



KSÜ Tarım ve Doğa Derg

KSU J. Agric Nat

e-ISSN : 2619-9149

T.C.

KAHRAMANMARAŞ

SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

Journal of Agriculture and Nature

Cilt-Volume 24 Sayı-Number 6 Yıl-Year: 2021



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

Dergimiz aşağıdaki indeksler tarafından taranmaktadır (This journal is indexed and abstracted by)

- Emerging Sources Citation Index
- TUBİTAK-TR Dizin
- CAB Abstracts
- CiteFactor
- DRJI (Directory of Research Journal Indexing)
- Google Scholar
- Index Copernicus
- International Directory of Agriculture, Food and The Environment
- Journal Index
- Scientific Indexing Services (SIS)
- The International Plant Names Index

Yazışma Adresi / Corresponding Address
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Tarım ve Doğa Dergisi,
46100 – Kahramanmaraş/TÜRKİYE
Tel : (+90-344) 300 2108

E-mail: dogabilimleri@ksu.edu.tr
Web: <http://dergipark.org.tr/ksudobil>
<http://dogadergi.ksu.edu.tr>

Bu dergi hakemli olup yılda 6 kez yayınlanır.
This journal is peer-reviewed and published 6 issues per year.

Dergimiz, herhangi bir başvuru veya yayımlama ücreti almamaktadır
The Journal doesn't have APC or any submission charges.

Derginin Eski Adı/Previous Name of Journal

KSU Fen ve Mühendislik Dergisi
KSU Journal of Science and Engineering
KSU Doğa Bilimleri Dergisi
KSU Journal of Natural Science

Derginin Eski ISSN Numarası/Previous ISSN Number
1301-2053



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

Sahibi/ Owner

Prof.Dr. Niyazi CAN
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Rektörü

Editörler / Editors

[Prof.Dr. Ali KAYGISIZ](#) (Baş Editör/Editor in Chief)
KSÜ Ziraat Fak. Zootečni Böl.
dogabilimleri@ksu.edu.tr

[Prof.Dr. İ. Ersin AKINCI](#)
KSÜ Ziraat Fak.
Bahçe Bitkileri Böl.
akinci.ie@ksu.edu.tr

[Prof.Dr. Adil AKYÜZ](#)
KSÜ Ziraat Fak.
Biyosistem Müh. Böl.
adilakyuz@ksu.edu.tr

[Prof.Dr. Sakine Serap AVGIN](#)
KSÜ Eğitim Fak.
Biyoloji Böl.
ssavgin@ksu.edu.tr

[Prof.Dr. İsmail AKYOL](#)
Ankara Üniv. Ziraat Fak.
Zootečni Böl.
ismail.akyol@ankara.edu.tr

[Prof.Dr. Kerim Mesut CİMRİN](#)
Hatay Mustafa Kemal Üniv. Ziraat Fak.
Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Böl.
mcimrin@mku.edu.tr

Alan Editörleri

**İngilizce Editörü/ English
Editor**

[Prof.Dr. Ramazan CETİNTAS](#)
KSÜ Ziraat Fak.
Bitki Koruma Böl.
cetintas@ksu.edu.tr

**İstatistik Editörü/ Statistics
Editor**

[Prof.Dr. Mustafa ŞAHİN](#)
KSÜ Ziraat Fak.
Tarımsal Biyoteknoloji Böl.
ms66@ksu.edu.tr

**Alan Editörü/ Associate
Editor**

[Doç.Dr. Mustafa KÜSEK](#)
KSÜ Ziraat Fak.
Bitki Koruma Böl.
mkusek@ksu.edu.tr



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

Uluslararası Danışmanlar Kurulu (International Advisory Board)

Doç. Dr. Khairulmazmi AHMAD
Putra University, MALAYSIA

Prof. Dr. Larisa CAÏSİN
State Agrarian University,
MOLDOVA

Prof.Dr. Mohammed H. Abu-DİEYEH
Qatar University, QATAR

Assist.Prof. Dr. Eslam FAID-ALLAH
Minoufiya University, EGYPT

Prof.Dr. Wayne GARDNER
The University of Georgia, USA

Prof.Dr Stanislaw HURUK
Jan Kochanowski Univ. POLAND

Prof. Dr. Khalid JAVED
University of Veterinary and Animal
Sciences, PAKİSTAN

Prof.Dr. A Salah KHATTAB
Tanta University, EGYPT

Prof.Dr. K Mahmood KHAWAR
Ankara Üniversitesi, ANKARA

Dr. Abdulaziz Bashir KUTAWA
Faculty of Agriculture, Universiti Putra
Malaysia (UPM), Selangor, MALAYSIA

Dr. Ram Prasad MAINALI
National Agriculture Genetic
Resources Center, NEPAL

Prof. Dr. Alisa PİRLOG
State Agrarian University,
MOLDOVA

Assist.Prof. Dr. Mehdi RAHİMİ
Graduate University of Advanced
Technology, İRAN

Dr. Ahmad K. SALAMA
Autonomous University of Barcelona,
SPAIN

Dr. Vivekanandarajah SARAVANAN
KnowledgeLink Group, Inc.,
SRI LANKA

Prof.Dr Vytautas TAMUTIS
Uniwersytet Aleksandra, LITVANIA

Prof. Dr. Muhammed Masood TARIQ
Balochistan University, PAKİSTAN

Dr. Thobela Louis TYASI
University of Limpopo Polokwane,
SOUTH AFRICA

Prof.Dr. Abdulmojeed YAKUBU
Nasarawa State University, NIGERIA

Doç. Dr. Daniel ZABORSKI
West Pomeranian University of
Technology, POLAND

Prof.Dr. Navid GHAVİ HOSSEİN-
ZADEH
University of Guilan, Rasht, İRAN

Prof.Dr. Jose Cola ZANUNCIO
Federal Univ. of Vicosa, BRAZIL

Ulusal Danışmanlar Kurulu (Advisory Board)

Doç.Dr. Tugay AYAŞAN
Korkutata Üniversitesi OSMANİYE

Prof. Dr. Fikri BALTA
Ordu Üniv. ORDU

Prof.Dr. Levent BAT
Sinop Üniv. SİNOP

Prof. Dr. H. Murat BÜYÜKÇAPAR
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv.
KAHRAMANMARAŞ

Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ
Sağlık Bilimleri Üniv. İSTANBUL

Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN
Atatürk Üniv. ERZURUM

Prof.Dr. Rüştu HATİPOĞLU
Çukurova Üniversitesi, ADANA

Prof.Dr. Murat KÜTÜK
Gaziantep Üniv. GAZİANTEP

Prof. Dr. Ramazan MERAL
Bingöl Üniv. BİNGÖL

Prof.Dr. Yeşim Yalçın MENDİ,
Çukurova Üniversitesi, ADANA

Prof.Dr. Fatih SATIL
Balıkesir Üniv. Balıkesir

Prof.Dr. Hüseyin SÜZEK
Muğla Sıtkı Koçman Üniv. MUĞLA

Prof.Dr. Nazım ŞEKEROLU
Kilis 7 Aralık Üniv. KİLİS

Prof. Dr. İbrahim YILMAZ
Akdeniz Üniv. ANTALYA

Prof. Dr. Kadir YILMAZ
Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv.
KAHRAMANMARAŞ



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

İÇİNDEKİLER/ CONTENTS

ARAŞTIRMA MAKALESİ - RESEARCH ARTICLE

- Bazı Çerezlik Kabak Genotiplerinde Morfolojik Değişkenliğin Ortaya Konması** 1127-1138
Revealing Morphological Variability in Some Confectionery Pumpkin Genotypes
Necibe KAYAK, Önder TÜRKMEN
- Klor Uygulamalarının Biber Bitkisinin Gelişimi, Meyve Verimi ve Bazı Kalite Parametreleri Üzerine Etkisi** 1139-1144
Influence of Chloride on Growth, Fruit Yield and Quality Parameters of Processing Pepper
Ahmet TURHAN, Neşe ÖZMEN
- Molecular and Morphological Identification of *Cantharellus pallens* Pilát 1959 (Cantharellales, Basidiomycota), a New Record for Turkey** 1145-1153
Türkiye için Yeni Bir Kayıt Olan *Cantharellus pallens* Pilát 1959 (Cantharellales, Basidiomycota)'nın Moleküler ve Morfolojik Teşhisi
Meryem Şenay ŞENGÜL DEMİR, Ömer TÜRKÜKUL, İbrahim TÜRKÜKUL
- Çoban Çökerten (*Tribulus terrestris*) ve Çoban Çantası (*Capsella bursa-pastoris*) Bitkilerinde in Vitro Antioksidan Enzim Kapasitesi ve Oksidatif Stres Düzeylerinin Belirlenmesi** 1154-1160
Determination of In Vitro Antioxidant Enzyme Capacity and Oxidative Stress Levels in Çoban Çökerten (*Tribulus terrestris*) and Çoban Çantası (*Capsella bursa-pastoris*) Plants
İlter DEMİRHAN, Meltem GÜNGÖR, Ergül BELGE KURUTAS, Mehmet ÖZYURT
- Investigation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Paliurus spina-christi* Mill. in Kahramanmaraş, Turkey** 1161-1169
Kahramanmaraş İlindeki *Paliurus spina-christi* Mill. Bitkisinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması
Lütfiye ARSLAN, Elife KAYA
- Effect of *Rosa pimpinellifolia* Extract on Human Tumor Cells Proliferation** 1170-1176
Rosa pimpinellifolia Ekstraktının İnsan Tümör Hücrelerinin Çoğalmasına Etkisi
Elif AYAZOĞLU DEMİR, Selim DEMİR, Nihal TÜRKMEN, İbrahim TURAN
- İstiridyedeki Mantarın (*Pleurotus ostreatus*) Farklı Flaş Zamanlarına Göre Antioksidan Aktivitesinin ve Hiperglisemide Anahtar Enzim Rolü Olan α -amilaz ve α -glukozidaz İnhibisyon Potansiyelinin Belirlenmesi** 1177-1186
Determination of Antioxidant Activity of Oyster Mushroom According to Different Flush Times and the Inhibition Potential of α -amylase and α -glucosidase, which are Key Enzyme Role in Hyperglycemia
Nurcan DOĞAN, Cemhan DOĞAN



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

- The Chemosensitizing Effect of Portulaca oleracea Methanol Extract on Human Colorectal and Lung Cancer Cells Against Irinotecan** 1187-1195
Portulaca oleracea Metanol Ekstraktının İnsan Kolorektal ve Akciğer Kanseri Hücrelerini Irinotekana Karşı Kemohassaslaştırıcı Etkisi
Mehmet Kadir ERDOĞAN
- Comparative Analyses of Antioxidant, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activities of Different Cladonia Species and Determination of Fumarprotocetraric Acid Amounts** 1196-1207
Farklı Cladonia Türlerinin Antioksidan, Sitotoksik ve Antiinflamatuvar Aktivitelerinin Karşılaştırmalı Analizleri ve Fumarprotosetrarik Asit Miktarlarının Belirlenmesi
Zekiye KOCAKAYA, Mustafa KOCAKAYA, Gökçe ŞEKER KARATOPRAK
- Fatty Acid Composition in Yersinia Ruckeri Strains Isolated from Rainbow Trout Farms** 1208-1212
Gökkuşluğu Alabalığı Yetiştiricilik Tesislerinden İzole Edilen Yersinia Ruckeri Suşlarının Yağ Asit Kompozisyonu
Ünal İSPİR, Mikail ÖZCAN, Muammer KIRICI
- Forecasting of Potato Late Blight Disease Using Alternative Sets of Meteorological Data and Disease Epidemiology** 1213-1220
Patates Mildiyösü Hastalığının Epidemiyolojisi ve Hastalık Tahmininde Farklı Meteorolojik Sistemlerin Kullanım Olanakları
Hale GÜNAÇTI, Tahsin AY
- Epidemiological Researches on Rice Blast Disease Caused by Pyricularia oryzae** 1221-1229
Pyricularia oryzae'nın Neden Olduğu Çeltik Yanıklık Hastalığı Üzerine Epidemiyolojik Araştırmalar
Efkan AKÇALI, Şener KURT
- Antepfıstığı Dalgüvesi Kermania pistaciella AMSEL (LEPIDOPTERA:TINEIDAE) 'nın Braconidae ve Ichnemonidae Familyasından Yeni Kayıt Parazitotleri** 1230-1236
Additions to the Fauna of Braconidae and Ichnemonidae Parasitoids of Kermania pistaciella AMSEL, With the Description of New Species
Yasemin Bengü ŞAHAN, Hasan TUNAZ
- Yerel Diatomit Topraklarının Kokusuz Toz Sarımsak İle Karışımının Kıрма Biti, Tribolium confusum du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae)'ne Karşı Etkinliği** 1237-1246
Efficacy of Local Diatomaceous Earths Mixtures With Odorless Garlic Powder Against Confused Flour beetle, Tribolium confusum du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae)
Merve GÖKÇE, Ali Arda ISIKBER, Özgür SAĞLAM



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

- [Gülner \(Mersin\) İlçesi Elma Ağaçlarındaki Zararlı ve Yararlı Arthropoda Türlerinin Tespiti ve Bazı Biyokolojik Gözlemler](#) 1247-1262
Determination of Pests and Beneficial Arthropoda Species Associated with Apple Trees in Gülner (Mersin) and Some Bioecological Observations
Emre Deniz SARI, Erol YILDIRIM
- [Examining Some Cereals for Mass Production of *Beauveria bassiana* \(Balsamo\) Vuillemin Conidia by Solid State Fermentation](#) 1263-1270
Beauveria bassiana Konidilerinin Katı Faz Fermantasyonu ile Kitlesel Üretimi için Bazı Tahılların İncelenmesi
Cebrail BARIŞ, Mehmet Kubilay ER
- [Örtüaltı Hıyar Yetiştiriciliğinde Sorun Olan Kök-ur Nematodları \(*Meloidogyne* spp.\)'na Karşı Kimyasal Mücadeleye Altaernatif Mücadele Olanaklarının Araştırılması](#) 1271-1279
The Investigation of Altaernative Struggle for The Chemical Struggle Against Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.)
Mehmet AYHAN, İlker KEPENEKÇİ
- [Adıyaman İli Ticari Badem Bahçelerinde Badem İçkurdu \(*Eurytoma amygdali* End.\)'nun Pupa Gelişiminin ve Ergin Çıkış Zamanın Belirlenmesi](#) 1280-1289
Determination of the Pupal Development and Timing of Adult Emergence of Almond Seed Wasp (*Eurytoma amygdali* End.) in Commercial Almond Orchards of Adıyaman Province
Öznur ÇAĞLAR, Ali Arda ISIKBER
- [Morphology of Spermathecae and Eggs of *Stenozygum coloratum* \(Klug, 1845\) \(Heteroptera: Pentatomidae\)](#) 1290-1299
Stenozygum coloratum (Klug, 1845) (Heteroptera: Pentatomidae)'un Spermateka ve Yumurta Morfolojisi
Selami CANDAN, Mustafa GÜLLÜ, Nurcan ÖZYURT KOÇAKOĞLU
- [Additional notes on the genus *Carpelimus* Leach, 1819 \(Staphylinidae: Oxytelinae\) fauna of Turkey](#) 1300-1303
Türkiye *Carpelimus* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) faunası üzerine ek notlar
Enes Zafer KACAR, Semih ÖRGEL, Sinan ANLAŞ
- [Kahramanmaraş Koşullarında Arpada Çiçeklenme-Olgunlaşma Döneminde Bazı Fizyolojik Özelliklerin İncelenmesi](#) 1304-1314
Investigation of Some Physiological Traits During Anthesis-Maturing Period of Barley in Kahramanmaraş Conditions
Cengiz YÜRÜRDURMAZ, Ayşe KURT, Rukiye KARA, Aydın AKKAYA



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

- Bazı Yem Bezelyesi (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) Çeşitlerinin Farklı Ekim Zamanlarındaki Tohum Verimi ve Verim Öğelerine Olan Etkileri 1315-1326
Effects on Yield Components and Seed Yield of Some Feed Pea (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) Varieties at Different Sowing Times
Bilal KESKİN, Süleyman TEMEL, Barış EREN
- The Effect of Feeding With Pumpkin Seed Membrane on Survival, Development and Longevity in Model Organism 1327-1332
Model Organizmanın Kabak Çekirdeği Membranı ile Beslemenin Yaşama, Gelişme ve Ömür Uzunluğuna Etkisi
Eda GÜNEŞ, Şerife BİÇER BAYRAM
- Embriyonik Dönemde Döngüsel Aydınlatma Yapılan Etlik ve Yumurtacı Cıvcıvlerinin Purkinje Hücrelerinde Bazı AgNOR Parametrelerinin Karşılaştırılması 1333-1342
The Comparasion of Some AgNOR Parameters of Purkinje Cells in The Laying and Broiler Chicks Exposed to Daily Cyclic Lighting During The Embryonic Period
Gamze TURGAY İZZETOĞLU, İrem Nur SERBESTOĞLU, Sezen ÖZKAN, Servet YALÇIN
- Relationship Between Production Characteristics and Proportion of Body Measurements of Holstein Cows 1343-1348
Siyah Alaca Süt Sığırlarında Vücut Ölçülerinin Birbirlerine Oranlarının Verim Özellikleri ile İlişkisi
Ahmet Refik ÖNAL, Ersin DAMA, Yahya Tuncay TUNA



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

HAKEMLER/Referees*

Prof. Dr. İzzet AKÇA
Prof. Dr. İzzet AKÇA
Dr. Öğr. Üyesi Tuğrul Zahit ALIÇLI
Prof. Dr. Suzan ALTINOK
Prof. Dr. Ferhat ALTUNSOY
Prof. Dr. Şerife E. ARICI ŞENKAYNAĞI
Prof. Dr. Şerife E. ARICI ŞENKAYNAĞI
Doç. Dr. Abdullah ASLAN
Prof. Dr. Mehmet ATAK
Prof. Dr. Ekrem ATAKAN
Prof. Dr. Ekrem ATAKAN
Doç. Dr. Arif AYAR
Doç. Dr. Tugay AYAŞAN
Dr. Nadire Pelin BAHADIRLI
Prof. Dr. Erol BAYHAN
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK
Prof. Dr. Mehmet BİLGİN
Doç. Dr. Halil BOLU
Prof. Dr. Canan CAN
Doç. Dr. Önder CANBOLAT
Doç. Dr. Özgür CENGİZ
Dr. Öğr. Üyesi. Sebahattin CÖMERTPAY
Prof. Dr. Dilek Ülker ÇAKIR
Prof. Dr. Ahmet Esen ÇELEN
Prof. Dr. M. Akif ÇÜRÜK
Doç. Dr. Selim DEMİR
Dr. Öğr. Üyesi. Tuğba DEMİR
Dr. Öğr. Üyesi. Tuğba DEMİR
Prof. Dr. Mevlüt EMEKÇİ
Dr. Öğr. Üyesi Ali ENDES
Prof. Dr. Oktay ERDOĞAN
Prof. Dr. Funda ERYILMAZ AÇIKGÖZ
Assist. Prof. Dr., Eslam FAID-ALLAH
Dr. Öğr. Üyesi. Serdar GENÇ
Dr. Öğr. Üyesi Tuba GENÇ KESİMCİ
Doç. Dr. Fatih GÖĞER
Prof. Dr. İbrahim HAYOĞLU
Prof. Dr. Mustafa İMREN

Ondokuz Mayıs Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Samsun
Ondokuz Mayıs Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Samsun
İstanbul Üniv. Su Bilimleri Fak. Bahçılık ve Su Ürünleri İşleme Tek. Böl. İstanbul
Ankara Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl. Ankara
Eskişehir Teknik Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Eskişehir
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Isparta
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Isparta
Fırat Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Elazığ
Hatay Mustafa Kemal Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl. Hatay
Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Adana
Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Adana
Amasya Üniv. Sabuncuoğlu Şerefeddin Sağlık Hizmetleri MYO. Amasya
Osmaniye Korkut Ata Üniv. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fak. Osmaniye
Hatay Mustafa Kemal Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl. Hatay
Dicle Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Diyarbakır
Aydın ADU Veteriner Fak. Veteriner Hekimliği Temel Bilimleri Böl. Aydın
Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl. Antalya
Dicle Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Diyarbakır
Gaziantep Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Gaziantep
Bursa Uludağ Üniv. Ziraat Fak. Zootečni Böl. Bursa
Van Yüzüncü Yıl Üniv. Su Ürünleri Fak. Su Ürünleri Avlama ve İşleme Tek. Böl. Van
KSÜ Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Böl. Kahramanmaraş
Çanakkale Onsekiz Mart Üniv. Tıp Fak. Temel Tıp Bilimleri Böl. Çanakkale
Ege Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl. İzmir
Çukurova Üniv. Tıp Fak. Temel Tıp Bilimleri Böl. Adana
Karadeniz Teknik Üniv. Sağlık Bilimleri Fak. Beslenme ve Diyetetik Böl. /
Sivas Cumhuriyet Üniv. Veteriner Fak. Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Böl. Sivas
Sivas Cumhuriyet Üniv. Veteriner Fak. Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Böl. Sivas
Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Ankara
Yozgat Bozok Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Yozgat
Pamukkale Üniv. Uygulamalı Bilimler Fak. Organik Tarım İşl. Böl. Pamukkale
Tekirdağ Namık Kemal Üniv. Teknik Bilimler MYO Tekirdağ
Dept. Of Animal Production, Faculty of Agriculture, Menofia University, EGYPT
Kırşehir Ahi Evran Üniv. Ziraat Fak. Tarımsal Biyoteknoloji Böl. Kırşehir
Iğdır Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Iğdır
Anadolu Üniv. Eczacılık Fak. Eczacılık Meslek Bilimleri Böl. Eskişehir
Harran Üniv. Ziraat Fak. Gıda Mühendisliği Böl. Şanlıurfa
Bolu Abant İzzet Baysal Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Bolu

* Soyada göre sıralanmıştır.



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

Prof. Dr. Haki KARA
Prof. Dr. Abdullah KAYA
Prof. Dr. Abdullah KAYA
Dr. Oğuzhan KAYGUSUZ
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa KOCAKAYA
Prof. Dr. Hasan KILIÇ
Prof. Dr. Halil KÜTÜK
Doç. Dr. Mehmet MAMAY
Prof. Dr. Yavuz MAZLUM
Prof. Dr. Sevilhan MENNAN
Prof. Dr. Hülya ÖZGÖNEN ÖZKAYA
Prof. Dr. Ersin POLAT
Doç. Dr. Özgür SAĞLAM
Doç. Dr. Özgür SAĞLAM
Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI
Dr. Vivekanandarajah SARAVANAN
Prof. Dr. Erdal SERTKAYA
Doç. Dr. Mustafa SEVİNDİK
Prof. Dr. Emrah SUR
Dr. Öğr. Üyesi Ayşegül SÜMER
Doç. Dr. Engin ŞEKER
Dr. Öğr. Üyesi Meryem Ş ŞENGÜL DEMİRRAK
Prof. Dr. Suat ŞENSOY
Doç. Dr. Yakup SENYUZ
Prof. Dr. Mustafa TAN
Prof. Dr. İbrahim TAPKI
Prof. Dr. Serdar TEZCAN
Prof. Dr. Serdar TEZCAN
Doç. Dr. Cemil TÖLÜ
Prof. Dr. Mehmet Rifat ULUSOY
Prof. Dr. Mehmet Rifat ULUSOY
Prof. Dr. Handan UYSAL
Prof. Dr. Yusuf UZUN
Doç. Dr. Fatih ÜÇKARDEŞ
Prof. Dr. Necmettin ÜNAL
Dr. Öğr. Üyesi Sakin Vural VARLI
Prof. Dr. Serap YALIN
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet YARAN
Prof. Dr. Ertan YILDIRIM

Sivas Cumhuriyet Üniv. Veteriner Fak. Klinik Öncesi Bilimleri Böl. Sivas
Gazi Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Ankara
Gazi Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Ankara
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. Atabey MYO Isparta
Yozgat Bozok Üniv. Boğazlıyan MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim Böl. Yozgat
Bingöl Üniv. Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl. Bingöl
Bolu Abant İzzet Baysal Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Bolu
Harran Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Şanlıurfa
İskenderun Teknik Üniv. Deniz Bilimleri ve Teknolojisi Fak. Hatay
Ondokuz Mayıs Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Samsun
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Isparta
Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Böl. Antalya
Tekirdağ Namık Kemal Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Tekirdağ
Tekirdağ Namık Kemal Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Tekirdağ
Aydın ADU Veteriner Fak. Veteriner Hekimliği Temel Bilimleri Böl. Aydın
KnowledgeLink Group, Inc., Waltham, MA 02451, USA
Hatay Mustafa Kemal Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Hatay
Osmaniye Korkut Ata Üniv. Bahçe MYO Osmaniye
Selçuk Üniv. Veteriner Fak. Temel Bilimler Böl. Konya
Recep Tayyip Erdoğan Üniv. Sağlık Bilimleri Fak. Rize
Munzur Üniv. Su Ürünleri Fak. Su Ürünleri Yetiştiriciliği Böl. Tunceli
Tokat Gaziosmanpaşa Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Tokat
Van Yüzüncü Yıl Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Böl. Van
Kütahya Dumlupınar Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Kütahya
Trakya Üniv. Havsa MYO Park ve Bahçe Bitkileri Böl. Tekirdağ
Hatay MKU Ziraat Fak. Zootečni Böl. Hatay
Ege Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. İzmir
Ege Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. İzmir
ÇOMU Ziraat Fak. Zootečni Böl. Çanakkale
Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Adana
Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Adana
Atatürk Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Erzurum
Van Yüzüncü Yıl Üniv. Eczacılık Fak. Eczacılık Meslek Bilimleri Böl. Van
Adıyaman Üniv. Tıp Fak. Temel Tıp Bilimleri Böl. Adıyaman
Ankara Üniv. Veteriner Fak. Zootečni ve Hayvan Besleme Böl. Ankara
Balıkesir Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl.
Mersin Üniv. Eczacılık Fak. Temel Eczacılık Bilimleri Böl. Mersin
Gaziantep Üniv. İslahiye MYO Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Böl. Gaziantep
Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Böl. Erzurum



Düzeltilme Yazısı / Erratum

Tuğ a H, Üzal Ö, Yaş ar F 2021. Bazı Organik Materyallerin Kıvrıcık Yaprak Salata (*Lactuca sativa* var. *Crispa*)' da Verim ve Bitki Besin Elementi İçeriklerine Etkisi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (3): 495-504. [https:// doi.org/ 10.18016/ksutarimdog a.vi.728899](https://doi.org/10.18016/ksutarimdog a.vi.728899).

¹Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Erciş Meslek Yüksekolulu, Van, TÜRKİYE, ^{2,3}Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Van, TÜRKİYE

✉: ozlemuzal@yyu.edu.tr

KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi'nin 2021 yılı 24. Cilt 3. Sayısında yer alan “Tuğ a H, Üzal Ö, Yaş ar F 2021. Bazı Organik Materyallerin Kıvrıcık Yaprak Salata (*Lactuca sativa* var. *Crispa*)' da Verim ve Bitki Besin Elementi İçeriklerine Etkisi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (3): 495-504. [https:// doi.org/ 10.18016/ksutarimdog a.vi.728899](https://doi.org/10.18016/ksutarimdog a.vi.728899).” referanslı makalede yazarlar tarafından makalede yer alan Çizelge 5'in dizgisi sırasında sehven bazı yazım hatalarının yapıldığı tespit edilmiştir. Makalede yer alan Çizelge 5'ün düzeltilmiş şekli aşağıda sunulmuştur.

Çizelge 5. Uygulamaların kök ve yaprakta K (%) ve Ca (%) miktarlarına etkisi.

Table 5. The effects of applications on K (%) and Ca (%) amounts in root and leaf.

Uygulama (Application)	K		Ca	
	Kök (Root) ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	Yaprak (Leaf) ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	Kök (Root) ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)	Yaprak (Leaf) ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)
Kontrol (Control)	1.760±0.22 A-D	5.291±0.45 A-C	1.410±0.27 BC	1.991±0.5
V1 (%3)	1.912±0.23 A-C	4.368±0.46b BC	1.378±0.26 b C	1.115±0.49
V2 (%6)	2.696±0.23 A	6.644±0.46 a A	2.898±0.26 a A	1.136±0.09
V3 (%3)	2.419±0.23 A	4.611±0.46 b BC	1.834±0.26 b BC	1.569±0.84
LSD	ÖD	3.137	1.813	ÖD
G1 (%3)	1.336±0.18 CD	4.112±0.48C	1.622±0.27 BC	1.015±0.26
G2 (%6)	1.476±0.18 B-D	4.952±0.48BC	1.412±0.27 BC	1.394±0.42
G3 (%9)	1.027±0.18D	4.648±0.48 BC	2.374±0.27 AB	1.263±0.43
LSD	ÖD	ÖD	ÖD	ÖD
L1 (%3)	1.451±0.18 B-D	5.850±0.39 a AB	1.745±0.31 BC	1.3085±0.56
L2 (%6)	1.640±0.18B-D	4.371±0.39 b BC	2.883±0.31 A	1.2667±0.49
L3 (%9)	1.958±0.18 AB	4.303±0.39 b C	2.653±0.31AB	1.113±0.27
LSD	ÖD	2.656	ÖD	ÖD
T.U.İ. LSD	1.456	2.901	1.695	ÖD

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasında fark vardır ($p < 0.05$). Aynı sütundaki küçük harfler gübrelerin üç farklı dozu arasındaki büyük harfler ise tüm gübre dozları arasındaki farklılıkları göstermektedir. ÖD: ortalamalar arasındaki fark önemli değil. T.U.İ.: tüm uygulamalar için LSD: En küçük anlamlı fark testi (least significant difference test).

The Revealing of Morphological Variability and Characterization of Some Confectionery Pumpkin

Necibe KAYAK¹, Önder TÜRKMEN^{2, 3}

¹Selcuk University, Graduate School of Natural and Applied Sciences, Department of Horticulture, Konya, Turkey, ²Selcuk University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture, Konya, Türkiye, ³Necmettin Erbakan University, Ereğli Faculty of Agriculture, Konya, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0001-7104-8544>, ²<https://orcid.org/0000-0003-3218-6551>

✉: necibe.kayak@gmail.com

ABSTRACT

In this study, it was aimed to examine some morphological features and determine the proximity between genotypes in 105 confectionary pumpkins lines (*Cucurbita pepo* L.), which were determined as promising at S4 level. In the study, some observations and measurements of plants including fruit and seed characteristics were taken. The appearance of plant genotypes are; 81.9% erect, 15.2% clutching, 0.9% semi-clutching; while the degree of branching of the genotypes was found to be 32.3% weak, 47.7% moderate, 22.8% high, and it was determined as 84.7% branched and 15.3% bush type. The body color of the genotypes has been found to be 49.5% green, 37.14% light green, 13.3% dark green. Leaf color was found as 64.7% green, 30.4% dark green, 4.7% light green, and leaf lobbing were determined as 1.9% low, 48.5% medium, 2.8% high, 4.7% excessive and 41.9% were defined as absent. The fruit spot density was determined as; 73.3% was low, 24.7% dense, 1.9% more spotted and 19.0% of the mature fruits was cream, 4.7% yellow, 0.9% green, 1.9% green-yellow, 4.7% dark-yellow, 28.6% light-yellow and 41.9% orange. The size of the mature fruits was 21.9% short, 38.0% medium and 40% long, while the diameter was determined as 62.8% long, 35.23% medium, and 3.8% narrow. The fruit size of genotypes respectively was; 14.2% of large, 36.1% medium, 50.4% small, and 0.9% small-medium. In order to determine the genetic diversity between genotypes, principal component analysis (PCA) and cluster analysis were performed and it was seen that genotypes were divided into 6 groups.

Research Article

Article History

Received : 21.01.2021
Accepted : 27.03.2021

Keywords

Confectionary pumpkins
Genetic Sources
Characterization
Variation
Cluster analysis

Bazı Çerezlik Kabak Genotiplerinde Morfolojik Değişkenliğin Ortaya Konması

ÖZET

Bu çalışma, S4 kademesinde ümitvar olarak belirlenmiş 105 adet çerezlik kabak hattında (*Cucurbita pepo* L.), bazı morfolojik özelliklerin incelenmesi ve genotipler arası yakınlıkların belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışmada bitki, meyve ve tohum özelliklerine ait bazı gözlem ve ölçümler yapılmıştır. Genotiplerin bitki görünümü %81.9 dik, %15.2 sarılıcı ve %0.9 yarı sarılıcı bulunurken kol atma derecesi %32.3'ünde zayıf, %47.7'sinde orta %22.8'inde fazla bulunmuş, genotiplerin %84.7'ü kollu %15.2'i kolsuz olarak saptanmıştır. Genotiplerin %49.5'i yeşil, %37.14'ü açık yeşil, %13,3'ü ise koyu yeşil gövdeli olarak bulunmuştur. Genotiplerde yaprak rengi, %64.7'sinde yeşil, %30.4'ünde koyu yeşil, %4.7'sinde açık yeşil; dilimlilik %1.9'unda az, %48.5'inde orta, %2.8'inde fazla, %4.7'sinde çok fazla, %41.9'unda yok, olarak tanımlanmıştır. Meyve benek renginde, % 31.4'ü yeşil, %7.6'sı turuncu, %0.9'u sarı, %60'ı krem; benek yoğunluğunda; %73,3'ü az, %24.7'si yoğun, %1.9'u fazla; meyve renginde, %19.0'u krem, %4.7'si sarı, %0.9'u yeşil, %1.9'u yeşil-sarı, %4.7'si koyu-sarı, %28.6'sı açık sarı, %41.9'u turuncu olarak bulunmuştur. Tohumluk meyve boyu; %21.9'unda kısa, %38.0'inde

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 21.01.2021
Kabul Tarihi : 27.03.2021

Anahtar Kelimeler

Çerezlik Kabak
Genetik kaynaklar
Karakterizasyon
Varyasyon
Cluster analizi

orta, %40'ında uzun; meyve çapı %62.8'inde uzun, %35.23'ünde orta, %3.8'inde dar olarak belirlenmiştir. Genotiplerin %14.2'si iri, %36.1'i orta, %50.4'ü küçük ve %0.9 küçük-orta meyve iriliğine sahip olmuştur. Genotipler arasındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesi amacıyla, temel bileşenler analizi (PCA) ile cluster analizi yapılmış ve genotiplerin 6 gruba ayrıldığı görülmüştür.

To Cite : Kayak N, Türkmen Ç 2021. The Revealing of Morphological Variability and Characterization of Some Confectionery Pumpkin. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1127-1138. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.865192.

INTRODUCTION

The Cucurbitaceae family have contained, herbaceous and annual plant species such as *Cucurbita pepo*, *Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata* that have great economic importance in the world and Turkey (Robinson and Decker-Walters, 1997). These species are used in human nutrition as well as in different industries. The pumpkin seeds have been consumed as confectionary in Turkey for many years, and their consumption has increased daily. Thus, a significant increase have seen in its production because of its nutritional value and benefit to human health in recent years (Ermiş, 2010). Pumpkin seeds contain high amounts of fat (40-50%) and protein (30-40%). It is also rich in carbohydrates (20-25%) and vitamin E values (Abak et al., 1997; Türkmen et al., 2015). There are no registration in Turkey for confectionary pumpkin cultivars. For this reason, confectionary pumpkins cultivation is made using by local populations. Since local cultivars have been grown in the same region for many years, they were easily adapted to climate-changing and to other conditions. Productivity and quality are the main factors in cultivation and it is necessary to have a good practice of growing techniques and to have genetically ideal varieties. This is only possible with hybrid cultivars that are of a premium nature. Hybrid cultivars are combine the superior features and increase productivity. In the case of breeding of hybrid cultivars, it is first necessary to determine the characteristics of the genetic diversity of the core collection. Therefore, it is important to collect, preserve and include these varieties to the plant breeding programs without genetic loss. Conventional morphological markers are used in determining the genetic relationships among the plants. In vegetable breeding, it is always important to determine the variation of morphological characteristics among genetic resources. In Turkey, there are some studies conducted on the breeding of confectionary pumpkin by different researchers. Türkmen et al. (2016) examined the plant, leaf, flower, fruit and seed properties of 81 confectionary pumpkin lines at S5 level according to UPOV parameters. It has been reported that some promising genotypes can contribute economy by being used in hybrid seed production in Turkey. In a study that conducted in Portugal, 20 morphological characteristics identified for *Cucurbita* spp. were used

to evaluate the diversity of 54 *C. pepo*, 32 *C. maxima* and 21 *C. moschata* genotypes. The highest mean values were observed in *C. pepo* for fruit length, shell thickness and seed weight, *C. maxima* for fruit width and 1000 seed weight, and *C. moschata* genotypes for fruit weight and thickness (Martins et al., 2015). Multi-variable analysis are used to evaluate data obtained from qualified gen pools created within the reclamation programs (Alkan, 2011). In order to detect the variability of certain characteristics, morphological features must be thoroughly inspected. For this reason, "Multi-variable Statistical Analysis" have been developed (Çakır, 1994). Cluster Analysis is one of the many variable statistical methods that have particularly been popular in recent years. These features are used to determine the superior genotypes by utilizing the criteria prepared by UPOV. Usage of the data obtained after the characterization studies, the similarities and groupings among of genotypes can be easily displayed by using cluster analysis and principle component analysis (Karaağaç and Balkaya, 2010). Soltani et al. (2016) compared 11 *C. pepo*, *C. moschata* and *C. maxima* genotypes, 3 of which were open-pollinated, and it was observed that genotypes were divided into 6 basic groups in terms of fruit and seed characteristics in the cluster analysis.

The main goal of this study was to determine some morphological characteristics differences and similarities among the local and nonlocal confectionary pumpkin genotypes of Turkey and to find solutions to the seed problem for confectionary pumpkin producers for future breeding efforts.

MATERIAL and METHODS

In the study, 105 prominent confectionary pumpkin genotypes (*Cucurbita pepo* L.) were used as plant material, which was previously selfed at S4 level. Seed sowing was realized in plastic seedling trays filled with peat moss (one seed per cell) and 10 seeds were sown from each genotype. Within a week following the sowing, the plants emerged, when the seedlings were ready for planting five of each genotype were planted under greenhouse conditions and irrigated by drip irrigation method. Morphological observation criteria were prepared by using the modified UPOV variety feature document (UPOV, 2002). In this study, the plant appearance, branching, and its degree, stem and leaf color, lobbing on the leaf, presence and color of the

ring at the base of the petal and spot color and density in ripe fruits, fruit color, fruit height, fruit diameter, the height-diameter ratio in mature fruit (index), size, 1000 grain weight, seed color, and cracking ease of seed were determined (UPOV, 2002).

The pumpkin genotypes can be easily demonstrated by using the morphological data determined by the existing similarities-differences and groupings among genotypes by using cluster analysis and principal component analysis.

All data were evaluated with the WARD program, it was included in the JMP computer program for cluster analysis and promising genotypes were determined by factor analysis with Principle Component Analysis (PCA) (Ward, 1963).

RESULTS and DISCUSSION

The plant appearance of the genotypes was found to be 81.9% erect, 15.2% clutching, 0.9% semi-clutching. The branching degree of the genotypes was found to be 47.7% moderate, 32.3% weak, 22.8% high and it was determined as 84.7% branched and 15.3% bush type. The body color of the genotypes was found as 49.5% green, 37.14% light green, 13.3% dark green (Table 1). Seymen (2010) had determined that, 59 (47.5%) of the confectionary pumpkin genotypes as erect, 49 (39.5%) genotype as semi-clutching and 16 (12.5) genotype as clutching. While 58 (46.7%) genotypes did not show branching, 66 (53.2) genotypes were observed, and 40 (32.2%) of these genotypes were semi-branching. When the stem color was examined, 23 (18.5%) of the genotypes were determined as light green, 28 (22.5%) dark green, and 73 (58.8%) green. Besides, Türkmen et al. (2016) determined the plant appearance of *C. pepo* genotypes as 37% erect, 31% semi-erect and 32% clutching, and branching status was 93% present and 7% absent. Leaf color was found as 64.7% green, 30.4% dark green, 4.7% light green, and leaf lobbing were determined as 1.9% low, 48.5% medium, 2.8% excess, 4.7% too much and 41.9% absent. The presence of the ring at the base of the crown was 81.9% absent, 18.0% present and the color of the ring at the crown base was 81.9% absent, 2.6% green-yellow and 13.3% green (Table 1). The fruit spot color was found to be green in 31.4%, orange in 7.6%, yellow in 0.9% and cream in 60% of the genotypes. It was determined that 73.3% of the genotypes was low, 24.7% dense, and 1.9% more spotted. In terms of fruit colors, the 19.0% of mature fruits was cream, 4.7% yellow, 0.9% green, 1.9% green-yellow, 4.7% dark-yellow, 28.6% light-yellow and 41.9% orange. The size of the mature fruits was 21.9% short, 38.0% medium and 40% long, while the diameter was 62.8% long, 35.23% medium and 3.8% narrow. The length to diameter ratio was determined as 58.0% round, 22.8% elliptical and 20% tall, while the size of the mature fruit was 14.2% large, 36.1% medium and 50.4% small (Table 2). In the study by Seymen (2010),

leaf color was determined as light green in 26 genotypes, dark green in 34 genotypes and green in 64 genotypes. Leaf lobbing was low in 54 genotypes, very low in 36 genotypes, medium in 16 genotypes and more in 18 genotypes. When the presence of a ring at the base of the crown was examined, while there was no ring at the base of the crown in 28 genotypes, rings were observed in 96 genotypes, while the ring color was yellow in 30 genotypes, 35 genotypes were green and 31 genotypes had a green-yellow ring color. It has been observed that our findings and Seymen's results are similar to the leaf color. But the leaf lobbing, the presence of the ring at the base of the crown, and the color of the ring at the base of the crown have different values compared to our study. It is thought that some incompatibilities may be related to the material used, the region and ecological differences and even the cultivation conditions. Türkmen et al. (2016) found that there is no leaf lobe in 3 genotypes, less in 37, medium in 32 and excess in 9. In our study, the seed color was found as 32.3% cream, 2.8% cream-dark cream, 48.5% light cream, 1.9% light cream-dark cream, 5.7% light cream-cream. Cracking ease of genotypes was found to be 60% difficult, 2.9% easy, 10.47% easy-difficult. They were taken seeds from one fruit between 73.5 and 418.8 g and 1000 grain weight was varied between 12.57 ± 0.40 and $131.02 \pm 15.5g$ (Table 3). Principal component analysis (PCA) provided a simplified classification of confectionary pumpkin genotypes for genetic diversity and breeding studies. PCA is based on the visualization of type projections on an axis or a series of axes that can best represent the relationship among types in a multidimensional field (Karaağaç, 2006). The PCA plot shows geometric distances reflecting similarities among genotypes in the table in terms of the measured variables.

According to these analysis, it was seen that genotypes were divided into 6 groups (Figure1). Group A contained two genotypes with PCA 1 negative and PCA 2 positive. Group B contained two genotypes with PCA 1 negative and PCA 2 positive. Group C included 12 genotypes with low PCA 1 and medium PCA 2 values. Group D contained two genotypes with PCA 1 negative and PCA 2 positive. Group F contained 17 genotypes with positive PCA1 and PCA2 values. Group E contained 66 genotypes with PCA 1 positive and negative and PCA 2 positive. Small genetic distance has been detected between genotypes 21 and 69. It has been observed that high diversity in terms of morphological characterization occurs in confectionary pumpkin genotypes. Martins et al. (2015) used 20 morphological features for the diversity of 54 *C. pepo*, 32 *C. maxima* and 21 *C. moschata* populations collected from the northern and center of Portugal. As a result of statistical analysis, they revealed the

difference at P<0.005 level for all characteristics except fruit thickness.

They revealed that these three species were separated in PCA and the total variation was 52.5%. Mladenovic et al. (2014), in their study to determine morphological characterization for 20 genotypes, showed that these genotypes were divided into 5 groups on the PCA axis as a result of principal component analysis. In a morphological characterization study conducted in 76 genotypes of *C. pepo* and *C. maxima* species; *C. pepo* included 10 genotypes classified as Cluster 1, while *C.*

maxima included 66 genotypes classified as Cluster 2. As a result of the PCA analysis, it was observed that 76 genotypes were divided into two groups and 66 *C. maxima* genotypes were separated from 10 *C. pepo* genotypes (Chao et al., 2013). The diversity of 64 *C. pepo* entries aimed at providing genetic improvement and application in Cucurbita breeding programs was analyzed using morphological markers. In principal component analysis (PCA), the 64 entries were clearly divided into two groups: a group of stemless seeds and a group of seeds covered with a shell (Yunli et al., 2020).

Table 1. Plant Appearance (A), Branching (B), Degree of The Branching (C), The Body Color (D), Leaf Color (E), Leaf Lobbing (F), The Presence of The Ring (G), The Collor of Thering (H)

Çizelge 1. Bitki Görünümü (A), Kol Atma (B), Kol Atma Derecesi (C), Gövde Rengi (D), Yaprak Rengi (E), Yaprak Lopluluğu (F), Halkanın Varlığı (G), Taç dibinde halkanın rengi (H)

Genotype Name	A	B	C	D	E	F	G	H
4	Erect	Present	Weak	Green	Green	Medium	Absent	-
5	Erect	Present	Medium	Light- Green	Light- Green	Medium	Present	Green- Yellow
11	Erect	Present	Weak	Light- Green	Yeşi	Absent	Present	Green- Yellow
17	Clutching	Absent	-	Dark- Green	Green	Absent	Absent	-
20	Erect	Present	Medium	Green	Green	Medium	Absent	-
21	Erect	Present	High	Light- Green	Green	Absent	Absent	-
22	Semi-Clutching	Absent	Weak	Green	Green	Absent	Absent	-
23	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	Absent	Absent	-
26	Erect	Present	High	Light- Green	Dark- Green	Absent	Present	Green
27	Erect	Present	Medium	Green	Green	Absent	Present	Green
28	Erect	Present	Medium	Light- Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
33	Erect	Present	High	Green	Green	Absent	Absent	-
37	Erect	Present	High	Green	Green	Absent	Absent	-
38	Erect	Present	Weak	Green	Green	Absent	Absent	-
41	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
42	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
43	Erect	Present	High	Green	Green	Medium	Absent	-
46	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Absent	Present	Green
47	Erect	Present	High	Light- Green	Green	Absent	Absent	-
49	Erect	Present	Medium	Light- Green	Dark- Green	Absent	Present	Green
50	Erect	Present	High	Green	Green	Absent	Absent	-
56	Erect	Present	Medium	Light- Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
58	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Medium	Absent	-
60	Erect	Present	Weak	Dark- Green	Green	Absent	Absent	-
64	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Medium	Present	Green

65	Erect	Present	Medium	Dark- Green	Green	Absent	Absent	-
66	Erect	Present	High	Green	Dark- Green	Medium	Absent	-
74	Erect	Present	High	Light- Green	Green	Absent	Absent	-
77	Erect	Present	Weak	Green	Green	Absent	Absent	-
78	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	Absent	Present	Green
83	Erect	Present	Weak	Light- Green	Green	Absent	Present	Green
85	Erect	Present	Weak	Green	Green	Absent	Absent	-
86	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Absent-Medium	Absent	-
87	Erect	Present	Weak	Light- Green	Dark- Green	Medium	Absent	-
88	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
89	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
90	Erect	Present	Medium	Green	Green	Absent	Absent	-
91	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Medium	Absent	-
92	Erect	Present	Weak	Light- Green	Dark- Green	Medium	Absent	-
93	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	Absent	Absent	-
94	Erect	Present	Medium	Dark- Green	Dark- Green	Medium	Absent	-
96	Erect	Present	High	Light- Green	Green	Absent	Absent	-
97	Erect	Present	High	Light- Green	Green	Absent	Absent	-
98	Erect	Present	High	Light- Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
99	Erect	Present	High	Green	Green	Medium	Absent	-
100	Erect	Present	Medium	Light- Green	Light- Green	Medium	Present	Green- Yellow
102	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	Absent	Absent	-
103	Erect	Present	Weak	Green	Dark- Green	Medium	Absent	-
105	Erect	Present	Medium	Dark- Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
109	Erect	Present	Medium	Dark- Green	Green	Absent	Absent	-
110	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
111	Erect	Present	Weak	Dark- Green	Green	High	Absent	-
112	Erect	Present	High	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
116	Erect	Present	High	Green	Green	Medium	Absent	-
118	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
120	Erect	Present	Medium	Dark- Green	Green	Absent	Absent	-
124	Erect	Present	Weak	Green	Green	Absent	Absent	-
125	Erect	Present	Weak	Light- Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
127	Erect	Present	Medium	Light- Green	Light- Green	Medium	Present	Green- Yellow
128	Erect	Present	Weak	Light- Green	Green	Medium	Present	Green
129	Erect	Present	Medium	Green	Dark- Green	High	Absent	-
130	Semi-C	Present	-	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
131	Erect	Present	Weak	Green	Light- Green	Medium	Absent	-

132	Erect	Present	Weak	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
133	Erect	Present	Weak	Green	Green	High	Absent	-
134	Erect	Present	High	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
137	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
138	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
144	Clutching	Absent	-	Green	Green	High	Absent	-
145	Erect	Present	High	Green	Green	High	Absent	-
146	Erect	Present	High	Dark- Green	Green	Absent	Absent	-
147	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
149	Clutching	Absent	Medium	Dark- Green	Light- Green	Medium	Absent	-
150	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	High	Absent	-
152	Clutching	Absent	-	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
153	Erect	Present	Medium	Green	Green	Low	Absent	-
154	Erect	Present	Medium	Green	Green	Low	Absent	-
155	Erect	Present	High	Green	Green	Absent	Absent	-
156	Erect	Present	Medium	Green	Green	Absent	Absent	-
157	Erect	Present	High	Green	Green	Absent	Absent	-
158	Clutching	Absent	-	Light- Green	Green	Absent	Absent	-
159	Clutching	Absent	-	Green	Dark- Green	Medium	Present	Green
161	Erect	Present	Medium	Green	Green	Absent	Absent	-
162	Erect	Present	Medium	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
164	Erect	Present	Medium	Green	Green	Absent	Absent	-
166	Erect	Present	Medium	Green	Green	Absent	Absent	-
169	Clutching	Absent	-	Green	Green	Absent	Present	Green
170	Clutching	Absent	-	Green	Dark- Green	Medium	Present	Green
174	Erect	Present	High	Green	Green	Medium	Absent	-
175	Erect	Present	High	Green	Dark- Green	Medium	Absent	-
176	Erect	Present	High	Dark- Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
177	Erect	Present	Weak	Light- Green	Green	Medium	Absent	-
178	Clutching	Absent	-	Light- Green	Green	Medium	Present	Green- Yellow
179	Clutching	Absent	-	Green	Green	Medium	Absent	-
180	Clutching	Absent	-	Green	Green	Absent	Present	Green
183	Erect	Present	Medium	Light- Green	Dark- Green	Medium	Absent	-
184	Erect	Present	High	Green	Green	Absent	Absent	-
187	Erect	Present	Weak	Green	Green	Medium	Absent	-
188	Clutching	Absent	-	Light- Green	Green	Absent	Present	Green
189	Clutching	Absent	-	Dark- Green	Dark- Green	Absent	Present	Green
190	Clutching	Absent	-	Dark- Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
191	Clutching	Absent	-	Dark- Green	Dark- Green	Absent	Absent	-
192	Erect	Present	Medium	Green	Green	Absent	Absent	-

196	Erect	Present	Medium	Green	Green	Medium	Absent	-
198	Clutching	Absent	-	Green	Dark-Green	Medium	Absent	-

Table 2. Fruit Spot Color (A), Spotted dence (B), Mature Fruits Color (C), Mature Fruits Length (D), Mature Fruits Diameter (E), The Length to Diameter Ratio (F), Size of The Mature Fruit (G)

Çizelge 2. Meyve Benek Rengi (A), benek yoğunluğu (B), olgun meyvelerde renk (C), tohumluk meyvenin boyu (D), tohumluk meyvenin çapı (E), tohumluk meyvenin boy çap oranı (F), tohumluk meyvenin iriliği (G)

Genotype Name	A	B	C	D	E	F	G
4	Cream	Low	Cream	Long	Long	Round	Medium
5	Cream	Low	Cream	Long	Long	Round	Medium
11	Green	Dense	Orange	Short	Long	Elliptical	Medium
17	Cream	Low	Orange	Short	Long	Round	Medium
20	Orange	Low	Orange	Long	Medium	Long	Medium
21	Green	Low	Orange	Short	Long	Round	Medium
22	Green	Dense	Orange	Long	Medium	Long	Smal
23	Cream	Low	Light-Yellow	Long	Long	Long	Medium
26	Cream	Low	Cream	Long	Narrow	Long	Medium
27	Cream	Low	Light- Yellow	Short	Medium	Elliptical	Large
28	Cream	Low	Light-Yellow	Long	Long	Long	Smal
33	Cream	Low	Light- Yellow	Long	Long	Elliptical	Smal
37	Cream	Low	Light- Yellow	Long	Long	Elliptical	Smal
38	Green	Low	Green-Yellow	Long	Long	Long	Smal
41	Cream	Low	Dark-Yellow	Medium	Long	Elliptical	Medium
42	Cream	Low	Light- Yellow	Long	Medium	Long	Smal
43	Cream	Dense	Light- Yellow	Long	Long	Round	Smal
46	Cream	Low	Cream	Long	Long	Round	Smal
47	Cream	Low	Orange	Medium	Medium	Round	Medium
49	Cream	Low	Cream	Medium	Long	Round	Smal
50	Green	High	Orange	Short	Long	Round	Medium
56	Cream	Low	Light- Yellow	Medium	Medium	Elliptical	Medium
58	Cream	Low	Orange	Long	Long	Elliptical	Smal
60	Green	Dense	Green-Yellow	Medium	Long	Round	Smal
64	Cream	Low	Light- Yellow	Short	Long	Round	Large
65	Green	Dense	Orange	Short	Long	Round	Large
66	Orange	Dense	Light- Yellow	Short	Long	Round	Smal
74	Green	Low	Orange	Medium	Long	Round	Smal
77	Cream	Low	Cream	Long	Medium	Elliptical	Smal
78	Cream	Low	Light- Yellow	Medium	Medium	Round	Medium
83	Cream	Low	Cream	Long	Long	Elliptical	Smal
85	Cream	Dense	Cream	Medium	Long	Elliptical	Smal
86	Cream	Low	Orange	Short	Long	Round	Medium
87	Cream	Low	Light- Yellow	Medium	Medium	Elliptical	Smal
88	Cream	Low	Light- Yellow	Short	Dar	Long	Large
89	Cream	Low	Orange	Medium	Medium	Round	Smal
90	Green	Dense	Orange	Long	Medium	Long	Smal
91	Cream	Low	Cream	Long	Long	Long	Smal
92	Cream	Dense	Light- Yellow	Long	Long	Round	Smal
93	Green	Dense	Orange	Long	Medium	Long	Medium
94	Cream	Low	Orange	Long	Long	Elliptical	Medium
96	Cream	Dense	Light- Yellow	Long	Medium	Long	Large
97	Cream	Low	Yellow	Long	Medium	Long	Medium
98	Green	Dense	Orange	Short	Dar	Elliptical	Large
99	Cream	Low	Light- Yellow	Long	Medium	Elliptical	Smal
100	Cream	Low	Light- Yellow	Long	Long	Round	Smal
102	Cream	Low	Cream	Short	Long	Round	Medium

103	Cream	Low	Orange	Long	Long	Elliptical	Smal
105	Cream	Low	Orange	Long	Long	Elliptical	Smal
109	Cream	Low	Light- Yellow	Medium	Long	Round	Medium
110	Cream	Low	Yellow	Medium	Long	Round	Smal
111	Green	Dense	Orange	Medium	Long	Round	Smal
112	Cream	Low	Light- Yellow	Short	Long	Round	Large
116	Green	Dense	Orange	Short	Long	Round	Medium
118	Cream	Low	Light- Yellow	Long	Medium	Long	Medium
120	Green	Dense	Orange	Short	Long	Round	Medium
124	Cream	Low	Light- Yellow	Short	Long	Round	Large
125	Cream	Low	Light- Yellow	Medium	Medium	Round	Medium
127	Cream	Low	Cream	Long	Long	Round	Medium
128	Cream	Low	Light- Yellow	Medium	Medium	Round	Smal
129	Cream	Low	Cream	Short	Long	Round	Medium
130	Green	Low	Orange	Long	Medium	Long	Smal
131	Cream	Low	Light- Yellow	Short	Long	Round	Smal
132	Yellow	Low	Orange	Short	Medium	Round	Medium
133	Cream	Low	Cream	Medium	Medium	Round	Large
134	Green	Dense	Dark-Yellow	Medium	Long	Round	Smal
137	Orange	Low	Orange	Long	Medium	Elliptical	Smal
138	Cream	Low	Light- Yellow	Long	Long	Round	Smal
144	Green	High	Dark-Yellow	Medium	Medium	Round	Large
145	Green	Low	Orange	Medium	Medium	Round	Smal
146	Green	Dense	Orange	Medium	Medium	Elliptical	Medium
147	Green	Low	Yellow	Medium	Medium	Elliptical	Smal
149	Green	Dense	Orange	Short	Long	Round	Medium
150	Green	Dense	Orange	Medium	Long	Round	Smal
152	Cream	Low	Light- Yellow	Long	Long	Long	Large
153	Cream	Low	Yellow	Short	Long	Round	Medium
154	Green	Dense	Orange	Long	Long	Elliptical	Smal
155	Cream	Low	Cream	Medium	Medium	Elliptical	Medium
156	Green	Low	Dark-Yellow	Long	Long	Long	Large
157	Cream	Low	Light- Yellow	Medium	Medium	Elliptical	Medium
158	Cream	Low	Light- Yellow	Medium	Long	Round	Medium
159	Green	Dense	Orange	Medium	Medium	Round	Medium
161	Cream	Low	Cream	Medium	Long	Round	Medium
162	Green	Dense	Orange	Long	Medium	Long	Smal
164	Cream	Low	Dark-Yellow	Long	Long	Long	Large
166	Green	Low	Orange	Medium	Medium	Round	Smal
169	Cream	Low	Cream	Long	Long	Long	Smal
170	Green	Dense	Orange	Medium	Long	Round	Smal
174	Green	Dense	Green	Medium	Long	Round	Smal
175	Cream	Low	Cream	Medium	Long	Round	Medium
176	Cream	Low	Dark-Yellow	Short	Long	Round	Medium
177	Orange	Low	Orange	Medium	Long	Round	Medium
178	Green	Dense	Orange	Short	Medium	Round	Large
179	Green	Low	Orange	Long	Long	Round	Smal
180	Cream	Low	Cream	Medium	Long	Round	Smal
183	Green	Low	Orange	Medium	Medium	Round	Large
184	Orange	Low	Orange	Medium	Long	Round	Smal
187	Green	Dense	Orange	Medium	Medium	Elliptical	Medium
188	Cream	Low	Cream	Long	Medium	Long	Smal
189	Cream	Low	Orange	Long	Long	Round	Smal
190	Cream	Low	Yellow	Medium	Long	Round	Smal
191	Orange	Low	Orange	Medium	Long	Round	Smal

192	Orange	Low	Orange	Medium	Long	Round	Smal
196	Orange	Low	Orange	Medium	Medium	Elliptical	Smal
198	Cream	Low	Cream	Long	Long	Round	Smal

Table 3. Seed Weight (g), 1000 Seed Weight (g), Seed Color, Cracking Ease

Çizelge 3. Tohum Ağırlığı (g), 1000 Tohum Ağırlığı (g), tohum Rengi, Çıtlama Kolaylığı

Genotype Name	Seed Weight (gram)	1000 Grain Weight (gram)	Seed Color	Cracking Ease
4	281.84±22.47	78.10±1.34	Light Cream	Difficult
5	236.46±17.85	74.58±23.11	Light Cream	Difficult
11	193.88±34.78	47.79±5.50	Light Cream	Easy
17	187.08±39.59	16.08±2.77	Light Cream	Easy
20	213.33±40.940	95.27±23.45	Light Cream	Difficult
21	183.91±11.44	64.21±10.06	Cream	Difficult
22	281.53±58.68	72.41±18.66	Cream	Difficult
23	190.04±37.50	65.01±3.54	Cream	Difficult
26	126.64±21.22	34.34±4.48	Cream	Easy
27	300.43±19.61	38.54±3.89	Cream	Difficult
28	302.66±11.38	62.52±1.78	Light Cream	Easy
33	280.17±446.11	131.02±15.5	Light Cream-Cream	Easy
37	244.11±30.01	44.59±3,24	Dark Cream	Easy
38	163.34±5.19	70.23±6.91	Dark Cream	Easy
41	156.94±4.28	44.70±3.3	Cream	Easy
42	158.35±28.21	40.95±2.22	Light Cream	Easy-Difficult
43	181.64±41.41	37.15±21.52	Light Cream	Easy
46	301.14±76.19	79.25±2.86	Dark Cream	Easy-Difficult
47	102.35±22.30	38.27±0.06	Light Cream	Easy
49	236.26±25.63	82.12±1.50	Light Cream	Easy
50	186.40±27.18	61.78±18.92	Cream	Difficult
56	231.44±21.52	39.30±0.49	Light Cream	Easy
58	135.54±30.02	77.11±2.04	Cream	Difficult
60	200.68±14.28	36.98±7.54	Cream	Easy
64	190.78±33.30	37.40±0.79	Light Cream	Easy-Difficult
65	204.85±28.86	34.39±13.86	Light Cream	Difficult
66	189.75±18.07	72.19±8.62	Cream	Easy
74	180.56±86.40	23.28±0,20	Light Cream	Difficult
77	332.20±97.86	60.43±10.91	LightCream-Dark Cream	Difficult
78	273.54±21.00	30.70±0.49	Light Cream	Easy
83	90.30±11.03	62.56±7.55	Light Cream	Easy-Difficult
85	251.46±65.12	46.25±22.67	Cream	Difficult
86	200.80±13.73	14.29±0.20	Light Cream	Easy
87	228.58±42.87	34.66±3.94	Light Cream	Difficult
88	252.52±17.32	72.26±8.66	Light Cream	Easy
89	272.50±15.59	54.58±3.83	Cream	Difficult
90	225.94±6.60	54.57±11.22	Light Cream	Difficult
91	205.97±27.11	35.29±1.04	Light Cream	Easy
92	266.34±37.97	37.16±0.49	Light Cream	Easy
93	166.30±32.22	83.54±5.72	Light Cream	Difficult
94	275.54±1.21	44.98±13.27	Light Cream	Easy-Difficult
96	227.54±1.78	22.59±22.34	Light Cream-Cream	Easy-Difficult
97	195.76±8.04	41.53±1.08	Light Cream	Difficult
98	118.62±9.54	82.12±1.50	Light Cream	Easy
99	334.42±26.24	59.17±0.58	Cream	Easy
100	228.32±18.28	12.57 ±0.40	Cream	Easy
102	93.38±17.71	16.08±18.56	Cream	Difficult
103	141.08±25.32	34.46±13.06	Light Cream-Cream	Difficult
105	234.11±9.54	47.44±5.25	Cream	Difficult
109	311.50±26.24	91.52±9.62	Light Cream-Cream	Easy-Difficult
110	252.70±21.15	129.84±6.59	Dark Cream	Difficult

111	229.92±13.97	43.90±2.75	Dark Cream	Difficult
112	180.24±15.30	29.67±6.83	Light Cream	Difficult
116	178.32±11.76	107.17±5.07	Light Cream	Easy
118	183.36±17.33	68.90±6.29	Cream	Difficult
120	254.52±12.01	40.18±11.40	Cream	Easy
124	239.81±28.92	50.16±0.11	Cream	Difficult
125	240.90±7.32	77.21±12.50	Cream	Easy
127	202.66±32.47	79.8±1.50	Light Cream	Difficult
128	203.30±27.45	91.52±3.82	Light Cream	Difficult
129	200.60±26.38	81.26±5.25	Cream	Difficult
130	418.84±32.47	75.83±14.73	Cream-Dark Cream	Easy-Difficult
131	283.28±30.26	29.75±0,50	Light Cream-Cream	Easy-Difficult
132	248.67±25.40	75.81±2.95	Light Cream	Difficult
133	249.12±30.60	72.04±4,90	Cream	Difficult
134	323.46±28.95	86.09±4,30	Light Cream	Difficult
137	246.97±18.46	83.49±2.46	Cream	Difficult
138	333.02±26.24	105.23±2.20	Light Cream	Easy
144	368.36±62.52	85.13±11.77	Cream-Dark Cream	Difficult
145	232.12±13.97	72.60±13.62	Cream	Difficult
146	239.96±87.30	55.44±11.85	Light Cream	Difficult
147	295.04±9.54	73.33±2.12	Light Cream	Difficult
149	284.56±49.58	92.53±2.91	Light Cream Dark Cream	Easy-Difficult
150	295.36±31.84	75.61±3.96	Light Cream	Difficult
152	184.62±1.83	106.68±6.25	Cream	Difficult
153	332.28±67.42	106.62±4.67	Light Cream	Difficult
154	275.52±10.87	26.45±4.55	Light Cream	Difficult
155	299.63±58.18	117.24±5.11	Light Cream	Difficult
156	142.18±39.25	78.66±2.91	Dark Cream	Difficult
157	221.83±31.84	91.18±7.90	Light Cream	Difficult
158	188.18±62.91	96.39±7.45	Light Cream	Difficult
159	73.50±29.82	32.14±2.10	Light Cream	Easy
161	183.76±32.01	16.33±0.49	Cream	Difficult
162	301.74±30.01	79.73±6.88	Cream	Difficult
164	246.74±73.5	50.43±6.03	Dark Cream	Difficult
166	240.28±26.81	78.32±11.33	Light Cream	Difficult
169	318.86±60.81	113.42±0.80	Light Cream-Cream	Difficult
170	286.88±33.05	76.14±1.04	Light Cream	Easy
174	203.62±28.48	81.47±1.10	Cream	Difficult
175	201.26±48.69	101.57±0.28	Cream	Difficult
176	255.31±26.81	57.89±0.58	Light Cream	Easy
177	288.43±2.55	50.41±0.28	Light Cream	Difficult
178	225.40±0.89	112.26±8.67	Cream	Difficult
179	217.52±46.08	93.87±17.66	Light Cream	Easy
180	296.24±29.14	109.65±6.11	Cream	Difficult
183	235.92±17.96	63.93±2.77	Cream	Easy
184	225.81±12.38	10.88±0.61	Cream	Difficult
187	280.91±3.50	98.70±16.25	Cream-Dark Cream	Difficult
188	140.06±25.39	128.62±0.270	Light Cream	Difficult
189	259.85±5.78	53.44±4.63	Light Cream	Difficult
190	181.72±53.01	60.02±25.04	LightCream-DarkCream	Difficult
191	205.24±12.13	31.66±1.02	Light Cream	Difficult
192	259.85±28.35	64.07±11.97	Light Cream	Easy-Difficult
196	181.72±11.97	99.96±11.97	Dark Cream	Difficult
198	205.24±22.58	85.42±4.44	Cream	Difficult
Average	229.65	63.77		

CONCLUSION

As a result, it has been determined that confectionary pumpkin genotypes are at a promising level and it is

possible to develop confectionary pumpkin varieties for different regions and ecological conditions. The data obtained will be an important resource and guide for

upcoming studies on genetic diversity in confectionary pumpkin.

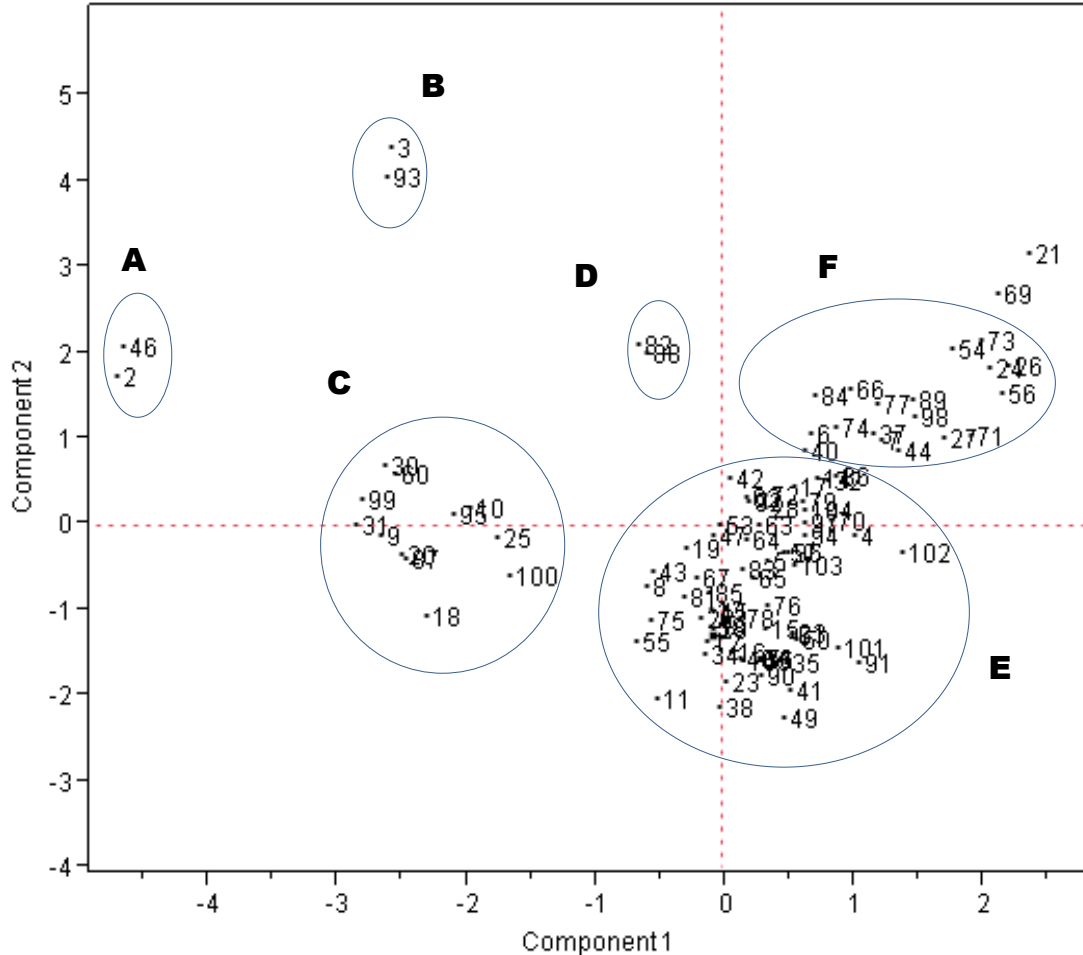


Figure 1. Two dimensional graphic obtained from principal component analysis with morphological data
Şekil 1. Morfolojik verilerle yapılan temel bileşen analizi sonucu elde edilen iki boyutlu grafik

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Selcuk University Scientific Research Projects Office (project number: 16201061). This article was produced from Necibe Kayak's M. Sc thesis "Morphological and molecular (SSR) characterization and determination of heterotic effects in confectionary pumpkin genotypes".

Researchers' Contribution Rate Statement Summary

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

Conflict of Interest Statement

The article authors declare that they do not have any conflict of interest.

REFERENCES

- Abak K, Sarı N, Çetiner B 1997. Changes of protein, fat content, and fatty acid composition in naked pumpkin seeds influenced by sowing time. First International Symposium on Cucurbits 20-23 May 1997, Adana Turkey.
- Alkan B B 2011. Çok Değişkenli İstatistiksel Yöntemlerde Biplot Tekniği. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İstatistik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 111 sy.
- Chao L, Yu G, Dong-Jie W, Xue L, Xiao-Xia Y, Cui C S, Shu-Ping Q 2013. Morphological and Molecular Diversity in A Germplasm Collection of Seed Pumpkin. *Scientia Horticulturae* 154: 8-16.
- Çakır F 1994. Karşılıklı Bağlılığının Ölçülmesinde Kümeleme Analizi ve Bir Uygulama. Marmara Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 99 sy.

- Ermış S 2010. Ekolojinin Kabuklu Ve Kabuksuz Çekirdek Kabak (*Cucurbita Pepo* L.) Hatlarında Tohum Verimi ve Çerezlik Kalitesine Etkisi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 165 sy.
- Karaağaç O 2006. Bafra Kırmızı Biber Gen Kaynaklarının (*Capsicum annuum* var. *conoides* Mill) Karakterizasyonu ve Değerlendirilmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 141 sy.
- Karaağaç O, Balkaya A 2010. Bafra Kırmızı Biber Populasyonları (*Capsicum annuum* L. var. *conoides* (Mill.) Irish) Tanımlanması ve Mevcut Varyasyonun Değerlendirilmesi. Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi 25(1): 10-20.
- Martins S, Pinto O, Carlos C, Carvalho de R, Carnide V 2015. Assessing genetic diversity in landraces of *Cucurbita* spp. using a morphological and molecular approach. *Procedia Environmental Sciences* 29: 68-69.
- Mladenovic E, Berenji J, Ognjanov V, Ljubojevic M, Cukanovic J, Salamun T 2014. Genetic Diversity in A Collection of Ornamental Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Genetika-Belgrade* 46: 199-207.
- Robinson R W, Decker-Walters D S 1997. Cucurbits In: Crop Production. *Science in Horticulture's Series* 0-85199-133-5 226p.
- Seymen M 2010. Çerezlik Kabaklarda (*Cucurbita pepo* L.) Tüketici İsteklerine Uygun Genotiplerin Seçimi. Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 62sy.
- Soltani F, Karimi R, Kashi A 2016. Estimation of Genetic Diversity in *Cucurbita* Species Using Morphological and Phytochemical Analysis. *International Journal of Vegetable Science* 23(1):42-53.
- Türkmen Ö, Uslu N, Paksoy M, Seymen M, Fidan S, Özcan M M 2015. Evaluation of fatty acid composition, oil yield, and total phenol content of various pumpkin seed genotypes. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse* 92(2):93-97.
- Türkmen Ö, Seymen M, Fidan S, Paksoy M 2016. Morphological Parameters and Selection of Turkish Edible Seed Pumpkins *Cucurbita pepo* L. Germplasm. *World Academy of Science, Engineering and Technology International Journal of Agricultural and Biosystems Engineering* 10(5): 283-290.
- UPOV 2002. Vegetable Marrow, Squash (*Cucurbita pepo* L.). *International Union for The Protection of New Varieties Of Plants*.
- Yunli W, Yangyang W, Wenlong X, Chaojie W, Chongshi C, Shuping Q 2020. Genetic Diversity Of Pumpkin Based On Morphological and SSR Markers. *Pak. J. Bot.* 52(2): 477-487.
- Ward J H 1963. Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function. *Journal of the American Statistical Association* 58:236-244.



Influence of Chloride on Growth, Fruit Yield and Quality Parameters of Processing Pepper

Ahmet TURHAN¹, Neşe ÖZMEN²

¹Bursa University of Uludag, Mustafakemalpaşa Vocational School, Department of Plant and Animal Production, 16500, Bursa, Turkey, ²Bursa University of Uludag, Mustafakemalpaşa Vocational School, Department of Food Processing, 16500, Bursa, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0002-1976-8082>, ²<https://orcid.org/0000-0001-5244-6256>,

✉: turhan@uludag.edu.tr

ABSTRACT

This study was carried out to investigate the effects of irrigation water containing different Cl⁻ on plant growth parameters, fruit yield and quality characteristics of pepper (*C. annuum* L. cv. Postal Capija). Nutrient solutions containing Cl⁻ concentrations were applied to processing pepper plants and effects of Cl⁻ on growth parameters, fruit yield and quality traits, leaf water potential and chloride contents were determined. Greenhouse experiments were conducted with the Cl⁻ concentrations [control (0.27), 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 and 15.0 mM] were applied to pepper plants. Plant height, fresh and dry weight, fruit yield and fruit weight, length and diameter were not affected by increasing Cl⁻ concentrations up to 3.0 mM, but further increases in Cl⁻ concentration negatively influenced this results. The greatest dry matter and soluble solids content were obtained from 3.0 and 4.5 mM Cl⁻ treatments. Increasing Cl⁻ concentration increased fruit acid content; the greatest acid content was from the greatest Cl⁻ concentration. Increasing growing media Cl⁻ concentration increased leaf Cl⁻ accumulation and Cl⁻ concentration >3.0 mM reduced leaf water potential. Research results showed that Cl⁻ concentrations in irrigation water are important for efficient and economical pepper cultivation, and using water containing more than 3.0 mM chlorine will jeopardize yield and quality.

Research Article

Article History

Received : 25.12.2020

Accepted : 21.03.2021

Keywords

Capsicum annuum

Chlorinated water

Water soluble solids

Total acidity

Klor Uygulamalarının Biber Bitkisinin Gelişimi, Meyve Verimi ve Bazı Kalite Parametreleri Üzerine Etkisi

ÖZET

Bu çalışmada, salçalık biber (*C. annuum* L. cv. Postal Capija) bitkilerine farklı Cl⁻ içeren besin solüsyonları uygulanmış ve biberin büyüme parametreleri, meyve verim ve kalite özellikleri, yaprak su potansiyeli ve klor içerikleri araştırılmıştır. Sera şartlarında yapılan araştırma tesadüf parselleri deneme desenine uygun ve dört tekerrürlü olarak planlanmış, bitkilere yedi farklı Cl⁻ [kontrol (0.27), 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5 and 15.0 mM] uygulaması yapılmıştır. Sonuçlar, Cl⁻ konsantrasyonunun 3.0 mM'e kadar yükselmesinden; büyüme parametreleri (bitki boyu, bitki yaş ve kuru ağırlığı) meyve verimi ve meyve karakteristiklerinin (meyve ağırlığı, meyve çap ve boyu) etkilenmediğini, ancak bu seviyenin üzerinde artan Cl⁻ konsantrasyonlarının söz konusu değerleri olumsuz etkilediğini göstermiştir. En yüksek meyve kuru madde ve suda çözünür kuru madde içerikleri 3.0 and 4.5 mM Cl⁻ uygulamalarında tespit edilmiştir. Buna karşın, Cl⁻ konsantrasyonlarındaki artış meyve asit içeriklerini de arttırmış ve en yüksek asit içeriği yüksek Cl⁻ uygulamasında bulunmuştur. Yetiştirme ortamında artan Cl⁻, yapraklarda daha fazla Cl⁻ birikmesine neden olmuş, (>3.0 mM) yaprak su potansiyelini ise düşürmüştür. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, besin solüsyonu Cl⁻ kapsamındaki artışların bitki büyümesi, verim ve meyve özelliklerinde önemli azalmalara neden olabileceğini, biberlerin sulanmasında kullanılan solüsyonun Cl⁻ kapsamının da dikkate alınmasının ne kadar gerekli olduğunu göstermiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 25.12.2020

Kabul Tarihi : 21.03.2021

Anahtar Kelimeler

Capsicum annuum,

Klorlu su,

Suda çözünür kuru madde,

Toplam asitlik

To Cite : Turhan A, Ozmen N 2021. Influence of Chloride on Growth, Fruit Yield and Quality Parameters of Processing Pepper. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1139-1144. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.846945.

INTRODUCTION

Chloride plays a role in photosynthesis and water balance in plants and is an essential micro-nutrient for plant growth and development (Chen et al., 2010). Vegetables crops generally have a low Cl⁻ requirement and low levels are up taken from the soil. Chloride may have toxic effects at relatively low concentrations and may result in irreversible damages in plants (Welch, 1995).

Water with different Cl⁻ concentrations is commonly used in irrigation of plants (Narkis et al., 1995; Rav Acha et al., 1995). Chloride ions are the most common toxic element encountered in irrigation water. Chlorine is not adsorbed by soil colloids, moves easily with soil water, and easily up taken by roots and transferred to leaves (Ayers and Westcot, 1985; Al Obaidy et al., 2014).

Chloride may intrude into ground waters from decomposition, seepage through sedimentary rocks, saline water intrusion into soils, wind-drifted salts, domestic and industrial wastewater discharges, and municipal wastewaters (Karanth, 1987; Hadian et al., 2015). Plants could be exposed to greater quantities of chlorine because of increasing use of chlorinated domestic and industrial wastewaters in agriculture. Treated wastewater effluents can be used in irrigation (Narkis and Kott, 1991; Rav Acha et al., 1995). Irrigation water is among the primary Cl⁻ sources in soils (Karaivazoglou et al., 2005). Irrigation water Cl⁻ concentrations of <70 mg L⁻¹ improves plant yield (As et al., 2007; Smith et al., 2016). Ground water with Cl⁻ contents up to 70 mg·L⁻¹ is suitable for irrigation and does not pose serious threats to production. Chloride concentration over 350 mg·L⁻¹ may result in toxic effects. Chloride ion concentrations in ground waters, used in irrigation, are between 0.70-153.55 me·L⁻¹ and allowable limit for irrigation waters is 11.54 me·L⁻¹ (Adhikary et al., 2014).

The red pepper (*Capsicum annum* L.), 'Postal Capija', is used in pepper paste production, roasted and oiled pepper production (Hekimoglu and Altindoger, 2019). This study was conducted to investigate effects of Cl⁻ concentration in irrigation water on plant growth, fruit yield and quality of pepper.

MATERIAL and METHODS

The experiments were conducted in a plastic-covered greenhouse of the Mustafakemalpaşa Vocational School of Uludağ University in Bursa, Turkey (latitude of 40°01' N, at longitude 28°22' E with an altitude of 22 m above sea level), from May-August 2020. 'Postal Capija' pepper seedlings were supplied from a commercial producer (Marmara Seedling Product.

Agri. Industry Trade Ltd. Co., Bursa, Turkey). The experiment was arranged in a completely randomized design with 4 replications. Three plastic pots (height 40 cm, diameter 30 cm) were used in each replicate and a single plant was maintained in each pot. Pots were filled with 25 kg of air-dried sand-clay-loam soil (60% sand, 21% clay, 19% silt, 1.3% organic matter, 10.3% lime, 35.6 mg L⁻¹ phosphorus, 355.20 mg L⁻¹ potassium, 0.09% total nitrogen, pH = 7.4, EC= 0.49 dS·m⁻¹, field capacity FC= 25%, permanent wilting point PWP = 13% and bulk density 1.23 g·cm⁻³). Soils were passed through a 4 mm sieve before being placed in pots. Holes, over laid with a 5 cm sand-gravel mix, were provided to facilitate drainage of excess water. Pepper seedlings were planted in pots on 20 May. Throughout the growing season, average temperature under the high tunnel was 26.4°C and average relative humidity 66.2%. Cultural processes described by Salk et al. (2008) were practiced, herbicides were not applied and weeds were controlled manually.

Nutrient solution (Hoagland and Arnon, 1950) was used in irrigations during the initial 10 days, and then experimental treatments were applied. In the control, nutrient solution with 9.5 mg·L⁻¹ (0.27 mM) Cl⁻ content was applied and additional chloride was not applied. In chlorine treatments, the Cl⁻ levels were: 1.5 mM (53.18 mg·L⁻¹), 3.0 mM (106.35 mg·L⁻¹), 4.5 mM (159.53 mg·L⁻¹), 6.0 mM (212.70 mg·L⁻¹), 7.5 mM (265.88 mg·L⁻¹), and 15.0 mM (531.75 mg·L⁻¹). Chloride concentrations were prepared with sodium hypochlorite (NaOCl). In all treatments, Cl⁻ was added to nutrient solution, mixed, and applied to soil in pots as a drench. Pots were covered with polyethylene to reduce evaporative losses. Irrigation was initiated based on evaporation from Class-A pan and pan coefficient was 1.0 (Kırnak et al., 2002). Irrigations were generally twice a week.

Plant height was measured just before harvest from the root collar to the apical growing tip. In control, and Cl⁻ treatments, plants were removed at the end of the experiment. Plants were cleaned with water and separated into roots, stems and leaf sections. All sections were weighed to determine fresh weights. Samples were placed in a forced air oven at 80°C for 48 h and reweighed to determine plant dry weights.

Fruit harvested from each treatment were weighed and average fruit weight determined. Ten fruit were randomly selected from each treatment and fruit diameter and length. To determine fruit yield per plant fully-ripened (full-red color) fruit were harvested on 14, 25 and 31 August and weighed, and summed to determine total yield.

For leaf Cl⁻ content, water-extracted dry leaf samples were stained with potassium chromate indicator and

titrated with AgNO₃ (Chapman and Pratt, 1961). Leaf water potential was determined following Sairam et al. (2002). Mature leaf samples collected between 14.00-14.30 were used. Four disc samples (1.5 cm dia) were removed from leaves, fresh weight of leaf discs were determined, samples were placed into 100 mL distilled water for 4 h and turgor weight determined. Leaf samples were placed in a forced air oven at 65°C for 48 h and reweighed to determine leaf relative water contents.

Eight fruit were randomly sampled from each replicate of each treatment. Samples were washed with tap water, and rinsed in distilled water. Seed were removed and samples ground. Resultant fruit pulp was placed in a forced air oven at 80°C for 48 h to obtain fruit dry matter content. Soluble solids content (SSC) of fruit juice was measured with a refractometer (Abbe-

type refractometer, model 60/DR, Bellingham & Stanley Ltd., Kent, UK). Total acidity was determined through titration with 0.1 N NaOH (Anonymous, 1968).

Data were subjected to analysis of variance in SPSS (SPSS® Statistics for Windows, ver. 20.0, IBM Corp., Armonk, NY). Means were separated with use Duncan's multiple range test. Regression analysis was performed on the relationships between Cl⁻ concentrations and growth parameters, yield and fruit characteristics in pepper.

RESULTS and DISCUSSION

Increasing Cl⁻ concentrations affected growth of plants. There was a good negative linear relationship between plant height, plant fresh weights, plant dry weights and Cl⁻ concentration (Figure 1).

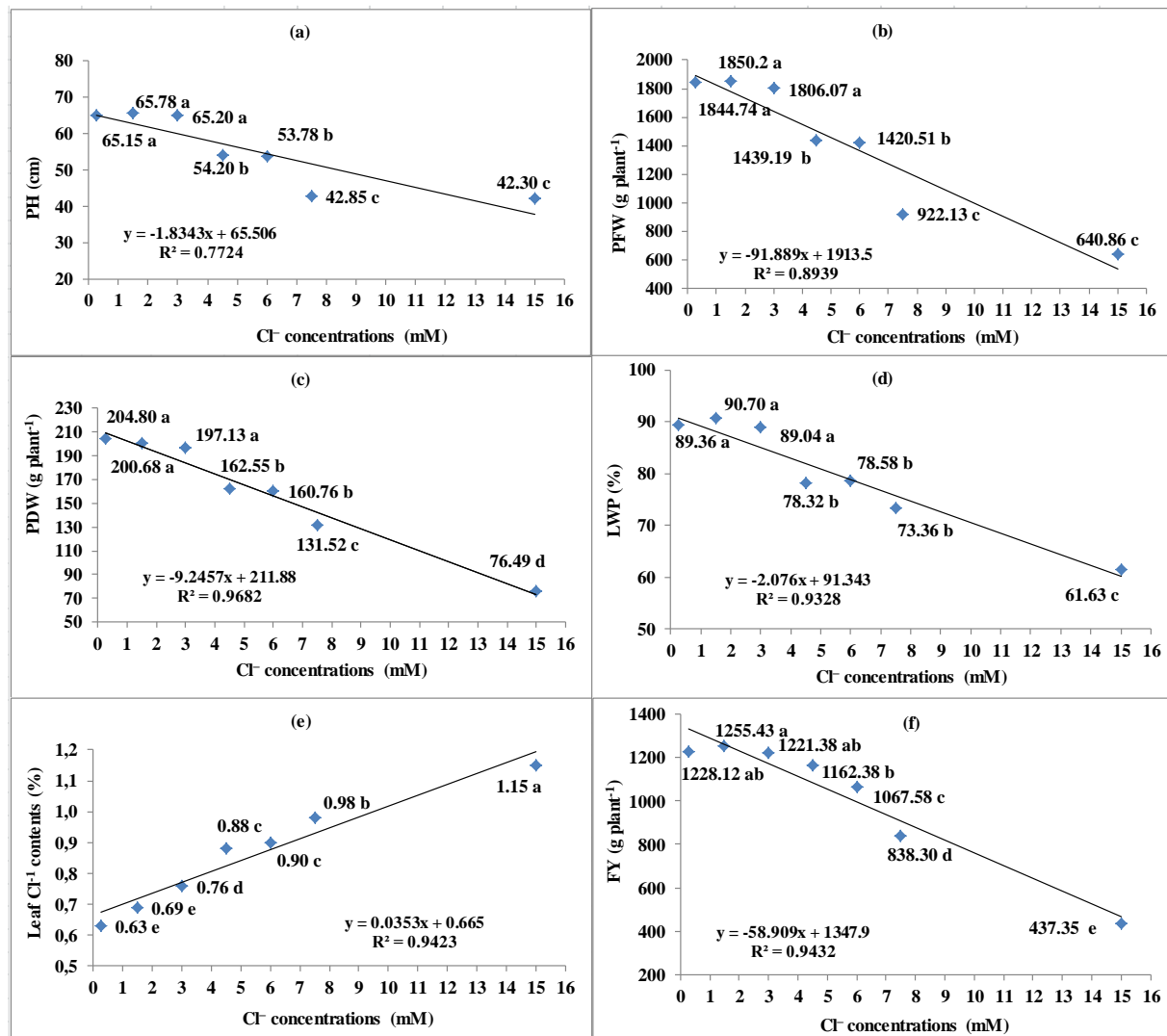


Figure 1. Effect of irrigation water chloride concentrations on pepper plant growth, leaf water potential and chloride content, yield.

Şekil 1. Sulama suyu klor konsantrasyonlarının biber bitkisinin büyümesi, yaprak su potansiyeli ve klorür içeriği, verim üzerine etkisi

As: PH plant height (a), PFW plant fresh weight (b), PDW plant dry weight (c), LWP leaf water potential (d), Cl⁻ chloride (e), FY fruit yield (f)

Plant height, plant fresh and dry weights were not influenced by Cl⁻ concentrations up to 3.0 mM level, but further increases in Cl⁻ concentration reduced responses. Plant fresh and dry weights were higher at 3.0 mM Cl⁻ than at 15.0 mM Cl⁻. Chlorine can have an inhibitor role on plant growth (Navarro et al., 2000; Scholberg et al., 2000).

The growing media Cl⁻ concentrations was well correlated with leaf relative water contents, (Figure 1). Decreasing leaf water contents occurred with increasing Cl⁻ concentrations. Concentrations of Cl⁻ up to 3.0 mM did not affect leaf water potential, but further increases in Cl⁻ concentrations reduced leaf water potentials which agrees with Turhan and Kuseu (2019) indicating reduced leaf water potentials

negatively affect conditions within the root zone.

Leaf Cl⁻ content was positively influenced by increasing Cl⁻ level. Increasing leaf Cl⁻ contents occurred with increasing irrigation water Cl⁻ concentrations (Figure 1) which agrees with Komosa and Gorniak (2015) and Kowalczyk et al. (2008). The greatest leaf Cl⁻ content was from the 15.0 mM treatment. Decreasing nutrient solution Cl⁻ concentration reduced leaf Cl⁻ contents and the lowest leaf Cl⁻ contents were observed in the control and 1.5 mM Cl⁻ treatments. Increasing growing media Cl⁻ concentrations increased plant Cl⁻ uptake and reduced uptake of the other nutrients through antagonistic effects (Shawer, 2014).

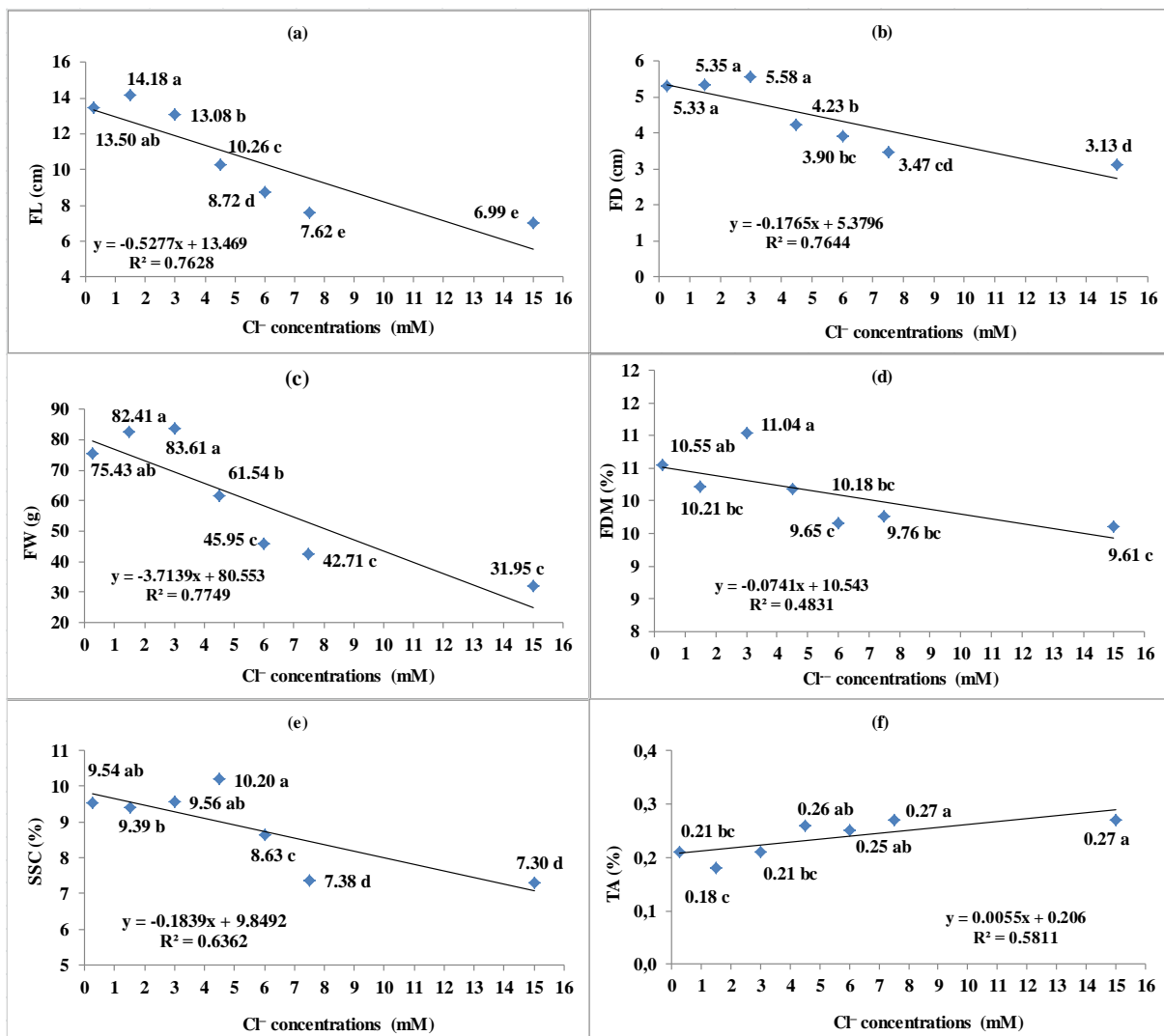


Figure 2. Effect of irrigation water chloride concentrations on fruit characteristics of pepper plant. Şekil 2. Sulama suyu klor konsantrasyonlarının biber bitkisinin meyve özellikleri üzerine etkisi As: FL fruit length (a), FD fruit diameter (b), FW fruit weight (c), FDM fruit dry matter (d), SSC fruit soluble solids contents (e), TA fruit total acidity (f)

There were significant, negative, linear relationship between pepper yield and Cl⁻ concentrations (Figure 1).

The Cl⁻ concentrations up to 3.0 mM resulted in slight changes in fruit yields and the greatest fruit yield was obtained from 1.5 mM Cl⁻ treatment. The Cl⁻

concentration of 4.5 mM, and greater, reduced fruit yields. The lowest fruit yield was from 15.0 mM Cl⁻ treatment. It was reported that low Cl⁻ levels increased total and marketable yields in tomato, but high Cl⁻ concentrations negatively influenced yield (Komosa and Gorniak, 2015). Yield reductions mostly come from smaller fruit (Tantawy, 2007).

A negative linear relationship occurred between Cl⁻ treatments and fruit length and diameter (Figure 2). Variance analysis indicated Cl⁻ treatments affected fruit physical characteristics. The heaviest and widest fruit were from 3.0 mM Cl⁻ treatment and the longest fruit were from 1.5 mM Cl⁻ treatment; increasing Cl⁻ concentration negatively influenced fruit characteristics. High Cl⁻ concentration (15.0 mM) had highly significant, negative, effects on fruit length, diameter and weight, and at this concentration, values decreased which agrees with Shawer (2014) for cucumber with increasing Cl⁻ concentrations increasing fruit length and diameter, but high Cl⁻ (15.0 mM) concentration reduced fruit dimensions. High sodium chloride treatments negatively influenced fruit weight of tomatoes (Zahedifar et al., 2012).

There were significant linear relationship between fruit chemical characteristics and Cl⁻ concentrations (Figure 2). The greatest dry matter content was in 3.0 mM Cl⁻ treatments. Soluble solids contents increased up to 4.5 mM Cl⁻ concentration and the greatest value was in this concentration. High dry matter, soluble solids and acidity contents were reported for salt-treated tomatoes (Leonardi et al., 2004; Helaly et al., 2017) and processing peppers (Turhan et al., 2014). Besides soluble solids content, increasing antioxidant capacities were reported with increasing salt concentrations (Peet et al., 2004). Effects of salinity on plants are mostly related to Cl⁻ and Na⁺ toxicity (Goyal et al., 2003; Zhu, 2003). The 6, 7.5 and 15.0 mM Cl⁻ concentrations reduced dry matter and soluble solids content. Acid content increased with increasing Cl⁻ concentrations and the greatest value was obtained from 7.5 and 15 mM Cl⁻ treatments.

CONCLUSIONS

Increasing growing media Cl⁻ concentrations influenced growth parameters, yield, fruit characteristics, leaf Cl⁻ content and water potentials of pepper plants. The threshold nutrient solution Cl⁻ concentration was 3.0 mM for pepper plants, indicating Cl⁻ concentration of nutrient solution should be kept at 3.0 mM and below. To determine the validity of the results studies under field conditions, for longer durations, with greater number of commercial species, are required.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

REFERENCES

- Adhikary PP, Dash CJ, Kumar G, Chandrasekharan H 2014. Characterization of groundwater quality for irrigation and drinking purposes using a modified groundwater quality index. *Indian J. Soil Cons.* 42: 260-267.
- Al Obaidy AH, Kadhem AJ, Hamiza NH, Al Mashhady AA 2014. Assessment of ground water quality for drinking and agricultural uses in Mouqdadiya District, Diyala, Iraq. *Eng. Tech. J.* 32: 2921-2936.
- Anonymous 1968. National canners association laboratory manual, Food Canners and Processors, AVI Publishing Co., Westport, CT.
- As BG, Horneck DA, Stevens RG, Ellsworth JW, Sullivan DM 2007. Managing irrigation water quality for crop production in the Pacific Northwest. A Pacific Northwest Extension Publication, Oregon State University, Corvallis, OR.
- Ayers RS, Westcot DW 1985. Water quality for agriculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Chapman HD, Pratt PF 1961. Methods of analysis for soils, plants and water. University of California, Berkeley, CA.
- Chen W, Zenli LH, Xiao E, Yang ES, Mishra S, Stoffella PJ 2010. Chlorine nutrition of higher plants: progress and perspectives. *J. Plt. Nutr.* 33: 943-952. doi:10.1080/01904160903242417.
- Hadian MS, Azy FN, Krismadiyanti I, Arfani DL, Sofyan ET, Prayogi TE 2015. Groundwater quality assessment for suitable drinking and agricultural irrigation using physico-chemical water analysis in the Rancaekek-Jatinangor District, West Java, Indonesia. 6th International Conference on Environmental Science and Technology, 84: 56-62. doi: 10.7763/IPCBE.
- Hekimoglu B, Altindoger M 2019. Samsun province kapija pepper sector report. Strategy Development Unit Samsun Governorship Provincial Directorate of Agriculture and Forestry, Samsun, Turkey.
- Helaly AA, Goda Y, Abd El Rehim AS, Mohamed AA, El Zeiny OAH 2017. Effect of irrigation with different levels of saline water type on husk tomato productivity. *Adv. Plants Agric. Res.* 6(4): 114-120. doi: 10.15406/apar.2017.06.00223.
- Hoagland DR, Arnon DI 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Circular 347. California Agricultural Experiment Station, College of Agriculture, University of California, Berkeley, CA.
- Goyal SS, Sharma SK, Rains DW 2003. Crop production in saline environments: Global and integrative perspectives, Haworth Press, New York.
- Karaivazoglu NA, Papakosta DK, Divanidis S 2005. Effect of chloride in irrigation water and form of

- nitrogen fertilizer on Virginia (flue-cured) tobacco. *Field Crops Res.* 92: 61-74. doi: 10.1016/j.fcr.2004.09.006.
- Karanth KR 1987. Ground water assessment: Development and management. Tata McGraw-Hill Education, New Delhi, India.
- Kırnak H, Kaya C, Degirmenci V 2002. Growth and yield parameters of bell peppers with surface and subsurface drip irrigation systems under different irrigation levels. *Atatürk Uni. J. Agri. Fac.* 33(4): 383-389.
- Komosa A, Gorniak T 2015. The effect of chloride on yield and nutrient interaction in greenhouse tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) grown in rockwool. *J. Plt. Nutrit.* 38: 355-370. doi: 10.1080/01904167.2014.934466.
- Kowalczyk W, Dysko J, Kaniszewski S 2008. Effect of nutrient solution pH regulated with hydrochloric acid on the concentration of Cl⁻ ions in the root zone in soilless culture of tomato. *J. Elementol.* 13(2): 245-254.
- Leonardi, C, Martorana M, Giuffrida F, Fogliano V, Pernice R 2004. Tomato fruit quality in relation to the content of sodium chloride in the nutrient solution. *Acta Horticult.* 659: 769-774. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.659.99.
- Narkis N, Kott Y 1991. A composition between chlorine dioxide and chlorine for the disinfection of effluents. Israel Water Commission, Tel Aviv, Israel.
- Narkis N, Armon R, Offer R, Orshansky F, Friedland E 1995. Effect of suspended solids of wastewater disinfection efficiency by chlorine dioxide. *Water Res.* 29: 227-236. doi: 10.1016/0043-1354(94)E0117-O.
- Navarro JM, Martinez V, Carvajal M 2000. Ammonium bicarbonate and calcium effects on tomato plants grown under saline conditions. *Plant Sci.* 157: 89-96. doi: https://doi.org/10.1016/s0168-9452(00)00272-7.
- Peet MM, Harlow CD, Larrea ES 2004. Fruit quality and yield in five small-fruited greenhouse tomato cultivars under high fertilization regime. *Acta Horticult.* 659: 811-818. doi: 10.17660/ActaHortic.2004.659.105.
- Rav Acha C, Kummel M, Salamon I, Adin A 1995. The effect of chemical oxidants on effluent constituents for drip irrigation. *Water Res.* 29: 119-129. doi: 10.1016/0043-1354(94)E0113-K.
- Sairam RK, Rao KV, Srivastava GC 2002. Differential response of wheat genotypes to long term salinity stress in relation to oxidative stress, antioxidant activity and osmolyte concentration. *Plant Sci.* 163(5): 1037-1046. doi: 10.1016/S0168-9452(02)00278-9.
- Scholberg JMS, McNeal BL, Jones JW, Boote KJ, Stanley CD, Obreza TA 2000. Nitrogen stress effects on growth and nitrogen accumulation by field-grown tomato. *Agron. J.* 92:159-167. doi: 10.21273/HORTSCI.50.11.1636.
- Salk A, Arın L, Deveci M, Polat S 2008. Special vegetable growing. Department of Horticulture, Faculty of Agriculture Press, Namık Kemal University, Tekirdag, Turkey.
- Shawer SS 2014. Interaction effect between nitrate and chloride on yield, uptake and translocation of nutrients in cucumber plant under nutrient film technique (NFT). *Middle East J. Agricult. Rsch.* 3(1): 42-48.
- Smith E, Porter W, Hawkins G, Harris JG 2016. Blueberry irrigation water quality. Cooperative Extension Bulletin Circular, 1105, University of Georgia, Athens, GA.
- Tantawy AESA 2007. Effect of some mineral and organic compounds on salinity tolerance in tomato., Faculty of Agriculture Al-Azhar Univ., Cairo, Egypt. PhD dissertation.
- Turhan A, Kuscü H, Özmen N, Demir AO 2014. The relationships between salinity levels of water used for irrigation with yield and quality parameters in red pepper (*Capsicum annum* cv. Kapija). *Anadolu J. Agr. Sci.* 29(3): 186-193. doi:10.7161/ANAJAS.2014.29.3.186-193.
- Turhan A, Kuscü H 2019. Effects of salinity stress on water use efficiency, yield components, leaf chlorophyll and carotenoid content of eggplant (*Solanum melongena* L.). *YYU. J. Agr. Sci.* 29(1): 61-68. doi: 10.29133/yyutbd.462094.
- Welch RM 1995. Micronutrient nutrition of plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14: 49-82. doi: 10.1080/713608066.
- Zahedifar M, Ronaghi A, Moosavi AA, Shirazi SS 2012. Influence of nitrogen and salinity levels on the fruit yield and chemical composition of tomato in a hydroponic culture. *J. Plant Nutrition*, 35(14): 2211-2221. doi: 10.1080/01904167.2012.724497.
- Zhu JK 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Curr. Opin. Plt. Biol.* 6:441-445. doi: 10.1016/s1369-5266(03)00085-2.

Molecular and Morphological Identification of *Cantharellus pallens* Pilát 1959 (Cantharellales, Basidiomycota), a New Record for Turkish Mycota

Meryem Şenay ŞENGÜL^{1*}, Ömer Faruk TÜRKEKUL², İbrahim TÜRKEKUL³

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Tokat Gaziosmanpaşa University, Tasliciftlik Campus, 60250, Tokat, Turkey, ²Department of Biology, Institute of Graduate Studies, Tokat Gaziosmanpaşa University, Tasliciftlik Campus, 60250, Tokat, Turkey, ³Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Tokat Gaziosmanpaşa University, Tasliciftlik Campus, 60250, Tokat, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0003-4879-1908>, ² <https://orcid.org/0000-0001-8856-0712>, ³<https://orcid.org/0000-0002-1036-9835>

✉: senay.sengul@gop.edu.tr

ABSTRACT

Cantharellus pallens Pilát 1959 in *Cantharellus* genus is recorded for the first time from Tokat city province, Turkey. Morphological studies, phylogenetic data derived from both the DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and large ribosomal subunit (LSU) genes revealed that this species is a new record for the Turkish mycota.

Research Article

Article History

Received : 12.01.2021

Accepted : 21.03.2021

Keywords

Cantharellus
Hydnaceae
Molecular phylogenetics
Taxonomy
Turkey

Türkiye Mikotası için Yeni Bir Kayıt Olan *Cantharellus pallens* Pilát 1959 (Cantharellales, Basidiomycota)'nın Moleküler ve Morfolojik Teşhisi

ÖZET

Cantharellus cinsine ait bir mantar türü olan *Cantharellus pallens* Pilát 1959, Türkiye'nin Tokat ilinde ilk kez kaydedilmiştir. Morfolojik çalışmalar, nükleer ribozomal internal transcribed spacer (ITS) ve large ribosomal subunit (LSU) genlerine ait DNA dizilerinden türetilen filogenetik veriler, bu türün Türk mikotası için yeni bir kayıt olduğunu ortaya koymaktadır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 12.01.2021

Kabul Tarihi : 21.03.2021

Anahtar Kelimeler

Cantharellus
Hydnaceae
Moleküler Filogenetik
Taksonomi
Türkiye

To Cite : Şengül MŞ, Türkekul ÖF, Türkekul İ 2021. Molecular and morphological identification of *Cantharellus pallens* Pilát 1959 (Cantharellales, Basidiomycota), a new record for Turkey. KSU J. Agric Nat. 24 (6): 1145-1153. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.858215.

INTRODUCTION

The genus *Cantharellus* Adans. ex Fr. (Fries, 1821) contains species of commercial, medicinal and economical importance, and they are best known as edible ectomycorrhizal mushrooms. The species of this genus are morphologically distinguished by a well-developed hymenium or a complex lamellae-like forked wrinkles, a solid and fleshy stipe, non-funnel-shaped pileus, smooth ellipsoid and non-amyloid spores, and spore deposits in cream to pinkish yellow or pale ochre color (Eyssartier and Buyck, 2000; Kibby, 2012). Many species mostly have five sterigmata per basidium and show differences in septal pore morphology (Hibbett et al., 2014). The type species of *Cantharellus* is *Cantharellus cibarius* which was first described by Fries (1821).

Molecular methods have been widely used to describe new species and reduce the possibility of misinterpretations in fungal taxonomy. The nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region is the most commonly used fungal barcode (Schoch et al., 2012) for the exploration of fungal diversity in environmental samples and solving species delimitation problems among morphologically similar species. However, due to high evolutionary rate of nuclear ribosomal RNA genes in *Cantharellus* genus (Moncalvo et al., 2006), use of different gene regions, such as combination of ITS and ribosomal nuclear large subunit (LSU) regions are important for a better infrageneric classification in this genus. *Cantharellus* species delimitation problems can only be resolved with the availability of additional molecular data from different geographic locations.

In the last decade, taxonomic research on *Cantharellus* has increased and with the help of molecular studies, approximately 180 species of *Cantharellus* have been described worldwide in subtropical, tropical and temperate climate regions (An et al., 2017; Buyck and Hofstetter, 2011; Buyck et al., 2011, 2013, 2014, 2016a, 2016b, 2016c; De Kesel, 2011; Deepika et al., 2014; Shao et al., 2011, 2014, 2016a, 2016b; Buyck and Randrianjohany, 2013; Foltz et al., 2013; Kumari et al., 2013; Liu et al., 2015; Suhara and Kurogi, 2015; De Kesel et al., 2016; Leacock et al., 2016; Olariaga et al., 2017; Ogawa et al., 2018; Parad et al., 2018; Lao et al., 2019; Jian et al., 2020). In Turkey, nine *Cantharellus* species (*C. amethysteus* (Quél.) Sacc., *C. cibarius* Fr., *C. cinereus* (Pers.) Fr., *C. ferruginascens* P.D. Orton, *C. friesii* Quél., *C. ianthinoxanthus* (R. Maire) Kühner, *C. lutescens* (Fr.) Fr., *C. subalbidus* A.H. Sm. & Morse, *C. melanoxeros* Desm.) have been described from various regions but they all lack molecular evidences (Allı et al., 2017; Solak et al., 2007; Sesli and Denchev, 2008; Keleş et al., 2014; Akata and Kumbaşı, 2014; Türkekul and Işık, 2016; Sesli et al., 2016; Bulam et al., 2018). No samples of *C. pallens* were recorded so far in Turkish mycobiota. More studies based on both morphological and molecular analysis are urgently needed for a better classification and correct description of *Cantharellus* species in Turkey and other locations.

In this study, we identified *Cantharellus pallens* Pilát (1959) from Tokat city province, Turkey, by both morphological examination and molecular phylogenetic studies. This species is identified with its pale orangish white to cream pileus, white to pale ochraceous cap surface, well-developed white to pale ochre-yellow hymenium, white to cream stipe, small and ellipsoid spores. This study presents a new *Cantharellus* species for Turkish mycological collections.

MATERIALS and METHODS

Study area and sampling

Mushroom specimens were collected from Akbelen plateau (Tokat). It has an elevation of 1600 to 1800 m with mild climate. This area is in the vicinity of Yaylacık Mountain. Due to its geographic location, it hosts many vegetations and a rich spot for fungal diversity. The sampling was made on June 29th, 2018. The fresh basidiomata were photographed in the field using a digital camera. Field notes were made and samples were dried for longer storage in boxes. They were deposited in the Fungarium of the Department of Biology, Tokat Gaziosmanpaşa University, Tokat, Turkey (GOPUF) with a voucher number TTS46.

Morphological analyses

Macromorphological characters of fresh fruitbodies, colors of different parts of the basidiomata; shape, size,

and color of the pileus and stipe; vegetation and odors were noted during field study. A mature sample was selected to obtain spore print of the sample. Microscopic studies were carried out on dry samples using a microscope. Some chemicals (such as 5% KOH, Congo red) were used to rehydrate and dye dry samples during the studies. The findings obtained in these studies were compared with the existing literature (Watling and Turnbull, 1998; Breitenbach and Kränzlin, 2000; Eyssartier and Buyck, 2000, 2001).

Molecular and phylogenetic analyses

Genomic DNA was extracted from about 20 mg of dried specimen using the ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep kit (Zymo Research Irvine, CA, USA) as described by the manufacturer's protocol. The primer pair ITS4/ITS5 (White et al., 1990) was used to amplify approximately 873 bp genomic sequence of the ITS1-5.8S-ITS2 region of the rDNA internal transcribed spacer region (ITS) and LROR-LR5 primer pair (Vilgalys and Hester, 1990) was used to amplify about 878 bp genomic sequence of the 28S nuclear ribosomal large subunit rRNA (LSU) gene region. The PCR conditions for ITS and LSU regions was performed as described in Şengül Demirak and Işık (2020). PCR amplifications were verified by using 1% agarose gel electrophoresis. PCR products were sequenced from both ends using forward and reverse primers (BM Labosis Inc., Ankara).

Sequences generated from both ends were edited and assembled to produce a final gene sequence for ITS and LSU regions of the studied sample and deposited in GenBank. Homology based searches using Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) program was used to find the best matches for each genomic sequence. Representative ITS and LSU sequences of *Cantharellus* species were retrieved from GenBank for phylogenetic analysis. Sequences were aligned using ClustalW (Larkin et al., 2007) and adjusted manually. Phylogenetic trees for both ITS and LSU sequences were drawn using the Maximum Likelihood (ML) method based on Tamura-Nei model (Tamura and Nei, 1993) using MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016) with bootstrap support of 1000 replicates and default settings. The bootstrap support values $\geq 50\%$ were marked on the branches of the tree. Initial tree for the heuristic search was obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The analysis involved 28 and 33 nucleotide sequences for ITS and LSU regions, respectively, including the studied specimen. All positions containing gaps and missing data were eliminated.

RESULTS and DISCUSSION

Taxonomy

Hydnaceae Chevall. 1826

Cantharellus pallens Pilát, Omagiu lui Traian Savulescu: 600 (1959)

Mycobank: MB 327488

Descriptions: Pileus 25–95 mm across, pale orangish white to orange cream, with the cap surface varying

from white to pale ochraceous, sometimes yellowish at the margin (Figure 1a). Hymenophore well-developed, forked veins to anastomosing. Stipe robust, whitish cream, 15–60 × 11–25 mm. Flesh white to whitish cream, pale violet in the stipe. Taste mild. Basidia 75–85 × 7–9 µm, slenderly clavate, 4 spored (Figure 1c). Basidiospores 7.5–9.5 × 3.5–5.5 µm, ellipsoid, hyaline, thin walled and smooth, with granular contents (Figure 1b).

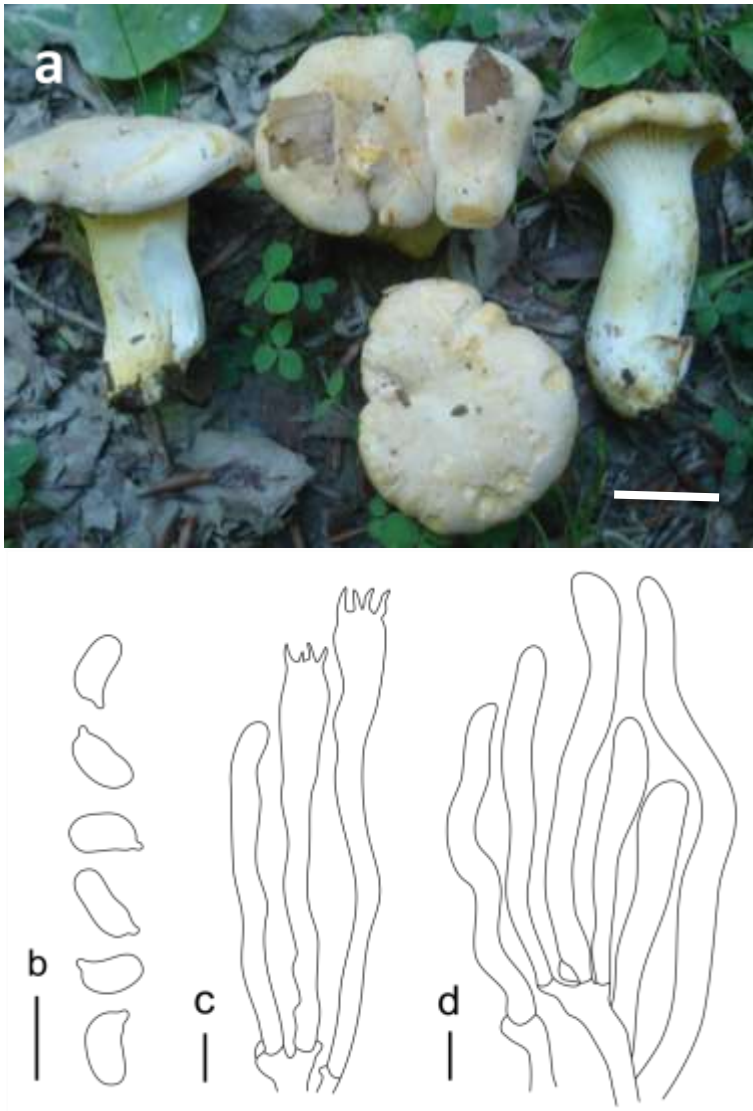


Figure 1. *Cantharellus pallens*. a. basidioma, b. basidiospores, c. basidia and basidioles. d. hyphal extremities of the pileipellis. Scale bars: a= 20 mm; b, c, d = 10 µm.

Şekil 1. *Cantharellus pallens*. a. bazidiyokarplar, b. bazidiyosporlar, c. bazidiyol ve bazidiyumlar, d. pileipellisde hif yapıları. Ölçek çubuğu: a= 20 mm; b, c, d= 10 µm.

Edibility: Edible, occasionally collected and sold on local markets in the world (Pilz et al., 2003).

Ecology: Rare, summer to fall, on rich, calcareous soil, mycorrhizal with beech (*Fagus* L.) and oak (*Quercus* L.) trees (Hansen and Knudsen, 1997).

Material examined: TURKEY—Tokat, Akbelen plateau, on soil, under *Quercus* L. sp., 40° 30' 41"N -

36° 37' 22"E, 1510 m, 29 June 2018, TTS46.

The holotype specimen of *C. pallens* Pilát (PRM 655551) is described from Czech Republic found on soil associated with conifers (Pilát, 1959). This species is quite robust and well characterized by its pale-colored morphological features, including a light colored, white to pale ochraceous cap, white flesh, pale orange to

white pileus, pale ochre white to pale ochre stipe, and a well-developed hymenophore with bright orange yellow to pale ochre yellow color, and thick margin (Pilát, 1959; Eyssartier and Buyck, 2000; Kibby, 2012; Olariaga et al., 2017). Among the European species of *Cantharellus*, *C. pallens* has the smallest spores, generally of $7-9 \times 4-5 \mu\text{m}$, with ellipsoid and smooth appearance (Bertolini, 2014).

Cantharellus pallens is mostly distributed in Europe, especially in the Mediterranean area, but also found in Great Smoky Mountains of North Carolina in the United States. (Buyck et al., 2016; Olariaga et al., 2017). *C. cibarius* is also greatly distributed in Europe, but not present in the Mediterranean climate (Olariaga et al., 2017). They have some differences in their ecological preferences such that *C. pallens* is associated with *Quercus*, other evergreen oaks, deciduous oaks and *Pinus*, while *C. cibarius* prefers cooler climates, and is found with broad-leaved trees such as *Castanea sativa* Mill., deciduous oaks or conifers, and shows preference for acidic soils (Olariaga et al., 2017). *C. pallens* and *C. cibarius* also exhibit some variable features. *C. cibarius* is characterized by an orange-yellow hat, pileus, stipe and uniform colored hymenophore, while *C. pallens* has a whitish to pale orange-yellow colored pileus, stipe, and has a brighter orange-yellow hymenophore near the margin (Eyssartier and Buyck, 2000; Olariaga et al., 2017). Moreover, *C. pallens* is often a very robust species.

Based on morphology, *C. ferruginascens* P.D. Orton (1969) is a species that has been synonymised with *C. pallens* (Pegler et al., 1997). Later, Watling and Turnbull (1998) indicated that they are different species exhibiting differences in their color and staining. Kibby (2012) also reported a larger spore size and predominant staining feature for *C. ferruginascens*. Moreover, it is indicated that *C. ferruginascens* differs from *C. pallens* due to different colors of young pileus and hymenophore (Olariaga et al., 2017). In northern Europe, the name *C. pallens* has been more commonly used, while *C. subpruinus* Eyssart. and Buyck (2000) has been used in southern Europe (Olariaga et al., 2017). Based on morphological characters, *C. subpruinus* was described to show strong staining and have young basidiomata with white pileus, but *C. pallens* is described as the non-staining species (Eyssartier and Buyck, 2000).

Phylogenetic analyses

We have successfully amplified about 880 bp ITS1-5.8S-ITS2 and LSU rRNA gene sequences which were deposited in GenBank with accession numbers MW386299 and MW386300, respectively. An initial BLAST searches using the ITS and LSU sequences as query retrieved sequences up to 99% identity belonging to *Cantharellus* subg. *Cantharellus* species

described from various collections in different geographic locations. Best matches from BLAST results and *C. pallens* sequences described in Olariaga et al. (2017) were included in the phylogenetic analysis.

