2021). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Average Carob Production 2013-2019. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/> Accessed on 01.06.2023.
- Ibrahim, R. M., Abdel-Salam, F. F., & Farahat, E. (2020). Utilization of Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Extract as Functional Ingredient in Some Confectionery Products. *Food and Nutrition Sciences*, 11(08), 757–772. <https://doi.org/10.4236/fns.2020.118054>
- Meilgaard, M. C., Civille, G. V., & Carr, B. T. (2006). *Sensory Evaluation Techniques*. Boca Raton, FL: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b1645>
- Memiş, E., & Tontul, İ. (2021). Optimization of spreadable carob cream formulation with mixture design. *Food and Health*, 7(2), 75–83. <https://doi.org/10.3153/fh21009>
- Nasar-Abbas, S. M., E-Huma, Z., Vu, T.-H., Khan, M. K., Esbenshade, H., & Jayasena, V. (2016). Carob Kibble: A Bioactive-Rich Food Ingredient. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 63–72. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12177>
- Ozbey, A. Oncul, N., Erdogan, K, Yildirim, Z. & Yildirim, M. (2013). Some Physical, Chemical and Microbiological Properties of Çalma Pekmez Produced in Tokat Region, Turkey. *Academic Food Journal*, 11(1), 46-52.
- Ozmen, D., Yıldırım, R.M., Bursa, K., Kian-pour, N., Toker, O.S., Palabiyik, I., Konar, N., & Yurt, B. (2023). Improvement of spreadability of grape molasses with induced crystallization for production of creamed molasses as a novel product. *International Journal of Gastronomy and Food Science*, 31, 100628. <https://doi.org/10.1016/j.ijgfs.2022.100628>
- Papaefstathiou, E., Agapiou, A., Giannopoulos, S., & Kokkinofita, R. (2018). Nutritional characterization of carobs and traditional carob products. *Food Science & Nutrition*, 6(8), 2151–2161. <https://doi.org/10.1002/fsn3.776>
- Peker, H. (2012). *Investigation of Production of Low Fat Yoghurt by Using Locust Bean Gum and Functional Fruit Yoghurt by Using Olive Leaf Extract*. Pamukkale University, Denizli, TR.
- Rodríguez-Solana, R., Romano, A., & Moreno-Rojas, J. M. (2021). Carob Pulp: A Nutritional and Functional By-Product Worldwide Spread in the Formulation of Different Food Products and Beverages. A Review. *Processes*, 9(7), 1146. <https://doi.org/10.3390/pr9071146>
- Sarıca, E., Filizkiran, G., Canbek, D., Ertürk, B., Coşkun, M., & Mustuloğlu, Ş. (2021). Effect of Locust Bean Gum Addition on Physicochemical and Sensory

- Characteristics of Kefir made from Goat Milk. *Akademik Gıda*, 19(1), 28–37. <https://doi.org/10.24323/akademik-gida.927653>
- Shiehzadeh, R. (2019). *The Effect of the Use of Carob Powder Butter and Olive Oil on the Physical Chemical and Rheological Properties of Spreadable Chocolate*. Ataturk University, Erzurum, TR.
- Stone, H., & Sidel, J. L. (Eds.). (2004). *Sensory Evaluation Practices. A Volume in Food Science and Technology* (3rd ed.). Redwood City, CA: Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-672690-9.X5000-8>
- Topaloglu, K. (2019). *Production of Gluten Free Cookie*. Bursa Uludag University, Bursa, TR.
- Tounsi, L., Karra, S., Kechaou, H., & Kechaou, N. (2017). Processing, physico-chemical and functional properties of carob molasses and powders. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(3), 1440–1448. <https://doi.org/10.1007/s11694-017-9523-4>
- Tounsi, L., Mkaouar, S., Bredai, S., & Kechaou, N. (2022). Valorization of carob by-product for producing an added value powder: characterization and incorporation into Halva formulation. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 16(5), 3957–3966. <https://doi.org/10.1007/s11694-022-01494-z>
- Valero-Muñoz, M., Martín-Fernández, B., Ballesteros, S., Lahera, V., & de las Heras, N. (2014). Carob Pod Insoluble Fiber Exerts Anti-Atherosclerotic Effects in Rabbits through Sirtuin-1 and Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Coactivator-1 $\alpha$ . *The Journal of Nutrition*, 144(9), 1378–1384. <https://doi.org/10.3945/jn.114.196113>





# The influence of anti-caking agents on powder flow properties of ready-to-drink coffee during storage

## Topaklanma önleyici maddelerin içime hazır kahvenin depolama sırasında toz akış özelliklerine etkisi

Duygu ASLAN TÜRKER<sup>1</sup>  Meryem GÖKSEL SARAÇ<sup>2</sup> , Mahmut DOĞAN<sup>3\*</sup> 

<sup>1,3</sup>Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Kayseri

<sup>2</sup>Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Sosyal Bilimler MYO, Aşçılık Bölümü, Sivas

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-9579-8347>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-8190-2406>; <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0003-1639-4641>

### To cite this article:

Aslan Türker, D., Göksel Saraç M. & Doğan, M. (2024). the influence of anti-caking agents on powder flow properties of ready-to-drink coffee during storage. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2): 258-266

DOI: 10.29050/harranziraat.1372394

### \*Address for Correspondence:

Mahmut DOĞAN

e-mail:

dogan@erciyes.edu.tr

### Received Date:

06.10.2023

### Accepted Date:

02.05.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ABSTRACT

Anti-caking agents are used in powder product formulations to prevent caking and to positively influence consumer preferences. In this study, ready-to-drink coffees, which are highly consumed were preferred and silicon dioxide (SiO<sub>2</sub>), maltodextrin (MD), glycerol monostearate (GMS), tricalcium phosphate (TCP) additives were added to the product formulations as anti-caking agents. Caking, cohesion and powder flow rate dependence (PFSD) tests were carried out on the 1st, 15th, 30th, 30th, 45th, 60th, 75th and 90th days and Scanned Electron Microscope (SEM) images were taken. In this way, the performances of anti-caking agents on instant coffee powder products during storage processes were determined. At the end of the study, it was determined that the powder flow properties of the anti-caking agents during the storage process were different. While the mean cake strength value of the control coffee sample was determined in the range of 93.90-159.63 g mm during the storage period, no caking was observed in the MD sample. The SEM imaging results of the samples are similar to the powder flow measurement values.

**Key Words:** Anti-caking agent, ready-to-drink coffee, powder flow, caking

### ÖZ

Topaklanma önleyici ajanlar toz ürün formülasyonlarında kekleşmeyi önleme ve tüketici tercihlerini olumlu yönde etkileme amaçlarıyla kullanılmaktadır. Bu çalışmada tüketimi oldukça fazla olan içime hazır toz kahve karışımları tercih edilmiş ve ürün formülasyonlarına silikon dioksit (SiO<sub>2</sub>), maltodekstrin (MD), gliserol monostearat (GMS), trikalsiyum fosfat (TCP) katkı maddeleri topaklanma önleyici ajanlar olarak eklenmiştir. Elde edilen toz karışım kahve çeşitleri ve kontrol grubu kahve örneğinin 1.,15.,30.,45.,60.,75 ve 90. günlerde kekleşme, kohezyon ve toz akış hızı bağımlılık (PFSD) testleri yapılmış ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri alınmıştır. Bu sayede topaklanma önleyici ajanların depolama süreçlerinde hazır toz kahve ürününde gösterdikleri performanslar tespit edilmiştir. Çalışma sonunda topaklanma önleyici ajanların depolama sürecinde gösterdiği toz akış özelliklerinin farklı olduğu belirlenmiştir. Kontrol kahve örneğinin depolama süresi boyunca ortalama kek gücü değeri 93.90-159.63 g mm aralığında belirlenirken MD örneğinde hiç kekleşme gözlenmemiştir. Örneklerim SEM görüntüleme sonuçları da toz akış ölçüm değerleri ile benzerlik göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Topaklanma önleyici ajan, hazır kahve, toz akış, kekleşme

## Introduction

In these days, many of the foods and ingredients on the market are supplied in powder form to facilitate handling and processing and to increase the stability of the ingredients (Fitzpatrick et al., 2005). The measurement of powder flow properties of foods is of great importance as it gives important clues about the behavior of powder during storage, transportation and processing. Powder flow characteristics are important in handling and processing operations such as flow from hoppers and silos, transport, mixing, compaction and packaging (Fitzpatrick et al., 2004). It has gain importance to know the properties of powders due to the increasing value of products, the complexity of processing unit operations and the formulations of new products (Zou et al., 2002).

The caking or agglomeration of free-flowing powder into lumps causes major problems in the processing of solid hygroscopic particulate materials. Therefore, it has been investigated for a long time to solve this problem (Adams et al., 1929; Bode et al., 2015). Caking in food powders is a common problem that can contribute to reduced product quality, functionality and shelf life (Descamps et al., 2013; Lipasek et al., 2012). It can occur during processing, transport or storage and therefore can be a problem for both production lines and consumers (Lipasek et al., 2012). In the case of caking in powder products, additional processing steps are often needed in which the powder is broken down before adding the raw material to silos or bunkers (Larsson, 2016). From the consumer's point of view, the formation of agglomerates and the reduced flowability of the powder can cause difficulties in emptying the jar of the powder products or the formation of lumps in the powdered food when emptying a bag with the powdered ingredients. Therefore, anti-caking agents are utilized to prevent consumer dissatisfaction and to increase the flowability and processing of powders. Anti-caking agents can function by one of several mechanisms. One of these mechanisms is to compete with host powder for moisture, the other is to create protective

barriers against moisture on the surface of hygroscopic particles or physical barriers between particles, another mechanism is to smooth surfaces to eliminate inter-particle friction; and to inhibit crystal growth, which is important in solid bridge formation (Lipasek et al., 2012).

Only a few publications are dealing with the effect of anti-caking agents on food powders (Akins, 2002; Nurhadi et al., 2017; Pui et al., 2020; Sharma et al., 2009), on the other hand, the comparison of anti-caking agents with each other and the effects of anti-caking agents on cohesion values and powder flow speed dependency values have not been addressed. It was hypothesized that the addition of anti-caking agents could prevent caking and improve powder flow properties of ready-to-drink coffees. Accordingly, the aims of the present paper were i) to investigate the influences of various anti-caking agents on the powder flow behavior and storage stability of instant coffees, ii) to classify and compare the effect of anti-caking agents, iii) to determine the best anti-caking agents to prevent caking and enhance flowing.

## Materials and Methods

### *Materials and chemicals*

Vegetable oil powder (78% fat), which is used as a material in the production of ready-to-use powdered coffee, is procured by Enka Sut A.S., (Konya, Türkiye) and skimmed milk powder was obtained from Pınar Sut Mamulleri San. Inc. (İzmir, Türkiye). Icing sugar and granulated coffee were purchased from local markets. Silicon dioxide (SiO<sub>2</sub> 100x, Tito, Turkey), maltodextrin (MD, Sigma Aldrich, USA), glycerol monostearate (GMS, Alfasol, Turkey) and tricalcium phosphate (TCP, Sigma Aldrich, USA) were used as anti-caking agents.

### *Methods*

#### *Preparation of instant coffee powders*

For preparing coffee samples 360 g skim milk powder, 100 g powdered sugar, 17 g vegetable oil powder, 80 g coffee and 4.40 g anticaking agent

were weighed and mixed, and stored at room temperature until analysis.

#### *Determination of the powder flow behaviors*

The flow properties of instant coffee powders were determined by testing the powder flow rate dependence (PFSD test), cohesion and caking (caking test) properties of the products using the Stable Micro System (TA-XT2 Plus, UK). For the analysis, a glass cylinder with a height of 120 mm, an inner diameter of 50 mm and a diameter of 48 mm was used. In addition, a special powder flow probe (Selective Laser Sintered DMLS Stainless Steel 316) with a height of 10 mm and moving in horizontal and vertical planes was used in the analysis. The degree of caking, PFSD and cohesion coefficient values were calculated with Texture Exponent 32 software.

#### *Scanned electron microscopy (SEM)*

Scanned Electron Microscope (SEM) (Tescan Mira3, Czech Republic) was used to identify the morphological structures of the instant coffee powders.

#### *Statistical analysis*

The ANOVA multiple comparison approach was used to determine statistical analysis of the study's data using the Minitab (Minitab Ltd., Coventry, England). To evaluate the difference between the means, the Tukey ANOVA test was utilized. The statistically significant difference is denoted by  $p < 0.05$ .

## **Results and Discussion**

### *Powder flow behaviors of instant coffee samples*

#### *Cohesion index values*

The cohesion index value provides information about the cohesiveness values of the samples. Cohesion is defined as the tendency of powdered food particles to come together and form larger powder areas (Merican et al., 2018). Flow models that vary depending on the cohesion index of the

samples are evaluated based on the flow property table of Benkovic and Bauman (2009). According to the table, if the cohesion index is 19, the flow is defined as hardened, extremely cohesive, while 16-19, 14-16, 11-14 and 11 are expressed as very cohesive, cohesive, easy flowing and free flowing respectively.

Cohesion index values increased in all ready-to-drink coffees samples during the storage process. The interesting thing is that the control coffee sample, without the addition of anti-caking agent, showed an easy flowing value at the beginning of the storage process, but at the end of the storage it moved to the extremely cohesive category and showed a much higher cohesion index value than the other samples. In this case, it can generally be said that the addition of anti-caking reduces the cohesion index value. In particular, the cohesion index values of the coffee sample with the addition of GMS anticaking agent were determined to be the lowest. On the other hand, although the rates of change during the storage process differed, the initial and final day cohesion index values of TCP and MD samples were found to be the same. During 15 days of storage, SiO<sub>2</sub>, GMS showed free flowing behavior, while all other samples were determined to be easy flowing. At the end of 90 days of storage, GMS sample showed cohesive behavior, while SiO<sub>2</sub>, MD and TCP samples showed very cohesive behavior (Figure 1).

In powder mixtures, all powder flow properties, especially the cohesion index value, vary with the materials added to the product formulation. In addition, various factors such as hygroscopicity, electrostatic activity, porosity, particle size and shape can also change the cohesion index value (Thomas et al., 2004). On the other hand, the addition of anticaking agent and variety change also effected the cohesion index values.

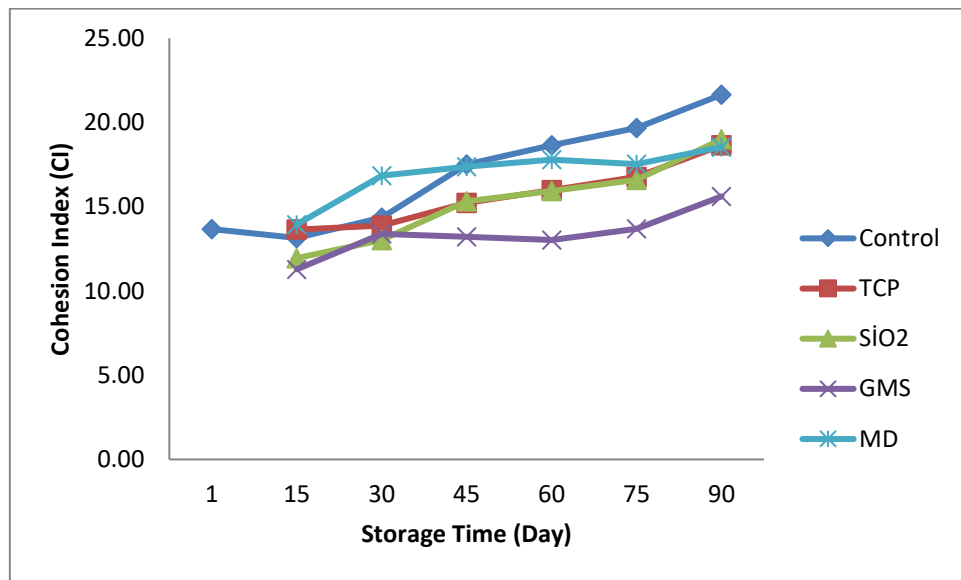


Figure 1. Cohesion index values of coffee samples during storage time  
SiO<sub>2</sub>: Silicon dioxide, MD: maltodextrin, GMS: glycerol monostearate, TCP: tricalcium phosphate

### Caking profiles

Due to their structure, powder products can come together and become lumps over time. This situation, which results in irregular collection and loss of properties, can be defined as caking (Mercan et al., 2018). Additionally, caking may have effects such as changing product properties and completely deteriorating the product in powder groups (Aguilera et al., 1995).

Caking problem is important in the storage period and packaging material selection of all powder products. Even the selection of the countries to which the manufactured products will be sent may vary due to the caking problem in powder product groups. Cake products are not preferred by consumers because they have lost their properties and are non-homogeneous powder mixtures. The mean cake strength values of instant coffee samples measured for this purpose are given in Table 1. When the table is examined, it is striking that the maltodextrin sample never formed cake during the storage period, and again, no cake was formed in the GMS sample during the 75<sup>th</sup> day of storage. On the other hand, there is a caking value in the control group coffee samples that increases during storage. In addition, although the addition of SiO<sub>2</sub> and TCP to coffee formulations significantly reduced the caking values, an increase in the caking values was observed in these samples during storage.

Anticaking agents bind more moisture to the product in powder mixtures, create a physical barrier within the product, eliminate friction or limit the interaction between powders, thus preventing the formation of caking (Barbosa-Cánovas et al., 2005). It is thought that the agents used in the study prevent caking by keeping the components in the coffee mixture separate.

### Powder speed flow dependence

The PFSD test expresses the flow stability of powder mixtures and how the powder changes during analysis (Jan et al., 2015). Compaction coefficient values of ready-to-drink coffee samples depending on increasing test speeds are shown in Figure 2. The 15<sup>th</sup> and 90<sup>th</sup> day values are shown graphically to serve as an example in storage time. As the compression rate increased, the compression coefficient of Control, GMS and MD samples decreased on the 15<sup>th</sup> day, while no significant change was observed in TCP and SiO<sub>2</sub> samples. On the 90<sup>th</sup> day, with increasing test speed, the compression coefficient values of GMS and MD samples decreased again, while TCP remained constant, control and SiO<sub>2</sub> showed a general increasing trend. Changes in compression coefficient values were detected in SiO<sub>2</sub> and control samples with increasing storage time.

Table 1. Mean cake strength (g mm) values of coffee samples

| Storage Day      | 1                        | 15                        | 30                        | 45                        | 60                        | 75                        | 90                        |
|------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Control          | 93.90±5.85 <sup>Ea</sup> | 116.03±3.57 <sup>Da</sup> | 122.49±2.37 <sup>Ca</sup> | 124.59±3.40 <sup>Ca</sup> | 153.46±2.54 <sup>Ba</sup> | 158.06±1.46 <sup>Aa</sup> | 159.63±0.18 <sup>Aa</sup> |
| TCP              | -                        | CAKE NOT FORMED           | 27.17±0.69 <sup>Cc</sup>  | 33.88±0.27 <sup>Bc</sup>  | 34.27±0.21 <sup>Bc</sup>  | 34.71±0.54 <sup>Bc</sup>  | 47.68±0.12 <sup>Ac</sup>  |
| SiO <sub>2</sub> | -                        | 36.15±2.21 <sup>Eb</sup>  | 38.44±1.21 <sup>Db</sup>  | 40.09±0.51 <sup>Cb</sup>  | 40.11±0.83 <sup>Cb</sup>  | 43.68±0.14 <sup>Bb</sup>  | 49.10±1.45 <sup>Ab</sup>  |
| GMS              | -                        | CAKE NOT FORMED           | CAKE NOT FORMED           | CAKE NOT FORMED           | CAKE NOT FORMED           | CAKE NOT FORMED           | 30.667±2.44 <sup>Ad</sup> |
| MD               | -                        | CAKE NOT FORMED           | CAKE NOT FORMED           | CAKE NOT FORMED           | CAKE NOT FORMED           | CAKE NOT FORMED           | CAKE NOT FORMED           |

Means followed by the same small letter in column and capital letter in row do not differ by Tukey's test ( $p > 0.05$ ). Data are mean values of triplicate samples  $\pm$  with standard deviation. SiO<sub>2</sub>: Silicon dioxide, MD: maltodextrin, GMS: glycerol monostearate, TCP: tricalcium phosphate

Table 2. Flow stability of coffee samples

| Storage Day            | 1                       | 15                      | 30                      | 45                      | 60                      | 75                      | 90                      |
|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>Control</b>         | 0.83±0.03 <sup>Ca</sup> | 0.90±0.04 <sup>Bc</sup> | 0.93±0.03 <sup>Bb</sup> | 0.99±0.03 <sup>Ab</sup> | 1.03±0.04 <sup>Aa</sup> | 0.98±0.04 <sup>Ab</sup> | 1.02±0.03 <sup>Aa</sup> |
| <b>TCP</b>             | -                       | 1.01±0.04 <sup>Ab</sup> | 0.98±0.04 <sup>Aa</sup> | 1.03±0.01 <sup>Ab</sup> | 0.98±0.02 <sup>Ab</sup> | 1.01±0.02 <sup>Ab</sup> | 1.00±0.02 <sup>Aa</sup> |
| <b>SiO<sub>2</sub></b> | -                       | 0.97±0.07 <sup>Bb</sup> | 1.00±0.02 <sup>Aa</sup> | 1.10±0.11 <sup>Aa</sup> | 1.04±0.03 <sup>Aa</sup> | 1.07±0.01 <sup>Aa</sup> | 1.03±0.06 <sup>Aa</sup> |
| <b>GMS</b>             | -                       | 0.88±0.07 <sup>Bd</sup> | 1.00±0.10 <sup>Aa</sup> | 1.01±0.10 <sup>Ab</sup> | 1.06±0.09 <sup>Aa</sup> | 0.98±0.01 <sup>Ab</sup> | 0.96±0.69 <sup>Ab</sup> |
| <b>MD</b>              | -                       | 1.10±0.10 <sup>Aa</sup> | 0.94±0.11 <sup>Bb</sup> | 0.98±0.04 <sup>Bb</sup> | 0.98±0.07 <sup>Bb</sup> | 0.98±0.04 <sup>Bb</sup> | 0.96±0.04 <sup>Bb</sup> |

Means followed by the same small letter in column and capital letter in row do not differ by Tukey's test ( $p > 0.05$ ). Data are mean values of triplicate samples  $\pm$  with standard deviation. SiO<sub>2</sub>: Silicon dioxide, MD: maltodextrin, GMS: glycerol monostearate, TCP: tricalcium phosphate

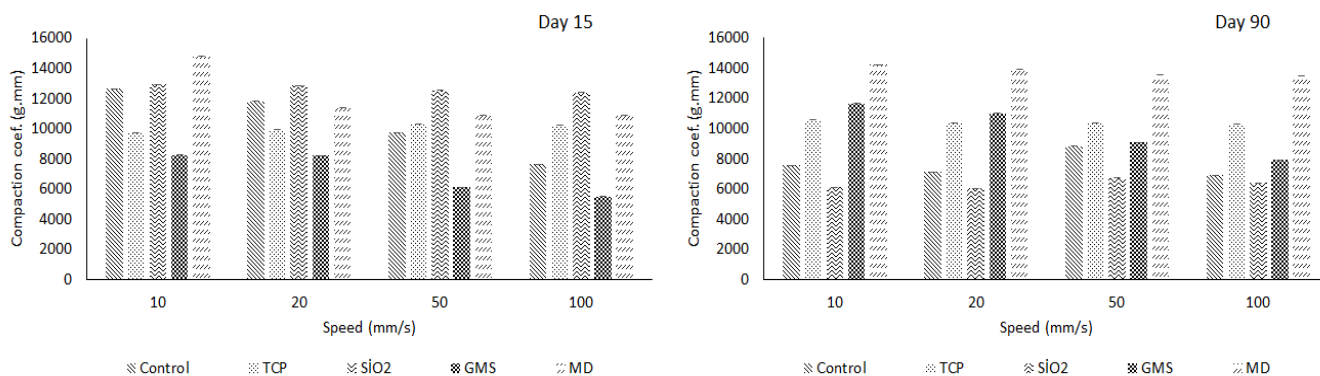


Figure 2. PFSD compaction coefficient trends of the powdered coffee samples

The flow stability of coffee samples is shown in Table 2. An increase in flow stability values was generally observed during the storage period of ready to drink coffee blends. However, flow stability values decreased in instant coffees with maltodextrin added. Especially in coffees that are referred to as control and do not contain any anti-caking agent, the flow stability values started with 0.83 and were determined as 1.02 at the end of storage. On the other hand, at the end of the storage period, the lowest flow stability value was determined as 0.96 in instant coffees with GMS and MD additions. Additionally, no difference could be detected in the stability values of control, TCP and SiO<sub>2</sub> added coffee samples as a result of storage ( $p > 0.05$ ). If the flow stability value is equal to 1, it is stated that the form of the powder product does not change. If it is less than or greater than 1, it is explained as the powder changing during the analysis (Benkovic and Bauman, 2009).

#### Scanned electron microscopy (SEM)

Figure 3 shows SEM images of instant coffee

mixtures. SEM images are evaluated to show the changes of powder samples during storage processes. SEM images were obtained after the 1<sup>st</sup> and 90<sup>th</sup> days of storage for coffee samples without any anti-caking agent, and after the 90<sup>th</sup> day of storage for coffee samples containing anti-caking agent. SEM images of the samples are shown at 100x and 500x magnification. As a result of the evaluation, 500x magnification images of the samples prepared with maltodextrin (MD) anti-caking agent show that there is no caking and the ingredients in the instant coffee mixture are present separately. Among the anti-caking agents, it can be said that MD is the best additive in instant coffee formulation.

Anti-caking agents prevent caking by different mechanisms such as water binding and barrier formation. For example, it is known that silicon dioxide coats the main product due to its small particle size and thus prevents caking (Nurhadi ve Roos, 2017). When the SEM images are examined, it is thought that anticaking agents surround the particles of the components in the coffee mixture and prevent them from coming together.

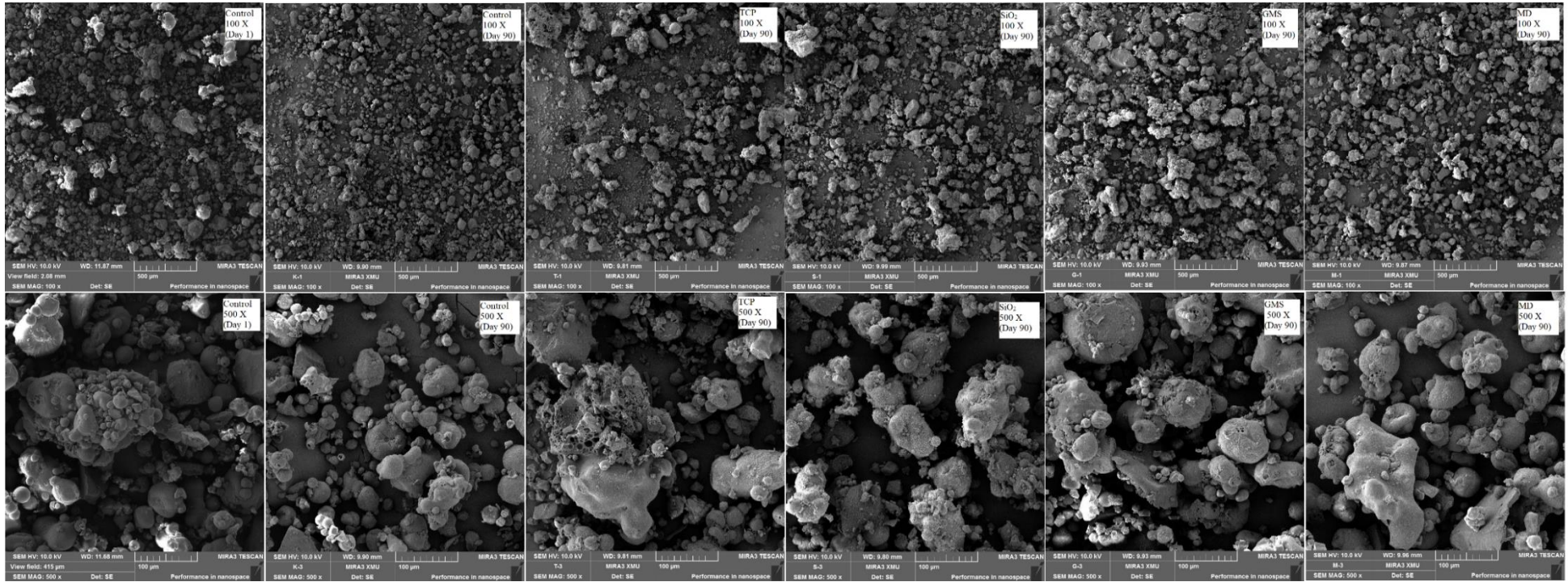


Figure 3. SEM images of coffee samples

## Conclusion

In this study, different anti-caking agents were added to ready-to-drink coffee samples and the changes in the powder product form during the storage period were determined by powder flow and SEM imaging. The problems of agglomeration and caking of powdered products effect the choice of packaging material, determination of storage processes and even determination of transfer routes for countries where they can be sent abroad. For this reason, the outputs of the study are considered important for ready-to-drink coffee samples that are consumed quite frequently. As a result of the study, it was determined that the caking values of the control coffee samples without any anti-caking agent increased during the storage process. On the other hand, it was determined that agents such as maltodextrin and glycerol monostearate did not cause caking and other additives used significantly reduced the caking values. In addition, SEM images were used to determine the agglomeration and caking of powders in the powder product and the visual results were similar to the powder flow values. It was observed that the anti-caking agents selected for the study were very effective during the storage period. It was observed that the anti-caking agents selected for the study were quite effective during the storage period. After this stage, new studies can be conducted with mixture forms to determine the synergistic effects of anti-caking agents, different anti-caking agents can be tried in the coffee sample, and the effects of the agents used within the scope of the study can be tested in different powder product groups to investigate their effects. Because of our study is a very new research in terms of literature, we believe that there is a need for a lot of new research in this field regarding powder product groups.

**Conflict of interest:** The authors declared no potential conflicts of interest regarding the publication of this article.

**Authors' Contribution:** Duygu ASLAN TÜRKER and Meryem GÖKSEL SARAÇ were responsible for selection of the research topic, conducting an experiment, data collection and analysis, writing and submitting the manuscript. Mahmut DOĞAN reviewed the manuscript.

## References

- Adams, J. R., & Merz, A. R. (1929). Hygroscopicity of fertilizer materials and mixtures. *Industrial & Engineering Chemistry*, 21(4), 305-307.
- Aguilera J, del Valle J, Karel, M. (1995). Caking phenomena in amorphous food powders. *Trends Food Science and Technology*, 6(5):149-155.
- Akins, M. L. (2002). *Effects of starch-based anti-caking agents on the functional properties of shredded mozzarella cheese*. Virginia Tech.
- Barbosa-Cánovas, G.V., Juliano, P., Ortega-Rivas, E., & Yan, H. (2005). *Food powders: Physical properties, processing, and functionality*, Springer-Verlag, New York, NY.
- Benkovic, M., & Bauman, I. (2009). Flow properties of commercial infant formula powders. *The World Academy of Science, Engineering and Technology*, 54(6), 495-499.
- Bode, A. A. C., Verschuren, M., Jansen, M., Jiang, S., Meijer, J. A. M., van Enckevort, W. J. P., & Vlieg, E. (2015). Influence of anticaking agents on the caking of sodium chloride at the powder and two-crystal scale. *Powder Technology*, 277, 262-267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2015.02.034>
- Descamps, N., Palzer, S., Roos, Y. H., & Fitzpatrick, J. J. (2013). Glass transition and flowability/caking behaviour of maltodextrin DE 21. *Journal of Food Engineering*, 119(4), 809-813.
- Fitzpatrick, J. J., & Ahrné, L. (2005). Food powder handling and processing: Industry problems, knowledge barriers and research opportunities. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 44(2), 209-214.
- Fitzpatrick, J. J., Barringer, S. A., & Iqbal, T. (2004). Flow property measurement of food powders and sensitivity of Jenike's hopper design methodology to the measured values. *Journal of Food Engineering*, 61(3), 399-405. doi: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(03\)00147-X](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(03)00147-X)
- Jan, S., Rafiq, S.I., & Saxena, D., (2015) Effect of physical properties on flow ability of commercial rice flour/powder for effective bulk handling. International Conference on Advancements in Engineering and Technology (ICAET)
- Larsson, A. (2016). *Evaluation of Natural Anti-caking Agents in Spices and Spice Blends For a Consumer-friendly Labeling of Spice Products*.
- Lipasek, R. A., Ortiz, J. C., Taylor, L. S., & Mauer, L. J. (2012). Effects of anticaking agents and storage conditions on



- the moisture sorption, caking, and flowability of deliquescent ingredients. *Food Research International*, 45(1), 369-380.
- Mercan, E., Sert, D., & Akin, N. (2018). Determination of powder flow properties of skim milk powder produced from high-pressure homogenization treated milk concentrates during storage. *LWT* 97:279–288.
- Nurhadi, B., & Roos, Y. H. (2017). Influence of anti-caking agent on the water sorption isotherm and flow-ability properties of vacuum dried honey powder. *Journal of Food Engineering*, 210, 76-82.
- Pui, L. P., Karim, R., Yusof, Y. A., Wong, C. W., & Ghazali, H. M. (2020). Anti-caking Agent Effects on the Properties of Spray-dried'Cempedak'Fruit Powder. *Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science*, 43(4).
- Sharma, S., Kaushal, B., & Sharma, P. (2009). Effect of cation exchange resin treatment and addition of anti-caking agent on nonenzymaticbrowning of lemon juice powder during storage. *Journal of Food Ecience and Technology*, 48(3): 296–304.
- Thomas, M. E., Scher, J., Desobry-Banon, S., & Desobry, S. (2004). Milk powders ageing: effect on physical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44(5), 297-322
- Zou, Y., & Brusewitz, G. H. (2002). Flowability of uncompacted marigold powder as affected by moisture content. *Journal of Food Engineering*, 55(2), 165-171. doi: [https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(02\)00060-2](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(02)00060-2).



# Physicochemical and sensory properties of vegetarian pasta produced with pea (*Pisum sativum*) protein powder

## Bezelye (*Pisum sativum*) protein tozu ile üretilen vejetaryen makarnanın fizikokimyasal ve duyuşal özellikleri

Sena Nur DOĞAN<sup>1</sup> , İlkay YILMAZ<sup>2\*</sup> 

<sup>1,2</sup>Baskent University, Faculty of Fine Arts, Design and Architecture, Department of Gastronomy and Culinary Arts, 06790, Ankara, Turkey

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-6413-8944>; <sup>2</sup><https://orcid.org/>

### To cite this article:

Doğan, S. N. & Doğan, S. (2024). Physicochemical and sensory properties of vegetarian pasta produced with pea (*Pisum sativum*) protein powder. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2):267-279

DOI: 10.29050/harranziraat.1382823

### \*Address for Correspondence:

İlkay YILMAZ

e-mail:

ilkayyilmaz@baskent.edu.tr

### Received Date:

29.10.2023

### Accepted Date:

18.03.2024

© Copyright 2018 by Harran University  
Faculty of Agriculture. Available on-line  
at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ABSTRACT

Dry legumes are frequently preferred as a protein source in plant-based diets. In this study, the production of "pea pasta" with the addition of pea protein powder was aimed. Moisture, ash, protein, weight loss, volume, and cooking time characteristics of the pasta were examined. Additionally, the sensory properties of the produced pea pasta and its effect on individuals' satiety were investigated, and the results were evaluated. In all sensory analyses, the pasta sample containing 10% pea protein powder was the most preferred among 8 different criteria. It was observed that the satiety lasted longer when consumers consumed pasta containing 10% pea protein powder compared to the control pasta consumption.

**Key Words:** Vegetarian pasta, pea protein powder, cooking properties, sensory evaluation

### ÖZ

Kuru baklagiller bitkisel bazlı beslenmede protein kaynağı olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Bu çalışmada bezelye protein tozu ilavesiyle "bezelye makarnası" üretimi amaçlanmıştır. Örneklerde nem, kül, protein tayini ile ağırlık kaybı, hacim, pişme süresi özellikleri incelenmiştir. Ayrıca üretilen bezelyeli makarnanın duyuşal özellikleri ve bireylerin tokluk hissine etkisi de araştırılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm duyuşal analizlerde %10 bezelye protein tozu içeren makarna örneği 8 farklı kriter arasından en beğenilen çeşit olmuştur. Tüketicilerin %10 bezelye protein tozu içeren makarna tüketimlerinin kontrol makarna tüketimi ile karşılaştırılmasında tokluk hislerinin daha uzun sürdüğü görülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Vejetaryen makarna, bezelye protein tozu, pişme özellikleri, duyuşal değerlendirme

### Introduction

The prevalence of chronic diseases is increasing worldwide and can lead to many deaths. The quality of life of individuals is affected by the difficulty of health care costs and access to healthy food. "Obesity" (Body mass index [BMI]  $\geq$  30) and "overweight" (BMI 25-29.9) represent abnormal or excessive fat accumulation that can

have a negative impact on health. There are many diets for the treatment of obesity. There is ample evidence from prospective cohort studies to support plant-based diets in preventing obesity and chronic diseases. (Gibbs and Cappuccio, 2022) A recent randomized controlled trial found that a low-fat vegan diet increased *Faecalibacterium prausnitzii* and decreased

*Bacteroides fragilis*, which was associated with greater body weight, fat mass, loss of visceral fat, and increased insulin sensitivity (Ahmad, 2022). Plant-based nutrition reduces total cholesterol and LDL levels and reduces fasting blood sugar, fasting insulin and insulin resistance levels. This nutritional style can be used in the treatment of some diseases, especially obesity (Ivanova et. al., 2021).

Protein is one of the essential nutrients for the human body and its benefits for weight management, satiety, muscle and skeletal development have been recognized for a long time (Ahnen et al., 2019). Protein sources are classified in two ways as plant and animal. Today, animal products are considered the main protein source. However, because of the increasing world population and the inability of every individual to have access to animal-derived protein, the Advisory Board for Dietary Guidelines recommended increasing vegetable protein consumption (Pasiakos and Lieberman, 2015). The plant-based diet, includes less meat and meat products consumption, which includes ecological concerns such as a sustainable life and supporting the global climate crisis, in addition to the desire of individuals to be healthy (Courty, et al., 2015).

Legumes, oil seeds and whole grains are good sources of vegetable protein thanks to their high protein content (Pasiakos and Lieberman, 2015). Food legumes are products of the *Leguminosae* family also called *Fabaceae*. They are grown mainly for their edible seeds and therefore are also called cereal pulses (Iqbal et al., 2006). The *Leguminosae* family contains three orders within itself. Of these orders, *Phaseolales*, beans, and cowpea; *Viciales*, lentils, peas and chickpeas; *Hedysarales* are the orders that include peanuts (Gökhisar, 2018). Beans, peas, soybeans, broad beans, black-eyed peas, etc. from legumes constitute a very important trade area in the world, especially in Latin America and Asia (Ertas, 2013). In Turkey, the production share of legumes progresses as chickpeas, lentils, beans, broad beans and peas, respectively (Yılmaz and Şen, 2021).

Peas (*Pisum sativum* L.), has been cultivated since ancient times. Its homeland is Western Asia and Europe. When the nutritional elements of peas are examined, 70-80% of fresh peas consist of water, 6-8% protein and 12-15% carbohydrates. Dried peas consist of 6-16% water, 18-20% protein, and 20-60% carbohydrates (USDA, 2022). Pea protein contains 9 essential amino acids that are essential for the human body. In addition, it also contains leucine, isoleucine and valine, which we call branched-chain amino acids, which support muscle growth (Tömösközi, et al., 2001). It has been found to be rich in various vitamins and minerals such as P, Ca, Mg, Fe, K (USDA, 2022). Peas, on the other hand, have not been adequately evaluated in the production of gluten-free, vegetarian, vegetable protein foods, the sector expanding daily.

In this context, thanks to the functional properties and high nutritional value of peas, it is thought that developing a product that can be consumed by everyone in the society by using pea protein concentrate and isolate in the food industry. Peas contain very important nutrients in terms of nutrition. In addition to being one of the best plant-based protein sources, it helps individuals stay full for longer with its high fiber content (Temiz and Yeşilsu, 2006). According to USDA data, 100 grams of cooked green peas contains; 134 kcal, 6.3 g protein, 14.4 g carbohydrate, 0 g cholesterol, 0.4 g fat, 2 g dietary fiber, 116 mg phosphorus, 26 mg calcium, 1.9 mg iron, 2 mg sodium, 316 mg potassium, 35 mg magnesium, 0.7 mg Vitamin A, 0.35 mg vitamin B1, 0.14 mg vitamin B2, 35.5 mg folic acid, 27 mg vitamin C, 2.1 mg vitamin E (USDA, 2022).

Foods high in protein increase the levels of certain hormones in the human body that reduce appetite. These hormones are glucagon-like peptide-1 (GLP-1), cholecystokinin (CCK) and peptide YY (PYY). Protein and fiber slow down digestion and increase the feeling of satiety (Wilde and Nakkoul, 2009).

Different products such as pea protein concentrate, pea protein isolate pea and flour can

be obtained from pea grains. Among these products, especially pea protein isolate and concentrate have a better nutritional quality than other forms of consumption of peas and are a good source of vegetable protein. Pea protein isolate typically contains around 80-85% protein content. Pea protein concentrate usually has a slightly lower protein content, ranging from 60-80%, depending on the processing method and specific product (Shanthakumar et al., 2022). Thanks to its protein content, it can be used as a method of enriching foods in terms of protein (Lam et al., 2016)

The flour substituted with pea protein isolate had a good bread making potential compared to the unsubstituted flour. Protein content was increased by more than 20% with pea protein isolate, the specific volume of bread samples with high protein content increased more than the others (Marchais et al., 2011).

Gluten-free rice pastas and pasta samples containing different legume flours were prepared and examined by adding different proportions of pea, chickpea and red lentil flour to rice flour. Sensory analysis of the surface, chewing, mouthfeel and taste properties of the pastas was performed. It was concluded that the legume flour added pasta samples were acceptable according to the sensory analysis results and the most popular legume flour added pasta in terms of taste was the lentil flour added pasta (Hosta, 2012).

This study aimed to prepare pasta samples with pea protein powder (PPP) that have high nutritional value and will increase the satiety of consumers. Therefore, this study aims to evaluate the physicochemical properties and quality characteristics of pasta after adding pea protein powder as a flour substitute.

## **Material and methods**

### **Materials**

In the production of pasta with added pea protein powder, semolina flour made from durum wheat, ground twice, and 100% natural pea protein powder from Saffoods Food

Industry Co. Ltd. have been utilized. Both flours have been stored in a cool and sealed area until use. Additionally, eggs, drinking water, and table salt used in pasta production were sourced from local markets. Pasta production trials and physical as well as sensory analyses were conducted in the culinary workshops of the Department of Gastronomy and Culinary Arts at Başkent University during the study. Moisture, ash, and protein analyses were carried out by Ayşenur & Turan Food Control Laboratory Inc.

## **Method**

### *Pasta preparation*

Preliminary trials were conducted initially for pasta production. In these preliminary trials, pasta was produced using semolina flour. However, the resulting pasta was not preferred due to its granular appearance in terms of texture. Following the failure of the initial trial, the liquid source was changed to increase the protein content of the pasta. However, this change in the liquid source led to increased stickiness, an undesirable characteristic of the pasta dough, resulting in another unsuccessful trial. In the final trial, semolina flour was replaced with semolina flour made from double-milled durum wheat. It was decided to use only water as the liquid source, and the pasta was produced again using traditional methods. In the conducted trials, pea protein powder was added to the pasta at rates of 0%, 10%, 20%, and 30%, and the desired texture was achieved. In the study, which received ethical approval from the Institutional Review Board with the number E-62310886-302.14.05-97460, after passing through three trial stages, the selected pasta sample was presented to the panelists for their evaluation.

The formulation utilized in pasta production is outlined in Table 1. Pea protein powder (PPP) was incorporated into the pasta formulations at rates of 0% (PPP-0), 10% (PPP-

10), 20% (PPP-20), and 30% (PPP-30) (Table 1), while semolina flour was removed at corresponding rates. The doughs were then mixed for 10 minutes. To prevent the dough from drying out, it was divided into portions, covered with cling film, and allowed to rest for 30 minutes. Subsequently, the rested pasta dough was rolled out to the desired thinness using a rolling pin until it could pass through a

pasta machine (Marcato In the Ampia 180, Italy). The dough was then passed through the machine twice at the 0 setting and twice at the 3 setting, and shaped into linguine. The shaped pasta was left to dry in sunlight for 24 hours. Pasta dries in 18-24 hours on average. In order to understand that the pasta was dried as desired, the breaking process was carried out (Ficco et al., 2016).

Table 1. Composition of pasta and amount of pea protein powder added to pasta

| Raw materials (g)      | Control(0%PPP) | 10% PPP | 20% PPP | 30% PPP |
|------------------------|----------------|---------|---------|---------|
| Semolina Flour (g)     | 174            | 156.6   | 139.2   | 121.8   |
| Pea Protein Powder (g) | 0              | 17.4    | 34.8    | 52.2    |
| Water (g)              | 60             | 60      | 60      | 60      |
| Egg (g)                | 50             | 50      | 50      | 50      |
| Salt (g)               | 5              | 5       | 5       | 5       |
| Totals                 | 289            | 289     | 289     | 289     |

### Chemical analysis

The Moisture content was analyzed according to the AOAC 977.21:2012 method. The Kjeldahl method was used to analyze the total protein (AOAC 920.176:2012). The color properties were estimated with the tristimulus spectrophotometry method, with CIELAB coordinates ( $L^*a^*b^*$ ) in a Konica Minolta CR-400 series equipment where the  $L^*$  parameter indicates luminosity, the  $a^*$  axis shows the variation from red ( $+a^*$ ) to green ( $-a^*$ ) and the  $b^*$  axis shows the variation from yellow ( $+b^*$ ) to blue ( $-b^*$ ).

### Cooking analysis

#### Cooking time

Optimum cooking time of pasta samples were determined by the method applied by Köksel, et al., (2000). 25 g of pasta sample was added into the 200 mL distilled water and brought to the boiling point, and a piece of pasta was taken out every 1 minute and placed between two glass slides. This process was repeated until no white particles remained in the pasta between the slides.

Minutes were measured with a stopwatch. The time elapsed from placing the pasta samples in boiling water to the disappearance

of the white-colored particles was recorded as the optimum cooking time (Köksel, et al., 2000).

#### Volume increase

For volume expansion analysis, each pasta sample was cooked, drained, and then placed in a 100 ml graduated cylinder containing 50 ml of distilled water. Subsequently, the volume changes caused by the sample in the water were noted. The same procedure was repeated for dry pasta samples, and the amount of water displaced was recorded. The difference between these measurements was noted, and the volume expansion was calculated as a percentage (%), following the equation provided by Demir (2008). These procedures were repeated twice, and the averages were recorded. The equation used for volume expansion is provided below.

$$\% \text{ Volume increase} = \frac{(V2 - V1) \times 100}{V1}$$

V1: Cooked pasta volume (ml)

V2: Raw pasta volume (ml)

#### Weight increase (Water absorption)

Dry weight measurements of 25 g were taken for each pasta sample before starting the analysis. Then, 25 g of sample samples were cooked in beakers filled with 200 ml of distilled water. The cooked pasta was filtered in a porcelain sieve for 5 minutes.

The weight of the filtered pasta was measured with the help of precision scales. The weight gains of the pasta were calculated by determining the differences between the weighing before and after cooking. The equation used for weight gain is given below (Lai, 2001).

$$\% \text{ Weight gain} = \frac{(G2 - G1) \times 100}{G1}$$

G1: weight of cooked pasta

G2: Weight of raw pasta

### *Sensory analysis*

The research consists of two parts. In the first part of the research, the sample consists of 12 trained panellists. In the second part of the study, the sample consists of 10 participants, 6 female and 4 males, who received nutrition counseling services.

The sensory analysis was determined through a sensory profile by multidimensional approximation. 12 trained panelists were between 20 and 50 years old. As a sensory analysis scale, the characteristics of the panel to be applied were determined concerning the book "Sensory Evaluation in Food" by Altuğ-Onoğur and Elmacı (Altuğ-Onoğur and Elmacı, 2015). A random three-digit code was given to each pasta group and sample plates were presented to the panelists in random order. During the tasting of the pasta samples, they were asked to drink water after the evaluation of each pasta. Cooked Pasta was evaluated for seven properties: color, surface texture, odor, chewiness, taste, appearance, and general taste. The evaluation in the prepared tasting form is based on a 5-point Likert scale with a hedonic scale of 1-5 (5 points: Very good, 4 Points: Good, 3 Points: Acceptable, 2 Points: Not Sufficient, 1 Point: Bad). While preparing

the pasta samples for analysis, 100 g sample was cooked in 500 mL water for 10 minutes and the excess water was filtered for 20 seconds (Köten and Ünsal, 2022).

Ten different individuals with similar health backgrounds who received nutrition counseling services had the most acceptable pasta sample added to their diet lists. In the diet plans of these individuals, with pasta being the only variable, the rest of the day's nutrition programs were kept identical, considering macronutrients and physical activities. Individuals receiving dietary counseling were asked to consume both the control pasta and the pasta with added pea protein powder, and then to note the duration of satiety they experienced throughout the day.

### *Statistical analysis*

Statistical analysis of all data obtained from the analysis was made. Analyzes were carried out using the statistical package program (SPSS). Standard deviation and mean among descriptive statistics were used in the analyses. Kruskal Wallis test was applied to the data that did not fit the normal distribution. Bonferroni Post Hoc test was used to test the difference between the groups and it was accepted as significant ( $p < 0.05$ ).

## **Results and Discussion**

### *Chemical composition and physicochemical properties of pasta*

According to the analysis results, the ash value of the control (0%) pasta sample is  $2.73\% \pm 0.49\%$ , the 10% PPP added pasta sample is  $3.11\% \pm 0.56$ , and the 20% PPP added pasta sample is  $2.58 \pm 0.46\%$ . It was determined that the pasta sample with 30% PPP addition had an ash value of  $3.74\% \pm 0.67\%$ . It is observed that ash values increase as PPP addition in foods increases, except for pasta with 20% PPP addition. Since PPP is richer in vitamins, minerals and protein, the ash value is expected to be higher than the control (0%) (Pınarlı et al., 2004). In a study in which sensory analysis

was performed by adding wheat germ to pasta samples, it was observed that as the amount of wheat germ, which is considered rich in fiber, increased, the amount of ash in pasta increased (Pınarlı et al., 2004). It is observed that the ash value increases as the amount of

carob flour, which has high vitamin and mineral value, increases in the pastas for which chemical analyzes were made by adding carob flour in different proportions, showing results consistent with our study (Yılmaz and Şen, 2021).

Table 2: Results of moisture, ash and protein content of pasta samples (%)

| Pasta Samples | Moisture Analysis (%)  | Ash Analysis (%)       | Protein Analysis (%)    |
|---------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| PPP-0         | 9.77±0.39 <sup>a</sup> | 2.73±0.49 <sup>c</sup> | 15.92±1.75 <sup>d</sup> |
| PPP-10        | 9.27±0.37 <sup>c</sup> | 3.11±0.56 <sup>b</sup> | 20.51±2.26 <sup>c</sup> |
| PPP-20        | 9.13±0.37 <sup>d</sup> | 2.58±0.46 <sup>d</sup> | 24.72±2.72 <sup>b</sup> |
| PPP-30        | 9.53±0.38 <sup>b</sup> | 3.74±0.67 <sup>a</sup> | 29.59±3.25 <sup>a</sup> |

-Parameters are given on the dry matter. Protein calculated with a factor of 5.75

-Means ± standard deviations that do not share the same subscript in the same column are significantly different from each other (p < 0.05).

According to Table 2, it is observed that as the PPP addition in foods increases, the moisture content decreases compared to the control pasta. From this result, it can be said that PPP-added pasta is more resistant to negative conditions such as mold and toxin formation compared to the control (0%) pasta sample. In the studies examined in the literature, the moisture holding ability decreases as the protein content increases (Yılmaz and Şen, 2021).

The protein powder used contained 85 grams of protein per 100 grams and semolina contained 11,5 grams of protein per 100 grams. As a result of the analysis, the protein content of 15.92 ± 1.75% in the control (0%), 20.51% ± 2.26% for pasta with 10% PPP added, 24.72 ± 2.72 % for pasta with 20% PPP added, for the pasta sample with 30% PPP addition, it was recorded as 29.59% ± 3.25%. It was determined that the protein values of the pasta increased as the PPP addition increased. As can be seen from the ash and protein analysis, pasta with PPP is richer in terms of nutrients and protein (Messia et al., 2021). This result positively affects the fact that pasta, which is one of the aims of the study, increases the protein and fiber ratio and provides a greater feeling of satiety. In a study where pasta production was carried out with the addition of

broad bean flour, it was observed that the ash and protein ratio in the pasta increased as the bean ratio increased (Jayesena and Nasar -Abbas, 2011).

#### *Physical properties*

##### *Cooking properties*

Cooking time analyzes of control and pasta with pea protein powder are given in Table 3. The cooking time of pasta is one of the factors that determine the quality of pasta. The fact that the pasta is cooked in a short time is a feature that increases the liking and acceptance of the consumer (Gull, Prasad, & Kumar, 2015). While the pasta sample with 0% pea protein powder was cooked for 8 minutes, it was observed that the pasta with 10% PPP was cooked in 9 minutes, and the pasta samples with 20% and 30% PPP added in the 11th minute were cooked and no starch particles remained when compressed between two slides. As can be seen, greater the pea protein powder increases, the longer the cooking time in pasta samples. One reason may be that there is more protein surrounding the starch (Yang et al., 2018).

In studies investigating the effects of protein on starch hydrolysis, it has been

observed that protein can intervene in nutritional properties and facilitate the

malabsorption of starch by blocking enzyme binding sites (Oates, 1997).

Table 3. Cooking analysis results

|        | Cooking Time (Seconds)  | Weight increase %        | Volume increase %        |
|--------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| PPP-0  | 513± 1.43 <sup>d</sup>  | 211.00±1.00 <sup>c</sup> | 280.67±0.58 <sup>c</sup> |
| PPP-10 | 547 ± 1.44 <sup>c</sup> | 193.00±2.65 <sup>d</sup> | 454.67±1.15 <sup>a</sup> |
| PPP-20 | 600 ± 0.00 <sup>b</sup> | 307.33±1.15 <sup>a</sup> | 372.00±1.73 <sup>b</sup> |
| PPP-30 | 633 ± 1.43 <sup>a</sup> | 226.00±3.46 <sup>b</sup> | 180.00±8.66 <sup>d</sup> |

Parameters are given means ± standard deviations

Means ± standard deviations that do not share the same subscript in the same column are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).

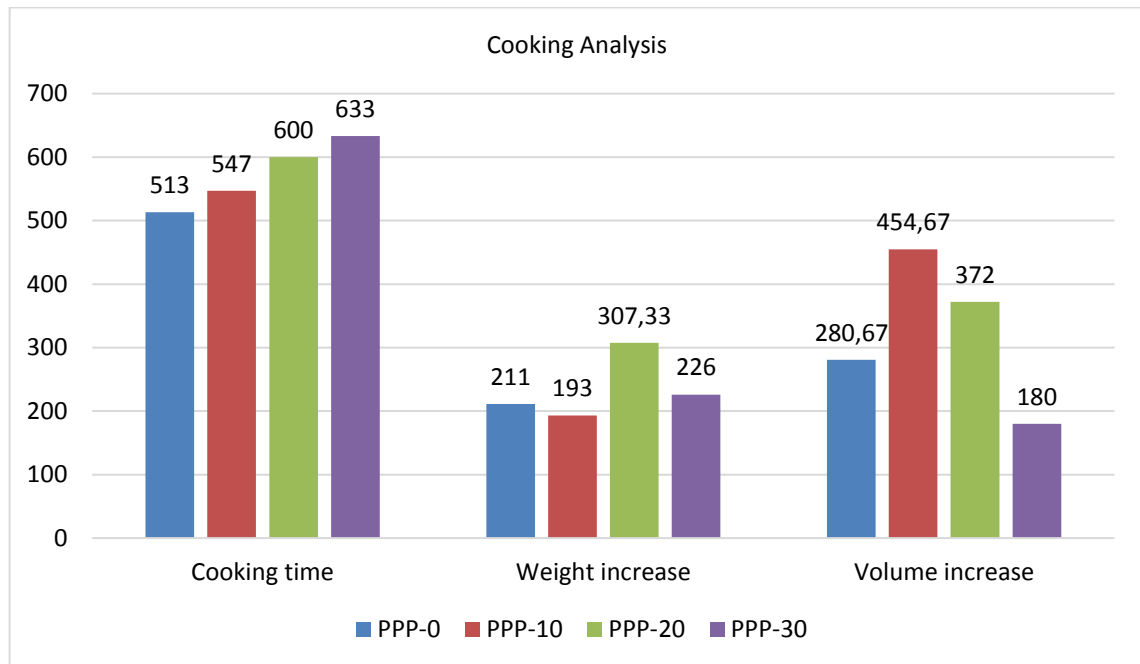


Figure 1. Cooking analysis results

In studies conducted to determine the contribution of pulse flour to weight gain in the literature, Giuberti, Gallo, Cerioli, Fortunati and Masoero (2015) found that the optimum cooking time increased as the amount of white bean flour increased in the pasta formulations they developed by adding 10%, 20% and 40% white bean flour.

In weight gain, 211 ± 1.00 weight gain was observed in the control sample containing 0% PPP, 193 ± 2.65 in the pasta sample containing 10% PPP, 307.33 ± 1.15 in the pasta sample containing 20% PPP, and 226 ± 3.46 in the pasta sample containing 30% PPP.

The means were found statistically significantly different from each other,  $X^2 = 10.458$ ,  $p < 0.05$ . Pairwise comparisons indicate that the only significant difference was found

between the pasta sample containing 10% PPP and 20% PPP. In line with these results, it was determined that the maximum increase in weight was in the pasta sample containing 20% PPP. As a result of the exposure of the pasta to the cooking process, it is expected that the mass and volume increase of the pasta samples will be high. Mass a low increase indicates a weak water binding capacity. Poor water binding capacity causes an increase in hardness, which is an undesirable feature in pasta.

When the volume increase analysis results of the prepared samples were examined, a volume increases of 280.67 ± 0.58 was observed in the control pasta, an increase of 454.67 ± 1.15 in the pasta with 10% PPP, and 372 ± 1.73 in the pasta sample with 20% PPP.



Also, an increase of  $180 \pm 8.66$  was observed in pasta with 30% PPP. The means of the volume increases were found statistically significantly different from each other,  $\chi^2 = 10.583$ ,  $p < 0.05$ . Pairwise comparisons indicate that the pasta sample with 30% PPP has significantly lower volume increase compared to 10% PPP. In 3 samples with PPP addition, it was

observed that the pasta sample with the lowest volume increase compared to the control pasta was the pasta with 30% PPP. The reason for this may be the decrease in water absorption capacity due to the increased protein content. Table 4 shows the color analysis results of pasta samples.

Table 4: Color analysis results of pasta samples

| Pasta Samples | $L^*$              | $a^*$             | $b^*$              |
|---------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| PPP-0         | $68.39 \pm 0.20^a$ | $5.72 \pm 0.87^a$ | $20.96 \pm 0.10^a$ |
| PPP-10        | $57.87 \pm 1.57^b$ | $5.37 \pm 0.18^b$ | $15.22 \pm 0.08^b$ |
| PPP-20        | $55.11 \pm 0.10^c$ | $5.12 \pm 0.03^c$ | $15.25 \pm 0.07$   |
| PPP-30        | $52.49 \pm 0.70^d$ | $5.07 \pm 0.03^c$ | $10.53 \pm 0.02^c$ |

Parameters are given means  $\pm$  standard deviations

Means  $\pm$  standard deviations that do not share the same subscript in the same column are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).

When the results in Table 4 are evaluated, it is seen that the colour criteria change as the protein ratio increases.

#### Sensory analysis

When the findings given in Table 5 are examined, it is seen that the criteria that the panelists gave the highest score regarding 0% PPP as expected. And then 10% PPP added pasta was color with a mean score of  $4.58 \pm 0.51$ , followed by an appearance with a mean score of  $4.25 \pm 0.75$  and appearance with a mean score of  $4.17 \pm$ . It is followed by stickiness with an average score of 0.72. The criteria that the panelists gave the lowest score for pasta with 10% PPP added were smell with an average score of  $3.42 \pm 1.08$ , surface

texture with an average score of  $3.58 \pm 0.79$ , and taste with an average score of  $3.83 \pm 0.72$ . is seen. According to the results, pasta with 10% PPP added was mostly liked in terms of all criteria. While it was seen that the criterion that the panelists gave the highest score for pasta with 20% PPP added was stickiness with a mean score of  $4.08 \pm 0.90$ , it was followed by a general liking with a mean score of  $4.00 \pm 0.60$ , and a mean score of  $3.83 \pm 0.83$ , respectively. For color, the highest value was obtained in 10% PPP sample with  $4.58 \pm 0.51$ , while the color decreased as the pea flour ratio in the samples increased and the smallest value in this sense was obtained from 30% PPP sample with  $2.83 \pm 0.72$ .

Table 5: Sensory analysis results of pasta samples

| Criteria        | 0% PPP                  | 10% PPP                | 20% PPP                | 30% PPP                | p    |
|-----------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------|
| Color           | 4.88±0.41 <sup>ab</sup> | 4.58±0.51 <sup>a</sup> | 3.83±0.83 <sup>c</sup> | 2.83±0.72 <sup>e</sup> | .000 |
| Surface Texture | 4.28±0.90 <sup>e</sup>  | 3.58±0.79 <sup>b</sup> | 3.17±1.03 <sup>h</sup> | 2.50±0.67 <sup>b</sup> | .000 |
| Smell           | 4.40±0.80 <sup>d</sup>  | 3.42±1.08 <sup>h</sup> | 3.50±0.80 <sup>f</sup> | 2.92±0.67 <sup>c</sup> | .000 |
| Chewability     | 4.92±0.52 <sup>a</sup>  | 3.92±0.90 <sup>e</sup> | 3.75±0.75 <sup>d</sup> | 3.17±0.72 <sup>b</sup> | .000 |
| Stickiness      | 4.56±0.82 <sup>c</sup>  | 4.17±0.72 <sup>c</sup> | 4.08±0.90 <sup>a</sup> | 3.50±0.80 <sup>a</sup> | .000 |
| Flavor          | 4.83±0.24 <sup>b</sup>  | 3.83±0.72 <sup>f</sup> | 3.58±0.79 <sup>e</sup> | 2.67±0.65 <sup>f</sup> | .000 |
| Appearance      | 4.55±0.13 <sup>c</sup>  | 4.25±0.75 <sup>b</sup> | 3.25±0.75 <sup>b</sup> | 2.92±0.79 <sup>d</sup> | .000 |
| General Liking  | 4.85±0.57 <sup>b</sup>  | 4.08±0.67 <sup>d</sup> | 4.00±0.60 <sup>b</sup> | 2.83±0.72 <sup>e</sup> | .000 |

Parameters are given means ± standard deviations

Means ± standard deviations that do not share the same subscript in the same line are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).

The criteria that the panelists gave the lowest score for pasta with 30% PPP were color, surface texture, smell, chewability, stickiness, flavor and appearance.

In accordance with the table, an increase in the protein content has a negative effect on the sensory properties.

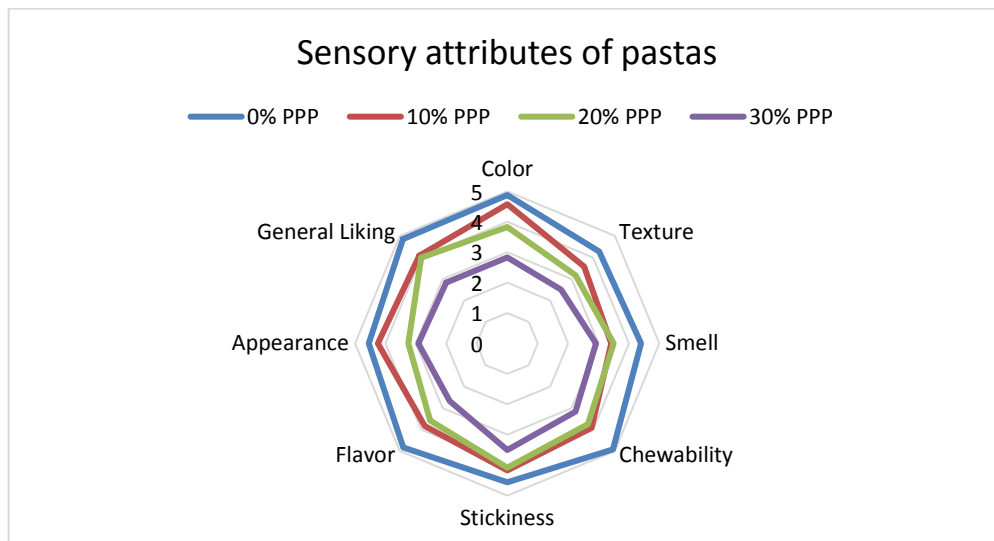


Figure 2. Sensory attributes of pastas

The effect of protein powder addition applied at different ratios on the sensory properties of pasta is as shown in Figure 2. Increasing protein ratio was found to have a negative effect on the sensory evaluations of the panelists.

In the analyzes made, it was determined that many criteria other than chewability and stickiness remained below the "3" value and were classified as "bad". The reason for this is that as the amount of pea powder increases, it does not meet the pasta criteria desired by the consumer, as it creates an undesirable woody odor, rough surface and hard texture.

Repeated measures ANOVA was conducted to test the differences in the sensory analysis results among pasta samples. The results in Table 5 show

that, statistically significant differences were found between pasta samples in all sensory analysis criteria,  $p < 0.05$ . Post-hoc analyses revealed that pasta with 0% PPP has significantly highest scores in surface texture, chewability, flavor and general liking criteria while pasta with 30% PPP has lowest scores and pasta with 10% and 20% PPP were statistically did not differ from each other. In terms of color criteria, all pasta samples differed significantly from each other with 0% PPP has the highest score and 30% PPP has the lowest score. Also, in terms of smell criteria, pasta with %0 PPP has significantly the highest score while other pasta samples (10%, 20%, 30%) did not differ significantly from each other. In terms of stickiness, pasta with 30% PPP

has significantly the lowest score while other pasta samples (0%, 10%, 20%) did not differ significantly from each other. Lastly, in terms of

appearance criteria, pasta with 0% and 10% PPP have higher scores than pasta with 20% and 30% PPP.

Table 6. Repeated measures variance for comparison of general liking criteria analysis results

| General liking results of pasta | Mean | Std. deviation | F      | p     | Post-hoc |
|---------------------------------|------|----------------|--------|-------|----------|
| 10% PPP                         | 4,08 | 0.67           | 30,143 | 0.000 | 1>3      |
| 20% PPP                         | 4.00 | 0.60           |        |       |          |
| 30% PPP                         | 2.83 | 0.72           |        |       |          |

Repeated measures variance to compare 3 different BPT-added pastas According to the results of the analysis, Table As shown in Table 6, a significant difference was found,  $F(2, 22) = 30.143$ ,  $p < 0.05$ . A test was conducted to determine between which groups the significant

difference was found. According to the Bonferroni Post-hoc test, the pasta with 10% BPT addition received in the general appreciation criterion score was found to be significantly higher than the other pastas.

Table 7. Hedonic scale findings (n=12)

| Pasta   | mean(x) | Overall Rating Average(x) | Standard deviation |
|---------|---------|---------------------------|--------------------|
| 10% PPP | 4.08    | $\bar{x} = 3.63$          | 0.87               |
| 20% PPP | 4.00    |                           |                    |
| 30% PPP | 2.83    |                           |                    |

According to the data in Table 7, it was determined that the most liked pasta ( $\bar{x} = 4.08$ ) was the pasta with 10% pea protein powder on average. It was determined that the 20% PPP added pasta sample ( $\bar{x} = 4.00$ ) had an average level of liking. ( $\bar{x} = 2.83$ ) and the pasta with 30% PPP addition was determined to be the pasta with the least liking level. The general liking level of 3 kinds of pasta ( $\bar{x} = 3.63$ ) has an average. Pasta with 10% and 20% PPP added were described as "Good" by the panelists based on the hedonic scale. Unlike the pasta with 30% PPP, the other two pasta samples have the potential to be added to the diet of consumers.

In the study, each sensory analysis criterion was subjected to a comparative analysis of variance. According to the results of the analysis, there was a significant difference in chewiness, stickiness, taste, appearance and general taste criteria, but no significant difference was found in the odor criterion by the panelists.

These differences occurred because the

increase in the amount of protein powder changed the texture of the pasta dough. All of these criteria constitute the quality of pasta and affect the acceptability of pasta by consumers.

In the results of the analysis, pasta with 10% PPP and 20% PPP added positive feedback from the panelists. Pasta with 30% PPP was not considered an acceptable pasta by the panelists. According to the results of the analysis of variance of repeated measurements made to compare 3 different pea protein powder (PPP) added pasta, significant differences were found between the evaluations for the color criteria. The most popular pasta in terms of color was the pasta with a 10% PPP addition. The addition of pea protein powder gives a darker color to the pasta. It is thought that the pasta with 30% PPP addition gets fewer points in terms of color due to the darkening of the color of the pasta as the PPP addition increases.

When the repeated measurements were made to compare the pasta with 3 different pea protein

powder (PPP) additions were examined in terms of chewiness, stickiness and surface texture criteria according to the results of analysis of variance, the pasta with 10% PPP added was the most popular pasta, while the pasta with 30% PPP addition received the lowest score by the

panelists. The pasta was an example. PPP adds a rough texture to the pasta dough. As the PPP powder used in pasta samples increases, it is thought that consumers prefer it less because the quality criteria of pasta deteriorate.

Table 8. Opinions of consumers about pea protein pasta

|   | f  | %   |
|---|----|-----|
| The effect of pasta enriched with pea protein on your feeling of fullness     |    |     |
| Very good   | 5  | 50  |
| Good  | 4  | 40  |
| Acceptable  | 0  | 0   |
| Bad   | 1  | 10  |
| Too bad   | 0  | 0   |
| The effect of pasta not enriched with pea protein on your feeling of fullness |    |     |
| Very good   | 0  | 0   |
| Good  | 4  | 40  |
| Acceptable  | 5  | 50  |
| Bad   | 1  | 10  |
| Too bad   | 0  | 0   |
| Total   | 10 | 100 |

Ten consumers who participated in the study were asked to indicate their feelings of fullness for the pasta with 10% pea protein powder and the control pasta. Individuals who had the same diet meals during the day were asked to fill in the questionnaire, considering the time of hunger after consuming pasta with PPP and the time of hunger after consuming control pasta. Considering the findings in Table 8, 50% of the consumers defined the pea protein-enriched pasta as very good, 40% as good, and 10% as bad when they evaluated the feeling of satiety. When consumers were asked to evaluate the control pasta, 50% defined it as acceptable, 40% as good and 10% as bad. Considering these findings, it can be said that the pasta enriched with pea protein gives a feeling of satiety for a longer time than the control pasta sample.

In a randomized controlled trial conducted in Oxford, participants were randomly assigned to test glucose (control), glucose with 25 g pea protein (test 1) and glucose with 50 g pea protein (test 2) on three separate days. The result was that consumption of pea protein reduced

postprandial glycemia and stimulated insulin release in healthy adults with a dose-response effect, supporting its role in regulating glycaemic and insulinemic responses (Thondre et al., 2021). In a randomized, crossover acute feeding study consisting of four treatments: chocolate beverage alone (50 g carbohydrate), or added with 24 g oat, pea or rice proteins tasted by Chinese males and blood tests were taken after consuming the beverages. The result shows alone chocolate beverages effects desire to eat. Plant-based beverage option has more useful glycaemic control and suppression of hunger (Tan et al., 2018).