We present ML trees based on the sequences for ITS and LSU regions to indicate phylogenetic relationship of the studied species with other *Cantharellus* species (Figures 2 and 3). In the ITS and LSU phylogenies, two distinct clades were recognized that separated the clade including *C. pallens* from *C. cibarius* with a high bootstrap support (Figures 2 and 3). They are both supported as monophyletic groups. Phylogeny reveals that *C. pallens* is closely related and sister to *C. cibarius*, where the sequence divergence between the two species was estimated to be approximately 0.02%. Recent molecular studies also indicate that they are closely related but phylogenetically distinct species (Olariaga et al., 2017; Ogawa et al., 2018). The results showed a high degree of sequence similarity in both ITS and LSU genomic regions for *C. cibarius* and *C. pallens* specimens, which may indicate that these two species can be conspecific. The phylogenetic analysis suggested that the two species were distinguished as separate lineages with high statistical support. Although not observed in the ITS phylogeny, *C. cibarius* specimen (KX828796) appear to be a basal clade in the LSU phylogeny. It is highly possible that DNA sequence generated for the LSU region of this specimen is incorrect and needs validation by additional sequencing data.

Cantharellus ferruginascens samples also formed a separate clade distant from *C. pallens* clade but sister to the clade of *C. alborufescens* (Malençon) Papetti and Alberti (1998). Similar phylogenetic results have also been shown by other studies (Buyck et al., 2014; Olariaga et al., 2017; Ogawa et al., 2018; Jian et al., 2020). We confirmed that *C. ferruginascens*, *C. alborufescens* and *C. pallens* are separate taxa within the *Cantharellus*.

Distinction based on morphological features alone is not enough for *C. pallens* and *C. subpruinus*. Buyck et al. (2014) reported that *C. subpruinus* is monophyly with *C. cibarius* based on the sequence analysis of the largest subunit of the RNA polymerase II (RPB2) region. In Figure 3, LSU based phylogeny shows that *C. subpruinus* collection from France (KF294660) is very closely related to *C. pallens* species described from different localities, and also supports the monophyly of *C. subpruinus* and *C. cibarius*. Zamora et al. (2018) propose that two different species may share identical DNA sequences at a given locus, even for already tested barcoding markers. This could explain why *C. subpruinus* is grouped with the sequences of *C. pallens* in the same clade. Since ITS sequence data is not available for *C. subpruinus*, we only made our interpretations according to the LSU

phylogeny. Additional collections from various localities and additional gene regions for molecular analysis has to be studied to solve the species

delimitation of the infrageneric group, including *C. subpruinosis* and *C. pallens*.

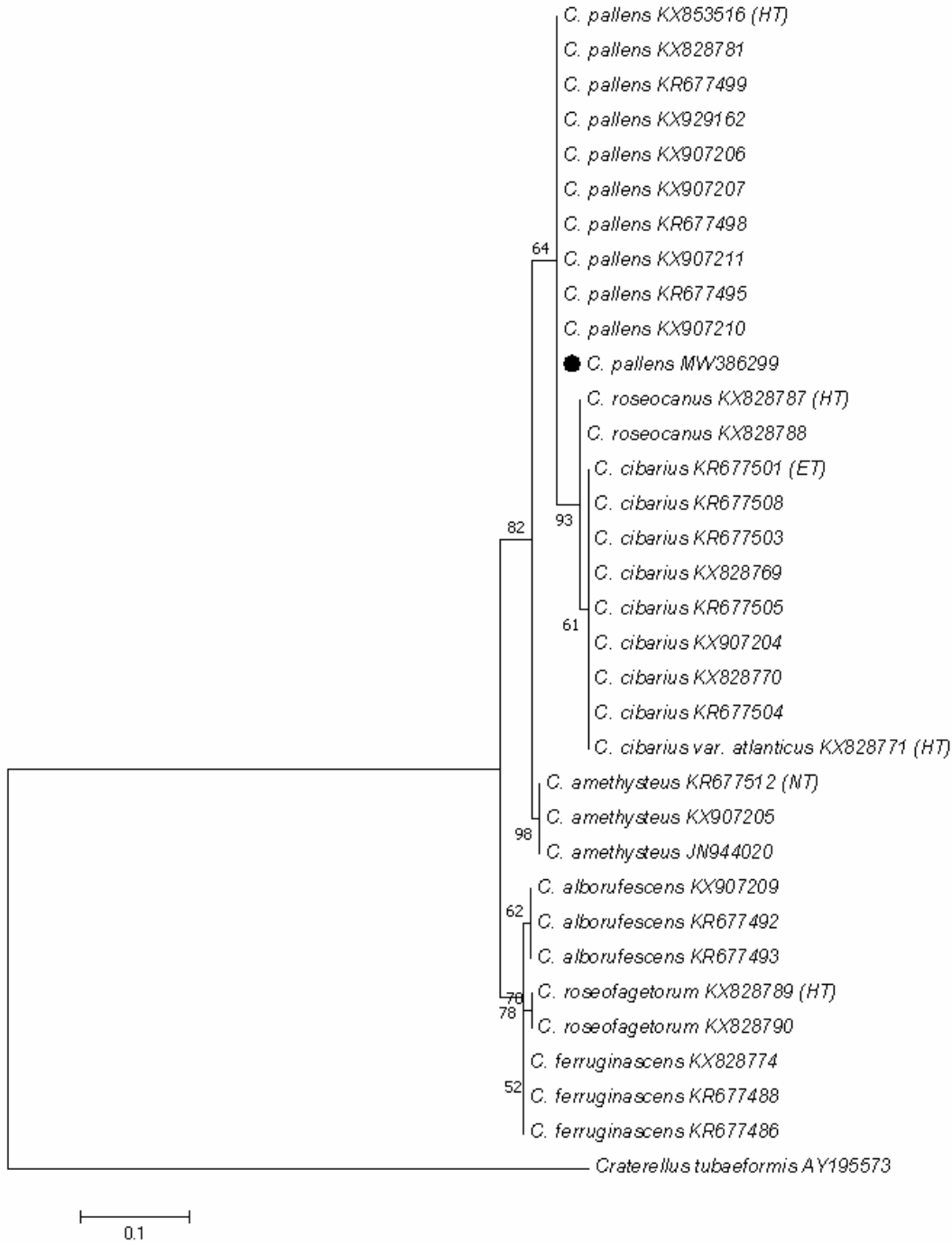


Figure 2. Molecular phylogenetic analysis using ML method based on ITS sequences. The studied specimen was indicated with black circle. Bootstrap support values $\geq 50\%$ from ML analysis were shown on the branches. Sequences from type collections were marked. Bar indicates 0.1 expected change per site per branch. *Craterellus tubaeformis* (AY195573) was the outgroup species. C.: *Cantharellus*; ET: epitipe; HT: holotype; NT: neotype

Şekil 2. ITS dizilerine dayalı ML yöntemi ile moleküler filogenetik analiz. Çalışılan numune siyah daire ile belirtilmiştir. ML analizlerinde, $\geq 50\%$ bootstrap destek değerleri olanlar dalların üstünde gösterilmiştir. Tip koleksiyonlar şekilde belirtilmiştir. 0.1 bar çizgisi, her daldaki her noktaya ait tahmini değişimi ifade etmektedir. *Craterellus tubaeformis* (AY195573) dış grup türüdür. C.: *Cantharellus*; ET: epitip; HT: holotip; NT: neotip

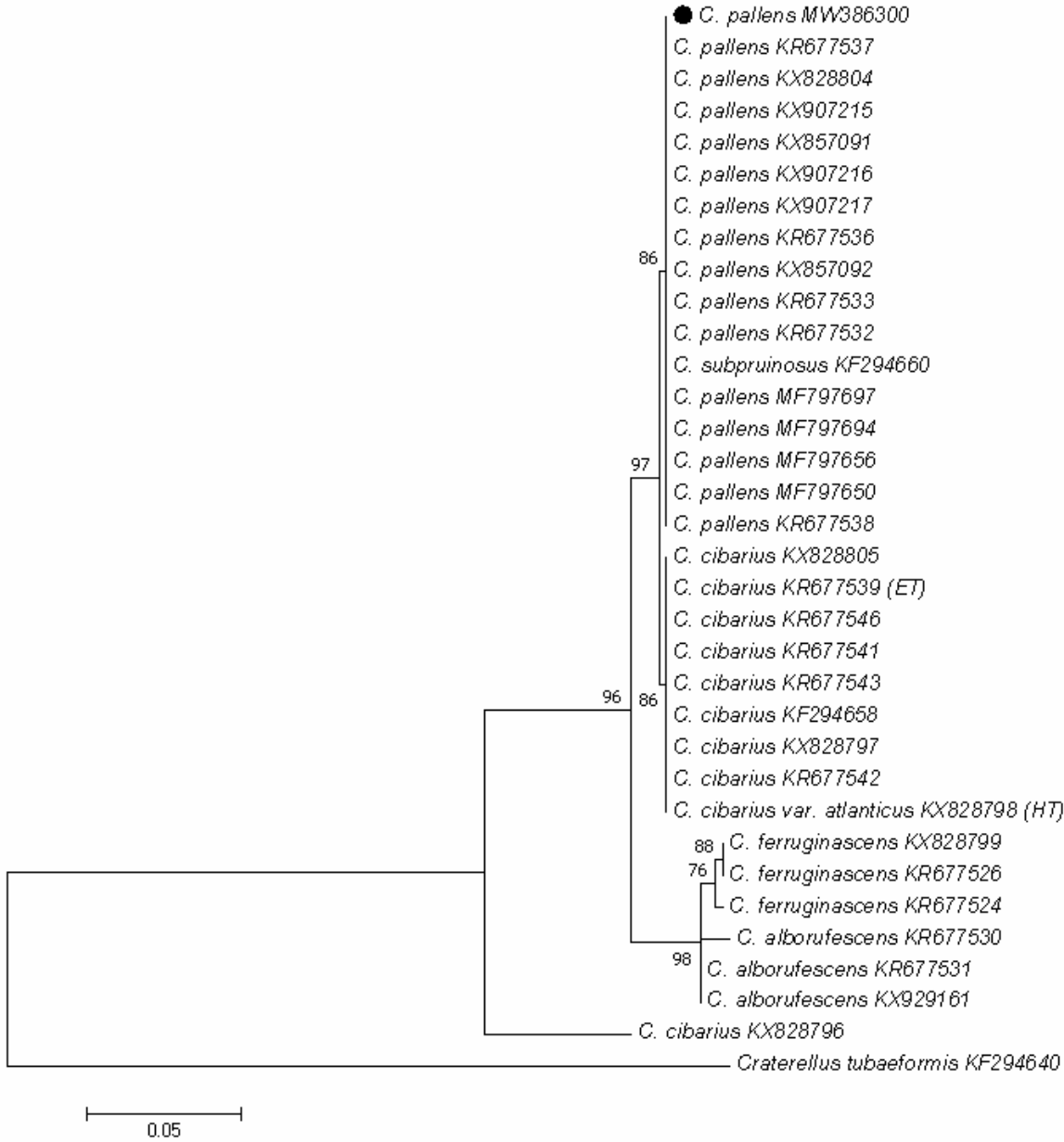


Figure 3. Molecular phylogenetic analysis using ML method based on LSU sequences. The studied specimen was indicated with black circle. Bootstrap support values $\geq 50\%$ from ML analysis were shown on the branches. Sequences from type collections were marked. Bar indicates 0.05 expected change per site per branch. *Craterellus tubaeformis* (KF294640) was the outgroup species. C.: *Cantharellus*; ET: epitype; HT: holotype

Şekil 3. LSU dizilerine dayalı ML yöntemi ile moleküler filogenetik analiz. Çalışılan numune siyah daire ile belirtilmiştir. ML analizlerinde, $\geq 50\%$ bootstrap destek değerleri olan dalların üstünde gösterilmiştir. Tip koleksiyonlar şekilde belirtilmiştir. 0.05 bar çizgisi, her daldaki her noktaya ait tahmini değişimi ifade etmektedir. *Craterellus tubaeformis* (AY195573) dış grup türüdür. C.: *Cantharellus*; ET: epityp; HT: holotip

CONCLUSIONS

Nomenclature of a new species displaying similar morphological features with the existing species and in the absence of molecular evidences causes ambiguity among *Cantharellus*. Thus, taxonomic studies with the help of molecular evidences have increased in the last decade to clarify species delimitation of this genus.

This study reports *Cantharellus pallens* from Tokat province, Turkey, with morphological and molecular evidences, including ITS and LSU gene regions. A taxa adopted to a different location can only be resolved with additional descriptions based on morphological, ecological features, and more importantly, with the inclusion of reliable molecular studies.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by Tokat Gaziosmanpaşa University Scientific Research Project Foundation (BAP project No: 2018/98). A part of this study is produced from the M.Sc. study of Ömer Faruk Türkekul.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Akata I, Kumbaşlı M 2014. A new and rare record for Turkish *Cantharellus*. *Biological Diversity and Conservation* 7(3): 143-145.
- Allı H, Candar SS, Akata I 2017. Macrofungual diversity of Yalova province. *The Journal of Fungus* 8(2): 76-84.
- An DY, Liang ZQ, Jiang S, Su MS, Zeng NK 2017. *Cantharellus hainanensis*, a new species with a smooth hymenophore from tropical China. *Mycoscience* 58: 438-444.
- Bertolini V 2014. Taxa interessanti della flora micologica toscana. *Rivista di Micologia* 2: 99-126.
- Breitenbach J, Kränzlin F 2000. *Fungi of Switzerland Vol.5, Edition Mycologia Lucerne, Switzerland.*
- Bulam S, Üstün NŞ, Pekşen A 2018. The most popular edible wild mushrooms in Vezirköprü district of Samsun province. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 6(2): 189-194.
- Buyck B, Hofstetter V 2011. The contribution of *tef-1* sequences to species delimitation in the *Cantharellus cibarius* complex in the southeastern USA. *Fungal Diversity* 49: 35-46.
- Buyck B, Cruaud C, Couloux A, Hofstetter V 2011. *Cantharellus texensis* sp. nov. from Texas, a southern lookalike of *C. cinnabarinus* revealed by *tef-1* sequence data. *Mycologia* 103: 1037-1046.
- Buyck B, Randrianjohany E 2013. *Cantharellus eyssartieri* sp. nov. (Cantharellales, Basidiomycota) from monospecific *Uapaca ferruginea* stands near Ranomafana (Eastern Escarpment, Madagascar). *Cryptogamie, Mycologie* 34(1): 29-34.
- Buyck B, Kauff F, Cruaud C, Hofstetter V 2013. Molecular evidence for novel *Cantharellus* (Cantharellales, Basidiomycota) from tropical African miombo woodland and a key to all tropical African chanterelles. *Fungal Diversity* 58: 281-298.
- Buyck B, Kauff F, Eyssartier G, Couloux A, Hofstetter V 2014. A multilocus phylogeny for worldwide *Cantharellus* (Cantharellales, Agaricomycetidae). *Fungal Diversity* 64: 101-121.
- Buyck B, Hofstetter V, Olariaga I 2016a. Setting the record straight on North American *Cantharellus*. *Cryptogamie, Mycologie* 37(3): 405-417.
- Buyck B, De Crop E, Verbeke A, Hofstetter V 2016b. Untangling the Central African *Cantharellus* sect. *Tenuis*: *Cantharellus minutissimus* sp. nov. and epitypification of *Cantharellus alboroseus*. *Cryptogamie, Mycologie* 37(3): 329-344.
- Buyck B, Olariaga I, Looney B, Justice J, Hofstetter V 2016c. Wisconsin chanterelles revisited and first indications for very wide distributions of *Cantharellus* species in the United States East of the Rocky Mountains. *Cryptogamie, Mycologie* 37(3): 345-366.
- Deepika K, Reddy MS, Upadhyay RC 2014. New records of *Cantharellus* species from the northwestern Hialayas of India. *Mycologia* 4: 205-220.
- De Kesel A 2011. *Cantharellus solidus*, a new species from Benin (West-Africa) with a smooth hymenium. *Cryptogamie, Mycologie* 32(3): 277-283.
- De Kesel A, Amalfi M, Ngoy BKW, Yorou NS, Raspé O, Degreef J, Buyck B 2016. New and interesting *Cantharellus* from tropical Africa. *Cryptogamie, Mycologie* 37(3): 283-327.
- Eyssartier G, Buyck B. 2000. Le genre *Cantharellus* en Europe. Nomenclature et taxonomie. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France* 116(2): 91-138.
- Eyssartier G, Buyck B 2001. Note nomenclaturale et systématique sur le genre *Cantharellus*. *Documents Mycologiques* 121: 55-56
- Fries EM 1821. *Systema mycologicum, sistens fungorum ordines, genera et species, huc usque cognitae, quas ad normam methodi naturalis determinavit, disposuit atque descripsit, Vol. 1. Sumtibus Ernesti Mauriti, Gryphiswaldie.*
- Foltz MJ, Perez KE, Volk TJ 2013. Molecular phylogeny and morphology reveal three new species of *Cantharellus* within 20 m of one another in western Wisconsin, USA. *Mycologia* 105: 447-461.
- Hansen L, Knudsen H 1997. *Nordic macromycetes. Vol. 3, Heterobasidioid, Aphyllorphoroid and Gastromycetoid Basidiomycetes. Nordsvamp.*
- Hibbett DS, Bauer R, Binder M, Giachini AJ, Hosaka K, Justo A, Larsson E, Larsson KH, Lawrey JD, Miettinen O, Nagy LG, Nilsson RH, Weiss M, Thorn RG 2014. *Agaricomycetes*. In: McLaughlin DJ, Spatafora JW (eds) *The mycota VII part a*. Springer-Verlag, Berlin, pp 373-412.
- Jian SP, Dai R, Gao J, Feng B 2020. *Cantharellus albus*, a striking new species from Southwest China. *Phytotaxa* 470(2): 133-144.
- Keleş A, Demirel K, Uzun Y, Kaya A 2014. Macrofungi of Ayder (Rize/Turkey) high plateau. *Biological Diversity and Conservation*, 7(3): 177-183.
- Kibby G 2012. *Fungal Portraits No. 52 Chanterelles and their allies. Field Mycology* 13(4): 111-117.

- Kumar S, Stecher G, Tamura K 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33(7): 1870-1874.
- Kumari D, Upadhyay RC, Reddy MS 2013. New records of *Cantharellus* species from the northwestern Himalayas of India. *Mycology* 4(4): 205-220.
- Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.
- Lao TD, Van Ngo T, Truong NB, Vu LT, Le TAH 2019. First record of *Cantharellus minor* from Vietnam with identification support from a combination of nrLSU and nrSSU phylogenetic analysis. *Advancements in Life Sciences* 6(3): 125-130.
- Leacock PR, Riddell J, Wilson AW, Zhang R, Ning Ch, Mueller GM 2016. *Cantharellus chicaoensis* sp. nov. is supported by molecular and morphological analysis as a new yellow chanterelle in midwestern United States. *Mycologia* 108(4): 765-772.
- Liu JK, Hyde KD, Jones EBG, Ariyawansa HA, Bhat DJ et al. 2015. Fungal diversity notes 1-110: taxonomic and phylogenetic contributions to fungal species. *Fungal Diversity* 72: 1-197.
- Moncalvo JM, Nilsson RH, Koster B, Dunham SM, Bernauer T, Matheny PB, Danell E 2006. The cantharelloid clade: dealing with incongruent gene trees and phylogenetic reconstruction methods. *Mycologia* 98(6): 937-948.
- Ogawa W, Endo N, Fukuda M, Yamada A 2018. Phylogenetic analyses of Japanese golden chanterelles and a new species description, *Cantharellus anzutake* sp. nov. *Mycoscience* 59(2): 153-165.
- Olariaga I, Moreno G, Manjoni JL, Salcedo I, Rodriguez D, Hofstetter V, Buyck B 2017. *Cantharellus* (Cantharellales, Basidiomycota) revisited in Europe through a multigene phylogeny. *Fungal Diversity* 83: 263-292.
- Papetti C, Alberti S 1998. Val Carobbio (S. Eufemia, Brescia) unappendice mediterranea in citta. *Bollettino del Circolo Micologico Giovanni Carini* 36: 25-30.
- Parad GA, Ghobad-Nejhad M, Tabari M, Yousefzadeh H, Esmailzadeh O, Tedersoo L, Buyck B 2018. *Cantharellus alborufescens* and *C. ferruginascens* (Cantharellaceae, Basidiomycota) new to Iran. *Cryptogamie, Mycologie* 39(3): 299-310.
- Pegler DN, Roberts PJ, Spooner BM 1997. British chanterelles and tooth-fungi: an account of the British cantharelloid and stipitate hydroid fungi. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pilát A 1959. *Cantharellus cibarius* Fr. und *Cantharellus pallens* sp. n. *Omagiu lui Traian. Savulescu* 597-600.
- Pilz D, Norvell L, Danell E, Molina R 2003. Ecology and management of commercially harvested chanterelle mushrooms (Vol. 576). US Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Fungal Barcoding Consortium 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109: 6241-6246.
- Sesli E, Denchev CM 2008. Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey. *Mycotaxon* 106: 65-67.
- Sesli E, Türkekul İ, Akata I, Niskanen T 2016. New records of Basidiomycota from Trabzon, Tokat, and İstanbul provinces in Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 40(5): 531-545.
- Shao SC, Tian XF, Liu PG 2011. *Cantharellus* in southwestern China: a new species and a new record. *Mycotaxon* 116: 437-446.
- Shao SC, Buyck B, Hofstetter V, Tian XF, Geng YH, Yu FQ, Liu PG 2014. *Cantharellus hygrophorus*, a new species in subgenus *Afrocantharellus* from tropical southwestern China. *Cryptogamie, Mycologie* 35(3): 281-289.
- Shao SH, Buyck B, Tian XF, Liu P-G, Geng YH 2016a. *Cantharellus phloginus*, a new pink-colored species from southwestern China. *Mycoscience* 57:144-149.
- Shao SH, Liu PG, Tian XF, Buyck B, Geng YH 2016b. A new species of *Cantharellus* (Cantharellales) from subalpine forest in Shangri-la, Yunnan, China. *Phytotaxa* 252(4): 273-279.
- Suhara H, Kurogi S 2015. *Cantharellus cyphelloides* (Cantharellales), a new and unusual species from a Japanese evergreen broad-leaved forest. *Mycological Progress* 14: 55.
- Solak MH, Işıloğlu M, Kalmış E, Allı H 2007. Macrofungi of Turkey, Checklist, Volume I. Üniversiteliler Ofset, Bornova, İzmir.
- Şengül Demirak MS, Işık H 2020. *Cortinarius rapaceoides*, a new record for Turkey. *Mycotaxon* 135: 559-568.
- Tamura K, Nei M 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 512-526.
- Türkekul İ, Işık H 2016. Bozatalan (Tokat) yöresi makrofungusları. *Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 9(1): 5-11.
- Vilgalys R, Hester M 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172(8): 4238-4246.
- Watling R, Turnbull E 1998. British fungus flora: agarics and boleti. 8/Cantharellaceae, Gomphaceae and amyloid-spored and xeruloid members of

- Tricholomataceae (excl. Mycena). Royal Botanic Garden Edinburgh.
- White TJ, Bruns T, Lee SJ, Taylor J 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. PCR protocols: a guide to methods and applications. New York, NY, USA, Academic Press, pp. 315-322.
- Zamora JC, Svensson M, Kirschner R et al. 2018. Considerations and consequences of allowing DNA sequence data as types of fungal taxa. IMA fungus 9: 167-175.

Kahramanmaraş'ta Yaygın Olarak Tüketilen Polifenol Yönünden Zengin Çoban Çökerten (*Tribulus Terrestris*) ve Çoban Çantası (*Capsella Bursa-Postaris*) Bitkilerin Antioksidan Gücünün Karşılaştırılması: in Vitro Çalışma

İlter DEMİRHAN¹, Meltem GÜNGÖR², Ergül BELGE KURUTAŞ³, Mehmet ÖZYURT⁴

¹Harran Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Elektronik-Otomasyon Bölümü, Biyomedikal Cihaz Teknolojisi Programı, Şanlıurfa/ Türkiye, ²Sanko Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Gaziantep / Türkiye, ^{3,4}Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Kahramanmaraş / Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0003-0054-7893>, ²<http://orcid.org/0000-0002-8062-1610>, ³<https://orcid.org/0000-0002-6653-4801>

⁴<https://orcid.org/0000-0002-2129-1236>

✉: ilterdemirhan@harran.edu.tr

ÖZET

Bu çalışma ile, Kahramanmaraş ili sınırları içinde doğal olarak yetişen Çoban Çantası (*Capsella bursa-postaris*) ve Çoban Çökerten (*Tribulus terrestris*) bitkilerinin doğal antioksidan enzim kapasitesinin ölçülmesi amaçlandı. Araştırma kapsamında Kahramanmaraş ili Bertiz yöresine ait *C.pastoris* ve *T.terrestris* bitkilerinden yararlanıldı. Bitki yaprakları, etanol ile hazırlanan çözücüde ekstrakte edilmiş daha sonra antioksidan enzim aktiviteleri katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) ile oksidatif stres indikatörü olan malondialdehit (MDA) düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle saptanmıştır. İki bitkinin SOD ve CAT enzim aktivitesi karşılaştırıldığında en yüksek CAT ve SOD aktivitesi *T.terrestris* bitkisinde ölçülürken *C.pastoris* bitkisinde bu değerler düşük bulunmuştur ($p<0.05$). MDA seviyeleri *C.pastoris* bitkisinde yüksek iken en düşük MDA seviyesi *T.terrestris* bitkisinde bulunmuştur ($p<0.05$). *C.pastoris* ve *T.terrestris* bitkileri yaprak dokularının antioksidan enzim aktivitesine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan analizlerde *T.terrestris* bitkisinin, *C.pastoris* bitkisine oranla daha fazla antioksidan enzim aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Her iki bitkide de antioksidan aktivitenin görülmesi, sahip oldukları fenolik ve flavonoid içeriklerinden kaynaklandığı sonucuna varılabilir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 25.02.2021

Kabul Tarihi : 09.04.2021

Anahtar Kelimeler

Antioksidan

Katalaz

Oksidatif stres

Comparison of The Antioxidant Power of Polyphenol-Rich Çoban Çökerten (*Tribulus Terrestris*) and Çoban Çantası (*Capsella Bursa-Postaris*) Plants Commonly Consumed in Kahramanmaraş: an in Vitro Study

ABSTRACT

Objective of this study to measure the natural antioxidant enzyme capacity of the Çoban Çantası (*Capsella bursa-postaris*) and Çoban Çökerten (*Tribulus terrestris*) plants grown naturally within the borders of Kahramanmaraş province. *C. pastoris* and *T. terrestris* plants belonging to Bertiz region of Kahramanmaraş province were used in the scope of the research. Plant leaves were extracted in a solvent prepared with ethanol, and then antioxidant enzyme activities catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and oxidative stress indicator malondialdehyde (MDA) levels were determined by spectrophotometric methods. The highest SOD and CAT enzyme activities of the two plants were measured in *T. terrestris* plant, while these values were found to be low in *C. pastoris* plant ($p<0.05$). While MDA levels were high in *C. pastoris*, the lowest MDA level was found in *T. terrestris* ($p<0.05$). It was concluded that leaf tissues of *C. pastoris* and *T. terrestris* plants have antioxidant enzyme activity. In the analysis, it was seen that *T. terrestris* plant sustained more antioxidant enzyme activity compared to *C. pastoris* plant.

Research Article

Article History

Received : 25.02.2021

Accepted : 09.04.2021

Keywords

Antioxidant

Catalase

Oxidative stress

- Atıf İçin:** Demirhan İ, Güngör M, Belge Kurutaş E, Özyurt M 2021. Çoban Çökerten (*Tribulus terrestris*) ve Çoban Çantası (*Capsella bursa-pastoris*) Bitkilerinde in Vitro Antioksidan Enzim Kapasitesi ve Oksidatif Stres Düzeylerinin Belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1154-1160. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.886422>.
- To Cite** Demirhan İ, Güngör M, Belge Kurutaş E, Özyurt M 2021. Comparison of The Antioxidant Power of Polyphenol-Rich Çoban Çökerten (*Tribulus Terrestris*) and Çoban Çantası (*Capsella Bursa-Postaris*) Plants Commonly Consumed in Kahramanmaraş: an in Vitro Study. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1154-1160. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.886422>.

GİRİŞ

Bitkiler yapısında bulunan farmakolojik özelliklere sahip bileşikler ve biyoaktif maddeler sayesinde serbest radikalleri süpürme özelliği gösterir ve günümüzde kullanılan ilaçların birçoğunun kökenini oluşturur. Bitkilerde tedavi amaçlı kullanım M.Ö. 5000'li yıllarda Mezopotomya uygarlığına dayanmakta olup yaklaşık 250 bitkisel drogen kullanıldığı tespit edilmiştir (Demirsoy, 1999). Gelecek yıllarda tüm dünyada bitkiler ile tedavinin artacağı Dünya Sağlık Örgütüncü bildirilmektedir (Sarışen, 2005). Bu sebeple, günümüzde bitkilerden elde edilen ekstraktların ana etken maddelerinin elde edilip değerlendirilmesi ekonomik ve sağlık açısından büyük önem taşımaktadır. Bitkilere ait yaprak, gövde, kök ve kabuk gibi kısımlar kullanılarak antioksidan aktivite ile ilgili bilimsel çalışmalar yapılmaktadır. Antioksidan aktivite çalışmaları olmasına rağmen yine de bazı bitkiler için sınırlı denilebilir. Bu bakımdan araştırmada antioksidan aktivite tayini sınırlı olan iki bitki türü seçilmiş ve tayin işlemi farklı bir yöntem ile yapılmıştır.

Türkiye'de tüm bölgelerde geniş yayılış gösteren Çoban çantası (*Capsella bursa-pastoris*) Cruciferae familyasına ait bir bitkidir ve halk arasında çoban çantası ve çingildaklı ot olarak bilinmektedir (Baytop, 1999). Taze yaprakları salata olarak da tüketilen ç. çantası çok çeşitli tıbbi etkilere sahip olup bazı çalışmalarda kullanılmıştır. Ratlarda yapılan çalışmalarda kan basıncını düzenlediği, antiülseratif ve antienflamatuar etkilerinin olduğu görülmektedir (Kurodo ve ark., 1969). Çoban Çökerten (*Tribulus terrestris*), Zygophyllaceae familyasına ait tek yıllık bir bitkidir. Bu bitki, yüzlerce yıldır çeşitli hastalıkların tedavisi için geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Çoban çökerten bitkisinin ana aktif bileşenlerini flavonoidler, alkaloidler, saponinler, amidler ve glikozitler oluşturmaktadır (Shadid ve ark., 2006).

Antioksidanlar radikal oluşumunun azaltılması, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumlu olan moleküllerdir (Hallwell., 1995). Antioksidanlar vücutta çok kısa ömürlü olmasına karşın saldırgan olan serbest radikaller ile savaşır. Prooksidan terimi, reaktif türler için kullanılan bir terimdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek az zararlı

veya zararlı olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır (Cao ve ark., 1999). Antioksidanlar bütün gıda maddelerinde bulunmakla birlikte gıdaların muhafazası veya gıda kalitesini artırmak amacıyla sonradan da eklenebilir. Besin çürümesinin engellenmesi veya acılığının giderilmesi durumlarında antioksidan maddelerden yararlanır (Evans ve ark., 1997). Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), karotenoidler ve polifenolik bileşiklerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketiminin kanser ve kalp hastalıklarının oluşumunu engellediği görülmektedir (Güçlü ve ark., 2005).

Çoban Çantası ve Çoban Çökerten bitkileri bazı aktarlarda ticari amaçla bulundurulmakla birlikte yerel halk tarafından yeterince bilinmemektedir. Literatür taramalarında, bu bitkiler ile ilgili antioksidan enzim aktivitesini inceleyen in vitro çalışmalara rastlanılmamıştır. Yapılan bu çalışmada, bu bitkilere ait antioksidan enzim aktiviteleri (SOD, CAT) ve oksidatif stres indikatörü (MDA) düzeyleri karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada Akdeniz Bölgesi Kahramanmaraş ili sınırlarında doğal olarak yetişen bitkiler kullanıldı. Bitki örnekleri sterilizasyon ve ayırma işlemleri yapılarak, oda şartlarında güneş görmeyecek şekilde ince bir tabaka halinde serilerek kurutuldu. Daha sonra örnekler değirmende çekilerek oda ısısında kullanılacak zamana kadar saklandı.

Biyokimyasal Analizler

Biyokimyasal analiz için bitki ekstresinin hazırlanması

Bitki örneklerinin hazırlanması işlemi KSÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Araştırma laboratuvarına getirilen taze bitki örnekleri steril bir neşter yardımıyla uygun kısımları alınarak küçük parçacıklara ayrıldı ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kurutulan bitki örnekleri lavion marka mekanik öğütücü yardımıyla toz haline getirilerek +4°C'de saklandı. Araştırmada ekstraksiyon işlemi etanol ile yapıldı. Bunun için 10 g bitki örneği alınarak 100 ml %70'lik etanol çözeltisi içerine konuldu ve

çalkalamalı inkübatörde (Nükleon NCI55) bir gece bekletildi. Ardından süzme işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen süzöntü 5000 rpm'de 5 dk süre ile santrifüj (Hettich 420 R) edildi. Süpernatant rotary evaparatör yardımıyla uzaklaştırıldı. Elde edilen madde hassas terazide (Radwag AS 510) tartıldı ve sonraki çalışmalar için güneş görmeyen alanda saklandı. Bu şekilde stok çözelti oluşturuldu.

Antioksidan Aktivitenin Saptanması

SOD aktivitesi tayini

Bitki ekstraktlarında SOD enzim aktivitesi, Fridovich tarafından açıklanan yöntemle ölçüldü (Fridovich, 1995). SOD, oksidatif enerji üretimi esnasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Bu yöntem, ksantin ve ksantin oksidaz kullanılarak oluşturulan süperoksit radikallerinin, 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5 fenil tetrazolium klorid (piyodonitrotetra zolium viyole:NT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin (OD) okunması esasına dayanmaktadır. Oluşan kırmızı rengin OD'si SOD yokluğunda oluşan renge göre azalır, buradaki farkın belirlenmesiyle de SOD aktivitesi ölçülür.

CAT aktivitesi tayini

CAT aktivitesi, 230 nm 'de hidrojen peroksit konsantrasyonundaki düşüşün ölçülmesiyle belirlendi (Beutler, 1984). CAT aktivitesi Ü/mg protein olarak ifade edildi. CAT hidrojen peroksitin yıkımını katalize eder. Hidrojen peroksitin CAT tarafından yıkım hızı, hidrojen peroksitin 230 nm'de ışığı absorbe etmesinden yararlanılarak spektrofotometrik olarak ölçüldü.

MDA düzeyinin tayini

Aerobik şartlarda pH 3.40'de tiyobarbitürik asit (TBA) ile örneğin 90-95 C°de inkübasyonu sonucu oluşan lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile pembe renkli kompleks oluşturma esasına dayanır. Oluşan bu renk şiddeti ortamdaki

MDA konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve 532 nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilir (Ohkawa, 1979).

Protein düzeyi

Folin Cioacalteu yöntemiyle hem protein hem de polifenol bileşiklerin düzeyleri saptanabilmektedir. Folin tekniği ile ekstrede proteinlerin içerdiği trozin ve triptofan rezidülerinin fosfotungustik –fosfomolibdik asit ile verdiği renk reaksiyonunun spektrofotometrik yöntemle 750 nm'deki absorpsiyon ölçümüne dayanır (Lowry, 1951). Sığır bovin serum albümin standart olarak kullanılmıştır.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel değerlendirmeler SPSS 22.0 paket programında yapıldı. Bitkilerin birbirleriyle karşılaştırılmalarında Mann Whitney U testi ve varyans analizi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık olarak P<0.05 düzeyi alındı.

BULGULAR

Çizelge 1'de görüldüğü gibi, iki bitki arasında en yüksek SOD ve CAT enzim aktivitesi Çoban Çökerten bitkisinde görüldü (p<0.05). Öte yandan, Çoban Çantası bitki ekstresinde MDA düzeyi yüksek iken, çoban çökerten bitki ekstresinde MDA düzeylerinin düşük olduğu saptandı (p<0.05) (Şekil 1).

TARTIŞMA ve SONUÇ

Türkiye, farklı bölgelerde çok çeşitli iklim bölgelerine sahip olması nedeni ile oldukça uygun tıbbi ve aromatik bitki florasına sahiptir. Meyve, sebze ve yabani otlar tedarik edilerek besin kaynağı olarak yüzyıllardır kullanılmaktadır. Bu besin kaynakları sahip oldukları flavonoid gibi bileşikler ile farmakolojik etkilere sahip olabilmektedir. Bu etkilerinden dolayı sağlık takviyelerinde veya ilaç olarak tercih edilen ajanlara dönüştürülerek kullanılmakta ve büyük ilgi görmektedir (Özkol ve ark., 2017).

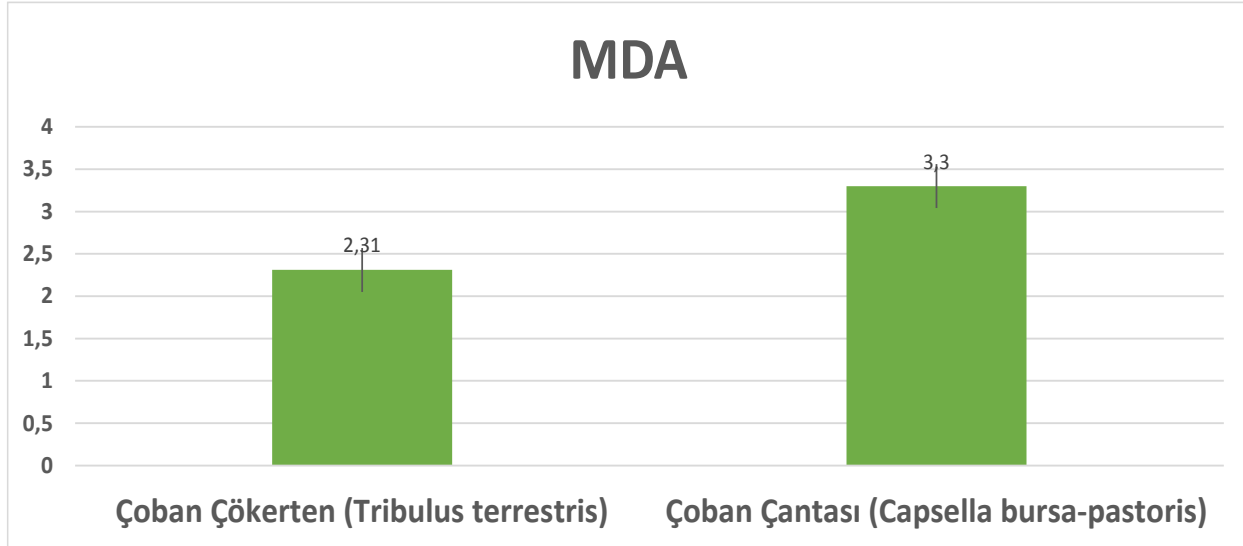
Çizelge 1. Çoban Çökerten (*Tribulus terrestris*) ve Çoban Çantası (*Capsella bursa-pastoris*) da antioksidan enzim aktiviteleri (CAT ve SOD)

Table 1. Antioxidant enzyme activities (CAT and SOD) in Çoban Çökerten (*Tribulus terrestris*) ve Çoban Çantası (*Capsella bursa-pastoris*)

	Çoban Çökerten (<i>Tribulus terrestris</i>) **	Çoban Çantası (<i>Capsella bursa-pastoris</i>)
CAT (Ü/mg protein)	113.6±0.95*	104.8±0.57*
SOD (Ü/mg protein)	1.51±0.03*	1.32±0.08*

*Sonaçlar ortalama ± standart hata olarak verildi.

**Çoban Çökertende CAT ve SOD aktivitesi Çoban Çantasına göre daha yüksek bulundu (p<0.05).



Şekil 1. Çoban Çökerten (*T.terrestris*) ve Çoban Çantası (*Capsella bursa-pastoris*) bitkilerinde MDA düzeyleri.
Figure 1. Comparison of MDA levels of Çoban Çökerten (*T.terrestris*) ve Çoban Çantası (*Capsella bursa-pastoris*).

Bitkiler geleneksel tedavi yöntemlerinde kullanılmak üzere doğrudan kullanılabilir veya çeşitli yöntemlerle ilaç şeklinde hazırlanır. Taze bitkiler doğrudan veya su ile kaynatıldıktan sonra dahilen veya haricen uygulama yapılarak kullanılabilir. Bitkilerden yemek, reçel, marmelat şeklinde de tedavi edici olarak faydalandığı literatürlerde kayıtlıdır (Tuzlacı ve Şenkardeş., 2016). Birçok hastalığın oluşumunda rolü olan oksidatif stres ve serbest radikallerin, canlı organizmalara olan zararlarını gidermek açısından, antioksidan yapıya sahip maddelerin tedarik edilmesi ve bunların antioksidan enzim aktivitelerinin bilinmesi sağlık açısından büyük öneme sahiptir (Kurutaş, 2015). Bitkilerde antioksidan enzim kapasite; test sistemi, ortam şartları ve kullanılan ekstraktlara bağlı olarak değişmektedir. Antioksidan enzim aktivitesi üzerine spektrofotometrik yöntemlerin kullanıldığı herhangi bir araştırma yapılmamıştır. Bu çalışmada bitkilere ait oksidatif strese karşı koyan antioksidan enzim aktivitelerinin miktarı ve lipid peroksidasyon seviyeleri (MDA) belirlenmiştir.

Araştırmada kullanılan bitkilerin (Ç. çökerten ve Ç.çantası), çok köklü geçmişlerinin olduğu, hastalıkların tedavisinde halk tarafından kullanıldığı ancak her iki bitki grubu için araştırmaların son yıllarda ağırlık kazandığı gözlenmektedir. Ç. çantası bitkisinin; flavonoid, sterol, histamin, tiramin, asetilkolin, organik asit, vitamin ve iz element gibi bileşikler bulunduran geniş bir kimyasal yelpazeye sahip olduğu görülmektedir (Al-Snafi, 2015). Ç. çantası bitkisinin insanlıkla ilişkisinin yüzyıllar öncesine dayandığı, özellikle Çin ve Japonya'da kanamaları inhibe edici, akciğer, mide ve böbrek rahatsızlıklarında tedavi edici olarak kullanıldığı bildirilmiştir (Al-Snafi, 2015). Son yıllarda Ç. çantası bitkisi ile çalışmalar yapılmış ve insan sağlığı açısından önemli sonuçlar elde edilmiştir. Ç. çantası

bitkisine ait su, etanol ve metanol ekstraktlarının sırasıyla %42.9, %29.5 ve %42.9 oranında tümör inhibisyonuna neden olduğu görülmektedir (Yıldırım ve ark., 2013). Karaciğer hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Alqasoumi ve ark., 2008). Halk arasında tansiyon düşürmek amacıyla kullanıldığı literatürde kayıtlıdır (Yiğit, 2014). Ç. Çökerten bitkisi de Ç. Çantası bitkisi gibi yüzyıllardır halk arasında geleneksel tıpta kullanılan tek yıllık bitkidir. Ç. Çökerten bitkisinin ana aktif bileşenleri arasında flavonoidler, alkaloidler, saponinler, amidler ve glikozitlerin olduğu görülmektedir (Shahid ve ark., 2016). Bitkinin tansiyon düşürmek amacıyla ve kalp hastalıklarında yerel halk arasında kullanıldığı literatürde kayıtlıdır (Güneş ve ark., 2011).

Antioksidan aktivite tayininde çok çeşitli (etanol, metanol, hekzanol, su) çözücüler hazırlanabilmektedir. Bu çözücüler ile hazırlanan ekstraktlar, bitki dokularının tıbbi açıdan aktif kısımlarının durağan kısımlarından ayrılmasını sağlar. Çözücülerle ekstraksiyon, bitkide bulunan antioksidan bileşiklerin kazanılmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Polar özellikli etanol çözeltisi, bitkinin sert kısımlarına ve benzer yapıları ulaşılmasını sağlar. Bu yüzden çalışmada ekstraksiyon verimi yüksek polar yapıları etanol çözeltisi kullanıldı. Her iki bitkinin antioksidan enzim kapasiteleri ölçülmüş ve Ç. çökerten bitkisinin daha yüksek antioksidan enzim aktivitesine (SOD, CAT) sahip olduğu görülmüştür. Bu durumun Ç. çökerten bitkisinin daha yüksek oranda fenolik bileşik içeriğinden kaynaklandığı sonucuna varılabilir. SOD enzimi bitkide önemli organellerden kloroplast ve mitokondri içerisinde yer alır. Bitkinin canlılığını sürdürebilmesi bu enzimlerin miktarına bağlıdır. Özellikle yapraklarda oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2)'in yok edilmesinde SOD ve CAT enzimlerinin rol aldığı belirtilmiştir (Omari ve Nhiri, 2020).

Enzimatik sistemler antioksidan savunmanın bir parçası olsa da, polifenoller gibi daha birçok molekül, antioksidan aktivitelerini dolaylı veya doğrudan uygulayabilir. Dolaylı etkileri, antioksidan enzimlerin indüklenmesi yoluyla endojen antioksidan sistemlerin güçlendirilmesinin yanı sıra, tüketilmeden önce gıdalardaki lipidlerin oksidasyonunun önlenmesi ve böylece prooksidan alımının azaltılmasıyla meydana gelir. Folin Ciocalteu tekniği, bitki özlerindeki toplam fenoliklerin ölçümü için yaygın olarak kullanılmaktadır. Gallik asit, kateşin, tanik asit, klorojenik asit, kafeik asit, vanilik asit ve ferulik asit bir referans standardı olarak kullanılmaktadır. Folin yönteminin kullanımında, askorbik asit, şekerler ve aromatik aminler gibi diğer maddelerin ölçümleri nedeniyle bir numunede daha yüksek toplam fenolik içerik (TPC) değerleri verdiği rapor edildiğinden bazı yanlışlıklar bildirilmiştir (folin reaktifinin okside olması gibi). Bireyler tarafından her bir teste uygulanan modifikasyonlar nedeniyle tutarsızlığı, eğri kalibrasyonu için kullanılan standartların tipinde tekdüzelik eksikliği ve farklı araştırmacılardan istenen fenolik bileşik bileşimi ve antioksidan testlerinin verilerini karşılaştırmak genellikle zordur. Bu çalışma da folin yöntemiyle örneklerde polifenol düzeyi belirlemek hatalı sonuçlara neden olabileceği düşünüldüğünden dolayı antioksidan enzim aktivite (CAT ve SOD) sonuçları mg protein başına düşen ünite olarak ifade edildi.

Araştırma sonuçlarına bakıldığında Ç. çökerten bitkisinin yüksek oranda SOD ve CAT enzim aktivitesi sahip olduğu görülmektedir. Yuan ve ark. etanol ile hazırlanmış bitki yaprak ekstraktlarının antioksidan aktivitesinin olduğunu, hücre canlılığını artırdığını, kaspaz-3'ün düzenlenmesi yoluyla göz ARPE-19 hücrelerinin apoptozunun önlenildiği belirtilmiştir (Yuan ve ark., 2020). Ayrıca ç. çökerten bitkisinin ARPE-19 hücrelerinde H₂O₂ tarafından indüklenen aşağı regüle edilmiş SOD ve CAT aktivitelerini artırdığı sonucuna vardılar. H₂O₂'nin çok düşük olduğu konsantrasyonlarda bitkide herhangi bir antioksidan enzim etkinliği görülmemektedir. H₂O₂'nin konsantrasyonlarında artışlarla birlikte antioksidan enzim sistemi (SOD ve CAT) devreye girdiği düşünülmektedir (Liu ve ark., 2010). Hammoda ve ark. yüksek antioksidan seviyesine sahip olduğunu DPPH radikal süpürme yöntemi ile tespit etmişlerdir (Hammoda ve ark., 2013). Ç. çökerten bitkisi antioksidan bakımından doğal, zengin ve sağlıklıdır. Benzer değerlendirmenin, Tian ve ark. tarafından ABTS ve DPPH yöntemi ile ç. çökerten bitkisinin antioksidan ölçüm sonucuna göre yaptıkları görülmektedir (Tian ve ark., 2019). Ç. çökerten bitkisinde CAT ve SOD antioksidan enzim aktivitesinin yüksek olması; hücre bölünmesi başta olmak üzere hücresel homeostazisin sağlanmasında rolü olduğu düşünülebilir.

Araştırmada ç. çantası bitkisinin antioksidan enzim aktivitesine sahip olduğu görülmektedir. Yıldırım ve ark. araştırmalarında çoban çantası bitkisinin etonollü ekstraktlarının, plazma ve doku biyokimyasal parametreleri üzerine SOD, CAT ve glutatyon peroksidaz aktivitesini artırdığını gözlemlediler (Yıldırım ve ark., 2020). Benzer şekilde, ç. çantası bitki özütünün antioksidan enzim (SOD, CAT) aktivitesini artırdığını ve hücrelerde nitrik oksit oluşumu üzerinde orta derecelerde inhibe edici etkisinin olduğunu belirten çalışma mevcuttur (Min Cha ve ark., 2017). Çoban Çantası bitkisinin antioksidatif etki gösterdiği Peng ve ark. tarafından in vivo fare modeli üzerinde gösterilmiş, fenolik asit ve flavonoidler dahil 24 bileşik içerdiği vurgulanmıştır (Peng ve ark., 2019). Fenolik asit ve flavonoid çeşitliliği bitkide antioksidan enzim değerinin göstergesi olarak değerlendirilebilir. Fenolik bileşikler bitkilerin hayatta kalmasında rol oynayan oksidatif strese karşı koyan çok önemli ajanlardır. Antioksidan enzimler, bitkileri çevresel stres uyarılarına karşı korumaktadır. Dolayısıyla bu enzimlerin bitkide bulunma oranları oldukça önemlidir.

Araştırma sonuçlarına bakıldığında her iki bitkinin de antioksidan enzim aktivite gösterdiği görülmektedir. SOD ve CAT enzim aktivitesinin ç. çökerten bitkisinde daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bu durum bitkinin yaşam alanlarının farklı olması, toprağın yapısı, sıcaklık vb. çevresel faktörlere bağlanabilir. Özellikle ağır metal iyonlarının miktarı bu enzimlerin çalışma şartlarını etkiler. Düşük konsantrasyonlarda bakır (Cu²⁺) iyonunun varlığı SOD ve CAT enzim aktivitesini azaltırken, normal düzeydeki Cu²⁺ iyonu varlığı SOD ve CAT enzim aktivitesini artırmaktadır. Bu açıdan bakıldığında ç. çantası bitkisine ait çözücülerde SOD ve CAT aktivitesinin ç. çökerten bitkisine göre daha düşük düzeylerde olması toprağın mineral madde içeriğine bağlı olabilir (Stanisavljevic ve ark., 2012).

Oksidatif stresin göstergesi olan MDA, aynı zamanda lipid peroksidasyonunun (LPO) son ürünüdür. LPO'nun fazla olması; hücre ya da ilgili dokularda oksidatif hasarın yoğun olduğu anlamına gelir. Bitkide bulunan antioksidan maddeler lipid peroksidasyonuna karşı ilgili dokuyu korumaktadır. Araştırma da, ç. çökerten bitkisinde MDA düzeyi düşük miktarlarda saptanmış olup bunu destekleyen benzer çalışmalar mevcuttur. Bu durum, ç. çökerten bitkisinin lipid peroksidasyonunda engelleyici özelliğinin daha fazla olduğunun göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Bir başka ifade ile ç. çökerten bitkisinde fenolik bileşik oranı daha fazla denilebilir. Yapılan çalışmalarda, en düşük MDA düzeyi, antioksidan enzim aktivitesinin en fazla olduğu durumlarda da görülmektedir (Yıldırım ve ark., 2013). MDA seviyesinin düşük değerlerde olması, lipid peroksidasyonun az olduğu anlamına gelmektedir. Lipid yıkımının az olması ile bitki doku canlılığı korunmuş olur. Kamboj ve ark. ç.

çökerten bitkisinin oksidatif stres ve lipid peroksidasyonunu azalttığını gözlemlediler (Kamboj ve ark., 2011). Ç. çökerten bitkisi ile yapılan farklı bir çalışmada güçlü antioksidan özelliğinin olduğu ve lipid peroksidasyonunu engellediği için düşük MDA seviyelerinin gözlemlendiği bildirilmiştir (Ivanova ve ark., 2005). Ç. çantası bitkisinin karaciğerde lipid birikimini engellediği in vivo araştırmalar ile gösterilmiştir (Choi ve ark., 2017). Çoban Çantası bitkisinin anti inflamatuvar ve antioksidatif olarak değerlendirildiği çalışmada MDA değerinin düşük seviyelerde olduğu gösterilmiştir (Choi ve ark., 2017). Çözücülerin fenolik bileşiklerle olan etkileşimleri MDA değerinin düşük ya da yüksek değerlerde okunmasına neden olabilir. Araştırmada kullanılan etanol çözücünün MDA seviyesinin düşük değerlerde okunmasında bir faktör olduğu söylenebilir.

Günümüzde değişen beslenme alışkanlıkları, salgın hastalıkların görülme sıklığı ve stres ortamı birçok hastalığın ortaya çıkışını tetiklemektedir. Bilim dünyasına yön veren mekanizmalardan birisi de şüphesiz bu hastalıklara yakalanma riskini en aza indirmek olacaktır. Bu açıdan bitkilerin biyolojik içeriklerini ve farmakolojik aktivitelerini öğrenmek büyük önem arz etmektedir. Bu bağlamda yapılan bu çalışmada her iki bitki grubunun da etkin antioksidan değerine sahip olduğu görülmüştür.

Literatür taraması yapıldığında her iki bitki türü özelinde antioksidan enzim aktivite ölçümü çalışmaları çok azdır. Günümüzde farklı yöntemler kullanılarak antioksidan ölçümler yapılabilmektedir. Bu çalışmada spektrofotometrik yöntemler kullanarak antioksidan enzim aktiviteleri üzerine sonuçların alınması hedeflendi. Bu anlamda antioksidan enzim parametreleri (SOD, CAT) ve oksidatif stres parametreleri (MDA) düzeyleri ölçülerek değerlendirildi. SOD ve CAT enzim değerlerine göre ç. çökerten bitkisinin antioksidan enzim aktivitesinin daha yüksek değerlerde olduğu gözlemlendi. Bulunan bu sonuçlar literatür çalışmalarını destekler niteliktedir. Bitkilerin aktif bileşiklerini ortaya çıkarmak için çeşitli solventler kullanılmaktadır. Etanol geleneksel olarak antioksidan aktiviteye sahip çoğu bitki ürününü ekstrakte etmek için kullanılan evrensel bir çözücüdür. Bu bakımdan araştırmada her iki bitki için çözücü olarak etanol tercih edilmiştir. MDA seviyelerine bakıldığında ç. çökerten bitki ekstresi; ç. çantası bitki ekstresine göre daha düşük değerlerde sonuç vermiştir. Her iki bitki grubunda lipid yıkımı azaltıcı etkisi görüldüğü söylenebilir. Ancak bu oran ç. çökerten bitkisinde daha fazladır. Bu bakımdan önceki çalışmaları destekler nitelikte sonuçlar ortaya konmuştur.

Bu her iki bitki ekstraktlarında in vitro antioksidan enzim aktivitelerini saptanması ve MDA miktar tayini ilk defa bu çalışmada değerlendirildi ve çeşitli hastalık modelleri oluşturulan hayvan modellerinde bu iki bitki

ekstraktlarının koruyucu etkileri ileri de yapılacak çalışmalarda araştırılabilir. Dahası, ç. çantası ve ç. çökerten üzerine yapılan sınırlı çalışmalar nedeniyle, bu kantitatif çalışma, ileri çalışmalara yeni ışık tutacaktır, in vivo çalışmaların yapılması ile bu araştırma desteklenmelidir. Bu araştırma ile her iki bitkinin antioksidan aktivite bakımından güçlü olduğunu ve bitkiyi oksidatif strese karşı koruyan mekanizmaların bulunduğu gösterilmiş durumdadır. Özellikle çok pahalı bir sektör haline gelen ilaç sektörüne, yapılacak araştırmalar ile yeni umutlar olacağı düşünülmektedir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Alqasoumi SI, Al-Rehaily AJ, AlSheikh AM, Abdel-Kader MS 2008. Evaluation of The Hepatoprotective Effect of Ephedra Foliate, Alhagi Maurorum, Capsella Bursa-Pastoris and Hibiscus Sabdariffa Against Experimentally Induced Liver Injury in Rats. *Natural Product Sciences*.14(2): 95-9.
- Al-Snafi AE 2015. The Chemical Constituents and Pharmacological Effects of Capsella Bursa-Pastoris- A Review. *International Journal of Pharmacology and Toxicology*. 5(2): 76-81.
- Baytop T 1999. Türkiye’ de Bitkilerle Tedavi Geçmişten Bugüne, 2. Baskı. Nobel Tıp Basımevi: İstanbul, Türkiye, sy.348-349.
- Beutler E 1984. Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods Third Edition. Grune and Stratton, New York, 11-12
- Cao G, Prior R L 1999. The Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples, *Methods in Enzymology* 299, 50-62.
- Choi H. K, Shin E. J, Park S. J, Hur, H. J, Park J. H, Chung M.Y, & Hwang J.T 2017. Ethanol Extract of Capsella Bursa-Pastoris Improves Hepatic Steatosis Through Inhibition of Histone Acetyltransferase Activity. *Journal of Medicinal Food*. 20(3): 251-257.
- Demirsoy A 1999. Yaşamın Temel Kuralları, Omurgasızlar /Böcekler; Entomoloji. Meteksan Yayınevi, Ankara, 6.Baskı; 447 sy.
- Evans R, Miller NJ, Paganga G 1997. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.
- Fridovich I 1995. Superoxide Radical and Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry* 64(1): 97-112.

- Güçlü K, Sözgen K, Tütem E, Özyürek M, Apak R 2005. Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid Using Copper (II)-Neocuproine Reagent in Beverages and Pharmaceutical, *Talanta*, 65, 1226-1232.
- Güneş F, Özhatay N 2011. An Ethnobotanical Study From Kars (Eastern) Turkey. *Biological Diversity and Conservation*, 4/1, 36-40.
- Hallwell B, Aeshbach R, Löliger J, Aruoma OI 1995. The Characterization Of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 33, 601- 617.
- Hammada, H. M., Ghazy, N. M., Harraz, F. M., Radwan, M. M., ElSohly, M. A., & Abdallah, II 2013. Chemical Constituents From *Tribulus Terrestris* and Screening of Their Antioxidant Activity. *Phytochemistry*, 92, 153-159.
- Ivanova, D., Gerova, D., Chervenkov, T., & Yankova, T 2005. Polyphenols and Antioxidant Capacity of Bulgarian Medicinal Plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 96(1-2): 145-150.
- Kamboj P, Aggarwal M, Puri S, & Singla, SK 2011. Effect of Aqueous Extract of *Tribulus Terrestris* on Oxalate-Induced Oxidative Stress in Rats. *Indian Journal of Nephrology*, 21(3): 154.
- Kuroda K, Kaku T 1969. Pharmacological and Chemical Studies on The Alcohol Extracts of *Capsella Bursa-Pastoris*, *Life Sciences*, 8(1): 151-155.
- Kurutaş EB 2015. The Importance of Antioxidants Which Play The Role in Cellular response Against Oxidative/Nitrosative Stress:Current State. *Nutrition Journal* 15(1):1-22.
- Liu Y, Jiang H, Zhao Z, An L 2010. Nitric Oxide Synthesis Like Activity-Dependent Nitric Oxide Production Protects Against Chilling Induced Oxidative Damage in *Chorispora Bungeana* Suspension Cultured Cells. *Plant Physiology And Biochemistry* 48: 936- 944.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein Measurement Eith The Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1): 265-275.
- Min Cha J, Won Se S, Tae Hyun L, Lalita S, Sun Yeou K, Kang Ro L 2017. Phenolic Glycosides From *Capsella Bursa-Pastoris* (L.) Medik and Their Anti-Inflammatory Activity. *Molecules*. 20;22(6): 1023.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K 1979. Assay For Lipid Peroxides in Animal Tissues By Thiobarbutiric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry* 95 (2): 351-358.
- Omari R.E.L, Nhiri M 2015. Adaptive Response to Salt Stress in *Sorghum* (*Sorghum bicolor*). *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*.15(7): 1351-1360.
- Özkol H, Bulut G, Balahoroglu R, Tuluçe Y, Ozkol, HU 2017. Protective Effects of Selenium, N-Acetylcysteine and Vitamin E Against Acute Ethanol İntoxication in Rats. *Biological Trace Element Research*. 175(1): 177-85.
- Peng J, Tianyoung U, Jin L, Jing D, Krei Z, Bahoui C, Kaikai L 2019. Shepherd's Purse Polyphenols Exert Its Anti-Inflammatory and Antioxidative Effects Associated With Suppressing MAPK and NF- κ B Pathways and Heme Oxygenase-1 Activation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 13;2019: 7202695.
- Sarışen Ö, Çalışkan D 2005. Fitoterapi: Bitkilerle Tedaviye Dikkat, *Sürekli Tıp Eğitimi Dergisi*, 14(8): 182.
- Shadid M, Riaz M, Talpur A.M, Pirezada T 2016. Phytopharmacology of *Tribulus Terrestris*. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*. 30(3): 785-788.
- Stanisavljević N, Savić J, Jovanović Ž, Miljuš-Djukić J, Radović S, Vinterhalter D,& Vinterhalter B. 2012. Antioxidative-Related Enzyme Activity in *Alyssum Markgrafii* Shoot Cultures as Affected by Nickel Level", *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(5): 1997-2006.
- Tian C, Zhang Z, Wang H, Guo Y, Zhao C, Liu M.2019. Extraction Technology, Component Analysis, and İn Vitro Antioxidant and Antibacterial Activities of Total Flavonoids and Fatty Acids From *Tribulus Terrestris* L. Fruits. *Biomedical Chromatography*. 33(4): 4474.
- Tuzlacı, E. Şenkardeş, İ 2016. Turkish Folk Medicinal Plants, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 15, 63-67.
- Yiğit SŞ 2014. Gaziantep ili Aktarlarında Satılan Bitkiler ve Etnobotanik Özellikleri, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 56 sy.
- Yildirim AB, Karakas FP, Turker AU 2013. In Vitro Antibacterial and Antitumor Activities of Some Medicinal Plant Extracts, Growing in Turkey. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 6(8): 616-24.
- Yildirim BA, Aydın T, Kordali S, Yildirim S, Cakir A. 2020. Antihemorrhoidal Activity of Organic Acids of *Capsella Bursa-Pastoris* on Croton Oil-İnduced Hemorrhoid in Rats. *Journal of Food Biochemistry*. Sep;44(9): 13343.
- Yuan Z, Weiwei D, Xiangdong H, Donglei Z, Wei H 2020. *Tribulus Terrestris* Ameliorates Oxidative Stress-Induced ARPE-19 Cell Injury through the PI3K/Akt-Nrf2 Signaling Pathway. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 14:2020:7962393.



Investigation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Paliurus spina-christi* Mill. in Kahramanmaraş, Turkey

Lütfiye ARSLAN¹, Elife KAYA^{2*}

¹Department of Bioengineering and Sciences, Institute of Science, Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Kahramanmaraş, Turkey,

²Department of Food Processing, Vocational School of Technical Sciences, Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Kahramanmaraş, Turkey,

³<https://orcid.org/0000-0001-7469-1279> ²<https://orcid.org/0000-0001-7213-3601>

✉: elife_kaya@hotmail.com

ABSTRACT

In this study, the antioxidant and antimicrobial activities of the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *Paliurus spina-christi* Mill, from Kahramanmaraş city were investigated. The antioxidant activities of the extracts were determined using the cupric ion (Cu⁺²) reducing antioxidant capacity (CUPRAC), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl-hydrate (DPPH), and 2,2-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) methods. The results were evaluated by comparing them with those of butylated hydroxytoluene (BHT) and Trolox, as standard substances. On the other hand, the antimicrobial activities of the plant extracts were identified using the agar well diffusion method. According to the CUPRAC method, the antioxidant activities of the plant extracts at a concentration of 800 µg/mL were found to be lower than those of the standard antioxidant substances. At the same concentration, the DPPH radical scavenging activity of the ethanolic extract of the leaves of the plant was found to be higher than that of Trolox. In the ABTS method, the radical scavenging activity of the fruit of the plant was found to be high and close to those of the standard antioxidants. According to the data obtained from antimicrobial studies, ethanol extracts obtained from fruit and leaf parts on all microorganisms except *Pasteurella multocoda* and *Bacillus cereus* bacteria have the highest zone diameter. The ethanol extract of fruit of the plant was found to be more effective in *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and *Candida albicans*.

Research Article

Article History

Received : 04.12.2021

Accepted : 07.04.2021

Keywords

Paliurus spina-christi Mill.,
Antioxidant
Antimicrobial
Rhamnaceae

Kahramanmaraş İlindeki *Paliurus spina-christi* Mill. Bitkisinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması

ÖZET

Çalışmada, Kahramanmaraş ilinde bulunan *Paliurus spina-christi* Mill. (Karaçalı) bitkisinin meyve ve yaprak kısımlarından elde edilen su ve etanol ekstratlarının antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir. Ekstrelerin antioksidan aktiviteleri, kuprik iyonu (Cu⁺²) indirgeme (CUPRAC), 1,1-Difenil 2-pikril hidrazil (DPPH) ve 2,2-azinobis (3-etilbenzo-tiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) yöntemleri ile belirlenmiştir. Sonuçlar, BHT (Bütil hidroksitoluen) ve Troloks standart maddeleriyle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Bitki ekstratlarının antimikrobiyal aktiviteleri ise agar kuyu difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. CUPRAC yöntemine göre, bitki ekstratlarının 800 µg/ml konsantrasyondaki antioksidan aktivitelerinin, standart antioksidan maddelere göre daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Aynı konsantrasyonda, bitkinin yaprak kısmının etanol ekstresinin DPPH radikali giderme aktivitesinin Trolokstan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. ABTS yönteminde ise, bitkinin meyve kısmının radikal giderme aktivitesinin yüksek ve standart antioksidanlara yakın olduğu tespit edilmiştir. Antimikrobiyal çalışmalardan elde edilen verilere göre *Pasteurella multocoda* ve *Bacillus cereus* bakterileri dışında tüm

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 04.12.2020

Kabul Tarihi : 07.04.2021

Anahtar Kelimeler

Paliurus spina-christi Mill.,
Antioksidan,
Antimikrobiyal
Rhamnaceae

mikroorganizmalar üzerinde meyve ve yaprak kısmından elde edilen etanol ekstrelerinin en yüksek zon çapına sahip olduğu, bitkinin meyve kısmının etanol ekstresi ise *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Candida albicans*'da daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

To Cite : Arslan L, Kaya E 2021. Investigation of Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Paliurus spina-christi* Mill. in Kahramanmaraş, Turkey. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1161-1169. DOI: 10.18016/ksutarimdoga.vi.835763.

INTRODUCTION

Today, the use of some herbs for therapeutic purposes, intended for maintaining a healthy life, and the subsequent consumption of natural antioxidants is increasing with each passing day, as are the number of studies on this subject. Many antioxidant compounds found naturally in vegetal sources have been identified as free radicals or active oxygen scavengers. Reactive oxygen derivatives, known as free radicals, induce the oxidation reactions in foods, causing spoilage and the loss of color and aroma, as well as many diseases in humans (Valko et al., 2006). Antioxidant substances are used to lessen the damage of free radicals and some kinds of reactive oxygen, as well as extend the shelf life of foods. These compounds are abundant in vegetables, shelled and unshelled fruits, seeds, leaves, flowers, roots, and shells (Pratt and Hudson, 1990; Damien Dorman et al., 1995; Tomaino et al., 2005). Natural antioxidants delay the progression of many chronic diseases by protecting the human body from free radicals, and also delay oxidative spoilage in foods (Gülçin et al., 2003). Synthetic antioxidants are too often used in the food industry to extend the shelf life of foods. Butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG), and tert-butylhydroquinone (TBHQ) are the most commonly used synthetic antioxidants in this field (Fk1 et al., 2005). However, restrictions have been imposed on the use of synthetic antioxidants due to their side effects; hence, today, the natural antioxidants found in foods have gained more importance.

Due to the complex structures of the plant extracts, the evaluations were conducted using multiple methods instead of a single method in the identification of the antioxidant characteristics (Chu et al., 2000). The methods used studies, such as CUPRAC, DPPH, and ABTS^{•+}, have been commonly used in the evaluation of plant extracts. Essential oils and plant extracts obtained from various vegetal sources are known to have antimicrobial activities on some microorganisms. Antimicrobial agents that also have aromatic properties are used for protecting raw and processed foods from spoilage, in the treatment of infectious diseases in medicine, in the field of alternative medicine, and in natural treatment processes (Hammer et al., 1999, Prince and Prabakaran, 2011).

Paliurus spina-christi Mill. (*Rhamnaceae*), colloquially known by different local names, such as blackthorn, Sincan thorn, bush thorn, and Christ's thorn, is spread

across the Balkans, the Caucasus, Southern Europe, and particularly, in Turkey (Deligöz et al., 2007). *P. spina-christi*, which is used with various medical methods by local people, is also important in terms of the substances it contains. The plant is known to have significant biological activities, since it contains alkaloids, flavonoids, glycosides, polyphenols, tannins, methyl esters of natural fatty acids, sterols, and free fatty acids (Medić-Šarić, M et al., 1996). Studies have also reported that the plant is used as an antidiarrheal, diuretic and antirheumatic medication, and that it has different extracts that comprise antimicrobial, hypolipidemic, antioxidant, antidiabetic, and antigenotoxic activities (Brantner and Males, 1990, 1999; Schirarend and Olabi, 1994; Brantner et al., 1996; El Rabey et al., 2014; Zor et al., 2017; Takım, 2021).

This study was intended to determine the antioxidant and antimicrobial activities of *P. spina-christi*, located in the city of Kahramanmaraş, which is used for medical purposes by the local people. For this reason, the antioxidant and antimicrobial properties of the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi* were investigated.

MATERIALS and METHODS

Chemicals

2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline [Neocuproine], 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) [ABTS], butylated hydroxytoluene [BHT], 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl [DPPH] and 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid [Trolox] were obtained from Sigma (Sigma-Aldrich GmbH, Sternheim, Germany). All other chemicals used were analytical grade and obtained from either Sigma-Aldrich or Merck.

Plant materials

The *P. spina-christi* sample used within the scope of the study was collected from the Süleymanlı town of Onikisubat in Kahramanmaraş Province, between May and June in 2018. The plant sample was identified and confirmed by Asst. Prof. Dr. Seyran PALABAŞ UZUN. A voucher specimen was deposited in the Kahramanmaraş Sütçü Imam University Forest Faculty Herbarium (KASOF 1324). The fruits and leaves of the plant were left to dry completely in the shade at room temperature. The completely dried

fruits and leaves of the plant were ground into a fine powder using a blender (Waring Commercial). The ground samples were kept at 4 °C until performing the experiments.

Preparation of ethanol and water extracts

For the water extracts, 20 g of dried fruit and leaf samples were weighed separately (at a ratio of 1:20), and 400 mL of pure water was added to each, and then they were mixed on a magnetic stirrer for 30 min (Gülçin, 2005). The extracts were filtered through Whatman No. 1 filter paper. The collected extracts were frozen at -20 °C, and once frozen, the extracts were lyophilized for a period of 18 h.

For the ethanol extracts, 20 g of the samples were weighed separately, and 400 mL of pure ethanol was added to each, and then they were mixed on a magnetic stirrer at 3000 rpm for a period of 6 h. The ethanol extracts were filtered through Whatman No. 1 filter paper, and the ethanol was removed from the collected extracts using an evaporator at 40 °C. Samples at concentrations of 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, and 800 µg/mL were prepared using the extracts.

Cupric ions reducing antioxidant capacity assay

The cupric ion reduction activities of the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi* were identified CUPRAC method of Apak et al. (2004). First, 1×10^{-2} M of CuCl_2 solution was added into the test tubes, and then 7.5×10^{-3} M of neocuproin solution and 1 M of ammonium acetate buffer were added. After mixing these solutions, the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of the plant, prepared at different concentrations (12.5–800 µg/mL), were added to the mixture, and absorbance was recorded at 450 nm. BHT and Trolox were used as the standard.

1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl-hydrate free radical scavenging assay

The free radical scavenging activities of the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi* were identified using DPPH, according to the method of Blois (1958).

First, 1 mL of 10^{-3} M DPPH radical solution was added to the 12.5–800 µg/mL concentrations of the water and ethanol extracts of the fruit and leaves of the plant. After keeping the mixtures at room temperature for 30 min, the absorbance at 517 nm was recorded against the blank, using the control solution (consisting of ethanol and DPPH). BHT and Trolox were used as the standard. A decrease in the absorbance value indicated the presence of an antioxidant substance in the environment. All of the antioxidant activity experiments were done with three repetitions. The values were calculated using the formula below.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} is the absorbance value of the control sample containing the DPPH radical solution alone, A_{sample} is the measured absorbance value of the sample prepared by adding a solution containing the DPPH radicals to the extracts.

2,2-Azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity assay

The ABTS radical scavenging activities of the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi* were identified according to the method described by Re et al. (1999). For the implementation of the method, the 2 mM ABTS solution was mixed with potassium persulfate solution at a ratio of 1/0.5, and then the mixture was kept in a magnetic stirrer in the dark for 1 night to obtain the $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radicals. Before using the resultant radical solution, its absorbance at 734 nm was adjusted to 0.700 ± 0.025 nm with a phosphate buffer of 0.1 M and pH = 7. The required amount was taken from the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of the plant, prepared at different concentrations (12.5–800 µg/mL), and then 1 mL of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ solution was added, and the resultant mixture was allowed to stand for 30 min. The absorbance at 734 nm was recorded against a blank consisting of the buffer solution. A decrease in the absorbance value indicated the amount of $\text{ABTS}^{\cdot+}$ radicals eliminated from the environment. The implementations were performed in triplicate, and the % inhibitions of the extracts and standards (BHT and Trolox) were calculated using the following equation.

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

A_{control} is the absorbance value of the control sample containing the ABTS radical solution alone, and A_{sample} is the measured absorbance value of the sample prepared by adding a solution containing the ABTS radicals to the extracts.

Microorganisms

The standard strains, which comprised *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Bacillus subtilis* (ATCC 11774), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Pasteurella multocida* (ATCC 12945), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6358), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 27729), and *Candida albicans* (ATCC 10231), were used to determine the antimicrobial activity of the *P. spina-christi* fruit and leaf extracts.

The strains used in the study were obtained from the Microbiology Laboratory of Atatürk Vocational School of Health Services, Kafkas University, Kars, Turkey. Mueller-Hinton broth and agar (Merck, Darmstadt,

Germany) were used to revitalize the bacteria, and Sabouraud dextrose broth and agar media (Merck) were used to resuscitate the yeast.

Determination of the antimicrobial activity and the agar well diffusion technique

First, 50 g of the fruit and leaves of *P. spina-christi* were weighed separately, and then ground. The extracts obtained from a Soxhlet device were evaporated at 50 °C. The fruit and leaf extracts taken from the evaporator were kept at 4 °C until analysis. The agar well diffusion method was used to identify the antimicrobial activity.

The bacterial strains taken from the stock cultures were separately incubated in 5 mL of liquid medium for 2 to 5 h at 35 °C and 30 °C, respectively. Next, 100 µL of the cultures that grew at the end of the incubation period was planted in petri dishes in such a way as to ensure that 10⁸ cfu/mL was available for the cultural bacteria and 10⁶ cfu/mL was available for the yeast. They were inoculated by frequently combing them in a petri dish, with a sterile swab being rubbed in 3 different directions. After this process, all of the petri plates were left to dry at room temperature for a period of 5 to 15 min. After completion of the drying process, 50 µL of the plant extracts were placed into small wells with a diameter of 5 mm, opened on the agar, and then the bacteria were incubated at 35 °C for 24 h, while the yeast was incubated at 30 °C for 48 h.

At the end of the incubation period, the diameters (mm) of the resultant inhibition zones around the wells were measured. The antimicrobial activity experiments against all test microorganisms were done with three repetitions.

Statistical analyses

The analysis results were created using Microsoft Office Excel 2010 and one-way ANOVA. The statistical analyses performed using IBM SPSS Statistics for Windows 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The experimental results were performed in triplicate.

RESULTS and DISCUSSION

CUPRAC assay results

The results of the Cu²⁺ reducing power, CUPRAC assay, are shown in Figure 1. The Cu²⁺ reduction power of the fruit ethanol (EEF) and water (WEF) extracts and leaf ethanol (EEL) and water (WEL) extracts increased in direct proportion to the increasing concentration. When the absorbance of the WEF, WEL, EEF, and EEL of the plant were compared with standard antioxidants, at a concentration of 800 µg/mL, the result was as follows: Trolox > BHT > WEF > EEL > WEL > EEF, respectively.

When the EEF and EEL of the plant were compared, EEL of the plant were found to have the highest Cu²⁺

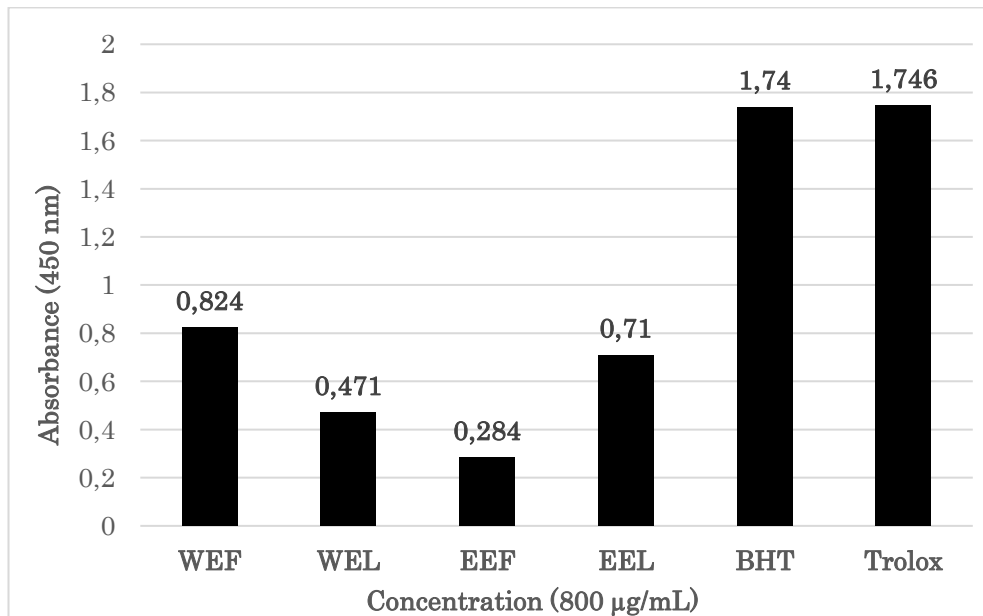


Figure 1. Comparison between the absorbance values of the standard antioxidants (BHT ve trolox) at a concentration of 800 µg/mL, and those of the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi*, using the CUPRAC method.

(BHT: butylated hydroxytoluene, WEF: water extract of the fruits, WEL: water extract of the leaves, EEF: ethanol extract of the fruits, EEL: ethanol extract of the leaves)

Şekil 1. *P. spina-christi* bitkisinin meyve ve yaprak kısımlarından elde edilen etanol ve su ekstraktlerinin (800 µg/ml) konsantrasyonundaki absorbansların CUPRAC yöntemine göre standart antioksidanlar (BHT ve troloks) ile karşılaştırılması

reducing activity. In the water-phase extracts, the highest Cu^{+2} reduction activity was found in the WEF of the plant. Likewise, an increase was also found in the absorbance values obtained with an increased concentration of the water and ethanol phase extracts of the plant. The higher absorbance values of the standard antioxidants (BHT and Trolox) were thought to possibly have been due to the fact that the extracts of the fruit and leaves had lower antioxidant compound contents or exhibited less antioxidant effect when compared to the standard antioxidants used (BHT and Trolox).

DPPH assay results

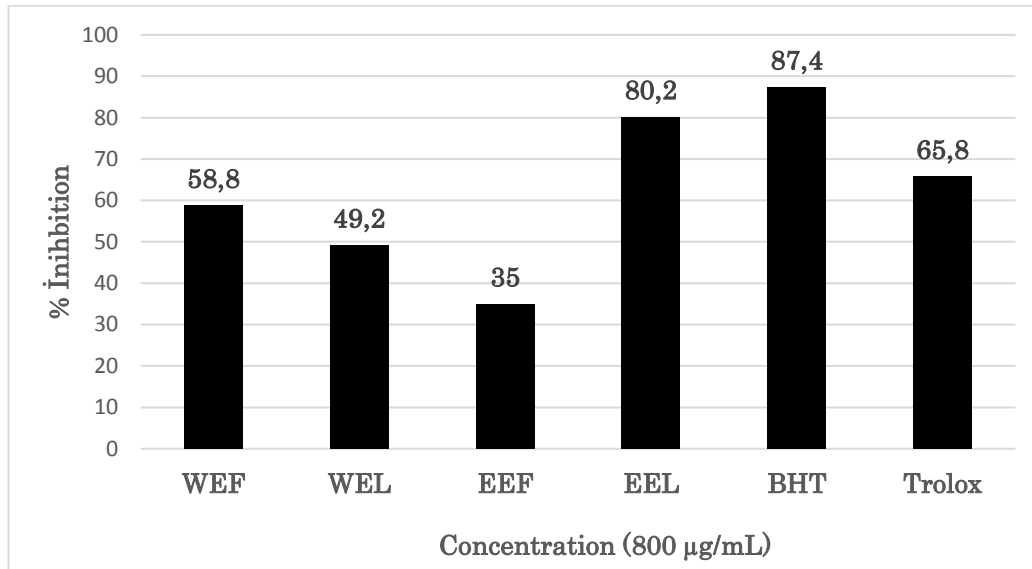


Figure 2. Comparison between the % inhibition values of the standard antioxidants (BHT and Trolox) at a concentration of 800 $\mu\text{g/mL}$, and those of the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi*, using the DPPH method.

Şekil 2. *P. spina-christi* bitkisinin meyve ve yaprak kısımlarından elde edilen etanol ve su ekstraktlerinin (800 $\mu\text{g/mL}$) konsantrasyonundaki %inhibisyon değerlerinin DPPH yöntemine göre standart antioksidanlar (BHT ve troloks) ile karşılaştırılması

When the activities of the WEF, WEL, EEF, and EEL of the plant were compared with standard antioxidants, at a concentration of 800 $\mu\text{g/mL}$, the free radical scavenging activity were as follows: BHT > EEL > Trolox > WEF > WEL > EEF, and the % inhibitions were as follows: 87.4 > 80.2 > 65.8 > 58.8 > 49.2 > 35, respectively (Figure 2).

The % inhibition values of both the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi* were found to increase with an increase in the concentration. The inhibition value (80.2%) of the EEL was higher than that of Trolox, the standard antioxidant substance (65.8%). Therefore, the antioxidant activity of the EEL was considerably high.

The maximum inhibition value of the WEF was 58.8%, while the maximum inhibition value of the EEF was 35%. This difference was thought to have been due to the fact that the fruit was hydrophilic, i.e. it had the

DPPH and ABTS $\cdot\cdot^+$ radical scavenging activity were used to measure the radical scavenging activities of plant extracts, mixtures, and pure substances. This method is based on the fact that when a solution containing DPPH is mixed with an antioxidant that tends to give hydrogen atoms, they react with each other, and consequently, the DPPH radical in the environment is reduced and the solution loses its original purple color. The transfer of hydrogen atom from the antioxidant to the stable DPPH radical reduces the absorbance by reducing the DPPH radical in the environment (Miller 1996; Gülçin et al., 2007).

ability to bond better with water.

ABTS assay results

The findings obtained with the method, which was based on the fact that adding an antioxidant-containing sample to the ABTS $\cdot\cdot^+$ radical solution produced through the oxidation of ABTS reduced the radical (Re et al., 1999), are shown in Figure 3. When the activities of the WEF, WEL, EEF, and EEL were compared with standart antioxidants, at a concentration of 800 $\mu\text{g/mL}$ in the ABTS radical scavenging activity method, the result was as follows: Trolox > BHT > EEF = WEF > EEL > WEL, and the % inhibitions were: 97.8 > 97.2 > 96.2 = 96.2 > 95.9 > 95.5, respectively. When the EEF and EEL were compared, the fruit of the plant was found to have the highest ABTS radical scavenging activity.

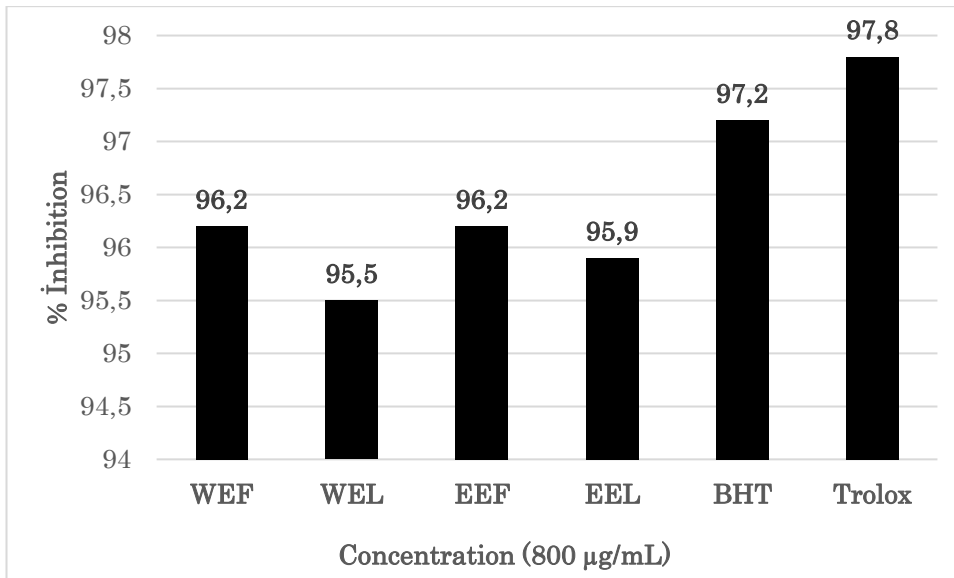


Figure 3. Comparison between the inhibition values (%) of the standard antioxidants (BHT and Trolox) at a concentration of 800 µg/mL, and those of the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi*, using the ABTS radical scavenging method.

Şekil 3. *P. spina-christi* bitkisinin meyve ve yaprak kısımlarından elde edilen etanol ve su ekstraktlerinin (800 µg/ml) konsantrasyonundaki % inhibisyon değerlerinin ABTS radikal giderme yöntemine göre standart antioksidanlar (BHT ve troloks) ile karşılaştırılması

According to the obtained data, regarding the ethanol and water extracts at a concentration of 800 µg/mL, the ABTS radical scavenging activities of the fruit was found to be higher than those of the leaves, and they were also found to be very close to those of the standard antioxidants (BHT and Trolox) used in the study.

The ethanol extracts were found to show higher antioxidant activity than the water extracts. In this study, conducted using the ABTS radical scavenging activity method, the % inhibition values were observed to increase in parallel with the increases in the concentrations of both the standard antioxidant substances and plant extracts.

The highest inhibition value (96.2%) was obtained with the ABTS method among the CUPRAC, ABTS and DPPH methods used for antioxidant activity. When the WEF, WEL, EEF, and EEL were evaluated, the antioxidant activities of the WEF were found to be higher than those of the WEL with all of the methods used.

When the literature studies were examined, it was seen that there was a limited number of studies on the antioxidant activities of *P. spina-christi*. Şen (2018) stated that, among the different solvent extracts obtained from the fruit, leaves, and branches of *P. spina-christi*, especially the ethyl acetate and ethanol extracts of the plant branches plant had strong antioxidant activity against DPPH and ABTS radicals. Ethyl acetate and ethanol extracts of branches of *P. spina-christi* showed the highest

antioxidant activity in DPPH and ABTS assays with IC₅₀ values of 15.54 and 22.06 µg/ml. In both ABTS and DPPH assays, all extracts showed low antioxidant activity when compared to standards. In this study, the ethanol extract of the leaves of *P. spina-christi* was found to have especially high antioxidant activity against the DPPH radicals when compared to Trolox, the standard antioxidant substance.

In study conducted by Kirca and Arslan (2008) to determine the antioxidant activity of the methanolic extract of the fruit of *P. spina-christi*, the inhibition value at the highest concentration was determined to be 70% using the ABTS radical scavenging activity method. In the present study, results higher than those in the literature were found using the ABTS radical scavenging activity method, with an inhibition value that was higher than 90%.

Takım and Isık (2020) examined the antioxidant activity of the fruit extracts of *P. spina-christi*, using the DPPH, ABTS, FRAP, and CUPRAC methods, and found that the plant had metal reduction and radical scavenging activity that was higher than those of the commonly used standard antioxidants. In addition, the radical scavenging rate of the fruit extract was found to be 77.41% using the ABTS method, while in the present study, the radical scavenging rate of the plant was found to be 96.2% using the same method.

Antimicrobial activity results

The agar well diffusion method is one of the methods

commonly used to determine antimicrobial activity. The inhibition zone diameters (mm) of different extracts of the fruit and leaves of *P. spina-christi* were

determined using the agar well diffusion method (Table 1), where in, $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

Table 1. Zone diameters (mm) of the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi*, determined using the agar well diffusion method.

Çizelge 1. *P. spina-christi* bitkisinin meyve ve yaprak kısımlarından elde edilen su ve etanol ekstraktlarına ait agar kuyu difüzyon yöntemine göre elde edilen zon çapları (mm).

Test microorganisms	Zone diameter / mm				
	WEF	WEL	EEF	EEL	Penicillin 10 mg
<i>B.cereus</i>	R	10b	R	R	14a
<i>B.subtilis</i>	15b	10c	R	20a	10c
<i>E.coli</i>	10bc	12b	10bc	26a	26a
<i>K.pneumoniae</i>	R	10b	30a	R	12b
<i>P.multicoda</i>	20a	12b	R	R	14b
<i>P.aeruginosa</i>	R	12c	16b	10c	20a
<i>S.aureus</i>	R	R	30a	30a	26b
<i>Y.enterocolitica</i>	R	R	R	R	16a
<i>C.albicans</i>	R	8c	24a	R	24a

R: Resistant

Values expressed with different letters in the same row are significant at $P < 0.05$.

It was observed that the water and ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of *P. spina-christi* had no antibacterial effects against *B. cereus* and *Y. enterocolitica* bacteria and produced an inhibition almost equivalent to the penicillin antibiotic (Table 1). Regarding *E. coli* bacteria, the ethanol extract obtained from the leaves of the plant created an inhibition diameter equivalent to that of the penicillin antibiotic, while the other extracts had a comparatively lower antibacterial effect. The ethanol extract obtained from the fruit of the plant was observed to show the highest activity against *K. pneumoniae*, and this activity was higher than the activity of the penicillin antibiotics. It was seen that the water extract obtained from the fruit and leaves of the plant had antibacterial activity against *P. multicoda*, while the ethanol extracts did not form a zone diameter. It was seen that the ethanol extract obtained from the fruit of the plant had the highest activity against *P. aeruginosa*, while the water extract obtained from the fruit had no inhibitory effect. It was ascertained that the ethanol extracts obtained from the fruit and leaves of the plant formed the highest zone diameter (30 mm) against *S. aureus*, but the water extracts had no antibacterial activity against this bacterium. Regarding *C. albicans* yeast, it was seen that the ethanol extract obtained from the fruit of the plant created an inhibition diameter equivalent to that of the penicillin antibiotic, while the other extracts had either no or very low antifungal activity. The highest antimicrobial activity for the fruit and leaf extracts of the plant was found to have been created by the ethanol extracts.

When the literature studies were examined, it was seen that there were a very few studies on the antimicrobial activity of this plant. In a study

conducted by Brantner et al. (1996), the highest zone diameter of the ethanolic root extracts of *P. spina-christi* was found to be greater than that of *S. aureus* (14 mm). In this study, it was observed that the highest zone diameter was greater than that of *S. aureus* (30 mm); the ethanol-phase leaf extract created a zone diameter equivalent to that of the penicillin antibiotic, especially against *E. coli*; and the obtained results were parallel to those in the literature. In another study, the antimicrobial activity of the hydrated extracts of the fruit of *P. spina-christi* was investigated by determining its antioxidant and minimal inhibition concentration using the DPPH activity method. Its antifungal activity against *P. eruginosa* and *S. aureus* was found to be very low (Orhan et al., 2012).

CONCLUSION

In this study, by using different antioxidant activity identification methods, it was found that *P. spina-christi* had antioxidant properties comparable to those of the standard antioxidant substances, and that the plant showed antioxidant properties close to the standard antioxidant substances used in the study, especially when considering the results obtained using the ABTS radical scavenging activity method. In antimicrobial studies, particularly the ethanol extracts of the fruit of the plant were found to have a high antimicrobial activity. Therefore, it seems promising in terms of its use in the food industry and various others, as an alternative to synthetic antioxidants and antimicrobial agents. In addition, it is believed that a new evaluation can be made by studying the antioxidant and antimicrobial effects of the growing conditions of the plant in different provinces using different standard substances, yeast, and bacteria, and that it can, consequently, provide a new perspective for

studies and the literature.

Acknowledgment

Thanks to Asst. Prof. Dr. Seyran PALABAŞ UZUN for her contribution in plant identification. This study was carried out by Kahramanmaraş Sütçü İmam University Scientific Research Projects Unit (BAP) 2018 / 2-13 YLS numbered project. The present study was derived from the MSc thesis entitled: Investigation of Antimicrobial and Antioxidant activities of *Paliurus spina-christi* Mill. plant in Kahramanmaraş province.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

REFERENCES

- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE 2004. Novel Total Antioxidant Activity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 52 (26): 7970-7981.
- Blois MS 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (4617): 1199-1200
- Brantner A, Males Z 1990. Investigations on the flavonoid glycosides of *Paliurus spina-christi*. *Planta Medica*, 56 (6): 582-583.
- Brantner A, Maleš Ž, Pepeljnjak S, Antolić A 1996. Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* Mill. (Christ's Thorn). *Journal of ethnopharmacology*, 52 (1): 119-122.
- Brantner A, Males Z 1999. Quality assessment of *Paliurus spina christi* extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 66 (2): 175-179.
- Chu YH, Chang CL, Hsu HF 2000. Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (5): 561-566.
- Deligöz A, Gültekin HC, Yıldız D, Gültekin ÜG, Musa G 2007. Karaçalı (*Paliurus spina-christi* Mill.) ve Hünnap (*Zizyphus jujuba* Mill.) Tohumlarının Çimlendirilmesi Üzerine Ga₃, Çıtlatma Ve Ekim Zamanının Etkileri. *Türkiye Ormanlık Dergisi*, 8 (2): 51-60.
- Damien Dorman HJ, Deans SG, Noble RC, Surai P 1995. Evaluation in vitro of plant essential oils as natural antioxidants. *Journal of Essential Oil Research*, 7 (6): 645-651.
- El Rabey HA, Attia ES, Al-Seeni MN, Al-Sieni AI, Ibrahim IH, Meerasahib MF, Shaikh-Omer AM, Abuelgassim AO 2014. The hypolipidemic and antioxidant activity of Christ's thorn (*Zizyphus Spina-Christi*) leaves powder in hypercholesterolemic male rats. *Life Science Journal*, 11 (10): 1010-1021.
- Fk1 I, Allouche N, Sayadı S 2005. The use of polyphenolic extract, purified hydroxy tyrosol and 3, 4-dihydroxy phenyl acetic acid from olive mill waste water for the stabilization of refined oils: a potential alternative to synthetic antioxidants. *Food Chemistry*, 93 (2): 197-204.
- Gülçin İ, Oktay M, Kireççi E, Küfrevioğlu Öİ 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. *Food Chemistry*, 83 (3): 371-382
- Gülçin İ 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56 (7): 491-499.
- Gülçin İ, Koksal E, Elmastas M, Aboul-Enein H. Y 2007. Determination of in vitro antioxidant and radical scavenging activity of *Verbascum oreophilum* C. Koch var. *Joannis* (Fam. Scrophulariaceae). *Res. J. Biol. Sci*, 2 (3): 372-382.
- Hammer KA, Carson CF, Riley TV 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, 86 (6): 985-990.
- Kırca A, Arslan E 2008. Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey. *International Journal of Food Science Technology*, 43 (11): 2038-2046.
- Medić-Šarić M, Males Ž, Šarić S, Brantner, A 1996. Quantitative Modeling of Flavonoid Glycosides Isolated from *Paliurus spina-christi* Mill. *Croatia chemica acta*, 69 (4): 1603-1616.
- Miller DD 1996. Mineral in OR Fennema (Ed.). *Food Chem. New YORK*, 611-649.
- Orhan DD, Özçelik B, Hoşbaş S, Vural M 2012. Assessment of antioxidant, antibacterial, antimycobacterial, and antifungal activities of some plants used as folk remedies in Turkey against dermatophytes and yeast-like fungi. *Turkish journal of biology*, 36 (6): 672-686.
- Pratt DE, Hudson B J F 1990. Natural Antioxidants Not Exploited Commercially. *Food Antioxidants*. pp 171-191.
- Prince L, Prabakaran P 2011. Antifungal activity of medicinal plants against plant pathogenic fungus *Colletotrichum falcatum*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1 (1): 84-87
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C 1999. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10): 1231-1237.
- Schirarend C, Olabi MN 1994. Revision of the genus *Paliurus* Tourn. Ex Mill. (Rhamnaceae). *Botanische Jahrbucher*, 116 (3): 333-360.
- Şen A 2018. Antioxidant and anti-inflammatory

- activity of fruit, leaf and branch extracts of *Paliurus spina-christi* Mill. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22 (2): 328-333.
- Takım K 2021. Bioactive component analysis and investigation of antidiabetic effect of Jerusalem thorn (*Paliurus spina-christi*) fruits in diabetic rats induced by streptozotocin. *Journal of Ethnopharmacology*, 264 : 113263.
- Takım K, Işık M 2020. Phytochemical Analysis of *Paliurus spina-christi* Fruit and Its Effects on Oxidative Stress and Antioxidant Enzymes in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 191:1353–1368.
- Tomaino A, Cimino F, Zimbalatti V, Venuti V, Sulfaro V, De Pasquale A, Saija A 2005. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical comparison of some spice essential oils. *Food Chemistry*, 89 (4): 549-554.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160 (1): 1-40.
- Zor M, Aydın S, Güner ND, Başaran N, Başaran AA 2017. Antigenotoxic properties of *Paliurus spina-christi* Mill fruits and their active compounds. *BMC complementary and alternative medicine*, 17 (1): 229.

The Effect of *Rosa pimpinellifolia* Extract on the Proliferation of Human Tumor Cells

Elif AYAZOGLU DEMİR¹, Selim DEMİR^{2*}, Nihal TURKMEN³, Ibrahim TURAN⁴

¹Department of Chemistry and Chemical Processing Technologies, Macka Vocational High School, Karadeniz Technical University, 61750 Trabzon, Turkey, ²Department of Nutrition and Dietetics, Faculty of Health Sciences, Karadeniz Technical University, 61080 Trabzon, Turkey,

³Department of Medical Services and Techniques, Vocational School of Health Services, Recep Tayyip Erdogan University, 53100 Rize, Turkey,

⁴Department of Genetic and Bioengineering, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Gumushane University, 29100 Gumushane, Turkey.

¹<https://orcid.org/0000-0001-9027-7633>, ²<https://orcid.org/0000-0002-1863-6280>, ³<https://orcid.org/0000-0002-8913-8692>

⁴<https://orcid.org/0000-0003-3400-5494>

✉: selim-demir@hotmail.com

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the antioxidant properties of *R. pimpinellifolia* and its cytotoxic effect against human colon (WiDr), liver (HepG2) and lung (A549) cancer cells compared with a normal fibroblast (BJ) cell line. The antioxidant properties of extract was determined using spectrophotometric methods, while the cytotoxic effect of extract was evaluated using MTT assay. The total phenolic content, total flavonoid content and reducing power values of extract were calculated as 16.4±0.4 mg gallic acid equivalent, 5.2±0.2 mg quercetin equivalent and 34.3±2.4 mg trolox equivalent per g sample, respectively. Although the extract exhibits selective cytotoxic effect on three cancer cell lines in a dose-dependent manner compared to BJ cells, the highest selectivity index value (2.7-fold) was obtained for the WiDr cell line. In conclusion, this is the first study to demonstrate the cytotoxic effect of *R. pimpinellifolia* on cancer cells. To demonstrate the molecular mechanism of this cytotoxic effect and to carry out *in vivo* studies may be a guide for future clinical studies.

Research Article

Article History

Received : 28.12.2020

Accepted : 25.03.2021

Keywords

Antioxidant activity

Cancer

Cell culture

Cytotoxicity

Rosa pimpinellifolia

Rosa pimpinellifolia Ekstraktının İnsan Tümör Hücrelerinin Çoğalmasına Etkisi

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, *R. pimpinellifolia*'nın antioksidan özelliklerini ve insan kolon (WiDr), karaciğer (HepG2) ve akciğer (A549) kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini normal bir fibroblast (BJ) hücre hattına kıyasla değerlendirmektir. Ekstraktın antioksidan özellikleri spektrofotometrik yöntemler kullanılarak belirlenirken, sitotoksik etkisi ise MTT testi kullanılarak değerlendirildi. Ekstraktın toplam fenolik içeriği, toplam flavonoid içeriği ve indirgeme gücü değerleri g örnek başına sırasıyla 16.4±0.4 mg gallik asit eşdeğeri, 5.2±0.2 mg kuersetin eşdeğeri ve 34.3±2.4 mg troloks eşdeğeri olarak hesaplandı. Ekstrakt BJ hücrelerine kıyasla üç kanser hücresi hattı üzerinde doza bağımlı bir şekilde seçici sitotoksik etki sergilemesine rağmen, en yüksek seçicilik indeksi değeri (2.7 kat) WiDr hücre hattı için elde edildi. Sonuç olarak, bu çalışma *R. pimpinellifolia*'nın kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisini gösteren ilk çalışmadır. Bu sitotoksik etkinin moleküler mekanizmasını göstermek ve *in vivo* çalışmaların yapılması gelecekteki klinik çalışmalar için yol gösterici olabilir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 28.12.2020

Kabul Tarihi : 25.03.2021

Anahtar Kelimeler

Antioksidan aktivite

Hücre kültürü

Kanser

Rosa pimpinellifolia

Sitotoksikite

To Cite : Ayazoğlu Demir E, Demir S, Türkmen N, Turan İ 2021. The Effect of *Rosa pimpinellifolia* Extract on the Proliferation of Human Tumor Cells. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1170-1176. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.848137.

INTRODUCTION

Cancer is a major public health problem worldwide, and approximately 10 million new cases are detected annually (Faezizadeh et al., 2016). There are various traditional treatment options, such as surgery,

radiotherapy, and chemotherapy, to treat cancer. As one of the most commonly used treatments, chemotherapy has been in clinic for about 70 years for the purpose of suppressing cancer cell proliferation (Demir et al., 2019). However, toxicity of chemotherapeutics on normal cells and drug resistance

on cancer cells affect the success percentage of chemotherapy (Faezizadeh et al., 2016). The worldwide high incidence of cancer and disadvantages of chemotherapy necessitates the development of new clinical strategies (Abotaleb et al., 2020). Increasing evidence supports the potential use of some phytochemicals that can kill cancer cells by modulating the expression of metabolic enzymes (Zhang, 2015). In recent years, the plant extracts with low toxicity on normal cells and with greater effect on cancer cells have led the scientific community to investigate the anticancer properties of herbal products (Faezizadeh et al., 2016; Zarei and Yaghoobi, 2019). Because natural products are an important source of phytochemicals and other bioactive compounds, they are an important resource for therapeutic products that can prevent or cure a large number of diseases (Mármol et al., 2020). Today, many epidemiological and clinical studies have revealed the positive relationship between herbal medicines consumption and human health (Lall et al., 2015; Mármol et al., 2020). For this reason, natural products rich in bioactive substances have become an area of interest for the pharmaceutical, food and cosmetic industries in recent years (Aliyazicioglu et al., 2017; Demir et al., 2018a). Recently, the emergence of side effects of synthetic antioxidants in chronic use has further increased this interest (Cosmulescu et al., 2017).

The *Rosa* genus with more than 100 species is one of the most populated members of the Rosaceae family and is widely distributed in Europe, Asia, the Middle East and North America (Fattahi et al., 2012; Kilinc et al., 2020). This genus is one of the most used plants in folk medicine for the treatment of different diseases, such as kidney and bladder stones, diarrhea, gum bleeding, arthritis, rheumatism, gout, colds, throat, asthma, hemorrhoids and pains (Guimarães et al., 2014; Koczka et al., 2018; Kilinc et al., 2020). *Rosa* species contain various biologically active compounds, such as sugars, organic acids, pectins, phenolics, tannins, carotenoids, tocopherols, fatty acids, vitamins, minerals and amino acids (Fattahi et al., 2012; Roman et al., 2013; Bhave et al., 2017). These species have many biological activities, such as antioxidant, antimutagenic, antidiabetic, antiproliferative, anti-inflammatory, anti-arthritic, analgesic, cardioprotective, antimicrobial, gastroprotective, neuroprotective, hepatoprotective, immunosuppressive, renoprotective, anti-aging, anti-ulcerogenic, anticarcinogenic and immunomodulatory effects and these activities are attributed to the above mentioned compounds (Khazaei et al., 2020; Mármol et al., 2020). In recent years, the investigation of the antiproliferative effects of Rosaceae species on cancer cells has become a very popular research area. Although there are many studies investigating the

cytotoxic effect of different *Rosa* species in various cancer cells, such as breast (4T1 and MCF-7) (Olsson et al., 2004; Radovanovic et al., 2013; Berkoz et al., 2019), colon (WiDr and HT-29) (Olsson et al., 2004; Demir et al., 2017), prostate (LNCaP) (Lee et al., 2008) and melanoma (B16) (Fujii et al., 2011), there is no study determining the cytotoxic effect of *Rosa pimpinellifolia* on cancer cells in the literature. The aim of this study was to investigate for the first time the selective cytotoxic effect of *R. pimpinellifolia* extract on human lung (A549), liver (HepG2) and colon (WiDr) cancer cells, which represent the most common types of cancer in the world, compared with a normal fibroblast (BJ) cell line.

MATERIALS and METHODS

Chemical and Reagents

All the chemicals and solvents used in extract preparation, antioxidant activity analysis and cytotoxicity experiments were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All the chemicals and solutions used in cell culture studies were purchased from Lonza (Verviers, Belgium) and Biological Industries (Kibbutz Beit Haemek, Israel).

Preparation of Extract

The fruits of *Rosa pimpinellifolia* were collected from Gumushane province of Turkey. The fruit samples were left to dry at room temperature for 20 days. The fruit parts of the dried plant were carefully powdered using a mechanical grinder (Retsch ZM 200, Haan, Germany). For preparing stock extract, 1 g of the powder material was weighed and mixed with 20 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) and then mixture was continuously stirred at 45°C for 24 h. At the end of the period, the mixture was filtered through filter paper (Whatman No.1) and 0.2 µM filter and stored at -20°C by aliquoting (Turan et al., 2018; Kilinc et al., 2020).

Determination of Total Phenolic Content

Total phenolic content (TPC) of extract was determined using Folin-Ciocalteu method (Slinkard and Singleton, 1977). Briefly, the sample (12.5 µL) was mixed with 125 µL of sodium carbonate and 62.5 µL of Folin reagent. After 30 min of reaction at room temperature, the absorbance was measured at 760 nm in a plate reader spectrophotometer (Molecular Devices Versamax, California, USA). Gallic acid was used as standard. Results are presented as mg gallic acid equivalent per g sample (GAE g⁻¹ sample) (Demir et al., 2019).

Determination of Total Flavonoid Content

Total flavonoid content (TFC) of extract was determined by aluminium chloride method (Moreno et al., 2000). The sample (20 µL) was mixed with 172 µL

of 80% ethanol, 4 µL of 10% aluminum chloride and 4 µL of 1 M potassium acetate solution. After 40 min of reaction at room temperature, the absorbance was measured at 415 nm in a plate reader spectrophotometer (Molecular Devices Versamax, California, USA). Quercetin was used as standard. Results are presented as mg quercetin equivalent per g sample (QE g⁻¹ sample) (Turan et al., 2017).

Reducing Power Analysis

The ferric reducing power of extract was determined using the method of developing by Oyaizu (1986). The sample (40 µL) was mixed with 100 µL of 0.2 M phosphate buffer, and 100 µL of potassium ferricyanate solutions. After 20 min of reaction 50°C, 100 µL of 10% trichloroacetic acid was added to the mixture and the mixture was centrifuged at 1800×g for 10 min. The supernatant (100 µL) was transferred to a flat-bottomed 96-well microplate and mixed with 100 µL of distilled water and 20 µL of iron (III) chloride. After 5 min of reaction at room temperature, the absorbance was measured at 700 nm in a plate reader spectrophotometer (Molecular Devices Versamax, California, USA). Trolox was used as a standard. Results are presented as mg trolox equivalent per g sample (TE g⁻¹ sample) (Misir et al., 2018).

Cell Culture

A549, WiDr, HepG2 and BJ cell lines were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). All cell lines were grown in a humidified incubator at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere. Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin was used for the culture of these cell lines.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium Bromide (MTT) Assay

The cytotoxic effects of the *Rosa pimpinellifolia* extract and cisplatin (was used as a positive control) on three human cancer and one normal cell lines were assayed using the MTT assay (Mosmann, 1983) with slight modifications (Misir et al., 2020). Cancer cells were seeded in 96-well plates at 5x10³ cells per well, while BJ cells were seeded at 2.5x10³ cells per well and overnight incubated at 37°C. After over night incubation, the cells were exposed with different concentrations of extract (5-500 µg mL⁻¹) and cisplatin (0.1-12 µg mL⁻¹) for 72 h. DMSO concentration to which cells were exposed was kept below 0.1% (v/v), and only cells treated with 0.1% (v/v) DMSO formed the negative control group. After incubation, MTT solution (0.25 mg mL⁻¹) was added to each well and after 2 h the formazan precipitate was dissolved in 200 µL of DMSO. Optical density (OD) of each well was measured at 570 nm using a microplate

spectrophotometer (Versamax Molecular Devices, CA, USA). The survival curve of the cells were calculated after comparison with control, and percent viability was determined as follows:

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{OD}_{\text{treatment group}} / \text{OD}_{\text{control group}}) \times 100$$

The dose-response curves were drawn using logarithmic concentrations against %cell viability and the IC₅₀ value of extract and cisplatin were calculated for each cell line. The IC₅₀ values calculated for extract and cisplatin in all cell lines were used to determine the selectivity index (SI) value with the following formula (Demir et al., 2018b):

$$\text{SI} = \text{BJ cells IC}_{50} / \text{Cancer cells IC}_{50}$$

Statistical Analysis

All experiments were performed at four times. The distribution of the data was examined with the Kolmogorov-Smirnov test. Data showing normal distribution were expressed as arithmetic mean±standard deviation. Statistical analyzes between the groups were revealed by ANOVA and post-hoc Tukey tests. p<0.01 was regarded as significant.

RESULTS and DISCUSSION

Oxidative stress is the condition that results from the deterioration of the oxidant-antioxidant balance in favor of the oxidant (Tusat et al., 2017). Increased oxidative stress damages the biomolecules, such as carbohydrate, protein, lipid and nucleic acids (Jiménez et al., 2016). The role of oxidative stress in the pathogenesis of various human diseases, including cancer, aging, and atherosclerosis, is increasingly accepted (Mavi et al., 2004; Jiménez et al., 2016). Thus, compounds with antioxidant properties that can modulate cellular redox balance are among the most promising targets for functional food science. Since plants can contain large amounts of these compounds, it has come to the fore in recent years, and the determining the antioxidant activity of plants has become one of the most popular research areas (Tumbas et al., 2012). Therefore, the antioxidant properties of the *R. pimpinellifolia* extract were determined by TPC, TFC and reducing power methods and the results are shown in Table 1.

Table 1. Antioxidant properties of *R. pimpinellifolia* extract (n=4)

Çizelge 1. *R. pimpinellifolia* ekstraktının antioksidan özellikleri (n=4)

Antioxidant Parameters	
Total Polyphenolic Content (mg GAE g ⁻¹ sample)	16.4±0.4
Total Flavonoid Content (mg QE g ⁻¹ sample)	5.2±0.2
Reducing Power (mg TE g ⁻¹ sample)	34.3±2.4

In the studies examining the antioxidant properties of *R. pimpinellifolia* extract, Mavi et al. (2004)

demonstrated that the TPC value of *R. pimpinellifolia* extract, collected from Turkey, is 58.8 mg GAE g⁻¹, while Fattahi *et al.* (2012) reported that the TPC and TFC values of *R. pimpinellifolia* extract, collected from West Azerbaijan, are 1.77 mg GAE g⁻¹ and 0.41 mg QE g⁻¹, respectively.

In other studies examining the antioxidant properties of different *Rosa* species extracts, collected from Hungary, Poland, Serbia, Transylvania, Tunisia, Turkey and West Azerbaijan, the TPC and TFC values are reported to vary between 2.26-76.6 mg GAE g⁻¹, and 0.44-26.47 mg QE g⁻¹, respectively (Jablonska-Rys *et al.*, 2009; Ghazghazi *et al.*, 2010; Fattahi *et al.*, 2012; Roman *et al.*, 2013; Koczka *et al.*, 2018; Paunović *et al.*, 2019; Kilinc *et al.*, 2020). The antioxidant results of this study are in agreement with the previous literature data. It is stated that the phenolic and flavonoid content of natural products may vary depending on the genotype, environment, soil conditions, harvest time and the extraction method used (Ozkan *et al.*, 2017). Small differences between

antioxidant activity results and available literature data are thought to be due to these reasons.

Colon cancer accounts for approximately 10% of all cancers and cancer-related deaths diagnosed worldwide each year, and it is the second most common cancer in women and the third most frequently diagnosed cancer in men (Dekker *et al.*, 2019). Lung cancer is the most common cause of cancer deaths in the world and each year approximately 1.8 million new cases of lung cancer are diagnosed worldwide (Wadowska *et al.*, 2020). Liver cancer is the fifth most common cause of malignancies and the third cause of cancer deaths, with less than 9% 5-year survival rate in patients (Alnajjar and Elsiesy, 2015). Therefore, this study aimed to determine the cytotoxic effect of *R. pimpinellifolia* extract on various cell lines, including A549, HepG2 and WiDr, representing common cancer types in the world, compared with a normal fibroblast (BJ) cell line. The cytotoxic effect of extract on these cell lines was determined using MTT assay and the growth curves of the cells are shown in Figure 1.

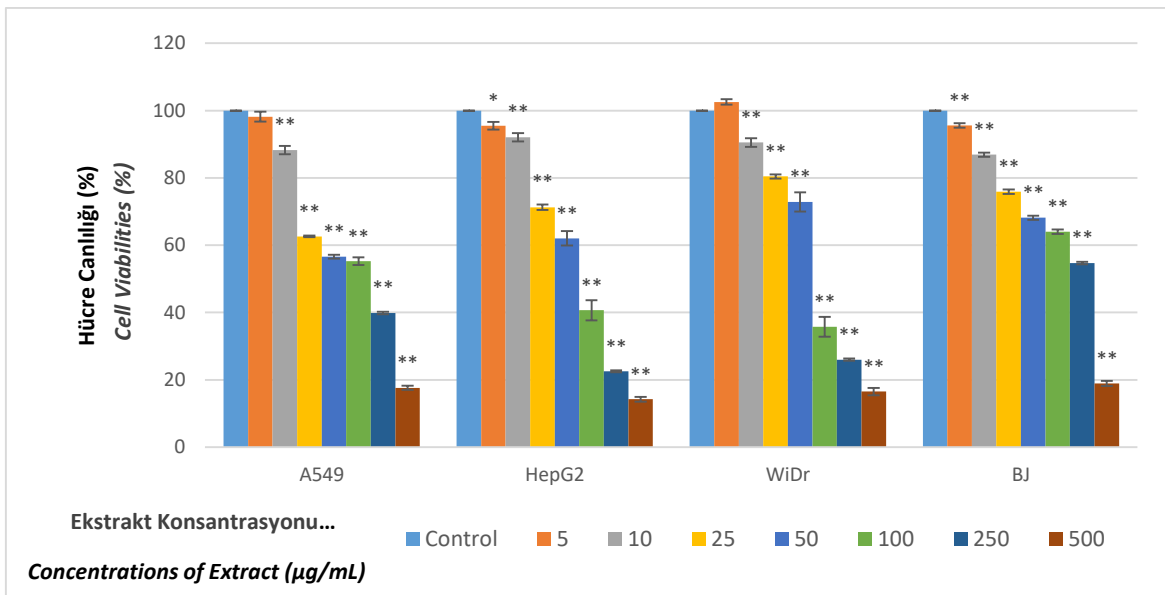


Figure 1. The cytotoxic of *R. pimpinellifolia* extract on cancer and BJ cell lines (n=4). *Statistically significant compared to its own control group (p=0.006), **Statistically significant compared to its own control group (p=0.0001).

Şekil 1. *R. pimpinellifolia* ekstraktının kanser ve BJ hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisi (n=4). *Kendi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı (p=0.006), **Kendi kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı (p=0.0001).

When all cells were evaluated together, statistically significant cytotoxic effect of extract was emerged starting at a concentration of 10 µg mL⁻¹ and extract exhibited cytotoxic effect in all studied cancer cells in a dose-dependent manner. In order to make the results more understandable, the IC₅₀ values (µg mL⁻¹) of extract and cisplatin (used a positive control in cytotoxicity experiments) in all studied cell lines were calculated and presented in Table 2.

When Table 2 is examined, it is seen that the IC₅₀ values for extract in cancer cells ranged from 72.1 to

Table 2. IC₅₀ values (µg mL⁻¹) calculated for *R. pimpinellifolia* extract and cisplatin (n=4)

Çizelge 2. *R. pimpinellifolia* ekstraktı ve cisplatin için hesaplanan IC₅₀ (µg mL⁻¹) değerleri (n=4)

	Extract	Cisplatin
A549	153.4±3.3	0.75±0.06
HepG2	74.3±5.2	3.57±0.06
WiDr	72.1±4.9	0.88±0.05
BJ	195.1±3.8	3.61±0.10

153.4 µg mL⁻¹. Many studies have been shown that the cytotoxic effect of different *Rosa* (*Rosa agretis*, *Rosa*

canina, *Rosa damascena*, *Rosa micrantha*, *Rosa roxburghii* Tratt) extracts on various human cancer cell lines, such as cervix (HeLa), breast (MCF-7), colon (HT-29 and HCT-115), esophageal (CaEs-17), gastric (SGC-7901), lung (NCI-H460 and A549) and liver (HepG2) cancer cells. In these studies, it is seen that the IC₅₀ values of *Rosa* extracts in cancer cells vary between 150-498 µg mL⁻¹ (Zamiri-Akhlaghi et al., 2011; Liu et al., 2012; Tumbas et al., 2012; Guimarães et al., 2014; Erguven et al., 2015; Nadpal et al., 2016). Thus, it is remarkable that the IC₅₀ values indicating the cytotoxic activity of *R. pimpinellifolia* extract on HepG2 and WiDr cell lines are quite low compared to the literature.

Selectivity is one of the most important criteria for a compound to be evaluated as a chemotherapeutic (Demir et al., 2018b). For this reason, one normal cell line (BJ) was used along with three cancer cells in the study. The SI of extract and cisplatin for all studied cancer cells were calculated using the formula described in the "Materials and Method Section" of the IC₅₀ values obtained for each cell and results were presented in Table 3.

Table 3. Selectivity index of *R. pimpinellifolia* extract and cisplatin

Çizelge 3. *R. pimpinellifolia* ekstraktı ve cisplatin için hesaplanan seçicilik indeksleri

	Extract	Cisplatin
A549	1.3	4.8
HepG2	2.6	1.1
WiDr	2.7	4.1

The results showed that the extract exhibited a highly selective cytotoxic effect, especially in the WiDr and HepG2 cell lines. It can be said that a compound or extract whose effect is investigated has a selective cytotoxic effect only if the SI value is greater than 2. (de Oliveira et al., 2016). From this point of view, the SI value of the extract in these two cell lines were satisfied this condition. Many studies have been shown that the selective cytotoxic effect of different *Rosa* (*Rosa beggeriana*, *Rosa canina* and *Rosa damascena*) extracts on various human cancer cell lines, such as breast (MCF-7), cervix (HeLa), colon (WiDr), liver (LCL) lung (A549) and prostate (PC-3), compared with normal fibroblast cells. In these studies, it is seen that the SI values of *Rosa* extracts in cancer cells vary between 1.3-3.8 (Artun et al., 2016; Turan et al., 2018; Zarei and Yaghoobi, 2019; Kilinc et al., 2020). This finding of the study were also in agreement with the previous reports. Preliminary experiments were performed to determine the optimum cell number per well for the MTT test. In these experiments, increasing amounts of each cell line were added to each well and the MTT protocol was applied. As a result of these experiments, seeding of 5000 cells per well giving

absorbance values between 0.5 and 1 for WiDr, HepG2 and A549 cell lines was accepted as optimum. Since the BJ cell line is a cell of connective tissue fibroblast origin and has a more bulky and elongated appearance compared to other cells, the optimum cell number was determined to be 2500 per well in order to avoid contact inhibition. These cell numbers used are similar to cell numbers in similar comprehensive studies in the literature (Balsevich et al., 2012; Turan et al., 2017).

Rosa species are reported to be rich in phenolics, such as gallic acid, vanilic acid, chlorogenic acid, caffeic acid, syringic acid, coumaric acid, ferulic acid, sinapic acid, salicylic acid, elagic acid, trans-cinnamic acid, protocatechuic acid, quercetin, rutin, myricetin, kaempferol, and catechin derivatives (Tumbas et al., 2012; Cosmulascu et al., 2017). Various studies reported that phenolics exhibit antiproliferative effect on various types of cancer cells, such as lung, colon, breast, prostate, liver, gastric and cervix (Lall et al., 2015; Zhou et al., 2016). The antiproliferative activities of these compounds are explained by several cellular mechanisms, such as their ability of modulating apoptosis, necroptosis, ROS formation, angiogenesis, metastasis, autophagy, ferroptosis, cell cycle arrest, mitochondrial function and endoplasmic reticulum stress (Zhou et al., 2016; Abotaleb et al., 2020). Therefore, we think that the selective cytotoxic effect of *R. pimpinellifolia* extract may be due to the synergistic effect of its phenolic content.

CONCLUSIONS

The results confirm that the phenolic and flavonoid contents of *Rosa pimpinellifolia* are rich and its antioxidant power is high. It can be concluded that *R. pimpinellifolia* might be a good candidate for inhibiting proliferation of especially WiDr and HepG2 cells. This is the first study to demonstrate the effect of *R. pimpinellifolia* on the proliferation of cancer cells. In future studies, it is necessary to determine the cytotoxic active components of *R. pimpinellifolia*, and to conduct characterization studies and to conduct anticancer efficacy studies in different cancer cell lines and experimental animal models.

Researchers Contribution Rate Declaration Summary

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

Conflicts of Interest Statement

None of the authors had any financial or personal relationships with other individuals or organizations that might inappropriately influence their work during the submission process.

REFERENCES

Abotaleb M, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D 2020. Therapeutic potential of plant phenolic acids in the

- treatment of cancer. *Biomolecules* 10(2): 221.
- Aliyazicioglu R, Demir S, Badem M, Sener SO, Korkmaz N, Demir EA, Ozgen U, Karaoglu SA, Aliyazicioglu Y 2017. Antioxidant, antigenotoxic, antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Dianthus carmelitarum*. *Rec Nat Prod* 11(3): 270-284.
- Alnajjar AM, Elsiesy HA 2015. Natural products and hepatocellular carcinoma: A review. *Hepatoma Res* 1: 119-124.
- Artun FT, Karagoz A, Ozcan G, Melikoglu G, Anil S, Kultur S, Sutlupinar N 2016. *In vitro* anticancer and cytotoxic activities of some plant extracts on HeLa and Vero cell lines. *J BUON* 21(3): 720-725.
- Balsevich JJ, Ramirez-Erosa I, Hickie RA, Dunlop DM, Bishop GG, Deibert LK 2012. Antiproliferative activity of *Saponaria vaccaria* constituents and related compounds. *Fitoterapia* 83(1): 170-181.
- Berkoz M, Yilmaz FO, Hunt AO, Yildirim M, Allahverdiyev O, Aslan A 2019. *Rosa canina* L. ethanolic extract induces the antiproliferative and apoptosis potential in MCF-7 and MDA-MB-468 cell lines. *Fresenius Environ Bull* 28(5): 3718-3725. □□
- Bhave A, Schulzova V, Chmelarova H, Mrnka L, Hajslova J 2017. Assessment of rosehips based on the content of their biologically active compounds. *J Food Drug Anal* 25: 681-690.
- Cosmulescu S, Trandafir I, Nour V 2017. Phenolic acids and flavonoids profiles of extracts from edible wild fruits and their antioxidant properties. *Int J Food Prop* 20(12): 3124-3134.
- Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB 2019. Colorectal cancer. *Lancet* 394: 1467-1480.
- Demir S, Turan I, Demir F, Ayazoglu Demir E, Aliyazicioglu Y 2017. Cytotoxic effect of *Laurocerasus officinalis* extract on human cancer cell lines. *Marmara Pharm J* 21: 121-126.
- Demir S, Turan I, Aliyazicioglu R, Ozer Yaman S, Aliyazicioglu Y 2018a. *Primula vulgaris* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervix cancer cells. *J Pharm Anal* 8(5): 307-311.
- Demir S, Turan I, Aliyazicioglu Y 2018b. Cytotoxic effect of *Rhododendron luteum* leaf extract on human cancer cell lines. *KSU J Agric Nat* 21(6): 950-956.
- Demir S, Turan I, Aliyazicioglu Y 2019. Antioxidant properties of *Primula vulgaris* flower extract and its cytotoxic effect on human cancer cell lines. *KSU J Agric Nat* 22(1): 78-84.
- de Oliveira PF, Damasceno JL, Bertanha CS, Araújo AR, Pauletti PM, Tavares DC 2016. Study of the cytotoxic activity of *Styrax camporum* extract and its chemical markers, egonol and homoegonol. *Cytotechnology* 68(4): 1597-1602.
- Erguven M, Kultur S, Ozsoy N 2015. Anti-proliferative effect of *Rosa agrestis* on endometrium cancer cells *in vitro*. *IJFER* 1(1): 17-23.
- Faezizadeh Z, Gharib A, Godarzee M 2016. Anti-proliferative and apoptotic effects of beta-ionone in human leukemia cell line K562. *Zahedan J Res Med Sci* 18(6): e7364.
- Fattahi S, Jamei R, Hosseini Sarghein S 2012. Antioxidant and antiradical activities of *Rosa canina* and *Rosa pimpinellifolia* fruits from West Azerbaijan. *Iran J Plant Physiol* 2(4): 523-529.
- Fujii T, Ikeda K, Saito M, 2011. Inhibitory effect of rose hip (*Rosa canina* L.) on melanogenesis in mouse melanoma cells and on pigmentation in brown guinea pigs. *Biosci Biotechnol Biochem* 75: 489-495.
- Ghazghazi H, Miguel MG, Hasnaoui B, Sebei H, Ksontini M, Figueiredo AC, Pedro LG, Barroso JG 2010. Phenols, essential oils and carotenoids of *Rosa canina* from Tunisia and their antioxidant activities. *Afr J Biotechnol* 9(18): 2709-2716.
- Guimarães R, Barros L, Calhelha RC, Carvalho AM, Queiroz MJRP, Ferreira ICFR 2014. Bioactivity of different enriched phenolic extracts of wild fruits from Northeastern Portugal: A comparative study. *Plant Foods Hum Nutr* 69: 37-42.
- Jablonska-Rys E, Zalewska-Korona M, Kalbarczyk J 2009. Antioxidant capacity, ascorbic acid and phenolics content in wild edible fruits. *J Fruit Ornament Plant Res* 17(2): 115-120.
- Jiménez S, Gascón S, Luquin A, Laguna M, Ancin-Azpilicueta C, Rodríguez-Yoldi MJ 2016. *Rosa canina* extracts have antiproliferative and antioxidant effects on Caco-2 human colon cancer. *PLoS One* 11(7): e0159136.
- Khazaei M, Khazaei MR, Pazhouhi M 2020. An overview of therapeutic potentials of *Rosa canina*: A traditionally valuable herb. *WCRJ* 7: e1580.
- Kilinc K, Demir S, Turan I, Mentese A, Orem A, Sonmez M, Aliyazicioglu Y 2020. *Rosa canina* extract has antiproliferative and proapoptotic effects on human lung and prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 72(2): 273-282.
- Koczka N, Stefanovits-Bányai E, Ombódi A 2018. Total polyphenol content and antioxidant capacity of rosehips of some *Rosa* species. *Medicines* 5: 84.
- Lall RK, Syed DN, Adhami VM, Khan MI, Mukhtar H 2015. Dietary polyphenols in prevention and treatment of prostate cancer. *Int J Mol Sci* 16: 3350-3376.
- Lee YH, Jung MG, Kang HB, Choi KC, Haam S, Jun W, Kim YJ, Cho HY, Yoon HG 2008. Effect of anti-histone acetyltransferase activity from *Rosa rugosa* Thunb. (Rosaceae) extracts on androgen receptor-mediated transcriptional regulation. *J Ethnopharmacol* 118: 412-417.
- Liu W, Li SY, Huang XE, Cui JJ, Zhao T, Zhang H 2012. Inhibition of tumor growth *in vitro* by a combination of extracts from *Rosa roxburghii* Tratt and *Fagopyrum cymosum*. *Asian Pac J Cancer Prev* 13: 2409-2414.
- Mármol I, Jiménez-Moreno N, Ancin-Azpilicueta C, Osada J, Cerrada E, Rodríguez-Yoldi MJ 2020. A

- combination of *Rosa Canina* extracts and gold complex favors apoptosis of Caco-2 cells by increasing oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Antioxidants* 9: 17.
- Mavi A, Terzi Z, Ozgen U, Yildirim A, Coşkun M 2004. Antioxidant properties of some medicinal plants: *Prangos ferulacea* (Apiaceae), *Sedum sempervivoides* (Crassulaceae), *Malva neglecta* (Malvaceae), *Cruciata taurica* (Rubiaceae), *Rosa pimpinellifolia* (Rosaceae), *Galium verum* subsp. *verum* (Rubiaceae), *Urtica dioica* (Urticaceae). *Biol Pharm Bull* 27(5): 702-705.
- Misir S, Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Ozer Yaman S, Deger O 2018. Antioxidant properties and protective effect of Turkish propolis on t-BHP-induced oxidative stress in foreskin fibroblast cells. *IJPER* 52(1): 94-100.
- Misir S, Aliyazicioglu Y, Demir S, Turan I, Hepokur C 2020. Effect of Turkish propolis on miRNA expression, cell cycle, and apoptosis in human breast cancer (MCF-7) cells. *Nutr Cancer* 72(1):133-145.
- Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J Ethnopharmacol* 71(1-2): 109-114.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
- Nađpal JD, Lesjak MM, Šibul FS, Anačkov GT, Četojević-Simin DD, Mimica-Dukić NM, Beara IN 2016. Comparative study of biological activities and phytochemical composition of two rose hips and their preserves: *Rosa canina* L. and *Rosa arvensis* Huds. *Food Chem* 192: 907-914.
- Olsson ME, Gustavsson KE, Andersson S, Nilsson A, Duan RD 2004. Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels. *J Agric Food Chem* 52: 7264-7271.
- Oyaizu M 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
- Ozkan MT, Aliyazicioglu R, Demir S, Misir S, Turan I, Yildirmis S, Aliyazicioglu Y 2017. Phenolic characterisation and antioxidant activity of *Primula vulgaris* and its antigenotoxic effect on fibroblast cells. *Jundishapur J Nat Pharm Prod* 12(1): e40073.
- Paunović D, Kalušević A, Petrović T, Urošević T, Djinović D, Nedović V, Popović-Djordjević J 2019. Assessment of chemical and antioxidant properties of fresh and dried rosehip (*Rosa canina* L.). *Not Bot Horti Agrobo* 47(1): 108-113.
- Radovanovic AM, Cupara SM, Popovic SLJ, Tomovic MT, Slavkovska VN, Jankovic SM 2013. Cytotoxic effect of *Potentilla reptans* L. rhizome and aerial part extracts. *Acta Pol Pharm* 70(5): 851-854.
- Roman I, Stănilă A, Stănilă S 2013. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Rosa canina* L. biotypes from spontaneous flora of Transylvania. *Chem Cent J* 7: 73.
- Slinkard K, Singleton VL 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult* 28: 49-55.
- Tumbas VT, Canadanovic-Brunet JM, Cetojevic-Simin DD, Cetkovic GS, Dilas SM, Gille L 2012. Effect of rosehip (*Rosa canina* L.) phytochemicals on stable free radicals and human cancer cells. *J Sci Food Agric* 92: 1273-1281.
- Turan I, Demir S, Aliyazicioglu R, Aliyazicioglu Y 2017. Evaluation of antioxidant and cytotoxic properties of *Primula vulgaris* leaf extract. *KSU J Nat Sci* 20(4): 361-367.
- Turan I, Demir S, Kilinc K, Yaman SO, Misir S, Kara H, Genc B, Mentese A, Aliyazicioglu Y, Deger O 2018. Cytotoxic effect of *Rosa canina* extract on human colon cancer cells through repression of telomerase expression. *J Pharm Anal* 8(6): 394-399.
- Tusat M, Mentese A, Demir S, Alver A, Imamoglu M 2017. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. *Braz J Urol* 43(6):1160-1166.
- Wadowska K, Bil-Lula I, Trembecki Ł, Sliwinska-Mosson M 2020. Genetic markers in lung cancer diagnosis: A review. *Int J Mol Sci* 21: 4569.
- Zamiri-Akhlaghi A, Rakhshandeh H, Tayarani-Najaran Z, Mousavi SH 2011. Study of cytotoxic properties of *Rosa damascena* extract in human cervix carcinoma cell line. *Avicenna J Phytomed* 1(2): 74-77.
- Zarei O, Yaghoobi MM 2019. Cytotoxic and anti-proliferative effects of *Rosa beggeriana* Schrenk extracts on human liver and breast cancer cells. *Avicenna J Phytomed* 9(4): 386-395.
- Zhang PY 2015. Polyphenols in health and disease. *Cell Biochem Biophys* 73: 649-664.
- Zhou Y, Zheng J, Li Y, Xu DP, Li S, Chen YM, Li HB 2016. Natural polyphenols for prevention and treatment of cancer. *Nutrients* 8: 515.

İstiridye Mantarının (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) Farklı Flaş Zamanlarına Göre Antioksidan Aktivitesinin ve Hiperglisemide Anahtar Enzim Rolü Olan α -amilaz ve α -Glukozidaz İnhibisyon Potansiyelinin Belirlenmesi

Nurcan DOĞAN¹, Cemhan DOĞAN²

^{1,2}Yozgat Bozok Üniversitesi Boğazlıyan Meslek Yüksekokulu Gıda İşleme Bölümü 66400, Boğazlıyan/Yozgat/Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0001-5414-1819>, ²<https://orcid.org/0000-0002-9043-0949>,

✉: nurcan.dogan@bozok.edu.tr

ÖZET

Pleurotus ostreatus, lezzeti, yüksek besleyici değeri ve tıbbi özellikleri ile dünya çapında bilinen ve ilk kültüre alınan mantarlardandır. Bu çalışmada olgun fruktifikasyon (OF) ve aşırı olgun fruktifikasyona (AOF) ait mantar tozlarının ekstraksiyon şartları Yanıt Yüzey Yöntemi (YYY) ile optimize edilmiştir. Ayrıca optimum şartlarda ekstraksiyonu yapılan mantar tozlarının, toplam fenolik madde miktarı (TFMM), antioksidan aktivitesi (DPPH, FRAP ve ABTS) ve hiperglisemide anahtar enzim rolü olan α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon etkisi ortaya konulmuştur. AOF'lerde TFMM % 6.93, DPPH, FRAP ve ABTS değerleri ise sırasıyla % 19.48, % 24.87 ve % 16.91 oranında kayba uğramıştır. Ayrıca α -glukozidaz inhibisyon potansiyeli hasat zamanının geciktirilmesi ile % 7.33 oranında azalmıştır. *P. ostreatus*'ün daha yüksek biyoaktif faydalar sergilemesi açısından flaş zamanı, dikkate alınması gereken önemli konular arasında olmalıdır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 03.01.2021

Kabul Tarihi : 18.03.2021

Anahtar Kelimeler

Pleurotus ostreatus

Antioksidan aktivite

α -amilaz ve α -glukozidaz aktivitesi

Flaş zamanı

Determination of Antioxidant Activity of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) According to Different Flush Times and the Inhibition Potential of α -amylase and α -glucosidase, which are Key Enzyme Role in Hyperglycemia

ABSTRACT

Pleurotus ostreatus is a macro-mushroom known worldwide for its taste, high nutritional value, and medicinal properties, and was one of the first cultivated mushroom. In this study, the extraction conditions of mushroom powders of mature fruit body (OF) and over-ripe fruit body (AOF) were optimized by Response Surface Method (RSM). Besides, the total phenolic content (TPC), antioxidant activity (DPPH, FRAP, and ABTS), and the inhibition effect of α -amylase and α -glucosidase, which are key enzymes in hyperglycemia, have been demonstrated for mushroom powders extracted under optimum conditions. TPC was lost 6.93 %, DPPH, FRAP and ABTS values 19.48 %, 24.87 %, and 16.91 % respectively in over-ripe fruits. In addition, α -glucosidase inhibition potential decreased by 7.33 % with delay of harvest time. In order to exhibit higher bioactive properties of *P. ostreatus*, flush time should be considered.

Research Article

Article History

Received : 03.01.2021

Accepted : 18.03.2021

Keywords

Pleurotus ostreatus

Antioxidant activity

α -amylase and α -glucosidase activity

Flush time

Atıf İçin: Doğan N, Cemhan D 2021. İstiridye Mantarının (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) Farklı Flaş Zamanlarına Göre Antioksidan Aktivitesinin ve Hiperglisemide Anahtar Enzim Rolü Olan α -amilaz ve α -glukozidaz İnhibisyon Potansiyelinin Belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1177-1186. DOI:10.18016/ksutarimdog.vi.853006.

To Cite : Doğan N, Cemhan D 2021. Determination of Antioxidant Activity of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.) According to Different Flush Times and the Inhibition Potential of α -amylase and α -glucosidase, which are Key Enzyme Role in Hyperglycemia. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1177-1186. DOI:10.18016/ksutarimdog.vi.853006.

GİRİŞ

P. ostreatus (İstiridye mantarı), kültür mantarları arasında ikinci sırada üretimi yapılan popüler egzotik

mantarlardandır. Kolay kültüre alınışı, yüksek lignoselülozik enzim sistemlerine sahip olması, yüksek randıman ve hastalıklara karşı dayanıklı olması

yanında, gastronomik açıdan lezzet üstünlüğü, besin değerinin yüksekliği ve tıbbi özellikleri açısından da değerli bir mantar çeşididir (Sarangi ve ark., 2006; Mata ve Torres-Hernández, 2008; Patil ve ark., 2010; Patel ve ark., 2012). Kimyasal kompozisyonu, biyoaktif içeriği ve duysal özellikleri substrata (yetiştirildiği ortam) göre değiştiği bilinen bir gerçektir (Liu ve ark., 2005). Ancak tek etken bu olmayıp her ne kadar substrat kadar etkili olmasa da mantarlarda flaş (hasat) zamanı da bu değişimlerde önemli bir parametredir (Mau ve ark., 1997; Soares ve ark., 2009; Saha ve ark., 2012).

P.ostreatus'un tıbbi özellikleri açısından en dikkat çekici özelliklerinden birkaçı yüksek fenolik içeriği sayesinde yüksek antioksidan aktivite göstermesi (Jayakumar ve ark., 2006; Choi ve Ryu, 2015; Sevindik ve ark., 2016) ve β -glukanlar, diyet lifleri gibi aktif polisakkarit içeriği ile antitümör, immün sistemini uyarıcı (Wasser, 2002) ve antidiyabetik özellik göstermesidir (De Silva ve ark., 2012; Zhang ve ark., 2016).

Günümüzde, hastalıkların birçoğunun tüketilen gıdalarla ilişkilendirilmesi, tüketicilerin satın aldıkları gıdalarda besleyici özelliği yanında ilave faydalar sağlaması konusunu gündeme taşımıştır. Özellikle bitkilerle alınan antioksidan maddelerin hücrelerin deformasyonuna neden olan serbest radikallere karşı olan koruyucu etkisi antioksidan aktivitesi yüksek olan ürünlere olan ilgiyi arttırmaktadır (Kris-Etherton ve ark., 2002; Sevindik, 2020). Aslında insan vücudunda bu savunma sistemleri hali hazırda var olup miktar açısından yetersiz kaldıklarından besin takviyesi ile antioksidan içeren gıdaların tüketilmesi insan vücudunun bu oksidatif hasardan korunmasında önemli bir avantajdır (Lin ve Yen, 1999; Krupodorova ve Sevindik, 2020).

Fenolik bileşikler kolayca okside olabilmeleri nedeniyle dolayısıyla yüksek antioksidan aktiviteye sahiptirler (Carabias-Martínez ve ark., 2005; Mohammed ve ark., 2018). *P.ostreatus*'ta içerdiği fenolikler sayesinde yüksek antioksidan özellik gösterir ve antioksidan aktiviteleri ile toplam fenolik bileşik miktarları arasında pozitif bir korelasyonun var olduğu bilinmektedir (Doğan ve ark., 2020). Mantarların önemli tıbbi özelliklerinden biri de antidiyabetik aktivite göstermeleridir. Kan glukoz seviyesinin yemek sonrası yüksek seyretmesi ile karakterize edilen Tip 2 diyabetin tedavisinde ince barsaklarda bulunan ve kompleks karbonhidratları absorbe edilebilir forma dönüştüren enzimlerin inhibisyonu önemli bir yaklaşımdır. Akarboz Tip 2 diyabetin tedavisinde kullanılan etken bir bileşik olup, birçok antidiyabetik ilaçta da etken maddesi olarak kullanılmaktadır. Akarboz karbonhidratların parçalanmasında anahtar enzim rolü oynayan α -glukozidaz ve α -amilaz enzimlerini inhibe ederek

monosakkaritlerin oluşumunu ve emilimini kısıtlamaktadır. Ancak bunun kullanımı ile ilgili yan etkiler söz konusudur (Su ve ark., 2013). Bu gibi sebeplerden ötürü doğal yollardan gıda ve/veya gıda takviyesi olarak antidiyabetik özellik gösteren gıda ajanlarının kullanımı önem kazanmaktadır. Son yıllarda yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda *P.ostreatus*'un α -glukozidaz ve α -amilaz inhibe edici etkisinin de olduğu bildirilmiştir (De Silva ve ark., 2012; Ravi ve ark., 2013; Zhang ve ark., 2016).

Mantarların sahip olduğu besinsel, biyoaktif ve gastronomik özelliklerinden tam manasıyla yararlanılabilmesi için hasat zamanı, dikkat edilmesi gereken önemli bir husustur. Mantarların flaş zamanlarına dikkat edilmeden, uygun büyüklüğe ulaştığında ya da ticari sevkiyat zamanı geldiğinde toplanması önemli bir problemdir. Bu çalışma da önemli bir ticaret hacmi olan *P.ostreatus* mantarının flaş zamanları dikkate alınarak sahip olduğu biyoaktif özelliklerden maksimum fayda sağlanması açısından, olgun fruktifikasyon ve aşırı olgun fruktifikasyonlara ait mantar tozlarının ekstraksiyon şartları YYY ile optimize edilmiştir. Ayrıca optimum şartlarda ekstraksiyonu yapılan mantar tozlarının, toplam fenolik madde miktarları, antioksidan aktiviteleri (DPPH, FRAP ve ABTS) ve hiperglisemide anahtar enzim rolü olan α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon özellikleri incelenmiştir.

MATERYAL ve METOD

Materyal

P.ostreatus saf kültürü Yozgat Bozok Üniversitesi Boğazlıyan MYO kültür bankasından temin edilmiştir. Sıvı kültür üretimi, misel üretimi ve mantar üretiminde kullanılan malt özütü, kavak talaşı, maya, yulaf, K_2PO_4 $MgSO_4$ kepek, $CaSO_4$ ve $CaCO_3$ Yozgat ilindeki tedarikçilerden, polietilen microsac torba (Type 14A, Unicorn Bags, TX) USA'den, diğer tüm kimyasallar aksi belirtilmedikçe Merck KGaA'dan temin edilmiştir.

Sıvı Kültür, Misel ve Mantar Üretimi

Sıvı kültür üretimi için; Stamets (2011) metodu modifiye edilerek uygulanmıştır. Karışım 25 °C'de 14 gün boyunca inkübe edilmiştir. Bu sürenin belirlenmesinde transparan görüntüsü kaybolup bulanık bir görüntü oluşturduğu zaman esas alınmıştır. Misel üretimi için, 0,5 μ delik çapına sahip filtreli ısıya dayanıklı microsac torbalarda % 55 nem içeriğine sahip % 1 $CaSO_4$ ve % 0,5 $CaCO_3$ ile harmanlanmış yulaf tanesi 121 °C'de 2 saat sterilize edilmiş ve 25 °C'ye soğutulmuş ve 10 ml sıvı kültür inoküle edilmiştir. Microsac torbalarda görsel olarak tam bir kolonizasyon oluşana kadar (10-15 gün) 25 °C'de inkübe edilmiştir. Mantar üretimi için; kavak talaşına suplement olarak ¼ oranında buğday kepeği, 1 % $CaCO_3$ ilave edilmiş ve nem oranı % 65 olacak

şekilde kompost ayarlanmıştır. Hazırlanan kompost filtreli torbalara doldurulmuş ve 121 °C'de 4 saat sterilize edilmiştir. Sterilize edilen kompostta %5 oranında misel inoküle edilmiştir. 3 hafta 25 °C ve % 85 nem ve karanlık ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Sonrasında torbalara 3 cm çapraz şekilli kesikler atılmış ve sıcaklık 17 °C ye düşürülüp nem % 95'e çıkarılmıştır. Pinhead (iğne başı) çıkıntılar görüldükren sonra 12 saat ışık verilmiştir. Yaprak çapı 5 cm olduğunda toplanan mantarlar olgun fruktifikasyon (OF), OF'den 5 gün sonra toplanan mantarlar ise aşırı olgun fruktifikasyon (AOF) olarak isimlendirilmiştir.

Mantarların Kurutulması ve Ekstraksiyon

OF ve AOF örnekleri flaş zamanı akabinde 0.5 cm boyutunda kesilmiş ve 40 °C'lik etüvde 12 saat kurutulmuştur. Kurutulan örnekler toz haline getirilmiştir (Bosch MKM6000, Almanya). Yapılan ön denemler neticesinde metanol ve su karışımı en yüksek biyoaktif özellik (TFMM ve DPPH) gösterdiğinden solvent olarak seçilmiştir. Ekstraksiyon işlemi Yanıt Yüzey Yönteminin (YYY)

Box-Behnken Tasarımı (BBD) dikkate alınarak solüsyonlar hazırlanmış ve yine tasarıma uygun sıcaklıkta 60 dakika su banyosunda (Wisd, Kore) ekstrakte edilmiştir.

Dizaynın Oluşturulması

Sıcaklık (30-60 °C), solvent/katı oranı (10-30 mL g⁻¹) ve metanol konsantrasyonu (% 30-80) gibi ekstraksiyon şartlarının TFMM ve DPPH üzerine etkisi Design Expert 11.0.0 yazılımı (Stat-Ease Inc., Minneapolis, MN) kullanılarak belirlenmiştir. BBD'ye ait bağımsız değişkenlerin seviyeleri, deneysel veriler ve tahminsel değerler Çizelge 1'de verilmiştir.

Bağımsız değişkenlerin yanıt üzerindeki etkisini gösteren 3D yüzey grafikleri, İki bağımsız değişken ve bir yanıtta oluşan 3 boyutlu yüzey grafiklerinde diğer bağımsız değişkenin orta noktasında sabit tutulması ve Design Expert 11.0.0) çıktılarının Mathematica yazılımında (sürüm 7; Wolfram Research, Champaign, IL) işlenmesiyle oluşturulmuştur.

Yanıtlar ve bağımsız değişkenler arasındaki ilişki, 2. dereceden polinom regresyon denkliği kullanılarak gösterilmiştir.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

Y: öngörülen yanıt, β_0 : kesişme, $\beta_1, \beta_2, \beta_3$: doğrusal katsayılar, $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$: etkileşim katsayıları, $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$: ikinci dereceden katsayılar, X_1, X_2, X_3 : bağımsız değişkenler

Çizelge 1. Box Behnken deneme dizaynına göre deneysel ve tahminlenen veriler

Table 1. Experimental and predicted data according to Box-Behnken design

Deneme noktası	Bağımsız Değişkenler			Olgun Fruktifikasyon (OF)				Aşırı Olgun Fruktifikasyon (AOF)			
	Independent variables			Mature Fruit				Over-Ripe Fruit			
Experimental point	X ₁ (°C)	X ₂ (mL g ⁻¹)	X ₃ (%)	TFMM (mg g ⁻¹)		GAEDPPH (µmol g ⁻¹)		TETFMM (mg GAE g ⁻¹)		DPPH (µmol TE g ⁻¹)	
				D.V.	T.V.	D.V.	T.V.	D.V.	T.V.	D.V.	T.V.
1	30	10	55	2.61	2.60	18.20	18.18	2.25	2.26	15.89	15.62
2	60	10	55	2.66	2.66	18.54	18.38	2.30	2.29	16.06	16.39
3	30	30	55	2.49	2.49	16.45	16.61	2.00	2.01	14.99	15.02
4	60	30	55	2.55	2.55	18.19	18.21	2.12	2.11	15.88	15.79
5	30	20	30	2.80	2.78	19.21	18.96	2.59	2.56	15.68	15.66
6	60	20	30	2.85	2.84	19.84	19.73	2.64	2.63	16.71	16.42
7	30	20	80	2.79	2.81	18.99	19.10	2.60	2.61	15.73	15.98
8	60	20	80	2.87	2.87	19.87	20.13	2.64	2.67	16.69	16.75
9	45	10	30	2.75	2.77	17.05	17.32	2.53	2.55	15.22	15.35
10	45	30	30	2.60	2.61	17.44	17.54	2.23	2.25	15.25	15.43
11	45	10	80	2.75	2.74	18.78	18.68	2.52	2.50	16.54	16.36
12	45	30	80	2.70	2.69	16.99	16.72	2.41	2.39	15.20	15.07
13	45	20	55	2.91	2.90	20.74	20.76	2.69	2.70	17.63	17.67
14	45	20	55	2.90	2.90	21.01	20.76	2.70	2.70	17.88	17.67
15	45	20	55	2.90	2.90	20.54	20.76	2.71	2.70	17.50	17.67

X₁: Sıcaklık, X₂: solvent/katı oranı, X₃: metanol konsantrasyonu, D.V.: Deneysel veriler, T.V.: Tahminlenen değerler

X₁: Temperature, X₂: solvent / solid ratio, X₃: methanol concentration, D.V.: Experimental data, T.V.: Predictive values

Toplam Fenolik Madde Miktarı (TFMM) Tayini

TFMM Singleton ve ark. (1999)'nın metodu esas alınarak spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 0.4 ml seyreltilmiş ekstrakt 2 ml Folin & Ciocalteu reaktifi ve 1.6 mL % 7.5 Na₂CO₃

çözeltisi ile karıştırılmıştır. Karanlık bir ortamda 60 dakikadan sonra, absorbans 765 nm'de okunmuştur (Shimadzu UV-1700, Kyoto, Japonya). TFMM, gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edilmiştir.

Antioksidan Kapasite Tayini (DPPH, ABTS, FRAP)

Antioksidan kapasite tayini 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü etki tayini, 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit (ABTS) ve demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP) yöntemi ile belirlenmiştir. Analizin sonuçları Trolox eşdeğeri ($\mu\text{M TE g}^{-1}$ sample) olarak ifade edilmiştir. DPPH analizi için 0.1 mL örnek 3.9 mL 25 mg L⁻¹ konsantrasyonda metanolik DPPH ile karıştırıldıktan sonra karanlık bir yerde oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiş ve 515 nm de absorbans okunmuştur (Brand-Williams ve ark., 1995). ABTS analizinde, 30 mg ABTS ve 7.8 mL 2.46 mM potasyum peroxodisülfattan oluşan çözelti PBS ile seyreltilerek 0.70'lik absorbansa ayarlanmıştır. 1950 μL seyreltilmiş ABTS solüsyonu ve 50 μL ekstrakt ile 6 dakika inkübe edildikten sonra 734 nm'de okunmuştur (Çam ve ark., 2009). FRAP analizi için 10 μL örnek ve 20 mM ferric chloride, 30 mM sodium acetate ve 10 mM TPTZ'den oluşan FRAP reaktifi ile bir solüsyon oluşturulmuş, 30 dakika inkübasyondan sonra, absorbans 593 nm'de okunmuştur (Benzie ve Strain, 1996).

α -amilaz ve α -glukozidaz İnhibisyon Aktivitesi Tayini

α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon aktivitesi tayini enzimatik-spektrofotometrik olarak belirlenmiştir ve pozitif kontrol olarak akarboz standartı kullanılmıştır. Bu amaçla α -amilaz inhibisyon aktivitesini belirlemek için ise 1 mL ekstrakt, 1 mL patates nişastası solüsyonu ve 1 mL 20 mM monosodyumfosfat bir test tüpünde karıştırılarak 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Enzimatik reaksiyonu başlatmak için tüpe 1 mL α -amilaz solüsyonu ilave edildikten 30 dakika sonra, 0.5 mL 5.31M potasyum sodyum tartarat ile 0.5 mL 96 mM 3,5-dinitrosalisilik asit solüsyonu tüpe eklenmiştir. Reaksiyonu durdurmak için karışım 5

dakika kaynar suda tutulduktan sonra absorbans 540 nm'de okunmuştur (McDougall ve ark., 2005; Cam ve ark., 2020). α -glukozidaz inhibisyon aktivitesini belirlemek için, 50 μL ekstrakt, 1250 μL 67 mM monopotasyum fosfat ve 50 μL α -glukozidaz bir test tüpünde karıştırılıp 37 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Enzimatik reaksiyonu başlatmak için tüpe 125 μL 10 mM 4-nitrophenyl-D-glucopyranoside solüsyonu eklenmiştir. 20 dakika sonra 2 mL 0.1 M Na₂CO₃ ilave edilerek reaksiyon durdurulmuş ve absorbans 400 nm'de okunmuştur. Ekstraktların antidiyabetik aktivitesi, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Antidiyabetik aktivite(\%)} = \frac{ABS_{kontrol} - ABS_{örnek}}{ABS_{kontrol}} \times 100 \quad (2)$$

ABS_{kontrol} ve ABS_{örnek}, sırasıyla kontrol ve numunenin absorbansını ifade eder. α -amilaz ve α -glukozidazın % 50'sini inhibe eden numunelerin fenolik konsantrasyonları IC₅₀ olarak ifade edilmiştir.

İstatistik Analizler

Grup ortalamaları arasındaki farklılıkları belirlemek için, SPSS 22.0 istatistik paket programı kullanılarak, gruplar arasındaki farkın önemi varyans analizi ile belirlenmiştir. Duncan çoklu karşılaştırma testi ile grup ortalamaları karşılaştırılmıştır (SPSS Inc., Chicago, IL).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Modelin Doğrulanması

Modelden üretilen 2. dereceden polinomial denklemin doğruluğunu saptamak için regresyon değeri (p-değeri), belirleme katsayısı (R²), düzeltilmiş R² (R²_{adj}), tahminlenmiş R² (R²_{pred}) ve model uyumsuzluğu gibi istatistiksel parametreler kullanılmıştır (Çizelge 2).

Çizelge 2. Polinomial denklemler ve model uyumluluğu için istatistiksel parametreler

Table 2. Polynomial equations and statistical parameters to determine model fitness

Örnek Sample	Yanıtlar Responses	2. dereceden polinomial denklemler 2nd order polynomial equations	Regression (p-value)	R ²	R ² _{adj}	R ² _{pred}	Model uyumsuzluğu Lack of fit
OF	TFMM	2.90+0.030X ₁ -0.054X ₂ +0.014X ₃ +0.025X ₂ X ₃ - 0.099X ₁ ² -0.227X ₂ ² +0.023X ₃ ²	<0.0001	0.994	0.989	0.951	0.180
	DPPH	20.76+0.449X ₁ -0.438X ₂ +0.136X ₃ -0.545X ₂ X ₃ - 0.503X ₁ ² -2.42X ₂ ² -0.783X ₃ ²	0.0001	0.965	0.931	0.799	0.258
AOF	TFMM	2.70+0.033X ₁ -0.105X ₂ +0.023X ₃ +0.048X ₂ X ₃ - 0.169X ₁ ² -0.364X ₂ ² +0.086X ₃ ²	<0.0001	0.993	0.985	0.944	0.088
	DPPH	17.67+0.381X ₁ -0.299X ₂ +0.163X ₃ -0.343X ₂ X ₃ - 0.658X ₁ ² -1.31X ₂ ² -0.810X ₃ ²	0.0003	0.958	0.916	0.745	0.325

X₁: sıcaklık, X₂: solvent/ katı oranı, X₃: metanol konsantrasyonu

X₁: Temperature, X₂: solvent / solid ratio, X₃: methanol concentration

Tüm yanıtların varyans analizinin (ANOVA) p değerinin 0.05'ten küçük olduğu görülmüştür. Bu durum seçilen modelin anlamlı olduğunu göstermektedir. Ayrıca 15 deney noktasında verilen yanıtların deneysel ve tahminlenen değerlerinin

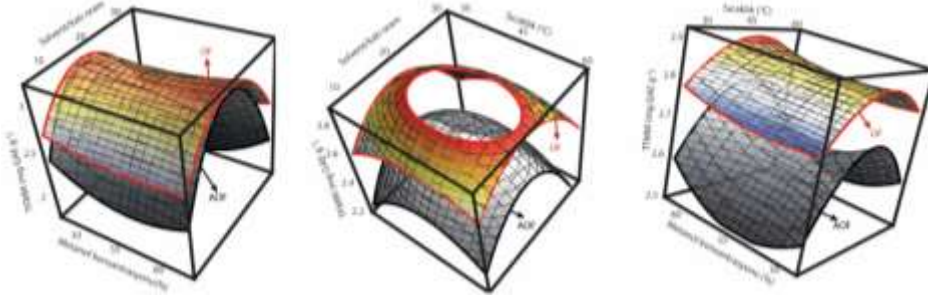
birbirine yakın olması da modelin güvenilirliğinin bir göstergesidir (Çizelge 1). Tüm bunlarla birlikte model uygunluğunu değerlendirmek için F testi uygulanmıştır. Her iki olgunlaşma aşamasında da modelin yanıtlar üzerine uyum eksikliği önemsiz

bulunmuştur ($p>0.05$). Yanıtların R^2 değerleri, OF için; TFMM ve DPPH için sırasıyla 0.994 ve 0.965, AOF için ise; 0.993 ve 0.958 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2). Dahası, R^2_{pred} ile R^2_{adj} arasındaki fark 0.2'den küçüktür. $Adj-R^2$ ile $pre-R^2$ değerleri arasındaki farkın 0.2 değerinden küçük olması ve R^2 ve R^2_{adj} değerlerinin %90' ın üstünde olması modelin uygunluğunu göstermektedir (Myers ve ark., 1995). Modelin yanıtlar üzerindeki etkisinin artırılması için, önemsiz olan faktörler ($p>0.05$) 2. derece polinomial denklemden çıkarılarak modifiye edilmiştir. Bu durum

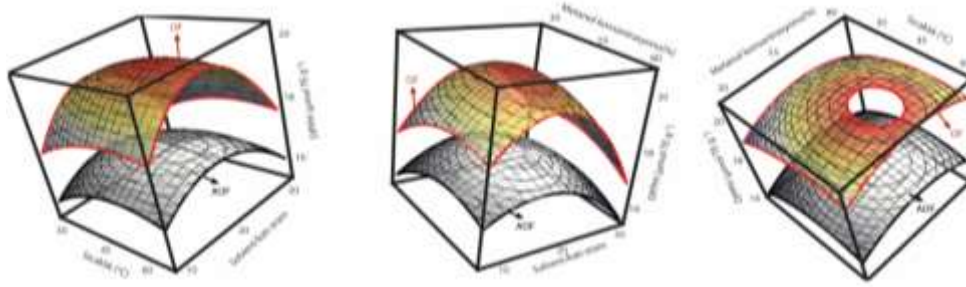
önemli faktörlerin yanıtlar üzerindeki etkisinin belirlenmesinde son derece önemlidir (Friedman ve ark., 2001).

Ekstraksiyon Faktörlerinin Yanıtlar Üzerine Etkisi ve Yanıtların Değerlendirilmesi

Her iki olgunlaşma aşaması için bağımsız faktörlerin TFMM üzerine etkisi Şekil 1. de, DPPH üzerine etkisi ise Şekil 2. de verilmiştir.



Şekil 1. Farklı olgunlaşma aşamalarında ekstraksiyon koşullarının TFMM üzerine etkisinin 3-D yüzey grafikleri
Figure 1. Superimposed 3-D surface plots of the effect of the extraction conditions on TPC at different maturation stages



Şekil 2. Farklı olgunlaşma aşamalarında ekstraksiyon koşullarının DPPH üzerine etkisinin 3-D yüzey grafikleri
Figure 2. Superimposed 3-D surface plots of the effect of the extraction conditions on DPPH at different maturation stages

Bağımsız değişkenlerden sıcaklık ve sıvı/katı oranı yanıtları önemli ölçüde etkilerken ($p<0.05$), metanol konsantrasyonunun bazı yanıtlar üzerindeki etkisi önemsiz bulunmuştur ($p>0.05$). Ekstraksiyon işleminde sıcaklık faktörü önemli bir parametredir. Çünkü sıcaklığın dokuları yumuşatması, çözünürlüğü artırması, yüzey gerilimini azaltması gibi etkilerinden dolayı fenoliklerin ekstrakta geçmesinde etkilidir. Ancak diğer taraftan yüksek sıcaklığın fenolik bileşiklere zarar verdiği de bilinen bir gerçektir (Dent ve ark., 2013). Bu sebepten ötürü sıcaklık ekstraksiyonları için önemli faktörlerin başında gelmektedir ve fenolik bileşikler gıdalara özgü olup, herbir fenolik maddenin de sıcaklıktan etkilenme olgusu farklıdır. Bu amaçla ekstraksiyon sıcaklığının ürüne özgü olarak optimize edilmesi önem kazanmaktadır. Ancak tabiki ekstraksiyon işlemlerinde, faktörlerin prosesi tek tek etkilemesinden ziyade bir bütünün parçası olarak değerlendirilmesi gerekir zaten optimizasyonun

amaçlarından biri de budur. Sıvı/katı oranı ve metanol konsantrasyonu orta noktada sabit tutulduğunda ve sıcaklığın etkisi tek başına düşünüldüğünde TFMM ve DPPH yanıtları üzerine OF için 0.99 arzu edirlilik değeri ile 48.70 °C, AOF için ise 0.98 arzu edirlilik değeri ile 47.90 °C kırılma noktası olarak belirlenmiştir. Yani her iki olgunlaşma aşamasında bu sıcaklık derecelerine kadar TFMM ve antioksidan kapasitelerinde artış gözlenmiş, kırılma noktalarına ulaştıktan sonra ise azalma eğilimine geçmiştir. Bu azalış sıcaklığın fenolikler üzerinde ki bozunma etkisinden kaynaklanmaktadır (Dent ve ark., 2013). TFMM ve DPPH özelliklerinin belirlenmesinde sıcaklığa karşı bu şekilde bir eğilimin olması beklenen bir durumdur. Gıdaların sahip oldukları antioksidan kapasitesi içermiş oldukları toplam fenolik madde miktarı ile ilişkilidir (Velioglu ve ark., 1998). Yapılan son çalışmalarda da mantarların içermiş oldukları fenoliklerle de antioksidan kapasitesi arasında pozitif yönde bir korelasyon olduğu görülmektedir (Cheung ve ark., 2003; Doğan ve

ark., 2020). Genel olarak, sıvı/katı oranı orta noktaya yaklaştıkça TFMM önemli ölçüde artmıştır. Ancak daha sonra azalma gözlenmiştir. Bu durum fenoliklerin sıvı/katı oranı belli bir konsantrasyonda iken maksimum miktarda ekstrakte olması ancak belirli bir seviyeden sonra solventin artması ve konsantrasyonun azalması ile açıklanabilir. Metanol konsantrasyonunun değişmesi OF lerde TFMM üzerinde etkili olurken ($p < 0.05$), DPPH üzerinde etkili görülmemiştir ($p > 0.05$). AOF lerde ise metanol konsantrasyonunun artması ile bir artış gözlenmiş olsada, bu artış %5 hata düzeyinde önemli görülmemiştir. Bu durumun fenolik maddelerin çözücüye transferinde çözücü polaritesinin öneminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Ekstraksiyonda tek tip alkol kullanımına göre, alkol ve su karışımı çözücülerin daha verimli olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur (Markom ve ark., 2007). Metanol ve suyun çözücü polarite indeksleri sırasıyla 6.6 ve 9'dur (Snyder, 1974). Dolayısıyla metanol solventi ön denemelerde daha yüksek aktivite gösterse de sulu karışımlarında istatistiksel olarak önemli olmaması suyun polaritesinin yüksek olması yanında bazı mantar fenoliklerinin suda daha iyi çözünmesi ile açıklanabilir. Liyana-Pathirana ve Shahidi (2005), antioksidan bileşenlerin ekstraksiyonunda en yüksek performansı %50 alkol karışımlı hidrosal solventinde gösterdiğini belirtmesi çalışma sonuçları ile uyumludur.

Farklı zamanlarda hasat edilen istiridye mantarında en yüksek fenolik ve antioksidan kapasite OF de tespit edilmiştir. OF'nin TFMM ve DPPH değeri AOF' den sırasıyla % 7.38 ve % 19.12 daha yüksektir. Olgunlaşma ile antioksidan kapasitesindeki kaybın daha yüksek çıkmasının sebebi olgunlaşma ile fenolikler içerisindeki antioksidanların daha fazla zarar görmesi ile açıklanabilir. Literatür çalışmaları da bu durumu desteklemektedir. *Agaricus brasiliensis*'in farklı olgunlaşma aşamalarında antioksidan aktivitesinin belirlendiği çalışmada olgunlaşma arttıkça antioksidan aktivitenin azaldığı, DNA zararlanmalarında daha az etkili olduğu ve sarcoma 180 tümör inhibisyonundaki etkisinin azaldığı görülmüştür (Mourão ve ark., 2011). *Agaricus brasiliensis* şapkalı bir mantar olduğundan burada ileri olgunlaşma şapkanın alt kısmında bulunan lamellerin açılması ile ifade edilmiştir. Ancak *P. ostreatus* şapkalı bir mantar olmadığından OF yaprak çapı 5 cm olduğunda, AOF ise, olgun fruktifikasyondan 5 gün sonrasında toplanması ile belirlenmiştir. 5 gün zaman aşımının belirlenmesinde yaprak uçları renk değiştirmesi, kıvrılması ve kendine özgü şeklini kaybetmesi etkili olmuştur. *Pleurotus djamor* (Rumph. ex Fr.) mantarı 1. gün, 2. gün, 3. gün ve 4. gün aralıklarla doğadan toplanmıştır. Yapılan fenolik ve antioksidan kapasitesi sonuçlarına göre sırasıyla 2.791 mg g⁻¹ toplam fenolik içeriği ile en yüksek 1. gün

ve onu sırasıyla 1.447 mg g⁻¹, 1.271 mg g⁻¹ değerleri ile 2. ve 3. gün olgunlaştırılan mantarlar takip etmiştir (Saha ve ark., 2012). Soares ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada *Agaricus blazei* Murrill mantarında 2 olgunluk (lamel kısmı açık, lamel kısmı kapalı) aşamasında TFMM, lamel kapalı iken daha yüksek bulunurken istatistiksel olarak bu farklılık önemli bulunmamıştır. Ancak antioksidan kapasitesi açısından lamel kısmı kapalı olan da daha yüksek olarak tespit edilmiştir.

Bazı yenilebilir mantarlar üzerine yapılan gen çalışmalarında, miselyum aşamasından olgunlaşma süreci boyunca gen farklılıkları, sayıları ve/veya seviyelerinde değişimler meydana geldiği ortaya konulmuştur. Sekonder metabolitlerden sorumlu genlerin olgunlaşmaya bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada miselyum ile fruktifikasyon değil, fruktifikasyonun farklı flaş zamanlarına göre biyoaktif maddelerindeki değişimler araştırılmıştır. Ancak gen farklılıklarının miselyum ve fruktifikasyon aşamalarında farklı olması yaşam döngüsünün farklı aşamalarında da bu genlerin değişebileceği sonucunu doğurmaktadır. Çalışma sonucuna göre fruktifikasyon yaşlandıkça (hasat geciktirildikçe) söz konusu aktif genlerin azalması yönündedir. Ayrıca fruktifikasyon aşamasında bazı spesifik proteinlerin ve fonksiyonel bileşiklerin üretimden sorumlu genlerinde bulunduğu tespit edilmiştir (Muraguchi ve ark., 2015; Song ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018). Mantarlar üzerine yapılan başka bir gen çalışmasında ise miselyum ile fruktifikasyon arasında bazı gen farklılıkları olsa da genel olarak her iki grupta da çoğu terpenoid ve polisakkarit biosentezi yüksek bulunmuştur (Chen ve ark., 2020). Literatür verileri ışığında mantarların yaşam döngüsünde farklı gen değişimleri gözlemlendiğinden, flaş zamanının son derece önemli olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca söz konusu biyolojik aktivite gösteren maddeler yalnızca bunlarla ilişkili olmayıp diğer biyoaktif bileşenlerden de kaynaklanabileceği üzerine düşünülmesi gereken bir diğer konudur.

Optimizasyon ve Deneysel Veriler ile Tahmini Değerlerin Doğrulanması

En iyi ekstraksiyon koşulları belirlemek için sayısal optimizasyon uygulanmıştır. Optimum noktaları belirlemek için 3 bağımsız değişken (sıcaklık, sıvı/katı oranı ve metanol konsantrasyonu) maksimum ve minimum noktalar aralığında, yanıtlar olan TFMM ve DPPH ise maksimum sonucu verecek şekilde seçilmiştir. En yüksek arzu edilebilirlik puanı esas alınarak optimum nokta belirlenmiştir. Optimum şartlar, modelin tahminlediği değerler ve optimum noktalarda analizlenen değerler Çizelge 3'de verilmiştir. Bu değerler arasındaki farkın %5 in altında olması modelin güvenilirliğini göstermektedir.

Çizelge 3. Optimum noktalar, deneysel veriler ve tahminlenen değerler

Table 3. Optimum points, experimental data and predicted values

Örnekler Samples	Optimum şartlar Optimal conditions		Metanol konsantrasyonu (%) Methanol conc.	Arzu edirlilik Desirability score	Yanıtlar Response	Tahmin i değerle Predicted value	Deneysel değerler Experimental value	Fark (%) Difference
	Sıcaklık (°C) Temperature	Sıvı/katı oranı (mL g ⁻¹) Liquid/solid ratio						
OF	49.3	19.0	60.0	0.99	TFMM	2.91	2.93±0.15	0.68
					DPPH	20.87	20.98±1.11	0.52
AOF	48.6	18.7	59.11	0.98	TFMM	2.71	2.74±0.23	1.09
					DPPH	17.52	17.56±0.87	0.23

Optimum Nokta Ekstraksiyonlarında TFMM, Antioksidan Aktivite (DPPH, FRAP ve ABTS) ve α -amilaz ve α -glukozidaz İnhibisyon Potansiyeli

Optimum nokta ekstraksiyonlarına göre farklı flaş zamanlarında örneklerin TFMM, antioksidan aktivite ve α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon potansiyeli Çizelge 4'de gösterilmiştir. Antioksidan maddelerin serbest radikalleri inhibe etme mekanizması farklı olduğundan antioksidan aktivite 3 farklı yöntemle (DPPH, FRAP ve ABTS) tespit edilmiştir. Flaş zamanları dikkate alındığında ekstraksiyon işlemi ile de paralel olarak en yüksek TFMM miktarı ve onunla paralel olarak antioksidan aktivite OF de tespit edilmiştir. AOF de antioksidan kapasitesinin düşük

olmasının fruktifikasyon yaşlandıkça oksidatif reaksiyonların etkin olması ve antioksidan bileşiklerin zarar görmesi ile açıklanabilir. En yüksek TFMM 2.93 mg GAE g⁻¹ ve antioksidan aktivite DPPH, FRAP ve ABTS için sırası ile 20.98 μ mol TE g⁻¹, 39.11 μ mol TE g⁻¹, 52.47 μ mol TE g⁻¹ ile OF de saptanırken, en düşük TFMM 2.74 mg GAE g⁻¹ ve antioksidan aktivite 17.56 μ mol TE g⁻¹, 31.32 μ mol TE g⁻¹ ve 44.88 μ mol TE g⁻¹ ile AOF de bulunmuştur. Fruktifikasyon yaşlandıkça TFMM % 6.93 oranında, DPPH, FRAP ve ABTS değerleri ise sırasıyla % 19.48, % 24.87 ve % 16.91 oranında kayba uğramıştır. Ayrıca TFMM ve tüm antioksidan kapasite yöntemlerinden elde edilen sonuçlara göre flaş zamanlarındaki farklılık önemli bulunmuştur (p<0.05).

Çizelge 4. Optimum noktalarda TFMM, antioksidan aktivite (DPPH, FRAP ve ABTS) ve α -amilaz/ α -glukozidaz inhibisyon potansiyeli

Table 4. TPC, antioxidant activity (DPPH, FRAP and ABTS) and α -amylase/ α -glucosidase inhibition potential at optimum points

Örnek Sample	TFMM (mg GAE g ⁻¹)	Antioksidan Kapasite Antioxidant capacity			Antidiyabetik aktivite Antidiabetic activity		
		DPPH (μ mol TE g ⁻¹)	FRAP (μ mol TE g ⁻¹)	ABTS (μ mol TE g ⁻¹)	α -glukozidaz IC ₅₀ (μ g mL ⁻¹)	α -amilaz IC ₅₀ (μ g mL ⁻¹)	GUD
OF	2.93±0.15 ^a	20.98±1.11 ^a	39.11±0.90 ^a	52.47±1.11 ^a	240.65±1.55 ^c	268.47±0.48 ^c	3x170.72 g
AOF	2.74±0.23 ^b	17.56±0.87 ^b	31.32±0.54 ^b	44.88±0.34 ^b	259.69±1.39 ^b	290.41±1.36 ^b	3x184.23 g
Akarboz	-	-	-	-	35.24±1.73 ^d	72.96±3.18 ^d	3x25 mg

GUD: Günlük uygulama dozu; aynı sütunda farklı harfler örneklerin istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir (p <0.05)

GUD: Daily application dose; Different letters in the same column indicate that the samples are statistically different (p <0.05)

Farklı olgunluklarda hasat edilen mantarlarda en düşük IC₅₀ değeri α -glukozidaz ve α -amilaz aktivite için sırasıyla 240.69 μ g mL⁻¹ ve 268.47 μ g mL⁻¹ değeri ile OF de saptanmıştır. Fruktifikasyon olgunlaştıkça α -glukozidaz ve α -amilaz inhibisyon potansiyeli azalmıştır. Antidiyabetik ilaçların etken maddesi olan akarboz ise 35.24 μ g mL⁻¹ ile α -glukozidaz, 72.96 μ g mL⁻¹ ile α -amilaz inhibisyon etkisine sahiptir. AOF de α -glukozidaz ve α -amilaz inhibisyon etkisinin daha düşük çıkmasının sebebinin mantarın sahip olduğu antidiyabetik özellik gösteren biyoaktif bileşiklerin olgunlaşma ile bozunabileceği ve/veya olgunlaşmanın farklı evrelerinde söz konusu biyoaktif bileşiklerin sentezinden sorumlu genlerin aktif veya pasif

olmasından kaynaklanacağı düşünülmektedir. Mantar çeşitlerinin antidiyabetik etkisinin araştırıldığı önceki çalışmalar ile uyumlu olarak α -amilaz inhibisyonu etkisi daha düşük, α -glukozidaz inhibisyonu daha yüksek olarak bulunmuştur (Stojkovic ve ark., 2019). Tip 2 diyabet hastalarına başlangıç düzeyinde iken akarboz etken maddesi olan bir ilaçtan günlük 3x25 mg'lık kullanması önerilmektedir (Lebovitz, 1995). *P. ostreatu*'sın α -glukozidaz üzerinden akarboz inhibisyonuna göre yapılan hesaplamayla OF üzerinde 3x170.72 g gün⁻¹ olarak kullanılması önerilmektedir (Çizelge 4). Su ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada da akarboza göre yapılan karşılaştırmada α -amilaz inhibisyonu

etkisinin α -glukozidaz inhibisyon etkisinde daha zayıf olarak bulunmuştur. Zeng ve ark. (2016)'nın yaptıkları çalışmada bazı fenolik bileşiklerin α -glukozidaz inhibitör etkisi ile ilişkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Friedman (2016)'ın yaptığı çalışmada ise mantar polisakkaritlerinin özellikle de β -glukanların antidiyabetik etkilerinin olduğu vurgulanmıştır. *P. ostreatus*'tan ekstrakte edilen polisakkaritlerin de antidiyabetik özellikleri ile ilişkisi gösterilmiştir (Choi ve Ryu, 2015; Zhang ve ark., 2016).

Mantarlarda, vegetatif miselyum aşamasından generatif olgunlaşma süreci boyunca gen farklılıkları, sayıları ve/veya seviyelerinde değişimler meydana gelmektedir. Bazı yenilebilir mantarlar üzerine yapılan gen çalışmalarında sekonder metabolitlerden sorumlu genlerin olgunlaşmaya bağlı olarak değiştiği tespit edilmiştir. Genel olarak terpenoid ve poliketid gibi sekonder metabolitlerden sorumlu genler miselyumda, olgunlaşan fruktifikasyonlara göre daha yüksek bulunurken, çoğalma, hücre onarım ve transkripsiyon genleri fruktifikasyon aşamasında daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca polisakkarit biyosentezinde rol oynayan genler hem miselyumda hem de fruktifikasyonda yüksek çıkmıştır. Ancak, β -glukan senteziyle ilişkili genler fruktifikasyonda miselyum ve pinhead aşamalarından daha yüksek çıkmıştır. Bu durum β -glukanların hücre duvarındaki polisakkaritlerde yüksek oranda bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca fruktifikasyonda bazı spesifik proteinlerin ve fonksiyonel bileşiklerin üretimden sorumlu genlerin de bulunduğu tespit edilmiştir (Muraguchi ve ark., 2015; Song ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018). Mantarlar üzerine yapılan başka bir gen çalışmasında ise miselyum ile fruktifikasyon arasında bazı gen farklılıkları olsa da genel olarak her iki grupta da çoğu terpenoid ve polisakkarit biyosentezi yüksek bulunmuştur (Chen ve ark., 2020). Literatür kaynakları ışığında mantarların yaşam döngüsünde farklı gen değişimleri gözlemlendiğinden, flaş zamanının son derece önemli olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca söz konusu biyolojik aktivite gösteren maddeler yalnızca bunlarla ilişkili olmayıp diğer biyoaktif bileşenlerden de kaynaklanabileceği üzerine düşünülmesi gereken bir diğer konudur. *Hericium erinaceus*'un 3 farklı olgunlaşma aşamasında kimyasal kompozisyonunun ve polisakkarit fraksiyonunun değiştiği tespit edilmiştir. Protein değeri olgunlaşma ile azalırken polisakkarit fraksiyonu farklı olgunlaşma basamaklarında değişiklik seyretmiştir. Fruktifikasyon uzantısı küçük olanlarda, orta ve olgun olanlara göre polisakkaritlerin molekül ağırlığı ve monosakkarit kompozisyonu önemli ölçüde farklılık göstermiştir (Li ve ark., 2015). Ayrıca mantarların farklı olgunlaşma sürecinde aroma ve tat komponentleri de değişime uğramaktadır (Mau ve ark., 1997). Çalışma kapsamında elde edilen çıktılara

bakıldığında flaş zamanının biyoaktif özellikler üzerine değişimsel etkisi literatürde farklı mantarlar üzerine yapılmış olan çalışmalarla da desteklenmektedir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Kültür mantarları üretimi son dönemlerde yükselen bir trend haline gelmiştir. Yenilebilir mantarların hem besleyici olarak hem de halk ilacı olarak kullanımının çok eski yıllara dayanması, mantarları üzerinde yoğun bir şekilde çalışılan konulardan biri haline getirmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *P. ostreatus*'un yüksek TFMM içerdiği ve dolayısıyla yüksek antioksidan aktivite sergilediği görülmektedir. Ayrıca α -amilaz ve α -glukozidaz inhibisyon potansiyelinin yüksek olması bu mantarı, besleyici özelliklerinin yanında tıbbi özellikleri ile de ön plana çıkarmaktadır. Ancak tüm sahip olduğu özelliklerden maksimum düzeyde yararlanabilmek için hasat zamanı son derece önemlidir. Bu çalışmada *Postreatus*'un farklı hasat zamanlarındaki biyoaktif değişimler ortaya konulmuştur. Ancak söz konusu bu biyoaktif bileşiklerin karakterizasyonunun ileri bir çalışma konusu olarak araştırılması da son derece önemlidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Yozgat Bozok Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından Proje No: 6602b-BMYO/17-125 ile desteklenmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Benzie IF, Strain JJ 1996. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of " Antioxidant Power": the FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239(1): 70-76.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset, C 1995. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*, 28(1): 25-30.
- Cam M, Basyigit B, Alasalvar H, Yilmaztekin M, Ahhmed A, Sagdic O, Konca Y, Telci I 2020. Bioactive Properties of Powdered Peppermint and Spearmint Extracts: Inhibition Of Key Enzymes Linked to Hypertension and Type 2 Diabetes. *Food Bioscience*: 100577.
- Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernández-Méndez J 2005. Pressurized Liquid Extraction in the Analysis of Food and

- Biological Samples. *Journal of Chromatography A* 1089(1-2): 1-17.
- Chen J, Li JM, Tang YJ, Ma K, Li B, Zeng X, Liu XB, Li Y, Yang ZL, Xu WN 2020. Genome-Wide Analysis and Prediction of Genes Involved in the Biosynthesis of Polysaccharides and Bioactive Secondary Metabolites in High-Temperature-Tolerant Wild *Flammulina filiformis*. *BMC Genomics* 21(1): 1-16.
- Cheung LM, Cheung PC, Ooi VE 2003. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Edible Mushroom Extracts. *Food Chemistry* 81(2): 249-255.
- Choi HY, Ryu HS 2015. Antioxidant and Anticancer Effects of Water Extract from *Pleurotus ostreatus*. *The Korean Journal of Food and Nutrition* 28(1): 60-65.
- Çam M, Hışıl Y, Durmaz G 2009. Classification of Eight Pomegranate Juices Based on Antioxidant Capacity Measured by Four Methods. *Food Chemistry* 112(3): 721-26.
- De Silva DD, Rapior S, Hyde KD, Bahkali A H 2012. Medicinal Mushrooms in Prevention and Control of Diabetes Mellitus. *Fungal Diversity* 56(1): 1-29.
- Dent M, Dragović-Uzelac V, Penić M, Bosiljkov T, Levaj B 2013. The Effect of Extraction Solvents, Temperature and Time on the Composition and Mass Fraction of Polyphenols in Dalmatian Wild Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts. *Food Technology and Biotechnology* 51(1): 84-91.
- Doğan N, Doğan C, Çam M, Hayoğlu İ 2020. Optimization and Comparison of Three Cooking Methods for Wheat Flour-Oyster Mushroom (*P. ostreatus*) Powder Composite Chips. *Journal of Food Processing and Preservation* 44(11):e14873
- Friedman J, Hastie T, Tibshirani R 2001. *The Elements of Statistical Learning*. Springer series in Statistics, Vol 1, New York.
- Friedman M 2016. Mushroom polysaccharides: chemistry and antiobesity, antidiabetes, anticancer, and antibiotic properties in cells, rodents, and humans. *Foods* 5(4): 80.
- Jayakumar T, Ramesh E, Geraldine P 2006. Antioxidant Activity of the Oyster Mushroom, *Pleurotus ostreatus*, on Ccl4-Induced Liver Injury in Rats. *Food and Chemical Toxicology* 44(12): 1989-1996.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD 2002. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in The Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine* 113(9): 71-88.
- Krupodorova T, Sevindik M 2020. Antioxidant potential and some mineral contents of wild edible mushroom *Ramaria stricta*. *AgroLife Sci. J.* 9: 186-191.
- Lebovitz HE 1995. A New Oral Therapy for Diabetes Management: Alpha-Glucosidase Inhibition With Acarbose. *Clinical Diabetes* 13(6): 99-104.
- Li QZ, Wu D, Chen X, Zhou S, Liu Y, Yang Y, Cui F 2015. Chemical Compositions and Macrophage Activation of Polysaccharides from Leon's mane Culinary-Medicinal Mushroom *Hericium erinaceus* (higher basidiomycetes) in Different Maturation Stages. *International Journal of Medicinal Mushrooms* 17(5): 443-452.
- Lin MY, Yen CL 1999. Antioxidative Ability of Lactic Acid Bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(4): 1460-1466.
- Liu J, Vijayakumar C, Hall III CA, Hadley M, Wolf-Hall CE 2005. Sensory and Chemical Analyses of Oyster Mushrooms (*Pleurotus sajor-caju*) Harvested from Different Substrates. *Journal of Food Science* 70(9): 586-592.
- Liyana-Pathirana C, Shahidi F 2005. Optimization of Extraction of Phenolic Compounds from Wheat Using Response Surface Methodology. *Food Chemistry* 9(1): 47-56.
- Markom M, Hasan M, Daud WRW, Singh H, Jahim JM 2007. Extraction of Hydrolysable Tannins from *Phyllanthus Niruri* Linn.: Effects of Solvents and Extraction Methods. *Separation and Purification Technology* 52(3): 487-496.
- Mata G, Torres-Hernández F 2008. Effect of Aerobic Fermentation Substrate on *Pleurotus ostreatus* Production and Resistance to *Trichoderma Viride*. In *Mushroom Biology and Mushroom Products*. Proceedings of the Sixth International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products 29 September-3 October, 2008, 74-82. GAMU GmbH, Institut für Pilzforschung, Germany.
- Mau JL, Chyau CC, Li JY, Tseng YH 1997. Flavor Compounds in Straw Mushrooms *Volvariella volvacea* Harvested at Different Stages of Maturity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4726-29.
- McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D 2005. Different Polyphenolic Components of Soft Fruits Inhibit α -amylase and α -glucosidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(7): 2760-2766.
- Mohammed FS, Akgul H, Sevindik M, Khaled BMT. 2018. Phenolic content and biological activities of *Rhus coriaria* var. *zebaria*. *Fresenius Environmental Bulletin* 27(8): 5694-5702.
- Mourão F, Umeo SH, Takemura OS, Linde GA, Colauto NB 2011. Antioxidant Activity of *Agaricus brasiliensis* Basidiocarps on Different Maturation Phases. *Brazilian Journal of Microbiology* 42(1): 197-202.
- Muraguchi H, Umezawa K, Niikura M, Yoshida M, Kozaki T, Ishii K, Sakai K, Shimizu M, Nakahori K, Sakamoto Y 2015. Strand-Specific RNA-Seq Analyses of Fruiting Body Development in *Coprinopsis cinerea*. *PLoS One* 10(10): e0141586.
- Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM 1995.

- Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, John Wiley & Sons. Inc., New York, 134-174.
- Patel Y, Naraiyan R, Singh V 2012. Medicinal Properties of *Pleurotus* Species (Oyster Mushroom): a Review. *World Journal of Fungal and Plant Biology* 3(1): 1-12.
- Patil SS, Ahmed SA, Telang SM, Baig MMV 2010. The nutritional value of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) kumm cultivated on different lignocellulosic agrowastes. *Innovative Romanian food biotechnology*.
- Ravi B, Renitta RE, Prabha ML, Issac R, Naidu S 2013. Evaluation of Antidiabetic Potential of Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in Alloxan-Induced Diabetic Mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 35(1): 101-09.
- Saha AK, Acharya S, Roy A 2012. Antioxidant Level of Wild Edible Mushroom: *Pleurotus djamor* (Fr.) Boedijn. *Journal of Agricultural Technology* 8(4): 1343-1351.
- Sarangi I, Ghosh D, Bhutia SK, Mallick SK, Maiti TK 2006. Anti-tumor and Immunomodulating Effects of *Pleurotus ostreatus* Mycelia-Derived Proteoglycans. *International Immunopharmacology* 6(8): 1287-1297.
- Sevindik M, Akgül H, Günel S, Doğan M 2016. *Pleurotus ostreatus*' un doğal ve kültür formlarının antimikrobiyal aktiviteleri ve mineral madde içeriklerinin belirlenmesi. *Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 16(1): 153-156.
- Sevindik M 2020. Antioxidant and antimicrobial capacity of *Lactifluus rugatus* and its antiproliferative activity on A549 cells. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 19(2): 423-427.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent Methods in *Enzymology. Methods in Enzymology* 299: 152-178.
- Snyder L 1974. Classification of the Solvent Properties of Common Liquids. *Journal of Chromatography A* 92(2): 223-230.
- Soares AA, de Souza CGM, Daniel FM, Ferrari GP, da Costa SMG, Peralta RM 2009. Antioxidant Activity and Total Phenolic Content of *Agaricus brasiliensis* (*Agaricus blazei* Murril) in Two Stages of Maturity. *Food Chemistry* 112(4): 775-781.
- Song HY, Kim DH, Kim JM 2018. Comparative Transcriptome Analysis of Dikaryotic Mycelia and Mature Fruiting Bodies in the Edible Mushroom *Lentinula edodes*. *Scientific Reports* 8(1): 1-15.
- Stamets P 2011. *Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms*, Ten speed press, New York, 555 sy.
- Stojkovic D, Smiljkovic M, Ciric A, Glamoclija J, Van Griensven L, Ferreira IC, Sokovic M 2019. An Insight into Antidiabetic Properties of Six Medicinal and Edible Mushrooms: Inhibition of α -amylase and α -glucosidase Linked To Type-2 Diabetes. *South African Journal of Botany* 120: 100-103.
- Su CH, Lai MN, Ng LT 2013. Inhibitory Effects of Medicinal Mushrooms on α -amylase and α -glucosidase—Enzymes Related to Hyperglycemia. *Food & Function* 4(4): 644-649.
- Velioglu Y, Mazza G, Gao L, Oomah B 1998. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(10): 4113-4117.
- Wang Y, Zeng X, Liu W 2018. De Novo Transcriptomic Analysis During *Lentinula edodes* Fruiting Body Growth. *Gene* 641: 326-34.
- Wasser SP 2002. Medicinal Mushrooms as a Source of Antitumor and Immunomodulating Polysaccharides. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60(3): 258-274.
- Zeng B, Chen K, Du P, Wang SS, Ren B, Ren YL, Yan HS, Liang Y, Wu FH 2016. Phenolic Compounds from *Clinopodium chinense* (Benth.) O. Kuntze and Their Inhibitory Effects on α -Glucosidase and Vascular Endothelial Cells Injury. *Chemistry & Biodiversity* 13(5): 596-601.
- Zhang Y, Hu T, Zhou H, Zhang Y, Jin G, Yang Y 2016. Antidiabetic Effect of Polysaccharides from *Pleurotus ostreatus* in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Biological Macromolecules* 83: 126-132.



The Chemosensitizing Effect of *Portulaca oleracea* Methanol Extract on Human Colorectal and Lung Cancer Cells Against Irinotecan

Mehmet Kadir ERDOĞAN[✉]

Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Arts and Sciences, Bingol University, 12000, Bingol, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0002-1579-5737>

✉: mkerdogan@bingol.edu.tr

ABSTRACT

Cancer is a major health problem causing great damage in recent years worldwide. Serious side effects of chemotherapeutics used in cancer treatment make natural products valuable. Combined use of chemotherapy drugs and herbal products is an important approach in reducing side effects and revealing a more effective treatment. In this study, the effects of methanolic extract from *Portulaca oleracea* (POM) alone and in combination with irinotecan were investigated against human colorectal carcinoma cell line HCT116 and human lung adenocarcinoma cell line A549. The antiproliferative/anti-colony formation effects were determined using WST-1 assay and clonogenic assay. Cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to exhibit the triggered apoptosis, and quantitative real time polimerase chain reaction (qRT-PCR) was performed to evaluate the mRNA expression of mTOR, Akt and PTEN genes, which are significant modulators of apoptotic and survival pathways. It was determined that 72 h treatment with increasing concentrations of POM (0-1000 µg mL⁻¹) decreased the viability of HCT116 and A549 cells in a dose-dependent manner. Also, POM and irinotecan exhibited synergistic effects in both cell lines. The combination of POM and irinotecan suppressed the colony forming capacity of HCT116 and A549 cells by 84% and 79%, respectively. POM also altered mTOR, Akt and PTEN gene expressions in HCT116 and A549 carcinoma cells, both alone and in combination with irinotecan. This study indicates that the phytotherapeutic effect of *P. oleracea* needs to be studied more intensively.

Research Article

Article History

Received : 06.01.2021

Accepted : 01.04.2021

Keywords

Portulaca oleracea

Irinotecan

Cancer

Apoptosis

Cell culture

Portulaca oleracea Metanol Ekstraktının İnsan Kolorektal ve Akciğer Kanseri Hücrelerini Irinotekana Karşı Kemosensitize Edici Etkisi

ÖZET

Kanser önemli bir sağlık sorunudur ve son yıllarda dünya çapında büyük zararlara neden olmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötiklerin ciddi yan etkileri, doğal ürünleri değerli kılmaktadır. Kemoterapi ilaçları ile bitkisel ürünlerin birlikte kullanılması, yan etkilerin azaltılması ve daha etkili bir tedavinin ortaya çıkarılmasında önemli bir yaklaşımdır. Bu çalışmada, tek başına ve irinotekan ile kombinasyon halinde *Portulaca oleracea* metanol ekstraktının (POM) etkileri, insan kolorektal karsinoma hücre hattı HCT116 ve insan akciğer adenokarsinom hücre hattı A549'a karşı araştırılmıştır. Antiproliferatif / anti-koloni oluşumu etkileri, WST-1 deneyi ve koloni oluşumu deneyi ile belirlendi. Hücre ölümü tespiti enzim bağlı immunosorbent analizi (ELISA) tetiklenen apoptozu göstermek için kullanıldı, ve apoptotik ve hayatta kalma yollarının önemli modülatörleri olan mTOR, Akt ve PTEN genlerinin mRNA ekspresyonunu değerlendirmek için kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) gerçekleştirildi. Artan POM konsantrasyonları (0-1000 µg mL⁻¹) ile 72 saatlik tedavinin doza bağlı olarak HCT116 ve A549 hücrelerinin

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 06.01.2021

Kabul Tarihi : 01.04.2021

Anahtar Kelimeler

Portulaca oleracea

Irinotekan

Kanser

Apoptoz

Hücre kültürü

canlılığını azalttığı belirlendi. Ayrıca, POM ve irinotekan, her iki hücre hattında da sinerjik etkiler sergiledi. POM ve irinotekan kombinasyonu, HCT116 ve A549 hücrelerinin koloni oluşturma kapasitesini sırasıyla %84 ve %79 oranında baskıladı. POM ayrıca HCT116 ve A549 karsinom hücrelerinde mTOR, Akt ve PTEN gen ekspresyonlarını hem tek başına hem de irinotekan ile kombinasyon halinde değiştirdi. Bu çalışma, *P. oleracea*'nın fitoterapötik etkisinin daha yoğun olarak araştırılması gerektiğini göstermektedir.

To Cite : Erdoğan MK 2021. The Chemosensitizing Effect of *Portulaca oleracea* Methanol Extract on Human Colorectal and Lung Cancer Cells Against Irinotecan. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1187-1195. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.848187.

INTRODUCTION

Cancer is a heterogeneous disease that characterized by uncontrolled proliferation, subsequent cellular transformation, angiogenesis, invasion and metastasis. The incidence and mortality of cancer is increasing year by year, and this rise reinforces the cancer remains one of the most devastating health problem. Lung cancer ranks first in the world in terms of incidence and mortality among cancers, and colorectal cancer is the second cause of cancer related deaths and is the fourth most common type of cancer worldwide (Bray et al., 2018). In cancer treatment the most commonly used applications are surgery, radiotherapy and chemotherapy. However, reasons such as recurrence of the tumor as a result of surgical intervention or the serious side effects of the drugs used in chemotherapy requires the development of safer and more effective approaches for cancer treatments (Afolayan et al., 2020). Recently, the complementary and alternative use of plants in cancer treatment has attracted considerable attention (Majolo et al., 2019; Younes et al., 2020).

Plants have been used therapeutically as well as many usage areas since ancient times and are an important resource at the point where modern medicine comes. It is known that the drug used in the treatment of most diseases is developed by taking inspiration from plants. An important part of chemotherapeutic drugs used especially in cancer treatment are derivatives of the compounds isolated from medicinal plants. The anticancer effect of plants can play crucial roles in the prevention and treatment of cancer, which is a major health problem for the most communities (Borah and Banik, 2020; Erdogan et al., 2020a).

Portulaca oleracea (purslane) is an annual edible green leafy vegetable that widespread in many regions of Europe, Asia, Africa, and the Middle East. It widely consumed as a potherb added in soups and salads. In many countries purslane used as a herbal medicine in the treatment of headaches, pain and swelling, intestinal and stomach illnesses, and shortness of breath (Nemzer et al., 2020). Omega-3 fatty acids, quercetin, kaempferol, apigenin, vitamin A and C, and tocopherols are among the main components of *P. oleracea* that makes purslane beneficial for health (Lim and Quah, 2007). Many pharmacological effects

of this plant was reported, including anti-inflammatory, cardiac stimulant, antioxidative, wound-healing, antibacterial, and anti-tumor (Xiang et al., 2005).

Apoptosis is a programmed or physiological form of cell death that occurs within genetic control by activating endogenous proteases in the cell. As a result of this process, the cell shrinks, the structure of the cytoskeleton is distorted, and membrane bubbling occurs, as well as nuclear condensation and nucleosomal DNA fragmentation. Since the cell's orientation to apoptosis occurs with the control of genes, mutations in these genes can lead to apoptosis avoidance (Ferreira et al., 2002).

Irinotecan is a camptothecin derivative that used in various cancer types including colorectal, prostate, pancreatic, and lung cancer as a chemotherapy agent. Although irinotecan is one of the essential medicines used in cancer treatment, it causes common side effects, including colon inflammation, fever, bone marrow, blood clots, shortness of breath, vomiting and diarrhea (Huang et al., 2020). Therefore, the development of new adjuvant treatment approaches that can reduce the side effects and increase anticancer efficacy of irinotecan even at low doses can make important contributions to cancer treatment. This study focused on the mechanistic elucidation of the possible interaction between POM and irinotecan in inhibiting the proliferation and inducing apoptosis of colon and lung cancer cells. In addition, the study aims to investigate the regulation of genes involved in various pathways related to survival and apoptosis in colon and lung cancer cells treated with POM and / or irinotecan.

MATERIALS and METHOD

Chemicals and Reagents

The fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin, Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), and phosphate buffered saline (PBS) was purchased from Lonza (Walkersville, MD, USA). Trypan blue, trypsin-EDTA, methanol, acetic acid and crystal violet was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Water Soluble Tetrazolium-1; 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2, 4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium,

monosodium salt (WST-1) cell proliferation assay kit was procured from Intron Biotechnology (Gyeonggi-do, Korea). Cell death detection ELISA kit was purchased from Roche (Mannheim, Germany). Irinotecan was procured from Kocak Pharma (Istanbul, Turkey). Forward and reverse primers were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA), pure link RNA mini kit from Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), 2xqPCRBIO SyGreen mix Lo-ROX kit from PCR Biosystems (London, UK), and high capacity cDNA reverse transcriptase kit from Thermo Fisher (Waltham, MA, USA), and analysis with kits was performed according to manufacturer's protocols.

Plant Material

The aerial parts of *P. oleracea* were obtained from a local market from Bingol, Turkey, and the samples were identified by Yakup Yapar from the Department of Biology, Bingol University. The plant samples were thoroughly washed and freed from water via a filter paper. Then, the samples were left to dry in an environment without sunlight and moisture. The dried samples were finely grounded using a blender for extraction. A voucher specimen was deposited in the Herbarium of Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Bingol University (herbarium No. 6565).

Methanolic Extraction

Overall, 20 g of finely powdered plant material was placed to the Whatman no. 1 filter paper and tightly closed. 400 mL of analytical grade methanol (1:20 / w:v) was placed to a flask and Soxhlet apparatus heated to at 50°C until getting a clear solvent in extraction chamber. Then the solvents in the mixture, which collected in the bottom flask, were evaporated by a rotary evaporator (IKA Rotary Evaporator model RV-10, Werke GmbH Co. KG, Germany) under reduced pressure at 45°C. Subsequently, the extracts were kept in a vacuum oven at 25°C until they became powdered and stored at -20 °C (Aizpurua-Olaizola et al., 2015; Erdogan et al., 2019). The powdered extracts were dissolved in traces of methanol and diluted with DMEM for further use in the studies.

Cells and Culture Conditions

HCT116 human colorectal carcinoma cells and A549 human non-small cell lung cancer cell line were provided by the cell repository of the Central Laboratory Research and Application Center of Bingol University, Turkey. The cell lines were maintained in DMEM with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin-streptomycin, and in a humidified atmosphere by 5% CO₂ and 37°C (Erdogan et al., 2020a). When the cells reached 80% of density, they were trypsinized to detach from the bottom surface and were counted in Neubauer's chamber for used in

studies.

Cell Viability

The dose-dependent antiproliferative effects of POM, irinotecan, and combinations were measured by the WST-1 cell proliferation assay kit according to manufacturer's protocol (Intron Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea). Briefly, 5×10³ cells/well were seeded into 96-well culture plates and incubated at 37°C and 5% CO₂ overnight. HCT116 and A549 cells were treated with various concentrations of POM (0, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800 and 1000 µg mL⁻¹) and irinotecan (0, 0.59, 1.47, 2.94, 5.88, 14.66, 29.35 and 58.70 µg mL⁻¹) for 72 h. Culture medium was replaced by fresh medium and 10 µL of WST-1 reagent were pipetted into wells. After 3 h incubation period, the amount of soluble formazan dye produced by metabolically active cells was measured with an ELISA microplate reader (SpectraMax 384 Plus, Molecular Devices, USA) at 450 nm as absorbance (optical density-OD). The mixture of WST-1 reagent and culture medium without cells was evaluated as a background control. To determine percentage of cell survival that formula was used:

$$\% \text{ cell survival} = [\text{OD}_{\text{Treatment}} - \text{OD}_{\text{Blank}} / \text{OD}_{\text{Control}} - \text{OD}_{\text{Blank}}] \times 100\%.$$

The absorbance value of the DMEM and WST-1 reagent mixture was evaluated as a blank. The control cells were treated with DMEM and trace methanol mixture only (1:50 / v:v). The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) value for each treatment group was calculated.

Calculation of Combination Index (CI)

The combination index of POM and irinotecan treatments was calculated by the following formula (Li et al., 2017);

$$\text{CI} = (\text{A}_{\text{POM}})_{50} / (\text{B}_{\text{POM}})_{50} + (\text{A}_{\text{Irinotecan}})_{50} / (\text{B}_{\text{Irinotecan}})_{50}.$$

In this formula; (A_{POM})₅₀: POM concentration with 50% inhibition effect when half of the IC₅₀ of irinotecan concentration is applied, (B_{POM})₅₀: IC₅₀ of POM, (A_{Irinotecan})₅₀: Irinotecan concentration with 50% inhibition effect when half of the IC₅₀ of POM concentration is applied, (B_{Irinotecan})₅₀: IC₅₀ of irinotecan. The CI values found after calculation indicates; CI > 1 antagonism, CI = 1: enhancer and CI < 1 synergism (Chou and Talalay, 1984).

Colony Formation Assay

The effect of the treatments on the colony formation capacity of the cells were determined by clonogenic assay which was previously described (Franken et al., 2006). The HCT116 and A549 cells were seeded in 60 mm petri dishes (5×10² cells/dish) and followed by overnight incubation, the cell lines treated with POM

(250 µg mL⁻¹), irinotecan (1.47 µg mL⁻¹) and the combination of 250 µg mL⁻¹ POM+1.47 µg mL⁻¹ irinotecan for 72 h. After treatment, the medium was sucked off and replaced by fresh medium. The cells were maintained in fresh medium for 12 days, and the formed colonies were fixed with a mixture of methanol : acetic acid (3:1/ v:v) for 5 min. Then this mixture was removed, and the petri dishes were washed with cold PBS and stained with crystal violet (0.05%) for 15 min. The colony formation were analyzed with the ImageJ 2.1 software and quantitated by GraphPad Prism 8.0.

CDD ELISA

The cell death detection Elisa (CDDE) method provides *in vitro* qualitative and quantitative analysis of the histone that passes from the nucleus to cytoplasm due to DNA fragmentation, as a result of apoptotic cell death. Briefly, 1x10⁴ cells/well were seeded in 96 well plates and the cells were treated with the half of IC₅₀ doses of POM, irinotecan and the combination of POM+Irinotecan for 72 h. The 96 well plate was centrifuged at 200xg for 15 min and after removing the supernatant, 200 µL of lysis buffer was added to the wells and incubated at room temperature for 30 min. The lysate was centrifuged at 200xg for 15 min and 20 µL of the supernatant was taken and transferred into a streptavidin-coated microplate. 80 µL of immunoreagent, that containing anti-histone and anti-DNA peroxidase (POD) antibodies, was added to each well. The microplate was covered with a sticky foil and kept on a shaker at a slow speed for 2 h. The liquid part was then removed, the wells were washed with incubation buffer and 100 µL of ABTS solution was added to the wells. Then, it was incubated on the microplate shaker for 25 min to be ready for colorimetric analysis. The absorbance of the wells was measured in the ELISA microplate reader (SpectraMax 384 Plus, Molecular Devices, USA) at 405 nm. In the treatment groups, intense color formation compared to control cells shows the DNA fragmentation characteristic of apoptosis. The absorbances of the groups were divided by the absorbance of the control, and enrichment factors, which are a colorimetric indicator of apoptosis, were calculated.

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

qRT-PCR was performed according to the method previously described (Erdogan et al., 2020b). 1x10⁶ cells were seeded the 6 well microplates and after an overnight incubation, the cells were treated with appropriate treatments (the half of IC₅₀ doses of POM, irinotecan and the combination of POM+Irinotecan) for 72 h. The medium was then removed, 1 mL of cold PBS was added to the wells and the cells were collected with a scraper. Pure Link RNA Mini kit (Invitrogen-Life

Technologies) for RNA isolation from cells, High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit (Thermo Fisher) for synthesis of total RNA from composite DNA, SYBR Green master mix for quantitative real-time PCR (2xqPCRBIO SyGreen Mix Lo-ROX Kit, PCR Biosystems) was used and all experimental steps were performed according to the manufacturer's protocols. The PCR reaction conditions were as follows: incubation at 95 °C for 2 min followed by 40 cycles at 95 °C for 5 s, 64 °C for 20 s, 72 °C for 2 min, and 1 cycle at 72 °C for 5 min. A PCR device (Rotor-Gene Q, Qiagen, Hilden, Germany) was used in the analysis. The forward and reverse primer sequences were used as follows: mTOR (forward primer: 5'-TGTCTGCTGGTCTGAACTG-3'; reverse primer: 5'-TTCAGCGATGTCTTGTGAGG-3'), Akt (forward primer: 5'-CACACCACCTGACCAAGATG-3'; reverse primer: 5'-CTGGCCGAGTAGGAGAACTG-3'), PTEN (forward primer: 5'-GGTGATGTGGCAGGACTCTT-3'; reverse primer: 5'-CAGCTTCCGAGAGGAGAGAA-3'), and β-actin (forward primer: 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3'; reverse primer: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'). mRNA expression rates were determined by the comparative threshold cycle (2^{-ΔΔCt}) method (Livak and Schmittgen, 2001). Ct values were normalized with β-actin mRNA expression rates.

Statistical analysis

Each assay was repeated at least three times and data are given as mean±standard deviation (SD). Statistical analysis of the findings were evaluated by one-way ANOVA test using Prism 8.0 (GraphPad Inc., San Diego, CA, USA). P value <0.05 was assumed as statistically significant at differences between the groups.

RESULTS and DISCUSSION

Lung cancer has the highest incidence and mortality among cancer cases worldwide (Bray et al., 2018). Colorectal cancer is the fourth most common cancer type and is the second cause of cancer-related deaths worldwide (Bray et al., 2018), and is an epigenetic-based disorder that causes the colon/rectal mucosa to transform into metastatic carcinoma (Jayathilake et al., 2019). Surgical intervention, radiotherapy, chemotherapy or hormone therapy can be applied in the treatment of lung and colorectal cancer depending on the genetic as well as clinical symptoms. However, the fact that these approaches are responsible for significant side effects necessitates alternative treatment approaches (Younes et al., 2020). Plants and plant derived compounds are considered as important resources in revealing new and alternative treatment approaches in this context. In this study, the viability of A549 human lung cancer and human HCT116 colorectal cancer cells depending on the increasing

concentration of POM, irinotecan and combination were determined by the WST-1 cell viability assay and shown in Figure 1a and 1b. Cell viability curves have

shown that POM, irinotecan and combination of POM+Irinotecan suppresses proliferation in both cell lines in a dose-dependent manner.

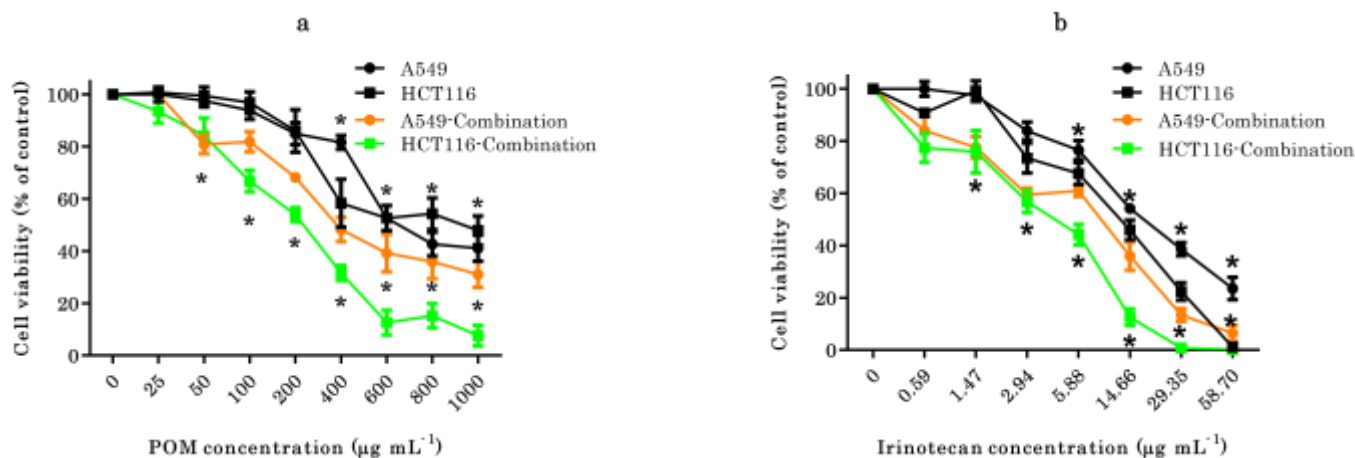


Figure 1. The antiproliferative effect of *Portulaca oleracea* methanol extract and combination of POM+IC₅₀/2 of irinotecan (a), and irinotecan and combination of Irinotecan+IC₅₀/2 of POM (b) on HCT116 human colon cancer and A549 human lung cancer cell lines in 72 h treatment. (*P<0.05; compared with the untreated cells).

Şekil 1. *Portulaca oleracea* metanol ekstraktı ile POM+Irinotekan IC₅₀/2 kombinasyonunun (a), ve irinotekan ile Irinotekan+ POM IC₅₀/2 kombinasyonunun (b) 72 saatlik tedavide HCT116 insan kolon kanseri ve A549 insan akciğer kanseri hücre hattı üzerindeki antiproliferatif etkisi. (*P<0.05; tedavi edilmeyen hücrelerle karşılaştırıldığında).

Since the 1990s, many large pharmaceutical companies have prioritized investments in combinatorial treatment approaches, which have the potential to increase the effectiveness of treatment processes, as well as studies focusing on natural products (Luzhetskyy et al., 2007; Majolo et al., 2019). Considering the complex nature of the compounds found in plant extracts and the economic and synthetically very difficult to synthesize, the focus has been on the discovery of drugs based on specific molecular targets to obtain more efficient compounds using combinatorial approach technologies (Ojima, 2008; Majolo et al., 2019). It is indicated that combinatorial approaches will be the future source of numerous new drugs or new chemical entities (Majolo

et al., 2019). Of the total of 136 new active substances with cancer-related activity between 1981 and 2014, 113 or 83% were either directly natural products or developed by imitation of natural products, only 23 or 17% were of synthetic origin (Newman and Cragg, 2016). Therefore, it has been reported widely that plants have great potential in terms of new therapeutic approaches, and plant-based combinational approaches act mechanically in the processes of cell proliferation, angiogenesis, invasion and apoptosis in the initiation, development and progression of cancer (Rajesh et al., 2015; Majolo et al., 2019). The IC₅₀ and CI values obtained by cell viability analysis are presented in Table 1. It is clear from these data that there was a synergistic interaction between POM and irinotecan.

Table 1. The IC₅₀ and combination index values of POM and irinotecan on HCT116 and A549 cells

Çizelge 1. POM ve irinotekanın HCT116 ve A549 hücreleri üzerindeki IC₅₀ ve kombinasyon indeksi değerleri

Cell Line	IC ₅₀ values		Combination Index (CI)
	POM (µg mL ⁻¹)	Irinotecan (µg mL ⁻¹)	POM+Irinotecan
HCT116	608.80±17.32	12.16±0.77	0.79±0.03
A549	722.45±23.19	18.41±1.24	0.93±0.04

Besides being important for the food industry, *P. oleracea* is a pharmacologically valuable plant that exhibits antimicrobial, neuroprotective, anti-inflammatory, antioxidant and anticancer activities thanks to its wide range of chemical components such

as flavonoids, proteins, alkaloids and vitamins. Although the efficacy of the extracts or compounds obtained from *P. oleracea* has been demonstrated in many *in vitro* and *in vivo* studies, the number of studies on their mechanism of action is limited. Therefore, considering *P. oleracea* in advanced clinical

studies will be possible with more mechanistic studies (Zhou et al., 2015). Al-Sheddi et al. (2015) showed that *P. oleracea* seed oil has been shown to significantly reduce the viability of human liver cancer HepG2 cell line and human lung cancer A549 cells, and the antiproliferative effect of the treatment was higher, especially at concentrations of 250 µg mL⁻¹ and above. In two previous studies, it was stated that the chloroform extract of the whole plant and aerial parts of *P. oleracea* were exhibited moderate antiproliferative activity in HCT-15 and Caco-2 colon cancer cells, and that the treatment was more effective at higher concentrations (Mali, 2015; El-burai et al., 2020). Similarly, in this study, it was observed that *P. oleracea* methanol extract was exhibited a dose-dependent effect on both cancer cell lines, but the antiproliferative activity was further increased especially at high concentrations. This difference may be due to the use of methanol, which has a different polarity, in extraction, and the different geography and

climatic conditions where the plant samples were collected (Gecibesler and Erdogan, 2019). A previous study showed that the methanolic extract of *P. oleracea* was non-toxic in normal Chang liver cells and was safe for daily consumption (Payudara et al., 2013). It has also been shown that the hydro-ethanolic extract of *P. oleracea* was not cytotoxic on isolated human lymphocytes (Rahimi et al., 2019). When all these studies are evaluated, it can be concluded that while *P. oleracea* does not exhibit toxic effects on normal cells, it has cytotoxic activity on cancerous cells.

The survival of a single cell and its colony growth can be analyzed by an *in vitro* colony formation assay or a clonogenic assay method (Franken et al., 2006). As shown in Figure 2, both POM individually and its combination with irinotecan significantly inhibited colony formation of the HCT116 and A549 cells (P<0.05).

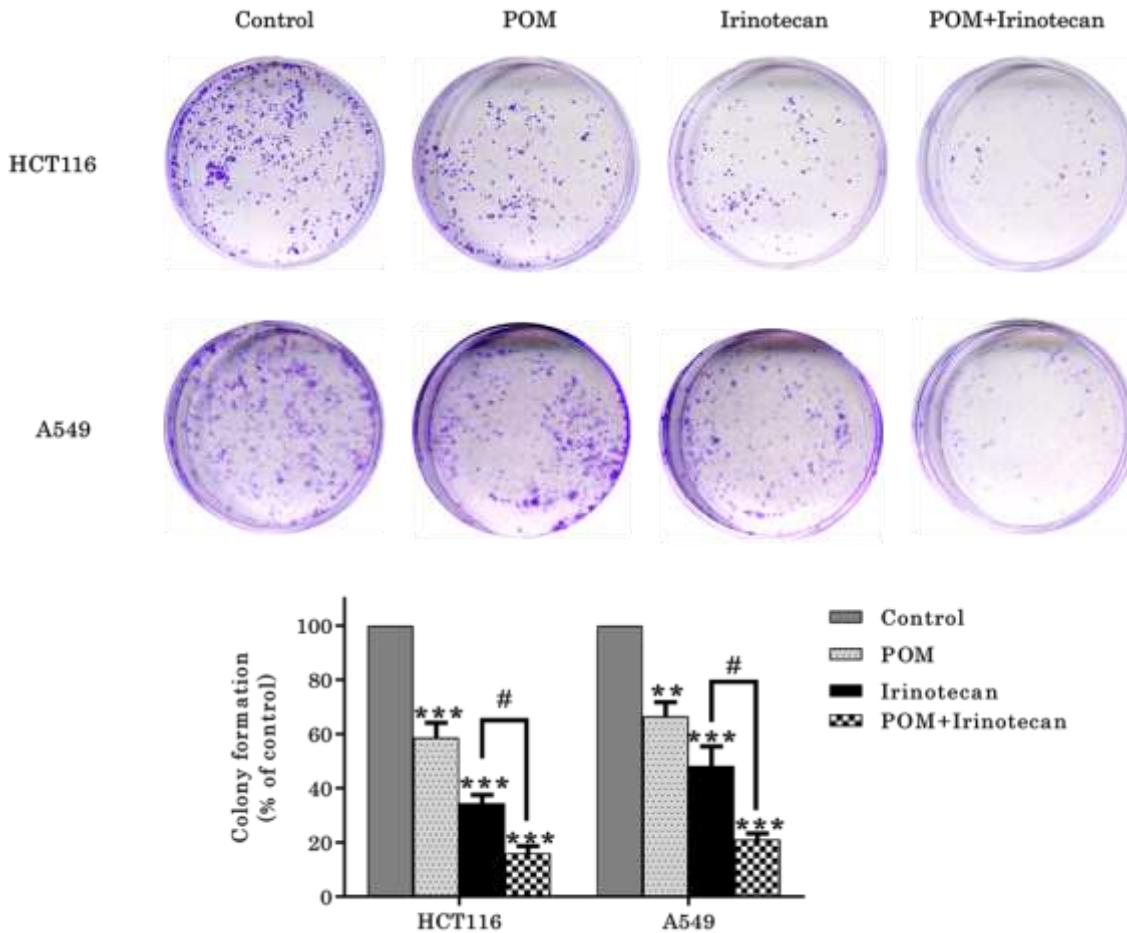


Figure2. Colony formation inhibitory effect of *Portulaca oleracea* methanol extract and / or irinotecan treatments on HCT116 and A549 cells. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.0001; compared with the untreated cells. #P<0.05; compared with the irinotecan treated cells).

Şekil 2. *Portulaca oleracea* metanol ekstraktının ve/veya irinotekan tedavilerinin HCT116 ve A549 hücreleri üzerindeki koloni oluşumunu inhibe edici etkisi. (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.0001; tedavi edilmeyen hücrelerle karşılaştırıldığında. #P<0.05; irinotekan ile tedavi edilen hücrelerle karşılaştırıldığında).

The avoiding apoptosis is a characteristic feature of cancer cells. Therefore, detection of apoptosis and

targeting genes in apoptotic signal transduction pathways is an experimental tool not only in drug discovery but also in clinical trials to confirm drug activity in the development of new anti-cancer treatment approaches (Carneiro and El-Deiry, 2020). The rapamycin mammalian target (mTOR) / AKT pathway is known to be associated with many neoplastic diseases. The activation of this pathway may be the result of mutations in the AKT genes, also known as protein kinase B, or the loss of the phosphatase and tensin homolog (PTEN). Considering the pioneering role of mTOR, Akt and PTEN in the tumorigenesis of cells, it highlights the targeting of these genes in the development of new therapeutic

approaches (Ocana et al., 2014). Rahimi et al. (2019) reported that *P. oleracea* hydro-ethanolic extract inhibited viability in U-87 human glioblastoma cancer cells in a time and dose dependent manner and caused inhibition of NF- κ B, an important regulator of apoptosis and survival. It has been reported that Portulacacerebroside A, isolated from the aerial parts of *P. oleracea*, regulates the mitochondrial death pathway in human liver cancer HCCLM3 cells by affecting the activation of p38MAPK and JNK proteins, which have important roles in the regulation of apoptosis (Zheng et al., 2014). The results of present study indicated that POM suppresses proliferation

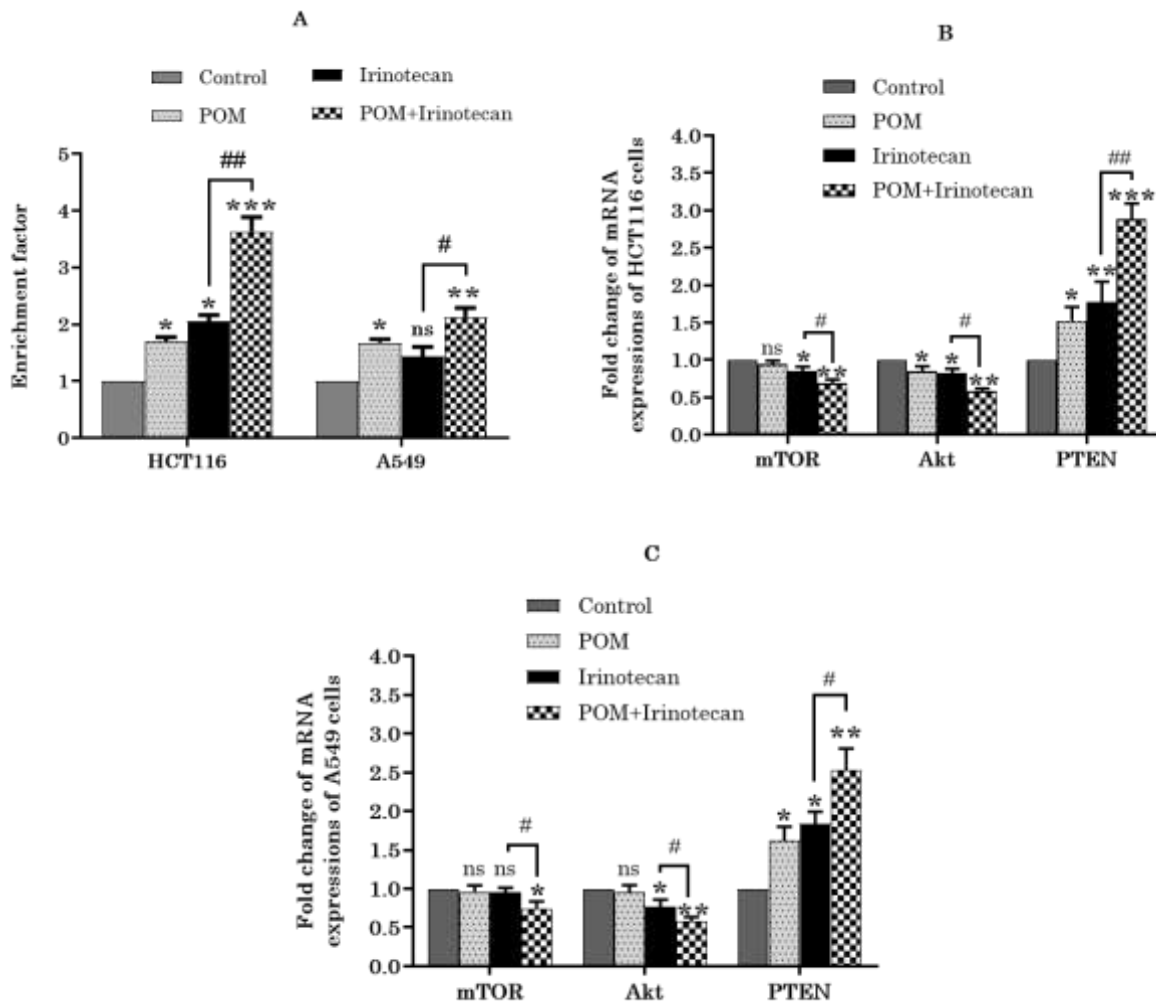


Figure 3. (A) Apoptotic effect of *P. oleracea* methanol extract and / or irinotecan treatments on HCT116 and A549 cells. (B-C) Changes in mTOR, Akt and PTEN mRNA expression levels in HCT116 (B) and A549 (C) cells treated with POM and / or irinotecan. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$; compared with the untreated cells. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; compared with the irinotecan treated cells. ns=not significant).

Şekil 3. (A) *P. oleracea* metanol ekstraktı ve / veya irinotekan tedavilerinin HCT116 ve A549 hücreleri üzerindeki apoptotik etkisi. (B-C) POM ve / veya irinotekan ile tedavi edilen HCT116 (B) ve A549 (C) hücrelerinde mTOR, Akt ve PTEN mRNA ekspresyon seviyelerindeki değişiklikler. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.0001$; tedavi edilmeyen hücrelerle karşılaştırıldığında. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; irinotekan ile tedavi edilen hücrelerle karşılaştırıldığında. ns=farklılık anlamlı değil).

in a dose-dependent manner on different cancer cell lines, HCT116 and A549, and enhances the regulatory

effect of irinotecan on mTOR, Akt and PTEN genes in important apoptotic and survival pathways, in

accordance with these studies. Figure 3A shows the effect of POM and/or irinotecan treatments on apoptosis, while Figure 3B and 3C shows the change in mTOR, Akt and PTEN gene levels, which have important functions in apoptosis and survival pathways.

These findings suggest that the antiproliferative, anti-colony forming and apoptotic effect of POM, particularly its combination with irinotecan, on colorectal and lung cancer cell lines is due to its ability to modulate the mTOR, Akt and PTEN pathway genes.

CONCLUSION

In conclusion, the combined treatment of methanolic extract of *P. oleracea* and irinotecan has a synergistic effect compared to their single use in inhibiting proliferation of HCT116 colorectal cancer and A549 lung cancer cells, inducing apoptosis by modifying the expression of the mTOR, Akt and PTEN. Therefore, the combination of *P. oleracea* and irinotecan has the potential to be a good approach in inducing cell death in colorectal and lung carcinogenesis. Advanced molecular mechanistic studies on *P. oleracea* may pave the way for new therapeutic combination therapies to be used in colon and lung cancer treatment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author would like to thank Mr. Yakup Yapar from Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Bingöl University for his kindly efforts in the identification of the plant samples and in the creation of herbarium records.

Contribution Rate Declaration Summary

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

Conflicts of Interest Statement

The authors declare that no conflict of interests.

REFERENCES

- Afolayan FI, Sulaiman KA, Okunade WT 2020. Ethnobotanical survey of plants used in cancer therapy in Iwo and Ibadan, South-Western of Nigeria. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 8(5): 346-367.
- Aizpurua- Olaizola O, Ormazabal M, Vallejo A, Olivares M, Navarro P, Etxebarria N, Usobiaga A 2015. Optimization of supercritical fluid consecutive extractions of fatty acids and polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. *Journal of Food Science* 80(1): 101-107.
- Al-Sheddi ES, Farshori NN, Al-Oqail MM, Musarrat J, Al-Khedhairy AA, Siddiqui MA 2015. *Portulaca oleracea* seed oil exerts cytotoxic effects on human liver cancer (HepG2) and human lung cancer (A-549) cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 16(8): 3383-3387.
- Borah P, Banik BK 2020. Medicinal plants and their compounds with anticancer properties. In *Green Approaches in Medicinal Chemistry for Sustainable Drug Design* 759-776.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 68(6): 394-424.
- Carneiro BA, El-Deiry WS 2020. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 17(7): 395-417.
- Chou TC, Talalay P 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Advances in Enzyme Regulation* 22: 27-55.
- El-burai H, Alzaharna M, Isleem R, El-Hindi M, Sharif F 2020. Anticancer activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and Oats (*Avena sativa* L.) Extracts, and their antitumor enhancement of 5-Fluorouracil on Colon Cancer Caco-2 Cell Line. *International Journal of Herbal Medicine* 8(3): 138-146.
- Erdogan MK, Agca CA, Askin H 2020b. *Achillea biebersteinii* extracts suppress angiogenesis and enhance sensitivity to 5-fluorouracil of human colon cancer cells via the PTEN/AKT/mTOR pathway in vitro. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 10(11): 505-515.
- Erdogan MK, Agca CA, Askin H 2019. Enhanced antiproliferative and apoptotic effects of 5-fluorouracil by combined with *Pistacia eurycarpa* Extracts on human colorectal cancer cells. *Biological Diversity and Conservation* 12(1): 27-38.
- Erdogan MK, Gecibesler İH, Behcet L 2020a. Chemical constituents, antioxidant, antiproliferative and apoptotic effects of a new endemic Boraginaceae species: *Paracaryum bingolienum*. *Results in Chemistry* 2: 100032.
- Ferreira CG, Epping M, Kruyt FA, Giaccone G 2002. Apoptosis: target of cancer therapy. *Clinical Cancer Research* 8(7): 2024-2034.
- Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, Van Bree C 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols* 1(5): 2315-2319.
- Gecibesler İH, Erdogan M 2019. A new nutraceutical resource from a rare native plant growing in Turkey and for its spectro-chemical and biological insights: Endemic *Diplotaenia bingolensis* (Apiaceae). *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 223: 117358.
- Huang H, Wang X, Zhang X, Zhang G, Jinbo M, Wang H, Jiang W 2020. Ganciclovir reduces irinotecan-induced intestinal toxicity by inhibiting NLRP3 activation. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 85(1): 195-204.

- Jayathilake AG, Kadife E, Luwor RB, Nurgali K, Su XQ 2019. Krill oil extract suppresses the proliferation of colorectal cancer cells through activation of caspase 3/9. *Nutrition & Metabolism* 16(1): 1-15.
- Li J, Wang R, Kong Y, Broman MM, Carlock C, Chen L, Liu X 2017. Targeting Plk1 to Enhance Efficacy of Olaparib in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 16(3): 469-479.
- Lim YY, Quah EP 2007. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food chemistry* 103(3): 734-740.
- Livak KJ, Schmittgen TD 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25(4): 402-408.
- Luzhetskyy A, Pelzer S, Bechthold A 2007. The future of natural products as a source of new antibiotics. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)* 8(8): 608-613.
- Majolo F, Delwing LKDOB, Marmitt DJ, Bustamante-Filho IC, Goettert MI 2019. Medicinal plants and bioactive natural compounds for cancer treatment: Important advances for drug discovery. *Phytochemistry Letters* 31: 196-207.
- Mali PY 2015. Assessment of cytotoxicity of *Portulaca oleracea* Linn. against human colon adenocarcinoma and vero cell line. *Ayu* 36(4): 432-436.
- Nemzer B, Al-Taher F, Abshiru N 2020. Phytochemical composition and nutritional value of different plant parts in two cultivated and wild purslane (*Portulaca oleracea* L.) genotypes. *Food Chemistry* 126(621): 1-9.
- Newman DJ, Cragg GM 2016. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of natural products* 79(3): 629-661.
- Ocana A, Vera-Badillo F, Al-Mubarak M, Templeton AJ, Corrales-Sanchez V, Diez-Gonzalez L, Amir E 2014. Activation of the PI3K/mTOR/AKT pathway and survival in solid tumors: systematic review and meta-analysis. *PloS One* 9(4): 195-219.
- Ojima I 2008. Modern natural products chemistry and drug discovery. *Journal of medicinal chemistry* 51(9): 2587-2588.
- Payudara S, Dan Nasofarinks K, Tan G, Wong K, Pearle-Wong GQ, Yeo S, Hueh ZAN 2013. In vitro Cytotoxic and antiproliferative effects of *Portulaca oleracea* methanol extract on breast, cervical, colon and nasopharyngeal cancerous cell lines. *Sains Malays* 42: 927-35.
- Rahimi VB, Mousavi SH, Haghghi S, Soheili-Far S, Askari VR 2019. Cytotoxicity and apoptogenic properties of the standardized extract of *Portulaca oleracea* on glioblastoma multiforme cancer cell line (U-87): a mechanistic study. *EXCLI Journal* 18: 165-172.
- Rajesh E, Sankari LS, Malathi L, Krupaa JR 2015. Naturally occurring products in cancer therapy. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences* 7(Suppl 1): 181-183.
- Xiang L, Xing D, Wang W, Wang R, Ding Y, Du L 2005. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. *Phytochemistry* 66(21): 2595-2601.
- Younes M, Ammoury C, Haykal T, Nasr L, Sarkis R, Rizk S 2020. The selective anti-proliferative and pro-apoptotic effect of *A. cherimola* on MDA-MB-231 breast cancer cell line. *BMC Complementary Medicine and Therapies* 20(1): 1-10.
- Zheng GY, Qu LP, Yue XQ, Gu W, Zhang H, Xin HL 2014. Portulacerebroside A induces apoptosis via activation of the mitochondrial death pathway in human liver cancer HCCLM3 cells. *Phytochemistry Letters* 7: 77-84.
- Zhou YX, Xin HL, Rahman K, Wang SJ, Peng C, Zhang H 2015. *Portulaca oleracea* L.: a review of phytochemistry and pharmacological effects. *BioMed Research International* 925631: 1-11.

Comparative Analyses of Antioxidant, Cytotoxic, and Anti-inflammatory Activities of Different *Cladonia* Species and Determination of Fumarprotocetraric Acid Amounts

Zekiye KOCAKAYA¹, Mustafa KOCAKAYA², Gökçe ŞEKER KARATOPRAK³

^{1,2}Yozgat Bozok University Boğazlıyan Vocational School, Department of Organic Agriculture, Yozgat, Turkey, ³Erciyes University Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Kayseri, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0001-5248-0462>, ²<https://orcid.org/0000-0003-2306-8094>, ³<https://orcid.org/0000-0001-5829-6914>

✉: gskaratoprak@gmail.com

ABSTRACT

The study aimed to determine the biological activities of 70% methanol extracts of nine *Cladonia* species from Turkey. The chemical composition was analyzed via spectrophotometric and chromatographic (HPLC) techniques. DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS•+ (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) radical scavenging activities, inhibition of β -carotene/linoleic acid co-oxidation, and cytotoxicity on A549 and COLO205 cell lines were studied. Anti-inflammatory activity was assessed on the Raw 264.7 mouse macrophage cell line by determining nitric oxide (NO) levels. Among the studied *Cladonia* species *Cladonia firma* was found the most active extract in ABTS•+ test system (2.58±0.04 mmol/L/Trolox) and also in the cytotoxicity and anti-inflammatory experiments. *Cladonia pocillum*, *Cladonia rangiformis*, and *Cladonia foliacea* were also found to be active. Fumarprotocetraric acid amounts are between 1.89-23.82 mg gextract⁻¹ and fumarprotocetraric acid content did not show linearity with biological activities. It has been proved with this study that lichens traditionally used in treatment have as much biological activity as plants and can be evaluated in pharmaceuticals and cosmetics.

Research Article

Article History

Received : 26.01.2021

Accepted : 03.03.2021

Keywords

Antioxidant

Anti-inflammatory

Cladonia

Cytotoxicity

Fumarprotocetraric acid

Farklı *Cladonia* Türlerinin Antioksidan, Sitotoksik ve Antiinflamatuvar Aktivitelerinin Karşılaştırmalı Analizleri ve Fumarprotocetraric Asit Miktarlarının Belirlenmesi

ÖZET

Çalışmada, Türkiye'den 9 *Cladonia* türünün % 70 metanol ekstratlarının biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı. Kimyasal bileşimi, spektrofotometrik ve kromatografik (HPLC) tekniklerle analiz edildi. Ekstrelerin DPPH• (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) ve ABTS•+ (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal süpürücü aktiviteleri, β -karoten/linoleik asit birlikte oksidasyonunun inhibisyonu ve A549 ve COLO205 hücre hatlarında sitotoksitesiteleri çalışıldı. Antiinflamatuvar aktivite, Raw 264.7 fare makrofaj hücre hattında nitrik oksit (NO) seviyelerinin belirlenmesiyle değerlendirildi. Çalışılan *Cladonia* türleri arasında *Cladonia firma*, ABTS•+ test sisteminde (2.58 ± 0.04 mmol/L/Troloks) ve ayrıca sitotoksitesite ve antiinflamatuvar deneylerinde en aktif ekstre olarak belirlendi. *Cladonia pocillum*, *Cladonia rangiformis* ve *Cladonia foliacea*'nin de aktif olduğu bulundu. Fumarprotocetraric asit miktarları 1.89-23.82 mg gekstre⁻¹ arasında olup fumarprotocetraric asit içeriği biyolojik aktivitelerle doğrusallık göstermedi. Geleneksel olarak tedavide kullanılan likenlerin bitkiler kadar biyolojik aktiviteye sahip olduğu ve ilaç ve kozmetikte değerlendirilebileceği bu çalışma ile kanıtlanmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 26.01.2021

Kabul Tarihi : 03.03.2021

Anahtar Kelimeler

Antioksidan

Antiinflamatuvar

Cladonia

Sitotoksitesite

Fumarprotocetraric asit

INTRODUCTION

Lichens are declared as composite organisms, consist of the symbiotic relationship between the fungus and a green alga (and/or cyanobacteria) as a photosynthetic partner (Hodkinson and Lutzoni, 2009; Selbmann et al., 2010). Lichens have been used as additives to folk medicines for many years, as well as in food, spices, and cosmetics in countries such as Afghanistan, China, India, Ireland, Spain and New Zealand (Dayan and Romagni, 2001; Huneck, 1999; Malhotra et al., 2007; Shukla et al., 2014). Lichens have antibacterial, antiproliferative, antioxidant, anti-HIV, anti-cancer, immune regulation, and anti-protozoan effects (Caviglia et al., 2001; Behera et al., 2005; Bhattacharyya et al., 2016). A large number of secondary metabolites, including depsides, depsidones, dibenzofurans, xanthenes and terpene derivatives are produced by lichens (Molnár and Farkas, 2010). The *Cladonia* genus is classified within the Cladoniaceae family (Lecanorales order and Ascomycota division) and the genus contains a large number of secondary metabolites including lichenic acids, phenolic compounds consisting mainly of depsides and depsidones (Huovinen and Ahti, 1982; Miadlikowska et al., 2006; Lumbsch and Huhndorf, 2010). *C. rangiferina*, known as reindeer lichens, is used as a medicinal tea for internal chest pains (Smith, 1973) as a medicine for diarrhea (Kari, 1987). Extracts of *Cladonia* species are used in folk medicine, therefore they have been evaluated in many studies for their biological activities (Koparal et al., 2006; Silva et al., 2010; Kosani et al., 2014; Coskun et al., 2015). Fumarprotocetraric acid, one of the depsidones of *Cladonia* species, has antioxidant, antitumor, antimicrobial, and also different biological activities (Ramos et al., 2014).

A common feature of the pathogenesis of most chronic diseases is the oxidative stress associated with the production of reactive oxygen species (ROS) (Antal, 2004). Due to its high reactivity and low stability, ROS enters lipids, proteins, and deoxyribonucleic acid (DNA) reactions. Oxidative damage caused by free radicals can initiate and promote the progression of certain chronic diseases, such as cancer, cardiovascular diseases, atherosclerosis, cataracts, and inflammation, in addition to neurodegenerative diseases (Parejo et al., 2002). The antioxidant mechanisms of phenolics include the removal of free radicals to terminate the radical chain reaction, the absorption of oxygen radicals (ROS), the chelation of the transition metals, the intervention of enzymes, the production and stimulation of ROS antioxidant enzyme activities. These activities of phenolics have been reported in many literatures to reduce the incidence of cancer. Phenolic antiproliferative agents have been involved in cell cycle arrest, induction of apoptosis, destruction of mitotic spindle formation, and

inhibition of angiogenesis (Syiem et al., 2009; Hoshayar et al., 2015). Phenolics are also essential compounds among phytochemicals to suppress inflammation, and their anti-inflammatory capacity has also been demonstrated in studies (Shahidi and Yeo, 2018). A wide variety of chronic inflammatory conditions has been shown in many kinds of research that it predisposes sensitive cells to neoplastic transformation and that chronic inflammation is associated with cancer (Khansari et al., 2019).

Despite the traditional usage of lichens, there is a lack of information about their biological properties. Therefore, this study aims to evaluate the relationship between the *in vitro* antioxidant, cytotoxic and anti-inflammatory activities, and phenolic compound fumarprotocetraric acid amounts of nine traditionally used *Cladonia* species: *Cladonia coniocraea* (Flörke) Spreng., *Cladonia fimbriata* (L.) Fr., *Cladonia firma* (Nyl.) Nyl., *Cladonia foliacea* (Huds.) Willd., *Cladonia furcata* (Huds.) Schrad., *Cladonia pocillum* (Ach.) O.J. Rich., *Cladonia pyxidata* (L.) Hoffm., *Cladonia rangiformis* Hoffm., and *Cladonia subulata* (L.) Weber ex F.H. Wigg.