## Conclusion

In this study, vegetarian pasta formulations incorporating three different ratios of pea protein powder were developed, and a sensory analysis test was conducted to assess the acceptability of the pasta among twelve panelists trained in sensory analysis. Following the sensory analysis test, trained panelists were tasked with evaluating the satiety-inducing effects of the

pasta samples with the highest overall acceptability by incorporating them into the diet plans of ten individuals who received nutritional counseling, consisting of six females and four males.

The sensory evaluation of the pasta samples, assessed across seven criteria, revealed that those with 10% and 20% pea protein powder (PPP) additions received positive feedback from consumers. Conversely, the pasta sample with the highest protein content, containing 30% PPP, was not preferred by the panelists and received lower scores in the quality assessment criteria of the sensory analysis test. Analysis of variance demonstrated significant differences in the results across various sensory attributes, including general taste, color, flavor, stickiness, chewiness, appearance, and surface texture, excluding odor.

The study highlights the potential of pea protein powder as a valuable food ingredient, enriching the nutritional profile of pasta with its abundance in vitamins, minerals, and protein content. Furthermore, findings from the analysis of satiety feelings among consumers who received nutritional counseling revealed that pasta with 10% PPP addition, favored by the panelists, elicited prolonged satiety compared to other samples, aligning with one of the research objectives. Future investigations should consider additional factors influencing satiety, such as daily physical activity, water intake, and sleep duration.

This study represents the first attempt to produce pasta formulations solely using pea protein powder at varying inclusion rates. It is anticipated that these findings will promote the consumption of pasta, a staple food widely consumed and easily stored in our country, particularly among individuals seeking alternative protein sources due to limited access to animal protein.

Future research endeavors should focus on developing pasta and similar food products with higher PPP inclusion rates, aiming to enhance protein content and nutritional value while ensuring consumer acceptance and satisfaction.

## Acknowledgments

This study was carried out as a master's thesis at Başkent University Institute of Social Sciences Gastronomy and Culinary Arts Master's Program. The authors thank all the participants who devoted their time to participate in this study. We are grateful for their helpful and sincere cooperation and for their warm acceptance of the work.

## Conflict of Interest Statement:

The authors of the article declare that there is no conflict of interest between them.

## Informed consent

All participants included in the study were informed and their consent was taken before filling out the questionnaire.

## Author Contribution:

Ilkay YILMAZ contributed to the conceptualization, methodology, formal analysis, writing—original draft, writing—review, editing and visualization of the article. Sena Nur Dogan contributed to the article in terms of methodology, formal analysis and statistical analysis. The authors have read and approved the final version of the article.

## References

- Ahmad S. R. (2022). Plant-based diet for obesity treatment. *Frontiers in nutrition*, 9, 952553.
- Courty, P. E., Smith, P., Koegel, S., Redecker, D., D. Wipf. (2014). Inorganic nitrogen Uptake and Transport in Beneficial plant Root Microbe interactions. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 34(1-3), 4–16. doi:10.1080/07352689.2014.897897.
- Demir, B. (2008). A Research on the Possibilities of Using Chickpea Flour in Traditional Pasta and Couscous Production, Published Master's Thesis, Selcuk University, Institute of Science, Department of Food Engineering, Konya.
- Ertas, N. (2013). Dephytinization processes of some legume seeds and cereal grains with ultrasound and microwave applications. *Legume Research-An International Journal*, 36(5), 414-421.
- Ficco, D. B. M., De Simone, V., De Leonardis, A. M., Giovanniello, V., Del Nobile, M. A., Padalino, L., ... & De Vita, P. (2016). Use of purple durum wheat to

- produce naturally functional fresh and dry pasta. *Food Chemistry*, 205, 187-195.
- Gibbs J, Cappuccio FP. (2022). Plant-based dietary patterns for human and planetary health. *Nutrients*. 14:1614. 10.3390/nu14081614
- Giuberti, G., Gallo, A., Cerioli, C., Fortunati, P., F. Masoero. (2015). Cooking quality and starch digestibility of gluten using free cake new bean flour. *Food Chemistry*. 175, 9.
- Gokhisar, O. K. (2018). Investigation of red lentil (*Lens Culinsris*) pasta production. Mersin University Institute of Science and Technology, Doctoral thesis. Mersin.
- Gull, A., Prasad, K., P. Kumar. (2015). Effect of nation flours and carrot pomace on cooking qualities, color and texture of the developed cake, *LWT - Food Science and Technology* 63, (1), 470-474.
- Hosta H.G. (2012). *Different Legumes Enriched with Flour Investigation of Quality and Some Nutritional Properties of Gluten-Free Rice Pastas* (Published Master's Thesis), Hacettepe University, Department of Food Engineering, Ankara.
- Iqbal, A., Khalil, I.A., Ateeq N, M.S. Khan. (2006). nutritional quality of important food legumes *Food chemistry*. 97, 331-335.
- Ivanova, S., Delattre, C., Karcheva-Bahchevanska, D., Benbasat, N., Nalbantova, V., & Ivanov, K. (2021). Plant-Based Diet as a Strategy for Weight Control. *Foods* (Basel, Switzerland), 10(12), 3052. <https://doi.org/10.3390/foods10123052>
- Jayesena, V., S.M. Nasar -Abbas. (2011). Development and Quality Evaluation of High-protein and High-fiber Pasta Using Lupin flour, *Journal of Textures Studies*, 43(2), 153–163.
- Köksel H., Sivri D., Özboy Ö., Bafıman A., H.D. Karacan. (2000). Hacettepe University, Faculty of Engineering. Publication No: 47, Grain Laboratory Handbook. Ankara.
- Köten, M., Ünsal, A.S., (2022). Nutritional, Chemical and Cooking Properties of Pastas Enriched with Terebinth (*Pistacia Terebinthus*) Fruits Roasted at Different Temperatures. *Food Science and Technology*, doi: <https://doi.org/10.1590/fst.47120>. v42, e47120. s:1-9.
- Köten, M., Ünsal, S., Atli, A., (2014). Türkiye’de Üretilen Makarnaların Bazı Kimyasal Bileşimlerinin Ve Pişme Kalitelerinin Belirlenmesi. *Gıda*, 39 (1): 33-40.
- Lai, H.M. (2001). Effects of Rice Properties and Emulsifiers on the Quality of Rice Pastry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82: 203-216.
- Lam, A.C.Y., Can Karaca, A., Tyler, RT, & M.T. Nickerson. (2016). Pea protein isolates Structure, extraction, and functionality. *Food Reviews International*, 34(2), 126–147.
- Messia, M. C., Cuomo, F., Falasca, L., Trivisonno, M. C., De Arcangelis, E., & Marconi, E. (2021). Nutritional and Technological Quality of High Protein Pasta. *Foods* (Basel, Switzerland), 10(3), 589. <https://doi.org/10.3390/foods10030589>
- Mikić, A., Medović, A., Jovanović, Ž., & N. Stanisavljević. (2014). Integrating archaeobotany, paleogenetics and historical linguistics may cast more light onto cropped domestication: the case of pea (*Pisum sativum*). *genetics Resources and Crop Evolution*, 61(5), 887–892.
- Onoğur Altuğ, T., Y. Elmacı. (2015). Sensory Evaluation in Foods. Sidas Media, Izmir.
- Pasiakos SM, Lieberman HR, V.L.Fulgoni. (2015). Higher -protein diets are associated with higher HDL cholesterol and lower BMI and waist circumference in US adults. *J Nutr*. 145:605–614.
- Pınarlı, İ., İbanoğlu, Ş., M.D. Öner. (2004). Effect of storage on the selected properties of macaroni enriched with wheat germ \_ *Journal of Food Engineering*, 249-256.
- Shanthakumar, P., Klepacka, J., Bains, A., Chawla, P., Dhull, S. B., & Najda, A. (2022). The Current Situation of Pea Protein and Its Application in the Food Industry. *Molecules* (Basel, Switzerland), 27(16), 5354. <https://doi.org/10.3390/molecules27165354>
- Tan, S. Y., Siow, P. C., Peh, E., & C. J. Henry. (2018). Influence of rice, pea, and oat proteins in attenuating glycemic response of sugar-sweetened beverages. *European journal of nutrition*, 57(8), 2795–2803.
- Temiz H. & A.F. Yeşilsu. (2006). Edible films and coatings of vegetable protein origin. *Electronic Journal of Food Technologies*, (2), 41-50.
- Thondre, P. S., Achebe, I., Sampson, A., Maher, T., Guérin-Deremau, L., Lefranc-Millot, C., Ahlström, E., & H. Lightowler. (2021). Co-ingestion of NUTRALYS® pea protein and a high-carbohydrate beverage influences the glycaemic, insulinaemic, glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) responses: preliminary results of a randomised controlled trial. *European journal of nutrition*, 60(6), 3085–3093.
- Wilde P.J. (2009). eating for life \_ foods for appetite control. *Journal of diabetes science and technology*, 3 (2), 366–370.
- Yılmaz İ. & B.B. Şen. (2021). Carob flour (*Ceratonia siliqua* L.) on physical, chemical, and sensory properties of pastas. *Harran Journal of Agricultural and Food Sciences*, 25(3).

# Aljinat bazlı hidrojelle enkapsüle edilmiş nar ekşisi antosiyaninlerinin fizikokimyasal özellikleri

## *Physicochemical properties of pomegranate sour anthocyanins encapsulated with alginate based hydrogel*

Elif AYKIN DİNÇER<sup>1</sup> , Cüneyt DİNÇER<sup>2,3\*</sup> , Osman Kadir TOPUZ<sup>4</sup> 

<sup>1</sup>Akdeniz Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Antalya, Türkiye

<sup>2</sup>Akdeniz Üniversitesi, Gıda Güvenliği ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi, Antalya, Türkiye

<sup>3</sup>Akdeniz Üniversitesi, Finike Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Antalya, Türkiye

<sup>4</sup>Akdeniz Üniversitesi, Su ürünleri Fakültesi, Su Ürünleri Avlama ve İşleme Teknolojisi Bölümü, Antalya,

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-4427-9819>; <sup>2,3</sup><https://orcid.org/0000-0002-9160-4242>; <sup>4</sup><https://orcid.org/>; <sup>4</sup><https://orcid.org/>

### To cite this article:

Aykin Dinçer, E., Dinçer, C. & Topuz, O. (2024). Aljinat bazlı hidrojelle enkapsüle edilmiş nar ekşisi antosiyaninlerinin fizikokimyasal özellikleri. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2):280-292

DOI: 10.29050/harranziraat.1377267

### \*Address for Correspondence:

Cüneyt Dinçer

e-mail:

cdincer@akdeniz.edu.tr

### Received Date:

17.10.2023

### Accepted Date:

16.05.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### Öz

Bu çalışmada %2, 8, 16 ve 32 (w/v) olmak üzere dört farklı oranda nar ekşisi eklenmiş aljinat kaplama materyali kullanılarak jelleşme yöntemi ile mikrokapsüller üretilmiştir. Üretilen mikrokapsüllerde kuru madde içeriği, su aktivitesi ( $a_w$ ) ve  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  renk değerleri, kapsül çapı, yığın yoğunluğu, antosiyanin içeriği ve FTIR taraması gibi bazı fizikokimyasal özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Mikrokapsüllerin üretiminde eklenen nar ekşisi oranı arttıkça kuru madde (%9.71 - 22.31), kapsül çapı (1.72 - 2.81 mm),  $a^*$ (-0.44 - 6.99),  $b^*$ (-1.34 - 6.09) renk değerleri ve antosiyanin içeriğinin (0.042 - 0.981 mg/kg) arttığı su aktivitesi (0.97 - 0.99), yığın yoğunluğu (0.47 - 0.54 g mL<sup>-1</sup>) ve  $L^*$  (31.64 - 42.60 ) renk değerinin ise azaldığı belirlenmiştir. %32 oranında nar ekşisi eklenen örneklerde arzu edilen renk yoğunluğu ve antosiyanin içeriği daha yüksek bulunmasına rağmen, kapsül şeklinin bozulduğu gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Nar ekşisi, enkapsülasyon, antosiyanin, mikrokapsül

### ABSTRACT

In this study, microcapsules were produced by gelation method by using alginate coating material with four different ratios of pomegranate sour added as 2, 8, 16 and 32 (w/v) %. Some physicochemical properties such as dry matter content, water activity ( $a_w$ ) and  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  color values, capsule diameter, bulk density, anthocyanin content and FTIR scanning were comparatively examined in the produced microcapsules. It was determined that as the ratio of pomegranate sour added in the production of microcapsules increased, dry matter (9.71 - 22.31%), capsule diameter (1.72 - 2.81 mm),  $a^*$ (-0.44 - 6.99),  $b^*$ (-1.34 - 6.09) color values and anthocyanin content (0.042 - 0.981 mg/kg) increased, while water activity (0.97 - 0.99), bulk density (0.47 - 0.54 g mL<sup>-1</sup>) and  $L^*$  color value (31.64 - 42.60 ) decreased. Although the desired color intensity and anthocyanin content were found to be higher in the samples with 32% pomegranate sour added, it was observed that the capsule shape was distorted.

**Key Words:** Pomegranate sour, encapsulation, anthocyanin, microcapsule

## Giriş

Punicaceae familyasına ait nar (*Punica granatum* L.), bilinen en eski meyvelerden biridir. Anavatanı İran'dan Himalayalar'a kadar uzanan bu meyve; tropik ve subtropik iklime sahip pek çok ülkede yetişebilmektedir. Nar, aynı zamanda sert kışları ve kuraklığı tolere edebilmekte ve çöl koşullarında bile üretilmektedir. Hindistan, İran, Çin, Türkiye, Afganistan, İspanya, Mısır, İsrail ve Tunus nar ihraç eden ülkelerin başında yer almaktadır (Lansky ve Newman, 2007; Güzel, 2010; Karabiyikli ve Kisla, 2012).

Son yıllarda narın beslenme ve sağlık yararları üzerine yapılan çalışmalar nara olan ilgiyi arttırmıştır. Narın özellikle delfinidin, siyanidin ve pelargonidin gibi antosiyaninler ve elajik asit, punikalajin ve punikalın gibi ellagitanninler nedeniyle yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu vurgulanmakta ve sağlık açısından etkileri daha çok bu bileşenler ile ilişkilendirilmektedir (Lansky ve Newman, 2007; Budak ve ark., 2013).

Narın yenebilen kısmı, yani daneleri, bütün meyvenin yaklaşık %52'sini oluşturmaktadır. Danenin ise %78'i meyve eti ve %22'si çekirdeklerden oluşmaktadır (Kulkarni ve Aradhya, 2005). Nar danelerinin %79 su, %18 karbonhidrat, %1.1 protein ve %0.9 yağ olduğu bildirilmekle birlikte narın bileşiminin iklim koşulları, bölge, olgunluk düzeyi ve depolama gibi faktörlere göre değiştiği rapor edilmektedir (Apaydin, 2008; Güzel, 2010).

Nar taze olarak kullanımının yanında meyve suyu, meyve suyu konsantresi, nar ekşisi, sos, şarap ve likör gibi çeşitli ürünlere işlenerek tüketilebilmektedir (Karabiyikli ve Kisla, 2012). Özellikle nar suyu, içerdiği biyoaktif bileşenlerin sağlık açısından önemli etkileri ve cezbedici tadı ile oldukça popülerdir. Ticari nar suyunun antioksidan kapasitesinin kırmızı şarap ve yeşil çaya göre üç kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (Gil ve ark., 2000; Budak ve ark., 2013). Diğer taraftan nar ekşisi Türkiye'de ağırlıklı olarak Akdeniz, Ege ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde üretilmektedir. Daha çok salata ve meze sosu, tatlandırıcı ve meşrubat maddesi olarak kullanılmaktadır. Büyük ölçekli üretim yapan firmalar tarafından tedarik edilmekle birlikte küçük ölçeklerde bölgelere göre değişen geleneksel yöntemlerle de üretilmektedir (Karabiyikli ve Kisla, 2012; Budak ve ark., 2013).

Geleneksel nar ekşisi, nar meyvelerinin sıkılmasıyla elde edilen meyve suyunun süzülüp

konsantre edilmesiyle elde edilen ve bazı yiyeceklere tat vermek için kullanılan ekşi bir gıda ürünü olarak tanımlanmaktadır (Karabiyikli ve Kisla, 2012; Budak ve ark., 2013). Nar Ekşisi, kendine özgü tatlı-ekşi ve hafif buruk tadı, koyu kahverengi rengi ve yoğun kıvamı ile eşsiz bir üründür (Budak ve ark., 2013).

Antioksidanlarca ve özellikle antosiyaninlerce zengin nar ve nar ürünlerinin gıda endüstrisinde kullanım potansiyeli oldukça yüksektir. Bununla birlikte bilinçli tüketicilerin sağlıklı yaşama yönelik giderek artan eğilimleri, fonksiyonel bileşenlerin besin değerini artırmak için gıda ürünlerine ilavesindeki popülariteyi ve pazar payını da arttırmaktadır. Ancak antosiyaninler gibi bileşenler çevresel, gastrointestinal ve işleme koşullarına oldukça hassastır ve önemli kayıplara uğrayabilmektedirler. Bu nedenle bu bileşenlerin korunması ve gıda endüstrisinde daha yaygın kullanımları için enkapsülasyon gibi yenilikçi yaklaşımların kullanılmaya başlandığı görülmektedir (Gökmen ve ark.,2012; Çoruhlu, 2013; Tavlaşoğlu, 2016; Tarone ve ark., 2020).

Enkapsülasyon katı, sıvı ya da gaz fazdaki bir bileşen veya karışımın başka bir madde veya sistem ile kaplanması veya hapsedilmesi olarak tanımlanabilmektedir (Koç ve ark., 2010; Tutun ve Yurdakul, 2022). Oluşan kapsüllerin boyutuna göre uygulanan işlem nanoenkapsülasyon (<0.2 µm), mikroenkapsülasyon (0.2-5000 µm), veya makroenkapsülasyon (>5000 µm) olarak adlandırılabilir (Gökmen ve ark., 2012). Enkapsülasyonda kaplanan madde, aktif madde, çekirdek, iç faz ya da dolgu maddesi olarak; kaplamada kullanılan madde ise kabuk, kaplama maddesi, duvar materyali, enkapsülant, membran, kapsül, matris, dış faz veya taşıyıcı olarak ifade edilebilmektedir (Ray ve ark., 2016).

Enkapsülasyonda aktif maddenin kaplanmasında birçok teknik olup en yaygın kullanılan kimyasal işlemler arasında koaservasyon, jelasyon, inklüzyon kompleksi, ara yüzey polimerizasyonu ve emülsiyon polimerizasyonu, mekanik işlemler arasında ise püskürterek kurutma, akışkan yatak, ekstrüzyon ve dondurarak kurutma sayılabilir (Koç ve ark., 2010; Gökmen ve ark.,2012; Tavlaşoğlu, 2016; Tarone ve ark., 2020; Tutun ve Yurdakul, 2022).

Damlatma veya iyonik jelasyon olarak da adlandırılan metot pratik ve ekonomik bir yöntem olarak bilinmekle birlikte çok miktarda ürün üretimine elverişli olmadığı için daha çok laboratuvar uygulamalarında küçük çaplı



üretimlerde tercih edilmektedir. Bununla birlikte son yıllarda geliştirilen şırınga–ekstrüzyon sistemleri ile yüksek miktarda tanecikler üretilerek enkapsüle gıda taneciklerinin ticarileştirilmesinin mümkün olabileceği belirtilmiştir (Çoruhli, 2013). Bu yöntem modernist mutfaklarda yalancı havyar, imitasyon yumurtalar ve özel mantılar gibi farklı ürünlerin üretiminde de kendine yer bulmakta ve son dönemde oldukça popülerite kazanmaktadır (Topuz ve ark., 2020).

Nar suyu, nar çekirdeği ekstraktı ve nar atıkları ekstraktlarının enkapsülasyonu ile ilgili bazı çalışmalar (Robert ve ark., 2010; Çam ve ark., 2014) yapılmakla birlikte iyonik jelleşme yöntemi ile nar ekşisinin enkapsüle edildiği bir çalışmaya ulaşılamamıştır. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda nar ekşisi kullanımının jelleşme yöntemi ile üretilen mikrokapsüllerin fizikokimyasal özellikleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda nar ekşisi kullanılarak elde edilen bu mikrokapsüllerde kuru madde içeriği, su aktivitesi ( $a_w$ ) ve  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  renk değerleri, kapsül çapı, yığın yoğunluğu, antosiyanin içeriği ve FTIR taraması gibi bazı fizikokimyasal özellikleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

## Materyal ve Metot

Lokal marketten temin edilen  $\sim 71^\circ\text{Bx}$  nar ekşisi (Kemal Kükrer, Eskişehir, Türkiye) çalışmada antosiyanin kaynağı aktif madde olarak kullanılmıştır. Kapsüllerin üretiminde kaplama materyali olarak sodyum aljinat (Tito, Türkiye) ve sertleştirme çözeltisi olarak da kalsiyum klorür ( $\text{CaCl}_2$ ) (Merck, Almanya) kullanılmıştır.

### Mikrokapsüllerin üretimi

Mikrokapsüllerin üretiminde Topuz ve ark., (2020) ile Nguyen ve ark., (2022)'nin açıkladığı metotlar modifiye edilerek kullanılmıştır. Gıda uygulamalarında kaplama materyali olarak genellikle polisakaritler kullanılmaktadır. Fenolik maddelerin ve özellikle de antosiyaninlerin kaplandığı pek çok çalışmada (Tavlaşoğlu, 2016; Toprakçı ve ark., 2022a; Toprakçı ve ark., 2022b; Toprakçı ve ark., 2023) sodyum aljinat kullanıldığı dikkate alınarak bu çalışmada da sodyum aljinat tercih edilmiştir. Buna göre %2'lik ( $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ) sodyum aljinat çözeltisi  $60^\circ\text{C}$  'de mekanik

karıştırıcı (MTOPS MS3040D Lab. Stirrer, Korea) kullanılarak hazırlanmıştır. Oda sıcaklığına soğutulan sodyum aljinat çözeltilerine % 2, 8, 16 ve 32 oranında ( $\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$ ) olacak şekilde  $71^\circ\text{Bx}$  nar ekşisi eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda ( $\sim 25^\circ\text{C}$ 'de) 30 dk boyunca karıştırılmıştır. Ardından bu karışım 3mL hacimli 1mm delik çapına sahip pastör pipeti kullanılarak manyetik karıştırıcı üzerindeki %2'lik hazırlanan  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinin içerisine yaklaşık 3 cm mesafeden damlatılarak mikrokapsüllerin oluşumu sağlanmıştır.  $\text{CaCl}_2$  çözeltisinde yaklaşık 5 dk bekleyen mikrokapsüller distile su ile üzerindeki fazla  $\text{Ca}^{2+}$  yıkandıktan sonra süzülerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Elde edilen mikrokapsüller analizler gerçekleştirilene kadar maksimum 2 gün  $5^\circ\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

### Analizler

#### Kuru madde ve su aktivitesi ( $a_w$ )

Örneklerin kuru madde analizi etüvde  $105^\circ\text{C}$ 'de sabit tartıma gelene kadar kurutulması ile gerçekleştirilmiştir. Kurutma öncesi ve sonrası yapılan tartımlardan sonra örneklerin kuru madde içeriği % olarak verilmiştir (AOAC, 2000). Örneklerin su aktivitesi ( $a_w$ ) değeri su aktivite ölçer (AquaLab 4TE Decagon Devices, Washington, ABD) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şahin-Nadeem ve ark., 2013).

#### Mikrokapsül boyutu ve yığın yoğunluğu ölçümü

Mikrokapsüllerin ortalama çapları dijital kumpas kullanılarak ölçülmüştür. Örneklerin ortalama boyutunu hesaplamak için rastgele seçilen 20 kapsül çapı üç farklı açıdan ölçülmüş ve daha sonra ölçülen değerlerin ortalaması alınmıştır (Topuz ve ark.,2020).

Örneklerin yığın yoğunluğu Aykın-Dinçer ve ark., (2021) tarafından açıklanan yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre 5 g örnek 25 mL'lik dereceli bir silindire tartılmış ve yığın yoğunluğunu belirlemek için kullanılan hacim (mL) ölçülmüştür. Yığın yoğunluğu, örneklerin kütlelerinin, örneklerin kapladığı silindirin hacmine bölünmesiyle hesaplanmıştır.

#### Renk ölçümü

Örneklerinin renk ölçümü, renk ölçüm cihazı (Chroma Meter CR-400 KonicaMinolta, Osaka, Japonya) (8 mm ışık deliği;  $2^\circ$  gözlemci) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cihazın ışık kaynağı darbeli ksenon lamba olup, ölçümler için  $D_{65}$  aydınlatıcı kullanılmıştır. Renk cihazının ölçüm

kabı içerisine, kabın tabanını kaplayacak şekilde örnekler yerleştirilmiş ve 3 ayrı noktadan renk ölçümü gerçekleştirilerek ortalama  $L^*$ ,  $a^*$  ve  $b^*$  değerleri kaydedilmiştir (Topuz ve ark., 2020).

#### Antosiyenin analizi

Çalışmada örneklerin monomerik antosiyenin tayininde ekstraktların hazırlanması Liu ve ark., (2015)'nin bildirdiği metot modifiye edilerek kullanılmıştır. Buna göre örneklerden 1 g alınarak santrifüj tüplerine aktarılmış ve 20 mL %60'lık etanol (%0.1 HCl içeren) ilave edilmiştir. Ardından tüpler ultrasonik banyoda (Çalışkan Ultrasonik clenar 180 W, 40 kHz, Türkiye) 30 °C'de 30 dakika boyunca ekstrakte edilmiştir. Daha sonra kaba filtre kağıdından süzülen örnekler analizlere kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

Toplam monomerik antosiyenin tayini pH diferansiyel metoduyla tayin edilmiştir (Wang ve Xu, 2007). Buna göre ekstraktan birisi potasyum klorür tampon çözeltisi (HCl ile pH 1'e ayarlanmış 0.025 M) ile diğeri sodyum asetat tampon çözeltisi (HCl ile pH 4'e ayarlanmış 0.4 M) ile daha önce deney başlangıcında saptanmış olan seyreltme faktörüne uygun olarak seyreltilmiştir. Her iki seyreltik, denge oluşması için 20 dk karanlıkta bekletildikten sonra her iki seyreltiğin  $\lambda_{vis-max}$  (520 nm) ve 700 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülmüştür. Yapılan absorbans okumalarından ( $A_{\lambda_{vis-max}}$  (520nm) ve  $A_{700}$ ) yararlanılarak A değeri aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır.

$$A = (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700}) \cdot pH \cdot 1.0 - (A_{\lambda_{vis-max}} - A_{700}) \cdot pH \cdot 4.5$$

Örnekteki, monomerik antosiyenin konsantrasyonu aşağıdaki eşitlik (1) yardımıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Monomerik antosiyenin (mg L}^{-1}\text{)} = \frac{(A)(MW)(S_f)1000}{(\epsilon)\ell} \quad (1)$$

Burada;

A: Düzeltilecek hesaplanmış absorbans farkı,  
MW: Baz alınacak antosiyenin molekül ağırlığı, (siyanidin-3-glikozit'in molekül ağırlığı: 449.2 g mol<sup>-1</sup>)

Sf= seyreltme faktörü,  
 $\epsilon$ =Molar absorptivite (absorpsiyon katsayısı), (siyanidin-3-glikozit'in absorpsiyon katsayısı: 26900 L (cm mol)<sup>-1</sup>)  
 $\ell$ =Spektrofotometrede kuvvet kalınlığı.

#### FTIR Analizi

Mikrokapsüllerin Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), FT-IR /FT-NIR spektrofotometre (Perkin Elmer Spectrum 400 spektrometre, Waltham, MA, ABD) kullanılarak elde edilmiştir. Ölçümler 4000-650 cm<sup>-1</sup> spektral aralıkta ve 4 cm<sup>-1</sup> spektral çözünürlükte gerçekleştirilmiştir.

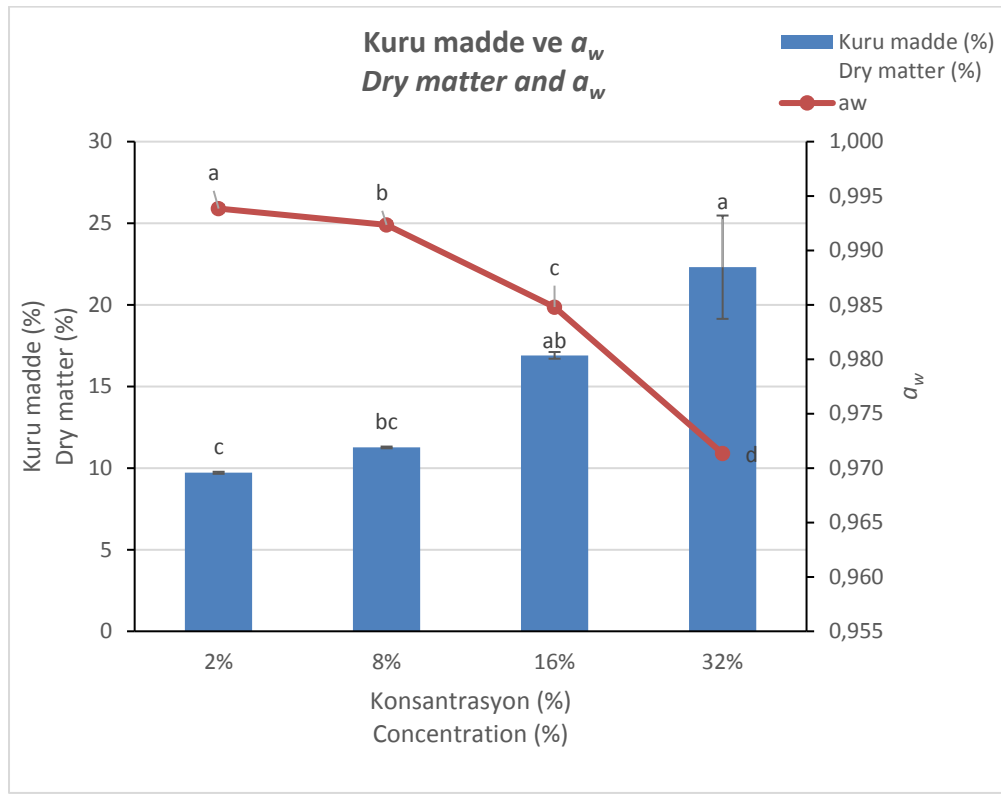
#### İstatiksel analizler

Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre iki tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş, analizler paralelli olarak yürütülmüştür. Ortalamalar varyans analizine tabi tutularak, önemli bulunan farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi (SAS System for Windows V7, SAS Institute, Cary, NC, ABD) ile ortaya konulmuştur. P<0.05 olduğunda önemli farklılıklar çizelgelerde farklı harflerle gösterilmiştir.

#### Araştırma Bulguları ve Tartışma

##### Mikrokapsüllerin kuru madde ve su aktivitesi ( $a_w$ ) değerleri

Mikrokapsüllerin kuru madde içeriği ve su aktivitesi ( $a_w$ ) değerleri Şekil 1'de verilmiştir. Örneklerin kuru madde içeriğinin %9.71 ile %22.31 arasında değiştiği ve kapsüllerin üretiminde kullanılan nar ekşisi oranının (%2-32) artışı ile genel olarak kuru madde miktarının da arttığı görülmektedir. Örneklerin  $a_w$  değerleri ise 0.97 ile 0.99 arasında değişim göstermiştir (Şekil 1). Örneklerin  $a_w$  değerlerinin kapsüllerin üretiminde kullanılan nar ekşisi oranının (%2-32) artışı ile istatistiki açıdan önemli düzeyde (P<0.05) azaldığı belirlenmiştir. Örneklerin kuru madde içerikleri ile  $a_w$  değerleri arasında da tahmin edilebileceği üzere negatif bir korelasyon (-0.9848) tespit edilmiştir.



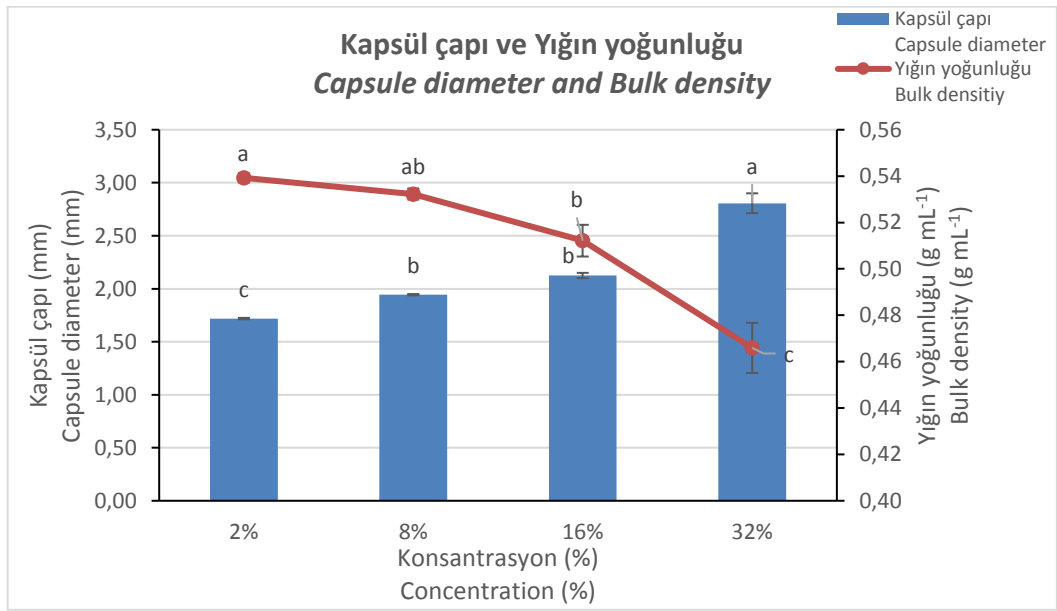
Şekil 1. Mikrokapsüllerin kuru madde ve su aktivitesi ( $a_w$ ) değerleri  
Figure 1. Dry matter and water activity ( $a_w$ ) values of microcapsules

da Silva Carvalho ve ark., (2019) jussara (juçara) meyvesi (*Euterpe edulis* Martius) antosiyanin ekstraktını aljinat, aljinat + kitosan, aljinat + peyniraltı suyu konsantresi, aljinat + jelatin ile kaplayarak iyonik jelyasyon ile ürettikleri küreciklerin kuru madde miktarını % 6.7 ile % 7.7 arasında rapor etmişlerdir. Araştırmacılar antosiyanin ekstraktı eklenmemiş aljinat küreciklerinin kuru madde içeriğini ise %5.6 olarak tespit etmiştir. Belščak-Cvitanović ve ark., (2016) ise Karahindiba (*Taraxacum officinale*) bitkisinin polifenoller ve b-karotenlerinin mikroenkapsülasyonunu gerçekleştirdikleri çalışmalarında kaplama materyali olarak aljinat, pektin, aljinat-peyniraltı suyu proteini, pektin-peyniraltı suyu proteini ve aljinat-hidroksipropil metil selüloz kullanmışlardır. Araştırmacılar mikrokapsüllerin kuru madde içeriklerini % 10.49 ile 21.54 arasında bildirmişlerdir. Nar ekşisi eklenerek üretilen mikrokapsüllerin kuru madde içeriğinin (%9.71-%22.31) bahsedilen çalışmalar

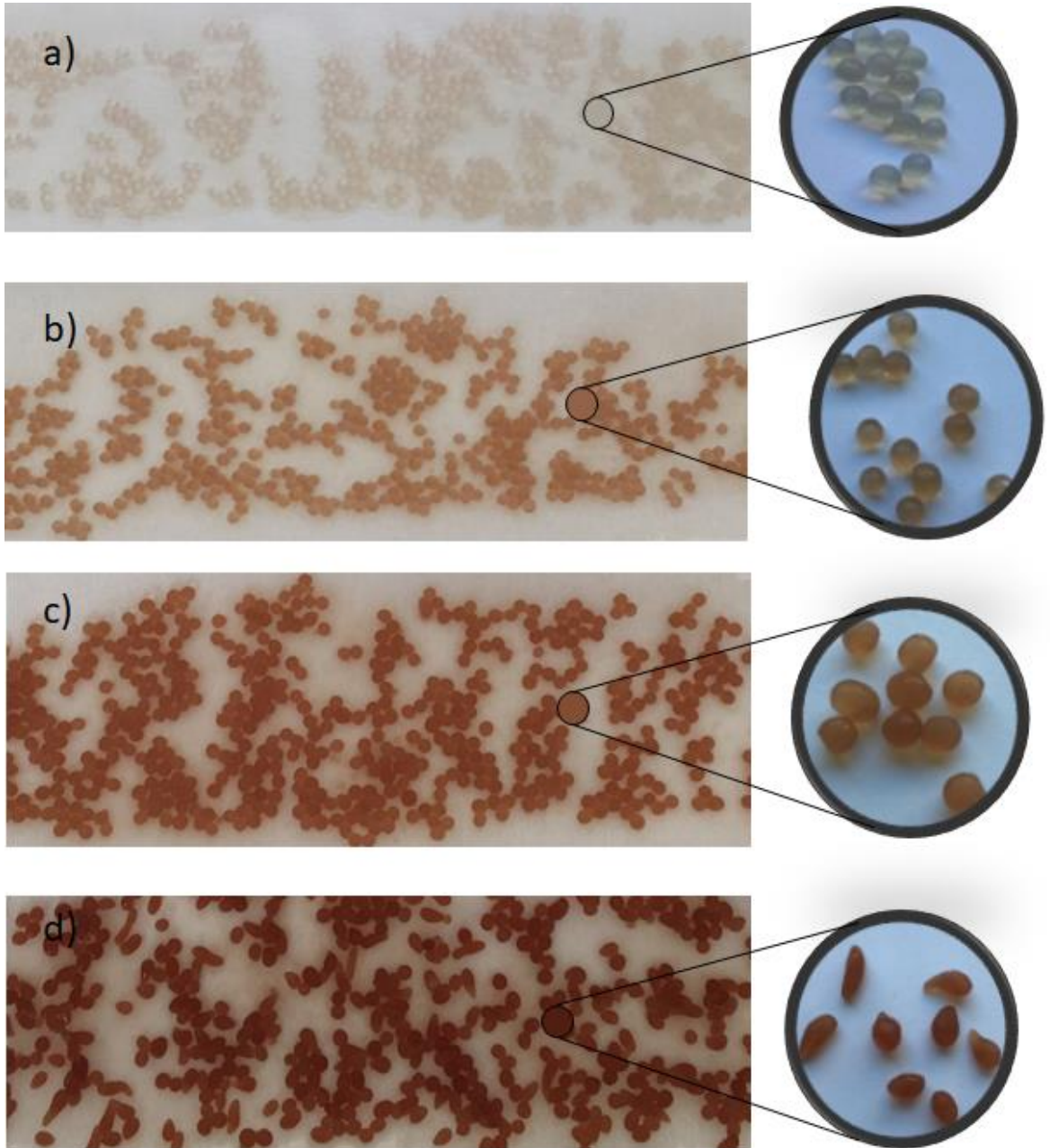
ile uyumlu olduğu görülmektedir.

#### Mikrokapsül boyutu ve yığın yoğunluğu

Üretilen mikrokapsüllerin boyut ve yığın yoğunluğuna ait sonuçlar Şekil 2’de sunulmuştur. Mikrokapsüllerin çapının 1.72 mm ile 2.81 mm arasında değiştiği ve eklenen nar ekşisi oranı (%2-32) arttıkça genel olarak mikrokapsüllerin çapının arttığı görülmektedir. Bununla birlikte eklenen nar ekşisine bağlı kapsüllerin çapındaki bu artışın %8 ile %16 oranında istatistiki açıdan önemli bir seviyede olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 2). Örneklerin yığın yoğunluğu  $0.47 \text{ g mL}^{-1}$  ile  $0.54 \text{ g mL}^{-1}$  arasında belirlenmiştir. Mikrokapsüllerin yığın yoğunluğu ise eklenen nar ekşisinin oranın (%2-32) artışına bağlı olarak azalmıştır. Ayrıca kapsül çapının artışı ile yığın yoğunluğunun azalışı arasındaki negatif korelasyon ( $-0.9931$ ) da oldukça yüksek seviyededir. Dikkat çeken diğer bir nokta %32 oranında nar ekşisi eklenmiş örneklerde şeklin belirgin derecede bozulduğudur (Şekil 3).



Şekil 2. Mikrokapsüllerin boyut ve yiğın yoğunluğu değerleri  
Figure 2. Size and bulk density values of microcapsules



Şekil 3. Mikrokapsüllerin görünüşü (a:%2, b:%8, c:%16, d:%32 nar ekşisi eklenmiş örnekler)  
Figure 3. Appearance of microcapsules (a:2%, b:8%, c:16%, d:32% samples with added pomegranate sour)

Mikrokapsüllerin boyutu ve şekli, farmasötik ve gıda ürünlerinin formülasyonunda dikkate alınması gereken önemli parametrelerdir, çünkü aktif fonksiyonel içeriğin hedeflenen düzeyde etkili olabilmesi için tek tip boyut dağılımına sahip küresel boncuklar arzu edilmektedir (Arriola ve ark., 2019).

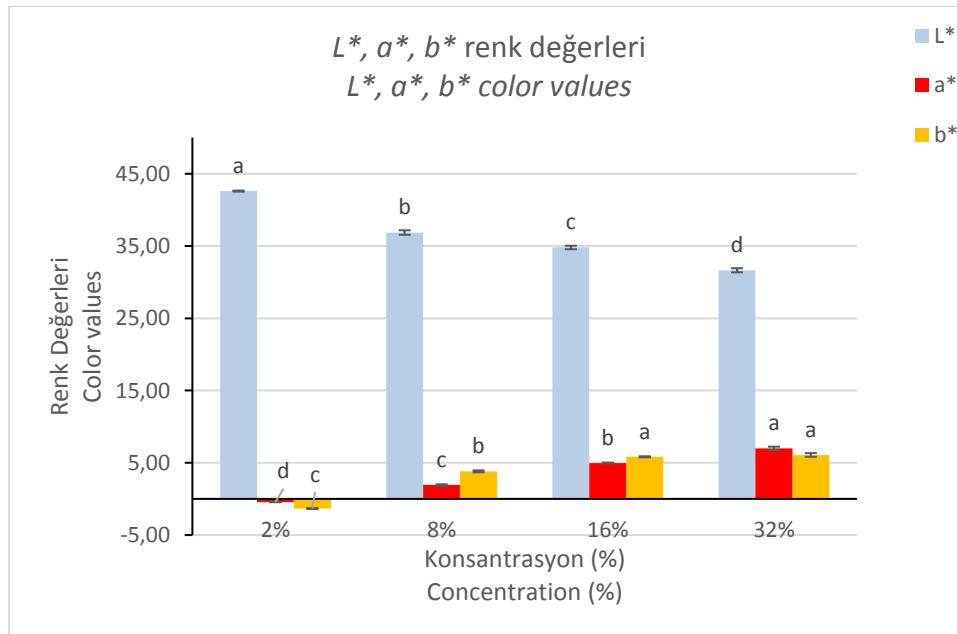
Çalışmada elde edilen mikrokapsüllerin boyutları genel olarak benzer çalışmalarda aljinat ile üretilen mikrokapsüllerin boyutları ile uyumludur. Nitekim Dallabona ve ark., (2020) jabuticaba kabuğu ve propolis özleri ile aljinat mikrokapsülleri geliştirdikleri çalışmada mikrokapsüllerin çapını 2-2.5 mm aralığında rapor etmişlerdir. Arriola ve ark., (2019)'da benzer şekilde stevya ekstraktlarını mikrokapsüle ettikleri çalışmada mikrokapsüllerin çapını 1.4 – 2.4 mm arasında rapor etmiştir.

Çam ve ark., (2014) aktif madde (fenolik)/kaplama materyali (maltodekstrin) oranı azaldıkça kapsül verimi ve etkinliğinin arttığını bildirmiştir. Tavlaşloğlu, (2016) aktif madde/kaplama oranı azaldıkça %2'lik pektin ve %2'lik aljinat içeren örnekler için enkapsülasyon verimliliğinin arttığını %1 pektin %1 aljinat kompleksi içeren aktif madde/kaplama oranı azaldıkça enkapsülasyon verimliliğinin de azaldığını bildirmiştir. Genel olarak

mikrokapsüllerin boyutu ve şeklinin mikrokapsül üretim metodu, üretimde kullanılan çözeltilerin bileşimi, çözeltilerin viskozitesi, damlatma hızı ve yüzey geriliminin yanı sıra çalışma parametrelerinden etkilenebileceği bildirilmektedir (Đorđević ve ark., 2015).

#### Renk değerleri

Nar ekşisinin  $L^*$  ((0) siyah – (100) beyaz),  $a^*$  ((+) kırmızı – (-) yeşil),  $b^*$  ((+) sarı – (-) mavi ) renk değerleri sırasıyla  $20.26 \pm 0.01$ ,  $3.71 \pm 0.02$  ve  $2.62 \pm 0.01$  olarak ölçülmüştür. Mikrokapsül örneklerin  $L^*$  değerlerinin 31.64 ile 42.60 arasında,  $a^*$  değerlerinin -0.44 ile 6.99 arasında,  $b^*$  değerlerinin -1.34 ile 6.09 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Şekil 4). Mikrokapsüllerin aktif madde olarak eklenen nar ekşisi oranı arttıkça  $L^*$  değerinin azaldığı,  $a^*$  ve  $b^*$  değerlerinin ise arttığı görülmektedir. Bu değişim Şekil 3'te de görülmektedir. Bununla birlikte görülen değişim %16 - %32 oranlarındaki  $b^*$  değeri dışında diğer oranlar ve renk değerlerinde istatistiki açıdan da önemli düzeyde ( $P < 0.05$ ) belirlenmiştir. Eklenen nar ekşisi oranı arttıkça  $L^*$  değerindeki azalma ve özellikle  $a^*$  değerindeki artış nar ekşisinde bulunan antosiyaninler ile ilişkilendirilebilir. Nitekim nar ekşisine rengini veren ana pigmentin antosiyaninler olduğu bilinmektedir (Budak ve ark., 2013).



Şekil 4. Örneklerin  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  renk değerleri  
Figure 4.  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  color values of samples

#### Antosiyanin içeriği

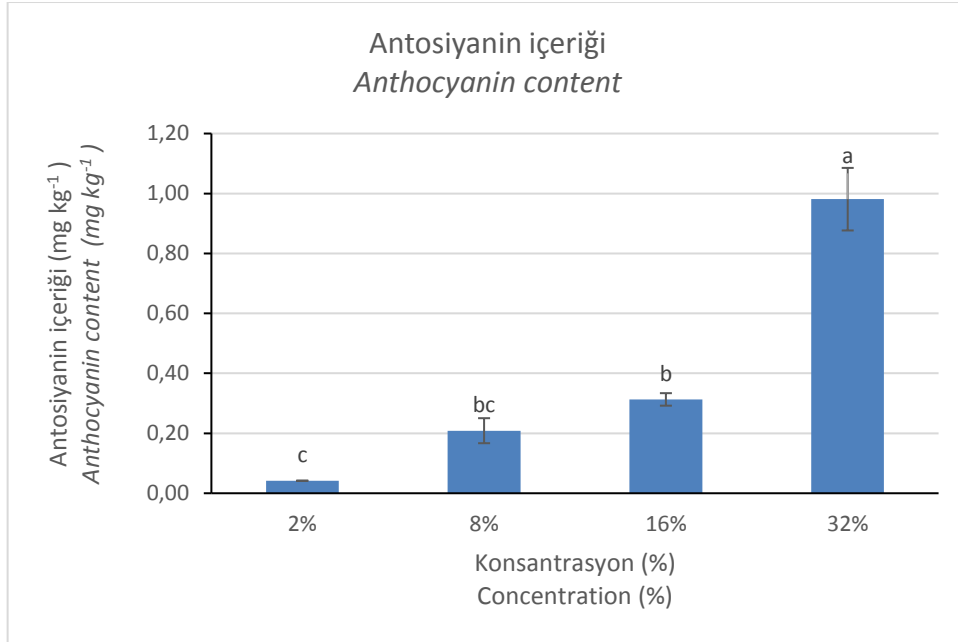
Farklı oranlarda (%2-32) nar ekşisi eklenerek

üretilen mikrokapsüllerin antosiyanin içeriklerine ait sonuçlar Şekil 5'te verilmiştir. Çalışmada

kullanılan nar ekşisinin antosiyanin içeriği  $15.427 \pm 0.084 \text{ mg kg}^{-1}$  olarak belirlenirken mikrokapsüllerin antosiyanin içerikleri 0.042 ile  $0.981 \text{ mg kg}^{-1}$  aralığında tespit edilmiştir. Eklenen nar ekşisi oranı arttıkça (%2-32) antosiyanin içeriği de artmıştır. Bununla birlikte bu artış eklenen nar ekşisi oranı %2'den %8'e çıktığında 4 kat, %8'den %16'ya çıktığında 0.5 kat %16'dan %32'ye çıktığında ise 2.13 kat olarak belirlenmiştir. Ayrıca %32 oranında nar ekşisi eklenen örneklerde arzu edilen renk yoğunluğu ve antosiyanin içeriği daha yüksek bulunmasına rağmen kapsül şekli küresellikten uzaklaşarak bozulmuştur.

Öztan (2006) nar ekşisi örneklerinin antosiyanin içeriğini  $0.022 \text{ mg g}^{-1}$  olarak rapor ederken, Baysal (2019), nar ekşisi üretiminde durultma maddeleri dozajlarının kaliteye etkisini

araştırdığı çalışmasında örneklerin monomerik antosiyanin içeriğini  $140.77$  ile  $856.93 \text{ mg L}^{-1}$  arasında bildirmiştir. Budak ve ark., (2013) 7 geleneksel ve 9 ticari nar ekşisi örneğinde toplam fenolik madde, antioksidan aktivite ve fenolik kompozisyonu gibi analizleri gerçekleştirmiştir. Çalışmada örneklerin toplam fenolik madde içeriğinin  $2050.6$  ile  $9788.6 \text{ mg L}^{-1}$  GAE arasında değiştiği ve geleneksel yöntem ile üretilen örneklerin fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitelerinin ticari nar ekşisi örneklerinden daha yüksek bulunduğu rapor edilmiştir. Türkmen ve ark., (2019) ise ticari nar ekşisi örneklerinde toplam fenolik madde içeriğini  $3946.39 \text{ mg L}^{-1}$ , flavonoid içeriğini ise  $12.73 \text{ mg L}^{-1}$  olarak rapor etmiştir.

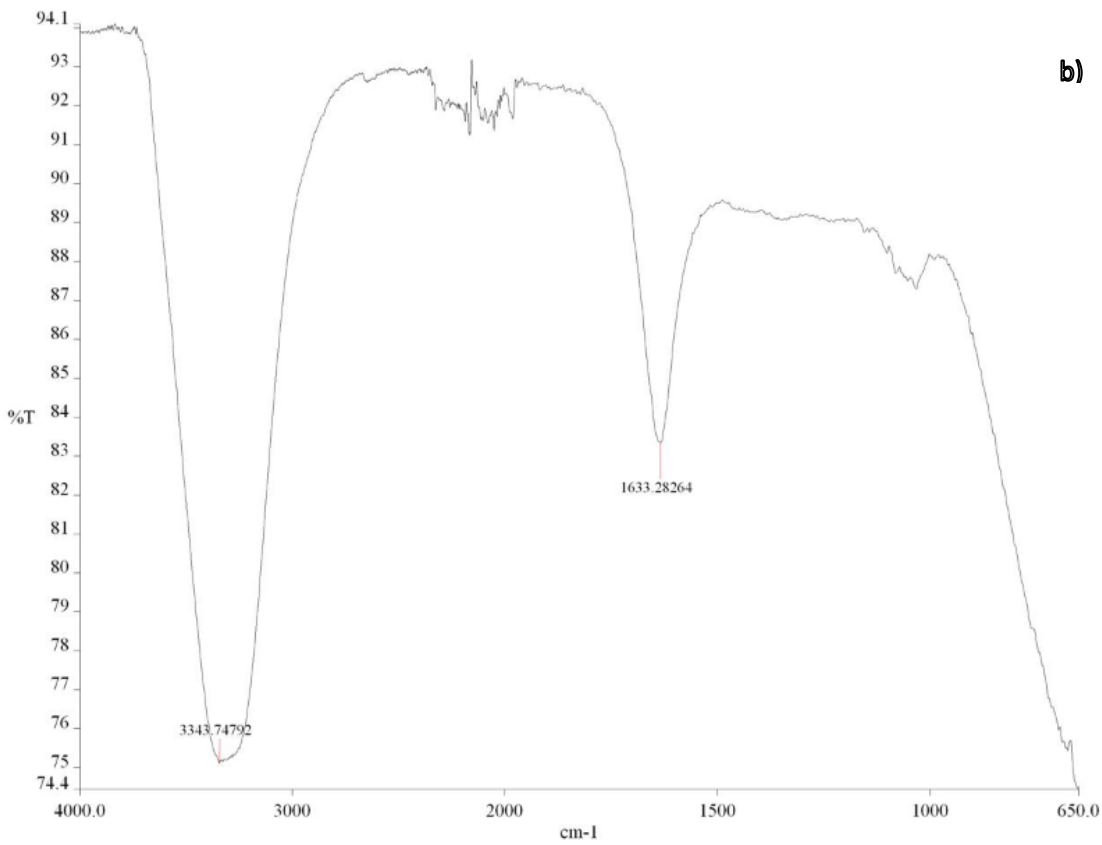
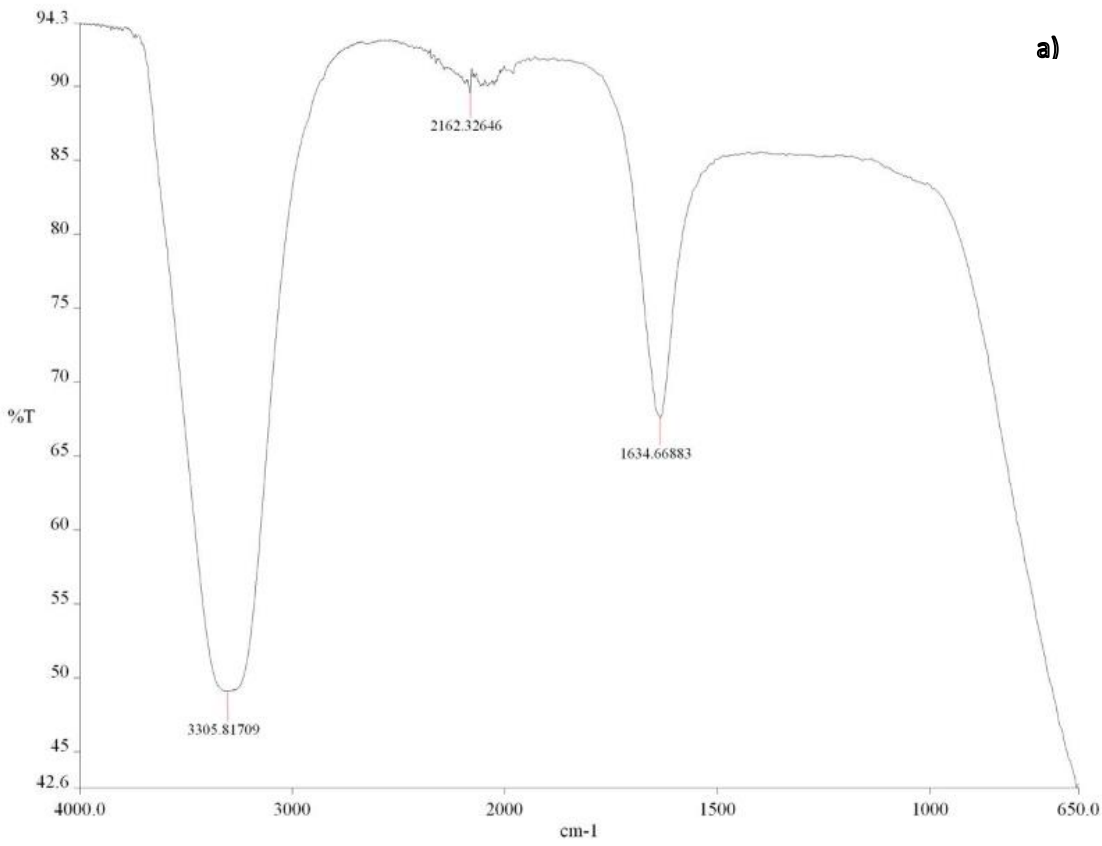


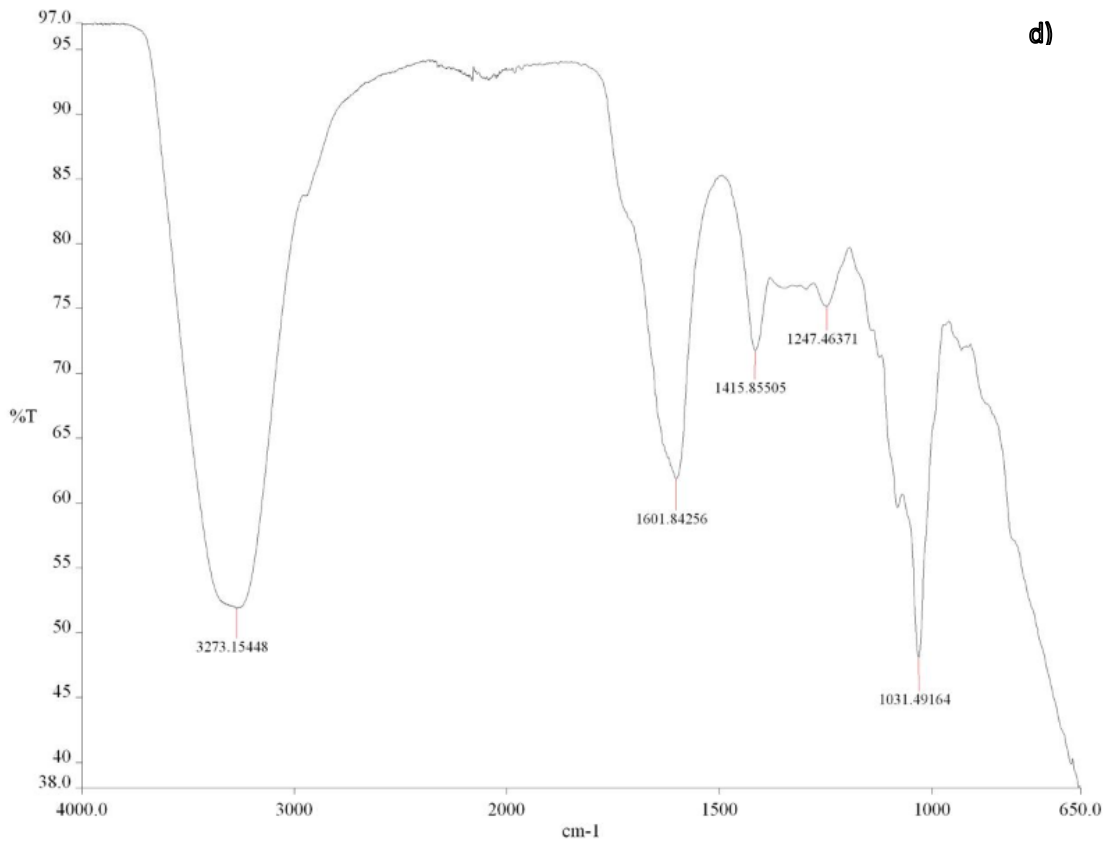
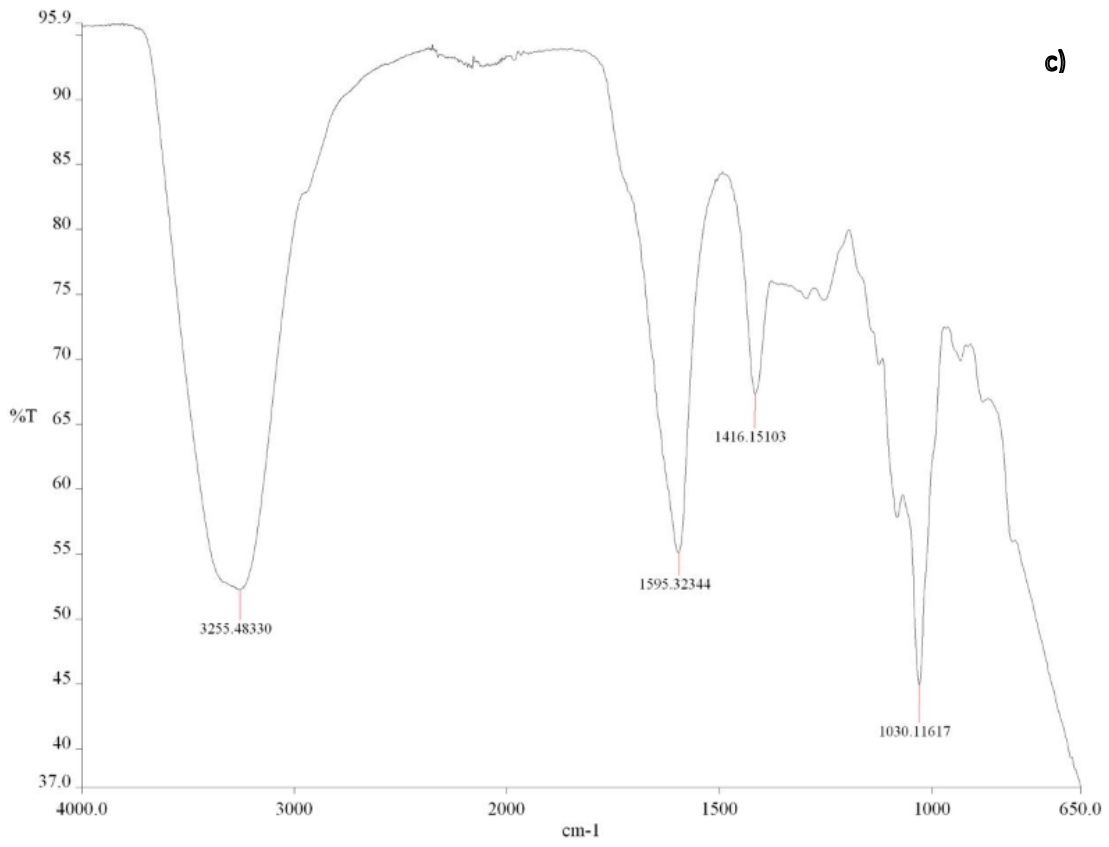
Şekil 5. Mikrokapsüllerin antosiyanin içerikleri  
Figure 5. Anthocyanin contents of microcapsules

#### FTIR analizi

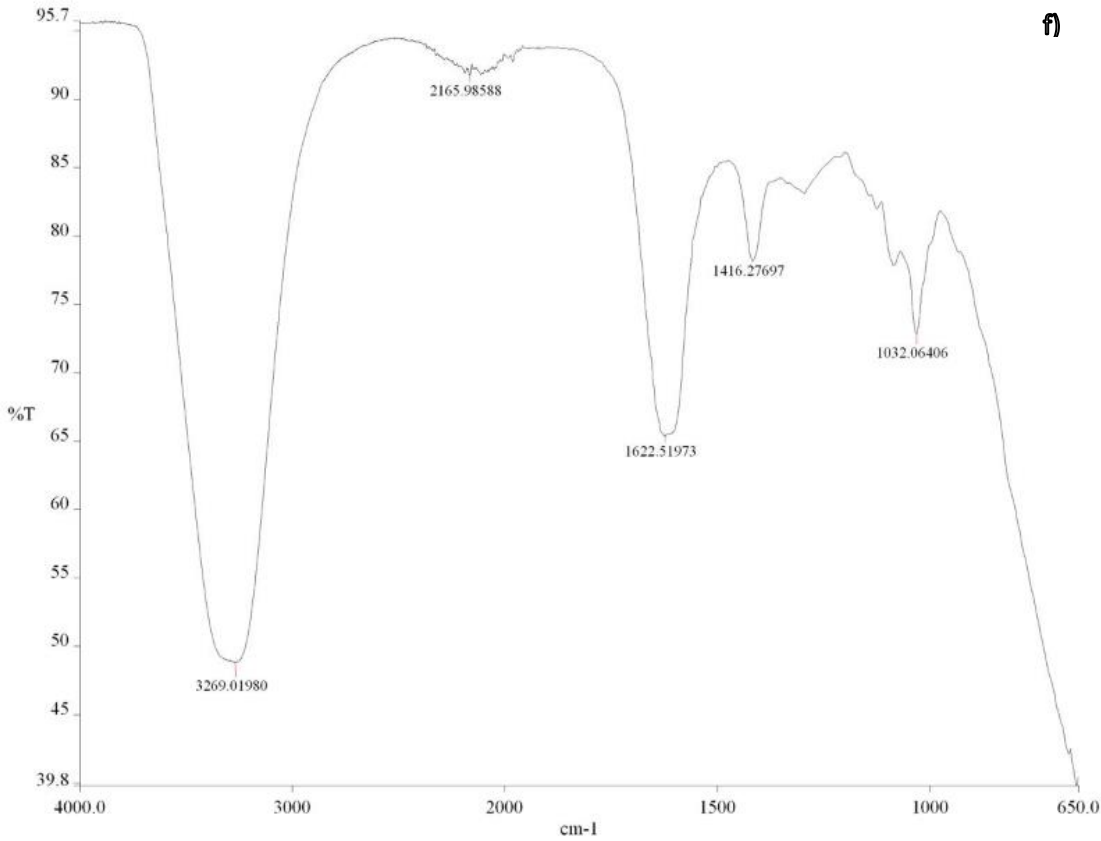
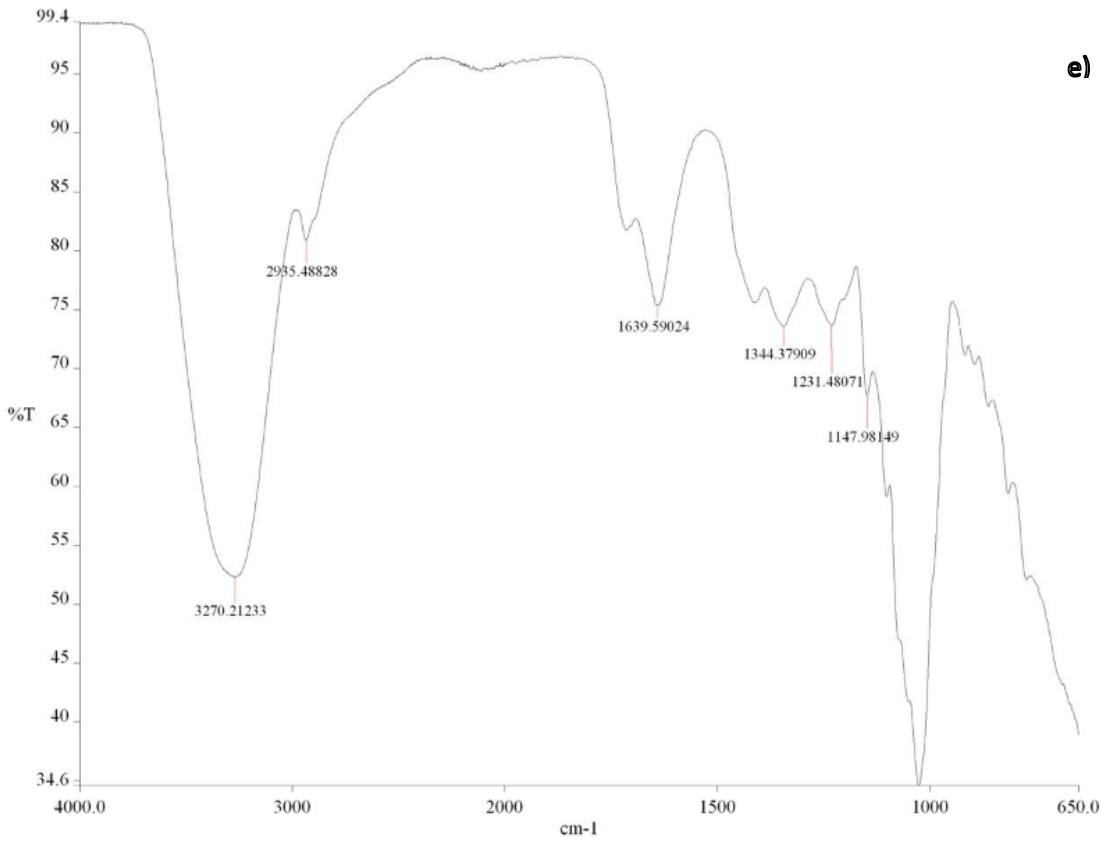
Her bir fonksiyonel grubun infrared spektrumunda karakteristik bir frekansı absorbe etmesi FTIR analizinin fonksiyonel grupları tanımlamasına imkan tanır (Dallabona ve ark.,

2020). Aljinat, nar ekşisi ve aljinat ile kaplanmış farklı oranlarda nar ekşisi içeren mikrokapsüllerin  $650-4000 \text{ cm}$  arasındaki spektrumları Şekil 6'da verilmiştir.









Şekil 6. Örneklerin Fourier dönüşümlü kızıl ötesi (FTIR) spektrumları (a) %2 Nar ekşisi eklenmiş örnek, b) %8 Nar ekşisi eklenmiş örnek, c) %16 Nar ekşisi eklenmiş örnek, d) %32 Nar ekşisi eklenmiş örnek, e) Nar ekşisi, f) Aljinat örneği)

Figure 6. Fourier transform infrared (FTIR) spectra of the samples (a) 2% pomegranate sour added sample, b) 8% pomegranate sour added sample, c) 16% pomegranate sour added sample, d) 32% pomegranate sour added sample, e) pomegranate sour, f) alginat sample)

Dallabona ve ark., (2020) yaptıkları çalışmada aljinat mikrokapsülleri ile ilgili 3450–3100  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki soğurmanın –OH grupları, 1688-1600  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki soğurmanın ise simetrik ve

asimetrik karboksil iyonlarından ( $\text{COO}^-$ ) kaynaklandığı belirtilmektedir. Aynı çalışmada 1504-1360  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki piklerin aromatik halkadaki C=C, 1400-1000  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki piklerin

ise C-O-C kaynaklı olabileceği ifade edilmektedir. Antosiyaninlerden özellikle siyanidin bileşenlerinin 3100-3400 aralığında (O-H simetrik), diğerlerinin ise 2900-2840  $\text{cm}^{-1}$  (C-H alifatik), 675-870  $\text{cm}^{-1}$  ve 1660 (C=C) bandında olduğu ve aljinat küreciklerindeki antosiyaninlerin de bunu doğruladığı ifade edilmiştir (Dallabona ve ark., 2020). Bununla birlikte 3350  $\text{cm}^{-1}$  bölgesindeki belirgin pikin su absorpsiyonu kaynaklı olabileceği de vurgulanmıştır. Ayrıca 1076, 1516 ve 1260  $\text{cm}^{-1}$  piklerinin de aromatik halkalar ve flavonoidlerin =C-O-C gruplarından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Benzer şekilde nar ekşisi eklenmiş mikrokapsüllerde ve nar ekşisi örneğinin kendisinde yapılan FTIR analizi sonucunda 3343-3255  $\text{cm}^{-1}$  aralığında belirlenen piklerin -OH grupları, 1639-1595  $\text{cm}^{-1}$  arasındaki soğurma COO- grupları, %16 ve %32 nar ekşisi eklenmiş örneklerde belirlenen piklerin aromatik halkadaki C=C ve yine %16 ve %32 nar ekşisi eklenmiş örneklerde ve nar ekşisinde 1344-1030  $\text{cm}^{-1}$  arasında belirlenen piklerin de C-O-C kaynaklı olabileceği değerlendirilmiştir.