Herein, the radical scavenging activities of DPPH• and ABTS•• and the inhibition of β -carotene/linoleic acid co-oxidation were investigated. Besides, cytotoxic activities on the A549 (Human non-small adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells) and COLO 205 (Human colon adenocarcinoma cell line) cell lines and anti-inflammatory activities in the Raw 264.7 (Mouse macrophage cell line) cell line were examined.

METHODS

Lichen Material and Reagents

The lichen samples were collected during 2013-2014 field studies. The collected specimens were diagnosed by using keys according to morphological and anatomical characteristics (Ahti and Hammer, 2002; Ahti et al., 2013). The samples were preserved in Bozok University, Bogazliyan Vocational School, Organic Agriculture Department. All chemical substances used in the experiments were of analytical quality and obtained from the Sigma Chemical Company (St. Louis, MO).

The locality information and herbarium numbers of *Cladonia* species

C. coniocraea: Turkey, Istanbul, Kemerburgaz on the way, Belgrad forests, *Pinus brutia* forests, 41°08'857"N, 28°55'683"E, alt. 20 m, 13/09/2013 (CLAD 77, 109); ***C. fimbriata***: Turkey, Çankırı, Ilgaz, East of Kastamonu-Ilgaz road, Başaraz village road, *Pinus nigra* and *Quercus* communities, 41°00'848"N, 33°42'495"E, alt. 1200 m, 07/07/2014 (CLAD 712, 713); ***C. firma***: Turkey, Çanakkale, Bayramiç, Northwest of

Hacıbekirler village, *Pinus brutia*, *Quercus* communities, siliceous rocks, 39°55'320"N, 26°45'634"E, alt. 220 m, 16/09/2013 (CLAD 52); *C. foliacea*: Turkey, Ankara, Güdül, Between Güdül and Beypazarı, serpentine rocks, 40°12'55"N, 32°09'54"E, alt. 750 m, 21/07/2014 (CLAD 640); *C. furcata*: Turkey, Rize, Çamlıhemşin, Kackar Mountains National Park, North of Ayder, Kavrun plateau road, *Picea* and *Fagus* mixed forest, 40°55'592"N, 41°08'801"E, alt. 1750 m, 16/08/2014 (CLAD 488); *C. pocillum*: Turkey, Mersin, Anamur, Antalya-Mersin road, Northwest of the Bozyazı Peninsula, Puren neighborhood, *Pinus brutia* forest, maquis vegetation, serpentine, 36°05'592"N, 33°04'345"E, alt. 31 m, 19/05/2013 and Mersin, Çamlıyayla, the northern part of the cattle plateau, limestone bedrock *Juniperus* sp. communities, 37°11'185"N, 34°37'579"E, alt. 1350 m, 20/05/2013 (CLAD 1, 55); *C. pxyidata*: Turkey, Çorum, North of Çatak Village, *Pinus nigra-Quercus* forest, serpentine bedrock, 40°41'486"N, 34°49'277"E, alt. 1325 m, 25/05/2013 (CLAD 135, 137); *C. rangiformis*: Turkey, Çorum, Located east of Belen, step vegetation, *Rosa canina*, limestone bedrock, 40°31'855"N, 35°04'103"E, alt. 1186 m, 24/05/2013 (CLAD 53); *C. subulata*: Turkey, Ordu, Çambaşı, Çambaşı Plateau, *Picea orientalis* and *Pinus nigra* forest, 40°44'06"N, 37°56'9"E, alt. 1560 m, 24/09/2014 (CLAD 998).

Preparation of the extracts

Air-dried *C. pocillum* (4.9 g), *C. coniocraea* (3.9 g), *C. pxyidata* (3.3 g), *C. rangiformis* (31g), *C. foliacea* (12 g), *C. firma* (6 g), *C. furcata* (10 g), *C. subulata* (15.8 g), *C. fimbriata* (8 g) thalli materials were powdered with grinder (IKA MF10.1, China) and extracted 3 times for 24 h using 70 % methanol (MeOH) in a shaking water bath at room temperature. After the extracts were filtered, they were removed from their solvent under vacuum (37 °C). Following this procedure, the extracts were lyophilized and stored at -18 °C before analysis.

Total phenolic and flavonoid content

The total phenolic content of *Cladonia* extracts was measured by using the Folin-Ciocalteu assay and estimated as gallic acid equivalents (GAE). The total flavonoid content was determined by using the aluminum chloride assay and estimated as catechin (CA) equivalents (Zhishen et al., 1999). Extracts were prepared at a concentration of 2 mg mL⁻¹ and dissolved in 70 % MeOH.

Determination of fumarprotocetraric acid amount with High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

Dry *Cladonia* extracts were dissolved in 70 % MeOH and analyzed with HPLC (Shimadzu LC-20AT) instrument with a C18 column (Mediterranean-C18, 5µm; 4.6x250 mm) using PDA spectrophotometric detector between the wavelengths of 200 and 550 nm.

Analysis time set to 20 minutes. Methanol-water-phosphoric acid (75:25:0.9, v/v/v) was used as a mobile solvent and the flow rate was set to 1 mL min⁻¹. The injection volume of the samples was applied as 10 µL. Fumarprotocetraric acid standard was dissolved in 70 % MeOH and diluted to five different concentrations to obtain calibration curve (Kosanic et al., 2018).

DPPH• radical scavenging activity

The method of Gyamfi et al. (1999) was used to evaluate the DPPH• radical removal effects of the extracts. Extracts were prepared at 10 different concentrations between 0.025-4 mg mL⁻¹ concentrations ranges. Butylated Hydroxytoluene (BHT) was used as a standard and prepared at 10 different concentrations between 0.001-1 mg mL⁻¹. 50 µL sample, 450 µL Tris-HCl buffer (pH 7.4 50 mM), 1 mL DPPH• radical (0.1 mM in MeOH) were put into the test tubes, respectively. After incubating in darkness at room temperature for 30 min, their absorbance at 517 nm against the blind, which is composed of MeOH, was recorded. EC₅₀ values of the extracts presented as the mean value of the triple analysis and the % inhibition calculated using Eq 1.

$$\% \text{ inhibition} = [(Abscontrol - Abssample) / Abscontrol] \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

ABTS• radical scavenging activity

The method of Re et al. (1999) was used to evaluate ABTS• scavenging effects of the extracts. 2.45 mM K₂S₂O₈ and 7 mM ABTS• solutions were mixed in a ratio of 1:1 and incubated for 16 hours in the dark at room temperature. This prepared ABTS• radical solution was measured at 734 nm and diluted with ethyl alcohol until an absorbance of 0.700 (± 0.030) was reached. The reaction kinetics of the 990 µL radical solution, which was mixed with 10 µL sample solution for 30 minutes at 1-minute intervals, was measured at 734 nm. Extracts were studied at 1-4 mg mL⁻¹ and standard BHT studied at 0.5-1 mg mL⁻¹ concentrations. Percent inhibition of all samples was calculated as equivalent to Trolox (TEAC) and the mean value of the triple analysis was used.

Inhibition of β-carotene bleaching

In this assay, the antioxidant activity of lichen extracts was evaluated using the method of Velioglu et al. (1998). After mixing, 1.2 mL of β-carotene solution (1 mg mL⁻¹ in chloroform), Tween 20, and linoleic acid, chloroform removed from media via rotary evaporator. The emulsion was prepared by adding distilled water to this mixture and mixing gently. For the blanks of the control and samples, the same procedure was performed without using β-carotene. BHT was used as a standard in the test system. After the extracts, standards, and controls were put into tubes together with the emulsion, these samples were kept in a water bath for 2 hours at 50 °C for autoxidation and the

fading level was measured at 470 nm every 15 minutes. Inhibition of β -carotene bleaching was calculated using Eq. 2.

$$AA\% = [1 - (Abs0\ sample - Abs120\ sample) / (Abs0\ control - Abs120\ control)] \times 100 \text{ (Eq. 2)}$$

Cell culture

Mouse macrophage cell line (Raw 264.7), Human non-small adenocarcinoma alveolar basal epithelial cells (A549), and Human colon adenocarcinoma cell line (COLO 205) that we used in our experimental studies were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC TIB-71, ATCC CCL-185, CCL-222, Manassas, VA, USA). The growing medium of cultures; DMEM, and RPMI (Invitrogen, Carlsbad, CA) with 1 % penicillin, streptomycin mixture solution (Invitrogen,) and 10 % FBS. The cultures were kept at 37 °C in 5 % CO₂ and 95 % air (Gaidhani et al., 2013).

Cytotoxicity on A549 and COLO 205 cells

Cell viability on A549 and COLO 205 cells, was assayed using a 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) test. Cultured cells were seeded (1×10^4 cell/well) in a 96-well microplate. Extracts prepared in the concentration range of 15.6-2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were then added to the plates kept at 37 °C for 24 hours for cell adhesion. After incubation 24 hours, the fluids in the wells were discharged and MTT solution in the fresh medium was added. Following 2 hours of incubation, dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well to dissolve the purple MTT formazan crystals after removing the medium containing the MTT solution. In three repeated experiments, the absorbance of plates was read using Elisa (Biotek Synergy HT) at a wavelength of 570 nm and the results were given as mean \pm SD.

Determination of NO in the Raw 264.7 cell line

The toxicity of the extracts in the Raw 264.7 cell line in the concentration range of 5-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was determined by the MTT method as mentioned above. After the non-toxic doses were determined, the cells were seeded at a number of 5×10^5 to 6 well plates and incubated for 24 hours. After incubation, lipopolysaccharide (LPS) was added to other wells, except for the control well, at a concentration of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The extracts were added to wells at a concentration of 20 and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and indomethacin at a concentration of 25 μM after 3 hours. At the end of 24 hours, supernatants were collected, and centrifuged (10 min., 700 x g). Each 100 μL of culture supernatant was mixed with the same volume of Griess Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). After incubating 10 min. at room temperature absorbance was read at 540 nm using Elisa. Sodium nitrite was used as a standard to prepare the calibration curve.

Statistical analysis

Levene test was performed for variance homogeneity. One-way analysis of variance was used among multiple groups. Dunnett test and Tukey test were applied for multiple comparison test at $P < 0.05$ level. EC 50 values were calculated using nonlinear regression curves (Sigma Plot 2001 version 7.0, SPSS Inc., Chicago IL).

RESULTS

Total phenolics and flavonoids

Total phenol and flavonoid amounts of the extracts were calculated using the spectrophotometric method and found that the *C. pocillum* and *C. coniocraea* contained a high amount of phenolic material (124.04 ± 2.73 ; 103.53 ± 1.59 $\text{mg}_{\text{GAE}} \text{g}_{\text{extract}}^{-1}$, respectively) (Table 1). The extract with the highest total flavonoid content was the *C. foliaceae* extract (22.46 ± 1.19 $\text{mg}_{\text{CAE}} \text{g}_{\text{extract}}^{-1}$).

Determination of fumarprotocetraric acid amount with HPLC

The chromatogram of *C. pocillum* extract and fumarprotocetraric acid amounts of the lichen extracts represented in Figure 1 and Table 1. The lowest fumarprotocetraric acid amount was identified in the *C. rangiformis* (18.89 $\text{mg}_{\text{extract}}^{-1}$) and the highest amount was identified in *C. fimbriata* (232.82 $\text{mg}_{\text{extract}}^{-1}$).

DPPH• radical scavenging

The capacity of extracts in physiological pH to remove the DPPH• radical, a stable and nitrogen-centered radical, has been investigated. Extracts were studied at 1, 2 and 4 mg mL^{-1} concentration. *C. pocillum* extract was found the most active extract in scavenging the DPPH• radical. *C. pocillum* extract showed higher inhibition and its EC₅₀ value was found 0.24 ± 0.05 mg mL^{-1} . The second-active ones were evaluated as *C. foliaceae* and *C. firma* showing similar inhibition percentages. EC₅₀ value of the BHT was found to be 0.14 ± 0.005 mg mL^{-1} (Table 2).

ABTS• radical scavenging

ABTS + • radical scavenging capacity of extracts and BHT at concentrations of 0.50-4 mg mL^{-1} were evaluated in this experiment. All extracts exhibited the highest activity at 4 mg mL^{-1} , while none exceeded the activity of BHT used as a positive control at a concentration of 1 mg mL^{-1} . Surprisingly *C. foliaceae* and *C. firma* showed more potent activity than *C. pocillum* in this test system (Table 2). ABTS + • radical removal capacity at 4 mg mL^{-1} is evaluated and the ranking is as follows: *C. firma* > *C. foliaceae* > *C. fimbriata* > *C. rangiformis* > *C. coniocraea* > *C. pocillum* > *C. furcata* > *C. pxyidata* ~ *C. subulata*.

Table 1. Total phenol, flavonoid and fumarprotocetraric acid amount of *Cladonia* species
Çizelge 1. *Cladonia* türlerinin toplam fenol, flavonoit ve fumarprotosetrarik asit miktarı

Species (Türler)	Total phenols (Toplam fenoller) [mg _{GAE} g _{extract} ⁻¹]	Total flavonoids (Toplam flavonoidler) [mg _{CAE} g _{extract} ⁻¹]	Fumarprotocetraric acid amount (Fumarprotosetrarik asit miktarı) (mg g _{extract} ⁻¹)
<i>C. pocillum</i>	124.04±2.73	20.57±0.79	13.59±0.68
<i>C. coniocraea</i>	103.53±1.59	19.50±0.52	18.82±1.39
<i>C. pxyidata</i>	80.71±0.67	16.66±0.41	13.94±1.36
<i>C. rangiformis</i>	78.39±0.85	17.18±0.14	1.89 ±0.12
<i>C. foliacea</i>	91.20±2.85	22.46±1.19	18.58 ±0.68
<i>C. firma</i>	72.07±0.00	15.03±0.86	8.47±1.97
<i>C. furcata</i>	59.58±0.70	17.13±2.38	3.48±1.24
<i>C. subulata</i>	80.40±3.00	16.19±0.57	9.19±0.68
<i>C. fimbriata</i>	86.10±2.42	19.58±0.42	23.82±1.98

Data are expressed as mean ± standard error (n=3)



Figure 1. Chromatogram of *C. pocillum* lichen extract at 254 nm
Şekil 1. 254 nm'de *C. pocillum* liken ekstresinin kromatogramı

Table 2. DPPH and ABTS radical scavenging effects of *Cladonia* species
Çizelge 2. *Cladonia* türlerinin DPPH ve ABTS radikal süpürme etkileri

Species (Türler)	DPPH (% Inhibition, EC ₅₀) (% İnhibisyon, EC ₅₀)			EC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	ABTS (mmol/L/Trolox)			
	4 mg mL ⁻¹	2 mg mL ⁻¹	1 mg mL ⁻¹		4 mg mL ⁻¹	2 mg mL ⁻¹	1 mg mL ⁻¹	0.5 mg mL ⁻¹
<i>C. pocillum</i>	89.74±0.12	86.30±0.69	85.17±0.05	0.24±0.05	2.41±0.07	2.01±0.08	1.29±0.05	
<i>C. coniocraea</i>	71.35±1.86	59.13±0.02	52.93±0.35		2.48±0.06	1.89±0.08	1.25±0.07	
<i>C. pxyidata</i>	72.46±0.94	68.32±0.04	57.27±0.07		1.67±0.08	1.30±0.05	1.26±0.05	
<i>C. rangiformis</i>	69.84±0.44	47.24±1.62	35.39±0.67		2.50±0.04	2.11±0.01	1.30±0.15	
<i>C. foliacea</i>	74.75±1.91	73.62±0.16	61.78±0.18		2.57±0.03	2.12±0.20	1.41±0.09	
<i>C. firma</i>	74.81±2.66	68.77±1.08	60.32±1.18		2.58±0.04	1.59±0.11	1.18±0.07	
<i>C. furcata</i>	56.62±0.15	32.91±2.42	24.46±0.81		2.34±0.10	1.88±0.15	1.49±0.13	
<i>C. subulata</i>	69.10±0.83	23.08±4.27	15.76±2.09		1.67±0.08	1.14±0.08	0.68±0.06	
<i>C. fimbriata</i>	73.97±0.83	52.82±0.55	38.73±0.43		2.52±0.05	1.94±0.11	1.23±0.03	
BHT				0.14±0.005			2.51±0.02	1.17±0.03

Data are expressed as mean ± standard error (n=3)

Inhibition of β-carotene bleaching

The oxidation inhibitory effect of the extracts was evaluated and the time-dependent change inhibition percentages were given in Figure 2. According to Figure 2, all extracts appear to inhibit oxidation but show less activity than positive control BHT. It was found that all extracts showed higher inhibition in the first 30 minutes, and at the end of 90 minutes, lipid peroxidation inhibitory effects decreased, while *C. rangiformis* was more active than other extracts.

Cytotoxicity on A549 and COLO 205 cells

The results obtained by the MTT cell viability method for the A549 cell line are given in Table 3. The results were given as percentage (%) and cell control group viability was accepted as 100 % and other groups were calculated. Significance of Levene statistics to test homogeneity of variance was found ($P<0.05$). Dunnet T3 test was applied to groups in which the assumption of normality was not provided for the variable. All the extracts at 15.6 µg mL⁻¹ concentration were not found

statistically different ($P>0.05$) from the control group. At 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration *C. pocillum*, *C. coniocraea*, *C. rangiformis*, *C. foliacea*, *C. firma*, *C. subulata* and *C. fimbriata* were found statistically

different from the control group ($P<0.001$). *C. firma* extract was statistically more significant when inhibition values were examined in all concentrations.

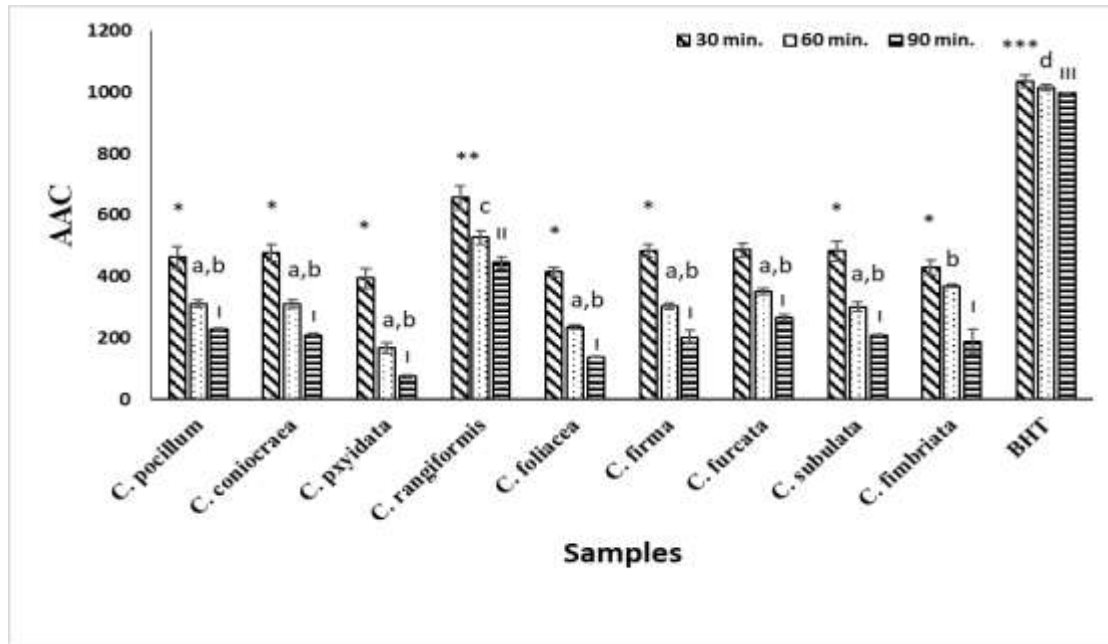


Figure 2. The effect of the *Cladonia* extracts and positive control on β -carotene/linoleic acid co-oxidation. Bars with the same symbol, lower case letter and number (*,***), (a–d), (1–5) are not significantly ($P>0.05$) different ($n=3$)

Şekil 2. *Cladonia* ekstrelerinin ve pozitif kontrolün β -karotene/linoleik asit birlikte oksidasyonu üzerine etkileri. Aynı sembol, küçük harf ve sayıya (*, ***), (a – d), (1-5) sahip değerler istatistiksel olarak farklıdır ($P>0.05$)

The results obtained by the MTT cell viability method for COLO 205 cell line are given in Table 3. The results were given as percentage (%) and cell control group viability was accepted as 100 % and other groups were calculated. Significance of Levene statistics to test homogeneity of variance was found ($P<0.05$). Dunnett T3 test was applied to groups in which the assumption of normality was not provided for the variable. Among the all studied extracts only *C. foliacea* and *C. firma* were found statistically different from the control group ($P<0.01$) at 15.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentration. At 1000 and 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentrations all the extracts showed potent inhibitory activity on COLO 205 cell line ($P<0.001$).

Determination of NO in the Raw 264.7 cell line

The results obtained by the MTT cell viability method for the Raw 264.7 cell line are given in Table 4. Considering the results of the MTT test, 20 and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ concentrations with the same significance compared to the control group were selected. When the control group and the LPS group were compared, the fact that the LPS group was significantly higher than the control group ($P<0.001$) showed that inflammation occurred (Table 5). Indomethacin administered at 25 μM doses brought the nitric oxide amount to the same

level as the control group. None of the extracts were found to be statistically significant with indomethacin ($P>0.05$).

DISCUSSION

In this study, chemical composition and *in vitro* antioxidant, cytotoxic and anti-inflammatory effects of nine *Cladonia* species were investigated. The biological activity of most of the species investigated in this study was illuminated for the first time.

The total phenol, and total flavonoid amounts of the extracts which were prepared from the thalli part of lichens, were determined by spectrophotometric methods. Total phenol amounts were found between the range of $72.07\pm 0.005 - 124.04\pm 2.73 \text{ mg}_{\text{GAE}} \text{ g}_{\text{extract}}^{-1}$ and total flavonoid amounts were found between the ranges of $16.19\pm 0.57 - 22.46\pm 1.19 \text{ mg}_{\text{CAE}} \text{ g}_{\text{extract}}^{-1}$ (Table 1). Comparing the herein reported results about the total phenolic and flavonoid contents with Kosanic et al. (2018), our results seem higher than their results. Similar to us they have studied with *C. fimbriata*, *C. furcata*, *C. subulata* and *C. foliacea*. In a different study, the total phenolic amounts of the *C. subulata*, *C. furcata*, and *C. fimbriata* methanolic extracts were .

Table 3. Cytotoxic activity of *Cladonia* species on A549 and COLO 205 lines
 Çizelge 3. *Cladonia* türlerinin A549 ve COLO 205 hatlarında sitotoksik aktivitesi

% Cell Viability (% Hücre Canlılığı)									
Concentrations (Konsantrasyonlar)									
Species (Türler)	Cell Lines	15.6 µg mL ⁻¹	31.25 µg mL ⁻¹	62.5 µg mL ⁻¹	125 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹	500 µg mL ⁻¹	1000 µg mL ⁻¹	2000 µg mL ⁻¹
<i>C. pocillum</i>	A549	75.71±8.16	77.49±4.66	76.54±5.78*	70.52±5.48*	49.90±6.94**	51.23±6.33**	20.68±3.62***	11.50±0.21***
	COLO 205	71.81±6.35	72.47±8.19	62.44±10.26*	35.93±4.84***	29.39±5.09***	13.43±1.38***	5.74±0.12***	5.95±0.39***
<i>C. coniocraea</i>	A549	86.40±3.67	93.17±12.03	89.87±17.60	61.77±4.30**	55.17±4.96**	42.47±2.48**	17.82±2.93***	11.45±0.74***
	COLO 205	76.96±3.76	70.55±10.56	59.84±3.00*	56.50±4.95*	48.02±0.87**	45.65±5.73**	17.94±5.19***	5.80±0.32***
<i>C. pxyidata</i>	A549	88.96±7.30	81.69±7.22	94.61±15.56	70.65±3.74	69.65±9.00*	71.54±3.23	98.03±19.58	86.99±6.51
	COLO 205	84.68±3.70	85.18±2.06	74.61±4.87	65.13±7.91*	60.44±7.85**	57.79±6.18**	45.31±3.75**	27.99±6.23***
<i>C. rangiformis</i>	A549	94.38±14.48	84.20±18.22	67.87±11.35	54.21±9.53**	41.39±8.85**	42.49±5.43**	21.58±2.67***	15.76±0.84***
	COLO 205	71.27±3.35	65.32±4.80*	50.65±2.46**	36.27±2.71***	36.94±2.35***	7.00±0.67***	6.53±0.19***	6.09±1.36***
<i>C. foliacea</i>	A549	76.48±2.70	73.76±6.69	65.00±9.27*	61.97±3.57*	66.73±9.96*	49.13±5.16**	38.50±2.56***	11.07±1.25***
	COLO 205	54.83±1.33*	48.22±3.86**	44.32±4.81***	32.99±4.28***	24.35±2.18***	5.78±0.08***	6.45±0.26***	5.17±0.73***
<i>C. firma</i>	A549	97.30±5.28	65.41±11.53*	59.89±4.51**	57.56±4.40**	45.36±3.75**	42.66±2.65**	48.28±7.46**	40.83±2.62***
	COLO 205	66.69±4.73*	51.67±6.65**	52.54±4.93**	39.28±2.54***	41.56±4.80***	31.18±3.35***	14.39±3.55***	4.52±0.38***
<i>C. furcata</i>	A549	123.45±2.21	100,89±13.18	81.18±8.53	87.62±12.03	71.94±9.24	56.32±12.07*	64.63±7.97*	57.61±10.99*
	COLO 205	99.29±5.37	96.16±5.43	87.86±12.28	73.70±8.06*	59.87±8.49*	49.53±5.47**	5.48±0.43***	5.79±0.49***
<i>C. subulata</i>	A549	100.65±5.55	67.17±6.40*	64.45±4.09*	59.50±1.38*	48.57±4.90**	46.72±1.82**	46.70±1.50**	39.89±1.62***
	COLO 205	74.91±5.41	60.62±4.06**	58.61±3.56**	55.87±5.05**	47.23±2.80***	38.72±4.25***	25.77±5.48***	8.73±1.75***
<i>C. fimbriata</i>	A549	119.58±14.9	115.45±9.48	95.31±11.42	87.22±8.74	78.69±5.44	92.55±3.83	76.59±4.32*	13.81±0.15***
	COLO 205	6	97.57±5.85	102.67±7.69	82.18±5.79	84.62±13.98	34.36±5.87***	6.56±0.19***	5.25±0.87***

Data are expressed as mean ± standard error (n=3). Significant differences are indicated as * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Table 4. Toxicity of *Cladonia* species on Raw 264.7 cell line

Çizelge 4. *Cladonia* türlerinin Raw 264.7 hücre hattı üzerinde toksisitesi

Species (Türler)	5 µg mL ⁻¹	10 µg mL ⁻¹	20 µg mL ⁻¹	40 µg mL ⁻¹	80 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹
<i>C. pocillum</i>	99.37±1.71	100.23±1.77	98.93±2.00	91.08±1.36	80.31±0.84	56.78±0.42**
<i>C. coniocraea</i>	110.14±1.28	104.63±3.46	101.23±3.28	97.17±2.03	81.44±1.02	59.95±0.33**
<i>C. pxyidata</i>	111.38±9.69	105.41±1.65	107.56±4.94	91.21±1.55	96.38±3.14	62.44±2.61*
<i>C. rangiformis</i>	108.90±3.35	99.96±0.57	95.55±1.39	89.84±0.71	75.79±0.78	59.95±0.57**
<i>C. foliacea</i>	113.04±4.30	101.99±0.74	99.52±1.53	99.91±3.08	73.75±0.62	65.83±0.41*
<i>C. firma</i>	104.76±0.58	103.15±7.78	103.72±2.61	97.48±4.38	79.63±1.02	68.77±0.24*
<i>C. furcata</i>	107.93± 3.95	105.71±6.06	103.48±4.55	96.78±1.33	76.39±2.53	64.85±0.19*
<i>C. subulata</i>	111.02±3.24	103.01±2.61	98.54±3.02	98.03±2.61	78.76±3.73	60.13±0.56**
<i>C. fimbriata</i>	110.23±6.59	109.46±4.31	109.58±4.98	96.72±2.09	73.95±2.96	62.04±0.38*

In cytotoxicity experiment, data are expressed as mean ± standard error (n=3). Significant differences are indicated as * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Table 5. Effect of *Cladonia* species on NO amount

Çizelge 5. *Cladonia* türlerinin NO miktarına olan etkileri

Species (Türler)	Concentration (Konsantrasyon)	NO amount (NO miktarı) (µM)	Concentration (Konsantrasyon)	NO amount (NO miktarı) (µM)
<i>C. pocillum</i>	40 µg mL ⁻¹	43.1±1.56 ^{a,b}	20 µg mL ⁻¹	34.50±0.83 ^{c,d}
<i>C. coniocraea</i>	40 µg mL ⁻¹	69.30±0.72 ^{k,l}	20 µg mL ⁻¹	43.70±0.65 ^{a,b}
<i>C. pxyidata</i>	40 µg mL ⁻¹	59.70±0.69 ^j	20 µg mL ⁻¹	42.36±0.35 ^{a,b}
<i>C. rangiformis</i>	40 µg mL ⁻¹	44.37±0.35 ^b	20 µg mL ⁻¹	36.36±0.35 ^{c,d,e}
<i>C. foliacea</i>	40 µg mL ⁻¹	40.03±0.78 ^{a,e,f}	20 µg mL ⁻¹	30.23±0.70 ¹
<i>C. firma</i>	40 µg mL ⁻¹	40.90±0.83 ^{a,b,f}	20 µg mL ⁻¹	31.00±2.21 ^{c,1}
<i>C. furcata</i>	40 µg mL ⁻¹	66.38±0.35 ^{b,k}	20 µg mL ⁻¹	48.70±0.53 ^g
<i>C. subulata</i>	40 µg mL ⁻¹	38.63±0.25 ^{e,f}	20 µg mL ⁻¹	34.30±1.14 ^{c,d}
<i>C. fimbriata</i>	40 µg mL ⁻¹	41.50±0.76 ^{a,b,f}	Control	8.44±0.18 ^h
Indomethacin	25 µM	8.30±0.35 ^h	LPS	72.37±0.67

In NO amount determination, data are expressed as mean ± standard error (n=3). The same letters (a-l) indicate the similarity between the groups ($P > 0.05$) and the different letters represent the difference between the groups ($P < 0.05$).

found as follows respectively, 0.211 ± 0.012 , 0.494 ± 0.047 and 0.405 ± 0.008 mg mL⁻¹ gallic acid. However, directly comparing this study and our results do not seem appropriate in terms of the units used. The fumarprotocetraric acid amounts of the lichen extracts are between the ranges of 18.89 – 232.82 mg g⁻¹ extract⁻¹. Fumarprotocetraric acid has been found in many *Cladonia* species such as *C. foliacea*, *C. verticillaris*, *C. furcata*, *C. rangiformis*, and *C. rangiferina*. (Laundon 1971; Yilmaz et al. 2004; De Barros et al. 2014; Narendra and Khurana, 2019). According to the Farkas et al. research, the concentration of fumarprotocetraric acid of *C. foliacea* acetone extract varied between 2.26 and 5.81 mg g⁻¹ in winter collected samples. The higher content of *C. foliacea* in our study may be due to the samples obtained from different countries, the time of collection, and extraction method (Farkas et al., 2020).

DPPH• radical scavenging method is a rapid method for evaluating the free radical scavenging effect of extracts. We found that the scavenging effect of *Cladonia* species was not as high as BHT used as a positive control (Table 2). When comparing with the literature we set similar results found by Rankovic et

al. (2011) and Kosanic et al. (2011; 2018). Hawry et al. demonstrated inhibition % of DPPH• radical for *C. subulata*, *C. furcata*, and *C. fimbriata*. According to the results, the highest activity was recorded for *C. fimbriata* as 21.57% inhibition. This result was considered to be lower than the percentage of inhibition at the lowest concentration used in our study. Besides, they found a 10% inhibition effect for *C. firma* extract but our data showed that at 1 mg mL⁻¹ concentration *C. firma* extract scavenged the 60% of radical (Hawrył et al., 2020). In the antioxidant activity of lichens, environmental factors play a crucial role. Environmental factors like air pollution, high light, desiccation, high temperature, and rehydration act on decreasing the antioxidant activity and reducing the synthesis of antioxidant compounds in lichens (Bartak et al., 2004; Weissman et al., 2005, 2006).

ABTS•+ / TEAC method is one of the most preferred antioxidant activity measurement methods. The assay can be applied to both lipophilic and hydrophilic components. Water-soluble acid of Vitamin E also known as Trolox is used as the reference standard (Okan et al., 2013). ABTS•+ radical removal effect of extracts and standards were tested at four different

concentrations of 0.5, 1, 2, and 4 mg mL⁻¹. It has been determined that the scavenging effect of the extracts were not as high as BHT at the same concentration (Table 2). In this test system, *C. firma* and *C. foliacea* were found more active than *C. pocillum* which was active in DPPH• radical scavenging activity. Although ABTS radical scavenging activities of *Cladonia* species were not found in the literature, Paudel et al. reported the IC₅₀ value of the methanol extract of *Cladonia* sp., whose species was not specified, as 51.6 µg mL⁻¹ (Paudel et al., 2012). In a different study IC₅₀ value of the fumarprotocetraric acid for ABTS radical scavenging was 277.8 ± 30.6 µg mL⁻¹ and 417.5 ± 66.8 µg mL⁻¹ for DPPH radical scavenging (Prokop'ev and Filippova, 2019). According to these results, it is understood that the antioxidant activity of fumarprotocetraric acid is not high, and it confirms that our fumarprotocetraric acid content and antioxidant activity are not correlated.

The β-carotene/linoleic acid method, which is one of the most widely used methods for this purpose, is based on the principle that the degradation products resulting from linoleic acid oxidation will turn the color of the β-carotene molecule. Extracts have been observed to inhibit lipid peroxidation due to time, but they were not as active as synthetic antioxidant BHT (Figure 2). There is only one study on the inhibition of β-carotene/linoleic acid oxidation for *Cladonia* species. Aslan et al. (2006) reported that *C. foliacea* did not exhibit notable inhibition of linoleic acid oxidation.

The result of the cytotoxic activity of lichen extracts on the studied cell lines is detailed in Table 3. In A549 cell line *C. firma* extract was statistically more significant when inhibition values were examined in all concentrations. *C. firma* extract was also found to be more active in the ABTS+• test system. However, other extracts except for *C. furcata* and *C. pxyidata* showed stronger inhibition than *C. firma* at a concentration of 2000 µg mL⁻¹. *C. pxyidata* showed no significant difference in all studied concentrations compared to the control group ($P>0.05$).

Against the COLO 205 cell line, all the extracts showed stronger inhibition than the A549 cell line. As in the A549 cell line, in this cell line, *C. firma* extract was significantly different compared to the control in all concentrations. *C. rangiformis* and *C. foliacea* were also found more potent than other extracts. *C. fimbriata* extract in the COLO 205 cell line had a lower inhibition percentage than the other extracts and did not show a statistical significance below 250 µg mL⁻¹ concentration. When the study of Kosanic et al. (2018) with *Cladonia* species is examined, the IC₅₀ value of lichen extracts on the A549 cell line seems to be below from our results. However, they incubated the cells for 72 hours with extracts and used a lower number of cells than we used in our study. In the study of Rankovic et al., evaluating the toxicity of *C. furcata*,

they reported that the IC₅₀ value of *C. furcata* on human colon cancer cell (LS174 cell line) was 40.22 µg mL⁻¹. In a study evaluating the toxic effects of *C. rangiformis* and *C. convoluta* on the MCF7 cell line, *C. rangiformis* was reported to inhibit the proliferation of cells in a dose-dependent manner (Coskun et al., 2015). Different inhibition percentages of the species in toxicity studies result from the differences in cell number, incubation time, and cell lines, and prevent us from making direct comparison with the data of our study. Also, no studies are evaluating the toxicity of most *Cladonia* species we studied in A549 and COLO cell lines.

Nitric oxide is synthesized from L-arginine by a family of enzymes called nitric oxide synthase. The interaction of nitric oxide with the superoxide radical results in a strong cytotoxic oxidant, peroxy nitrite radical (ONOO•). Nitric oxide is produced in high amounts by cytokines and endotoxins in cases of infection and plays a role in killing parasites, but overproduction can cause reperfusion injury (Choudhari et al., 2013). The decrease in NO levels in all groups treated with *Cladonia* extracts except *C. coniocraea* (20 µg mL⁻¹) showed an anti-inflammatory effect. The most active species were found as *C. foliacea*, *C. firma*, and *C. subulata* (Table 4). Although there is no study evaluating the effects of *Cladonia* species on NO in Raw 264.7 cell line, the anti-inflammatory activities of some species have been evaluated by different methods in the literature. The anti-inflammatory activity of *C. clathrata* was studied using the paw edema model induced by 1% carrageenan. It has been reported that *C. clathrata* extract at a dose of 100-400 mg kg⁻¹ reduced paw edema (Silva et al., 2010). In a formaldehyde-induced edema model, *C. rangiformis* exhibited 33.8%, 36.1%, 43.1% inhibition at 50, 100 and 200 mg kg⁻¹ doses (Süleyman et al., 2002).

The results we obtained from our study, confirm the relationship between antioxidant activity and cytotoxic activity. At the same time, *C. firma* and *C. foliacea*, which were active in cytotoxicity experiments, also exhibited anti-inflammatory activity. These results confirm the use of compounds with antioxidant properties in cancer and inflammation. Antioxidant, cytotoxic, and anti-inflammatory activities have not shown linearity with the fumarprotocetraric acid content of extracts. The results suggested us that presence of p-hydroxybenzoic acid derivatives; vanillic and protocatechuic acid derivatives and also dibenzofuran derivative usnic acid in *Cladonia* species can be related to antioxidant, cytotoxic, and anti-inflammatory activities (Zagoskina et al., 2013).

CONCLUSION

Antioxidant, cytotoxic, and anti-inflammatory

activities of 70% methanol extracts of the nine *Cladonia* species have been evaluated in this study. Although this study is superior to other studies conducted with *Cladonia* species in terms of the number of species studied, it also makes a significant contribution to the literature by comparing species activities to each other. The *Cladonia* species which were active in the antioxidant test systems were also showed potent inhibition to the cancer cell lines than the other species, thus proven the correlation between the antioxidant and cytotoxic activity. The amount of fumarprotocetraric acid was not correlated with activity experiments. This study showed that lichens have biological activity and more detailed studies should be done on lichens for biologically active products, pharmaceuticals, or cosmetics.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was financially supported by Yozgat Bozok University project with the project number of 6602b BMYO/17-121.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Ahti T, Hammer S 2002. *Cladonia*. In: Nash III TH, Ryan BD, Gries C, Bungartz F, editor. Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region. Arizona State University.
- Ahti T, Stenroos S, Moberg R 2013. Nordic Lichen Flora Volume 5 Cladoniaceae, Museum of Evolution. Uppsala University.
- Antal DS 2004. Medicinal plants with antioxidant properties from Banat region (Romania): a rich pool for the discovery of multi-target phytochemicals active in free-radical related disorders. *Analele Universitatii din Oradea-Fascicula Biology* 22:14-22.
- Aslan A, Güllüce M, Sökmen M, Adıgüzel A, Şahin F, Özkan H 2006. Antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Cladonia foliacea*, *Dermatocarpon miniatum*, *Evernia divaricata*, *Evernia prunastri*, and *Neofuscella pulla*. *Pharmaceutical Biology* 44:247-252. <https://doi.org/10.1080/13880200600713808>
- Bartak M, Hajek J, Vrablíková H, Dubova J 2004. High-light stress and photoprotection in *Umbilicaria antarctica* monitored by chlorophyll fluorescence imaging and changes in zeaxanthin and glutathione. *Plant Biology* 3:331-341. <https://doi.org/10.1055/s-2004-820877>.
- Behera BC, Verma N, Sonone A, Makhija U 2005. Antioxidant and antibacterial activities of *Usnea ghattensis* in vitro. *Biotechnology Letters* 27:991-995. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-7847-3>
- Bhattacharyya S, Deep PR, Singh S, Nayak B 2016. Lichen secondary metabolites and its biological activity. *American Journal of Pharm-Tech Research* 6:29-44.
- Caviglia AM, Nicora P, Giordani P, Brunialti G, Modenesi P 2001. Oxidative stress and usnic acid content in *Parmelia caperata* and *Parmelia soledians* (lichens). *II Farmaco* 56:379-382. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01090-4](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01090-4)
- Choudhari SK, Chaudhary M, Bagde S, Gadbail AR, Joshi V 2013. Nitric oxide and cancer: a review. *World Journal of Surgical Oncology* 11:1. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>
- Coskun ZM, Ersoz M, Acikgoz B, Karalti I, Cobanoglu G, Sesal C 2015. Anti-proliferative and apoptotic effects of methanolic extracts from different *Cladonia* species on human breast cancer cells. *Folia Biologica (Praha)* 61:97-103.
- Dayan FE, Romagni JG 2001. Lichens as a potential source of pesticides. *Pesticide Outlook* 12:229-232. <https://doi.org/10.1039/b110543b>
- De Barros Alves GM, de Sousa Maia MB, de Souza Franco E, Galvão AM, da Silva TG, Gomes RM, da Silva NH 2014. Expectorant and antioxidant activities of purified fumarprotocetraric acid from *Cladonia verticillaris* lichen in mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 27:139-143. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2013.07.002>
- Farkas E, Biró B, Szabó K, Veres K, Csintalan ZS, Engel R 2020. The amount of lichen secondary metabolites in *Cladonia foliacea* (Cladoniaceae, Lichenised Ascomycota). *Acta Botanica Hungarica* 62:33-48. <https://doi.org/10.1556/034.62.2020.1-2.4>
- Gaidhani SN, Singh A, Kumari S, Lavekar GS, Juvekar, AS, Sen S, Padhi MM 2013. Evaluation of some plant extracts for standardization and anticancer activity. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 12:682-687.
- Gyamfi MA 1999. Yonamine M, Aniya Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana: *Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. *General Pharmacology* 32:661-667. [https://doi.org/10.1016/S0306-3623\(98\)00238-9](https://doi.org/10.1016/S0306-3623(98)00238-9)
- Hawrył A, Hawrył M, Hajnos-Stolarz A, Abramek J, Bogucka-Kocka A, Komsta Ł 2020. HPLC fingerprint analysis with the antioxidant and cytotoxic activities of selected lichens combined with the chemometric calculations. *Molecules* 25, 4301. <https://doi.org/10.3390/molecules25184301>
- Hodkinson B, Lutzoni F 2009. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis* 49:163-180. <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0049-3>

- Hoshyar R, Mostafavinia SE, Zarban A, Hassanpour M, Partovfari M, Taheri A, Pouyan M 2015. Correlation of anticancer effects of 12 Iranian herbs on human breast adenocarcinoma cells with antioxidant properties. *Free Radicals and Antioxidants* 5:65-73. <https://doi.org/10.5530/fra.2015.2.4>
- Huneck S 1999. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften* 86:559-570. <https://doi.org/10.1007/s001140050676>
- Huovinen K, Ahti T 1982. Biosequential patterns for the formation of depsides, depsidones, and dibenzofurans in the genus *Cladonia* (lichen-forming ascomycetes). *Annales Botanici Fennici* 19:225-234. Available at www.jstor.org/stable/23725855
- Kari PR 1991. *Tanaina* plantlore, Dena'ina K'et'una, Alaska Natural History Association. 206 pp.
- Khansari N., Shakiba Y, Mahmoudi, M 2009. Chronic inflammation and oxidative Stress as a major cause of age-related diseases and cancer. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 3:73-80. <https://doi.org/10.2174/187221309787158371>
- Koparal AT, Ayaz Tüylü B, Türk H 2006. In vitro cytotoxic activities of (+)-usnic acid and (-)-usnic acid on V79, A549, and human lymphocyte cells and their non-genotoxicity on human lymphocytes. *Natural Product Research* 20:1300-1307. <https://doi.org/10.1080/14786410601101910>
- Kosani M, Rankovi B, Stanojkovi T, Rancic A, Manojlovi N 2014. *Cladonia* lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *Food Science and Technology* 59:518-525. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.04.047>
- Kosanić M, Ranković B, Vukojević J 2011. Antioxidant properties of some lichen species. *Journal of Food Science and Technology* 48:584-590. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0174-2>
- Kosanić M, Ristić S, Stanojkovic T, Manojlovic N, Ranković B 2018. Extracts of five *Cladonia* lichens as sources of biologically active compounds. *Farmacia* 66:644-651. <https://doi.org/10.31925/farmacia.2018.4.13>
- Laundon, J 1971. Fumarprotocetraric Acid in *Cladonia rangiformis*. *The Lichenologist* 5(1-2), 175-176. <https://doi.org/10.1017/S0024282971000173>
- Lumbsch HT, Huhndorf SM 2010. Myconet Volume 14. Part One. Outline of Ascomycota-2009. Part Two. Notes on Ascomycete Systematics. Nos. 4751-5113. *Fieldiana Life and Earth Sciences* 2010:4751-5113. <https://doi.org/10.3158/1557.1>
- Malhotra S, Subban R, Singh A 2007. Lichens- role in traditional medicine and drug discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine*. 5(2):1-6.
- Miadlikowska J, Kauff F, Hofstetter V, Fraker E, Grube M, Hafellner J, Reeb V, Hodgkinson BP et al 2006. New insights into classification and evolution of the Lecanoromycetes (Pezizomycotina, Ascomycota) from phylogenetic analyses of three ribosomal RNA- and two protein-coding genes. *Mycologia* 98:1088-1103. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832636>
- Molnár K, Farkas E 2010. Current results on biological activities of lichen secondary metabolites: a Review. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung* 65:157-173. <https://doi.org/10.1515/znc-2010-3-401>
- Narendra Kumar SM, Khurana P 2019. Active compounds and bacteria harbouring capacity of lichens and its medicinal use in bacterial and cancer infections. *Plant Biotechnology: Progress in Genomic Era* 327-348. https://doi.org/10.1007/978-981-13-8499-8_15
- Okan OT, Varlıbaş H, Öz M, Deniz İ 2013. Antioxidant analysis methods and some non-wood forest plant products as sources of antioxidants in Eastern Black Sea Region. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty JF* 13:48-59.
- Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Flerlage N, Burillo J, Codina C 2002. Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 50:6882-6890. <https://doi.org/10.1021/jf020540a>
- Paudel B, Bhattarai HD, Pandey DP, Hur JS, Hong SG, Kim C, Yim JG 2012. Antioxidant, Antibacterial activity and Brine shrimp toxicity test of some Mountainous Lichens from Nepal *Biol Res*. 45: 387-391. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000400010>
- Prokop'ev IA, Filippova GV 2019. Antioxidant activity of secondary metabolites from *Cladonia* lichens. *Chemistry of Natural Compounds* 55: 945-947. <https://doi.org/10.1007/s10600-019-02855-9>
- Ramos DDBM, Gomes FS, Napoleão TH, Paiva PMG, Silva MDC, Coelho LCBB 2014. Antimicrobial activity of *Cladonia verticillaris* lichen preparations on bacteria and fungi of medical importance. *Chinese Journal of Biology* 2014:1-7. <https://doi.org/10.1155/2014/219392>
- Ranković BR, Kosanić MM, Stanojković TP 2011. Antioxidant, antimicrobial and anticancer activity of the lichens *Cladonia furcata*, *Lecanora atra* and *Lecanora muralis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 11:97. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-97>
- Re R, Pellegrini N 1999. Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26:1231-1237. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Selbmann L, Zucconi L, Ruisi S, Grube M, Cardinale M, Onofri S 2010. Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and

- psychrotolerance. *Polar Biology* 33:71-83. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0686-2>
- Shahidi F, Yeo J 2018. Bioactivities of phenolics by focusing on Suppression of chronic diseases: A review. *Int J Mol Sci* 19:1573. Published 2018 May 25. <https://doi.org/10.3390/ijms19061573>
- Shukla P, Upreti DK, Nayaka S, Tewari P 2014. Natural dyes from Himalayan lichens. *Indian Journal of Traditional Knowledge* 13:195-201.
- Silva JA, Bomfim RR, Estevam C, Antonioli AR, Araújo AA, Thomazzi SM 2010. Pharmacological properties of lichen *Cladonia clathrate*. *Pharmaceutical Biology* 48:745-752. <https://doi.org/10.3109/13880200903273914>
- Smith GW 1973. Arctic Pharmacognosia / Arctic. 26:1-333.
- Süleyman H, Yildirim D, Aslan A, Göçer F, Gepdiremen A, Güvenalp Z 2002. An investigation of the antiinflammatory effects of an extract from *Cladonia rangiformis* Hoffm. *Biol Pharm Bull.* 25:10-3. <https://doi.org/10.1248/bpb.25.10>
- Syiem D, Sharma R, Saio V 2009. In vitro study of the antioxidant potential of some traditionally used medicinal plants of North-East India and assessment of their total phenolic content. *Pharmacologyonline* 3:952-965.
- Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 46:4113-4117. <https://doi.org/10.1021/jf9801973>
- Weissman L, Fraiberg M, Shine L, Garty J, Hochman A 2006. Responses of antioxidants in the lichen *Ramalina lacera* may serve as an early-warning bioindicator system for the detection of air pollution stress. *FEMS Microbiology Ecology* 58:41-53. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00138.x>
- Weissman L, Garty J, Hochman A 2005. Characterization of enzymatic antioxidants in the lichen *Ramalina lacera* and their response to rehydration. *Applied and Environmental Microbiology* 71:6508-6514. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6508-6514.2005>
- Yilmaz M, Türk AO, Tay T, Kivanç M 2004. The antimicrobial activity of extracts of the lichen *Cladonia foliacea* and its (-)-usnic acid, atranorin, and fumarprotocetraric acid constituents. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2004 Mar-Apr; 59:249-54. <https://doi.org/10.1515/znc-2004-3-423>
- Zagoskina NV, Nikolaeva TN, Lapshin PV, Zavarzin AA, Zavarzina AA 2013. Water soluble phenolic compounds of lichens. *Mikrobiologiya* 82:434-441. <https://doi.org/10.1134/S0026261713030132>
- Zhishen J, Mengcheng T, Jianming W 1999. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem.* 64, 555-559. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00102-2).



Fatty Acid Composition in *Yersinia ruckeri* Strains Isolated from Rainbow Trout Farms

Ünal İSPİR¹, Mikail ÖZCAN², Muammer KIRICI³

¹Malatya Turgut Ozal University, Doğanşehir Vahap Küçük Vocational School, Department of Aquaculture, Malatya, Turkey, ²Kahramanmaraş Sutcu Imam University, Agriculture Faculty, Department of Fisheries Kahramanmaraş, Turkey, ³Bingöl University, Food Agriculture and Livestock Vocational School, Department of Veterinary Health, Bingöl, Turkey.

¹<https://orcid.org/0000-0002-2077-0219>, ²<https://orcid.org/0000-0001-9032-0697>, ³<https://orcid.org/0000-0003-1888-4388>

✉: mikailozcan@ksu.edu.tr

ABSTRACT

In this study, a total of 33 *Yersinia ruckeri* isolates were obtained from rainbow trout farms in the five different region of Turkey. We determined to changes in fatty acids group of the strains. All the isolates were identified as *Y. ruckeri* based on colonial, cellular morphology and biochemical characters. All *Y. ruckeri* 8 major fatty acids, including 12:0 (Lauric acid), 14:0 (Myristic acid), 16:0 (Palmitic acid), 16:1n-7 (Palmitoleic acid), 17:1 (Heptadecanoic acid), 18:1n-9c (Oleic acid), 18:2n-6c (Linoleic acid), 18:3n-3c (Alfa-linoleic acid). Compared to isolates biochemical property, there was no difference between fatty acids and biochemical characteristics. The results of this study showed that the fatty acids composition of *Y. ruckeri* isolated strains from rainbow trout farms in Turkey is on a large scale homogenous.

Research Article

Article History

Received : 09.12.2020
Accepted : 26.03.2021

Keywords

Rainbow trout
Yersinia ruckeri
Fatty acids composition

Gökkuşuğu Alabalığı Yetiştiricilik Tesislerinden İzole Edilen *Yersinia Ruckeri* Suşlarının Yağ Asit Kompozisyonu

ÖZET

Bu çalışmada Türkiye'nin beş farklı bölgesindeki gökkuşuğu alabalığı yetiştiricilik tesislerinden izole edilen 33 *Yersinia ruckeri* yağ asit miktarlarındaki değişimler incelenmiştir. Bütün suşların koloni ve hücre morfolojisi ile biyokimyasal özellikleri yönünden incelenmesi sonucu *Y. ruckeri* olduğu ortaya konulmuştur. Bütün *Y. ruckeri* suşlarında 12:0 (Laurik asit), 14:0 (Miristik asit), 16:0 (Palmitik asit), 16:1n-7 (Palmitoleik asit), 17:1 (Heptadekanolik asit), 18:1n-9c (Oleik asit), 18:2n-6c (Linoleik asit), 18:3n-3c (Alfa-linoleik asit) gibi 8 önemli yağ asidi tespit edilmiştir. İzolatların biyokimyasal özellikleri karşılaştırılmıştır. Yağ asidi ve biyokimyasal özellikler arasında farklılık bulunamamıştır. Bu çalışmada Türkiye'deki gökkuşuğu alabalığı yetiştiricilik tesislerinden izole edilen *Y. ruckeri* suşlarının yağ asidi kompozisyonunun büyük oranda homojen olduğu görülmüştür.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 09.12.2020
Kabul Tarihi : 26.03.2021

Anahtar Kelimeler

Gökkuşuğu alabalığı
Yersinia ruckeri
Yağ asidi kompozisyonu

To Cite : İspir Ü, Özcan M, Kırıcı M 2021. Fatty Acid Composition in *Yersinia ruckeri* Strains Isolated from Rainbow Trout Farms. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1208-1211. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.838056.

INTRODUCTION

Enteric red mouth disease, known as ERM or Yersiniosis, was first reported in 1950's in the rainbow trout farms in the USA as a septicemic disease with high mortality rates in sub-acute and acute forms (Bullock and Anderson, 1984; Busch, 1982; Frerichs and Roberts, 1989; Lucangeli et al., 2000; Ross et al., 1966). ERM disease is widespread in many parts of the world (Bullock et al., 1977; Roberts, 1983; Lesel et al., 1983; Stevenson and Daly, 1982).

In Turkey, Yersiniosis caused by *Yersinia ruckeri* was identified in rainbow trouts in 1991. As the trout farms

increased in number, the disease became more widespread, starting to cause economic losses. This disease is currently frequently found in trout farms and has become the most important bacterial disease in Turkey (Çağırğan and Yürekli Türk, 1991; Kubilay, 1997; Kubilay and Diler, 1999; Timur and Timur, 1991).

A standardized and rapid identification system is offered by the API 20E system. Miniaturized multitest system was originally developed for the identification of Gram-negative enteric bacteria in clinical laboratories. During the last decade, this system has been increasingly used for the identification of marine

and fresh water fish pathogens (Tanrıkuş et al., 2004). Lipids are one of the most basic organic compounds in bacteria, as in other living things in the world. Lipids, which play an important role in the functions of cytoplasmic membranes, are affected by different environmental factors such as temperature, surface tension, osmotic pressure and pH. Fatty acids that make up lipids in defining and characterizing bacteria are accepted as one of the basic taxonomic criteria. It is considered that free fatty acid complexes, which are used in bacterial systematics, will be a good chemotaxonomic property in different growth environments in terms of microbial ecology (Karıptas, 1999).

The detection of the fatty acids of the bacteria using gas chromatography dates back to the 1960s. It has been suggested that mobile *Aeromonas* strains of clinical and non-clinical origin can be classified by liquid-gas chromatography according to their fatty acid metal ester profiles (Canonica and Pisono, 1985).

In this study, the analysis of the heterogeneity of *Y. ruckeri* isolated from fish in the trout farming plants in different regions of Turkey was carried out in order to reveal their fatty acid profiles. For this purpose, the biochemical properties of the strains used in the study,

in addition to the traditional biochemical tests, the relationship of epidemiological characters with the fatty acid composition were revealed.

MATERIAL and METHODS

Bacteria

Y. ruckeri (33) isolates used in the study were isolated from classical fish farms in different regions of Turkey between 2005 and 2014 by classical methods. All strains were cultured at 25°C using Tryptic Soy Agar (TSA). Isolates that were revealed to be *Y. ruckeri* by biochemical tests were confirmed using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method reported by Şeker et al. (2012). Sowing was performed in Shotts-Waltman Medium (SWM) and Ribose Ornithine Deoxycholate (ROD) selective fattening sites.

Isolates, which were previously isolated and added to glycerin in Tryptic Strain Broth (TSB), kept at -20°C, were freshly cultured in Tryptic Strain Agar (TSA) for sterility control before the study started, and it was checked whether the strains were pure. DSM18506 was used as the reference strain. Table 1 shows the geographical distribution of the isolates used in the study.

Table 1. The gathering places of *Y. ruckeri* used in the study
Çizelge 1. Çalışmada kullanılan Y. ruckeri'nin toplanma yerleri

Isolate no	Collection date	Region-city	Organ-isolated location
1-6	2005, 2014	Malatya	Kidney-lesion
7	2011	Aydın	Kidney
8	2012	Rize	?????
9-10	2008, 2012	Kayseri	Kidney
11-23	2005-2014	Elazığ	Kidney, spleen-lesion
24,25	2009	Mersin	?????
26-30	?????	Isparta	?????
31, 32	2011	Artvin	Liver
33	2010	Muğla	Liver

Fatty acid extraction and analysis

Bacteria were incubated in 100ml TSB placed in 500ml flasks at 25 °C for 48 hours and collected by centrifugation at 2500 rpm for 10 minutes. The bacteria were washed twice with 0.85% NaCl and kept at room temperature for 2 hours. For hydrolysis of approximately 55 mg bacteria biomass, NaOH and 1 ml of methanol mixture were added and incubated for 30 minutes in a water bath at 95°C. Then, 2 ml of 6 N HCl prepared in methanol was added to methylation of free fatty acids and kept for 10 minutes in a water bath at 80°C. The aqueous phase for fatty acid extraction was collected and 1.15 ml of the hexane/methyl tert-butyl ether (1:1) mixture was added to each tube and inverted for 10 minutes. After the supernatant was removed, 3ml of 1.2% NaOH was added and shaken for 5 minutes. The supernatant organic phase was taken to the chromatography bottles (viallere) for fatty acid

determination.

Fatty acid analysis was carried out by using Ultra 2-HP (25m x 0,22 mm x 0,33mm) column and hydrogen gas in gas chromatography-mass spectrophotometer (GC-MS).

RESULTS and DISCUSSION

It was determined that 33 *Y. ruckeri* isolates used in the study showed a homogeneous structure in terms of biochemical tests.

Results revealed that *Y. ruckeri* forms a ground glass-like zone due to the precipitation of calcium salts and hydrolysis of Tween 80 by forming green colored colonies in Shotts-Waltman medium (SWM) selective medium. *Y. ruckeri* was found to give yellow colonies in Ribose Ornithine Deoxycholate (ROD) medium as a result of fermentation of ribose and precipitation of sodium desoxycholate salts. The positive result of

isolate 7 in terms of Sorbitol test is that this strain has serotype 2 characteristics. This strain was immobile and found that it did not hydrolyze the tween 80.

It was determined that *Y. ruckeri* bacteria isolated from different regions of Turkey did not have a significant differences in fatty acid composition and

had a homogeneous structure. The composition of bacterial isolates to fatty acid is shown in Table 2. 8. Important fatty acids such as 12:0 (Lauric acid), 14:0 (Myristic acid), 16:0 (Palmitic acid), 16:1n-7 (Palmitoleic acid), 17:1 (Heptadecanoic acid), 18:1n-9c (Oleic acid), 18:2n-6c (Linoleic acid), 18:3n-3c (Alfa-linoleic acid) were detected in bacterial strains.

Table 2. Fatty acid levels of *Y. ruckeri* isolates.

Çizelge 2. Y. ruckeri izolatlarının yağ asit düzeyleri.

Fatty acids (%)								
Isolates	12:0	14:0	16:0	16:1n-7	17:1	18:1n-9c	18:2n-6c	18:3n-3c
1-6	4.98	1.32	22.00	0.34	0.55	1.38	10.05	2.0
7	4.99	0.97	24.95	1.02	1.09	1.41	12.45	2.59
8	5.3	1.39	19.90	0.29	0.55	1.37	11.00	2.33
9-10	5.09	1.30	19.95	0.30	0.54	1.38	10.95	2.53
11-23	4.98	1.33	21.00	0.30	0.51	1.37	10.95	2.51
24,25	5.06	1.40	21.53	0.32	0.51	1.36	11.00	2.71
26-30	5.12	1.42	19.89	0.32	0.55	1.36	11.02	2.65
31, 32	5.26	1.29	19.95	0.31	0.53	1.36	10.98	2.66
33	4.99	1.29	19.99	0.31	0.53	1.37	9.42	2.68
DSM18506	5.21	1.41	21.04	0.32	0.54	1.36	10.55	2.69

DSM18506: *Yersinia ruckeri* serotype O1 reference strain

Lipid compounds are abundant in the cell wall and cytoplasmic membrane of gram-negative microorganisms. Among the most common lipids are cyclopropane acid in *E.coli*, palmitic acid, cis-vaccenic acid, beta-hydroxy myristic acid in endotoxin of *E. coli*, beta-hydroxy acid in *P. aeruginosa*, cis-vaccenic acid in *Agrobacter tumefaciens*, palmitic acid in *S. marcescens* and 9, 10-methylen hexadecanvic acid, even and unsaturated fatty acids in microplasms, cholesterol and a small amount of caprylic acid and capric acid (Arda, 2000). In this study *Y. ruckeri* strains, 11 important fatty acids were detected such as 12:0 (Lauric acid), 14:0 (Miristik acid), 16:0 (Palmitik acid), 16:1n-7 (Palmitoleik acid), 17:1 (Heptadekanik acid), 18:1n-9c (Oleik acid), 18:2n-6c (Linoleik acid), 18:3n-3c (Alfa-linoleik acid).

Bacteria are the simplest and smallest microbial cells. Few of the bacteria with low oil production can synthesize the desired amount of oil (Denli and Tekin, 2000). Current information on the production of oil in bacteria is more related to pathogens. In the study conducted by Bunker (1963), *Mycobacterium* species stand out among the 5 microorganisms whose fat ratios vary between 7-21%. In a recent study (Beopoulos et al., 2009), it is stated that the total cell mass of *Rhodotorula glutinis* can store 72% fat. In the same article, although it is a very rare condition among bacteria, it is stated that *Rhodococcus opacus* bacteria can form a very high fat accumulation as 87%, but there is no information about the form of the oil. In this study, all of the samples are also pathogenic. Fat ratios obtained from samples range between 40.58% and 49.47% as with Malatya (1-6) 42.62%; Aydın (7) 49.47%; Rize (8) 42.13%; Kayseri (9-10) 42.04%; Elazığ

(11-23) 42.95%; Mersin (24-25) 43.89%; Isparta (26-30) 42.33%; Artvin (31-32) 42.34%; Muğla (33) 40.58%.

The examination of fatty acid profiles was performed on 33 *Yersinia ruckeri* species isolated from rainbow trout breeding facilities in 9 provinces in five different regions. As a result of gas chromatography analysis, fatty acid profile was determined as 12:0, 14:0, 16:0, 16:1n-7, 17:1, 18:1n-9c, 18:2n-6c, 18:3n-3c. When this results were compared to previous reports on FAME composition of *Y. ruckeri* isolates from the USA (Arias et al., 2007) and Fatty acid composition of *Yersinia ruckeri* isolates from aquaculture ponds in North West Germany (Huang et al., 2014), the fatty acids 12:0, 14:0 and 16:0 were found as main components in three studies. Jantzen and Lassen (1980) observed that strains from *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* all exhibited a similar fatty acid composition of 14:0, 16:1 and 16:0 and 16:0 was the most prominent fatty acid present in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* (Tan et al., 2010). Canonica and Pisano (1988) reported in a study with *Aeromonas* species that they contain 12:0, 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 16:1, 18:1, and 3-OH 14:0 fatty acids. Fatty acid contents of 10 Bacteria species of *Aeromonas* species isolated from 52 ice cream samples taken from ice cream in Kırşehir were examined and it was determined as 12:0, 14:0, 15:0, 15:0 3OH, 16:1, 16:0 ve 17:1, 17:0 3OH, 18:1 and 18:0 (Karıptaş and Yeniçeri, 2016). The fatty acid profile of *Y. ruckeri* obtained in this study with the fatty acid profiles determined as a result of studies with different species show (12:0, 14:0, 16:0 ve 17:1) similarities and (16:1n-7, 18:1n-9c, 18:2n-6c, 18:3n-3c) differences.

CONCLUSION

Results of this study concluded that the fatty acid composition of *Y. ruckeri* strains isolated from rainbow trout farms in different geographic regions of Turkey revealed that *Y. ruckeri* strains sustain a very similar character in terms of fatty acid composition. It has been determined that serotype 1 strain is common in Turkey as in European countries. Since this research has been studied with *Y. ruckeri* strains isolated from businesses covering different geographic regions of Turkey, the results of the research obtained will contribute to future studies with this bacterium.

Acknowledgment

This work was presented as a oral presentation at the International Conference on Natural Science and Engineering (ICNASE'16), March 19-20, 2016, Kilis, Turkey.

Researchers Contribution Rate Declaration Summary

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

Conflicts of Interest Statement

None of the authors had any financial or personal relationships with other individuals or organizations that might inappropriately influence their work during the submission process.

REFERENCES

- Arda M 2000. Temel Mikrobiyoloji; Genişletilmiş İkinci Baskı. Medisan Yayın Serisi no 46. Ankara, 548 p.
- Beopoulos A, Chardot T, Nicaud JM 2009. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, 91(6): 692-696.
- Bullock GL, Anderson DP 1984. Immunization Against *Yersinia ruckeri*, Cause and Enteric Redmouth Disease. (Symposium on fish Vaccination. Theoretical Background and Practical Results on Immunization Against Infectious Diseases). 20-22 February, O.T.E. PARIS. 66-151.
- Bullock GL, Stuckey HM, Shotts EB 1977. Early Records of North American and Australian outbreaks of enteric redmouth bacterium. *Fish Health News*, 6(2): 96-97.
- Bunker HJ 1963. Microbial Food. Rainbow, C., Rose, A., H., (Ed.), *Biochemistry of Industrial Microorganisms*. Academic Press, 147. New York, 34-67 pp.
- Busch RA 1982. Enteric Redmouth Disease. Symposium International de Talloires. 10-12 May., 1982, Les Antigenes des Microorganismes Pathogènes des Poissons. Collection Fondation Marcel Merieux, 201-224.
- Çağırğan H, Yürekli Türk O 1991. First isolation of *Yersinia ruckeri* from rainbow trout farm in Turkey, In: The Fifth Conference of EAFF, Disease of Fish and Shellfish, 24-29 August 1991, Book of Abstract, 131 p.
- Canonica FP, Pisano MA 1985. Identification of hydroxy fatty acids in *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6): 1061-1062.
- Canonica FP, Pisano MA 1988. Gas-Liquid Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters of *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, and *Aeromonas caviae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(4): 681-685.
- Denli Y, Tekin A 2000. Oil production and microorganisms. *Gıda dergisi*, 25(4): 265-270.
- Frerichs GN, Roberts RJ 1989 The bacteriology of Teleosts. In: Fish pathology (ROBERTS, R.J. ed.) Second Edition. Bailliere Tindall, London 289-320 pp.
- Huang Y, Ryll M, Walker C, Jung A, Runge M, Steinhagen D 2013. Fatty acid composition of *Yersinia ruckeri* isolates from aquaculture ponds in North West Germany. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 127(1-2):10-15.
- Jantzen E, Lassen J 1980. Characterization of *Yersinia* species by analysis of whole-cell fatty acid. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 30: 421-428.
- Karıptas E 1999. Chemical Composition of *Rhodococcus ruber* with Different Growth Conditions, PhD Thesis, University of Newcastle upon Tyne, England, 233 p.
- Karıptaş E, Yeniçeri M 2016. A Study on the Antimicrobial Resistance and Fatty Acid Compositions of Motile *Aeromonas* Isolated From Ice Cream Samples in the City of Kirsehir (Turkey). *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences*, 3(4): 318-323.
- Kubilay A 1997. A Study on antibody production and detection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against pathogen *Yersinia ruckeri*. Süleyman Demirel University, Institute of Science, PhD Thesis, 118 p.
- Kubilay A, Diler Ö 1999. Lam agglutination test and detection of serotypes of *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout. *Journal of Suleyman Demirel University Faculty of Fisheries*, 6(1): 40-47.
- Lesel R, Lesel M, Gavini F, Vuillaume A 1983. Outbreak of enteric red mouth disease in rainbow trout, *Salmo gairdneri* richardson, in France. *Journal of Fish Diseases*, 6: 385-387.
- Lucangeli C, Morabito A, Caprioli A, Achene L, Busani L, Mazzolini E, Fabris A, Macri A 2000. Molecular fingerprinting of strains of *Yersinia ruckeri* serovar O1 and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated in Italy. *Veterinary Microbiology*, 76: 273-

281.

- Roberts MS 1983. A report of an epizootic in hatchery reared rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson at an English trout farm, caused by *Yersinia ruckeri*. *Journal of Fish Diseases*, 6: 551-552.
- Ross AJ, Rucker RR, Ewing WN 1966. Description of a bacterium associated with remouth disease of rainbow trout. *Canadian journal of Microbiology*, 12: 763-770.
- Şeker E, Karahan M, İspir Ü, Çetinkaya B, Sağlam N, Sarıyüpeoğlu M 2012. Investigation of *Yersinia ruckeri* Infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum 1792) Farms by Polymerase Chain Reaction (PCR) and Bacteriological Culture. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(6): 913-916.
- Stevenson RMW, Daly JG 1982. Biochemical and serological characteristic of Ontario isolates of *Yersinia ruckeri*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39: 870-876.
- Tan Y, Wu M, Liu H, Dong X, Guo Z, Song Z, Li Y, Cui Y, Song Y, Du Z, Yang R 2010. Cellular fatty acids as chemical markers for differentiation of *Yersinia pestis* and *Yersinia Pseudotuberculosis*. *Lett Appl Microbiol* 50: 104-111.
- Tanrıkul TT, Çağırğan H, Tokşen E 2004. Identification of isolated *Vibrio sp.* from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L., 1758) using API 20E system. *E.U. Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 22(3-4): 243-247.
- Timur G, Timur M 1991. An Outbreak of Enteric redmouth disease in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in Turkey. *Bull. Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 11: 182-183.

Forecasting of Potato Late Blight Disease Using Alternative Sets of Meteorological Data and Disease Epidemiology

Hale GÜNAÇTI^{1*}, Tahsin AY²

¹Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü, Adana, ²Ulubey İlçe tarım müdürlüğü, Uşak

¹<https://orcid.org/0000-0002-5587-1845>, ²<https://orcid.org/0000-0002-8158-7880>

✉: hale.gunacti@tarimormman.gov.tr

ABSTRACT

Phytophthora infestans (Mont) de Bary, the causal agent of late blight of potato is one of the most important plant pathogens. The disease can occur in a wide variety of climatic conditions and can be very devastating if it does not managed properly. To reduce yield losses, different protective measures are used, including fungicide treatment. Uncontrolled and excessive fungicide applications cause environmental pollution. Accordingly, crop protection strategies optimizing the number of treatments are of great interest. Prediction of potato late blight epidemics was studied in two different locations of Adana. Meteorological data (hourly) were recorded by an iMETOS® automatic weather station installed in the field and were compared with regional station Winstel, Blitecast and Ullrich-Schrodter models. Three disease warning models were compared to forecast the development of potato late blight in Adana between 2013 and 2014 first time. In the Çukurova region, the Winstel model yielded more accurate results in predicting infection conditions compared to the other two models. Studies provided that, the conditions of potato late blight disease formation in the region were determined and the use of the Winstel early warning system following the regional conditions and biotechnical methods which will be alternative to chemical control were provided by the regional farmers.

Research Article

Article History

Received : 18.01.2021

Accepted : 21.03.2021

Keywords

Epidemiology
DSSs,
Disease forecasting
Phytophthora infestans

Patates Mildiyösü Hastalığının Epidemiyolojisi ve Hastalık Tahmininde Farklı Meteorolojik Sistemlerin Kullanım Olanakları

ÖZET: *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary'nin neden olduğu Patates Mildiyösü tüm dünyada ürün kayıplarına neden olan önemli bir hastalıktır. Hastalık, çok çeşitli iklim koşullarında ortaya çıkabilir ve kontrol edilemezse bitkinin tamamen kurumasına ve tüm yapraklarının dökülmesine neden olmaktadır. Çukurova Bölgesi'nde hastalıkla mücadelede ürün kayıplarını en aza indirmek için fungusit uygulamaları dahil olmak üzere çeşitli koruyucu önlemler kullanılmaktadır. Fungisitlerin kontrolsüz ve çok sayıda uygulanması çevre kirliliğine neden olmaktadır. Bu nedenle ilaçlama sayısını optimize eden bitki koruma stratejileri büyük ilgi görmektedir. Çalışmalar, 2013 ve 2014 yıllarında, iklim verilerini değerlendirerek bölge koşullarında en doğru enfeksiyon tahminine olanak veren erken uyarı modelinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla yaprak ıslaklık süresi, hava sıcaklığı, yağış ve nispi nem değerleri anlık olarak ölçülmüştür. Patates mildiyösü hastalığının tahmin çalışmaları, Adana ilinde ticari patates yetiştiriciliğin yoğun olarak yapıldığı 2 farklı alanda iMETOS® elektronik iklim istasyonunun bulunduğu tarlalarda yürütülmüştür. Bölgede ilk defa yapılan bu çalışma kapsamında Ullrich Schrodter, Winstel ve Blitecast modelleri karşılaştırılmalı olarak uygulanarak bölge koşullarında en doğru enfeksiyon tahminine olanak veren erken uyarı modeli belirlenmiştir. Çukurova bölgesinde Winstel modelinin diğer iki modele göre en iyi sonuç gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmada elde edilen bilgiler

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 18.01.2021

Kabul Tarihi : 21.03.2021

Anahtar Kelimeler

Epidemiyoloji,
DSSs,
Erken tahmin uyarı
Phytophthora infestans.

yardımıyla Patates Mildiyösü hastalığının bölgede epidemi oluşturma koşulları belirlenerek bölge şartlarına en uygun olan Winstel erken uyarı sistemi ile kimyasal mücadeleye alternatif olacak biyoteknik yöntemlerin bölge çiftçisi tarafından kullanımı sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler:

To Cite : Günaçtı H, Ay T. 2021. Forecasting of Potato Late Blight Disease Using Alternative Sets of Meteorological Data and Disease Epidemiology. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1213-1220. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.863578.

INTRODUCTION

Potato late blight (PLB), caused by *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, 1876, was responsible for the occurrence of the destructive Great Irish Potato Famine during the first outbreak in Europe in the early 1840s (Bourke, 1991). *P. infestans* is a serious and destructive disease of potato in the world, including the Çukurova region in Turkey. Fungicides used against PLB disease represents approximately 50% of the total amount of annual used fungicides. The low yield and quality caused by this disease account for huge economic losses. Overall, potatoes are produced in 7000 ha area in Çukurova region, and an average of 12-14 fungicide application were done against this disease seasonally.

Intensive chemical control of potato crops against PLB is realized in most of Europe with large potato production. Recently, up to 20 fungicide applications have been used to manage disease in many Europe countries (Schepers and Spitz, 2006; Hansen et al., 2007).

Both potato cultivation and seed potato production are very important in the Çukurova region. The humidity of the region cause an increase of yield loss and consequently more of fungicide applications causing a large economic and environmental damage. With the early warning study conducted in the region for the first time, it was tried to prevent unnecessary pesticide use. Decision support system (DSSs) used in the control of the disease in potato plant protection support to determine the proper first application date and the following treatments. This lets the number of fungicide treatments to be reduced and plays an important role in both the price efficiency of chemical control and also in environment protection. In these systems, the relative humidity, air temperature and leaf wetness duration can be determined and the probability of an outbreak is predicted. The first successful forecasting model was the negative prognosis of *P. infestans* Ullrich and Schrodter in 1966. DSSs have been developed after the years and are readily available and purchasable (McCown, 2002). In the Euroblight website a list of 12 DSSs is presented, all for the management of one pathogen, *P. infestans* (<http://www.euroblight.net/EuroBlight.asp>). A list of 16 DSSs for late blight management is currently on the website of the University of California (UCIPM Online; <http://www.ipm.ucdavis.edu/disease/database/potatolateblight.html>) (Shtienberg, 2013).

The reliable weather dependency of PLB has been used as an elementary for several types of models to determine how to effectively control the disease with fungicides. The models evaluated how favourable the conditions for disease development are based mainly on observations of weather condition. There are some similar examples of such PLB control systems (e.g. Smith, 1956; Ullrich and Schrödter, 1966; Krause et al., 1975; Hansen et al., 1993; 1996; The Negfry-system (Hansen et al., 1993; 1996). Such so-called DSSs have the potential of reducing the fungicide inputs while maintaining an acceptable level of control.

In Çukurova, losses of yield is reported about 40-80% depending on the cultivars and weather conditions.

Because of controlling of the late blight requires-frequent fungicide treatments, cost for controlling of this disease in potato is higher than to other crops. Due to high disease pressure in the highland tropics, some farmers apply fungicides more than ten times per growing season (Gunacti et al., 2016).

In this study, the Ullrich-Schrodter model (Ullrich and Schrodter, 1966), Winstel model (Winstel, 1993) and Blitecast model were compared by using them to predict the progress of PLB in the potato growing areas of two locations in Adana Province between 2013 and 2014. In the current study, in Çukurova, which is the most important producer of potato cultivation, the basis for the initiation of biotechnical control with the PLB disease was prepared.

MATERIALS and METHODS

This study was conducted in 2013 and 2014 to determine the early warning model, which allows for the most accurate prediction of infection by evaluating the climate data. For this purpose, the leaf wetness duration, air temperature, rainfall and relative humidity values were measured instantly. The trials were carried out in two periods in the fields where electronic observatory station was established in two different fields in Seyhan and Yüreğir districts of Adana. Depending on the climatic conditions in Adana province, planting of potatoes is done between 15 December and 15 January. Climatic data were recorded between planting and harvesting periods.

Early-Warning Models

In this study, Ullrich-Schrodter, Winstel and Blitecast models were used as a comparison in the estimation of

the outgrowth of late blight disease. As predicted by the models, all models were started to work together with the grow of potato plants. According to the study of the models, the phenological period of 3 weeks before the harvest was entered and the study of the models was terminated by entering the phenological period of harvest. With the start of the study, field inspections were carried out regularly and the date of the first symptoms of late blight were recorded. The studies were conducted at two stations established in 2 different potato fields in Sarıhuğlar and Kürkçüler locations in Yüreğir and Seyhan districts between 2013 to 2014. For both climate stations, plots were designed for the experimental area in potato fields. Potato cv. Marfona were planted in the experimental area. To observe the emergence of the disease, 1 m safety strip was left between the control plots and both experimental areas. To isolate from farmer spraying, the trial plots were divided in the opposite direction of the dominating wind of the field. A spraying area of 50 m² is reserved for each model. Climate stations have been installed on 10.01.2013 at both locations and activated immediately. Mancozeb+Metalaxyl-M (64+4 % effective ingredients, Ridomil Gold) and dimethomorph+mancozeb (9+60 % effective ingredients, Acrobat) fungicides were used as given by the models.

Ullrich-Schrodter Model

The model is used to assessment hourly temperature, leaf wetness and rainfall. It is a 'negative prognosis' model which forecast when late blight epidemics are not likely to occur. Beginning at crop emergence, daily and risk rate over a week are evaluated. Risk rate is then calculated with the model's table Hansen (1993), Ullrich and Schrodter and Fry models established by the combination of the model in the Ullrich-Schrodter temperature (°C), leaf wetness (%) and rainfall (mm / h) data are used. The daily index values were evaluated by taking the climate data together with the plant output in the field. When the total index value is 160, the model gives a warning. The first application was made when the total index value was 160 and the daily index value was 8 and above.

Winstel Model

This model was made up of 2 stages and temperature (°C) and leaf wetness (%) or leaf wetness data are used. In the first stage, climatic data were calculated to determine the conditions for infection. After the infection condition was determined, the second phase was started. At the second phase, the spraying time was determined (Winstel, 1993). Treatment should be beginning when phase 1 is followed by phase 2. Phase 1 forecasting infection when the following

requirements are met daily average temperature between 10 and 23 °C and then at least 10 h of temperatures higher than 10 °C and leaf wetness higher than 90 %. Phase 2 forecasting pathogen growth when the maximum daily temperature is between 23 and 30 °C for two successive days and must occur after at least 24 h but not later than 10 days after the first phase.

Blitecast Model

Blitecast was designed as a computerized synthesis of both the Hyre and Wallin models and has been used successfully forecasting late blight in the USA and Europe (Krause et al.,1975). Firstly, part of the program forecasts the initial occurrence of PLB 7-14 days after the first accumulation of either '10 rain-favourable days' according to Hyre's criteria (Hyre, 1954), or the accumulation of 18 severity values according to Wallin's model (Wallin, 1962). Secondly, the program suggests fungicide sprays based on the number of rain-favourable days and severity values accumulated during the previous seven days. Fry et al.(1983) modified Blitecast to schedule fungicide applications more precisely once the initiation of chemical sprays to manage late blight has begun. They incorporated levels of host resistance and weathering of fungicides with Blitecast to suit this system for applying chemicals on both susceptible and resistant cultivars. Daily minimum and maximum temperature values (°C), relative humidity 90 % and above (hours), maximum and minimum temperature values (°C) and 24-hour precipitation (mm) data were used in this study.

RESULTS and DISCUSSION

Studies in 2013 season

Potatoes were planted at Kürkçüler station in Seyhan district on 07.01.2013 and Sarıhuğlar station in Yüreğir district on 10.01.2013. The climate data obtained from iMETOS@climate devices had been collected with the cultivation of potato plants (Fig.1 and Fig. 2).

The Ullrich-Schrodter model, one of the early warning models, increased the index value of 160 diseases and the daily index value of more than 8 in the Sarıhuğlar climate station on 24.02.2013, while the Kürkçüler station reached this value only at 23.03. 2013 (Table 1). After the first warnings were received in the experimental areas of the model, the first spraying was made. A second warning was received at Kürkçüler station on 18.04.2013. Two further warnings were taken at the Sarıhuğlar station on 05.04.2013 and 21.04.2013, and 2nd and 3rd spraying were carried out in the area related to the warnings (Table 1).

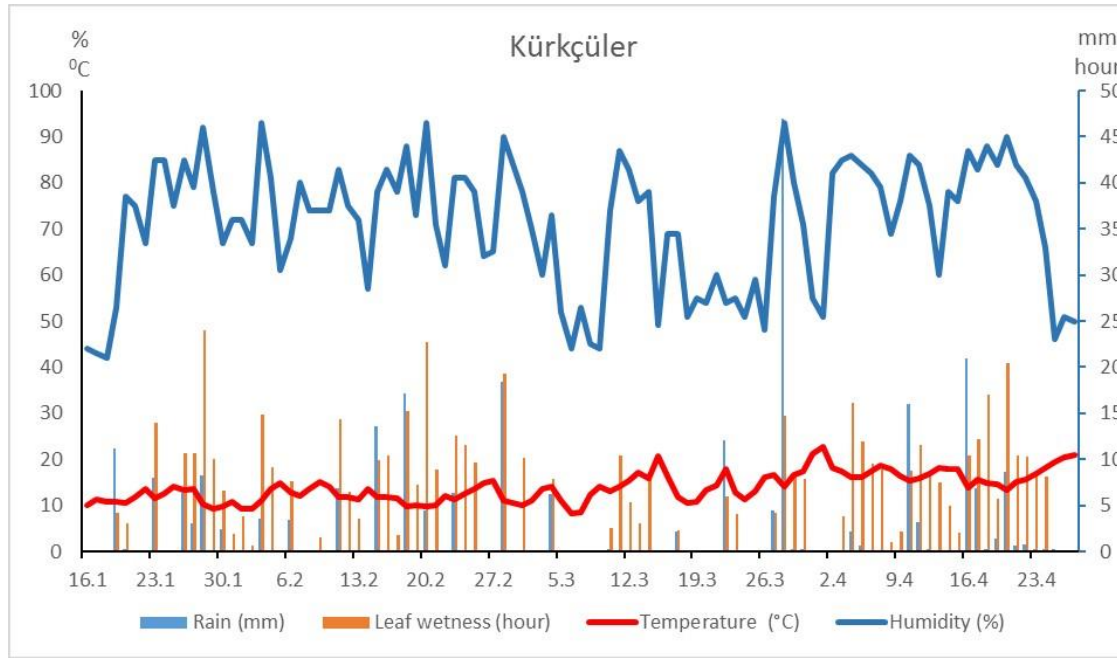


Figure 1. Climate data from Kürkçüler village of 2013
Şekil 1. Kürkçüler köyüne ait 2013 yılı iklim verileri

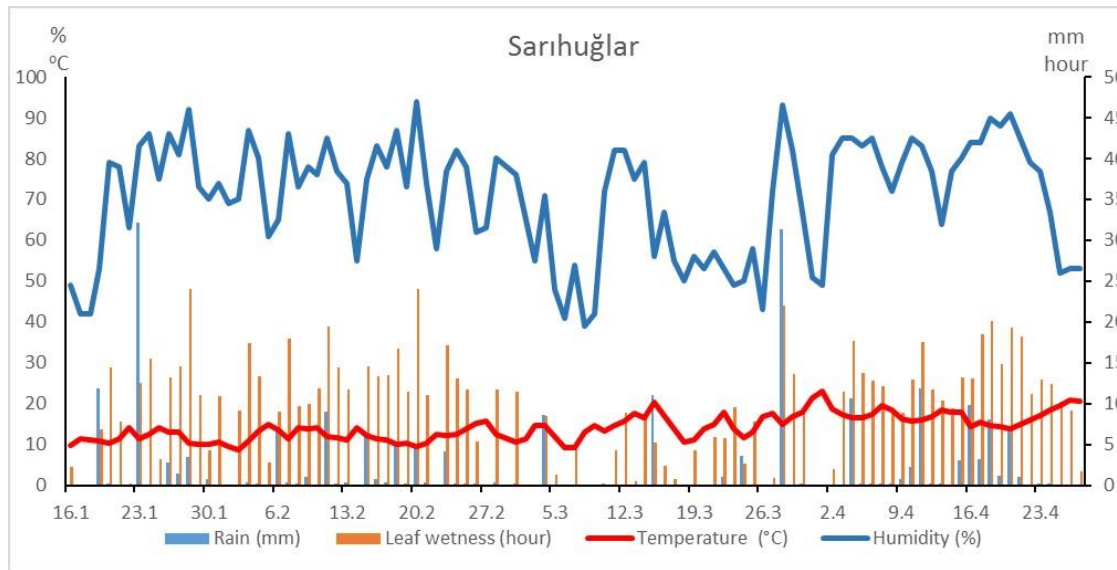


Figure 2. Climate data from Sarıhuğlar village of 2013
Şekil 2. Sarıhuğlar köyüne ait 2013 yılı iklim verileri

The Winstel model was alerted for the risk of infection at the Sarıhuğlar station on 13 times. According to Kürkçüler station data, the infection risk has reached the expected level 11 times in 2013. In March and April, following risk warnings, maximum temperatures reached appropriate values for infection. A total of 4 pesticides were applied in the experimental plot belonging to the model on March 15, March 29, April 12, April 26, of 2013 at Sarıhuğlar station. At the Kürkçüler station, spraying was applied to the experiment area on March 15, and April 5, and April 19 of 2013 when the model gave the spraying warning (Table 1).

Sarıhuğlar station for Blitecast model has warned 4 levels 8 times in 2013. In the data obtained from the Kürkçüler station, the warning level was calculated as level 4-6 times in 2013. A higher warning level has not been reached at both stations. Considering the number of rainy days and plant development period within 7 days before the warnings, the pesticide was applied to the plots allocated for the model in both stations on April 24, 2013. The early symptoms of the disease were observed on April 26, 2013, in the control plots (Table 1).

Table 1. Disease occurrence dates according to DSSs models and disease occurrence at Sarıhuğlar and Kürkçüler stations in 2013

Çizelge 1. 2013 yılında DSS modellerine göre Sarıhuğlar ve Kürkçüler istasyonlarında hastalık görülme tarihleri

Sarıhuğlar				Kürkçüler			
Ullrich-Scrodter	Winstel	Blitecast	Date of observation in the field	Ullrich-Scrodter	Winstel	Blitecast	Date of observation in the field
24.02.2013	23.01.2013	4.02.2013	26.04.2013	23.03.2013	23.01.2013	4.02.2013	24.04.2013
05.04.2013	24.01.2013	29.03.2013		18.04.2013	26.01.2013	28.03.2013	
21.04.2013	10.02.2013	4.04.2013			28.01.2013	29.03.2013	
	11.02.2013	5.04.2013			23.02.2013	18.04.2013	
	15.02.2013	10.04.2013			12.03.2013	20.04.2013	
	23.02.2013	11.04.2013			3.04.2013	21.04.2013	
	12.03.2013	18.04.2013			5.04.2013		
	28.03.2013	21.04.2013			10.04.2013		
	3.04.2013				12.04.2013		
	10.04.2013				17.04.2013		
	12.04.2013				24.04.2013		
	17.04.2013						
	19.04.2013						

Studies in 2014 season

Potatoes were planted at Sarıhuğlar station on January 5, 2014 and at Kürkçüler station on January 7, 2014. The climate data were started to be taken with the cultivation of potato plants (Fig. 3 and Fig. 4). The Ullrich-Schrodter model has reached the index value of 160 diseases at Kürkçüler station on March 3, 2014, but no application has been made for this model since the daily index has not reached 8 times required for the application. There was no warning about the model at

Sarıhuğlar station (Table 2).

In the Winstel model, the risk of spreading for 2 hours or more following the 10-hour infection warning was determined as a warning threshold for the application. For the Winstel model, a warning was received 4 times for the risk of infection at Sarıhuğlar station. According to Kürkçüler Station data, Infection risk was seen 3 times in 2014. Following the disease risk warnings in March and April, high temperatures reached the appropriate values for infection.

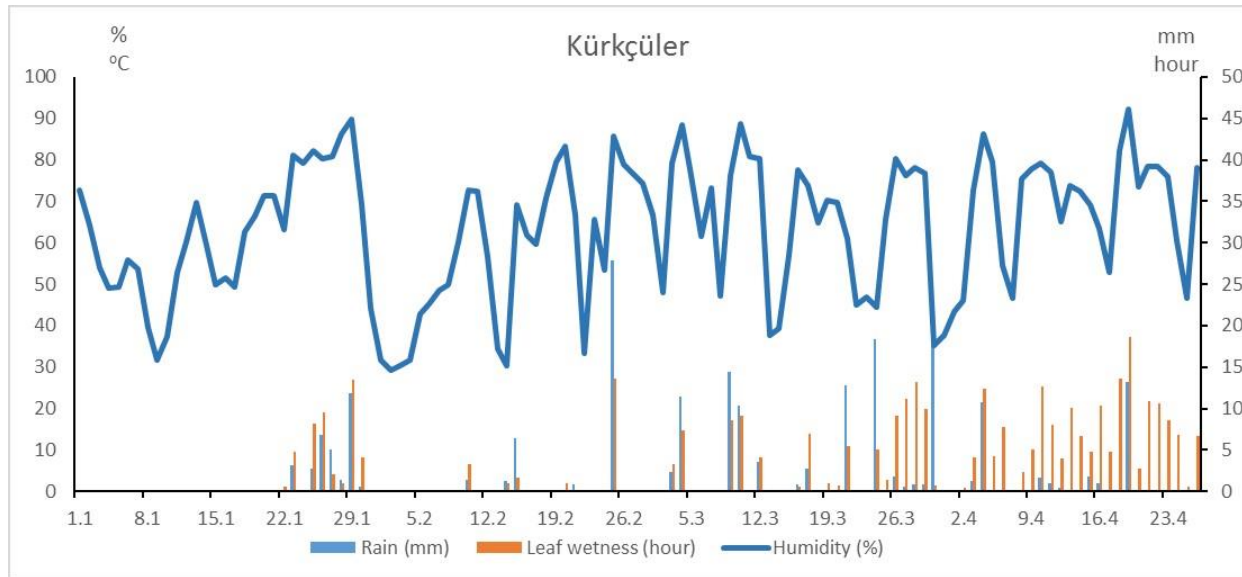


Figure 3. Climate data from Kürkçüler village of 2014

Şekil 3. Kürkçüler köyüne ait 2014 yılı iklim verileri

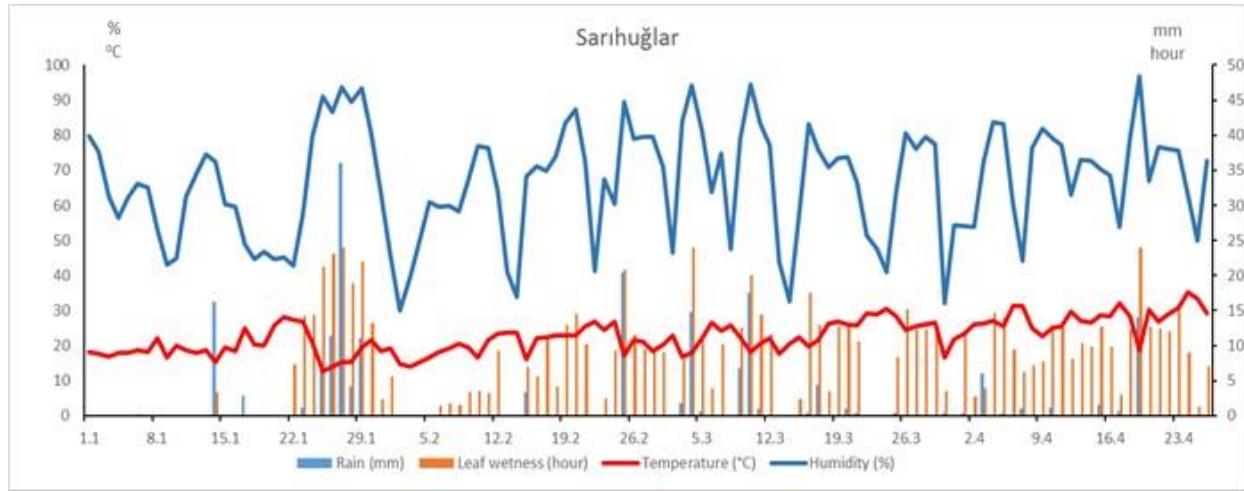


Figure 4. Climate data from Sarıhuğlar village of 2014
Şekil 4. Sarıhuğlar köyüne ait 2014 yılı iklim verileri

Table 2. The dates of disease prediction according to DSSs models and disease occurrence at Sarıhuğlar and Kürkçüler stations in 2014

Çizelge2. 2014 yılında DSS modellerine göre Sarıhuğlar ve Kürkçüler istasyonlarında hastalık görülme tarihleri

Sarıhuğlar				Kürkçüler			
Ullrich-Scrodter	Winstel	Blitecast	Date of observation in the field	Ullrich-Scrodter	Winstel	Blitecast	Date of observation in the field
	04.03.2014						
		24.02.2014	17.04.2014	3.03.2014	9.03.2014	23.03.2014	26.04.2014
	10.03.2014	5.04.2014			12.04.2014	18.04.2014	
	19.03.2014						
		21.04.2014			21.04.2014		
	04.04.2014						

A total of 3 pesticides were applied to the experimental plots of the model on March 4, March 19, and April 4 of 2014 at Sarıhuğlar station. At the Kürkçüler station, on March 10 and April 12 of 2014 when the model was given a warning of spraying, spraying was applied to the plot in the experimental area (Table 2).

In the Blitecast model, the spray threshold is calculated by considering the number of rainy days. The total 10-day precipitation amount was more than 3 cm and the 5-day average temperature is less than 25.5 °C or the total density value according to the Wallin scale was more than 18; it was accepted that the first symptoms of the disease would be observed after 7 to 14 days. Until the report preparation date in 2014, Blitecast model did not give any model warning because the amount of rainfall required for spraying was never reached and no spraying was done for the plot allocated to this model.

The first symptoms of the disease in control plots were observed on April 17, 2014. In this study, which was conducted to determine the prediction-warning model that provides the most accurate prediction of infection by evaluating the climate data in the conditions of Çukurova region, the dates of the prediction and warning for the infection of the three models and the

infection rates in the region were compared. For the development of late blight disease, first of all, fungal spores should be germinated. For this purpose, high-temperature and high relative humidity, such as suitable temperature, free water film on the plant surface, dew and precipitation is required. Humid conditions for the penetration of the pathogen should persist for a certain period. Secondary spores (zoospores) that occur after sports germination should be able to perform a successful penetration. The presence of free water film on the leaf increases the efficacy of *P. infestans* as in many leaf pathogens. Therefore, the duration of the leaf wetness is widely used as a critical determinant of the risk of epidemiology in early warning systems (Agrios, 1997; Harrison, 1992; 1995).

Ullrich-Schrodter model; this model was tested during the two breeding periods; the infection conditions could not be predicted correctly. The model warned the total index value of 160 in Sarıhuğlar location 3 times (February 14, April 5 and April 21 of 2013) and twice in the Kürkçüler location (23.03.2013 and 18.04.2013). When the warnings were made, the relevant plots were treated, but the disease occurred on the control plots on April 26, 2013, long after the warning dates. In both

stations, the Ullrich-Schrodter model was treated according to the total index value of 160 for the prediction of the first infection signs and the unnecessary application was made. In 2014, 160 disease index values were reached at the Kürkçüler station on March 3, 2014, but since the daily index did not reach 8 times for an application, no application was made for this model.

There was no warning about the model at Sarıhuğlar station. Blitecast model; this model could not accurately predict infection conditions during the two sowing periods. To give a model warning, the total density value should be 18. During the studies, the total severity value of both stations did not reach 18. The model was late in predicting infection conditions in this period. In other breeding periods, it did not give any warning. However, in the controls performed during these periods, disease symptoms were detected in the fields. According to these results, it was seen that Blitecast model does not yield correct results in predicting the conditions of infection in Çukurova region. Winstel Model; in both periods, the model was more suitable than the other two models in predicting infection conditions. After infection of the plant by a pathogen, a certain incubation time is required for the disease symptoms on the plant. After the model gave a warning, the first signs of PLB disease were determined at the end of the incubation period in the potato fields in both years. Temperature is very important in the life cycle of *P. infestans*. The temperature can significantly affect spore germination, mycelial growth rate, inoculum formation and viability. Temperatures below 20 °C induce sporangium germination indirectly at an optimum temperature of 12-13 °C. Temperatures above 20 °C promote optimal direct germination at 24 °C (Harrison and Lowe, 1989; Sato, 1994). The incubation period of the pathogen is also important in the incidence of diseases. During the incubation period, the pathogen develops and spreads within the host tissues. The temperature of the incubation period increases as the temperature increases and decreases. The incubation period of *P. infestans* is 3.5 days at 22 °C, 13 days at 12 °C and 10 days at 30 °C. Incubation time plays a key role in the starting of chemical control of disease (Baykal, 1995; Ullrich and Schrodter, 1966).

More than 25 models are used for the forecast warning of PLB in the world. The fact that there are so many models is due to both the characteristics of the agent and the diversity of ecology in the regions where potatoes are grown. For this reason, while different models are used among countries, sometimes different models are used even within the country. In the Çukurova region, the Winstel model was more accurate in predicting infection conditions than in the other two models (Ullrich-Schrodter and Blitecast models). The application of the 8 - 12 spraying pre-

warning system which is routinely done by the manufacturer has been reduced to 4 applications. Hansen et al. (2002), it was reported that the use of early warning systems reduced the use of fungicide by 8-62 % compared to routine practices. With the data obtained in the study, epidemiological conditions of potato subclinical disease were determined and Winstel early warning system which is suitable for the region conditions and biotechnical methods which may be an alternative to chemical control were used. Early warning systems are very important to ensure effective and economic control in the disease management program. In this way, chemical control was applied at the right time and the desired success was achieved in the control against diseases and unnecessary disinfection was prevented during the period of infection.

CONCLUSIONS

With the help of the information obtained in this study, the conditions of epidemic formation of PLB in the region were determined and the use of biotechnical methods which would be an alternative to chemical control by Winstel early warning system which is suitable for the region conditions was provided by the local farmers. Considering the high sporulation capacity of *P. infestans* and the ability to germinate in a short period, the precondition for success in combating the disease is to determine the relationships between host, pathogen and environmental conditions in the best way. Management strategies for PLB include two main approaches; fungicide applications and host resistance. Moreover, the use of certificated and disease-free tubers for planting and cultural control measurements can greatly reduce the early initiation of disease symptoms. Early warning systems are very important to ensure that an effective and economic control program is implemented. In this way, chemical control was applied at the right time to achieve the desired success in combating the disease and unnecessary spraying during the period when infection conditions were not prevented. This study is important in terms of showing that biotechnological solutions can be provided to the disease. As a result, with the early warning studies, the project prepared the ground for the initiation of the biotechnical control with the PLB in Çukurova, which is the most important production area of early grown potato cultivation. Although the approach used to predict the initiation of PLB development is diverse but most of them have been demonstrated to adequately forecast the initial appearance of the disease as well as timely fungicide application.

A large number of late blight forecasting models exist and are currently used in many potato production areas throughout the world and give satisfactory information. DSSs increase the efficacy of control

strategies without increasing risk and can also be used to justify fungicide inputs and as a source of advice in situations where the number of sprays or product choice is limited by legislation. The application of forecasting model for late blight of potato reduces the frequency of fungicides application up to 50 % as compared with conventional, calendar-based program.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study is a part of the project fully supported by the Scientific and Technical Research Council of Turkey (TUBITAK) with project number, TOVAG-1120112. The author is thankful to colleague Prof. Dr. Canan Can.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Agrios G 1997. Plant Pathology 4th ed. Academic Pres, Inc. San Diego, CA, 656 pp.
- Baykal N 1995. Fitopatoloji, Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa 47-49.
- Bourke A 1991. Potato blight in Europe in 1845: the scientific controversy. In: Lucas JA,
- Fry WE, Apple AE, Bruhn JA 1983. Evaluation of potato late blight forecasts modified to incorporate host resistance and fungicide weathering. *Phytopathology* 73:1054-1059.
- Gunacti H, Ay T, Can C 2016. Çukurova'da Patates Mildiyösü Erken Uyarı Sisteminin Oluşturulması ve *Phytophthora infestans* Populasyonunun Moleküler ve Biyokimyasal Karakterizasyonu. Tübitak Projesi 1120112: Sonuç Raporu 69 s.
- Gunacti H, Ay T, Can C 2019. Genotypic and phenotypic characterization of *Phytophthora infestans* populations from potato in Turkey. *Phytoparasitica* 47:429-439.
- Hansen JG1993. The use of meteorological data for potato late blight forecasting in Denmark. Workshop on computer-based DSS on crop protection. Parma, Italy. In:SP report no. 7:183-192.
- Hansen JG, Andersson B 1996. Development and practical implementation of a system for potato late blight forecasting in potatoes. In: International Symposium on Applied Agrometeorology and Agroclimatology. European Commission. Cost 77, 79, 711. (Eds. Dalezios, N.R) 251-258.
- Hansen JG, Colon LT, Cooke DEL, Lassen P, Nielsen B, Cooke LR, Andrivon D, Lees AK 2007. Eucabligh – collating and analysing pathogenicity and resistance data on a European scale. EPPO Bulletin 37: 383-390.
- Hansen JG, Kleinhenz B, Jorg E, Wander JGN, Spits HG, Dowley LJ, Rauscher E, Michelante D, Dubois L, Steenblock T 2002. Results of validation trials of *Phytophthora* DSS s in Europe, 2001. Proceedings of the Sixth Workshop of an European Network for development of an Integrated Control Strategy of potato late blight, Edinburgh, Scotland, 26-30 September 2001. PPO-Special Report no. 8,231 – 242.
- Harrison JG, Lowe R1989. Effect of humidity and air speed on sporulation of *Phytophthora infestans* on potato leaves. *Plant Pathology* 38: 585-591.
- Harrison JG1992.Effects of the aerial environment on late blight of potato foliage. *Plant pathology* 41:384-416.
- Harrison JG1995. Factors involved in the development of potato late blight diseases (*Phytophthora infestans*).in *Potato Ecology and Modelling of Crops Under Conditions Limiting Growth*. Eds AJ Haverkort and DKL McKerron. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands215-236.
- Hyre RA 1954. Progress in forecasting late blight of potato and tomato. *Plant Disease reporter* 38:245-253.
- Krause RA, Massie LB, Hyre RA 1975. Blitecast a computerized forecast of potato late blight. *Plant Disease Reporter* 59:95-98.
- McCown RL 2002. Locating agricultural decisions support systems in the troubled past and sociotechnical complexity of models for management. *Agric. Sys.* 74:11-25
- Sato N 1994. Effect of sporulating temperature on the limit temperature in indirect germination of the sporangia of *Phytophthora infestans*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan.* 60:60-65.
- Schepers HTAM, Spits HG 2006.The development and control of *Phytophthora infestans* in Europe in 2004-2005. In: Westerdijk CE, Schepers HTAM (eds) Proceedings of the ninth workshop of an European network for development of an integrated control strategy of potato late blight. PPO special report no 11: 11-22.
- Shtienberg D 2013. Will Decision-Support Systems Be Widely Used for the Management of Plant Diseases Annual Review of Phytopathology 51:1-16.
- Smith LP 1956. Potato blight forecasting by 90 % humidity criteria. *Plant Pathology* 5:83-87.
- Ullrich J, SchrödterH 1966. Das problem der Vorhersage des Auftretens der Kartoffelkrutfaule (*Phytophthora infestans*) und die Möglichkiet seiner lösungdurcheine Negativprognose. *Nachrichten Dt. Pflanzenschutzdienst (Braunschweig)* 18:33-40.
- Wallins JR 1962. Summary of recent progress in predicting late blight epidemics in United States and Canada. *Am Potato J* 39: 306-12.
- Winstel K 1993. Kraut-und knollenfaule der kartoffeleineeeueprognosemoglichkeit- sowiebekämpfunggrategien. *Med. Fac. Landbouww Uni. Gent*, 58/3b.

Some Epidemiological Studies on Rice Blast Disease Caused by *Pyricularia oryzae*

Efkan AKÇALI^{1*}, Şener KURT²

¹Biyolojik Mücadele Araştırma Enstitüsü, 01321, Adana, Türkiye, ²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 31001, Hatay, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-5486-7502>, ²<https://orcid.org/0000-0003-4545-5968>

*: akcaliefkan@hotmail.com

ABSTRACT

In this study, the effects of temperature and the duration of leaf wetness on the development of rice blast disease caused by *Pyricularia oryzae* and the reactions of Edirne and Osmancık-97 rice cultivars were investigated under controlled environmental conditions. Rice cultivars Edirne and Osmancık-97 were inoculated with a conidial suspension (5×10^5 conidia ml⁻¹) of *P. oryzae* and exposed to combinations of five different leaf wetness durations (from 6 to 30 h) and four different temperatures (20 to 32°C) over the course of infection period. Disease severity on cvs. Edirne and Osmancık-97 increased with increasing temperatures and hours of wetness duration. The highest disease severity was detected on plants exposed to 30 h leaf wetness duration at 28°C, while the lowest disease severity values were observed 6 h leaf wetness duration at 20°C temperature. Increased leaf wetness durations significantly increased disease severity at optimal temperature. But, it was observed that the all disease severity values on cv.Osmancık-97 was lower than cv. Edirne at same temperatures and leaf wetness durations. In addition, a new and simple technique was developed to increase the sporulation capacity of the *P. oryzae* to provide enough inoculum quantity in the experiments by this study.

Research Article

Article History

Received : 31.12.2020

Accepted : 12.03.2021

Keywords

Rice blast

Duration of leaf wetness

Temperature

Disease severity

Pyricularia oryzae'nin Neden Olduğu Çeltik Yanıklık Hastalığı Üzerine Bazı Epidemiyolojik Çalışmalar

ÖZET

Bu çalışmada, *Pyricularia oryzae*'nin neden olduğu çeltik yanıklık hastalığının gelişiminde sıcaklık ve yaprak ıslaklık süresinin etkileri ile Edirne ve Osmancık-97 çeltik çeşitlerinin hastalığa karşı tepkileri kontrollü çevre koşulları altında incelenmiştir. Edirne ve Osmancık-97 çeltik çeşitleri *P. oryzae*'nin (5×10^5 conidia ml⁻¹) konidial süspansiyonu ile inokule edilmiş ve enfeksiyon dönemi boyunca dört farklı sıcaklık (20-32°C) ve beş farklı yaprak ıslaklık süresi (6 ila 30 saat) kombinasyonuna maruz bırakılmıştır. Edirne ve Osmancık-97 çeşitlerinde, hastalık şiddeti artan sıcaklıklar ve yaprak ıslaklık süreleri ile yükselmiştir. En yüksek hastalık şiddeti 28°C sıcaklıkta 30 saat yaprak ıslaklık süresine maruz kalan bitkilerde tespit edilirken, en düşük hastalık şiddeti değerleri 20°C sıcaklıkta 6 saat yaprak ıslaklık süresinde saptanmıştır. Yükselen yaprak ıslaklık süreleri, optimum sıcaklıkta hastalık şiddetini önemli ölçüde artırmıştır. Ancak Osmancık-97 çeşidindeki tüm hastalık şiddeti değerlerinin aynı sıcaklık ve yaprak ıslaklık sürelerinde Edirne çeşidinden daha düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca, bu çalışma ile denemelerde yeterli inokulum miktarını sağlamak için *P. oryzae*'nin sporlama kapasitesini artıracak yeni ve basit bir teknik geliştirilmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 31.12.2020

Kabul Tarihi : 12.03.2021

Anahtar Kelimeler

Çeltik yanıklığı

Yaprak ıslaklık süresi

Sıcaklık

Hastalık şiddeti

To Cite : Akçalı E, Kurt Ş 2021. Some Epidemiological Studies on Rice Blast Disease Caused by *Pyricularia oryzae*. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1221-1229. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.851241.

INTRODUCTION

Rice has been considered one of the most significant

staple food crops of more than half of the world's population (Nalley et al., 2016). The global rice

production has reached to 510.1 million tonnes in 2018 and consumption has expanded by 1.1 percent in 2017/18 to 503.9 million tonnes (FAO, 2020). Asian countries supply approximately 90% of the world rice production. While China has a 27% share in world production with 208 million tonnes, followed by India with 22% and Indonesia with 9.7% (FAO, 2018). Turkey's rice farming has been made in around 120 thousand hectare areas in Marmara, Black Sea, Southeast Anatolia, the Mediterranean and the Aegean regions and rice production was approximately 940 thousand tonnes (TUIK, 2018). The current global human population is predicted to grow by over a third and to reach 9 billion between 2009 and 2050 (Godfray et al., 2010); accordingly, it must increase by 70% globally cultivated land between 2005 and 2007 and 2050 to reach food request from population development (FAO, 2009). Therefore, any reduction in production will have adverse effects on human food demand.

Rice diseases caused by fungi are considered as the main limiting factor in rice production and cause both qualitative and quantitative losses (Kongcharoen et al., 2020). Rice blast, caused by the heterothallic ascomycete fungus *Pyricularia oryzae* Cav. (teleomorph: *Magnaporthe oryzae*) on rice, is one of the most widely disseminated and economically destructive diseases of rice and grass plants in the world (Ou, 1985; Asibi et al., 2019) and Turkey (Oran, 1975). Rice blast, the most serious and widespread disease in global rice production, is responsible for approximately 45-50% of rice yield losses worldwide (Singh et al., 2019; Asibi et al., 2019). It is therefore one of the most important limiting factors in rice production and a serious concern for the combat with global food security. *P. oryzae* species complex that causes blast disease has a broad spectrum of host range and is known to infect almost more than 50 species of the gramineae plants including rice, wheat, and millets (Castroagudín et al., 2016). It has been stated that rice production was affected by the rice blast disease in more than 50 countries around the world, including America and Europe (Sirithunya et al., 2007). Also, rice blast was reported to infect rice resulting in yield loss of about 30-80% in Southeast Asia, South America and other parts of the world (Ou, 1985; Talbot, 2003; Khush and Jena, 2009). Unless the spraying is made, it may cause yield loss at levels ranging between 60 to 100% in areas where sensitive varieties of rice are grown (Aravindan et al., 2016).

In the field, the fungus is encountered mainly in the anamorphic state which used to be called *Pyricularia oryzae* if it infects the rice. Also, *Magnaporthe grisea* can attack wheat, barley and various wild grasses on which the asexual state is called *P. grisea* (synonym: *Pyricularia oryzae*). The fungus infects any aerial part at all developmental stages of rice, causing leaf, collar,

neck and panicle blast symptoms. Leaf infection reduces the photosynthetic capacity of the plant and can even lead to death of the plant. However, panicle infection that result in yield loss causes great economic damage. Climatic conditions significantly affect the disease establishment, development and severity resulting in large genotype by environment interactions. The majority of field studies about rice blast disease has been conducted in tropical and subtropical environments (Suzuki, 1975; Groth, 2006). Temperature and wetness duration are significant atmospheric parameters influence the relation between fungal plant pathogens and host plants. Temperature generally accelerate biological process and both plant and their pathogens. The wetness duration that a part of plant is subjected to liquid water is an important factor affecting the occurrence and development of disease. Spore germination and appressorium formation require free water. It is both difficult and time consuming for rice breeders to breed for resistance to current strains of blast since blast is a fungus that can evolve and mutate to overcome resistance genes (Zhou et al., 2007). Identifying environmental parameters necessary for the occurrence and development of the disease help to understand the biology and epidemiology of the disease. Integrated management using biofungicides, resistant cultivars, chemical fungicides for foliar spraying and fluxapyroxad for seed application are the most effective tools in management of blast in rice growing areas where conditions are favourable for severe epidemics (Gohel and Chauhan, 2015; Chen et al., 2019; Anonymous, 2020; Kongcharoen et al., 2020). Management of rice blast through breeding blast-resistant varieties had only limited success due to the frequent breakdown of resistance in field conditions (Bonman et al., 1992). Understanding the biology of rice blast disease is therefore of particular significance because it promises to develop new and durable disease control strategies (Skamnioti and Gurr, 2009). Temperature and leaf wetness are important factors deciding the progress of fungal plant diseases (Diéguez-Urbeondo et al. 2011; Uysal and Kurt 2017), because they play a key role in the infection process, namely conidial germination, appressorium formation, and germ tube elongation. Hence, the interactions between leaf wetness duration and temperature are scientifically important, because they were used to create different forecasting models depending on climate parameters.

The objectives of this study were to assign the effects of temperature and duration of leaf wetness on the progress of rice blast disease caused by *P. oryzae* and reactions of Edirne and Osmancik-97 cultivars against blast disease in controlled environment conditions. Knowledge on the effect of climatic parameters could be utility for making or improving a novel forecasting

model which uses for estimate of timing of fungicide applications, so rice blast disease could be controlled with true spray timing and decreasing fungicide spray numbers.

MATERIAL and METHOD

Plant production

For this purpose, rice seeds cvs. Edirne and Osmancık-97 grown commercially in Edirne, Turkey were used in all experiments. The seeds were sown in a mixture (4:1, v/v) of sterilized soil and peat in a 28 cell plastic growing tray. Before sowing, seeds were treated with tap water during about 3-4 days of room temperature, and transferred into growing trays. Rice plants were cultivated in a climatic chamber set at 26°C temperature and 70% humidity.

Preparation of inoculum

P. oryzae isolate PC1 was obtained from infected rice plants from Ceyhan district of Adana province of the Mediterranean Region in 2010. This virulent isolate of *P. oryzae* has been chosen to represent the population of Turkey. Isolation of the pathogen from infected leaf tissue of the rice plant was particularly difficult, because of the contamination of other microorganisms and the slow growing and the non-competitive growth characteristics of *P. oryzae* on an artificial growing medium.

The isolation was achieved by suspending rice leaf with symptomatic blast blades by pasting double sided tape to the lids of 9 cm petri dishes containing water agar. After incubation for 24 h at 26°C, conidia released from the conidiophores were collected on the water agar surface. Fungal hyphae were taken from the agar medium and transferred on PDA (potato dextrose agar, Merck, Darmstadt, Germany) supplemented with 50 mg L⁻¹ streptomycin sulphate. The causal agent was identified based on morphological and cultural characteristics. Virulence test was performed by spraying plants with a suspension of 5x10⁵ conidia ml⁻¹ using a hand held

sprayer to confirm pathogenicity of *P. oryzae* on rice plants. Conidial suspensions were prepared by flooding the surface of the colony with 10 ml of sterile distilled water by gently rubbing the surface with a sterile bent glass rod and filtering the resulting suspension through two layers of cheesecloth. In order to increase conidial density for inoculum concentration desired, the suspension was centrifuged at 3000 rpm for 3 min and the supernatant was discarded. Afterward, remaining conidial pellet were re-suspended with sterile distilled water. The conidial suspension was adjusted to a concentration of 5x10⁵ conidia per ml with an aid of haemocytometer. Following inoculation, plants were covered with polyethylene and incubated at 26°C for 24 hours. Later, polyethylene was removed and rice plants were kept for 6 days at 70% relative humidity (RH). Non inoculated plants sprayed with sterile distilled water served as the control.

The effect of temperature and leaf wetness duration on disease severity

The trial was established to search the effect of temperature and leaf wetness duration on blast infection on both Edirne and Osmancık-97 inoculated with *P. oryzae* in a climatic chamber set from 20 to 32°C temperature, 70% humidity, 12 h fluorescent light and 12 h dark. The experiment included five wetness duration (6, 12, 18, 24 and 30 h) for infection and four temperatures (20, 24, 28 and 32°C) for advance of disease. In the trial, 100 rice plants were used for each combination of temperature and leaf wetness duration and the experiment was repeated twice. This trial was arranged as a split plot design with two replications, using plants of cvs. Edirne and Osmancık-97 inoculated with a suspension of 5x10⁵ conidia per ml of *P. oryzae* by spraying plants with a hand held sprayer. Sterile distilled water was similarly applied on control plants. After all treatment period, rice plants were removed to another climatic chamber with 26°C temperature and a relative humidity of 70%. All inoculated and control rice plants were kept in a controlled climatic chamber as described above (Fig. 1).

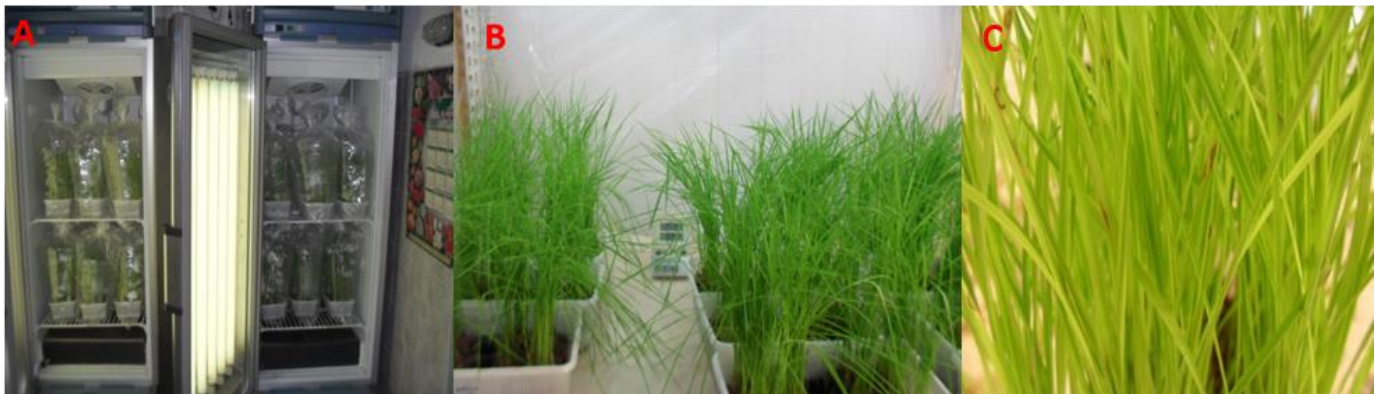


Figure 1. Incubation period of plants after inoculation (A, B) and the period of disease severity assessment (C)
Şekil 1. İnokulasyon sonrası bitkilerin inkübasyon dönemi (A, B) ve hastalık şiddeti değerlendirme dönemi (C)

Disease evaluation on the individual of rice seedlings was performed on a scale (Anonymous, 1996) of 0 to 9 (0= non affected; 1= 1% affected leaf area; 3= 10% affected leaf area; 5= 25% affected leaf area; 7= 50% affected leaf area; 9= more than 50% affected leaf area) seven days after inoculation. Percent disease severity was calculated using the Townsend-Heuberger formula (Townsend and Heuberger, 1943).

Sporulation induction of *Pyricularia oryzae*

P. oryzae often produces small amounts of conidia when grown in artificial growing medium. In order to obtain more sporulation, *P. oryzae* Ceyhan isolate PC1 was grown up at 27°C and under UV-light at 12h day/night cycle for 21 days. Afterward, mycelial discs cut about 1 cm width and 5 cm long like bands were transferred into another petri dishes no including PDA medium. All cultures were incubated at 27°C under UV-light at 12h day/night cycle during about 3-4 days.

Statistical analysis

Statistical analysis of the data was realized using the

Table1. The mean blast severity on cvs. Edirne and Osmancık-97 inoculated with *P. oryzae* at different temperatures and leaf wetness durations

Çizelge 1. P. oryzae'nin farklı sıcaklık ve yaprak ıslaklık sürelerinde çeşitler üzerindeki ortalama hastalık şiddeti

Cultivar	Duration(h)	Temperature (°C)				Average(%)
		20	24	28	32	
Edirne	6	1.0±0.34	3.3±0.45	6.2±0.45	6.8±0.78	4.3
	12	3.0±0.34	4.9±0.23	7.2±0.56	7.6±0.45	5.7
	18	4.7±0.89	6.3±0.78	9.9±0.34	8.3±0.33	7.3
	24	5.4±0.56	8.1±0.34	11.8±0.23	9.3±0.22	8.7
	30	6.6±0.33	8.7±0.45	12.3±0.78	9.8±0.00	9.4
Average		4.1	6.3	9.5	8.7	7.1a
Osmancık-97	6	0.1±0.11	1.0±0.12	2.2±0.45	2.3±0.11	1.4
	12	0.9±0.23	1.6±0.22	2.7±0.22	2.7±0.00	2.0
	18	1.3±0.22	1.9±0.12	3.1±0.23	2.8±0.34	2.3
	24	1.8±0.23	2.4±0.00	3.4±0.11	3.0±0.34	2.7
	30	2.2±0.22	2.7±0.45	4.0±0.23	3.4±0.11	3.1
Avarage		1.3	1.9	3.1	2.8	2.3b
General Average		3.1d	4.7c	7.2a	6.4b	

Values with in the same letter are not significantly different according to Duncan Multiple Range Test ($P= 0.05$).

The current epidemiological study conducted in a controlled environment has demonstrated the efficacy of wetness duration, temperature and cultivars on the progress of rice blast disease. The results of many studies revealed a significant relationship among leaf wetness duration, temperature, and disease severity (MacHardy et al., 1989; Trapero-Casas and Kaiser, 1992; Webb and Nutter, 1997; Uysal and Kurt, 2017). The increase or decrease in disease severity values for different cultivars are most likely due to the susceptibility of cultivars to the blast disease. Miah et al. (2017) explained that resistant cultivars against rice blast disease in compare to susceptible cultivars indicates different degrees of resistance.

SPSS statistics program (version 11.5, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Analysis of variance was performed at the significance level of $P=0.05$. When appropriate, means were separated using Duncan's Multiple Range Test ($P= 0.05$).

RESULTS and DISCUSSION

The effect of temperature and leaf wetness duration on disease severity

At the end of the incubation period, while disease progress occurred in all stages of the trial, there was no symptom of blast disease in the uninoculated control plants. The impact of wetness duration and temperature on the blast severity (%) on cvs. Osmancık-97 and Edirne changed from 0.1 to 12.3. While the lowest disease severity (%) on Edirne and Osmancık-97 varieties were 1 and 0,1 at 20°C temperature and 6-hour leaf wetness, the highest disease severity (%) values were 12.3 and 4.0 at 28°C temperature and 30-hour leaf wetness, respectively (Table 1).

Blast severity increased as temperature and leaf wetness durations increased on cvs. Edirne and Osmancık-97. The highest disease severity (%) values were recorded as 12.3 and 4.0 respectively, while the temperature was 28°C and the duration of leaf wetness was 30 hours (Table1). Although the disease severity increased with increasing leaf wetness at all temperatures, the disease severity (%) value of 32°C was lower than 28°C at 18-hour leaf wetness duration. Minimum 6-hour leaf wetness duration at 20°C was sufficient to the beginning of the rice blast infection for Edirne and Osmancık-97. Disease severity values on Edirne were higher than Osmancık-97 for the same wetness duration and temperature. Studies on the

factors such as temperature, humidity, light intensity and their effects on mycelial development and sporulation of *P. oryzae* were revealed that the optimal temperature for mycelial growth is about 28°C and the growth ranged from 8-9°C to 37°C (Suematsu, 1916; Sawada, 1927; Nisikado, 1927; Abe, 1930; Yoshii, 1936; Ou, 1985), but, optimum growth temperatures can vary from isolate to isolate (Konishi, 1933; Tochinai and Shimamura, 1932; Tseng et al., 1965; Ou, 1985).

Temperature ($P \leq 0.05$) and leaf wetness duration ($P \geq 0.05$) had a major impact on conidial germination, appressorium formation, penetration, rice blast disease development and severity (Figure 2 and 3). Knowledge about the effect of temperature and leaf wetness duration on disease severity on different varieties is vital to assessing the epidemiology of rice blast disease.

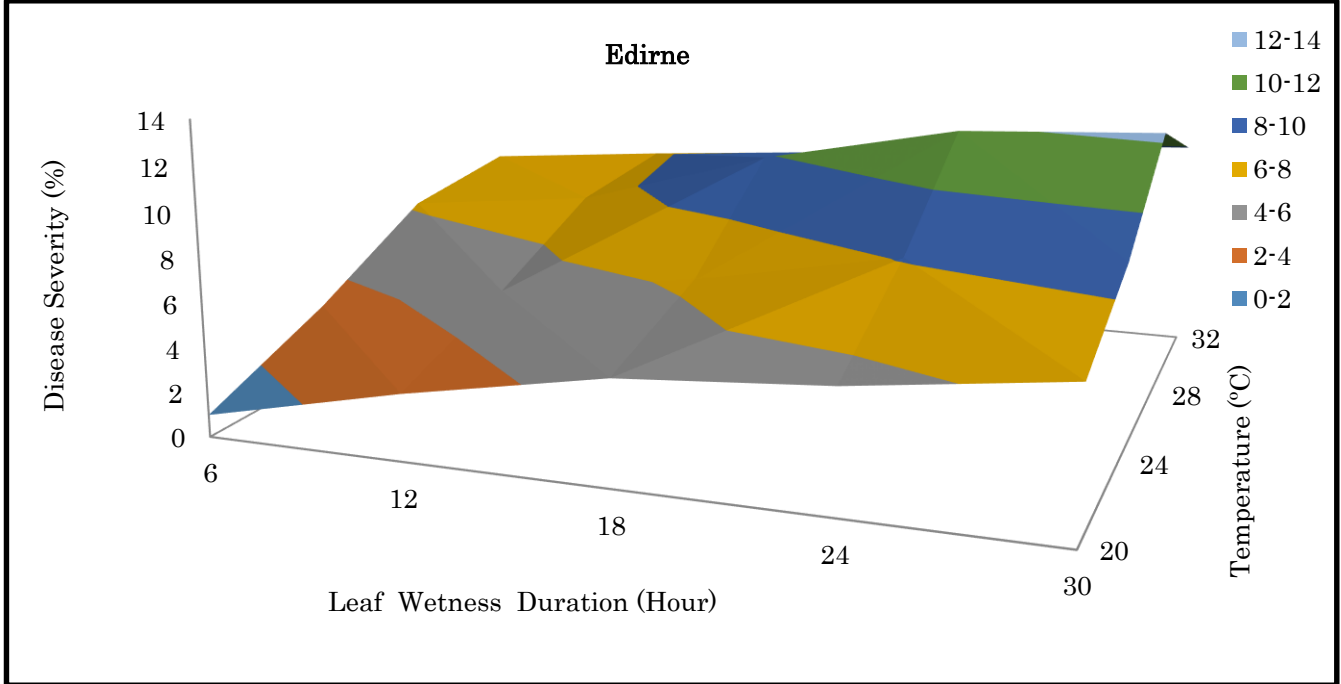


Figure 2. The effects of different temperatures and leaf wetness durations on blast severity in cv. Edirne
Şekil 2. Edirne çeşidinde farklı sıcaklık ve yaprak ıslaklık sürelerinin hastalık şiddeti üzerine etkisi

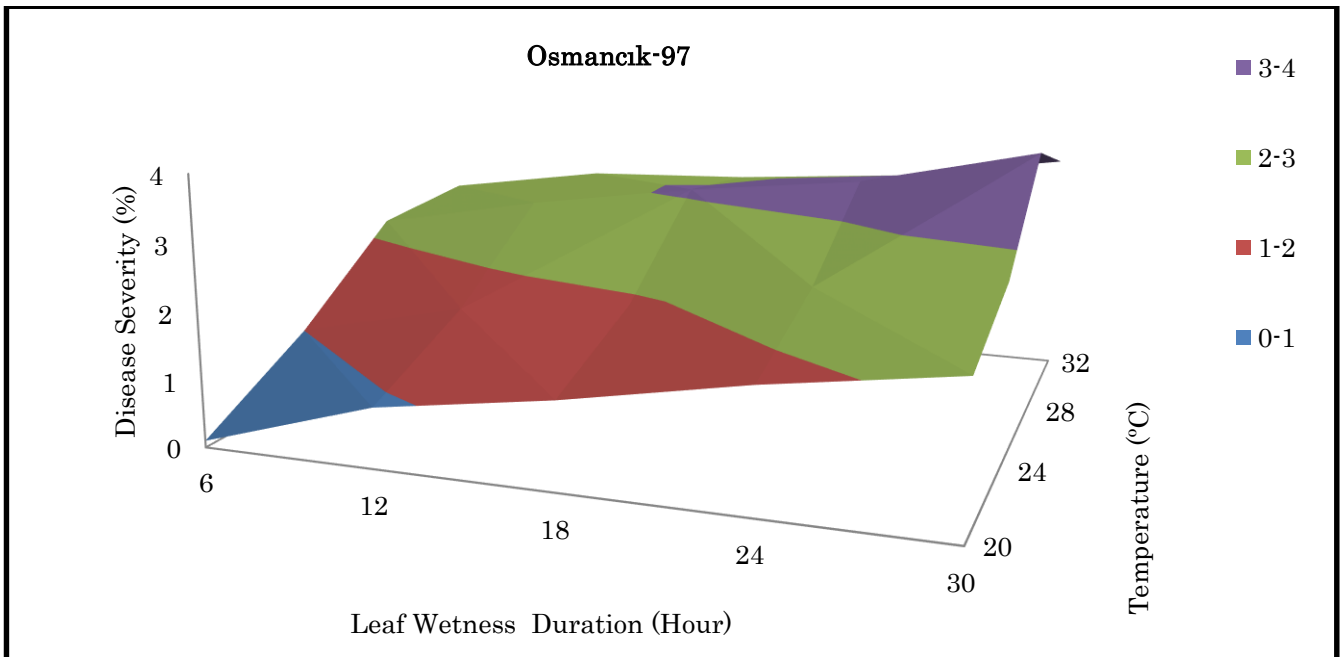


Figure 3. The effects of different temperatures and leaf wetness durations on blast severity in cv. Osmancık-97
Şekil 3. Osmancık-97 çeşidinde farklı sıcaklık ve yaprak ıslaklık sürelerinin hastalık şiddeti üzerine etkisi

Kato (1974) reported that conidial germination of *P. oryzae* can occur in the water within 3 hours. In addition, Rajput et al. (2017) revealed that the highest spore germination and appressoria formation rates occurred within 4 hours at 22, 27 and 32°C.

Rice plants leaves were infected and caused symptoms in all combinations of temperatures and leaf wetness durations by *P. oryzae* isolate PC1. When the effects of temperature and leaf wetness duration interaction on the mean disease severity (%) were compared with Duncan's Multiple Comparison Test (Table 2), the lowest mean disease severity (%) value was 2.7 at 20°C in different leaf wetness durations. The highest mean disease severity (%) value was found as 6.3, while the temperature was 28°C indifferent leaf wetness

duration. Recent research on the effect of temperature on the incidence of the rice blast pathogen *Magnaporthe oryzae* indicated that the infection stages of pathogen such as conidial germination, appressoria formation, penetration and disease development were influenced significantly from temperature. They also reported that the maximum spore germination was observed at 27°C temperature, the spore germination decreased at 22°C and minimum spore germination was observed at 32°C (Rajput et al., 2017). These findings indicated that spore germination was inhibited with higher temperature. The temperature rise can inhibit the MgNIMA gene, which encodes the kinase protein that is a key factor for mitosis. As a result of blocking of mitosis, conidia loses vitality (Liu et al., 2007).

Table2. The effects of interaction between temperatures and leaf wetness durations on the mean blast severity
Çizelge 2. Sıcaklık ve yaprak ıslaklık süresi interaksyonunun ortalama hastalık şiddeti üzerine etkisi

Duration (h)	Temperature (°C)				Average (%)
	20	24	28	32	
6	0.6±0.29 l	2.2±0.70 j	4.2±1.18 f	4.6±1.32 ef	2.9 d
12	2.0±0.63 k	3.3±0.97 hı	5.0±1.34 e	5.2±1.42 de	3.8 c
18	3.0±1.03 ı	4.1±1.32 fg	6.5±1.96 c	5.6±1.62 d	4.8 b
24	3.6±1.13 gh	5.3±1.64 de	7.6±2.41 b	6.2±1.84 c	5.7 a
30	4.4±1.26 f	5.7±1.75 d	8.2±2.43 a	6.6±1.83 c	6.2 a
Average (%)	2.7 d	4.1 c	6.3 a	5.6 b	

Values within the same letter are not significantly different according to Duncan Multiple Range Test (P= 0.05).

Considering different leaf wetness durations, the lowest mean disease severity (%) was recorded as an average of 2.9 in 6-hour leaf wetness. On the other hand, the highest mean disease severity (%) was obtained as an average of 6.2 in 30-hour leaf wetness. Rowlandson (2015) reported that studies have been carried out for centuries on the relationship between leaf wetness duration and the development of fungal diseases. However, it is known that as the wetness duration increases, the rice blast severity increases (Kato,1976). Our data are consistent with the findings of Teng (1994), who reported that the sporulation of *M. oryzae* and disease progress was supported by high humidity (89%), optimum temperature (25–28°C), and minimal 4 hour leaf wetness.

Considering the interactions between temperature and leaf wetness, the lowest mean blast severity (%) was observed in 6 hours of leaf wetness and an average value of 0.6 at 20°C.

The highest mean disease severity (%) was observed with an average value of 8.2 at 28-hour leaf wetness duration and 30°C temperature. According to the statistical analysis mean disease severity (%) values at the end of the leaf wetness period of 24 and 30 hours at 32°C temperature appeared in the same group both in itself and 18-hour leaf wetness duration at 28°C temperature. There were significant interactions

between the temperature and leaf wetness durations. Anderson et al. (1947) whose are studying about infectivity, spreading and continuity of *P. oryzae* reported that it was required to have 16-24 hours of continuous leaf wetness at 24-28°C to produce the most infection on the rice plant.

Sporulation inducing of *Pyricularia oryzae*

With this technique developed in studies on the epidemiology and control measurements of rice blast caused by (*Pyricularia oryzae* Cav.) in Çukurova, it has become quite easy to increase fungal spore production in artificial culture medium (Figure 4 and 5).

CONCLUSION

The current study indicated the impact of leaf wetness duration and temperature on the beginning, progress, infection severity of the rice blast disease at two rice cultivars and also described a simple and effective technique to increase spore density in artificial culture medium. Disease severity was increased by the rising temperature and leaf wetness on Edirne and Osmancık-97 cultivars and the highest disease severity (%) values were recorded at the 28°C temperature and 30-hour leaf wetness duration. 4-hour leaf wetness duration at 20°C was sufficient for

the disease to occur. This information will contribute to the disease forecasting, management, the production of abundant spore for using in artificial

inoculation and for testing of resistant and susceptible genotypes in controlled environment.



Figure 4. Increased spore density in PDA growing medium
Şekil 4 PDA kültür ortamında artan spor yoğunluğu

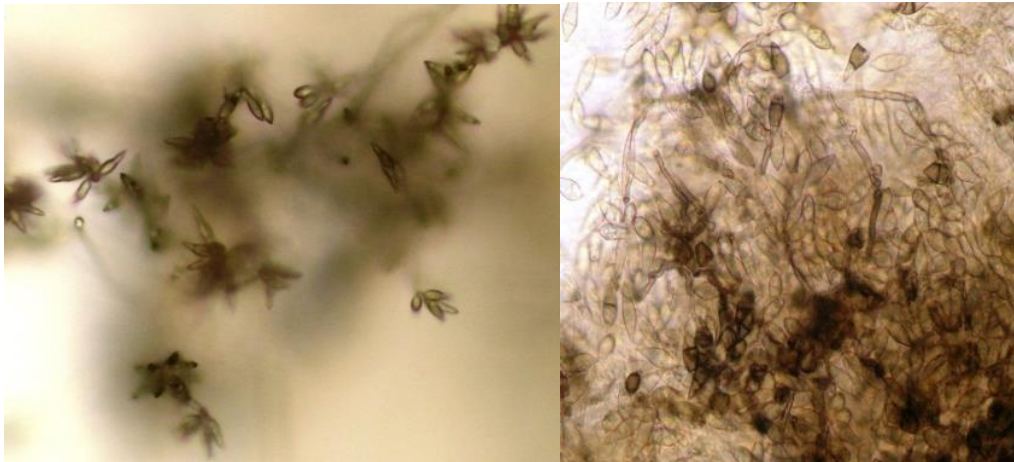


Figure 5. Spore density after treatment on culture medium
Şekil 5. Kültür ortamında uygulama sonrası spor yoğunluğu

ACKNOWLEDGEMENTS

The project was supported by the Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, General Directorate of Agricultural Research and Policies (Project no. TAGEM-BS-10 / 07-04 / 02-11) and Hatay Mustafa Kemal University Scientific Research Projects Unit (Project no. 1101 D 0102). We are thankful to them.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest

REFERENCES

Abe T 1930. The relation of temperature and time to the invasion of rice blast fungus. Annals of the

- Phytopathological Society of Japan 2: 277-278.
Anderson AL, Henry BW, Tullis EC 1947. Factors affecting infectivity, spread and persistence of *Pyricularia oryzae* Cav. Ibid 37: 94-110.
Anonymous 1996. Ziraî mücadele standart ilaç deneme metotları. Tarım ve Köyîşleri Bakanlığı Cilt II: 1821.
Anonymous 2020. Bitki koruma ürünleri veritabanı Tarım ve Orman Bakanlığı. <https://bku.tarimorman.gov.tr/Arama/Index> [Accessed on December 2020].
Aravindan S, Yadav MK, Sharma P 2016. Biological control of rice blast disease with *Trichoderma* spp. under upland rice system. ORYZA-An International Journal on Rice 53(2): 167-173.
Asibi AE, Qiang Chai QC, Coulter JA 2019. Rice blast: A disease with implications for global food security. Agronomy 9: 451.
Bonman JM, Vergel De Dios TI, Bandong JM, Lee EJ

1992. Breeding rice for resistance to pests. *Annu. Rev. Phytopathology* 30: 507-528.
- Castroagudín VL, Moreira SI, Pereira DAS, Moreira SS, Brunner PC, Maciel JLN, Crous PW, McDonald BA, Ceresini PC 2016. *Pyricularia agraminis-tritici*, a new *Pyricularia* species causing wheat blast. *persoonia. Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 37: 199–216.
- Chen WC, Chiou TY, Delgado AL, Liao CS 2019. The control of rice blast disease by the novel biofungicide formulations. *Sustainability* 11: 3449.
- Diéguez-Uribeondo J, Förster H, Adaskaveg JE 2011. Effect of wetness duration and temperature on the development of anthracnose on selected almond tissues and comparison of cultivar susceptibility. *Phytopathology* 101: 1013–1020.
- FAO 2009. FAO's director general on how to feed the world in 2050. Insights from an Expert Meeting at FAO 1: 1-35.
- FAO 2018. Food and Agriculture Organization, Databases. Rice Market Monitor. <http://www.fao.org/3/I9243EN/i9243en.pdf> [Accessed on March 2020]
- FAO 2020. World food situation. <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb>.
- Godfray HCJ, Beddington JR, Crute IR, Haddad L, Lawrence D, Muir JF, Pretty J, Robinson S, Thomas SM, Toulmin C 2010. Food security: The challenge of feeding 9 billion people. *Science* 327: 812–818.
- Gohel HL, Chauhan HL, 2015. Integrated management of leaf and neck blast disease of rice caused by *Pyricularia oryzae*. *Afr. J. Agric. Res.* 10: 2038–2040.
- Groth DE 2006. Azoxystrobin rate and timing effects on rice head blast incidence and rice grain and milling yields. *Plant Disease* 90:1055-1058.
- Kato H 1974. Epidemiology of rice blast disease. *Rev. Plant Prot. Res.* 7:1-20.
- Kato H 1976. Some topics in disease cycle of rice blast and climatic factors. In *Climate and Rice*. International Rice Research Institute, Manila, Philippines, pp. 417-425.
- Khush GS, Jena KK 2009. Current status and future prospects for research on blast resistance in rice (*Oryza sativa* L.) in: Wang GL, Valent B, editors. *Advances in genetics, genomics and control of rice blast disease*. Springer, pp. 1–10.
- Kongcharoen N, Nipon Kaewsalong N, Dethoup T 2020. Efficacy of fungicides in controlling rice blast and dirty panicle diseases in Thailand. *Scientific Reports* 10:16233.
- Konishi S 1933. On the physiologic specialization in the rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Br.et Cav. *Forsch. auf dem Geb. Der Pflanzenkrankh., Kyoto* 2: 55-57.
- Liu XH, Jian Ping L, Lei Z, Bo D, Hang M, Lin F 2007. Involvement of a *Magnaporthe grisea* serine/threonine kinase gene, MgATG1, in appressorium turgor and pathogenesis. *Eukaryotic Cell* 6: 997–1005.
- MacHardy WE, Gadoury DM 1989. A revision of Mill's criteria for predicting apple scab infection periods. *Phytopathology* 79:304-310.
- Miah G, Rafii MY, Ismail MR, Sahebi M, Hashemi FSG, Yusuff O, Usman MG 2017. Blast disease intimidation towards rice cultivation: A review of pathogen and strategies to control. *The Journal of Animal & Plant Sciences* 27(4): 1058-1066.
- Nalley L, Tsiboe F, Durand Morat A, Shew A, Thoma G 2016. Economic and environmental impact of rice blast pathogen (*Magnaporthe oryzae*) alleviation in the United States. *Plosone* 11(12): e0167295. doi:10.1371/journal.pone.0167295.
- Nisikado Y 1927. Studies on rice blast disease. *Japanese Journal of Botany* 3: 239-244.
- Oran YK 1975. Güneydoğu Anadolu'da çeltik Yanıklığı fungusu (*Pyricularia oryzae*)' nun taksonomisi, bioekolojisi, zararı ve çeltik çeşitlerinin dayanıklılığı üzerine araştırmalar. *Bitki Koruma Bülteni* 6(1): 1-46.
- Ou SH, 1985. Blast. in: Ou, SH. (ed) *Rice diseases*. 2nd edn. Wallingford, UK, CAB International, pp. 109-201.
- Rajput LS, Sharma T, Madhusudhan P, Sinha P 2017. Effect of temperature on rice blast infection process with emphasis on appressoria formation by *Magnaporthe oryzae*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6(4): 1931-1939.
- Rowlandson T, Gleason M, Sentelhas P, Gillespie T, Thomas C, Hornbuckle B 2015. Reconsidering leaf wetness duration determination for plant disease management. *Plant Disease* 99(3): 310-315.
- Sawada K 1927. Lecture on the rice blast disease. *Bulletin of the Government Research Institute, Department of Agriculture Formosa* 45:88.
- Singh HS, Kaushik SS, Chauhan MS, Negi RS 2019. Efficacy of different fungicides against rice blast caused by *Pyricularia oryzae* (Cav.) under field condition in Satna district of Madhya Pradesh. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 8(6): 63-69.
- Sirithunya P, Sreewongchai T, Sriprakhon S, Toojinda T, Pimpisithavorn S, Kosawang C, Smitamana P 2007. Assessment of genetic diversity in Thai isolates of *Pyricularia grisea* by random amplification of polymorphic DNA. *Journal of Phytopathology* 156: 196-204.
- Skamnioti P, Gurr SJ 2009. Against the grain: safeguarding rice from rice blast disease. *Trends in Biotechnology* 27:141-150.
- Suematsu N 1916. On the artificial culture of rice blast fungus (*Dactylaria parasitans* Cav.). *Botanical Magazine* 30:97-99.
- Suzuki H 1975. Meteorological factors in the epidemiology of rice blast. *Annual Review of*

- Phytopathology 13: 239-56.
- Talbot NJ 2003. On the trail of a cereal killer: exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. Annual Review of Microbiology 57: 177-202.
- Teng PS 1994. The epidemiological basis for blast management. In: rice blast disease. R. S. Zeigler and S. A. Leong, eds. CAB International, Wallingford, U.K.
- Trapero-Casas A, Kaiser WJ 1992. Development of *Didymella rabiei* the teleomorph of *Ascochyta rabiei*, on chickpea straw. Phytopathology 82(11): 1261-1266.
- Tseng TC, Yuan CS, Wu LC 1965. Temperature response of *Piricularia oryzae* Cav. isolated in different seasons in Taiwan. Botanical Bulletin of Academia Sinica 6: 93-100.
- Tochinai Y, Shimamura M 1932. Studies on the physiologic specialization in *Piricularia oryzae* Br. et Cav. Annals of the Phytopathological Society of Japan 2: 414-441.
- Townsend GK, Heuberger JW 1943. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. Plant Disease Report 27: 340-343.
- TUIK 2018. Turkish statistical institute Crop Production Statistics. <http://www.tuik.gov.tr> [Accessed on March 2020].
- Uysal A, Kurt Ş 2017. Influence of inoculums density, temperature, wetness duration and leafage on infection and development of spinach anthracnose caused by the fungal pathogen *Colletotrichum spinaciae*. Eur J Plant Pathol. DOI 10.1007/s10658-017-1249.
- Yoshii H 1936. Pathological studies of rice blast caused by *Piricularia oryzae*. I. some studies on the physiology of the pathogen. II. the mode of infection of the pathogen. Annals of the Phytopathological Society of Japan 6: 199-218.
- Webb DH, Nutter FW 1997. Effects of leaf wetness duration and temperature on infection efficiency, latent period, and rate of pustule appearance of rust in alfalfa. Phytopathology 87: 946-950.
- Zhou E, Jia Y, Singh P, Correll J, Lee F 2007. Instability of the *Magnaporthe oryzae* a virulence gene AVR-pita alters virulence. Fungal Genet. Biol. 44: 1024-1034. doi: 10.1016/j.fgb.2007.02.003 PMID:17387027.

Antepfıstığı Dalgüvesi, *Kermania pistaciella* Amsel (Lepidoptera: Tineidae) 'nın Braconidae ve Ichnemonidae Familyasından Yeni Kayıt Parazitoitleri

Yasemin Bengü ŞAHAN¹, Hasan TUNAZ²

¹Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Şahinbey-Gaziantep, ²KSÜ Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Avşar Kampüsü, 46100 Onikişubat-Kahramanmaraş

¹<https://orcid.org/0000-0002-9470-3406>, ²<https://orcid.org/0000-0003-4942-6056>

✉: yaseminbengu.sahan@tarimorman.gov.tr

ÖZET

Antepfıstığı Dalgüvesi [*Kermania pistaciella* Ams. (Lep: Tineidae)] ekonomik anlamda zarar yapan türler arasında olup, Antepfıstığı yetiştirilen bütün alanlarda bulunmaktadır. Bu çalışma ile; antepfıstığı dalgüvesi (*K. pistaciella*) 'nın 2015-2017 yılları arasında Gaziantep ilinde üç farklı alanda (Alahacı Mahallesi (705 m), Yağmuralan Mahallesi (531 m) ve Merkez Şahinbey İlçesi (856 m)) yerleştirilen kültür kafeslerinde parazitoit çıkış seyri takip edilmiştir. Elde edilen verilere göre; 5 tür Braconidae [*Chelonus (Microhelonus) karakumicus* (Tobias, 1966) (Hym., Braconidae, Cheloninae), *Mirax rufilabris* (Haliday, 1833) (Hym., Braconidae, Miracinae), *Chelonus (Microhelonus) karakumicus* (Tobias, 1966) (Hym., Braconidae, Cheloninae), *Chelonus (Microchelonus) latrunculus* Marshall (Hym., Braconidae, Cheloninae), *Chelonus (Microchelonus) sulcatus* Jurine, 1807 erkek (Hym., Braconidae, Cheloninae) *Chelonus (Microchelonus) chetini* Beyarslan and Şahan sp. nov. dişi (Hym., Braconidae, Cheloninae)], 4 tür Ichnemonidae familyasından parazitoit [*Gelis imitatus* nov. sp. (Hym., Ichnemonidae, Cryptinae), *Gelis kermaniae* (Hym., Ichnemonidae, Cryptinae), *Gelis cinctus* (Hym., Ichnemonidae, Cryptinae), *Mesostenus transfuga* (Hym., Ichnemonidae, Cryptinae)]; tespit edilmiştir. *Chelonus (Microhelonus) karakumicus*, *Gelis kermaniae*, *Gelis cinctus*, *Chelonus (Microchelonus) sulcatus* parazitoit türleri Türkiye için yeni kayıttır. *Mesostenus transfuga* ve *Chelonus (Microchelonus) latrunculus* türleri Türkiye'de daha önceden tespit edilmiş olup, *K. pistaciella* üzerinde ilk kez saptanmıştır. Ayrıca, *Gelis imitatus* sp. nov. ile *Chelonus (Microchelonus) chetini* Beyarslan and Şahan sp. nov. türleri dünya için yeni kayıt niteliğindedir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 01.10.2020

Kabul Tarihi : 07.01.2021

Anahtar Kelimeler

Braconidae, Ichnemonidae

Kermaniae pistaciella (Amsel)

Parazitoit

Yeni kayıt

Contribution to the Fauna of Braconidae and Ichnemonidae Parasitoids of Pistachio twig borer moth *Kermania pistaciella* Amsel (Lepidoptera: Tineidae) With the Description of New Species

ABSTRACT

Pistachio twig borer moth [*Kermania pistaciella* Ams. (Lepidoptera: Tineidae)] is one of the pest species causing economical damage in all pistachio cultivation areas in Turkey. In this study, we investigated parasitoids of *K. pistaciella* larvae and pupae in culture cages placed in three different areas (Alahacı District (705 m), Yağmuralan District (531 m) and the Şahinbey District (856 m) between 2015-2017. The parasitoid species were identified as Braconids; [*Chelonus (Microhelonus) karakumicus* (Tobias, 1966) (Hym., Braconidae, Cheloninae), *Mirax rufilabris* (Haliday, 1833) (Hym., Braconidae, Miracinae), *Chelonus (Microhelonus) karakumicus*, *Chelonus (Microchelonus) latrunculus* Marshall, *Chelonus (Microchelonus) sulcatus* Jurine, 1807 male (Hym., Braconidae, Cheloninae), *Chelonus (Microchelonus) chetini* Beyarslan and Şahan sp. nov. female (Hym., Braconidae, Cheloninae)] and the Ichneumonids [*Gelis imitatus* nov. sp. (Hym.,

Research Article

Article History

Received : 01.10.2020

Accepted : 07.01.2021

Keywords

Braconidae

Ichnemonidae

Kermaniae pistaciella (Amsel)

Parasitoid

New record

Ichnemonidae, Cryptinae), *Gelis kermaniae* (Hym., Ichnemonidae, Cryptinae), *Gelis cinctus* (Hym., Ichnemonidae, Cryptinae), *Mesostenus transfuga* (Hym., Ichnemonidae, Cryptinae)]. *Chelonus (Microchelonus) karakumicus*, *Gelis kermaniae*, *Gelis cinctus*, *Chelonus (Microchelonus) sulcatus* were first record in Turkey. *Mesostenus transfuga* and *Chelonus (Microchelonus) latrunculus* are already determined in Turkey but found first record for parasitoid of *Kermania pistaciella*. Additionally, *Gelis imitatus* sp. nov. and *Chelonus (Microchelonus) chetini* Beyarslan and Şahan sp.nov. were recorded as new species.

Atıf İçin: Şahan Y.B, Tunaz H 2021. Antepfıstığı Dalgüvesi *Kermania pistaciella* Amsel (LEPIDOPTERA:TINEIDAE) 'nın Braconidae ve Ichnemonidae Familyasından Yeni Kayıt Parazitoitleri. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1230-1236. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.803418.

To Cite : Şahan Y.B, Tunaz H 2021. Contribution to the Fauna of Braconidae and Ichnemonidae Parasitoids of Pistachio twig borer moth *Kermania pistaciella* Amsel (Lepidoptera: Tineidae) With the Description of New Species. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1230-1236. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.803418.

GİRİŞ

Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde tarihin eski dönemlerinden bu yana yetiştiriciliği yapılan antepfıstığı meyvesi; içerdiği protein, antioksidanlar, aroma, vitamin ve minerallerin zenginliği ile birlikte kullanıldığı her gıda maddesinin kalite ve lezzetini arttırarak Bölge üreticisine önemli derecede ekonomik katkı sağlamaktadır. Ayrıca bu Bölgede, sulama suyunun sınırlı, yağış miktarının az (300-500 mm) ve birçok kültür bitkisi tarafından ekonomik olarak değerlendirilemeyen topraklarda, antepfıstığı yetiştirilmesi hem ülke ve hem de çiftçi ekonomisi için büyük bir kazançtır. Bölgede 200 bin ailenin geçim kaynağını antepfıstığı oluşturmaktadır (Arpacı, 2010).

Dünyada önemli antepfıstığı üreticisi ülkeler incelendiğinde 2016-2019 yılları arasında ortalama, 364.321 ton üretimiyle A.B.D. birinci sırada yer alırken, bunu 158.750 ton ile İran izlemektedir. Türkiye 143.250 ton üretimi ile üçüncü, Çin 77.064 ton ile dördüncü ve Suriye 35.808 ton üretimi ile beşinci sırada yer almaktadır (Aslan 2020).

Türkiye'de başta Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki iller olmak üzere antepfıstığının yoğun olarak yetiştirildiği illerde meyve veren antepfıstığı ağaçlarının sayısı Gaziantep'te 17.181.970 adet, Şanlıurfa'da 13.811.910 adet, Adıyaman'da 4.452.832 adet, Kahramanmaraş'ta 798.250 adet ve Siirt'te 2.809.000 adettir (TUİK, 2017). Yıllık antepfıstığı üretiminin büyük çoğunluğu Güneydoğu Anadolu ve Doğu Anadolu bölgesindeki illerden elde edilmektedir. Ayrıca; yeni antepfıstığı plantasyonlarının artmasıyla gelecekte meyve veriminin, bunun yanında da ekonomik kazancın yükselmesi beklenmektedir.

Ülke ekonomisine önemli katkı sağlayan antepfıstığında aynı yılın ürününü, bir yıl sonraki ürününü (karagözleri) ve antepfıstığı ağacını zarara uğratan; ürünün verim ve kalite değerini düşüren farklı böcek türleri bulunmaktadır. Özer (1958)

Balıkesir ve Kütahya illeri yabani antepfıstığı alanlarında, Ulu ve ark. (1972) Ege Bölgesi'nde, Çelik (1975) Gaziantep'te; Günaydın (1978), Altın, ve Bolu, (2002) Güneydoğu Anadolu Bölgesi antepfıstığı alanlarında yaptıkları çalışmalarda 40'ın üzerinde zararlı böcek ve akar türü saptamışlardır.

Bu önemli zararlılardan Antepfıstığı dalgüvesinin Gaziantep, Şanlıurfa ve Siirt'te yoğun olduğu yapılan ön çalışmalarda belirlenmiştir. Zararlı kışı bir yıllık sürgünler içerisinde geçirerek meyve gözlerinin dökülmesine sebep olarak ürün kaybına neden olmakta, beslenmesi sırasında zarar gören sürgünde meyve gözleri ve yapraklar dökülmekte, sürgünler kısa kalmaktadır. Larvalar ikinci zararını ise cumba denilen meyve salkımlarına vermektedir. Salkımların içeri giren larva salkım saplarında beslenmekte, bu nedenle meyveler gelişmemekte veya dökülmektedir.

Antepfıstığı üretimi yapılan farklı ülkelerden İran'da Mehrnejad (2001, 2003), Emami ve ark., (2004), Bassirat (2005), Gries ve ark. (2006), Manikavasagam ve ark., (2008), Abbaszadeh ve ark. (2006, 2011), İzadi ve ark. (2011), Tezerji, (2011), Arbabtafti ve ark. (2012), Mollaei ve ark. (2017), *K. pistaciella*'nın biyolojisi, gelişme eşiği, zarar eşiği, populasyon takibi, bazı morfolojik özellikleri, parazitoitleri ve mücadelesi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Türkiyede Küçükarslan (1966), Mart ve ark. (1995), Bolu (2002), Özgen ve ark. (2012), Şimşek ve Bolu (2016), Yanık ve ark. (2016), yapmış oldukları çalışmalarla *K. pistaciella*'nın bazı biyolojik ve morfolojik özellikleri, populasyon takibi, parazitoitleri ve mücadelesine yönelik önemli veriler elde etmişlerdir.

Bu nedenle; antepfıstığı dalgüvesi (*K. pistaciella*)'nın biyolojik mücadelesi ile ilgili çalışmalara zemin oluşturulması amacıyla farklı rakımlara sahip üç yörede (Alahacı Mahallesi (705 m), Yağmuralan Mahallesi (531 m) ve Gaziantep Merkez Şahinbey İlçesi (856 m)) parazitoitleri saptanmıştır.

MATERYAL ve METOT

Zararlının ergin ve parazitoit çıkışlarını izlemek amacıyla 2015-2018 yıllarında Gaziantep Şahinbey ilçesi ve 2015-2017 yılları arasında Alahacı, Yağmuralan mahallelerine Şubat ayı sonunda ikişer adet 70×70×100 cm boyutlarında tül (insect net) ile çevrili kültür kafesi bırakılmıştır. Kafeslerin her birine yine Şubat-Mart aylarında toplanan üzerinde pupa tespit edilen bir ya da iki yaşında sürgün dallar budama makası ile kesilerek yerleştirilmiştir. Çalışmada 2015 yılında tüm lokasyonlarda kültür kafeslerine 100'er adet pupalı sürgün konmuştur. Bununla birlikte 2015 yılında Gaziantep Şahinbey ilçesindeki deneme alanından toplanan erginlerin sayısı yapılmış olan diğer çalışmalarda kullanılmak için yetersiz bulunduğundan, çalışmanın yapıldığı diğer yıllarda, Şahinbey ilçesindeki kafeslerde pupalı sürgün sayısı artırılarak 600 adet yerleştirilmiştir. Vitpherolure KP ticari isimli, [(2S, 12Z)-2-Acetoxy-12-heptadecene] etken maddeli, Scentomos Research and Development INC tarafından üretilip Verim İnşaat ve Turizm LTD. ŞTİ. tarafından ithal edilen feromon tuzaklar her lokasyona ikişer adet yerleştirilmiştir.

Alahacı ve Yağmuralan yörelerindeki kafeslerde feromon tuzaklarında ilk erginler yakalandıktan sonra haftalık olarak, Gaziantep Şahinbey Enstitü bahçesinde bulunan kafeste ise günlük sayımlar yapılmıştır. Böylece doğal koşullarda zararlının ergin

ve parazitoitlerinin çıkışı belirlenmiştir.

Örnekleme Yöntemi

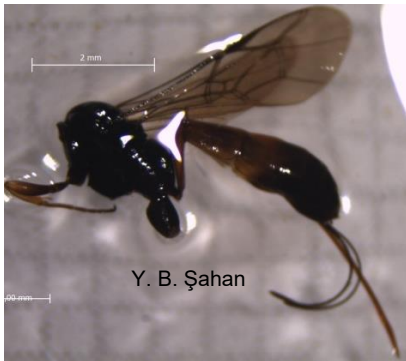
Kültür kafesinden ağız aspiratörü ile toplanan ve laboratuvara getirilen parazitoit örnekleri içinde % 70'lik etil alkol bulunan tüpler içinde muhafaza edilerek teşhis için hazırlanmıştır.

Parazitoit teşhisleri

Braconidae örnekleri, Bitlis Eren Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Prof. Dr. Ahmet BEYARSLAN, Ichneumonidae, Cryptinae örnekleri Avusturya Landes Müzesinden Prof. Dr. Martin SCWARZ tarafından teşhis edilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Kermania pistaciella'nın doğal koşullarda parazitoitlerinin belirlenmesi çalışmaları 2015-2017 yılları arasında Gaziantep İli Şahinbey İlçesi Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü bahçesi, Nizip ilçesi Yağmuralan ve Alahacı mahalleleri çiftçi bahçelerinde yürütülmüştür. 2015 yılında kültür kafesinden elde edilen parazitoitler *C. karakumicus* (Şekil 1 ve 2) ve *M. rufilabris* (Şekil 3) olarak teşhis edilmiştir. 2016 yılında elde edilen parazitoitler *C. karakumicus* ve *M. rufilabris*, *G. imitatus* nov. sp.



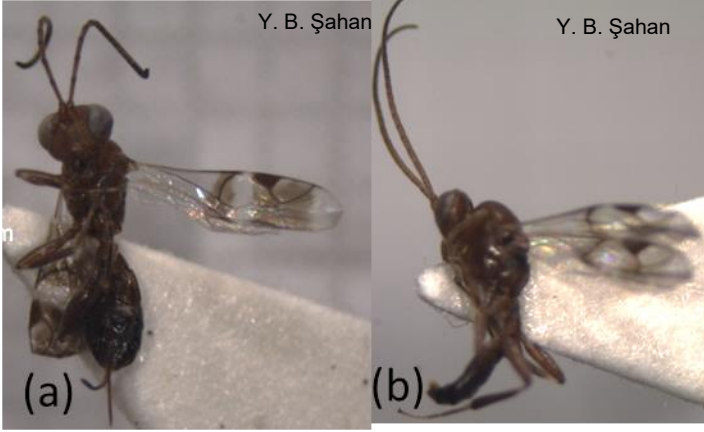
Şekil 1. *Mesostenus transfuga*
Figure1. *Mesostenus transfuga*



Şekil 2. *Chelonus (Microhelonus) karakumicus*
Figure2. *Chelonus (Microhelonus) karakumicus*



Şekil 3. *Mirax rufilabris*
Figure3. *Mirax rufilabris*



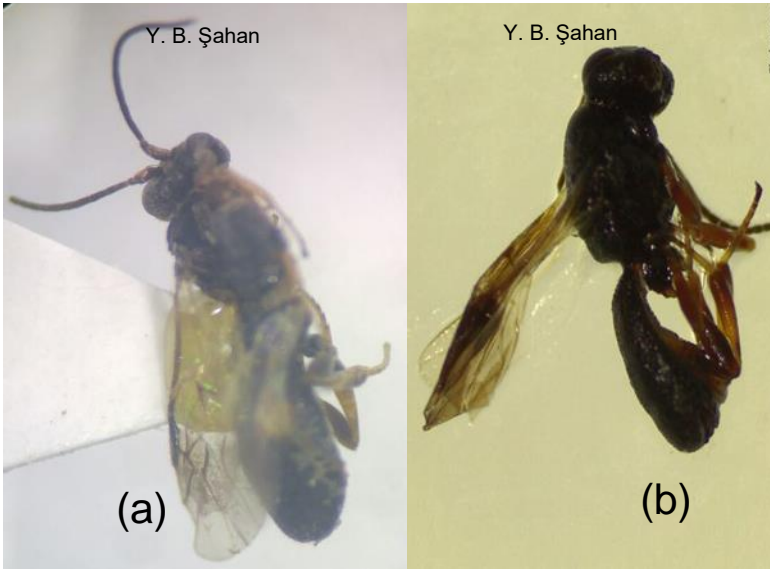
Şekil 4. *Gelis imitatus* erkek (a) ve dişi (b)
Figure 4. *Gelis imitatus* male (a) and female (b)



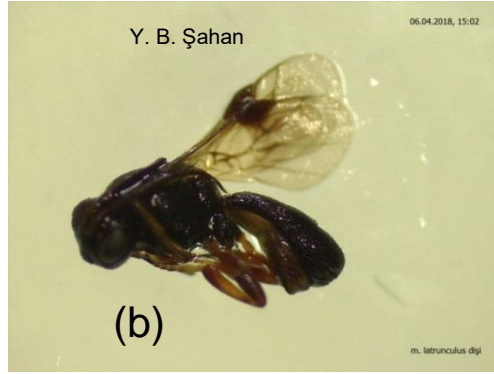
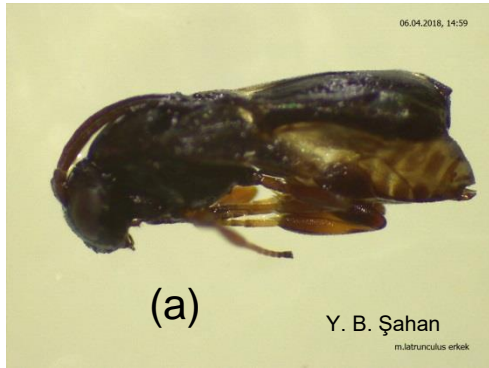
Şekil 5. *Gelis cinctus* dişi
Figure 5. *Gelis cinctus* female



Şekil 6. *Gelis kermaniae* dişi
Figure 6. *Gelis kermaniae* female



Şekil 7. *Chelonus sulcatus* erkek (a) ve dişi (b)
Figure 7. *Chelonus sulcatus* male (a) and female (b)



Şekil 8. *Chelonus latrunculus* erkek (a) ve dişi (b)
Figure 8. *Chelonus latrunculus* male (a) and female (b)



Şekil 9. *Chelonus chetini* Beyarslan and Şahan sp. nov.
Figure 9. *Chelonus chetini* Beyarslan and Şahan sp. nov.

Çizelge 1 Yıllara göre parazitoit sayısı
Table 1 Number of parasitoids by years

Tür <i>Species</i>	Takım <i>Order</i>	Familya <i>Family</i>	2015 <i>2015</i>	2016 <i>2016</i>	2017 <i>2017</i>
<i>Mirax rufilabris</i>	Hymenoptera	Braconidae	3	23	22
<i>Chelonus karakumicus</i>	Hymenoptera	Braconidae	18	169	0
<i>Chelonus sulcatus</i>	Hymenoptera	Braconidae	0	0	11
<i>Chelonus latrunculus</i>	Hymenoptera	Braconidae	0	0	34
<i>Chelonus chetini</i>	Hymenoptera	Braconidae	0	0	86
<i>Gelis imitatus</i>	Hymenoptera	Ichneumonidae	0	3	
<i>Gelis kermaniae</i>	Hymenoptera	Ichneumonidae	0	1	5
<i>Gelis cinctus</i>	Hymenoptera	Ichneumonidae	0	1	
<i>Mesostenus transfuga</i>	Hymenoptera	Ichneumonidae	0	1	

(dişi) (Şekil 4.b), *G. imitatus* nov. sp. (erkek) (Şekil 4.a), *G. kermaniae* (dişi) (Şekil 6), *G. cinctus* (dişi) (Şekil 5) ve *M. transfuga* (dişi) (Şekil 1) olarak teşhis edilmiştir. 2017 yılında elde edilen parazitoitler ise *M. rufilabris*, *C. latrunculus* erkek (Şekil 8.a), *C. latrunculus* dişi (Şekil 8.b), *C. sulcatus* (Şekil 7.a), *C. sulcatus* dişi (Şekil 7.b) ve *C. chetini* dişi olarak teşhis edilmiştir.

2015-2017 yılları arasında tüm loksayonlardan elde edilen parazitoit sayıları toplamı verilmiştir (Çizelge 1). 2017 yılında elde edilen 5 adet Hym; Ichneumonidae örneğinin teşhisi yapılamadığı için tür bilgisi bulunmamaktadır. Türkiye'de Şimşek ve Bolu

(2016), *Dinocampus coccinellae* Shrank (Hym: Braconidae)'nin antepfıstığında zararlı *K. pistaciella*'nın parazitoiti olarak Dünya'da ilk kayıt olduğunu, Özgen ve ark., ise Siirt Aydınlar yöresinde iki yeni parazitoit türü *Chelonus flavipalpis* Szépligeti ve *Mirax rufilabris* Haliday (Hymenoptera: Braconidae)'nin tespit edildiğini belirtmişlerdir. İran'da yürütülen çalışmalarda ise, Abbaszadeh ve ark. (2006), türü belirlenmemiş olan 3 parazitoit (*Chelonus* sp. (Hym: Braconidae), *Pteromalus* sp. (Hym: Pteromalidae) ve bir Ichneumonidae), Manickavasagam ve ark. (2008), *K. pistaciella*'nın pupalarında ve birincil parazitoiti olan *Chelonus kermakiae* Tobias (Hymenoptera: Braconidae)'de

hiperparazitoiti olan *Cheiloneurus pistaciae* sp. nov (Hymenoptera: Encyrtidae)'yi tespit etmişlerdir. Mehrnejad ve Basirat (2009), ise *K. pistaciella* 'nın 15 adet hymenoptera türü parazitoitini tespit etmiş, bunlardan 3 tür primer parazitoit, 2 tür hiperparazitoit, 10 tür fakültatif hiperparazitoit olduğunu bu türlerden % 85 'ini *C. kermakiaé* nin oluşturduğunu belirtmiştir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

2015-2017 yılları arasında teşhis edilen *Chelonus (Microchelonus) karakumicus*, *Gelis kermaniae*, *Gelis cinctus*, *Chelonus (Microchelonus) sulcatus* parazitoit türlerinin Türkiye için yeni kayıttır. *Mesostenus transfuga* ve *Chelonus (Microchelonus) latrunculus* türleri Türkiye'de daha önceden tespit edilmiş olup, *K. pistaciella* üzerinde parazitoit olarak ilk kez saptanmıştır. Ayrıca, *Gelis imitatus* sp. nov. ile *Chelonus (Microchelonus) chetini* Beyarslan & Şahan sp. nov. türleri dünya için yeni kayıt niteliğindedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü tarafından desteklenmiştir (Proje No: TAGEM-BS-14/08-09/01-14). Çalışmada parazitoitlerin toplanması ve takibinde emeği geçen Antepfıstığı Araştırma Enstitüsü'nden Ahmet ŞAHAN (Antep Fıstığı Araştırma Enstitüsü, Gaziantep)'a, tür teşhislerini yapan, Prof. Dr. Ahmet BEYARSLAN (Bitlis Eren Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Bitlis) ve Prof. Dr. Martin SCWARZ (Avusturya Landes Müzesi, Avusturya)'a teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

Abbaszadeh G, Seiedoleslami H, Samih M A, Hatami B 2006. Bioecology of Pistachio Twig Borer Moth *Kermania pistaciella* Amsel, in Rafsanjan and Isfahan-Iran. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 71(2): 563-569.

Abbaszadeh G, Seiedoleslami H, Hatami B 2011. Ecological, Cultural and Pheromonal Studies on Pistachio Wood Borer, *Kermania pistaciella* A. Annals of Plant Protection Sciences 19(1): 25-28.

Altın M, Bolu H 1992. Güneydoğu Anadolu Bölgesi Antepfıstığı Alanlarında Önemli Bazı Zararlı ve Yararlı Türlerin Popülasyon Değişimlerinin

Belirlenmesi Üzerine Araştırmalar; Diyarbakır Project Report, BKA/04-E-045.

Arbabafti R, Sheikhigharjan A, Mahmoudvand M, Mohammadipour A 2012. Cost-Benefit Analysis of Pistachio Twig Borer, *Kermania pistaciella* Amsel (Lepidoptera: Oinophylidae) Chemical Control. Archives of Phytopathology and Plant Protection 45(16): 1972-1979.

Arpacı S 2010. Antepfıstığı ve Geleceği, TMMOB Kent Sempozyumu, 15-16 Ekim 2010, Gaziantep.

Aslan N 2020. Antepfıstığı İstatistikleri, Antepfıstığı Araştırma Dergisi 8: 2-5.

Bassirat M 2005. Determination of Heat Requirements for Pistachio Twig Borer Moth, *Kermania pistaciella*. IV International Symposium on Pistachios and Almonds. ISHS Acta Horticulturae 726: 519-524.

Bolu H 2002. Güneydoğu Anadolu Bölgesi Antepfıstığı Alanlarındaki Böcek ve Akar Faunasının Saptanması. Türkiye Entomoloji Dergisi 26(3): 197-208.

Çelik MY 1975. Gaziantep İli'nde Antepfıstığının zararlıları ve Bunların Faydalı Böcekleri Üzerinde Çalışmalar. Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı 9:43-44.

Emami Y, Aliakbar A, Farivar Mehin H, Rajabi A, Hajabdollahi M 2004. Study on Possibility of Extraction and Identification of Pistachio Twig Borer Sexual Pheromone (*Kermania pistaciella*). Pistachio Reseach Institute (PRI) 2009 33 s. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=IR2008000671>.

Gries R, Khaskin G, Daroogheh H, Mart C, Karadag S, Er MK 2006. (2S, 12Z)-2-Acetoxy-12-heptadecene: Major Sex Pheromone Component of Pistachio Twig Borer, *Kermania pistaciella*. Journal of Chemical Ecology 32(12): 2667-2677.

Günaydın T 1978. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde Antepfıstıklarında Zarar Yapan Böcek Türleri, Tanımları, Yayılışları ve Ekonomik Önemleri Üzerinde Araştırmalar. Diyarbakır Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü, Yayınlanmamış Uzmanlık Tezi 106 sy.

Izadi H, Samih MA, Behroozy E, Hadavi F, Mahdian K 2011. Energy Allocation Changes During Diapause in Overwintering Larvae of Pistachio Twig Borer, *Kermania Pistaciella* Amsel (Lepidoptera: Tineidae) in Rafsanjan. Arpn Journal of Agricultural and Biological Science 6(5): 12-17.

Küçükarslan N 1966. Antepfıstıklarında Zarar Yapan Fıstık Dalgüvesi (*Kermania pistaciella* Amsel, Lep. – Oinophilidae) 'nin Biyoloji ve Savaşı Üzerinde Bazı İncelemeler, Sabri A.Ş. Basımevi, İstanbul, 64 s.

Manickavasagam S, Mehrnejad MR, Noyes JS 2008. *Cheiloneurus pistaciae* sp. nov. (Hymenoptera:

- Encyrtidae) A Facultative Hyperparasitoid of *Kermania pistaciella* Amsel (Lepidoptera: Tineidae), A Pest of Pistachio Trees in Iran. *Zootaxa* 1958(1): 61-64.
- Mart C, Yigit A, Çelik MY 1995. Biological Observations and Chemical Control of Pistachio Twig Borer, *Kermania pistaciella*, Injurious in Pistachio Orchards in Turkey. *ISHS Acta Horticulturae* 419: I International Symposium on Pistachio 373-378 sy.
- Mehrnejad MR 2001. The Natural Parasitism Ratio of The Pistachio Twig Borer Moth, *Kermania pistaciella*, in Iran. III International Symposium on Pistachios and Almonds. *ISHS Acta Horticulturae* 591: 541-544.
- Mehrnejad MR 2003. The Influence of Host Species on Some Biological and Behavioural Aspects of *Dibrachys boarmiae* (Hymenoptera: Pteromalidae), Parasitoid of *Kermania pistaciella* (Lepidoptera:Tineidae). *Biocontrol Science and Technology* 13(2): 219-229.
- Mehrnejad MR, Basirat M 2009. Parasitoid complex of the pistachio twig borer moth, *Kermania pistaciella*, in Iran. *Biocontrol Science and Technology* 19(5): 499-510.
- Mollaei M, Izadi H, Moharramipour S, Moghadam EB 2017. Physiology of Hibernating Larvae of the Pistachio Twig Borer, *Kermania pistaciella* Amsel (Lepidoptera: Tineidae). Collected From Akbari Cultivar of *Pistacia vera* L. *Neotropical Entomology* 46(1): 58-65.
- Özer M 1958. Balıkesir ve Kütahya Vilayetlerindeki Yabani Antepfıstıklarında Rastlanan Bazı zararlılar üzerinde incelemeler. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yıllığı* 8(2):111-120.
- Özgen İ, Bolu H, Beyarslan A 2012. *Chelonus flavipalpis* Szépligeti, 1896 and *Mirax rufilabris* Haliday, 1833 (Hymenoptera: Braconidae): Two New Larva-Pupa Parasitoids of Pistachio Twig Borer *Kermania pistaciella* Amsel, 1964 (Lepidoptera: Oinophilidae) With the Parasitization Ratios From Turkey. *Munis Entomology and Zoology* 7(1): 238-242.
- Şimşek A, Bolu H 2016. Determination of The Beneficial Insect Fauna in Pistachio (*Pistacia vera* L.) Areas in Diyarbakır Province. *Bitki Koruma Bülteni* 56(3): 267-282.
- Tezerji ZS 2011. Determination of Damages of Pistachio Twig Borer Moth *Kermania pistaciella* Amsel, to Fruit Clusters of Pistachio Trees. V. International Symposium on Pistachios and Almonds. *ISHS Acta Horticulturae* 912: 701-707.
- TÜİK 2017. Türkiye İstatistik Kurumu URL: <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=92,locale=tr> (erişim tarihi: 27.01.2018)
- Ulu O, Zümreoğlu A, San S 1972. Ege Bölgesi'nde Antepfıstığı Zararlıları İle Bunların Parazit ve Predatörleri Üzerinde Ön Çalışmalar. *Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı*, 6:55.
- Yanık E, Yildirim Y 2016. Effectiveness of Mass Trapping for Control of The Pistachio Twig Borer, *Kermania pistaciella*. *Bulletin of Insectology* 69(1): 35-40.
- Yanık E, Karadağ S, Ünlü L, Sırt A, Evelekler H, Sinangil F 2016. Antepfıstığı Dal Güvesi, *Kermania pistaciella* Amsel (Lepidoptera: Oinophilidae)'nın Türkiye'de Sentezlenen Eşeyssel Feromonunun Etkinliğinin Belirlenmesi Uluslararası Katılımlı Türkiye VI. Bitki Koruma Kongresi 5-8 Eylül 2016 Konya, Türkiye Özet Kitabı 174 s.

Yerel Diatomit Topraklarının Kokusuz Toz Sarımsak İle Karışımının Kıрма Biti, *Tribolium confusum* du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae)'ne Karşı Etkinliği

Merve GÖKÇE¹, Ali Arda İŞİKBER^{2*}, Özgür SAĞLAM³

^{1,2}Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Kahramanmaraş, ³Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Tekirdağ

¹<https://orcid.org/0000-0002-5580-3340>, ²<https://orcid.org/0000-0003-1213-3532>, ³<https://orcid.org/0000-0003-3138-2884>

✉: aaisikber@gmail.com

ÖZET

Bu çalışmada iki yerel diatomit toprağı preparatının (Detech® ve Demite®) tek başına ve bunların kokusuz sarımsak tozuyla belli oranlardaki karışımlarının Kıрма Biti, *Tribolium confusum* du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae)'ne karşı etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla buğday üzerinde 25±1 °C sıcaklık ve % 65±5 nispi nem ortamında tek başına iki yerel diatomit topraklarının ve bunların kokusuz sarımsak tozuyla karışımlarının 600, 900 ve 1500 ppm (mg DE/kg ürün) konsantrasyonlarda 7 ve 14 gün süreyle biyolojik testler yürütülmüştür. Mevcut çalışmada elde edilen sonuçlara göre buğday üzerinde tek başına Demite® ve Detech® diatomit toprağı uygulamaları ile Demite® ve Detech® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımlarının (E3, E4, E5 ve E6) test edilen böceklere karşı etkinlikleri uygulama konsantrasyonuna ve süresine göre önemli farklılıklar gösterdiği görülmüştür. Düşük konsantrasyonda (600 ppm) genel olarak Demite® ve Detech® diatomit toprakların kokusuz sarımsak karışımlarının (E5 ve E6) *T. confusum* erginlerine karşı etkinliklerinin tek başına Demite® diatomit toprağı uygulamasına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada düşük konsantrasyonda Demite® ve Detech® diatomit toprağı uygulamasına kokusuz sarımsak eklemesinin *T. confusum* erginlerine karşı etkinliğin artmasına neden olduğu, dolayısıyla bu iki ticari yerel diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımlarının düşük konsantrasyonlarda (<900 ppm) *T. confusum*'un kontrolünde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 12.02.2021

Kabul Tarihi : 25.03.2021

Anahtar Kelimeler

Yerel Diatomit toprağı

Kokusuz sarımsak

Tribolium confusum

Buğday

Efficacy of Local Diatomaceous Earths Mixtures With Odorless Garlic Powder Against Confused Flour beetle, *Tribolium confusum* du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae)

ABSTRACT

In this study, the efficacy of two local diatomaceous earth deposits (Detech® and Demite®) alone and their mixtures with odorless garlic powder in certain proportions against confused flour beetle, *Tribolium confusum* du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae) was determined. For this purpose, the biological tests at 600, 900 and 1500 ppm (mg DE / kg wheat) concentrations of two local diatomaceous earth deposits alone and their mixtures with odorless garlic powder for 7 and 14 days were carried out at 25 ± 1 °C temperature and 65 ± 5% relative humidity. According to the results obtained in the present study, the effectiveness of Demite® and Detech® diatomaceous earth alone and mixtures of Demite® and Detech® diatomaceous earth and odorless garlic (E3, E4, E5 and E6) on wheat against *T. confusum* adults was observed to have significant differences according to application concentrations and exposure times. At low concentration (600 ppm), in general the mixtures of Demite® and Detech® diatomaceous earth with odorless garlic (E3, E4, E5 and E6) had higher insecticidal efficacy than Demite® and Detech® diatomaceous earth alone treatment. As a result, in this study, it was concluded that adding odorless garlic to Demite® and Detech® diatomaceous earth at low

Research Article

Article History

Received : 12.02.2021

Accepted : 25.03.2021

Keywords

Local diatomaceous earth

Odorless garlic powder

Tribolium confusum

Wheat

concentrations resulted in increased insecticidal efficacy against *T. confusum* and can be used in the control of *T. confusum* at their low concentrations (<900 ppm).

Atıf İçin	Gökçe M, Işıkber AA, Sağlam Ö 2021. Yerel Diatomit Topraklarının Kokusuz Toz Sarımsak İle Karışımının Kıрма Biti, <i>Tribolium confusum</i> du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae)'ne Karşı Etkinliği. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1237-1246. https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.879342 .
To Cite	Gökçe M, Işıkber AA, Sağlam Ö 2021. Efficacy of Local Diatomaceous Earths Mixtures With Odorless Garlic Powder Against Confused Flour beetle, <i>Tribolium confusum</i> du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae). KSU J. Agric Nat 24 (6): 1237-1246. https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.879342 .

GİRİŞ

Depo tahıl zararlılarının mücadelesinde sentetik insektisitlerin ve fumigantların kullanımı yıldan yıla birçok probleme (dayanıklılık, kullanıcıya toksisitesi, çevreye zararı (ozon delici özelliği), üründe kalıntı, vs.) neden olmaktadır. Bugün geleneksel olarak kullanılan fumigantların ve koruyucu kontak insektisitlerin artan zararlarından dolayı birçok araştırmacı alternatif mücadele yöntemlerine yönelmişlerdir. Bu alternatif mücadele yöntemlerinden birisi de diatomit toprağı (Diatomaceous earth-DE) kullanımınıdır. Diatomit toprakları su yosunları sınıfından tek hücreli mikroskobik alglerin fosilleşmiş silisli kavkularından oluşmuş bir çökeltidir. Diatomitlerin hücre çeperleri (kavkuları) amorf silisten ($\text{SiO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) oluşmuştur. Diatomit toprakları muhtemelen insektisit olarak kullanılabilen kuru maddelere bağlı en etkili doğal kaynaktır (Korunic, 1997; Korunic, 1998). Çeşitli diatomit preparatların toz formülasyonunun depolanmış tahıl zararlılarına karşı genellikle 1000 ppm konsantrasyonda yüksek etkinlik gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Subramanyam ve ark., 1994; Korunic, 1998; Wakil ve ark., 2006; Athanassiou ve ark., 2007; Kostyukovsky ve ark., 2010; Ferizli ve ark., 2011). Diatomit toprakları böceklerin kutikülasında etkili olup böceğin hızla kurumasına ve dolayısıyla su kaybından ölümüne neden olmaktadır. Memelilere toksik değildir (sıçanlarda ağızdan LD_{50} değeri > 5000 mg/kg vücut ağırlığı), ürünler üzerinde toksik kalıntı bırakmaz ve diatomit toprağı gıda katkı maddesi olarak kullanıldığı için US EPA'ya göre GRAS (Genellikle Güvenilir Kabul Edilen) kategorisinde sınıflandırılır (FDA, 1995). Diatomit toprakları uygulama yapılan ürünlerde uzun süre kalabilmelerinden dolayı özellikle depolanmış tahılları zararlı böceklerden uzun süre korumada geleneksel insektisitlere alternatif olabilmektedir. Yapılan incelemelerde Türkiye'nin çok zengin doğal DE yataklarına sahip olduğu ve bu geniş DE yataklarının ülkenin değişik bölgelerinde olduğu görülmektedir (Özbey ve Atamer, 1987; Mete, 1988; Sıvacı ve Dere, 2006; Çetin ve Taş, 2012). Türkiye'nin volkanojen Neojen'inde diatomit zuhurlarının yaygın olduğu hacim yönünden en büyük yataklar İç Anadolu'nun güneydoğusunda toplanmıştır. Türkiye'nin diatomit rezervinin 125 milyon ton ve Türkiye'nin bilinen en büyük diatomit yatağının Hırka (Kayseri) (106 milyon ton) olduğu bilinmektedir (Çetin

ve Taş, 2012).

Sarımsak, *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), yumrusu ve bunun ekstraktları depolanmış ürün zararlılarının kontrolünde umut verici sonuçlar vermişlerdir. Sarımsağın petrolium eter ekstraktı fasulye tohum böceğı (*Callosobruchus chinensis* (L.)) üzerinde kaçırıcı etkiye sahip olmuştur (Pandey ve ark., 1976). Jood ve ark. (1993) sarımsak tozunu mısır tanelerini kahpra böceğinden (*Trogoderma granarium* (Evert.)) korumada kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Ho ve ark. (1995) doğranmış sarımsak suyunun ve sarımsağın etil asetat ekstraktının *Tribolium castaneum* (Herbst) ve *Sitophilus zeamais* Motschulsky üzerinde yüksek derecede kaçırıcı etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Sarımsak yağının ise hem *T. castaneum* hem de *S. zeamais*'in F_1 dölünde üremenin azalması üzerinde oldukça etkili olduğu ve *T. castaneum*'un yumurtalarına, erginlerine ve pupalarına karşı toksik olduğu bulunmuştur (Ho ve ark., 1996). Sarımsak uçucu yağlarında yağda ve suda çözünür maddeler bulunmaktadır. Yağda çözünenlerin koku yaydıkları ve sülfürlü bileşiklerin fazla oranda bulunduğu bilinmektedir. Jirovetz ve ark. (1992) yaptıkları çalışmada sarımsak uçucu yağında diallyl-trisulphide (%29.7), diallyl tetrasulfid (%4.4), diallyl disulfid (%3.2), diallyl sulfid (%2.5) ve metil allyl trisulfid (%2.1) bileşenlerinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Huang ve ark. (2000) sarımsak uçucu yağının ana bileşiklerinin, diallyl trisulfid, diallyl disulfid ve metil allyl trisulfid, *T. castaneum* ve *S. zeamais* üzerinde yüksek fumigant aktivite gösterdiğini ve depolanmış ürün zararlılarının mücadelesinde potansiyel alternatif fumigant olarak düşünölebileceğini bildirmişlerdir.

Son yıllarda yürütölen yoğun çalışmalar sonucunda depolanmış ürün zararlılarına karşı Türkiye orijinli yerel diatomit toprağı preparatları, Detech® ve Demite® ticari isimli (Entoteam Ar-Ge Tic. Ltd. Şti), geliştirilmiştir. Bu iki yerel diatomit preparatının toz formülasyonunun çeşitli depolanmış tahıl zararlılarına karşı genellikle 1000 ppm konsantrasyonda yüksek etkinlik gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Bayram ve ark., 2020; Sağlam ve ark., 2020; Ertürk ve ark., 2020; Bağrıaçık, 2020). Bu toz formülasyonların daha düşük konsantrasyonlarda kullanılması hem ekonomik hem de ürün kalitesine yönünde önemli avantajlar sağlaması açısından çok önemlidir. Bu yüzden bu yerel diatomit toprağı

preparatlarının zenginleştirilmesine yönelik çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Sarımsak bitkisinin değişik bitki ekstraktları ve uçucu yağ depolanmış tahıl zararlılarına karşı yüksek etkinlik gösterdiği yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Pandey ve ark., 1976; Jood ve ark., 1993; Ho ve ark., 1995, 1996; Huang ve ark., 2000). Ancak sarımsak ekstraktın ve uçucu yağının da en önemli dezavantajının üründe bırakmış olduğu istenmeyen naoh kokudur. Mevcut yerel iki diatomit toprağı formülasyonlarının (Detech® ve Demite®) kokusuz sarımsak tozu ile zenginleştirilmesinin yerel diatomit toprağı formülasyonların düşük konsantrasyonlarda depolanmış tahıl zararlılarına karşı etkinliğini artırabileceği ön görülmüştür. Bu bağlamda bu çalışmada yerel iki diatomit toprağının (Detech® ve Demite®) tek başına ve bunların kokusuz sarımsak tozuyla belli oranlardaki karışımların, kırma biti, *Tribolium confusum* du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae) erginlerine karşı etkinliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Biyolojik testlerde kullanılan böcek materyali

Bu çalışmada, laboratuvar koşullarında yürütülen biyolojik etkinlik testlerinde kırma biti, *Tribolium confusum* du Val. (Coleoptera: Tenebrionidae) erginleri kullanılmıştır. Biyolojik etkinlik testlerinde kullanılan *T. confusum* erginleri Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü'ne ait Entomoloji Laboratuvarı'nda yetiştirilen stok kültürlerden elde edilmiştir. Bu stok kültürler Mersin ilinde bulunan buğday depolarından elde edilmiştir.

Biyolojik etkinlik testlerinde kullanılan yerel diatomit toprağı formülasyonları

Buğday üzerinde yerel diatomit topraklarının kokusuz toz sarımsak ile karışımının *T. confusum* erginlerine karşı biyolojik etkinliğini belirleme testlerinde Entoteam Ar-Ge San. Tic. Ltd. Şti. tarafından geliştirilen ve depolanmış tahıl zararlılarına karşı yüksek etkinliği kanıtlanmış olan Detech® ve

Demite® ticari isimli Türkiye orijinli yerel diatomit toprağı preparatları kullanılmıştır. Detech® ve Demite® ticari isimli yerel diatomit topraklarının toz formülasyonu Entoteam Ar-Ge San. Tic. Ltd. Şti. firmasından temin edilmiştir. Biyolojik etkinlik testlerinde kullanılan Detech® ve Demite® ticari isimli yerel diatomit topraklarının toz formülasyonunun bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 1'de verilmektedir. Ayrıca, yerel diatomit topraklarının belli oranlarda karışımlardan oluşan yerel diatomit toprağı toz preparatlarının (Detech® ve Demite®) genel görüntüsü ve taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüsü sırasıyla Şekil 1'de verilmektedir.

Denemelerde kullanılan kokusuz sarımsak tozu

Biyolojik etkinlik testlerinde kullanılan yerel diatomit toprağı toz preparatlarıyla kokusuz sarımsak karışımında Veganatrel kokusuz (Odorless) toz sarımsak (*Allium sativum*) tablet (Veganatrel, Veganatrel Ürünler Ltd. Şti, Türkiye) kullanılmıştır. Kokusuz sarımsak tozu (KS) sarımsak dişlerinin parçalanıp ezildikten sonra asit ile muamele edilmesiyle elde edilmiştir. Kokusuz sarımsağın ana birleşimi allisinidir. Allisin, bozulmamış sarımsak dişlerinde mevcut değildir, ancak enzim allinaz varlığında kokusuz öncü allininden (+ -S-alil-L-sistein sülfoksit) elde edilir. Sarımsak dişinde allin ve allinaz farklı bölmelerde bulunur. Sarımsak dişleri kesildiğinde veya ezildiğinde, hem enzim hem de allinin temasa geçerek allisin üretimini başlatır. Bütün sarımsak dişlerinin dilimlenene veya ezilinceye kadar çok az veya hiç koku göstermemesinin nedeni bu durumdan kaynaklanmaktadır.

Denemelerde kullanılan yerel diatomit toprakları ile kokusuz sarımsak tozu karışımları

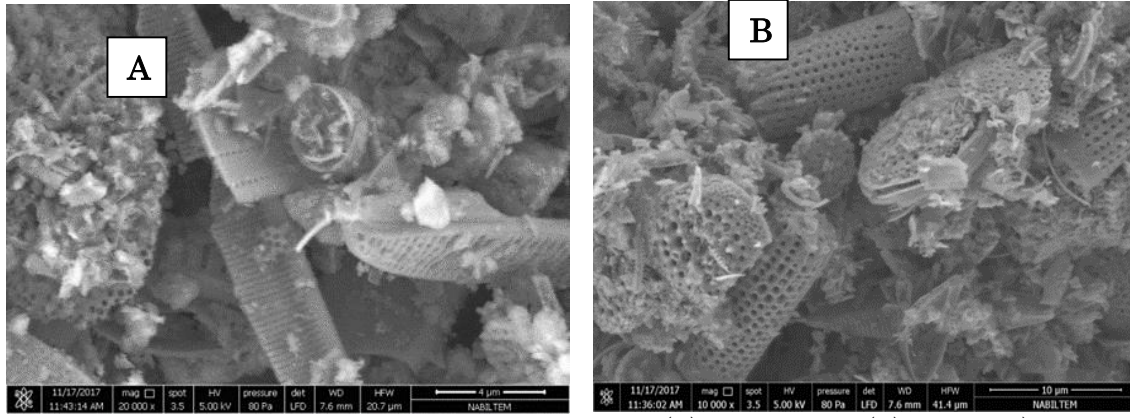
Yerel diatomit toprakları, Detech® ve Demite® ile kokusuz sarımsak tozu karışımları elde edilmiştir. Detech® yerel diatomit toprağının %1 ve %10 kokusuz sarımsak tozlu ile karışımlarına sırasıyla E3 ve E4 kodları verilirken Demite® yerel diatomit karışımının %1 ve %10 kokusuz sarımsak tozlu ile karışımlarına sırasıyla E5 ve E6 kodları verilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 1. Biyolojik etkinlik testlerinde kullanılan Detech® ve Demite® ticari isimli yerel diatomit toprağının toz formülasyonlarının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Table 1. Some physical and chemical properties of dust formulations of local diatomaceous earth, Detech® and Demite®, used in biological tests.

Yerel diatomit toprağı formülasyonu (Local diatomaceous earth formulation)	SiO ₂ oranı (SiO ₂ ratio) (%)*	Medyan partikül büyüklüğü (Median particule size) (µm)**	pH değeri (pH value) ± S.hata	Yığın yoğunluğu (Bulk density) ± S.hata (g/l)	Renk (Colour)
Detech®	80.6	14.06	8.25±0.01	248.1±5.3	Sarımtırak-beyaz
Demite®	82.2	14.08	8.45±0.03	223.9±1.6	Sarımtırak-beyaz

*Yerel diatomit toprakların analizleri Maden Tetkik ve Arama Genel Müdürlüğü ait Analiz Laboratuvarları tarafından yapılmıştır. ** Hacimsel kümülatif partikül büyüklüğü dağılımında toplam partikül hacminin %50'sine denk gelen (d(0.5)) medyan değeridir.



Şekil 1. Yerel diatomit toprağı toz preparatlarının, (A) Detech® ve (B) Demite®) taramalı elektron mikroskop (SEM) görüntüleri, 20000x büyütme.

Figure 1. Scanning electron microscope (SEM) images of local diatomaceous earth dust formulations, (A) Detech® and (B) Demite®), 20000x magnification.

Çizelge 2. Yerel diatomit toprağı, Detech® ve Demite® ile kokusuz sarımsak (KS) karışım oranları ve hazırlanan karışımların kodları

Table 2. Mixing ratios of local diatomaceous earths, Detech® and Demite® with odorless garlic (KS) and their codes of prepared mixtures

Kodlar (Codes)	Karışımların oranı (Mixture ratio)
E3	%99 Detech® + %1 Kokusuz sarımsak tozu (KS)
E4	%90 Detech® + %10 Kokusuz sarımsak tozu (KS)
E5	%99 Demite® + %1 Kokusuz sarımsak (KS)
E6	%90 Demite® + %10 Kokusuz sarımsak (KS)

Denemelerde kullanılan buğday çeşidi:

Biyolojik testlerde %11±1 ürün nemi içeren Elbistan Yazlığı isimli yumuşak beyaz ekmeklik buğday (*Triticum aestivum* L.) çeşidi kullanılmıştır.

Metot

Test böceklerinin laboratuvarında yetiştirilmesi

Test böceğinin yetiştirilmesinde kullanılan un olası böcek bulaşmasından arındırmak için bir hafta süre ile - 20°C sıcaklığa ayarlı derin dondurucuda tutulmuştur. *Tribolium confusum* erginleri 1 mm'lik Retsch marka elek yardımıyla elenerek bulaşık undan ayrılmıştır. Bir litrelik cam kavanozlar içerisine 250 g buğday unu ve 12.5 g kuru maya ilave edildikten sonra karışık cinsiyette 250-300 adet ergin bırakılmış ve kavanozların ağızları hava giriş çıkışını engellemeyecek genişlikte tülle kapatılmıştır. Hazırlanan kavanozlar 26 ± 1 °C' de % 65 ± 5 nispi nemde 1 hafta süre ile karanlık ortamda tutulmuş ve erginlerin yumurta bırakması sağlanmıştır. Bir hafta sonunda erginler elek yardımıyla bulaşık undan ayrılmış ve bulaşık olmayan buğday unu ve kuru maya konulan kavanozlara eklenerek kültürlerin devamlılığı sağlanmıştır. Kırk beş gün sonra hazırlanan kültür kavanozlarından çıkan yeni nesil erginler biyolojik denemelerde kullanılmıştır. Bu işlemlere çalışma boyunca devam edilmiştir.

Biyolojik etkinlik testleri

Biyolojik testlerin her birinde diatomit toprağı (DE) ve diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak tozu karışımları (DE+KS) 1 kg buğdaya 600, 900 ve 1500 ppm (mg Diatomit toprağı veya Diatomit toprağı sarımsak tozu karışımı/ kg buğday) konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Standart işleme bağlı olarak, 1 kg buğday daneleri cam kavanozlara yerleştirildikten sonra buğday danelerinin üzerine her bir konsantrasyona karşılık gelen DE ve DE+KS tozları bırakılmıştır. DE ve DE+KS toz preparatların buğday danesi üzerinde eşit şekilde dağılımını sağlamak için yaklaşık 3 dakika elle çalkalanmıştır. Diatomit toprağı uygulaması yapılmayan buğday daneleri kontrol olarak kabul edilmiştir. Daha sonra, her bir DE ve DE+KS uygulaması yapılan ürün partisinden her biri 50 g olan 4 örnek alınmış ve bu örnekler cam şişelere aktarılarak ağızları havalandırma için üstünde ince tül ile kaplı 1.5 cm delik olan tüllerle kapatılmıştır. Bu işlemten sonra <21 günlük 30 adet karışık cinsiyette ergin bireyler sadece DE uygulanmış ve DE+KS karışımları buğday danelerini içeren cam kavanozlara yerleştirilmiştir. Altına plastik ızgara yerleştirilen plastik kutulardan (26 cm x 36.5 cm x 15 cm boyutlarında) nem çemberi oluşturulmuştur. Bu nem çemberlerinin alt kısmına %65±5 nispi nemi sağlayan sırasıyla doyurulmuş sodyum nitrit solüsyonu yerleştirildikten sonra (Greenspan, 1977) plastik ızgaraların üzerine DE ve DE+KS uygulanmış buğday danelerini içeren cam kavanozlara yerleştirilmiştir. Daha sonra bu plastik kutular 26±1 °C sıcaklık seviyesine ayarlanmış soğutmalı inkubator içerisine yerleştirilmiştir. Deneme boyunca nem çemberi içerisindeki sıcaklık ve bağıl nem seviyesi HOB0 veri toplayıcısı (HOB0, Onset computers, ABD) ile izlenmiştir. Uygulamadan 7 ve 14 gün sonra 2 mm'lik metal elek ile buğdaylar elenmiş ve erginlerin ölü-canlı sayımları yapılmıştır. Ayrıca, tek başına kokusuz sarımsak tozunun (KS) en yüksek konsantrasyonda (1500 ppm) *T. confusum* erginlerine karşı etkinliğini

belirlemek için de ön biyolojik testleri yürütülmüştür. Bu testler sonucunda buğday üzerinde tek başına kokusuz sarımsak tozunun 1500 ppm konsantrasyonuna 7 ve 14 gün süreyle maruz bırakılan *T. confusum* erginlerinde oldukça düşük ölüm oranları (sırasıyla %0 ve %5.3±3.1) elde edilmiştir. Tek başına kokusuz sarımsak tozunu (KS) en yüksek konsantrasyonda (1500 ppm) bile *T. confusum* erginlerinde karşı etkinliğin oldukça düşük olmasından dolayı diğer konsantrasyonlarda test yapılmasına gerek görülmemiştir.

Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler

Buğday üzerinde yürütülen biyolojik testler sonucunda test edilen her böcek türü için test edilen birey sayılarını ve uygulamadan 7. ve 14. gün sonra ölü ve canlı birey sayılarını içeren EXCEL tabloları oluşturulmuştur. Kontrolde ölüm olan uygulamalarda Abbott'un düzeltme formülü (Abbott, 1925) kullanılarak ölüm oranları düzeltilmiştir. Diatomit toprağı ve diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışım uygulamalarına ait 7. ve 14. günkü ölüm oranlarına ayrı ayrı Arcsin transformasyonu uygulandıktan sonra Minitab 17 (McLaughlin ve Wakefield, 2015) istatistik programı kullanılarak iki faktörlü (uygulama konsantrasyonu ve diatomit uygulaması) varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Diatomit uygulamasına ve uygulama konsantrasyonuna ait ölüm oranları tek yönlü varyans analizine tabi tutulduktan sonra ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Tukey ortalamaları kıyaslama testi kullanılarak belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Yapılan çift yönlü varyans analizleri sonucunda tek başına Demite® ve Demite® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımlarına ait 7 gün süreyle diatomit uygulamalarının ($F_{2,27}=4.83$, $P=0.016$) ve

uygulama konsantrasyonlarının ($F_{2,27}=175.52$, $P<0.0001$) *T. confusum* ölüm oranları üzerinde istatistiki açıdan önemli derecede etkiye sahip olduğu görülmüştür. Bu iki faktör arasındaki etkileşiminin de istatistiksel açıdan önemli olduğu saptanmıştır (diatomit uygulaması x uygulama konsantrasyonu için $F_{4,27}=3.72$, $P=0.015$). Yedi gün maruz kalma süresi sonucunda 600 ve 900 ppm konsantrasyonlarda tek başına Demite® ve Demite® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımlarından (E5 ve E6) elde edilen *T. confusum* ölüm oranları arasında istatistiksel açıdan fark bulunmazken 1500 ppm konsantrasyonda diatomit uygulamaları arasında istatistiksel olarak önemli fark olduğu bulunmuştur (Çizelge 3). E6 kodlu diatomit toprağı karışımından elde edilen *T. confusum* ölüm oranının, tek başına Demite® uygulamasından elde edilen *T. confusum* ölüm oranından istatistiksel olarak önemli seviyede daha yüksek olduğu saptanmıştır. Aynı konsantrasyonda E5 kodlu diatomit toprağı karışımı ve tek başına Demite® uygulamalarından elde edilen *T. confusum* ölüm oranları istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Tek başına Demite® uygulamasının 900 ve 1500 ppm konsantrasyonlarından elde edilen *T. confusum* ölüm oranları arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmazken 1500 ppm konsantrasyonda elde edilen *T. confusum* ölüm oranı hem 600 ppm hem de 900 ppm konsantrasyonlardan elde edilen ölüm oranlarından istatistiksel açıdan önemli seviyede daha yüksek olduğu saptanmıştır (Çizelge 3). E5 ve E6 diatomit toprağı karışımlarının 1500 ppm konsantrasyonda elde edilen *T. confusum* ölüm oranının hem 600 ppm hem de 900 ppm konsantrasyonlardan elde edilen ölüm oranlarından istatistiksel açıdan önemli seviyede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Benzer olarak 900 ppm konsantrasyonda elde edilen *T. confusum* ölüm oranının 600 ppm konsantrasyondan elde edilen ölüm oranından istatistiksel açıdan önemli seviyede daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Buğday üzerinde tek başına Demite® diatomit toprağın ve Demite® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımların (E5 ve E6) farklı konsantrasyonlarına 7 gün süreyle maruz bırakılan *Tribolium confusum* erginlerin düzeltilmiş ölüm oranları

Table 3. Corrected mortality rates of *Tribolium confusum* adults exposed for 7 days to different concentrations of Demite® local diatomaceous earth alone and the mixtures of Demite® and odorless garlic (E5 and E6) on wheat

Uygulamalar (<i>Treatments</i>)	Düzeltilmiş ölüm oranı (<i>Corrected mortality rate</i>) (%) ± S. hata			F ve P değeri* (<i>F and P value</i>)
	600 ppm	900 ppm	1500 ppm	
E5 (%99 Demite® +%1 KS)	2.5 ± 1.6 Ca	48.3 ± 5.0 Ba	81.5 ± 2.2 Aba	$F_{2,9}= 103.84$, $P<0.001$
E6 (%90 Demite® +%10 KS)	6.6 ± 1.4 Ca	40 ± 4.9 Ba	82.4 ± 5.9 Aa	$F_{2,9}= 33.86$, $P<0.001$
Demite®	1.6 ± 0.9 Ba	46.6 ± 3.6 Aa	56.1 ± 3.0 Ab	$F_{2,9}= 99.75$, $P<0.001$
Kontrol (<i>Control</i>)	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 0.9	
F ve P değeri* (<i>F and P value</i>)	$F_{2,9}=3.06$ $P=0.097$	$F_{2,9}= 0.95$ $P=0.422$	$F_{2,9}= 5.70$ $P=0.025$	

*Verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Tukey testine göre ortaya konmuştur. Aynı sütundaki farklı küçük harfler ve aynı satırdaki farklı büyük harfler istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

Yapılan çift yönlü varyans analizleri sonucunda tek başına Demite® ve Demite® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımlarına ait 14 gün süreyle diatomit uygulamaların *T. confusum* ölüm oranları üzerinde istatistiksel açıdan önemli derecede etkiye sahip olduğu görülürken ($F_{2,27}=116.24$, $P<0.0001$) uygulama konsantrasyonların *T. confusum* ölüm oranları üzerinde istatistiksel açıdan önemli etkiye sahip olmadığı bulunmuştur ($F_{2,27}=3.29$, $P=0.0528$). Bu iki faktör arasındaki interaksiyonun istatistiksel olarak farklı olduğu saptanmıştır (diatomit uygulaması x uygulama konsantrasyonu için $F_{4,27}=3.46$, $P=0.0209$). On dört gün maruz kalma süresi sonucunda tek başına Demite® diatomit toprağının ve Demite® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımlarının *T. confusum* ölüm oranları üzerine etkisi incelendiğinde 600 ppm konsantrasyonda, E5 diatomit toprağı karışımından elde edilen *T. confusum* ölüm oranları tek başına Demite® uygulamasından

elde edilen *T. confusum* ölüm oranından istatistiki olarak önemli seviyede daha yüksek olduğu görülmüştür (Çizelge 4). E6 diatomit toprağı karışımından elde edilen *T. confusum* ölüm oranı ile E5 diatomit toprağı karışımından ve tek başına Demite® uygulamasından elde edilen *T. confusum* ölüm oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. 900 ve 1500 ppm konsantrasyonlarda tüm diatomit uygulamalarından elde edilen *T. confusum* ölüm oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Her bir değer uygulama konsantrasyonu ayrı ayrı değerlendirildiğinde tüm diatomit uygulamalarında 900 ve 1500 ppm konsantrasyonlardan elde edilen *T. confusum* ölüm oranları, 600 ppm konsantrasyondan elde edilen ölüm oranından istatistiki olarak önemli seviyede daha yüksek olurken (Çizelge 4), 900 ve 1500 ppm konsantrasyonlardan elde edilen *T. confusum* ölüm oranları arasından istatistiki olarak önemli bir fark bulunmamıştır.

Çizelge 4. Buğday üzerinde Demite® diatomit toprağının ve Demite® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımlarının (E5 ve E6) farklı konsantrasyonlarına 14 gün süreyle maruz bırakılan *Tribolium confusum* erginlerinin düzeltilmiş ölüm oranları

Table 4. Corrected mortality rates of *Tribolium confusum* adults exposed for 14 days to different concentrations of Demite® local diatomaceous earth alone and the mixtures of Demite® and odorless garlic (E5 and E6) on wheat

Uygulamalar (Treatments)	Düzeltilmiş ölüm oranı (Corrected mortality rate) (%) ± S. hata			F ve P değeri* (F and P value)
	600 ppm	900 ppm	1500 ppm	
E5 (%99 Demite® +%1 KS)	63.6 ± 9.6 Ba	99.1 ± 0.8 Aa	100 ± 0 Aa	$F_{2,9}= 26.67$, $P=0.0002$
E6 (%90 Demite® +%10 KS)	49.1 ± 7.4 Bba	97.5 ± 1.5 Aa	100 ± 0 Aa	$F_{2,9}= 54.51$, $P<0.0001$
Demite®	29.1 ± 6.7 Bb	99.1 ± 0.8 Aa	100 ± 0 Aa	$F_{2,9}= 110.68$, $P<0.0001$
Kontrol (Control)	8.3 ± 1.6	0 ± 0	5 ± 0.9	
F ve P değeri* (F and P value)	$F_{2,9}= 4.42$ $P=0.0459$	$F_{2,9}= 0.50$ $P=0.6244$	F= - P= -	

*Verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Tukey testine göre ortaya konmuştur. Aynı sütundaki farklı küçük harfler ve aynı satırdaki farklı büyük harfler istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

Yapılan çift yönlü varyans analizine göre 7 gün süreyle diatomit uygulamasının ve uygulama konsantrasyonunun *T. confusum*'un ölüm oranları üzerine istatistiki olarak önemli etkiye sahip olduğu görülmüştür (diatomit uygulaması için $F_{2,27}=5.08$, $P=0.0134$; uygulama konsantrasyonu için $F_{2,27}=263.36$, $P<0.0001$). Diatomit uygulaması x konsantrasyon interaksiyonunu arasında istatistiksel olarak önemli fark olmadığı görülmüştür (diatomit uygulaması x uygulama konsantrasyonu için $F_{4,27}=2.50$, $P=0.0662$). Yedi gün maruz kalma süresi sonucunda 600 ppm konsantrasyonda E3 diatomit toprağı karışımından elde edilen *T. confusum* ölüm oranları, tek başına Detech® ve E4 diatomit toprağı karışımından elde edilen ölüm oranlarından istatistiki olarak önemli seviyede daha yüksek olurken, tek başına Detech® uygulamasından elde edilen ölüm oranı ile E4 diatomit toprağı karışımlarından elde edilen ölüm oranları

arasından istatistiksel olarak önemli farklı olmadığı bulunmuştur (Çizelge 5). 900 ppm konsantrasyonda E3 diatomit toprağı karışımından elde edilen *T. confusum* ölüm oranı, E4 diatomit toprağı karışımı ve tek başına Detech® uygulamasından elde edilen ölüm oranlarından istatistiki olarak önemli seviyede daha yüksek olurken, E4 diatomit toprağı karışımı ve tek başına Detech® uygulamasından elde edilen ölüm oranları arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 5). 1500 ppm konsantrasyonda ise diatomit uygulamalarından elde edilen *T. confusum* ölüm oranları arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır. Her bir diatomit uygulaması ayrı ayrı incelendiğinde E3 diatomit toprağı karışımının 600 ppm konsantrasyonundan elde edilen *T. confusum* ölüm oranı 900 ve 1500 ppm konsantrasyonlardan elde edilen ölüm oranlarından istatistiki olarak önemli seviyede daha düşük olduğu

görüldükçe, 900 ve 1500 ppm konsantrasyonlarda elde edilen ölüm oranları arasında istatistiksel açıdan önemli fark bulunmamıştır (Çizelge 5). E4 diatomit toprağı karışımı ve tek başına Detech® uygulamaları için 1500 ppm konsantrasyondan elde edilen *T. confusum* ölüm oranları 600 ve 900 ppm konsantrasyonlardan elde edilen ölüm oranlarından

istatistiksel açıdan önemli seviyede daha yüksek olurken 900 ppm konsantrasyondan elde edilen *T. confusum* ölüm oranları 600 ppm konsantrasyonlardan elde edilen ölüm oranlarından istatistiksel açıdan önemli seviyede daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Çizelge 5. Buğday üzerinde tek başına Detech® diatomit toprağın ve Detech® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımların (E3 ve E4) farklı konsantrasyonlarına 7 gün süreyle maruz bırakılan *Tribolium confusum* erginlerin düzeltilmiş ölüm oranları

Table 5. Corrected mortality rates of *Tribolium confusum* adults exposed for 7 days to different concentrations of Detech® local diatomaceous earth alone and the mixtures of Detech® and odorless garlic (E3 and E4) on wheat

Uygulamalar (<i>Treatments</i>)	Düzeltilmiş ölüm oranı (<i>Corrected mortality rate</i>) (%) ± S. hata			F ve P değeri* (<i>F and P value</i>)
	600 ppm	900 ppm	1500 ppm	
E3 (%99 Detech® +%1 KS)	32.5 ± 2.5 Ba	92.5 ± 2.5 Aa	97.4 ± 1.7 Aa	F _{2,9} = 80.70 P<0.0001
E4 (%90 Detech® +%10 KS)	11.6 ± 3.5 Cb	80.8 ± 2.8 Bb	99.1 ± 0.9 Aa	F _{2,9} = 157.88 P<0.0001
Detech®	17.5 ± 6.7 Cb	80.8 ± 3.4 Bb	97.4 ± 1.7 Aa	F _{2,9} = 60.65 P<0.0001
Kontrol (<i>Control</i>)	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 0.96	
F ve P değeri* (<i>F and P value</i>)	F _{2,9} = 5.08 P=0.0334	F _{2,9} = 5.84 P=0.0237	F _{2,9} = 0.39 P=0.6831	

*Verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Tukey testine göre ortaya konmuştur. Aynı sütundaki farklı küçük harfler ve aynı satırdaki farklı büyük harfler istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

Yapılan çift yönlü varyans analizine göre 14 gün süreyle diatomit uygulamasının ve uygulama konsantrasyonunun *T. confusum*' un ölüm oranları üzerine istatistiki olarak önemli etkiye sahip olduğu görülmüştür (diatomit uygulaması için F_{2,27}=99.10, P<0.0001; uygulama konsantrasyonu için F_{2,27}=4.98, P=0.0144). Diatomit uygulaması x konsantrasyon interaksiyonunu arasında da istatistiksel olarak önemli fark olduğu görülmüştür (diatomit uygulaması x uygulama konsantrasyonu için F_{4,27}=5.06, P=0.0036). On dört gün maruz kalma süresi sonucunda 600 ppm konsantrasyonda E3 diatomit toprağı uygulamasından elde edilen ölüm oranı tek başına Detech® ve E4 diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımı uygulamasından elde edilen ölüm oranlarından istatistiki olarak önemli seviyede daha yüksek olduğu görüldükçe, tek başına

Detech® uygulamasından elde edilen *T. confusum* ölüm oranı ile E4 diatomit toprağı uygulamalarından elde edilen ölüm oranları arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır (Çizelge 6). 900 ve 1500 ppm uygulama konsantrasyonlarında diatomit uygulamalarından elde edilen *T. confusum* ölüm oranları arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır (Çizelge 6). Her bir diatomit toprağı uygulaması ayrı ayrı incelendiğinde tüm diatomit uygulamalarında 900 ve 1500 ppm konsantrasyonlardan elde edilen *T. confusum* ölüm oranları 600 ppm konsantrasyondan elde edilen ölüm oranından istatistiki olarak önemli seviyede daha yüksek olduğu görüldükçe 900 ve 1500 ppm konsantrasyonlarda elde edilen *T. confusum* ölüm oranları arasında istatistiki olarak önemli fark bulunmamıştır (Çizelge 6).

Çizelge 6. Buğday üzerinde tek başına Detech® diatomit toprağın ve Detech® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımların (E3 ve E4) farklı konsantrasyonlarına 14 gün süreyle maruz bırakılan *Tribolium confusum* erginlerin düzeltilmiş ölüm oranları

Table 6. Corrected mortality rates of *Tribolium confusum* adults exposed for 14 days to different concentrations of Detech® local diatomaceous earth alone and the mixtures of Detech® and odorless garlic (E3 and E4) on wheat

Uygulamalar (<i>Treatments</i>)	Düzeltilmiş ölüm oranı (<i>Corrected mortality rate</i>) (%) ± S. hata			F ve P değeri* (<i>F and P value</i>)
	600 ppm	900 ppm	1500 ppm	
E3 (%99 Detech® +%1 KS)	90.0 ± 2.7 Ba	99.2 ± 0.8 Aa	100 ± 0 Aa	F _{2,9} = 18.97 P=0.001
E4 (%90 Detech® +%10 KS)	58.4 ± 8.5 Bb	99.2 ± 0.8 Aa	100 ± 0 Aa	F _{2,9} = 45.36 P<0.0001
Detech®	74.5 ± 6.8 Bb	99.1 ± 0.8 Aa	100 ± 0 Aa	F _{2,9} = 35.04 P<0.0001
Kontrol (<i>Control</i>)	8.3 ± 1.6	0 ± 0	5 ± 0.9	

F ve P değeri* (<i>F and P value</i>)	F_{2,9}= 6.11 P=0.021	F_{2,9}= 0.50 P= 0.6224	F_{2,9}= - P= -	
---	--	--	--	--

*Verilere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Tukey testine göre ortaya konmuştur. Aynı sütundaki farklı küçük harfler ve aynı satırdaki farklı büyük harfler istatistiki olarak birbirinden farklıdır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Tek başına Demite® diatomit toprağına ve Demite® diatomit toprağı kokusuz sarımsak karışımlarına (E5 ve E6) ait ölüm oranları incelendiğinde genel olarak yüksek konsantrasyonda (1500 ppm) tek başına Demite® diatomit toprağın ve Demite® diatomit toprağı kokusuz sarımsak karışımların *T. confusum* erginlerine karşı etkinliklerinde önemli fark bulunmazken diğer iki konsantrasyonda (600 ve 900 ppm) tek başına Demite® diatomit toprağın ve Demite® diatomit toprağı kokusuz sarımsak karışımların *T. confusum* erginlerine karşı etkinliklerinde istatistiki olarak önemli fark görülmüştür. Düşük konsantrasyonda (600 ppm) genel olarak Demite® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımların (E5 ve E6) *T. confusum* erginlerine karşı etkinliklerin tek başına Demite® uygulamasına göre daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, düşük konsantrasyonda Demite® uygulamasına kokusuz sarımsak eklemesinin *T. confusum* erginlerine karşı etkinliğin artmasına neden olduğunu göstermektedir. Ancak 900 ppm konsantrasyondan benzer sonuçların elde edilmediği görülmektedir. 900 ppm konsantrasyonda tek başına Demite® uygulaması ile Demite® diatomit toprağı ile kokusuz sarımsak karışımların (E5 ve E6) *T. confusum* erginlerine karşı etkinliklerin benzer olduğu görülmüştür. Detech® diatomit toprağı için elde edilen sonuçlar incelendiğinde 1500 ppm konsantrasyonda Detech® diatomit toprağı uygulamasına kokusuz sarımsak eklenmesinin *T. confusum* erginlerin ölüm oranlarında önemli artışa neden olmadığı görülürken 600 ve 900 ppm konsantrasyonlarda Detech® diatomit toprağı uygulamasına kokusuz sarımsak eklenmesinin *T. confusum* erginlerin ölüm oranlarında önemli artışa neden olduğu bulunmuştur.

Yapılan çalışmalarda birçok ticari diatomit toprağı preparatında depolanmış tahıl zararlılarına karşı önerilen konsantrasyonun genellikle 1000 ppm olduğu vurgulanmaktadır (Korunic, 1998; Subramanyam ve ark., 1994; Athanassiou ve ark., 2007; Kostyukovsky ve ark., 2010; Wakil ve ark., 2006). Bu çalışmada düşük konsantrasyonda (600 ppm) Demite® ve Detech® diatomit toprağı uygulamalarına kokusuz sarımsak eklemesinin *T. confusum*'a karşı etkinliğin artmasına neden olurken yüksek konsantrasyonlarda (900 ve 1500 ppm) *T. confusum*'a karşı etkinliğin artmasına neden olmaması çalışmada test edilen yüksek konsantrasyonlar birçok ticari diatomit toprağının önerilen konsantrasyonuna yakın veya yüksek olmasında kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Düşük konsantrasyonda Demite® ve Detech® diatomit toprağı uygulamasına kokusuz

sarımsak eklenmesinin test edilen böceklere karşı etkinliğin artmasına neden olmasının muhtemel nedeni kokusuz sarımsak tozu ile temas eden böcekler rahatsız olması ve dolayısıyla ürün içerisinde daha fazla hareket ederek diatomit toprağı partiküllerine daha fazla maruz kalmasıyla açıklanabilir.

Sarımsak ekstraktların depolanmış tahıl zararlılarına karşı etkinliklerine yönelik bazı araştırmalar yapılmıştır (Ho ve ark., 1995; Ho ve ark., 1996; Huang ve ark., 2000). Ancak sarımsak ekstraktların diatomit toprağı ile kombinasyonun depolanmış tahıl zararlıların etkinliğine yönelik literatürde kısıtlı sayıda çalışma bulunmaktadır (Yang ve ark., 2010). Yang ve ark. (2010) laboratuvar koşullarında tek başına sarımsak uçucu yağ ve diatomit toprağı ile sarımsak uçucu yağı kombinasyonunun *S. oryzae* ve *T. castaneum* erginlerine karşı etkinliğini belirlemek için biyolojik etkinlik testleri yürütmüşlerdir. Çalışmanın sonucunda sarımsak uçucu yağ ile diatomit toprağın kombinasyonun test edilen böceklere karşı etkinliği tek başına sarımsak uçucu yağ uygulamasından önemli ölçüde daha yüksek olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada sarımsak uçucu yağ ile diatomit toprağın aynı anda uygulanması, etkili sarımsak uçucu yağ için gereken uçucu yağ konsantrasyonunu önemli ölçüde azaltmış olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada ayrıca diatomit toprağının sarımsak uçucu yağı ile kombine edildiğinde etkili olan ticari diatomit preparatının tavsiye edilen uygulama konsantrasyonunun (Athanassiou ve ak., 2003; Arnaud ve ark., 2005; Chanbang ve ark., 2007) azaltılabileceği de bildirilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar mevcut çalışmada düşük konsantrasyonda (600 ppm) elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Bunun dışında değişik diatomit toprağı preparatların farklı bitki ekstraktlarının veya bitki uçucu yağlarla kombinasyonun depolanmış tahıl zararlılarına karşı etkinliklerine yönelik çalışmaların literatürde mevcut olduğu görülmektedir. Khorrami ve Soleymanzade (2016) laboratuvar koşullarında *Satureja hortensis* L., *Trachyspermum ammi* I. Sprague, *Ziziphora tenuior* L., *Cuminum cyminum* L. ve *Foeniculum vulgare* Mill. uçucu yağları, etanolik ekstraktların ve tozların tek başına ve diatomit toprağı ile kombinasyonun *Callosobruchus maculatus* (F.) erginlerine karşı sinerjik etkileşimlerini incelemişlerdir. Bu çalışmada test edilen bitkilerin uçucu yağların, etanolik ekstraktların ve tozların diatomit toprağı ile kombinasyonun bu bitkilerin uçucu yağların, etanolik ekstraktların ve tozların tek başına uygulanmasına göre *C. maculatus* erginlerine karşı daha yüksek etkinlik gösterdiği ve dolayısıyla bitki ekstraktların diatomit toprağı ile birlikte sinerjistik etkiye neden

olduğu bildirilmiştir. Bu sonuçlar, bazı uçucu yağın ve bitki ekstraktlarının daitomit toprağının etkinliğini artırabileceği hipotezini desteklerken mevcut çalışmamda düşük diatomit konsantrasyonunda elde edilen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Ziaee ve ark. (2014) *Carum copticum* (L.) tozu ve uçucu yağın diatomit toprağı ile kombinasyonun *T. confusum* ve *S. granarius* erginlere karşı sinerjik/antagonistik etkileşiminin belirlenmesine yönelik çalışma yürütmüşlerdir. Çalışma sonucunda test edilen uçucu yağ ile diatomit toprağı ile kombinasyonu *T. confusum* ve *S. granarius* erginlerine karşı sinerjistik etki gösterirken test edilen bitkinin toz ekstraktı ile diatomit toprağının kombinasyonu *T. confusum* ve *S. granarius* erginlere karşı antogonistik etki gösterdiği görülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışmada Demite® ve Detech® diatomit toprağına kokusuz sarımsak eklenmesinin bu iki ticari yerel diatomit toprağı preparatların düşük konsantrasyonlarda (<900 ppm) depolanmış tahıl zararlısı, *T. confusum*'un mücadelesinde kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır. Ancak, bundan sonraki çalışmalarda bu yerel diatomit toprağının kokusuz sarımsak karışımına ait toz preparatların laboratuvar dışında gerçek depo koşullarında farklı depolanmış tahıl zararlılarına karşı ticari olarak uygulanabilirliklerinin araştırılması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada yerel diatomit toprağı preparatların (Detech® ve Demite®) temin edilmesini sağlayan Entoteam Ar-Ge Gıda San. Tic. Ltd. Şti. firmasına sonsuz teşekkürlerimiz sunarız.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

Abbott WS 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.

Arnaud L, Thi Lan, HT, Brostaux Y, Haubruge E 2005. Efficacy of Diatomaceous Earth Formulations Admixed with Grain Against Populations of *Tribolium castaneum*. *Journal of Stored Products Research* 41: 121-130.

Athanassiou CG, Kavallieratos NG, Tsaganou FC, Vayias BJ, Dimizas CB, Buchelos CTh 2003. Effect of Grain Type on the Insecticidal Efficacy of SilicoSec Against *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Crop Protection* 22: 1141-1147.

Athanassiou CG, Kavallieratos NG, Meletsis CM 2007. Insecticidal Effect of Three Diatomaceous Earth Formulations, Applied Alone or in Combination, Against Three Stored-Product Beetle Species on Wheat and Maize. *Journal of Stored Products Research* 43: 330-334.

Bağrıaçık O 2020. Buğday ve Mısır Üzerinde Yerel Diatom Toprağının Ürün Yüzey Uygulamasının Bazı Depolanmış Tahıl Zararlılarına Karşı Etkinliği. Yüksek Lisans Tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, s.68.

Bayram A, Isıkber AA, Sağlam Ö, Şen R 2020. Evaluation of Repellency Effect of Diatomaceous Earth Formulation (Detech®) on Three Coleopteran Stored Grain Insect. *IOBC-WPRS Bulletin* 148: 56-64.

Chanang Y, Arthur FH, Wilde GE, Throne JE 2007. Efficacy of Diatomaceous Earth to Control *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) in Rough Rice: Impacts of temperature and relative humidity. *Crop Protection* 26: 923-929.

Çetin M, Taş B 2012. Biyolojik Orjinli Tek Mineral: Diatomit. *Türk Bilim Araştırma Vakfı (TÜBAV) Bilim Dergisi* 5(2): 28-46.

FDA (Food and Drug Administration, USA) 1995. Specifications for Diatomaceous Earths as a Maximum 2 % Animal Feed Additive. 21 CFR Section 573.340.

Ertürk S, Atay T, Toprak U, Alkan M 2020. The Efficacy of Different Surface Applications of Wettable Powder Formulation of Detech® Diatomaceous Earth Against the Rice Weevil, *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 89: 1-9.

Ferizli A, Beriş G, Emekçi M 2011. Effects of Diatomaceous Earth on the Mortality and Progeny Production of *Rhyzopertha dominica* (Coleoptera: Bostrychidae). *Journal of Agricultural Sciences* 17 (2): 85-94.

Greenspan L 1977. Humidity Fixed Points of Binary Saturated Aqueous Solutions. *Journal of Research of the National Bureau of Standards—A Physics and Chemistry* 81A: 89-96.

Ho SH, Ma Y, Tan HTW 1995. Repellency of Some Plant Extracts to the Stored Products Beetles, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. In: Proceedings of the Symposium on Pest Management for Stored Food and Feed, 5-7 September 1995. Semeo Biotrop, Bogor, Indonesia. s.209-215.

Ho SH, Koh, L, Ma Y, Huang Y, Sim KY 1996. The Oil of Garlic, *Allium sativum* L. (Amaryllidaceae), as a Potential Grain Protectant Against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Postharvest Biology and Technology* 9: 41-48.

- Huang Y, Xing CS, Hung HS 2000. Bioactivities of Methyl Allyl Disulfide and Diallyl Trisulfide from Essential Oil of Garlic to Two Species of Stored-Product Pests, *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology* 93: 537–543.
- Jirovetz L, Jager W, Koch HP, Remberg G 1992. Investigations of Volatile Constituents of the Essential Oil of Egyptian Garlic (*Allium sativum* L.) by Means of GC-MS and GC-FTIR. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung* 194: 363–365.
- Jood, S, Kapoor AC, Singh R 1993. Evaluation of Some Plant Products Against *Trogoderma granarium* Everst in Stored Maize and Their Effects on Nutritional Composition and Organoleptic Characteristics of Kernels. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 41: 1644-1648.
- Khorrani, F, Soleymanzade A 2016. Efficacy of Some Medicinal Plant Essential Oils, Extracts and Powders Combined with Diatomaceous Earth on Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus* F. (Coleoptera: Bruchidae). *International Journal of Science and Research* 5: 1118-1123.
- Korunic Z 1997. Rapid Assessment of Insecticidal Value of Diatomaceous Earths Without Conducting Bioassays. *Journal of Stored Products Research* 33: 219-229.
- Korunic Z 1998. Diatomaceous Earth a Group of Natural Insecticides. *Journal of Stored Products Research* 34: 87-97.
- Kostyukovsky M, Trostanetsky A, Menasherov M, Yasinov G, Hazan T 2010. Laboratory Evaluation of Diatomaceous Earth Against Main Stored Product Insect. *Proceedings of the 10th International Working Conference on Stored-Product Protection, 27 June to 2 July 2010, Estoril, Portugal* (Editörler: Carvalho ve ark.). Julius Kühn-Institute, Berlin, Germany, s.701-704.
- McLaughlin KM, Wakefield DB 2015. *An Introduction to Data Analysis Using Minitab 17 Textbook Binding*. Fifth Edition, University of Connecticut. 186 sy.
- Mete Z 1988. Kütahya-Alayunt Yöresi Diyatomit Yataklarının Zenginleştirilmesi. *Akdeniz Üniversitesi Isparta Mühendislik Fakültesi Dergisi* 49: 184-201.
- Özbey G, Atamer N 1987. Kizelgur (Diatom) Hakkında Bazı Bilgiler. 10. Türkiye Madencilik Bilimsel Teknik Kongresi, Ankara. s.493-502.
- Pandey ND, Singh SR, Tewari GC 1976. Use of the Plant Powders, Oils and Extracts as Protectants Against Pulse Beetle, *Callosobruchus chinensis* L. *Indian Journal of Entomology* 38: 110-113.
- Saglam, O, Şen R, Bozkurt H, Isikber AA 2020. Insecticidal Efficacy of Three Commercial Diatomaceous Earths, Detech®, Demite® and Silicosec® Against Cowpea Weevil, *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *IOBC-WPRS Bulletin* 148: 47-53.
- Sıvacı R, Dere Ş 2006. Melendiz Çayı'nın (Aksaray-Ihlara) Epipelik Diatom Florasının Mevsimsel Değişimi. *Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi* 27: 1-12.
- Subramanyam Bh, Swanson CL, Madamanchi N, Norwood S 1994. Effectiveness of Insecto®, a New Diatomaceous Earth Formulation, in Suppressing Several Stored-Grain Insect Species. *Proceedings of the 6th International Working Conference on Stored-Product Protection, 17-23 April 1994, Canberra, Australia* (Editörler: Highley, E., Wright, E.J., Banks, H.J., Champ, B.R.) CAB International, Wallingford, United Kingdom. s.650-659.
- Wakil W, Ashfaq M, Shabbir A, Javed A, Sagheer M 2006. Efficacy of Diatomaceous Earth (Protect-It) as a Protectant of Stored Wheat Against *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrycidae). *Pakistan Entomologist* 28: 19-23.
- Yang FL, Liang GW, Xu YJ, Lu YY, Zeng L 2010. Diatomaceous Earth Enhances the Toxicity of Garlic, *Allium sativum*, Essential Oil Against Stored-Product Pests. *Journal of Stored Products Research* 46: 118-123.
- Ziaee M, Moharrampour S, Francikowski J 2014. The Synergistic Effects of *Carum copticum* Essential Oil on Diatomaceous Earth Against *Sitophilus granarius* and *Tribolium confusum*. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 17: 817–822.

Gülнар (Mersin) İlçesi Elma Ağaçlarındaki Zararlı ve Yararlı Arthropoda Türlerinin Tespiti ve Bazı Biyokolojik Gözlemler*

Emre Deniz SARI¹, Erol YILDIRIM²

¹Tarım Kredi Kooperatifleri, Mersin Bölge Birliği, 2397 Gülнар Tarım Kredi Kooperatifli- Gülнар- Mersin-TÜRKİYE, ²Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 25240- Erzurum- TÜRKİYE

¹<https://orcid.org/0000-0001-8405-9218>, ²<https://orcid.org/0000-0002-3509-425X>

✉: eyildi@atauni.edu.tr

ÖZET

Gülнар (Mersin)'da elma ağaçlarında bulunan zararlı ve yararlı Arthropoda türlerini saptamaya yönelik olarak yapılan bu çalışma 2014-2015 yıllarında ilkbahar, yaz ve sonbahar aylarında sürdürülmüştür. Çalışma sonucunda, 26 zararlı ve 13 yararlı tür tespit edilmiştir. En önemli zararlı türlerin; *Panonychus ulmi* (Koch, 1836), *Aphis pomi* DeGeer, 1773, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann, 1802), *Tropinota hirta* (Poda, 1761) ve *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) olduğu belirlenmiştir. Bölgede elma ağaçlarında ekonomik açıdan önemli ve ana zararlı türün, *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) olduğu ve eşeysel çekici feromon tuzakları kullanılarak bu türün ilk ergin çıkış zamanı, popülasyon değişimleri ve doğada aktif olarak bulunduğu dönemler saptanmıştır. Ayrıca, bu çalışmada incelenen zararlı türlerin biyokolojileri ile ilgili bazı bilgiler elde edilmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 16.02.2021

Kabul Tarihi : 01.04.2021

Anahtar Kelimeler

Elma
Zararlı ve Yararlı Arthropoda Türleri
Biyokoloji
Gülнар
Mersin

Determination of Pests and Beneficial Arthropoda Species Associated with Apple Trees in Gülнар (Mersin) and Some Bioecological Observations

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the apple trees pests and beneficial Arthropoda species on the apple trees in Gülнар (Mersin) during the spring, summer and autumn of 2014-2015. In the this study, 26 pests and 13 beneficial Arthropoda species were revealed. Of these, *Panonychus ulmi* (Koch, 1836), *Aphis pomi* DeGeer, 1773, *Eriosoma lanigerum* (Hausmann, 1802), *Tropinota hirta* (Poda, 1761) and *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) were determined as the most important harmful species. The first adult emergence time, population changes and active periods of *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758), which is economically important and the main pest species in in apple trees of this area, were determined. In addition, some information about the bioecology of the pest species examined was obtained.

Research Article

Article History

Received : 16.02.2021

Accepted : 01.04.2021

Keywords

Apple fruit trees
Pests and beneficial species in Arthropoda
Bioecology,
Gülнар
Mersin

Atf İçin: Sarı ED, Yıldırım E 2021. Gülнар (Mersin) İlçesi Elma Ağaçlarındaki Zararlı ve Yararlı Arthropoda Türlerinin Tespiti ve Bazı Biyokolojik Gözlemler. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1247-1262. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.881526.

To Cite: Sarı ED, Yıldırım E 2021. Determination of Pests and Beneficial Arthropoda Species Associated with Apple Trees in Gülнар (Mersin) and Some Bioecological Observations. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1247-1262. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi. 881526.

GİRİŞ

Ilıman iklim meyvesi olan elma (*Malus domestica* Borkh.), gülgiller (Rosaceae) familyasının Pomoideae altfamilyası içerisinde yer alır. Elma, dünyada ve Türkiye'de ekonomik değeri en yüksek meyve türlerinden birisidir. Sibiryaya ve Çin'in kuzeyi gibi çok soğuk iklim bölgelerinin yanında, Kolombiya ve Endonezya gibi sıcak bölgelere de adapte olmuş bir meyve türüdür (Hampson ve ark., 2000). Türkiye, dünya üzerinde bulunduğu coğrafi konumu nedeniyle tropik bahçe bitkileri dışında tüm meyve türleri için

oldukça elverişli bir iklime sahiptir. Bu bakımdan Türkiye, bahçe bitkileri kültürünün doğuş yeri, dünyada yetişen birçok meyve türünün anavatanı konumundadır (Ağaoğlu ve ark., 1997). Dünya üzerinde çok geniş alanlara yayılmış olan elma, pek çok bölgeye kolay adapte olabilen bir meyve türüdür. Dünya üzerinde 6.000 çeşidi bulunan elmanın Türkiye'de ise 450-500 çeşidinin olduğu bilinmektedir. Elma bulunduğu ortama kolay adapte olma özelliğine sahip olması ve tüketicilerin tercih etmelerinden dolayı ülkemizde yetiştiriciliği geniş alanlarda yapılmakta ve üretimi hızla artmaktadır (Özbek,

1978).