## Sonuçlar

Çalışma kapsamında %2, 8, 16 ve 32 olmak üzere dört farklı oranda nar ekşisi eklenmiş aljinat kaplama materyali kullanılarak jelleşme yöntemi ile üretilen mikrokapsüller üretilmiştir. Üretilmiş mikrokapsüllerin kuru madde içeriği,  $a_w$  değeri, kapsül çapı, yığın yoğunluğu ve  $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$  renk değerleri ve FTIR analiz sonuçlarının genel olarak benzer çalışmalarda üretilen mikrokapsüller ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Eklenen nar ekşisi oranı arttıkça mikrokapsüllerde kuru madde içeriği ve kapsül çapının arttığı,  $a_w$  değeri ve yığın yoğunluğunun ise azaldığı tespit edilmiştir. Mikrokapsüllerde antosiyanin içeriğinin ise 0.042 ile 0.981 mg/kg aralığında tespit edildiği ve eklenen nar ekşisi oranı arttıkça mikrokapsüllerin antosiyanin içeriğinin de arttığı bildirilmiştir. Ayrıca %32 nar ekşisi eklenen örneklerde arzu edilen renk yoğunluğu ve antosiyanin içeriği daha yüksek bulunmasına rağmen kapsül şekli küresellikten uzaklaşarak bozulmuştur. Eklenen nar ekşisi oranındaki artışın maliyeti de arttırdığı göz önüne alındığında %16 oranında nar ekşisi eklenerek üretilen mikrokapsüllerin özellikle modernist mutfaklarda kullanımı tavsiye edilebilir. Gıda uygulamalarında aktif maddelerin taşınmasında tek tip boyut dağılımına sahip küresel boncukların tercih edildiği dikkate

alındığında üretilen kapsüller kabul edilebilir bir formdadır. Diğer taraftan nar ekşisi antosiyanin içeriği, renk ve lezzeti nedeniyle mutfaklarda ve gıda sanayiinde uygulama alanı bulan bir üründür. Bununla birlikte nar ekşisinin doğrudan kullanılması sonucu oluşabilecek keskin-acı-buruk tat ve istenmeyen renklerin salınması kapsülleme ile kontrol edilebilecek ve kullanıldığı ürünün fiziksel özellikleri iyileştirilebilecektir.

## Yazarların Katkısı

Elif AYKIN-DİNÇER ve Cüneyt DİNÇER denemenin planlanması, mikrokapsüllerin üretimi, analizler, istatistik değerlendirme ve makalenin yazım sürecinde, Osman Kadir TOPUZ denemenin planlanması, çalışmanın fonlanması ve makalenin yazım sürecinde görev almıştır.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar tarafından bildirilen herhangi bir çıkar çatışması yoktur.

## Kaynaklar

- AOAC. (2000). Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 17th edition. AOAC, Washington DC
- Apaydin, E. (2008). Nar suyu konsantresi üretim ve depolanma sürecinde antioksidan aktivitedeki değişimler (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Arriola, N. D. A., Chater, P. I., Wilcox, M., Lucini, L., Rocchetti, G., Dalmina, M., ... & Amboni, R. D. D. M. C. (2019). Encapsulation of stevia rebaudiana Bertoni aqueous crude extracts by ionic gelation—Effects of alginate blends and gelling solutions on the polyphenolic profile. *Food Chemistry*, 275, 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.086>
- Aykın-Dinçer, E., Özdemir, M., & Topuz, A. (2021). Quality characteristics of bone broth powder obtained through Refractance Window™ drying. *LWT-Food Science and Technology*, 147, 111526. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111526>
- Baysal, Z. (2019). Nar ekşisi üretiminde durultma maddeleri dozajlarının kaliteye etkisi (Yüksek Lisans Tezi). Mersin Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Mersin.
- Belščak-Cvitanović, A., Bušić, A., Barišić, L., Vrsaljko, D., Karlović, S., Špoljarić, I., ... & Komes, D. (2016). Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale* L.) polyphenols and  $\beta$ -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin. *Food Hydrocolloids*, 57, 139-152. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.01.020>
- Budak, N. H., Ertekin-Filiz, B., Seydim, A. C., Koşkan, Ö., & Guzel-Seydim, Z. B. (2013). Comparison of antioxidant properties of traditional and commercial pomegranate sours. *Journal of Food, Agriculture &*

- Environment*, 11(3&4), 368-371. <https://doi.org/10.1234/4.2013.4663>
- Çam, M., İçyer, N. C., & Erdoğan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1), 117-123. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>
- Çoruhli, T. (2013). Kara dut antosiyaninlerinin iyonik jelyasyon yöntemi ile enkapsülasyonu ve enkapsülasyon parametrelerinin tepki yüzeyi metodu ile optimize edilmesi (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- da Silva Carvalho, A. G., da Costa Machado, M. T., Barros, H. D. D. F. Q., Cazarin, C. B. B., Junior, M. R. M., & Hubinger, M. D. (2019). Anthocyanins from jussara (*Euterpe edulis* Martius) extract carried by calcium alginate beads pre-prepared using ionic gelation. *Powder Technology*, 345, 283-291. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.01.016>
- Dallabona, I. D., de Lima, G. G., Cestaro, B. I., de Souza Tasso, I., Paiva, T. S., Laureanti, E. J. G., ... & Jorge, R. M. M. (2020). Development of alginate beads with encapsulated jaboticaba peel and propolis extracts to achieve a new natural colorant antioxidant additive. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 1421-1432. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.256>
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A., ... & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7, 452-490. <https://doi.org/10.1007/s12393-014-9106-7>
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D. M., & Kader, A. A. (2000). Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 4581-4589. <https://doi.org/10.1021/jf000404a>
- Gökmen, S., Palamutoğlu, R., & Sariçoban, C. (2012). Gıda endüstrisinde enkapsülasyon uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1), 36-50.
- Güzel, N. (2010). Nar suyu konsantresi üretim aşamalarında prosiyanidinlerdeki değişimler (Yüksek Lisans Tezi). Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karabiyikli, S., & Kışla, D. (2012). Inhibitory effect of sour pomegranate sauces on some green vegetables and kisir. *International Journal of Food Microbiology*, 155(3), 211-216. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.006>
- Koç, M., Sakin, M., & Kaymak-Ertekin, F. (2010). Mikroenkapsülasyon ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı. *Pamukkale University Journal of Engineering Sciences*, 16(1).
- Kulkarni, A. P., & Aradhya, S. M. (2005). Chemical changes and antioxidant activity in pomegranate arils during fruit development. *Food Chemistry*, 93(2), 319-324. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.029>
- Lansky, E. P., & Newman, R. A. (2007). Punica granatum (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of ethnopharmacology*, 109(2), 177-206. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.006>
- Öztaş, T. (2006). Mor havuç, konsantresi, şalgam suyu, nar suyu ve nar ekşisi ürünlerinde antioksidan aktivitesi tayini ve fenolik madde profilinin belirlenmesi (Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Ray, S., Raychaudhuri, U., & Chakraborty, R. (2016). An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. *Food Bioscience*, 13, 76-83. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 45(7), 1386-1394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02270.x>
- Tarone, A. G., Cazarin, C. B. B., & Junior, M. R. M. (2020). Anthocyanins: New techniques and challenges in microencapsulation. *Food Research International*, 133, 109092. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109092>
- Tavlaşoğlu, M. (2016). Kara havuç ekstraktının soğuk jelleşme yöntemiyle pektin ve/veya Na-aljinat ile enkapsülasyonu (Doktora Tezi). İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Toprakçı, İ., Torun, M., & Şahin, S. (2022a). Development of an encapsulation method for trapping the active materials from sour cherry biowaste in alginate microcapsules. *Foods*, 12(1), 130. <https://doi.org/10.3390/foods12010130>
- Toprakçı, İ., Torun, M., Torun, F. B., & Şahin, S. (2022b). Alginate-based hydrogels for trapping the polyphenols of *Hibiscus sabdariffa*: use of a statistical experimental design approach. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-11. <https://doi.org/10.1007/s13399-022-03421-0>
- Toprakçı, İ., Torun, M., & Şahin, S. (2023). Encapsulation of plum biowaste extract: design of alginate beads by response surface approach. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17(3), 2676-2687. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-01826-7>
- Topuz, O. K., Aygün, T., & Ural, G. N. (2020). Caviar-like hydrogel beads containing different concentrations of NaCl and melanin-free squid ink. *Food Bioscience*, 36, 100652. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100652>
- Turkmen, F. U., Takci, H. M., Sağlam, H., & Sekeroglu, N. (2019). Investigation of some quality parameters of pomegranate, sumac and unripe grape sour products from Kilis markets. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 11(1), 61-71. <https://doi.org/10.3920/QAS2018.1293>
- Tutun, S., & Yurdakul, O. Enkapsülasyon ve Gıda Teknolojisinde Kullanımı. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 13(2), 99-119. <https://doi.org/10.38137/vftd.1096571>
- Wang, W. D., & Xu, S. Y. (2007). Degradation kinetics of anthocyanins in blackberry juice and concentrate. *Journal of Food Engineering*, 82(3), 271-275. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.01.018>



# Horoz Karası (*Vitis vinifera* L) kuru üzüm ve üzüm çekirdeği metanol ekstraktlarının antioksidan özellikleri ile fenolik bileşikleri

## *Antioxidant properties and phenolic compounds of methanol extracts of raisin and grape seed of Horoz Karası (Vitis vinifera L)*

Gülcan KOYUNCU<sup>1\*</sup> , Filiz UÇAN TÜRKMEN<sup>2</sup> 

<sup>1</sup> Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Gıda İşleme Bölümü, Kilis, Türkiye

<sup>2</sup> Kilis 7 Aralık Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Kilis, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0001-7406-5331>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-3653-9433>

### To cite this article:

Koyuncu, G. & Uçan Türkmen, F. (2024). Horoz Karası (*Vitis vinifera* L) kuru üzüm ve üzüm çekirdeği metanol ekstraktlarının antioksidan özellikleri ile fenolik bileşikleri. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2): 293-303

DOI: 10.29050/harranziraat.1358296

### \*Address for Correspondence:

Gülcan KOYUNCU

e-mail:

gulcan.koyuncu@kilis.edu.tr

### Received Date:

11.09.2023

### Accepted Date:

01.06.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ÖZ

Beslenme ve sağlık üzerine önemli olumlu etkileri olan üzüm ve üzüm ürünlerinin biyoaktif özelliklerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, Horoz Karası (*Vitis vinifera* L) çeşidi kuru üzüm ve çekirdek metanol ekstraktlarının fitokimyasal özellikleri, farklı yöntemlerle antioksidan özellikleri ve fenolik bileşikleri belirlenmiştir. Kuru üzümün metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde miktarı  $0.662 \text{ mg GAE g}^{-1}$  olarak bulunurken, çekirdekte bu değer  $1.542 \text{ mg GAE g}^{-1}$  olarak belirlenmiştir. Toplam flavonoid madde ( $0.15 \text{ mg RE g}^{-1}$ ) ve askorbik asit ( $174.29 \text{ mg L}^{-1}$ ) miktarları çekirdekte daha yüksek tespit edilmiştir. DPPH radikal giderme aktivitesi kuru üzümde daha fazla bulunurken, FRAP antioksidan kapasitesi çekirdekte daha yüksek bulunmuştur. Tüm antioksidan analizlerinde kuru üzüm ve çekirdek arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Kuru üzümde en yüksek miktarda bulunan fenolik bileşikler flavonoidlerden kateşin hidrat ( $406.91 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ve flavonlardan krisin ( $331.60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) olurken, çekirdekte hidrosisinamik asitlerden kafeik asit ( $990.42 \text{ mg kg}^{-1}$ ) ve flavonlardan narinjin ( $310.56 \text{ mg kg}^{-1}$ ) olmuştur. Çekirdeklerin kuru üzüme kıyasla oldukça yüksek miktarda fenolik bileşik içerdiği de tespit edilmiştir. Elde edilen veriler Horoz Karası kuru üzüm ve çekirdeklerinin metanol ekstraktlarının içerdikleri biyoaktif özellikler sayesinde fenolik bileşen ve doğal antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Horoz Karası, Üzüm çekirdeği, Ekstraksiyon, Antioksidan kapasitesi, Fenolik bileşik

### ABSTRACT

It is of great importance to determine the bioactive properties of grapes and grape products that have significant positive effects on nutrition and health. In this study, phytochemical properties, antioxidant properties by different methods and phenolic compounds of raisins and seeds methanol extracts of Horoz Karası (*Vitis vinifera* L) variety were determined. While the total phenolic content of the methanol extracts of raisins was  $0.662 \text{ mg GAE g}^{-1}$ , this value was determined as  $1.542 \text{ mg GAE g}^{-1}$  in the seeds. The amounts of total flavonoid substance ( $0.15 \text{ mg RE g}^{-1}$ ) and ascorbic acid ( $174.29 \text{ mg L}^{-1}$ ) were found to be higher in the seeds. While DPPH radical scavenging activity was higher in raisins, FRAP antioxidant capacity was higher in seeds. In all antioxidant analyses, the differences between raisins and seeds were found to be

statistically significant ( $p < 0.05$ ). The phenolic compounds found in the highest amount in raisins were catechin hydrate ( $406.91 \text{ mg kg}^{-1}$ ) from flavonoids and chrysin ( $331.60 \text{ mg kg}^{-1}$ ) from flavones, while caffeic acid ( $990.42 \text{ mg kg}^{-1}$ ) from hydroxycinnamic acids in seeds and naringine ( $310.56 \text{ mg kg}^{-1}$ ) from flavones were found. It has also been determined that the seeds contain a very high amount of phenolic compounds compared to raisins. The data obtained revealed that methanol extracts of Horoz Karası raisins and seeds can be used as a phenolic component and natural antioxidant source thanks to the bioactive properties they contain. The differences between raisins and seeds were statistically significant in all antioxidant analyses.

**Key Words:** Horoz Karası, Grape seed, Extraction, Antioxidant capacity, Phenolic compound

## Giriş

Türkiye, coğrafi konumu ve ekolojik faktörleriyle bağcılığa oldukça elverişlidir ve birçok bölgesinde üzüm üretimi yapılmaktadır (Şimşek ve ark., 2004). Üzüm genellikle sofralık, kurutmalık ve şaraplık olmak üzere üç farklı amaçla işlenmektedir (Çelik ve ark., 2005). Ülkemizde 3.902.211 dekar alanda 1.856.929 ton sofralık, 1.430.160 ton kurutmalık, 382.911 ton şaraplık üzüm üretimi yapılmaktadır (TÜİK, 2022). Kuru üzüm besleyici özelliklerinin yanı sıra son zamanlarda sağlık açısından faydalı yönlerinin ortaya çıkmasıyla daha dikkat çeken bir ürün haline gelmiştir. Kuru üzüm içerdiği fenolik bileşikler, yüksek antioksidan kapasite, doymamış yağ asitleri ve zengin temel gıda bileşenleri sayesinde bu sağlık faydalarını sağlamaktadır. Bu bileşikler taze üzümde de bulunmalarına rağmen kuru üzümde miktarları artış göstermektedir (Karadeniz ve ark., 2000). Üzüm çekirdekleri önemli tarımsal ve endüstriyel atıklardan birisidir (Fernandes ve ark., 2013) ve fenolik bileşikler bakımından oldukça zengin bir kaynaktır (Torres ve ark., 2002).

Fenolik bileşikler, bitkilerde aromatik aminoasit metabolizması sırasında sentezlenen yan bileşiklerden meydana gelen ikincil metabolitlerdir. Fenolik bileşikler üzümlerin rengini, duyuşal özelliklerini vermektedir ve olgunlaşma sırasında şekerlerin katabolizması sırasında oluşturmaktadırlar. Fotosentez sonucu oluşan karbonun %2'si fenolik bileşiklere dönüşmektedir (Williams ve Grayer, 2004). Üzümü diğer meyvelerden ayıran önemli bir özelliği kabuğunda, etinde ve çekirdeğinde bulunan fenolik bileşiklerdir (Negro ve ark., 2003). Ekstrakte olabilen fenolik bileşiklerin %10'u meyve etinde, %30'u üzüm kabuğunda, %60'ı ise

çekirdekte bulunmaktadır (Duran, 2014). Üzüm ve ürünlerinde yüksek miktarda fenolik bileşiklerin bulunduğu ve bu bileşenlerin kardiyovasküler hastalıkları önlediği (Terra ve ark., 2007), antimitojen, antioksidan, antikanserijen (Sanchez, 2006) ve antimikrobiyal (Nychas ve ark., 2003) özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.

Üzüm meyvesinde tanımlanan başlıca fenolik bileşik grupları fenolik asitler, antosiyaninler, flavonoller, flavan-3-oller ve tanenler ve flavanollerdir (Ribereau-Gayon ve ark., 2006). Üzümde bulunan fenolik asitler; gallik, klorojenik, kafeik, siyirincik, p-kumarik, ferrulik, o-kumarik, trans-sinamik asit iken flavonoidler kateşin, vanilin, epikateşin, rutin, kuersetindir (Baydar ve Akkurt, 2001). Üzüm ve ürünlerinde bulunan fenolik bileşiklerin kompozisyonu olgunluk, çeşit, iklim, kültürel işlemler, toprağın fiziksel ve kimyasal özellikleri gibi faktörlerden etkilenmektedir (Arozarena ve ark., 2002).

Üzüm ve çekirdekler içerdikleri fenolik maddeler sayesinde antioksidan aktivite kazanmaktadır. Antioksidanlar kansere, yaşlanmaya, kalp-damar hastalıklarına neden olan serbest radikalleri etkisiz hale getirebilen bileşenlerdir. Bu nedenle tüm dünyada antioksidan aktivitesi yüksek, antosiyanince zengin meyvelere olan ilgi artmıştır (Scheerens, 2001). Yapay antioksidanların yol açabileceği toksik ve karsinogenik etkilerden dolayı gıda sanayinde doğal antioksidanların kullanımı önem kazanmıştır (Göktürk Baydar ve ark., 2007).

Bu çalışma kapsamında Horoz Karası kuru üzüm ve çekirdeklerinin metanol ekstraktlarının toplam fenolik madde, toplam flavonoid madde ve askorbik asit miktarlarının, farklı yöntemlerle (DPPH radikal giderim aktivitesi, fosfomolibdenyum, demir (II) iyonlarını şelatlama, demir iyonlarını indirgeme kapasitesi, trolks

eşdeğeri, bakır indirgeme kapasitesi) antioksidan kapasitelerinin ve fenolik bileşenlerinin tespit edilmesi hedeflenmiştir. Literatürde kuru üzümde ABTS, DPPH, FRAP, CUPRAC yöntemleri kullanılarak yapılan antioksidan analizlere rastlanırken; toplam flavonoid madde, askorbik asit, fosfomolibdenyum ve demir şelatlama yöntemleriyle yapılan biyoaktif madde ve antioksidan kapasite analizlerine rastlanmamıştır. Ayrıca Horoz Karası üzüm çekirdeğinde de sadece DPPH, FRAP ve demir(II) iyonlarını şelatlama aktivitesi tayinleri yapılarak antioksidan aktivite belirlenmiştir. Bu nedenle Horoz Karası üzüm ve çekirdeklerinin metanol ekstrelerinde farklı antioksidan yöntemleri kullanılarak antioksidanın belirlenmesi ve bu ekstrelerde fenolik bileşenlerin de açığa çıkarılmasından ötürü mevcut çalışmamız özgün bir nitelik taşımaktadır.

## Materyal ve Metot

### Materyal

Bu çalışmada kullanılan Horoz Karası kuru üzüm ve çekirdekleri, Kilis ili Musabeyli ilçesinde bağcılık yapan bir üreticiden kurutulmuş halde temin edilmiştir. Kuru üzüm ve çekirdekleri oda sıcaklığında cam kaplar içerisinde analizler yapıncaya kadar karanlık ve nemsiz bir ortamda  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

### Ekstraksiyon

Kuru üzüm ve çekirdekler öğütülerek (Arçelik K 3104), %85'lik metanol ile (1:10 (w/v)) 1 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Homejenize üzüm ve çekirdekler santrifüj edilip ( $+4^{\circ}\text{C}$ , 5000 rpm, 10 dk), süzölmüş (whatman no:1) ve elde edilen süpernatantın  $55^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta vakum evaporatörde metanolün uzaklaştırılmasıyla ekstraktlar (100 mg/mL) elde edilmiştir. Ekstraktlar analizler yapılınca kadar  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de buzdolabında muhafaza edilmiştir (Aydın, 2015).

### Toplam fenolik madde miktarı

Numunelerdeki toplam fenolik madde miktarı Ucan Turkmen ve Mercimek Takci (2018)'ya göre spektrofotometrik olarak belirlenmiştir.

Ekstraktlardan 0.5 mL alınarak üzerlerine 2.5 mL %10 (v/v) Folin-Ciocalteu reaktifi ve 2.5 mL %7.5 (w/v)  $\text{NaHCO}_3$  eklenmiş ve  $45^{\circ}\text{C}$ 'de 45 dk inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda 765 nm'de numunelerin absorbansları ölçülmüştür (Biochrom, Libra S60, B, İngiltere). Ekstraktların toplam fenolik madde miktarı gallik asit eşdeğeri (mg GAE  $\text{g}^{-1}$ ) olarak hesaplanmıştır ( $y=0.8286x$ ,  $R^2=0.997$ ).

### Toplam flavonoid madde miktarı

Ekstraktların toplam flavonoid madde miktarı, alüminyum klorür kolorimetrik yöntemle tespit edilmiştir. Numunelerden 1 mL alınarak 1:6 oranında seyreltilmiş ve üzerlerine %5 (w/v) 0.3 mL  $\text{NaNO}_2$  eklenerek 5 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda karışıma %10 (w/v)  $\text{AlCl}_3.6\text{H}_2\text{O}$ 'dan 0.6 mL ilave edilip, tekrar 5 dk inkübe edilip 1M NaOH çözeltisinden 2 mL eklenmiştir. Son hacim distile su ile 10 mL'ye tamamlanmış ve 510 nm'de absorbansı ölçülmüştür. Kuru üzüm ve çekirdeklerin toplam flavonoid madde miktarları mg RE  $\text{g}^{-1}$  (rutin eşdeğeri) olarak hesaplanmıştır (Ucan Turkmen ve Mercimek Takci, 2018).

### Askorbik asit miktarı

Kuru üzüm ve çekirdeklerin metanol ekstraktlarının L-askorbik asit miktarları, renk reaktifi olarak 2,6-diklorofenol-indofenol kullanılarak 518 nm'de spektrofotometrik absorbans ölçümleri ile mg  $\text{L}^{-1}$  olarak belirlenmiştir (Ucan Turkmen ve Mercimek Takci, 2018).

### DPPH radikal giderme aktivitesi

DPPH (2,2-difenil 1-pikrilhidrazil) radikalinin yıkımı sonucu renkteki değişimin spektrofotometrik olarak ölçülmesine dayanan metot kullanılmıştır. Ekstraktlardan 100  $\mu\text{L}$  alınarak üzerlerine 3900  $\mu\text{L}$  DPPH eklenerek 2 saat karanlıkta inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda numunelerin 515 nm'de absorbansları ölçülerek aşağıdaki formül yardımıyla hesaplama yapılmıştır (Ucan Turkmen ve Mercimek Takci, 2018).

$$\% DPPH \text{ Radikali Giderme Aktivitesi} = (\text{kontrol}_{abs.} - \text{örnek}_{abs.}) \times 100 / \text{kontrol}_{abs.} \quad (1)$$

#### Fosfomolibdenyum antioksidan kapasite testi

Reaktif çözeltilerden 3 mL alınarak 300 µL ekstrakt ile karıştırılmış ve 95°C'de 90 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda 695 nm'de absorban ölçülmüş ve toplam antioksidan kapasite mg troloks eşdeğeri g<sup>-1</sup> olarak hesaplanmıştır (Zengin ve ark., 2014).

#### Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi

Ekstraktlardan 1 mL alınarak üzerlerine 3.7 mL distile su ve 100 µL 2 mM FeCl<sub>2</sub> ilave edilmiş ve 30 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir. Süre bitiminde 200 µL 5 mM ferrozin eklenmiş ve 10 dk sonunda 562 nm'de absorban ölçümü yapılmıştır. Kontrol olarak numune yerine distile su eklenerek işlemler yapılmıştır. Standart olarak EDTA (50-250 µg mL<sup>-1</sup>) kullanılmıştır. İnhibisyon yüzdeleri aşağıdaki formül aracılığı ile hesaplanmıştır (Ucan Turkmen ve ark., 2021).

$$\% \text{ Şelatlama Aktivitesi} = 1 - (\text{örnek}_{abs.} / \text{kontrol}_{abs.}) \times 100 \quad (2)$$

#### Demir indirgeme kapasitesi tayini (FRAP)

1 mL ekstrakta pH 6.6'ya ayarlanmış 0.2 M'lık fosfat tamponundan 2.5 mL, %1 (w/v) K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> çözeltilisinden 2.5 mL ilave edilerek 20 dk 50°C'de inkübasyona bırakılmış ve %10 (w/v) TCA'dan 2.5 mL ilave edilerek santrifüjlenmiştir (2500 rpm, 10 dk). Süpernatantlardan 2.5 mL alınarak üzerine 2.5 mL distile su ve %0.1 (w/v) FeCl<sub>3</sub>'den 0.5 mL ilave edilerek 700 nm dalga boyunda spektrofotometrik absorban ölçümü yapılmıştır (Ucan Türkmen ve ark., 2022).

#### Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite testi (TEAC)

2.45 mM potasyum persülfat içeren 7 mM ABTS solüsyonu hazırlanmıştır. Bu çözelti, ABTS radikalini üretmek için 12 ve 16 saat boyunca 20°C'ye ayarlanmış bir inkübatörde tutulmuştur. Radikal solüsyonu, numuneleri ve Troloks standardını seyreltmek için kullanılan PBS (fosfat tamponu; Fosfat Tampon Salin) solüsyonu hazırlanmıştır. 0.1 M fosfat tamponuna 8.77 g

NaCl eklenmiş ve pH 7.4'e ayarlanmıştır. Analize başlamadan önce 1 mL ABTS radikal çözeltilisi alınmış ve yaklaşık 90-100 mL PBS ile 734 nm'de 0.700 ± 0.02'lik bir absorbansa seyreltilmiştir. Daha sonra 20 µL ekstrakt ve 2 mL PBS karıştırılmış; absorban 6 dakika boyunca dakika başına ölçülmüştür. Sonuçlar hem yüzde inhibisyon olarak verilmiş hem de TEAC (Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi) değeri olarak µM troloks eşdeğeri 10 g L<sup>-1</sup> şeklinde ifade edilmiştir (Ucan Türkmen ve ark., 2020).

#### Bakır iyonu indirgeme aktivitesi (CUPRAC)

Ekstraktlardan 0.5 mL alınarak üzerlerine 10 mM CuCl<sub>2</sub>'den 1 mL, 7.5 mM neokuproinden 1 mL ve 1 M, pH 7'ye ayarlanmış NH<sub>4</sub>Ac tamponundan 1 mL ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir. Aynı şekilde CuCl<sub>2</sub> içermeyen kör hazırlanmış ve 450 nm'de absorbanları ölçülmüştür (Baltacı ve ark., 2021).

#### Fenolik bileşiklerin tayini

Kuru üzüm ve çekirdek ekstraktlarındaki fenolik bileşenler, ters-faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (Agilent, 1260 Infinity RP-HPLC, USA) ve C18 kolonu (5 µm, 4.6 x 250 mm, ACE Generix) kolonu kullanılarak belirlenmiştir. Enjeksiyon hacmi: 10 µl, Fırın sıcaklığı: 30°C, Dedektör: DAD, Mobil faz A: %0,1 fosforik asit-su çözeltilisi, Mobil faz B: %100 asetonitril. Fenolik bileşenlerin miktarı dış standart yöntemi ile alıkonma zamanlarına göre mg kg<sup>-1</sup> olarak belirlenmiştir (Mizzi ve ark., 2020).

#### İstatistiksel analiz

Kuru üzüm ve çekirdek ekstraktlarının farklı antioksidan analizlerine göre anlamlı bir farklılık gösterip göstermediğini belirlemek için SPSS 23.0 paket programı kullanılmıştır. Üzüm ve çekirdek arasındaki farkın önemi bağımsız örneklem T-testi ile belirlenmiştir (p<0.05).

#### Bulgular ve Tartışma

*Kuru üzüm ve çekirdek metanol ekstraktlarının fitokimyasal özellikleri ve antioksidan aktiviteleri*

Kuru üzüm ve çekirdek numunelerinin toplam fenolik madde (TPC), toplam flavonoid içeriği (TFC), askorbik asit miktarı (AAA), DPPH inhibisyonu, fosfomolibdenyum, demir iyonlarını şelatlama, FRAP, TEAC ve CUPRAC analizleri için bağımsız örneklem T-testi kullanılmış ve analiz

sonuçları Çizelge 1’de verilmiştir. Yapılan analizler sonucunda kuru üzüm ve çekirdekler arasında tüm analizler açısından istatistiksel olarak önemli bir fark olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.05$ ).

Çizelge 1. Kuru üzüm ve çekirdeklerin metanol ekstraktlarının fitokimyasal özellikler ile antioksidan aktivitelere karşı bağımsız örneklem T-testi sonuçları

Table 1. Independent sample T-test results of methanol extracts of raisins and seeds against phytochemical properties and antioxidant activities

| Analizler<br><i>Analyzes</i>   | Örnek<br><i>Sample</i>     | N | Ortalama<br><i>Mean</i> | Standart Sapma<br><i>Standard Deviation</i> | t       | SD | p*   |
|--|----------------------------|---|-------------------------|---|---------|----|------|
| Toplam fenolik madde<br>(mg GAE g <sup>-1</sup> )<br><i>Total phenolic substance (mg GAE g<sup>-1</sup>)</i>     | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | 0.662                   | 0.01  | -7.408  | 2  | 0.01 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | 1.542                   | 0.21  |         |    |      |
| Toplam flavonoid madde<br>(mg RE g <sup>-1</sup> )<br><i>Total flavonoid substance (mg RE g<sup>-1</sup>)</i>    | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | 0.01                    | 0.00  | -117.04 | 4  | 0.00 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | 0.15                    | 0.00  |         |    |      |
| Askorbik asit miktarı<br>(mg l <sup>-1</sup> )<br><i>Amount of ascorbic acid (mg L<sup>-1</sup>)</i>             | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | 55.51                   | 1.09  | -59.081 | 4  | 0.00 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | 174.29                  | 3.31  |         |    |      |
| DPPH radikali giderme aktivitesi<br>(%)<br><i>DPPH radical scavenging activity (%)</i>                           | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | 86.96                   | 0.51  | 31.824  | 4  | 0.00 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | 62.68                   | 1.22  |         |    |      |
| Fosfomolibdenyum analizi<br>(µg TE g <sup>-1</sup> )<br><i>Phosphomolybdenum analysis (µg TE g<sup>-1</sup>)</i> | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | 2.52                    | 0.02  | -5.489  | 4  | 0.00 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | 2.75                    | 0.06  |         |    |      |
| Demir (II) iyonlarını şelatlama aktivitesi<br>(%)<br><i>Chelating activity of iron (II) ions (%)</i>             | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | -                       | -   | -22.589 | 4  | 0.00 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | 33.29                   | 1.60  |         |    |      |
| FRAP (abs.)<br><i>FRAP (abs.)</i>  | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | 2.329                   | 0.02  | -5.238  | 4  | 0.00 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | 2.611                   | 0.09  |         |    |      |
| TEAC (% inhibisyon)<br><i>TEAC (% inhibition)</i>  | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | 2.50                    | 0.83  | 5.665   | 4  | 0.00 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | -                       | -   |         |    |      |
| TEAC (µM troluks eşdeğeri 10 g <sup>-1</sup> )<br><i>TEAC (µM trolox equivalent 10 g<sup>-1</sup>)</i>           | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | 20.05                   | 0.06  | 12.788  | 4  | 0.00 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | -                       | -   |         |    |      |
| CUPRAC (mg troluks eşdeğeri g <sup>-1</sup> )<br><i>CUPRAC (mg trolox equivalent g<sup>-1</sup>)</i>             | Kuru Üzüm<br><i>Raisin</i> | 3 | 92.20                   | 3.27  | -15.921 | 4  | 0.00 |
|  | Çekirdek<br><i>Seed</i>    | 3 | 204.46                  | 11.76                                       |         |    |      |

\* $p < 0.05$  olan değerleri içeren gruplar arasındaki sonuçlar istatistiksel olarak önemlidir.

\*Results between groups with values of  $p < 0.05$  are statistically significant.

Üzüm çekirdeklerindeki TPC, TFC ve AAA miktarları sırasıyla 1.542 mg GAE g<sup>-1</sup>, 0.15 mg RE



$g^{-1}$ , 174.29  $mg L^{-1}$  bulunmuş olup tüm değerler üzümde tespit edilen sonuçlardan daha yüksektir. DPPH radikal giderme aktivitesi kuru üzümde daha fazla (%86.96) belirlenirken; FRAP, CUPRAC ve fosfomolibdenyum sonuçları çekirdekte daha yüksek tespit edilmiştir. Ekstraktların 100  $mg mL^{-1}$  konsantrasyonda TEAC değerleri sadece üzümde, demir iyonlarını şelatlama aktivitesi ise sadece çekirdek metanol ekstraktlarında belirlenmiştir.

Şelatlama aktivitesi, standart şelatör EDTA'ya kıyasla değerlendirilmiş ve bu aktivite EDTA'dan daha düşük bulunmuştur (%80.16-94.42; 50-250  $\mu g mL^{-1}$  troloks konsantrasyonunda). Ekstraktlarda belirlenen FRAP ve CUPRAC değerleri standartlara kıyasla oldukça yüksek bulunmuştur (Çizelge 2). Çizelge 2. FRAP, demir iyonlarını şelatlama aktivitesi (Ucan Turkmen ve ark., 2020) ve CUPRAC analizleri için kullanılan standartlar

Table 2. Standards used for FRAP, chelating activity of iron ions (Ucan Turkmen et al., 2020) and CUPRAC analysis

| Analizler<br>Analyses   | Standartlar<br>Standards                    | Konsantrasyonlar<br>Concentrations |                             |                         |                         |                        |
|---|---|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
|   |   | 20 $\mu g mL^{-1}$                 | 50 $\mu g mL^{-1}$          | 100 $\mu g mL^{-1}$     | 200 $\mu g mL^{-1}$     | 400 $\mu g mL^{-1}$    |
| FRAP (abs.)<br>FRAP (abs.)  | BHT<br>BHT                                  | 0.07±0.00 <sup>e</sup>             | 0.09±0.00 <sup>d</sup>      | 0.14±0.00 <sup>c</sup>  | 0.33±0.02 <sup>b</sup>  | 0.45±0.01 <sup>a</sup> |
|   | BHA<br>BHA                                  | 0.22±0.01 <sup>d</sup>             | 0.24±0.01 <sup>c</sup><br>d | 0.25±0.02 <sup>c</sup>  | 0.32±0.03 <sup>b</sup>  | 0.51±0.01 <sup>a</sup> |
|   | $\alpha$ -tokoferol<br>$\alpha$ -tocopherol | 0.13±0.00 <sup>e</sup>             | 0.15±0.00 <sup>d</sup>      | 0.16±0.01 <sup>c</sup>  | 0.20±0.01 <sup>b</sup>  | 0.29±0.01 <sup>a</sup> |
|   | Askorbik asit<br>Ascorbic acid              | 0.12±0.00 <sup>e</sup>             | 0.13±0.00 <sup>d</sup>      | 0.17±0.00 <sup>c</sup>  | 0.25±0.00 <sup>b</sup>  | 0.37±0.00 <sup>a</sup> |
| Demir iyonlarını şelatlama aktivitesi (%)<br>Chelating activity of iron ions (%)  | EDTA<br>EDTA                                | 50 $\mu g mL^{-1}$                 | 100 $\mu g mL^{-1}$<br>1    | 150 $\mu g mL^{-1}$     | 200 $\mu g mL^{-1}$     | 250 $\mu g mL^{-1}$    |
|   |   | 80.16±1.34 <sup>b</sup>            | 93.59±0.83<br>a             | 94.42±0.00 <sup>a</sup> | 94.83±0.00 <sup>a</sup> | 94.73±0.10<br>a        |
| CUPRAC (mg troloks eşdeğeri $g^{-1}$ )<br>CUPRAC (mg trolox equivalent $g^{-1}$ ) | Troloks<br>Trolox                           | 50 $\mu g mL^{-1}$                 | 100 $\mu g mL^{-1}$<br>1    | 150 $\mu g mL^{-1}$     | 200 $\mu g mL^{-1}$     | 250 $\mu g mL^{-1}$    |
|   |   | 5.25±0.01 <sup>e</sup>             | 11.33±0.27<br>d             | 17.17±0.42 <sup>c</sup> | 21.34±0.61 <sup>b</sup> | 26.62±0.42<br>a        |

\*Gösterilen veriler 3 verinin ortalama değerleridir. Grafikte aynı satırlarda farklı harfle ifade edilen değerler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ( $p<0.05$ ).

\*The data shown are the average values of 3 data. The difference between values expressed with different letters on the same lines in the graph is statistically significant ( $p<0.05$ ).

Balbaba ve Bağcı (2022), Horoz Karası yaş üzümde toplam fenol miktarının 360.5-484.7  $mg GAE 100 g^{-1}$ , DPPH radikal yakalama aktivitesinin ise %87-98 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Kök ve Bal (2017) ise Horoz Karası taze üzüm çeşidinde su:metanol (30:70) (v/v) ekstresinde toplam fenol miktarını 886.44  $mg GAE kg^{-1}$  olarak belirtmişlerdir. Öz (2018)'ün çalışmasında kurutmalık üzüm çeşitlerinin (Besni, Banazı Siyahı, Dımışkı, Horoz Karası, Kerküş, Rumi) etanol çekirdek ekstresinde bulunan toplam fenolik ve flavonoid madde miktarlarının ve antioksidan aktivitelerin (ABTS, DPPH, CUPRAC) et ve kabuğa oranla çok daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Kelebek ve ark. (2013), Antep Karası kuru üzümün ABTS, DPPH, FRAP ve ORAC antioksidan kapasite değerlerini sırasıyla 63.66, 40.47, 17.69 ve 77.41  $mmol L^{-1}$  troloks  $kg^{-1}$  olarak

belirlemişlerdir.

Kök (2020), üzümdeki fenolik bileşiklerin ve antosiyaninlerin konsantrasyonunun, üzüm çeşidi, iklim koşulları ve bağ yönetim uygulamaları gibi farklı faktörlere bağlı olduğunu ve Muscat Hamburg, Horoz Karası ve Cardinal çeşidi üzümde toplam fenolik bileşenlerin 1479.89-1945.41  $mg GAE kg$  taze meyve<sup>-1</sup> aralığında değiştiğini belirlemiştir. Breksa ve ark. (2010) 2.5 g örnek ve 5 mL çözgen (8:2 metanol:etanol(v/v)) ile hazırladıkları ekstrelerde, 16 farklı kuru üzüm çeşidinin antioksidan aktivitelerinin 316.3-1141.3  $mg GAE 100 g$  kuru ağırlık<sup>-1</sup> aralığında değiştiğini tespit etmişlerdir. Aras Aşçı ve Göktürk Baydar (2021), taze üzüm (Kalecik Karası, Öküzgözü, Emir, Narince), kuru üzüm (Karadimrit, Çekirdeksiz Sultani) ve şaraplarda (Kalecik Karası, Öküzgözü, Emir, Narince) toplam fenolik bileşik miktarını

1.45-1771 mg GAE g<sup>-1</sup> arasında belirlerken toplam flavanoid madde miktarını 0.15-197.55 mg RE g<sup>-1</sup> aralığında bildirmişlerdir. Tespit edilen en düşük değerler kuru üzümlere ait bulunmuştur.

Sarıçam (2014), bütün ya da toz halinde etüvde veya liyofilizatörde kurutulmuş Besni ve Horoz Karası üzüm çekirdeklerinin antioksidan özelliklerini belirlediği çalışmasında aseton:su (70:30, (v/v)) çözgen karışımıyla hazırladığı ekstrelerde ; Horoz Karası üzüm çekirdeklerinde toplam fenolik madde miktarını en yüksek toz-liyofilize (258.78 mg GAE g<sup>-1</sup>), en düşük ise bütün-etüvde kurutulmuş örneklerde (83.45 mg GAE g<sup>-1</sup>); DPPH radikal süpürme aktivitesini en yüksek toz-liyofilize (%90.27), en düşük toz etüv örneğinde (%80.23); FRAP değerlerini ise en yüksek toz-etüv (620.63 mg FeSO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>), en düşük bütün-etüvde kurutulan örnekte (468.07 mg FeSO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>) ve demir şelatlama aktivitesini en yüksek toz-liyofilize (%79.45) ve en düşük toz-etüv (%30.33) numunelerinde tespit ettiğini bildirmiştir.

Yalçın ve ark. (2013)'nın çalışmalarında 5 farklı üzüm çeşidinin çekirdeklerinde (Kalecik Karası, Kabarnet, Senso, Gamay, Öküzgözü) 10 g örnek ve 50 mL çözgen (etanol, metanol, aseton) kullanarak hazırladıkları ekstrelerde en yüksek DPPH inhibisyon aktivitesini %93.66 ile Öküzgözü çeşidinin metanol ekstresinde, en düşük aktiviteyi %20.34 ile Gamay çeşidinin etanol ekstresinde belirlemişlerdir. Toplam fenolik madde miktarında ise en yüksek değeri 583.03 mg GAE g kuru ekstrakt<sup>-1</sup> değeri ile Kabarnet çeşidinin aseton ile elde edilen ekstraktında bulmuşlardır. Burcova ve ark. (2019) organik asma posasının antioksidan, tokoferol ve polifenol içeriklerini belirledikleri çalışmalarında, üzüm çekirdeklerinin (58,65 µM troloks mg<sup>-1</sup>) kabuğa oranla (14,24 µM troloks mg<sup>-1</sup>)

<sup>1</sup>) yaklaşık 4 kat daha fazla antioksidan içerdiğini, çekirdeklerin etanol ekstraktlarındaki baskın fenolik bileşenlerin kumarik asit (10.97 g kg<sup>-1</sup>), rutin (6.79 g kg<sup>-1</sup>), kuersetin (3.75 g kg<sup>-1</sup>) ve kateşin (3.99 g kg<sup>-1</sup>) olduğunu bildirmişlerdir. Göktürk Baydar ve ark. (2007), Narince çeşidi üzüm çekirdeğinin aseton:su:asetik asit (90:9.5:0.5) ve etilasetat:metanol:su (60:30:10) ekstralarında toplam fenolik bileşik miktarlarını sırasıyla 627.98 ve 667.87 mg GAE g<sup>-1</sup> olarak bulmuşlardır.

Bulunan sonuçlar literatür ile karşılaştırıldığında benzerlikler ve farklılıklar bulunmaktadır. Bu durumun, üzümlerin taze veya kuru olması, üzüm ve çekirdek çeşidi, üzüm ve çekirdeğin yetiştirildiği yer ve iklim, çözücü ve ekstraksiyon yöntemi gibi değişkenlerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Kurutulmuş Horoz Karası üzüm çeşidinde ve çekirdeğinde metotta belirtilen ekstraksiyon yöntemi ve çözgenleri kullanılarak yapılmış farklı yöntemler kullanarak antioksidan kapasiteyi belirleyen başka bir çalışma bulunmamaktadır.

#### *Kuru üzüm ve çekirdek metanol ekstraktlarının fenolik bileşikleri*

Kuru üzüm ve çekirdeklerinin metanol ekstraktlarının fenolik bileşikleri Çizelge 3'de verilmiştir. Üzüm metanol ve çekirdek ekstraktlarının toplam fenolik içerikleri sırayla 1.10 ila 406.91 mg kg<sup>-1</sup> ve 9.73 ila 990.42 mg kg<sup>-1</sup> arasında değişiklik göstermiştir. Üzüm metanol ekstraktında en fazla bulunan fenolik bileşik kateşin hidrat iken, çekirdek metanol ekstraktında kafeik asit olmuştur. Üzüm ekstraktlarında 780.79 mg kg<sup>-1</sup> ve çekirdek ekstraktlarında 1944.77 mg kg<sup>-1</sup> fenolik bileşen tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Kuru üzüm ve çekirdek metanol ekstraktlarının fenolik bileşikleri (mg kg<sup>-1</sup>)Table 3. Phenolic compounds of raisin and seed methanol extracts (mg kg<sup>-1</sup>)

| Fenolik bileşikler<br><i>Phenolic compounds</i>           | Kuru üzüm<br><i>Raisin</i> | Çekirdek<br><i>Seed</i> |
|---|----------------------------|-------------------------|
| Hidroksibenzoik asitler<br><i>Hydroxybenzoic acids</i>    |                            |                         |
| Vanilik asit<br><i>Vanillic acid</i>                      | t.e.                       | 65.61                   |
| 4-Hidroksi benzoik asit<br><i>4-Hydroxy benzoic acid</i>  | 3.30                       | 189.28                  |
| Hidroksisinamik asitler<br><i>Hydroxycinnamic acids</i>   |                            |                         |
| o-kumarik asit<br><i>o-coumaric acid</i>                  | 2.80                       | t.e.                    |
| t-ferulik asit<br><i>t-ferulic acid</i>                   | t.e.                       | t.e.                    |
| Kafeik asit<br><i>Caffeic acid</i>                        | 29.68                      | 990.42                  |
| p-kumarik asit<br><i>p-coumaric acid</i>                  | t.e.                       | 34.89                   |
| Klorojenik asit<br><i>Chlorogenic acid</i>                | t.e.                       | t.e.                    |
| 3-Hidroksi sinamik asit<br><i>3-Hydroxy cinnamic acid</i> | 5.40                       | 9.73                    |
| Rosmarinik asit<br><i>Rosmarinic acid</i>                 | 1.10                       | 29.71                   |
| Salisilik asit<br><i>Salicylic acid</i>                   | t.e.                       | t.e.                    |
| t-sinamik asit<br><i>t-cinnamic acid</i>                  | t.e.                       | t.e.                    |
| Flavanonlar<br><i>Flavanones</i>                          |                            |                         |
| Narinjin<br><i>Narinjin</i>                               | t.e.                       | 310.56                  |
| Narinjenin<br><i>Narinjenin</i>                           | t.e.                       | t.e.                    |
| Flavonoller<br><i>Flavonols</i>                           |                            |                         |
| Rutin<br><i>Routine</i>                                   | t.e.                       | 90.99                   |
| Kuersetin<br><i>Quercetin</i>                             | t.e.                       | t.e.                    |
| Flavonlar<br><i>Flavones</i>                              |                            |                         |
| Krisin<br><i>Krisin</i>                                   | 331.60                     | t.e.                    |
| Flavonoidler<br><i>Flavonoids</i>                         |                            |                         |
| Kateşin hidrat<br><i>Catechin hydrate</i>                 | 406.91                     | 223.58                  |

t.e: Tespit edilemedi

t.e: Not detected

Williamson ve Carughi (2010), kuru üzümdeki fenolik içeriğin daha çok flavonollerden (kuersetin, kaemferol) ve fenolik asitlerden (kaftarik ve kutarik asit) kaynaklandığını bildirmişlerdir. Kelebek ve ark. (2013), Antep Karası kuru üzümünün toplam miktarı 885 mg kg<sup>-1</sup> olan 27 farklı fenolik bileşen tespit etmişlerdir. Bu

bileşikler içerisinde en yüksek miktarda bulunanları 149 mg kg<sup>-1</sup> ile (+)-kateşin, 92.99 mg kg<sup>-1</sup> ile trans kaftarik asit ve 72.52 mg kg<sup>-1</sup> ile (-)-epikateşin olmuştur.

Meng ve ark. (2011), 9 çeşit kuru üzümde 3,4-dihidroksibenzoik asidin 3.72-1846.32, salisilik asitin 6.79-1326.08, (+)-kateşinin 17.5-764.79,

kuersetinin 13.85-326.7, rutin 11.21-70.42, gallik asidin 0.35-69.60, kafeik asidin 10.04-66.47, şirinjik asidin 8.55-48.45, ferulik asidin 8.72-48.94 ve kumarik asidin 2.38-23.45 µg g km<sup>-1</sup> arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Breksa ve ark. (2010), 16 çeşit kuru üzüm çeşidinde gallik asit, kaftarik asit, rutin, kateşin, epikateşin, kuersetin-3-O-glikozit ve kaemferol3-O-glikozit fenolik bileşiklerinin tespit edildiğini bildirmişlerdir.

Wang ve ark. (2010), Muscadine üzüm posasında gallik asit, epikateşin, epigallokateşin, kateşin, mirsetin, kuersetin, kaempferol, ellajik asit, delfinidin, syanidin, petunidin, peonidin ve malvidin fenolik bileşiklerinin bulunduğunu; ayrıca toplam fenolik bileşik miktarının 34.1 mg GAE g ekstre<sup>-1</sup> olduğunu tespit etmişlerdir. Duran (2014), 8 farklı üzüm çekirdeğinde 4 farklı fenolik bileşik grubundan (hidroksibenzoik asit türevleri, hidrokisisinnamik asit türevleri, flavanoller ve flavonoller) 24 fenolik bileşen bulunduğunu belirtmiştir. Bu bileşiklerden çalışma ile uyumlu olan vanilik asit, 4- hidroksi benzoik asit, kafeik asit, p-kumarik asit ve rutin Horoz Karası çeşitlerinde de tespit edilmiştir.

Topalovic ve ark. (2012), üzümdeki fenolik bileşiklerin miktarlarının genetik, tarımsal uygulamalar, iklimsel, coğrafik etmenler ile bitkinin kuvveti ve olgunlaşma aşamalarına bağlı olarak farklılık gösterebileceğini belirtmişlerdir. Çalışmalar arasında olabilecek farklılıklar bu duruma bağlanabilir.

## Sonuçlar

Bu çalışma ile Kilis ilinin yetiştiriciliğinde ön planda olduğu Horoz Karası veya yöresel olarak bilinen adıyla Kilis Karası kuru üzüm ve çekirdeklerinin metanol ekstraktlarının fenolik bileşenleri ve antioksidan kapasiteleri literatüre kazandırılmıştır. Kuru üzümlerde 7, çekirdeklerde ise 9 farklı fenolik bileşen tespit edilmiştir. Ekstraktlarda tespit edilen fenolik ve flavanoid madde miktarlarına paralel olarak yüksek antioksidan kapasite de belirlenmiştir. Literatüre benzer olarak üzüm çekirdeklerinin meyveye kıyasla daha yüksek fenolik bileşen miktarı ve

antioksidan kapasitesi olduğu belirlenmiştir. Kuru üzüm ve çekirdeklerinde belirlenen yüksek antioksidan içeriğinin bu ürünlerin yapay antioksidanlara alternatif olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Ayrıca bu ürünlerin göstermiş oldukları biyoaktif özellikler günlük diyetle üzüm ve ürünlerine yer verilmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

## Ekler

Kilis 7 Aralık Üniversitesi BAP birimine (Proje No: 21-13112) ve fenolik bileşen tayininde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Ümit Haydar EROL'a teşekkür ederiz.

## Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

## Yazarların Katkısı

GK ve FUT deney planını geliştirmiş, deneysel çalışmaları gerçekleştirmiş ve GK tarafından makale yazılmıştır.

## Kaynaklar

- Aras Aşçı, Ö., & Göktürk Baydar, N. (2021). Exchange of total carbohydrate, minerals, and phenolics in grape and grape products. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 9(6), 1106-1113.
- Arozarena, I., Ayestar An, B., Cantalejo, M. A., Navarro, M., Vera, M., Abril, I., & Casp, A. (2002). Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from Highland low-quality vineyards over two years. *European Food Research and Technology*, 214, 303-309.
- Aydin, S., Yilmaz, O., & Gokce, Z. (2015). Protective effect of *Morus nigra* L. (mulberry) fruit extract on the liver fatty acid profile of wistar rats. *Pakistan Journal of Zoology*, 47(1), 255-261.
- Balbaba, N., & Bağcı, S. (2022). Horoz Karası üzüm çeşidinde bazı kalite parametrelerinin belirlenmesi. *Food and Health*, 8(4), 290-301.
- Baltacı, N., Aydogdu, N., Sarikurcu, C., & Tepe, B. (2021). *Onosma gracilis* (Trautv.) and *O. oreodoxa* (Boiss. & Heldr.): Phytochemistry, *in silico* docking, antioxidant and enzyme inhibitory activities. *South African Journal of Botany*, 143, 410-417.
- Baydar, N. G., & Akkurt, M. (2001). Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turkish*

- Journal of Agriculture and Forestry*, 25, 163-168.
- Brekša, A.P., Takeoka, G.R., Hidalgo, M.B., Vilches, A., Vasse, J., & Ramming, D.W. (2010). Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. *Food Chemistry*, 121(3), 740-745.
- Burcova, Z., Kreps, F., Schmidt, S., Strizincova, P., Jablonsky, M., Kyselka, J., Haz, A., & Surina, I. (2019). Antioxidant activity and the tocopherol and phenol contents of grape residues. *BioResources*, 14, 4146-4156.
- Çelik, H., Çelik, S., Marasalı Kunter, B., Söylemezoğlu, G., Boz, Y., Özer, C., & Atak, A. (2005). Bağcılıkta gelişme ve üretim hedefleri. *Türkiye Ziraat Mühendisliği IV. Teknik Kongresi*, (s. 565-588), 3-7 Ocak, Ankara, Türkiye.
- Duran, Z. (2014). *Malatya ve Elazığ illerinde yetiştirilen bazı üzüm çeşitlerinin organik asit, şeker ve fenolik madde bileşikleri ile antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malatya.
- Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*, 50, 161-166.
- Göktürk Baydar, N., Özkan G., & Yaşar S. (2007). Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. *Food Control*, 18, 1131-1136.
- Karadeniz, F., Durst, R. W., & Wrolstad, R. E. (2000). Polyphenolic composition of raisins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(11), 5343-5350.
- Kelebek, H., Jourdes, M., Selli, S., & Teissedre, P. L. (2013). Comparative evaluation of the phenolic content and antioxidant capacity of sun-dried raisins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2963-2972.
- Kok, D. (2020). Response of grape quality characteristics of some table grape varieties (*V. vinifera* L.) grown in Northwestern Turkey to heat summation index and latitude-temperature index. *Erwerbs-Obstbau*, 62, 17-23.
- Kök, D., & Bal, E. (2017). Compositional differences in phenolic compounds and anthocyanin contents of some table and wine grape (*V. vinifera* L.) varieties from Turkey. *Oxidation Communications*, 40(2), 648-656.
- Meng, J., Fang, Y., Zhang, A., Chen, S., Xu, T., Ren, Z., & Wang, H. (2011). Phenolic content and antioxidant capacity of chinese raisins produced in Xinjiang province. *Food Research International*, 44(9), 2830-2836.
- Mizzi, L., Chatzitzika, C., Gatt, R., & Valdramidis, V. (2020). HPLC analysis of phenolic compounds and flavonoids with overlapping peaks. *Food Technology and Biotechnology*, 58(1), 12-19.
- Negro, C., Tommasi, L., & Miceli A. (2003). Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresource Technology*, 87, 41-44.
- Nychas, G. J. E., Tassou, C. C., & Skandamis, P. (2003). Making the Most of Herbs, Spices and Their Active Components. In: S. Roller (Ed.). *Natural antimicrobials for the minimal processing of foods* (pp. 176-200).
- Öz, V. (2018). *Güneydoğu Anadolu Bölgesi çekirdekli kuru üzümünün bazı fitokimyasal özelliklerinin belirlenmesi* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.
- Ribereau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., & Lonvaud, A. (2006). *The chemistry of wine stabilization and treatments*. England, Ltd, England: John Wiley&Son.
- Sanchez, C.M. (2006). *Polyphenolic fractions from wine by-products as potential antitumoral and/or protective agents against UV damage* (Unpublished doctoral thesis). Universidad De Barcelona, Instituto De Investigaciones Químicas Y Ambientales De Barcelona-Csic.
- Sarıçam, A. (2014). *Üzüm çekirdeği ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Scheerens, J. C. (2001). Phytochemicals and the consumers: Factors affecting fruit and vegetable consumption and the potential for increasing small fruit in the diet. *Horttech*, 11, 547-556.
- Şimşek, A., Artık, N., & Başpınar, E. (2004). Detection of raisin concentrate (pekmez) adulteration by regression analysis method. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17, 155-163.
- Terra, X., Valls, J., Vitrac, X., Merrillon, Jm., Arola, L., Ardevol, A., Blade, C., Fernandez-Larrea, J., Pujadas, G., Salvado, J., & Blay, M. (2007). Grape-seed procyanidins act as antiinflammatory agents in endotoxin-stimulated raw 264.7 macrophages by inhibiting Nfkb signaling pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4357-4365.
- Topalovic, A., Godjevac, D., Perovic, N., & Trifunovic, S. (2012). Comparative study of the phenolic composition of seeds from grapes cv Cardinal and Alphonse Lavallee during last month of ripening. *Italian Journal of Food Science*, 24, 159-166.
- Torres, J. L., Varela, B., Garcia, M. T., Carilla, J., Matito, C., Centelles, J. J., Cascante, M., Sort, X., & Bobet, R. L. (2002). Valorization of grape (*Vitis Vinifera*) byproducts, antioxidant and biological properties of polyphenolic fractions differing in procyanidin composition and flavonol content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7548-7555.
- TÜİK, (2022). Türkiye İstatistik Kurumu. Bitkisel Üretim İstatistikleri Veri Tabanı. Retrieved from: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92&local>

e=tr.

- Ucan Turkmen, F., & Mercimek Takci, H. A. (2018). Ultraviolet-C and ultraviolet-B lights effect on black carrot (*Daucus carota* ssp. *sativus*) juice. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 1038-1046.
- Ucan Turkmen, F., Mercimek Takci, H. A., & Sarigullu Onalan, F. E. (2020). Evaluation of antioxidant activity of sour cherry stalk extracts by in vitro methods. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi*, 10(2), 290-301.
- Ucan Turkmen, F., Sarigullu Onalan, F. E., & Mercimek Takci, H. A. (2021). Antioxidant activities of pomegranate peel methanolic and water extracts by in vitro methods. *Natural Science and Discovery*, 4(1), 1-6.
- Ucan Türkmen, F., Sarıgüllü Önalın, F. E., & Mercimek Takci, H. A. (2022). Nar kabuklarının su ve metanol ekstraktlarının antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi. *Akademik Ziraat Dergisi*, 11(2), 363-372.
- Wang, X., Tong, H., Chen, F., & Gangemi, J. D. (2010). Chemical characterization and antioxidant evaluation of Muscadine grape pomace extract. *Food Chemistry*, 123, 1156-1162.
- Williams, C. A., & Grayer, R. J. (2004). Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Product Reports*, 21(4), 539-573.
- Williamson, G., & Carughi, A. (2010). Polyphenol content and health benefits of raisins. *Nutrition Research*, 30(8), 511-519.
- Yalçın, H., Sağdıç, O., Ekici, L., & Kavuncuoğlu, H. (2013). Ülkemizde işlenmiş üzümün çekirdek yağlarının yemeklik yağ kalitesinin belirlenmesi ve çekirdek ekstraktı ve yağın bazı yemeklik yağların stabilitesine etkisi. Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Proje No: FBA-10-2960, 37 s.
- Zengin, G., Sarikurcu, C., Aktumsek, A., Ceylan, R., & Ceylan, O. (2014). A comprehensive study on phytochemical characterization of *Haplophyllum myrtifolium* Boiss. endemic to Turkey and its inhibitory potential against key enzymes involved in alzheimer, skin diseases and type II diabetes. *Industrial Crops and Products*, 53, 244-251.



# Donmuş Muhafaza Edilen Pişmiş Sığır Köftelerinde Doğal Antioksidan Olarak Kızılcık (*Cornus mas*) Ekstraktının Kullanımı

## *The Use of Cornelian Cherry (*Cornus mas*) Extract as Natural Antioxidant in Cooked Beef Patties During Frozen Storage*

Şeyma ELGİN<sup>1</sup> , Orhan ÖZÜNLÜ<sup>2\*</sup> , Haluk ERGEZER<sup>3</sup> 

<sup>1,2,3</sup>Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-8792-645X>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0001-8633-253X>; <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0001-7489-165X>

### To cite this article:

Elgin, Ş., Özünlü, O. & Ergezer, H. (2024). Donmuş muhafaza edilen pişmiş sığır köftelerinde doğal antioksidan olarak kızılcık (*cornus mas*) ekstraktının kullanımı. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2): 304-320

DOI: 10.29050/harranziraat.1416330

\*Address for Correspondence:  
Orhan ÖZÜNLÜ  
e-mail:  
orhan1907gfb@hotmail.com.tr

Received Date:

08.01.2024

Accepted Date:

24.04.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ÖZ

Bu çalışmada, 200, 300 ve 500 ppm konsantrasyonlarında hazırlanan kızılcık ekstraktları sığır köftelerine katılanmış ve depolama boyunca (-18°C, 6 ay) köftelerin fizikokimyasal özelliklerinde (pH, renk, toplam fenolik madde miktarı, antiradikal aktivite değeri, TBARS değeri ve karbonil içeriği) meydana gelen değişiklikler araştırılmıştır. Kızılcık ekstraktının köftelerdeki pH değerini önemli oranda (P<0,05) etkilediği tespit edilmiştir. Depolama boyunca köftelerin parlaklık (L\*) ve kırmızılık (a\*) değerlerinde düşüş yaşanırken sarılık (b\*) değerlerinde ise önemli artışlar görülmüştür (P<0,05). Depolama boyunca tüm örneklerin toplam fenolik madde miktarında önemli düşüşler gözlenirken (P<0,05) oransal olarak en büyük düşüş (%50.11) K0 numaralı örnekte gerçekleşmiş ve bunu sırasıyla K200 (%26.20), K300 (%20.27) ve K500 (%10.96) numaralı örnekler takip etmiştir. Her bir analiz gününde gruplar arasında önemli farklılıkların olduğu (P<0,05) ve en büyük %ARA değerine K500 numaralı örneğin sahip olduğu görülmüştür. Artan konsantrasyonlardaki kızılcık ekstraktının köftelerdeki lipid ve protein oksidasyonunu önemli ölçüde engellediği gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kızılcık ekstraktı, oksidasyon, köfte, fizikokimyasal özellikler

### ABSTRACT

In this study, was to investigate changes occurred in physicochemical properties (pH, color, total phenolic content, DPPH radical scavenging activity, TBARS value and carbonyl content) of beef patties with the addition of different concentrations (200, 300 and 500 ppm) of the cornelian cherry extracts during the storage periods (-18°C, 6 months). The addition of the cornelian cherry extracts had a discernible effect on the beef patties' pH value (P<0.05). Throughout storage periods, the lightness (L\*) and redness (a\*) value of all samples were decreased although there were increased in yellowness (b\*) value. From the beginning to the end of the storage, the total phenolic content of the samples was decreased and this decrement was respectively in the K0 (%50.11), K200 (%26.20), and K300 (%20.27) and K500 (%10.96) groups. In terms of DPPH radical scavenging activity, there were significant differences among the samples at each evaluation period (P<0.05) and the K500 sample had the higher than the other samples. The increment of the cornelian cherry extracts has been highly effective found for preventing lipid and protein oxidation in cooked beef patties.

**Key Words:** Cornelian cherry extract, patty, oxidation, physicochemical properties

## Giriş

Büyükbaş ve küçükbaş kasaplık hayvanlardan elde edilen köfte tipi ürünler hem ülkemizde hem de dünyada severek tüketilmektedir. Köfte, çeşitli hayvanlardan elde edilen etin yağ ile birlikte kıyma makinasından geçirilmesinden sonra içine çeşitli baharatlar ile bazı katkı ve dolgu maddelerinin ilave edildiği bir üründür. Et her ne kadar protein, lipid, vitamin ve mineralce zengin bir gıda olsa da yüksek su aktivitesi ve pH değeri nedeniyle sınırlı bir raf ömrüne sahiptir. Et ve et ürünlerinin kalitelerinde olumsuz birtakım değişikliklere yol açarak ürünün tüketilemez hale gelmesine neden olan en önemli kimyasal değişimlerden birinin oksidasyon (lipid ve protein oksidasyonu) olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından belirtilmiştir (Martini ve ark., 2021; Werenska ve ark., 2022).

Bir üründe lipid ve protein oksidasyonun başlayabilmesi için ortamda öncelikle reaktif oksijen veya azot türleri, doymamış yağ asidi, aminoasitler ve oksijenin bulunması gerekir. Reaktif oksijen ve azot türleri, canlı hayvanların metabolik aktiviteleri (solunumları sonucunda) sonucunda endojen olarak üretilmelerinin yanında çevresel faktörlerinde (güneş ışınları, radyasyon, çevre kirliliği, gibi) bu bileşiklerin oluşumunu teşvik ettiği belirtilmiştir (Sarma ve ark., 2010). Canlı hayvanların bünyelerinde bulunan çeşitli protein (laktoferrin ve transferrin) ve enzimlerin (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, tiyoredoksin redüktaz, peroksi redoksinler, katalaz, glutatyon S-transferaz) oksidasyona karşı antioksidan etki gösterdiği bilinmektedir (Casteilla ve ark., 2001; Papuc ve ark., 2017). Hayvanın kesimiyle birlikte dolaşım sisteminin durmasıyla antioksidan enzimlerin etkisi hızla sona ermektedir. Bu maddelerin tükenmesiyle et yapısında bulunan demir içerikli hemoglobin ve myoglobin gibi çeşitli prooksidan bileşiklerin varlığıyla hem lipid hem de protein oksidasyonu katalizlenmektedir (Estevez ve Cava, 2004; Soladoye ve ark., 2015).

Lipidler büyük oranda doymuş ve doymamış yağ asitlerinden oluşan önemli gıda bileşenlerinden biridir. Kırmızı et, kanatlı ve su ürünlerine nazaran

daha fazla doymuş yağ asidi içermektedir. Hayvanın cins, yaş, cinsiyet, karkasın alındığı bölge, uygulanan teknolojik işlemler gibi birtakım parametrelerin etin doymuş veya doymamış yağ asidi profilini etkilediği bilinmektedir. Doymamış yağ asitleri doymuş yağ asitlerine göre stabil olmadığı için oksijen ile çok kolay bir şekilde reaksiyona girebilmektedir. Et ve ürünlerinin kalite karakteristiğinde olumsuz birtakım değişikliklere neden olan oksidasyonun ilk başta lipidlerde meydana geldiği ve ardından lipid oksidasyonu ara ürünlerinin (lipid radikali, alkoksi radikali, peroksi radikali) protein oksidasyonunu tetiklediği belirtilmiştir. Lipid ve protein oksidasyonu benzer şekilde 3 aşamadan (başlangıç, yayılma ve bitiş) oluşmaktadır. Etin bünyesinde bulunan doymamış yağ asitleri oksijen varlığında ortamda bulunan reaktif oksijen türleriyle reaksiyona girip lipid oksidasyonunu başlatır (Papuc ve ark., 2017; Oswell ve ark., 2018; Das ve ark., 2020). Lipid oksidasyonunun başlamasıyla birlikte et renk pigmenti olan myoglobinin metmyoglobine dönüştüğü ve depolama süresi boyunca etteki kırmızılığın yavaş yavaş azalarak yerini kahverengimsi-gri bir renge bıraktığı gözlenir. Ayrıca, lipid oksidasyonu sonucunda oluşan çeşitli aldehitler, ketonlar, uçucu organik bileşiklerin toksik karakterli oldukları ve insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilerinin olduğu bilinmektedir (Vieira ve ark., 2017; Kanner, 2007; Cohn, 2002; Halliwell ve Gutteridge, 1990).

Protein oksidasyonu, aminoasitlerin ortamda bulunan reaktif oksijen veya azot türleri ile ve bazı lipid oksidasyonu ara ürünlerinin reaksiyonu sonucu oluşan protein radikallerinin ileri düzeyde modifikasyonu olarak tanımlanır (Shacter, 2000). Protein oksidasyonu lipid oksidasyonuna nazaran daha yavaş gerçekleşmektedir. Ayrıca, lipid oksidasyonunda olduğu gibi protein oksidasyonunda da ışık, ısı, sıcaklık, radyasyon gibi çevresel faktörlerin yanı sıra boyut küçültme, kütleme, fermentasyon, tuzlama, tütsüleme, kurutma gibi ete uygulanan çeşitli teknolojik işlemlerin de protein oksidasyonunu katalizlediği belirtilmektedir (Ergezer ve ark., 2016; Oswell ve ark., 2018).



Genel olarak et ve ürünlerinin oksidasyonu sonucunda etin duyuşsal (istenilmeyen tat ve kokunun oluşumu, lezzet ve renk kaybı), besleyici değerde düşüşler (esansiyel aminoasitlerde azalma, A, D ve K vitamin kaybı, tekli veya çoklu doymamış yağ asitlerinde azalma) ve teknolojik özelliklerinde (proteinlerin çözünürlüğünde ve proteinlerin emülsifikasyon özelliklerinde düşüşler) olumsuz birtakım değışiklikler yaşanır (Devatkal ve ark., 2014; García-Lomillo ve ark., 2017).

Gıda endüstrisi, köfte tipi ürünlerin raf ömrünü uzatabilmek ve bunun yanında üründe meydana gelebilecek oksidatif reaksiyonları yavaşlatabilmek veya engellemek için çeşitli stratejileri (antimikrobiyal ve antioksidan karakterli maddelerin kullanımı, yağ asidi profilinde değışiklik, kolesterol miktarının azaltımı, tuz miktarının azaltımı gibi) geliştirmeye başlamıştır (Nikmaram ve ark., 2018). Bu amaçla bu tür ürünlerin üretiminde BHA (bütillenmiş hidroksi anisol), BHT (bütillenmiş hidroksi tolüen), PG (propil gallat) gibi sentetik antioksidan maddeler kullanılmaktadır (Hashemi ve ark., 2017; Sen ve Mandal, 2017). Ancak, yapılan bilimsel araştırmalar sonucunda sentetik karakterli antioksidan maddelerin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu tespit edildikten sonra bu durum hem bilim insanları hem de et endüstrisini bu maddelere alternatif olabilecek doğal karakterli çeşitli antioksidan maddelerin kullanımına yönelik Ar-Ge çalışmalarına yönlendirmiştir (Maqsood ve ark., 2006; Lorenzo ve ark., 2013; Falowo ve ark., 2014; Munekata ve ark., 2017; Şahin ve ark., 2017, Lorenzo ve ark., 2018). Literatür incelediğinde, son yıllarda antioksidanca oldukça zengin polifenol içerikli çeşitli meyve ve sebze ekstraktlarının (biberiye, yeşil çay, üzüm çekirdeği, Moringa bitki çiçeği, kimyon tohumu, nar kabuğu, brokoli tozu gibi) köfte tipi ürünlerin üretiminde kullanılmaya başlandığı görülmüştür (Naveena ve ark., 2008; Banerjee ve ark., 2012; Lorenzo ve ark., 2013; Lorenzo ve ark., 2014; Pateiro ve ark., 2015; Lorenzo ve Munekata, 2016; Turgut ve ark., 2016; Pereira ve ark., 2017; Chauhan ve ark., 2018;

Madane ve ark., 2019).