Türkiye'nin hemen hemen her bölgesinde yetişen elma, Gülnar ilçesinde de üreticilerin en önemli gelir kaynaklarının başında gelmektedir. Türkiye'de 2.480.444 ton elma üretilmekte bunun ise 4.293 (%0.17) tonu Gülnar'da üretilmektedir (Anonim, 2014). Elma yetiştiriciliğinde üretimi sınırlayan ve kaliteyi düşüren birçok hastalık ve zararlı bulunmaktadır. Türkiye'de ve gerekse uluslararası alanda elma zararlıları ve doğal düşmanları ile ilgili bazı çalışmaların yapıldığı dikkati çekmektedir. Bunlardan bazıları ise şunlardır; Elma içkurdu, *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758) yumuşak çekirdekli meyvelerde önemli zararlılara neden olmaktadır (Chapman, 1973; Erden, 1988; Barnes, 1991). Croft (1982), Elma içkurdunun (*C. pomonella*) bütün dünyada elmanın en önemli zararlısı olduğunu, yılda iki veya daha fazla nesil verdiğini, mücadele yapılmayan bahçelerde meyve kurtlanma oranlarının %25'in üzerine ulaşabildiğini bildirmektedir. Pedigo (1996), *C. pomonella*'nın Japonya ve Batı Avustralya hariç dünyanın bütün ülkelerinde bulunduğunu ve elmanın en önemli zararlısı olmakla beraber, ceviz, armut ve ayvada da zararlı olduğunu, yılda 1-3 nesil verdiğini, zarar oranının %20-95 arasında değiştiğini belirtmektedir. Türkiye'de yapılan çalışmalarda ise Özpınar ve ark., (2009), Çanakkale ilinde Elma içkurdunun yayılış alanı ve popülasyon gelişimi üzerinde yaptıkları çalışmada, ilk ergin çıkışının nisan ayında gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Marmara ve Trakya Bölgesi'nde yapılan bir çalışmada, *Panonychus ulmi* İstanbul, Kocaeli, Sakarya ve Bursa'da tespit edilmiş ve konukçularının ise yumuşak çekirdekli (elma, armut, ahlat, ayva ve muşmula) ve sert çekirdekli meyveler (kiraz ve vişne) ile mahlep ve fındık olduğu belirlenmiştir (Göksu ve Atak, 1969). Amasya yöresinde elma bahçelerinde zararlı akar türleri arasında *Bryobia rubrioculus*, *Tetranychus urticae*, *T. viennensis*, *Panonychus ulmi*, *Aculus schlechtendali*, *Calepitrimerus baileyi*, *Tarsonemus carli*, *Cenopalpus pucher* gibi fitofag türlerin yanında, *Amblyseius agrestis*, *Euseius finlandicus*, *Kampimodromus aberrans*, *Phytoseius finitimus*, *Typhlodromus pyri* ve *Tydeus californicus* gibi predatör türler de saptanmıştır (İncekulak ve Ecevit, 2002). Bulut ve Kılınçer (1989) Ankara'da Elma içkurdunun yumurta parazitöitleri olan *Trichogramma embryophagum* (Hartig 1838) ve *T. kılınçeri* Kostadinov'nin doğal etkinlikleri üzerine yaptıkları çalışmada her iki parazitoit türün yaygın ve etkin olduğunu saptamışlardır. Çiftçi ve ark., (1995), *C. pomonella*'nın Antalya'nın Korkuteli ve Elmalı ilçelerinde yılda iki nesil verdiğini bildirmişlerdir. Karaca ve ark. (2010), Isparta elma bahçelerinde 2001-2004 yılları arasında yaptıkları bir çalışmada, 4 takıma ait 19 zararlı tür tespit etmişler ve *Tetranychus urticae* (Koch, 1836), *Panonychus ulmi*

(Koch, 1836) ve *C. pomonella*'nın ise en yaygın zararlı türler olduğunu belirlemişlerdir. Mamay ve Yanık (2013), *C. pomonella*'nın Şanlıurfa'da elma bahçelerinde ilk ergin uçuşunun nisan sonunda başladığını ve uçuşların eylül sonuna kadar yaklaşık beş ay aktif olarak sürdüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca zararlının ergin popülasyonunun oluşturduğu tepe noktaları dikkate alındığında üç nesil verdiğini bildirmişlerdir. Altay ve ark. (1972), Marmara Bölgesi meyve bahçelerinde ekonomik olarak zarara sebep olan Coccidae familyası türlerinden *Sphaerolecanium prunastri* (Boyer de Fonscolombe, 1834), *Parthenolecanium corni* (Bouché, 1844) ve *Ceroplastes sinensis* Del Guercio, 1900'in bulunduğunu ve bu türlerin avcılarının *Chilocorus bipustulatus*, *Adalia bipunctata* olduğunu kaydetmişlerdir. Düzgüneş ve Toros (1978), Ankara ili ve çevresinde yaptıkları bir çalışmada, elma ağaçlarında bulunan yaprakbiti türlerinden *Aphis pomi* De Geer, 1773, *Dysaphis plantaginea* (Passerini, 1860) ve *Dysaphis devectora* (Walker, 1849)'nın en yaygın türler olduğunu, nadir olarak da *Aphis craccivora* Koch, 1854'nin görüldüğünü belirtmişlerdir. Erden (1979), Adana, Mersin, Kahramanmaraş ve Antalya illeri elma bahçelerinde yapılan bir çalışmada dokuz takıma ait 35 familyaya bağlı 40 tür tespit etmiştir. Yiğit ve Uygun (1982), Adana, Mersin ve Kahramanmaraş illerindeki elma bahçelerinde 1978-1979 yıllarında yaptıkları bir çalışmada, altı takıma ait 42 familyaya bağlı 132 fitofag tür, yedi takıma ait 21 familyaya bağlı 67 entomofag tür olmak üzere toplam 199 tür kaydetmişlerdir. Erden (1988), Ağrı, Erzincan, Erzurum, Gümüşhane, Kars, Sivas ve Tunceli illerindeki yumuşak çekirdekli meyvelerde yürüttüğü çalışmalarda *C. pomonella* larvalarının elma ağaçlarındaki zarar oranının %58,48 olduğunu ve zararlının bölgede iki nesil verdiğini tespit etmiştir. Kiroğlu ve ark. (1992), Karadeniz Bölgesi'ndeki elma bahçelerinde entegre mücadele imkanlarını araştırmışlar ve önemli zararlılardan biri olan *A. pomi*'nin devamlı elma ağaçları üzerinde yaşadığını ve yaz aylarında daha çok sürgünlerde beslendiğini belirlemişlerdir. Toros ve ark. (1996), Van ilinde Aphidoidea üstfamilyasına bağlı 40 yaprakbiti türü saptamışlardır. Bu türlerden *A. pomi*, *H. pruni*, *M. cerasi*, *Chaitophorus leucomelas* Koch 1854 ve *Brachycaudus cardui* (Linnaeus, 1758) (Hemiptera: Aphididae)'nin bölgede en yaygın türler olduğunu kaydetmişlerdir. Coşkun (1999), Iğdır ovasındaki yumuşak ve taş çekirdekli meyve ağaçlarında bulunan Coccidae ve Diaspididae familyalarına ait türleri belirlemek amacıyla yaptığı çalışma sonucunda, Coccidae familyasından *S. prunastri* ve Diaspididae familyasından *Diaspidiotus perniciosus*, *Lepidosaphes ulmi* (Linnaeus, 1758) ve *Diaspidiotus prunorum* (Laing, 1931) olmak üzere toplam dört tür tespit etmiş, bunlardan *D. perniciosus* ve *L. ulmi*'nin ekonomik zarar eşiğini aştığını belirlemiştir. Kasap (2003),

Amphitetranychus viennensis'in beş farklı elma çeşidinde 25°C ve 65±10 orantılı nemde, 16:8 ışıklandırma periyodunda gelişme durumu ve dönemlerini bildirmiştir. *A. viennensis*'in Golden Delicious çeşidi üzerinde diğer elma çeşitlerinden daha iyi gelişim gösterdiğini, gelişme süresinin 10,7 gün ve yumurta bırakma oranının 5,2 yum/dişi/gün olduğunu kaydetmiştir. Narmanlıoğlu (2013), Yukarı Çoruh Vadisi'nde yetiştirilen meyve türlerinden elma, armut, ayva, erik, şeftali, kayısı, kiraz, vişne ve ceviz ağaçlarında yürüttüğü çalışmalar sonucunda Aphididae familyasından 15 yaprakbiti türünü tespit etmiştir.

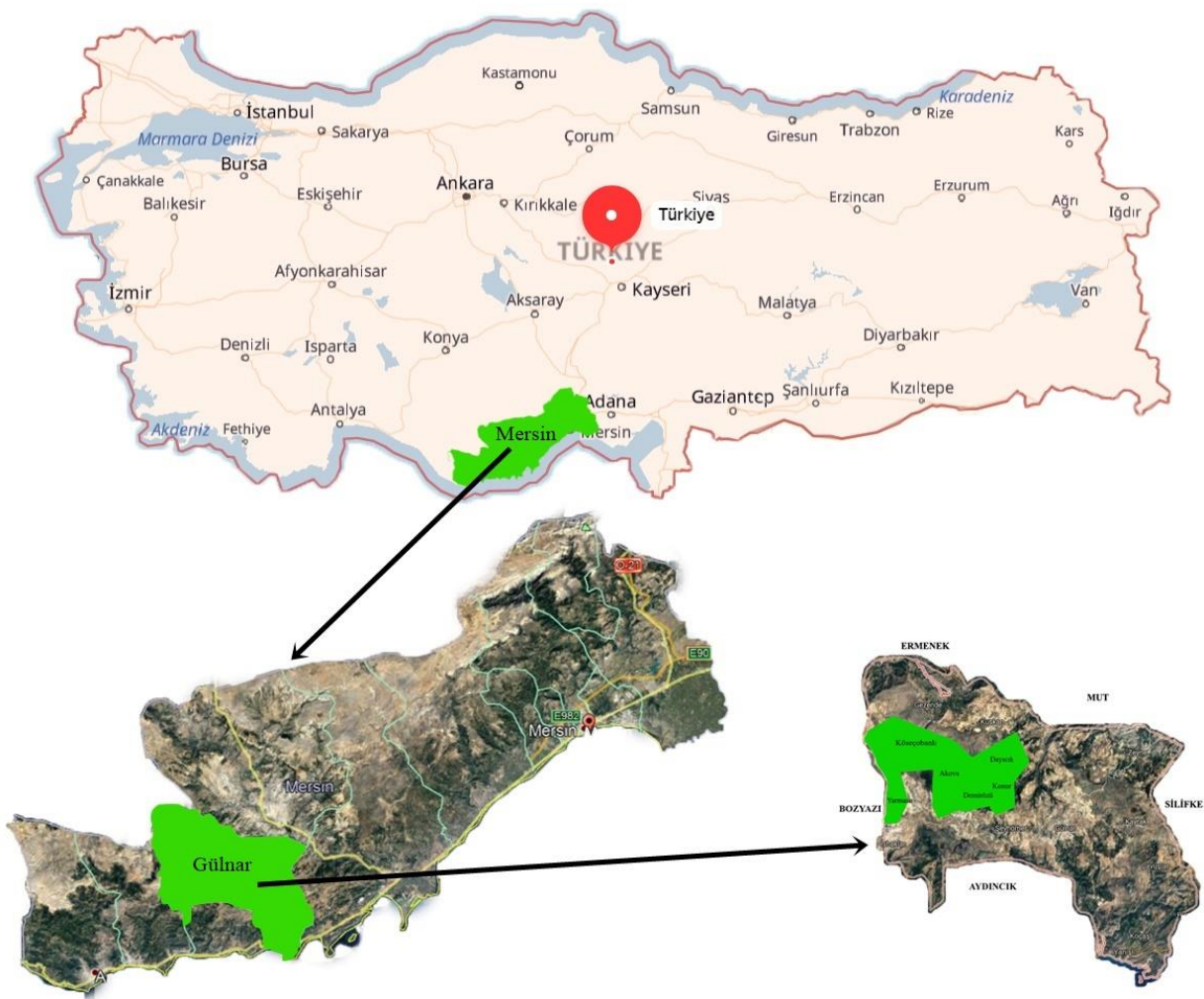
Gülнар ilçesinde elmada bulunan zararlı ve faydalı türler üzerinde daha önce kapsamlı bir çalışma

yapılmamıştır. Bu çalışmanın amacı, Gülнар ilçesinde elma ağaçlarında ekonomik kayıplara sebep olan zararlı türlerin ve doğal düşmanlarının tespiti ve zararlı türlerin biyokolojileri ile ilgili bazı bilgiler elde edilerek zararlılara karşı yürütülecek olan entegre mücadele çalışmalarında söz konusu verilerin kullanılmasını sağlamaktır.

MATERYAL ve METOT

Araştırma Bölgesi

Araştırmanın materyalini, Mersin ili Gülнар ilçesindeki elma bahçelerinden toplanan zararlı ve doğal düşman türlerine ait örnekler oluşturmuştur (Şekil 1).



Şekil 1. Arazi çalışmalarının yürütüldüğü alanların Türkiye'deki konumu.

Figure 1. Location of the areas where the execution of fieldwork in Turkey.

Materyalin Toplanması

Araştırma alanında zararlı ve faydalı türleri tespit etmek amacıyla 2014-2015 yıllarında ve Mart-Ekim ayları arasında belirlenen bahçelere her hafta düzenli olarak gidilerek materyal toplanmış ve gözlemler yapılmıştır. Çalışmalar elmanın farklı fenolojik

dönemlerinde görülebilen türleri tespit etmek amacıyla çiçeklenme başlangıcından meyve hasadına kadar, haftada en az bir gün, kış mevsiminde ise mevsim boyunca iki kez araziye çıkılarak sürdürülmüştür. Çalışmanın sorvey planı, bölgenin ulaşım durumu, coğrafik özellikleri ve üretim

kapasitesi göz önüne alınarak yapılmıştır.

Elma bahçelerindeki zararlı ve yararlı türlerin belirlenmesi amacıyla, her örnekleme bahçesindeki ağaçların öncelikle kök boğazı, gövde, dal, sürgün, yaprak, çiçek ve meyveleri gözle incelenerek örnekler alınmıştır. Bu amaçla, bölgede elma yetiştiriciliğinin yoğun olarak yapıldığı mahalleler, İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü ve Ziraat Odası verilerinden yararlanılarak tespit edilmiştir. Tespit edilen mahallelerde bulunan bahçelerde örnekleme ve gözlemler yapılmıştır. Sörvey çalışmaları çiçeklenme ile hasat arasındaki kritik dönemlerde daha sık yapılmıştır. Ayrıca örneklerin toplandığı yer bilgileri ve toplama tarihleri de kaydedilmiştir. Örnekleme aşağıda belirtilen metotlara göre yapılmıştır.

Dal sayım metodu

Kışı ağaçların üzerinde geçiren zararlı türleri ve yoğunluklarını belirlemek için bu yöntem kullanılmıştır. Dal sayımları, ağaçların dormant dönemde olduğu mart ayı başından sonuna kadar iki defa yapılmıştır. Bunun için bahçeyi temsil edecek şekilde beş ağacın her birinden 20 cm uzunlukta farklı yöneylerde bulunan, 1-3 yıllık 12 dal parçası kesilmiş ve bunlar önce kese kâğıdına ve sonra polietilen torbalara yerleştirilerek laboratuvara getirilmiştir. Burada dalların onar adedi üzerindeki zararlı; kabuklubit, koşnil, kırmızıörümcek yumurtaları v.s. mikroskop altında sayılmıştır. İkişer adedi ise parazitoit çıkartma kutularına yerleştirilerek doğal parazitlenme oranı saptanmaya çalışılmıştır.

Gözle kontrol metodu

Bu yöntem, bütün vejetasyon süresince, elma bahçelerinde bulunan zararlı ve yararlı türler ile bunların popülasyon yoğunluklarını saptamak için kullanılmıştır.

Gözle inceleme, vejetasyon süresince 1-2 hafta aralıklarla yapılmıştır. Bunun için, bahçeyi temsil edecek şekilde on ağaç seçilmiş ve bu ağaçların her birinden onar olmak üzere toplam 100 adet bitkinin farklı kısımları incelenmiştir. Fenolojik döneme bağlı olarak, çiçeklenme öncesinde tomurcuk, çiçeklenme döneminde çiçek, daha sonra yaprak ve meyve üzerinde bulunan, zararlı ve yararlı böcekler ve yenikler gözle veya büyüteçle ağaçların üzerinde gözlenmiştir. Örnekleme bahçesindeki ağaç sayısına bağlı olarak her ağacın etrafında dolaşarak bitkinin fenolojik dönemine göre gövde, dal, sürgün, yaprak ve meyveleri üzerinde gözle görülen erginler elle veya ağız aspiratörü ile toplanarak, etiket bilgisiyle birlikte plastik kapaklı kutulara konulmuştur. Ergin öncesi dönemde olanlar ise ya buldukları bitki organıyla birlikte kesilerek veya bir pens yardımıyla alınarak besinleriyle birlikte ağız hava almaya elverişli olan plastik saklama kutularına etiket bilgileriyle birlikte konulmuş ve kültüre alınarak ergin çıkışları

sağlanmıştır.

Zararlı ve predatör akar türleri ve yoğunluklarını belirlemek için, her bahçeden seçilen on ağacın değişik yön ve yüksekliklerinden alınan yaprak örneklerinin alt ve üst yüzeyleri büyüteç ve mikroskop altında incelenmiştir. Zararlı ve predatör akar türlerine ait canlı dönemlerinin gözlemleri yapılmıştır. Yapraklar ve dallar üzerindeki akarlar fırça yardımıyla içerisinde %70'lik alkol bulunan tüplere alınarak tüplerin ağız kapatılıp parafilmle sarılıp etiket bilgileri de yazıldıktan sonra muhafaza altına alınmıştır. Yaprakbitleri gibi yumuşak vücutlu olan bireyler ise yumuşak uçlu bir fırça yardımıyla, içerisinde %70'lik alkol bulunan tüplere aktarılarak etiket bilgileri de eklendikten sonra tüplerin ağız kapatılmış ve parafilmle sarılarak muhafaza altına alınmıştır.

Darbe metodu

Bu yöntem, ağaçların üzerinde bulunan hareketli veya hareket kabiliyeti az olan zararlı ve yararlı türlerin yoğunluklarını belirlemek için kullanılmıştır. Çiçeklenme başlangıcından itibaren, haftalık olarak çıkılan arazi çalışmalarında rastgele seçilen ağaçlar üzerinde uygulanmıştır. Bu işlem sörvey yapılan bahçelerden tesadüfen seçilen on ağacın toplam 40 dalına uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Ağaçların dört yönünden ve farklı yüksekliklerinden birer dalı seçilerek her dala sopa ile üç kez vurularak dalların üzerinde bulunan zararlı ve yararlı türlerin, dalların altında tutulan bir kenarı 50 cm olan kare şeklindeki beyaz kumaştan yapılan Japon şemsiyesi üzerine düşmesi sağlanmıştır. Japon şemsiyesi üzerine düşen böcekler aspiratör yardımıyla toplanmış ve öldürme kutusuna aktarılmıştır. Bu böceklerden ergin olanları öldürme şişelerinde öldürülerek, lokasyon bilgisini içeren etiketler konularak koleksiyon yapılmak üzere laboratuvara getirilmiştir. Burada türlerine göre ayrılarak yoğunlukları belirlenmiştir. Japon şemsiyesi içerisine düşen tüm bireyler daha sonra 30x50 cm boyutlarında polietilen torba içerisine, lokalite bilgisini içeren etiketle birlikte konularak laboratuvara getirilmiştir. Laboratuvara getirilen polietilen torba içerisindeki materyalden bitki parçacıkları temizlendikten sonra larva döneminde olan örnekler kültüre alınmıştır.

Tuzak metodu

Bu çalışmada tuzak olarak elma bahçelerinde zararlıların popülasyon takibinde eşeysel çekici tuzaklar, yapışkan tuzaklar, besin tuzakları, ışık tuzakları ve renk tuzakları kullanılmıştır.

Özellikle, *C. pomonella* için delta tipi eşeysel çekici tuzaklar kullanılmıştır. Tuzaklar, Gülnar'da elma yetiştiriciliğinin yoğun yapıldığı yerlerde hâkim rüzgâr yönü esas alınarak yerden 1.5-2 metre yükseklikteki dallara asılmıştır. Feromon tuzaklar, yakalanan erginlerin yapışması için tabanında

yapışkan levha bulunan ve dişi bireylerin feromonlarının yapay olarak emdirildiği kapsüllerden oluşmaktadır. Tuzaklardaki feromon kapsülleri, alınan ticari firmanın prospektüs önerisi ile 4-6 haftada bir yenileriyle değiştirilmiştir. Yapışkan plaka ise özelliğini kaybetmesine göre belirli aralıklarda yenileri ile değiştirilmiştir. Tuzaklar nisan ayının ikinci haftasında asılmış ve ilk ergin çıkış zamanı belirlenene kadar her gün kontrol edilmiş ve ilk ergin çıkışı belirlendikten sonra haftada bir kez tuzak kontrolleri yapıp sayım sonuçları kaydedilmiştir. *Tropinota hirta* (Poda, 1761) için her bahçeye yarısına kadar su doldurulmuş en az iki adet olacak şekilde mavi leğenler konulmuştur. Bu leğenler belirli aralıklarla kontrol edilmiş suya düşen erginler kaplara alınmış ve suyu eksilen leğenlere su takviyesi yapılmıştır. Kabuk altında kışı geçiren ve belli dönemlerini kabuk altında hareketsiz geçiren zararlılar için içerisinden geçemeyecekleri sıklıkta örülmüş file ile buldukları yerin üzeri kapatılmış, aktif hale geçtiklerinde buranın altında kalması ve kontrol altına alınması hedeflenmiştir.

Kültüre alma metodu

Dal sayımı ve göz ile inceleme yöntemlerine göre örnekleme yapılırken zararlı ile bulaşık dal, sürgün, yaprak, meyve ve kabuk gibi bitki parçaları koparılarak saydam torba, plastik kap, petri kutusu ve tüplere alınarak, bitki parçacıkları, diğer zararlılardan temizlendikten sonra, oda şartlarında, şeffaf plastik olan kültür kaplarına ayrı ayrı alınmış ve ergin çıkışları sağlanmıştır.

Sürgün alma metodu

Ağaçlarda bulunan zararlı ve yararlı türlerin örnekleme amacıyla, seçilen bahçeleri temsil edecek şekilde beşer ağaç işaretlenmiş, bunların her birinden kış mevsiminde iki kez, 2-3 yıllık dallardan uçtan itibaren 20 cm uzunlukta sürgün kesilerek laboratuvara getirilmiş üzerindeki zararlılar mikroskopla incelenmiştir. Ayrıca çiçeklenme döneminde her bahçede on ağaç işaretlenerek ve her ağaçtan 10 cm'lik bir sürgün laboratuvara getirilmiş, zararlı ve yararlı türlerin toplanmasında kullanılmıştır.

Atrap metodu

Otsu bitkilerden sezon içinde ağaçlara geçişi mümkün olan türleri belirlemek için gerek duyuldukça atrap yöntemi de kullanılmıştır.

Materyallerin Hazırlanması

Elma ağaçlarından toplanan örnekler laboratuvara getirilerek bitki parçacıklarından ayıklanmış ve küçük boyutlu ergin bireyler üçgen kâğıtlar üzerine yapıştırılmış, büyük boyutlu bireyler ise doğrudan

İğnelenmiştir. Yapıştırıcı madde olarak su içerisinde çözünebilir bir yapıştırıcı (glotofix) kullanılmıştır. İğneleme ve üçgen kartonlara yapıştırma işlemleri yapılırken vücut üzerinde teşhis karakteri olarak kullanılan kısımların zarar görmemesine özen gösterilmiştir. Bunun için tripsler öncelikle trips saklama sıvısından alınıp içerisinde laktofenol bulunan petrilere 30 dakika bekletilmiştir. Bu bireyler daha sonra üzerine Hoyer damlatılmış lam üzerine ventral olarak yerleştirilerek kanat, bacak ve antenleri düzeltildikten sonra üzerleri lamelle kapatılıp 55°C'ye ayarlanmış etüvde bir saat bekletilmiştir. Bu şekilde preparatları yapılan örnekler teşhise hazır hale getirilmiştir.

Tür Teşhislerinin Yapılması

Türlerin familya düzeyinde teşhisi mikroskop yardımı ile yapılmıştır. Teşhisler yapılırken genellikle türlerin morfolojik karakterleri kullanılmıştır. Daha sonra familya bazında ayrılan örnekler konunun uzmanı olan kişiler tarafından teşhis edilmiştir:

BULGULAR ve TARTIŞMA

Teşhisi Yapılan Zararlı Türler

Mersin ili Gülnar ilçesinde 2014-2015 yıllarında elma bahçelerindeki zararlı Arthropoda türlerini belirlemek amacıyla yapılan bu çalışma sonucunda beş takıma bağlı 12 familyaya ait 26 tür tespit edilmiştir. Bunlar:

Takım: Prostigmata

Eriophyidae

Aculus schlechtendali (Nalepa, 1890)

A. schlechtendali'nin dişilerinin kışı tomurcuklara yakın yarık ve çatlaklarda, tomurcuk pulları altında gruplar halinde hareketsiz olarak geçirdiği tespit edilmiştir. Kışladıkları alanlarda 60x'lik büyüteç yardımıyla görülen ergin dişilerinin yerinin tespit edilmesi amacıyla kalemle işaretleme yapılarak düzenli olarak arazide kontrolleri yapılmıştır. Erginlerin nisan ayının ilk haftasından itibaren gözlerin de uyanmasıyla birlikte kışlama yerlerinden çıkmaya başladığı tespit edilmiştir. Haftalık olarak yapılan arazi çalışmalarında yeni sürgünlerdeki taze yapraklarda ve tomurcuklarda mayıs ayının üçüncü haftasından itibaren yoğunluğunun artmaya başladığı ve aktif olarak zarar yaptığı belirgin bir şekilde tespit edilmiştir. Zararlının en yoğun görüldüğü dönem haziran, temmuz ve ağustos ayları olup, yaprakların alt yüzlerinde yoğun olarak gözlenmiştir. Daha sonraki aylarda zararlı popülasyonunda hızlı bir düşüş gözlenmiştir. Yaprak üzerinde pas belirtileri görüldüğü anda ilaçlama yapılmakta ve ilaçlama yapılmadığında popülasyon yoğunluğunun ve zarar şiddetinin artmasına bağlı olarak yaprakların alt yüzünde keçeğe benzer şekil bozukluğuna neden oldukları gözlenmiştir. Aynı zamanda meyve üzerinde

de beslendiği ve pas oluşturduğu tespit edilmiştir. Denizhan (2007) yaptığı çalışmada zararlının kışı deutogyne döneminde ağaçların çatlak ve yarıklarında, henüz açılmamış olan tomurcuk diplerinde geçirdiğini ve *Aculus schlechtendali*'nin kışlaklarda kışı geçiren deutogyne dönemleri havaların ısınmaya başlamasıyla birlikte tomurcuklar ve henüz açılmakta olan yapraklara yerleşmeye başladıklarını ifade etmiştir. Easterbook (1984), bu türün elma yapraklarının alt yüzeyinde yoğun olarak gözlemlendiğini ileriki dönemlerinde *A. schlechtendali*'nin meyvelerde pas rengi görünümünde bir simptomu neden oldukları için ciddi zararlar oluşturduklarını bildirmiştir.

Tetranychidae

Bryobia rubrioculus (Scheuten, 1857)

B. rubrioculus'un kışı yumurta halinde taze dalların sürgün boğumlarında kırmızı kümeler halinde geçirdiği tespit edilmiştir. Kışı aynı zamanda ergin olarak da geçirdiği görülmüştür. Dallarda ve gövdede görülen yumurtaların yerinin tespit edilmesi amacıyla dallara renkli ipler bağlanmıştır. İp bağlanan dallardaki yumurtalar renkli kalemlerle işaretlenmiştir. Haftalık olarak yapılan arazi çalışmalarında *B. rubrioculus*'un kış yumurtasının nisanın ilk haftasından itibaren açılmaya başladığı ve bunun mayısa kadar devam ettiği tespit edilmiştir. Haftada bir çıkılan arazi çalışmalarında yumurtalar hem yapraklarda ve hem de dallarda tespit edilmiştir. Aynı zamanda yapraklarda hem ergin ve hem de nimf dönemlerine rastlanmıştır. Ağaç üzerinde yeni nesile ait ilk yumurtalara mayısın son haftasında rastlanmıştır. Haziran ve temmuz aylarında ilaçlamalar devam etmesine rağmen popülasyon yoğunluğu fazla olarak kaydedilmiştir. Çiçek tomurcukları iyice gelişince *Panonychus ulmi* ile beraber *B. rubrioculus* kış yumurtaları açılmaya başlamıştır. Nisanın son haftasında elma yapraklarının 2-3 cm büyüklüğü aldığı gözlenmiştir. Bu tarihte kış yumurtalarının tamamına yakının açıldığı tespit edilmiştir. Haziran ilk haftasından itibaren akar popülasyonunun artmaya başladığı ve en yüksek yoğunluğa temmuz ayında ulaştığı görülmüştür. Bahçelerde yapılan kontrollerde yapraklarda zararın en fazla temmuz ayında olduğu gözlenmiştir.

Panonychus ulmi (Koch, 1836)

P. ulmi'nin kışı yumurta halinde geçirdiği, yumurtaları elma ağaçlarının meyve tomurcuğu ve odun gözlerinin etrafına bıraktığı tespit edilmiştir. Dallar üzerinde görülen yumurtaların yerinin tespit edilmesi amacıyla 60x'lik lup kullanılmış ve kırmızı renkli bir kalemle yumurtaların bulunduğu kısımlar işaretlenmiştir. *P. ulmi*'nin kış yumurtalarının nisan ayının ortalarından itibaren açılmaya başladığı tespit edilmiştir. Arazi çalışmalarında yaprakların alt ve üst

yüzeyinde; yumurta, ergin ve nimf dönemlerine rastlanmıştır. Yeni nesil erginlerinin yoğun olarak yumurta bırakmaya haziran ayının ilk haftasında başladığı görülmüştür. Haziran ayının ortasında sürekli ilaçlama yapılmasına rağmen popülasyon yoğunluğunun yüksek olduğu gözlenmiştir. Çiçek tomurcukları iyice gelişince *P. ulmi*'nin zarar yapmaya başladığı görülmüştür. Nisanın son haftasında bitki üzerinde ilk çıkan yapraklarda zararı gözlenmeye başlanmıştır. Haziran'ın ilk haftasından itibaren yaprak başına düşen akar popülasyonunun artmaya başladığı ve en yüksek yoğunluğun temmuz ayının ortalarında olduğu görülmüştür. Bahçelerde yapılan kontrollerde yapraklarda zararın en çok temmuz ve ağustos ayında dikkat çekici düzeyde olduğu tespit edilmiştir. *P. ulmi*'nin zararı nisan ayının ilk haftasından ekim ayının sonuna kadar devam etmekte olduğu görülmüştür. *P. ulmi* çiçek çanak yaprakları etrafındaki taze yaprakları emerek sararttığı gözlenmiştir. Yazın ise zarar görmüş yaprakların bronz rengini aldığı ve yaprak kenarlarının kıvrılarak ilerleyen dönemlerde döküldüğü tespit edilmiştir. Ağız yapısı delici ve emici yapıda olduğu, styleti ile yaprak dokusunu parçaladıkları ve yaprağın öz suyu ile beslendikleri görülmüştür. Emgi yaptığı alanlarda sarı renkli bir görüntü oluştuğu tespit edilmiştir. Cuthbertson ve Murchie (2006) yaptıkları çalışma ile *P. ulmi*'nin konukçularının yapraklarındaki bitki öz suyunu emerek zararlı olduğu ve bunun sonucu yapraklarda önce beyaz, sonra sarımsı kahverengi lekeler meydana geldiği ve daha sonra bu lekeler birleşerek yaprağın kuruyup dökülmesine sebep olduklarını, genellikle yaprakların alt kısmında ve yaprak damarlarına yakın yerlerde stiletleri ile sokup emme şeklinde zarar yaptıklarını, zararı ilerledikçe emgi yerlerinde renk değişikliği ve bronz bir görüntüye sebep olduklarını, konukçusu olduğu meyve ağaçlarında *P. ulmi* zararı sonucunda meyvelerde kalite ve kantitenin olumsuz etkilendiğini bildirmişlerdir.

Tetranychus urticae (Koch, 1836)

Bu türün, kışı dişi olarak ağaç kabuklarının altında, ağaçlardaki çatlak ve yarıklarda uyusuk halde geçirmekte olduğu tespit edilmiştir. Dişiler kışı geçirirken portakal veya kiremit rengine dönüştükleri için arazide fark edilmeleri daha kolay olmaktadır. Dişi erginlerin harekete geçme zamanını belirlemek amacıyla kalemle işaretlemeler yapılmıştır. Erginlerin mart ayının son haftasından itibaren kışlama yerlerinden çıkmaya başladığı tespit edilmiştir. Hem yaprakların alt yüzeyinde hem de üst yüzeyinde yumurta, ergin ve nimf dönemlerine rastlanılmıştır. Mayıs ayının sonunda itibaren yoğunluğunun artmaya başladığı tespit edilmiştir. Temmuz ve ağustos aylarında ise zarar seviyesinin arttığı gözlenmiş buna bağlı olarak popülasyon yoğunluğu kontrol edilmiş ve yaprak başına düşen birey sayısının fazla olduğu

görülmüştür. *T. urticae*'nin zararı nisan ayının ilk haftasından ekim ayının sonuna kadar devam ettiği görülmüştür. Erken dönemde çiçek çanak yaprakları ve ufak yaprakları emerek sarartmışlardır. Yazın ise zarar gören yaprakların bronz rengini aldığı gözlenmiştir. Zarar gören yaprakların kenarları kıvrılmış zarar çok ilerleyince de yaprakların dökülmeye başladığı görülmüştür. Diğer kırmızı örümcekler gibi *T. urticae* erginlerinin yaprak öz suyunu emerek zararlı olduğu ve bunun sonucu yapraklarda önce beyaz, sonra sarımsı kahverengi lekeler meydana geldiği ve daha sonra bu lekeler birleşerek yaprağın kuruyup dökülmesine sebep olduğu gözlenmiştir. Zararın yoğun olduğu bahçelerde meyvelerin küçük kaldığı ve tam olarak renk almadığı gözlenmiştir. Bu türün yapraklarda yoğun olarak ağ ördükleri de gözlenmiştir. Gerson ve Vacante (2012), Akdeniz ülkelerindeki turuncgillerde 11 akar türünün zarar yaptığını, bunların arasında *T. urticae*'nin de bulunduğunu bildirmiştir. Bu kırmızı örümcek türünün özellikle alt dallardaki yapraklardan bulaştığı ve emgi yaparak yaprakların klorofil yapısını bozdukları belirtilmiştir. Özellikle genç ağaçlarda fotosentezdeki kayıp nedeniyle kurumalar ve ölümlerin ortaya çıktığını bildirilmiştir.

Takım: Hemiptera

Aphididae

Aphis (Aphis) craccivora Koch, 1854

A. craccivora'nın yeni çıkan taze sürgenlerde görülmeye başladığı ve bu sürgünler üzerinde beslendiği gözlenmiştir. Yapraklarda beslenmeleri sonucu kıvrılma ve fumajine sebep oldukları görülmüştür. Bu türün, tespit edilen diğer türlere göre vücut renklerinin daha koyu olduğu gözlenmiş ve predatör ve parazitoitlerinin de bulunduğu tespit edilmiştir. Beslendikleri yerlerde çıkarmış oldukları fumajinlerin etrafında karıncaların beslendiği saptanmıştır.

Aphis (Aphis) pomi DeGeer, 1773

Bu türün, Nisan ayında erginleri koloni halinde yıllık sürgünlerde görülmeye başlanmıştır. Yapılan sörvey çalışmalarında sezon boyunca zararlıının hem kanatlı hem kanatsız bireylerine rastlanmıştır. Çalışmanın yürütüldüğü 2014-2015 yıllarının mayıs, haziran, temmuz aylarında popülasyon yoğunluğunun diğer aylara göre fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak ağustos ayında yüksek sıcaklık ve doğal düşmanlarının etkisiyle ergin bireylerde bir durağanlık gözlenmiştir. Haziran ayında popülasyon yoğunluğunun zirve seviyeye ulaştığı gözlenmiştir. *A. pomi*'nin daha çok fidanlıklarda ve genç ağaçlarda zarar oluşturduğu görülmüştür. Yaşlı ağaçlarda, daha çok sürgünler üzerinde yoğunluk gösterdikleri, aşırı yoğunluklarda sürgünlerin gelişmesinin yavaşladığı gözlenmiştir. Beslenmeleri sonucu fumajin oluşturdukları ve bu fumajinler üzerinde karıncaların

toplandıkları gözlenmiştir. Bu fumajinlerin arıları da cezbediği görülmüştür. Kimyasal kullanılmayan bahçelerde *A. pomi*'nin popülasyonunun yararlılar tarafından kontrol altında tutulduğu gözlenmiştir.

Dysaphis (Dysaphis) devectora (Walker, 1849)

D. devectora, Nisan ayının ilk haftası gözlerin patlaması ile birlikte görülmeye başlanmış ve çiçeklenme döneminden sonra ergin dişi bireylerin popülasyonlarında artış olduğu gözlenmiştir. Arazi çalışmalarında yaprakların alt yüzeylerinde ergin ve nimf dönemleri gözle ve lup yardımıyla tespit edilmiştir. Bitki özsuyunu emmek sureti ile yaprakların kıvrılarak kırmızı renk almasına neden olduğu ve fumajin oluşması nedeni ile bitkinin özümleme yapmasına engel olduğu aynı zamanda bu fumajinlerin etrafında karıncaların beslendiği gözlenmiştir.

Dysaphis (Pomaphis) plantaginea (Passerini, 1860)

Bu türün, Nisan ayının ilk haftasından sonra yapraklara geçtiği ve zarar oluşturmaya başladığı tespit edilmiştir. Yapraklarda kıvrılma ve fumajine sebep olarak yaprakta şekil bozukluklarına neden oldukları, aynı zamanda bu yapraklara yakın olan elmalarda gelişmenin yavaşladığı ve küçük kaldıkları gözlenmiştir. Mayıs ve haziran ayında popülasyonu ve zarar oranının en üst düzeye çıktığı görülmüştür. Haziran ayından sonra yapraklarda *D. plantaginea* popülasyonunda önemli oranda azalma olduğu gözlenmiştir. *D. plantaginea*, daha çok genç ağaçlarda zarar oluşturduğu görülmüştür. Yaşlı ağaçlarda, daha çok sürgünler üzerinde yoğunluk gösterdikleri aşırı yoğunluklarda sürgünlerin gelişmesinin yavaşladığı gözlenmiştir. Beslenmeleri sonucu fumajin oluşturdukları, bu fumajinler üzerinde karıncaların toplandıkları gözlenmiştir. Ayrıca bu fumajinlerin arıları da cezbediği görülmüştür. Sürgünler üzerindeki yaprakbitleri ile faydalı böceklerin beslendiği, ilaçlanmayan bahçelerde bu faydalıların zararlı popülasyonunu baskıladığı görülmüştür.

Eriosoma lanigerum (Hausmann, 1802)

Bu tür, kışı ergin dişi halinde ağaçların kabukları arasında ve kök boğazında geçirdiği tespit edilmiştir. Popülasyonunun temmuz ayının ikinci haftasında diğer aylara göre daha yoğun olduğu görülmüş ve ağustos ayından sonra popülasyon yoğunluğunun hızla düştüğü saptanmıştır. Bitki özsu emerek beslendikleri ve bitkiye salgıladıkları toksik maddeler sonucu urların ve şişkinliklerin meydana gelmesine ve ağaçlarda şekil bozukluklarına sebep olduğu görülmüştür. Alaserhat (2015), Erzincan ve Gümüşhane illerinde yetiştirilen ılıman iklim meyve türlerinde bu zararlı türün özellikle yaşlı ve terk edilmiş bahçelerdeki elma ağaçlarında yoğun ve yaygın olduğunu, ayrıca haziran ve eylül aylarında elma dışında erik ağaçlarında da bulunduğunu ifade etmiştir. Başka bir çalışmada ise *E. lanigerum*'ün

yüksek popülasyona ulaştığı dönemlerde, elma ağaçlarının gövde, dal ve sürgünleri ile meyvelerin çekirdek evi içerisinde zarar meydana getirdiği, zarar sonucu bitkinin zayıfladığı, az ürün vermesine hatta kurumasına neden olduğu ve çıkardığı toksik salgıların bitkide ur oluşumuna neden olduğu, köklerde beslenmesi sonucunda ise bitkinin toprak altı organları üzerinde de urların oluştuğu ve meydana getirdiği yaraların diğer hastalık etmenleri için giriş kapısı oluşturduğu ifade edilmektedir (Düzgüneş ve Toros, 1978).

***Rhopalosiphum padi* (Linnaeus, 1758)**

R. padi'nin elmada zarar oluşturduğuna dair herhangi bir bilgi bulunamamıştır. Kuloğlu (2011), *R. padi*'nin hububat türleri üzerinde zarar oluşturduğunu bildirmiştir. Bu tür elma üzerinde ekonomik olarak zarar oluşturmamaktadır. Ancak diğer yaprakbitleri popülasyonu ile birlikte arazi koşullarında rastlanmıştır.

Cicadellidae

***Empoasca decipiens* Paoli, 1930**

E. decipiens, kışı ergin dönemde yabancı ot ve bitki artıklarının arasında geçirdiği tespit edilmiştir. Nisan sonlarında erginler kışlaklardan çıkarak yaprakların alt yüzeylerinde beslenmeye başladıkları görülmüştür. Mayıs, haziran ve temmuz aylarında popülasyonun yoğun olduğu, temmuz ayından sonra ise popülasyon yoğunluğunun azalmaya başladığı tespit edilmiştir. Ergin ve nimfler yaprakların alt yüzünde bitki özsuğunu emerek beslenmektedirler. Çok genç ve küçük yapraklarda öncelikle damarlar etrafında yaprak dokularında büzgüler meydana getirerek küçük yaprakları çanak biçiminde çukurlaştırdıkları görülmüştür. Beslendikleri yaprakların yumuşaklığını kaybettikleri ve yaprağın alt yüzeyindeki damarların beyaz bir renk aldıkları fark edilmiştir. Zaman ilerledikçe bu yaprakların kenarlarında çepeçevre renk açılmaları olduğu görülmüştür.

Diaspididae

***Diaspidiotus perniciosus* (Comstock, 1881)**

Bu tür, lokal olarak bazı noktalarda tespit edilmiştir. İlkbaharda ağaçlarda gelişmenin başlamasıyla birlikte bitki özsuğu ile beslenmeye ve gelişmeye başladıkları görülmüştür. Nisan ve mayıs başlarında olgun bireyler gözlenmiştir. Bu dönemde çoğalmaya başladığı ve tekrar kabuk oluşturmaya başladığı, haziran ve temmuz aylarında zarar yoğunluklarının arttığı, ağaçların gövde, dal, yaprak, sürgün, tomurcuk ve meyvelerin özsularını emerek beslendiği, bu kısımdaki kabuklar bıçakla kaldırıldığı zaman altta kırmızı lekeler oluşturdukları gözlenmiştir. Meyve üzerinde beslendikleri yerde kabuk kaldırıldığında yapışmış oldukları yerin etrafında beslenmeden kaynaklı kırmızı lekeler oluşturdukları tespit edilmiştir. Erden (1988), beslendikleri yerlerde kabuk bir bıçak ile dal eksenine paralel şekilde kesildiği

zaman, altta kırmızı lekelerin görülmesinin bu zararlının en tipik özelliği olduğunu, emgi yerlerinin etrafında hale şeklinde kırmızı lekeler meydana getirdiğini, meyvelerin küçük kalarak pazar değerinin düştüğünü ifade etmiştir.

Lygaeidae

***Nysius graminicola* (Kolenati, 1845)**

Bu tür, elma üzerine ekonomik düzeyde zarar oluşturmamaktadır. Önder ve ark. (2006), yapmış oldukları bir çalışmada bu türün ekonomik önemi olmayan bir tür olduğunu, tarım alanları, ormanlar, makilik ve çayırılık alanlarda yaşadıklarını, bol bulunan bir tür olduğunu ve bitkisel besinlerle beslendiklerini bildirmişlerdir.

Rhopalidae

***Liorhyssus hyalinus* (Fabricius, 1794)**

Bu tür, elma üzerinden atrap sallama yöntemi ile elde edilmiştir. Elma üzerine ekonomik düzeyde zarar oluşturmalarına dair herhangi bir gözlem yapılamamıştır.

***Rhopalus (Rhopalus) subrufus* (Gmelin, 1790)**

Bu tür, elma ağaçları üzerinden atrap sallama yöntemi ile elde edilmiştir. Elma üzerine ekonomik düzeyde zarar oluşturmamaktadır.

Takım: Thysanoptera

Thripidae

***Frankliniella occidentalis* (Pergande, 1895)**

F. occidentalis için yörede düzenli olarak ilaçlamalar yapıldığı ve çok küçük canlılar oldukları için biyolojisi tam olarak takip edilememiştir. Yapılan genel gözlemler ise düzenli olarak not alınmıştır. Trips türlerinin kışı ergin halde elma ağaçlarının kalın kabuklarının alt kısımlarında gizlenerek geçirmekte olduğu tespit edilmiştir. İlkbaharda gözlerin uyanması ile birlikte ergin bireyler doğada görülmeye başlamıştır. Trips yoğunluğu, elmanın çiçeklenme döneminde en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür. Zararlının sürgün ve yapraklar üzerinde de bulunduğu saptanmıştır. Çiçek içerisinde en yoğun rastlanan türün *F. occidentalis* olduğu tespit edilmiştir. Tripslerin bitki özsuğunu emerek beslenmeleri sonucunda, genç yapraklarda klorotik ve nekrotik lekeler gözlenmiştir. Çiçeklerde beslenme sonrasında renksizleşme ve deformasyonlar meydana geldiği görülmüştür. Meyve üzerinde de beslendiği ve meyve kabuğunda pas benzeri bir zarar oluşturduğu saptanmıştır.

***Thrips meridionalis* (Priesner, 1926)**

Bu tür, diğer trips türleri ile birlikte aynı popülasyon içerisinde yer aldıkları tespit edilmiştir.

***Thrips tabaci* Lindeman, 1889**

Bu tür, diğer trips türleri ile birlikte aynı popülasyon içerisinde yer aldıkları tespit edilmiştir.

Takım: Coleoptera

Curculionidae

Otiorhynchus torosicus Gültekin and Davidian, 2016

Bu türün, mart sonu ve nisan ayının başında ağaç çatlak ve yarıklarında ve gövdenin toprakla birleştiği yerlerde toprak içerisinde kışı ergin olarak geçirdiği tespit edilmiştir. İlkbaharda yaprakların açması ile birlikte yeşil aksamla beslendiği ve zarar yaptığı görülmüştür. Özellikle yeni dikilen fidanlarda beslenmesi sonucu fidanların yapraksız kaldığı ve büyük zararlar oluşturduğu gözlenmiştir. Mayıs ve haziran aylarında ergin popülasyonu ve zararının arttığı tespit edilmiştir.

Paophilus asiaticus (Desbrochers des Loges, 1902)

Bu türün, kışı ağaç çatlak ve yarıklarında geçirdiği tespit edilmiştir. İlkbaharda yaprakların açması ile birlikte yeşil aksamla beslendiği ve zarar yaptığı görülmüştür. Özellikle yeni dikilen fidanlarda beslenmesi sonucu fidanların yapraksız kaldığı gözlenmiştir.

Polydrusus (Scythodrusus) ponticus Faust, 1888

Bu türün, mart sonu ve nisan ayının başında ağaç çatlak ve yarıklarında ve gövdenin toprakla birleştiği yerlerde toprak içerisinde ergin olarak geçirdiği tespit edilmiştir. İlkbaharda yaprakların açması ile birlikte yeşil aksamla beslendiği ve zarar yaptığı görülmüştür. Özellikle yeni dikilen fidanlarda beslenmesi sonucu fidanların yapraksız kaldığı gözlenmiştir. Türkiye'nin farklı bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan birçok meyve çeşidinde daha önce tespit edilmiştir. Balachowsky (1963), *P. ponticus*'un Orta Anadolu'da meyve ağaçlarında önemli zararlar yaptığını belirtmektedir.

Melolonthidae

Melolontha albida Frivaldszky, 1835

Bu tür, kışı larva döneminde geçirmektedir. Kışlamakta olan larva 24 Mart 2014'de toprak içerisinde tespit edilmiştir. Mart ayının sonunda ilk erginlerin ışık tuzaklarına geldiği gözlenmiştir. Çalışma yapılan elma bahçelerinde yoğun bir zarar meydana getirmemiştir. Erginler elmanın yeşil aksamında beslenirken gözlenmiştir.

Polyphylla (Polyphylla) olivieri Laporte de Castelnau, 1840

Bu tür, kışı larva olarak ağaç köklerine yakın yerlerde geçirdiği saptanmıştır. Mart ayının sonunda ilk erginlerin ışık tuzaklarına geldiği görülmüştür. Erginleri yapraklarla beslenmektedir. Larvalar elma ağaçlarının kök bölgelerinden kazılmak suretiyle çıkarılmıştır. Tezcan ve ark. (2013), bu türün başta kiraz olmak üzere meyve fidanlarının ve ağaçlarının köklerini kemirerek zararlar yol açtığını, erginlerinin ise yaz aylarında görüldüğünü ve akşam saatlerinde aktifleşerek ışığa yönelim gösterdiğini bildirmişlerdir. Lodos (1986), bu türün Türkiye'de yaygın bir şekilde bulunduğunu, esas zararı yapan larvaların, meyve

ağaçlarının köklerini kemirmek suretiyle beslendiğini belirtmiştir. Çalışma yapılan elma bahçelerinde yoğun bir zararı olmadığı gözlenmiştir.

Scarabaeidae

Tropinota (Epicometis) hirta (Poda, 1761)

Bu tür, çiçeklenme zamanında zarar oluşturmaktadır. Bu türün toplanması ve yoğunluğunun saptanması için içerisi su ile doldurulmuş mavi leğenler ve kapar firmasından alınan cezbediciler kullanılmıştır. Bu türün kışı larva halinde toprak altında geçirdiği tespit edilmiştir. İlkbaharda havaların ısınmasıyla beraber ilk ergin bireyler nisan ayının ortalarından itibaren görülmeye başlamıştır. Elmanın çiçeklenmesinin yoğun olduğu dönemde ergin bireylerin çiçeklerle beslendiği gözlenmiştir. Elma ağaçlarının 15 Nisan - 5 Mayıs tarihleri arasındaki çiçeklenme döneminde, popülasyon yoğunluğu yüksek seviyeye ulaşmış olduğu ve genellikle çiçeklerde bulunduğu ve beslendiği gözlenmiştir. Çiçeklerin dökülmesiyle popülasyonlarında ani bir düşüş gözlenmiştir. Elma ağaçlarında meyve tutumu başladıktan sonra, zararlı yeni çiçeklenmeye başlayan bitkilere geçiş yaptığı tespit edilmiştir. Ergin bireylerin çiçeklerin dişi ve erkek organları, polen tozlarını hatta tomurcuklarını yiyerek zarar oluşturduğu tespit edilmiştir. Racksko ve ark. (2007), Macaristan'da *T. hirta* erginlerinin meyve ağaçlarının çiçeklerini yiyerek verim kaybına neden olduğunu belirtmişlerdir.

Takım: Lepidoptera

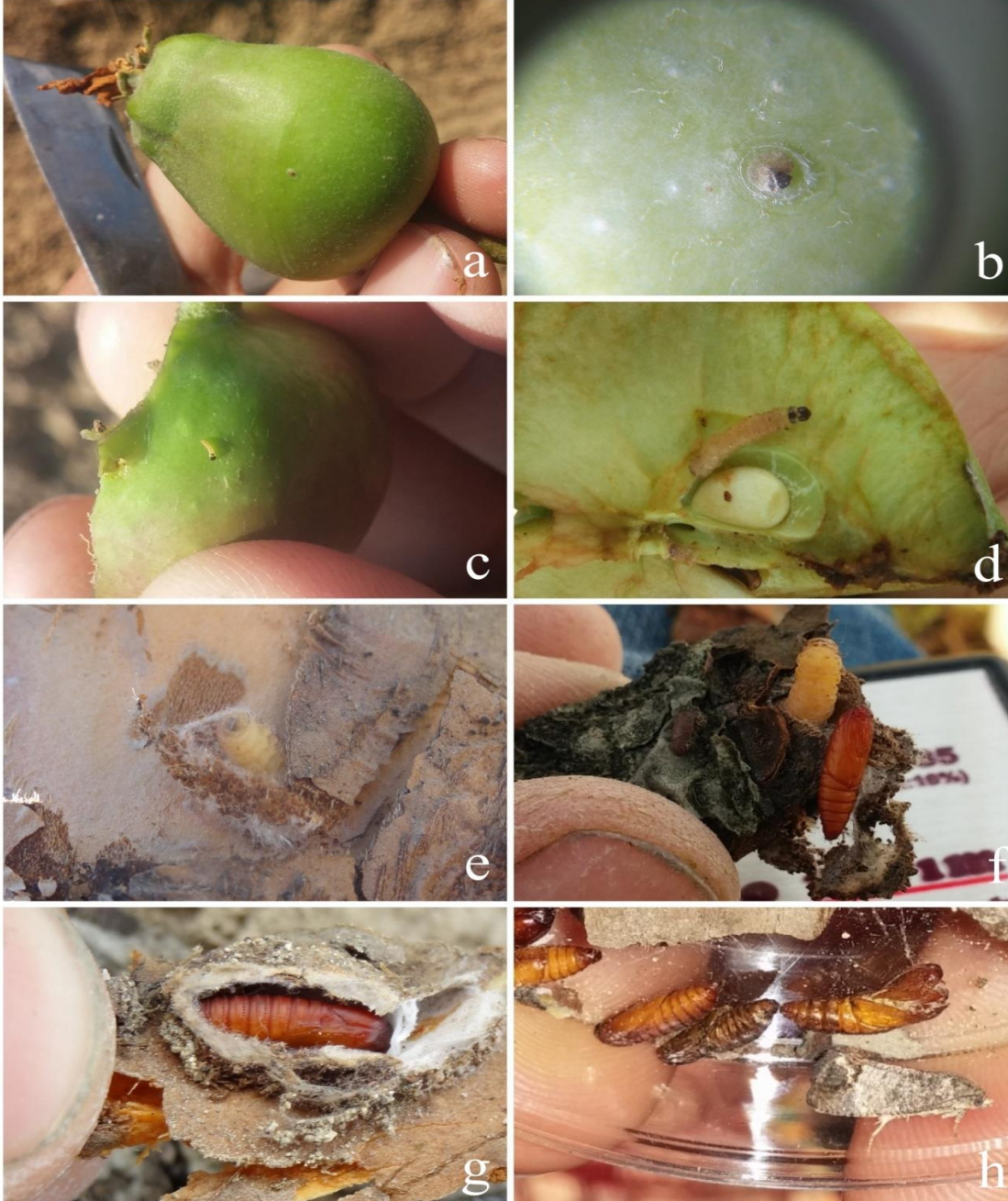
Tortricidae

Cydia pomonella (Linnaeus, 1758)

C. pomonella'nın yörede ekonomik olarak ciddi zararlar sebep olduğu ve mücadelesi için yılda 15-20 kez ilaçlama yapıldığı gözlenmiştir. Bu türün, ergin çıkışını ve popülasyon yoğunluğunu tespit etmek amacıyla feromon tuzakları kullanılmıştır. Mart ayının ilk haftasından itibaren arazi çalışmalarına başlanmıştır. *C. pomonella*'nın mart ortasında doğa koşullarında kışı olgun larva döneminde ağaç kabuklarının altında, kök kısmına yakın çatlaklar ve kabuklar arasında ördükleri kokon içerisinde geçirdiği sörvey çalışmaları esnasında tespit edilmiştir. Mart ayının sonundan itibaren larvaların pupaya dönüşmeye başladığı gözlenmiştir (Şekil 2.f). Doğa koşullarında periyodik olarak yapılan takiplerde, elma içkurdu'nun kışı olgun larva olarak ağaç kabuklarının altında ve ağaca yakın yerlerdeki çatlak yarıklar gibi saklanmasına uygun olan yerlerde ördükleri kokon içerisinde geçirdiği tespit edilmiştir (Şekil 2.g). Türkiye'de yapılan birçok çalışmada *C. pomonella*'nın kışı larva döneminde geçirdiği belirtilmiştir (Anonim, 2008). Kışı olgun larva döneminde geçiren bu tür, mart ayının sonundan itibaren pupaya dönüşmeye başladığı görülmüştür. Nisan ayının ortalarından sonra pupalar açılmaya ve ilk erginler görülmeye başlamıştır (Şekil

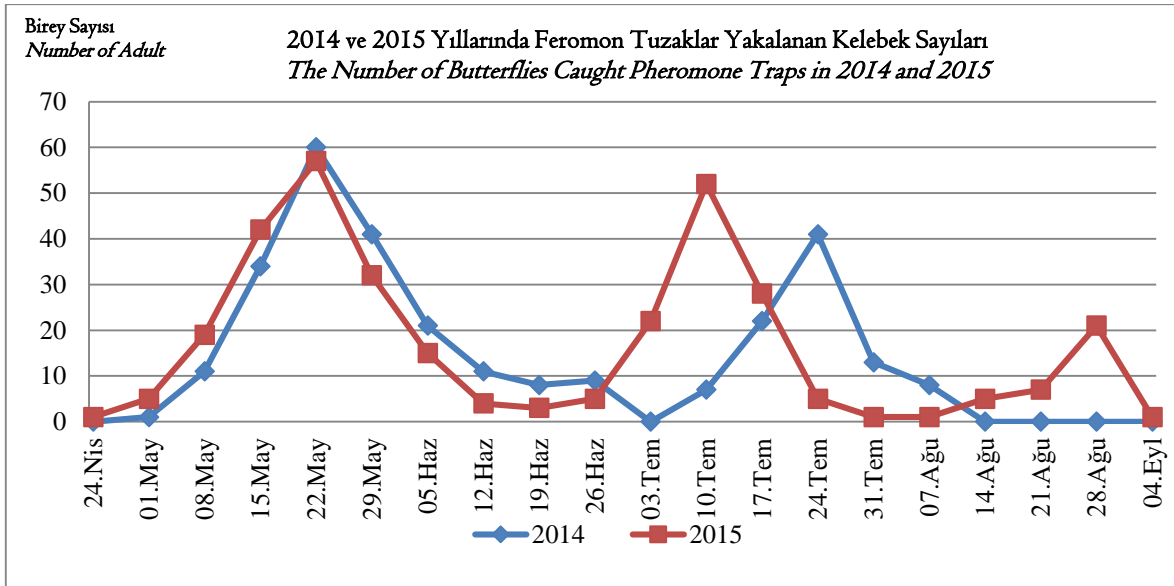
2.h). İlk erginlerin görülmesi ise ağaçların fenolojik olarak çiçeklenme zamanına denk geldiği gözlenmiştir. Şekil 3'den de anlaşılacağı üzere feromon tuzaklardaki ergin sayısı mayıs ayının ortası, haziran ayının sonu ve temmuz ayının ilk haftası bazı yıllarda ise ağustos ayının sonunda pik yaptığı gözlenmiştir. Bu tuzaklarda yakalanan kelebek sayısının 2014 yılı içerisinde 2 tepe noktası oluşturduğu ve 2015 yılında ise 3 tepe noktası oluşturduğu saptanmıştır. Buna

dayanarak elma içkurdunun yılda 2-3 nesil verdiği tespit edilmiştir. Bu değişkenliğin ise yıllara göre iklimsel farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Nesil süreleri larvadan larvaya ele alınacak olursa kışı olgun larva olarak geçiren elma içkurdunu, mart ayının son haftasında pupaya dönüşmeye başlamış (Şekil 2.f), ilk erginler ise 01.05.2014 tarihinde görülmüştür (Şekil 2.h).



Şekil 2. *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758)'nin; **a** ve **b**) yumurtanın meyve üzerinde görünümü, **c**) yumurtadan yeni çıkan larva, **d**) meyve içinde beslenen larva, **e**) kabuk altında kokon örmeye başlamış larva, **f**) kabuk altında bulunan larva ve pupa, **g**) kabuk altında kokon içerisinde bulunan pupa, **h**) pupadan çıkış yapan ergin

Figure 2. *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758); **a** and **b**) the appearance of the egg on the fruit, **c**) the newly hatched larva, **d**) the larva feeding inside of the fruit, **e**) the larva that has started to knit cocoons under the shell, **f**) the larva and pupa under the shell, **g**) the pupa in the cocoon under the shell, **h**) adult exiting the pupa



Şekil 3. 2014 ve 2015 yılındaki feromon tuzaklarına göre ergin popülasyon yoğunluğu
Figure 3. Adult population density according to pheromone traps in 2014 and 2015

İlk nesil kelebekleri tuzaklarda 22.05.2014 tarihinde pik noktaya ulaşmış olup ilk yumurtalar 16.05.2014 tarihinde yaprakların üst yüzeyinde ve meyve üzerinde saptanmıştır (Şekil 2 a ve b). Yumurta açılmaları ise yoğun olarak 26.05.2014 – 03.06.2014 tarihleri arasında gerçekleştiği tespit edilmiştir (Şekil 2.c,d). Meyve içerisinde beslenen larvalar 17.06.2014 tarihinde sonra meyve içerisinde çıkmaya başlamış olup (Şekil 3.e), haziran sonu ve temmuz ortasında doğada elma içkurdu daha çok pupa döneminde görülmüş, ancak bu dönemde nadir de olsa larva ve kelebekler de doğada gözlenmiştir. İkinci neslin ilk kelebekleri 10.07.2014 tarihinde feromon tuzaklarında yakalanmıştır. Bu da pupaların açılmaya başladığının göstergesi olup, bu dönemden sonra kelebek popülasyonu giderek artmış ve 24.07.2014 tarihinde doruk noktaya ulaşmıştır (Şekil 3). Önceden tahmin ve erken uyarı istasyonu verilerine göre ise ikinci nesil yumurta açılımları 24.07.2014 tarihinde başlamıştır. *C. pomonella* larvaları, elmada özellikle sapa yakın kısım ile çiçek çukurundan giriş yapmakta ve çekirdek evine doğru galeri açarak ilerlemekte ve her meyve içerisine tek bir larva girmektedir (Şekil 2.d).

Gelişme Eşiğinin Hesaplanması: Böcek hayatını sağlıklı bir şekilde tamamlayabilmesi için, belirli seviyede bir sıcaklık enerjisi toplamına ihtiyacı vardır. Bu enerjinin toplam miktarı “gün/derece (g/d)” birimi ile ifade edilir (Oğurlu, 2001). Elma içkurdu 10 °C sıcaklığın üzerinde gelişmeye başlar ve bu sıcaklıkta zararlının “Gelişme Eşiği”dir (Pitcairn ve ark., 1992; Beers ve ark., 1993).

Çizelge 1 ve 2’deki veriler Demirözü ve Yarmasu mahallelerinde bulunan erken uyarı cihazından alınan verilerle oluşturulmuştur. Elma içkurdunun 2014 ve 2015 yılında Gülnar ilçesinde yılda 2-3 nesil verdiği belirlenmiştir.

18.08.2014 tarihinde larvalar meyve içerisinden çıkmaya başlamıştır. 2015 yılında 05.04.2015 tarihinde ilk pupalar doğada görülmüş olup (Şekil 2.f), ilk kelebekler 24.04.2015 tarihinde feromon tuzağına gelmiştir. Tuzaklardaki kelebek sayısı 22.05.2015 tarihinde 2015 yılındaki en yüksek sayıya ulaşmıştır (Şekil 3). 04.06.2015 tarihinde yumurtalar açılarak larvalar meyve içerisine girmeye başlamış olup (Şekil 2.c,d), elma içerisinde beslenen larvalar 24.06.2015 tarihinde meyve içerisinden çıkmaya başlamıştır. 19.06.2015 tarihinde tuzaklardaki kelebek sayısı 3 olarak sayılmış olup, bu tarihten sonra feromon tuzakların da kelebek sayısı artmaya başlamış, 10.07.2015 tarihinde ise kelebek sayısı 52’ye ulaşarak yıl içerisindeki ikinci en yüksek seviyesini görmüştür. 31.07.2015 tarihinde ikinci nesil yumurtalarının açılmaya başladığı görülmüştür. Şekil 3’de 2014 ve 2015 yıllarına ait feromon tuzaklarda haftalık kelebek sayım sonuçları yer almaktadır.

***Archips rosana* (Linnaeus, 1758)**

Bu türün, 10 Nisan 2014 ve 15 Nisan 2015’de kışı yumurta paketi halinde dallar üzerinde geçirdiği tespit edilmiştir. Dallar üzerinde gözle ve 60x’lik lup yardımıyla görülen yumurta paketlerinin yerinin tespit edilmesi amacıyla kırmızı renkli kalemle işaretlemeler yapılmıştır. Yumurta paketlerinin mayıs’ın ilk haftasından itibaren açılmaya başladığı tespit edilmiştir. 2014-2015 yıllarının haziran ayında popülasyon yoğunluğu zirve seviyeye ulaşmış olduğu ve genellikle larvaların taze yapraklar ve sürgünlerle beslendiği saptanmıştır. *A. rosana* larvaları birden fazla yaprağı ağlarla birbirine bağlayıp buket haline getirdikleri, tek yaprağı ise orta damar doğrultusunda puro gibi uzunlamasına sardıkları görülmüştür.

Yapılan bu çalışmada, *P. ulmi*, *A. pomi*, *E. lanigerum*, *T. hirta* ve *C. pomonella*’nın elma üretim alanlarında

yaygın olarak bulunduğu, popülasyonlarının ise yoğun olduğu saptanmıştır. Bu türlerin elma bahçelerinde önemli zararlı konumunda oldukları belirlenmiştir. Bu türlerin yanında Curculionidae familyasına ait türlerin de yeni dikilen fidanlarda önemli zararlar meydana getirmeye başladıkları görülmüştür.

Saptanan zararlı türler arasında ekonomik açıdan en önemli türün *C. pomonella* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ekonomik açıdan önemli olan diğer zararlıların ise Acarina takımına ait türler olduğu görülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4. *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758)'nin; a,b,c,d ve e) beslenmesi sonucu oluşan zarar, f) zarar sonucu dökülen meyveler.

Figure 4. *Cydia pomonella* (Linnaeus, 1758); a, b, c, d and e) damage caused by feeding, f) fruits spilled as a result of damage

Teşhisi Yapılan Yararlı Türler

Mersin İlinde Gülnar İlçesinde yapılan sörvey çalışması esnasında gidilen elma bahçelerinde teşhis edilen yararlı türler ve etkili olduğu zararlı türler Çizelge 3'de verilmiştir.

Chrysoperla carnea'nın hem ergin bireyleri ve hem de larvalarının yaprakbitleri ve kırmızıörümcekler üzerinde etkin bir şekilde predatör olarak doğada beslendikleri tespit edilmiştir. *C. carnea* larvaları *O. niger*, *D. lutescens* ve *D. serenus* türleri elma bahçelerinde bulunmasına rağmen doğada

beslenirken gözlemlenememiştir. *C. septempunctata* erginleri ve larvaları yaprakbitlerinin yoğunluğu arttığı dönemlerde elma ağaçlarından toplanmıştır ve yaprakbitleri ve kırmızıörümceklerle beslendiği görülmüştür. *E. balteatus* ve *M. corollae* ergin bireyleri *A. pomi* ve *D. plantaginea*'nın popülasyonlarının yoğun olduğu elma bahçelerinden toplanmıştır. *A. bipunctata*, *H. sedecimguttata*, *A. transversafasciata*, *M. octodecimguttata* erginleri ve larvaları *D. depecta* üzerinde beslenirken alınmıştır. Bu türler aynı zamanda diğer yaprakbitleri üzerinde beslenirken de gözlenmiş olup, en yoğun *D. depecta* üzerinde tespit

edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda Coccinellidae familyasına ait türlerin doğal düşmanlar bakımından önemli olduğu görülmektedir. Bu familyaya ait türler genel predatör türlerdir. Elma ağaçlarında bulunan yumuşak vücutlu arthropodların popülasyonlarının erken ilkbaharda artması pek çok

polifag avcı doğal düşmanlarında popülasyonlarının artmasına neden olmaktadır. Çalışmanın yürütüldüğü Mersin ilindeki elma bahçelerinde Coccinellidae familyasına ait türlerin genel olarak zengin olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 1. Mersin İlinin Gülnar ilçesi Demirözü Mahallesi 2014-2015 yılına ait aylık etkili sıcaklık (Gün/derece) toplamları

Table 1. Total monthly effective temperature (day/degree) for 2014-2015 in Demirözü-Gülnar district of Mersin Province

Aylar (Months)	2014 yılı Etkili Sıcaklık (gün/-derece) (Effective Temperature in 2014 (d/d))	2015 yılı Etkili Sıcaklık (gün/-derece) (Effective Temperature in 2014 (d/d))
Ocak (January)	0°	0°
Şubat (February)	0°	0°
Mart (March)	53.9°	27.3°
Nisan (April)	41.51°	74.00°
Mayıs (May)	129.2°	152.91°
Haziran (June)	283.03°	231.92°
Temmuz (July)	415.25°	391.76°
Ağustos (August)	417.88°	380.42°
Eylül (September)	252.34°	310.41°
Ekim (October)	114.02°	202.96°
Kasım (November)	3.92°	33.37°
Aralık (December)	0°	0°
Genel toplam (The overall total)	1711.05°	1805.05°

Çizelge 2. Mersin İlinin Gülnar ilçesi Yarmasu Mahallesi 2014-2015 yılına ait aylık etkili sıcaklık (Gün/derece) toplamları

Table 2. Total monthly effective temperature (day/degree) for 2014-2015 in Yarmasu-Gülnar district of Mersin Province

Aylar (Months)	2014 yılı Etkili Sıcaklık (gün/ derece) (Effective Temperature in 2014 (d/d))	2015 yılı Etkili Sıcaklık (gün/-derece) (Effective Temperature in 2014 (d/d))
Ocak (January)	0°	0°
Şubat (February)	0°	0°
Mart (March)	0.6°	0°
Nisan (April)	12.83°	83.1°
Mayıs (May)	71.01°	88.55°
Haziran (June)	141.77°	160.61°
Temmuz (July)	323.02°	319.68°
Ağustos (August)	266.37°	310.96°
Eylül (September)	142.73°	206.25°
Ekim (October)	33.64°	61.52°
Kasım (November)	0°	0°
Aralık (December)	0°	0°
Genel toplam (The overall total)	991.97°	1230.67°

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 03.07.2019 tarihinde kabul edilen Yüksek Lisans tezinin bir kısmıdır. Türlerin teşhisinde yardımcı olan Prof. Dr. İrfan TUNÇ, Prof. Dr. Sultan ÇOBANOĞLU, Prof. Dr. Selma ÜLGENTÜRK, Prof. Dr. Levent GÜLTEKİN, Dr. Mustafa ÖZDEMİR, Dr. Işıl ÖZDEMİR, Dr. Gülten YAZICI, Dr. Alper POLAT ve Dr. Emine DEMİR'e sonsuz teşekkürlerimizi sunarız.

Çıkar çatışması beyanı

Yazarlar arasında çıkar çatışması yoktur.

Yazar Katkı Oranları

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağladıklarını beyan ederler.

Çizelge 3. Yararlı türler ve etkili olduğu zararlılar
Table 3. Natural enemies and pests to be effective

Takım/ Familya (Order/ Family)	Doğal Düşmanın Adı (Name of natural enemy)	Etkili olduğu 1. Zararlı (The first pest to be effective)	Etkili olduğu 2. Zararlı (The second pest to be effective)
Mesostigmata/ Phytoseiidae	<i>Typhlodromus psyllakisi</i> Swirski and Ragusa, 1976	<i>Aculus schlechtendali</i> (Nalepa, 1890)	*
Neuroptera/ Chrysopidae	<i>Chrysoperla carnea</i> (Stephens, 1836)	<i>Tetranychus urticae</i> (Koch, 1836)	<i>Dysaphis (Dysaphis)</i> <i>devectora</i> (Walker, 1849)
Hemiptera/ Anthocoridae	<i>Orius (Orius) niger</i> (Wolff, 1811)	*	*
Hemiptera/ Miridae	<i>Deraeocoris (Camptobrochis)</i> <i>serenus</i> (Douglas and Scott, 1868)	*	*
	<i>Deraeocoris (Camptobrochis)</i> <i>punctulatus</i> (Fallen, 1807)	*	*
	<i>Deraeocoris (Knightocapsus)</i> <i>lutescens</i> (Schilling, 1837)	*	*
	<i>Campylomma verbasci</i> (Meyer- Dür, 1843)	*	*
Diptera/ Syrphidae	<i>Episyrphus balteatus</i> (De Geer, 1776)	<i>Aphis (Aphis) pomi</i> DeGeer, 1773	<i>Dysaphis (Pomaphis)</i> <i>plantaginea</i> (Passerini, 1860)
	<i>Eupeodes corollae</i> (Fabricius, 1794)	<i>Aphis (Aphis) pomi</i> DeGeer, 1773	<i>Dysaphis (Pomaphis)</i> <i>plantaginea</i> (Passerini, 1860)
Coleoptera/ Coccinellidae	<i>Adalia (Adalia) bipunctata</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Dysaphis (Dysaphis)</i> <i>devectora</i> (Walker, 1849)	*
	<i>Halyzia sedecimguttata</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Dysaphis (Dysaphis)</i> <i>devectora</i> (Walke, 1849)	*
	<i>Myrrha (Myrrha)</i> <i>octodecimguttata</i> (Linnaeus, 1758)	<i>Dysaphis (Dysaphis)</i> <i>devectora</i> (Walker, 1849)	*
	<i>Coccinella (Coccinella)</i> <i>septempunctata</i> Linnaeus, 1758	<i>Aphis (Aphis) pomi</i> DeGeer, 1773	<i>Dysaphis (Pomaphis)</i> <i>plantaginea</i> (Passerini, 1860)

*Teşhis edilen yararlı türlerin etkili olduğu zararlı türler tespit edilemedi

KAYNAKLAR

Alaserhat İ 2015. Erzincan ve Gümüşhane illerinde yetiştirilen ılıman iklim meyve türlerinde bulunan Aphididae (Hemiptera) türleri, yoğunlukları, doğal düşmanları ve sekonder konukçularının belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 320 sy., Erzurum.

Altay M, Gürses A, Uyar K 1972. Marmara Bölgesinde kabuklubitler (Coccoidea) üzerine araştırmalar. Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı Yayın No: 69, İstanbul, 29 sy.

Anonim 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları, Cilt:4. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Bitki Sağlığı Araştırmaları Daire

- Başkanlığı Yayınları, Ankara, 145 sy.
- Anonim 2014. Bitkisel Üretim Veri Tabanı. Türkiye İstatistik Kurumu Veri Tabanı. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul>. (23.07.2014).
- Balachowsky AS 1963. Entomologie Applique A l'agriculture, Tome 1 (Premier and second volume) Coleopteres Massonet Cie., Paris.
- Barnes MM 1991. Codling Moth Occurrence, Host, Race Formation, and Damage. Tortricid Pests, Their Biology, Natural Enemies and Control. World Crop Pests. Elsevier, pp 313-329.
- Beers EH, Brunner JF, Willet MJ, Warner GM 1993. Orchard Pest Management. A Resource Book for the Pacific Northwest: Good Fruit Grower, Yakima, WA., 276 pp.
- Bulut H, Kılınçer N 1989. Elma içkurdu (*Cydia pomonella* (L.))'nun yumurta parazitoidleri *Trichogramma embyophagum* (Hartig), *Trichogramma kilinceri* Kostadinov ve bunların doğal etkinlikleri üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 29(3-4): 165-194.
- Chapman PJ 1973. Bionomics of the apple-feeding Tortricidae. Annual Review of Entomology, 18(1): 73-96.
- Çiftçi K, Özkan A, Türkyılmaz N 1995. Antalya ili elma zararlılarının biyolojik mücadele imkânlarının araştırılması. Bitki Koruma Bülteni, 35(1-2): 45-61.
- Coşkun T 1999. Iğdır Ovası'ndaki yumuşak ve taş çekirdekli meyve ağaçlarında bulunan Coccidae ve Diaspididae (Homoptera: Coccoidea) familyalarına ait türlerin belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 30 sy., Erzurum.
- Croft BA 1982. In Introduction to Pest Management. (Ed. By R. L. Metcalf and W. H. Luckmann. John Wiley & Sons). Apple Pest Management, pp 465-498.
- Cuthbertson AGS, Murchie AK 2006. Environmental monitoring of economically important invertebrate pests in Bramley apple orchards in Northern Ireland. International Journal of Environmental Science & Technology, 3(1): 1-7.
- Denizhan E 2007. Ankara ilinde park ve süs bitkilerinde Eriophyidae (Acarina) türleri, konukçuları, yaygınlıkları ve doğal düşmanlarının saptanması ile zararlı *Aculus schlechtendali* (Nalepa, 1892)'nin popülasyon gelişimi üzerine araştırmalar. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 267 sy, Ankara.
- Düzgüneş Z, Toros S 1978. Ankara ili ve çevresinde elma ağaçlarında bulunan yaprakbiti türleri ve kısa biyolojileri üzerinde araştırmalar. Turkish Journal of Entomology, 2(3): 151-175.
- Easterbook MA 1984. The biology and control of the rust mites *Aculus schlechtendali* and *Epitrimerus pyri* on apple and pear in England. East Malling Research Station, Maidstone, Kent, UK, pp 797-803.
- Erden F 1979. Güney Anadolu Bölgesi'nde Elma Bahçelerinde İntegre Mücadele Yönünden Böcek Faunası Üzerinde Ön Çalışmalar. Zirai Mücadele Araştırma Yıllığı, 37 sy.
- Erden F 1988. Erzincan Bölgesi Yumuşak Çekirdekli Meyve Ağaçlarının Böcek Kökenli Zararları, Tanınmaları ve Önemlilerin Zararlılık Durumları Üzerinde Araştırmalar. Koruma Kontrol Genel Müdürlüğü Yayın, No: 4, 96 sy.
- Gerson U, Vacante V 2012. Acari. In: Integrated Control of Citrus Pest in the Mediterranean Region (Vacante, V. and Gerson, U., Eds.) Bentham e Books, pp 88-108.
- Göksu ME, Atak ED 1969. Marmara ve Trakya Bölgesinde Avrupa kırmızıörümceği (*Panonychus ulmi*) üzerinde araştırmalar. Bitki Koruma Bülteni, 9(1): 19-36.
- Hampson CR, Quamme HA, MacDonald RA, Lane WD, Lapins KO 2000. Silken, Creston and Chinook: Three new apples from Canada. Acta Horticulturae, 538: 711-714.
- İncekulak R, Ecevit O 2002. Amasya elma bahçelerinde bulunan akar türleri ve popülasyon dinamiklerinin belirlenmesi. Türkiye 5. Biyolojik Mücadele Kongresi Bildirileri, Erzurum, 297-314 sy.
- Karaca G, Karaca I, Yardımcı N, Demirözer O, Aslan B, Kılıç HÇ 2010. Investigations on pests, diseases and present early warning system of apple orchards in Isparta, Turkey. African Journal of Biotechnology, 9(6): 834-841.
- Kasap İ 2003. Life history of hawttorn spider mite *Amphitetranynchus viennensis* (Acarina: Tetranychidae) on various apple cultivars and at different temperatures. Experimental and Applied Acarology, 31: 79-91.
- Kıroğlu H, Aykaç KM, Ergüder MT, Çamlıdere R, Kılıç M, Çevik T 1992. Karadeniz Bölgesi Elma Bahçelerinde Entegre Savaş Olanakları Üzerine Çalışmalar. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Ankara Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Yayın No: 21-22, Ankara.
- Kuloğlu İ 2011. Yalova ilinde bazı süs bitkilerinde görülen Aphidoidea (Homoptera) türleri üzerine araştırmalar. Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 33 sy., Edirne.
- Mamay M, Yanık E 2013. Şanlıurfa'da elma bahçelerinde elma içkurdu [*Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)]'nin popülasyon gelişimi ve farklı metotlar kullanılarak bulaşıklık oranının belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 19(2): 113-120.
- Narmanlıoğlu HK 2013. Çoruh vadisi'nde yetiştirilen ılıman iklim meyvelerindeki Aphididae (Hemiptera) türleri ve bunların doğal düşmanları. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 168 sy., Erzurum.
- Oğurlu İ 2001. Böcek Ekolojisi. Süleyman Demirel

- Üniversitesi Orman Fakültesi Yayın No:9, 187 sy.
- Önder F, Karsavuran Y, Tezcan S, Fent M 2006. Türkiye Heteroptera (Insecta) Kataloğu. 164 S. Meta Basım Matbaacılık Hizmetleri, Bornova, İzmir,
- Özbek S 1978. Özel Meyvecilik. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları, No: 128, Ders Kitabı, Adana.
- Özpınar A, Şahin AK, Polat B 2009. Çanakkale ilinde elma içkurdu [*Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae)]'nın yayılış alanı ve popülasyon gelişmesinin belirlenmesi. Türkiye III. Bitki Koruma Kongresi, 15 - 18 Temmuz, Van, 100 sy.
- Pedigo LP 1996. Entomology & Pest Management. Secon Edition. Prentice Hall. Inc. New Jersey.
- Pitcairn MJ, Zalom FG, Rice RE 1992. Degree-day forecasting of generation time of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) populations in California. Environmental Entomology, 21(3): 441-446.
- Racksko J, Leite GB, Petri JL, Zhongfu S, Wang Y, Szabó Z, Soltész M, Nyéki J 2007. Fruit Drop: the Role of Inner Agents and Environmental Factors in the Drop of Flowers and Fruits. International Journal of Horticultural Science, 13(3): 13-23.
- Tezcan S, Gülperçin N, Pehlivan E 2013. *Polyphylla (Polyphylla) olivieri* Laporte de Castelnau, 1840 (Coleoptera: Melolonthidae) türünün ergin popülasyonunun Kemalpaşa (İzmir) yöresi kiraz bahçelerinde ışık tuzaklarla izlenmesi. XI. Ulusal Ekoloji ve Çevre Kongresi, Samsun, 253 sy.
- Toros S, Yaşar B, Özgökçe MS, Kasap İ 1996. Van ilinde Aphidoidea üst familyasına bağlı türlerin saptanması üzerine çalışmalar. Türkiye III. Entomoloji Kongresi, Ankara, 77-84 sy.
- Yiğit A, Uygun N 1982. Adana, İçel ve Kahramanmaraş illeri elma bahçelerinde zararlı ve yararlı faunanın saptanması üzerine çalışmalar. Bitki Koruma Bülteni, 22(4): 163-178.

Examining Some Cereals for Mass Production of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin Conidia by Solid State Fermentation

Cebraıl BARIŞ¹, ²Mehmet Kubilay ER²

^{1,2}Kahramanmaraş Sütçü İmam University Agriculture Faculty Plant Protection Department Kahramanmaraş

¹<https://orcid.org/0000-0002-5895-0151>, ²<https://orcid.org/0000-0003-1568-8656>

✉: cbaris@ksu.edu.tr

ABSTRACT

This study was conducted to test five substrates (whole rice, broken rice, dövme, wheat and bulgur) for the mass production of *Beauveria bassiana* isolate 5-4, known to be affective against stored-cereal pests. A solid-state fermentation technique was used, and amount of product, number of conidia, germination, hydrophobicity and thermotolerance of conidia, and their virulence on *Rhizopertha dominica* adults were used to evaluate the success of substrates. For production, 100 g of a substrate was used in a polypropylene bag. After sterilization and inoculation, the bags were sealed and incubated for 14 days at 25°C. Hydrophobicity was assessed using the aqueous-solvent partitioning method with PM buffer, and liquid paraffin as two phases. Thermotolerance tests were conducted by exposing conidia to 35, 40 and 45°C for 15, 30 and 60 minutes. In virulence test, adults were released into 40 gr wheat mixed with conidia and kept at 25°C and 65% relative humidity in darkness for 14 days. The highest amount of product was obtained by using whole rice (4.10g/bag), followed by broken rice, wheat, dövme and bulgur. The highest number of conidia was achieved using broken rice (10.24x10¹⁰conidia/g) and whole rice (9.62x10¹⁰conidia/g). The germination rates of conidia did not vary significantly. Significantly higher hydrophobicity rate was obtained using wheat (88.73%). The conidia from bulgur and wheat showed higher thermotolerance than those from other substrates. The conidia obtained from whole rice and broken rice caused 80.3% and 72.0% mortalities, respectively, significantly higher than the others. Rice was found to be a better choice for this isolate as the ultimate purpose is to suppress pest populations, with awareness of its shortcomings. It was found crucial to test all important characteristics of produced conidia together for assessment of substrates.

Research Article

Article History

Received : 19.11.2020

Accepted : 25.03.2021

Keywords

Mass production
Beauveria bassiana
Hydrophobicity
Pathogenicity
Thermotolerance

Beauveria bassiana Konidilerinin Katı Faz Fermantasyonu ile Kitlesel Üretimi için Bazı Tahılların İncelenmesi

ÖZET

Bu çalışma, depolanmış tahıl zararlılarına karşı etkili olduğu bilinen *Beauveria bassiana* izolatı 5-4'ün kitlesel üretimi için beş substratı (tam pirinç, kırık pirinç, dövme, buğday ve bulgur) test etmek için yürütülmüştür. Katı faz fermantasyon tekniği kullanılmış ve substratların başarısını değerlendirmek için ürün miktarı, konidi sayısı, çimlenme, hidrofobisite ve konidi termotoleransı ve elde edilen konidilerin *Rhizopertha dominica* erginleri üzerindeki virülenslikleri kullanılmıştır. Üretim için, polipropilen bir torba içinde 100 g substrat sterilize edilmiş ve inokulasyondan sonra torbalar kapatılıp 25°C sıcaklıkta 14 gün inkübe edilmiştir. Hidrofobisite, iki faz olarak likid paraffin ve PM tamponu ile ayrıştırma yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Termotolerans testleri, konidilerin 35, 40 ve 45°C sıcaklığa 15, 30 ve 60 dakika süreyle maruz bırakılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Virülenslik testinde erginler, konidi ile muamele

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 19.11.2020

Kabul Tarihi : 25.03.2021

Anahtar Kelimeler

Kitlesel üretim
Beauveria bassiana
Hidrofobisite
Patojenite
Termotolerans

edilmiş olan 40 gr buğdayın içine bırakılmış ve 25°C sıcaklık ve %65 nispi nemde karanlık ortamda 14 gün bekletilmiştir. En yüksek ürün miktarı tam pirinç (4.10 gr/torba) kullanılarak elde edilirken, bunu kırık pirinç, buğday, dövme ve bulgur izlemiştir. En yüksek konidi sayısı, kırık pirinç (10.24×10^{10} konidi/g) ve tam pirinç (9.62×10^{10} konidi/g) kullanılarak elde edilmiştir. Konidilerin çimlenme oranları önemli ölçüde değişmemiştir. Buğday kullanılarak önemli ölçüde daha yüksek hidrofobisite oranı elde edilmiştir (%88.73). Bulgur ve buğdaydan elde edilen konidiler, diğer substratlardan elde edilen konidilere kıyasla daha yüksek termotolerans göstermiştir. Tam pirinç ve kırık pirinçten elde edilen konidi, sırasıyla %80.3 ve %72.0 ile diğerlerinden önemli ölçüde daha yüksek ölüme neden olmuştur. Zayıf özellikleri bulunmakla birlikte, nihai amaç zararlı popülasyonunu baskılamak olduğundan bu izolat için princin daha iyi bir seçim olduğu belirlenmiştir. Substratların değerlendirilmesinde üretilen konidilerin tüm kritik özelliklerinin birlikte değerlendirilmesinin çok önemli olduğu bulunmuştur.

To Cite: Barış C, Er M. K 2021. Examining Some Cereals for Mass Production of *Beauveria bassiana* Conidia by Solid State Fermentation. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1263-1270. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.828259.

INTRODUCTION

Avoiding qualitative and quantitative loss due to insect pests during storage periods is quite important and challenging for agricultural commodities (Moino et al., 1998; Padin et al., 2002). The most commonly practiced method to suppress the populations of these pests is the use of synthetic chemical insecticides (Athanassiou and Palyvos, 2006). However, because of the adverse effects associated with such chemicals on non-target organisms, environment and humans there has been an increasing demand for alternative and more eco-friendly options (Arthur, 1996; Michalaki et al., 2007). The use of entomopathogenic fungi is an acceptable alternative to synthetic insecticides to control a variety of pests (Wraight and Carruters, 1999; Lomer et al., 1999; Wraight et al., 2001). Entomopathogenic fungi have also been investigated as alternatives for the management of stored grain pests. A number of studies demonstrated this potential with a range of success depending on both fungus and pest species (Rice ve Cogburn, 1999; Cherry et al., 2005; Shams et al., 2011; Sewify et al., 2014). In these studies, researchers have focused on *Beauveria bassiana* being a potential species that can be developed as a biological control agent in grain storages. In order to demonstrate its potential in actual storage conditions, its application in larger quantities of grains needs to be fulfilled. That in turn requires mass production of *B. bassiana* spores with an appropriate procedure, as the procedure itself can have effects on the ultimate success of the fungus to control grain pests.

Mass production of entomopathogenic fungi for the management of pest insects has been investigated for producing three types of fungal propagules. One of them is fungal vegetative cells called blastoconidia, which are produced in liquid culture media as

submerged. The second propagule type is mycelium, which are grown in liquid fermentation. The most resistant and more persistent stage of the fungal life cycle, conidia, is the third propagule type. These conidia can be produced by surface culturing on a solid medium. The medium is usually inoculated with blastoconidia obtained from culturing in liquid fermentation. Conidia produced using solid media have a hydrophobic property, which is important for their adherence to targeted insect surface. Besides, the shelf life of conidia produced in solid media can have a longer shelf life (Moore and Higgins, 1997).

Furthermore, in mass production procedures, additive substances have various effects on the properties of entomopathogenic fungi in the final product (Humphreys et al., 1989; Ying and Feng, 2004; Kassa et al., 2008; Gangwar, 2013; Patil et al., 2014). It is also known that properties of yielded conidia can be altered depending on ambient conditions like temperature, humidity and pH together with the water activity of the product (Borisade and Magan, 2014; Lizzy et al., 2015). This study was conducted to test various mass production substrates for developing a mass production procedure of the conidia of a *B. bassiana* isolate (5-4), known to be affective against stored-cereal pests. A solid-state fermentation technique was chosen as the production technique as the final product will need to be a long lasting powder with a hydrophobic property, so that the product can be mixed into cereal kernels, can stay for required period of time for sufficient efficacy, and can adhere easily to the insect surface.

MATERIAL and METHOD

Insect culture

Rhyzopertha dominica (F.) (Coleoptera: Bostrichidae) adults were obtained from a laboratory culture

originally established from individuals collected in Kahramanmaraş. The cultures were maintained under controlled conditions at 30±5 °C and 65±5% R.H in darkness and kept on wheat (*Triticum aestivum*). One week old adults were used for pathogenicity tests.

Fungus culture and inoculum preparation

B. bassiana isolate used in tests (5-4) is a single spore culture of *B. bassiana* 151138, which was originally isolated from a *R. dominica* adult. This isolate was taken from the Department of Plant Protection, University of Kahramanmaraş Sütçü İmam, Turkey.

In order to prepare inoculum for mass production, the fungus was grown on PDA (potato dextrose agar) in sealed Petri plates for 14 days at 25±2° C in dark and the conidia in the cultures were harvested in 10 ml sterile distilled water with 0.01% Tween80. Spore count of the suspension was determined by using a hemocytometer and the suspension concentration was adjusted to 2x10⁷conidia/ml.

Production of conidia

Whole rice, broken rice, dövme, wheat and bulgur were used as substrates for mass production of *B. bassiana* conidia. 100 g of each substrate was placed individually in an autoclavable polypropylene bag (25cmx38cm). Tap water was added into the bags and they were kept overnight. Thereafter, excess water was removed and 1.5g CaSO₄ and 1.5g CaCO₃ were added and mixed thoroughly to get a uniform coating over the substrate (Nirmala et al., 2005). Then, the prepared bags were sterilized by autoclaving at 121 °C for 20 minutes. After cooling, each bag was inoculated with 10 ml of inoculum (conidial suspension at 2x10⁷conidia/ml concentration). The bags were sealed and incubated for 14 days at 25±2°C and 12:12h light:dark photoperiod. Once the fungi in bags sporulated, the bags were opened and the contents were allowed to dry at 25° C until the moisture content was low enough for sieving to separate the conidia from the substrate. The obtained product was stored at +4° C until it is used. The whole process was carried out in 5 replications for each substrate.

Obtained conidia from each replication was weighed by using a precision scale and recorded. In order to determine count of conidia in the products, one milligram conidia was mixed within 10 ml of 1% Tween 80 solution and vortexed. The concentration of the conidial suspension was determined by counting on a hemocytometer under a light microscope at 40x magnification. This process was repeated five times for each sample. Number of conidia per gram of product was then calculated.

Germination tests

After determining the concentration, each conidial

suspension was adjusted to the concentration of 1x10⁶ conidia/ml before spreading 100µl on PDA. They were incubated 24 hours at 25±2° C in darkness. Thereafter, the conidia were examined under a light microscope at 40x magnification and those with germ tubes equal or longer than the conidia were considered germinated. The germination ratios were calculated after examining a minimum of 300 conidia from each of the five replicate plates.

Determination of hydrophobicity

Conidial hydrophobicity was tested according to the aqueous-solvent partitioning method described by Shah et al. (2007). Obtained conidia in the products were suspended in PM buffer containing 0.02% (v/v) Tween 80, and the concentration of the suspension was adjusted to 2x10⁷ conidia/ml. As the organic phase, 40 µl liquid paraffin was added to each 4 ml of the suspension. The mixture was vortexed for 3 minutes. After the two phases (organic phase and aqueous phase) are separated from each other, the number of conidia in the aqueous phase was found by counting on a Neubauer hemocytometer under a microscope. The test was repeated five times for conidia obtained from each substrate. The hydrophobicity rate (Hr) was calculated as $Hr = (1-C/C_0) \times 100$, where C₀ is concentration of conidia in the suspension before addition of liquid paraffin, and C is the concentration of conidia in the aqueous phase after the separation of two phases.

Determination of thermotolerance

The conidia from the products using different substrates were subjected to thermotolerance tests at 35, 40 and 45° C. For each replication of each product, 1 mg of conidia was added into 10 ml of 0.1% Tween 80. The suspension was mixed using vortex and then 1 ml of suspension was transferred into an Eppendorf tube. The tubes were heated in a water bath at above mentioned temperatures for 15, 30 and 60 minutes. The tests were conducted with five replications and the viability of treated and non-treated control conidia was determined by the germination tests.

Virulence of conidia

For each treatment, 40 gr durum wheat homogenously mixed with the required amount of conidia to provide the concentrations of 2x10⁷ conidia/g wheat in a 50 ml centrifuge tube. Twenty *R. dominica* adults were placed inside each tube. For control, clean wheat without fungal conidia was used. All the experimental tubes were placed in a humidity chamber, a sealed plastic container (45x31x18.5 cm) with saturated NaNO₂ solution. The experiment had four replications for each product, and was conducted at 25±2° C and 65±5% relative humidity in darkness. Adult mortalities were recorded 14 days after treatment.

Statistical Analysis

The data (hydrophobicity, thermotolerance, germination rates, conidia amounts and mortality rates) were subjected to one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparison test ($P \leq 0.05$) and were arcsine transformed prior to the statistical analysis. All statistical analyses were conducted by using SPSS statistics program.

RESULTS

Amount of conidia, their germination and hydrophobicity

Beauveria bassiana conidia were mass produced on different substrates and obtained amount of products, number of conidia in the products, germination rates and hydrophobicity of the conidia were presented in Table 1. Substrate was significantly important in terms of amount of product, number of conidia and

hydrophobicity, while germination of conidia in all cases were similarly high. The highest amount of product was obtained by using whole rice as substrate (4.10 g/bag), followed by broken rice (3.20 g/bag), wheat (2.01 g/bag), dövme (1.61 g/bag) and bulgur (1.23 g/bag). The highest number of conidia was achieved using broken rice (10.24×10^{10} conidia/g) and whole rice (9.62×10^{10} conidia/g) while the other substrates resulted in significantly lower number of conidia. The germination rates of conidia obtained from different substrates did not show any significant differences ($F_{4,20} = 0.61$; $P = 0.658$) and all had a germination rate of 95% or higher. The hydrophobicity rates of conidia varied between 81.60% and 88.73%. The highest hydrophobicity rate was obtained using wheat as substrate (88.73%). This was significantly higher than the rest, while the differences among the rest were insignificant.

Table 1. Effects of substrate in mass production of *Beauveria bassiana* conidia in terms of amount, germination and hydrophobicity (\pm s.e.)

Çizelge 1. *Beauveria bassiana* konidilerinin kitlesel üretiminde substratların hidrofobisite, çimlenme ve miktar açısından etkisi (\pm s.h.)

Substrates	Amount of product per bag (g)	Number of conidia in products ($\times 10^{10}$ conidia/g)	Germination (%)	Hydrophobicity rate (%)
Whole rice	4.10 \pm 0.21 a	9.62 \pm 0.15 a	95.72 \pm 1.18 a	83.04 \pm 0.77 b
Broken rice	3.25 \pm 0.20 b	10.24 \pm 0.09 a	94.93 \pm 1.30 a	82.10 \pm 0.97 b
Dövme	1.61 \pm 0.12 cd	3.06 \pm 0.63 b	96.20 \pm 0.62 a	82.13 \pm 0.36 b
Wheat	2.10 \pm 0.17 c	0.87 \pm 0.15 c	97.13 \pm 0.50 a	88.73 \pm 0.64 a
Bulgur	1.23 \pm 0.05 d	0.48 \pm 0.10 c	96.33 \pm 0.64 a	81.60 \pm 0.73 b
ANOVA results	$F_{4,20} = 35.16$ $P < 0.0001$	$F_{4,20} = 241.9$ $P < 0.0001$	$F_{4,20} = 0.61$ $P = 0.658$	$F_{4,20} = 16.71$ $P < 0.0001$

* Different letters within each column indicate significant differences according to Tukey multiple comparison test ($P < 0.05$).

Thermotolerance of conidia

Germination rates of *B. bassiana* conidia exposed to high temperatures for 15, 30 and 60 mins. were presented in Tables 2, 3 and 4, respectively. The germination rates of untreated conidia were $>95\%$ for all substrates at 24 hours. Examining all the tables shows that temperature, exposing time and substrate are important factors for the thermotolerance of *B. bassiana* conidia. When exposed to 35°C for 15 mins, tolerance of conidia did not differ except for those obtained using bulgur, which tolerated significantly better than the rest. Bulgur was better than the rest except for wheat as substrate for conidial tolerance at 40°C for 15 mins (Table 2). Substrate did not significantly change the tolerance of conidia at 35° C for 30 mins. After exposing to 40° C for 30 mins, conidia from bulgur, wheat and dövme germinated better than those obtained using whole and broken rice (Table 3). Treatment of the conidia for 60 mins at 35° C did not cause any significant difference while at 40° C conidia grown on whole and broken rice were more susceptible than the others (Table 4). At all exposure times, *B. bassiana* conidial germination was impeded severely

at 45° C. Overall the conidia from bulgur and wheat showed higher germination rates than the others.

Virulence of conidia

Rhizopertha dominica adult mortalities caused by application of *B. bassiana* conidia produced using different substrates are presented in Figure 1. There were significant differences among obtained *R. dominica* adult mortalities ($F_{4,20} = 35.16$; $P < 0.0001$). The most virulent conidia were produced on rice while the least virulent conidia were produced on wheat and bulgur. At 14 days post-treatment, the conidia obtained from whole rice and broken rice caused 80.3% and 72.0% mortality, respectively. However, the conidia obtained from dövme, wheat, bulgur caused significantly lower mortalities, 56.7%, 43.5%, 39.3%, respectively.

DISCUSSION

Five different substrates were evaluated for developing a mass production procedure of the conidia of a *B. bassiana* isolate (5-4), efficiency of which has previously been demonstrated to be high against

stored-cereal pests. The results show that both quantity (amount of product and number of conidia) and quality (germination rate, hydrophobicity rate and thermotolerance) of conidia were influenced by substrate used for production. The only characteristic that did not show significant change depending on substrate was the germination rate of *B. bassiana* conidia in this study. It seems that once conidia were produced by the fungus, almost all are capable of germinating, at least soon after production.

The tested substrates significantly affected the quantity of conidia and the highest yield of conidia was obtained using rice, which is used predominantly for mass production of entomopathogenic fungi (Mar and Lumyong, 2012; Ye et al., 2006; Cherry et al., 1999; Nirmala et al., 2005; Patil et al., 2011). There are numerous studies demonstrating the significance of substrate or nutrient content of the medium where entomopathogenic fungi are produced on the virulence of obtained conidia (Feng et al., 2000; Shah et al., 2005;

Table 2. Effect of exposing *Beauveria bassiana* conidia to high temperatures for 15 minutes on their germinations (%) (\pm s.e.)

Çizelge 2. *Beauveria bassiana* konidilerinin yüksek sıcaklıklara 15 dakika maruz bırakılmasının çimlenmeleri üzerine etkisi (%) (\pm s.h.)

Temperature Substrates	35°C	40°C	45°C	ANOVA results
Whole rice	91.66 \pm 1.26 bA	83.00 \pm 2.41 cdB	26.00 \pm 1.70 bC	F _{2,12} =148.135 P<0.0001
Broken rice	93.00 \pm 1.28 bA	78.00 \pm 2.02 dB	46.66 \pm 1.42 aC	F _{2,12} =98.651 P<0.0001
Dövme	89.66 \pm 0.51 bA	86.66 \pm 0.96 bcA	14.00 \pm 1.12 cB	F _{2,12} =947.471 P<0.0001
Wheat	92.66 \pm 1.00 bA	91.66 \pm 0.54 abA	3.00 \pm 0.70 dB	F _{2,12} =2212.345 P<0.0001
Bulgur	97.00 \pm 0.51 aA	96.66 \pm 0.85 aA	22.66 \pm 0.99 bB	F _{2,12} =1357.107 P<0.0001
ANOVA results	F _{4,20} =14.195 P<0.0001	F _{4,20} =19.953 P<0.0001	F _{4,20} =91.827 P<0.0001	

* Different capital letters in a row and different small letters in a column indicate significant differences according to Tukey multiple comparison tests (P<0.05).

Table 3. Effect of exposing *Beauveria bassiana* conidia to high temperatures for 30 minutes on their germinations (%) (\pm s.e.)

Çizelge 3. *Beauveria bassiana* konidilerinin yüksek sıcaklıklara 30 dakika maruz bırakılmasının çimlenmeleri üzerine etkisi (%) (\pm s.h.)

Temperature Substrates	35°C	40°C	45°C	ANOVA results
Whole rice	88.33 \pm 1.13 aA	60.66 \pm 3.23 bB	10.00 \pm 0.77 bcC	F _{2,12} =164.468 P<0.0001
Broken rice	88.00 \pm 1.29 aA	59.66 \pm 4.13 bB	19.66 \pm 1.53 aC	F _{2,12} =66.889 P<0.0001
Dövme	84.00 \pm 0.88 aA	80.33 \pm 1.04 aA	6.66 \pm 0.90 cB	F _{2,12} =949.921 P<0.0001
Wheat	87.00 \pm 0.85 aA	86.33 \pm 0.57 aA	1.00 \pm 0.57 dB	F _{2,12} =2939.383 P<0.0001
Bulgur	88.66 \pm 0.70 aA	89.00 \pm 0.55 aA	13.66 \pm 0.69 bB	F _{2,12} =1902.601 P<0.0001
ANOVA results	F _{4,20} =2.765 P=0.056	F _{4,20} =16.064 P<0.0001	F _{4,20} =69.430 P<0.0001	

* Different capital letters in a row and different small letters in a column indicate significant differences according to Tukey multiple comparison tests (P<0.05).

Table 4. Effect of exposing *Beauveria bassiana* conidia to high temperatures for 60 minutes on their germinations (%) (\pm s.e.)

Çizelge 4. *Beauveria bassiana* konidilerinin yüksek sıcaklıklara 60 dakika maruz bırakılmasının çimlenmeleri üzerine etkisi (%) (\pm s.h.)

Temperature Substrates	35°C	40°C	45°C	ANOVA results
Whole rice	74.00 \pm 2.07 bA	27.00 \pm 3.89 bB	3.66 \pm 0.99 bcC	F _{2,12} =86.787 P<0.0001
Broken rice	78.00 \pm 1.30 abA	28.33 \pm 4.00 bB	5.00 \pm 1.29 bC	F _{2,12} =94.934 P<0.0001
Dövme	76.00 \pm 0.83 bA	59.66 \pm 0.41 aB	2.33 \pm 0.95 cC	F _{2,12} =1428.977 P<0.0001
Wheat	84.33 \pm 0.38 aA	76.33 \pm 1.05 aB	0.00 dC	F _{2,12} =1366.243 P<0.0001
Bulgur	84.66 \pm 0.38 aA	84.00 \pm 0.38 aA	10.33 \pm 0.52 aB	F _{2,12} =4114.225 P<0.0001
ANOVA results	F _{4,20} =6.881 P<0.001	F _{4,20} =42.315 P<0.0001	F _{4,20} =61.119 P<0.0001	

* Different capital letters in a row and different small letters in a column indicate significant differences according to Tukey multiple comparison tests (P<0.05).

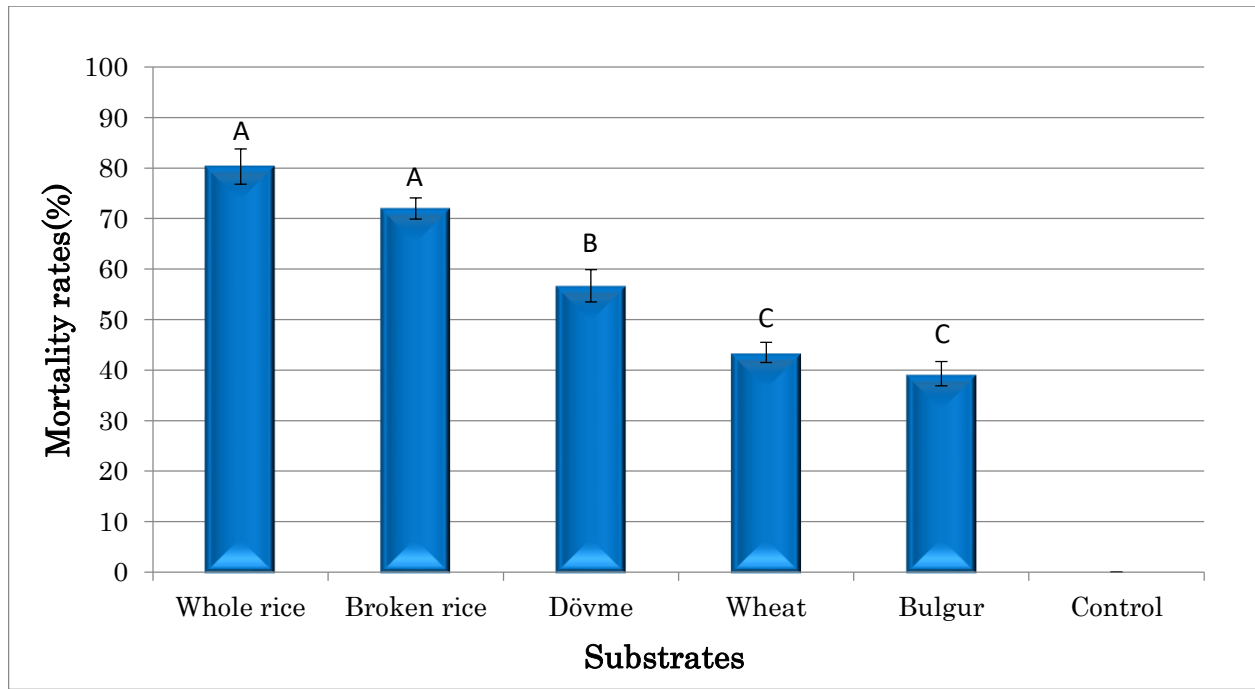


Fig. 1. Virulence of *Beauveria bassiana* conidia produced using different substrates against *Rhizopertha dominica* adults at the concentration of 2×10^7 conidia/g wheat (Bars represent standard errors, $n=4$)

Şekil 1. Farklı substratlar kullanılarak üretilen *Beauveria bassiana* konidilerinin 2×10^7 konidi/g buğday konsantrasyonunda *Rhizopertha dominica* erginlerine karşı virülenslikleri (Barlar standart hatayı belirtmektedir, $n=4$)

Shah et al., 2007; Latifian et al., 2013). In the present study conidia with the highest virulence against *R. dominica* adults were obtained when whole or broken rice was used for mass production of *B. bassiana* conidia. This is probably another reason for rice to be commonly preferred in mass production of entomopathogenic fungi (Mar and Lumyong, 2012; Ye et al., 2006; Cherry et al., 1999; Nirmala et al., 2005; Patil et al., 2011). Although these results indicated that rice would be the best choice for production of *B. bassiana* conidia, some properties of the conidia were found to be better when other substrates were used. The conidial thermotolerance of entomopathogenic fungi has been shown to be significantly influenced by ambient conditions where fungi are grown. It was found that during mycelial growth, especially the substrate used can enhance conidial thermotolerance (Ying and Feng, 2006; Kim et al., 2011). The present study supports these results. The thermotolerance of conidia significantly varied depending on the substrate and the most tolerant conidia was obtained by using wheat and bulgur. Kim et al. (2011) and Ying and Feng (2004) found a positive relationship between thermotolerance and hydrophobicity of conidia. Similarly, according to the results of the present study, the conidia produced by using wheat showed both high thermotolerance and high hydrophobicity amongst tested substrates.

It is once more demonstrated that choice of substrate is a very important step in developing a mass

production procedure for entomopathogenic fungi. Although the results may apply to most closely related entomopathogenic fungi, at least for mass production of the tested *B. bassiana* isolate (5-4), as substrate, rice should be preferred to achieve highly virulent more conidia while wheat should be the choice to reach more hydrophobic and thermotolerant conidia. In this study, all the tested characteristics were evaluated together for the first time for an entomopathogenic fungus. These results demonstrated that in the decision making stage for mass production of entomopathogenic fungi, all important characteristics should be assessed together. In this study, As the main purpose of evaluating substrates for the mass production of the tested *B. bassiana* isolate (5-4) is to obtain conidia for the control of stored cereal pests, rice can be selected as substrate to achieve high mortality and thus better suppression of the pest, while ways to improve their lower features are to be sought in future researches.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

REFERENCES

Arthur FH, 1996. Grain protectants: current status and prospects for the future. *Journal of Stored Products Research*, 32: 293-302.

- Athanassiou CG, Palyvos, N.E., 2006. Laboratory evaluation of two diatomaceous earth formulations against *Blattisocius keegani* Fox (Mesostigmata, Ascidae) and *Cheyletus malaccensis* Oudemans (Prostigmata: Cheyletidae). *Biological Control*, 38: 350-355.
- Cherry AJ, Jenkins NE, Bateman R, Lomer CJ, Heviefo G, 1999. A West African pilot scale production plant for aerial conidia of *Metarhizium* sp. for use as a mycoinsecticide against locusts and grasshoppers. *Biocontrol Science and Technology*, 9: 35-51.
- Cherry AJ, Abalo P, Hell K, 2005. A laboratory assessment of the potential of different strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research*, 41: 295-309.
- Borisade OA, Magan N, 2014. Growth and sporulation of entomopathogenic *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Isaria farinosa* and *Isaria fumosorosea* strains in relation to water activity and temperature interactions. *Biocontrol Science and Technology*, 24(9): 999-1011.
- Feng FC, Liu B.L, Tzeng YM, 2000. *Verticillium lecanii* spore production in solid-state and liquid-state fermentations. *Bioprocess Engineering*, 23: 25-29.
- Gangwar GP, 2013. Evaluation of different substrates for mass multiplication of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin, *Agriculture Science Digestion*, 33(4): 321-323.
- Humphreys AM, Matewele P, Trinci APJ, Gillespie AT, 1989. Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in batch and fed-batch culture. *Mycological Research* 92: 275-264.
- Kassa A, Brownbridge M, Parker BL, Skinner M, Skinner GV, Gouli SM, Lee F, Hata T, 2008. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 112: 583-591.
- Kim JS, Kassa A, Skinner M, Hata T, Parker BL, 2011. Production of thermotolerant entomopathogenic fungal conidia on millet grain. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38(6): 697-704.
- Latifian M, Rad B, Amani M, Rahkhodaei E, 2013. Mass production of Entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) by using agricultural products based on liquid-solid diphasic method for date palm pest control. *International Journal of Agriculture and Crop Protection*, 5 (19): 2337-2341.
- Lizzy AM, Mark DL, Ray MM, 2015. Effects of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. *Brazilian journal of Microbiology*, 46(1):67-74.
- Lomer CJ, Bateman RP, Dent D, De Geroote H, Douro-Kpindou O-K, Kooyman, C, Langewald J, Ouambama Z, Peveling R, Thomas M, 1999. Development of strategies for the incorporation of biological pesticides into the integrated management of locusts and grasshoppers. *Agricultural and Forest Entomology* 1: 71-88.
- Mar TT, Lumyong S, 2012. Conidial production of entomopathogenic fungi in solid state fermentation. *KKU Research Journal*, 17(5): 762-768.
- Michalaki MP, Athanassiou CG, Teenberg T, Buchelos CTh, 2007. Effect of *Paecilomycesfumosoroseus* (Wise) Brown and Smith (Ascomycota: Hypocreales) alone or in combination with diatomaceous earth against *Tribolium confusum* Jacquelin du Val (Coleoptera: Tenebrionidae) and *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *Biological Control*, 40: 280-286.
- Moino Jr A, Alves SB, Pereira RM, 1998. Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin isolates for control of stored-grain pests. *Journal of Applied Entomology*, 122: 301-305.
- Moore D, Higgins PM, 1997. Viability of stored conidia of *Metarhizium flavoviride* Gams and *Rozyspall* produced under different culture regimes and stored with clays. *Biocontrol Science and Technology*, 7: 335-344.
- Nirmala R, Ramanujan B, Rabindra RJ, Rao NS, 2005. Growth parameters of some isolates of entomofungal pathogens and production of dust-free conidia on rice medium. *Journal of Biological Control*, 19(2): 121-128.
- Padín S, Dal Bello G, Fabrizio M, 2002. Grain loss caused by *Tribolium castaneum*, *Sitophilus oryzae* and *Acanthoscelides obtectus* in stored durum wheat and beans treated with *Beauveria bassiana*. *Journal of Stored Products Research*, 38(1): 69-74.
- Patil SD, Kadam JR, Chandele AG, Wagh SS, Jadhav RS, 2014. Growth, development and viability of *Metarhizium anisopliae* on media with various nutrient sources. *International Journal of Plant Protection*, 7(2): 420-423.
- Rice WC, Cogburn RR, 1999. Activity of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* against three coleopteran pests of stored grain. *Journal of Economic Entomology*, 92: 691-694.
- Sewify GH, Shabrawy HA, Eweis ME, Naroz MH, 2014. Efficacy of Entomopathogenic Fungi, *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for controlling certain stored product insects. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 24(1): 191-196.
- Shah FA, Wang CS, Butt TM, 2005. Nutrition influences growth and virulence of insect-pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbial Letters*, 251: 259-266.
- Shah FA, Safavi SA, Pakdel AK, Rasoulilian GR, Bandani AR, Butt TM, 2007. Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic

- fungus *Beauveria bassiana*. Microbial Letters, 270: 116-123.
- Shams G, Safaralizadeh MH, Imani S, Shojai M, Aramideh S, 2011. A laboratory assessment of the potential of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Beauvarin) to control *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus granarius* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). African Journal of Microbiology Research, 5: 1192-1196.
- SPSS 2017. SPSS 24 for Windows User's Guide Release. Spss Inc, Chicago.
- Wraight SP, Carruthers RI, 1999. Production, delivery and use of mycoinsecticides for control of insect pests on field crops. In: Hall, F. R. and Menn, J. J. (eds.), Biopesticides Use and Delivery. Humana Press, New Jersey, pp 233-269.
- Wraight SP, Jackson MA, Kock SL, 2001. Production, stabilization and formulation of fungal biocontrol agents. In: Butt, T. M., Jackson, C. W. and Magan, N. (eds.), Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential, CABI Publishing, Wallingford, pp 253-287.
- Ye SD, Ying SH, Chen C, Feng MG, 2006. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. Biotechnology Letters, 28: 799-804.
- Ying SH, Feng MG, 2004. Relationship between thermotolerance and hydrophobin-like proteins in aerial conidia of *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces fumosoroseus* as fungal biocontrol agents. Journal of Applied Microbiology, 97: 323-331

Örtüaltı Hıyar Yetiştiriciliğinde Sorun Olan Kök-ur Nematodları (*Meloidogyne* spp.)'na Karşı Kimyasal Mücadeleye Alternatif Mücadele Olanaklarının Araştırılması

Mehmet Veysel AYHAN¹, İlker KEPENEKCI²

¹Kocaeli İl Tarım ve Orman Müdürlüğü, KOCAELİ, ²Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi, TOKAT

¹<https://orcid.org/0000-0002-7316-9152>, ²<https://orcid.org/0000-0002-8734-3422>

✉: kepenekci@gmail.com

ÖZET

Bu çalışma, örtüaltı hıyar yetiştiriciliğinde sorun olan kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.)'na karşı kimyasal mücadeleye alternatif mücadele olanaklarını araştırmak amacıyla 2017-2018 yıllarında Kocaeli ilinde yürütülmüştür. Denemeler, saksı denemesi şeklinde tesadüf parselleri deneme desenine göre 8 karakter, 10 tekerrürlü ve 2 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Domates saf kültürden elde edilen ikinci dönem kök-ur nematodu (*Meloidogyne incognita*) larvaları (L2), Ceylan F₁ hıyar çeşidi bitkileri, Hint hardalı (*Barassicae juncae*), Kadife çiçeği (*Tagetes erecta*) bitki aksamaları, Susam yağı (Nemax®), *Trichoderma harzianum* Rifai KRL-AG2 4x10⁶ spor/g (T-22 Planter Box®), Arbüskülar Mikorizal Fungus (Endo root®, %23,5 canlı *Glomus* spp.) ve karşılaştırma ilacı Fenamiphos etken maddeli (Nemasat®) denemenin materyallerini oluşturmuştur. Elde edilen bulgulara göre; kök-ur nematodunun hıyar bitkisinde oluşturduğu urların engellenmesi, topraktaki nematod sayısının azaltılması, daha az yumurta kümesi oluşumu, bitki boyunu artırıcı etkisi, bitki yaş ve kuru ağırlığına, kök yaş ve kuru ağırlığına etkileri bakımından her bir saksıya 50 g Hint hardalı yeşil aksam uygulamalarının etkisi diğer karakterlerdeki uygulamalara göre daha yüksek bulunmuştur. Hint hardalı (*B. juncae*)'ndan sonra *T. harzianum* ve Susam yağı karakterleri etkili bulunmuştur.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 22.02.2021

Kabul Tarihi : 05.04.2021

Anahtar Kelimeler

Meloidogyne

Tagetes erecta

Trichoderma harzianum

Glomus

Barassicae juncae

The Investigation of Alternative Control Possibilities Instead of Chemical Control Against Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Greenhouse Pepper Cultivation

ABSTRACT

This study was conducted in order to investigate the alternative control to chemical control against root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) which was a problem in greenhouse cucumber growing in Kocaeli (Turkey) province during 2017-2018. The experiments were carried out according to randomized plot design with 8 characters, 10 replications and two repetitions as pot trials. The second stage root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) larvae (J2) obtained from the pure culture of tomatoes, Ceylan F₁ cucumber variety plants, Indian mustard (*Barassicae juncae*), Marigold (*Tagetes erecta*) plant components, Sesame oil (Nemax), *Trichoderma harzianum* Rifai KRL-AG2 4x10⁶ spore/g (T-22 Planter Box®), Arbuscular mycorrhizal fungus (Endo root®, 23,5% live *Glomus* spp.) and the comparative nematicides Fenamiphos (Nemasat®) composed of the experiment materials. According to the findings obtained; it was been found more effective effect of 50 g Indian mustard green component applications in each pot than other characters, in terms of prevention of knots created by root-knot nematodes in cucumber plants, reduction of the number of nematodes in the soil, formation of less egg-cluster, increasing effect of plant height, effects of plant wet and dry weight and root wet and dry weight. *T. harzianum* and Sesame oil characters were found to be effective after the Indian mustard (*B. juncae*).

Research Article

Article History

Received : 22.02.2021

Accepted : 05.04.2021

Keywords

Meloidogyne

Tagetes erecta

Trichoderma harzianum

Glomus

Barassicae juncae

- Atıf İçin:** Ayhan MV, Kepenekci İ 2021. Örtüaltı Hıyar Yetiştiriciliğinde Sorun Olan Kök-ur Nematodları (*Meloidogyne* spp.)'na Karşı Kimyasal Mücadeleye Alternatif Mücadele Olanaklarının Araştırılması. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1271-1279. DOI: 10.18016/ksutarimdog.a.vi.882089.
- To Cite :** Ayhan MV, Kepenekci İ 2021. The Investigation of Alternative Control Possibilities Instead of Chemical Control Against Root-knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Greenhouse Pepper Cultivation. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1271-1279. DOI: 10.18016/ksutarimdog.a.vi.882089.

GİRİŞ

Sebzelerde ekonomik anlamda zararlı olan türlerden biri de konukçusu olduğu bitkinin kök sisteminde urlara neden olarak, bitkilerin iletim dokularını tahrip ederek, topraktan yeterli miktarda su ve besin maddeleri alımını engelleyen, ekonomik anlamda üründe ciddi kayıplarına sebep olan kök-ur nematodları [*Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae)]'dır. Kök-ur nematodları ile bulaşık sebze yetiştiriciliği yapılan tarım alanlarında, gerekli önlemler alınmadığı zaman, ürün kayıpları, zararlının yoğunluğuna, bitkinin çeşidine ve bitki hassasiyetine göre değişmektedir. Bu oran genellikle sebzelerde %15-85'e kadar ulaşabilmektedir. Kök-ur nematodları sahil bölgelerimiz başta olmak üzere sebze yetiştiriciliği yapılan örtü altı ve açık alanlarda ve meyve bahçelerinde yaygın olarak görülebilmektedir (Anonim, 2008; Yıldız ve Mamay, 2012).

Kök-ur nematodlarına karşı uygulanmakta olan mücadele metotlarından en yaygın olanı kimyasal mücadeledir. Sebze yetiştiriciliğinde özellikle örtü altı sebze üretimi yapılan alanlarda, kök-ur nematodlarına karşı yüksek toksik etkiye sahip nematisitler yoğun olarak kullanılmaktadır. Nematisitlerin nematod kontrolündeki etkinlikleri başarılı olmasına rağmen, geniş spektrumlu bir etkiye sahip olmaları, araştırmacılar tarafından kanserojen etkilerinin ortaya konması, ürünler üzerinde kalıntı problemlerinin ortaya çıkması gibi sebeplerden dolayı Avrupa Birliği'nce alınan kararlar doğrultusunda Tarım ve Orman Bakanlığı'nca Cadusafos, Carbofuran, Oxamyl, Iprodione gibi birçok nematisitin kullanımı ülkemizde yasaklanmıştır (Kepenekci, 2012).

Nematisitlerin toksik derecelerinin yüksek olması, insan ve çevre sağlığına verdiği zararlar, ilaç uygulamalarının pahalı ve zor olması, ihraç edilen ürünlerin kalıntı problemleri nedeniyle geri dönmesi gibi sebeplerden dolayı kimyasal mücadeleye alternatif mücadele yöntemleri üzerinde çalışmaların geliştirilmesine ağırlık verilmiştir. Son yıllarda ülkemizde çevreye, doğal yaşama ve insan sağlığına olumsuz etkileri olmayan biopreparatlar ile ilgili çalışmalara hız verilmiştir.

Kök-ur nematodlarına karşı alternatif mücadele olanaklarının araştırılmasına yönelik biyoteknik mücadele yöntemleri kapsamında bitkisel ekstraktlar ile ilgili dünyada ve ülkemizde çok sayıda araştırma yapılmaktadır. Elde edilen bulguların mücadele uygulamalarına aktarılmasıyla ülkemizde kök-ur nematodlarına karşı insan sağlığına ve çevreye

olumsuz etkiler oluşturan kimyasal mücadele alanları daraltılacaktır (Kepenekci, 2012).