Kızılçık meyvesi, ılıman iklim bölgelerinde yetişebilen, kırmızı renkli ve eliptik şekillidir. Kızılçık, antioksidanca zengin bir meyve olmasının yanında kardiyovasküler rahatsızlıklar, idrar yolu enfeksiyonları ve kanser gibi pek çok hastalığın önüne geçilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Vinson ve ark., 2001; Sun ve ark., 2002; Lin ve ark., 2002).

Kızılçık meyvesinin et ve ürünlerinde kullanımına yönelik literatürde sınırlı sayıda çalışmaya ulaşılmıştır. Bunlardan birinde, kızılçık suyunun dana eti burgerlerinde asidik yapı oluşturması nedeniyle son ürün verimini düşürmüş olmasına rağmen lipid oksidasyonunun engellenmesinde etkili olduğu görülmüştür (Salejda ve ark., 2018). Başka bir çalışmada ise, kızılçık ekstraktı katkılı yemlerle beslenen kanatlılardan elde edilen etlerde 90 günlük donmuş depolama boyunca lipid oksidasyonunun kontrol grubuna kıyasla etkili bir şekilde önlendiği belirlenmiştir (İbrahim ve ark., 2021).

Bu çalışmada, antioksidanca oldukça zengin bir ürün olan kızılçık meyvesi ekstrakte edilerek (çözücü olarak %80 etanol ve %20 distile su kullanılmıştır) farklı konsantrasyonlarda (200, 300 ve 500 ppm) köftelere ilave edilmiş ve depolama boyunca (-18°C, 6 ay) fırında pişirilmiş (180°C, 25 dk) köftelerin fizikokimyasal özelliklerinde meydana gelen değışiklikler araştırılmıştır.

## **Materyal ve Metot**

### *Materyal*

Çalışmada kullanılan sığır kaburga eti Denizli ilindeki bir süpermarketten (Migros Süpermarket, Denizli), kızılçıklar ise Denizli ilindeki semt pazarından temin edilmiştir.

### *Kızılçık Meyvesinin Ekstraksiyonu*

Temin edilen kızılçıklar laboratuvara transfer edilmiştir. Burada kızılçıklar öncelikle çeşme suyu kullanılarak kaba kirlerinden arındırılmıştır. Temizlenmiş kızılçıkların çekirdekleri manuel olarak çıkarılmıştır. Ardından 200 g kızılçık el blenderinin (Braun MQ7045X Multi Quick 7, ABD) içerisine konulmuş ve üzerine 400 ml %80 etanol-

%20 saf su içeren çözücü ilave edilmiştir. Yaklaşık 2 dk boyunca el blenderinde parçalanmış örnekler Whatman (no:42) filtre kâğıdı kullanılarak filtre edilmiş ve ardından süzöntü Rotary evaporatör (Büchi Rotavapor R-114, St. Gallen, İsviçre) cihazında alkollü kısım tamamen uzaklaştırılana kadar evapore edilmiş ve geriye kalan sıvı kısım alınıp 200, 300 ve 500 ppm konsantrasyonlarda ekstraktlar hazırlanmıştır. Elde edilen kızılçık ekstraktları köfte üretiminde kullanılıncaya kadar derin dondurucuda (Regal CD 62210, Türkiye) muhafaza edilmiştir (-18 °C).

#### *Köftelerin Hazırlanması ve Paketlenmesi*

Köfte üretiminde bir süpermarketten temin edilen olgunlaşmış sığır kaburga eti soğuk zincir altında hızlı bir şekilde Pamukkale Üniversitesi Et ve Et Ürünleri İşleme Teknolojileri Laboratuvarına getirilmiştir. Dana kaburga etleri (toplamda 2 kg) öncelikle 3 mm delikli aynaya sahip kıyma makinesinden (PM-70, Mainca, Barselona, İspanya) geçirilmiş ve ardından kıymalar tartılarak dört eşit gruba (kontrol grubu ve farklı konsantrasyonlarda kızılçık ekstraktları ilave edilmiş üç farklı grup) ayrılmıştır. Her bir köfte formülasyonuna %4 oranında irmik, %1.5 oranında tuz ilave edilmiş ve elle 20 dk boyunca yoğurulmuştur. Kontrol grubu dışındaki gruplara ise daha önce konsantrasyonları ayarlanmış kızılçık ekstraktları (200, 300 ve 500 ppm) ilave edilmiştir. Daha sonra 4 farklı formülasyona (**K0**: kontrol grubu, **K200**: 200 ppm kızılçık ekstraktı ilaveli örnek grubu, **K300**: 300 ppm kızılçık ekstraktı ilaveli örnek grubu, **K500**: 500 ppm kızılçık ekstraktı ilaveli örnek grubu) sahip kıyma karışımları metal silindir şekil vericilerle (6 cm çapında, 2 cm yüksekliğinde) şekillendirilip 180 °C'ye ayarlanmış fırına (Kumtel LX-3525, Türkiye) yerleştirilip 25 dk boyunca ısı işleme tabi tutulmuştur. Fırından çıkarılan köfteler oda şartlarında soğumaya bırakılmış ve ardından örnekler kilitli buzdolabı poşetlerinin (Koroplast, Türkiye) içerisine yerleştirilip derin dondurucuda (Regal CD 62210, Türkiye) -18°C'de 6 ay süreyle muhafaza edilmiştir.

#### *Analizler*

#### *pH ve Renk Değeri*

Pişirilmiş köftelerdeki pH analizi Crison Basic 20 (İspanya) marka dijital pH metre kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için, 10 g köfte örneği alınıp cam beherin içerisine yerleştirilmiş ve üzerine 90 ml distile su ilave edilmiştir. Daha sonra karışım homojenizatörde yaklaşık 2 dk süreyle parçalanmıştır. Ardından pH probu karışımın içerisine daldırılmış ve okunan değer kaydedilmiştir. Ölçümden önce pH metre uygun tampon çözeltilerle kalibre edilmiştir.

Depolama boyunca pişirilmiş köfte örneklerinin aletsel renk değerlerinde (**CIE L\***: parlaklık, **CIE a\***: kırmızılık, **CIE b\***: sarılık) meydana gelen değişiklikleri belirlemek için Kalorimetre cihazı (Miniscan XE Plus, ABD) kullanılmıştır. Bunun için köfte örnekleri cam bir petrinin içerisine yerleştirilmiş ve kalorimetrenin konumu değiştirilerek 3 ayrı okumaları gerçekleştirilmiştir. *Toplam fenolik madde miktarı ve antiradikal aktivite*

Köftelerde toplam fenolik madde miktarı Li ve ark. (2006) tarafından geliştirilen Folin-Ciocalteus (F-C) metodu kullanılarak belirlenmiştir. Bunun için, 0.5 g köfte örnekleri alınıp deney tüpünün içerisine aktarılmış ve üzerine 5 ml metanol eklenerek buzdolabında (Regal VERA 455 A, Regal, Manisa, Türkiye) bir gece bekletilmiştir. Ardından uygun konsantrasyonlarda metanollü çözelti test tüplerine aktarılmıştır. 0.5 ml seyreltilen ekstrakt üzerine 0.2 N 2.5 ml Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Bu karışım üzerine 2 mL %7.5 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi eklenerek fenolik hidroksil gruplarının hidrojenlerini suya vermeleri sağlanmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında karanlık ortamda bekletilen karışımların maviye dönen renginin şiddeti 760 nm' de ölçülmüştür. Kör çözelti için 0.5 ml ekstrakt yerine aynı miktarda saf su, kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması içinde 0.5 mL ilgili standart çözeltilerden ilave edilmiştir.

Köfte örneklerinde antiradikal aktivite (ARA) DPPH yöntemi ile Fratianni ve ark. (2010)'a göre belirlenmiştir. Bunun için, 0.5 g köfte örnekleri alınıp deney tüpünün içerisine aktarılmış ve üzerine 5 ml metanol eklenerek buzdolabında (Regal VERA 455 A, Regal, Manisa, Türkiye) bir gece

bekletilmiştir. Metanollü çözelti uygun konsantrasyonlarda test tüplerine alınmıştır. Buna göre ekstraktlardan 0.1 mL alınarak vialler içerisine eklenmiştir. Her bir vialde 5 mL 0.1mM konsantrasyonlu DPPH çözeltisi eklenerek vorteks ile karıştırılmış ve 27 °C de inkübe edilmiştir. 20 dakika sonunda absorbanlar 517 nm dalga boyunda okunmuştur. Kör çözelti olarak saf metanol, kontrol çözeltisi olarak 0.1 mL ekstrakt yerine 0.1 mL su eklenmiştir. Ekstraktların antioksidan kapasitesinin bir ölçüsü olan %ARA değerleri aşağıdaki formüle göre (1) hesaplanmıştır.

Çalışmada kullanılan kızılık ekstraktındaki toplam fenolik madde miktarı kuru madde üzerinden 32.3 mg gallik asit eşdeğeri/g olarak belirlenirken, antiradikal aktivite değeri ise %83.09 olarak tespit edilmiştir.

$$\% \text{ARA} = Ak - \left( \frac{A\ddot{o}}{Ak} \right) \times 100 \quad (1)$$

**Ak:** Kontrolün absorbanı

**Aö:** Örneğin absorbanı

#### *Lipid ve protein oksidasyonunun tespiti*

Lipid oksidasyonu son ürünlerini saptamak amacıyla TBARS analizi Witte ve ark. (1970)'e göre yapılmıştır.

Protein oksidasyonunu belirlemek amacıyla toplam karbonil miktarı Oliver ve diğ. (1987)'e göre yapılmıştır.

#### *İstatistik analiz*

Analizler 2 tekrar ve 2 paralel şekilde gerçekleştirilmiştir. Ölçülen parametreler için ortalama değerler hesaplanmış ve Windows için SPSS yazılımı (SPSS 21.0 for Windows; SPSS Inc. Chicago, IL, ABD) kullanılarak varyans analizi ile karşılaştırılmıştır ve farklı Varyans Analizi (ANOVA) testleri kullanılmıştır. Bunun için köfteleri gruplara göre karakterize etmek için tek faktörlü bir ANOVA ve depolama süresinin kalite parametreleri üzerindeki etkisini araştırmak için hem grupları hem de depolama süresini dikkate alan iki faktörlü bir ANOVA testi uygulanmıştır. Ortalamalar ayrıca Duncan testi kullanılarak karşılaştırılmıştır.

İstatistiksel anlamlılık %95 güven düzeyinde belirlenmiştir (P<0.05). Ortalama değerler standart sapma ( $\pm$ Standart Sapma) ile birlikte raporlanmıştır.

## **Araştırma Bulguları ve Tartışma**

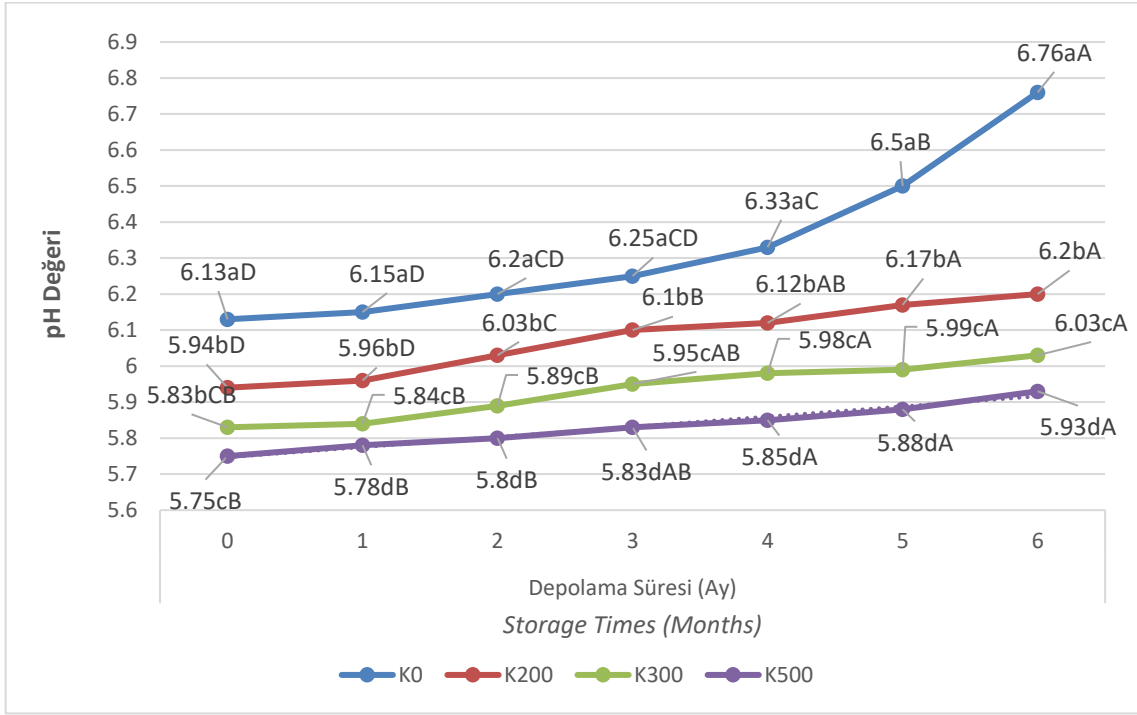
### *pH Değeri*

Pişirilmiş sığır köftelerinin pH değerinde meydana gelen değişiklikler Şekil-1'de verilmiştir. Örneklerin pH değerleri 5.75 ile 6.76 arasında değişiklik göstermiştir. Depolamanın başlangıcında en yüksek pH değeri K0 numaralı örnek grubunda tespit edilmesine rağmen kızılık konsantrasyonu arttıkça örneklerdeki pH değerinin düştüğü görülmüştür. Bu durumun kızılık ekstraktının yapısında bulunan asidik karakterli bileşiklerden (fenolik asit, tanin, proantosiyanidin ve flavonoid) kaynaklandığı düşünülmektedir (Daoutidou ve ark., 2021; Caillet ve ark., 2012; Al-Zoreky, 2009; Puupponen-Pimiä ve ark., 2005). 0. aydan 1. aya gelindiğinde, tüm örneklerin pH değerinde kısmi bir artış gözlenmesine rağmen bu değişim önemli bulunmamıştır (P>0,05). 1. aydan 2. aya gelindiğinde ise, K200 numaralı örneğin pH değerinde önemli bir artışın olduğu görülmüştür (P<0,05). Depolamanın 2. ayından 3. ayına gelindiğinde, K0, K300 ve K500 numaralı örneklerin pH değerinde kısmi bir artışın olmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır (P>0,05). 3 aylık süre zarfında K0 numaralı örneğin pH değerindeki artışın (6.25'ten 6.76 seviyesine yükselmesi) etin yapısında bulunan proteolitik karakterli enzimlerin faaliyeti ile alakalı olduğu düşünülmektedir. (Hernandez ve ark., 2004).

Depolamanın 4. ayından 6. ayına gelindiğinde ise, K300 ve K500 numaralı örneklerin pH değerinde önemli bir değişiklik tespit edilmemiştir (P>0,05). 0. ay hariç, her bir depolama sürecinde gruplar arasında önemli bir farklılığın olduğu gözlenmiştir (P<0,05).

Zahid ve ark. (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, dana köftelerinin üretiminde antioksidan kaynağı olarak BHT (%0.02), askorbik asit (%0.05) ve karanfil ekstraktı (%0.01) kullanılmış ve depolama boyunca (-18°C, 6 ay) tüm

örneklerin pH değerinde önemli bir artış görülmüştür.



Şekil 1. Depolama Boyunca (-18°C, 6 ay) Kızılılık Ekstraktı İlaveli Pişirilmiş Köftelerin pH Değerinde Meydana Gelen Değişiklikler (K0: kontrol grubu, K200: 200 ppm kızılılık ekstraktı ilaveli köfte grubu, K300: 300 ppm kızılılık ekstraktı ilaveli köfte grubu, K500: 500 ppm kızılılık ekstraktı ilaveli köfte grubu)

a, b, c, d: Aynı depolama günlerinde (farklı renkli çizgiler) gruplar arasındaki istatistiksel farkın önemli düzeyde olduğunu göstermektedir (P<0,05).

A, B, C, D: Aynı grup içerisinde (aynı renkli çizgiler) depolama süresi boyunca (-18°C, 6 ay) istatistiksel farkın önemli düzeyde olduğunu göstermektedir (P<0,05).

Figure 1. pH Values of cooked beef patties treated with different concentration levels of cranberry extract during storage (-18°C, 6 months) (K0: control, K200: 200 ppm cranberry extract added beef patty, K300: 300 ppm cranberry extract added beef patty, K500: 500 ppm cranberry extract added beef patty)

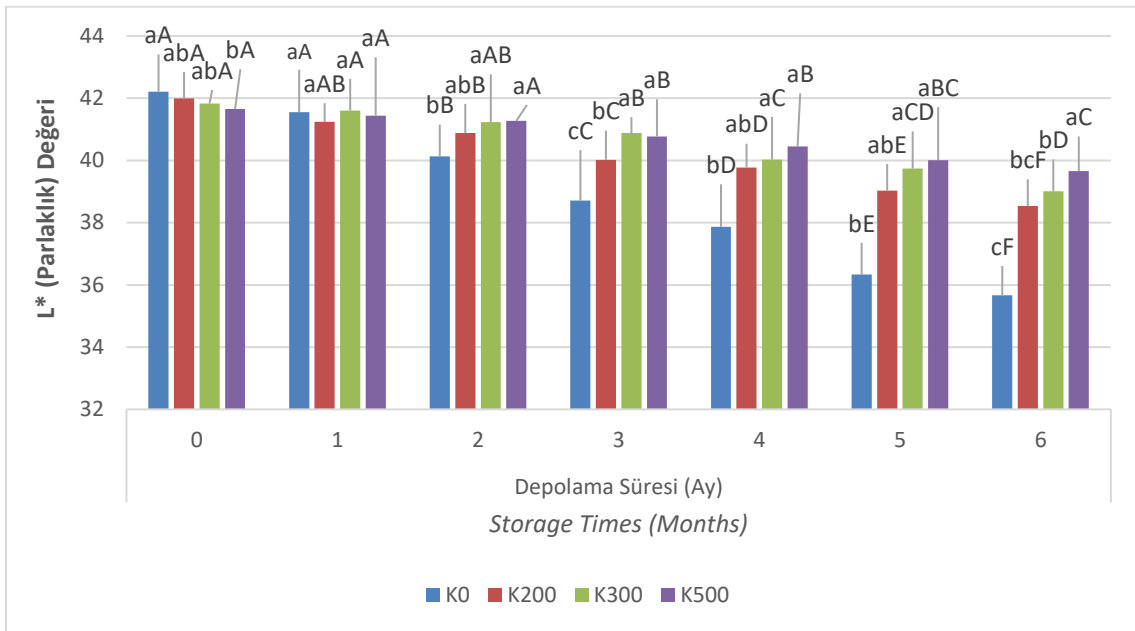
a, b, c, d: Indicates that the statistical difference (P<0,05) is significant at the same storage day (the lines with different colors) within the treatments.

A, B, C, D: Indicates that the statistical difference is significant within the same treatment (the lines with same colors) throughout storage (-18°C, 6 ay) (P<0,05).

### Renk Değeri

Depolama boyunca (-18°C, 6 ay) pişirilmiş sığır köftelerinin aletsel renk değerlerinde (L\*, a\* ve b\* değeri) meydana gelen değişiklikler Şekil-2, 3 ve 4'te verilmiştir. Depolamanın başlangıcında K0 numaralı örneğin en yüksek L\* değerine (42.21) sahip olduğu gözlenmiş ve gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). 1. ayda, gruplar arasında önemli bir farklılığın olmadığı gözlenirken depolamanın 2. ayına gelindiğinde K300 ve K500 numaralı örneklerin birbirine oldukça yakın parlaklık değerlerine sahip olduğu görülmüştür. 2., 3., 4. ve 5. aylarda, K0 numaralı örneğin en düşük

parlaklık değerine sahip olduğu ve K300 ve K500 numaralı örneklerin ise istatistiksel açıdan benzer olduğu tespit edilmiştir (P>0,05). Depolamanın sonunda, K200 (38,54) ve K300 (39,01) numaralı örneklerin istatistiksel açıdan benzer olduğu (P>0,05) ve en yüksek parlaklık değerine K500 (39.66) numaralı örnekte olduğu gözlenmiştir. Genel anlamda, depolama boyunca tüm örneklerin parlaklık değerinde önemli düşüşlerin olduğu ve bu düşüşün köftelerin depolanması sırasında açığa çıkan oksidatif reaksiyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Öznlü ve Egezer, 2022; Villalobos-Delgado ve ark., 2020).



Şekil 2. Depolama Boyunca (-18°C, 6 ay) Pişirilmiş Köftelerin L\* (Parlaklık) Değerinde Meydana Gelen Değişiklikler (K0: kontrol grubu, K200: 200 ppm kıvılcık ekstraktı ilaveli köfte grubu, K300: 300 ppm kıvılcık ekstraktı ilaveli köfte grubu, K500: 500 ppm kıvılcık ekstraktı ilaveli köfte grubu)

a, b, c: Aynı depolama gününde (farklı renkli sütunlar) gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0,05).

A, B, C, D, E, F: Depolama boyunca aynı grup içerisindeki (aynı renkli sütunlar) farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0,05).

Figure 2. L\* values of cooked beef patties treated with different concentration levels of cranberry extract during storage (-18°C, 6 months) (K0: control, K200: 200 ppm cranberry extract added beef patty, K300: 300 ppm cranberry extract added beef patty, K500: 500 ppm cranberry extract added beef patty)

a, b, c: The statistical difference is significantly found at the same storage day (the columns with different colors) within the treatments (P<0,05).

A, B, C, D, E, F: The statistical difference is significantly found within the same treatment (the columns with same colors) throughout storage (P<0,05).

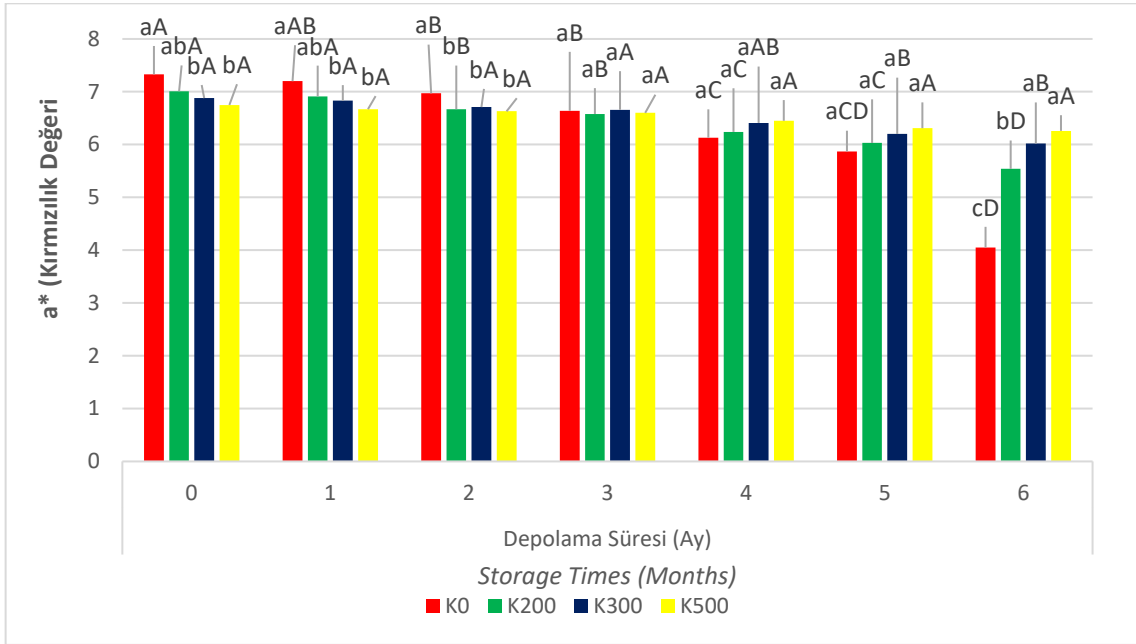
Çalışma sonuçlarımızın aksine, farklı oranlarda (%0, 0.4, 0.8, 1.2) siyah pirinç ekstraktının sığır köftesine ilave edildiği bir çalışmada, depolama boyunca (4°C, 6 gün) siyah pirinç ekstraktı ilaveli örneklerin parlaklık değerinde bir dalgalanmanın yaşandığı görülürken kontrol grubunda ise önemli bir değişikliğin olmadığını bildirilmiştir (Prommachart ve ark., 2020). Başka bir çalışmada ise, farklı oranlarda (%0.1, 0.2, 0.4) liyofilize edilmiş siyah karadut ekstraktının sığır köftesine ilave edildiği bir çalışmada, depolama boyunca (4°C, 15 gün) hem atmosferik hem de vakumla paketlenmiş örneklerin parlaklık değerlerinde bir dalgalanmanın olduğu belirtilmiştir (Turan ve Şimşek, 2021).

Piştirilmiş köftelerin kıvılcık değerinde meydana gelen değişiklikler Şekil-3'te verilmiştir. Örneklerdeki kıvılcık değerinin 4.05 ile 7.33 arasında değişkenlik gösterdiği ve depolamanın ilk 2 ayında K0 numaralı örneğin en yüksek kıvılcık değerine sahip olduğu görülmüştür. İlave edilen

ekstraktın rengi aletsel olarak tespit edilmemesine rağmen görsel olarak ekstrakt sarı-turuncu bir renge sahiptir. Bu nedenle farklı oranlardaki kıvılcık ekstraktı, piştirilmiş köftelerin kıvılcık değerinde artan oranlara bağlı olarak düşmeye neden olmuştur. Depolamanın 2. ayında, kıvılcık ekstraktı ilaveli örnek grupları arasında istatistiksel açıdan bir farklılık tespit edilmemiş (P>0,05) ve örnekler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan bir anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir (P<0,05). Depolamanın 3., 4. ve 5. aylarında gruplar arasında önemli bir farklılığın olmadığı (P>0,05) ve depolamanın sonunda en yüksek kıvılcık değerine K500 (6.26) numaralı örneğin sahip olduğu gözlenmiştir. Depolama boyunca tüm örneklerin kıvılcık değerinde bir düşüş görülürken (P<0,05) bu düşüşün en fazla kontrol grubunda (K0) yaşandığı görülmüştür. Antioksidan kaynağı olarak kullanılan kıvılcık ekstraktının köftelerdeki kıvılcık rengi önemli oranda koruması ürünlerin depolanması sırasında meydana gelen

lipid ve protein oksidasyonunu önemli ölçüde engellemesini göstermesi açısından büyük önem arz etmiştir (Salejda ve ark., 2018). Ayrıca, depolama boyunca pişirilmiş köftelerin aletsel renk

değerlerinde meydana gelen değişiklikler lipid ve protein oksidasyonu sonuçlarıyla da paralellik göstermiştir.



Şekil 3. Depolama Boyunca (-18°C, 6 ay) Pişirilmiş Köftelerin a\* (Kırmızılık Değeri) Değerinde Meydana Gelen Değişiklikler (K0: kontrol grubu, K200: 200 ppm kızılca ekstreli ilaveli köfte grubu, K300: 300 ppm kızılca ekstreli ilaveli köfte grubu, K500: 500 ppm kızılca ekstreli ilaveli köfte grubu)

a, b, c, d: Aynı depolama gününde (farklı renkli sütunlar) gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0,05).

A, B, C: Depolama boyunca aynı grup içerisindeki (aynı renkli sütunlar) farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0,05).

Figure 3. a\* values of cooked beef patties treated with different concentration levels of cranberry extract during storage (-18°C, 6 months) (K0: control, K200: 200 ppm cranberry extract added beef patty, K300: 300 ppm cranberry extract added beef patty, K500: 500 ppm cranberry extract added beef patty)

a, b, c, d: The statistical difference is significantly found at the same storage day (the columns with different colors) within the treatments (P<0,05).

A, B, C: The statistical difference is significantly found within the same treatment (the columns with same colors) throughout storage (P<0,05).

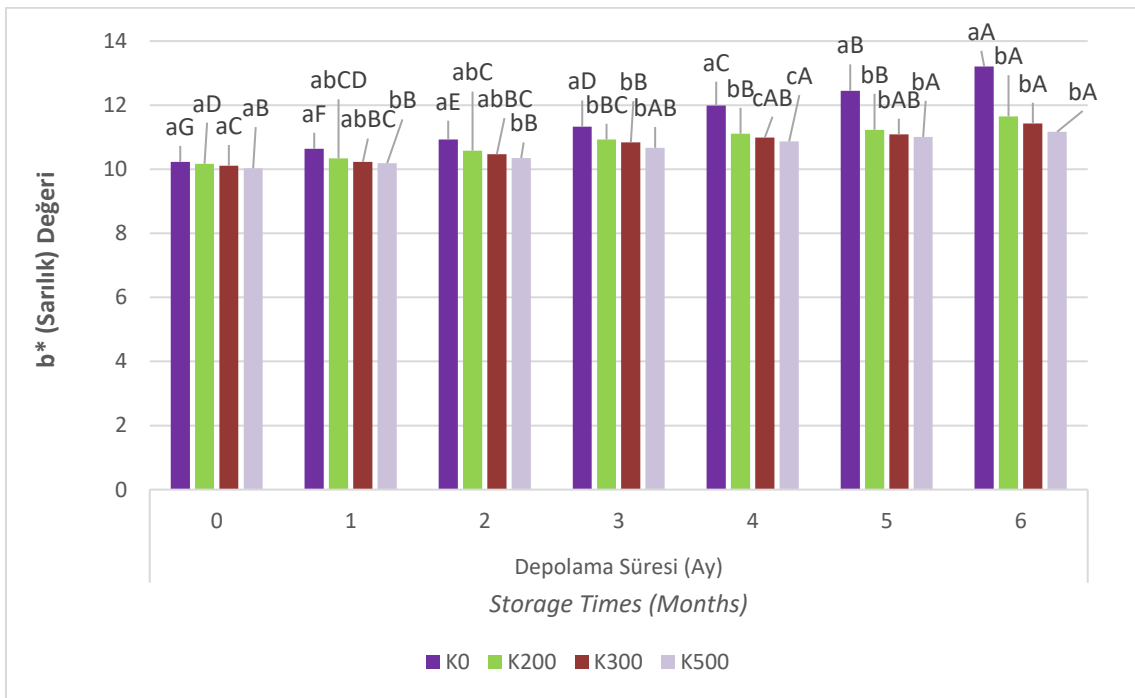
Farklı konsantrasyonlarda yeşil kahve tozu ekstraktının (250, 500 ve 1000 ppm) sığır köftesine ilave edildiği bir çalışmada, depolama boyunca (4°C, 14 gün) köftelerin kırmızılık değerinde önce bir düşüş daha sonra ise (depolamanın 7. gününden sonra) bir yükseliş olduğunu belirtilmiştir (Mostafa ve Azab, 2022). Babaoğlu ve ark. (2022) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, sığır köftelerinin üretiminde doğal bitki ekstraktları (kuş kirazı, böğürtlen, kırmızı frenk üzümü ve yaban mersini) kullanılmış ve genellikle depolama boyunca (4°C, 9 gün) tüm örneklerin kırmızılık değerinde önce bir düşüş (depolamanın ilk altı gününde) daha sonra ise bir yükseliş (depolamanın 6. gününden 9. gününe gelindiğinde) yaşandığını bildirmişlerdir.

Depolama boyunca pişirilmiş sığır köftelerinin aletsel sarılık değerinde meydana gelen değişiklikler Şekil-4'de verilmiştir. Depolamanın başlangıcında köfte örneklerinin sarılık değerlerindeki sonuçların birbirine benzer olduğu gözlenmiştir (P>0,05). Depolamanın 1. ve 2. aylarında K200 ve K300 numaralı örnekler arasında önemli bir farklılığın olmadığı (P>0,05) ve K500 numaralı örneğin ise en düşük sarılık değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. 3., 5. ve 6. aylarda, en yüksek sarılık değerine K0 numaralı örneğin sahip olduğu ve K0 numaralı örneğin diğer örnek gruplarına göre istatistiksel açıdan farklı olduğu görülmüştür (P<0,05). Depolamanın 4. ayında, K300 (10,99) ve K500 (10,87) numaralı örnekler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır

( $P>0,05$ ). Depolama boyunca tüm örneklerin sarılık değerinde önemli bir artışın olduğu ve bu artışın et renk pigmenti olan miyoglobinin ısı ile birlikte metmyoglobine dönüşmesiyle birlikte depolama boyunca ortamda bulunan başta oksijen, hemoglobin, demir gibi bileşiklerin etin yapısında bulunan lipidlerle reaksiyona girip lipid oksidasyonunu katalizlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Öznlü ve ark., 2022; Shimizu ve Iwamoto, 2022; Amaral ve ark., 2018; Byrne ve ark., 2002).

Sığır köftelerinin üretiminde portakal kabuğu, domates posası ve şeker kamışı posası ekstraktları

ilave edilmiş ve depolama sırasında ( $4^{\circ}\text{C}$ , 12 gün) modifiye atmosferde paketlenen ( $\%80 \text{O}_2 + \%20 \text{CO}_2$ ) örneklerin sarılık değerinde önemli bir artışın olduğu belirtilmiştir (Liang ve ark., 2022). Başka bir çalışmada ise, soğan zarı ekstraktlarının ( $\%0,01$ ,  $0,05$  ve  $0,1$ ) sığır köftesinin üretiminde kullanılmasıyla depolama sırasında ( $4^{\circ}\text{C}$ , 12 gün) köftelerin sarılık değerinde bir düşüşün olmasına rağmen bu düşüşün önemli olmadığı ( $P>0,05$ ) bildirilmiştir (Wang ve ark., 2022).



Şekil 4. Depolama Boyunca ( $-18^{\circ}\text{C}$ , 6 ay) Pişirilmiş Köftelerin  $b^*$  (Sarılık) Değerinde Meydana Gelen Değişiklikler (**K0**: kontrol grubu, **K200**: 200 ppm kıvılcık ekstraktı ilaveli köfte grubu, **K300**: 300 ppm kıvılcık ekstraktı ilaveli köfte grubu, **K500**: 500 ppm kıvılcık ekstraktı ilaveli köfte grubu)

<sup>a, b, c</sup>: Aynı depolama gününde (farklı renkli sütunlar) gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ).

<sup>A, B, C, D, E, F, G</sup>: Depolama boyunca aynı grup içerisindeki (aynı renkli sütunlar) farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ).

Figure 4.  $b^*$  values of cooked beef patties treated with different concentration levels of cranberry extract during storage ( $-18^{\circ}\text{C}$ , 6 months) (**K0**: control, **K200**: 200 ppm cranberry extract added beef patty, **K300**: 300 ppm cranberry extract added beef patty, **K500**: 500 ppm cranberry extract added beef patty)

<sup>a, b, c</sup>: The statistical difference is significantly found at the same storage day (the columns with different colors) within the treatments ( $P<0,05$ ).

<sup>A, B, C, D, E, F, G</sup>: The statistical difference is significantly found within the same treatment (the columns with same colors) throughout storage ( $P<0,05$ ).

#### Toplam Fenolik Madde ve Antiradikal Aktivite

Depolama boyunca pişirilmiş sığır köftelerin toplam fenolik madde ve antiradikal aktivite değerlerinde meydana gelen değişiklikler Çizelge-1'de verilmiştir. Kontrol grubuyla

karşılaştırıldığında kıvılcık ekstraktı ilaveli köftelerin toplam fenolik madde içerikleri daha yüksek bulunmuştur ve bu durumun kıvılcık ekstraktının bileşiminde yer alan çeşitli polifenollerin, fenolik asitlerin, flavonoidlerin ve

triterpenoidlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Her bir depolama sürecinde örnekler arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıkların olduğu tespit edilmiştir ( $P<0,05$ ). Depolama boyunca tüm örneklerin toplam fenolik madde miktarında önemli düşüşlerin yaşandığı görülürken ( $P<0,05$ ) oransal olarak en büyük düşüşün (%50.11) K0 numaralı örnekte ve bunu sırasıyla K200 (%26.20), K300 (%20.27) ve K500 (%10.96) numaralı örnekler takip etmiştir. Depolamanın 2. ayından (99.71 mg gallik asit/100 g ürün) 3. ayına (98.89 mg gallik asit/100 g ürün) gelindiğinde K500 numaralı örneğin toplam fenolik madde içeriğinde düşüşün olduğu ancak bu düşüşün önemli olmadığı belirtilmiştir ( $P>0,05$ ).

Sığır hamburger köftelerine farklı oranlarda kurutulmuş karanfil tozunun ilave edildiği bir çalışmada, depolama boyunca (4°C, 21 gün) tüm örneklerin toplam fenolik madde içeriğinde düşüşün olduğu ve bu düşüşün en fazla kontrol grubunda olduğu bildirilmiştir (Ahmed ve ark., 2022). Al-Juhaimi ve ark. (2020) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, mısır akasya ağacının taze meyvesi ekstrakte edilmiş ve farklı oranlarda (%0, 0.5, 1 ve 2) sığır hamburger köftesine ilave edilmiş ve depolama boyunca tüm örneklerin toplam fenolik madde miktarında önemli azalışların olduğu ve bu azalışın en çok kontrol ve %0.5 meyve ekstraktı ilave edilmiş hamburger köftesinde olduğu belirtilmiştir.

Çizelge 1. Depolama Boyunca Kızılçık Ekstraktı İlaveli Köftelerin Toplam Fenolik Madde Miktarında ve DPPH Antiradikal Aktivite Değerlerinde (%ARA) Meydana Gelen Değişiklikler

Table 1. Total phenolic content and DPPH antiradical activity of cooked beef patties treated with different concentration levels of cranberry extract during storage (-18°C, 6 months) (K0: control, K200: 200 ppm cranberry extract added beef patty, K300: 300 ppm cranberry extract added beef patty, K500: 500 ppm cranberry extract added beef patty)

| Toplam Fenolik Madde Miktarı (mg gallik asit/100 g) / Total Phenolic Content (mg gallik asit/100 g) |   |                           |                          |                          |                          |                          |                          |
|---|---|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Örnek Grupları  | Depolama Süresi (Ay) / Storage Times (Months) |                           |                          |                          |                          |                          |                          |
|   | 0   | 1                         | 2                        | 3                        | 4                        | 5                        | 6                        |
| K0  | 42,21±0,23 <sup>dA</sup>                      | 40,79±0,20 <sup>dAB</sup> | 35,73±0,34 <sup>dB</sup> | 32,13±0,11 <sup>dC</sup> | 30,45±0,31 <sup>dD</sup> | 28,33±0,54 <sup>dE</sup> | 21,06±0,24 <sup>dF</sup> |
| K200  | 90,91±0,61 <sup>CA</sup>                      | 88,65±0,25 <sup>CB</sup>  | 86,11±0,35 <sup>CC</sup> | 83,44±0,12 <sup>CD</sup> | 79,45±0,35 <sup>CE</sup> | 74,13±0,13 <sup>CF</sup> | 67,09±0,25 <sup>CG</sup> |
| K300  | 97,87±0,33 <sup>BA</sup>                      | 94,11±0,27 <sup>BB</sup>  | 91,22±0,40 <sup>BC</sup> | 89,99±0,16 <sup>BD</sup> | 87,33±0,37 <sup>BE</sup> | 84,21±0,14 <sup>BF</sup> | 78,03±0,26 <sup>BG</sup> |
| K500  | 101,33±0,18 <sup>AA</sup>                     | 100,27±0,15 <sup>AB</sup> | 99,71±0,39 <sup>AB</sup> | 98,89±0,21 <sup>AB</sup> | 97,83±0,22 <sup>AC</sup> | 95,57±0,38 <sup>AD</sup> | 90,22±0,29 <sup>AE</sup> |
| DPPH Antiradikal Aktivite (%ARA) / DPPH antiradical activity (%ARA)                                 |   |                           |                          |                          |                          |                          |                          |
| K0  | 31,13±0,26 <sup>dA</sup>                      | 28,75±0,30 <sup>dB</sup>  | 24,18±0,34 <sup>dC</sup> | 22,07±0,11 <sup>dD</sup> | 21,65±0,14 <sup>dE</sup> | 19,77±0,42 <sup>dF</sup> | 16,45±0,5 <sup>dG</sup>  |
| K200  | 72,45±0,41 <sup>CA</sup>                      | 69,93±0,18 <sup>CB</sup>  | 65,69±0,40 <sup>CC</sup> | 61,08±0,15 <sup>CD</sup> | 59,33±0,16 <sup>CE</sup> | 55,61±0,41 <sup>CF</sup> | 50,11±0,52 <sup>CG</sup> |
| K300  | 78,89±0,33 <sup>BA</sup>                      | 77,81±0,19 <sup>BB</sup>  | 76,20±0,5 <sup>BC</sup>  | 73,31±0,25 <sup>BD</sup> | 71,27±0,27 <sup>BE</sup> | 69,37±0,37 <sup>BF</sup> | 64,23±0,53 <sup>BG</sup> |
| K500  | 81,37±0,20 <sup>AA</sup>                      | 80,93±0,21 <sup>AA</sup>  | 80,19±0,37 <sup>AB</sup> | 79,44±0,2 <sup>AC</sup>  | 78,34±0,33 <sup>AD</sup> | 77,09±0,35 <sup>AE</sup> | 73,45±0,54 <sup>AF</sup> |

a, b, c, d: Aynı sütunda bulunan harfler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ).

A, B, C, D, E, F, G: Aynı satırda bulunan harfler istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur ( $P<0,05$ ).

a, b, c, d: Mean values within the same column bearing different superscripts differ significantly ( $P<0,05$ ).

A, B, C, D, E, F, G: Mean values within the same row bearing different superscripts differ significantly ( $P<0,05$ ).

Depolama boyunca pişirilmiş sığır köftelerinin toplam fenolik madde ve antiradikal aktivite değerlerinde meydana gelen değişiklikler Çizelge-1'de verilmiştir. Depolamanın başlangıcında K0 numaralı örneğin %ARA değeri 31.13 olarak bulunmuştur. Kızılçık ekstraktı ilaveli köfte örneklerinde %ARA değerinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Depolama boyunca tüm örneklerin %ARA değerinde önemli düşüşlerin yaşandığı görülürken ( $P<0,05$ ) oransal olarak en büyük düşüş (%47.16) K0 numaralı örnekte gözlenmiş ve bunu sırasıyla K200 (%30.84), K300 (%18.58) ve K500 (%9.73) numaralı örnekler takip etmiştir. Her bir depolama sürecinde gruplar

arasında önemli farklılıkların olduğu ( $P<0,05$ ) ve en büyük %ARA değerine K500 numaralı örneğin sahip olduğu görülmüştür. Depolamanın 0. ayından 1. ayına gelindiğinde K500 numaralı örneğin %ARA değeri 81.37'den 80.93 seviyesine düşmesine rağmen bu düşüş anlamlı bulunmamıştır ( $P>0,05$ ). Genel anlamda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kızılçık ekstraktı serbest radikal oluşumunu önemli ölçüde engelleyerek oksidasyonu yavaşlatmıştır.

Dana köftelerine doğal (enginar ekstraktı, 27.3 mg gallik asit/100 g et) ve sentetik (BHT, 10 mg gallik asit/100 g et) karakterli antioksidan madde ilave edilmiş ve depolama boyunca (4°C, 7 gün)



köftelerin %ARA değerinde önemli düşüşlerin olduğu ve enginar ekstraktı katkılı örneklerin %ARA değeri diğer örnek gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur (Ergezer ve Serdaroğlu, 2018). Bellucci ve ark. (2022) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, domuz köftelerine farklı konsantrasyonlarda (250, 500 ve 750 mg/kg) Açaı tozu ilave edilmiş ve depolama boyunca Açaı tozu katkılı köftelerin %ARA değerinde kısmi düşüşün yaşandığı ve bu düşüşün anlamlı olduğu ( $P<0,05$ ) belirtilmiştir.

### *TBARS Değeri ve Karbonil İçeriği*

Lipid oksidasyonu temelde 3 aşamada oluşan ve son üründe arzu edilemeyen ransid tada neden olan önemli kalite karakteristiklerinden birini oluşturmaktadır. Lipid oksidasyonunun birincil yan ürünü olan hidro peroksitler oksidasyonun ilerlemesiyle birlikte yerini daha kısa zincirli ve uçucu karakterdeki çeşitli aldehit, keton gibi bileşiklere bırakmıştır. Lipid oksidasyonunun son ürünlerinde çok sayıda bileşik oluşmasına rağmen malondialdehitler bu bileşikler arasında en fazla oluşandır. Bu yüzden et ve ürünlerinde lipid oksidasyon son ürünlerinin tespit edilmesinde TBARS analizi gerçekleştirilmektedir.

Piştirilmiş köftelerin depolanması sırasında TBARS değerlerinde meydana gelen değişiklikler Şekil-5'te gösterilmiştir. Depolamanın başlangıcında köfte örneklerindeki TBARS değerleri birbirine yakın değerler almasına rağmen gruplar arasında önemli farklılıklar olduğu ( $P<0,05$ ), K200 ve K300 numaralı örnekler arasında ise istatistiksel açıdan bir farklılığın olmadığı tespit edilmiştir ( $P>0,05$ ). Her bir depolama sürecinde K0 numaralı örneğin en yüksek TBARS değerine sahip olduğu ve depolamanın 1. ayında, K0 (0.35 mg malondialdehit/kg ürün) ve K200 (0,31 mg malondialdehit/kg ürün) numaralı örnekler arasında önemli farklılığın olmadığı görülmüştür ( $P>0,05$ ). 2., 4., 5., ve 6. aylarda, gruplar arasında anlamlı bir farklılığın olduğu gözlenmiştir ( $P<0,05$ ). Depolamanın başlangıcından depolamanın 1. ayına gelindiğinde K500 numaralı örneğin TBARS değeri 0.21 (mg malondialdehit/kg ürün)'den 0.24 (mg malondialdehit/kg ürün) seviyesine yükselmesine

rağmen istatistiksel açıdan bir farklılık bulunmamıştır ( $P<0,05$ ). Depolama boyunca tüm örneklerin TBARS değerinde önemli artışların olduğu ve oransal olarak bu artışın en fazla K0 numaralı (%807) örnekte olduğu ve bunu sırasıyla K200 (%404.16), K300 (%291.30) ve K500 (%238.10) numaralı örneklerin takip etmiştir.

Piştirilmiş köftelerin depolama sırasında karbonil içeriğinde meydana gelen değişiklikler Şekil-6'da verilmiştir. Köftelerin karbonil içeriği 0.20 ile 1.23 nmol karbonil/mg protein arasında değişkenlik göstermiştir. Her bir depolama süresince K0 numaralı örneğin en yüksek karbonil içeriğine sahip olduğu gözlenmiştir. 1. ayda, gruplar arasında önemli farklılıkların olduğu ( $P<0,05$ ) ve K300 ile K500 numaralı örnekler arasında anlamlı bir farklılığın olmadığı ( $P>0,05$ ) tespit edilmiştir. Depolamanın 3., 4. ve 5. aylarında, gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıkların olduğu ( $P<0,05$ ) ve her bir depolama süresince K500 numaralı örneğin en düşük karbonil içeriğine sahip olduğu görülmüştür. Depolamanın sonunda, K0 numaralı örnekteki karbonil içeriğinin 1.23 nmol karbonil/mg protein seviyesine çıktığı ve kızılçık ekstraktı ilaveli köfte örnekleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ( $P>0,05$ ). Depolamanın başlangıcından depolamanın 1. ayına gelindiğinde, K300 ve K500 numaralı örneklerin karbonil içeriğinde bir artış görülmesine rağmen istatistiksel açıdan bir farklılık tespit edilmemiştir ( $P>0,05$ ). Depolamanın 3. ayından depolamanın 6. ayına gelindiğinde ise, K0 numaralı örnekte önemli artışların olduğu gözlenirken ( $P<0,05$ ) kızılçık ekstraktı ilaveli köfte örneklerinde ise önemli farklılıklar görülmemiştir ( $P>0,05$ ).

Diğer taraftan, ısıtma işlem sonucu et renk pigmenti olan myoglobin metmyoglobine ve heme formundaki demirin heme olmayan demir formuna dönüşümü ile birlikte etlerin depolanması sırasında meydana gelen lipid oksidasyonunun protein oksidasyonunu katalizlediği belirtilmektedir (Estévez ve ark., 2009).

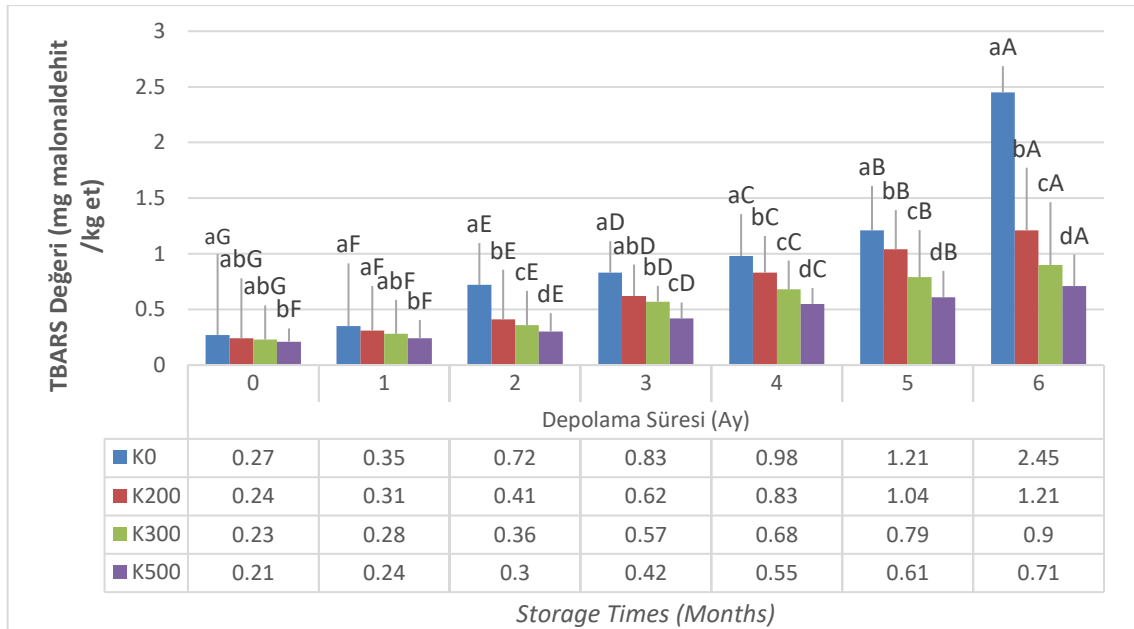
Dondurarak muhafaza, başta et ve ürünleri olmak üzere çeşitli gıdaların uzun süreli muhafazasında kullanılan bir yöntemdir. Dondurarak muhafazayla birlikte, etin besinsel içeriği önemli ölçüde

korunabilmekte ve birtakım biyokimyasal reaksiyonların hızı da yavaşlatılabilmektedir. Her ne kadar dondurularak muhafaza yöntemiyle etin raf ömrü uzatılmış olsa da oksidatif (lipid ve protein oksidasyonu) ve enzimatik (lipaz, proteaz, lipoksigenaz vb.) faaliyetler hali hazırda devam etmektedir. Lipaz ve lipoksigenaz enzimleri, et yapısında bulunan yağlarla ve ortamda bulunan oksijenle reaksiyona girerek lipid oksidasyonuna neden olmaktadır (Maqsood ve ark., 2015; Rahman ve ark., 2015). Ayrıca, etlerin dondurulması sırasında oluşan buz kristalleri hücre membranında mekanik hasarlara yol açarak prooksidanların (okside olmuş yağlar, serbest radikaller, heme demir) açığa çıkmasını kolaylaştırmaktadır. Böylece, donmamış haldeki prooksidanlar etteki çözünmemiş madde konsantrasyonuna artırarak oksidatif bozulmayı teşvik edebilmektedir (Utrera ve ark., 2014; Zaritzky ve ark., 2012). Diğer taraftan, ısıl işlem sonucu et renk pigmenti olan myoglobinin metmyoglobine ve heme formundaki demirin heme olmayan demir formuna dönüşümü ile birlikte etlerin depolanması sırasında meydana gelen lipid oksidasyon son ürünlerinin protein

oksidasyonunu hızlandırdığı belirtilmektedir (Estévez ve ark., 2009).

Dolayısıyla, K0 numaralı örneğin TBARS değerinde meydana gelen artışın etin yapısında bulunan lipaz ve lipoksigenaz enzim aktivitelerinin yanı sıra hem demirin prooksidan etki göstererek lipid oksidasyonunu katalizlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Ismail ve ark., 2009; Min ve Ahn, 2005). Depolama boyunca K0 numaralı örnekteki karbonil içeriğinin önemli oranda arttığı ve bu artışın ısıl işlemle sonucu myoglobinin metmyoglobine dönüşümü ile birlikte Maillard reaksiyonu sonucu oluşan ürünlerin yanı sıra lipid oksidasyon ürünlerinin de protein oksidasyonunu katalizlemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Al-Dalali ve ark., 2022; Estévez ve ark., 2009).

Kızılılık, yapısında bulunan antosiyanin, flavonol, fenolik asit ve proantosiyanidin bileşikler sayesinde güçlü antioksidan özelliklere sahiptir. Depolama boyunca tüm örneklerin TBARS ve karbonil içeriğinde artışlar görülmesine rağmen kızılılık ekstraktının lipid ve protein oksidasyonu reaksiyonlarını yavaşlattığı gözlenmiştir (Stobnicka ve Gniewosz, 2018).



Şekil 5. Depolama Boyunca (-18°C, 6 ay) Köftelerin TBARS Değerlerinde (mg malonaldehit/kg et) Meydana Gelen Değişiklikler (**K0**: kontrol grubu, **K200**: 200 ppm kızılılık ekstraktı ilaveli köfte grubu, **K300**: 300 ppm kızılılık ekstraktı ilaveli köfte grubu, **K500**: 500 ppm kızılılık ekstraktı ilaveli köfte grubu)

a, b, c, d: Aynı depolama gününde (farklı renkli sütunlar) gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0,05).

A, B, C, D, E, F, G: Depolama boyunca aynı grup içerisindeki (aynı renkli sütunlar) farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0,05).

Figure 5. TBARS values of cooked beef patties treated with different concentration levels of cranberry extract during

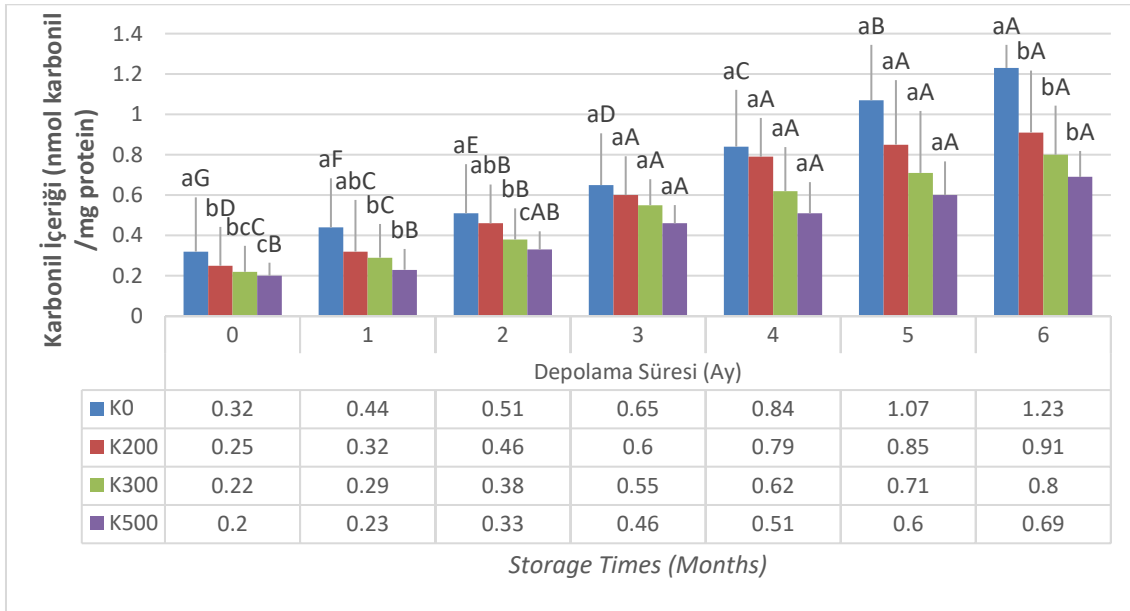
storage (-18°C, 6 months) (**K0**: control, **K200**: 200 ppm cranberry extract added beef patty, **K300**: 300 ppm cranberry extract added beef patty, **K500**: 500 ppm cranberry extract added beef patty)

a, b, c, d: The statistical difference is significantly found at the same storage day (the columns with different colors) within the treatments (P<0,05).

A, B, C, D, E, F, G: The statistical difference is significantly found within the same treatment (the columns with same colors) throughout storage (P<0,05).

Sığır köftelerine farklı miktarlarda BHA (%0,1) ve siyah kimyon ekstraktları (%0,1, 0,2 ve 0,3) ilave edilmiş ve depolama boyunca (4°C, 15 gün) tüm örneklerin TBARS değerinde önemli artışlar olmasına rağmen depolamanın sonunda %0,3 siyah kimyon ekstraktı ilaveli köftenin TBARS değeri 0,52 malondialdehit/kg ürün seviyesinin altında kaldığı görülmüş ve diğerlerinin 1 mg malondialdehit/kg ürün seviyesine yaklaştığı belirtilmiştir (Rahman ve ark., 2021). Başka bir

çalışmada ise, sığır köftelerine farklı türde doğal bitki ekstraktları (ceviz kabuğu, hibiskus çiçeği ve kırmızı biber) ilave edilmiş ve depolama boyunca (4°C, 12 gün) tüm örneklerin TBARS değerinde artışlar görülürken en fazla artışın (%385) kontrol grubunda olduğu ve depolamanın sonunda bitki ekstraktı katkılı köfte örneklerindeki TBARS değerinin 0,4 ile 0,60 seviyelerinde kaldığı bildirilmiştir (Villasante ve ark., 2020).



Şekil 6. Depolama Boyunca (-18°C, 6 ay) Köftelerin Karbonil İçeriğinde (nmol karbonil/mg protein) Meydana Gelen Değişiklikler (**K0**: kontrol grubu, **K200**: 200 ppm kıvılcık ekstraktı ilaveli köfte grubu, **K300**: 300 ppm kıvılcık ekstraktı ilaveli köfte grubu, **K500**: 500 ppm kıvılcık ekstraktı ilaveli köfte grubu)

a, b, c: Aynı depolama gününde (farklı renkli sütunlar) gruplar arasındaki farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0,05).

A, B, C, D, E, F, G: Depolama boyunca aynı grup içerisindeki (aynı renkli sütunlar) farklılık istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur (P<0,05).

Figure 6. Carbonyl content of cooked beef patties treated with different concentration levels of cranberry extract during storage (-18°C, 6 months) (**K0**: control, **K200**: 200 ppm cranberry extract added beef patty, **K300**: 300 ppm cranberry extract added beef patty, **K500**: 500 ppm cranberry extract added beef patty)

a, b, c: The statistical difference is significantly found at the same storage day (the columns with different colors) within the treatments (P<0,05).

A, B, C, D, E, F, G: The statistical difference is significantly found within the same treatment (the columns with same colors) throughout storage (P<0,05).

Sığır köftelerine farklı türde antioksidan maddeler (BHT, askorbik asit ve karanfil ekstraktları) ilave edilmiş ve depolama boyunca (4°C, 10 gün) örneklerdeki karbonil içeriğinin 4 ile 10 nmol karbonil/mg protein arasında değiştiği ve

depolama boyunca örneklerdeki karbonil içeriğinin arttığı belirtilmiştir (Zahid ve ark., 2019). Zhang ve ark. (2020) tarafından yapılan benzer bir çalışmada ise, farklı konsantrasyonlarda (2,5, 5 ve 10 g/kg) hazırlanan karnabahar yaprağı ekstraktı domuz

köftelerine ilave edilmiş ve depolama sırasında (4°C, 9 gün) tüm örneklerin karbonil içeriğinde bir artış olmasına rağmen 10 g/kg karnabahar ekstraktı ilaveli köftedeki karbonil içeriğindeki artışın diğerlerine göre daha az olduğu bildirilmiştir.

## Sonuçlar

Et ve et ürünlerinin raf ömrünün uzatılmasında çeşitli katkı ve koruyucu maddeler kullanılmaktadır. Bu maddeler ürünün tekstür, renk, duyu (renk, koku, tat, aroma gibi), mikrobiyolojik özellikler gibi birçok kalite özelliklerinde iyileştirmeler sağlamaktadır. Kızılçık, antioksidan özelliği oldukça yüksek olan ve polifenollerce zengin bir üründür. Sentetik antioksidan maddelerin toksik karakterli bileşikler olduğu ve insan sağlığı üzerinde olumsuz birtakım değişikliklere yol açtığı bilinmektedir. Bu duruma istinaden ilgili çalışmada, 200, 300 ve 500 ppm konsantrasyonlarda hazırlanan kızılçık ekstraktları sığır köftelerinin üretiminde kullanılmıştır. Çalışma kapsamında incelenen parametrelerin bütünü ele alındığında, köftelere 500 ppm e kadar kızılçık ekstraktı ilavesinin depolama boyunca pH ve renk üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmadığı ekstrakt ilaveli örnekleri fenolik maddelerce zenginleştirerek lipid ve protein oksidasyonuna karşı koruduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla, ucuz ve güvenilir bir ürün olan kızılçık ekstraktının et endüstrisinde kullanılan sentetik antioksidan maddelere alternatif olabileceğini göstermesi açısından büyük önem arz etmiştir.

## Ekler

Çalışmanın gerçekleştirilmesi aşamasında üretimde ve analizler çalışmalarında verdikleri destekten dolayı Pamukkale Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerine teşekkür ederiz.

**Çıkar Çatışması Beyanı:** Makale yazarları, aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

**Yazar Katkısı:** Orhan ÖZÜNLÜ, çalışma üretimi,

çalışma tasarımı, deneme deseninin oluşturulması, üretim aşamalarının gerçekleştirilmesi, veri analizi ve makale yazım redaksiyonu; Şeyma ELGİN, çalışma üretimi ve analizlerin gerçekleştirilmesi; Haluk ERGEZER, çalışma tasarımı, deneme deseninin oluşturulması, çalışmanın yürütülmesi, verilerin değerlendirilmesi ve makale redaksiyonu konularında katkı sağlamıştır.

## Kaynaklar

- Ahmed, I.A.M., Babiker, E.E., Al-Juhaimi, F.Y., & Bekhit, A.E.D.A. (2022). Clove Polyphenolic Compounds Improve the Microbiological Status, Lipid Stability, and Sensory Attributes of Beef Burgers during Cold Storage. *Antioxidants*, 11, 1354.
- Al-Dalali, S., Li, C., & Xu, B. (2022). Effect of frozen storage on the lipid oxidation, protein oxidation, and flavor profile of marinated raw beef meat. *Food Chemistry*, 376, 131881.
- Al-Juhaimi, F.Y., Almusallam, I.A., Ahmed, I.A.M., Ghafoor, K., & Babiker, E.E. (2020). Potential of *Acacia nilotica* fruit flesh extract as an anti-oxidative and anti-microbial agent in beef burger. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, e14504.
- Al-Zoreky, N.S. (2009). Antimicrobial activity of pomegranate (*Punica Granatum* L.) fruit peels. *International Journal of Food Microbiology*, 134, 244-248.
- Amaral, A.B., Da Silva, M.V., & Da Lannes, S.C.S. (2018). Lipid oxidation in meat: Mechanisms and protective factors. *Annual Review of Food Science and Technology*, 38, 1-15.
- Babaoğlu, A.S., Unal, K., Dilek, N.M., Poçan, H.B., & Karakaya, M. (2022). Antioxidant and antimicrobial effects of blackberry, black chokeberry, blueberry, and red currant pomace extracts on beef patties subject to refrigerated storage. *Meat Science*, 187, 108765.
- Banerjee, R., Verma, A. K., Das, A. K., Rajkumar, V., Shewalkar, A. A., & Narkhede, H. P. (2012). Antioxidant effects of broccoli powder extract in goat meat nuggets. *Meat Science*, 91(2), 179-184.
- Bellucci, E.R.B., dos Santos, J.M., Carvalho, L.T., Borgonovi, T.F., Lorenzo, J.M., & Barretto, A.C.D.S. (2022). Açai extract powder as natural antioxidant on pork patties during the refrigerated storage. *Meat Science*, 184, 108667.
- Byrne, D.V., Bredie, W.L.P., Mottram, D.S., & Martens, M. (2002). Sensory and chemical investigations on the effect of oven cooking on warmed-over flavour development in chicken meat. *Meat Science*, 61, 127-139.
- Caillet, S., Côté, J., Sylvain, J.F., & Lacroix, M. (2012). Antimicrobial effects of fractions from cranberry

- products on the growth of seven pathogenic bacteria. *Food Control*, 23, 419-428.
- Casteilla, L., Rigoulet, M., & Penicaud, L. (2001). Mitochondrial ROS metabolism: modulation by uncoupling proteins. *IUBMB Life*, 52(3-5), 181-188.
- Chauhan, P., Das, A. K., Das, A. K., Bhattacharya, D., & Nanda, P. K. (2018). Effect of black cumin and arjuna fruit extract on lipid oxidation in pork nuggets during refrigerated storage. *Journal of Meat Science*, 13(1), 73-80.
- Cohn, J. (2002). Oxidized fat in the diet, postprandial lipaemia and cardiovascular disease. *Current Opinion in Lipidology*, 13, 19-24.
- Daoutidou, M., Plessas, S., Alexopoulos, A., & Mantzourani, I. (2021). Assessment of Antimicrobial Activity of Pomegranate, Cranberry, and Black Chokeberry Extracts against Foodborne Pathogens. *Foods*, 10, 486.
- Delgado-Adámez, J., Bote, E., Parra-Testal, V., Martín, M. J., & Ramírez, R. (2016). Effect of the olive leaf extracts in vitro and in active packaging of sliced Iberian pork loin. *Packaging Technology and Science*, 29(12), 649-660.
- Devatkal, S. K., Thorat, P., & Manjunatha, M. (2014). Effect of vacuum packaging and pomegranate peel extract on quality aspects of ground goat meat and nuggets. *Journal of Food Science & Technology*, 51, 2685-2691.
- Ergezer, H., Gökçe, R., Hozer, Ş., & Akcan, T. (2016). Et ve Ürünlerinde Protein Oksidasyonu: Etki Mekanizması, Tespit Yöntemleri ve Etkileri. *Akademik Gıda*, 14(1), 54-60.
- Ergezer, H., & Serdaroğlu, M. (2018). Antioxidant potential of artichoke (*Cynara scolymus* L.) byproducts extracts in raw beef patties during refrigerated storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12, 982-991.
- Estévez, M., Ollilainen, V., & Heinonen, M. (2009). Analysis of protein oxidation markers  $\alpha$ -amino adipic and  $\gamma$ -glutamic semialdehydes in food proteins using liquid chromatography (LC)-electrospray ionization (ESI)-multistage tandem mass spectrometry (MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3901-3910.
- Estevez, M., & Cava, R. (2004). Lipid and protein oxidation, release of iron from heme molecule and colour deterioration during refrigerated storage of liver pâté. *Meat Science*, 68(4), 551-558.
- Falowo, A. B., Fayemi, P. O., & Muchenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64, 171-181.
- Fратиanni, F., De Martino, L., Melone, A., De Feo, V., Coppola, R., & Nazzaro, F. (2010). Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. *Journal of Food Science*, 75(8), 528-535.
- García-Lomillo, J., Gonzalez-SanJose, M.L., Del Pino-García, R., Ortega-Heras, M., & Muñiz-Rodríguez, P. (2017). Antioxidant effect of seasonings derived from wine pomace on lipid oxidation in refrigerated and frozen beef patties. *LWT*, 77, 85-91.
- Halliwel, B., & Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- Hashemi, S. M. B., Nikmaram, N., Esteghlal, S., Khaneghah, A. M., Niakousari, M., Barba, F. J., Roothinejad, S., & Koubaa, M. (2017). Efficiency of ohmic assisted hydrodistillation for the extraction of essential oil from oregano (*Origanum vulgare* subsp. *viride*) spices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 172-178.
- Hernandez, P., Zomeno, L., Arino, B., & Blasco, A. (2004). Antioxidant, lipolytic and proteolytic enzyme activities in pork meat from different genotypes. *Meat Science*, 66(3), 525-529.
- Ibrahim, D., Moustafa, A., Metwally, A.S., Nassan, M.A., Abdallah, K., Eldemery, F., Tufarelli, V., Laudadio, V., & Kishawy, A.T.Y. (2021). Potential Application of Cornelian Cherry Extract on Broiler Chickens: Growth, Expression of Antioxidant Biomarker and Glucose Transport Genes, and Oxidative Stability of Frozen Meat. *Animals*, 11, 1038.
- Ismail, H.A., Lee, E.J., Ko, K.Y., & Ahn, D.U. (2009). Fat content influences the color, lipid oxidation, and volatiles of irradiated ground beef. *Journal of Food Science*, 74, 432-440.
- Kanner, J. (2007). Dietary advanced lipid oxidation end products are risk factors to human health. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51(9), 1094-1101.
- Li, Y., Guo, C., Yang, J., Wei, J., Xu, J., & Cheng, S. (2006). Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chemistry*, 96, 254-260.
- Liang, Z., Veronica, V., Huang, J., Zhang, P., & Fang, Z. (2022). Combined effects of plant food processing by-products and high oxygen modified atmosphere packaging on the storage stability of beef patties. *Food Control*, 133, 108586.
- Lin, L.C., Kuo, Y.C., & Chou C.J. (2002). Immunomodulatory proanthocyanidins from *Ecdysanthera utilis*. *Journal of Natural Product*, 65, 505-508.
- Lorenzo, J. M., González-Rodríguez, R. M., Sánchez, M., Amado, I. R., & Franco, D. (2013). Effects of natural (grape seed and chestnut extract) and synthetic antioxidants (butylatedhydroxytoluene, BHT) on the physical, chemical, microbiological and sensory characteristics of dry cured sausage "chorizo". *Food Research International*, 54, 611-620.
- Lorenzo, J. M., Batlle, R., & Gomez, M. (2014). Extension of the shelf-life of foal meat with two antioxidant active packaging systems. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 59(1), 181-188.
- Lorenzo, J. M., & Munekata, P. E. S. (2016). Phenolic

- compounds of green tea: Health benefits and technological application in food. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(8), 709–719.
- Lorenzo, J. M., Munekata, P. E. S., Sant' Ana, A. S., Carvalho, R. B., Barba, F. J., Toldrá, F., & Trindade, M. A. (2018). Main characteristics of peanut skin and its role for the preservation of meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 1–10.
- Madane, P., Das, A. K., Nanda, P. K., Bandyopadhyay, S., Jagtap, P., Shewalkar, A., & Maity, B. (2020). Dragon fruit (*Hylocereus undatus*) peel as antioxidant dietary fibre on quality and lipid oxidation of chicken nuggets. *Journal of Food Science and Technology*, 57(4), 1449–1461.
- Maqsood, S., Abushelaibi, A., Manheem, K., & Kadim, I.T. (2015). Characterization of the lipid and protein fraction of fresh camel meat and the associated changes during refrigerated storage. *Journal of Food Composition and Analysis*, 41, 212-220.
- Maqsood, S., Benjakul, S., Balange, A. K., Faine, L. A., Rodrigues, H. G., Galhardi, C. M., & Novelli, E. L. B. (2006). Butyl hydroxytoluene (BHT)-induced oxidative stress: Effects on serum lipids and cardiac energy metabolism in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 57(3), 221–226.
- Martini, S., Cattivelli, A., Conte, A., & Tagliazucchi, D. (2021). Black, green, and pink pepper affect differently lipid oxidation during cooking and *in vitro* digestion of meat. *Food Chemistry*, 350, 129246.
- Min, B., & Ahn, D.U. (2005). Mechanism of lipid peroxidation in meat and meat products-a review. *Food Science and Biotechnology*, 14, 152-163.
- Mostafa, H.S., & Azab, E.F.E. (2022). Efficacy of green coffee as an antioxidant in beef meatballs compared with ascorbic acid. *Food Chemistry*, 14, 100336.
- Naveena, B. M., Sen, A. R., Vaithyanathan, S., Babji, Y., & Kondaiah, N. (2008). Comparative efficacy of pomegranate juice, pomegranate rind powder extract and BHT as antioxidants in cooked chicken patties. *Meat Science*, 80(4), 1304–1308.
- Nikmaram, N., Budaraju, S., Barba, F. J., Lorenzo, J. M., Cox, R. B., Mallikarjunan, K., & Roohinejad, S. (2018). Application of plant extracts to improve the shelf-life, nutritional and health-related properties of ready-to-eat meat products. *Meat Science*, 145,245–255.
- Oliver, C.N., Ahn, B.W., Moerman, E.J., Goldstein, S., & Stadtman, E.R. (1987). Aged-related changes in oxidized proteins, *Journal of Biological Chemistry*, 262, 5488–5491.
- Oswell, N.J., Thippareddi, H., & Pegg, R.B. (2018). Practical use of natural antioxidants in meat products in the U.S.: A review. *Meat Science*, 145, 469-479.
- Özünlü, O., & Ergezer, H. (2022). Development of novel paper-based colorimetric indicator labels for monitoring shelf life of chicken breast fillets. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46, e17013.
- Papuc, C., Goran, G. V., Predescu, C. N., & Nicorescu, V. (2017). Mechanisms of oxidative processes in meat and toxicity induced by postprandial degradation products: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16, 96–123.
- Prommachart, R., Belem, T.S., Uriyapongson, S., Rayas-Duarte, P., Uriyapongson, J., & Ramanathan, R. (2020). The effect of black rice water extract on surface color, lipid oxidation, microbial growth, and antioxidant activity of beef patties during chilled storage. *Meat Science*, 164, 108091.
- Pateiro, M., Bermudez, R., Lorenzo, J., & Franco, D. (2015). Effect of addition of natural antioxidants on the shelf-life of “chorizo”, a Spanish dry-cured sausage. *Antioxidants*, 4(1), 42–67.
- Pereira, D., Pinheiro, R. S., Heldt, L. F. S., Moura, C. de, Bianchin, M., Almeida, J. de F., dos Reis, A.S., Ribeiro, I.S., Haminiuk, C.W.I., & Carpes, S.T. (2017). Rosemary as natural antioxidant to prevent oxidation in chicken burgers. *Food Science and Technology*, 37, 17–23.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Hartmann-Schmidlin, S., Kähkönen, M., Heinonen, M., Määttä-Riihinen, K., & Oksman-Caldentey, K.M. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 991-1000.
- Rahman, M.H., Alam, M.S., Monir, M.M., & Ahmed, K. (2021). Comprehensive effects of black cumin (*Nigella sativa*) and synthetic antioxidant on sensory and physicochemical quality of beef patties during refrigerant storage. *Journal of Agriculture and Food Research*, 4, 100145.
- Rahman, M.H., Hossain, M.M., Rahman, S.M.E., Amin, M.R., & Oh, D.H. (2015). Evaluation of Physicochemical Deterioration and Lipid Oxidation of Beef Muscle Affected by Freeze-thaw Cycles. *Korean Society for Food Science of Animal Resources*, 35(6), 772-782.
- Salejda, A.M., Kucharska, A.Z., & Krasnowska, G. (2018). Effect of Cornelian Cherry (*Cornus mas* L.) Juice on Selected Quality Properties of Beef Burgers. *Journal of Food Quality*, 2018, 1563651.
- Sarma, A.D., Mallick, A.R., & Ghosh, A.K. (2010). Free radicals and their role in different clinical conditions: an overview. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 1(3), 185-192.
- Sen, A. R., & Mandal, P. K. (2017). Use of natural antioxidants in muscle foods and their benefits in human health: An Overview. *International Journal of Meat Science*, 7, 1–5.
- Shacter, E. (2000). Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, 32(3–4), 307–326.
- Shimizu, H., & Iwamoto, S. (2022). Problems of Lipid Oxidation in Minced Meat Products for a Ready-made Meal during Cooking, Processing, and Storage. *Reviews in Agricultural Science*, 10, 24-35.
- Soladoye, O.P., Juarez, M.L., Aalhus, J.L., Shand, P., & Estevez,

- M. (2015). Protein Oxidation in Processed Meat: Mechanisms and Potential Implications on Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14, 106-122.
- Stobnicka, A., & Gniewosz, M. (2018). Antimicrobial protection of minced pork meat with the use of Swamp Cranberry (*Vaccinium oxycoccos* L.) fruit and pomace extracts. *Journal of Food Science and Technology*, 55(1), 62-71.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., & Liu, R.H. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7449-7454.
- Şahin, S., Samli, R., Birteksöz Tan, A. S., Barba, F. J., Chemat, F., Cravotto, G., & Lorenzo, J. M. (2017). Solvent-free microwave-assisted extraction of polyphenols from olive tree leaves: Antioxidant and antimicrobial properties. *Molecules*, 22, 1056–1068.
- Turan, E., & Şimşek, A. (2021). Effects of lyophilized black mulberry water extract on lipid oxidation, metmyoglobin formation, color stability, microbial quality and sensory properties of beef patties stored under aerobic and vacuum packaging conditions. *Meat Science*, 178, 108522.
- Turgut, S. S., Soyer, A., & Işıklı, F. (2016). Effect of pomegranate peel extract on lipid and protein oxidation in beef meatballs during refrigerated storage. *Meat Science*, 116, 126–132.
- Utrera, M., Parra, V., & Estevez, M. (2014). Protein oxidation during frozen storage and subsequent processing of different beef muscles. *Meat Science*, 96(2), 812-820.
- Vieira, S.A., Zhang, G., & Decker, E.A. (2017). Biological Implications of Lipid Oxidation Products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94, 339-351.
- Villalobos-Delgado, L.H., González-Mondragón, E.G., Ramírez-Andrade, J., Salazar-Govea, A.Y., & Santiago-Castro, J.T. (2020). Oxidative stability in raw, cooked, and frozen ground beef using Epazote (*Chenopodium ambrosioides* L.) *Meat Science*, 168, 108187.
- Villasante, J., Ouerfelli, M., Bobet, A., Metón, I., & Almajano, M.P. (2020). The Effects of Pecan Shell, Roselle Flower and Red Pepper on the Quality of Beef Patties during Chilled Storage. *Foods*, 9, 1692-1709.
- Vinson, J.A., Su, X., Zubik, L., & Bose, P. (2001). Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5315-5321
- Wang, C., An, X., Gao, Z., Li, Z., Tian, S., & Lu, Y. (2022). Effects of ethanolic extract from onion skin on the quality characteristics of beef patties during refrigerated storage. *Food Science and Technology*, 42, e118121.
- Werenska, M., Okruszek, A., Haraf, G., Woloszyn, J., & Goluch, Z. (2022). Impact of frozen storage on oxidation changes of some components in goose meat. *Poultry Science*, 101(1), 101517.
- Witte, V.C., Krauze, G.F., & Bailey, M.E. (1970). A new extraction method for determining 2-thiobarbituric acid values of pork and beef during storage, *Journal of Food Science*, 35, 582–585.
- Zahid, M.A., Seo, J.K., Parvin, R., Ko, J., & Yang, H.S. (2019). Comparison of Butylated Hydroxytoluene, Ascorbic Acid, and Clove Extract as Antioxidants in Fresh Beef Patties at Refrigerated Storage. *Food Science of Animal Resources*, 39(5), 768-779.
- Zahid, M.A., Seo, J.K., Parvin, R., Ko, J., Park, J.Y., & Yang, H.S. (2020). Assessment of the Stability of Fresh Beef Patties with the Addition of Clove Extract During Frozen Storage. *Food Science of Animal Resources*, 40(4), 601-612.
- Zhang, H., Liang, Y., Li, X., & Kang, H. (2020). Antioxidant extract from cauliflower leaves effectively improve the stability of pork patties during refrigerated storage. *Journal of Food Processing and Preservation*, 44, e14510.
- Zaritzky, N. (2012). Physical–chemical principles in freezing D.W. Sun (Ed.), *Handbook of frozen food processing and packaging*, CRC Press, 3-38.