Bu çalışmada, örtüaltı hıyar yetiştiriciliğinde sorun olan kök-ur nematodları (*Meloidogyne* spp.)'na karşı kimyasal mücadeleye alternatif mücadele olanakları araştırılmıştır. Bu amaçla Hint hardalı (*Brassica juncea*), Kadife çiçeği (*Tagetes erecta*) bitki aksamaları, Susam yağı (Nemax®), *Trichoderma harzianum* Rifai *KRL-AG2* 4x10⁶ spor/g (T-22 Planter Box®) ve Arbüsküler Mikorizal Fungus (Endo root®, %23,5 canlı *Glomus* spp.) çalışma kapsamına alınmıştır.

MATERYAL ve METOT

Bu çalışma 2017-2018 yıllarında nematisit etkisi olduğu düşünülen Hint hardalı [*Brassica juncea* (Euphorbiaceae)] ve kadife çiçeği [*Tagetes erecta* (Asteraceae)] bitkilerine ait olan toprak altı ve toprak üstü tüm aksamın ve bazı biyolojik ticari preparatların [Arbüsküler mikorizal fungus (Endo Roots), Susam yağı (*Sesamum indicum*), *Trichoderma harzianum* (T-22 planter box)] kök-ur nematodu (*M. incognita*)'na olan etkisini araştırmak amacıyla saksı denemeleri şeklinde Kocaeli Üniversitesi Aslanbey Meslek Yüksek Okulu (KÜAMYO) laboratuvarı ve seralarında (Kocaeli), Kocaeli İl Tarım ve Orman Müdürlüğü Laboratuvarında ve Yaşar TOSUN [Başiskele İlçesi Kullar Mahallesi, Kocaeli (BİKM)]'a ait ısıtmasız seralarda yürütülmüştür.

Saksı Denemeleri

Saksı denemeleri kapsamında 16 Mayıs 2017-25 Temmuz 2017 tarihleri arasında KÜAMYO'ya ait serada birinci denemeler kurulmuştur. 01 Ağustos 2018-09 Ekim 2018 tarihleri arasında BİKM'de yer alan üretici serasında ikinci denemeler kurulmuştur. Söz konusu çalışmada kullanılan uygulama karakterlerine ait bilgiler aşağıda yer alan Çizelge 1'de verilmiştir. Her bir saksı bir tekerrür olacak şekilde; 10 tekerrürlü ve 2 tekrarlı (iki farklı zamanda) olarak tesadüf parselleri deneme desenine göre saksı denemeleri şeklinde kurulmuştur. Deneme süresince hıyar bitkileri, tek ana gövdeden olacak şekilde yetiştirilmiş, yan koltuklar alınmıştır.

Sera-Saksı Denemelerinde Kullanılacak Hıyar Fidelerin Yetiştirilmesi ve Nematod Saf Kültürü Oluşturma Çalışmaları

Saf kültürün devamının sağlanması ve nematodların üretimi için kök-ur nematodlarına hassas olduğu bilinen SC-2121 domates çeşidi tohumları

kullanılmıştır. Tohumlar viyollere ekilmeden önce yüzeysel dezenfeksiyon amacıyla %3'lük çamaşır suyunda 1 dakika tutulup steril suyla yıkanmış ve kurutma kağıdı üzerinde kurutulmuştur. Bunu takiben tohumlar, içinde tohum toprağı konulmuş 45 oluklu (9×5) viyollere (en: 5 cm, derinlik: 6 cm) her oluğa bir tohum olacak şekilde dikilmiştir. Viyoller 23±2°C'de 16 saat aydınlık 8 saat karanlık ortama

yerleştirilerek düzenli olarak sulanmıştır. Viyollerde 2-4 gerçek yapraklı döneme gelen fideler saksılara şaşırtılarak seraya aktarılmıştır. Daha sonra elde bulunan stok kültürden nematodlar fidelerinin kökleri etrafına açılan 3-4 deliğe bombeli pipet yardımıyla 3000 yumurta (kök-ur nematodu yumurtası) bitki¹ olacak şekilde bulaştırılmıştır.

Çizelge 1. Denemede kullanılan karakterler ve simgeleri
Table 1. Characters and symbols used in the experiment

No	Uygulama karakterleri (Applications characters)	Karakter Simgesi (Character symbols)
1	Kontrol (+) Nematodlu Kontrol	K (+)
2	Kontrol (-) Nematodsuz Kontrol	K (-)
3	İlaçlı Kontrol	İK (+)
4	Hint Hardalı (<i>Brassicae juncae</i>)	H (+)
5	<i>Trichoderma harzianum</i>	TD (+)
6	Kadife çiçeği (<i>Tagates erecta</i>)	T (+)
7	Arbüskülar mikoriza	M (+)
8	Susam yağı (<i>Sesamum indicum</i>)	SY (+)

Şaşırtma işleminde saksılarda %80 kum %15 toprak ve %5 kil olacak şekilde toprak karışımı kullanılmıştır. Kullanılan saksılar 10×10 cm boyutlarında olup 800 cm³ toprak karışımı almaktadır. Toprak karışımları saksılara konulmadan önce saksıların alt kısımlarına bitki köklerin dışarı çıkmasını ve karışımların dökülmesini önlemek amacıyla kâğıt tela yerleştirilmiştir. Tohumların şaşırtılacağı saksılarda kullanılan kum ve toprak karışımı 121°C de 15 dakika otoklavda iki kere sterilize edilip, iki işlem arasında 24 saat beklenilmiştir (Nakasone ve ark., 2004).

Yumurtaları elde etmek için kök-ur nematodu (*M. incognita*) ile enfekteli kökler yıkanarak 1 L'lik kavonoz içine yaklaşık 1 cm uzunluğunda doğranarak konulduktan sonra üzerine 200 ml %0.525 yoğunlukta NaOCl çözeltisi eklenip, ağzı kapatılarak 3.0-3.5 dakika çalkalama işlemi yapılmıştır. Çalkalama işleminden sonra 500 mech'lik (delik genişliği 25 µm) elek üzerine yerleştirilmiş 200 mech (delik genişliği 75 µm) elek üzerine kavonoz içindeki nematodlu NaOCl çözeltisi dökülerek elek temiz suyla durulanmıştır. Üstteki elek ayrıldıktan sonra alttaki elek üzerinde biriken nematod yumurtaları beherlere alınmıştır. (Hussey ve Barker, 1973). Elde edilen nematod yumurtaları denemelerde kullanılmak üzere +4C°'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.

Denemenin Kurulması

Viyollerde yetiştirilen Hıyar fideleri (Ceylan F1), 2-4 yapraklı döneme gelince her saksıya bir fide olacak şekilde şaşırtılmıştır [Denemelerde 7×7cm (yaklaşık 340 ml veya 320 g toprak alan) ebatlarında içinde toprak kum karışımı (%80 kum, %15 toprak ve %5 kil) bulunan plastik saksılar kullanılmıştır]. Şaşırtılan fideler kök sistemlerinin gelişmesi için 5 gün düzenli

olarak kontrol edilerek sulanmıştır. Gelişme geriliği görülen veya popülasyonda uyum içinde olmayan fideler denemeye alınmamıştır.

Daha önce elde edilen nematod yumurtalarının bir kısmı denemelerde kullanılmak amacıyla mikroskop altında sayım yapılarak 1 ml'de 3000 yumurta olacak şekilde ayarlanmıştır. Ayrıca nematod yumurtalarının bir kısmı inkübasyona bırakılarak 2. dönem larvalar (L2)'in oluşumu sağlanmış ve toplanmıştır. 1 ml içinde 1000 2. dönem enfektif larva (1000 L2 ml⁻¹) olacak şekilde mikroskop altında sayım gerçekleştirilmiş ve aynı gün bu larvalar sera saksı denemelerinde kullanılmıştır.

Kurulan tüm denemelerde (+) kontrol (sadece nematod yumurtası veya L2'nin uygulandığı) ve (-) kontrol (sadece su uygulanan, herhangi bir nematod uygulaması yapılmayan) olmak üzere 2 kontrol grubu kurulmuştur. Ayrıca ilaçlı kontrol (İK) olarak Fenamiphos etken maddeli Nemasat (Nemasat 400 EC) kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar bitki/saksı başına ayarlanmış ve uygulamalardan sonra her bir saksıya 100 ml su verilmiştir.

Pozitif (+) kontrol uygulaması

Fideler şaşırtıldıktan 5 gün sonra fidelerin kökleri etrafına açılan 2 cm derinliğindeki deliğe pipet yardımıyla bitki başına 1000 L2 ml⁻¹ verilmiştir. (Hussey and Barker, 1973). 10 tekrerrür olacak şekilde pozitif kontrol (+) karakterleri oluşturulmuştur. Uygulamadan hemen sonra 100 ml su verilmiştir.

İlaçlı kontrol uygulaması

İlaçlı kontrol olarak zararlıya karşı uzun gün etkisi olan ruhsatlı Fenamiphos etken maddeli Nemasat 400

EC ilacı kullanılmıştır. Fideler şaşırtıldıktan sonra 5 gün kök gelişimi için beklenilmiştir. Fidelerin kökleri etrafına açılan 2 cm derinliğinde olan deliğe bitki başına 3000 yumurta ml⁻¹ olacak şekilde uygulama yapılmıştır (Melakeberhan, 1997). Uygulamadan hemen sonra Nemasat 400 EC isimli ilaç 5 L suya 15 ml (saksı başına 1.5 ml), dozunda saksı başına 500 ml ilaçlı su olarak verilmiştir. İlaçlamadan önce ve sonra fideler 100 ml suyla sulanmıştır.

Negatif (-) Kontrol uygulaması

Negatif (-) kontrol karakterinde fideler şaşırtıldıktan sonra kök gelişimi için 5 gün beklenilmiş ve denemeler kurulurken hiçbir nematod uygulaması yapılmamış aynı oranda sadece su verilmiştir.

Arbüsküler Mikorizal Fungus (Endo Roots Soluble) Uygulaması

Glomus intraradice, *G. aggregatum*, *G. mosseage*, *G. clarum*, *G. monosporus*, *G. deserticola*, *G. brasilianum*, *G. etunicatum*, *Gigaspora margarita* türlerinin içerdiği Endo Roots preparatı bitki başına 15 gram 500 ml su ile karıştırılarak uygulama yapılmıştır.

Kadife çiçeği (*Tagetes erecta*) ve köklerinin uygulanması

Saksılarda yetiştirilen kadife çiçekleri sökülerek çeşme suyuyla toprağından arınmak amaçlı yıkanmıştır. Daha sonra kadife çiçeği bitkilerinin kök aksamı makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Bu parçalanmış köklerden her bir saksıya 30 gr gelecek şekilde tartılarak nematod uygulamasından hemen sonra saksı toprağına karıştırılmıştır.

***Trichoderma harzianum* (T-22 planter box) uygulaması**

Trichoderma harzianum (T-22 planter box) 5 L suya 10 g uygulaması ile saksılara yaklaşık olarak 500 ml ilaçlı su gelecek şekilde verilmiştir.

Hint hardalı (*Brassica juncea*) uygulaması

Hint hardalı bitkisinin yaprakları, gövde kısımları makas yardımıyla küçük parçalara ayrılmıştır. Daha sonra blenderdan geçirilerek her bir saksıya 50 gr gelecek şekilde tartılarak aynı gün nematod

uygulaması yapılan saksı topraklarına karıştırılmıştır.

Susam (*Sesamum indicum*) yağı (Nemax®) uygulaması

Nematodlara karşı mücadelede kullanılan Nemax® (Susam yağı), saksı başına 3 ml preparat düşecek şekilde 2 L suya 30 ml karıştırılarak saksı başına 200 ml olacak şekilde verilmiştir. Başlangıçta nematodla bitlikte uygulama yapılmış sonra 15 gün ara ile 3 kez daha uygulanmıştır. Toplamda 4 uygulama yapılmıştır.

Denemenin Değerlendirilmesi

Uygulamalardan 9 hafta sonra bitkiler saksılardan köklere zarar vermeden toprakları ile birlikte çıkartılıp numaralandırma işlemi yapılmıştır. Denemeler sonunda her bir bitkinin boyu (cm), bitki üst aksam ve kök yaş ağırlığı (gr) parametreleri kaydedilmiştir. En son olarak, 70°C'de 48 saat kurutma (Mohammad ve ark., 2007) işlemi yapıldıktan sonra her bitki için üst aksam ve kök kuru ağırlıkları (gr) tartılmıştır. Ayrıca yaprak ve meyve sayıları kaydedilmiştir.

Nematod yumurta paket sayımı ve kökteki urlanma oranı parametrelerini değerlendirmek amacıyla, fazla tazyikli olmayan musluk suyu altında kök sisteminin topraktan tam arındırılması için yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kökler phloxine B (0.15 g L su⁻¹) ile 15-20 dakika boyanmıştır (Daykin ve Hussey, 1985) ve binoküler altında yumurta paketleri sayılmıştır.

Deneme sonunda, yapılan uygulamaların kök-ur nematodlarının topraktaki larva popülasyonları (L2)'na etkilerinin belirlenmesi amacıyla, "Geliştirilmiş Baermann-Huni Yöntemi" kullanılarak saksı toprakları analiz edilmiş (Hooper, 1986) ve topraktaki nematodlar sayılmıştır.

Köklerde bulunan yumurta kümeleri ve urlanma oranları değerlendirilmesi amacıyla, boyanan yumurta kümeleri sayılmış ve 0-5 yumurta kümesi reaksiyon skalasına göre (Triantaphyllou, 1981; Sasser ve ark., 1984) değerlendirilmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 2. Yumurta kümesi-reaksiyon skalası (Triantaphyllou, 1981; Sasser ve ark., 1984)

Table 2. Egg cluster reaction scale (Triantaphyllou, 1981; Sasser ve ark., 1984)

Kökteki yumurta kümesi sayısı (Number of egg mass in the roots)	Skala değeri [Scale value (Gal index)]	Sonuç (Results)
Yumurta kümesi yok	0	Dayamklı
1-2	1	Dayamklı
3-10	2	Dayamklı
11-30	3	Hassas
31-100	4	Hassas
101 üstü	5	Hassas

Uygulamaların nematodlar üzerindeki etkinliğini belirlemek için köklerdeki ırlanma miktarları belirlenmiştir. Bu amaçla, Çizelge 3.'de belirtilen Zeck (1971) skalasına göre kökler değerlendirilerek bulaşıklık dereceleri ortaya konmuştur.

Deneme sonucunda elde edilen tüm değerlerin varyans analizleri (ANOVA) için SPSS (Version 16.00; SPSS, Chicago, IL, USA) istatistik yazılım programı kullanılmış olup, ortalamaların karşılaştırması Duncan testine göre $P \leq 0.05$ düzeyinde yapılmıştır.

Ayrıca, kök-ur skalası değerlerine $\log_{10} (X+1)$ transformasyonu uygulanarak istatistiksel analizler gerçekleştirilmiştir.

Denemeler boyunca sera içi sıcaklık ve nem değerleri HOB0 (sıcaklık ve nem kaydedici) kullanılarak kaydedilmiştir. 2017 yılı için (16.05-27.07.2017) sıcaklık $26.98^{\circ}\text{C} \pm 8.01$ ($14.9-42.9^{\circ}\text{C}$); nem 79.9 ± 27.17 (%21.5-100.0) ve 2018 yılı için (01.08-12.10.2018) sıcaklık $23.80^{\circ}\text{C} \pm 7.30$ ($14.2-40.1^{\circ}\text{C}$); nem 79.6 ± 28.07 (%21.5-100.0) olarak kaydedilmiştir.

Çizelge 3. Kök-ur nematodları ile bulaşıklık durumlarını gösteren skala (Zeck,1971)

Table 3. Scale showing contamination status whit root-knot nematodes (Zeck, 1971)

Bulaşma Derecesi (Degree of contamination)	Bitkilerin Belirtileri (Symptoms of plant)
0	Kök sistemi tümüyle sağlam.
1	Kökler dikkatle incelendiğinde çok az ur var.
2	Uurlar küçük, fakat 1.dereceye oranla çok.
3	Kök sisteminde çok sayıda ur vardır. Uurların bazıları birleşerek büyümüştür. Fakat köklerin vazifesini aksatmaz.
4	Çok sayıdaki uurlara ilaveten büyük uurlar mevcut,fakat köklerin çoğu görevlerine devam eder.
5	Uurlardan dolayı köklerin yaklaşık olarak %25'i görev yapamaz.
6	Kök sisteminin yaklaşık %50'si görev yapamaz
7	Kök sisteminin yaklaşık %75'i urlu,ürün kaybı var.
8	Sağlam kök kalmamıştır, bitkinin beslenme düzeni bozulmuştur. Fakat bitki hala yeşildir.
9	Kök sistemi tamamen urla kaplı olup kök çürür.
10	Bitki ve kök ölür.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Sera koşullarında yürütülen saksı denemeleri sonucunda pozitif kontrol (nematod verilen) (K+) ve negatif kontrol (nematod verilmeyen sadece su uygulanan) (K-) deneme karakterleri'ne ait hıyar bitkilerinin köklerindeki ırlanma miktarı; kökteki yumurta paketi sayısı; topraktaki 2. dönem larva sayısı (L2); bitki boyları; bitki yaş ve kuru ağırlığı; kök yaş ve kuru ağırlıkları; meyve ve yaprak sayıları bakımından ilaçlı kontrol, (İK); Hint Hardalı (*Brassicae juncae*), (H); *Trichoderma*, (TD); Kadife çiçeği (*Tagates erecta*), (T); Arbüskular mikoriza, (M) ve Susam yağı (*Sesamum indicum*) (SY) uygulamaları ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Köklerdeki ırlanma Miktarı

Uygulamalar değerlendirildiğinde İK (2.05 ± 0.20), M (2.30 ± 0.17) ve T deneme karakterleri birlikte aynı grupta yer almışlardır. Daha sonra sırasıyla H (0.85 ± 0.13), TD (0.95 ± 0.11) ve SY (1.10 ± 0.12) deneme karakterleri farklı bir grupta yer almıştır. Köklerdeki en düşük ırlanma H (0.85 ± 0.13) karakterinde olmuştur. Kök-ur ıskalaya değerleri açısından değerlendirilme yapıldığında ise, H, TD ve SY deneme karakterleri eşdeğer düzeyde ve diğer uygulamalara göre köklerdeki ur oluşumunu daha fazla engellemiş

olduğu görünmektedir [F (2.09)= 117.244 $P < 0.05$]. Uygulamaların köklerdeki ırlanmaya azaltıcı etkisi %63.40-86.50 oranında olmuştur (Çizelge 4).

Yumurta Kümesi

Sera saksı 1. ve 2. deneme sonuçlarına göre yapılan uygulamaların hıyar bitkilerinin köklerindeki yumurta kümelerine etkisinin incelenmesi sonucunda; uygulamalar içinde köklerde en yüksek yumurta kümesi miktarı K+ deneme karakterinde (3.30 ± 0.15) görülmüş ve tek başına bir grup oluşturmuştur. Diğer uygulamalar ise en düşük yumurta kümesine sırasıyla H (0.60 ± 0.16), TD (0.75 ± 0.11) ve SY (0.95 ± 0.05) karakterlerinde rastlanılmıştır. Yumurta kümesi reaksiyon ıskalası açısından değerlendirildiğinde, H, TD ve SY deneme karakterleri eşdeğer düzeyde ve diğer uygulamalara göre daha az yumurta paketine sahip bulunmuştur [F (2.09)= 77.181 $P < 0.05$]. Yapılan uygulamaların köklerdeki yumurta kümesi miktarlarını azaltıcı etkisi %40.2-82.2 oranında olmuştur (Çizelge 4).

Topraktaki Kök-Ur Nematodu 2. Dönem Larva Sayıları

Uygulanan deneme karakterleri arasında en düşük 2. dönem larva yoğunluğu H (72.00 ± 7.11) karakterinde

saptanmış, TD (98.00±11.23) deneme karakteri ile istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. Daha sonra; SY (113.00±10.88) deneme karakteri istatistiksel olarak ayrı grup oluşturmuştur. İK (272.00±19.02), M (282.50±47.96), T (332.00±46.03)

deneme karakterleri istatistiksel olarak eş değer düzeyde ayrı grup olmuşlardır [F (2.09)= 157.466 P<0.05]. Uygulamaların hıyar bitkilerinin saksı toprağındaki kök-ur nematodu 2. dönem larva sayılarına %95.1-75.9 oranında olmuştur (Çizelge 5).

Çizelge 4. Farklı uygulamalara göre hıyar bitkilerinin köklerinde *Meloidogyne incognita*'nın oluşturduğu urlanma miktarı (Ur Skala Değeri) [X±SH (min-max)] (n=10), yumurta kümesi-reaksiyon skalası [X±SH (min-max)], (n=10) ve pozitif kontrol (K+)'e göre azaltıcı etkisileri (%)

Table 4. The gall injury rates [X±SE (min-max)] (n=10), the egg cluster reaction scale [X±SE (min-max)] (n=10) of *Meloidogyne incognita* in the roots of cucumber plants according to different applications and decreasing effect (%) to positive control (K+)

Uygulamalar (Applications)	Ur Skala Değeri ^a (Gall scale value)	Azaltıcı Etki (%) [Decreasing effect (%)]	Yumurta Paketi ^a (Egg package)	Azaltıcı Etki (%) [Decreasing effect (%)]
H (+)	0.85±0.13 (0.00-1.50) ^b	b 86.5	0.60±0.16 (0.00-1.00)	b 82.2
TD (+)	0.95±0.11 (0.00-1.50)	b 84.9	0.75±0.11 (0.50-1.50)	b 77.6
SY (+)	1.10±0.12 (0.50-1.50)	b 82.5	0.95±0.05 (0.50-1.00)	b 71.6
M (+)	2.30±0.17 (1.50-3.00)	c 63.4	1.80±0.08 (1.50-3.00)	c 46.2
T (+)	2.25±0.18 (1.50-3.00)	c 64.2	2.00±0.14 (1.00-3.00)	c 40.2
İK (+)	2.05±0.20 (1.00-3.00)	c 67.4	1.40±0.16 (0.50-2.00)	d 58.2
K (-)	0.00±0.00 (0.00-0.00)	a -	0.00±0.00 (0.00-0.00)	a -
K (+)	6.30±0.32 (5.50-8.00)	d 0	3.35±0.15 (3.00-4.00)	e 0

^a İstatistiksel analizlerde urlanma ve yumurta kümesi-reaksiyon skala verilerine log₁₀(X+1) transformasyonu uygulanmıştır.

^b Aynı harfi içeren ortalamalar Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı değildir (P≤0.05).

Çizelge 5. Yapılan uygulamalar sonunda hıyar bitkilerinin saksı topraklarındaki topraklarda *Meloidogyne incognita* 2. dönem larva sayıları [X±SH (min-max)] (n=10), bitki boyu (cm) ve pozitif kontrol (K+)'e göre azaltıcı etkisi (%)

Table 5. Second stage larvae number [X±SE (min-max)] (n=10) of *Meloidogyne incognita* in the pots soil of cucumber plants and plant height (cm) in as a result of applications and increasing effect (%) of nematodes numbers according to positive control (K)

Uygulamalar (Applications)	Nematod sayısı (Number of nematodes)	Azaltıcı Etki (%) [Increasing effect (%)]	Bitki Boyu (cm) (Plant height)	Azaltıcı Etki (%) [Increasing effect (%)]
H (+)	72.00±7.11(50-200) ^a	ab 95.1	252.3±5.66(213.5-282.5)	a 87.4
TD (+)	98.00±11.23(50-170)	ab 92.8	240.50±4.44(220-262)	a 78.6
SY (+)	113.00±10.88(70-170)	b 91.7	215.15±3.04(202.5-229)	b 59.8
M (+)	282.5±47.96(100-480)	c 79.4	203.75±5.38(184-234)	bc 51.3
T (+)	332.0±46.03(170-550)	c 75.9	195.75±3.97(178.5-215)	c 45.4
İK (+)	272.0±19.02(170-350)	c 80.2	178.8±9.43(146.5-227)	d 32.8
K (-)	0.0±0.0(0.0-0.0)	a -	176.20±2.14(165-184)	d 30.9
K (+)	1378.0±70.2(1100-1640)	d 0.0	134.60±4.27(111-158)	e -

^a Aynı harfi içeren ortalamalar Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı değildir (P≤0.05).

Bitki Boyu

Deneme karakterleri içinde en yüksek bitki boyu H (252.35±5.26) karakterinde saptanarak TD (240.50±4.44) karakteri ile istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. SY (215.15±3.04) karakteri üçüncü yüksek boy ortalamasıyla ayrı bir grubu oluşturmuştur. En düşük bitki boyu K+ (134.60±4.27) deneme karakterinde kaydedilmiştir [F (2.09)= 52.133 P<0.05]. Yapılan uygulamaların hıyar bitkilerinin boyuna artırıcı etkisi %30.9-87.4 oranında olmuştur (Çizelge 5).

Bitki Yaş Ağırlığı

En yüksek bitki yaş ağırlığı H (266.39±11.61) karakterinde saptanarak ayrı grupta yer almıştır. Daha sonra sırayla; TD (198.91±7.78), SY (184.51±7.93) ve M (181.66±9.85) deneme karakteri istatistiksel olarak aynı grupta yer almıştır. T (138.44±5.62) karakteri ayrı grup olmuştur. İK (123.70±9.50) ve K- (122.86±8.31) deneme karakterleri birlikte aynı grupta yer almışlardır. En düşük bitki boyu K+ (94.13±4.42) deneme karakterinde kaydedilmiş ve istatistiksel olarak ayrı grup oluşturmuştur [F (2.09)= 41.985 P<0.05]. Yapılan

uygulamaların hıyar bitkilerinin boyuna artırıcı etkisi %30.5-183.0 oranında olmuştur (Çizelge 6).

Bitki Kuru Ağırlığı

Deneme karakterleri içinde en yüksek bitki kuru ağırlığı H (39.38±1.74) karakterinde saptanmış, TD (36.15±0.81) deneme karakteri ile aynı grupta yer almıştır. SY (31.06± 1.26) ve M (29.08± 1.11) deneme karakterleri istatistiksel olarak aynı grupta yer

almıştır. Daha sonra sırayla; T (28.05± 1.14), İK (21.42± 1.81) ve K- (24.76± 2.06) deneme karakterleri ayrı gruplarda yer almışlardır. En düşük bitki kuru ağırlığı K+ (16.33± 0.69) deneme karakterinde kaydedilmiş ve istatistiksel olarak ayrı grup oluşturmuştur [F (2.09)= 41.985 P<0.05]. Yapılan uygulamaların hıyar bitkilerinin kuru ağırlığına etkisi %31.1-141.1 oranında olmuştur (Çizelge 6).

Çizelge 6. Yapılan uygulamalar sonunda hıyar bitkilerinin yaş, kuru ağırlıkları (gr) [X±SH (min-max)] (n=10) ve pozitif kontrol (K+)'e göre artırıcı etkisi (%)

Table 6. The wet, dry weight of cucumber plants as a result of applications [X±SE (min-max)] (n=10) and increasing effect (%) to positive control (K)

Uygulamalar (Applications)	Bitki Yaş Ağırlık (gr) [Plant wet weight (gr)]	Arttırıcı Etki (%) [Increasing effect (%)]	Bitki Kuru Ağırlık (gr) [Plant dry weight (gr)]	Arttırıcı Etki (%) [Increasing effect (%)]
H (+)	266.39±11.61(204.76-318.07) ^a	a 183	39.38±1.74 (27.77-47.37)	a 141.1
TD (+)	198.91± 7.78 (160.07-243.50)	b 111.3	36.15±0.81 (31.99-40.75)	a 121.3
SY (+)	184.51± 7.93 (140.60-229.19)	b 96	31.06± 1.26 (26.07-37.88)	b 90.2
M (+)	181.66± 9.85 (135.77-219.92)	b 92.9	29.08± 1.11 (21.08-34.37)	b 52.2
T (+)	138.44± 5.62 (131.60-186.10)	c 47	28.05± 1.14 (23.59-35.54)	bc 71.7
İK (+)	123.70± 9.50 (135.77-219.92)	d 31.4	21.42± 1.81 (14.10-32.10)	cd 31.1
K (-)	122.86± 8.31 (95.04-183.25)	d 30.5	24.76± 2.06 (15.38-35.71)	d 51.6
K (+)	94.13± 4.42 (80.10-120.18)	e -	16.33± 0.69 (11.82-19.19)	e -

^a Aynı harfi içeren ortalamalar Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı değildir (P<0.05).

Kök Yaş Ağırlığı

Deneme karakterleri içinde en yüksek kök yaş ağırlığı H (12.04±0.53) karakterinde saptanmış ve tek başına ayrı grup olmuştur. Daha sonra; TD (8.73±0.48) ve SY (8.52± 0.31) deneme karakteri aynı grupta yer almıştır [F (2.09)= 41.985 P<0.05]. Yapılan uygulamaların hıyar bitkilerinin kuru ağırlığına etkisi %31.1-141.1 oranında olmuştur (Çizelge 7).

Kök Kuru Ağırlığı

Deneme karakterleri içinde en yüksek kök kuru ağırlığı H (2.63±0.28) karakterinde saptanmış, sırasıyla TD (2.18±0.14), SY (2.03± 0.10) ve M (1.87± 0.20) deneme karakterleri istatistiksel olarak eş değer düzeyde grup olmuşlardır. En düşük bitki kök kuru ağırlığı K+ (1.59± 0.88) deneme karakterinde kaydedilmiş ve istatistiksel olarak ayrı grup oluşturmuştur [F (2.09)= 41.985 P<0.05]. Yapılan uygulamaların hıyar bitkilerinin kuru ağırlığına etkisi %31.1-141.1 oranında olmuştur (Çizelge 7).

Çizelge 7. Yapılan uygulamalar sonunda hıyar köklerinin yaş, kuru ağırlıkları (gr) [X±SH (min-max)] (n=10) ve pozitif kontrol (K+)'e göre artırıcı etkisi (%)

Table 7. The wet, dry root weight of cucumber plants as a result of applications [X±SE (min-max)], (n=10) and increasing effect (%) to positive control (K)

Uygulamalar (Applications)	Yaş Kök Ağırlık (gr) [Wet root weight (gr)]	Arttırıcı Etki (%) [Increasing effect (%)]	Kuru Kök Ağırlık (gr) [Dry root weight (gr)]	Arttırıcı Etki (%) [Increasing effect (%)]
H (+)	12.04±0.53 (9.01-13.90) ^a	a 84	2.63±0.28 (1.42-3.85)	a 65
TD (+)	8.73±0.48 (6.82-11.60)	b 33.4	2.18±0.14 (1.51-2.90)	ab 37
SY (+)	8.52± 0.31 (26.07-37.88)	b 30.2	2.03± 0.10 (1.55-2.76)	abc 27,6
M (+)	7.28± 0.46 (5.27-10.03)	c 11.3	1.87± 0.20 (1.24-3.34)	abcd 17.6
T (+)	7.16± 0.30 (5.42-8.42)	c 9.4	1.73± 0.98 (1.31-2.37)	bcd 8.8
İK (+)	7.03± 0.38 (4.68-9.50)	c 7.4	1.52± 0.16 (1.24-2.92)	d 4.4
K (-)	7.08± 0.20 (6.25-7.84)	c 8.2	1.76± 0.71 (1.44-2.19)	bcd 10.6
K (+)	6.54± 0.52 (5.60-9.82)	c -	1.59± 0.88 (1.16-2.16)	cd -

^a Aynı harfi içeren ortalamalar Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı değildir (P<0.05).

Yaprak Sayısı

Deneme karakterleri içinde en yüksek yaprak sayısı H (38.30±1.03) karakterinde saptanmış istatistiksel

olarak ayrı grup olmuştur. Daha sonra sırasıyla TD (30.40±1.01), SY (30.50±0.92) ve M (30.40±0.63) deneme karakterleri istatistiksel olarak eş değer

düzye de aynı grupta yer almıştır. İK (28.70±1.98) deneme karakteri ayrı grupta yer almıştır. En düşük yaprak sayısı K+ (15.90±0.79) deneme karakterinde kaydedilmiş ve istatistiksel olarak ayrı grup oluşturmuştur [F (2.09)= 39.824 P<0.05]. Yapılan uygulamaların hıyar bitkilerinin yaprak sayısına arttırıcı etkisi %45.2-140.8 oranında olmuştur (Çizelge 8).

Meyve Sayısı

Deneme karakterleri içinde en yüksek meyve sayısı H

(12.10±0.43) karakterinde saptanmış istatistiksel olarak ayrı grup olmuştur. TD (11.20±0.20), SY (10.70±0.21) deneme karakterleri istatistiksel olarak eş değer düzeyde aynı grupta yer almıştır. Daha sonra sırasıyla M (8.30±0.26), İK (7.40±0.33), T (6.90±0.17) ve K- (6.60±0.16) deneme karakterleri ayrı grup oluşturmuştur En düşük meyve sayısı K+ (5.30±0.21) deneme karakterinde kaydedilmiş ve istatistiksel olarak ayrı grup oluşturmuştur [F (2.09)= 39.824 P<0.05]. Yapılan uygulamaların hıyar bitkilerinin meyve sayısına arttırıcı etkisi % 45.2-140.8 oranında olmuştur (Çizelge 8).

Çizelge 8. Yapılan uygulamalar sonunda hıyar bitkilerinin yaprak, meyve sayısı [X±SH (min-max)] (n=10) ve pozitif kontrol (K+)'e göre arttırıcı etkisi (%)

Table 8. The leaf, fruits numbers of cucumber plants as a result of applications [X±SE (min-max)], (n=10) and increasing effect (%) to positive control (K)

Uygulamalar (Applications)	Yaprak Sayısı (adet) [Numbers of leaf (total)]	Arttırıcı Etki (%) [Increasing effect (%)]	Meyve Sayısı (adet) [Numbers of fruits (total)]	Arttırıcı Etki (%) [Increasing effect (%)]
H (+)	38.30±1.03 (34-45) ^a	a 140.8	12.10±0.43 (10-14)	a 128.3
TD (+)	30.40±1.01 (26-37)	b 91.2	11.20±0.20 (10-12)	b 111.3
SY (+)	30.50±0.92 (28-36)	b 91.8	10.70±0.21 (10-12)	b 101.8
M (+)	30.40±0.63 (26-33)	b 91.2	8.30±0.26 (7-9)	c 91.2
T (+)	26.80±0.61 (24-29)	c 68.5	6.90±0.17 (6-8)	de 30.1
İK (+)	28.70±1.98 (21-39)	bc 80.5	7.40±0.33 (5-9)	d 39.6
K (-)	23.10±0.60 (20-26)	d 45.2	6.60±0.16 (6-7)	e 20.7
K (+)	15.90±0.79 (13-22)	e 0	5.30±0.21 (4-6)	f 0

^a Aynı harfi içeren ortalamalar Duncan testine göre istatistiksel olarak farklı değildir (P≤0.05).

McLeod ve Steel (1999)'in 15 *Brassica* türleriyle yaptıkları çalışmada 10 ve 20 g olmak üzere 2 ayrı dozda yeşil aksamın toprağa karıştırıldığında *Meloidogyne javanica*'nın popülasyonunda önemli ölçüde azalma meydana geldiğini ve bu bağlamda söz konusu olan kök-ur nematodunu baskıladığını bildirmişlerdir. Stirling ve Stirling (2003) ise domates bitkisinde *M. javanica*'nın mücadelesinde sera koşullarında *B. juncea* ve *B. napus*'un kök, yaprak ve gövde kısımlarından meydana gelen karışımı organik yeşil gübre materyali olarak toprağa uygulanmışlardır. Araştırmacılar uygulamalar sonucu *M. javaica* popülasyonunu büyük oranda baskılandığını bildirmişlerdir.

Goswami ve ark. (2008) tarafından domates bitkisinde kök-ur nematodları ile mücadelede *Acremonium strictum* ve *Trichoderma harzianum* kullanılarak tarla denemelerinde köklerde urlanmanın azaldığını ortaya koymuşlardır. Mukhtar ve ark. (2013)'nin yaptıkları çalışmada, kök-ur nematodlarından *M. incognita*'ya karşı *Pasteuria penetrans*, *Pochnia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* ve *Trichoderma harzianum* bamya bitkisi kullanılarak denenmiş ve *P. lilacinus* ve *T. harzianum*'un etkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmada da *T. harzianum* (TD) uygulamaları kök-ur nematodu ile mücadelede başarılı bulunmuştur.

Kariuki ve Muhandra (2010), Nairobi (Kenya)'de fasulye bitkisinde zararlı nematodlara karşı Vydate® (Oxamyl), Sesamin EC® (Susam yağı) (1 L da⁻¹ ve 2 L da⁻¹ dozunda 7 gün ara ile 3 kez uygulama) ve Bionematon® (*Paecilomyces lilacinus*) (50 g 100 m⁻² dozunda 7 gün ara ile 3 kez uygulama)'u ayrı ayrı ve SesaminEC®'in 1 L da⁻¹ dozu ile Bionematon®'u kombine ederek uygulamışlardır. Çalışmanın sonucunda SesaminEC®'in 2 L da⁻¹ dozunun etkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada da benzer sonuçlar alınmış ve susam yağı (Nemax) (SY) uygulamaları kök-ur nematodu ile mücadelede başarılı bulunmuştur.

Sonuç olarak yürütülen bu çalışmada; Hint hardalı (H) yapılan tüm uygulamaların değerlendirilmesi sonucu kök-ur nematodlarının hıyar bitkilerinde oluşturduğu urları engelleme, topraktaki nematod sayısını azaltma daha az yumurta kümesi oluşumu, hıyar bitkisinin boyuna arttırıcı etki gösterme, bitki ve kök yaş ve kuru ağırlığına, yaprak ve meyve sayısını arttırmada olumlu etkileri bakımından uygulamalar içerisinde öne çıkmış, diğer bütün uygulamalara göre daha başarılı bulunmuştur. Daha sonra *Trichoderma harzianum* (TD) ve susam yağı (Nemax) (SY) uygulamaları kök-ur nematodu ile mücadelede değerlendirilen kriterlerde başarılı bulunmuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı (Tokat)'nda yüksek lisans tezi olarak yürütülmüş ve 20 Mart 2019 tarihinde kabul edilmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Anonim 2008. Zirai Mücadele Teknik Talimatları Cilt 6. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar Genel Müdürlüğü, 286 s., Ankara.
- Daykin ME, Hussey RS 1985. Staining and histopathological techniques in nematology. Pp. 39-48, KR Barker, GG Carter, JN Sasser (eds.), An advanced treatise on *Meloidogyne*. Vol. II. Methodology. North Carolina State University Graphics. Raleigh, Pp223.
- Goswami J, Pandey RK, Tewari JP, Goswami BK 2008. Management of root knot nematode in tomato through application of fungal antagonists *Acremonium strictum* and *Trichoderma harzianum*. Journal Environmental Science Health B, 43: 237-240.
- Hussey RS, Barker KR 1973. Comparison of methods of collecting inocula of *Meloidogyne* spp., including a new technique. U.S. Agricultural Research Service Crops Research Division, 57: 1025-1028.
- Hooper DJ 1986. Extraction of Free Living Stages from Soil. Pp. 5-30. In: Laboratory Methods for Work with Plant and Soil Nematodes, JF Southey (ed). Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- Kariuki GM, Muhandra R 2010. Efficacy trial of Sesamin EC as a potential nematicide for the management of common plant parasitic nematodes affecting vegetables in Kenya. (Unpublished) Nematicide Efficacy Trial Reports of Vick Agricare Consultancy Nairobi, Kenya. Pp. 10.
- Kepekci İ 2012. Nematoloji (Bitki Paraziti ve Entomopatojen Nematodlar) [Genel Nematoloji (Cilt-I) ISBN 978-605-4672-11-0, Taksonomik Nematoloji (Cilt-II) ISBN 978-605-4672-12-7] [Nematology (Plant parasitic and Entomopathogenic nematodes) (General

- Nematology, Volume-I) (Taxonomic Nematology, Volume-II) pp.1155.], Eğitim, Yayın ve Yayınlar Dairesi Başkanlığı, Tarım Bilim Serisi Yayın No: 3 (2012/3), LIV+1155 s.
- McLeod RW, Steel CC 1999. Effects of brassica-leaf manures and crops on activity and reproduction of *Meloidogyne javanica*. Nematology, 1: 613-624.
- Melakeberhan H 1997. Effect of temperature and nitrogen source on tomato genotypes response to *Meloidogyne incognita* infection. Fundamental and Applied Nematology, 20: 1-8.
- Mohammad AB, Eskandar Z, Saeid S, Mohammad J, Fariba M 2007. Evaluation of Sulfosulfuran for Broadleaved and Grass Weed Control in Wheat (*Triticum aestivum* L.) in Iran. Crop Protection, 26: 1385-1389.
- Mukhtar T, Arshad Hussain M, Zameer Kayani M 2013. Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamyosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. Phytopathologia Mediterranea, 52: 66-76.
- Nakasone KK, Peterson SW, Jong SC 2004. Preservation and Distribution of Fungal Cultures. GM Mueller, GF Bills, MS Foster (eds.) Biodiversity of fungi, Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press. Pp. 47-37.
- Sasser JN, Carter CC, Hartman KM 1984. Standardization of Host Suitability Studies and Reporting of Resistance to Root-Knot Nematodes. A Coop. Publ. of the Dep. of Plant Pathology and the U.S. Agency for Int. Development North Carolina State Uni. Raleigh. 7.
- Stirling GR, Stirling AM 2003. The potential of Brassica green manure crops for controlling root-knot nematode (*Meloidogyne javanica*) on horticultural crops in a subtropical environment. Australian Journal of Experimental Agriculture, 43: 623-630.
- Triantaphyllou AC 1981. Oogenesis and chromosomes of parthenogenetic root-knot nematodes *Meloidogyne incognita*, Journal Nematology, 13: 95-104.
- Yıldız Ş, Mamay M 2012. Şanlıurfa ili nar bahçelerinde bitki paraziti nematodların belirlenmesi. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 16: 19-23.
- Zeck WM 1971. Ein Bonitierungsschema zur Feldauswertung von Wurzelgallenbefall. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer, 24: 144-147.

Adıyaman İli Ticari Badem Bahçelerinde Badem İçkurdu (*Eurytoma amygdali* End.)' nun Pupa Gelişiminin ve Ergin Çıkış Zamanının Belirlenmesi

Öznur ÇAĞLAR^{1*}, Ali Arda IŞIKBER²

¹Sert Kabuklu Meyveler Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Adıyaman, ²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü, Kahramanmaraş

¹<https://orcid.org/0000-0002-1101-8666>, ²<https://orcid.org/0000-0003-1213-3532>

✉: oznur.caglar@tarimorman.gov.tr

ÖZET

Bu çalışmada; Adıyaman İlinde Besni (Merkez) ve Kahta (Tuğlu köyü ve Hacı Yusuf köyü) ilçelerinde bulunan badem bahçelerinde Badem İçkurdu (*Eurytoma amygdali* End. (Hymenoptera: Eurytomidae))'nün ergin çıkış zamanının ve pupa gelişme süresinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Badem İçkurdu'nun pupa gelişimini ve ergin çıkışlarını takip etmek amacıyla her bir badem bahçesinin farklı bölgelerinden badem ağaçları seçilmiş ve her bir ağacın güney, kuzey ve güney-batı yönlerinde bulunan dallara şifon dal kafesler yerleştirilerek içerine *E. amygdali* ile bulaşık mumyalanmış badem meyveleri konulmuştur. Çalışma sonucunda, üç farklı örnekleme yerindeki badem ağaçların farklı yönlerine (güneybatı, kuzey ve güney) yerleştirilen kafesler içerisinde bulunan *E. amygdali* ile bulaşık mumyalanmış badem meyveleri içerisindeki diyapozdaki larvaların ilk beyaz pupa ve ilk ergin çıkış tarihleri ve pupa ile ergin çıkış süreleri arasında istatistiksel olarak önemli farklılığın olmadığı görülmüştür ($P>0,05$). İlk beyaz pupa oluşumu Kahta ilçesi 1. bahçede (Tuğlu köyü), Kahta 2. bahçede (Hacıyusuf köyü) ve Besni ilçesindeki bahçede sırasıyla 26, 28 ve 26 Şubat'ta gerçekleşirken badem ağacı pembe çiçek tomurcuğu döneminde olduğu görülmüştür. İlk ergin çıkışı Kahta ilçesi 1., 2. bahçede ve Besni ilçesindeki bahçede sırasıyla 27, 27 ve 24 Mart'ta gerçekleşirken badem ağaçları çağla mercimek iriliği döneminde olduğu belirlenmiştir. Ergin çıkış süresi Kahta ilçesi 1., 2. bahçede ve Besni'deki bahçede sırasıyla 15, 15 ve 17 gün sürmüştür. Pupa süresi Kahta ilçesi 1., 2. bahçede ve Besni ilçesindeki bahçede sırasıyla 34, 33 ve 31 gün olarak kaydedilmiştir. Kahta ilçesi 2. bahçede ve Besni ilçesindeki bahçede ilk beyaz pupa görülme tarihiyle ilk ergin çıkışının görüldüğü tarihler arasında (28 Şubat-27 Mart 2018) günlük ortalama sıcaklık değerleri sırasıyla 12.88 ve 14.05 °C olarak tespit edilmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 10.02.2021

Kabul Tarihi : 25.03.2021

Anahtar Kelimeler

Eurytoma amygdali

Badem İçkurdu

Badem

Ergin çıkışı

Adıyaman

Determination of the Pupal Development and Timing of Adult Emergence of Almond Seed Wasp (*Eurytoma amygdali* End.) in Commercial Almond Orchards of Adıyaman Province

ABSTRACT

In this study, the timing of adult emergence and pupal development time of almond seed wasp (*Eurytoma amygdali* End. (Hymenoptera: Eurytomidae)) at Besni and Kahta district (Tuğlu and Hacıyusuf village) of Adıyaman Province was determined. In order to observe pupal development and adult emergence of *E. Amygdali*, three almond trees at each orchard site were randomly selected and chiffon branch cages in infested fruits from previous year were placed on their twigs on different directions (north, south and south-west). As a result of the study, there were no statistically significant differences between the times of first white pupal formation, the first adult emergence and pupal development time of the diapause larvae in the chiffon branch cages placed at three different directions (south-west, north and south) of the almond trees at three different orchard sites ($P>0.05$).

Research Article

Article History

Received : 10.02.2021

Accepted : 25.03.2021

Keywords

Eurytoma amygdali

Almond seed wasp

Almond

Adult emergence

Adıyaman

The first white pupa formation was observed in 1st orchard (Tuğlu village), 2nd orchard (Hacıyusuf village) of Kahta district and in the orchard of Besni district on February 26, 28 and 26 respectively, where the almond trees were at the pink flower bud period. The first adult emergence was observed in the 1st, 2nd orchard of Kahta district and in the orchard in Besni district on March 27, 27 and 24 respectively where almond trees were at young almond fruit stage with the size of a lentil. The adult emergence period lasted 15, 15 and 17 days in the 1st orchard, 2nd orchard of Kahta district and in the orchard in Besni district respectively. Pupal development time was determined as 34, 33 and 31 days in the 1st, 2nd orchard of Kahta district and the orchard in Besni district respectively. Between the dates of first white pupa formation and first adult emergence (28 February-27 March 2018) in 2nd orchard of Kahta district and orchard of Besni district, the average daily temperatures were determined as 12.88 and 14.05 °C, respectively.

Atıf İçin: Çağlar Ö, Işıkber AA 2021. Adıyaman İli Ticari Badem Bahçelerinde Badem İçkurdu (*Eurytoma amygdali* End.)'nin Pupa Gelişiminin ve Ergin Çıkış Zamanının Belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1279-1289. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.878080>.

To Cite: Çağlar Ö, Işıkber AA 2021. Determination of the Pupal Development and Timing of Adult Emergence of Almond Seed Wasp (*Eurytoma amygdali* End.) in Commercial Almond Orchards of Adıyaman Province. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1279-1289. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.878080>.

GİRİŞ

Dünyada badem üretimi çoğunlukla Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yoğunlaşmıştır. Dünya badem dikim alanlarının %61.63'ü Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde bulunmaktadır (FAO, 2018). Dünyada en fazla badem dikimi yapan ülkeler ise İspanya (544.518 ha), ABD (380.405 ha), Tunus (184.500 ha) ve Fas (165.817 ha)'tır. Bu ülkeleri 33 bin hektar ile Türkiye 7. sırada takip etmektedir (FAO, 2018). TÜİK (2018) verilerine göre, Adıyaman ili 5.843 hektar badem dikim alanı ile Türkiye'de ilk sırada yer almaktadır. Adıyaman ilinde badem ekim alanı sıralamasında Kahta ve Besni ilçeleri ön plana çıkmaktadır. Kahta ilçesi toplam dikim alanının % 48' lik kısmını ve Besni ilçesi ise % 21' lik dikim alanını oluşturmaktadır. Adıyaman ili ülkemizdeki toplam badem ekim alanlarının yaklaşık % 14' üne tekabül etmektedir. Adıyaman ili 2018 yılı ağaç başı verim ortalaması 10 kg' dır.

Badem İçkurdu, *Eurytoma amygdali* Enderlein (Hymenoptera: Eurytomidae), Yunanistan, Bulgaristan, Sırbistan, Kıbrıs, Türkiye, Lübnan, Suriye, Ürdün ve İsrail gibi Güneydoğu Avrupa'daki ve Ortadoğu'daki farklı ülkelerde badem ağaçlarında görülen önemli bir zararlıdır. Bu zararlı türün Fransa, Ermenistan, Azerbaycan ve Gürcistan'daki badem bahçelerinde de bulunduğu bildirilmiştir (Plaut, 1973, 1975; Zerova ve Fursov, 1991). Badem İçkurdu, Türkiye'de badem bahçelerinde önemli zarar oluştururken badem yetiştirilen tüm alanlarda görülmektedir (Nizamlıoğlu, 1962; Günaydın ve Ekici, 1969; Barut, 2007; Yeşilyaprak, 2015). Günaydın ve Ekici (1969), Elazığ, Mardin, Tunceli, Bingöl illerinde yürüttükleri çalışmalarda badem ağaçlarının ortalama % 51.4 Badem İçkurdu ile bulaşık olduğu, ağaç başına verim kaybının 5.75 kg olduğu ve bu

verimin % 48.8'ne denk geldiğini yıllık verim kaybının ekonomik değeri ise 2.016,000 ₺ olduğunu tespit etmişlerdir.

Badem İçkurdu, Türkiye'nin her yerinde yılda tek döl veren (univoltine) monofag bir zararlıdır. Kışı yere düşen bulaşık badem meyveleri içerisinde veya ağacın üzerinde mumyalaşmış bulaşık badem meyvelerinin içerisinde olgun larva döneminde geçirir. Türkiye'de bulaşık meyve içerisindeki kışı geçiren olgun larvalar baharda pupa olmaya başlarken bulaşık meyvelerden erginlerin çıkışı delik açarak bahar ortasında (Nisan) başlayıp erken baharın sonlarına (Mayıs) kadar devam ettiği görülmektedir (Barut, 2007; Yeşilyaprak, 2015). Ergin dişiler, ovipozitörlerini kullanarak genç badem meyvelerinin (çağla) ekzo ve mezokarpı (meyve eti) delerek endokarpın iç kısmına yumurta bırakırlar. Her dişinin 80 yumurta bıraktığı bilinmektedir (Özbek ve ark., 1998). Meyve etinin içerisindeki yumurtadan çıkan larva meyve özüne (embriyo) inerek meyvenin içini tamamen tahrip eder. Meyve özünü tamamen yiyen larvalar yazın sonunda olgun larva dönemine ulaştıktan sonra sonbaharda zarar görmüş meyve içerisinde kışı geçirmek üzere diyapoz girerler. Zarar görmüş meyveler ağaç üzerinde kalarak sağlam meyvelerden daha erken sararmakta, sonbahar ve kışın ağaç üzerinde kalarak siyahlaşmaktadır.

Badem İçkurdu'nun mücadelesine yönelik bir strateji geliştirilmesi, zararlının biyonomisi (biyolojisi ve ekolojisi) hakkında bilgi sağlayarak başarılıdır (Rozsypal ve ark., 2013). Bu zararlının gelişmesi ve hayatta kalması çevresel faktörlerle özellikle sıcaklıkla yakından ilişkilidir. Sıcaklık özellikle birinci ve ikinci (son) diyapoz larva dönemlerinin tamamlanması veya sonlandırılmasında önemli bir etkiye sahiptir (Tzanakakis ve ark., 1992, 1994).

Birinci diyapoz larva döneminin tamamlanması için ılıman sıcaklığa (19-20 °C) gereksinim duyarken ikinci (son) diyapoz larva dönemi ise daha düşük sıcaklığa (9-10 °C) ihtiyaç duymaktadır (Tzanakakis ve ark., 1991). Bu bağlamda bulaşık meyvelerdeki olgun larvaların diyapozu tamamlanarak ergin çıkış zamanlarının belirlenmesi kimyasal mücadelenin başarısında büyük öneme sahiptir.

Türkiye’de badem üreticilerinin Badem İçkurdu’nun kimyasal mücadelesinde çoğunlukla başarısız olduğu görülmektedir. Bunun en önemli sebebi zararlının farklı biyolojiye, ekolojiye ve zarar şekline sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Badem bahçelerinde olgun diyapoz larvaları içeren bir yıl önce bulaşık bademlerden bahar ayında ergin çıkış zamanlarının doğru olarak belirlenmesi kimyasal mücadelenin başarısında kritik öneme sahiptir. Bulaşık bademlerden ergin çıkışlarının başlamasına takiben ilaçlamanın yapılmaması veya geç ilaçlama yapılması erginlerin taze badem meyvesinin içerisine yumurta bırakılmasına imkan sağlamaktadır. Bu aşamadan sonra zararlının larva dönemi badem meyvesinin içerisinde gerçekleşirken bu zararlıya ruhsatlı insektisitlerin tümü deyme (kontakt) yoluyla etkiye sahip olması sebebiyle bundan sonra yapılacak ilaçlama zararlının kontrolünü imkansız hale getirmektedir. Bu durum Türkiye’de badem bahçelerinde Badem İçkurdu’ndan kaynaklanan önemli ekonomik verim kayıplarını beraberinde getirmektedir (Günaydın ve Ekici, 1969). Entegre Mücadele uygulamaları çerçevesinde Badem İçkurdu’nun mücadelesinin daha etkin bir şekilde yapılması için bahar aylarında ergin dişilere karşı kimyasallar en uygun zamanda uygulanması gerekmektedir. Ancak sıcaklığa bağlı olarak ergin çıkış zamanları ve dolayısıyla ilaçlama zamanları ve ilaçlama sayıları badem yetiştirilen bölgelere göre önemli farklılıklar göstermektedir. Bu çalışmada Adıyaman ilinde üç farklı badem bahçesinde ergin çıkış zamanlarının ve pupa gelişme sürelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Denemelerde kullanılan böcek materyali:

Çalışmanın böcek materyali Badem İçkurdu (*Eurytoma amygdali* Enderlein)’nun erginlerinden ve diğer dönemlerini (diyapozdaki larva, beyaz krem pupa (erken dönem pupa) ve siyah pupa (geç dönem pupa)) içeren bir yıl önceden (2017) kalan bulaşık badem meyvelerinden oluşmuştur. Bulaşık badem meyvelerinden oluşmuş bulaşık badem meyveleri Adıyaman ilinin Kahta ve Besni ilçelerindeki badem bahçelerinde hasattan sonra ağacın üzerinden veya toprak yüzeyinden toplanmıştır. Badem İçkurdu’nun ergin bireyleri ve pupaları bu bulaşık badem meyvelerinden elde edilmiştir.

Denemelerde kullanılan badem materyali

Ergin çıkış zamanının ve pupa gelişme süresinin belirlenmesi ile ilgili denemelerde kullanılan *E. amygdali* ile bulaşık mumyalaşmış bademler (*Prunus amygdalus* (L.) Batsch.) Adıyaman ilinde Kahta ve Besni ilçelerinde yaygın olarak üretimi yapılan Ferragnes ve Ferraduel badem çeşitlerinden toplanarak elde edilmiştir.

Denemede kullanılan kafesler:

Badem İçkurdu’nun ergin çıkışlarını takip etmek amacıyla 50X60X60 cm (en - yükseklik - boy) boyutlarında alt tarafı sunta, etrafı tül ve sinek teliyle kaplı böcek kültür kafesleri kullanılmıştır. Ağaç yönünün ergin çıkış zamanına ve pupa gelişimine etkisini belirlemek için badem ağacının dallarında şifon dal kafesler kullanılmıştır. Şifon dal kafesler, 30 cm çaplı 2 adet paslanmaz çelik tele geçirilerek silindirik bir şekilde 110 cm uzunluğunda ve tellerin etrafı tamamen tülardan oluşmuştur.

Sıcaklık kayıt edici cihaz:

Badem İçkurdu’nun pupa gelişiminin ve ergin çıkış zamanının belirlendiği badem bahçelerinde ortamın hava sıcaklığını kayıt etmek için Hobo Onset dış mekan sıcaklık/Nem kaydedici Datalogger (Hobo U12-013 Sıcaklık/Nispi nem Dış Mekan Data Logger, Onset Computer Corporation, Bourne, MA) kullanılmıştır.

Metot

Badem içkurdu’nun pupa gelişiminin ve ergin çıkış zamanının belirlenmesi:

Badem İçkurdu’nun pupa gelişimi ve ergin çıkış zamanının belirlenmesine yönelik çalışmalar 2018 yılında Adıyaman İlinde bulunan üç farklı badem bahçelerinde yürütülmüştür. Badem bahçeleri Adıyaman İlini temsil edecek şekilde Kahta ilçesinden iki ve Besni ilçesinden bir bahçe olmak üzere belirlenmiştir. Kahta ilçesindeki birinci badem bahçesi (Tuğlu Köyü) 800 dekar 5-7 yaşında Ferragnes ve Ferraduel badem çeşitlerinden, Kahta ilçesindeki ikinci badem bahçesi (Hacıyusuf köyü) 130 dekar 5-6 yaşında Ferragnes ve Ferraduel badem çeşitlerinden ve Besni ilçesindeki üçüncü badem bahçesi (Konuklu köyü) 100 dekar 10-11 yaşında Ferragnes ve Ferraduel badem çeşitlerinden oluşmaktadır. Tüm bahçeler damlama sulama sistemi ile sulanmaktadır. Adıyaman İlinin Kahta ve Besni ilçelerindeki badem bahçelerinden bir yıl önce badem içkurdu ile bulaşık olduğu tahmin edilen badem meyveleri toplanmıştır. Badem İçkurdu’nun ergin çıkışlarını ve pupa gelişimini takip etmek amacıyla her bir badem bahçesinden rastgele 3 badem ağacı seçilmiştir. Her bir ağacın güney, kuzey ve güney-batı yönlerinde bulunan dallara şifon dal kafesler yerleştirilmiştir. Her deneme bahçesinde toplam 3 ağaçta 9 adet şifon

dal kafes kullanılmıştır. Bu dal kafeslerin her birinin içerisine bir yıl önce Badem İçkurdu ile bulaşık 200 adet mumyalaşmış badem meyveleri konulmuş ve ağızları kalın ip ile kapatılmıştır. Böylece her badem ağacına üç farklı yöndeki dalına toplam 600 adet bulaşık badem meyvesi yerleştirilmiştir. Her badem bahçesinde 3 badem ağacında, her ağaçta 600 adet toplamda 5.400 adet badem içkurdu ile bulaşık mumyalaşmış meyve yerleştirilmiştir. Dal kafesler içerisinde mumyalaşmış bademlerin içerisindeki badem içkurdunun diyapoz larvalarının pupa olma durumu ve ergin çıkışları mart ayına kadar iki haftada bir kez, mart ayından sonra haftada bir kez kontrol edilmiş ve pupa durumu ile çıkan ergin sayıları kayıt edilmiştir. Bulaşık badem meyvelerinden pupa oluşumu ve erginlerin çıkış dönemi ile ağacın fenolojisi arasında ilişki olup olmadığını araştırmak için ağacın fenolojik dönemleri (çiçek tomurcuğu, çiçeklenme başlangıcı ve sonu, genç meyve oluşum dönemi, meyve gelişme dönemleri) de kayıt edilmiştir. Denemelerin yürütüldüğü Kahta 2. Bahçe (Hacıyusuf köyü) ve Besni ilçesindeki ticari badem bahçesine 01 Şubat 2018 tarihinde itibaren birer adet HOB0 sıcaklık/nem Datalogger yerleştirilmiş ve birer saat aralıklarla günlük sıcaklık değerlerini kaydedecek şekilde ayarlanmıştır. HOB0'ların kaydedeceği iklim verileri bilgisayar ortamına aktarılarak, her güne ait en yüksek ve en düşük sıcaklık değerleri kullanılmak suretiyle, günlük ortalama sıcaklık değerleri hesaplanmıştır.

Verilerin değerlendirilmesi ve istatistiksel analizler

Her sayımda her şifon dal kafeste bulunan bir yıl önce bulaşık meyvelerdeki diyapoz larvaların krem beyaz pupa ve siyah pupa olma oranları ve ergin çıkış oranları hesaplanmıştır. Meyvelerdeki krem beyaz pupa (erken dönem pupa) ve siyah pupa (geç dönem pupa) olma oranları ve ergin çıkış oranları çıkış olan meyve sayısının toplam bulaşık meyve sayısına bölünüp 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır. Böylece gözlem yapılan her badem bahçesi ve her sayım tarihi için krem beyaz pupa, siyah pupa olma oranları ve ergin çıkış oranları belirlenmiştir. Üç bahçedeki her gözlem tarihinde ağaçların farklı yönlerine yerleştirilen mumyalaşmış badem meyvelerindeki diyapoz larvaların krem beyaz pupa, siyah pupa olma oranlarına ve ergin çıkış oranlarına ayrı ayrı Arcsin transformasyonu uygulandıktan sonra SAS 9 (SAS Ins. 2009) istatistik programı kullanılarak tek yönlü varyans analizine (ANOVA) tabi tutulmuştur. Krem beyaz pupa, siyah pupa olma oranlarına ve ergin çıkış oranlarına ait ortalamalar arasındaki farklılıklar % 5 önem seviyesinde Tukey testi kullanılarak belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Yapılan varyans analizi sonucunda çalışmanın

yürütüldüğü üç badem bahçesinde tüm gözlem sürelerinde ağacın farklı yönlerine yerleştirilen kafesler içerisinde bulunan *E. amygdali* ile bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerdeki diyapoz larva, krem beyaz pupa, siyah pupa ve ergin olma oranları arasında istatistiksel olarak önemli farkın olmadığı görülmüştür ($P>0.05$, Çizelge 1, 2, 3). Bu sonuçlar aynı ağacın farklı yönlerine (Güneybatı, kuzey ve güney) yerleştirilen *E. amygdali* ile bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerde diyapoz larva, pupa gelişimine ve ergin oluşumuna önemli etkiye sahip olmadığını göstermiştir.

İlk gözlem tarihi 12-14 Şubat'ta çalışmanın yürütüldüğü üç badem bahçesinde de badem ağaçları çiçek tomurcuğu döneminde olduğu ve kontrol edilen bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerin tümünde (%100) diyapoz larvaların olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1, 2, 3). Badem ağaçlarının pembe çiçek tomurcuğu dönemindeki 26-28 Şubat tarihinde Tuğlu köyü (Kahta), Hacıyusuf köyü (Kahta) ve Besni'deki badem bahçelerinde diyapoz larvaların büyük oranda (sırasıyla %74, %63.9 ve %70.4) krem beyaz pupaya dönmeye başladığı tespit edilmiştir. Çiçek açma başlangıç dönemindeki 8 Mart'taki sayımda Tuğlu köyündeki (Kahta) badem bahçesinde diyapoz larvaların tamamen (%100) krem beyaz pupaya döndüğü gözlenirken (Çizelge 1) Hacıyusuf köyü (Kahta) ve Besni'deki badem bahçelerinde ise sırasıyla diyapoz larvaların %97.2 ve %74'nin krem beyaz pupaya döndüğü görülmüştür (Çizelge 2, 3). Çalışmanın yürütüldüğü üç badem bahçesinde de krem beyaz pupalardan ilk siyah pupaların oluşumu 14-16 Mart'ta gerçekleşirken bu tarihte badem ağaçları %20-%70 çiçek açma döneminde olduğu görülmüştür.

Eurytoma amygdali ile bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerde ilk ergin çıkışları çalışmanın yürütüldüğü üç badem bahçesinde 24-27 Mart'ta gözlenmiştir. İlk ergin çıkışları badem ağacının mercimek iriliğindeki çağla dönemine denk geldiği gözlenmiştir. Bu tarihte Tuğlu köyü (Kahta), Hacıyusuf köyü (Kahta) ve Besni'deki badem bahçelerinde bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerin sırasıyla %72.2', %77.8 ve %12.9'unda ergin çıkışları gerçekleşmiştir (Çizelge 1, 2, 3). Çağlalar nohut iriliğine ulaştığı 3 Nisan'daki gözlemlerde Tuğlu köyü (Kahta), Hacıyusuf köyü (Kahta) ve Besni'deki badem bahçelerinde bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerinden ergin çıkış oranlarının sırasıyla %90.7, %86.1 ve %94.4'e yükseldiği görülmüştür. 11 Nisan'da ise bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerin tümünde (%100) ergin çıkışları tamamlanırken çağlalar beklenen meyve büyüklüğüne ulaşmıştır. Bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerinden ergin çıkışları 15-17 gün sürmüştür. Genellikle bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerinden ilk çıkış yapan erginlerin erkek bireyler olduğu görülmüştür.

Çizelge 1. Adıyaman ilinin Kahta ilçesindeki (Tuğlu köyü) birinci ticari badem bahçesinde belli gözlem sürelerinde badem ağaçlarının farklı yönlerine yerleştirilmiş kafesler içerisinde bulunan *Eurytoma amygdali* ile bulaşık mumyalaşmış badem meyveler içerisinde diyapoz larva, krem beyaz pupa, siyah pupa ve ergin olma oranları

Table 1. The rates of diapause larva, cream white pupa, black pupa and adult emergence in mummified almond fruits infested by *Eurytoma amygdali* in the cages placed in different directions of almond trees at certain observation periods at the first commercial almond orchard in Kahta district (Tuğlu village) in Adıyaman province

Gözlem tarihi (Observation date)	Ağacın yönü (Direction of tree)	Böcek döneminin oranı (Rate of insect stage) (%)				Ağacın Fenolojisi (Phenology of tree)
		Diyapozdaki larva (Diapause larva)	Krem beyaz pupa (Cream white pupa)	Siyah Pupa (Black pupa)	Ergin (Adult)	
12 Şubat (February) 2018	Güneybatı (South-West)	100±0	0±0	0±0	0±0	Çiçek Tomurcuk Dönemi (Flower bud stage)
	Güney (South)	100±0	0±0	0±0	0±0	
	Kuzey (North)	100±0	0±0	0±0	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	-	-	
26 Şubat (February) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0 A	100±0 A	0±0	0±0	Pembe Çiçek Tomurcuk Dönemi (Pink flower bud stage)
	Güney (South)	16.67±16.67 A	83.33±16.67 A	0±0	0±0	
	Kuzey (North)	11.1±11.1 A	88.87±11.13 A	0±0	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	F _{2,6} = 0.54 P=0.610	F _{2,6} = 0.54 P=0.610	-	-	
8 Mart (March) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	100±0	0±0	0±0	Çiçek Açma Başlangıç Dönemi (Beginning of flowering stage)
	Güney (South)	0±0	100±0	0±0	0±0	
	Kuzey (North)	0±0	100±0	0±0	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	-	-	
14 Mart (March) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	91.67± 8.33 A	8.33±8.33 A	0±0	%20 Çiçek Açma Dönemi (20% Blooming stage)
	Güney (South)	0±0	83.33±16.67 A	16.67±16.67A	0±0	
	Kuzey (North)	0±0	91.67± 8.33 A	8.33±8.33 A	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	F _{2,6} = 3.39 P=0.104	F _{2,6} = 3.39 P=0.104	-	
27 Mart (March) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	0±0	27.77±14.69 A	72.2±14.70A	Çağla Mercimek İriliği Dönemi (Young almond fruit stage with the size of a lentil)
	Güney (South)	0±0	0±0	25.0±14.43 A	75.0±14.43A	
	Kuzey (North)	0±0	0±0	30.53±19.42 A	69.43±19.45A	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	F _{2,6} = 0.03 P=0.972	F _{2,6} = 0.03 P=0.972	
03 Nisan (April) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	0±0	16.67±8.33 A	83.33±8.33 A	Çağla Nohut İriliği Dönemi (Young almond fruit stage with the size of a chickpea)
	Güney (South)	0±0	0±0	8.33±8.33 A	91.67±8.33 A	
	Kuzey (North)	0±0	0±0	16.67±16.67 A	83.33±16.67A	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	F _{2,6} = 0.17 P=0.815	F _{2,6} = 0.17 P=0.815	
11 Nisan (April) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	0±0	0±0	100±0	Çağla Dönemi (Developed almond fruit stage)
	Güney (South)	0±0	0±0	0±0	100±0	
	Kuzey (North)	0±0	0±0	0±0	100±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	-	-	

*Verilere tek yönlü varyans analizi (ANAVO) uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Tukey testine göre ortaya konmuştur. Aynı sütunda benzer harfler ile gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

Çizelge 2. Adıyaman ilinin Kahta ilçesindeki (Hacıyusuf köyü) ikinci ticari badem bahçesinde belli gözlem sürelerinde badem ağaçlarının farklı yönlerine yerleştirilmiş kafesler içerisinde bulunan *Eurytoma amygdali* ile bulaşık mumyalanmış badem meyveler içerisinde diyapoz larva, krem beyaz pupa, siyah pupa ve ergin olma oranlar

Table 2. The rates of diapause larva, cream white pupa, black pupa and adult emergence in mummified almond fruits infested by *Eurytoma amygdali* in the cages placed in different directions of almond trees at certain observation periods at the second commercial almond orchard in Kahta district (Hacıyusuf village) in Adıyaman province

Gözlem tarihi (Observation date)	Ağacın yönü (Direction of tree)	Böcek döneminin oranı (Rate of insect stage) (%)				Ağacın fenolojisi (Phenology of tree)
		Diyapozdaki larva (Diapause larva)	Krem beyaz pupa (Cream white pupa)	Siyah pupa (Black pupa)	Ergin (Adult)	
14 Şubat (February) 2018	Güneybatı (South-West)	100±0	0±0	0±0	0±0	Çiçek Tomurcuk Dönemi (Flower bud stage)
	Güney (South)	100±0	0±0	0±0	0±0	
	Kuzey (North)	100±0	0±0	0±0	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	-	-	
28 Şubat (February) 2018	Güneybatı (South-West)	22.2±7.84 A	77.73±11.13 A	0±0	0±0	Pembe Çiçek Tomurcuk Dönemi (Pink flower bud stage)
	Güney (South)	44.43±3.94 A	55.53±5.53 A	0±0	0±0	
	Kuzey (North)	11.1±7.85 A	88.87±11.13 A	0±0	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	F _{2,6} = 3.12 P=0.118	F _{2,6} = 3.12 P=0.118	-	-	
8 Mart (March) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0 A	100±0 A	0±0	0±0	Çiçek Açma Başlangıç Dönemi (Beginning of flowering stage)
	Güney (South)	8.33±8.33 A	91.67±8.33 A	0±0	0±0	
	Kuzey (North)	0±0 A	100±0 A	0±0	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	F _{2,6} = 1 P=0.422	F _{2,6} = 1 P=0.422	-	-	
16 Mart (March) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	100±0 A	0±0 A	0±0	%20 Çiçek Açma Dönemi (20% Blooming stage)
	Güney (South)	0±0	91.67±8.33 A	8.33±8.33 A	0±0	
	Kuzey (North)	0±0	100±0 A	0±0 A	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	F _{2,6} = 1 P=0.422	F _{2,6} = 1 P=0.422	-	
27 Mart (March) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	0±0	25.0±0.0 A	75.0±0.0 A	Çağla Mercimek İriliği Dönemi (Young almond fruit with the size of a lentil period)
	Güney (South)	0±0	0±0	25.0±14.43A	75.0±14.43A	
	Kuzey (North)	0±0	0±0	16.67±16.67 A	83.33±16.67A	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	F _{2,6} = 0,14 P=0.870	F _{2,6} = 0,14 P=0.870	
03 Nisan (April) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	0±0	16.67±8.33 A	83.33±8.33 A	Çağla Nohut İriliği Dönemi (Young almond fruit with the size of a chickpea period)
	Güney (South)	0±0	0±0	0±0 A	100±0 A	
	Kuzey (North)	0±0	0±0	11.13±11.13 A	88.87±11.13A	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	F _{2,6} = 1.12 P=0.386	F _{2,6} = 1.12 P=0.386	
11 Nisan (April) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	0±0	0±0	100±0	Çağla Dönemi (Developed almond fruit stage)
	Güney (South)	0±0	0±0	0±0	100±0	
	Kuzey (North)	0±0	0±0	0±0	100±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	-	-	

*Verilere tek yönlü varyans analizi (ANAVO) uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Tukey testine göre ortaya konmuştur. Aynı sütunda benzer harfler ile gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

Kahta ilçesi 2. bahçede ve Besni'deki bahçede ilk beyaz pupa oluşumunun görüldüğü 14-28 Şubat tarihleri arasında günlük ortalama sıcaklık değerleri sırasıyla 8.64 ve 9.33 °C olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4). İlk siyah pupa oluşumu Kahta ilçesi 1., 2. bahçede ve Besni'deki bahçede sırasıyla 14, 16 ve 16 Mart'ta

gerçekleşirken badem ağacı %20, %70 ve %70 çiçek açma döneminde olduğu belirlenmiştir. Kahta ilçesi 2. bahçede ve Besni'deki bahçede ilk siyah pupa oluşumunun görüldüğü 08-16 Mart tarihleri arasında günlük ortalama sıcaklık değerleri sırasıyla 12.6 ve 14.26 °C olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 3. Adıyaman ilinin Besni ilçesindeki ticari badem bahçesinde belli gözlem sürelerinde badem ağaçlarının farklı yönlerine yerleştirilmiş kafesler içerisinde bulunan *Eurytoma amygdali* ile bulaşık mummulaşmış badem meyveler içerisinde diyapoz larva, krem beyaz pupa, siyah pupa ve ergin olma oranlar

Table 3. The rates of diapause larva, cream white pupa, black pupa and adult emergence in mummified almond fruits infested by *Eurytoma amygdali* in the cages placed in different directions of almond trees at certain observation periods at the commercial almond orchard in Besni district in Adıyaman province

Gözlem tarihi (Observation date)	Ağacın yönü (Direction of tree)	Böcek döneminin oranı (Rate of insect stage) (%)				Ağacın fenolojisi (Phenology of tree)
		Diyapozdaki larva (Diapause larva)	Krem beyaz pupa (Cream white pupa)	Siyah Pupa (Black pupa)	Ergin (Adult)	
14 Şubat (February) 2018	Güneybatı (South-West)	100±0	0±0	0±0	0±0	Çiçek Tomurcuk Dönemi (Flower bud stage)
	Güney (South)	100±0	0±0	0±0	0±0	
	Kuzey (North)	100±0	0±0	0±0	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	-	-	
26 Şubat (February) 2018	Güneybatı (South-West)	19.43±10.01 A	80.53±10.03 A	0±0	0±0	Pembe Çiçek Tomurcuk Dönemi (Pink flower bud stage)
	Güney (South)	36.1±7.35 A	63.87±7.35 A	0±0	0±0	
	Kuzey (North)	33.3±0 A	66.6±0 A	0±0	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	F _{2,6} = 1.55 P=0.287	F _{2,6} = 1.55 P=0.287	-	-	
8 Mart (March) 2018	Güneybatı (South-West)	19.43±10.01 A	80.53±10.03 A	0±0	0±0	Çiçek Açma Başlangıç Dönemi (Beginning of flowering stage)
	Güney (South)	27.77±2.77 A	72.20±2.80 A	0±0	0±0	
	Kuzey (North)	30.53±2.77 A	69.40±2.80 A	0±0	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	F _{2,6} = 0.87 P=0.467	F _{2,6} = 0.87 P=0.467	-	-	
16 Mart (March) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	63.86±7.35 A	36.10±7.35 A	0±0	%20 Çiçek Açma Dönemi (20% Blooming stage)
	Güney (South)	0±0	77.73±11.13 A	22.20±11.1 A	0±0	
	Kuzey (North)	0±0	83.33±11.67 A	16.67±16.67 A	0±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	F _{2,6} = 0.66 P=0.550	F _{2,6} = 0.66 P=0.550	-	
24 Mart (March) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	8.33±8.33 A	75.0±14.43 A	16.67±16.67 A	Çağla Mercimek İriliği Dönemi (Young almond fruit with the size of a lentil period)
	Güney (South)	0±0	0±0 A	88.87±11.13 A	11.11±11.11 A	
	Kuzey (North)	0±0	8.33±8.33 A	80.53±10.03 A	11.11±11.11 A	
	F ve P değeri* (F and P value)	0±0	F _{2,6} = 0.50 P=0.630	F _{2,6} = 0.34 P=0.726	F _{2,6} = 0.06 P=0.943	
03 Nisan (April) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	0±0	8.33±8.33 A	91.67±8.33 A	Çağla Nohut İriliği Dönemi (Young almond fruit with the size of a chickpea period)
	Güney (South)	0±0	0±0	8.33±8.33 A	91.67±8.33 A	
	Kuzey (North)	0±0	0±0	0±0 A	100±0 A	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	F _{2,6} = 0.50 P=0.630	F _{2,6} = 0.50 P=0.630	
11 Nisan (April) 2018	Güneybatı (South-West)	0±0	0±0	0±0	100±0	Çağla Dönemi (Developed almond fruit stage)
	Güney (South)	0±0	0±0	0±0	100±0	
	Kuzey (North)	0±0	0±0	0±0	100±0	
	F ve P değeri* (F and P value)	-	-	-	-	

*Verilere tek yönlü varyans analizi (ANAVO) uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar %5 önem seviyesinde Tukey testine göre ortaya konmuştur. Aynı sütunda benzer harfler ile gösterilen ortalamalar arasında istatistiksel olarak fark yoktur.

İlk ergin çıkışı Kahta ilçesi 1., 2. bahçede ve Besni'deki bahçede sırasıyla 27, 27 ve 24 Mart'ta gerçekleşirken badem ağacı çağa mercimek iriliği döneminde olduğu görülmüştür. Kahta ilçesi 2. bahçede ve Besni'deki bahçede ilk ergin çıkışının görüldüğü 16-27 Mart tarihleri arasında günlük ortalama sıcaklık değerleri sırasıyla 14.93 ve 16.51 °C olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4). Ergin çıkış süresi Kahta ilçesi 1., 2. bahçede ve Besni'deki bahçede sırasıyla 15, 15 ve 17 gün sürmüştür. Pupa süresi Kahta ilçesi 1., 2. bahçede ve Besni'deki bahçede sırasıyla 34, 33 ve 31 gün olarak belirlenmiştir. Kahta ilçesi 2. bahçede ve Besni'deki bahçede ilk beyaz pupa görülme tarihiyle ilk ergin çıkışının (pupa açılışının) görüldüğü tarihler arasında

(Kahta ilçesi ikinci bahçe için 28 Şubat-27 Mart ve Besni'deki bahçe için 26 Şubat-24 Mart) günlük ortalama sıcaklık değerleri sırasıyla 12.88 ve 14.05 °C olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar üç farklı lokasyondaki badem ağaçlarına yerleştirilen kafesler içerisinde bulunan *E. amygdali* ile bulaşık mumyalaşmış badem meyveler içerisindeki diyapoz larvaların ilk beyaz pupa, ilk siyah pupa olma ve ilk ergin çıkış tarihleri ve pupa ile ergin çıkış süreleri arasında büyük farklılığın olmadığı görülmüştür. İlk beyaz pupa oluşumu Kahta ilçesi 1., 2. bahçede ve Besni'deki bahçede sırasıyla 26, 28 ve 26 Şubat'ta gerçekleşirken badem ağacı pembe çiçek tomurcuğu döneminde olduğu görülmüştür (Çizelge 5).

Çizelge 4. Adıyaman ili Kahta 2. Bahçe (Hacıyusuf köyü) ve Besni ilçesindeki ticari badem bahçesinde her gözlem tarihi aralığındaki günlük ortalama sıcaklık ve maksimum- minimum sıcaklık değerleri

Table 4. Daily average temperature and maximum-minimum temperature values in each observation date interval in the commercial almond orchard at Kahta (Hacıyusuf village) and Besni district in Adıyaman province

Gözlem tarihi (Observation date)	Bahçe lokasyonu (Orchard location)			
	Kahta 2. Bahçe (Hacıyusuf Köyü)		Besni	
	Günlük ortalama sıcaklık (Daily mean temperature) (°C) ± S.hata	Maksimum (Maximum)- Minimum sıcaklık (Minimum temperature) (°C)	Günlük ortalama sıcaklık (Daily mean temperature) (°C) ± S.hata	Maksimum (Maximum)- Minimum sıcaklık (Minimum temperature) (°C)
01-14 Şubat (February) 2018	9.04±0.33	1.17-19.04	9.56±0.33	-1.06-23.63
14-28 Şubat (February) 2018	8.64±0.29	2.39-19.31	9.33±0.43	1.17-24.79
28 Şubat (February) – 08 Mart (March) 2018	11.12±0.83	3.31-21.71	11.39±0.74	2.89-25.17
08-16 Mart (March) 2018	12.60±0.41	5.4-24.79	14.26±0.48	4.15-29.5
16-27 Mart (March) 2018	14.93±0.61	4.99-27.91	16.51±0.34	7.03-29.9
27 Mart (March)- 03 Nisan (April) 2018	15.51±0.47	5.4-27.91	16.16±0.31	5.4-30.31
03-11 Nisan (April) 2018	17.44±0.88	5.4-33.59	18.77±0.69	3.74-34.85

Çizelge 5. Adıyaman ilinde üç farklı lokasyondaki badem bahçesinde badem ağaçlarına yerleştirilen kafesler içerisinde bulunan *Eurytoma amygdali* ile bulaşık mumyalaşmış badem meyveler içerisindeki diyapoz larvaların ilk beyaz pupa, ilk siyah pupa olma ve ilk ergin çıkış tarihleri ve pupa ile ergin çıkış süreleri

Table 5. The dates of the first white pupa, the first black pupa, the first adult emergence and the time of pupa and adult emergence of diapause larvae inside mummified almond fruits infested by *Eurytoma amygdali*, in cages placed on almond trees at three different locations of Adıyaman province

Bahçe lokasyonu (Orchard location)	İlk beyaz pupa tarihi (Date of first white pupa)	Ağacın fenolojik dönemi (Phenology of the tree)	İlk siyah pupa tarihi (Date of first black pupa formation)	Ağacın fenolojik dönemi (Phenology of the tree)	İlk ergin çıkış tarihi (Date of first adult emergence)	Ağacın fenolojik dönemi (Phenology of the tree)	Pupa süresi (Pupal period) (gün) (day)	Ergin çıkış süresi (Period of adult)
Kahta 1. Bahçe	26 Şubat 2018	Pembe çiçek tomurcuk	14 Mart 2018	%20 çiçek açımı	27 Mart 2018	Çağla mercimek iriliği	34	15
Kahta 2. Bahçe	28 Şubat 2018	Pembe çiçek tomurcuk	16 Mart 2018	%70 çiçek açımı	27 Mart 2018	Çağla mercimek iriliği	33	15
Besni	26 Şubat 2018	Pembe çiçek tomurcuk	16 Mart 2018	%70 çiçek açımı	24 Mart 2018	Çağla mercimek iriliği	31	17

SONUÇ ve ÖNERİLER

Denemelerin yürütüldüğü Adıyaman iline Besni ilçesinde bir ve Kahta ilçesinde iki toplamda üç badem bahçesinde tüm gözlem sürelerinde ağacın farklı yönlerine yerleştirilen kafesler içerisinde bulunan *E.*

amygdali ile bulaşık mumyalaşmış badem meyvelerdeki diyapoz larva, krem beyaz pupa, siyah pupa ve ergin olma oranları arasında istatistiksel olarak önemli farkın olmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar aynı ağacın farklı yönlerine (güneybatı, kuzey

ve güney) yerleştirilen *E. amygdali* ile bulaşık mummylaşmış badem meyvelerde diyapoz larva, pupa gelişimine ve ergin oluşuma önemli etkiye sahip olmadığını göstermiştir.

Denemelerin yürütüldüğü üç bahçede de 12-14 Şubat tarihine kadar *E. amygdali* ile bulaşık mummylaşmış badem meyvelerin tümünde diyapoz larvaların bulunduğu görülürken ilk pupa oluşumu 26-28 Şubat tarihinde, badem ağaçlarının pembe çiçek tomurcuğu döneminde gerçekleşmiştir. 6-8 Mart tarihinde badem ağaçları çiçek açma dönemine ulaştığında bulaşık mummylaşmış badem meyvelerinde ilk siyah pupalar görülmüştür. *Eurytoma amygdali* ile bulaşık mummylaşmış badem meyvelerde ilk ergin çıkışları 24-27 Mart'ta gözlenmiştir. İlk ergin çıkışları badem ağacının mercimek iriliğindeki çağla dönemine denk geldiği tespit edilmiştir. 11 Nisan'da ise bulaşık mummylaşmış badem meyvelerin tümünde (%100) ergin çıkışları tamamlanırken çağlalar beklenen meyve büyüklüğüne ulaşmıştır. Bulaşık mummylaşmış badem meyvelerinden ergin çıkışları yaklaşık 15-17 gün sürmüştür. Katsoyannos ve ark. (1992), 1986-1989 tarihleri arasındaki 4 yıl süresince Yunanistan'ın Selanik Bölgesi'nde yürüttükleri çalışmada, Retsou badem çeşidindeki zarar görmüş bademlerden ergin çıkışını tespit etmişlerdir. 4 yıllık çalışmanın başlangıcından itibaren yakalanan erginlerin ilk olarak 13-24 Nisan tarihleri arasında ortaya çıktığı ve maksimum seviyeye 17 Nisan-11 Mayıs tarihleri arasında ulaştığını belirlemişlerdir. Ergin çıkış zamanının mevcut çalışmada daha geç dönemde olması iklimsel farklılık veya badem çeşidi farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Türkiye'de Kahramanmaraş ilindeki 2005 yılında badem bahçesinde yürütülen çalışmalarda ilk ergin çıkışlarının çağlalar yaklaşık 7-8 mm büyüklüğe ulaştığında, 15 Nisan'da gerçekleştiğini ilk ergin çıkışını takiben 5 gün sonra ergin çıkışı en üst düzeye ulaştığı ve ergin çıkışlarının 19 Mayıs'ta tamamlandığı bildirilmiştir (Barut, 2007). Yeşilyaprak (2015), 2014-2015 yıllarında, Şanlıurfa ilinin Bozova (Ürünli), Merkez (İlhan) ve Karaköprü (Çıralı) ilçelerindeki badem bahçelerinde yürütülen çalışmada *E. amygdali*'nin ilk ergin çıkışı nisanın ikinci haftasında gerçekleştiğini ve en yüksek ergin çıkışının nisanın üçüncü haftasında ve son ergin çıkışının mayısın üçüncü haftasında olduğunu belirlemiştir. Ergin çıkış zamanının mevcut çalışmada daha geç dönemde olması iklimsel farklılık veya badem çeşidi farklılığından kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.

Üç farklı lokasyondaki badem ağaçlarına yerleştirilen kafesler içerisinde bulunan *E. amygdali* ile bulaşık mummylaşmış badem meyvelerindeki diyapoz larvaların ilk beyaz pupa ve ilk ergin çıkış tarihleri ve pupa ile ergin çıkış süreleri arasında büyük farklılık olmadığı görülmüştür. İlk beyaz pupa oluşumu Kahta ilçesi 1. bahçede (Tuğlu köyü), Kahta 2. bahçede

(Hacıyusuf köyü) ve Besni ilçesindeki bahçede sırasıyla 26, 28 ve 26 Şubat'ta gerçekleşirken badem ağaçlarının pembe çiçek tomurcuğu döneminde olduğu görülmüştür. İlk ergin çıkışı Kahta ilçesi 1. bahçede (Tuğlu köyü), Kahta 2. bahçede (Hacıyusuf köyü) ve Besni ilçesindeki bahçede sırasıyla 27, 27 ve 24 Mart'ta gerçekleşirken badem ağaçlarının çağla mercimek iriliği döneminde olduğu görülmüştür. Ergin çıkış süresi Kahta ilçesi 1. bahçede (Tuğlu köyü), Kahta 2. bahçede (Hacıyusuf köyü) ve Besni ilçesindeki bahçede sırasıyla 15, 15 ve 17 gün sürmüştür. Kahta ilçesi 2. bahçede ilk beyaz pupa oluşumunu ve ilk ergin çıkışının Besni'deki bahçeye göre 2-3 gün geç olduğu görülmüştür. Bunun en önemli sebebinin bu iki lokasyondaki sıcaklık değerlerindeki farklılıktan olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Kahta ilçesi 2. Bahçedeki gözlem tarihleri aralığında günlük ortalama sıcak değerlerinin Besni ilçesindeki bahçeye göre 1-1.5 °C daha düşük olduğu görülmüştür. Pupa süresi Kahta ilçesi 1. bahçede (Tuğlu köyü), Kahta 2. bahçede (Hacıyusuf köyü) ve Besni ilçesindeki bahçede sırasıyla 34, 33 ve 31 gün olarak belirlenmiştir. Besni ilçesindeki bahçede pupa gelişme süresinin Kahta 2. bahçeye (Hacıyusuf köyü) göre 2-3 gün daha kısa olması Besni ilçesindeki bahçede günlük ortalama sıcaklık değerlerinin 1-1.5 °C daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İbrahim (2008) tarla koşullarında pupa gelişimini 35.9 günde tamamladığını bildirmiştir. Bu çalışmadaki pupa gelişme süresinin mevcut çalışmamızdaki pupa gelişme sürelerinden 2-5 gün daha uzun olması yine sıcaklık değerlerindeki farklılıktan kaynaklanmış olabileceği söylenebilir.

Sonuç olarak bu çalışmada Adıyaman ilinde farklı lokasyondaki badem bahçelerindeki badem ağaçlarına yerleştirilen kafesler içerisinde bulunan *E. amygdali* ile bulaşık mummylaşmış badem meyveler içerisinde diyapoz larva, krem beyaz pupa, siyah pupa ve ergin olma oranları arasında istatistiki olarak önemli farklılığın olmadığı görülmüştür. İlk ergin çıkışlarının badem meyvesinin mercimek iriliğindeki 24-27 Mart tarihlerinde olduğu ve ergin çıkışlarının 15-17 gün sürdüğü belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda her yılki sıcaklık değerlerine göre ergin çıkış tarihlerinin değişebileceği göz önüne alındığında *E. amygdali* ile kimyasal mücadelede ilk ilaçlamanın ilk ergin çıkışlarının olduğu badem ağacın fenolojik durumuna (badem meyvesinin mercimek iriliğinde) göre yapılmasının mümkün olabileceği önerilebilir. İlaçlama sayısının ise ergin çıkışlarının 14-17 gün sürdüğü düşünüldüğünde ve seçilecek insektisit etki süresine bağlı olarak bir veya iki kez yapılmasının uygun olabileceği düşünülmektedir. Bundan sonraki çalışmaların farklı lokasyonlardaki badem bahçelerinde sıcaklığa bağlı olarak *E. amygdali*'nin ergin çıkış zamanlarının gün-derece modeline esas etkili sıcaklıklar toplamı değerlerinin, ergin çıkış

zamanlarına bağlı olarak ilaçlama zamanlarının, ergin çıkış süresine göre ilaçlama sayısını ve yapılan ilaçlamaların badem iç kurduna karşı etkinliklerinin belirlenmesine yönelik olması gerekmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu makale birinci yazarın Yüksek Lisans tez çalışmasının bir bölümü olup, KSÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (Proje No: 2018/2-12 YLS) tarafından desteklenmiştir

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Barut GB 2007. Kahramanmaraş Koşullarında Bademlerde Zararlı Badem İçkurdu, (*Eurytoma amygdali* Enderlein (Hymenoptera: Eurytomidae)'nın Bazı Biyolojik Özelliklerinin Belirlenmesi Üzerine Çalışmalar. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 25 sy.
- FAO 2019. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Alınma Tarihi: 08.12.2020).
- Günaydın T, Ekici V 1969. Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da (*Eurytoma amygdali* Enderlein) Üzerinde Araştırmalar. Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Bitki Koruma Bülteni Supplement 1: 1-28.
- İbrahim MY 2008. Biological and Ecological Studies on The Almond Fruit Wasp, *Eurytoma amygdali* End., (Hymenoptera:Eurytomidae) at Homs Governorate-Syria. Jordan Journal of Agricultural Science 4(1): 103-114.
- Katsoyannos BI, Kouloussis NA, Bassiliou A 1992. Monitoring Populations of The Almond Seed Wasp, *Eurytoma amygdali*, with Sex Pheromone Traps and Other Means, and Optimal Timing of Chemical Control. Entomologia Experimentalis et Applicata 62 (1): 9-16.

- Nizamhoğlu K 1962. Türkiye Ziraatına Zararlı Olan Böcekler ve Mücadelesi Fasikül 4: 63 - 65.
- Özbek H, Güçlü Ş, Hayat R, Yıldırım E 1998. Meyve, Bağ ve Bazı Süs Bitkileri Zararlıları. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisi (İkinci Baskı), Erzurum, 272-273.
- Rozsypal J, Kostal V, Zahradnickov H, Simek P 2013. Overwintering Strategy and Mechanisms of Cold Tolerance in The Codling Moth (*Cydia pomonella*). PLoS ONE 8: 1–11.
- Plaut HN 1975. The contents of Mummified "Sticktight" Almond Fruit and Its Relevance to The Control of The Almond Wasp (*Eurytoma amygdali* End.). Hassadeh 55(8): 1294-1296.
- Plaut HN, Mansour F 1973. Studies of The Behaviour, Dispersal, and Damage Potential of The Almond Wasp, *Eurytoma amygdali*. Entomologia Experimentalis et Applicata 16(4): 415-421.
- SAS Institute Inc. 2009. SAS / STAT R User's Guide, Version 6, 4th Ed. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- TÜİK 2019. T.C. Başbakanlık Türkiye İstatistik Kurumu. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Alınma Tarihi: 08.12 2020).
- Tzanakakis ME, Karakassis EJ, Tsaklidis G, Karabina EC, Argalavini IC, Arabatzis G 1991. Diapause Termination in The Almond Seed Wasp, *Eurytoma amygdali* Enderlein (Hym., Eurytomidae), in Northern Greece and Under Certain Photoperiods and Temperatures. J. Appl. Entomol. 111: 86–98.
- Tzanakakis ME, Veenendaal RL, Veerman A 1992. Effects of Photoperiod and Temperature on The Termination of Diapause in The Univoltine Seed Wasp *Eurytoma plotnikovi*. Physiol. Entomol. 17: 176–182.
- Tzanakakis ME, Veerman, A 1994. Effect of Temperature on The Termination of Diapause in The Univoltine Almond Seed Wasp *Eurytoma amygdali*. Entomologia Experimentalis et Applicata 70(1): 27-39.
- Yeşilyaprak M 2015. Şanlıurfa İli Badem Bahçelerinde Zararlı Olan Badem İçkurdu [(*Eurytoma amygdali* Enderlein (Hymenoptera: Eurytomidae)]'nin Yaygınlığı ve Zarar Durumunun Tespiti. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 36 sy..
- Zerova MD, Fursov V.N 1991. The Palaearctic Species of *Eurytoma* (Hymenoptera: Eurytomidae) Developing in Stone Fruits (Rosaceae: Prunoideae). Bulletin of Entomological Research 81(2): 209-219.

Morphology of Spermathecae and Eggs of *Stenozygum coloratum* (Klug, 1845) (Heteroptera: Pentatomidae)

Selami CANDAN¹, Mustafa GÜLLÜ², Nurcan ÖZYURT KOÇAKOĞLU³

^{1,3}Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, 06500 Ankara, Turkey, ²Bingöl University, Faculty of Agriculture, Department of Plant Protection, Bingöl, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0002-7402-1360>, ²<https://orcid.org/0000-0002-4133-6534>, ³<https://orcid.org/0000-0001-7137-8631>

✉: nurcanozyurt@gazi.edu.tr

ABSTRACT

The spermathecae and egg morphology of *Stenozygum coloratum* (Klug, 1845) were examined with light and scanning electron microscopy, and their external morphology was characterized in detail (egg chorion surface, operculum, and aero-micropylar processes, and spermathecae morphology). Eggs are barrel-shaped; operculum is round and the hatching line can be easily distinguished in the scanning electron photograph. The egg batches usually consist of 12 eggs. Because of the thick egg chorion, embryonic development was not visible from the outside. The eggs of *S. coloratum* are usually laid in two rows and are glued to the *Capparis spinosa* (Capparaceae) plants. The egg burster is highly sclerotized, thick and T shaped. It is clearly observed in the hatched egg. Egg-burster is remains attached with the inside lateral surface of the egg. The well-marked operculum intersects the ring of 18–20 short pipe shaped micropylar projections that are found between the tubercles around the hatching line. In *S. coloratum*, the spermathecae has a semi-oblong spermathecal bulb, a pumping region, intermediate flanges, a dilation of spermathecal duct and distal and proximal ducts. The pumping region has distal and proximal flanges. The balloon-like median spermathecal dilation has sclerotized rod and is narrowed distally and tipped. The proximal area of the spermathecal duct is close to the vagina opening. Two V-shaped sclerites and two ring sclerites are localized on the genital chamber (vagina) wall in to which opens the spermathecae. Egg and spermathecae structures in insects differ from species to species. In this study, spermathecae and egg structures of this species, which have not been studied before, were examined in detail, and it was aimed to contribute to systematic and taxonomic studies.

Research Article

Article History

Received : 11.01.2021

Accepted : 18.03.2021

Keywords

Egg chorion

Egg burster

Micropyle

Spermatheca

S. coloratum

Stenozygum coloratum (Klug, 1845) (Heteroptera: Pentatomidae)'un Spermatheca ve Yumurta Morfolojisi

ÖZET

Stenozygum coloratum'un (Klug, 1845) spermatheca ve yumurta morfolojisi ışık ve taramalı elektron mikroskobu ile incelenmiş ve dış morfolojileri ayrıntılı olarak karakterize edilmiştir (yumurta koryon yüzeyi, operkulum ve aero-mikropilleri ve spermatheca morfolojisi). Yumurtalar fiçi şeklindedir, operkulum yuvarlaktır ve açılma hattı taramalı elektron mikroskobu fotoğrafında kolaylıkla ayırt edilebilir. Yumurta kümesi genellikle 12 yumurtadan oluşmaktadır. Yumurta koryonunun kalın olması nedeniyle embriyonik gelişim dışarıdan görünmemektedir. *S. coloratum* yumurtaları genellikle iki sıra halinde *Capparis spinosa* (Capparaceae) bitkilerine yapıştırılır. Yumurta kırıcısı oldukça sklerotize, kalın ve T şeklindedir. O, açılan yumurtada açıkça görülmektedir. Yumurta kırıcısı, açılan yumurtanın iç yan yüzeyinde kalır. Belirgin operkulum, açılma hattı çevresinde tüberküllerin arasında bulunan 18-20 kısa boru şeklindeki mikropil çıkıntılarının halkası ile kesişir. *S. coloratum*'da, spermatheca, yarı oblong bir spermatheca haznesi, spermathecal kanal,

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 11.01.2021

Kabul Tarihi : 18.03.2021

Anahtar Kelimeler

Yumurta kabuğu

Yumurta kırıcısı

Mikropil

Spermatheca

S. coloratum

pompalama bölgesi, spermatekal kanalın dilasyonu, distal ve proksimal kanallara sahiptir. Pompalama bölgesi distal ve proksimal yakalara sahiptir. Balon benzeri medyan spermatekal dilasyon sklerotize çubuğa sahiptir ve o distal ve uc kısımda daralmıştır. Spermatekal kanalın proksimal bölgesi vajina açıklığına yakındır. İki V şeklindeki sklerit ve iki halka sklerit, spermatekaya açılan genital oda (vajina) duvarında yer almaktadır. Böceklerde yumurta ve spermateka yapıları türden türe farklılık göstermektedir. Bu çalışmada daha önce çalışılmamış olan bu türün spermateka ve yumurta yapıları detaylı olarak incelenmiş, sistematik ve taksonomik çalışmalara katkı sağlanması amaçlanmıştır.

To Cite : Candan S, Güllü M, Özyurt Koçakoğlu N 2021. Morphology of Spermathecae and Eggs of *Stenozygum coloratum* (Klug, 1845) (Heteroptera: Pentatomidae). KSU J. Agric Nat 24 (6): 1290-1299. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.858454.

INTRODUCTION

Stenozygum coloratum (Klug, 1845), which is called the variegated caper bug, is common in the Eastern Mediterranean region. *S. coloratum* is a small agricultural pest and generally thrives on wild caper-bush, *Capparis spinosa* L. Capparaceae, but sometimes migrates to thrive on a variety of cultivars, including avocados. The damage to the fruit is accompanied by heavy persein secretion and the appearance of black spots (Izhar et al., 1990).

The surface pattern and shape of insect eggs, are taxonomic characters which are useful in identification of species. In pterygote insects, the taxonomic and phylogenetic significance of eggshell structure has been demonstrated at different levels in different orders (Hinton, 1981; Salkeld, 1983; Margaritis, 1985). The color, size and shape of the eggs and the number, size and shape of the micropylar processes of Pentatomidae family can be easily distinguished and constitute significant characters for the identification of species and genera (Esselbaugh, 1946; Hinton, 1981; Izhar et al., 1990; Bundy and McPherson, 2000; Candan et al., 2001). At the egg stage, despite available information regarding the diversity of taxa, there are no cladistic analyzes at lower taxonomic levels in Pentatomidae, including egg characteristics.

The spermathecae, which is insect female reproductive system region, is responsible for sperm storage, fertilization, copulation, and oviposition (Gaffour-Bensebbane, 1991, 1994; Pascini, 2017).

The egg and spermathecae structures differ among insect species and these structures are systematically and taxonomically important. Therefore, in this study, the egg and spermathecae structure of *S. coloratum* was examined in detail and compared with other Heteroptera species.

MATERIAL AND METHOD

Preparation of Eggs

Adults of *Stenozygum coloratum* were collected from Adana, Turkey (June 2013). At room temperature, fresh eggs were collected from a colony kept in rearing

cages. Insects were kept on *Capparis spinosa* plants in plastic jars until they deposited eggs.

The eggs were observed with stereomicroscopy (Olympus SZX12). Length and width measures were taken and aero-micropylar processes were counted.

The freshly laid eggs were cleaned, prepared and air dried for SEM examination. The eggs were mounted with double sided tape on SEM stubs, coated with gold using a sputter coater (Polaron SC 502). Then, the eggs were viewed with SEM (Jeol JSM 6060 LV) at 5 kV and taken photograph.

Preparation of Spermathecae

The abdomen regions of six female samples were prepared by first softening for 5-10 minutes in 10% KOH. Then spermathecae parts were carefully removed under a dissection stereomicroscope (Olympus SZX7). Then the spermathecae were placed in glycerin. The examinations were made and photographed with light microscope (Olympus BX51).

For scanning electron microscopy (SEM), six spermathecae were cleaned. After being dehydrated in a graded ethanol series and air dried were mounted using double-sided tape on SEM stubs, gold coated by a sputtering device Polaron SC 502 Sputter Coater. Then, sample examinations were made and photographed using a Jeol JSM 6060 LV SEM.

For the structure of the spermathecae, we follow the terminology proposed by Pendergrast (1957), Salkeld (1983), Margaritis (1985) and Pascini (2017). Abbreviation list is seen in Table 1.

RESULTS

Description of Eggs of *Stenozygum coloratum*

The eggs of *S. coloratum* are usually laid in two rows (Figures 1a-d) and are glued to the *C. spinosa* plants. Each female of *S. coloratum* was deposited 12 eggs on average in mass (Figures 1a-d). The barrel-shaped eggs averaged 1.05 ± 0.05 mm in diameter. The chorion and the egg microsculpture prevent observation of the embryonic development. There are two black bands or rings around each egg, one lower and one higher. The

Table 1. The spermathecae abbreviations used in figures.
Çizelge 1. Şekillerde kullanılan spermateka kısaltmaları.

Spermathecae abbreviations (Spermateka kısaltmaları)	Descriptions (Tanımlar)
Sb	Spermathecal bulb (apical receptacle)
Df	Distal flange of pump
Pf	Proximal flange of pump
Pr	Pumping region
Dsd	Distal part of spermathecal duct
Dpd	Proximal part of spermathecal duct
DI	Dilation of spermathecal duct
Dr	Dilation rod

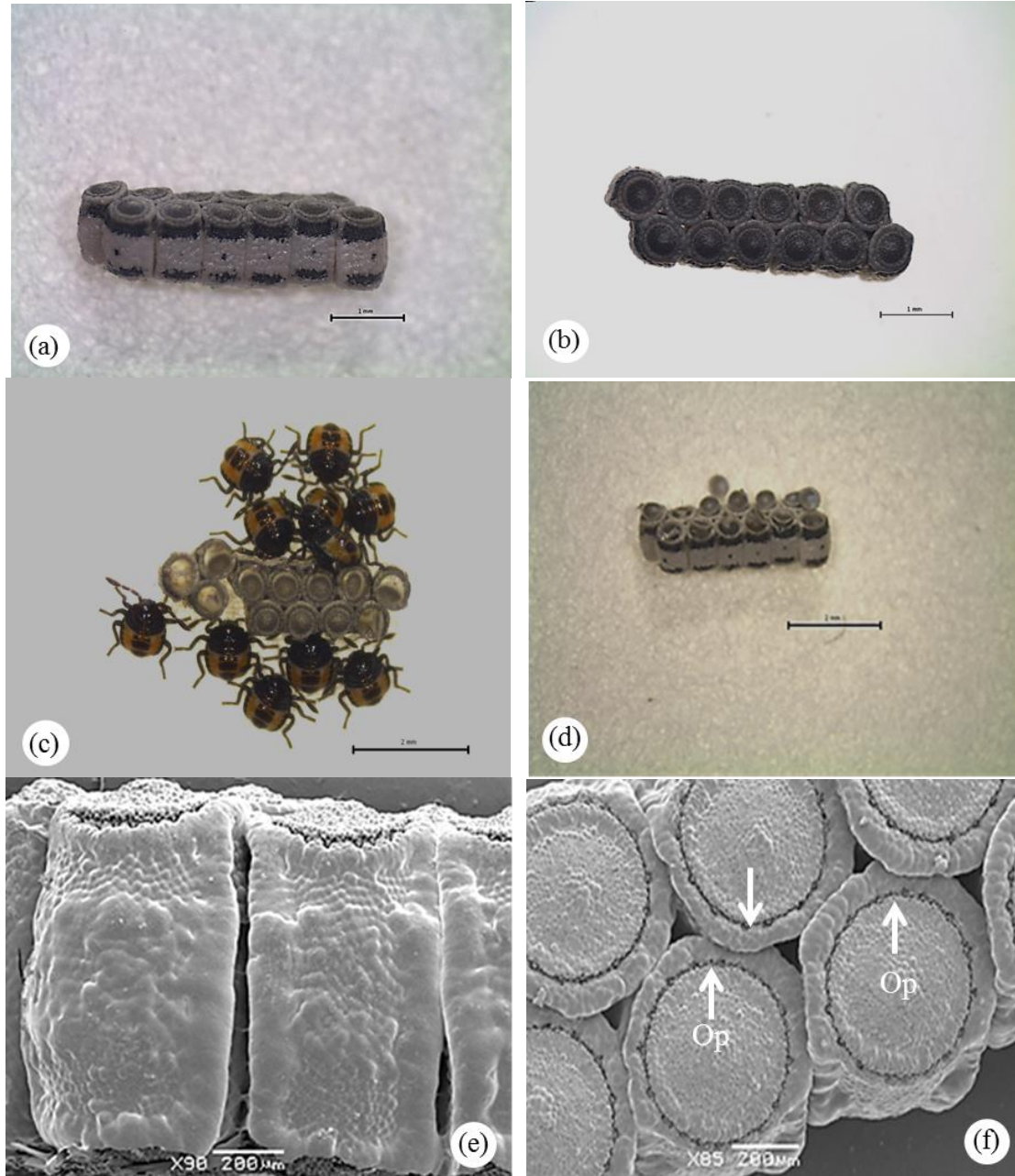


Figure 1. Light and SEM photos of eggs of *Stenozygum coloratum*. (a-b) Egg mass of *S. coloratum*. (a) Side view (b) Dorsal view (c) Hatched egg and nymphs (d) Dorsolateral view of hatched eggs (e) SEM photos of lateral surface of eggs. (f) SEM photos of dorsal view of unhatched eggs, hatching line (→) and operculum (Op)

Şekil 1. *Stenozygum coloratum* yumurtalarının ışık ve SEM fotoğrafları. (a-b) *S. coloratum*'un yumurta kümesi. (a) Yandan görünüm (b) Üstten görünümü (c) Açılmış yumurta ve nimfler (d) Açılmış yumurtaların dorsolateral görünümü (e) Yumurtaların yan yüzeyinin SEM fotoğrafları. (f) Açılmamış yumurtaların operkulum hattının (→) ve operkulumun (Op) dorsal görünümünün SEM fotoğrafları

lower band is narrower than the upper one and the middle of the outside surface of each egg has a blackish spot. The operculum is almost entirely white with only the margin of the central white spot slightly black. The egg shells are clear white following hatching (Figures 1a-d). In light and SEM microscopic examination, the operculum and egg surface of *S. coloratum* is generally rough, and there is no pattern on the surface (Figures

1e, f), but when the surface of the egg chorion (exochorion) is removed, the egg surface is found to be covered with irregular polygonal shapes and deeply buttressed walls (Figures 2a-d). The polygons are mostly hexagonal and tightly connected to each other. Their edges are different in length. Among these polygons there are large voids and chambers in the form hexagonal (Figures 2a-d).

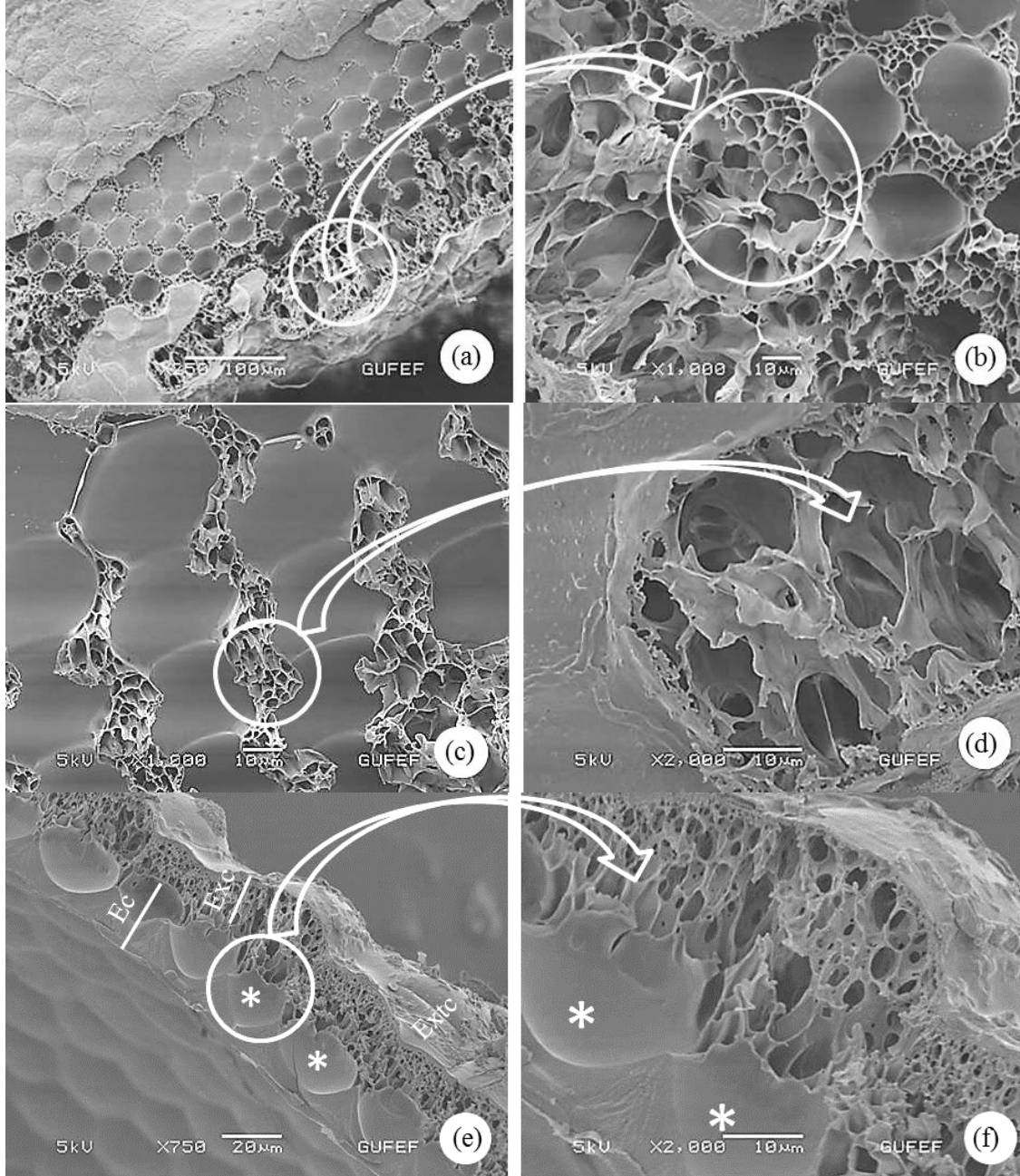


Figure 2. SEM micrographs of egg chorion of *Stenozygum coloratum*. (a-b) Irregular polygonal sculptures outlined by the extrachorion. (c-d) The chorionic network with perforated polygons in middle of the egg exochorion. (e) Chorion layers in egg cross sections. Ec: Endochorion, Exc: Exochorion, Extc: Extrachorion (f) Perforated layer in exochorion and air chamber in endochorion (*).

Şekil 2. *Stenozygum coloratum*'un yumurta koryonunun SEM mikrografları. (a-b) Ekstrakoryon tarafından ana hatları çizilen düzensiz poligonal şekiller. (c-d) Yumurta ekzokoryonunun ortasında delikli çokgenlere sahip koryonik ağ. (e) Yumurtanın enine kesitinde koryon tabakaları. Ec: Endochorion, Exc: Exochorion, Extc: Extrachorion (f) Ekzokoryonda delikli katman ve endokoryonda hava odası (*)

In cross sections of the egg, the chorion is shown to consist of three different layers. These are extrachorion, exochorion and endochorion. The exochorion has a perforated layer; the endochorion also contains large air chambers (Figures 2e, f).

The operculum consists of irregular polygonal swollen tubercles. They vary in shape and size, and some of them have pores in the middle (Figures 3a-c). In

unhatched eggs, the eclosion line is hardly discernible among the tubercles (Figure 2f). In hatched eggs, the eclosion line appears in a circular shape around the operculum (Figure 2f). Around the eclosion line, similar tubercles with irregular shapes and deeply buttressed walls are dispersed (Figures 3a-e). The gap among the tubercles is very large and perforations are very distinct (Figures 3b, c, e).

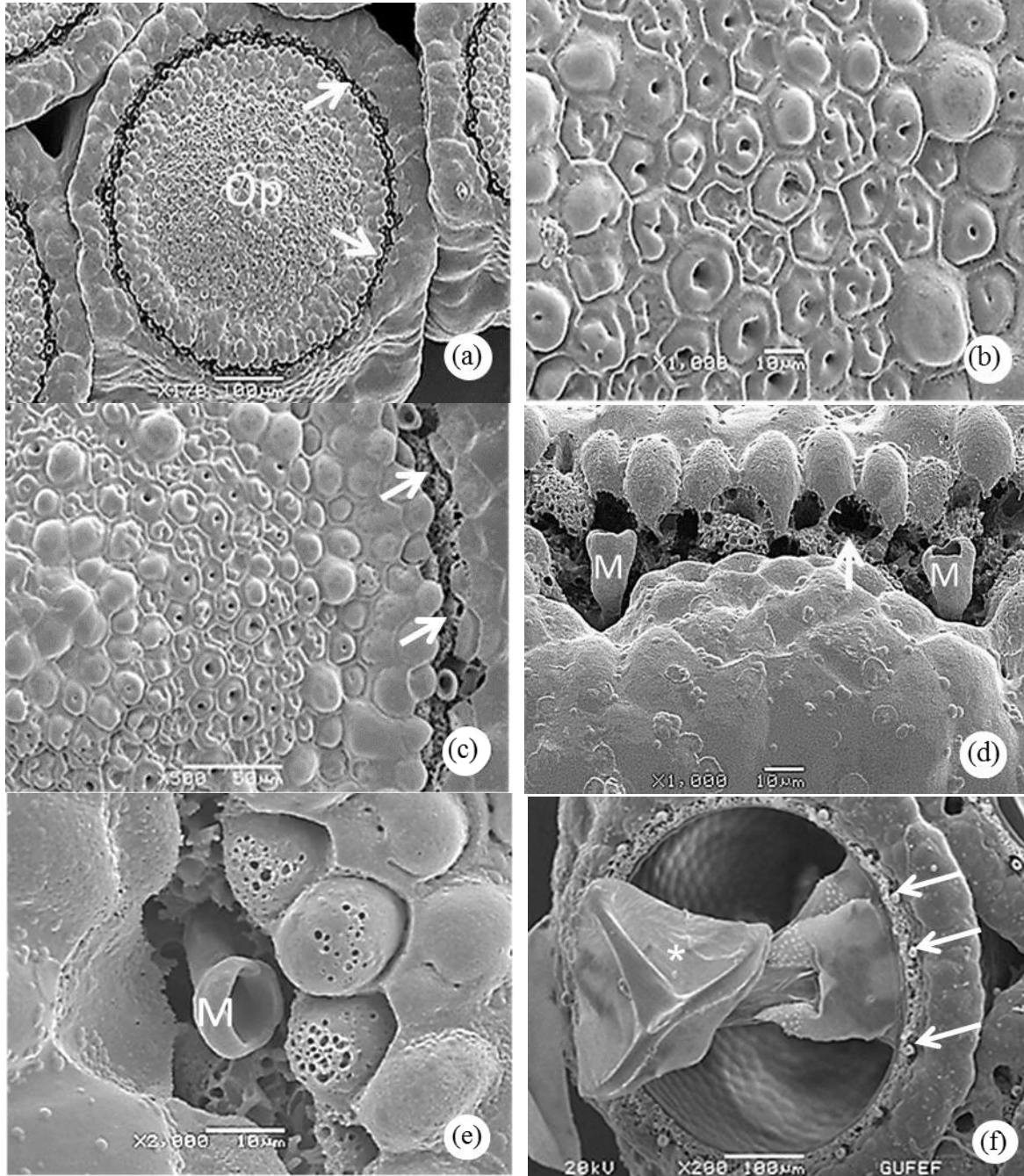


Figure 3. SEM photos of eggs of *Stenozygum coloratum*. (a) Operculum (Op), hatching line (→), and micropylar projections (b) Regular and irregular polygons in operculum surface. (c-e) Eclosion line (→), micropylar projections (M) and perforated polygons in operculum surface. (f) T-shaped egg-burster (*) in the hatched egg and micropylar projections (→)

Şekil 3. *Stenozygum coloratum* yumurtalarının SEM fotoğrafları. (a) Operkulum (Op), açılma hattı (→) ve mikropilar çıkıntılar (b) Operkulum yüzeyinde düzenli ve düzensiz çokgenler. (c-e) Açılma hattı çizgisi (→), mikropil çıkıntıları (M) ve operkulum yüzeyinde delikli çokgenler. (f) Açılan yumurtadaki T-şekilli yumurta kırıcı (*) ve mikropil çıkıntıları (→)

There are 18-20 short pipe-shaped micropylar projections that are found between the tubercles along the hatching line. Each micropylar projection rises from a large cavity in the chorion (Figures 3c-e). The egg burster, which is inverted T-shaped black and it is responsible for opening the operculum. The egg burster is thick and highly sclerotized (Figure 3f).

Description of spermathecae of *Stenozygum coloratum*

S. coloratum spermathecae has the spermathecal bulb (apical receptacle), a spermathecal pump (pumping region), intermediate flanges (distal and proximal) associated with the pump, the spermathecal ducts, spermathecal dilation with sclerotized the ring sclerites are localized on the wall of the genital chamber (vagina) into which opens the spermathecae (Figures 4a, b).