# Salicylic acid improves cold and freezing tolerance in pea

## Salisilik asit bezelyede soğuk ve donma toleransını artırır

Ufuk ÇELİKKOL AKÇAY<sup>1\*</sup>, Hande Nur KUMBUL<sup>2</sup>, İbrahim Ertan ERKAN<sup>3</sup>

<sup>1,2,3</sup>Department of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, Isparta University of Applied Sciences, Isparta, Turkey

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-1260-3813>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0002-8851-1686>; <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0002-2815-412X>

### To cite this article:

Çelikkol Akçay U., Kumbul H.N. & Erkan İ.E. (2024). Salicylic acid improves cold and freezing tolerance in pea. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2):321-334

DOI: 10.29050/harranziraat.1440738

### \*Address for Correspondence:

Ufuk Çelikkol Akçay

e-mail:

ufukakcay@isparta.edu.tr

### Received Date:

21.02.2024

### Accepted Date:

30.04.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ABSTRACT

The most significant crop losses worldwide occur due to unfavorable temperatures such as heat, drought, cold, and freezing. Bioregulator substances like salicylic acid can play important roles in the growth, development, and stress responses of plants. In this study, changes in stem/root length and relative water content of peas under cold and freezing stress, as well as antioxidant system indicators such as proline, malondialdehyde, hydrogen peroxide, chlorophyll and ion leakage levels were investigated. The expressions of genes coding for the *TOP2* and *PDH47* enzymes, which play important roles in the replication, transcription, and repair of DNA molecules, were also examined in root and stem tissues in the presence of two different concentrations of salicylic acid under cold and freezing stress. The results have shown that the application of salicylic acid, when added to the growth medium, can have positive effects on the cold resistance of pea plants. Salicylic acid likely achieves some of its effects by increasing the activity of superoxide dismutase, one of the most important enzymes taking a role in combating reactive oxygen species. The data obtained indicate that salicylic acid also increased the expressions of *TOP2* and *PDH47* genes, which can both change the topology of DNA, possibly facilitating the transcription of genes taking a role in antioxidative defense. Salicylic acid also reduced the levels of reactive oxygen species hydrogen peroxide and maintained cell membrane integrity, which leads to a decrease in ion leakage and an increase in water-holding capacity. With this study, the mechanisms of action of salicylic acid in cold stress tolerance have been further elucidated, and its potential use in agricultural cultivation has been evaluated.

**Key Words:** *Pisum sativum* L., salicylic acid, cold stress, freezing stress

### ÖZ

Dünya çapında en önemli ürün kayıpları; sıcak, kuraklık, soğuk ve donma gibi olumsuz hava sıcaklıklarından kaynaklanmaktadır. Salisilik asit gibi biyodüzenleyici maddeler bitkilerin büyümesinde, gelişmesinde ve stres tepkilerinde önemli roller oynayabilirler. Bu çalışmada soğuk ve donma stresi altında bezelyelerin gövde/kök uzunluğu ve bağlı su içeriğindeki değişimler ile prolin, malondialdehit, hidrojen peroksit, klorofil ve iyon sızıntısı seviyeleri gibi antioksidan sistem göstergeleri araştırılmıştır. DNA moleküllerinin replikasyonu, transkripsiyonu ve onarımında önemli rol oynayan *TOP2* ve *PDH47* enzimlerini kodlayan genlerin ifadeleri de soğuk ve donma stresi altında, iki farklı konsantrasyonda salisilik asit varlığında, kök ve gövde dokularında incelenmiştir. Sonuçlar, büyüme ortamına eklendiğinde salisilik asit uygulamasının bezelye bitkilerinin soğuğa karşı direnci üzerinde olumlu etkileri olabileceğini göstermiştir. Salisilik asit muhtemelen bazı etkilerini reaktif oksijen türleriyle mücadelede rol alan en önemli enzimlerden biri olan süperoksit dismutazın aktivitesini artırarak sağlamaktadır. Elde edilen veriler salisilik asidin aynı zamanda DNA topolojisini



değiştirebilen *TOP2* ve *PDH47* genlerinin ifadesini de arttırdığını ve muhtemelen antioksidatif savunmada rol alan genlerin transkripsiyonunu kolaylaştırdığını göstermektedir. Salisilik asit aynı zamanda reaktif oksijen türü olan hidrojen peroksit düzeylerini azaltmış ve hücre zarı bütünlüğünü korumuştur, bu da iyon sızıntısında azalmaya ve su tutma kapasitesinde artışa yol açmıştır. Bu çalışma ile salisilik asidin soğuk stresine toleranstaki etki mekanizmaları bir adım daha aydınlatılarak tarımsal alanda kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Pisum sativum* L., salisilik asit, soğuk stresi, donma stresi

## Introduction

Among the causes of low crop yield, biotic factors such as diseases, insects, and weeds contribute to some extent, however usually the most significant losses occur due to unfavorable temperatures such as heat, drought, cold, and freezing (Mahajan & Tuteja, 2005). Cold and freezing stresses share fundamental mechanisms but involve different components. Cold stress results in various adverse effects, including a decrease in enzyme activities, membrane stiffening, destabilization of protein complexes, stabilization of RNA secondary structures, accumulation of reactive oxygen species, inhibition of photosynthesis, and cell membrane leakage, which can lead to cell death in advanced stages (Ruelland & Zachowski, 2010). Whereas the primary cause of freezing stress is the formation of ice within tissues. Freezing stress manifests its major harmful effects through damage caused by intense dehydration in cell and organelle membranes. During freezing stress, key genetic responses involve an increase in CBF gene expression, initiating transcriptional regulation, and mRNA degradation regulated by small RNAs through pre-mRNA splicing, which helps in the adaptation to low temperatures (Chinnusamy et al., 2007; Sunkar et al., 2007).

Agricultural plants most affected by cold stress are those planted in early spring or harvested in late autumn (Ceyhan, 2006; Duke, 2012; Tekin & Ceyhan, 2020). Pea (*Pisum sativum* L.) is one of the plants sown in early spring. Pea is one of the most cultivated legume crops globally after beans, chickpeas and black-eyed peas (FAOSTAT, 2022). The plant is highly productive under suitable weather conditions, and plays crucial roles in sustainable agriculture worldwide (Özdemir, 2002). Peas are a cool-season crop, exhibiting excellent growth in cool and moist conditions, but their development slows down in hot and dry weather. While it can withstand temperatures near freezing, it can be damaged by spring frosts (Alan, 1984; Ceyhan, 2006).

Biochemical and genetic responses of peas to

cold and freezing stress have been explored in limited studies. One of the earliest studies suggested that the application of abscisic acid (ABA) and conditioning at 2°C increased freezing tolerance and induced the production of a 24 kDa protein in peas (Welbaum et al., 1997). Another study examined the effects of low and high temperatures on peas, revealing that while fluorescence was unaffected at 10 and 35 °C, it caused reversible damage to the photosystem at 4 and 40 °C (Georgieva & Lichtenthaler, 1999). Major carbon and phosphate compounds of peas subjected to cold stress at 5-7 °C and high light were also compared with two cold-resistant alpine plants, *Ranunculus glacialis* and *Soldanella alpina* (Streb et al., 2003). Peas showed significant increases in sucrose, glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, mannose-6-phosphate, and phosphoglycerate levels, while the ATP/ADP ratio decreased. Alpine plants exhibited changes in ascorbate and glutathione levels, suggesting their role in stress metabolism. Research has also been conducted on pea seeds and epicotyl mitochondria regarding cold tolerance, revealing their ability to survive without damage at temperatures ranging from -3.5 °C to 40 °C. This resilience was attributed to a lower phosphatidylethanolamine/phosphatidylcholine ratio, fewer unsaturated fatty acids, and increased production of heat shock protein HSP22 and PsLEAm protein (Stupnikova et al., 2006). Another study investigated the relationship between cold stress and photosynthetic mechanisms in peas selected for cold resistance and tomatoes selected as cold-sensitive. The superiority of peas in stress conditions was explained by the different arrangements of thylakoid complexes in chloroplasts (Garstka et al., 2007).

Studies examining the relationship between the pea genome and cold stress have focused on the pea ABR17 gene, a member of the pathogenesis-related gene family PR10. The ABR17 gene was continuously expressed in *Arabidopsis* and conferred freezing stress tolerance, suggesting a potential role in plant-

pathogen interactions (Srivastava et al., 2006). The function of the gene has been suggested to be an RNase enzyme. Other genes found to function under cold stress in peas are the DNA-regulating *TOP2* and *PDH47*, whose expressions were also investigated in this study. *TOP2* is a type 2 DNA topoisomerase enzyme, which plays a roles in changing the topology of DNA and is involved in processes such as replication, transcription, recombination, and chromosome segregation. In plants, topoisomerases represent the least studied group of enzymes compared to bacteria, yeast, and animal systems (Singh, Sopory, & Reddy, 2004). Studies have shown that *TOP2* gene expression in peas can be increased by cold and salt stresses, as well as by salicylic acid and ABA treatments (Hettiarachchi et al., 2005).

Helicases, like topoisomerases, play important roles in DNA metabolism. Most helicases belong to the DEAD-box protein family and are involved in essential cellular processes such as DNA replication, repair, recombination, transcription, ribosome biogenesis, and translation initiation (Vashisht & Tuteja, 2006). The functions of helicases under stress conditions are not fully understood, but they are shown to regulate some metabolic pathways activated by stress, interact with topoisomerases, play regulatory roles in transcription and translation after being phosphorylated by protein kinases, and be involved in the repair of damaged DNA/RNA molecules (Vashisht & Tuteja, 2006). Compared to organisms such as humans, flies, worms, and yeast with determined genomic sequences, *Arabidopsis* contains the largest number (more than 50) of DEAD-box RNA helicase genes (Aubourg et al., 1999; Boudet et al., 2001). The first report suggesting the presence of cold-regulated DEAD-box helicase genes in plants and their involvement in stress signal transduction was related to *Arabidopsis* (Seki et al., 2001). In peas, a DEAD-box DNA helicase gene has been characterized and identified as *PDH47*, showing 93% similarity to the tobacco translation initiation factor eIF4A protein. *PDH47* demonstrated ATP-/Mg<sup>2+</sup>-dependent DNA unwinding and DNA-/Mg<sup>2+</sup>-dependent ATPase activity (Vashisht & Tuteja, 2005). The expression of *PDH47* in peas was significantly increased in shoots and roots under cold and salt stress but did not respond to heat stress. ABA treatment increased the expression only in roots but did not affect gene expression in shoots.

In recent years, various studies have intensively investigated the responses of plants to stress tolerance through the application of various external bioregulatory substances. Salicylic acid (SA), which is chemically close to aspirin, has been studied since the early 1990s for its role in regulating plant abiotic stress responses. In plant cells, cinnamic acid formed at the end of the shikimate metabolic pathway branches into three different pathways to produce rosmarinic acid, phenolics, and salicylic acid. Salicylic acid has been found to regulate cellular redox balance by modulating antioxidant enzyme activities and activating an alternative respiratory pathway. Additionally, it stimulates the expression of an RNA-dependent RNA polymerase gene involved in transcriptional post-silencing, suggesting a role in post-transcriptional gene silencing (Xie et al., 2001). Salicylic acid has been shown to enhance tolerance to various stresses, including heat, drought, salinity, UVB radiation, and heavy metals, in a wide range of plants through different metabolic pathways (Chen et al., 2023). Studies have also been conducted on the effects of external salicylic acid applications under cold and freezing stress in various plants. In these studies, it was determined that salicylic acid is involved in cold signal transduction using cGMP, phospholipids, Ca, ROS, NO, and MAPK signaling pathways. Salicylic acid generally plays a role in the enzymatic and non-enzymatic defense systems through the activation of transcription factors such as MYB, MYC, ABREB/A, and DREB1/2, promoting the accumulation of osmolytes, antifreeze proteins, heat shock proteins, dehydrins, and PR proteins (Saleem et al., 2021).

Studies investigating the effect of salicylic acid on pea development have also shed light on its working mechanism. For example, pea seeds coated with acetylsalicylic acid and hydrolyzed fish proteins achieved higher weight and height values after germination (Andarwulan & Shetty, 1999). The study also suggested that salicylic acid had stimulating effects on the antioxidant system, as indicated by increased total phenolic content, proline content, guaiacol peroxidase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme activities. In another study, salicylic acid application to peas increased cell wall lignification, phenolic substances (mainly lignin) through pentose phosphate and shikimate metabolic pathways, and the production of NADPH<sub>2</sub> and proline

(McCue et al., 2000). In peas, (Singh, Mishra, et al., 2004) demonstrated that salicylic acid increased the expression of the chloroplast translation elongation factor *tufA* gene, suggesting its role in environmental stress adaptation. Another study focused on the regulation of the PIP2-PLC (phospholipase C) enzyme, responsible to produce IP3 and DAG, two second messengers involved in signal transduction. The activity of the enzyme was found to be associated with acclimatization to heat, ABA applications, and the concentration of salicylic acid in the environment (Liu, Huang, et al., 2006; Liu, Liu, et al., 2006).

It is well known that salicylic acid provides stress resistance in plants under cold and freezing stress. The relationship between salicylic acid and the responses of pea tissues under various stresses has begun to be elucidated with different indicators, but the effect of salicylic acid application under cold and freezing stress in peas has been the subject of limited number of studies within our knowledge. In this study, changes in stem/root length and relative water content of pea under cold and freezing stress, as well as antioxidant system indicators such as proline, malondialdehyde, hydrogen peroxide, and chlorophyll levels, ion leakage, and the expressions of genes coding for the *TOP2* and *PDH47* enzymes, which play important roles in the replication, transcription, and repair of DNA molecules, were examined in root and stem tissues in the presence of two different concentrations of salicylic acid under cold and freezing stress. Pea (*Pisum sativum* L.) is one of the agricultural plants sown in early spring and most affected by cold stress (Duke, 2012). Extreme and unexpected weather conditions have become very common in recent years throughout the world due to climate change (Zomer et al., 2017). Therefore in this study, the mechanisms of action of salicylic acid in cold stress tolerance have been further elucidated, and its potential use for stress mitigation in agricultural production has been evaluated.

## Materials and Methods

In this study, the pea variety Emerald, developed and registered by Istanbul Seed Company was used.

### *Plant growth*

Pea seeds were sterilized with a 2% sodium hypochlorite solution, then germinated in 200 ml polypropylene containers containing sterile perlite, with three seeds each, and irrigated with ½ Hoagland solution (Hoagland & Arnon, 1950) every three days. The seed development continued for 15 days in a plant growth chamber with a 16-hour light/8-hour dark cycle, at 23°C, and 50% humidity until stress application.

### *Cold stress applications*

Cold stress was applied by lowering the temperature to 4°C after 15 days of seedling development when the seedlings were at the stage 4 of leaf development (fourth stipule unfolded), and leaf samples for analysis were always collected from the forth stipule on the 1st and 4th days of cold stress (24 hours and 96 hours after the initiation of cold stress). Freezing stress was induced by lowering the temperature to -0.5°C, and samples were collected during the same periods as cold stress. Plants treated with salicylic acid (at concentrations of 50 and 100 µM) were germinated by irrigating with ½ Hoagland solution containing salicylic acid of the specified concentrations as soon as they were placed on perlite. Cold and freezing stresses, as well as sample collection periods, were applied as described above. Control plants kept under normal conditions spent an additional 1 and 4 days in the same environment after the 15-day germination period, ensuring that they experienced the same duration as the stressed plants in the culture environments.

Experiment was performed in randomized complete block design with treatments performed in triplicate, with each replicate consisting of four polypropylene containers containing three seeds each. This resulted in 12 pea seedlings prepared per treatment, and with replicates, there were a total of 36 seedlings for each treatment.

### *Determination of stem/root length and relative water content*

After completing 15 days of development, plants subjected to stress with or without the presence of salicylic acid, along with control plants, were uprooted from perlite, washed under tap water, and root and stem lengths were determined. Root and stem tissues were separated, weighed, and after drying at 60°C for 48 hours, weighed again to determine dry

weights. Relative water content (RWC) was calculated according to the formula  $RWC(\%) = (\text{Fresh weight} - \text{Dry weight}) / (\text{Turgid weight} - \text{Dry weight}) \times 100$ , from Smart and Bingham (1974). The turgid weight was calculated by soaking tissues in distilled water at room temperature for 24 hours.

#### *Determination of proline content*

The determination of proline content started with the homogenization of 0.3 g leaf samples taken from the fourth stipule in liquid nitrogen, followed by dissolution in 1 ml of 3% sulfosalicylic acid (Bates, et al., 1973). Then, 0.1 ml of the sample, after centrifugation, was mixed with 0.2 ml acid ninhydrin, 0.2 ml of 96% acetic acid, and 0.1 ml of 3% sulfosalicylic acid. The mixtures were held at 96°C for 1 hour, and after centrifugation and mixing with 1 ml of toluene, the absorbance of the upper phase was read at 520 nm.

#### *Determination of hydrogen peroxide content*

The amounts to be determined according to Bergmeyer (2012) started with the liquid nitrogen homogenization of 0.5 g leaf tissue and dissolution in 1.5 ml of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 6.8). In the samples where 0.25 ml of supernatant was collected after centrifugation, the enzymatic reaction was initiated by mixing with 1.25 ml peroxidase solution (83 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0, 0.005% (w/v) o-dianisidine, 40 µg peroxidase/ml) at 30°C. After 10 minutes, the reaction was stopped by adding 0.25 ml of 1 N perchloric acid, and the absorbance of the supernatant was measured at 436 nm after centrifugation.

#### *Determination of malondialdehyde (MDA) content*

The determination of MDA content for assessing cell membrane damage followed the Ohkawa et al. (1979) method. The homogenization of 0.2 g leaf tissue in liquid nitrogen was followed by adding 1 ml of 5% trichloroacetic acid (TCA). After centrifugation, the same volume of 20% TCA containing 0.5% thiobarbituric acid (TBA) was added, and the mixture was kept at 96°C for 25 minutes. The samples were cooled on ice, and the absorbance was read at 532 nm. Non-specific absorbance at 600 nm was determined and subtracted from the initial absorbance value.

#### *Ion leakage*

Ion leakage, determined according to the method of Nanjo et al. (1999), involved shaking six leaves in 15 ml tubes containing 5 ml of 0.4 M mannitol. Electrical conductivity was recorded as C1 using a Mettler Toledo MPC 227 conductivity meter. After boiling in water for 15 minutes and cooling the samples to room temperature, C2 readings were taken, and the leakage-related conductivity was calculated using the formula  $[(C1/C2) \times 100]$ .

#### *Determination of chlorophyll content*

Chlorophyll amounts were determined using the method of Lichtenthaler and Wellburn (1983). This involved the liquid nitrogen homogenization of 3 g leaf tissue, centrifugation, and determination of the supernatant at different absorbance values. Chlorophyll a (mg/L) and chlorophyll b (mg/L) were calculated using the following formulas:

- Chlorophyll a (mg/L) =  $15.65 \text{ Abs}_{666} - 7.340 \text{ Abs}_{653}$
- Chlorophyll b (mg/L) =  $27.05 \text{ Abs}_{653} - 11.21 \text{ Abs}_{666}$

#### *Determination of superoxide dismutase (SOD) enzyme activities*

Enzyme activities were determined according to the method of Beauchamp and Fridovich (1971). The homogenization of 0.2 g leaf samples in a glass-glass homogenizer mixed with homogenization buffer on ice was followed by centrifugation, and the supernatant was stored at -80°C until use. The protein content of the extracts was determined by the Bradford (1976) method. A native polyacrylamide gel consisting of a separation part and stacking part with a 30% (29:1) acrylamide-bis solution was prepared for use in a Bio-Rad midi gel apparatus. After loading the samples, electrophoresis was conducted at 8 V/cm, monitoring the tracking dye. Subsequently, the gel apparatus was disassembled, and for the determination of different isozymes of the SOD enzyme, first KCN and hydrogen peroxide were applied, and then negative activity staining with NBT was performed to visualize the enzyme isozyme bands.

#### *Determination of gene expressions for TOP2 and PDH47 genes*

The mRNA sequences of the *TOP2* and *PDH47* genes with GenBank accession numbers Y14559.1

and AY167670.1 were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database. The expression at the transcription level of these genes was investigated using the semi-quantitative reverse-transcription PCR (RT-PCR) technique. The pea actin gene with the GenBank accession number X68649.1 was used as an internal control.

#### *RNA isolation and reverse transcription PCR (RT-PCR)*

RNA isolation from pea leaves was performed using Qiagen RNeasy plant mini kits based on guanidine-isothiocyanate lysis and silica-membrane purification methods. The quantity of the obtained total RNAs was determined spectrophotometrically, and their quality was assessed by separating and visualizing them with 2% agarose gel electrophoresis. cDNA libraries were created using the Thermo First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo, USA) from the obtained RNA molecules. From this library, the *TOP2* and *PDH47* genes with NCBI accession numbers Y14559.1 and AY167670.1 were amplified by PCR using primers designed with the PrimerPremier 5.0 program from CA, USA, providing the most suitable conditions for amplification. The obtained bands were separated on a 0.8% agarose gel and visualized using the Biolab UV Tech gel imaging system. The bands were analyzed numerically using the ImageJ software developed by the National Institute of Health (NIH, USA) to determine differences in gene expression levels.

#### *Statistical analyses*

The data obtained in the study were evaluated using the SPSS 16.0 program. Differences between applications were determined by comparing means with the One Way Anova and Tukey Test.

### **Results and Discussion**

Under cold and freezing stress conditions, the

dry weights of pea roots and stems remained unchanged under any application of salicylic acid (data not shown). Different temperature treatments did not have a significant effect on tissue lengths on the 1st stress day, only causing the stems under cold and freezing stress to be shorter on the 4th day compared to those developed under normal conditions (Table 1). Root lengths increased under cold stress only in the presence of 100µM salicylic acid, similar to the findings of Golovatskaya et al. (2023), which demonstrated the improvement of morphological features in potato plants under cold stress with salicylic acid application and attributed it to the stimulation of the enzymatic/non-enzymatic defense system by salicylic acid.

Chilling and freezing stress for the duration of one day did not change the relative water contents of leaves, whereas freezing stress for 4 days decreased relative water contents, and the application of SA in both concentrations significantly increased RWC (Table 1). Total chlorophyll contents were not affected by SA application and cold stress, whereas freezing stress decreased chlorophyll content by up to 55% compared to normal growth conditions (Table 1). Chilling and freezing stress increased proline levels in both tissues in the range of 1 to 2.5-fold. Proline levels showed significant decreases upon SA application (Table 1). SA decreased proline levels even in control shoots grown under normal conditions. Nearly 3-fold and 2-fold decreases were observed in shoots upon SA treatment under 1 and 4 days of chilling stress, respectively. Nearly 2-fold and 1.5-fold decreases were observed in roots upon SA treatment under 1 and 4 days of chilling stress, respectively. Significant decreases in proline levels were also observed in shoot tissues on the 4th day of freezing stress upon SA treatment. In this study, proline content of pea plants decreased with cold stress, whereas in previous studies, it was reported that the proline content of pea plants increased with cold stress and other stresses (Gökmen & Ceyhan, 2015; Tekin & Ceyhan, 2020).

Table 1. Plant morphological responses, leaf relative water content (RWC), proline and total chlorophyll levels.

| Treatments                          | Shoot Length (cm)          | Root Length (cm)             | RWC (%)                 | Total Chlorophyll (µg/g DW) | Proline (nmol/g DW)            |                               |
|-------------------------------------|----------------------------|------------------------------|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| <i>1<sup>st</sup> Day of Stress</i> |                            |                              |                         |                             |                                |                               |
|                                     |                            |                              |                         |                             | Shoot                          | Root                          |
| C*                                  | 5,74 ± 0,22 <sub>a,b</sub> | 8,36 ± 0,44 <sub>a,b</sub>   | 99 ± 0,7 <sub>a,b</sub> | 24,22 ± 2,89 <sub>a,b</sub> | 188,66 ± 13,21 <sub>a,c</sub>  | 73,20 ± 6,71 <sub>a</sub>     |
| SA50                                | 6,22 ± 0,19 <sub>b</sub>   | 9,32 ± 0,59 <sub>b,c</sub>   | 100 ± 0,8 <sub>b</sub>  | 22,36 ± 1,80 <sub>a,c</sub> | 141,24 ± 12,94 <sub>b</sub>    | 74,91 ± 7,19 <sub>a,b</sub>   |
| SA100                               | 6,19 ± 0,37 <sub>b</sub>   | 9,14 ± 0,58 <sub>a,b,c</sub> | 100 ± 0,6 <sub>b</sub>  | 23,87 ± 1,32 <sub>a,b</sub> | 136,86 ± 12,38 <sub>b</sub>    | 70,62 ± 7,08 <sub>a</sub>     |
| C st4**                             | 5,21 ± 0,24 <sub>a,c</sub> | 8,69 ± 0,58 <sub>a,b,c</sub> | 99 ± 1,1 <sub>a,b</sub> | 30,18 ± 3,12 <sub>b</sub>   | 463,40 ± 16,21 <sub>d</sub>    | 102,31 ± 9,89 <sub>b,c</sub>  |
| SA50 st4                            | 5,97 ± 0,42 <sub>a,b</sub> | 9,36 ± 0,49 <sub>b,c</sub>   | 98 ± 1,5 <sub>a,b</sub> | 27,74 ± 3,54 <sub>a,b</sub> | 168,21 ± 14,37 <sub>a,b</sub>  | 47,60 ± 6,61 <sub>a</sub>     |
| SA100 st4                           | 6,44 ± 0,33 <sub>b</sub>   | 10,14 ± 0,51 <sub>c</sub>    | 100 ± 0,6 <sub>b</sub>  | 27,92 ± 2,85 <sub>a,b</sub> | 149,48 ± 13,71 <sub>a,b</sub>  | 57,47 ± 5,94 <sub>a</sub>     |
| C st-                               | 4,40 ± 0,25 <sub>c</sub>   | 8,92 ± 0,48 <sub>a,b,c</sub> | 99 ± 0,7 <sub>a,b</sub> | 16,05 ± 1,19 <sub>c,d</sub> | 208,59 ± 14,33 <sub>c</sub>    | 149,14 ± 13,15 <sub>d</sub>   |
| SA50 st-                            | 4,41 ± 0,34 <sub>c</sub>   | 7,77 ± 0,38 <sub>a</sub>     | 100 ± 0,8 <sub>b</sub>  | 15,75 ± 1,28 <sub>d</sub>   | 176,3 ± 13,72 <sub>a,b,c</sub> | 117,01 ± 12,87 <sub>c</sub>   |
| SA100 st-                           | 4,67 ± 0,37 <sub>c</sub>   | 8,61 ± 0,49 <sub>a,b</sub>   | 97 ± 0,8 <sub>a</sub>   | 16,02 ± 0,15 <sub>c,d</sub> | 165,72 ± 13,35 <sub>a,b</sub>  | 117,27 ± 12,93 <sub>c</sub>   |
| <i>4<sup>th</sup> Day of Stress</i> |                            |                              |                         |                             |                                |                               |
| C                                   | 7,35 ± 0,46 <sub>a</sub>   | 9,72 ± 0,23 <sub>a</sub>     | 95 ± 1,2 <sub>a</sub>   | 31,15 ± 3,21 <sub>a</sub>   | 145,53 ± 12,99 <sub>a</sub>    | 73,54 ± 9,29 <sub>a,b,c</sub> |
| SA50                                | 7,52 ± 0,31 <sub>a</sub>   | 9,52 ± 0,33 <sub>a</sub>     | 98 ± 1,5 <sub>a,b</sub> | 28,92 ± 3,48 <sub>a</sub>   | 113,06 ± 12,85 <sub>a</sub>    | 56,01 ± 7,96 <sub>a</sub>     |
| SA100                               | 8,09 ± 0,42 <sub>a</sub>   | 11,51 ± 0,34 <sub>b</sub>    | 100 ± 0,8 <sub>b</sub>  | 31,29 ± 3,09 <sub>a</sub>   | 134,71 ± 13,28 <sub>a</sub>    | 64,95 ± 7,87 <sub>a</sub>     |
| C st4                               | 5,32 ± 0,27 <sub>b</sub>   | 7,61 ± 0,34 <sub>c</sub>     | 100 ± 0,5 <sub>b</sub>  | 30,63 ± 3,39 <sub>a</sub>   | 418,30 ± 17,32 <sub>b</sub>    | 106,96 ± 11,69 <sub>d</sub>   |
| SA50 st4                            | 5,52 ± 0,38 <sub>b</sub>   | 8,40 ± 0,45 <sub>c,d</sub>   | 100 ± 0,8 <sub>b</sub>  | 30,09 ± 3,56 <sub>a</sub>   | 190,98 ± 13,94 <sub>c</sub>    | 73,54 ± 8,23 <sub>a,b,c</sub> |
| SA100 st4                           | 5,43 ± 0,26 <sub>b</sub>   | 8,12 ± 0,33 <sub>c,d</sub>   | 97 ± 1,3 <sub>a,b</sub> | 32,36 ± 4,03 <sub>a</sub>   | 224,49 ± 13,87 <sub>c,d</sub>  | 66,50 ± 3,77 <sub>a,b</sub>   |
| C st-                               | 4,88 ± 0,44 <sub>b</sub>   | 9,28 ± 0,51 <sub>a</sub>     | 66 ± 1,8 <sub>c</sub>   | 17,03 ± 0,94 <sub>b</sub>   | 274,23 ± 14,47 <sub>e</sub>    | 99,48 ± 8,34 <sub>d</sub>     |
| SA50 st-                            | 4,94 ± 0,37 <sub>b</sub>   | 9,15 ± 0,48 <sub>a,d</sub>   | 76 ± 2,3 <sub>d</sub>   | 17,83 ± 1,37 <sub>b</sub>   | 212,37 ± 13,16 <sub>c,d</sub>  | 89,95 ± 7,78 <sub>b,c,d</sub> |
| SA100 st-                           | 4,59 ± 0,34 <sub>b</sub>   | 8,63 ± 0,37 <sub>a,c,d</sub> | 77 ± 2,1 <sub>d</sub>   | 18,01 ± 1,67 <sub>b</sub>   | 243,81 ± 13,66 <sub>d,e</sub>  | 93,30 ± 8,91 <sub>c,d</sub>   |

\*C, SA50 and SA100 represent plants irrigated with Hoagland solution containing 0µM, 50µM and 100µM salicylic acid in nutrient media, respectively. \*\* The abbreviations next to the treatments; st4 represents cold stress applied at 4°C, and st- represents freezing stress applied at -0.5°C.

The letters at the bottom right of the results indicate statistically significant differences (p≤0.05) compared to control plants grown at room temperature. 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> days of stress should be examined separately.

Ion leakage levels increased with the intensity of stress on non-SA treated control plants except freezing-stressed roots on the 4th day, which had similar values to cold-stressed roots on the 4th day (Table 2). The levels in both tissues under chilling and freezing stress for 1- and 4-day

durations were always lower with SA application, with cold-stressed shoots on the 1st day, shoots and roots under normal conditions, and shoots under freezing stress on the 4th day being significant.

Table 2. Cell membrane integrity parameters ion leakage and malondialdehyde (MDA) levels and the level of reactive oxygen species hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

| Treatments                    | Ion Leakage (%)                 |                               | MDA (nmol/g DW)               |                                | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol/g DW) |                                |
|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---|--------------------------------|
|                               | Shoot                           | Root                          | 1 <sup>st</sup> Day of Stress |                                |   |                                |
|                               |                                 |                               | Shoot                         | Root                           | Shoot                                     | Root                           |
| C*                            | 17,34 ± 1,94 <sub>a,b,c,d</sub> | 16,88 ± 1,40 <sub>a</sub>     | 0,019 ± 0,001 <sub>a</sub>    | 0,012 ± 0,001 <sub>a,b,c</sub> | 0,079 ± 0,006 <sub>a</sub>                | 0,125 ± 0,013 <sub>a</sub>     |
| SA50                          | 14,87 ± 1,39 <sub>a</sub>       | 14,52 ± 1,37 <sub>a</sub>     | 0,018 ± 0,001 <sub>a</sub>    | 0,013 ± 0,002 <sub>a,b,c</sub> | 0,102 ± 0,017 <sub>a,b</sub>              | 0,184 ± 0,017 <sub>b</sub>     |
| SA100                         | 15,01 ± 0,76 <sub>a</sub>       | 15,04 ± 0,88 <sub>a</sub>     | 0,019 ± 0,001 <sub>a</sub>    | 0,012 ± 0,001 <sub>a,b,c</sub> | 0,112 ± 0,013 <sub>a,b</sub>              | 0,202 ± 0,012 <sub>b,c</sub>   |
| C st4**                       | 19,58 ± 1,26 <sub>c,d</sub>     | 31,36 ± 3,30 <sub>b,c</sub>   | 0,020 ± 0,002 <sub>a</sub>    | 0,014 ± 0,001 <sub>b,c</sub>   | 0,129 ± 0,014 <sub>b,c</sub>              | 0,199 ± 0,014 <sub>b,c</sub>   |
| SA50 st4                      | 15,46 ± 1,28 <sub>a,b,c</sub>   | 26,52 ± 3,21 <sub>b</sub>     | 0,020 ± 0,002 <sub>a</sub>    | 0,010 ± 0,001 <sub>a</sub>     | 0,130 ± 0,011 <sub>b,c</sub>              | 0,176 ± 0,016 <sub>b</sub>     |
| SA100 st4                     | 15,17 ± 1,33 <sub>a,b</sub>     | 24,81 ± 2,97 <sub>b</sub>     | 0,020 ± 0,003 <sub>a</sub>    | 0,011 ± 0,001 <sub>a,b</sub>   | 0,097 ± 0,005 <sub>a</sub>                | 0,100 ± 0,013 <sub>a</sub>     |
| C st-                         | 21,16 ± 1,97 <sub>d</sub>       | 40,07 ± 2,96 <sub>d</sub>     | 0,018 ± 0,001 <sub>a</sub>    | 0,018 ± 0,002 <sub>d</sub>     | 0,151 ± 0,015 <sub>b,c</sub>              | 0,206 ± 0,011 <sub>b,c</sub>   |
| SA50 st-                      | 17,33 ± 1,86 <sub>a,b,c,d</sub> | 36,36 ± 3,72 <sub>c,d</sub>   | 0,017 ± 0,002 <sub>a,b</sub>  | 0,015 ± 0,001 <sub>c,d</sub>   | 0,082 ± 0,007 <sub>a</sub>                | 0,234 ± 0,010 <sub>c</sub>     |
| SA100 st-                     | 19,44 ± 1,54 <sub>b,c,d</sub>   | 37,92 ± 3,08 <sub>c,d</sub>   | 0,012 ± 0,002 <sub>b</sub>    | 0,015 ± 0,001 <sub>c,d</sub>   | 0,125 ± 0,016 <sub>b,c</sub>              | 0,197 ± 0,017 <sub>b,c</sub>   |
| 4 <sup>th</sup> Day of Stress |                                 |                               |                               |                                |   |                                |
|                               | Shoot                           | Root                          | Shoot                         | Root                           | Shoot                                     | Root                           |
| C                             | 20,12 ± 1,79 <sub>a</sub>       | 24,20 ± 1,46 <sub>a,b</sub>   | 0,018 ± 0,002 <sub>a,b</sub>  | 0,010 ± 0,00 <sub>a</sub>      | 0,091 ± 0,003 <sub>a,b</sub>              | 0,158 ± 0,020 <sub>a,b</sub>   |
| SA50                          | 12,74 ± 0,89 <sub>b</sub>       | 18,39 ± 1,32 <sub>a</sub>     | 0,017 ± 0,001 <sub>a</sub>    | 0,010 ± 0,00 <sub>a</sub>      | 0,090 ± 0,002 <sub>a,b</sub>              | 0,164 ± 0,032 <sub>a,b</sub>   |
| SA100                         | 12,96 ± 1,27 <sub>b</sub>       | 18,35 ± 1,27 <sub>a</sub>     | 0,016 ± 0,00 <sub>a,c</sub>   | 0,010 ± 0,001 <sub>a</sub>     | 0,052 ± 0,001 <sub>a</sub>                | 0,189 ± 0,031 <sub>b</sub>     |
| C st4                         | 23,45 ± 2,22 <sub>a</sub>       | 37,33 ± 2,73 <sub>c</sub>     | 0,021 ± 0,001 <sub>b</sub>    | 0,018 ± 0,001 <sub>b</sub>     | 0,182 ± 0,016 <sub>c</sub>                | 0,208 ± 0,024 <sub>b,c,d</sub> |
| SA50 st4                      | 22,29 ± 2,16 <sub>a</sub>       | 35,14 ± 2,73 <sub>c,d</sub>   | 0,016 ± 0,00 <sub>a,c</sub>   | 0,014 ± 0,001 <sub>c</sub>     | 0,144 ± 0,022 <sub>c,d</sub>              | 0,197 ± 0,025 <sub>b,c</sub>   |
| SA100 st4                     | 22,49 ± 1,90 <sub>a</sub>       | 34,7 ± 2,00 <sub>c,d</sub>    | 0,020 ± 0,001 <sub>b</sub>    | 0,016 ± 0,00 <sub>d</sub>      | 0,139 ± 0,008 <sub>c,d</sub>              | 0,100 ± 0,019 <sub>a</sub>     |
| C st-                         | 25,66 ± 3,21 <sub>a</sub>       | 34,07 ± 3,79 <sub>c,d</sub>   | 0,014 ± 0,00 <sub>c,d</sub>   | 0,012 ± 0,001 <sub>e</sub>     | 0,104 ± 0,028 <sub>b,d</sub>              | 0,279 ± 0,031 <sub>d</sub>     |
| SA50 st-                      | 13,55 ± 1,45 <sub>b</sub>       | 28,28 ± 3,31 <sub>b,d</sub>   | 0,014 ± 0,001 <sub>c,d</sub>  | 0,011 ± 0,00 <sub>a,e</sub>    | 0,104 ± 0,009 <sub>b,d</sub>              | 0,272 ± 0,027 <sub>c,d</sub>   |
| SA100 st-                     | 23,59 ± 2,34 <sub>a</sub>       | 30,68 ± 1,89 <sub>b,c,d</sub> | 0,013 ± 0,001 <sub>d</sub>    | 0,010 ± 0,00 <sub>a</sub>      | 0,103 ± 0,019 <sub>b,d</sub>              | 0,265 ± 0,029 <sub>c,d</sub>   |

\*C, SA50 and SA100 represent plants irrigated with Hoagland solution containing 0 μM, 50μM and 100μM salicylic acid in nutrient media, respectively. \*\* The abbreviations next to the treatments; st4 represents cold stress applied at 4°C, and st- represents freezing stress applied at -0.5°C.

The letters at the bottom right of the results indicate statistically significant differences (p≤0.05) compared to control plants grown at room temperature. 1<sup>st</sup> and 4<sup>th</sup> days of stress should be examined separately.

Shoot MDA levels were not significantly affected by neither stress nor SA application, with reductions in 100 μM SA treated shoots under the 1st day of freezing stress and 50 μM treated shoots under the 4th day of chilling stress being exceptions (Table 2). Root tissues were more responsive to chilling and freezing stresses in terms of MDA levels. Levels increased for both stresses under both durations. SA applications in

the 50 μM concentration reduced MDA levels significantly under chilling stress conditions. Both chilling and freezing stress increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels in both tissues in both durations (Table 2). Under normal conditions, SA applications increased tissue H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, except for shoot tissue on the 4th day, in which the level was not changed with 50 μM SA application and decreased significantly upon 100 μM SA application. However, the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

levels decreased upon SA application in both tissues under both chilling and freezing stresses. Magnitudes of significant decreases changed in the range of 1.1 to 2.1-fold, under 1 day long freezing stress and 4 days long chilling stress applied root tissue, respectively.

Comparative analysis of all antioxidative stress indicators revealed that salicylic acid played a crucial role in combating stress by preserving cell membrane integrity, reducing ion leakage, and increasing water-holding capacity. Similar observations in terms of ion leakage, MDA and relative water content levels were also made by Mutlu et al. (2016), Wang et al. (2020), and Golovatskaya et al. (2023) in barley, wheat, and potato plants, respectively. In pea tissues under stress, especially under cold stress, proline levels significantly increased. However, it was determined that salicylic acid did not contribute to the role of osmo protectant proline in the stress response system. Nevertheless, Wang et al. (2022) showed that salicylic acid application increased proline accumulation under freezing stress in winter wheat seeds, indicating that salicylic acid's effects may vary in different plant species.

SOD enzyme activity was detected in both pea tissues in the form of several or one of the Mn SOD1, CuZn SOD1, and CuZn SOD2 isozymes as determined by KCN/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment (data not shown). Shoots exhibited more intense activity when compared to roots under any treatment. Total SOD activity in shoot tissues was comprised of the activities of all three isozymes. In root

tissues, activities of Mn SOD1 and CuZn SOD1 were undetectable under normal conditions and cold stress, whereas CuZn SOD2 was the only isozyme active under freezing stress (data not shown). In shoot tissue, cold stress increased SOD activity on the 1st day of stress for all treatments and only in non-SA treated seedlings on the 4th day of stress (Figure 1). SA application with one-day duration increased SOD activity in a concentration-dependent manner in shoot tissue under normal conditions and only upon 100 µM SA application on the 4th day. Significant decreases in shoot SOD activities were observed under the 4th day of cold stress upon SA treatments. In root tissue, increasing stress intensities increased SOD activity in an SA application-independent manner (Figure 1). Unlike root tissue, freezing stress always caused reductions in shoot SOD activity. In summary, SOD enzyme activity showed significant increases, especially on the 1st day of cold stress, compared to plants under normal conditions, but activities decreased with prolonged stress or intensified freezing stress. However, SOD enzyme activities showed a significant increase in the presence of salicylic acid at different isoenzyme levels. Similarly, Tekin & Ceyhan (2020) reported that an increase in SOD activity was observed in pea plants exposed to cold stress. Salicylic acid has also been shown to increase SOD enzyme activity in alfalfa, cucumber, barley, and potato plants under cold stress (Golovatskaya et al., 2023; Ignatenko et al., 2021; Mutlu et al., 2016; Wang et al., 2023).



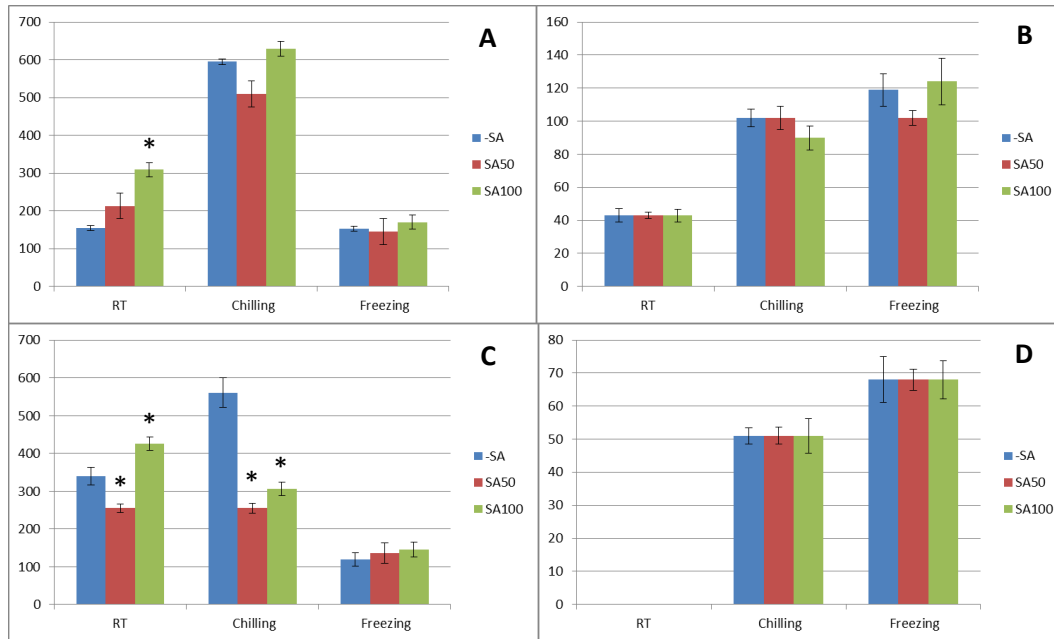


Figure 1. Superoxide dismutase (SOD) enzyme activities in shoots at day 1 (A), in roots at day 1 (B), in shoots at day 4 (C), in roots at day 4 (D) RT, Chilling and Freezing represent room temperature, cold stress applied at 4°C, and freezing stress applied at -0.5°C, respectively. Columns show the total activity of MnSOD1, CuZnSOD1 and CuZnSOD2 isoenzymes. \*Indicates significant differences ( $p \leq 0.05$ ) compared to the respective control.

Shoot *PDH47* expressions increased with the intensity of stress on day 1 of stress application without SA treatment (Figure 2). SA treatments significantly increased *PDH47* expressions under

normal growth conditions up to 10-fold and under cold and freezing stress applications in a range of 1.2 to 4-fold.

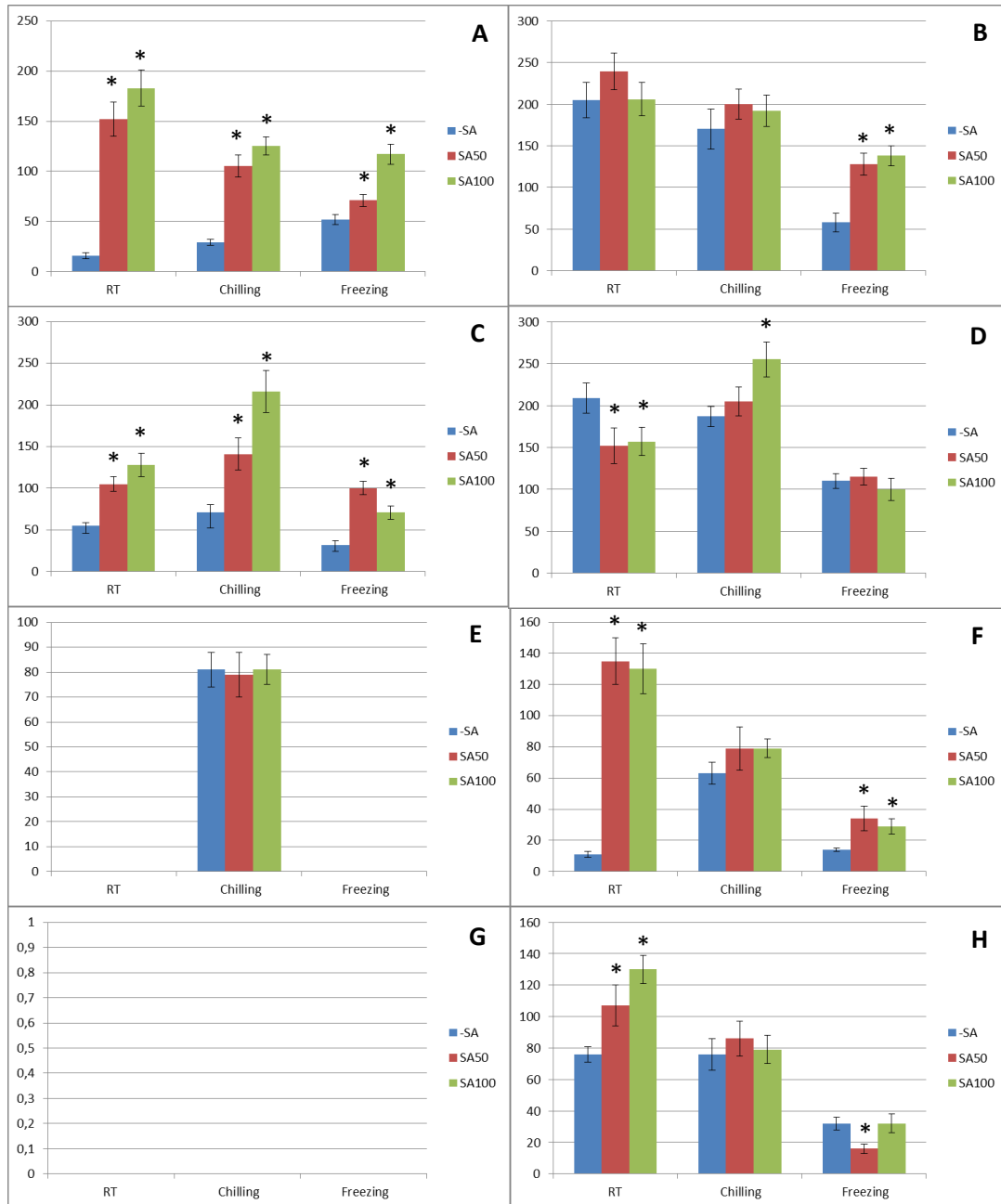


Figure 2. *PDH47* and *TOP2* gene expressions respective to internal control actin gene. *PDH47* expression on day 1 shoot (A), day 1 root (B), day 4 shoot (C), and day 4 root (D). *TOP2* expression on day 1 shoot (E), day 1 root (F), day 4 shoot (G) and day 4 root (H). RT, Chilling and Freezing represent room temperature, cold stress applied at 4°C, and freezing stress applied at -0.5°C, respectively. \*Indicates significant differences ( $p \leq 0.05$ ) compared to the respective control.

Unlike non-SA treated controls, *PDH47* activity decreased with the intensity of stress application under SA treatments. The lowest expression was observed under normal conditions on non-SA treated seedlings and the highest expression was on 100  $\mu\text{M}$  SA-treated explants under normal conditions. SA-dependent expression patterns for shoots were similar on day 4 in normal and stress conditions, being higher under SA treatments compared to non-SA treated seedlings. However, unlike a steady decline in the intensity of stress as on day 1, all treatment groups showed higher expressions under chilling stress compared to

room temperature and freezing stress on day 4.

Root tissue also exhibited strong *PDH47* expression under normal and stress conditions, while the expression was mostly unaffected from SA treatments (Figure 2). SA application significantly increased the expression only under 1 day freezing stressed roots and under 4 days chilling stressed roots compared to non-SA treated controls, while the application significantly decreased the expression levels under normal conditions compared to non-SA treated control on the 4th day. The levels of *PDH47* expression were lowest under freezing

stress for each treatment compared to expressions under normal conditions and cold stress.

Shoot *TOP2* expression was absent under every condition and application tested and appeared only under 1-day long cold stress treatment at the same intensity independent from SA application (Figure 2). Unlike shoot tissue, *TOP2* activity was present in root tissue under every treatment for both durations. SA application in both concentrations usually increased *TOP2* expression under normal and stress conditions, except for 4 days of freezing stress. Freezing stress did not affect *TOP2* expression level in non-SA treated seedlings under 1-day treatment; however, it decreased the expression under 4-days treatment compared to control plants under normal conditions. In SA treated plants, *TOP2* expression decreased gradually with increasing intensity of stress.

Investigations into the expression of *TOP2*, *PDH47*, and actin genes under cold and freezing stresses with salicylic acid applications revealed that all three genes were induced by stress and responded to the presence of salicylic acid in the environment. Hettiarachchi et al. (2005) demonstrated that *TOP2* gene expression increased under cold and salt stresses, as well as with applications of salicylic acid and ABA from phytohormones. The reason for the increase in *TOP2* gene expression under stress when DNA replication and cellular activities decrease has not been fully explained, but it has been suggested that it may be related to chromatin modeling and the need for DNA to adopt appropriate topology for the expression of stress-regulated genes. Significant increases were observed in the expression of the *PDH47* gene in stem and root tissues under salinity and cold stress in peas (Vashisht et al., 2005). When the *PDH47* gene was transferred to indica rice, the plant acquired resistance features under drought stress, demonstrating this by increasing relative water content with proline and reducing internal hydrogen peroxide levels (Singha et al., 2020; Singha et al., 2017). The data obtained in this study suggest that the expressions of these genes, which are believed to function in ribosome biogenesis, transcription, translation, and repair of damaged DNA/RNA molecules and potentially play an active role in stress tolerance, can be increased with salicylic acid. These increases might have positive effects observed on the

antioxidative defense system.

## Conclusions

This study has shown that the application of salicylic acid, when added to the growth medium, can have positive effects on the cold resistance of pea plants. Salicylic acid likely achieves some of its effects by increasing the activity of superoxide dismutase, one of the most important enzymes taking a role in combating reactive oxygen species. The data obtained indicates that salicylic acid increased the expressions of *TOP2* and *PDH47* genes, which can both change the structure of the DNA molecule. By altering the topology of DNA, they likely facilitate the transcription of genes encoding defense enzymes under both cold and freezing stress. Salicylic acid probably activates other enzymatic antioxidative system members such as CAT and POD, reducing the levels of reactive oxygen species such as hydrogen peroxide, which was also examined in this study. In this way, salicylic acid maintains cell membrane integrity, leading to a decrease in ion leakage and an increase in water-holding capacity. In summary, salicylic acid has been shown to induce various changes in pea metabolism, some of which were examined in this study, and these changes have been determined to have positive effects on the plant's cold (4°C) and freezing stress (-0.5°C) response systems at a level that can be utilized in agricultural cultivation.

## Acknowledgement

This study was funded by TÜBİTAK with the project number of 102O367.

## Disclosure Statement

The authors declare that they have no competing interests.

## Contributions

Ufuk Celikkol Akçay, Hande Nur Kumbul and İbrahim Ertan Erkan equally contributed to experimental design, performance of analyses and the preparation of the manuscript.

## References

- Alan, M. (1984). Pea hand book. *Ege Agricultural Research Institute Publications* (37), 27.

- Andarwulan, N., & Shetty, K. (1999). Improvement of pea (*Pisum sativum*) seed vigour response by fish protein hydrolysates in combination with acetyl salicylic acid. *Process Biochemistry*, 35(1-2), 159-165.
- Aubourg, S., Kreis, M., & Lecharny, A. (1999). The DEAD box RNA helicase family in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic acids research*, 27(2), 628-636.
- Beauchamp, C., & Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
- Bergmeyer, H.U. (2012). *Methods of enzymatic analysis*. Elsevier.
- Boudet, N., Aubourg, S., Toffano-Nioche, C., Kreis, M., & Lecharny, A. (2001). Evolution of intron/exon structure of DEAD helicase family genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditis*, and *Drosophila*. *Genome Research*, 11(12), 2101-2114.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Ceyhan, E. (2006). Genetic analysis of cold hardiness in peas (*Pisum sativum* L.). *Journal of Plant Sciences*, 1(2), 138-143.
- Chen, S., Zhao, C. B., Ren, R. M., & Jiang, J. H. (2023). Salicylic acid had the potential to enhance tolerance in horticultural crops against abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1141918.
- Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2007). Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends in plant science*, 12(10), 444-451.
- Duke, J. (2012). *Handbook of legumes of world economic importance*. Springer Science & Business Media.
- Garstka, M., Venema, J. H., Rumak, I., Gieczewska, K., Rosiak, M., Koziol-Lipinska, J., Kierdaszuk, B., Vredenberg, W. J., & Mostowska, A. (2007). Contrasting effect of dark-chilling on chloroplast structure and arrangement of chlorophyll-protein complexes in pea and tomato: plants with a different susceptibility to non-freezing temperature. *Planta*, 226, 1165-1181.
- Georgieva, K., & Lichtenthaler, H. K. (1999). Photosynthetic activity and acclimation ability of pea plants to low and high temperature treatment as studied by means of chlorophyll fluorescence. *Journal of Plant Physiology*, 155(3), 416-423.
- Golovatskaya, I., Kadyrbaev, M., Boyko, E., & Filonova, M. (2023). Salicylic Acid Improves Cold Resistance of *Solanum tuberosum* Regenerants via Regulation of the Antioxidant System. *Russian Journal of Plant Physiology*, 70(5), 112.
- Gökmen, E., Ceyhan, E. (2015). Effects of drought stress on growth parameters, enzyme activities and proline content in chickpea genotypes. *Bangladesh Journal of Botany*, 44 (2), 177-183.
- Hettiarachchi, G. H., Reddy, M. K., Sopory, S. K., & Chattopadhyay, S. (2005). Regulation of TOP2 by various abiotic stresses including cold and salinity in pea and transgenic tobacco plants. *Plant and cell physiology*, 46(7), 1154-1160.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347(2nd edit).
- Ignatenko, A., Talanova, V., Repkina, N., & Titov, A. (2021). Effect of Salicylic Acid on Antioxidant Enzymes and Cold Tolerance of Cucumber Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 68(3), 491-498.
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. In: Portland Press Ltd.
- Liu, H. T., Huang, W. D., Pan, Q. H., Weng, F. H., Zhan, J. C., Liu, Y., Wan, S. B., & Liu, Y. Y. (2006). Contributions of PIP2-specific-phospholipase C and free salicylic acid to heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *Journal of Plant Physiology*, 163(4), 405-416.
- Liu, H. T., Liu, Y. Y., Pan, Q. H., Yang, H. R., Zhan, J. C., & Huang, W. D. (2006). Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP2-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57(12), 3337-3347.
- Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of biochemistry and biophysics*, 444(2), 139-158.
- McCue, P., Zheng, Z., Pinkham, J. L., & Shetty, K. (2000). A model for enhanced pea seedling vigour following low pH and salicylic acid treatments. *Process Biochemistry*, 35(6), 603-613.
- Mutlu, S., Atıcı, Ö., Nalbantoğlu, B., & Mete, E. (2016). Exogenous salicylic acid alleviates cold damage by regulating antioxidative system in two barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Frontiers in Life Science*, 9(2), 99-109.
- Nanjo, T., Kobayashi, M., Yoshida, Y., Kakubari, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999). Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 461(3), 205-210.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Özdemir, S. (2002). *Yemeklik Baklagiller*. Hasad Yayıncılık.
- Ruelland, E., & Zachowski, A. (2010). How plants sense temperature. *Environmental and experimental botany*, 69(3), 225-232.
- Saleem, M., Fariduddin, Q., & Janda, T. (2021). Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: A review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 40, 464-485.
- Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., & Shinozaki, K. (2001). Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell*, 13(1), 61-72.
- Singh, B., Mishra, R., Agarwal, P. K., Goswami, M., Nair, S., Sopory, S., & Reddy, M. (2004). A pea chloroplast translation elongation factor that is regulated by abiotic factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 320(2), 523-530.

- Singh, B., Sopory, S., & Reddy, M. (2004). Plant DNA topoisomerases: structure, function, and cellular roles in plant development. *Critical reviews in plant sciences*, 23(3), 251-269.
- Singha, D. L., Sarma, S., & Singh, S. (2020). Understanding the mode of regulation of proline biosynthesis for drought tolerance in transgenic rice overexpressing PDH47 gene.
- Singha, D. L., Tuteja, N., Boro, D., Hazarika, G. N., & Singh, S. (2017). Heterologous expression of PDH47 confers drought tolerance in indica rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 130, 577-589.
- Smart, R. E., & Bingham, G. E. (1974). Rapid estimates of relative water content. *Plant Physiology*, 53(2), 258-260.
- Srivastava, S., Rahman, M. H., Shah, S., & Kav, N. N. (2006). Constitutive expression of the pea ABA-responsive 17 (ABR17) cDNA confers multiple stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant biotechnology journal*, 4(5), 529-549.
- Streb, P., Aubert, S., Gout, E., & Bligny, R. (2003). Cold-and light-induced changes of metabolite and antioxidant levels in two high mountain plant species *Soldanella alpina* and *Ranunculus glacialis* and a lowland species *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 96-104.
- Stupnikova, I., Benamar, A., Tolleter, D., Grelet, J., Borovskii, G., Dorne, A. J., & Macherel, D. (2006). Pea seed mitochondria are endowed with a remarkable tolerance to extreme physiological temperatures. *Plant Physiology*, 140(1), 326-335.
- Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., & Zhu, J. K. (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in plant science*, 12(7), 301-309.
- Tekin, N. B., Ceyhan, E. (2020). Effects of cold stress on enzyme activities in peas. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 7(1): 170–177.
- Vashisht, A. A., Pradhan, A., Tuteja, R., & Tuteja, N. (2005). Cold-and salinity stress-induced bipolar pea DNA helicase 47 is involved in protein synthesis and stimulated by phosphorylation with protein kinase C. *The Plant Journal*, 44(1), 76-87.
- Vashisht, A. A., & Tuteja, N. (2005). Cold stress-induced pea DNA helicase 47 is homologous to eIF4A and inhibited by DNA-interacting ligands. *Archives of biochemistry and biophysics*, 440(1), 79-90.
- Vashisht, A. A., & Tuteja, N. (2006). Stress responsive DEAD-box helicases: a new pathway to engineer plant stress tolerance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 84(2), 150-160.
- Wang, W., Wang, X., Lv, Z., Khanzada, A., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Huo, Z., & Jiang, D. (2022). Effects of cold and salicylic acid priming on free proline and sucrose accumulation in winter wheat under freezing stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(6), 2171-2184.
- Wang, W., Wang, X., Zhang, J., Huang, M., Cai, J., Zhou, Q., Dai, T., & Jiang, D. (2020). Salicylic acid and cold priming induce late-spring freezing tolerance by maintaining cellular redox homeostasis and protecting photosynthetic apparatus in wheat. *Plant Growth Regulation*, 90, 109-121.
- Wang, X., Miao, J., Kang, W., & Shi, S. (2023). Exogenous application of salicylic acid improves freezing stress tolerance in alfalfa. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1091077.
- Welbaum, G., Bian, D., Hill, D., Grayson, R., & Gunatilaka, M. (1997). Freezing tolerance, protein composition, and abscisic acid localization and content of pea epicotyl, shoot, and root tissue in response to temperature and water stress. *Journal of Experimental Botany*, 48(3), 643-654.
- Xie, Z., Fan, B., Chen, C., & Chen, Z. (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(11), 6516-6521.
- Zomer, R.T., Bossio, D.A., Sommer, R., & Verchot LV (2017). Global sequestration potential of increased organic carbon in cropland soils. *Sci Rep*, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15794-8>.



# Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit (NAA) uygulamalarının pamuğun (*Gossypium hirsutum* L.) verim ve bazı tarımsal özelliklerine etkisi

## *Effect of naphthalene acetic acid (NAA) applications at different periods and doses on the yield and some agricultural characteristics of cotton (Gossypium hirsutum L.)*

Hasan HALILOĞLU<sup>1\*</sup>, Orhan ÇOKLU<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Osmanbey Kampüsü Şanlıurfa/Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0002-6826-3320>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0009-0006-8269-5417>

### To cite this article:

Haliloğlu, H. & Çoklu, O. (2024). Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit (naa) uygulamalarının pamuğun (*Gossypium hirsutum* L.) verim ve bazı tarımsal özelliklerine etkisi. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(1):335-344

DOI: 10.29050/harranziraat.1423585

### \*Address for Correspondence:

Hasan Haliloğlu

e-mail:

haliloglu@harran.edu.tr

### Received Date:

22.01.2024

### Accepted Date:

25.14.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ÖZ

Bu çalışma farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit (NAA) uygulamalarının pamuğun (*Gossypium hirsutum* L.) verim ve bazı tarımsal özelliklerine etkisini belirlemek amacıyla planlanmıştır. Deneme Şanlıurfa ili Harran Ovası koşullarında 2017 ve 2018 yılları yetiştirme sezonlarında tesadüf blokları deneme deseninde üç tekrarlamalı olarak kurulmuştur. NAA uygulamaları kontrol, taraklanma başlangıcı + çiçeklenme başlangıcı (T.B.+Ç.B.) dönemlerinde (15+15 g da<sup>-1</sup>, 30+30 g da<sup>-1</sup>, 45+45 g da<sup>-1</sup>), taraklanma başlangıcı + çiçeklenme doruğu (T.B.+Ç.D.) dönemlerinde (15+15 g da<sup>-1</sup>, 30+30 g da<sup>-1</sup>, 45+45 g da<sup>-1</sup>) ve çiçeklenme başlangıcı + çiçeklenme doruğu (Ç.B.+Ç.D.) dönemlerinde (15+15 g da<sup>-1</sup>, 30+30 g da<sup>-1</sup>, 45+45 g da<sup>-1</sup>) olacak şekilde uygulamalar yapılmıştır.

Çalışmada; En yüksek kütlü pamuk verimi, meyve dalı sayısı, koza sayısı, koza kütlü pamuk ağırlığı Ç.B.30+Ç.D.30 uygulamasından, en yüksek erkencilik oranı Ç.B.45+Ç.D.45 uygulamasından ve en yüksek bitki boyu Ç.B.15+Ç.D.15 uygulamasından elde edilmiştir. Farklı dönemlerde bölünmüş dozlar şeklinde NAA uygulamalarının 100 tohum ağırlığı ve odun dalı sayısına herhangi bir etkisi olmamıştır. Çırcır randımanı ve lif indeksi özelliklerinde NAA uygulamalarının etkisinin olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışmada; kütlü pamuk verimleri 435.43 kg da<sup>-1</sup> ile 762.01 kg da<sup>-1</sup> arasında değişmiştir. Harran Ovası koşullarında kütlü pamuk için Ç.B.30+Ç.D.30 uygulaması tercih edilmelidir.

**Anahtar Kelimeler:** Pamuk, naftalin asetik asit, farklı dönem, doz, verim

### ABSTRACT

This study was conducted to determine the effect of naphthalene acetic acid application (NAA) on the yield and some agricultural properties of cotton. The experiment was established under the Harran Plain conditions of Şanlıurfa province in 2017 and 2018 growing seasons as randomized complete block design with three replications. NAA applications were performed as follow, the control, at the beginning of squaring + the beginning of flowering (B.S.+B.F.) periods (15+150 g ha<sup>-1</sup>, 300+300 g ha<sup>-1</sup>, 450+450 g ha<sup>-1</sup>), at the beginning of squaring + the peak of flowering (B.S.+P.F.) (150+150 g ha<sup>-1</sup>, 300+300 g ha<sup>-1</sup>, 450+450 g ha<sup>-1</sup>), and at the beginning of flowering + the peak of flowering (B.F.+P.F.) periods (150+150 g ha<sup>-1</sup>, 300+300 g ha<sup>-1</sup>, 450+450 g ha<sup>-1</sup>).

As a result of the study; the highest number of sympodial branches, number of bolls, boll seed cotton weight and seed cotton yield were obtained from B.F.300 +P.F.300 g ha<sup>-1</sup> application, the highest earliness ratio was obtained from B.F.450+P.F.450 g ha<sup>-1</sup>

application and the highest plant height was obtained from B.F.150+P.F.150 g ha<sup>-1</sup> application. NAA applications in divided doses at different periods were not have effect on the 100 seed weight and number of monopodial branches. The effect of NAA applications on ginning outturn and fiber index properties was not seen. In this study, the seed cotton yield varied between 4354.3 kg ha<sup>-1</sup> and 7620.1 kg ha<sup>-1</sup>. In Harran Plain conditions, B.F.300 +P.F.300 g ha<sup>-1</sup> application can be would rather for seed cotton yield.

**Key Words:** Cotton, naphthalene acetic acid, different periods, dose, yield

## Giriş

Genetik iyileştirmeler ürünlerdeki verim potansiyelini arttırmada büyük gelişmeler sağlamış olsa da çevresel faktörlerden, gübre uygulamalarından ve çeşitli biyotik ve abiyotik streslerden etkilenen fiili üretimdeki verim farkı, verim stabilitesini büyük ölçüde etkilemektedir (Ren ve ark., 2023). Bu nedenle, bitkilerin büyüme performansını artıracak ve abiyotik streslerin ve uygun olmayan yetiştirme koşullarının verim stabilitesi üzerindeki olumsuz etkilerini azaltacak yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitki büyüme düzenleyicilerinin yoğun olarak kullanıldığı bitkilerden bir tanesi de pamuktur (Liu ve ark., 2022).

Sürekli büyüme özelliği gösteren pamuk, odunsu ve çalı yapılı çok yıllık bir bitkidir. Dünyadaki bazı tropikal alanların kuru alanlarında zaman içerisinde gelişim sağlamıştır. Yapılan ıslah ve adaptasyon çalışmalarıyla yarı kurak ve sulanan yerlerde çok fazla yetiştirilmektedir. Ancak, bu adaptasyon değişimine rağmen, halen tropikal kökenli özelliklerin birçoğunu sergilemeye devam etmektedir. Pamuk bitkisi, yüksek ışık yoğunluğu ve sıcak iklim koşullarında gelişimini en iyi şekilde devam ettirmekte, bir düzeye kadar kuraklığa toleranslı olmakta ve yetiştirme döneminin geç zamanına kadar ve iklim şartlarının uygunluğuna göre bu gelişimini devam ettirmektedir.

Pamuk bitkisi yetiştiricilik koşullarına ve çevre değişikliklerine karşı çok duyarlıdır. Strese veya stres eksikliğine yanıt olarak vejetatif ve generatif büyümesindeki değişim tahmin edilebilir. Bununla birlikte, pamuk bitkisinin meyve kaybını telafi etme veya stresten kurtulma yeteneği şaşırtıcı olabilir. Pamuk üreticileri verimli pamuk üretimi için generatif ve vejetatif büyüme arasındaki dengeyi yönetmek amacıyla bitki gelişim düzenleyicileri (BGD) ve diğer kültürel uygulamaları kullanmaktadır.

Bitki büyüme düzenleyicilerin kullanımı, bitkilerde fizyolojik veya morfolojik süreçleri teşvik eden, engelleyen veya başka şekillerde değiştiren geniş bir bileşiği kapsar. Bazı BGD'ler bitki hormonları veya onların benzerleri olabilirken, diğerleri sadece metabolik

düzenleyicilerdir. Bu ürünler, bitkilerin büyüme ve gelişimini değiştiren organik bileşikler olarak sınıflandırılır. Bitki tarafından doğal olarak üretilen bitki hormonlarının aksine, BGD'ler bitki tarafından doğal olarak üretilmekte veya suni olarak üretilen kimyasal bileşikler olarak kabul edilmektedir. Düşük konsantrasyonlarda bile biyolojik olarak aktiftirler ve bitki hormonlarında gözlemlenenlere benzer tepkiler ortaya çıkarırlar. Bitki büyüme ve gelişme süreçlerinin çoğu doğal bitki hormonları tarafından düzenlendiğinden, bu süreçler ya bitki hormon seviyesini değiştirerek ya da bitkinin doğal hormonlarına tepki verme kapasitesini değiştirerek manipüle edilebilir. Tüm BGD'ler, büyümeyi kontrol etmek ve verimliliği artırmak amacıyla pamuk büyümesini ve gelişimini değiştirmek için üreticinin cephaneliğindeki yönetim araçları olarak düşünülmelidir (Jost ve ark., 2006).

Bitki gelişim düzenleyicileri üreticiler tarafından yüksek verim için verim artırıcı olarak kullanılabilir. Bunların kimyasal içerikleri ve kullanım hususlarına göre farklı tepkiler göstermektedir. Büyüme düzenleyicilerinin uygulanması, tarla ürünlerinin büyüme ve verimi üzerinde iyi bir yönetim etkisine sahiptir. Hormonlar, bitkilerde fizyolojik süreçleri düzenler ve sentetik büyüme düzenleyicileri tarla ürünlerinin büyüme ve gelişimini artırarak toplam kuru kütlelerini artırabilir. NAA bitkilerde kök sisteminin uçlarının gelişimini teşvik ederek daha fazla, düz ve kalın köklerin oluşmasında önemli etkiler ortaya çıkarır. NAA, meyve oluşturma oranını artırabilmekte, meyve dökülmesini önleyebilmekte ve çiçek cinsiyet oranını teşvik edebilir (Raofi ve ark., 2014).

NAA (1-Naftalinasetik asit) sentetik oksinlerin en önemlisidir. Oksinler dört gruba ayrılmaktadır. En önemlileri Naftalen, Indol, Benzol ve Fenoksi grubudur. Naftalin günümüzde çeşitli formülasyonları potasyum, amonyum ve sodyum tuzları şeklinde veya etil ester biçiminde satılmaktadır. Kristal bir yapıya sahip olup renksizdir (Çoklu, 2018).

NAA hormonu pamuk bitkisinde erken çiçek ve meyve dökülmelerini (silkmeye) önlemekte, çiçeklenmeyi teşvik etmekte, tarak ve koza

dökümünü azaltmakta, tohum iriliği, koza ağırlığı ve verimde önemli miktarda erkencilik ve artış sağlamaktadır. Hormonal olarak düzenlenen dökülme hızı, inhibitörlerinin uygulanmasıyla yavaşlatılabilir. Örneğin, ABA'nın teşvik ettiği meyve yapılarının dökülmesi, ABA'nın teşvik edici etkilerine karşı koyan NAA (naftalin asetik asit) ile kontrol edilebilir (Tarik et al., 2017). Harran ovasında özellikle temmuz ve ağustos aylarının aşırı sıcak olmasından dolayı zaman zaman bitkilerin su stresine girmeleri ve zararlı populasyonunda son zamanlarda gözlemlenen artış dolayısı ile silkme oranında artışlar olabilmektedir.

Bu çalışma farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamalarının pamuk bitkisinde verim ve bazı tarımsal özelliklerine etkisini saptamak için yapılmıştır.

## Materyal ve Metot

Bu çalışma 2017 ve 2018 yılları pamuk yetiştiricilik sezonlarında Harran Ovası şartlarında yürütülmüştür. Çalışmada, bitkisel materyal olarak Candia pamuk çeşidi ve bitki gelişim düzenleyicisi olarak ise ticari ismi BIOFORTUNE [%1.18 2-(1-Naphthyl) acetamide (NAD) %0.43 2-(1-Naphthyl) acetic acid (NAA)] olan ürün kullanılmıştır (Anonim, 2017b).

### Deneme yeri toprak özellikleri

Deneme alanındaki toprak derin profilli olup ana materyali killi-tınlı, tüm profilde kireç, potasyum ve fosfor oranı yüksek, organik maddece fakir, ancak hafif alkali yapıdadır (Anonim, 2017a).

Çalışma alanına ait toprak numunelerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri şu şekildedir.

Çizelge 1.1 Deneme alanına ait toprak numunelerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri

Table 1. Chemical and physical properties of the trial soils

|      | Derinlik (cm)<br>Depth (cm) | Organik Madde (%)<br>Organic matter (%) | pH   | Toplam Tuz (%)<br>Total salt | Kireç (%)<br>Lime (%) | P <sub>2</sub> O <sub>5</sub><br>(kg da <sup>-1</sup> ) | K <sub>2</sub> O<br>(kg da <sup>-1</sup> ) |
|------|-----------------------------|---|------|------------------------------|-----------------------|---|--|
| 2017 | 0-20                        | 0.5282                                  | 7.69 | 0.027                        | 17.9                  | 59.54   | 247.04                                     |
| 2018 | 0-20                        | 0.6324                                  | 7.73 | 0.019                        | 18.8                  | 52.31   | 158.53                                     |

Kaynak: Anonim, 2017a, 2018

Çizelge 1 incelendiğinde, deneme alanı toprağının kil bünyeli ve kireç içeriğinin yüksek ve pH'ın hafif bazik özellikte olduğu görülebilmektedir.

### İklim özellikleri

Harran Ovası Akdeniz ikliminin etkisinde olup, Karasal iklim hakimdir. Kışları soğuk ve yağışlı, yazları ise fazla sıcak ve kurak geçmektedir. Yıllık yağış miktarı 365 mm, yıllık buharlaşma ise 1.848 mm olup ortalama yıllık sıcaklık 17.2 °C'dir.

Çizelge 2.'den, yetiştirme dönemleri boyunca (Nisan-Kasım Ayları) ortalama sıcaklık değerleri birinci yılda (2017), 12.1°C - 34.2°C arasında; ikinci

yılında (2018), 14.1°C - 33.0°C arasında; maksimum sıcaklık değerleri birinci yılda (2017), 22.8°C - 41.3°C arasında; ikinci yılda (2017), 19.9°C - 39.8°C arasında; minimum sıcaklık değerleri 2017 yılında, 4.8°C ile 26.7°C arasında; 2018 yılında, 10°C ile 26.4 °C arasında; ortalama nisbi nem değerleri 2017 yılında, %22.9 ile %53.9 arasında; 2018 yılında, %29.8 ile %62.4 arasında; ortalama yağış miktarı değerleri 2017 yılında, 0.0 ile 79.2 mm arasında; 2018 yılında, 0.0 ile 83.2 mm arasında; 5 cm'deki toprak sıcaklık değerleri birinci yılda (2017), 11.3 °C - 36.2 °C arasında; ikinci yılda (2018) ise 13°C ile 37.9°C arasında değişim göstermiştir (Anonim, 2018).



Çizelge 2. Pamuk yetiştirme sezonlarında aylık ortalama bazı iklim değerleri

Table 2. Some monthly average climate dates for cotton growing seasons

|      |                                 | Nisan | Mayıs | Haziran | Temmuz | Ağustos | Eylül | Ekim | Kasım |
|------|---------------------------------|-------|-------|---------|--------|---------|-------|------|-------|
| 2017 | Ort. mak. sıcaklık (°C)         | 23.1  | 30.1  | 36.4    | 41.3   | 39.4    | 36.9  | 27.3 | 22.8  |
|      | Ort. min. sıcaklık (°C)         | 10.8  | 16.2  | 22.4    | 26.7   | 24.9    | 22.6  | 15.1 | 4.8   |
|      | Ort. sıcaklık (°C)              | 16.6  | 22.9  | 29.7    | 34.2   | 32.3    | 29.6  | 20.5 | 12.1  |
|      | Ort. nisbi nem (%)              | 50.2  | 39.0  | 27.     | 22.9   | 35.7    | 28.8  | 36.9 | 53.9  |
|      | Ort. yağış (kg/m <sup>2</sup> ) | 79.2  | 0.0   | 0.0     | 0.0    | 0.0     | 0.0   | 17.1 | 78.6  |
|      | 5 cm toprak sic. (°C)           | 17.6  | 24.7  | 31.7    | 36.2   | 35.5    | 32.0  | 24.2 | 11.3  |
| 2018 | Ort. mak. sıcaklık (°C)         | 27.0  | 30.0  | 36.5    | 39.8   | 39.6    | 32.9  | 27.0 | 19.9  |
|      | Ort. min. sıcaklık (°C)         | 14.2  | 15.0  | 22.4    | 25.1   | 26.4    | 20.3  | 15.4 | 10.0  |
|      | Ort. sıcaklık (°C)              | 20.5  | 22.2  | 29.8    | 32.7   | 33.0    | 26.0  | 20.5 | 14.1  |
|      | Ort. nisbi nem (%)              | 48.0  | 47.2  | 29.8    | 34.7   | 46.8    | 52.6  | 55.6 | 62.4  |
|      | Ort. yağış (kg/m <sup>2</sup> ) | 1.8   | 26.7  | 8.6     | 0.0    | 0.5     | 83.2  | 22.5 | 35.3  |
|      | 5 cm toprak sic. (°C)           | 22.2  | 25.3  | 33.0    | 37.9   | 37.5    | 29.9  | 20.9 | 13.0  |

Kaynak: MGM, 2018

### Metot

Çalışma, tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekrarlamalı olarak yürütülmüştür. Her parsel 4 sıralı olarak 12 m uzunluğunda oluşturulmuştur.

2017 yılında ekim işlemi 25 Nisan, 2018 yılında ise 20 Nisan tarihinde havalı mibzer ile tavlı toprağa yapılmıştır. Sıra üzeri 10-12 cm, sıra arası ise 70 cm olarak ayarlanmıştır. Deneme yıllarında ekimle beraber 8 kg da<sup>-1</sup> azot ile 8 kg da<sup>-1</sup> fosfor (20-20-0) gübresi, üst gübrelemede de 8 kg/da (%46 üre) azot lister aletiyle toprağa verilmiştir.

Ekim öncesi geniş yapraklı otlarla mücadele için 300 ml da<sup>-1</sup> (450 g l<sup>-1</sup> Pendimethalin) ve ekim sonrasında *Cynodon dactylon*(L.) Pers. (Köpekdişiyarığı) ve *Sorghum halepense*(L.) Pers. (Kanyaş)'a karşı 125 ml da<sup>-1</sup> (116,2 g l<sup>-1</sup> Clethodim) herbisitleri uygulanmıştır. Daha sonraki zamanlarda yapılan kontrollerde ekonomik zarar eşikleri esas alınarak zararlılara karşı kimyasal mücadele yapılmıştır. Deneme alanında yabancı ot kontrolü, toprağın kaymak tabakasını kırmak ve havalandırmak amacıyla 2017 yılında dört, 2018 yılında ise üç defa makina çapası yapılmıştır. Herhangi bir hastalığa rastlanmadığından fungusit kullanılmamıştır. Denemelerde NAA uygulama zamanları ve dozları şu şekilde uygulanmıştır.

Kontrol, T.B.+Ç.B. (15+15,130+30,1 45+45 g da<sup>-1</sup>), Ç.B.+Ç.D. (15+15,130+30,145+45 g da<sup>-1</sup>) ve T.B.+Ç.D. (15+15,130+30,145+45 g da<sup>-1</sup>).

Naftalin asetik asit uygulamaları 1 m'de 1-2 tarak (T.B.), 1 m'de 1-2 çiçek veya ekimden 65-75 gün sonra (Ç.B.), 1 m'de 8-10 çiçek veya 3-5 çiçeklenme başlangıcından 15-20 gün sonra (Ç.D.) (Chen ve ark., 1997) ikişer doz olarak uygulanmıştır. Her uygulama öncesi litre ölçüsü

olan motorlu sırt pompası tam olarak su doldurulup kontrol parsellerine püskürtülerek her parselde uygulanan su miktarı belirlenmiştir. Daha sonra her parsel için belirlenmiş olan su pompaya konulmuş, daha sonra her parsel için hesaplanan NAA suya karıştırılmış ve bitkilere uygulanmıştır. Uygulamalar hava sıcaklığının daha düşük olduğu saat 19.00'dan sonra yapılmıştır. Denemenin birinci yılında ilk su ekimden 21 gün sonra, ikinci yılda ise ekimden 23 gün sonra olmak üzere her iki yılda da 7'şer kez karık sulama yapılmıştır. 2017 yılında 20 Eylül, 2018 yılında ise 17 Eylül tarihlerinde son sulama yapılmıştır.

2017 yılında 1. hasat 14 Ekim, 2. hasat 10 Kasım tarihinde, 2018 yılında 1. hasat 10 Ekim, 2. hasat ise 7 Kasım tarihlerinde ikişer defada elle yapılmıştır. Hasat her parselin ortada bulunan iki sıranın baş ve son kısımlarından 1'er metre atılarak kalan 14 m<sup>2</sup> üzerinden yapılmıştır. Araştırmada incelenen bitki boyu, odun dalı sayısı, meyve dalı sayısı, koza sayısı, koza kütlü pamuk ağırlığı, kütlü pamuk verimi, erkencilik oranı, çırçır randımanı, 100 tohum ağırlığı ve lif indeksi özellikleri Worley ve ark., 1976'a göre belirlenmiştir.

Çalışmada elde edilen veriler, Minitab 19 programında tesadüf blokları deneme deseninde yıllar ayrı ayrı varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar Tukey-HSD testi sonucunda gruplandırılmıştır (Anonymous, 2017).

### Araştırma Bulguları ve Tartışma

İncelenen özelliklere ait F değerleri çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. İncelenen özelliklerin F değerleri  
Table 3. F values of the verifying properties

|             | F Değerleri   |          |   |                     |   |                     |  |                     |  |        |
|-------------|---|----------|---|---------------------|---|---------------------|--|---------------------|--|--------|
|             | 2017  | 2018     | 2017  | 2018                | 2017  | 2018                | 2017   | 2018                | 2017   | 2018   |
|             | Bitki Boyu<br>(cm)<br><i>Plant height<br/>(cm)</i>  |          | Odun Dalı Sayısı<br>(adet bitki <sup>-1</sup> )<br><i>Monopodial branches<br/>(no plant<sup>-1</sup>)</i> |                     | Meyve Dalı Sayısı<br>(adet bitki <sup>-1</sup> )<br><i>Sympodial branches<br/>(no plant<sup>-1</sup>)</i> |                     | Koza Sayısı<br>(adet bitki <sup>-1</sup> )<br><i>Number of bolls<br/>(no plant<sup>-1</sup>)</i> |                     | Koza Kütlü Pamuk<br>Ağırlığı (g)<br><i>Boll seed cotton<br/>weight (g)</i> |        |
| Tekerrür    | 0.30  | 0.40     | 2.61  | 0.68                | 1.41  | 0.74                | 0.14   | 1.71                | 2.04   | 0.11   |
| Uygulamalar | 18.12**   | 21.85**  | 2.16 <sup>ö.d</sup>   | 0.68 <sup>ö.d</sup> | 17.53**   | 7.19**              | 59.53**  | 39.82**             | 11.51**  | 0.86** |
|             | Kütlü Pamuk Verimi<br>(kg da <sup>-1</sup> )<br><i>Seed cotton yield<br/>(kg da<sup>-1</sup>)</i> |          | Erkencilik Oranı<br>(%)<br><i>Earliness ratio<br/>(%)</i>   |                     | Çırçır Randımanı<br>(%)<br><i>Ginning percentage<br/>(%)</i>  |                     | 100 Tohum Ağırlığı<br>(g)<br><i>100 seed weight<br/>(g)</i>                                      |                     | Lif indeksi<br>(g)<br><i>Lint index<br/>(g)</i>                            |        |
| Tekerrür    | 1.13  | 0.05     | 0.95  | 0.85                | 1.22  | 0.99                | 0.88   | 0.68                | 0.51   | 2.17   |
| Uygulamalar | 179.89**  | 136.67** | 48.87**   | 39.47**             | 4.64**  | 2.54 <sup>ö.d</sup> | 1.72 <sup>ö.d</sup>  | 0.57 <sup>ö.d</sup> | 2.85*  | 3.95** |

\*\*:%1 \*:%5 ö.d: önemli değil

### Bitki boyu (cm)

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamalarından elde edilen bitki boyu değerlerinin yapılan varyans analizi sonucunda her iki yılda da önemli seviyede ( $p \leq 0.01$ ) farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 3).

Farklı dönem ve dozlarda uygulanan NAA'den elde edilen bitki boyları 83.13 cm ile 98.33 cm arasında değişmiş ve denemenin 1. yılında ortalama 91.08 cm, 2. yılında ise 88.87 cm olmuştur. Her iki yılın verileri değerlendirildiğinde en yüksek bitki boyu değerleri Ç.B.15+Ç.D.15 uygulamasından (97.73 ve 96.00 cm) ve en düşük değerler 2017 yılında T.B.45+Ç.D.45 (84.17 cm), 2018 yılında ise Ç.B.45+Ç.D.45 uygulamasından (83.3 cm) elde edilmiştir.

Çizelge 4 incelendiğinde denemenin ilk yılında bitki boyunu azalttığı, ikinci yılda kimi doz ve zamanlarda artışlar ve azalışlar olduğu görülebilmektedir. İki yılda da Ç.B.15+Ç.D.15 ve T.B.15+Ç.D.15 dozlarının kontrol parsellerine göre bitki boyunu arttırmıştır. Pamukta bitki boyunun çok uzun olması özellikle ilaçlama ve hasat etkinliğini düşürdüğü için istenmemektedir.

Sonuçlarımız Gencsoylu (2009); Rajendran ve ark. (2011); Gobi ve Vaiyapuri (2013); Gillani ve ark. (2015) ile Ali ve ark. (2012)'nin NAA uygulamalarının bitki boyunu azalttığına dair sonuçları ile 2017 yılı verileri uyum göstermekte, ancak 2018 yılı verileri ise tam uyum göstermemektedir.

### Odun dalı sayısı (adet bitki<sup>-1</sup>)

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları sonucu elde edilen odun dalı sayısı değerlerinin yapılan varyans analizi sonucunda her iki yılda da önemli farklılıklar bulunamamıştır (Çizelge 3).

Çizelge 4.'den deneme yıllarında farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamaları sonucu oluşan odun dalı sayıları 0.63 (adet bitki<sup>-1</sup>) ile 0.83 (adet bitki<sup>-1</sup>) arasında değişim gösterdiği ve ortalamaların denemenin 1. yılında 0.69 (adet bitki<sup>-1</sup>) ve 2. yılında 0.73 (adet bitki<sup>-1</sup>) olduğu görülebilmektedir. İki yıl birlikte incelendiğinde en yüksek değerler 2018 yılında T.B.15+Ç.D.15 uygulamasından (0.83 adet bitki<sup>-1</sup>), en düşük değerler ise 2017 yılında T.B.15+Ç.B.15, Ç.B.15+Ç.D.15, Ç.B.30+Ç.D.30 ile T.B.45+Ç.D.45 (0.63 adet bitki<sup>-1</sup>) uygulamalarından elde edilmiştir.

Odun dallarında oluşan pamuğun lif kalitesi meyve dallarında meydana gelenlere göre daha düşük oluşmaktadır. Kaliteli bir pamuk üretimi için odun dalı sayısının az veya hiç olmaması istenen bir durumdur. Çizelge 4.'den her iki yılda da odun dalı sayıları üzerine farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamalarının herhangi bir etkisi saptanamamıştır. Bu sonuçlara göre NAA uygulamalarının odun dalı sayılarına önemli bir etkisinin olmadığı söylenebilir.

Çizelge 4. Farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamaları sonucu oluşan ortalama bitki boyu, odun dalı sayısı, meyve dalı sayısı, koza sayısına ait değerler

Table 4. Means of average plant height, monopodial branches, sympodial branches, number of bolls obtained from NAA applications at different periods and doses

| Uygulamalar<br>Applications | Bitki Boyu<br>(cm)<br>Plant height<br>(cm) |              | Odun Dalı Sayısı<br>(adet bitki <sup>-1</sup> )<br>monopodial<br>branches (no plant <sup>-1</sup> ) |       | Meyve Dalı Sayısı<br>(adet bitki <sup>-1</sup> )<br>Sympodial branches<br>(no plant <sup>-1</sup> ) |          | Koza Sayısı<br>(adet bitki <sup>-1</sup> )<br>number of bolls<br>(no plant <sup>-1</sup> ) |           |
|-----------------------------|--|--------------|---|-------|---|----------|--|-----------|
|                             | 2017                                       | 2018         | 2017  | 2018  | 2017  | 2018     | 2017   | 2018      |
| Kontrol                     | 96.43 a*                                   | 90.70 bc*    | 0.77  | 0.830 | 7.37 d*   | 7.03 c*  | 7.47 f*  | 7.30 e*   |
| T.B.15+Ç.B.15               | 94.13 ab                                   | 90.87 bc     | 0.67  | 0.70  | 8.33 bc   | 8.50 a   | 10.73 de   | 11.07 abc |
| T.B.30+Ç.B.30               | 88.83 bcd                                  | 87.90 cd     | 0.67  | 0.73  | 7.63 cd   | 8.33 a   | 10.23 e  | 9.93 d    |
| T.B.45+Ç.B.45               | 86.73 cd                                   | 85.03 de     | 0.73  | 0.73  | 7.73 cd   | 8.13 ab  | 10.67 de   | 9.87 d    |
| Ç.B.15+Ç.D.15               | 97.73 a                                    | 96.00 a      | 0.63  | 0.73  | 9.00 ab   | 7.37 bc  | 12.57 ab   | 11.30 ab  |
| Ç.B.30+Ç.D.30               | 92.87 abc                                  | 88.00 d      | 0.63  | 0.67  | 9.60 a  | 8.43 a   | 12.97 a  | 11.77 a   |
| Ç.B.45+Ç.D.45               | 85.33 d                                    | 83.13 e      | 0.73  | 0.77  | 8.27 bc   | 8.40 a   | 11.77 bc   | 10.77 bcd |
| T.B.15+Ç.D.15               | 98.33 a                                    | 94.83 ab     | 0.70  | 0.73  | 8.27 bc   | 8.20 ab  | 11.07<br>cde   | 10.73 bcd |
| T.B.30+Ç.D.30               | 86.23 d                                    | 87.20<br>cde | 0.73  | 0.73  | 7.53 cd   | 7.63 abc | 10.07 e  | 9.80 d    |
| T.B.45+Ç.D.45               | 84.17 d                                    | 85.03 de     | 0.63  | 0.66  | 8.63 b  | 8.00 ab  | 11.63<br>bcd   | 10.20 cd  |
| Ortalama                    | 91.08                                      | 88.87        | 0.69  | 0.73  | 8.24  | 8.00     | 10.92  | 10.27     |
| %C.V.                       | 2.42                                       | 1.76         | 8.50  | 11.88 | 3.54  | 3.93     | 3.17   | 3.25      |

\*: Aynı harf grubuna giren ortalamalar arasında istatistiki olarak herhangi bir farklılık bulunmamaktadır.

#### Meyve dalı sayısı (adet bitki<sup>-1</sup>)

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları sonucu elde edilen meyve dalı sayısı değerlerinin yapılan varyans analizi sonucunda her iki yılda da önemli ( $p \leq 0.01$ ) farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 3).

Çizelge 4.'den, her iki deneme yılında farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamaları sonucu oluşan meyve dalı sayılarının 7.03 ile 9.60 (adet bitki<sup>-1</sup>) arasında değiştiği ortalamaların 8.24 ve 8.00 (adet bitki<sup>-1</sup>) olduğu izlenebilmektedir. En yüksek meyve dalı sayısı iki yılda da Ç.B.30+Ç.D.30 uygulamasından (9.60 ve 8.43 adet bitki<sup>-1</sup>), en düşük meyve dalı sayıları ise denemenin iki yılında da kontrol (7.37 ve 7.03 adet bitki<sup>-1</sup>) parselinden elde edilmiştir.

Farklı doz ve dönemlerde uygulamaların hepsinde meyve dalı sayısı kontrol parsellerine göre daha yüksek oluşmuştur. Pamukta meyve dalı sayısı ve verim arasında pozitif bir bağlantı vardır. Bu sebeple meyve dalı sayısı bakımından yapılacak olan çalışmalarda Ç.B.30+Ç.D.30 uygulaması tavsiye edilebilir.

Naftalin asetik asit uygulamasının meyve dalı sayısını artırdığına dair benzer sonuçlar; Rajendran ve ark.,(2011) ile Gobi ve Vaiyapurii (2013) isimli araştırmacılar tarafından da ifade edilmiştir..

#### Koza sayısı (adet bitki<sup>-1</sup>)

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları sonucu elde edilen koza sayısı değerlerinin yapılan varyans analizi sonucunda her iki yılda da önemli ( $p \leq 0.01$ ) farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 3).

Her iki yılda farklı doz ve dönemlerde NAA uygulamasından elde edilen koza sayılarının 7.30 ile 12.97 (adet bitki<sup>-1</sup>) arasında değişim gösterdiği ve ortalamaların 10.92 ve 10.27 (adet bitki<sup>-1</sup>) olduğu izlenebilmektedir (Çizelge 4). En yüksek değerler iki yılda da Ç.B.30+Ç.D.30 uygulamasından (12.97 ve 11.77 adet bitki<sup>-1</sup>) elde edilmiştir.

Farklı dönem ve dozlarda tüm NAA uygulamalarından kontrole göre daha fazla koza sayılarının (adet/bitki) elde edildiği ve Ç.B.30+Ç.D.30 uygulamalarının diğer uygulamalardan daha fazla sayıda koza sayısı oluşturduğu görülebilmektedir.

Naftalin asetik asit uygulamasının koza sayısını arttırdığına ilişkin bulgular; Koler ve ark. (2010); Sarlach ve Sharmaa(2012); Gobi ve Vaiyapurii(2013) ile Gillani ve ark. (2015) isimli araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir.

#### Koza kütlü pamuk ağırlığı (g koza<sup>-1</sup>)

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları sonucu elde edilen koza kütlü pamuk ağırlığı değerlerinin yapılan varyans analizi

sonucunda her iki yılda da önemli ( $p \leq 0.01$ ) farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 3).

Her iki deneme yılında farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları neticesinde koza kütlü pamuk ağırlıkları 4.37 (g koza<sup>-1</sup>) ile 5.64 (g koza<sup>-1</sup>) aralığında değişim gösterdiği ve ortalamaların 5.28 ve 4.99 (g koza<sup>-1</sup>) arasında olduğu izlenebilmektedir. 2017 yılında en yüksek değer Ç.B.30+Ç.D.30 (5.64 g koza<sup>-1</sup>) uygulamasından, en düşük değer ise T.B.45+Ç.D.45 (4.83 g koza<sup>-1</sup>) uygulamasından, 2018 yılında ise en yüksek değer Ç.B.30+Ç.D.30

(5.28 g koza<sup>-1</sup>) uygulamasından, en düşük değer ise kontrol (4.37 g) uygulamasından elde edilmiştir (Çizelge 5).

Çizelge 5.'den farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamaları sonucu her iki yılda da Ç.B.30+Ç.D.30 uygulamasının en yüksek değerleri verdiği izlenebilmektedir. Nitekim kütlü pamuk verimlerine bakıldığında da Ç.B.30+Ç.D.30 uygulamasının en yüksek değerleri vermesi bu sonucu doğrulamaktadır. Gillani ve ark. (2015) benzer sonuçlar saptamışlardır.

Çizelge 5. Farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamaları sonucu oluşan ortalama koza kütlü pamuk ağırlığı, kütlü pamuk verimi ve erkencilik oranına ait değerler

Table 5. Means of average boll seed cotton weight, seed cotton yield and earliness ratio obtained from NAA applications at different periods and doses

| Uygulamalar<br>Applications | Koza Kütlü Pamuk Ağırlığı<br>(g koza <sup>-1</sup> )<br>Seed cotton weight (g boll <sup>-1</sup> ) |          | Kütlü Pamuk Verimii(kg da <sup>-1</sup> )<br>Seed cotton yield (kg da <sup>-1</sup> ) |           | Erkencilik Oranı(%)<br>Earliness ratio (%) |          |
|-----------------------------|--|----------|---|-----------|--|----------|
|                             | 2017   | 2018     | 2017  | 2018      | 2017                                       | 2018     |
|                             | Kontrol  | 5.19 bc* | 4.37 c*   | 532.16 f* | 435.43 g*                                  | 89.56 b* |
| T.B.15+Ç.B.15               | 5.38 ab  | 4.77 bc  | 651.21 c  | 566.66 cd | 84.89 c                                    | 86.03 e  |
| T.B.30+Ç.B.30               | 5.46 ab  | 5.12 ab  | 644.36 cd   | 556.87 de | 95.88 a                                    | 95.53 ab |
| T.B.45+Ç.B.45               | 4.95 c   | 5.09 ab  | 560.61 e  | 480.77 f  | 95.92 a                                    | 95.28 ab |
| Ç.B.15+Ç.D.15               | 5.40 ab  | 5.04 ab  | 715.06 b  | 633.05 b  | 91.50 b                                    | 90.58 cd |
| Ç.B.30+Ç.D.30               | 5.64 a   | 5.28 a   | 762.01 a  | 666.76 a  | 89.82 b                                    | 88.25 de |
| Ç.B.45+Ç.D.45               | 5.11 bc  | 5.03 ab  | 648.86 c  | 588.98 c  | 97.08 a                                    | 97.05 a  |
| T.B.15+Ç.D.15               | 5.46 ab  | 5.12 ab  | 747.42 a  | 634.84 b  | 86.37 c                                    | 90.20 d  |
| T.B.30+Ç.D.30               | 5.42 ab  | 4.95 ab  | 644.25 cd   | 576.60 cd | 94.72 a                                    | 93.37 bc |
| T.B.45+Ç.D.45               | 4.83 c   | 5.09 ab  | 620.59 d  | 535.32 e  | 94.84 a                                    | 93.24 bc |
| Ortalama                    | 5.28   | 4.99     | 652.70  | 567.53    | 92.06                                      | 91.93    |
| %C.V.                       | 2.45   | 3.00     | 1.46  | 1.85      | 1.15                                       | 1.06     |

\*: Aynı harf grubuna giren ortalamalar arasında istatistiki olarak herhangi bir farklılık bulunmamaktadır.

#### Kütlü pamuk verimi (kg da<sup>-1</sup>)

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları sonucu elde edilen kütlü pamuk verimi değerlerinin yapılan varyans analizi sonucunda her iki yılda da önemli ( $p \leq 0.01$ ) farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 3).

Her iki yılda farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamasından elde edilen kütlü pamuk verimlerinin 435.43 kg da<sup>-1</sup> ile 762.01 kg da<sup>-1</sup> ve yıl ortalamalarının 652.70 kg da<sup>-1</sup> ve 567.50 kg da<sup>-1</sup> arasında olduğu izlenebilmektedir. 2017 yılında Ç.B.30+Ç.D.30 ve T.B.15+Ç.D.15 uygulamaları, 2018 yılında ise Ç.B.30+Ç.D.30 uygulamalarından en yüksek kütlü pamuk verimleri elde edilmiştir. İki deneme sezonunda da en yüksek değerlerin Ç.B.30+Ç.D.30 uygulamasında, en düşük değerlerin ise kontrol parselinde olduğu, bu

sonuçlara göre farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamalarının kontrole göre kütlü pamuk verimini önemli miktarda arttırdığı görülebilmektedir (Çizelge 5). NAA uygulaması, meyve tutum oranını ve meyve dökümünü artırarak bitkilerin büyümesi ve verimi üzerinde iyi bir yönetim etkisine sahiptir (Raofi ve ark., 2014). NAA bitki büyümesini olumlu yönde etkiler ve pamuğun olgunluğunu geliştirir (Abro, 2004).

Naftalin asetik asit uygulamalarının kütlü pamuk veriminde artışa sebep olduğuna dair benzer bulgular Kataria ve Khanparai(2011); Ali ve ark.(2012); Gobi ve Vaiyapuri (2013); Gillani ve ark. (2015) ile Parveen ve ark.(2017) tarafından da bildirilmiştir.

#### Erkencilik oranı (%)

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları sonucu elde edilen erkencilik oranı değerlerinin yapılan varyans analizi sonucunda her iki yılda da önemli ( $p \leq 0.01$ ) farklılıklar gösterdiği saptanmıştır (Çizelge 3).

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamasından elde edilen ortalama erkencilik oranının %84.89 ile %97.08 arasında değiştiği ve yıl ortalamalarının %92.06 ile %91.93 olduğu izlenebilmektedir. 2017 yılında T.B.30+Ç.B.30, T.B.45+Ç.B.45, Ç.B.45+Ç.D.45, T.B.30+Ç.D.30 ve T.B.45+Ç.D.45 uygulamaları aynı grupta yere alarak en yüksek değerleri vermişlerdir. Ancak iki yılda da en yüksek değer Ç.B.45+Ç.D.45 uygulamasından, en düşük değer ise T.B.15+Ç.B.15 uygulamasından oluştuğu görülebilmektedir (Çizelge 5). Ç.B.45+Ç.D.45 NAA uygulamasının en fazla erkencilik sağladığı ve yapılacak erkencilik çalışmalarında bu uygulamanın göz önünde bulundurulabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

NAA uygulamalarının erkencilik oranını arttırdığı ile ilgili Parveen ve ark. (2017) tarafından benzer sonuçlar bildirilmiştir.

#### *Çırcır randımanı (%)*

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları sonucu elde edilen erkencilik oranı değerlerinin yapılan varyans analizi sonucunda 2017 yılında önemli ( $p \leq 0.01$ ) farklılıklar gösterdiği, 2018 yılında ise önemsiz olduğu saptanmıştır (Çizelge 3).

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamasından elde edilen çırcır randımanının %45.18 ile % 46.31 arasında değiştiği ve yıl ortalamalarının ise %45.76 ile 45.24 olduğu görülebilmektedir (Çizelge 6). Yapılan Tukey testine göre 2017 yılında farklı gruplar oluşmuş ancak, en düşük ortalama çırcır randımanı

Ç.B.30+Ç.D.30 (%45.18) uygulamasından, 2018 yılında ise istatistiksel olarak herhangi bir farklılık bulunmadığından karşılaştırma testi yapılmamıştır. Çalışmanın birinci yılında uygulamalar arasında farklılıklar bulunması, ancak ikinci yılında bulunmasının nedeni, deneme yerlerinin toprak özellikleri ve deneme yıllarındaki iklim değerlerinin farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Sonuçların tümü değerlendirildiğinde 2017 yılında T.B.45+Ç.B.45 uygulamasının en yüksek çırcır randımanını verdiği sonucuna ulaşılmıştır.

NAA uygulamasından elde edilen sonuçlar; Jadhav ve ark., (2015)'nin naftalin asetik asit'in çırcır randımanını arttırdığı sonuçlarıyla uyuşmakta, Rajendran ve ark.,(2011) ile Sarlach ve Sharma (2012)'nin çırcır randımanını azalttığı sonuçlarıyla uyuşmamaktadır.

#### *100 Tohum ağırlığı (g)*

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları sonucu elde edilen 100 tohum ağırlığı değerlerinin yapılan varyans analizi sonucunda her iki yılda da önemli farklılıklar göstermediği saptanmıştır (Çizelge 3).

Farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamaları sonucu oluşan 100 tohum ağırlıklarının 9.67 g ile 10.14 g arasında değiştiği ve yıl ortalamalarının 9.97 g ve 9.79 g olduğu görülebilmektedir (Çizelge 6). Uygulamalar arasında önemli seviyede farklılıkların bulunmaması neticesinde bu özellik bakımından farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamalarının etkisinin önemli olmadığı söylenebilir.

Elde edilen sonuçlar; Kataria ve Khanpara (2011) sonuçları ile uyuşmakta, ancak Rajendran ve ark. (2011) ile Sarlach ve Sharma (2012)'nin sonuçlarıyla uyuşmamaktadır.

Çizelge 6. Farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamaları sonucu oluşan ortalama,ıçırçır randımanı,ı100 tohum ağırlığı,ılif indeksine ait değerler

Table 6. Means of average ginning percentage, 100 seed weight, lint index obtained from NAA applications at different periods and doses

| Uygulamalar<br>Applications | Çırçır Randımanı(%)<br>Ginning percentage (%) |                       | 100 Tohum Ağırlığı(g)<br>100 seed weight (g) |                       | Lif İndeksi (g)<br>lint index (g) |         |
|-----------------------------|---|-----------------------|--|-----------------------|-----------------------------------|---------|
|                             | 2017  | 2018                  | 2017   | 2018                  | 2017                              | 2018    |
| Kontroll                    | 46.17 ab*                                     | 45.77 <sup>ö.d.</sup> | 9.80 <sup>ö.d.</sup>                         | 10.12 <sup>ö.d.</sup> | 8.40 ab*                          | 8.54 a* |
| T.B.15+Ç.B.15               | 46.27 a                                       | 45.81                 | 10.03  | 10.05                 | 8.64 a                            | 8.16 ab |
| T.B.30+Ç.B.30               | 46.10 ab                                      | 44.91                 | 10.01  | 10.13                 | 8.68 a                            | 8.26 ab |
| T.B.45+Ç.B.45               | 46.31 a                                       | 46.02                 | 9.91   | 9.54                  | 8.57 ab                           | 8.13 ab |
| Ç.B.15+Ç.D.15               | 45.35 ab                                      | 44.84                 | 10.25  | 9.55                  | 8.47 ab                           | 7.76 b  |
| Ç.B.30+Ç.D.30               | 45.18 b                                       | 44.89                 | 10.14  | 9.98                  | 8.35 ab                           | 8.13 ab |
| Ç.B.45+Ç.D.45               | 45.31 ab                                      | 45.54                 | 9.93   | 9.45                  | 8.23 ab                           | 7.90 b  |
| T.B.15+Ç.D.15               | 45.81 ab                                      | 45.12                 | 10.03  | 9.97                  | 8.48 ab                           | 8.19 ab |
| T.B.30+Ç.D.30               | 45.74 ab                                      | 44.89                 | 9.93   | 9.78                  | 8.47 ab                           | 7.97 ab |
| T.B.45+Ç.D.45               | 45.38 ab                                      | 45.60                 | 9.67   | 9.29                  | 8.04 b                            | 7.78 b  |
| Ortalama                    | 45.76   | 45.24                 | 9.97   | 9.79                  | 8.43                              | 8.08    |
| %C.V.                       | 0.76  | 0.96                  | 2.15   | 2.67                  | 2.33                              | 1.66    |

\*: Aynı harf grubuna giren ortalamalar arasında istatistiki olarak herhangi bir farklılık bulunmamaktadır.

### Lif indeksi (g)

Yapılan varyans analizinde, farklı dönem ve dozlarda NAA uygulamaları sonucu oluşan lif indeksi değerleri bakımından önemli ( $p \leq 0.05$ ) seviyede farklılıklar bulunmuştur (Çizelge 3).

Çizelge 6'dan, farklı dönem ve dozlarda naftalin asetik asit uygulamasından elde edilen lif indeksi değerlerinin 8.04 g ile 8.73 g arasında değiştiği ve yıl ortalamalarının 8.43 g ile 8.08 g olduğu izlenebilmektedir. Nitekim aynı çizelgeden iki yılda da sadece iki grubun oluşması bu özellik yönünden bir stabilitenin olmadığı söylenebilir.

NAA uygulamalarından elde ettiğimiz değerler; Rajendran ve ark. (2011) ve Sarlach ve Sharma (2012)'nin NAA'in lif indeksini azalttığı sonuçları ile kısmen uyuşmakta, Kataria ve Khanpara (2011) ile Jadhav ve ark. (2015)'nin NAA'in lif indeksine herhangi bir etkisinin olmadığı bulgularıyla uyuşmamaktadır.

### Sonuçlar

En yüksek kütlü pamuk verimi, meyve dalı sayısı,koza sayısı ve koza kütlü pamuk ağırlığı Ç.B.30+Ç.D.30, uygulamasından elde edilirken, en yüksek erkencilik oranı Ç.B.45+Ç.D.45 uygulamasından ve en yüksek bitki boyu ise Ç.B.15+Ç.D.15 uygulamasından elde edilmiştir. Farklı dönemlerde bölünmüş dozlar şeklinde NAA uygulamalarının odun dalı sayısı ve 100 tohum ağırlığına herhangi bir etkisi olmamıştır.

Pamuk üretiminde çiftçiler için kütlü pamuk verimi en önemli konudur. Harran Ovası

koşullarında yapılacak olan pamuk yetiştiriciliğinde kütlü pamuk verimi için Ç.B.30+Ç.D.30 uygulamaları önerilmektedir.

-Bu çalışmanın ilk yılı Orhan ÇOKLU'nun Yüksek Lisans çalışmasının bir kısmından üretilmiştir.

-Makale yazarları arasında bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

### Kaynaklar

- Ali, S.S., Abro, G.H., Rustamani, M.A. & Nizamani, S.M. (2012). Effect of Application of Plant Growth Regulators on *Earias vittella* (Fabricius), Infestation and Yield Components of Cotton. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 8: 677-682.
- Abro, G.H., Syed, T.S., Unar, M.A. & Zhang, M.S. (2004). Effect of a plant growth regulator and micronutrients on insect pest infestation and yield components of cotton. *Journal of Entomology*, 1(1): 12-16.
- Anonim, (2017a). Yaşar tarım toprak analiz laboratuvarı.
- Anonim, (2017b). <http://gentatarim.com/urun/biofortune-bitki-gelisim-duzenleyicisi/>
- Anonim, (2018). Yaşar tarım toprak analiz laboratuvarı.
- Anonymous, (2017). <http://www.mini-tab.com/en-us/>
- Chen, R.L., Pan, W.Q., Gao, S.T., Gu, D.L. & Gao, D.Y. (1997). A Preliminary Study on The Technique of Foliar Spraying of Concentrated N on Cotton During the Boll Period. *Field Crop Abstracts*: 501-607.
- Çoklu, O., 2018. Farklı Doz ve Dönemlerde Naftalin Asetik Asit (NAA) Uygulamalarının Pamuğun

- Verim, Verim Unsurları ve Lif Teknolojik Özelliklerine Etkisi. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 57 sayfa.
- Gencsoylu, I. (2009). Effect of plant growth regulators on agronomic characteristics, lint quality, pests and predators in cotton. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(2):147-153. <https://doi.org/10.1007/s00344-009-9083-x>
- Gillani, S.M.N, Iqbal, R.M, Akram, M. Ajmal, F. Wasim, M.A. & Ijaz, M. (2015). Performance of Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through foliar application of growth promoters. *Pakistan Journal of Life and Social Science*, 13(1): 20-26.
- Gobi, R. & Vaiyapui, V. (2013). Effect of plant growth regulators on growth, yield and economics of irrigated cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Archives*, 13(1): 101-103.
- Jadhav, S.G., Chavan, D.A. & Waghmare, Y.M. (2015). Effect of plant spacing, growth regulator and nutrient management on yield, quality and economics of BT cotton. *Journal of Cotton Research and Development*, 29 (1): 48-52.
- Jost, P., Whitaker, J., Brown, S.M. & Bednarz, C. (2006). *Use of plant growth regulators as a management tool in cotton*. Univ of Georgia Coop Ext Bulletin 1305.
- Kataria, G.K. & Khanpara, M.D. (2011). Effect of naphthalene acetic acid on growth, yield attributes and yield in irrigated bt cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Indian Journal of Applied Research*, 1(1): 10-11. <https://doi.org/10.36106/ijar>
- Koler, P., Patil, B.C. & Pawar, K.N. (2010). Foliar spray of agrochemicals on square drying in different cotton genotypes. *Journal of Cotton Research and Development*, 4(2): 210-215.
- Koler, P. & Patil, B. C. (2011). Influence of agrochemicals on growth and yield of cotton genotypes. *Journal of Cotton Research and Development*, 25(1): 63-67.
- Koler, P. & Patil, B.C. (2013). Plant growth regulators and its influence on yield, morphophysiological and biochemical parameters in hybrid cotton. *Journal of Cotton Research and Development*, 27(1): 50-55.
- Liu, C. et al. (2022). Novel plant growth regulator guvermectin from plant growth-promoting rhizobacteria boosts biomass and grain yield in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(51): 16229-16240. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c07072>
- MGM, 2018. Meteoroloji Genel Müdürlüğü, Şanlıurfa ili rasat kayıtları.
- Patel, J. K. (1993). Response of cotton (*G. hirsutum*) to triacontanol and naphthalene acetic acid sprays. *Indian Journal of Agronomy*, 38(1): 97-101.
- Parveen, S., Iqbal, R.M., Akram, M., Iqbal, F., Tahir, M. & Rafay, M. (2017). Improvement of growth and productivity of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) through foliar applications of naphthalene acetic acid. *Ciências Agrárias*, 38(2): 561-570. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n2p561>
- Rajendran, K., Palchamy, A., Sankaranarayanan, K., Prabakaran, K. & Bhararhi, K. (2011). Enhancing Productivity of Summer Irrigated Cotton Through Plant Growth Regulator and Foliar Nutrition. *Madras Agricultural Journal*, 98(7-9): 248-250.
- Raofi, M. M., Dehghan, S., Keighobadi, M. & Poodineh, O. (2014). Effect of naphthalene acetic acid in agriculture and the role of increase yield. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences*, 7(14): 1378-1380. <http://ijagcs.com/.../1378-1380.pdf>
- Ren, M., Mao, G., Zheng, H., Wang, W. & Tang, Q. (2023). Growth changes of tomato seedlings responding to sodium salt of  $\alpha$ -naphthalene acetic acid and potassium salt of fulvic acid. *Scientific Reports*, 1: 4024. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31023-x>
- Sarlach, R.S. & Sharma, B. (2012). Influence of Naphthalene acetic acid and cobalt chloride on growth and yield of cotton hybrids. *International Journal of Plant Research*, 25(1): 76-80.
- Sawan, Z.M., Sakr, R.A. and Ahmed, F.A. (1989). Effect of 1-naphthaleneacetic acid on the seed, protein, oil, and fatty acids of Egyptian cotton. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 66(10): 1472-1474.
- Sawan, Z. M. & Sakr, R.A. (1998). Effect of 1-naphthalene acetic acid concentrations and the number of applications on the yield components, yield and fibre properties of the Egyptian cotton (*Gossypium barbadense* L.). *Agronomie*, 18 (4): 275-283.
- Thind, S.K., Pathak, D. & Sohu, R.S. (2007). GA<sub>3</sub> and NAA affect some physio-morphological features and number of bolls in cotton (*Gossypium spp.*) *Journal of Cotton Research and Development*, 21(2): 201-205.
- Worley, S.JR., Harmon H.R., Harrel, D.C. & Culp, T.W. (1976). Ontogenetic Model of Cotton Yield. *Crop Science*, 16: 30-34.



# Comparison of various single-disc type furrow openers used in no-till seeders in terms of furrow properties and acting forces

## Doğrudan ekim makinalarında farklı tek diskli tip gömücü ayakların çizi profili ve etki eden kuvvetler yönünden karşılaştırılması

Yusuf AYDIN<sup>1</sup> , Ahmet ÇELİK<sup>2</sup> , Mehmet Zahid MALASLI<sup>3\*</sup> 

<sup>1</sup>Ministry of Agriculture and Forestry, Sivas Provincial Directorate, Divriği District Directorate, 58300 Divriği, Sivas, Turkey

<sup>2</sup>Department of Agricultural Machinery and Technologies Engineering, Faculty of Agriculture, Atatürk University, 25240 Erzurum, Turkey

<sup>3</sup>Department of Biosystems Engineering, Ereğli Faculty of Agriculture, Necmettin Erbakan University, 42310 Ereğli, Konya, Turkey

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-3952-9932>; <sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0001-6225-3220>; <sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0002-5845-1272>

### To cite this article:

Aydın, Y., Çelik, A. & Malaslı, M. Z. (2024). Comparison of various single-disc type furrow openers used in no-till seeders in terms of furrow properties and acting forces. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2): 345-356

DOI: 10.29050/harranziraat.1447573

### \*Address for Correspondence:

Mehmet Zahid Malaslı

e-mail:

mzmalasli@erbakan.edu.tr

### Received Date:

05.03.2024

### Accepted Date:

27.05.2024

© Copyright 2018 by Harran University Faculty of Agriculture. Available on-line at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ABSTRACT

The purpose of this study was to examine the impact of various single-disc type furrow openers used in no-till seeders on furrow aspects and forces acting on the discs at various soil moisture contents, soil compaction levels, and seeding depths in soil bin. Factors included plain, notched, wavy, concave, and fluted types of disc coulters, two soil moisture levels (12-18%), two soil compaction levels (2-3 MPa), and two seeding depths (50-75 mm). According to the results, the plain, notched, and fluted type discs had the lowest vertical, draft, and side force, while the wavy type disc had the maximum vertical force, draft force, and side force and the concave type disc had the highest side force. The vertical, draft, and side force requirements of all furrow openers were found to be lower in loose soils with low moisture content and greater in compacted soils with high moisture content. Fluted, concave, and wavy-type discs produced the best results in terms of the specific vertical, specific draft, and specific side forces, respectively. While the highest furrow cross-sectional area was obtained in the wavy disc, this furrow opener was followed by concave, notched, fluted, and plain-type furrow openers, respectively.

**Key Words:** No-till, disc type furrow opener, furrow profile, soil compaction, soil bin

### Öz

Bu çalışmanın amacı, doğrudan ekim makinalarında kullanılan farklı tek diskli tip gömücü ayakların, farklı toprak nem içeriklerinde, toprak sıkışma seviyelerinde ve ekim derinliklerinde, çizi profiline ve disklere etki eden kuvvetler üzerindeki etkisini toprak kanalında incelemektir. Faktörler arasında düz, kertikli, dalgalı, konkav, yivli tip disk açıcılar, iki toprak nem seviyesi (%12-18), iki toprak sıkıştırma seviyesi (2-3 MPa) ve iki ekim derinliği (50-75 mm) yer almaktadır. Sonuçlara göre, düz, kertikli ve yivli disklerin minimum düşey, yan ve çeki kuvvetlerine sahip olduğu, dalgalı tip diskin ise maksimum düşey kuvvet, çekme kuvveti ve yan kuvvete sahip olduğu ve konkav tip disklerin ise en yüksek yan kuvvete sahip olduğu gözlemlenmiştir. Tüm gömücü ayakların düşey, çekme ve yan kuvvet gereksinimlerinin gevşek, az nem içeriğine sahip topraklarda daha düşük, buna karşılık; sıkıştırılmış, yüksek nem içeriğine sahip topraklarda daha yüksek olduğu bulunmuştur. Yivli, konkav ve dalgalı tip disklerin sırasıyla özgül düşey, özgül çekme ve özgül yan kuvvetler açısından en iyi sonuçları verdiği tespit edilmiştir. En yüksek çizi kesit alanı dalgalı diskte elde edilmiş olup, bu gömücü ayağı konkav, kertikli, yivli ve düz tip çizi açıcılar izlemiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Doğrudan ekim, diskli tip gömücü ayak, çizi profili, toprak sıkışıklığı, toprak kanalı



## Introduction

A furrow opener is the most important unit of no-till seeders (Seidi et al., 2010; Troger et al., 2012). Furrow openers open a furrow with sufficient depth and width in residue field conditions and place the seeds into the furrow. Depending on the soil type and working conditions, many types of furrow openers are available (Karayel and Özmerzi, 2007; Altikat et al., 2013).

Furrow openers comprised of hoes, chisels, winged chisels, reverse T's, discs types (single disc, double disc, and three disc rotating discs driven by tractor pto) are used in reduced tillage and direct seeding methods (ASABE, 2013). Single and double disc type furrow openers are used more widely (Tajuddin and Balasubramanian, 1995) to expose the soil to less impact and compaction (Karayel and Šarauskis, 2011). The furrow opener used in no-till seeders firstly cuts the soil and residue well and leaves the existing residue on the surface without burying it in the furrow (Doan et al., 2005).

Single disc type furrow openers which are commonly used in no-till seeders, can be large-diameter, flat, wavy or notched type. The reason why very different types of single disc type furrow openers are available is because they penetrate well into soil in residue field conditions and have a high residue cutting success (Murray et al., 2006). Plain discs that can cut the soil better are also easy to self-sharpen. Since the wavy type discs are self-sharpening, the risk of soil adhesion is low. Although narrow fluted type and fluffy hole type discs loosed soil sufficiently, they have limited use in high clay content and sticky soil conditions. Although wide fluted discs have the ability of opening the desired furrows in easily dispersible soils, in some soil conditions, they can form large clods that cannot cover the seeds in the furrow as expected (Çelik, 2009).

Soil-tool interactions are explained in terms of draft and vertical forces, as well as soil particle displacement (Conte et al., 2009; Lisowski et al., 2016). Force requirement of the disc-type furrow opener is influenced by soil moisture content, soil texture class, penetration resistance, residue level,

furrow opener geometry, and rotational speed of the opener (Kushwaha et al., 1986). There are various studies on the performance of different disc-type furrow openers. In terms of sugarcane residue-cutting capabilities and vertical force requirements, tooth-type disc openers outperformed smooth-type single-disc furrow openers (Magalhaes et al., 2007; Bianchini and Magalhaes, 2008). Ahmad et al. (2015) stated that the diameter, seeding depth, and forward speed had significant effects on the draft and vertical forces acting on the double disc opener having various diameters. The mean draft values were 648.9, 737.2, and 784.6 N, while the vertical forces were 904.7, 1553.9, and 1620.4 N for the openers with diameters of 330, 450, and 600 mm, respectively. Ahmad et al. (2017) studied the draft and vertical force requirements, as well as straw-cutting ability of double disc with smooth-edge, notched, and toothed single-disc furrow openers in no-till paddy fields. According to the findings of this study, furrow opener type, operating depth, and speed, all had a substantial influence on draft and vertical forces, with double disc-type furrow openers having the maximum draft and vertical force. Ov et al. (2008) investigated the force needs of plain and several types of wavy disc furrow openers used in no-till planting in soil bin conditions at varied forward speeds. They stated that while maximum draft force is obtained in plain disc, maximum vertical force occurs in 26 wavy discs. Magana et al. (1994) evaluated the residue cutting performance of notched and smooth type coulters with 425 mm diameter and determined that the smooth coulters had a poorer sugarcane cutting capacity than the notched type coulters. Zeng et al. (2021) three vertical tillage discs with different shapes, namely notched, plain, and rippled, were tested in a soil bin at two different working depths, shallow (63.5 mm) and deep (127 mm). The study was conducted using corn residue. Deep working depth was found to result in 5.1% higher residue mixing, 53.4% greater soil cutting forces, and 34.9% larger soil displacements as compared to the shallow depth.

In the no-till seeding technology, the furrow

profile is an important soil disturbance component. The cross-sectional area is the distance between the furrow profile and the furrow bottom, whereas the spoiled soil area is the distance between the original profile and the soil surface after it has been disturbed. These parameters can be determined by means of graphical representations and different representations of their areas can be surveyed by means of planimetric techniques and/or computer software programs, as recommended by various researchers (Conte et al., 2009; Santos et al., 2010; Hasimu and Chen, 2014; Francetto et al., 2016).

This study was carried out to test the single disc type furrow opener with different properties, which are widely used in no-till seeders, at different soil moisture content and soil compaction levels. The aim of the experiments carried out under controlled soil bin conditions was to determine the most suitable furrow opener in terms of some important soil physical properties as well as the furrow profile properties and the forces acting on the discs from different directions.

## Material and Methods

### *Soil bin*

This research was carried out in the soil bin conditions located at Atatürk University,

Agricultural Machinery and Technologies Engineering Laboratory. The soil bin is 16 m long, 2.5 m wide and 0.8 m deep. The soil bin carriage has a slide that can be moved manually in both directions on the X-axis and a shaft that can be moved in both directions with the help of an electric motor along the Y-axis (Fig. 1).

The soil preparation stages before the experiment consisted of cultivating with a rotary hoe, gaining the appropriate moisture level with a pulverization, periodically applying the soil to the desired compaction level with the wavy and flat type rollers used by mounting on the soil bin carriage, and leveling it with a scraper blade. Soil samples taken from the plots determined to represent the soil bin were weighed with a precision scale with a sensitivity of 0.01 g.

An electric motor with a power of 15 kW was used as the power unit of the soil bin carriage. The speed of the carriage which was adjusted by the speed control unit, was kept under control during the trials with a speed radar mounted on it. In the study, 6 load cells with a capacity of 2 tons were used to reveal the draft, vertical, and lateral forces in different disc-type furrow openers. The values taken from the load cells and speed radar were stored by the data logger and sent to the computer.



Figure 1. Soil bin carriage

This research was carried out to compare the performance of five various single disc coulters which are commonly used in no till seeders in different soil conditions. For this purpose, the discs

on the furrow opener unit were designed and manufactured for easy change and use. The furrow openers were made of steel with a diameter of 460 mm and a thickness of 4 mm (Fig. 2). The furrow

openers were connected to the soil bin carriage by means of a specially designed disc connection unit.

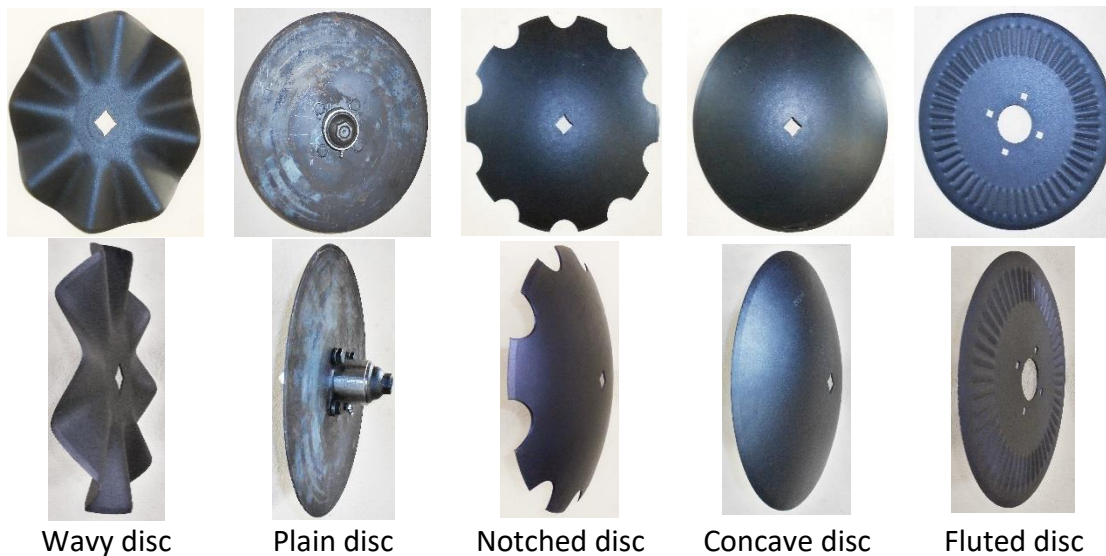


Figure 2. The disc type furrow openers used in the study

### Experimental design

In this study, which was carried out under controlled soil bin, five different disc type furrow openers, two different soil compaction levels, two different soil moisture levels and two different planting depths were considered as factors. The research was carried out in three replications according to the divided plots design. The

diameter value of 460 mm, which is widely used in no-till seeders, was taken into account for the diameter of the disc type furrow opener with zero tilt and disc angle. Some important parameters considered in the experiment such as working depth, forward speed, soil moisture content and soil compaction level are given in Table 1.

Table 1. Factors and factor levels

| Factors                           | Level of factors                              |
|-----------------------------------|---|
| Disc types                        | Wavy, plain, notched, concave and fluted disc |
| Disc diameters (mm)               | 460   |
| Forward speed (km/h)              | 3.6   |
| Seeding depth (mm)                | 50 - 75                                       |
| Soil moisture content (% d.b.)    | 12 - 18                                       |
| Soil penetration resistance (MPa) | 2 - 3   |

### Determination of soil moisture content and penetration resistance

Undisturbed soil samples were taken from 0-5 and 5-10 cm soil depths in four replications, taking into account the working depth before starting the experiments in the soil bin to determine the soil moisture content. After the samples were weighed on a precision scale, they were left to dry in an oven at 105 °C for 24 hours. The soil samples taken from the oven were weighed and their dry weights were obtained and moisture content values were calculated (ASABE, 2015).

The soil compaction level was determined with measurements made with five replications from each plot before the disc opener passed, and the

compression effects of the furrow opener in the furrow region were determined with measurements made after the furrow opener passed. The impact was determined with two replication measurements made along the furrow line at 5 cm intervals and a depth of 10 cm from the center of the furrow line and 20 cm towards the edges of the furrows (Malasli and Celik, 2019).

### Determination of furrow depth and furrow profile

In the experiments, the furrows were cleaned after the passage of the disc opener and the depths of the furrows were measured using a caliper depth measuring apparatus with two repetitions from each plot. The obtained values

were compared with the measurements made with a profilograph and an evaluation was made.

A rod-type profilograph consisting of 36 aluminum rods spaced at 1 cm intervals placed perpendicular to the direction of advance was used to determine the profiles of the furrows



Figure 3. Rod type profilograph

immediately after the passage of the furrow opener (Fig. 3). The values obtained from the measurements made in duplicate from each plot were transferred to graphs and plot profiles were obtained (Jester and Klik, 2005; Karayel and Özmerzi, 2006; Troger et al., 2012).



#### *Determination of vertical, draft, and side forces*

The disc-type furrow opener operates under the influence of three important forces: vertical (shear), horizontal (drawn), and side (Abu-Hamdeh and Reeder, 2003; Armin et al., 2017). 6 S-type load cells with a composite error rate of 0.02-0.03%, placed with special connections to the buttress to which the furrow opener is attached, were used to determine these forces (Afify et al., 1998; Aminzadeh, 2014; Zhang, 2016). The signals obtained from the load cells were stored in a data logger (Campbell CR1000 type) and transferred to the computer (Malasli and Celik, 2019).

#### *Statistical analysis*

All results from the experiments were subjected to analysis of variance. As a result of the analysis, the averages of the factor levels were subjected to the DUNCAN multiple comparison test. Graphs of the analysis of variance results and graphs of the important interactions were prepared in Excel.

SPSS package program was used to analyze the variance of the data obtained from the experiment and compare the means.

## **Results and Discussion**

#### *Results on soil moisture content penetration resistance*

The soil moisture content and penetration resistance results after the soil bin preparation and just before starting the experiments are given in Fig. 4. The average soil moisture content and compaction level values during the winter and summer wheat planting periods in Erzurum conditions were taken into consideration in the experiments. Accordingly, the soil moisture content for soil depths of 0-5 and 5-10 cm was 12% and 18%, and the penetration resistance was found to be very close to the target values chosen as 1.7 MPa and 2.6 MPa, respectively (Fig. 4).

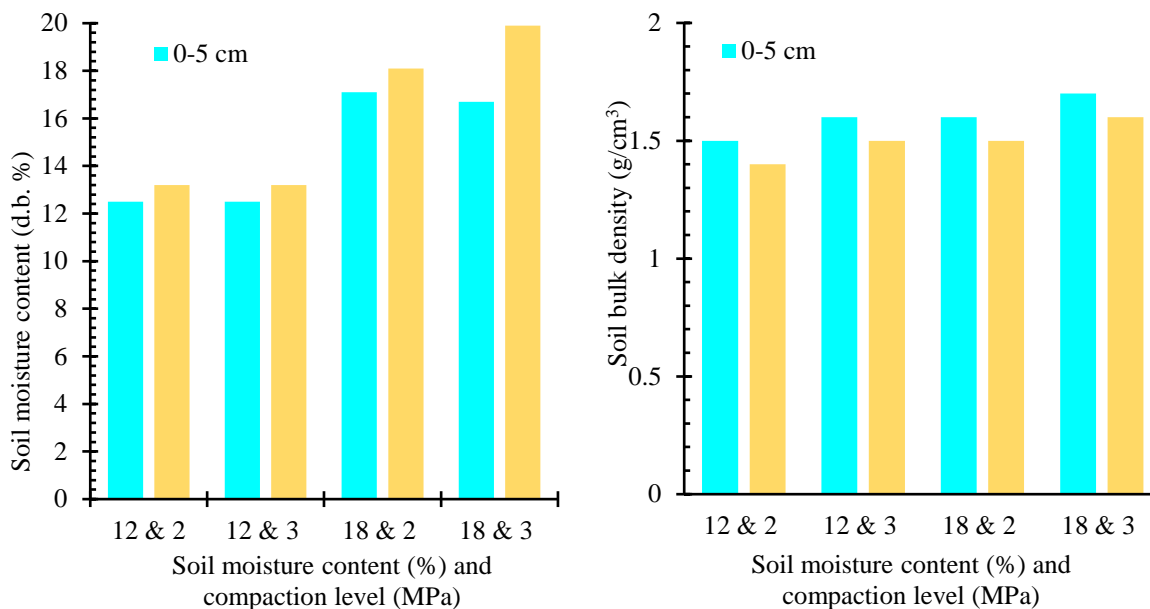


Figure 4. Soil moisture content and penetration resistance values

### Results on draft, vertical, and side forces

Instantaneous measurements were made in the study from the load cells to determine the effects of different soil moisture contents, compaction levels, and working depths on the forces acting on the single disc-type furrow openers. The obtained data were recorded by the data logger and transferred to the computer and evaluated. The results of the analysis of variance applied to the draft, vertical and side forces are given in Fig. 5. According to the obtained results, the lowest vertical force was determined in the flat type disc and the lowest side force and draft force were determined in the notched type disc furrow opener. Ahmad et al. (2017) stated that the

highest vertical and draft forces occur in double disc, notched disc, toothed disc and flat type single disc furrow openers, respectively. On the other hand, the highest draft force and vertical force were found in the wavy type, and the maximum side force was in the concave type disc opener. McKyes (1985), stated that tillage equipment with a wider cutting width demand more draft force. Similarly, Darmora and Pandey (1995) stated that seven furrow openers with different widths create different draft forces. Hasimu and Chen (2014) stated that winged hoe type openers have higher draft force and specific draft requirements than other hoe type openers because they open a wider furrow.

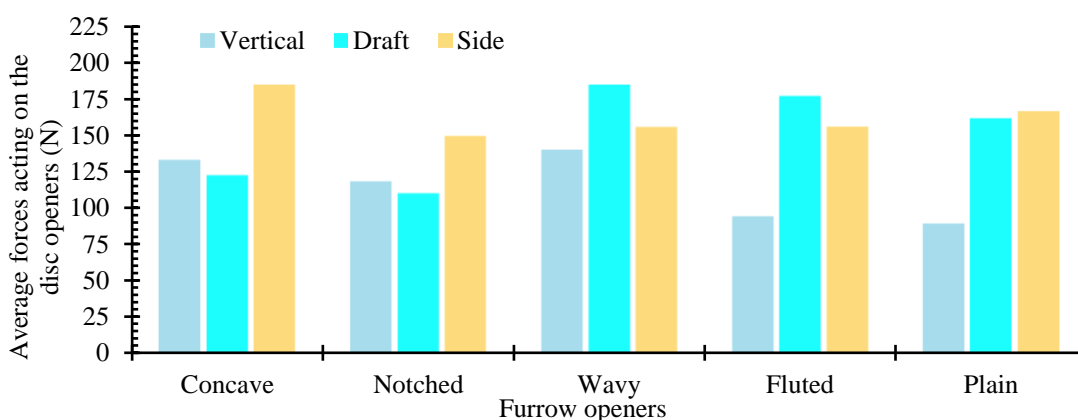


Figure 5. Average vertical, draft, and lateral force values acting on the furrow openers

The results related to the effects of different soil compaction, moisture content and working depth levels on the forces acting on different types of discs in the study are given in Fig. 6. Accordingly,

the effect of different soil compaction levels on the forces acting on the furrow openers was found to be statistically insignificant. The side force values for both compaction levels were found to be

higher than those for the draft force and vertical force. The forces on the discs were found to be statistically significant according to the change in soil moisture content. The vertical, draft, and side force requirements of all furrow opener types have been determined to be lower in low soil moisture content and compaction level, and greater in high

soil moisture content and compaction level. It was determined that the amount of soil cut by the furrow openers increased with the target furrow depth increasing the force acting on the discs. As with soil compaction and moisture content levels, side force was found to be higher than draft force and vertical force at different furrow depths.

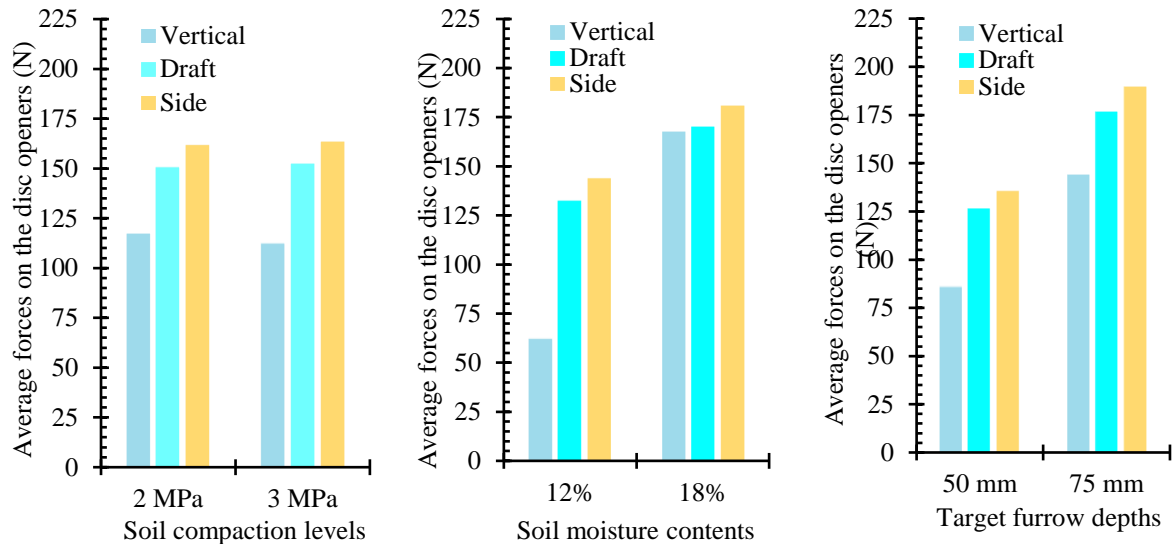


Figure 6. The effects of different soil compaction, moisture content and furrow depth levels on the forces on different disc type furrow openers

#### Results on specific draft, vertical and side forces

The specific draft force was obtained by dividing the obtained draft averages by the cross-sectional area of furrows. Specific draft force, which is defined as the force per unit soil area in no-till seeders, is considered a good performance indicator. In practice, it is preferred that the specific draft force values are small. Two factors are taken into account for the specific draft force: the draft force requirement and the furrow

dimension formed by the furrow opener. The results obtained from the experiments revealed that the smallest specific vertical, side and draft force values were obtained in the fluted, concave and wavy type discs, respectively. While the highest specific vertical force was obtained in the notched type disc, the highest specific draft force and side force were obtained in the plain type disc (Table 2).

Table 2. Specific force values in different disc type furrow openers

| Furrow opener type | Specific vertical force<br>kPa | Specific draft force<br>kPa | Specific side force<br>kPa |
|--------------------|--------------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| Concave            | 53.2 a                         | 54.3 c                      | 78.1 b                     |
| Notched            | 64.3 a                         | 56.4 c                      | 77.4 b                     |
| Wavy               | 57.3 a                         | 76.6 b                      | 65.9 b                     |
| Fluted             | 46.9 a                         | 94.0 a                      | 85.1 ab                    |
| Plain              | 50.5 a                         | 98.3 a                      | 99.9 a                     |
| <i>P</i>           | 0.004                          | 0.000                       | 0.270                      |

The effect of soil compaction levels on specific forces was found to be insignificant. While the specific forces were almost the same in both soil compaction levels, the specific side force was

found to be higher than the specific vertical and specific draft force. The specific forces of the furrow openers were statistically significant at 12% and 18% soil moisture levels. The specific forces

increased as the soil moisture content increased (Fig. 7).

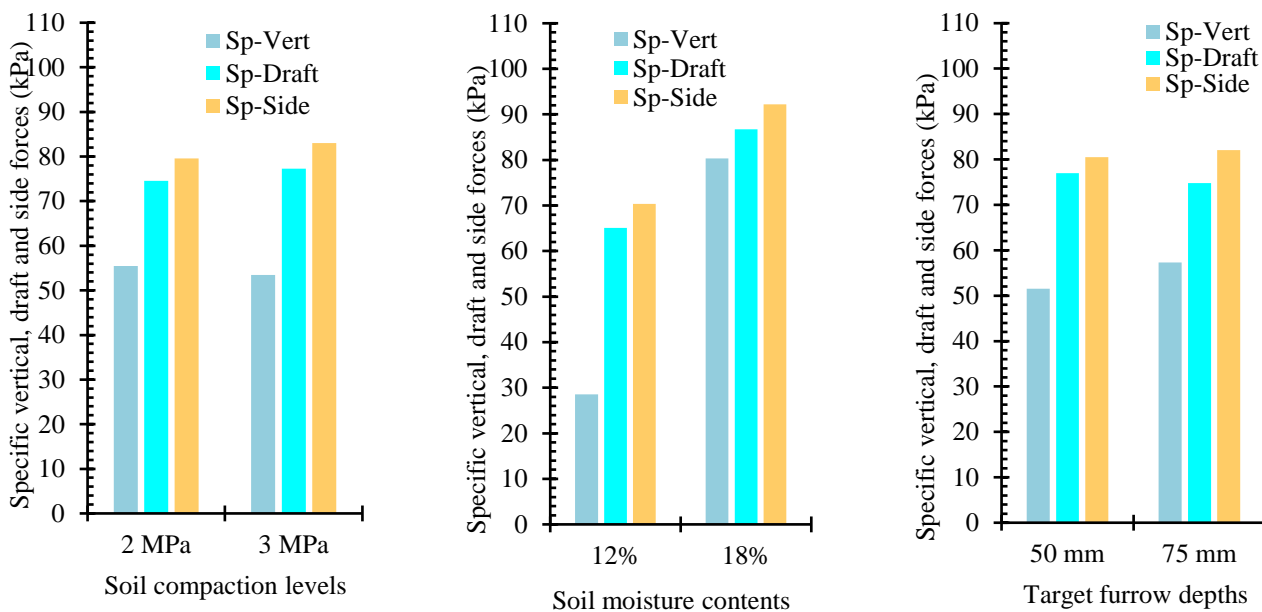


Figure 7. The effects of different soil compaction, moisture content and furrow depth levels on the specific forces acting on different disc type furrow openers

**Results on furrow profile**

In the study, the furrow depth and furrow width data, which were measured immediately after the furrow opener passed, were transferred to the MATLAB program and the furrow cross-sectional area was calculated. According to the obtained results, the effect of different disc type furrow openers on the furrow width and furrow cross-sectional area was found to be statistically significant. While the highest furrow cross-sectional area was obtained in the wavy disc, this furrow opener was followed by concave, notched,

fluted and plain type furrow openers, respectively (Fig. 8). Considering the characteristics of the furrow openers in terms of shape, the highest furrow cross-sectional area was obtained with the wavy disc, as expected, and the lowest furrow cross-sectional area was obtained with the plain type disc. The change in soil compaction level and moisture content did not have a significant effect on the cross-sectional area. The values obtained on the target furrow depth created a larger cross-sectional area in furrow as expected.

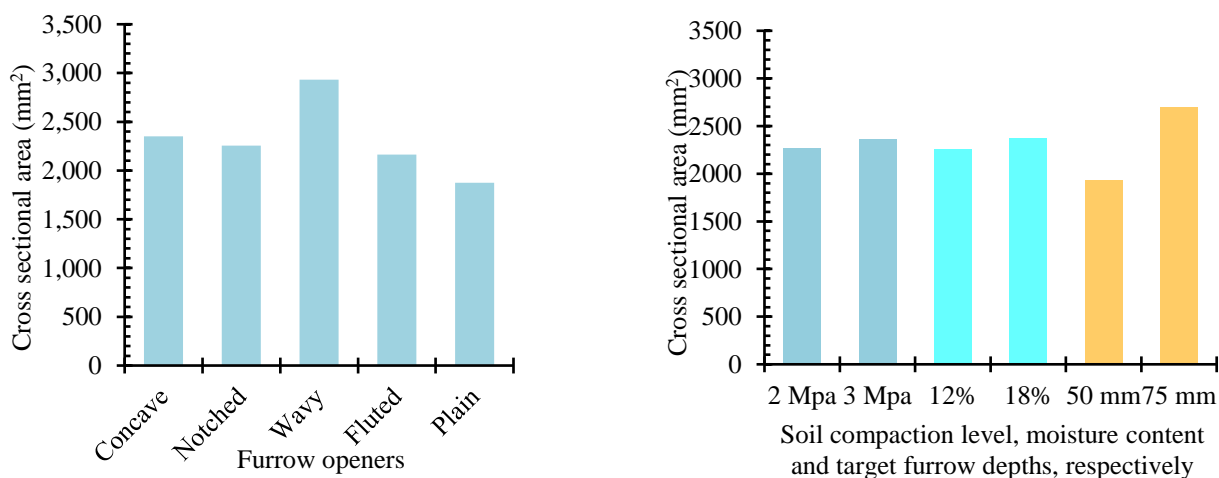


Figure 8. Results on the furrow cross-sectional area

As in the furrow cross-sectional area, the highest furrow width occurred after the passage of the wavy type disc type furrow opener, followed by concave, notched, fluted and plain type discs,

respectively. A furrow width of 2/3 of the wavy disc was obtained with the plain disc type furrow opener. For this reason, it is more preferred in no-till since narrow furrows do not cause much soil

deformation. The effect of the soil compaction level and soil moisture level on the width of the furrow was not found to be statistically significant. The variation of the furrow depth according to the target depth significantly affected the width of the furrow. When the depth of the furrow increased from 50 mm to 75 mm, there was an increase in the width of the furrow due to the increased soil deformation, as the furrow opener sank deeper into the soil.

As in the results obtained regarding the furrow width, the changes in soil compaction and moisture content did not create a significant difference in the furrow depth, while the targeted planting depth was found to be statistically significant.

The furrow profiles formed by the different disc-type furrow openers vary depending on the soil moisture content, soil compaction level and the targeted furrow depth (Fig. 9 and Fig. 10).

Although the obtained furrow profiles looked similar to each other, more distinctive profiles emerged at a target furrow depth of 75 mm. The furrow profile of each furrow opener at 18% soil moisture content and 3 MPa compaction level was found to be more pronounced and closer to the desired target than 12% soil moisture and a 2 MPa soil compaction level. In addition, values close to the targeted furrow depth were obtained for all furrow opener types at 18% soil moisture and 2 MPa compaction levels.

Considering the profiles formed by the furrow openers, the concave, notched and wavy type furrow openers have formed a wider line than the plain and the fluted type disc. Again, while values close to the targeted furrow depth were obtained in all discs, the amount of degraded soil, which is considered as loosened soil accumulated at the edge of the cut, was higher in concave, notched and wavy type discs.

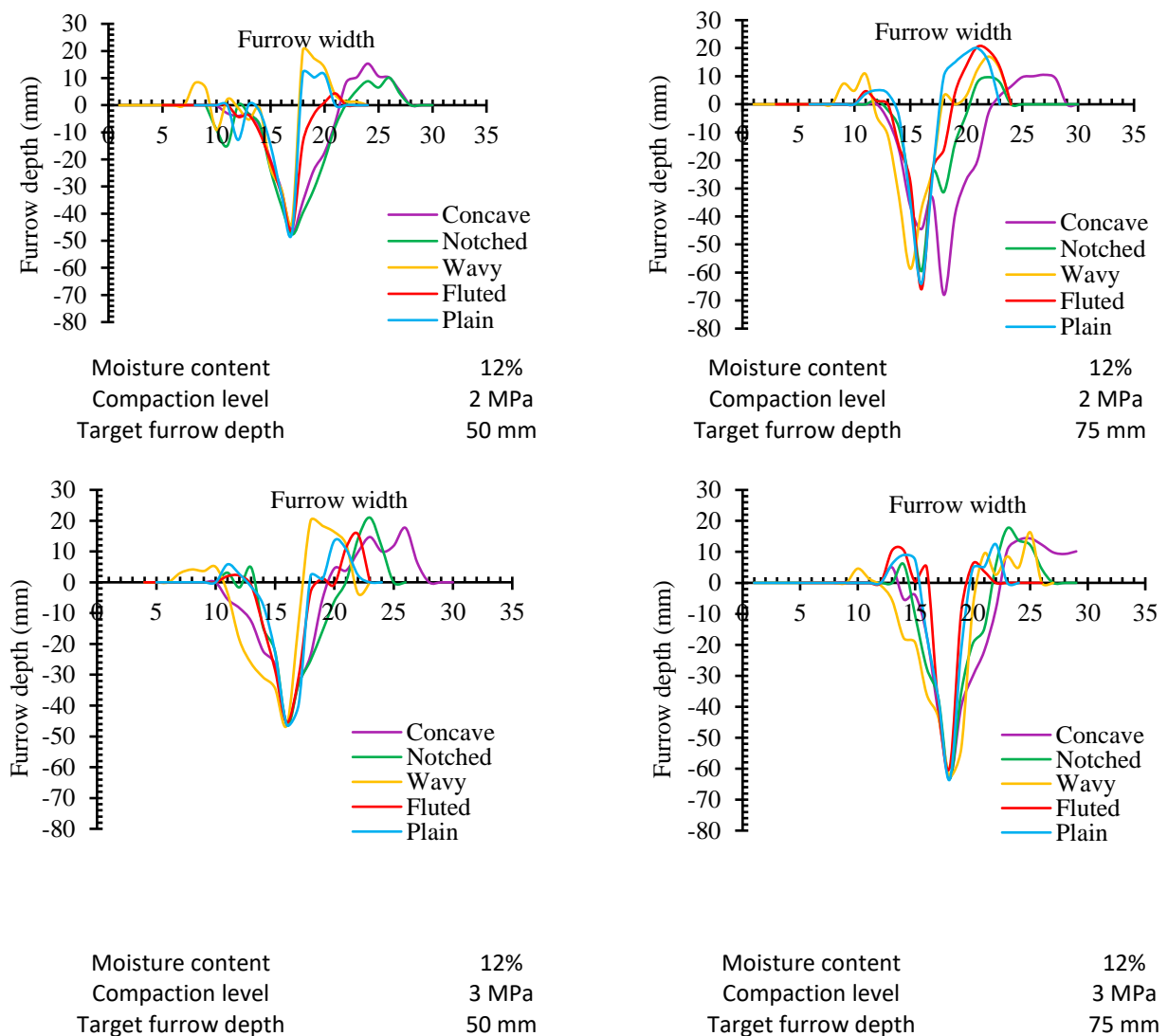


Figure 9. Furrow profiles formed at different compaction levels and furrow depths with 12% soil moisture content



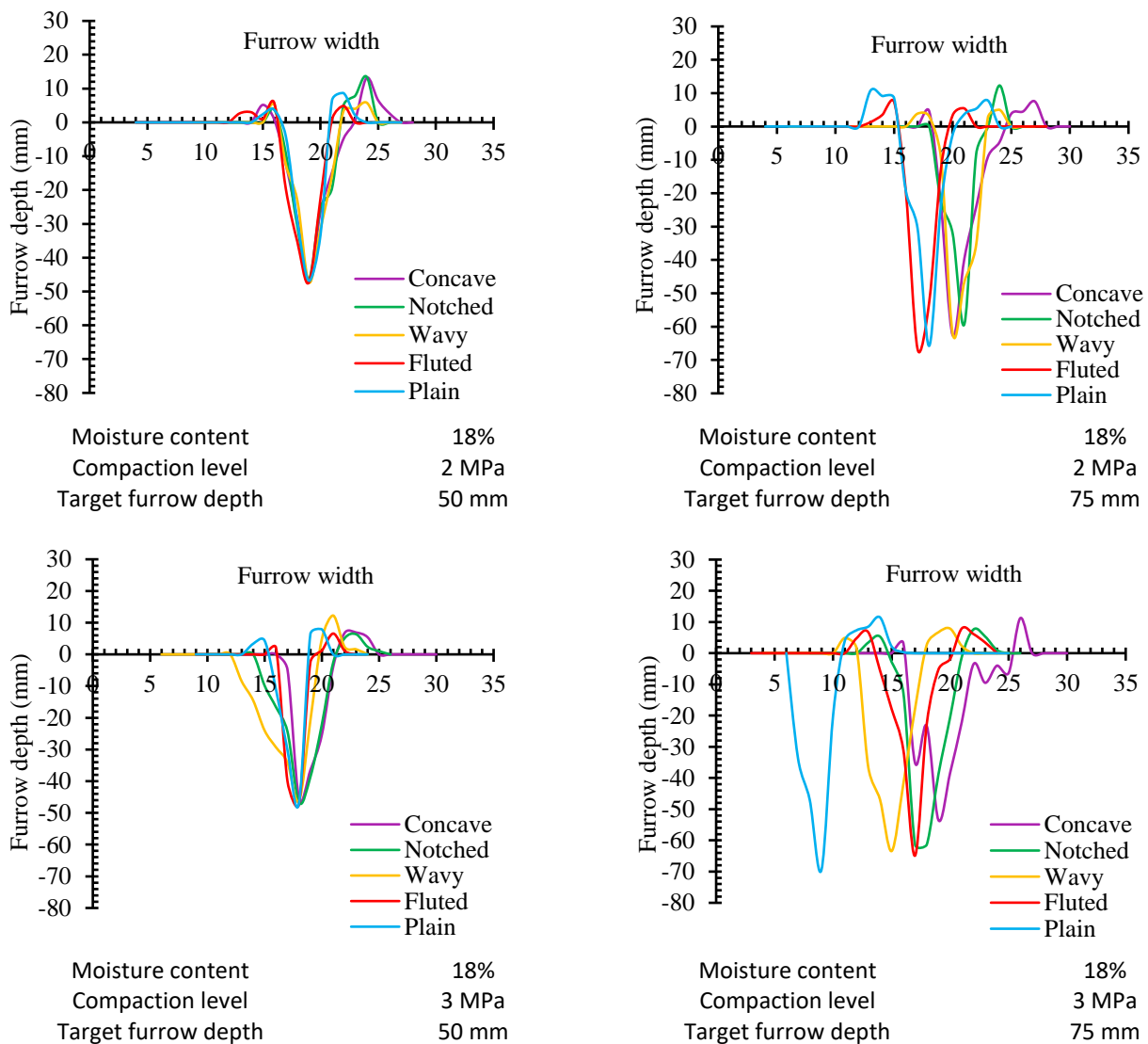


Figure 10. Furrow profiles formed at different compaction levels and furrow depths with 18% soil moisture content

### Conclusion

According to the results obtained from the research, no furrow opener gave the best results on the basis of all parameters. The best results were obtained with plain type discs in terms of furrow width, furrow cross-sectional area and vertical force while notched type discs delivered the best results in terms of draft force and side force and fluted, concave and wavy type discs produced the best results in terms of specific vertical force, specific draft force and specific side force, respectively.

The results revealed that soil conditions are a very important factor in the selection of the disc type furrow opener to be used in no-till seeders. According to these results obtained, using a plain disc type furrow opener in wet and hard soils, and a concave type disc furrow opener in low moisture level and soft soils can be recommended in terms

of the furrow profile and the acting forces. In addition, it is important for companies that manufacture no-till seeders with a single disc type furrow opener not to ignore important working parameters such as soil moisture content and compaction level and working depth, and to design and manufacture by taking into account different field conditions.

It is of great importance that the analysis and evaluation of the results obtained by testing different disc type furrow openers at zero-degree tilt and disc angles are taken into account in future researches that will be planned by taking tilt and disc angles into account different. Investigating different residue conditions together with these features, which could not be taken into account due to the scope of the study, but are planned for future research, will contribute significantly to the more effective use of disc type furrow openers.

**Acknowledgement:** This manuscript represents of the MSc study by the first author. This research was supported by the Scientific Research Administration Unit of Ataturk University, Erzurum, Turkey.

**Conflict of interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.

**Author contributions:** Ahmet Çelik conceived the idea and supervised the study, whereas Yusuf Aydın and Mehmet Zahid Malaslı designed and manufactured the furrow openers and conducted the tests in the soil bin and wrote the manuscript.

## References

- Abu-Hamdeh, N.H., & Reeder, R.C. (2003). A nonlinear 3D finite element analysis of the soil forces acting on a disk plow. *Soil Tillage Research*, 74, 115-124.
- Afify, M., Kushwaha, R., & Gerein, M. (1998). Effect of combined disc angles on soil forces of coulter discs. In: 2001 ASAE Annual Meeting. American Society of Agricultural and Biological Engineers, pp. 1.
- Ahmad, F., Weimin, D., Qishou, D., Rehim, A., & Jabran, K. (2017). Comparative performance of various disc-type furrow openers in no-till paddy field conditions. *Sustainability*, 9, 1143.
- Ahmad, F., Weimin, D., Qishuo, D., Hussain, M., & Jabran, K. (2015). Forces and straw cutting performance of double disc furrow opener in no-till paddy soil. *Plos one*, 10, e0119648.
- Altikat, S., Celik, A., & Gozubuyuk, Z. (2013). Effects of various no-till seeders and stubble conditions on sowing performance and seed emergence of common vetch. *Soil Tillage Research*, 126, 72-77.
- Aminzadeh, R. (2014). *Modified Design of a Precision Planter For a Robotic Assistant Farmer*. MSc Thesis. Saskatchewan University, Saskatoon, Canada.
- Armin, A. (2014). *Mechanics of soil-blade interaction*. PhD Thesis. Saskatchewan University, Saskatoon, Canada.
- Armin, A., Fotouhi, R., & Szyszkowski, W. (2017). Experimental and finite element analysis for mechanics of soil-tool interaction. *International Journal of Mechanical and Mechatronics Engineering*, 11, 433-439.
- ASABE (2013). ASABE Standard S477.1: Terminology for Soil-Engaging Components for Conservation-Tillage Planters, Drills and Seeders. ASABE, St. Joseph, MI.
- ASABE (2015). American Society of Agricultural and Biological Engineers, ASABE Standard S526.4: Soil and Water Terminology. ASABE, St. Joseph, MI, USA.
- Bianchini, A., & Magalhaes, P. (2008). Evaluation of coulters for cutting sugar cane residue in a soil bin. *Biosystems Engineering*, 100, 370-375.
- Çelik, A. (2009). The factors affecting performance of direct seeding machines. *Atatürk University Journal of Agricultural Faculty*, 40, 101-108.
- Conte, O., Levien, R., Trein, C.R., Xavier, A.A.P., & Debiasi, H. (2009). Draft power requirement, soil mobilization in sowing lines and soybean yield in no-tillage. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44, 1254-1261.
- Darmora, D., & Pandey, K. (1995). Evaluation of performance of furrow openers of combined seed and fertiliser drills. *Soil Tillage Research*, 34, 127-139.
- Doan, V., Chen, Y., & Irvine, B. (2005). Effect of residue type on the performance of no-till seeder openers. *Canadian Biosystems Engineering*, 47, 29-35.
- Francetto, T.R., Alonço, A.D.S., Brandelero, C., Machado, O.D.D.C., Veit, A.A., & Carpes, D.P. (2016). Disturbance of Ultisol soil based on interactions between furrow openers and coulters for the no-tillage system. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 14, e0208-e0208.
- Hasimu, A., & Chen, Y. (2014). Soil disturbance and draft force of selected seed openers. *Soil Tillage Research*, 140, 48-54.
- Jester, W., & Klik, A. (2005). Soil surface roughness measurement methods, applicability, and surface representation. *Catena*, 64, 174-192.
- Karayel, D., & Özmerzi, A. (2007). Comparison of vertical and lateral seed distribution of furrow openers using a new criterion. *Soil Tillage Research*, 95, 69-75.
- Karayel, D., & Özmerzi, A. (2006). Effect of furrow openers on furrow profile and soil disturbance. *Akdeniz University Journal of the Faculty of Agriculture*, 19, 279-287.
- Karayel, D., & Šarauski, E. (2011). Effect of down force on the performance of no-till disc furrow openers for clay-loam and loamy soils. *Agricultural Engineering Research Papers*, 43, 16-24.
- Kushwaha, R., Vaishnav, A., & Zoerb, G. (1986). Performance of powered-disc coulters under no-till crop residue in the soil bin. *Canadian Agricultural Engineering*, 28, 85-90.
- Lisowski, A., Klonowski, J., Green, O., Świętochowski, A., Sypuła, M., Strużyk, A., Nowakowski, T., Chlebowski, J., Kamiński, J., & Kostyra, K. (2016). Duckfoot tools connected with flexible and stiff tines: Three components of resistances and soil disturbance. *Soil Tillage Research*, 158, 76-90.
- Magalhães, P.S.G., Bianchini, A., & Braunbeck, O.A. (2007). Simulated and experimental analyses of a toothed rolling coulter for cutting crop residues. *Biosystems Engineering*, 96, 193-200.
- Magana, S.C., Rico, D.M., & Wills, B. (1994). Kinematics of Notched Disc Coulters, ASAE Paper No. 941009. ASAE, St. Joseph, MI.
- Malasli, M. Z., & Celik, A. (2019). Disc angle and tilt angle effects on forces acting on a single-disc type no-till seeder opener. *Soil and Tillage Research*, 194, 104304.
- McKyes, E. (1985). *Soil cutting and tillage*, Development in Agricultural Engineering Volume 7; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands.
- Murray, J.R., Tullberg, J.N., & Basnet, B.B. (2006). *Planters and Their Components: Types, Attributes, Functional Requirements, Classification and Description*. ACIAR Monograph No. 121. Elect Printing, Canberra, AU.
- Ov, R., Koller, K., Ros, V., Drocaş, I., & Marian, O. (2008). Study Regarding The Forces That Occurs In A No-Till

- Technology Process In Relation With Geometrical Parameters Of The Coulter Discs. Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Agriculture, 65.
- Santos, A.J.M., Gamero, C.A., Backes, C., Salomão, L.C., & Bicudo, S.J. (2010). Desempenho de discos de corte de semeadora-adubadora em diferentes quantidades de cobertura vegetal. *Energia na Agricultura*, 25, 17-30.
- Seidi, E., Abdollahpour, S., Javadi, A., & Moghaddam, M. (2010). Effects of novel disk-type furrow opener used in no-tillage system on micro environment of seed. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5, 1-6.
- Tajuddin, A., & Balasubramaniam, M. (1995). Comparative performance of different types of furrow openers. *Agric. Mech. Asia Africa Latin Am. (AMA)*, 26 (2), 18–20
- Troger, H.C., Reis, Â.V.D., Machado, A.L., & Machado, R.L. (2012). Analyzing the efforts in furrow openers used in low power planters. *Engenharia Agrícola*, 32, 1133-1143.
- Zeng, Z., Thoms, D., Chen, Y., & Ma, X. (2021). Comparison of soil and corn residue cutting performance of different discs used for vertical tillage. *Scientific Reports*, 11, 2537.
- Zhang, Y. (2016). *On the Mechanics of Disc-Soil-Planter Interaction*. MSc thesis. Saskatchewan University, Saskatoon, Canada.



# Solucan ve biyo-gübre uygulamalarının çilek bitkisinin kök ve gövdesinin besin elementi içeriğine etkisi

## *Effect of vermicompost and bio-fertilizer treatments on nutrient composition in strawberry roots and stems*

Neslihan KILIÇ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Kadirli Uygulamalı Bilimler Fakültesi, Organik Tarım İşletmeciliği Bölümü, Osmaniye, Türkiye

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0001-8665-3093>

### To cite this article:

Kılıç N. (2024). Solucan ve biyo-gübre uygulamalarının çilek bitkisinin kök ve gövdesinin besin elementi içeriğine etkisi. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 28(2):357-373

DOI: 10.29050/harranziraat.1399463

### \*Address for Correspondence:

Neslihan KILIÇ  
e-mail:  
neslihankilic@osmaniye.edu.tr

### Received Date:

02.12.2023

### Accepted Date:

02.06.2024

© Copyright 2018 by Harran University  
Faculty of Agriculture. Available on-line  
at [www.dergipark.gov.tr/harranziraat](http://www.dergipark.gov.tr/harranziraat)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License.

### ÖZ

Çilek, besin değeri açısından önemi ve ekonomik faydası nedeniyle Türkiye'de üretimi her geçen yıl artan meyvelerden birisidir. Son yıllarda organik çileğe olan talep de artmaktadır. Organik çilek yetiştiriciliğinde yüksek verim ve kaliteyi elde etmek için bitkinin ihtiyacı olan besin elementlerinin belirlenmesi ve uygun yöntemlerle verilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada Monterey çilek çeşidinde solucan gübresinin tek başına ve faydalı bakteri ve mikoriza içeren biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının çilek bitkisinin kök ve gövdesinde azot (N), fosfor (P), potasyum (K), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg), demir (Fe), çinko (Zn) ve mangan (Mn) içeriğine etkileri incelenmiştir. Akdeniz iklimi etkisi altında Osmaniye ilinde yürütülen bu tarla denemesinde sadece su verilen kontrol uygulamasının yanında solucan gübresi ve birlikte uygulamaların yer aldığı 7 farklı uygulama yer almıştır. Solucan gübresi ve biyo-gübrelerin birlikte uygulamasında kök ve gövdenin besin elementi içeriği, tek başına uygulanan solucan gübresi ve kontrole kıyasla daha yüksek olmuştur. Solucan gübresi ile içeriğinde *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma konigii* olan biyo-gübrenin birlikte uygulamasının, diğer uygulamalara göre daha yüksek kök N (%1.04), K (%0.51), Mn (25.38 mg kg<sup>-1</sup>), Zn (64.88 mg kg<sup>-1</sup>) ve gövde N (%1.71), P (%0.17), K (%1.29), Mg (%0.22), Fe (159.13 mg kg<sup>-1</sup>) içeriklerine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular, solucan gübresi ve biyo-gübrenin birlikte uygulanmasının diğer uygulamalara kıyasla kök ve gövdenin bitki besin içeriğine daha fazla katkı sağladığını göstermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Çilek, solucan gübresi, biyo-gübre, besin elementleri, kök ve gövde

### ABSTRACT

Strawberry cultivation in Turkey is increasing year after year, driven by its nutritional value and economic significance. This growing popularity extends to organic strawberries, with consumer demand witnessing a steady rise in recent years. To obtain high yield and quality in organic strawberry cultivation, identifying and providing the essential nutrients that the plants require is paramount. This study investigated the effects of vermicompost application alone and in combination with biofertilizers containing beneficial bacteria and mycorrhizae on the nitrogen (N), phosphorus (P), potassium (K), calcium (Ca), magnesium (Mg), iron (Fe), zinc (Zn), and manganese (Mn) content in the root and stem of strawberry cv. Monterey. The field experiment was

conducted in Mediterranean climate conditions in Osmaniye Province, Türkiye. Seven different treatments were applied, including a control treatment with only water application, vermicompost treatment, and co-application treatments. Plants treated with a combination of vermicompost and bio-fertilizer exhibited significantly higher nutrient content in their roots and stems compared to those treated with vermicompost alone and controls. This combined treatment, containing vermicompost and specific beneficial bacteria (*Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Trichoderma harzianum*, and *Trichoderma koningii*), resulted in increased root levels of N (1.04%), K (0.51%), Mn (25.38 mg kg<sup>-1</sup>), and Zn (64.88 mg kg<sup>-1</sup>). Similarly, stem nutrient content increased, showing higher levels of N (1.71%), P (0.17%), K (1.29%), Mg (0.22%), and Fe (159.13 mg kg<sup>-1</sup>) compared to other treatments. These findings suggest that the combined vermicompost and bio-fertilizer treatment provides higher nutrients in roots and stems compared to other treatments.

**Key Words:** Strawberry, vermicompost, bio-fertilizer, nutrients, root and stem

## Giriş

Çilek (*Fragaria × ananassa* Duch.) eşsiz tat ve aromasından dolayı dünyada ve ülkemizde üretimi giderek artan üzümü meyveler grubunun en önemli üyelerinden birisidir. Çilek üretim alanı ve miktarı, son yıllarda dünyada ciddi bir artış göstermiştir. Dünya Gıda ve Tarım Organizasyonu verilerine göre 2022 yılında çilek üretimi 9.569.864 ton olup, 3.354.803 ton ile Çin birinci, 1.261.890 ton ile Amerika ikinci ve Türkiye 728.112 ton ile üçüncü sırada yer almaktadır (FAO, 2024).

Çilek, şeker, vitamin ve mineraller gibi çok çeşitli besleyici bileşikler açısından zengindir. İyi bir C vitamini kaynağı olan çilek, karotenoidler, fenolikler, antosiyaninler ve flavonoidler gibi kimi bileşikler de içerdiğinden mükemmel bir doğal antioksidan kaynağıdır. Ayrıca, belirli kanser türlerini, kardiyovasküler hastalıkları, inflamasyonu, obeziteyi ve tip II diyabeti önleyebilen serbest radikalleri temizleme konusunda oldukça yüksek bir kapasiteye sahiptir (Giampieri ve ark., 2015; Skrovankova ve ark., 2015; Morais ve ark., 2019; Zhao ve ark., 2021).

Çilek yetiştiriciliğinde verim ve meyve kalitesini etkileyen en önemli faktörler, uygun çeşit, iklim, toprak yapısı ve bitkinin yeterli besin elementi almasıdır. Çilek bitkisinin yeterli besin elementi alması bitkinin büyümesini, gelişimini dolayısıyla verimini olumlu etkilemektedir. Bitki köklerinin yeterli besin alımı genetik yapı, uygulanan gübre ve kültürel uygulamalar gibi birçok faktöre bağlıdır. Meyvelerde yüksek verim için farklı çevresel koşullar altında yetiştirilen çeşitlerin ihtiyaç duyduğu besin element miktarı farklı

olabilmektedir (Demirsoy ve ark., 2012).

Azot (N), fosfor (P), potasyum (K), magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), demir (Fe), mangan (Mn) ve çinko (Zn) çilek yetiştiriciliğinde en fazla gereksinim duyulan makro ve mikro elementlerdir. Azot, yapraktaki nişastanın sentezi, protein sentezi için amino asitlerin üretimi ve dolayısıyla verimi için gerekli olduğu gibi bitkilerin vejetatif büyümesi için de temel olarak gerekli olan besin maddelerinden biridir (Kumar ve ark., 2021). Fosfor, hücre bölünmesi, çiçek ve meyve oluşumunda önemli rol oynar. Nükleik asitlerin, hücre zarlarının ve enzimlerin önemli bir bileşenidir. Fotosentez, karbonhidrat metabolizması, enerji üretimi gibi çeşitli hücresel süreçler için gereklidir (Trejo-Téllez ve Gómez-Merino, 2014; Bolat ve Kara, 2017; Kumar ve ark., 2021). Çilek bitkisi K ile iyi bir şekilde beslendiğinde, daha fazla şeker sentezleyebilir ve meyveler daha tatlı olur (Trejo-Téllez ve Gómez-Merino, 2014). Kalsiyum, bitki hücre duvarının tamamlayıcı bir parçasıdır ve bu yüzden hücre duvarı yapısını düzenleyen bitki besin elementi olarak bilinmektedir. Ayrıca Ca, meyve sertliği için çok önemli bir besindir (Trejo-Téllez ve Gómez-Merino, 2014; Bolat ve Kara, 2017). Magnezyum, klorofil, phytin ve pektinin yapı taşıdır. Fotosentezde, protein sentezinde rol oynar (Bolat ve Kara, 2017). Demir, klorofil sentezi ve bazı proteinler için gerekli ve hücre metabolizmasında önemli rol oynar. Çinko, klorofil ve karbonhidrat üretiminde ve enzim aktivitelerinde görev yapar. Ayrıca büyüme hormonlarının (oksin hormonu) üretimi için gerekli olan bir bitki besin elementidir. Mangan ise bitkideki esas rolü katalizör olması ile birlikte klorofil sentezinde de

etkilidir (May ve Pritts, 1990; Ersoy ve Demirsoy 2006a; Bolat ve Kara, 2017).

Yetiştiricilikte toprak ve bitki analizleri yapılmadan uygulanan kimyasal gübreler zamanla toprakta besin maddesi dengesinin bozulmasına ve yüzey sularının kirlenmesi gibi çevre sorunlarına yol açmaktadır. Bu nedenle, çevreye dost organik yöntemlerle çileğin yetiştiriciliğinde üretimi artırmak için bitkinin besin elementi ihtiyacı ile ilgili araştırmaların artırılması son derece önemlidir. Solucan gübresi ve biyo-gübre gibi uygulamalar çevre dostu uygulamalardan bazılarıdır. Solucanların aktivitesiyle üretilen solucan gübresi, makro ve mikro besin elementleri, vitaminler, proteazlar, amilazlar, lipaz, selüloz ve kitinaz gibi enzimler ve hareketsiz mikroflora açısından zengindir. Daha az su kullanımı ve daha az yabancı ot büyümesi tarımsal üretimde solucan gübresi kullanımının faydalarından sadece birkaçıdır (Olle, 2019). Ayrıca, toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini iyileştirdiği ve bitki gelişmesini artırarak çilek verimini artırdığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Joshi ve ark., 2015; Srivastav ve ark., 2018; Ramnarain ve ark., 2019).

Tarımda mikrobiyal gübre veya biyo-gübre olarak da tanımlanan ve bitki gelişimini teşvik eden rizobakteriler (PGPR), bitkilerde abiyotik stres toleransı, besin elementi bağlanması [azot bağlanması ve fosfor çözücülüğü] gibi etkilerinin olduğu bildirilmiştir (İmriz ve ark., 2014; Nadeem ve ark., 2014; Lu ve ark., 2020). Biyo-gübreler, bitki bünyesinde Indol-3-Asetik Asit (IAA) ve sitokinin üretimi, bitki bünyesinde gibberelinin teşvik edilmesi, uçucu organik bileşiklerin üretimi, bitki hastalıklarının önlenmesi için kitinaz, glukanaaz ve ACC-deaminaz gibi koruma enzimlerinin üretimi gibi etkileriyle bitki gelişimini

desteklemektedir (Vejan ve ark., 2016). Ayrıca, bitkilerin topraktan daha fazla su ve besin maddelerinden yararlanmaları, kök gelişimini desteklemesi, sistemik dayanıklılığı artırması, yer ve besin yarışı ile hastalık etmenini baskılayabildiği gibi etkilerinin olduğu bildirilmiştir (İmriz ve ark., 2014; Basu ve ark., 2017; Emmanuel ve Babalola, 2020).

Organik çilek yetiştiriciliğinde bitki büyümesi, verim ve meyve kalitesini etkileyen en önemli faktörlerden birisi bitkinin optimum gelişimi için gereksinim duyduğu besin elementlerini alabilmesidir. Organik uygulamalar ile bitki köklerinin topraktaki besin elementlerini alım etkinliğini artırmak çok önemlidir. Bu çalışmada Monterey çilek çeşidine solucan gübresi tekli ve beş farklı biyo-gübre ile (bakteri-mikorizal spor) birlikte uygulanarak bitkinin kök ve gövdenin besin elementi içeriği üzerine etkisi incelenmiştir.

## **Materyal ve Metot**

### *Materyal*

Deneme 2019-2020 yılı yetiştirme sezonunda Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi deneme alanında yürütülmüştür (37.0408458N, 36.2204845E). Bu bölge Akdeniz iklimine sahip olup denizden yüksekliği 121 m'dir. Deneme alanı aylık iklim verileri olarak Osmaniye Meteoroloji Müdürlüğü 2019 ve 2020 yılı kayıtları kullanılmıştır. Deneme süresince en düşük sıcaklık -4.8 °C ile 2020 yılı şubat ayında, en yüksek sıcaklık ise 41.8 °C ile 2020 yılı mayıs ayında gerçekleşmiştir (Çizelge 1). Denemenin yürütüldüğü 2020 yılında toplam 696 mm yağış düşmüş ve yağışın önemli bir kısmı Mart ve Mayıs ayları arasında gerçekleşmiştir.

Çizelge 1. Denemenin yürütüldüğü 2019 ve 2020 yıllarına ait iklim verileri

Table 1. The climate conditions during the 2019-2020 growing period

| İklim özellikleri<br><i>Climatic features</i>  | Yıl<br><i>Year</i> | Aylar/ Months |      |       |      |       |      |      |      |      |      |      |       |
|--|--------------------|---------------|------|-------|------|-------|------|------|------|------|------|------|-------|
|  |                    | 1             | 2    | 3     | 4    | 5     | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12    |
| Maks. Sıcaklık (°C)<br><i>Max. Temp. (°C)</i>  | 2019               | 17.9          | 21.9 | 26.9  | 32.2 | 39.1  | 37.5 | 38.7 | 39.9 | 37.7 | 38.5 | 30.5 | 20.9  |
|  | 2020               | 18.2          | 22.9 | 27.6  | 30.1 | 41.8  | 39.4 | 40.6 | 43.6 | 46.9 | 36.8 | 28.0 | 22.5  |
| Min. Sıcaklık (°C)<br><i>Min. Temp. (°C)</i>   | 2019               | -0.1          | 3.5  | 2.0   | 6.8  | 12.0  | 17.2 | 18   | 20.9 | 15.3 | 14.4 | 7.0  | 4.7   |
|  | 2020               | -0.7          | -4.8 | 3.5   | 5.9  | 12.3  | 16.1 | 22.1 | 20.0 | 19.8 | 16.0 | 4.6  | 1.6   |
| Ort. Sıcaklık (°C)<br><i>Mean Temp. (°C)</i>   | 2019               | 9.5           | 11.9 | 13.5  | 16.9 | 24.2  | 26.7 | 28   | 29.4 | 26.9 | 23.9 | 17.8 | 11.5  |
|  | 2020               | 9.3           | 10.1 | 15.2  | 17.7 | 22.9  | 25.0 | 29.6 | 29.7 | 20.7 | 25.2 | 16.1 | 13.2  |
| Toplam Yağış (mm)<br><i>Precipitation (mm)</i> | 2019               | 316.6         | 53.2 | 121.2 | 36.6 | 3.2   | 44.6 | 27.2 | 25.8 | 33.8 | 28.2 | 24.0 | 210.8 |
|  | 2020               | 54.6          | 92.0 | 182.4 | 123  | 126.2 | 1.8  | 0.0  | 25   | 9.4  | 7.8  | 31.4 | 42.4  |
| Nem (%)<br><i>Humidity (%)</i>                 | 2019               | 66.3          | 63.7 | 66.2  | 64.2 | 52.6  | 68   | 67.6 | 65.1 | 58.5 | 57.6 | 46.9 | 75.0  |
|  | 2020               | 61.9          | 58.1 | 66.9  | 66.7 | 58.3  | 63.8 | 66.1 | 59.2 | 57.1 | 74.5 | 53.3 | 53.9  |

Denemede, Kaliforniya Üniversitesi tarafından ıslah edilen Monterey çilek çeşidi kullanılmıştır (Shaw ve Larson, 2009). Orta derecede nötr gün çeşidi olan Monterey, seçkin bir aromaya sahiptir. Mildiyö'ye karşı hassastır. Erkeni olması yanı sıra bitki yapısı çok güçlüdür (Türemiş ve Ağaoğlu, 2013). Çalışmada tabandan katı solucan gübresi ve üstten sıvı solucan gübresi (EkosolFarm) tek başına ve faydalı bakteriler, funguslar içeren biyo-gübreler ile birlikte uygulanmıştır. Kırmızı Kaliforniya kültür solucanlarının dışkılarında elde

edilen Ekosolfarm, %100 organik solucan gübresidir. Solucan gübresi %35 organik madde, %1.2 azot (N), %1 organik azot, %20 toplam hümik ve fulvik asit içermektedir. Ekosolfarm sıvı solucan gübresinin %7 toplam organik madde, %1 azot, %6 toplam humik fulvik asit içerdiği bildirilmiştir (Anonim, 2023). Çalışmada ticari adı RhizoFill, Subtima, Fontera microzone, Endo Roots Soluble (Mikoriza) ve Bontera olan beş farklı biyo-gübre kullanılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Biyo-gübrelerin içerdikleri canlı mikroorganizmalar ve konsantrasyonları

Table 2. Live microorganisms contained in bio-fertilizers and their concentrations

| Biyo-gübreler<br><i>Bio-fertilizers</i> | Mikroorganizmalar ve konsantrasyonları<br><i>Microorganisms and their concentrations</i>   |
|---|--|
| RhizoFill                               | <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> ( $1 \times 10^9$ cfu/ml)   |
| Subtima                                 | <i>Bacillus subtilis</i> ( $1 \times 10^9$ cfu/ml)   |
| Fontera microzone                       | <i>Azospirillum brasilense</i> , <i>Azotobacter vinelandii</i> , <i>Rhizobium trifolii</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Azotobacter chroococcum</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Macillus mucilaginosus</i> ( $5 \times 10^8$ cfu/g) |
| Endo Roots Soluble (Mikoriza)           | <i>Glomus intraradices</i> (%25), <i>Glomus mosseae</i> (%24), <i>Glomus aggregatum</i> (%1), <i>Glomus clarum</i> (%1), <i>Glomus monosporum</i> (%1), <i>Glomus deserticola</i> (%1), <i>Glomus brasilianum</i> (%1), <i>Glomus etunicatum</i> (%1), <i>Gigaspora margarita</i> (%1)                               |
| Bontera                                 | <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Trichoderma konigii</i> ( $1.2 \times 10^8$ cfu/ml)  |

Denemede kullanılan uygulamalar aşağıda verilmiştir.

T<sub>1</sub>: Gübresiz (kontrol) sadece su verilmiştir.

T<sub>2</sub>: Katı solucan gübresi taban (Ekosolfarm)+Sıvı solucan gübresi üstten (Ekosolfarm)

T<sub>3</sub>: Katı solucan gübresi taban (Ekosolfarm)+Sıvı solucan gübresi üstten (Ekosolfarm) + RhizoFill ( $1 \times 10^9$ cfu/ml)

T<sub>4</sub>: Katı solucan gübresi taban (Ekosolfarm)+Sıvı solucan gübresi üstten (Ekosolfarm)+ Subtima ( $1 \times 10^9$ cfu/ml)

T<sub>5</sub>: Katı solucan gübresi taban (Ekosolfarm)+ Sıvı solucan gübresi üstten (Ekosolfarm)+ Fontera microzone ( $5 \times 10^8$  cfu/g)

T<sub>6</sub>: Katı solucan gübresi taban (Ekosolfarm)+ Sıvı solucan gübresi üstten (Ekosolfarm) +Mikoriza

(ERS) ( $1 \times 10^4$  cfu/g)

T<sub>7</sub>: Katı solucan gübresi taban (Ekosolfarm)+ Sıvı solucan gübresi üstten (Ekosolfarm)  
+Bontera ( $1.2 \times 10^8$ cfu/ml)

### Metot

Deneme, tesadüf blokları deneme desenine göre 4 tekerrürlü ve her tekerrürde 20 bitki olacak

şekilde kurulmuştur. Deneme alanı toprakları hafif alkali ve tın bünyeye sahiptir (Çizelge 3). Toprak pH'sını düşürmek amacıyla toz kükürt ( $50 \text{ kg da}^{-1}$ ) toprağa uygulanmıştır. Toz kükürt toprağa uygulandıktan sonra, sedde yapılmış ve damla sulama boruları yerleştirilmiş ve siyah polietilen malçla toprak yüzeyi kaplanmıştır.

Çizelge 3. Deneme alanına ait bazı toprak özellikleri

Table 3. Some of soil properties for the experimental site

| Toprak özellikleri<br>Soil Properties | Birim<br>Unit       | Değerleri<br>Values |
|---------------------------------------|---------------------|---------------------|
| Bünye                                 |                     | Tın                 |
| pH                                    |                     | 7.9                 |
| Elektriksel iletkenlik                | $\text{dS m}^{-1}$  | 1.45                |
| Kireç (%)                             | %                   | 37.13               |
| Organik madde (%)                     |                     | 0.51                |
| P                                     |                     | 5.89                |
| K                                     |                     | 134                 |
| Ca                                    |                     | 7033                |
| Mg                                    |                     | 358                 |
| Na                                    | $\text{mg kg}^{-1}$ | 56                  |
| Fe                                    |                     | 1.99                |
| Cu                                    |                     | 1.16                |
| Mn                                    |                     | 0.94                |
| Zn                                    |                     | 0.28                |

Kontrol hariç (T<sub>1</sub>), diğer uygulamalarda fide dikimi sırasında bitki başına 30 gram granül solucan gübresi toprağa karıştırılmıştır. AMF sporu içeren T<sub>6</sub> uygulamasında ise fide dikimi sırasında her fide için 0.2 g mikoriza (ERS) toprağa karıştırılarak bir kez uygulanmıştır. Taze çilek fideleri Kasım 2019'da üçgen dikim yöntemiyle 30x30 cm aralıklarla dikilmiştir. Dikimden bir hafta sonra başlamak üzere üretim sezonu boyunca 15 günde 1 kez olmak üzere  $2 \text{ L da}^{-1}$  olacak şekilde sıvı solucan gübresi ve  $1 \text{ ml L}^{-1}$  olacak şekilde diğer gübreler hazırlanıp verilmiştir. Kontrolde sadece su verilmiştir. Fideleri kış soğuklarından korumak amacıyla aralık ayında polietilen alçak tünel kurulmuş, mart ayında havaların ısınması ile birlikte kaldırılmıştır.

Deneme 2020 yılı Mayıs ayı sonuna kadar devam etmiştir. Mayıs ayı sonunda kök ve gövdede N, P, K, Ca, Mg, Fe, Zn ve Mn analizleri yapılmıştır. Uygulamaların her tekerrüründen on bitkinin kök ve gövdesi çeşme suyunda yıkanıp 2 kez saf sudan geçirilmiştir. Kök ve gövdeler etüvde  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de sabit ağırlığa gelinceye kadar

kurutulmuştur. Kurutulan örnekler porselen havanda öğütüldükten sonra  $550 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de 6 saat süreyle yakılmıştır. P, K, Ca, Mg, Fe, Zn ve Mn analizi için kuru yakma yöntemi, N analizi için Kjeldahl yaş yakma yöntemi uygulanmıştır. K, Ca, Mg, Fe, Zn ve Mn okumaları atomik absorpsiyon spektrometrede, P ölçümleri spektrofotometrede (Jones, 2001)' e göre yapılmıştır.

Araştırma sonucunda elde edilen verilerin varyans analizi MSTAT-C istatistik paket programı kullanılarak yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki fark LSD testi kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca, elde edilen veriler arasındaki ilişkiler korelasyon analizi ile belirlenmiştir.

### Araştırma Bulguları ve Tartışma

#### Kök makro besin element içerikleri (%)

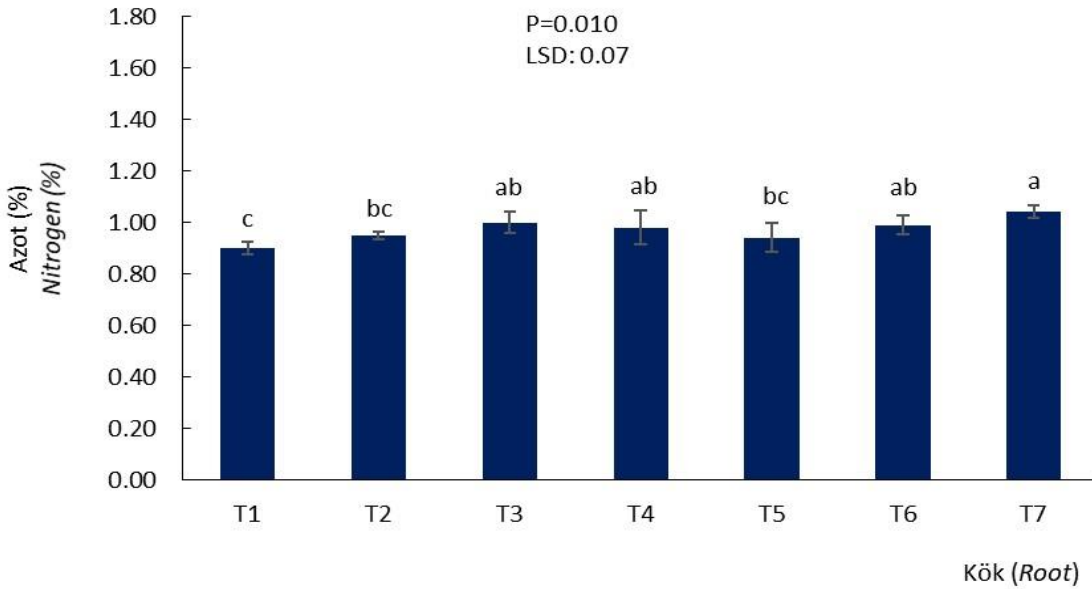
Solucan gübresinin tek başına ve diğer uygulamalar ile birlikte kullanımının kök N içeriğine etkisi istatistiksel olarak önemlidir ( $p < 0.05$ ) (Şekil 1). Çilek kök N içeriği, uygulamalara bağlı olarak %0.90 (T<sub>1</sub>) ile %1.04 (T<sub>7</sub>) arasında



değiştirilmiştir. Taylor ve Harrier (2001), mikoriza uygulamalarında Elvira çilek çeşidinin kök N içeriğinin %0.46 ile %1.10 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Demirsoy ve ark. (2012), Camarosa ve Sweet Charlie çilek çeşitlerinin organik ve konvensiyonel yetiştiriciliği ve iki farklı malçın etkisini araştırdıkları çalışmada, Sweet Charlie çilek çeşidinde kök N içeriğinin organik yetiştiricilikte %0.62 ile %1.01 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarında kök N içeriği, kontrole göre daha yüksektir. Kök N içeriğindeki artış, bu uygulamaların bitkinin topraktan daha kolay ve

daha fazla su ve N elementi alımı ile ilişkili olabilir. Nitekim, İmriz ve ark. (2014), bitki büyümesini teşvik eden rizobakterilerin en önemli özelliklerinden birisinin atmosferdeki serbest azotu bağlayabilmesi olduğunu, azotu bağlayan nonsimbiyotik bakterilerden bazılarının *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *clostridium*, *Corynebacterium*, *Dexia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* olduğunu; Beer ve Singh (2015) bitkide besin elementi artışının biyolojik azot fiksasyonu ve enzim kompleksi üretiminin, besin elementi formunu çözündürüp kullanılabilir formda gelmiş olabileceğini bildirmişlerdir.



Şekil 1. Uygulamaların çileğin kök azot içeriğine etkisi

Figure 1. The effect of treatments on the nitrogen content of strawberry root

LSD testine göre %5 düzeyinde önemli farklılık gösteren ortalamalar farklı harflerle gösterilmiştir. T<sub>1</sub>: Gübresiz (kontrol); T<sub>2</sub>: Solucan gübresini; T<sub>3</sub>: Solucan gübresini+RhizoFill; T<sub>4</sub>: Solucan gübresini+Subtima; T<sub>5</sub>: Solucan gübresini+Fontera microzone; T<sub>6</sub>: Solucan gübresini+Mikoriza (ERS); T<sub>7</sub>: Solucan gübresini+Bontera

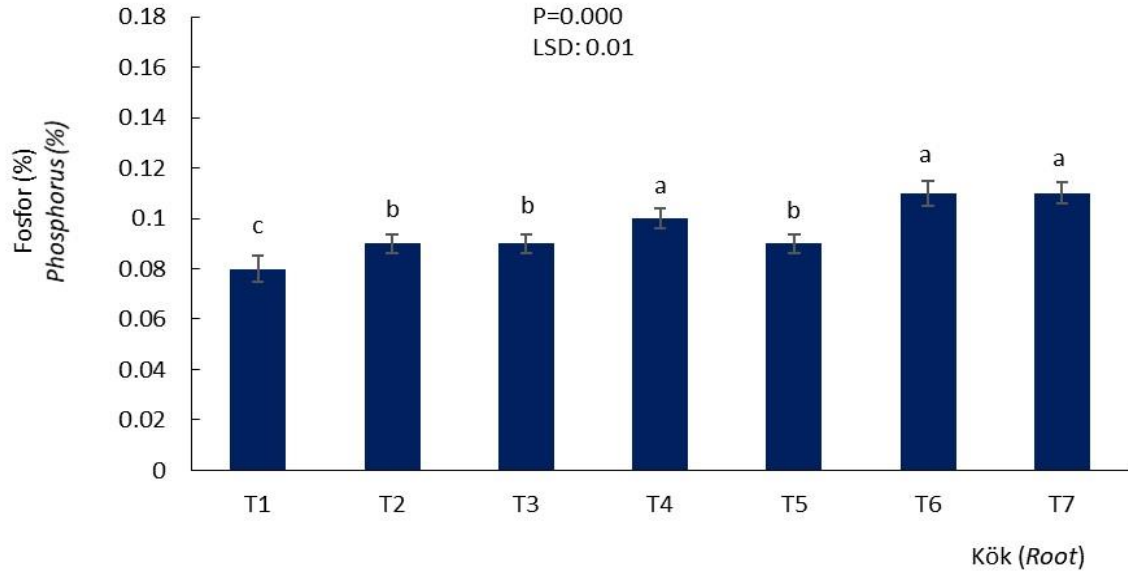
Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının kök P içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Şekil 2). Bitkinin en yüksek kök P içeriği T<sub>7</sub>, T<sub>6</sub> ve T<sub>4</sub> uygulamalarında sırasıyla %0.11, %0.11 ve %0.10 iken, kontrolde (T<sub>1</sub>) en düşük (%0.08) tespit edilmiştir (Şekil 2). Kök P içeriğini Taylor ve Harrier (2001), yaptıkları çalışmada Elvira çilek çeşidinde %0.05-0.12 arasında; Demirsoy ve ark. (2010), Sweet Charlie çilek çeşidinde %0.22-0.52 arasında; Demirsoy ve ark.

(2012), yaptıkları çalışmada %0.19-0.29 arasında; Soppelsa ve ark. (2019), %0.13-0.18 arasında; Balcı (2023), hasat döneminde %0.08-0.05 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarında kök P içeriği, kontrolden daha yüksek çıkmıştır. Fosfatın çözünmeyen formlarını çözünebilir formlara dönüştürmede biyo-gübrelerin etkili olduğu, *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *B. megatarium*, *Pseudomonas striata*, *P. rathonia*,

*Rhizobium leguminosarum* organik asit üreterek fosforu çözebilen bakteriler olduğu bildirilmiştir (İmriz ve ark., 2014; Nosheen ve ark., 2021). Sweet Charlie çilek çeşidinde, organik gübrelerin biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının bitki büyüme parametrelerini önemli ölçüde etkilediği belirtilmiştir. Bitki büyümesindeki artışın, organik

uygulamaların topraktaki faydalı mikroorganizmaların aktivitelerini arttırmasıyla ilişkilendirilmiş olup, bu durumun büyümeyi teşvik eden maddelerin üretimini artırarak bitkinin büyüme süreci boyunca daha uzun süre besin bulunabilirliğini sağlamasından kaynaklanmış olabileceği bildirilmiştir (Soni ve ark., 2018).



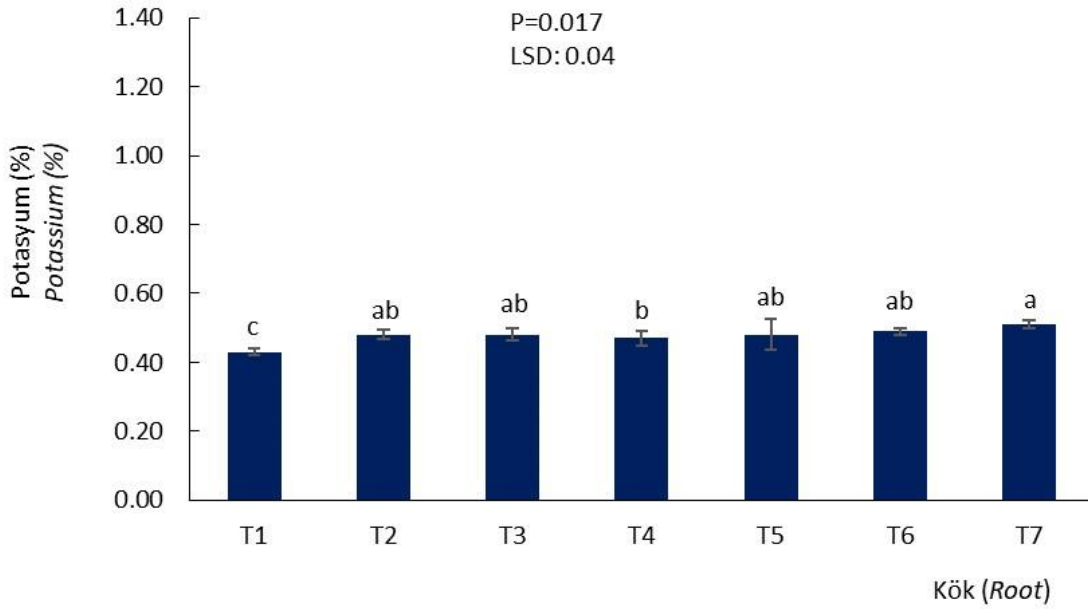
Şekil 2. Uygulamaların çileğin kök fosfor içeriğine etkisi

Figure 2. The effect of treatments on phosphorus content of strawberry root

LSD testine göre %5 düzeyinde önemli farklılık gösteren ortalamalar farklı harflerle gösterilmiştir. T<sub>1</sub>: Gübresiz (kontrol); T<sub>2</sub>: Solucan gübresi; T<sub>3</sub>: Solucan gübresi+RhizoFill; T<sub>4</sub>: Solucan gübresi+Subtima; T<sub>5</sub>: Solucan gübresi+Fontera microzone; T<sub>6</sub>: Solucan gübresi+Mikoriza (ERS); T<sub>7</sub>: Solucan gübresi+Bontera

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının kök K içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ( $p < 0.05$ ) (Şekil 3). Denemede kökte en yüksek K içeriği %0.51 ile T<sub>7</sub> uygulamasında belirlenmiştir. Solucan gübresinin tek başına ve diğer uygulamalarla

birlikte kullanımında kök K içeriği kontrolden (T<sub>1</sub>) (%0.43) daha yüksek çıkmıştır. Demirsoy ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada kök K içeriğinin %0.62 ile %1.03 arasında; Soppelsa ve ark. (2019), %0.39-0.59 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.



Şekil 3. Uygulamaların çileğin kök potasyum içeriğine etkisi

Figure 3. The effect of treatments on the potassium content of strawberry roots

LSD testine göre %5 düzeyinde önemli farklılık gösteren ortalamalar farklı harflerle gösterilmiştir. T<sub>1</sub>:

Gübrelessiz (kontrol); T<sub>2</sub>: Solucan gübresi; T<sub>3</sub>: Solucan gübresi +RhizoFill; T<sub>4</sub>: Solucan gübresi+Subtima; T<sub>5</sub>: Solucan gübresi+Fontera microzone; T<sub>6</sub>: Solucan gübresi+ Mikoriza (ERS); T<sub>7</sub>: Solucan gübresi+Bontera

Kökte Ca içeriği açısından, uygulamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmasa da en yüksek Ca içeriği %1.95 ile T<sub>7</sub> uygulamasında belirlenmiştir (Çizelge 4). Soppelsa ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada kök Ca içeriğinin % 1.60-1.97 arasında; Balcı (2023), Albion çilek çeşidinde kökte Ca içeriğinin hasat döneminde % 1.53-3.06 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Çilek bitkisinin kök Mg içeriği istatistiksel olarak

önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Kökte en yüksek Mg içeriği T<sub>7</sub> (%0.14) ve T<sub>6</sub> (%0.14) uygulamalarında, en düşük ise %0.11 ile kontrolde (T<sub>1</sub>) tespit edilmiştir (Çizelge 4). Ersoy ve Demirsoy (2006a), yaptıkları çalışmada Camarosa çilek çeşidinde kök Mg içeriği %0.15-0.23 arasında, Soppelsa ve ark. (2019), yaptıkları çalışmada kök Mg içeriğinin % 0.21-0.26 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 4. Uygulamaların çileğin kök kalsiyum, magnezyum, demir, mangan ve çinko içerikleri üzerine etkisi

Table 4. The effect of treatments on the calcium, magnesium, iron, manganese and zinc contents of strawberry roots

| Uygulamalar<br>Treatments | Ca (%) | Mg (%) | Fe (mg kg <sup>-1</sup> ) | Mn (mg kg <sup>-1</sup> ) | Zn (mg kg <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|--------|--------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| T <sub>1</sub>            | 1.77   | 0.11 b | 267.88                    | 20.00 d                   | 48.00 c                   |
| T <sub>2</sub>            | 1.82   | 0.11 b | 297.50                    | 20.75 cd                  | 53.88 bc                  |
| T <sub>3</sub>            | 1.81   | 0.12 b | 283.25                    | 21.25 cd                  | 56.50 b                   |
| T <sub>4</sub>            | 1.76   | 0.12 b | 310.63                    | 24.63 ab                  | 54.88 bc                  |
| T <sub>5</sub>            | 1.82   | 0.11 b | 292.38                    | 22.50 bcd                 | 57.50 ab                  |
| T <sub>6</sub>            | 1.84   | 0.14 a | 301.25                    | 22.88 abc                 | 51.50 bc                  |
| T <sub>7</sub>            | 1.95   | 0.14 a | 309.13                    | 25.38 a                   | 64.88 a                   |
| Ortalama<br>Mean          | 1.82   | 0.12   | 294.57                    | 22.48                     | 55.31                     |
| LSD <sub>0.05</sub>       | Ö.D    | 0.02   | Ö.D                       | 2.60                      | 7.79                      |
| P                         | 0.171  | 0.004  | 0.072                     | 0.006                     | 0.014                     |

LSD testine göre %5 düzeyinde önemli farklılık gösteren ortalamalar farklı harflerle gösterilmiştir. Ö.D: Önemli değil. T<sub>1</sub>: Gübrelessiz (kontrol); T<sub>2</sub>: Solucan gübresi; T<sub>3</sub>: Solucan gübresi +RhizoFill; T<sub>4</sub>: Solucan gübresi+Subtima; T<sub>5</sub>: Solucan gübresi+Fontera microzone; T<sub>6</sub>: olucan gübresi+ Mikoriza (ERS); T<sub>7</sub>: Solucan gübresi+Bontera

*Kök mikro besin element içerikleri (mg kg<sup>-1</sup>)*

Kök Fe içeriği istatistiksel olarak önemli çıkmasa da uygulamalar arasında en yüksek Fe içeriği 309.13 mg kg<sup>-1</sup> ile T<sub>7</sub> uygulamasında, en düşük Fe içeriği ise 267.88 mg kg<sup>-1</sup> ile kontrolde (T<sub>1</sub>) belirlenmiştir (Çizelge 4). Demirsoy ve ark. (2012), tarafından Eylül ve Nisan ayı arasında yapılan çalışmada yetiştirme uygulaması olarak, klasik parsellerdeki bitkilere amonyum sülfat (bitki başına 3g) uygulanmış, organik parsellerde ise bitki başına 40 ml organik gübre (%10 N, %15 KO<sub>2</sub>, %0,2 Mn, %0,6 Fe, %0,3 Zn ve %0,2 MgO) ve humik asit uygulaması yapılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda, Sweet Charlie çilek çeşidinde kök Fe içeriğinin organik yetiştiricilikte 400.6-540.3 mg kg<sup>-1</sup> arasında, konvansiyonel yetiştiricilikte ise 430.6-518.1 mg kg<sup>-1</sup> arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bitkideki besin element içerikleri uygulamalara, uygulama yöntemlerine, dozlara, çilek çeşitlerine ve deneme alanının ekolojik koşullarına bağlı olarak değişebilmektedir.

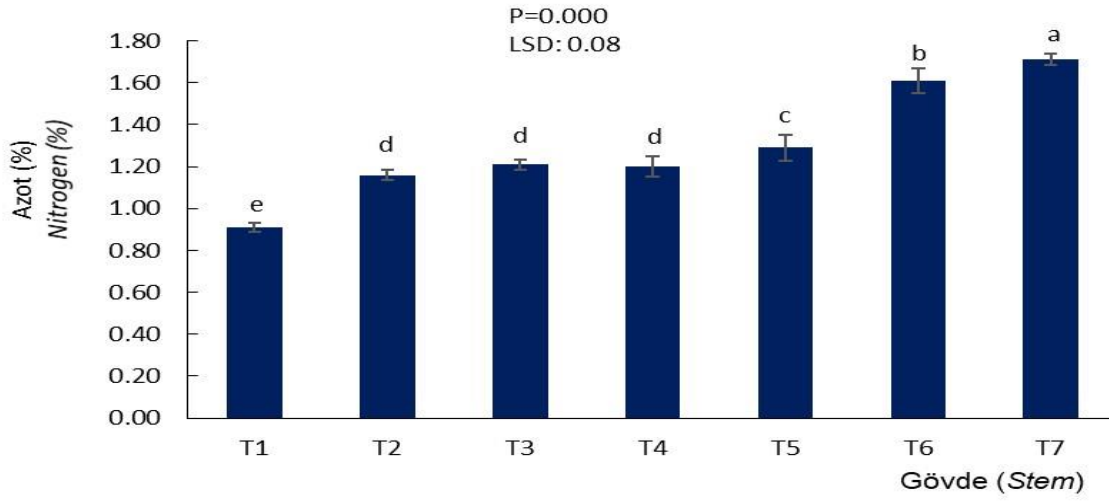
Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının kök Mn içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmıştır (p<0.05). Denemede kök Mn içeriği, uygulamalara bağlı olarak 20.00 mg kg<sup>-1</sup> (T<sub>1</sub>) ile 25.38 mg kg<sup>-1</sup> (T<sub>7</sub>) arasında değişmiştir (Çizelge 4). May ve ark. (1994), Earliglow çilek çeşidinde kök Mn içeriğinin 50-120 mg kg<sup>-1</sup> arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, kimyasal gübre kullanılarak yetiştirilen Camarosa çilek çeşidinde kök Mn içeriğinin 45.7-215.2 mg kg<sup>-1</sup> arasında olduğu bildirilmiştir (Ersoy ve Demirsoy 2006a). Demirsoy ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada Sweet Charlie çilek çeşidinin kök Mn içeriğinin organik yetiştiricilikte 15.7-74.3 mg kg<sup>-1</sup> arasında, konvansiyonel yetiştiricilikte ise 14.4-48.6 mg kg<sup>-1</sup> arasında; Camarosa çilek çeşidinde ise organik yetiştiricilikte 15.6-93.4 mg kg<sup>-1</sup> arasında,

konvansiyonel yetiştiricilikte 48.6-94.8 mg kg<sup>-1</sup> arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada kök Mn içeriğinin araştırmacıların buldukları değerden düşük çıkmasının nedeni kullanılan gübrelerin farklılığından kaynaklanmış olabilir.

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının kök Zn içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). En yüksek kök Zn içeriği 64.88 mg kg<sup>-1</sup> ile T<sub>7</sub> uygulamasında, en düşük ise 48.00 mg kg<sup>-1</sup> ile kontrolde (T<sub>1</sub>) saptanmıştır (Çizelge 4). Balcı (2023), Albion çilek çeşidinde kökte Zn içeriğinin hasat döneminde 50.70-72.45 mg kg<sup>-1</sup> arasında değiştiğini bildirmiştir.

*Gövde makro besin element içerikleri (%)*

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının gövde N içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05) (Şekil 4). Çilek bitkisi gövde N içeriği uygulamalarda (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub> ve T<sub>7</sub>) kontrole göre daha yüksek çıkmıştır. Gövdede en yüksek N içeriği T<sub>7</sub> (%1.71) uygulamasında, en düşük N içeriği ise % 0.91 ile kontrolde (T<sub>1</sub>) tespit edilmiştir (Şekil 4). Taylor ve Harrier (2001), Elvira çilek çeşidinde mikoriza uygulamalarında gövde N içeriğinin % 0.96-1.33 arasında değiştiğini; Ersoy ve Demirsoy (2006b), Camarosa çilek çeşidinde gövde N içeriğinin %0.82 ile %1.98 arasında değiştiğini; Demirsoy ve ark. (2012), Camarosa ve Sweet Charlie çilek çeşidinin organik ve konvansiyonel yetiştiriciliği ve iki farklı malçın etkisini araştırdıkları çalışmada, gövde N içeriğinin %0.82-1.14 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Ersoy ve Demirsoy (2006b), N içeriğinin bitkinin tüm kısımlarında (yaprak, gövde ve kök) meyve tutum döneminden hasat sonuna kadar azaldığını bildirmişlerdir.



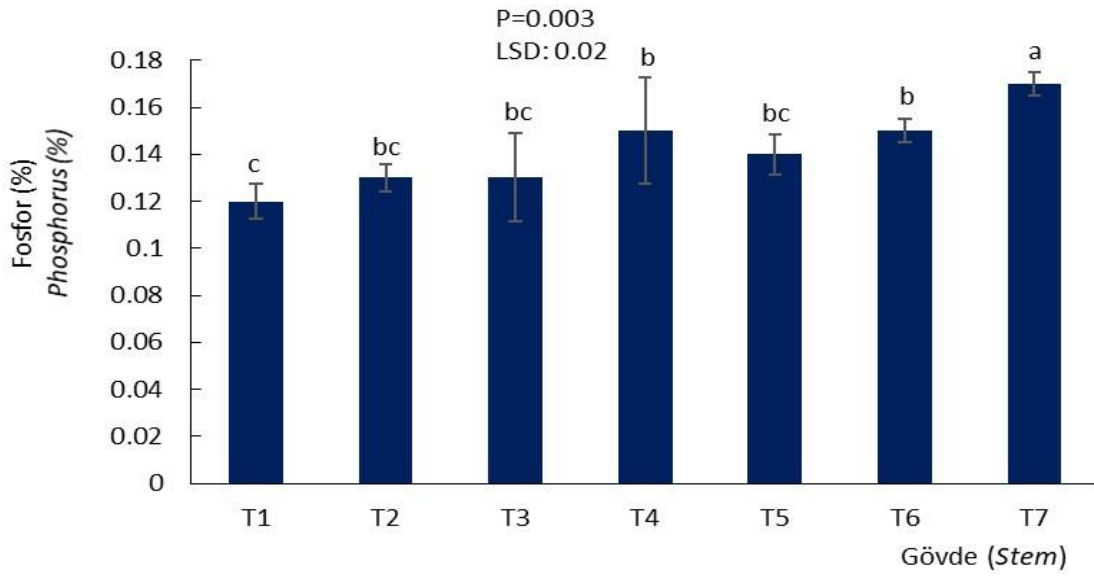
Şekil 4. Uygulamaların çileğin gövde azot içeriğine etkisi

Figure 4. The effect of treatments on the nitrogen content of strawberry stem

LSD testine göre %5 düzeyinde önemli farklılık gösteren ortalamalar farklı harflerle gösterilmiştir. T<sub>1</sub>: Gübresiz (kontrol); T<sub>2</sub>: Solucan gübresi; T<sub>3</sub>: Solucan gübresi+RhizoFill; T<sub>4</sub>: Solucan gübresi+Subtima; T<sub>5</sub>: Solucan gübresi+Fontera microzone; T<sub>6</sub>: Solucan gübresi+Mikoriza (ERS); T<sub>7</sub>: Solucan gübresi+Bontera

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının gövde P içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ( $p < 0.05$ ). Uygulamalar arasında en yüksek gövde P içeriği %0.17 ile T<sub>7</sub> uygulamasında, en düşük P içeriği ise %0.12 ile kontrolde (T<sub>1</sub>) belirlenmiştir (Şekil 5). Taylor ve Harrier (2001), Elvira çilek çeşidinde gövde P içeriğinin %0.08-0.16 arasında değiştiğini ve en düşük P içeriğinin kontrolde olduğunu (%0.08), Demirsoy ve ark. (2010), Sweet Charlie çilek çeşidinde gövde P içeriğinin %0.21-0.48 arasında, Demirsoy ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada gövde P içeriğinin %0.25-0.34 arasında

değiştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, Balcı (2023), kireç stresi koşullarında yetiştirilen Albion çilek çeşidinde mikoriza uygulamasının etkilerini araştırdığı çalışmada, gövde P içeriğinin hasat döneminde %0.08-0.14 arasında değiştiğini bildirmiştir. Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarında gövde P içeriği, kontrolden daha yüksek çıkmıştır. Biyo-gübrelerin atmosferdeki azotu bağladığı, bitkilerin alımı için çözünmeyen fosforu çözünür fosfora dönüştürdüğü, toprak verimliliğini ve biyolojik aktiviteleri artırdığı bildirilmiştir (Kumar ve ark., 2020).



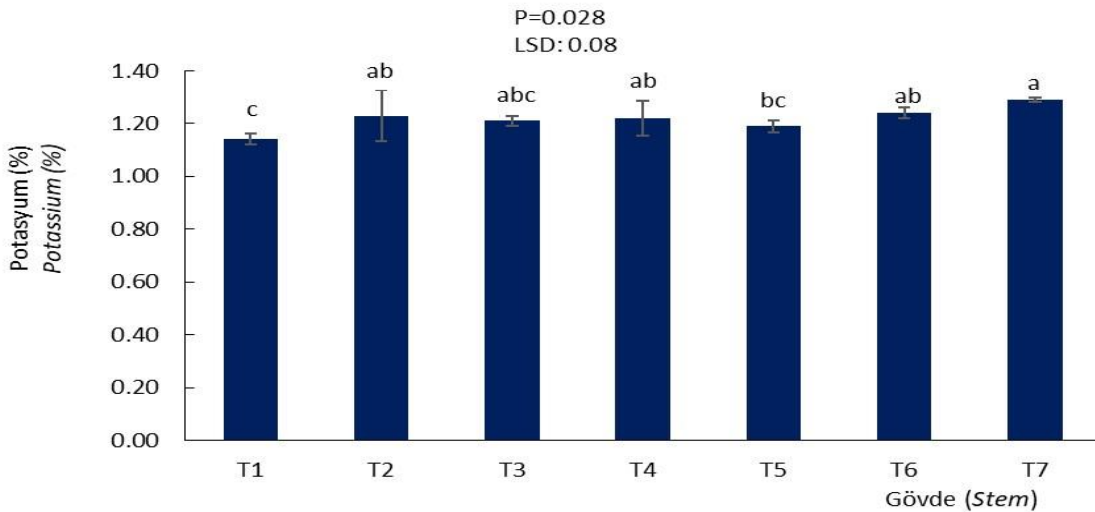
Şekil 5. Uygulamaların çileğin gövde fosfor içeriğine etkisi

Figure 5. The effect of treatments on phosphorus content of strawberry stem

LSD testine göre %5 düzeyinde önemli farklılık gösteren ortalamalar farklı harflerle gösterilmiştir. T<sub>1</sub>: Gübresiz (kontrol); T<sub>2</sub>: Solucan gübresi; T<sub>3</sub>: Solucan gübresi+RhizoFill; T<sub>4</sub>: Solucan gübresi+Subtima; T<sub>5</sub>: Solucan gübresi+Fontera microzone; T<sub>6</sub>: Solucan gübresi+Mikoriza (ERS); T<sub>7</sub>: Solucan gübresi+Bontera

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının gövde K içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ). Çilek gövde K içeriği, uygulamalara bağlı

olarak %1.14 (T<sub>1</sub>) ile %1.29 (T<sub>7</sub>) arasında değişmiştir (Şekil 6). Demirsoy ve ark. (2010), Sweet Charlie çilek çeşidinde gövde K içeriğinin %0.64-1.35 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.



Şekil 6. Uygulamaların çileğin gövde potasyum içeriğine etkisi

Figure 6. The effect of treatments on the potassium content of strawberry stem

LSD testine göre %5 düzeyinde önemli farklılık gösteren ortalamalar farklı harflerle gösterilmiştir. T<sub>1</sub>: Gübresiz (kontrol); T<sub>2</sub>: Solucan gübresi; T<sub>3</sub>: Solucan gübresi +RhizoFill; T<sub>4</sub>: Solucan gübresi+Subtima; T<sub>5</sub>: Solucan gübresi+Fontera microzone; T<sub>6</sub>: Solucan gübresi+ Mikoriza (ERS); T<sub>7</sub>: Solucan gübresi+Bontera

Çilek bitkisinin gövde Ca içeriği uygulamalara göre değişiklik göstermiştir ancak bu değişim istatistiksel olarak önemsiz çıkmıştır ( $p > 0.05$ ) (Çizelge 5). Gövdede en yüksek Ca içeriği %2.03 ile T<sub>4</sub> uygulamasında bulunurken, en düşük %1.86 ile

T<sub>1</sub> uygulamasında tespit edilmiştir. Demirsoy ve ark. (2010), yaptıkları çalışmada gövde Ca içeriğinin %0.33 ile %1.74 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Çilek bitkisinin gövde Mg içeriği istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ( $p < 0.05$ ).

Bitkinin gövde Mg içeriği, uygulamalara bağlı olarak %0.18 (T<sub>1</sub>) ile %0.22 (T<sub>7</sub>) arasında değişmiştir (Çizelge 5). Ersoy ve Demirsoy (2006a),

yaptıkları çalışmada Camarosa çilek çeşidinde gövde Mg içeriklerinin %0.09 ve %0.19 arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Çizelge 5. Uygulamaların çileğin gövde kalsiyum, magnezyum, demir, mangan ve çinko içerikleri üzerine etkisi  
Table 5. The effect of treatments on the calcium, magnesium, iron, manganese and zinc contents of strawberry stem

| Uygulamalar<br>Treatments | Ca (%) | Mg (%)  | Fe (mg kg <sup>-1</sup> ) | Mn (mg kg <sup>-1</sup> ) | Zn (mg kg <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|--------|---------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| T <sub>1</sub>            | 1.86   | 0.18 c  | 128.54 d                  | 9.13 c                    | 54.38 d                   |
| T <sub>2</sub>            | 1.97   | 0.20 ab | 139.25 bc                 | 11.75 b                   | 67.25 bc                  |
| T <sub>3</sub>            | 1.91   | 0.19 bc | 141.88 bc                 | 14.88 a                   | 77.95 a                   |
| T <sub>4</sub>            | 2.03   | 0.20 ab | 141.13 bc                 | 12.17 b                   | 59.38 cd                  |
| T <sub>5</sub>            | 1.98   | 0.20 ab | 136.63 c                  | 12.24 b                   | 65.38 bc                  |
| T <sub>6</sub>            | 1.89   | 0.19 bc | 145.38 b                  | 13.75 ab                  | 70.75 ab                  |
| T <sub>7</sub>            | 2.00   | 0.22 a  | 159.13 a                  | 15.75 a                   | 78.85 a                   |
| Ortalama<br>Mean          | 1.95   | 0.20    | 141.71                    | 12.81                     | 67.71                     |
| LSD <sub>0.05</sub>       | Ö.D    | 0.02    | 7.71                      | 2.17                      | 10.48                     |
| P                         | 0.068  | 0.034   | 0.000                     | 0.001                     | 0.002                     |

LSD testine göre %5 düzeyinde önemli farklılık gösteren ortalamalar farklı harflerle gösterilmiştir. Ö.D: Önemli değil. T<sub>1</sub>: Gübresiz (kontrol); T<sub>2</sub>: Solucan gübresi; T<sub>3</sub>: Solucan gübresi +RhizoFill; T<sub>4</sub>: Solucan gübresi+Subtima; T<sub>5</sub>: Solucan gübresi+Fontera microzone; T<sub>6</sub>: olucan gübresi+ Mikoriza (ERS); T<sub>7</sub>: Solucan gübresi+Bontera

#### Gövde mikro besin element içerikleri (mg kg<sup>-1</sup>)

Çizelge 5'te görüldüğü gibi gövde Fe içeriği istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). Bitkinin gövde Fe içeriği uygulamalarda (T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub> ve T<sub>7</sub>) kontrole (T<sub>1</sub>) göre daha yüksek çıkmıştır. En yüksek gövde Fe içeriği 159.13 mg kg<sup>-1</sup> ile T<sub>7</sub> uygulamasında tespit edilmiştir. Taylor ve Harrier (2001) ve Ersoy ve Demirsoy (2006a), yaptıkları araştırmalarında kök Fe içeriğini, gövde Fe içeriğinden daha yüksek bulmuşlardır. Bu çalışmada da kökteki Fe içeriği gövdeden daha yüksek çıkmıştır. Albrechts ve Howard (1980), Fe'in en fazla gövde ve köklerde biriktiğini, bu durumun Kessel (2003) ve Ersoy ve Demirsoy (2006a), Fe'in immobil ve hareketinin yavaş olmasından kaynaklanmış olabileceğini bildirmişlerdir.

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının gövde Mn içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli çıkmıştır (p<0.05). En yüksek Mn içeriği T<sub>7</sub> (15.75 mg kg<sup>-1</sup>) ve T<sub>3</sub> (14.88 mg kg<sup>-1</sup>) uygulamalarında en düşük ise 9.13 mg kg<sup>-1</sup> ile kontrolde (T<sub>1</sub>) olduğu belirlenmiştir (Çizelge 5). Demirsoy ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada Sweet Charlie çilek çeşidinde gövde Mn içeriğinin organik yetiştiricilikte 60.3-79.7 mg kg<sup>-1</sup> arasında, konvansiyonel yetiştiricilikte ise 80.6-89.5 mg kg<sup>-1</sup> arasında;

Camarosa çilek çeşidinde organik yetiştiricilikte 36.5-41.5 mg kg<sup>-1</sup> arasında, konvansiyonel yetiştiricilikte ise 48.4-53.3 mg kg<sup>-1</sup> arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada araştırmacıların buldukları değerden düşük çıkmasının nedeni kullanılan gübre, dozları ve uygulama şeklindeki farklılıklardan kaynaklanmış olabilir.

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarının gövde Zn içeriği üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (p<0.05). En yüksek gövde Zn içeriği T<sub>7</sub> (78.85 mg kg<sup>-1</sup>) ve T<sub>3</sub> (77.95 mg kg<sup>-1</sup>) uygulamalarında en düşük ise kontrolde (T<sub>1</sub>:54.38 mg kg<sup>-1</sup>) belirlenmiştir (Çizelge 5). Balcı (2023), yaptığı çalışmada Albion çilek çeşidinde gövde Zn içeriğinin hasat döneminde 12.5-67.3 mg kg<sup>-1</sup> arasında değiştiğini bildirmişlerdir.

Solucan gübresinin tek başına ve biyo-gübrelerle birlikte uygulamalarının kök ve gövde besin elementleri arasındaki ilişkilere ait korelasyon katsayıları(r) ve önem seviyeleri Çizelge 6'da verilmiştir. Çilek bitkisinin kök N içeriği ile gövde N (r=0.818\*), kök P (r=0.819\*), gövde P (r=0.803\*), kök K (r=0.861\*), gövde K (0.898\*\*), kök Mg (r=0.811\*), gövde Fe (r=0.946\*\*), gövde Mn (r=0.954\*\*), kök Zn

( $r=0.759^*$ ) ve gövde Zn ( $r=0.839^*$ ) içeriği arasında önemli ve pozitif ilişkiler tespit edilmiştir. Çilek bitkisinin gövde N içeriği ile kök P ( $r=0.927^{**}$ ), gövde P ( $r=0.886^{**}$ ), kök K ( $r=0.894^{**}$ ), gövde K ( $r=0.866^*$ ), kök Ca ( $r=0.834^*$ ), kök Mg ( $0.892^{**}$ ), gövde Fe ( $r=0.899^{**}$ ) ve gövde Mn ( $r=0.814^*$ ) içeriği arasında önemli ve pozitif ilişkiler olduğu belirlenmiştir.

Çilek bitkisinin kök P içeriği ile gövde P ( $r=0.915^{**}$ ), kök K ( $r=0.795^*$ ), gövde K ( $r=0.866^*$ ), kök Mg ( $r=0.921^{**}$ ), kök Fe ( $r=0.829^*$ ), gövde Fe ( $r=0.863^*$ ) ve kök Mn ( $r=0.827^*$ ) içeriği arasında önemli ve pozitif ilişkiler olduğu görülmüştür. Çilek bitkisinin gövde P içeriği ile kök K ( $r=0.789^*$ ), gövde K ( $r=0.848^*$ ), kök Mg ( $0.803^*$ ), gövde Mg ( $r=0.816^*$ ), kök Fe ( $r=0.844^*$ ), gövde Fe ( $r=0.895^{**}$ ) ve kök Mn ( $r=0.956^{**}$ ) içeriği arasında önemli ve pozitif ilişkiler saptanmıştır (Çizelge 6).

Çilek bitkisinin kök K içeriği ile gövde K ( $r=0.929^{**}$ ), kök Ca ( $r=0.801^*$ ), gövde Mg ( $r=0.789^*$ ), kök Fe ( $r=0.762^*$ ), gövde Fe ( $r=0.899^{**}$ ), gövde Mn ( $r=0.895^{**}$ ), kök Zn ( $r=0.802^*$ ) ve gövde Zn ( $r=0.845^*$ ) içeriği arasında önemli ve pozitif ilişkiler tespit edilmiştir. Çilek bitkisinin gövde K içeriği ile kök Ca ( $r=0.793^*$ ), kök Mg ( $r=0.760^*$ ), gövde Mg ( $r=0.820^*$ ), kök Fe ( $r=0.837^*$ ), gövde Fe ( $r=0.958^{**}$ ) ve gövde Mn ( $r=0.827^*$ ) içeriği arasında önemli ve pozitif ilişkiler saptanmıştır. Bitki köklerinin besin elementlerini almasında toprakta besin elementlerinin miktarı önemli olduğu kadar dengeli olması da önemlidir (Korkmaz, 2005). Elementler dengeli olduğu sürece birbirleriyle sinerjik etkide bulunabilmektedir. Kacar ve Katkat (1998), bitkilerin K alımı üzerine  $Ca^{+2}$  ve  $Mg^{+2}$  ile  $K^+$  arasındaki karşılıklı ilişkilerin etkili olacağını bildirmiştir. Azot ile yeterli beslenen bitkilerin fosfor alımını artıracığı, fosfor ile yeterli beslenen bitkilerin diğer besin elementlerinin alınımını olumlu yönde etkileyeceği bildirilmiştir (Korkmaz ve Saltalı, 2012). Bozkurt ve ark. (2000) aynı koşullarda yetiştirilen elma çeşitlerinin beslenme durumu ile ilgili yapılan çalışmada, yaprak Zn içeriği ile N ve Mn içerikleri arasında, Ca içeriği ile Mg içeriği arasında önemli ve pozitif ilişkiler

bulunduğu bildirilmiştir. Sarıdaş ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada, yaprak N içeriği diğer makro besin elementlerinden olumlu etkilendiği, Ca içeriği ile Mg ve K içeriği arasında, Fe içeriği ile Mn içeriği arasında pozitif korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Farklı oranlarda solucan gübresi uygulanarak yetiştirilen marulda, besin elementleri arasında yapılan korelasyon analizinde Fe içeriği ile Mn içeriği arasında, K içeriği ile Ca, Fe, Mg, Mn ve N içeriği arasında önemli ve pozitif ilişkiler bulunduğu bildirilmiştir (Kibar, 2018). Bu çalışmada da bitkinin gelişimi için çok önemli olan besin elementleri arasında önemli ve pozitif ilişkiler tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bitki köklerinin topraktaki besin elementlerini sağlıklı bir şekilde aldığı ve etkin bir şekilde kullanarak üst aksamına taşıdığını göstermektedir. Bitki köklerinin dengeli besin elementleri almasından dolayı olumsuz bir etkileşim olmadığı görülmektedir.



Çizelge 6. Çilek bitkisinin kök ve gövde besin elementleri arasındaki korelasyon katsayıları  
Table 6. Correlation coefficients between root and stem nutritional elements of strawberry plant

|    | N     | Kök     | Gövde   | N       | Kök     | Gövde   | P       | Kök    | Gövde  | K      | Kök     | Gövde  | Ca      | Kök   | Gövde   | Mg    | Kök   | Gövde | Fe | Kök | Gövde | Mn | Kök | Gövde | Zn | Kök | Gövde |      |
|----|-------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|-------|---------|-------|-------|-------|----|-----|-------|----|-----|-------|----|-----|-------|------|
|    |       |         |         |         |         |         |         |        |        |        |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       | Root |
| N  | Kök   | 1.000   |         |         |         |         |         |        |        |        |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| N  | Gövde | 0.818*  | 1.000   |         |         |         |         |        |        |        |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| P  | Kök   | 0.819*  | 0.927** | 1.000   |         |         |         |        |        |        |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| P  | Gövde | 0.803*  | 0.886** | 0.915** | 1.000   |         |         |        |        |        |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| K  | Kök   | 0.861*  | 0.894** | 0.795*  | 1.000   |         |         |        |        |        |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| K  | Gövde | 0.898** | 0.866*  | 0.866*  | 0.929** | 1.000   |         |        |        |        |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Ca | Kök   | 0.706   | 0.834*  | 0.643   | 0.726   | 0.801*  | 1.000   |        |        |        |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Ca | Gövde | 0.404   | 0.286   | 0.366   | 0.590   | 0.501   | 0.530   | 1.000  |        |        |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Mg | Kök   | 0.811*  | 0.892** | 0.921** | 0.803*  | 0.677   | 0.760*  | 0.686  | 0.042  | 1.000  |         |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Mg | Gövde | 0.679   | 0.666   | 0.603   | 0.816*  | 0.789*  | 0.820*  | 0.764* | 0.801* | 0.424  | 1.000   |        |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Fe | Kök   | 0.689   | 0.701   | 0.829*  | 0.844*  | 0.762*  | 0.837*  | 0.444  | 0.787* | 0.561  | 0.767*  | 1.000  |         |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Fe | Gövde | 0.946** | 0.899** | 0.863*  | 0.895** | 0.899** | 0.958** | 0.867* | 0.451  | 0.835* | 0.817*  | 0.736  | 1.000   |       |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Mn | Kök   | 0.739   | 0.735   | 0.827*  | 0.956** | 0.666   | 0.733   | 0.525  | 0.710  | 0.670  | 0.773*  | 0.855* | 0.782*  | 1.000 |         |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Mn | Gövde | 0.954** | 0.814*  | 0.719   | 0.697   | 0.895** | 0.827*  | 0.729  | 0.301  | 0.734  | 0.616   | 0.559  | 0.885** | 0.603 | 1.000   |       |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Zn | Kök   | 0.759*  | 0.654   | 0.512   | 0.739   | 0.802*  | 0.743   | 0.781* | 0.665  | 0.423  | 0.914** | 0.583  | 0.816*  | 0.703 | 0.777*  | 1.000 |       |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |
| Zn | Gövde | 0.839*  | 0.717   | 0.542   | 0.495   | 0.845*  | 0.748   | 0.760* | 0.123  | 0.609  | 0.524   | 0.357  | 0.790*  | 0.340 | 0.944** | 0.710 | 1.000 |       |    |     |       |    |     |       |    |     |       |      |

\* ve \*\*: P≤0.05 ve P≤0.01 olasılık düzeyinde önemlidir.

## Sonuçlar

Sağlıklı yaşam ve çevre bilincinin giderek önem kazandığı günümüzde solucan gübresi, biogübre gibi çevre dostu organik gübrelerin kullanımının yaygınlaştırılması oldukça önemlidir. Organik gübreler toprağın fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini iyileştirerek toprak verimliliğini artırmaktadır. Organik gübrelerin topraktaki bu olumlu etkileri, bitkide yüksek verim ve kaliteli meyve üretimi olarak kendini göstermektedir. Ancak organik gübrelerin bitkiye ve toprağa beklenen faydayı sağlaması için, bitkinin ihtiyacı olan besin elementlerinin belirlenmesi ve uygun yöntemlerle verilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, solucan gübresinin biyo-gübreler ile birlikte uygulamalarında (T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>, T<sub>5</sub>, T<sub>6</sub> ve T<sub>7</sub>) kök ve gövde besin element içeriği artmıştır. Faydalı bakteri ve mikoriza içeren gübrelerin kullanımı, solucan gübresinin etkinliğini artırarak bitkinin topraktan daha fazla besin elementi alımını sağlamıştır. Mevcut uygulamalar bitkinin daha iyi beslenmesini sağlamanın yanı sıra toprağın organik maddesine, mikrobiyolojik yapısına pozitif katkılarından dolayı sürdürülebilir toprak verimliliğini de olumlu yönde etkilediği düşünülmektedir. Bu sonuçlar, günümüzde küresel pazarda önemli bir yer edinen organik ürünlerin, ülkemizde yetiştiriciliğinin artırılması açısından umut vericidir.

**Çıkar Çatışması:** Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

**Yazar Katkısı:** Makaleye ait tüm çalışmalar Neslihan KILIÇ tarafından yapılmıştır.

## Kaynaklar

- Albregts, E. E., & Howard, C. M. (1980). Accumulation of nutrients by strawberry plants and fruit grown in annual hill culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 105(3), 386-388.
- Anonim (2023). [https://www.ekosol.net/urunler\\_menu](https://www.ekosol.net/urunler_menu) (Erişim Tarihi:17.11.2023).
- Balci, G. (2023). The effect of the application of mycorrhiza on vegetative growth, mineral element intake, and

some biochemical characteristics of strawberry seedlings under lime stress. *Horticultural Studies*, 40(2), 62-71. DOI:

<http://doi.org/10.16882/HortiS.1330523>

- Basu, S., Rabara, R., & Negi, S. (2017). Towards a better greener future - an alternative strategy using biofertilizers. I: Plant growth promoting bacteria. *Plant Gene*, 12, 43-49. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plgene.2017.07.004>
- Beer, K., & Singh, A. K. (2015). Effect of vermicompost and biofertilizers on strawberry: Chlorophyll and nutrients concentration in leaves. *Annals of Plant and Soil Research*, 17(2), 211-214.
- Bolat, İ., & Kara, Ö. (2017). Bitki besin elementleri: Kaynakları, işlevleri, eksik ve fazlalıkları. *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 19(1), 218-228. DOI: 10.24011/barofd.251313
- Bozkurt, M. A., Çimrin, K. M., & Karaca, S. (2000). Aynı koşullarda yetiştirilen üç farklı elma çeşidinde beslenme durumlarının değerlendirilmesi. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 6(4): 101-105. DOI: 10.1501/Tarimbil\_0000001003
- Demirsoy, L., Demirsoy, H., Ersoy, B., Balci, G., & Kizilkaya, R. (2010). Seasonal variation of N, P, K and Ca content of leaf, crown and root of 'Sweet Charlie' strawberry under different irradiation. *Zemdirbyste-Agriculture*, 97 (1), 23-32.
- Demirsoy, L., Demirsoy, H., & Balci, G. (2012). Different growing conditions affect nutrient content, fruit yield and growth in strawberry *Pak. J. Bot*, 44 (1), 125-129.
- Emmanuel, C. O., & Babalola, O. O. (2020). Productivity and quality of horticultural crops through co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and plant promoting bacteria. *Microbiological Research*, 239, 126569. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126569>.
- Ersoy, B., & Demirsoy, H. (2006a). Değişik gölgeleme uygulamalarının Camarosa çilek çeşidinde bazı elementlerin mevsimsel değişimine etkileri üzerine bir araştırma. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 21(1), 82-88.
- Ersoy, B., & Demirsoy, H. (2006b). Effect of shading on seasonal variation of some macro-nutrients in Camarosa strawberry," *Asian Journal of Chemistry*, 18(3), 2329-2340.
- FAO, (2024). Food and Agriculture Organization of United Nations Web Sites. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (Erişim Tarihi: 23.01.2024).
- Giampieri, F., Forbes-Hernandez, T. Y., Gasparini, M., Alvarez-Suarez, J. M., Afrin, S., Bompadre, S.,... & Battino, M. (2015). Strawberry as a health promoter: an evidence based review. *Food & Function*, 6(5), 1386-1398. DOI: 10.1039/c5fo00147a
- İmriz, G., Özdemir, F., Topal, İ., Ercan, B., Taş, M. N., Yakışır,

- E., & Okur, O. (2014). Bitkisel üretimde bitki gelişimini teşvik eden rizobakteri (PGPR)'ler ve etki mekanizmaları. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, 12(2), 1-19.
- Jones, J. B. (2001). *Laboratory guide for conducting soil tests and plant analysis*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 384p.
- Joshi, R., Singh, J., & Vig, A. P. (2015). Vermicompost as an effective organic fertilizer and biocontrol agent: effect on growth, yield and quality of plants. *Rev Environ Sci Biotechnol*, 14:137–159. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11157-014-9347-1>
- Kacar, B., & Katkat, A.V. (1998). *Bitki Besleme*. Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, Yayın No: 127, Vipaş Yayınları: 3, Bursa.
- Kibar, B. (2018). Marulda bitkisel özellikler, bazı kalite özellikleri ve besin elementleri arasındaki ilişkilerin belirlenmesi. *Uluslararası Tarım ve Yaban Hayatı Bilimleri Dergisi*, 4(2), 149-160. DOI:10.24180/ijaws.486571
- Kessel, C. (2003). Strawberry diagnostic workshops: nutrition. Strawberry diagnostic workshops. Ministry of agriculture and food, Ontario.
- Korkmaz, K. (2005). Kireçli toprakların fosfor durumlarının belirlenmesi ve fosfor uygulamasının mısır verimine etkisi. *Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 126s, Adana.
- Korkmaz, A., & Saltalı, K. (2012). *Bitki Besleme*, edit by M.Rüstü Karaman, gübretaş rehber kitaplar dizisi, Pelin ofset matbaacılık. ISBN 978-605-87103-2-0, Bl:2 Sayfa: 109-110.
- Kumar, P., Sharma, N., & Gupta, R. (2020). Rhizosphere stoichiometry, fruit yield, quality attributes and growth response to PGPR transplant amendments in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) growing on solarized soils. *Scientia Horticulture*, 265,109215. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109215>
- Kumar, S., Kumar, S., & Mohapatra, T. (2021). Interaction between macro-and micro-nutrients in plants. *Frontiers in Plant Science*, 12, 665583. DOI: 10.3389/fpls.2021.665583
- Lu, H., Wu, Z., Wang, W., Xu, X., & Liu, X. (2020). Rs-198 liquid biofertilizers affect microbial community diversity and enzyme activities and promote *Vitis vinifera* L. growth. *BioMed Research International*. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/8321462>.
- May, G.M., & Pritts, M.P. (1990). Strawberry nutrition. *Adv. Strawberry Prod.*, 9:10-23.
- May, G. M., Pritts, M. P., & Kelly, M. J. (1994). Seasonal patterns of growth and tissue nutrient content in strawberries. *Journal of plant nutrition*, 17(7), 1149-1162. DOI: <https://doi.org/10.1080/01904169409364795>
- Morais, C.M., Mucha, A., Ferreira, H., Gonçalves, B., Bacelar, E., & Marques, G. (2019). Comparative study of plant growth-promoting bacteria on the physiology, growth and fruit quality of strawberry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99: 5341–5349. DOI: <https://doi.org/10.1002/jsfa.9773>
- Nadeem, S. M., Ahmad, M., Zahir, Z. A., Javaid, A., & Ashraf, M. (2014). The role of mycorrhizae and plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in improving crop productivity under stressful environments. *Biotechnology Advances*, 32(2), 429-448. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.005>
- Nosheen, S., Ajmal, I., & Song, Y. (2021). Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production. *Sustainability*, 13(4), 1868. DOI: <https://doi.org/10.3390/su13041868>
- Olle, M. (2019). Review: vermicomposting, its importance and benefit in agriculture. *Agraarteadus | Journal of Agricultural Science*, 30(2):93–98. DOI: <https://doi.org/10.15159/jas.19.19>.
- Ramnarain, Y. I., Ansari, A. A., & Ori, L. (2019). Vermicomposting of different organic materials using the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 8, 23-36. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40093-018-0225-7>
- Sarıdaş, M. A., Paydaş Kargı, S., Nogay, G., & Attar, Ş. H. (2018). Interrelation of plant nutrients of strawberry leaf samples under Mediterranean climate condition. *Acta Hort.* 1217, 159–162. DOI: 10.17660/ActaHortic.2018.1217.20
- Shaw, D.V., & Larson, K.D. (2009). Strawberry plant named 'Monterey'. Google Patents. <http://www.google.com/patents/USPP19767> (Erişim tarihi: 9 Kasım 2023)
- Skrovankova, S., Sumczynski, D., Mlcek, J., Jurikova, T., & Sochor, J. (2015). Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. *International journal of Molecular Sciences*, 16(10), 24673-24706. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms161024673>
- Soppelsa, S., Kelderer, M., Casera, C., Bassi, M., Robatscher, P., Matteazzi, A., & Andreotti, C. (2019). Foliar applications of biostimulants promote growth, yield and fruit quality of strawberry plants grown under nutrient limitation. *Agronomy*, 9(9), 483. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9090483>
- Soni, S., Kanawjia, A., Chaurasiya, R., Chauhan, P.S., Kumar, R., & Dubey, S. (2018). Effect of organic manure and biofertilizers on growth, yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) cv. Sweet Charlie. *Journal of Pharmacogony and Phytochemistry*, 2:128-132.
- Srivastav, A., Singh, B. K., Pandey, R., Singh, K., & Singh, V. (2018). Effect of organic manures and bio-fertilizers on vegetative growth and yield of strawberry cv.

- Chandler. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(5), 2841-2844.
- Taylor, J., & Harrier, L. A. (2001). A comparison of development and mineral nutrition of micropropagated *Fragaria* × *ananassa* cv. Elvira (strawberry) when colonised by nine species of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied Soil Ecology*, 18(3), 205-215. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0929-1393\(01\)00164-0](https://doi.org/10.1016/S0929-1393(01)00164-0)
- Trejo-Téllez, L. I., & Gómez-Merino, F. C. (2014). Nutrient management in strawberry: Effects on yield, quality and plant health. *Strawberries: Cultivation, antioxidant properties and health benefits*, Malone, N., Ed.; Nova Science Publishers: New York, NY, USA, pp. 239–267.
- Türemiş, N., & Ağaoğlu, Y. S. (2013). *Üzümsü Meyveler*, II. Bölüm. Ağaoğlu, S., Gerçekcioğlu, R. (eds.) Tomurcuk Bağ Ltd. Şti. Eğitim yayınları 1: 55-100.
- Vejan, P., Abdullah, R., Khadiran, T., Ismail, S., & Nasrulhaq Boyce, A. (2016). Role of plant growth promoting rhizobacteria in agricultural sustainability—a review. *Molecules*, 21(5), 573. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21050573>
- Zhao, Z., Wu, X., Chen, H., Liu, Y., Xiao, Y., Chen, H., ... & Yao, H. (2021). Evaluation of a strawberry fermented beverage with potential health benefits. *PeerJ*, 9, e11974. DOI: 10.7717/peerj.11974

# HARRAN TARIM ve GIDA BİLİMLERİ DERGİSİ

## YAZIM KURALLARI

1. Makale, **Microsoft Word programında, Calibri** yazı karakterinde, **1.15 satır aralığında, 12 punto** düz metin ve tek sütun olarak yazılmalıdır.
2. Kenar boşlukları; **sol, sağ, alt ve üst- 3 cm** bırakılarak, her satıra ardışık olarak **satır numarası** verilerek hazırlanmalıdır.
3. Yazar(lar) makalenin ne türde bir yazı (**Araştırma makalesi, derleme, teknik not vb.**) olduğunu belirtmelidir.
4. **Türkçe başlık 14 punto (koyu ve ortalı)** küçük harflerle (Başlığın sadece ilk kelimesinin baş harfi büyük) ve düz yazılmalıdır. **İngilizce başlık 12 punto** ve ortalı yazılmalıdır.
5. Yazar isimleri **Adı SOYADI** kuralına göre Türkçe başlık sonrası **12 punto (koyu, ortalı ve düz)** ve bir boşluk bırakılarak yazılmalı, yazar isimlerinin sonuna adres için üst simge olarak rakam, sorumlu yazarı belirtmek için ise \* simgesi verilmelidir. **Adres satırı** yazar isimleri sonrasında 1 boşluk bırakılarak **10 punto (normal, düz ve ortalı)** yazılmalıdır.
6. Adres satırından sonra 1 boşluk bırakılarak yazarların ORCID numaraları yazılmalıdır. ORCID satırının altına, sorumlu yazar e-posta adresi belirtilmelidir.
7. Metin genel olarak;
  - **Öz,**
  - **Abstract,**
  - **Giriş,**
  - **Materyal ve Metot,**
  - **Araştırma Bulguları ve Tartışma,**
  - **Sonuçlar,**
  - **Ekler**
  - **Kaynaklar** şeklinde olmalıdır.
8. Ana başlıkların yazımında koyu olarak kelimelerin sadece baş harfleri büyük yazılmalıdır. İkincil ve üçüncül başlıklarda sadece ilk kelimenin baş harfi büyük, diğer kelimeler küçük, koyu değil ve italik yazılmalıdır. Metin ana başlıkları, metin başlangıcı ve sonunda olmak üzere 1' er boşluk bırakılmalıdır. Alt başlıklardan önce 1 boşluk bırakılmalı, ancak sonrasında boşluk bırakılmamalıdır. Tüm başlıklar girinti verilmeden sola yaslı olarak yazılmalıdır.
9. **Metin içerisinde kaynak gösterimi (Yazar, yıl)** esasına göre yapılmalıdır. Metin içerisinde iki yazarlı bir kaynağın gösteriminde, metin Türkçe ise (**ilk yazar soyadı ve ikinci yazar soyadı, yıl**) kuralı uygulanmalıdır. İkiyden fazla yazarın bulunduğu kaynakların gösteriminde (**ilk yazarın soyadı ve ark., yıl**) kuralı uygulanmalıdır.  
Örneğin: (Mamay, 2020), (İkinci ve Bolat, 2018); (Söylemez ve ark., 2019),
10. Makale İngilizce olarak yazılacaksa (**ilk yazar and ikinci yazar, yıl**) ve (**ilk yazarın soyadı et al., yıl**) kuralı uygulanmalıdır.  
Örneğin: (Söylemez, 2018), (Bolat and Mamay, 2015), (Mamay et al., 2010).
11. Metin içerisinde birden fazla kaynağa aynı anda atıf yapılacak ise; kaynaklar yayınlandıkları yıl dikkate alınarak kronolojik olarak sıralanmalıdır.
12. **ÖZ (ABSTRACT):** Başlık sola yaslı olmalı, 10 punto, koyu, paragraf başında girinti verilmemelidir. Türkçe ve İngilizce metin 300 kelimeyi aşmayacak şekilde, 10 punto ve 1 satır aralığında yazılmalıdır. Öz ile Anahtar Kelimeler ve Abstract ile Key Words arasında tek

satır boşluk (10 punto, düz) bırakılarak metnin hemen altında en fazla 5 adet **Anahtar Kelimeler (Key Words)** yazılmalıdır. Key Words ile ana metin (Giriş) arasında iki satır boşluk bırakılmalıdır.

13. Makalelerde fotoğraf, grafik, çizim vb. “**Şekil**” olarak, Tablolar ise “**Çizelge**” olarak ifade edilmelidir.
14. Çizelge ve Şekiller ardışık olarak numaralandırılmalıdır (Şekil 1. veya Çizelge 1.). “Şekil” ve “Çizelge” içerikleri 1 satır aralıklı ve **10 punto** olarak hazırlanmalıdır.
15. Çizelge başlıkları çizelgenin üstünde, şekil başlıkları ise şekillerin altında ilk harf büyük olacak şekilde 1 satır aralıklı **10 punto** olarak yazılmalıdır.
16. **Türkçe yazılmış makalelerde Şekil ve Çizelge başlıklarının İngilizceleri, Türkçe başlığın hemen altında *italik* olarak yazılmalıdır.** (Makale İngilizce olarak yazılmışsa, Şekil ve Çizelge başlıklarının Türkçe karşılıkları yazılmayacaktır)

Şekil 1. Araştırma bahçesinde tespit edilen ortalama sıcaklık, ortalama nispi nem ve aylık yağış miktarı ortalaması değerleri (2007-2011 yılları ortalaması)

Figure 1. The average temperature, average relative humidity and average monthly rainfall data detected in the research garden (average of the years 2007-2011)

Çizelge 2. Şeftali çeşitlerinin 2007 - 2011 yılları arasındaki fenolojik gözlem sonuçları

Table 2. Phenological observation results of peach cultivars for between 2007 and 2011

**Türkçe yazılmış makalelerde** Çizelge ile Şekillerin içerisinde bulunan parametrelerin İngilizce karşılıkları bu parametrelerin hemen altına ***italik*** olarak yazılmalıdır. (Makale İngilizce olarak yazılmışsa, Şekil ve Çizelgelerin içerisinde belirtilen parametrelerin Türkçe karşılıkları yazılmayacaktır.)

Çizelge 3. Denemede yer alan şeftali çeşitlerinin bazı pomolojik özellikleri

Table 3. Some pomological properties of peach varieties

| Çeşitler<br>Varieties | Meyve ağırlığı(g)<br>Fruit weight (g) | Meyve eni (mm)<br>Fruit width (mm) | Meyve boyu(mm)<br>Fruit length (mm) | Çekirdek ağırlığı (g)<br>Kernel weight (g) |
|-----------------------|---------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| Cardinal              | 78.19 f                               | 50.73 d                            | 48.48 c                             | 5.06 d                                     |
| Cresthaven            | 129.58 b                              | 61.69 bc                           | 59.56 b                             | 8.31 bc                                    |

17. Makale metni ve Çizelge-Şekil içerisinde bildirilen ondalık rakamlar, **nokta** ile ayrılmalıdır. (123.87; 0.987 vb.).
18. Çizelge-Şekillerden önce ve sonra **bir satır boşluk** bırakılmalıdır.
19. Makale yazımında “**Uluslararası Birim Sistemi**” (SI)’ye uyulmalıdır. Buna göre; g/l yerine **g l<sup>-1</sup>**, mg/l yerine **mg l<sup>-1</sup>** ya da **ppm** kullanılmalıdır. Yüzde ile belirtilen ifadeler açıklayıcı olmalıdır. Örneğin; %3 yerine **%3 (w/v)**, **%3 (v/v)**, **%3 (w/w)** şeklinde belirtilmelidir.
20. **Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi Kaynaklar listesinin bildirişinde APA Formatını kullanmaktadır.** Buna göre **kaynaklar listesi** aşağıdaki kurallar çerçevesinde hazırlanmalıdır.

## 1. DERGİ YAYINLARINA ATIF VERME

### 1.1. Tek yazarlı makale

Mamay, M. (2015). Nar yaprakbiti [*Aphis punicae* Passerini (Hemiptera: Aphididae)]’nin Şanlıurfa ili nar bahçelerindeki bulaşıklık haritası. *Türkiye Entomoloji Bülteni*, 5(3), 159-166.

### **1.2. İki yazarlı makale**

Soylemez, S., & Pakyurek, A. Y. (2017). Responses of rootstocks to nutrient induced high EC levels on yield and fruit quality of grafted tomato cultivars in greenhouse conditions. *Applied ecology and environmental research*, 15(3), 759-770. DOI: [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1503\\_759770](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1503_759770)

### **1.3. İki den fazla yazarlı makale**

Mamay, M., Ünlü, L., Yanık, E., Doğramacı, M., & İkinci, A. (2016). Efficacy of mating disruption technique against carob moth, *Apomyelois ceratoniae* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae) in pomegranate orchards in Southeast Turkey (Şanlıurfa). *International Journal of Pest Management*, 62(4), 295-299.

İkinci, A., Mamay, M., Unlu, L., Bolat, I., & Ercisli, S. (2014). Determination of heat requirements and effective heat summations of some pomegranate cultivars grown in Southern Anatolia. *Erwerbs-Obstbau*, 56(4), 131-138. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10341-014-0220-8>

## **2. KİTAPLARI KAYNAK GÖSTERME**

### **2.1. Kaynak kitap ise,**

Mohsenin, N. N. (1970). *Physical Properties of Plant and Animal Materials*. New York: Gordon and Breach Science Publishers.

### **2.2. Kaynak kitaptan bir bölüm ise,**

Author, A. A. (Year). Chapter title. In E. E. Editor (Ed.), *Title of book: And subtitle* (pp. pages). Place: Publisher.

### **2.3. Editörlü kitap**

Yeşilyaprak, B. (Ed. ). (2003). *Gelişim ve öğrenme psikolojisi*. Ankara: Pegema Yayıncılık.

### **2.4. Yazarı bilinmeyen kaynakları veya internet kaynaklarını kaynak olarak gösterme;**

Anonymous (2005). Tereyağı, diğer süt yağı esaslı sürülebilir ürünler ve sadeyağ tebliği. Türk Gıda Kodeksi, Tebliğ No: 2005/19, Ankara.

FAO, (2015). Statistical data of FAO. Retrieved from: <http://faostat.fao.org/site/567/default.asp>.

## **3. YÜKSEK LİSANS ve DOKTORA TEZLERİNE ATIF VERME**

Doktora ya da yüksek lisans tezlerine elektronik veri tabanlarından, kurumsal arşivlerden ve kişisel web sayfalarından erişilebilir. Eğer bir teze ProQuest doktora ve yüksek lisans tezleri veri tabanından ya da diğer bir kaynaktan erişildiyse, atıfta bu bilgi verilmelidir. Bir veri tabanı servisinde mevcut olan bir doktora ya da yüksek lisans tezi için aşağıdaki kaynak gösterme biçimi kullanılır:

### 3.1. Yayınlanmamış tez

Mamay, M. (2013). *Determination of population development and infestation ratio of carob moth [Apomyelois ceratoniae Zell. (Lepidoptera:Pyralidae) in pomegranate orchards in Sanliurfa province and using mating disruption technique for its control* (Yayımlanmamış doktora tezi). Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

Söylemez, S. (2014). *Effects of nutrient induced salinity levels and rootstocks on plant growing, yield and some fruit quality features at soilless grown grafted tomatoes* (Yayımlanmamış doktora tezi). Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Şanlıurfa.

### 3.2. Yayınlanmış tez

May, B. (2007). *A survey of radial velocities in the zodiacal dust cloud*. Bristol, UK: Canopus Publishing.

## 4. SEMPOZYUM VE TOPLANTI BİLDİRİLERİNE ATIF VERME

Mamay, M. (2017). Population density of overwintering larvae of Carob Moth [*Apomyelois (=Ectomyelois) ceratoniae* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae)] in pomegranate orchards in Southeastern Anatolia. SEAB 2017. *Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on EuroAsian Biodiversity*, (pp. 235), 05-08 July 2017, Minsk, Belarus.

İkinci, A. & Mamay, M. (2017). Effects of fruit thinning on morphological, physico-chemical properties, bioactive compounds, antioxidant activity and pest & disease control in pomegranate fruit (*Punica granatum* L.) *International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies*, (pp. 642), 15-17 May 2017, Cappadocia, Turkey.

Sönmez, C., Mamay, M. & Söylemez, S. (2019). Determination of the effect of different hydroponic culture and different NH<sub>4</sub>:NO<sub>3</sub> ratio on the density of aphid [*Aphis* spp. (Hemiptera: Aphididae)] population in greenhouse lettuce. *1<sup>st</sup> International Gobeklitepe Agriculture Congress (IGAC-2019)*, (pp. 599-604), 25-27 November, Şanlıurfa, Turkey.

**Not: Yukarıda yer alan kaynak gösterimlerde bulamadığınız farklı materyal veya konu başlıklarındaki kaynak bildirişleri için internetteki APA Kaynak Gösterimi ile ilgili web sayfalarından ya da aşağıdaki linkteki bilgilerden yararlanabilirsiniz.**

[https://libguides.library.usyd.edu.au/ld.php?content\\_id=47913440](https://libguides.library.usyd.edu.au/ld.php?content_id=47913440)

Şencan, İ., ve Doğan, G. (2017). Bilimsel yayınlarda kaynak gösterme, tablo ve şekil oluşturma rehberi: APA 6 Kuralları. *Türk Kütüphaneciliği Dergisi*, Ankara.

[https://www.tk.org.tr/APA/apa\\_2.pdf](https://www.tk.org.tr/APA/apa_2.pdf)



**HARRAN TARIM ve GIDA BİLİMLERİ DERGİSİ**  
**YAZAR REHBERİ**

1. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi'ne gönderilen makaleler Dergi Yayın Kurulu tarafından belirlenen yazım kurallarına göre yazılmalıdır.
2. Makaleler, **Dergipark Sistemi üzerinden online** olarak yüklenmelidir.
3. Tüm yazarlar tarafından imzalanan **Telif Hakkı Devir Sözleşmesi** ve **Makale Kontrol Listesi** (sorumlu yazar tarafından imzalanacak) makale ile birlikte sisteme yüklenmelidir.
4. **iThenticate Programı Benzerlik Raporu** (%20'yi geçmemelidir) ve gerekli ise **Etik Kurul Kararı** makale ile birlikte sisteme yüklenmelidir.
5. Hazırlanacak olan makale metni genel olarak;

- **Öz,**
- **Abstract,**
- **Giriş,**
- **Materyal ve Metot,**
- **Araştırma Bulguları ve Tartışma,**
- **Sonuçlar,**
- **Ekler,**
- **Beyanlar**
  - **Çıkar Çatışması**
  - **Yazar Katkısı**
- **Kaynaklar** bölümlerinden oluşmalıdır.

6. **Başlık:** Kısa ve açıklayıcı olmalı, **Calibri** yazı karakterinde, **14 punto, koyu**, düz, ortalanarak ve küçük harflerle (Başlığın sadece ilk kelimesinin baş harfi büyük) yazılmalıdır. Başlık tercihen 15 kelimeyi geçmemelidir. İngilizce başlık Türkçe başlığı tam olarak karşılamalı, 12 punto ve koyu yazılmalıdır.

7. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi'ne yayınlanması için makalenin ilk gönderiminde **yazar isimleri, kurum isimleri, adresleri, ORCID numaraları ve e-posta bilgileri yer almamalıdır.**

8. Makalenin hakem değerlendirmesi tamamlandıktan ve makale Yayın Kurulu tarafından kabul edildikten sonra, 7. maddede yer alan yazar isimleri ve diğer bilgiler, hakem önerilerine göre yeniden düzenlenmiş olan makale sayfası üzerine yazıldıktan sonra, Dergi web sayfasında yer alan düzenlenmiş makaleyi gönder sayfasından Dergi sistemine yüklenmelidir. **Kontrol edilmiş veya düzeltilmiş olan makale, yeni bir makale gibi Dergi web sayfasından yüklenmemelidir.**

9. Yazar isimleri **Adı SOYADI** kuralına göre Türkçe başlık sonrası **12 punto (koyu, ortalı ve düz)** ve bir boşluk bırakılarak yazılmalı, yazar isimlerinin sonuna adres için üst simge olarak rakam, sorumlu yazarı belirtmek için ise \* simgesi verilmelidir. Adres satırı yazar isimleri sonrasında 1 boşluk bırakılarak **10 punto (normal, düz ve ortalı)** yazılmalıdır. Adres satırından sonra 1 boşluk

birakılarak yazarların ORCID numaraları yazılmalıdır. ORCID satırının altına sorumlu yazar e-posta adresi belirtilmelidir.

10. **ÖZ:** Çalışmanın yürütüldüğü yer ve zamanını, amacını, yöntemini ve sonuçları içermelidir. Sola yaslı, 10 punto, koyu, paragraf başında girinti verilmemelidir. Türkçe ve İngilizce metin 300 kelimeyi aşmayacak şekilde 10 punto ve 1 satır aralığında yazılmalıdır. Öz ile Anahtar Kelimeler ve Abstract ile Key Words arasında tek satır boşluk (10 punto, düz) bırakılarak, metnin hemen altında en fazla 5 adet **Anahtar Kelimeler (Key Words)** yazılmalıdır. Key Words ile ana metin (Giriş) arasında iki satır boşluk bırakılmalıdır.

11. **Giriş:** Bu bölümde; çalışma konusu, gerekçesi, konu ile doğrudan ilgili önceki çalışmalar ve çalışmanın amacı verilir. Bu bölümde; çalışmanın konusu özetlenmeli, konu hakkındaki mevcut bilgi doğrudan ilişkili önceki çalışmalarla değerlendirilmeli ve bilgi üretimine ihtiyaç duyulan hususlar vurgulanıp çalışma ile ilişkilendirilmelidir. Son olarak çalışmanın amacı net ve açık bir şekilde ifade edilmelidir.

12. **Materyal ve Metot:** Bu bölümde; çalışmada kullanılan canlı ve cansız materyaller, uygulanan yöntemler, değerlendirilen ölçütler, uygulanan deneme desenleri veya örnekleme yöntemleri ile istatistiksel analizler gerektiğinde kaynaklarla da desteklenerek, açık ve net biçimde anlatılmalıdır. Yeni veya değiştirilmiş yöntemler, aynı konuda çalışanlara araştırmayı tekrarlama olanağı verecek nitelikte açıklanmalıdır. Bu amaçla gerektiğinde alt başlık kullanılmalıdır.

13. **Araştırma Bulguları ve Tartışma:** Çalışmada elde edilen bulgular şekil ve çizelgeler yardımıyla ve istatistiksel analizlere dayalı olarak açık ve net bir biçimde verilmelidir. İstatistikî olarak önemli bulunan faktörler, uygulanan istatistik analiz tekniğine uygun karşılaştırma yöntemi ile yorumlanarak ilgili istatistikler üzerinde harflendirme yapılmalıdır. Aynı veriler hem grafik hem de çizelge ile verilmemeli, konuya en uygun araç seçilmeli, anlatımda tekrarlayan cümle ve ifadelerden kaçınılmalıdır. Tartışma kısmında, uyum ve zıtlık açısından önceki çalışmalarla karşılaştırılmalı, doldurduğu bilgi açığı vurgulanmalı, önceki bölümlerdeki ifadelerin olduğu gibi tekrarından kaçınılmalıdır.

14. **Sonuçlar:** Bu bölümde; elde edilen nihai sonuçlar ve varsa öneriler, bilime ve uygulamaya katkısıyla birlikte kısa ve öz olarak verilmelidir.

15. **Ekler:** Çalışmayı destekleyen kurum ve kuruluşlar ile çalışmaya katkı sağlayanlar bu kısımda ifade edilmelidir. Ayrıca, makalenin lisansüstü tezlerden üretilip üretilmediği, abstract olarak kongre ve sempozyumlarda sunulup sunulmadığı da Ekler bölümünde belirtilmelidir.

#### 16. **Beyanlar (Declarations)**

**Çıkar Çatışması:** Kişiler makalelerin etik ilkeler çerçevesinde değerlendirilebilmesi ve bağımsız bir süreç yürütülebilmesi için olası çıkar çatışmaları ile ilgili olarak yayın kurulunu bilgilendirmelidir. Ekonomik veya kişisel fayda sağlanan durumlar çıkar çatışmasını meydana getirir. Bilimsel sürecin ve yayınlanan makalelerin güvenilirliği; bilimsel çalışmanın planlanması, uygulanması, yazılması, değerlendirilmesi, düzenlenmesi ve yayınlanması sırasında çıkar çatışmalarının objektif bir şekilde ele alınmasıyla doğrudan ilişkilidir. Makale ile ilgili çıkar çatışması söz konusu değilse, "**makale yazarları, aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder**" ifadesi yazılmalıdır.

**Yazar Katkısı:** Çalışmanın tasarlanması, planlanması, kurulması, yürütülmesi, verilerin analizi ve

makalenin yazılmasında içeriğe bilimsel açıdan katkı sağlayan her bir yazarın makaleye katkı şekli belirtilmelidir. Yazar katkıları, örnek olarak “**MM çalışmayı tasarlayarak denemeleri kurmuş, MM ve AA çalışmayı yürütmüş, BB verileri analiz etmiş, MM, AA ve BB makaleyi yazmıştır**” şeklinde ifade edilebilir.

17. **Kaynaklar:** Makalede atıfta bulunulan literatürlere Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi Yayın Kurulu tarafından belirlenen **yazım kurallarına göre** yazılmalıdır.

Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi Yazım Kuralları için ...

18. **Kısaltmalar ve Semboller:** Makale başlığı ve başlıklarda kısaltma kullanılmamalıdır. Gerekli olan kısaltmalar kavramların ilk geçtiği yerde parantez içinde verilmelidir. Kısaltmalarda ve sembollerin kullanımında ilgili alanın evrensel kurallarına uyulması zorunludur.

19. **Formüller:** Makalelerde formüller “Eşitlik” olarak adlandırılmalı ve italik olarak yazılmalıdır. Makalede birden fazla eşitlik varsa numaralandırılmalı, numara formülün yanında sağa dayalı olarak parantez içinde gösterilmelidir.

20. Makaleye ardışık olarak **satır ve sayfa numarası** verilmelidir.

21. **Calibri** karakterinde, **12 punto** ve **1.15 satır** aralıklı yazılan makale **20 sayfa**yı geçmemelidir.

22. Yayınlanmasına karar verilen eserler, sadece şekilsel olarak, yukarıda yer alan bilgiler doğrultusunda yeniden düzenlenmeli, yazar(lar)ca herhangi bir eklenti ya da çıkartma yapılmamalıdır.

23. Makale içerisinde, dergi basıldığı haliyle görünen hataların sorumluluğu yazarlara aittir. Yayın Kurulundan kaynaklanan basım hataları için ise düzeltme yayınlanabilir.

24. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi; yazarlardan makale gönderimi, değerlendirilmesi ve basım aşamalarında herhangi bir basım ücreti almamaktadır.

## MANUSCRIPT WRITING RULES

1. The manuscript should be written in Microsoft Word program, in Calibri font, **1.15** line spacing, **12** pt. plain text and a single column.
2. Margins; **Left, right, bottom and top 3 cm** should be left, and each row should be prepared consecutively by giving the line number.
3. Author (s) should indicate the type of manuscript (**Research Manuscript, Review, Technical Note** etc.).
4. **The English title should be written in 14 pt (bold and centered)** lowercase letters (only the first word of the title is capitalized) and in plain text. The Turkish title should be written in 12 font size and centered.
5. Author names should be written in **12 pt. (Bold, centered and plain)** and a space after the title according to the Name SURNAME rule, followed by a number as superscript for the address and a \* symbol to indicate the corresponding author. Address line should be written after the author names, leaving **1 space and 10 pt (normal, straight and centered)**.
6. Authors' ORCID numbers should be written, leaving 1 space after the address line. Under the ORCID line, the responsible author e-mail address must be specified.
7. The text should generally be in the following form;
  - **Abstract**
  - **Introduction**
  - **Material and Method,**
  - **Results and Discussion,**
  - **Conclusions**
  - **Acknowledgement**
  - **References**
8. In the writing of main titles, only the initials of the words should be capitalized in bold. In secondary and tertiary titles, only the first letter of the first word should be capitalized, other words should be in small, not bold and italic. There should be 1 space each, including the main headings of the text, the beginning and the end of the text. 1 space should be left before subtitles, but no spaces should be left after them. All titles should be left justified without indenting.
9. Reference should be cited **in the text based on (Author, year) rule**. In the presentation of a reference with two authors in the text, the rule (**first author's surname and second author's surname, year**) should be applied. In the display of sources with more than two authors (**first author's surname et al., year**) rule must be applied.

For example; (Bilgili, 2020), (Bilgili and vanEs, 2018); (Bilgili et al., 2019).

10. If more than one reference will be cited at the same time in the text; Referencens should be ordered chronologically, considering the year they were published.

11. **ABSTRACT:** Title should be left justified, 10 pt, bold, not indented at the beginning of the paragraph. Turkish and English texts should be written in 10 font size and 1 line spacing, not exceeding 300 words. **A maximum of 5 Key Words** should be written just below the text, leaving a single line space (10 pt., Plain) between Abstract and Keywords, and Öz (Turkish Abstract) and Key Words. Two lines of space should be left between Key Words and the main text.

12. Photographs, graphics, drawings, etc. should be expressed as "Figure" and Tables as "Tables".

13. Tables and Figures should be numbered consecutively (Figure 1. or Table 1.). Contents of "Figure" and "Table" should be prepared with 1 line spacing and 10 pt.

14. Table titles should be written above the table, and figure titles should be written below the figures in 10 pt, 1 line spacing with the first letter capital.

15. Figure and Table titles should be written in italics;

*Figure 1. The average temperature, average relative humidity and average monthly rainfall data detected in the research garden (average of the years 2007-2011) Table 2. Phenological observation results of peach cultivars for between 2007 and 2011*

16. Decimal numbers in the manuscript text and Table-Figure should be separated by **a period**. (123.87; 0.987 etc.).

17. One blank line should be left before and after the table-figures.

18. Manuscript writing should comply with the "International Unit System" (SI). According to this; Use g l-1 instead of g / l, and mg l-1 or ppm instead of mg / l. Percentages should be descriptive. For example; It should be specified as 3% (w / v), 3% (v / v), 3% (w / w) instead of 3%.

19. Harran Journal of Agriculture and Food Sciences uses **APA Style** in the submission of the sources list. Accordingly, the list of references should be prepared in accordance with the following rules.

19.1. **Citation to journal publications;**

19.1.1. Single author manuscripts;

Mamay, M. (2015). Infestation map of pomegranate aphid [*Aphis punicae* Passerini (Hemiptera: Aphididae)] in Şanlıurfa province pomegranate orchards. Turkey Entomology Bulletin, 5(3), 159-166.

19.1.2. Two-author manuscripts;

Soylemez, S., & Pakyurek, A. Y. (2017). Responses of rootstocks to nutrient induced high EC levels on yield and fruit quality of grafted tomato cultivars in greenhouse conditions. Applied Ecology and Environmental Research, 15(3), 759-770. DOI: [http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1503\\_759770](http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1503_759770)

19.1.3. Manuscripts with more than two authors;

İkinci, A., Mamay, M., Unlu, L., Bolat, I., & Ercisli, S. (2014). Determination of heat requirements and effective heat summations of some pomegranate cultivars grown in Southern Anatolia. Erwerbs-Obstbau, 56(4), 131-138. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10341-014-0220-8>.

**19.2. Referencing Books;**

19.2.1. If the source is a book;

Mohsenin, N. N. (1970). Physical Properties of Plant and Animal Materials. New York: Gordon and Breach Science Publishers.

19.2.2. If it is a chapter from the source book;

Author, A. A. (Year). Chapter title. In E. E. Editor (Ed.), Title of book: And subtitle (pp. pages). Place: Publisher.

19.2.3. Edited book;

Yeşilyaprak, B. (Ed.). (2003). Development and learning psychology. Ankara: Pegema Publishing.

**19.3. Citing sources of unknown author or internet sources;**

Anonymous (2005). Butter, other milk fat-based spreads and plain butter notification. Turkish Food Codex, Communiqué No: 2005/19, Ankara.

FAO, (2015). Statistical data of FAO. Retrieved from: <http://faostat.fao.org/site/567/default.asp>.

**19.4. Citing Master's and Doctoral theses;**

Doctorate or master theses can be accessed from electronic databases, corporate archives and personal web pages. If a dissertation is accessed from the ProQuest database of doctoral and master's theses or any other source, this information should be provided in the reference. For a doctorate or master thesis available in a database service, the following citation format is used;

**Unpublished thesis;**

Mamay, M. (2013). *Determination of population development and infestation ratio of carob moth [Apomyelois ceratoniae Zell. (Lepidoptera:Pyralidae)] in pomegranate orchards in Sanliurfa province and using mating disruption*

*technique for its control* (Unpublished doctoral dissertation). Harran University, Graduate School, Şanlıurfa.

Söylemez, S. (2014). *Effects of nutrient induced salinity levels and rootstocks on plant growing, yield and some fruit quality features at soilless grown grafted tomatoes* (Unpublished doctoral dissertation). Harran University, Graduate School, Şanlıurfa.

**Published thesis;** May, B. (2007). A survey of radial velocities in the zodiacal dust cloud. Bristol, UK: Canopus Publishing.

#### 19.5. Citing Symposium and Meeting Papers

Mamay, M. (2017). Population density of overwintering larvae of Carob Moth [*Apomyelois* (= *Ectomyelois*) *ceratoniae* Zell. (Lepidoptera: Pyralidae)] in pomegranate orchards in Southeastern Anatolia. SEAB 2017. *Proceedings of the 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity*, (pp. 235), 05-08 July 2017, Minsk, Belarus.

Ikinci, A. & Mamay, M. (2017). Effects of fruit thinning on morphological, physico-chemical properties, bioactive compounds, antioxidant activity and pest & disease control in pomegranate fruit (*Punica granatum* L.) *International Conference on Agriculture, Forest, Food Sciences and Technologies*, (pp. 642), 15-17 May 2017, Cappadocia, Turkey.

Sönmez, C., Mamay, M. & Söylemez, S. (2019). Determination of the effect of different hydroponic culture and different NH<sub>4</sub>:NO<sub>3</sub> ratio on the density of aphid [*Aphis* spp. (Hemiptera: Aphididae)] population in greenhouse lettuce. *1st International Gobeklitepe Agriculture Congress (IGAC-2019)*, (pp. 599-604), 25-27 November, Şanlıurfa, Turkey.

Note: You can use the web pages related to **APA Referencing Style** on the internet.

## TELİF HAKKI DEVİR SÖZLEŞMESİ

Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi Yayın Kurulu Başkanlığına

Eserin Adı:

Yazar(lar);

- Sunulan makalenin yazar(lar)ın orijinal çalışması olduğunu;
- Tüm yazarların bu çalışmaya bireysel olarak katılmış olduklarını ve bu çalışma için her türlü sorumluluğu aldıklarını;
- Tüm yazarların sunulan makalenin son halini gördüklerini ve onayladıklarını;
- Makalenin başka bir yerde özet dışında basılmadığını veya basılmak için sunulmadığını;
- Makalede bulunan metnin, şekillerin ve dokümanların başkalarına ait Telif Haklarını ihlal etmediğini taahhüt ederler.

Bununla birlikte, yazarların veya varsa yazarların işverenin;

- Patent hakları;
- Yazar(lar)ın kitaplarında veya diğer çalışmalarında makalenin tümünü ücret ödemeksizin kullanma hakkı;
- Makaleyi satmamak koşuluyla kendi amaçları için çoğaltma hakkı gibi fikri mülkiyet hakları saklıdır.
- Makalenin herhangi bir bölümünün başka bir yayında kullanılmasına Harran Tarım ve Bilimleri Dergisi yayımcı kuruluş olarak belirtilmesi ve Dergiye atıfta bulunulması şartıyla izin verilir.

*Ben / Biz, telif hakkı ihlali nedeniyle üçüncü şahıslarla istenecek hak talebi veya açılacak davalarda Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi Editörlerinin hiçbir sorumluluğunun olmadığını, tüm sorumluluğun yazarlara ait olduğunu, ayrıca makalede hiçbir suç unsuru veya kanuna aykırı ifade bulunmadığını, araştırma yapılırken kanuna aykırı herhangi bir malzeme ve yöntem kullanılmadığını taahhüt ederim/ederiz.*

|                             |  |       |      |
|-----------------------------|--|-------|------|
| <b>1. Yazarın Bilgileri</b> |  |       |      |
| Adı SOYADI                  |  |       |      |
| Kurum Adresi                |  |       |      |
| ORCID Numarası              |  | Tarih | imza |

|                             |  |       |      |
|-----------------------------|--|-------|------|
| <b>2. Yazarın Bilgileri</b> |  |       |      |
| Adı SOYADI                  |  |       |      |
| Kurum Adresi                |  |       |      |
| ORCID Numarası              |  | Tarih | imza |

Telif Hakkı Devir Sözleşmesi tüm yazarlarca imzalandıktan sonra tek bir form olarak sisteme yüklenmelidir)

Lütfen arka sayfaya geçiniz.



<https://dergipark.org.tr/tr/pub/harranziraat>

e-ISSN: 2587-1358