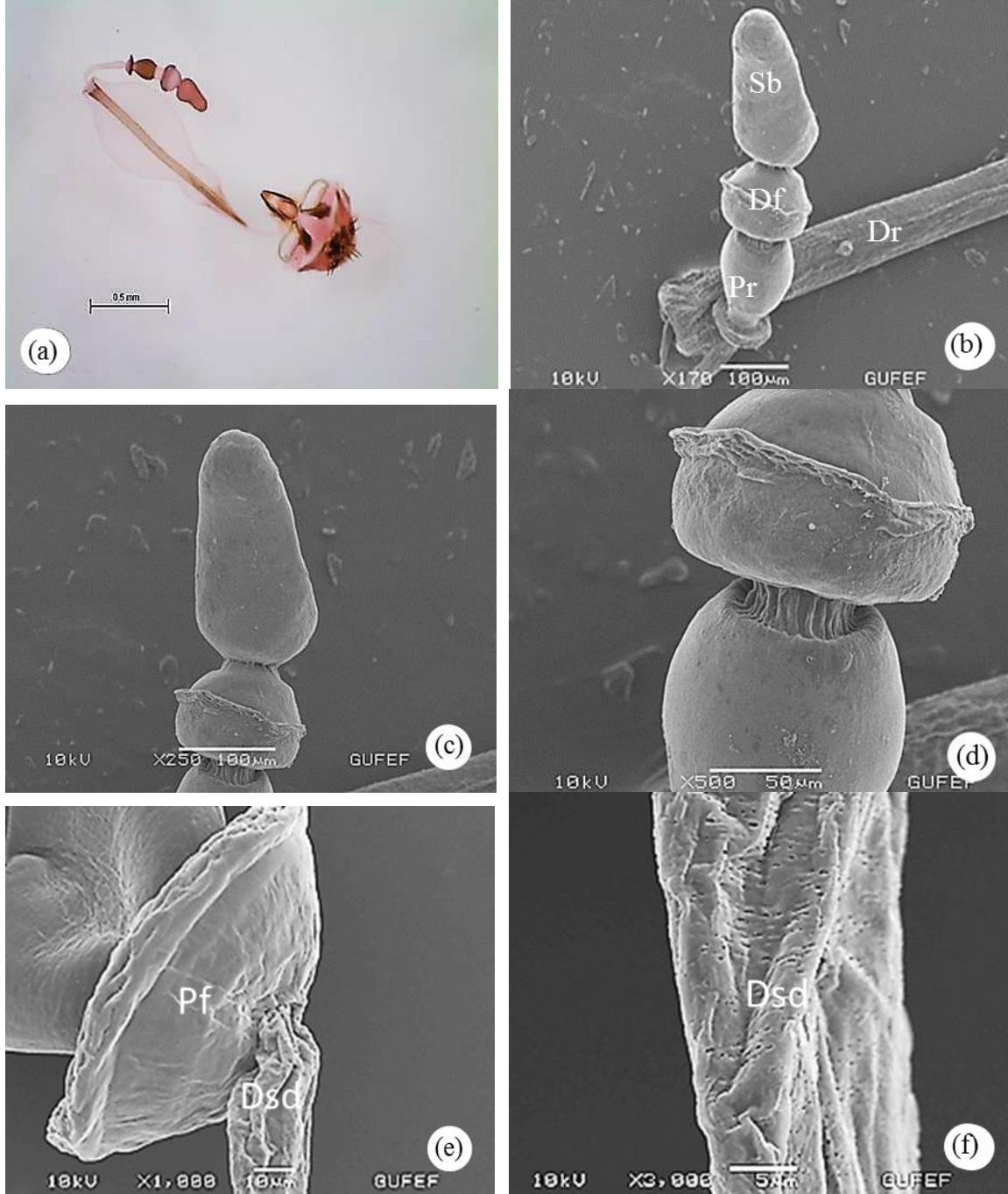


Figure 4. Light and SEM photos of spermathecae of *Stenozygum coloratum*. (a) General view of spermathecae of *S. coloratum*. (b-d) Spermathecal bulb (Sb), distal flange (Df) and pumping region (Pr), sclerotized dilation rod (Dr). (e-f) Proximal flange (Pf) and distal spermathecal duct (Dsd).

Şekil 4. *Stenozygum coloratum* spermathekal'ın ışık ve SEM fotoğrafları. (a) *S. coloratum*'un spermathekası'nın genel görünümü. (b-d) Spermathekal hazne (Sb), distal yaka (Df) ve pompalama bölgesi (Pr), sklerotize dilatasyon çubuğu (Dr). (e-f) Proksimal yaka (Pf) ve distal spermathekal kanal (Dsd)

The spermathecal bulb is sclerotized and semi-oblong. The spermathecal pump with distal and proximal flanges is somewhat sclerotized and swollen at the mid-posterior position (Figures 4a-c). The distal spermathecal duct is the same length as the proximal duct. The proximal flange is narrower than the distal flange and appears as a plate (Figures 4c-f). The balloon-like median spermathecal dilation has

sclerotized rod and is narrowed distally and tipped (Figure 4a); Spermathecal dilation is join with the proximal part of the spermathecal duct (Figure 5a). The spermathecal dilation has thin muscular walls (Figure 5b). The cuticular wall of proximal spermathecal duct is strongly wrinkled and is closely associated with the genital chamber (vagina) opening (Figures 5c-f). There are two sclerites, one at each side of the genital chamber (Figure 5e).

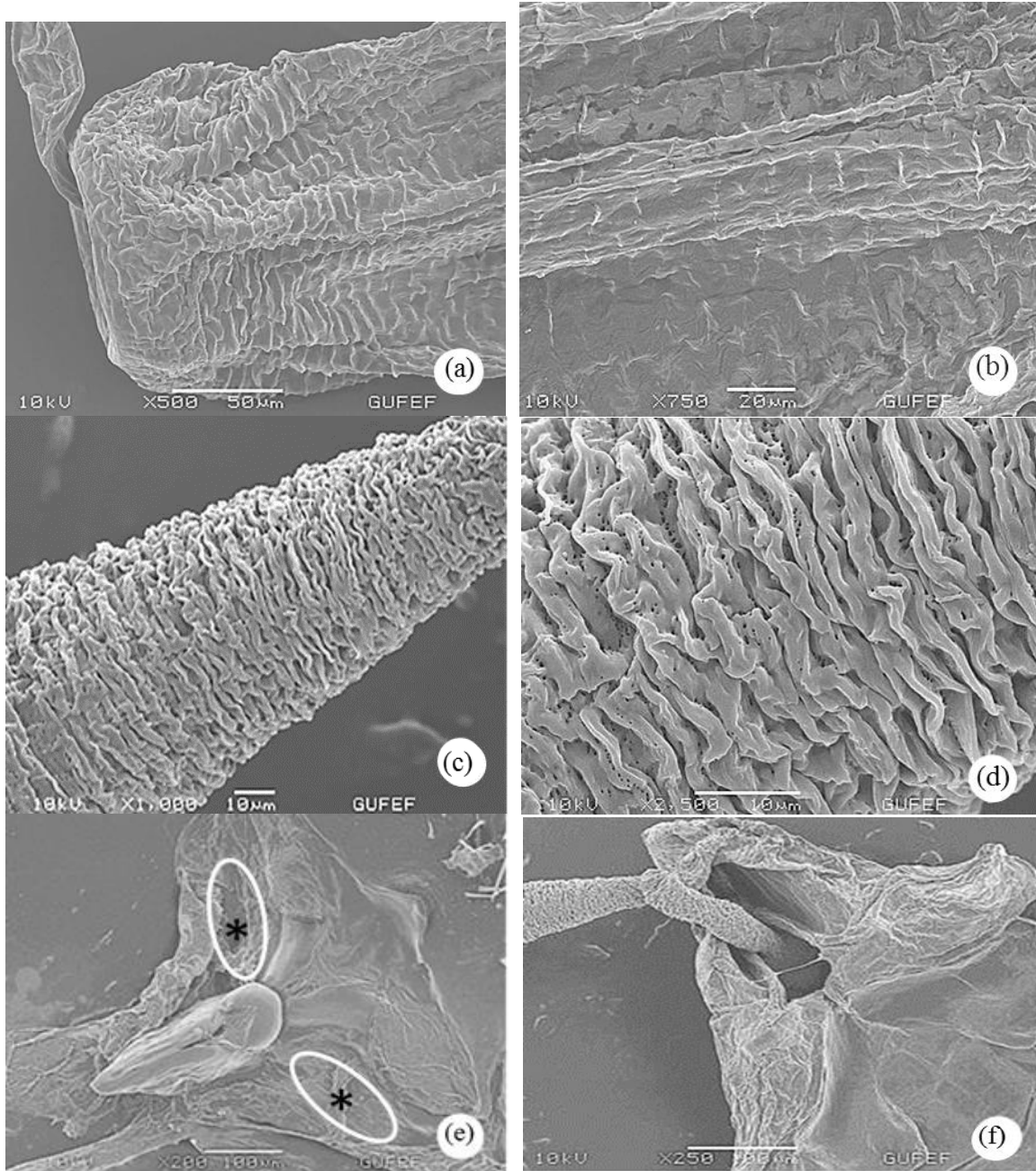


Figure 5. SEM photos of spermathecae of *Stenozygum coloratum*. (a-b) Distal region of median spermathecal dilation and surface. (c-d) The cuticular wall of the proximal duct, strongly wrinkled. (e) Two ring sclerites (*) at both dorsal sides of genital chamber (f) Opening of spermathecal duct, lateral sides of genital chamber and proximal spermathecal duct.

Şekil 5. *Stenozygum coloratum*'un spermathekalının SEM fotoğrafları. (a-b) Orta spermathekal dilatasyonun distal bölgesi ve yüzeyi. (c-d) Proksimal kanalın oldukça kırışık kütiküler duvarı (e) Genital odanın her iki dorsal tarafında iki halka sklerit (*) (f) Spermathekal kanalın, genital odanın yan taraflarının ve proksimal spermathekal kanalın açıklığı

DISCUSSION

The barrel shaped *Stenozygum coloratum* eggs are usually deposited in 2 rows and are glued to host plants (*Capparis spinosa* in the field). The main characters of the microsculpture of the chorion, color, operculum, egg burster and the number of micropylar processes are of great systematic value at generic and family level (Puchkova, 1959, 1961; Cobben, 1968; Hinton, 1981; Javahery, 1994). In insects, the color of eggs changes during embryogenesis (Hinton, 1981; Javahery, 1994). Among Pentatomidae species, some eggs are barrel-shaped with hexagonal pits or shallow depressions, others may resemble those of *S. coloratum*, or fine spines or with chorionic hairs at the reticulation lines (Javahery, 1994). Some eggs are cylindrical or spherical but lack chorionic spines or reticulations (Candan, 1997).

The eggs of stink bugs, studied by various authors so far, differ greatly in their chorion surface morphology. Most of them have a chorion called "spinose" and this chorion is characterized by spines with dotted surfaces. *Euschistus servus* Say, *E. obscurus* Palisot, *E. quadrator* Rolston, *E. tristigmus* Say (Bundy and McPherson, 2000), *Codophila varia* Fabricius (Candan et al., 2001), *Carpocoris pudicus* Poda (Cobben, 1968), *Mormidea* sp. (Javahery, 1994; Wolf and Reid, 2003), *Palomena prassina* Linnaeus (Candan, 1998a), *Piezodorus lituratus* Fabricius (Candan, 1998b), *Eocanthecona furcellata* Wolff (Kumar et al., 2002), *Podisus maculiventris* Say (Lambdin and Lu, 1984), *Euschistus variolarius* Palisot (Candan et al., 2005), *G. semipunctatum* Fabricius (Candan, 1999b) and *Graphosoma lineatum* Müller (Candan and Suludere, 1999) serve as examples. Others are called to as "coarsely reticulate, foveate" (Bundy and McPherson, 2000) and are characterized by the presence of pits arranged hexagonally on the surface. This type of chorion has been stated in *Acrosternum hilare* Say (Javahery, 1994), *Apodiphus amygdali* Germar (Candan, 1997), *Rhaphigaster nebulosa* Poda (Candan, 2001), *Coptosoma siamicum* Walker (Mohan, 1988), *Eurydema rugulosum* Dohrru (Suludere et al., 1999). As well as, a spongy and mushroom shaped chorion type has been seen in the surface of *Vilpianus gali* Wolff (Candan, 1997) and *Ancyrosoma leucogrammes* Gmelin (Candan, 1999a) eggs, a wart-like chorion has been found on *Edessa bifida* Say (Wolf and Reid, 2003) eggs and the presence of polymorphic tubercles have been noted on the chorionic surface of *Eurydema ventrale* Kolenati and *E. blandum* Horvath eggs (Suludere et al., 1999).

Micropile processes originate from the chorion around the cap in all Pentatomidae species, but in Acanthosomidae, Cydnidae, Scutelleridae, and Thyrocoridae, they tend to project from the inner side of the shell. They differ in shape, length and number according to the taxa taken into consideration

(Javahery, 1994). The aeromicropile process has a central channel for the passageway of sperm and serves for respiratory exchange in many Heteroptera species, including *S. coloratum* (Southwood, 1956; Cobben, 1969; Candan 1998a).

In some Pentatomidae species, the first sign of embryonic development in eggs appears long after revolution as two red eye spots with a T-shaped or Y-shaped egg burster between them just below the operculum (Javahery, 1994; Candan, 1998a; 1998b). The egg burster is highly sclerotized and thick in *S. coloratum*. It is difficult to observe the T-shaped egg burster and two eye spots in unhatched eggs because of the sculpturing and the thickness of the chorion. The role of the egg burster in hatching of pentatomid eggs has been noted previously (Southwood, 1956; Puchkova, 1959, 1961; Cobben, 1968; Hinton, 1981) as described below. Hatching begins with the peristaltic contraction of the prolarva body, and a curved incision appears on the burster, extending into a circular incision in the inner margin of the micropile processes (Javahery, 1994). In Pentatomidae species, the incision line or hatching line is a straight longitudinal incision or a circular line. In *S. coloratum*, the hatching line is circular. The egg-burster also has taxonomical importance in Heteroptera as in Pentatomidae (Hinton, 1981; Puchkova, 1966).

One spermathecae is present in all Pentatomoidea (Heteroptera) species, usually only one spermathecae is found to be present. Spermathecae is linked to the vagina (Dupuis, 1955, 1970). It is characterized by a well-marked pump in the intermediate part with both proximal and distal flanges (Pendergrast, 1957; Kumar, 1965; McDonald, 1966; Pluot-Sigwalt and Lis, 2008). In some Pentatomidae, the spermathecal morphology is different. In some subfamilies (Podopinae and Asopinae) the spermathecae has a spermathecal bulb, a pump with two flanges, a median spermathecal dilation with sclerotized rod, and one or two sclerites (Margaritis, 1985; Kocorek and Danielczok-Demska, 2002). In other Podopinae, the spermathecal bulb is [oblong-ovate (*Dybowskyia reticulate* (Dallas), spherical *Scotinophara lurida* (Burmeister), *S. scotti* (Horvath), *S. horvathi* (Distant), or semi-oblong [*Graphosoma rubrolineatum* (Westwood)], and has one to three spermathecal processes. In some Asopinae, the spermathecal bulb is spherical *Picromerus bidens* (Linnaeus), *P. lewisii* (Scott), *Arma chinensis* Fallou, semi-oblong (*Pinthaeus sanguinipes* (Fabricius), or semi-ovoidal *Zicrona caerulea* (Linnaeus) and all species of the Asopinae lack spermathecal processes (Javahery, 1994). Our study shows that the spermathecal bulb of *S. coloratum* is semi-oblong and lacks a process.

Sperm transfer is performed directly with the help of a sperm pump (Margaritis, 1985; Kim and Lee, 1994; Candan et al., 2007, 2014, 2015). In Pentatomidae,

generally, the pumping region has two flanges (distal and proximal) as does *S. coloratum*. The size and shape of the flanges can vary. Also, the spermathecal ducts can also vary according to shape. In some taxa, they are essentially straight; in others they can be very coiled. Also, sometimes there is a swelling or enlargement just below the proximal flange (Javahery, 1994; Candan et al., 2014, 2015). In this SEM study, the distal spermathecal duct and the proximal spermathecal are almost the same length, and muscular structures. These spermathecal ducts are longitudinal muscular fibers and connect with the common oviduct. This is a common feature of pentatomids (Scudder, 1959; Puchkova, 1966; Margaritis, 1985; Javahery, 1994; Pascini and Martins, 2017). The spermathecal duct, where it attaches to the bulb, is also transformed into a pump, the cuticular lining of which is slightly sclerotized and flexible (Lambdin, and Lu, 1984).

Spermathecal ducts are region of the sperm transport system, they are responsible for sperm can be transported directly from the spermathecae to the common oviduct (Puchkova, 1959). The two ring sclerites presence within the genital chamber are common to all species of Pentatomidae previously studied (Javahery, 1994; Candan et al., 2014, 2015).

Based on our study, morphological characters of eggs and spermathecae of *S. coloratum* can be useful in the classification of Pentatomidae. However, further studies are required to establish clear trends within the Pentatomidae family to which *S. coloratum* belongs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our gratitude to Dr. Robert Lavigne (Professor Emeritus, University of Wyoming, Laramie, Wyoming, USA) for the linguistic improvement of this article.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

Conflicts of Interest

No conflict of interest was declared by the authors.

REFERENCES

- Bundy CS, McPherson RM 2000. Morphological Examination of Stink Bug (Heteroptera: Pentatomidae) Eggs on Cotton and Soybeans, with a Key to Genera. *Ann Entomol Soc Am* 93(3): 616-624.
- Candan S, Suludere Z 2001. Chorionic Structure of Eggs with Parasites and Normal of *Rhaphigaster nebulosa* (Poda, 1761) (Heteroptera: Pentatomidae). *Türk Entomol Derg* 25(1): 41-48.
- Candan S, Suludere Z 1999. Chorionic Structure of *Graphosoma lineatum* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera, Pentatomidae). *J Entomol Res Soc* 1(3): 1-7.
- Candan S 1999a. *Ancyrosoma leucogrammes* (Gmelin) (Heteroptera: Pentatomidae) Yumurtalarının Dış Morfolojisi, *GÜ Fen Bil Enst Derg* 12(4): 933-941.
- Candan S 1998a. External Morphology of Eggs of *Palomena prasina* (L.) (Heteroptera: Pentatomidae). *J Inst of Sci and Tech Gazi Univ* 11(4):791-800.
- Candan S 1998b. External Morphology of Eggs of *Piezodorus lituratus* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae). *Türk Entomol Derg* 22(4):307-313.
- Candan S 1999b. *Graphosoma semipunctatum* (F.) (Heteroptera: Pentatomidae) Yumurtalarının Dış Morfolojisi. *GÜ Fen Bil Enst Derg* 12(3):769-778.
- Candan S, Erbey M, Özyurt N, Suludere Z 2014. Spermathecae Morphology in Four Species of *Eurydema* Laporte, 1833 (Heteroptera: Pentatomidae) from Turkey: A Scanning Electron Microscope Study. *J Entomol Zool Stud* 2(3):206-213.
- Candan S, Erbey M, Özyurt N, Suludere Z 2014. Spermathecae Morphology in Four Species of *Eurydema* Laporte, 1833 (Heteroptera: Pentatomidae) from Turkey: A Scanning Electron Microscope Study. *J Entomol Zool Stud* 2(3):206-213.
- Candan S 1997. External Morphology of Eggs of Some Pentatomidae (Heteroptera: Insecta). University of Gazi, Phd Thesis, Turkey, 223 p.
- Candan S, Suludere Z, Acikgoz F 2005. Chorion Morphology of Eggs of the North American stink bug *Euschistus variolarius* (Palisot de Beauvois, 1817) (Heteroptera: Pentatomidae): A Scanning Electron Microscopy Study. *Entomol News* 116(3):177-182.
- Candan S, Suludere Z, Erbey 2007. Morphology of Eggs and Spermatheca of *Odontotarsus purpureolineatus* (Heteroptera, Scutelleridae). *Biologia* 62(6): 763-769.
- Candan S, Suludere Z, Kiyak S 2001. External Morphology of Eggs of *Codophila varia* (Fabricius, 1787) (Heteroptera: Pentatomidae). *J Entomol Res Soc* 3(1-2): 33-39.
- Candan S, Yilmaz FS, Suludere Z, Erbey M 2015. Morphology of spermathecae of some pentatomids (Hemiptera: Heteroptera: Pentatomidae) from Turkey. *Zootaxa* 3937(3):500-516.
- Cobben RH 1968. Evolutionary Trends in Heteroptera. Part 1. Eggs, Architecture of the Shell, Gross Embryology and Eclosion. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen, the Netherlands 475 p.
- Dupuis C 1955. Les génitalia des Hémiptères Hétéroptères (génitalia externes des deux sexes; voies ectodermiques femelles.): *Revue de la morphologie. Lexique de la nomenclature. Index bibliographique analytique. Mém Mus Hist Nat Paris* 6:183-278.

- Dupuis C 1970. Heteroptera. (Taxonomist's Glossary of Genitalia in Insects Munksgaard International Booksellers and Publishers, Copenhagen, . Ed. Tuxen SL) 190-209.
- Esselbaugh CO 1946. A Study of the Eggs of the Pentatomidae (Hemiptera). Ann Entomol Soc Am 39(4):667-691.
- Gaffour-Bensebbane C 1994. Les Variations Morphologiques de L'appareil Genital Ectodermique des Femelles de Scutelleridae (Heteroptera, Pentatomoidea). Nouv Rev Entomol 11:267-281.
- Gaffour-Bensebbane C 1991. Morphologie des Voies Genitales Ectodermiques des Femelles d'*Eurygaster austriaca* (Schrank, 1776) [Het.: Scutelleridae]. Bull Soc Entomol Fr, 95(7-8):209-227.
- Hinton HE 1981. Biology of Insect Eggs. Vols. I-III., Pergamon Press, Oxford, 1125 p.
- Izhar Y, Wysoki M, Swirski E, Amitai S 1990. The Variegated Caper Bug, *Stenozygum coloratum* (Klug) (Rhynchota: Pentatomidae), and Its Damage to avocado and persimmon. Hassadeh, 70:1244-1245.
- Javahery M 1994. Development of Eggs in Some True Bugs (Hemiptera-Heteroptera). Part I. Pentatomoidea. Can Entomol 126(2):401-433.
- Kim HR, Lee CE 1994. Morphological Studies on the spermathecae of Korean Podopinae and Asopinae (Heteroptera: Pentatomidae). Korean J Appl Entomol 24:217-223.
- Kocorek A, Danielczok-Demska T 2002. Comparative Morphology of the Spermatheca within the Family Dinidoridae (Hemiptera: Heteroptera). Eur J Entomol 99:91-98.
- Kumar R 1965. Contributions to the Morphology and Relationships of Pentatomoidea (Hemiptera: Heteroptera) Part I. Scutelleridae. Aust J Entomol 4(1):41-55.
- Kumar V, Morrison MN, Babu AM, Thiagarajan V 2002. Egg Shell Architecture of the Stink Bug, *Eocanthecona furcellata* (Wolff.): Ultrastructure of Micropylar Processes and Egg Burster. Insect Sci Appl 22(1):67-74.
- Lambdin PL, Lu GQ 1984. External Morphology of Eggs of the Spined Soldier Bug, *Podisus maculiventris* (Say) (Hemiptera: Pentatomidae). Proc Entomol Soc Wash 86 (2):374-377.
- Margaritis LH 1985. Structure and Physiology of the Eggshell. (Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Pergamon Press, Oxford, Eds. Kerkut GA, Gilbert LI 153-230).
- McDonald FJD 1966. The Genitalia of North American Pentatomoidea (Hemiptera: Heteroptera). Quaest Entomol 2:7-150.
- Mohan D 1988. Host Plant Relationships with Reference to the Biology of Fern Infesting Pentatomid, *Coptosoma siamicum* Walker, with Notes on the Fine Architecture of the Egg. J Entomol Res 12(1):149-153.
- Pascini TV, Martins GF 2017. The Insect Spermatheca: an Overview. Zool 121:56-71.
- Pendergrast JG 1957. Studies on the Reproductive Organs of the Heteroptera with a Consideration of Their Bearing on Classification. Trans R Entomol Soc Lond 109(1):1-63.
- Pluot-Sigwalt D, Lis JA 2008. Morphology of the Spermatheca in the Cydnidae (Hemiptera: Heteroptera): Bearing of its Diversity on Classification and Phylogeny. Eur J Entomol 105(2):279-312.
- Puchkova LV 1959. Eggs of the true bugs (Hemiptera-Heteroptera). I. V. Pentatomoidea, I. Ent Obozr 38(3):634-48.
- Puchkova LV 1961. The eggs of Hemiptera-Heteroptera VI. Pentatomoidea, 2, Pentatomidae and Plataspidae. Entomol Obozr 40:131-143.
- Puchkova LV 1966. The Morphology and Biology of the Eggs of the Terrestrial Bugs (Hemiptera). Horae Soc Entomol Ross 51:75-132.
- Salkeld EH 1983. Catalogue of the Eggs of Some Canadian Geometridae (Lepidoptera), with Comments. Mem Entomol Soc Can 126:3-271.
- Scudder GGE 1959. The Female Genitalia of the Heteroptera: Morphology and Bearing on Classification. Trans R Entomol Soc Lond 111(14):405-467.
- Southwood TRE 1956. The Structure of the Eggs of the Terrestrial Heteroptera and its Relationship to the Classification of the Group. Trans R Entomol Soc Lond 108(6):163-221.
- Suludere Z, Candan S, Kalender Y 1999. Chorionic Sculpturing in Eggs of Six Species of *Eurydema* (Heteroptera, Pentatomidae): A Scanning Electron Microscope Investigation. J Entomol Res Soc 1(2):27-56.
- Wolf KW, Reid W 2003. The Wart-Like Chorion of *Edessa bifida* (Hemiptera: Pentatomidae). J Submicr Cytol Pathol 35(4):469-473.-

Additional Notes on the Genus *Carpelimus* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) Fauna of Turkey

Enes Zafer KACAR¹, Semih ÖRGEL², Sinan ANLAŞ³

¹Alaşehir Vocational School, Manisa Celal Bayar University, Alaşehir, Manisa, Turkey. ²Demirci Vocational School, Manisa Celal Bayar University, Demirci, Manisa, Turkey ³Alaşehir Vocational School, Manisa Celal Bayar University, Alaşehir, Manisa, Turkey.

¹<https://orcid.org/0000-0002-9123-1765>, ²<https://orcid.org/0000-0002-6362-3091>, ³<https://orcid.org/0000-0001-7059-5677>

✉: eneszaferkacar@gmail.com

ABSTRACT

In this study, 117 specimens of the genus *Carpelimus* Leach (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae) were collected from different provinces and regions of Turkey between 2005 and 2019. As a result of the field studies, a totally 12 species of the genus were recorded. Among them, *Carpelimus (Trogophloeus) fiorii* Gildenkov is the first record from Turkey. In addition, *C. (s.str.) fuliginosus* (Gravenhorst) from Aegean and Southeast Anatolia Regions, *C. (s.str.) gusarovi* Gildenkov from Aegean and Mediterranean Regions, *C. (s.str.) pusillus* (Gravenhorst) from Eastern Anatolia Region, *C. (Paratrogophloeus) rivularis* (Motschulsky) from Aegean Region, *C. (Troginus) exiguus* (Erichson) from Eastern Anatolia Region and *C. (Troginus) impressus* (Lacordaire) from Marmara Region are the first recorded for the area.

Research Article

Article History

Received : 19.01.2021

Accepted : 21.03.2021

Keywords

Staphylinidae

Oxytelinae

Carpelimus

New records

Turkey

Türkiye *Carpelimus* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) Faunası Üzerine Ek Notlar

ÖZET

Bu çalışmada, 2005-2019 yılları arasında Türkiye'nin farklı il ve bölgelerinden *Carpelimus* Leach (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae) cinsine bağlı 117 örnek toplanmıştır. Arazi çalışmaları sonucunda toplam 12 tür rapor edilmiştir. Bunların arasında, *Carpelimus (Trogophloeus) fiorii* Gildenkov türü Türkiye için ilk kayıt niteliğindedir. Ayrıca, *C. (s. str.) fuliginosus* (Gravenhorst) türü Ege ve Güneydoğu Anadolu Bölgeleri'nden, *C. (s. str.) gusarovi* Gildenkov türü Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nden *C. (s. str.) pusillus* (Gravenhorst) türü Doğu Anadolu Bölgesi'nden *C. (Paratrogophloeus) rivularis* (Motschulsky) türü Ege Bölgesi'nden, *C. (Troginus) exiguus* (Erichson) türü Doğu Anadolu Bölgesi'nden ve *C. (Troginus) impressus* (Lacordaire) türü ise Marmara Bölgesi'nden ilk defa bildirilmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 19.01.2021

Kabul Tarihi : 21.03.2021

Anahtar Kelimeler

Staphylinidae

Oxytelinae

Carpelimus

Yeni kayıtlar

Türkiye

To Cite : Kacar EZ, Örgel S, Anlaş S 2021. Additional notes on the genus *Carpelimus* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) fauna of Turkey. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1300-1303. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.864393.

INTRODUCTION

According to Newton (2019), the Oxytelinae genus *Carpelimus* Leach, 1819 includes 384 species in worldwide. In the meantime, fifteen species and one subspecies have been described by Gildenkov (2019a, b, 2020a, b, c), Gildenkov and Tronquet (2019) and Lee and Ahn (2019). In the Palaearctic region, the genus is represented by 127 species and subspecies in five subgenera, with four species listed as incertae sedis (Schülke and Smetana, 2015).

Twenty-nine species and two subspecies belonging to the genus were listed from Turkey (Anlaş, 2009: updated). The Turkish species belong to four subgenera: the nominal subgenus (seven species and

one subspecies); *Paratrogophloeus* Hatch, 1957 (five species); *Troginus* Mulsant and Rey, 1878 (three species); *Trogophloeus* Mannerheim, 1830 (14 species and one subspecies). Seven of these species are exclusively known from Turkey.

The main purpose of the present paper is to supplement the knowledge of the *Carpelimus* fauna of Turkey based on the material of different parts of Turkey.

MATERIAL and METHODS

Field studies were conducted from different provinces and regions of Turkey between 2005 and 2019. Most of the specimens were found from under the stone. Also,

some specimens were collected by hibernation trap bands. The material referred to in this study is stored in the Alaşehir Zoological Museum Manisa (AZMM). Classification and nomenclature of the genus *Carpelimus* listed by Schülke and Smetana (2015) have been followed in this study.

RESULT

In the study, a total of 12 species belonging to genus *Carpelimus* have been recorded from Turkey. Among them, *Carpelimus fiorii* Gildenkov, 2004 is the first records for the Turkish Fauna. In addition, first records have been given for many regions and provinces of Turkey.

Oxytelinae Fleming 1821

Tribe Thinobiini J. Sahlberg, 1876

Carpelimus (s.str.) fuliginosus (Gravenhorst, 1802)

Material examined: **Manisa:** 1♂, 06.III.2006, Turgutlu, Ovacık, hibernation trap band, leg. Anlaş. **Siirt:** 3♂♂, 11♀♀, 10. VI. 2009, leg. Yağmur.

Distribution in Turkey: Adana, Ankara Antalya, İstanbul (Anlaş, 2009; Anlaş and Rose, 2009; Assing, 2014). This species is recorded from Aegean and Southeast Anatolia Regions for the first time.

Distribution in the world: *C. fuliginosus* is distributed in Europe, Algeria, Libya, and Turkey, in the Palaearctic Region. It is also known from Afrotropical Region (Schülke and Smetana, 2015).

Carpelimus (s.str.) gusarovi Gildenkov, 1997

Material examined: **Kahramanmaraş:** 1♂, 1♀, 09.III.2008, Türkoğlu, 37°22'11"N, 36°48'54"E, leg. Yağmur. **Manisa:** 1♂, 15.IV.2006, Demirci, Hanımkaaya, leg. Anlaş.

Distribution in Turkey: Amasya, Samsun, Tokat (Assing, 2009, 2010). This species is recorded from Aegean and Mediterranean Regions for the first time.

Distribution in the world: *C. gusarovi* is distributed in Azerbaijan, Austria, Bulgaria, France, Hungary, Italy, Moldavia, The Netherlands, Romania, South European Territory of Russia, Ukraine, Iraq, and Turkey (Schülke and Smetana, 2015).

Carpelimus (s.str.) insularis (Kraatz, 1858)

Material examined: **Diyarbakır:** 2♂♂, 04.VII.2010, Silvan, leg. Yağmur. **Hatay:** 1♂, 14.IV.2007, Reyhanlı 10 km W, leg. Yağmur. **Kahramanmaraş:** 6♂♂, 4♀♀, 23.VI.2007, Andırın, 37°31'48"N, 36°22'49"E, 720 m, leg. Anlaş.

Distribution in Turkey: Adana Ankara, Antalya, Aydın, Hatay, İzmir, Kilis, Manisa and Mersin (Anlaş, 2009; Tezcan and Anlaş, 2009). This species is recorded from Diyarbakır and Kahramanmaraş Provinces for the first time.

Distribution in the world: *C. insularis* is widely distributed in the Palaearctic Region. It is also known

from the Afrotropical, Neotropical, and Oriental Regions (Schülke and Smetana, 2015).

Carpelimus (s.str.) pusillus (Gravenhorst, 1802)

Material examined: **Elazığ:** 1♂, 3♀♀, 10.VII.2016, central province, leg. Yağmur.

Distribution in Turkey: Ankara (Anlaş, 2009). This species is recorded from Eastern Anatolia Region for the first time.

Distribution in the world: *C. pusillus* is widely distributed in the Palaearctic Region. It is also known from Afrotropical, Nearctic, Australian Regions (Schülke and Smetana, 2015).

Carpelimus (Paratrogophloeus) bilineatus Stephens, 1834

Material examined: **Diyarbakır:** 1♂, 1♀, 30.VI.2010, Silvan 20 km SW, Köprübaşı, leg. Yağmur; 1♂, 06.VI.2010, Silvan, Köprübaşı, Ambarçay, leg. Özgen. **Elazığ:** 1♂, 12.VI.2010, Doğukent, leg. Özgen. **Mardin:** 1♂, 1♀, 23.IV.2010, Karasu, leg. Özgen; 1♂, 2♀♀, 10.VIII.2006, Yeşilli leg. Anlaş. **Trabzon:** 2♂♂, 06.VI.2006, Sümela 7 km N, leg. Anlaş.

Distribution in Turkey: Adana, Ankara, Antalya, Aydın, Diyarbakır, İzmir, Manisa, Mardin, Mersin, Niğde, Osmaniye, Siirt, Sinop, Van, Yalova (Anlaş, 2009; Anlaş and Rose, 2009; Tezcan and Anlaş, 2009; Özgen et al., 2010). This species is recorded from Eastern Black Sea Region and Elazığ Province for the first time.

Distribution in the world: This is a cosmopolitan species. *C. bilineatus* is known from Europe, North Africa, Middle Asia, China, Russia, Mongolia, Cyprus, Iran, and Turkey in the Palaearctic Region (Schülke and Smetana, 2015).

Carpelimus (Paratrogophloeus) rivularis (Motschulsky, 1860)

Material examined: **Manisa:** 1♂, 06.III.2006, Turgutlu, Ovacık, hibernation trap band, leg. Anlaş.

Distribution in Turkey: Adana, Amasya, Ankara, İstanbul, Kars, Ordu (Anlaş, 2009; Gildenkov, 2009a). This species is recorded from Aegean Region for the first time.

Distribution in the world: According to Schülke and Smetana (2015), *C. rivularis* is widely distributed in the Palaearctic Region. It is also known from the Nearctic Region.

Carpelimus (Paratrogophloeus) similis (Smetana, 1967)

Material examined: **Ankara:** 1♂, 25.VI.2016, Kızılcahamam, 40°35'33"N, 32°39'30"E, leg. Örgel. **Elazığ:** 1♂, 19.V.2010, Doğukent, leg. Özgen. **Giresun:** 1♂, 2♀♀, 24.IV.2013, Tirebolu, leg. Örgel. **Kahramanmaraş:** 1♂, 17.V.2019, Göksun, 38°14'21"N, 36°35'12"E, 1570 m, leg. Örgel. **Kayseri:** 1♂, 1♀, 16.V.2019, Develi, 38°05'43"N, 35°43'13"E, 1740 m,

leg. Örgel. **Trabzon:** 1♂, 06.VI.2006, Maçka, leg. Anlaş. **Distribution in Turkey:** Ankara, Amasya, Çanakkale, Erzurum, Gümüşhane, Manisa, Muğla, Niğde, Osmaniye, Samsun, Sinop, Van (Anlaş, 2009; Gildenkov, 2009a). This species is recorded from Elazığ, Giresun, Kahramanmaraş, Kayseri and Trabzon for the first time.

Distribution in the world: *C. similis* is known from in Belgium, Bosnia, Bulgaria, Central European Territory, Czech Republic, France, Great Britain, Georgia, Hungary, Italy, The Netherlands, Slovakia, Spain, Switzerland and Turkey (Schülke and Smetana, 2015).

***Carpelimus (Trogophloeus) coiffaiti* Gildenkov, 2001**

Material examined: **Kahramanmaraş:** 2♂♂, 2♀♀, 23.VIII.2007, Andırın, 37°31'48"N, 36°22'49"E, 720 m, leg. Anlaş.

Distribution in Turkey: Antalya, Erzurum, Hatay (Anlaş, 2009; Anlaş and Rose 2009; Gildenkov, 2009b).

Distribution in the world: This is an Anatolian endemic species and recorded from Kahramanmaraş Province for the first time.

***Carpelimus (Trogophloeus) corticinus* (Gravenhorst, 1806)**

Material examined: **Balıkesir:** 1♂, 10.X.2017, Erdek, 40°27'61"N, 27°54'60"E, 202 m, leg. Sak & Bulut. **Denizli:** 1♂, 11.IV.2015, Tavas, 37°39'36"N, 28°52'06"E, 1131 m, leg. Örgel. **Diyarbakır:** 1♂, 1♀, 17.VI.2007, Karacadag, 37°52'16"N, 39°52'39"E, 975 m, leg. Yağmur; 3♂♂, 6♀♀, 16.VI.2006, Eğil, Aşağıdöşemeler 3 km W, 38°13'44"N, 40°05'12"E, 675 m, leg. Özgen; 1♂, 1♀, 04.VI.2010, Eğil 3 km W, leg. Özgen; 1♂, 05.VI.2010, Dicle River banks, leg. Özgen. **Elazığ:** 1♂, 19.III.2010, Doğukent, leg. Özgen. **Kırklareli:** 2♂♂, 25.V.2010, İğneada, 41°51'27"N, 27°57'32"E, leg. Bekchiev; 1♂, 1♀, Hamam Lake, leg. Kunt. **Muğla:** 2♂♂, 3♀♀, 21.V.2015, Dalaman, 36°53'37"N, 28°53'25"E, 127 m, leg. Örgel.

Distribution in Turkey: Adana, Amasya, Ankara, Antalya, Ardahan, Artvin, Balıkesir, Bitlis, Diyarbakır, Erzurum, Hakkari, İzmir, Kilis (Anlaş, 2009; Anlaş and Rose, 2009; Gildenkov, 2009b; Özgen et al., 2010; Assing, 2013, 2014; Sert et al., 2014). This species is recorded from the European part of Turkey, and also Denizli, Elazığ and Muğla Provinces for the first time.

Distribution in the world: *C. corticinus* is known in the Palaearctic Region from Europe and North Africa, South and Middle Asia, Middle East, Eastern, and Western Siberia, China, Cyprus, Israel, and Turkey in addition to Nearctic, Australian, and Neotropical Region (Schülke and Smetana, 2015).

***Carpelimus (Trogophloeus) fiorii* Gildenkov, 2004**

Material examined: **Ardahan:** 1♂, 12.VII.2012, Hanak,

41°18'05"N, 42°49'52"E, 2160 m leg. Altın. **Elazığ:** 1♂, 27.V.2010, Doğukent, leg. Özgen. **Muğla:** 1♂, 2♀♀, 21.V.2015, Dalaman, 36°53'37"N, 28°53'25"E, 127 m, leg. Örgel. **Diyarbakır:** 2♂♂, 9♀♀, 06.VI.2010, Silvan, Ambarköy, Köprübaşı, leg. Özgen.

Distribution in Turkey: This species is recorded from Turkey for the first time.

Distribution in the world: This species is known from Georgia and Italy (Schülke and Smetana, 2015).

***Carpelimus (Troginus) exiguus* (Erichson, 1839)**

Material examined: **Elazığ:** 1♂, 2♀♀, 10.VII.2016, central province, leg. Yağmur. **Muğla:** 1♂, 6♀♀, 21.V.2015, Dalaman, 36°53'37"N, 28°53'25"E, 127 m, leg. Örgel.

Distribution in Turkey: Adana, Afyonkarahisar, Ankara, Antalya, Çanakkale, Gaziantep, Kahramanmaraş, Kilis, Mersin, Karaman, Şanlıurfa (Anlaş, 2009; Anlaş and Rose, 2009; Gildenkov, 2009b, 2014). This species is recorded from Eastern Anatolia Region and Muğla province for the first time.

Distribution in the world: According to Schülke and Smetana (2015), *C. exiguus* is widely distributed in the Palaearctic Region. It is also known from the Afrotropical and Oriental Regions.

***Carpelimus (Troginus) impressus* (Lacordaire, 1835)**

Material examined: **Kırklareli:** 2♂♂, 25.V.2010, İğneada, Demirköy, 41°51'27"N 27°57'32"E, 5 m, leg Kunt.

Distribution in Turkey: This species was known from Amasya (Heyden, 1890). This species is recorded from Marmara Region for the first time.

Distribution in the world: *C. imperessus* is known from Europe, Algeria, Morocco, Russia, Syria and Turkey in the Palaearctic Region.

ACKNOWLEDGMENTS

We are most grateful to M. Y. Gildenkov (Smolensk, Russia), for identification/confirmation of some specimens. In addition, we are most grateful to our colleagues for making their staphylinid collections available to me.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

REFERENCES

Anlaş S 2009. Distributional checklist of the Staphylinidae (Coleoptera) of Turkey, with new and additional records. Linzer biologische Beiträge, 41:

- 215-342.
- Anlaş S, Rose A 2009. Contribution to the Oxytelinae (Coleoptera: Staphylinidae) fauna of Turkey, with new and interesting records. *Acta Zoologica Bulgarica* 61 (1): 101-104.
- Assing V 2009. On the Staphylinidae of Turkey. VI. Thirteen new species and additional records (Coleoptera). *Koleopterologische Rundschau* 79: 117-172.
- Assing V 2010. On the Staphylinidae of Turkey. VII. Five new species and additional records (Coleoptera: Staphylinidae). *Koleopterologische Rundschau* 80: 71-102.
- Assing V 2013. On the Staphylinidae (Coleoptera) of Turkey IX. Five new species, a new synonymy, and additional records. *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde A, Neue Serie* 6: 103-125.
- Assing V 2014. On the Staphylinidae of Turkey X. Two new species and additional records (Insecta: Coleoptera). *Linzer biologische Beiträge* 46(2): 1133- 1146.
- Gildenkov M Y 2009a. Novye dannye o rasprostraneni v Palearktike vidov roda *Thinodromus* I vidov roda *Carpelimus* iz podrodov *Carpelimus* s.str., *Paratrogophloeus*, *Bucephalinus* (Coleoptera, Staphylinidae). *Izvestiia Smolenskogo Gosudarstvennogo Universiteta* 2(6): 25-42.
- Gildenkov M Y 2009b. Novye dannye o rasprostraneni v Palearktike vidov roda *Carpelimus* iz podrodov *Myopinus*, *Trogophloeus*, *Troginus* (Coleoptera, Staphylinidae). *Izvestiia Smolenskogo Gosudarstvennogo Universiteta* 3(7): 237-255.
- Gildenkov M Y 2014. New data on the Japanese fauna of *Carpelimus* Leach, 1819 (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae). *Amurian zoological journal* VI (4): 357-364.
- Gildenkov M Y 2019a. Two new species of the genus *Carpelimus* Leach, 1819 from Malaysia (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae). *Russian Entomological Journal*. 28(4): 370–372.
- Gildenkov M Y 2019b. A new species of the genus *Carpelimus* Leach, 1819 (Coleoptera, Staphylinidae, Oxytelinae) from South Africa. *Euroasian Entomological Journal*. 18(5): 355–356.
- Gildenkov M Y 2020a. NEW DATA ON THE NEW GUINEA FAUNA OF *CARPELIMUS* LEACH, 1819 (COLEOPTERA: STAPHYLINIDAE: OXYTELINAE). *AMURIAN ZOOLOGICAL JOURNAL*. 12(3): 369-377.
- Gildenkov M Y 2020b. Two New Species of the Genus *Carpelimus* Leach, 1819 (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae) From Vietnam. *Far Eastern Entomologist*. 407: 1-7
- Gildenkov M Y 2020c. Eight new species of the genus *Carpelimus* Leach, 1819 from Indonesia (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae). *Russian Entomological Journal*. 29(1): 53–60.
- Gildenkov M Y, Tronquet M 2019. A new species of the genus *Carpelimus* Leach, 1819 (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae) from Cyprus. *Baltic Journal of Coleopterology*, 19(1): 71–75.
- Heyden L 1890. Beiträge zur Coleopteren-Fauna von Amasia und Samsoun in Nord-Kleinasien. – *Deutsche Entomologische Zeitschrift*: 361-374.
- Lee J S, Ahn K J 2019. Description of a new species of *Carpelimus* Leach (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae) in Korea. *Coleopterists Bulletin*, 73(4): 1093–1097.
- Newton A F 2019. StaphBase: Staphyliniformia world catalog database (version Nov 2018). In: *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2019 Annual Checklist* (Roskov Y., Ower G., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds.). Digital resource at www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2019. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands.
- Özgen I, Anlaş S, Eren S 2010. Contribution to the knowledge of Staphylinidae (Coleoptera) fauna of cotton and pistachio fields in Southeastern Anatolia. *Journal of Anatolian Natural Sciences* 1 (1): 20-26.
- Tezcan S, Anlaş S 2009. Notes on the light trap collected rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae) of the integrated cherry orchards of western Turkey. *Turkish Journal of Entomology* 33: 3-11.
- Schülke M, Smetana A 2015. Staphylinidae. In: Löbl I, Löbl D (editors). *Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Volume 2. Hydrophiloidea Staphyloidea*. Revised and Updated Ed. Leiden, the Netherlands: Brill, pp. 304-1134.
- Sert O, Turan Y, Fırat S, Şabanoğlu B, Kabalak M 2014. Faunistical, Ecological and Zoogeographical Assessments on Some Subfamilies of The Family Staphylinidae (Coleoptera) in Ankara Province. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*. 42 (4): 517-529.

Kahramanmaraş Koşullarında Arpada Çiçeklenme-Olgunlaşma Döneminde Bazı Fizyolojik Özelliklerin İncelenmesi

Cengiz YÜRÜRDURMAZ^{1*}, Ayşe KURT², Rukiye KARA³, Aydın AKKAYA⁴

^{1,2,4}Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, ³Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Kahramanmaraş

¹<http://orcid.org/0000-0002-3407-0184>, ²<https://orcid.org/0000-0003-0887-2519>, ³<https://orcid.org/0000-0003-1493-8473>

⁴<http://orcid.org/0000-0001-9560-1922>,

✉: Cengiz.yururdurmaz@gmail.com

ÖZET

Bu çalışma, 2015-2017 üretim sezonunda, Kahramanmaraş Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü arazisinde yürütülmüştür. Araştırmada 10 adet arpa genotipi (Akhisar 98, Martı, Lord, G158P003, Kıral 97, Kendal, Altıkat, Bürküt, Troya ve Zeus) kullanılmış ve deneme tesadüf blokları planına göre 4 tekrarlamalı olarak kurulmuştur. Çiçeklenme döneminde bayrak yaprak alanı ve klorofil içeriği, çiçeklenmenin tamamlandığı dönemde bitki örtüsü sıcaklığı, tane doldurma döneminde net fotosentez hızı, stoma iletkenliği ve transpirasyon hızı ölçülmüş ve hasatta tane verimi belirlenmiştir. Bayrak yaprak alanı, net fotosentez hızı, stoma iletkenliği ve transpirasyon hızı yönünden genotipler arasındaki farklar önemli olmamıştır. Lord (41.23), Bürküt (42.49) ve Troya (41.96) çeşitleri en yüksek bayrak yaprak klorofil içeriğine, Lord (19.25°C) çeşidi en düşük bitki örtüsü sıcaklığına sahip olmuşlardır. En yüksek tane verimi Troya (625.5 kg^{da}) çeşidinden elde edilmiştir. Tane verimi ile; transpirasyon hızı ve bayrak yaprak klorofil içeriği arasında olumlu ve önemli, stoma iletkenliği arasında olumsuz ve önemli ilişki olduğu saptanmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 15.02.2021

Kabul Tarihi : 27.04.2021

Anahtar Kelimeler

Arpa

Genotip

Tane Verimi

Fizyolojik Özellikler

Investigation of Some Physiological Traits During Anthesis-Maturing Period of Barley in Kahramanmaraş Conditions

ABSTRACT

This research was carried out in 2015-2017 growing season in East Mediterranean Transitional Zone Agricultural Research of Institute. Ten barley genotypes (Akhisar 98, Martı, Lord, G158P003, Kıral 97, Kendal, Altıkat, Bürküt, Troya ve Zeus) were used in an experiment established as randomized complete block design with four replications. The flag leaf area and chlorophyll content at anthesis, plant canopy temperature at the end of anthesis, net photosynthesis rate, stomatal conductance and transpiration rate at grain filling period and grain yield at harvest were determined. There were no significant differences among genotypes for the flag leaf area, net photosynthesis rate and transpiration rate. The cultivars Lord (41.23), Bürküt (42.49) and Troy (41.96) had the highest flag leaf chlorophyll content, Lord (19.25°C) variety had the lowest vegetation temperature. The highest grain yield was obtained from Troya (625.5 kg^{ha}) cultivar. There were significant and positive relationships between grain yield and; transpiration rate and flag leaf chlorophyll content, and a negative and significant relationship between stomatal conductance.

Research Article

Article History

Received : 15.02.2021

Accepted : 27.04.2021

Keywords

Barley

Genotype

Grain Yield

Physiological Traits

Atıf İçin: Yürürdurmaz C, Kurt A, Kara R, Akkaya A 2021. Kahramanmaraş Koşullarında Arpada Çiçeklenme-Olgunlaşma Döneminde Bazı Fizyolojik Özelliklerin İncelenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1304-1314. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.880748>.

To Cite: Yürürdurmaz C, Kurt A, Kara R, Akkaya A 2021. Investigation of Some Physiological Traits During Anthesis-Maturing Period of Barley in Kahramanmaraş Conditions. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1304-1314. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.880748>.

GİRİŞ

Arpa insan ve hayvan beslenmesinde kullanılan, buğdaydan sonra en fazla üretimi yapılan bitkidir. 2020 yılı verilerine göre 403 bin da ekim alanı ve 96.4 bin ton arpa üretimi olan Kahramanmaraş'ta arpa verimi 239 kg^{da}'dır (Anonim 2021). Dekara verimin düşük olmasının nedeni, bölgeye uygun olmayan genotiplerin yetiştirilmesi ve yanlış yetiştirme tekniklerinin uygulanması ile yerel ve uzun boylu genotiplerin kullanılması verimi kısıtlayan en önemli unsurlardır.

Buğdaya göre, yaprak özgül ağırlığı daha düşük olması nedeniyle arpada yaprak büyüme hızı ve erken dönem gelişme hızı daha yüksektir (Lopez-Castaneda ve ark., 1995; Amanullah, 2015). Başaklanma ve olgunlaşma dönemleri, ekolojilere göre değişmekle beraber, buğdaydan yaklaşık bir ay kadar önce olabilmektedir (Çölkesen ve ark., 1999). Tane doldurma dönemi, çoğunlukla serin ve yağışlı iklim koşullarında gerçekleşmekte, yüksek sıcaklık ve kuraklığın etkili olduğu dönem başlamadan tane doldurmayı tamamlamaktadır. Arpanın buğdaya göre vejetasyon süresini daha erken tamamlaması, Akdeniz İklim kuşağı ve Kahramanmaraş koşulları için önemli bir özelliktir. Çünkü bu iklim kuşağında, buğdayın tane doldurma döneminde yüksek sıcaklık ve kuraklık etkili olmakta, sulama imkânı olmayan koşullarda, tane verimi önemli ölçüde düşmektedir. Buğdaya göre tarlayı erken boşaltması ve ikinci ürün tarımına daha uzun süreli fırsat vermesi, kışlık yetiştiriciliğinin bölgede risk taşımaması gibi diğer özellikler nedeniyle de arpa bölge için ideal bir münavebe bitkisidir. Çeşitli geliştirme çalışmalarında agronomik özellikler yanında fizyolojik özellikler üzerinde de durulmaktadır. Fotosentez, kültür bitkilerinde tane verimi ve kuru madde üretiminin ana kaynağıdır. Aynı zamanda ürünün büyümesini ve gelişmesini sürdürmek için de önemli bir süreçtir (Mahmood ve ark., 2019). Klorofil içeriği gibi fotosentetik özelliklerin ölçülmesinin, bitki büyümesi ve verimi üzerindeki çevresel stresin etkisini tahmin edebileceği bildirilmiştir (Guo ve Li 1996; Fracheboud ve ark., 2004). Bayrak yaprağı, başaklara kısa mesafede olması ve yaprakların geri kalanından daha uzun süre yeşil kalması nedeniyle tane dolumu ve verimi için birincil karbonhidrat kaynağıdır (Li ve ark., 1998). Bayrak yaprağının fizyolojik ve morfolojik özelliklerinin verim üzerindeki rolünün anlaşılması, mahsulün büyümesi ve gelişmesinde yeni bir bakış açısı sağlayacaktır (Duke, 1983). Yüksek sıcaklıklarda, buğday genotipleri arasında net fotosentez hızı yönünden görülen farkların klorofil a:b oranındaki değişimlerle ilişkili olduğu (Al-Khatib ve Paulsen, 1984; Harding ve ark., 1990), net fotosentez hızındaki varyasyonların, sıcak koşullarda buğday verimini önemli düzeyde etkilediği bildirilmiştir (Reynolds ve ark., 2000). Yaprak yeşil kalma süresinin

kurak koşullarda seleksiyon kriteri olarak kullanılabileceği (Çekiç, 2007), tritikale genotiplerinde verim ve klorofil parametreleri arasında önemli ilişkiler bulunduğu belirtilmiştir (Hura ve ark., 2009). Tane dolum döneminde yapraklar tarafından yapılan fotosentez yanında başak tarafından yapılan fotosentezin de verime katkı sağladığı (Tambussi ve ark., 2007), stresler nedeniyle fotosentezin azalması halinde yapısal olmayan depo maddelerinin taneye taşındığı (Bingham ve ark., 2009), yeterli asilimat üretilmediği durumda tane ağırlığının önemli düzeyde azaldığı sonucuna varılmıştır (Serrago ve ark., 2013). Bu çalışmada, 10 adet arpa genotipi 2015-2017 üretim sezonlarında, çiçeklenme-olgunlaşma dönemleri arasında tane verimi ile fizyolojik özellikler incelenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Kahramanmaraş koşullarında 2015-2017 ürün yıllarında yürütülmüş olan bu çalışmada, materyal olarak, 10 adet arpa genotipi (Akhisar 98, Martı, Lord, G158P003, Kırıl 97, Kendal, Altıkay, Bürküt, Troya ve Zeus) kullanılmış (Çizelge 1) ve deneme tesadüf blokları deneme planına göre 4 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Genotiplerin ekimi Kahramanmaraş Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü arazisine ilk yıl 28.12.2015, ikinci yıl 06.12.2016 tarihinde, metrekaareye 450 tane düşecek şekilde, 1,2x8,3 m ebatlarındaki parsellere, parsel ekim makinesiyle yapılmıştır. Her parsel 6 bitki sırası içerilmiş olup, ekimle beraber dekara saf 7 kg N ve P₂O₅ olacak şekilde 20-20-0 kompoze gübre, üst gübre olarak ta saf 8 kg N^{da} olacak şekilde Amonyum Nitrat kullanılmıştır. Her iki deneme yılında da sulama yapılmamış, yabancı ot mücadelesi yabancı ot ilacı kullanılarak yapılmıştır.

Kahramanmaraş ilinin uzun yıllar ortalaması olarak (1960-2015) ve denemenin yapıldığı 2015-2017 üretim sezonlarında, Ekim - Haziran dönemi aylık ortalama sıcaklık ve yağış değerleri Çizelge 2'de verilmiştir (Anonim, 2017). Çizelge 2'den görüldüğü gibi, Kahramanmaraş'ta uzun yıllar ortalamasına göre yıllık yağış miktarı 720.3 mm'dir. Araştırmanın yürütüldüğü 2015-16 ve 2016-17 ürün yıllarındaki yıllık toplam yağışlar sırasıyla 354.9 ve 533.3 mm olmuştur. Uzun yıllar ortalamasına göre, birinci ürün yılında 365.4 mm, ikinci ürün yılında ise 187.0 mm daha az yağış düşmüştür. Yağışın miktarı yanında, vejetasyon periyodu içerisindeki dağılımı da yıllar arasında önemli farklılık göstermiştir. Şubat aylarında birinci ve ikinci yılda, uzun yıllar ortalamasından oldukça düşük miktarda yağış meydana gelmiştir (Çizelge 2). Bitkilerin generatif gelişme (gebecik, başaklanma, çiçeklenme, döllenme, tane dolumu) gösterdikleri Mart, Nisan ve Mayıs aylarındaki yağış miktarı bakımından ise (ikinci ürün yılı Mayıs ayı hariç) her iki ürün yılındaki yağış

miktarı uzun yıllar ortalamasından daha az olmuştur. Uzun yıllar ortalamasına göre, Kahramanmaraş'ta yıllık ortalama sıcaklık 13.4 °C'dir. Araştırmanın yürütüldüğü 2015-16 ve 2016-17 ürün yıllarındaki yıllık ortalama sıcaklık değerleri sırasıyla 15.2 °C ve 13.5 °C olmuştur. Birinci yıl, ikinci yıl ve uzun yıllar ortalamasına göre daha yüksek sıcaklığa sahip olmuştur. Her iki ürün yılı da uzun yıllar ortalamasına göre, daha yüksek yıllık ortalama sıcaklığa sahip olmuştur. Yörede uzun yıllar ortalamasına göre yıllık ortalama nispi nem % 60.7'dir. Araştırmanın birinci ve ikinci ürün yıllarındaki yıllık nispi nem değerleri ise,

sırasıyla % 50.5 ve % 52.3 olmuştur.

Denemenin yürütüldüğü arazinin 0-30 cm derinliğinden alınan toprak örneklerinin analiz sonuçlarına göre topraklar killi-tınlı tekstüre ve hafif alkali reaksiyona sahiptir. Makro besin elementlerinden fosfor ve potasyum orta derecede yeterli, kalsiyum fazla, magnezyum çok fazladır. Mikro besin elementleri az veya yetersiz düzeyde, organik madde içeriği yönünden toprak fakir durumdadır (Çizelge 3).

Çizelge 1. Denemede kullanılan genotipler ve bazı özellikleri

Table 1. Genotypes used in the research and some of their characteristics

Genotipler	Gelişme Tabiatı	Bitki Boyu	Başak Tipi	Menşei
Akhisar-98	Yazlık	85-95 cm	6 sıralı	Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Martı	Alternatif	85-90 cm	6 sıralı	Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Lord	Kışlık	100-110 cm	6 sıralı	Tareks A.Ş.
G158P003	Yazlık		6 sıralı	İleri kademe hat
Kıral 97	Alternatif	70-80 cm	6 sıralı	Bahri Dağdaş Uluslararası Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Kendal	Yazlık	Orta uzunlukta	6 sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi
Altıkat	Yazlık	Orta uzunlukta	6 sıralı	GAP Uluslararası Tarımsal Araştırma ve Eğitim Merkezi
Bürküt	Yazlık	103-110 cm	6 sıralı	Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Troya (Egebeyi)	Yazlık	105-110 cm	6 sıralı	Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü
Zeus	Kışlık	Orta uzunlukta	2 sıralı	Progen Tohum A.Ş.

Çizelge 2. Deneme yılı ve uzun yıllar (1960-2015) ortalamasına ait bazı iklim verileri

Table 2. Some climate data belong to research and long terms (1960-2015)

Aylar	Yağış (mm)			Sıcaklık (°C)			Nispi Nem (%)		
	2015-2016	2016-2017	Uzun Yıllar (1960-2015)	2015-2016	2016-2017	Uzun Yıllar	2015-2016	2016-2017	Uzun Yıllar
Ekim	35.3	10.7	45.4	20.3	20.5	19.0	55.5	41.0	54.0
Kasım	15.4	36.8	82.9	13.7	11.1	11.8	43.0	49.5	63.1
Aralık	20.0	105.0	131.0	8.4	4.5	6.8	45.8	67.9	70.4
Ocak	140.6	126.7	128.5	4.1	3.8	4.9	65.7	65.9	70.1
Şubat	30.3	3.7	114.5	11.0	7.4	6.4	60.9	44.0	66.6
Mart	61.3	74.5	96.2	12.8	12.2	10.6	50.3	55.4	60.4
Nisan	17.6	67.8	74.7	19.3	15.8	15.4	41.5	49.0	58.0
Mayıs	16.5	105.0	40.4	20.6	19.6	20.3	49.4	55.0	54.5
Haziran	17.9	3.1	6.7	26.8	26.4	25.2	42.3	42.9	49.1
Toplam	354.9	533.3	720.3						
Ortalama				15.2	13.5	13.4	50.5	52.3	60.7

Table 3. Some physical and chemical properties of soil of trial area

Çizelge 3. Deneme alanı topraklarının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

OM (%)	Kireç (%)	pH	EC mS.cm ⁻¹	Kum %	Kil %	Silt %	Bünye
0.65	15.71	7.52	1.63	48.0	26.72	25.28	Killi-Tınlı
P	K	Ca	Mg	B	Fe	Cu	Zn
12.52	167.5	4427.5	1570	0.257	0.99	0.32	0.09

Araştırmada, Koç ve ark., (2003), Kuşcu, (2006), Bahar ve ark., (2008), Koç ve ark., (2008), Hui ve ark., (2008), Kara, (2009) ve Kara, (2016) tarafından uygulanan yöntemler esas alınarak; bayrak yaprak alanı (cm²),

bayrak yaprak klorofil içeriği (SPAD), bitki örtüsü sıcaklığı (°C), net fotosentez hızı (µmol CO₂ m⁻²s⁻¹), stoma iletkenliği (mol m⁻²s⁻¹), transpirasyon hızı (mmol H₂O m⁻² s⁻¹) ve tane verimi (kg/da)

belirlenmiştir. Sonuçlara ait istatistiksel hesaplamalarda SAS paket programı kullanılmıştır (SAS, 1999). Yapılan araştırmada incelenen tüm özelliklerde yıllara ait varyanslar Barlett (JMP 7.0) homojenite testi uygulanmış, klorofil içeriği, transpirasyon hızı ve tane verimi için önemli, diğer özellikler için ise önemsiz farkların çıkması nedeniyle yıllar hem ayrı ayrı hemde birlikte değerlendirilmiştir.

Bayrak Yaprak Alanı

Bayrak yaprak alanı yönünden genotipler arasındaki farklar her iki yıl, iki yıllık ortalamalar, yıllar ve yıl x genotip etkisi bakımından önemsiz olmuştur. Bayrak yaprak alanları ilk yıl 10.34-13.98 cm², ikinci yıl 9.94-13.75 cm² arasında değişmiş, genotipler arasındaki fark önemli olmamıştır (Çizelge 4). İlk yıl

Lord ve Troya çeşitleri 13 cm² üzerinde olurken, Kırıl-97, Altıkat ve Bürküt genotipleri 12 cm²'nin altında bayrak yaprak alanına sahip olmuştur. İkinci yılda Bürküt, Troya, Lord ve Kırıl-97 çeşitleri 13 cm² nin üzerinde en yüksek yaprak alanına sahip çeşitler olurken, Martı çeşidi 9.94 cm² ile en düşük yaprak alanına sahip çeşit olmuştur. Çukurova koşullarında yapılan bir çalışmada, yaprak alanı yönünden genotipler arasındaki farkların önemsiz (Genç ve ark., 1994), diğer iki çalışmada ise önemli olduğu sonucuna varılmıştır (Bahar, 2004; Kuşcu, 2006). Kahramanmaraş koşullarında ekmeclik buğday çeşitleriyle yapılan çalışmada, ana sap yaprak alanı yönünden genotipler arasındaki fark bir yıl önemsiz, diğer yıl önemli olmuş (Kara, 2009), kışlık buğday ve arpada özgül yaprak alanının yıllara göre değiştiği tespit edilmiştir (Sieling ve ark., 2016).

Çizelge 4. Arpa Genotiplerine Ait Ortalama bayrak yaprak alanı (BYA) ve bayrak yaprak klorofil içeriği (BYKİ)
Table 4. Flag leaf area (BYA) and flag leaf chlorophyll content (BYKİ) of barley genotypes

Genotipler	BYA (cm ²)			BYKİ (SPAD)		
	2015-2016	2016-2017	Ortalama	2015-2016	2016-2017	Ortalama
Akhisar-98	12.44±0.31	12.87±1.13	12.65±0.55	49.15±1.66	31.25±0.53	40.20±3.48 ab
Martı	12.33±1.57	9.94±0.72	11.13±0.92	50.52±0.94	30.85±0.28	40.69±0.37 ab
Lord	13.98±0.66	13.45±1.33	13.71±0.69	50.77±1.97	31.68±0.46	41.23±0.37 a
G158P003	12.39±1.82	11.19±.121	11.79±1.03	47.52±3.77	32.20±0.96	39.86±3.41 ab
Kırıl-97	11.98±3.09	13.24±.126	12.61±1.56	47.37±4.99	31.15±0.38	39.26±0.38 ab
Kendal	12.03±1.28	11.22±1.81	11.63±1.04	45.52±1.45	31.90±1.14	38.71±2.71 ab
Altıkat	11.45±1.27	11.07±2.03	11.26±1.11	47.87±3.13	31.55±0.83	39.71±3.43 ab
Bürküt	11.54±0.87	14.11±1.78	12.83±1.04	51.12±1.87	33.85±2.25	42.49±3.54 a
Troya	13.04±1.98	13.75±1.92	13.39±1.28	50.97±2.46	32.95±2.11	41.96±0.37 a
Zeus	10.34±0.86	12.39±1.79	11.37±1.00	41.87±2.93	30.63±0.17	36.25±2.52 b
Ortalama	12.15	12.32	12.24	48.7 a	31.8 b	40.25
	ns	ns	ns	ns	ns	*
CV	24.7	25.5	25.1	11.7	5.8	10.5

Bayrak Yaprak Klorofil İçeriği

Yaprakların toplam klorofil miktarını temsil eden ve SPAD 502 cihazıyla ölçülen SPAD değerleri incelendiğinde, genotipler arasındaki farklar her iki yılda önemsiz olmuş, iki yıllık ortalamalara ve yıllara göre ise önemli olmuştur (Çizelge 4). Her iki yılda da Bürküt çeşidi en yüksek (birinci yıl 51.12, ikinci yıl 33.85), Zeus çeşidi en düşük (birinci yıl 41.87, ikinci yıl 30.63) SPAD değerine sahip olmuştur. İki yıllık ortalamalara göre Bürküt, Troya ve Lord çeşitleri yüksek bayrak yaprak klorofil içeriğine sahip çeşitler olurken, en düşük değere sahip Zeus çeşidi hariç diğer genotipler aynı grupta yer almışlardır. Çukurova koşullarında yapılan çalışmada ortalama bayrak yaprak klorofil içeriği, bu araştırmadan elde edilen sonuçlara benzer şekilde, ortalama 49.5 mg m² olarak belirlenmiştir (Yıldırım, 2005). Bayrak yaprak klorofil içeriği yönünden sonuçlar kararlı olmayıp, genotipler arasındaki farkın bir yıl önemli, diğer yıl önemsiz olduğu (Kuşcu, 2006), ekmeclik ve makarnalık buğdaylarda önemli olduğu (Bahar, 2004), Konya'da

önemli (Yeğin, 2012), Mardin ve Diyarbakır koşullarında önemsiz olduğu (Kızılgöçü ve ark., 2016) şeklinde sonuçlara varılmıştır. Kurak koşullarda yapraklarını uzun süreyle yeşil tutabilen arpa genotiplerinin, karbonhidrat sentezini sürdürdüğü, dolayısıyla yüksek verime sahip olduğu bildirilmiştir (Gous ve ark., 2013).

Bitki Örtüsü Sıcaklığı

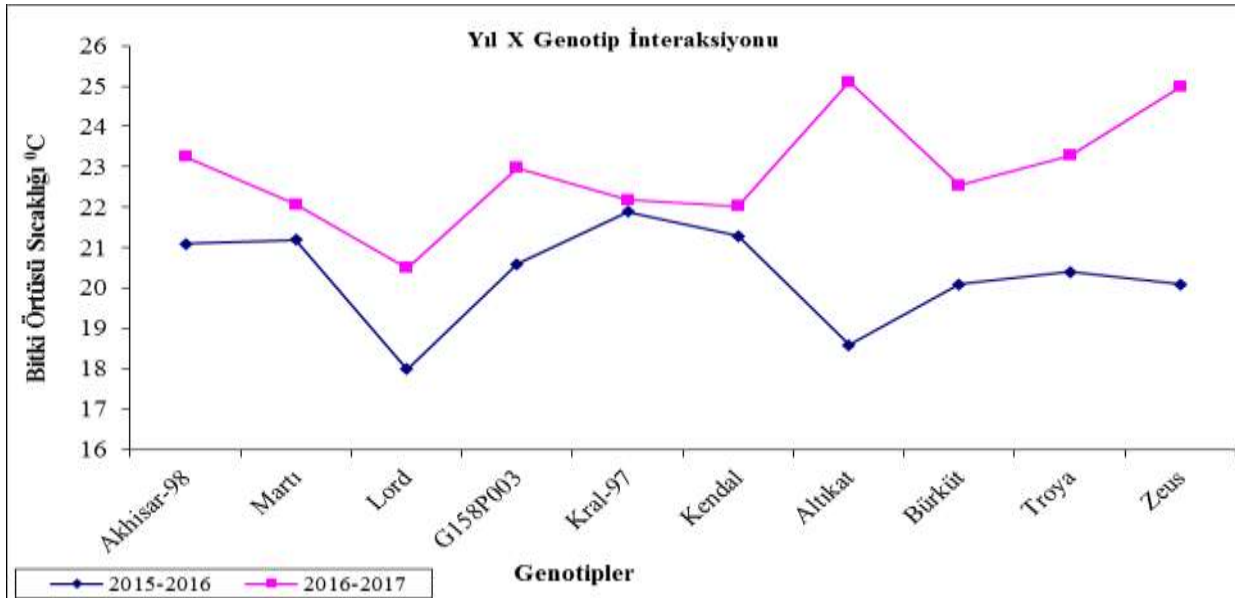
Bitki örtüsü sıcaklığı yönünden her iki yıl ve iki yıllık ortalamalara göre genotipler arasındaki farklar önemli bulunmuş (P<0.05), en düşük bitki örtüsü sıcaklığı her iki yılda ve iki yıllık ortalamalara göre Lord çeşidinde ölçülmüştür (Çizelge 5). Lord ve Altıkat (ikinci yıl hariç) çeşitleri bu özellik yönünden öne çıkmış, diğer genotipler 20 °C üzerinde sıcaklıklara sahip olmuştur. İki yıllık ortalama değerlere göre yıllar arasındaki fark (P<0.01) ve yıl x genotip etkisi (P<0.05) seviyesinde istatistikî olarak önemli bulunmuştur. İkinci yılda tüm genotiplerin bitki örtüsü sıcaklıklarında artışlar olmuş ve yıllar

arasındaki fark önemli olmuştur. Bitki örtüsü sıcaklığı ilk yıl 20.3 °C, ikinci yıl 22.9 °C olmuştur. Arpa genotipleri arasındaki farkların önemli olduğu, Mardin koşullarında sıcaklık değerlerinin 14.65-18.77 °C arasında, Diyarbakır koşullarında 22.30-24.23 °C arasında değiştiği tespit edilmiştir (Kızılgöçü ve ark., (2016). Bitki örtüsü sıcaklığına dayalı fizyolojik özelliklerin, seleksiyon kriteri olarak önemli rol oynayacağı (Bahar ve ark., 2008), düşük yaprak sıcaklığına sahip genotiplerin seçilmesiyle, toprak nemini daha etkili kullanabilen buğday çeşitlerinin geliştirilmesinin mümkün olabileceği belirtilmiştir (Hui ve ark., 2008).

Genotiplerin, bitki örtüsü sıcaklığı yönünden yıllara göre kararlı bir durum göstermemeleri, yıl x genotip interaksyonunun önemli çıkmasına neden olmuştur (Şekil 1). Birinci yılda ölçüm yapılan tarihte sıcaklıkların, ikinci yıl sıcaklığından daha düşük olmasından dolayı, genotiplerde bitki örtüsü sıcaklık değerleri ilk yıl, ikinci yıldan daha düşük olmuştur (Çizelge 5 ve Şekil 1). Ölçümün yapıldığı andaki sıcaklık artışına bağlı olarak bitki örtüsü sıcaklıklarının da arttığı, bitki örtüsü sıcaklığı değerlerinin, stresli koşullarda stressiz koşullara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Araghi ve Assad, 1998).

Çizelge 5. Arpa Genotiplerine Ait Ortalama bitki örtüsü sıcaklığı (BÖS), net fotosentez hızı (NFH)
Table 5. Canopy temperature (BOS) and net photosynthetic rate (NFH) of barley genotypes

Genotipler	BÖS (°C)			NFH (µmolCO ₂ /m ² /s)		
	2015-2016	2016-2017	Ortalama	2015-2016	2016-2017	Ortalama
Akhisar-98	21.1±0.78 ab	23.25±0.81 abc	22.18±0.66 a	9.31±0.94	12.52±0.97	10.91±0.87
Martı	21.2±0.60 ab	22.08±0.42 bc	21.64±0.38 a	10.68±0.82	11.95±0.50	11.32±0.51
Lord	18.0±0.93 c	20.50±0.20 c	19.25±0.65 b	10.65±1.12	12.77±0.89	11.71±0.78
G158P003	20.6±0.48 abc	22.98±0.79 abc	21.79±0.62 a	12.37±1.16	9.50±0.27	10.94±0.77
Kıral-97	21.9±0.92 a	22.18±0.78 abc	22.04±0.56 a	12.56±1.14	10.09±1.21	11.32±0.90
Kendal	21.3±1.17 a	22.03±0.57 bc	21.68±0.62 a	11.77±0.81	11.83±1.03	11.80±0.61
Altıkat	18.6±1.29 bc	25.10±1.47 a	21.86±1.52 a	11.00±1.32	11.35±1.20	11.18±0.83
Bürküt	20.1±0.52 abc	22.55±0.49 abc	21.34±0.56 a	11.89±0.36	11.94±1.13	11.92±0.55
Troya	20.4±1.27 abc	23.28±0.72 abc	21.83±0.87 a	11.96±0.78	11.25±0.31	11.61±0.41
Zeus	20.1±1.56 abc	24.98±1.90 ab	22.51±1.47 a	11.79±0.83	10.60±0.66	11.20±0.54
Ortalama	20.3 b	22.9 a	21.6	11.4	11.3	11.35
	*(P<0.05)	*	*	ns	ns	ns
CV	7.93	7.9	7.92	15.8	15.9	15.8



Şekil 1. Bitki Örtüsü Sıcaklığı Yönünden Yıl x Genotip İnteraksiyonu
Figure 1. Year x Genotypes interaction by canopy temperature

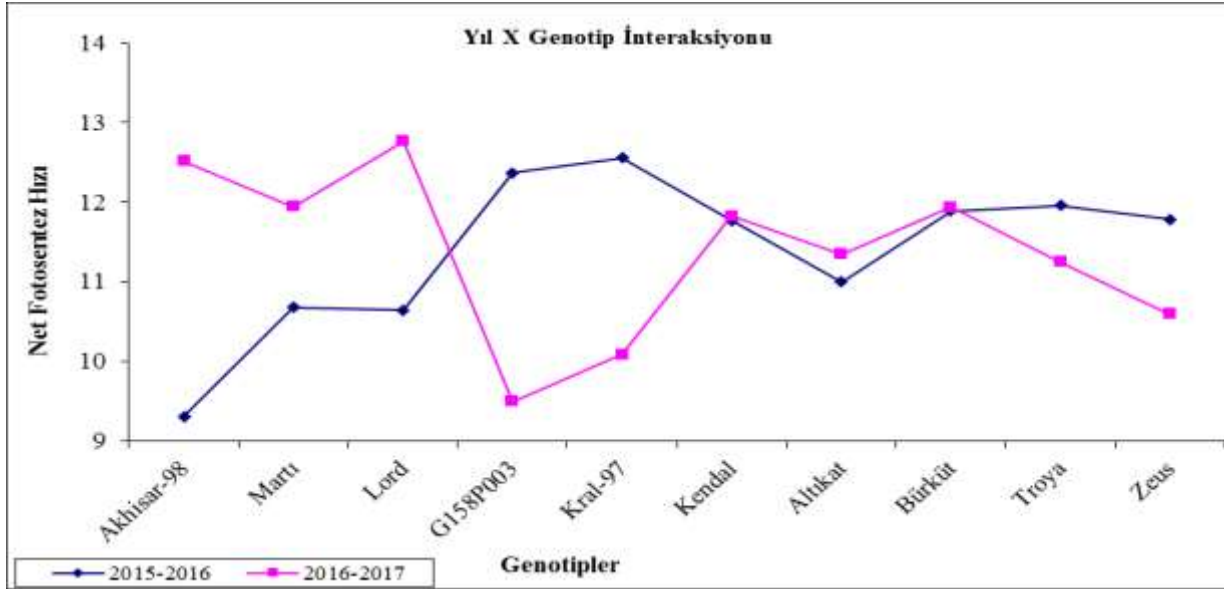
Net Fotosentez Hızı

Net fotosentez hızı yönünden, varyans analizine göre genotipler arasındaki farklar önemli olmamıştır (Çizelge 5). Net fotosentez hızı yönünden yıl x genotip interaksyonu % 5 seviyesinde önemli bulunmuştur

(Şekil 2). Birinci yıl en yüksek net fotosentez hızı 12.56 µmol CO₂ m⁻²s⁻¹ olarak Kıral-97 genotipinde ölçülmüş, bunu az bir farkla G158P003 genotipi izlemiştir. İkinci yıl ve iki yıllık ortalamalara göre Bürküt çeşidi en yüksek net fotosentez hızına sahip

çeşit olmuştur. Net fotosentez hızı yönünden genotipler arasındaki farkların laboratuvar koşullarında önemli, tarla koşullarında önemsiz olduğu (Koç, 1993), genotiplerin yakın sonuçlar verdiği belirlenmiştir (Genç ve ark., 1994). Bayrak yaprak fotosentez hızının verimle ilişkili olduğu (Koç ve ark., 2003), tamamlayıcı seleksiyon kriteri olarak kullanılabilmesi (Koç ve ark., 2008), stres koşullarının fotosentezi dolayısıyla tane ağırlığını düşürdüğü şeklinde sonuçlar elde edilmiştir (Serrago ve ark., 2013).

Net fotosentez hızı yönünden yıl x genotip interaksyonunu %5 seviyesinde önemli bulunmuştur. Genotiplerin çoğu yıllara göre kararlı bir durum göstermesine karşılık, G158P003, Kıral-97, Troya ve Zeus genotipleri bu duruma farklı tepki göstermişler ve yıl x genotip interaksyonunun önemli çıkmasına neden olmuşlardır (Şekil 2). Ayrıca, ilk yılda G158P003, Kıral-97, Troya ve Zeus çeşidi dışındaki genotipler, birinci ürün yılında ikinci ürün yılına göre daha yüksek net fotosentez hızına sahip olurken, bu genotiplerde ise bunun tersi bir durum söz konusu olmuştur.



Şekil 2. Net Fotosentez Hızı Yönünden Yıl x Genotip İnteraksiyonu
Figure 2. Year x Genotypes interaction by net photosynthetic rate

Stoma İletkenliği

Genotipler arasındaki farklar önemli olmamış, stoma iletkenliği birinci yıl 0.107 ile 0.170 mol m⁻²s⁻¹ arasında değişmiş, G158P003 genotipi en yüksek, Martı çeşidi en düşük değere sahip olmuştur (Çizelge 6). En yüksek stoma iletkenliği ikinci yılda Lord, iki yıllık ortalamalara göre ise Kıral-97 çeşidinde belirlenmiştir. Tane dolum döneminde, ikinci yılda tüm genotiplerin stoma iletkenliklerinde artışlar olmuş ve yıllar arasındaki fark önemli olmuştur (P≤ 0,01). Stoma iletkenliği, ilk yıl 0.144 mol m⁻² s⁻¹, ikinci yıl 0.215 mol m⁻² s⁻¹ olmuştur. Kahramanmaraş koşullarında tritikale genotipiyle yapılan çalışmada, stoma iletkenliği yönünden, genotipler arasındaki farkın önemli olmadığı, ortalama stoma iletkenliğinin 0.190-0.267 mol m⁻²s⁻¹ arasında değiştiği tespit edilmiştir (Kara, 2016). Sıcaklık stresi altındaki buğday genotiplerinde, stoma iletkenliğinin 0.277-0.357 mol H₂O m⁻² s⁻¹ arasında değiştiği (Koç ve ark., 2008), ekmeçlik ve makarnalık buğday genotipleri arasındaki farkların yıllara ve çevrelere göre, önemli veya önemsiz olduğu (Bahar, 2004), erken dönemde yapılan ölçümlerde, genotipler arasındaki farkların bir yıl önemli, diğer yıl önemsiz olduğu şeklinde sonuçlar

tespit edilmiştir (Kuşcu, 2006).

Transpirasyon Hızı

Transpirasyon hızı yönünden arpa genotipleri arasındaki farklar önemli olmamış (Çizelge 6), birinci yıl Kıral-97 çeşidi en yüksek (3.73 mmol H₂O m⁻² s⁻¹), Martı çeşidi en düşük (2.66 mmol H₂O m⁻²s⁻¹) transpirasyon hızına sahip olmuştur (Çizelge 6). İkinci yılda Troya çeşidi en yüksek, G158P003 genotipi en düşük transpirasyon hızına sahip olmuştur. Bu araştırmanın sonucuna benzer şekilde, Çukurova ve Kahramanmaraş koşullarında yapılan çalışmalarda transpirasyon hızı bakımından genotipler arasındaki farkların önemli olmadığı sonucuna varılmıştır (Genç ve ark., 1994; Dalkılıç ve ark., 2016). Kahramanmaraş koşullarında tritikale genotipiyle yapılan başka bir çalışmada, iklim koşullarının transpirasyon hızı üzerindeki etkisinin genotiplere göre değişen bir trend gösterdiği sonucuna varılmıştır (Kara, 2016). Transpirasyon hızı bakımından yıllar arasındaki fark %1 seviyesinde istatistikî olarak önemli bulunmuştur. Genotiplerin ortalaması olarak, transpirasyon hızı ilk yıl 3.35 mmol H₂O m⁻² s⁻¹, ikinci yıl 2.22 mmol H₂O m⁻² s⁻¹ olmuştur.

Çizelge 6. Arpa Genotiplerine Ait Ortalama stoma iletkenliği (SI) ve transpirasyon hızı (TH)
 Table 6. Stomatal conductance (SI) and transpiration rate (TH) of barley genotypes

Genotipler	SI (mol/m ² /s)			TH (mmolH ₂ O/ m ² /s)		
	2015-2016	2016-2017	Ortalama	2015-2016	2016-2017	Ortalama
Akhisar-98	0.147±0.03	0.22±0.03	0.19±0.03	3.32±0.57	2.35±0.39	2.84±0.37
Martı	0.107±0.02	0.22±0.02	0.16±0.03	2.66±0.22	2.26±0.18	2.47±0.15
Lord	0.122±0.02	0.25±0.02	0.18±0.03	3.02±0.42	2.29±0.21	2.65±0.26
G158P003	0.170±0.01	0.18±0.04	0.17±0.02	3.02±0.30	1.94±0.16	2.83±0.37
Kıral-97	0.167±0.03	0.22±0.03	0.20±0.02	3.73±0.17	2.35±0.27	3.04±0.30
Kendal	0.150±0.03	0.22±0.05	0.19±0.03	3.54±0.57	2.29±0.21	2.92±0.37
Altıkat	0.145±0.03	0.22±0.04	0.18±0.03	3.22±0.46	2.08±0.23	2.65±0.32
Bürküt	0.127±0.01	0.23±0.04	0.18±0.03	3.11±0.26	2.20±0.30	2.66±0.25
Troya	0.147±0.01	0.22±0.02	0.18±0.02	3.51±0.13	2.38±0.08	2.95±0.23
Zeus	0.155±0.01	0.19±0.02	0.17±0.01	3.66±0.37	2.06±0.22	2.86±0.36
Ortalama	0.144 b	0.215 a	0.18	3.35 a	2.22 b	2.79
	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV	20.9	18.9	20.1	22.6	20.9	22.6

Tane Verimi

Tane verimi yönünden arpa genotipleri arasındaki farklar birinci yılda önemsiz bulunmuş (Çizelge 7), ikinci yıl, iki yıllık ortalamalar, yıllar ve yıl x genotip interaksyonu önemli olmuştur (P<0.01). Tane verimi ilk yıl 672-498 kg/da arasında değişmiş, en yüksek tane verimine 672 kg/da ile Troya çeşidi, en düşük tane verimine 498 kg/da ile Zeus çeşidi sahip olmuştur. İkinci yılda Altıkat, Troya, Kıral-97 ve Kendal çeşitleri en yüksek tane verimine sahip çeşitler olmuşlar ve aynı grupta yer almışlardır. İki yıllık ortalamalara göre Troya çeşidi en yüksek, Lord, Zeus ve G158P003 genotipleri ise en düşük tane verimine sahip olmuşlardır. İlk yıl genotiplerin verimi 572.9 kg/da olurken ikinci yıl 461.0 kg/da olmuştur. Akar ve ark. (1999)'a göre Orta Anadolu ve Geçit Bölgelerinde yıllık ortalama yağışın miktarının 400 mm'yi geçtiği yıllarda yatma sebebiyle arpa bitkisinde önemli verim kaybı olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada da buna benzer

şekilde yüksek oranda yağış alınmasına rağmen ikinci yıl genotiplerden elde edilen TV değerleri ilk yılın altında kalmıştır. Bu verim kaybının önemli sebepleri arasında yatma görülmesi sayılabilir. Tane verimi, çevre faktörleri ve yetiştirme teknikleri yanında genetik yapı tarafından da önemli derecede etkilenen bir özelliktir. Kahramanmaraş koşullarında yapılan araştırmalarda arpa çeşitlerinin tane veriminin 367-735 kg/da (Çölkesen ve ark., 2002) ve 426-771 kg/da arasında değiştiği (Çokkızgın ve ark., 2008), ortalama tane veriminin 517 kg/da olduğu ve çeşitler arasındaki farkların önemli olduğu (Turan, 2008) şeklinde sonuçlara varılmıştır. Van koşullarında yapılan çalışmalarda tane verimi yönünden çeşitler arasındaki farkların önemli olduğu (Kaydan ve Yağmur, 2007; Erman ve ark., 2008), Haymana koşullarında arpa genotiplerinin tane verimlerinin 267-625 kg/da arasında değiştiği tespit edilmiştir (Ergün ve Geçit, 2008).

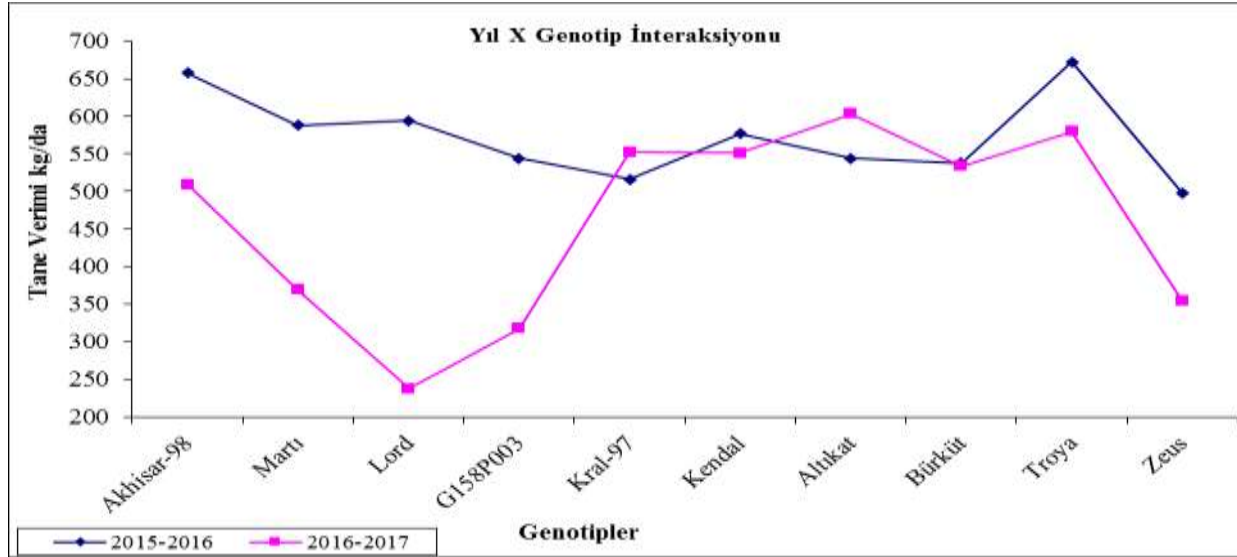
Çizelge 7. Arpa Genotiplerine Ait Ortalama tane verimi (TV)

Table 7. Grain yield (TV) of barley genotypes

Genotipler	TV (kg da)		
	2015-2016	2016-2017	Ortalama
Akhisar-98	657.3±24.88	509.3±24.05 abc	583.3±32.23 ab
Martı	587.6±13.49	369.5±71.22 bcd	478.6±53.14 bc
Lord	594.0±53.49	237.9±22.85 d	416.0±72.55 c
G158P003	544.3±39.46	318.3±32.89 d	431.3±48.89 c
Kıral-97	516.5±60.20	552.6±97.76 a	534.5±53.58 ab
Kendal	577.3±27.06	551.0±76.57 a	564.1±37.92 ab
Altıkat	543.5±29.43	603.2±34.10 a	573.4±23.70 ab
Bürküt	538.5±56.64	533.8±57.34 ab	536.2±37.32 ab
Troya	671.6±4.59	579.4±34.06 a	625.5±23.59 a
Zeus	498.3±34.97	355.0±20.05 cd	426.6±32.88 c
Ortalama	572.9 a	461.0 b	517.0
	(P<0.05)	**	**
CV	13.9	23.9	18.6

Tane verimi bakımından yıl x genotip interaksyonu önemli olmuştur ($P \leq 0.01$). Genotiplerin ürün yıllarındaki koşullara karşı gösterdikleri tepkinin farklı olması nedeniyle yıl x genotip interaksyonu önemli bulunmuştur (Şekil 3). Araştırma, yağmura bağımlı koşullarda yürütüldüğü için arpa yetiştirme sezonu boyunca yağış miktarı tane verimi üzerinde doğal olarak etkili olmuştur. Araştırmanın ikinci

yılında Nisan ve özellikle de Mayıs ayında düşen fazla yağış tane veriminde yatmadan kaynaklı olarak önemli azalış sağlarken, birinci yılda aynı aylardaki yetersiz yağış tane veriminin daha yüksek olmasına neden olmuştur. Şekil 3' de görüldüğü gibi, tane verimi yıllara ve genotiplere göre değişmiş ve yıl x genotip interaksyonunun önemli çıkmasına neden olmuştur.



Şekil 3. Tane Verimi Yönünden Yıl x Genotip İnteraksyonu
Figure 3. Year x Genotypes interaction by grain yield

Araştırmada özellikler arası ilişkiler incelenmiş olup korelasyon tablosu Çizelge 8'te sunulmuştur. Çizelge 8'de görüldüğü gibi; TV ile; TH ($r=0.234^*$) ve BYKİ ($r=0.354^{**}$) arasında olumlu ve önemli, Sİ ($r= -0.296^{**}$) arasında olumsuz ve önemli ilişki olduğu saptanmıştır. Tang ve ark., (2017) tane verimi ile SPAD değerleri arasında yüksek korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Tane verimi ile net fotosentez hızı arasındaki ilişkiyi Fischer ve ark., (1981) önemsiz bulmuştur. Delgado ve ark., (1994), tane veriminin klorofil içeriğiyle ilişkili olduğunu; Ashraf, (2000), verimle toplam klorofil içeriğinin olumlu ancak önemsiz ilişkili olduğunu belirlemişlerdir. Bazı araştırmalarda, stoma iletkenliğinin tane verimi ile olumlu ilişkili olduğu (Delgado ve ark., 1994; Bahar,

2004), bir araştırmada ise stoma iletkenliğinin ölçülen bütün dönemlerde (çiçeklenme, süt olum ve geç sarı olum) tane verimi ile ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Jiang ve ark., 2000). Bayrak yaprak klorofil içeriği ile TH ($r=0.603^{**}$) arasında olumlu ve önemli, BÖS ($r= -0.468^{**}$) ve Sİ ($r= -0.519^{**}$) arasında olumsuz ve önemli ilişki olduğu belirlenmiştir. Transpirasyon hızı ile BÖS ($r= -0.326^{**}$) arasında olumsuz, NFH ($r=0.356^{**}$) arasında olumlu ve anlamlı ilişki bulunmuştur. Transpirasyon hızı ile fotosentez hızı arasında olumlu bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir (Guo ve ark., 2008). Stoma iletkenliği ile BÖS ($r= 0.234^*$) ve NFH ($r=0.487^{**}$) arasında olumlu ve önemli ilişkiler tespit edilmiştir.

Çizelge 8. İncelenen özellikler arası ilişkilere ait korelasyon katsayıları

Table 8. Correlation coefficients of the relationships between the examined traits

	BYA	BÖS	NFH	Sİ	TH	BYKİ
BÖS	0.188					
NFH	0.044	-0.087				
Sİ	0.096	0.234*	0.487**			
TH	0.032	-0.326**	0.356**	0.058		
BYKİ	0.037	-0.468**	-0.038	-0.519**	0.603**	
TV	0.015	-0.142	-0.189	-0.296**	0.234*	0.354**

SONUÇ

Bu çalışma kapsamında, 10 adet arpa genotipi 2015-2017 üretim sezonunda, Kahramanmaraş Doğu Akdeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü arazisinde denemeye alınarak; çiçeklenme-olgunlaşma dönemi arasında tane verimi ve bazı fizyolojik özellikler incelenmiştir. İki yıllık araştırma sonuçlarına göre bayrak yaprak alanı, net fotosentez hızı, stoma iletkenliği ve transpirasyon hızı yönünden genotipler arasındaki farklar önemli olmamıştır. Tane verimi ile olumlu ve önemli ilişki içerisinde olan transpirasyon hızı ve bayrak yaprak klorofil içeriği gibi özellikler seleksiyon kriteri olarak kullanılabilir. Yıllara bağlı olarak iklim koşullarındaki değişimler ve genotiplerin yıllara göre farklı tepki göstermeleri nedeniyle, daha güvenilir sonuçlara ulaşabilmek için uzun yılları kapsayan benzer araştırmaların yapılması yararlı olacaktır.

TEŞEKKÜR

Çalışmamız KSU Bilimsel Araştırma Projeleri Tarafından desteklenmiştir (2016/3-34 YLS). Çalışmamızın ilk yıl rakamları yüksek lisans tezinden alınmıştır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

Akar T, Avcı M, Düşünceli F, Tosun H, Ozan N, Sipahi H 1999. Orta Anadolu ve Geçit Bölgelerinde Arpa Tarımının Sorunları ve Çözüm Yolları. Orta Anadolu'da Hububat Tarımının Sorunları ve Çözüm Yolları Sempozyumu 8-11 Haziran, Konya.

Al-Khatib K, Paulsen GM 1984. Mode of High Temperature Injury to Wheat During Grain Development. *Physiol. Plant* 61: 363-368.

Amanullah 2015. Specific Leaf Area and Specific Leaf Weight in Small Grain Crops Wheat, Rye, Barley, and Oats Differ at Various Growth Stages and NPK Source. *Journal of Plant Nutrition*, 38:1694-1708.

Anonim 2017. Kahramanmaraş Meteoroloji İstasyonu Verileri, <https://mgm.gov.tr/tahmin/il-ve-ilceler.aspx?il=Kahramanmaras>.

Anonim 2021. <https://biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul> (Erişim tarihi: 2021).

Araghi SG, Assad MT 1998. Evaluation of Four Screening Techniques for Drought Resistance and Their Relationship to Yield Reduction Ratio in Wheat. *Euphytica* 103:293-299.

Ashraf MY 2000. Genotypic Variation for Chlorophyll Content and Leaf Area in Wheat and Their Relation to Grain Yield. *Wheat Information Service*, 90:42-44.

Bahar B 2004. Çukurova Taban ve Kıraç Koşullarında Bazı Ekmeklik ve Makarnalık Buğday Genotiplerinde Stoma İletkenliği ve Diğer Yaprak Özellikleri ile Verim ve Verim Unsurları Arasındaki İlişkiler Üzerine Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, 166 sy, Adana.

Bahar B, Yıldırım M, Barutçular C, Genç İ 2008. Effect of Canopy Temperature Depression on Grain Yield and Yield Components in Bread and Durum Wheat. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 36(1): 34-37.

Bingham IJ, Walters DR, Foulkes MJ, Paveley ND 2009. Crop Traits and The Tolerance of Wheat and Barley to Foliar Disease. *Ann. Appl. Biol.* 154: 159-173.

Çekiç C 2007. Kurağa Dayanıklı Buğday (*Triticum aestivum* L.) İslahında Seleksiyon Kriteri Olabilecek Fizyolojik Parametrelerin Araştırılması. Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Toprak Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, 124 sy, Ankara.

Çokkızgın A, Çölkesen M, İdikut L 2008. Kahramanmaraş Koşullarına Uygun Arpa Çeşit ve Hatların Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Ülkesel Tahıl Sempozyumu, 2-5 Haziran, s.738-744, Konya.

Çölkesen M, Öktem A, Engin A, Öktem AG, Demirbağ V, Yürürdürmaz C, Çokkızgın A 2002. Bazı Arpa Çeşitlerinin (*Hordeum vulgare* L.) Kahramanmaraş ve Şanlıurfa Koşullarında Tarımsal ve Kalite Özelliklerinin Belirlenmesi. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 5(2): 76-87.

Dalkılıç AY, Kara R, Yürürdürmaz C, Şimşek B, Aldemir Y, Akkaya A 2016. Makarnalık Buğdayda Ekim Sıklığının Fizyolojik Parametreler Üzerine Etkileri. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi* 25(1): 78-87.

Delgado MI, Reynolds MP, Larque-Saavedra A, Nava ST 1994. Genetic Diversity for Photosynthesis in Wheat under Heat Stressed Field Environments and its Relation to Productivity. *Wheat Special Report No.30*, 17 pages, Mexico.

Duke JA 1983. *Gmelina arborea* Roxb. Handbook of Energy Crops. Centre for New Crops and Plant Products, Purdue University, USA.

Ergün N, Geçit HH 2008. İleri Kademe Arpa (*Hordeum vulgare* L.) Hatlarında Verim ve Verime Etkili Bazı Karakterlerin İncelenmesi. Ülkesel Tahıl Sempozyumu, 2-5 Haziran, s.14-23, Konya.

Erman M, Çığ F, Sönmez F 2008. Farklı Ekim Zamanı Uygulamalarının Bazı Arpa (*Hordeum vulgare*

- conv. distichon Alef.s.1) Verim ve Verim Ögelerine Etkisi. Ülkesel Tahıl Sempozyumu, 2-5 Haziran, s.697-703, , Konya.
- Fischer RA, Bidinger F, Syme JR, Wall PC 1981. Leaf Photosynthesis, Leaf Permeability, Crop Growth, and Yield of Short Spring Wheat Genotypes under Irrigation. *Crop Sci* 21(3): 367-373.
- Fracheboud J, Jompuk C, Ribaut JM, Stamp P, Leipner J 2004. Genetics Analysis of Cold Tolerance of Photosynthesis in Maize. *Plant Mol Biol* 56: 241-253.
- Genç İ, Koç M, Barutçular C 1994. Yerel Buğday Çeşitlerimiz Gen Kaynağı Olarak Gerçekten Önemli mi? Tarla Bitkileri Kongresi, 25-29 Nisan, 1: 244-246, , Bornova-İzmir.
- Gous PW, Hasjim J, Franckowiak J, Fox GP, Gilbert RG 2013. Barley Genotype Expressing “Stay-Green”like Characteristics Maintains Starch Quality of The Grain During Water Stress Condition. *J Cereal Sci.* 1(6): 414-419.
- Guo P, Li M 1996. Studies on Photosynthetic Characteristics in Rice Hybrid Progenies and Their Parents. I. Chlorophyll Content, Chlorophyll-Protein Complex and Chlorophyll Fluorescence Kinetics. *Journal of Tropical and Subtropical Botany* 4: 60-65.
- Guo S, Tang Y, Gao F, Ai W, Qin L 2008. Effects of Low Pressure and Hypoxia on Growth and Development of Wheat. *Acta Astronautica* 63:1081-1085.
- Harding SA, Guikema JA, Paulsen GM 1990. Photosynthetic Decline from High Temperature Stress During Maturation of Wheat. I. Interaction with senescence process. *Plant Physiol.* 92: 648-653.
- Hui Z, Zhengbin Z, Hongbo S, Ping X, Foulkes MJ 2008. Genetic Correlation and Path Analysis of Transpiration Efficiency for Wheat Flag Leaves. *Environmental and Experimental Botany* 64(1): 128-134.
- Hura T, Hura K, Grzesiak MT 2009. The Usefulness of Chlorophyll Fluorescence Parameters in Harvest Prediction in 10 Genotypes of Winter Triticale under Optimal Growth Conditions. *Plant Biosystems* 143: 496-503.
- Jiang GM, Hao NB, Bai KZ, Zhang QD, Sun JZ, Guo RJ, Ge QY, Kuang TY 2000. Chain Correlation between Variables of Gas Exchange and Yield Potential in Different Winter Wheat Cultivars. *Photosynthetica* 38(2): 227-232.
- Kara R 2009. Kahramanmaraş Yöresine Ait Yerel Ekmeklik Buğday Genotiplerinin Verim Ve Fizyolojik Özellikler Yönünden İncelenmesi., Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, 100 sy Kahramanmaraş.
- Kara R 2016. Evaluation of Flag Leaf Physiological Traits of Triticale Genotypes under Eastern Mediterranean Conditions. *Turkish Journal of Field Crops* 21(1): 67-78.
- Kaydan D, Yağmur M 2007. Van Ekolojik Koşullarında Bazı İki Sıralı Arpa Çeşitlerinin (*Hordeum vulgare* L. conv. distichon) Verim ve Verim Ögeleri Üzerine Bir Araştırma. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarım Bilimleri Dergisi 13(3): 269-278.
- Kızılgöçer F, Yıldırım M, Albayrak Ö, Akıncı C 2016. Bazı Arpa Genotiplerinin Diyarbakır ve Mardin Koşullarında Verim ve Kalite Parametrelerinin İncelenmesi. İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 6(3): 161-169.
- Koç M 1993. Bazı Yerel ve İslah Edilmiş Makarnalık Buğday Çeşitlerinde Bayrak Yaprağı Fotosentez Hızı Üzerinde Araştırmalar, Makarnalık Buğday ve Mamülleri Sempozyumu, 30 Kasım-3 Aralık, s.460-466. Ankara.
- Koç M, Barutçular C, Genç I 2003. Photosynthesis and Productivity of Old and Modern Durum Wheats in A Mediterranean Environment. *Crop Sci.* 43(3): 2089-2098.
- Koç M, Barutçular C, Tiryakioğlu M 2008. Possible Heat-Tolerant Wheat Cultivar Improvement Through The Use of Flag Leaf Gas Exchange Traits in a Mediterranean Environment. *J. of the Sci. Food and Agric.* 88: 1638-1647.
- Kuşcu A 2006. Yazlık Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Veriminde Son Çeyrek Yüzyılda Gerçekleşen İlerlemelerin Morfolojik ve Fizyolojik Esasları. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, 225 sy, Adana.
- Li Z, Pinson SRM, Stansel JW, Paterson AH 1998. Genetic Dissection of The Source-Sink Relationship Affecting Fecundity and Yield in Rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Breed.* 4: 419-426.
- Lopez-Castaneda C., Richards RA, Farquhar GD 1995. Variation in Early Vigor Between Wheat and Barley. *Crop Science* 35: 472-479.
- Mahmood YA, Mohammed MS, Hassan HN 2019. A physiological Explanation of Drought Effect on Flag-Leaf Specific Weight and Chlorophyll Content of Barley. *Iraqi Journal of Science* 60(12):2531-2539.
- Reynolds MP, Delgado MI, Gutierrez-Rodriguez M, Larque-Saavedra A 2000. Photosynthesis of Wheat in A Warm, Irrigated Environment I: Genetic Diversity and Crop Productivity. *Field Crops Research*, 66: 37-50.
- SAS 1999. SAS Inst., 1999, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Serrago RA, Alzueta I, Savin R, Slafer GA 2013. Understanding Grain Yield Responses to Source-Sink Ratios During Grain Filling in Wheat and Barley Under Contrasting Environments. *Field Crops Research* 150(20): 42-51.
- Sieling K, Böttcher U, Kage H 2016. Dry Matter Partitioning and Canopy Traits in Wheat and Barley under Varying N Supply. *Europ. J. Agronomy* 74: 1-8.

- Tambussi EA, Bort J, Guiamet JJ, Nogués S, Araus JL 2007. The Photosynthetic Role of Ears In C3 Cereals: Metabolism, Water Use Efficiency and Contribution to Grain Yield. *Crit Rev Plant Sci.* 26: 1-16.
- Tang Y, Wui X, Li C, Yang W, Huang M, Ma X, Li S 2017. Yield, Growth, Canopy Traits and Photosynthesis in High-Yielding, Synthetic Hexaploid-Derived Wheats Cultivars Compared with Non-Synthetic Wheats. *Crop & Pasture Science* 68, 115–125.
- Turan İ 2008. Kahramanmaraş Koşullarında Bazı Buğday, Arpa ve Tritikale Çeşitlerinin Verim ve Verim Özelliklerinin Belirlenmesi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 50 sy, Kahramanmaraş.
- Yeğin ZG 2012. Arpa Genotiplerinde Tuz Toleransının Fizyolojik Analizlerle Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 83 sy, Konya.
- Yıldırım M 2005. Seçilmiş Altı Ekmeklik Buğday (*Triticum aestivum* L.) Çeşidinin Diallel F1 Melez Döllerinde Bazı Tarımsal, Fizyolojik ve Kalite Parametrelerinin Kalıtımı Üzerinde Bir Araştırma. Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, 314 sy, Adana.

Bazı Yem Bezelyesi (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) Çeşitlerinin Farklı Ekim Zamanlarındaki Tohum Verimi ve Verim Öğelerine Olan Etkileri

Bilal KESKİN^{1*}, Süleyman TEMEL², Barış EREN³

^{1,2}İğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü İğdir Türkiye, ³İğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü İğdir Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0001-6826-9768>, ²<https://orcid.org/0000-0001-9334-8601>, ³<https://orcid.org/0000-0002-3852-6476>

✉: bilalkeskin66@yahoo.com

ÖZET

Bu araştırma İğdir Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkez Müdürlüğüne ait araştırma alanında 2 (iki) yıl süreyle (2018-2019 ve 2019-2020) tesadüf bloklarında bölünmüş parseller deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Altı farklı ekim zamanı (Mart ayı başında, Mart ayı sonunda, Nisan ayı başında, Ekim ayı sonu, Kasım ayı başı ve Kasım ayı sonu)'nda, 4 farklı yem bezelyesi (Kirazlı, GAP Pembesi, Özkaynak ve Taşkent) çeşidinin tohum verimi ve bazı verim unsurları belirlenmiştir. Araştırmada yem bezelyesi'nin olgunlaşma süresi (OS), bitkide bakla sayısı (BBS), baklada tane sayısı (BTS), biyolojik verim (BV), tohum verimi (TV), saman verimi (SV), hasat indeksi (HI), bin tane ağırlığı (BTA) belirlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, araştırmanın ikinci yılındaki BBS, BTS, SV, TV ve BV değerleri birinci yıla göre daha yüksek olmuştur. Yem bezelyesinde yüksek biyolojik, tohum ve saman veriminin alınabilmesi için tohum ekimlerinin Mart ayı başında yapılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Tohum ve saman verimleri bakımından Kirazlı çeşidinin daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak bölge şartlarında Kirazlı çeşidinin seçilmesi ve bu çeşidin Mart ayı başında ekilmesi durumunda daha yüksek biyolojik, tohum ve saman veriminin elde edileceği belirlenmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 28.01.2021
Kabul Tarihi : 19.04.2021

Anahtar Kelimeler

Yem bezelyesi
Ekim zamanı
Çeşit
Tohum

Effects on Yield Components and Seed Yield of Some Feed Pea (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) Varieties at Different Sowing Times

ABSTRACT

This research was conducted in Agricultural Application and Research Center, İğdir University, 2018-2019 and 2019-2020, as a randomized complete block design in split plots with three replications. Seed yield and some other yield components of four different feed peas (Kirazlı, GAP Pembesi, Özkaynak and Taşkent) cultivar were determined in 6 different sowing times (early March, late March, early April, late October, early November and end of November). In the research, the maturation time of the feed pea (MT), the number of pods per plant (PN), the number of seeds per pod (SN), biological yield (BY), seed yield (SEY), straw yield (SY), harvest index (HI), thousand grain weight (TGW) were determined. Results indicated that, the BBS, BTS, SV, TV and BV values in the second year of the study were higher than the first year. It was concluded that seed sowing should be done at the beginning of March in order to obtain high biological, seed and straw yield in feed peas. It was determined that Kirazlı variety was better in terms of seed and hay yields. As a result, it was determined that in the case of selecting the Kirazlı variety, the higher biological, seed and straw yield could be obtained by sowing it in early March under the region conditions.

Research Article

Article History

Received : 28.01.2021
Accepted : 19.04.2021

Keywords

Feed pea
Sowing time
Variety
Seed

Atıf İçin: Keskin B, Temel, S, Eren B 2021. Bazı Yem Bezelyesi (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) Çeşitlerinin Farklı Ekim Zamanlarındaki Tohum Verimi ve Verim Öğelerine Olan Etkileri. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1315-1326. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.870115>.

To Cite : Keskin B, Temel, S, Eren B 2021. Effects on Yield Components and Seed Yield of Some Feed Pea (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) Varieties at Different Sowing Times. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1315-1326. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.a.vi.870115>.

GİRİŞ

Türkiye’de yıllara göre ekim alanı ve üretimi artan yem bezelyesinin (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) 2020 yılı istatistiklerine göre 243.191 da alanda ekimi yapılmaktadır. Türkiye’nin toplam tarım alanı 231.363.960 da ve nadas alanı 31.732.521 da’dır. Yem bezelyesi ekim alanı 2020 yılı istatistiklerine göre toplam ekim alanı içerisinde %0.10’luk bir paya sahiptir. Bu oran 2017 yılı istatistiklerinde %0.03 civarındadır. 2014 yılındaki ekim alanı 37.395 da iken bu miktar 2020 yılında 243.191 da ekim alanına ulaşmış ve ekim alanı 6 yıl içerisinde yaklaşık olarak 6.5 kat artmıştır (TÜİK, 2020). Iğdır ili 1.029.533 da toplam ekim alanına sahip olmasına rağmen, yem bezelyesi üretimi, istatistiklere girecek kadar bir ekim alanına sahip değildir.

Türkiye İstatistik Kurumunun 2020 yılı istatistiklerine göre 14.193.351 adet büyükbaş ve 54.112.626 adet küçükbaş olmak üzere toplamda 68 milyon hayvan varlığı bulunmaktadır (TÜİK, 2020). 2015 yılı istatistiklerine göre toplam kaliteli kaba yem üretimi 83.9 milyon ton ve kaliteli kaba yem açığı da 30 milyon ton olarak hesaplanmıştır (Özkan ve Demirbağ, 2016). Ülkemizde yıllara göre hayvan varlığı ve kaliteli kaba yem açığı sürekli artış göstermektedir. Bu açığın ve hayvanların yem ihtiyacının kısa vadede karşılanması için yem bitkilerinin hem alan hem de verim ve kalite yönünden artırılması büyük önem göstermektedir.

Iğdır ilinde 2020 yılı istatistiklerine göre 147.154 adet büyükbaş, 1.224.683 adet koyun ve 54.520 adet keçi bulunmaktadır. Iğdır ilinde hayvanların beslenmesinde daha çok çayır mera alanlarından faydalanılmaktadır. Iğdır ilinin ekimi yapılan toplam 972.359 da alanı içerisinde yem bitkileri 408.280 da alanda yapılmakta olup; toplam ekim alanı içerisindeki yem bitkilerinin payı %39’dur (TÜİK 2020). Iğdır ilinde yem bitkileri ekim alanının fazla olması bölge çiftçilerinin en önemli geçim kaynağının hayvancılık olduğunu göstermektedir. Iğdır ilinde tane mısır, silajlık mısır ve yonca tarımı yaygın olarak yapılmasına rağmen, yem bezelyesi tarımı henüz yapılmamaktadır. Son 5 yıllık istatistiklere göre Türkiye’deki yem bezelyesi ekim alanının yaklaşık olarak 3 kat arttığı ve bu artışın Iğdır ilinde de olması durumunda bölge hayvancılığın gelişmesi açısından önemli olacağı düşünülmektedir.

Yem bezelyesi süt ineklerine tek başına verildiğinde süt verimi ve kalitesi üzerinde olumsuz etkiye sahip olup; Ca, P ve Fe bakımından zengindir. Yem bezelyesi ot üretimi, tohum üretimi, yeşil gübreleme ve silaj amacıyla tek başına veya tahıl türleri ile karışım yapılarak ekimi yapılmaktadır. Yem bezelyesi

tohumları %20-30 arasında ham protein içermeleri nedeniyle kesif yem olarak değerlendirilmelerde tercih edilen önemli bir bitkidir (Avcıoğlu ve ark., 2009). Protein içeriğinin yüksek olması nedeniyle Avrupa ülkelerinde soya bitkisine alternatif olarak önerilmektedir (Açıkgöz, 2001; Avcıoğlu ve ark., 2009; Uzun ve ark., 2012; Kaplan ve ark., 2014).

Bu araştırma Iğdır ekolojik şartlarında farklı yem bezelyesi çeşitleri ve farklı ekim zamanlarındaki tohum verimi ve bazı verim öğelerinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Bu çalışma ile hangi yem bezelyesi çeşidinin hangi ekim zamanında ekilmesi durumunda tohum verimi ve verim öğelerinin uygun olacağı belirlenmiştir.

MATERYAL ve METOD

Araştırmanın yürütüldüğü Iğdır iline ait bazı iklim değerleri Çizelge 1’de verilmiştir. Çizelge 1 incelendiğinde 2019-2020 yıllarına göre, 2018-2019 Yıllarındaki sıcaklık (15.1 °C), yağış (352.6 mm) ve nem (%58.3) daha yüksek olmuştur. Diğer taraftan uzun yıllara göre, yem bezelyesinin ekiminin yapıldığı 2018-2019 ve 2019-2020 yıllarındaki sıcaklık ve nem miktarı yüksek, yağış miktarı ise düşük gerçekleşmiştir (Çizelge 1). Bölgenin iklim değerlerine bakıldığında Türkiye’nin en kurak iklim kuşağında yer aldığı görülmektedir.

Deneme alanı topraklarını temsil edecek şekilde 4 farklı noktadan alınan toprak örnekleri Iğdır Üniversitesi Ziraat Fakültesi Laboratuvarlarında analiz edilmiş ve toprakların az tuzlu, orta alkali, organik içeriği düşük, kireç içeriği yüksek olduğu belirlenmiştir (Çizelge 2).

Araştırma 6 ekim zamanında (Mart ayı başında, Mart ayı sonunda, Nisan ayı başında, Ekim ayı sonu, Kasım ayı başı ve Kasım ayı sonu) 4 farklı yem bezelyesi (Kirazlı, GAP Pembesi, Özkaynak ve Taşkent) çeşidinin tohum verimi ve bazı verim unsurlarını belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Deneme 2018-2019 ve 2019-2020 yıllarında ilkbahar ve sonbaharda olmak üzere Iğdır Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkez deneme sahasında sulu koşullarda tesadüf bloklarında bölünmüş parseller deneme desenine göre üç tekerrürlü olarak kurulmuştur. Ekim zamanları ana parsellere, çeşitler ise alt parsellere yerleştirilmiştir. Parsel uzunlukları 3 m, parsel genişlikleri 1.75 m olmak üzere her bir parsel alanı 5.25 m² olarak ayarlanmıştır. Ana parseller arası 2 m, alt parseller arası 1.2 m ve bloklar arası 1.5 m boşluk bırakılmıştır. Yem bezelyesi tohumları 35 cm sıra aralığı ve 10 cm sıra üzeri olacak şekilde el markörü ile açılan çizilere elle ekimi yapılmıştır (Tan, 2018). Her bir parsele standart olarak ekimle birlikte saf

olarak 5 kg da⁻¹ N (% 21'lik amonyum sülfat) ve 12 kg da⁻¹ P₂O₅ (% 39-41'lik Triple süper fosfat) kullanılmıştır. İlkbahar tohum ekimleri 2018-2019 ve 2019-2020 yıllarında sırasıyla 07 ve 14 Mart, 22 ve 28 Mart, 06 ve 12 Nisan, sonbahar tohum ekimleri ise 22-22 Ekim, 5 ve 12 Kasım ve 19 ve 22 Kasım tarihlerinde yapılmıştır.

Sulama işlemleri yağmurlama sulama yöntemine göre yapılmıştır. Bitkiler çiçek oluşturmaya başladıktan sonra sulamalar salma sulama yöntemi ile yapılmıştır. Yabancı ot mücadelesi parsel içlerinde el çapası ile parsel aralarında ise çapa makinesi ile yapılmıştır. Yem bezelyesi baklalarının dolduğu ve tohumların sertleştiği dönemde tohum hasatları yapılmıştır.

Çizelge 1. Araştırmanın yürütüldüğü bölgeye ait bazı iklim verileri (Anonim, 2020)

Table 1. Some climate data for the region where the research was conducted (Anonymous, 2020)

Aylar	2018-2019 yılı			2019-2020 yılı			Uzun yıllar ortalaması (1978-2017)		
	Sıcaklık (°C)	Yağış (mm)	Nem (%)	Sıcaklık (°C)	Yağış (mm)	Nem (%)	Sıcaklık (°C)	Yağış (mm)	Nem (%)
Mart	12.3	16.5	51.9	6.8	23.5	59.7	6.9	21.5	49.9
Nisan	14.2	18.2	49.7	12.1	25.1	56.9	13.4	37.9	49.0
Mayıs	18.4	69.1	65.5	19.9	25.9	51.2	17.6	48.9	51.1
Haziran	23.4	31.8	54.5	25.6	13.6	45.8	22.3	33.2	45.7
Temmuz	29.2	5.8	42.8	27.3	0.6	40.1	26.2	14.7	43.3
Ağustos	26.4	4.1	48.4	27.0	0.6	41.2	25.6	9.8	44.5
Eylül	22.8	6.5	48.2	20.0	10.5	53.6	20.7	10.3	48.9
Ekim	15.0	20.8	63.9	15.8	4.5	58.0	13.3	28.1	62.3
Kasım	7.0	29.4	80.9	4.3	8.0	70.1	5.9	19.4	65.7
Aralık	3.9	30.9	81.6	4.7	8.2	80.0	-0.4	13.0	68.4
Ocak	0.6	12.3	69.3	0.0	7.3	65.2	-3.1	13.1	66.5
Şubat	3.7	19.1	61.9	1.9	14.1	64.5	0.3	15.5	59.8
Mart	6.8	23.5	59.7	10.6	18.1	56.5	6.9	21.5	49.9
Nisan	12.1	25.1	56.9	11.7	83.6	64.8	13.4	37.9	49.0
Mayıs	19.9	25.9	51.2	18.6	76.1	55.0	17.6	48.9	51.1
Haziran	25.6	13.6	45.8	23.9	15.7	44.7	22.3	33.2	45.7
Top./Ort.	15.1	352.6	58.3	14.4	335.4	56.7	13.1	406.9	53.2

Çizelge 2. Araştırmanın yürütüldüğü topraklara ait bazı özellikler

Table 2. Some characteristics of the soils where the research was conducted

pH	Kireç %	EC (mS/cm)	Organik Madde %	P (ppm)	K (ppm)	Ca (ppm)	Mg (ppm)
8.16	11.2	1.58	0.95	3.21	1.92	20	7.82

Araştırmada İncelenen Özellikler

Olgunlaşma süresi (gün)

Ekim tarihi ile tohum hasat olgunluğu arasındaki geçen gün sayısı olgunlaşma süresi olarak hesaplanmıştır (Anonim, 2001).

Bitkide bakla sayısı (adet/bitki)

Hasat dönemine gelen parsellerde hasat öncesi hasat alanı içinde kalan kısımda tesadüfen belirlenen 10 adet bitkinin baklaları sayılıp ortalamalarının alınması ile bitkide bakla sayısı bulunmuştur (Ekiz, 1983).

Baklada tane sayısı (adet/bakla)

Bitkide bakla sayısı için belirlenen 10 adet bitkiden elde edilen tane sayısı bakla sayısına oranlanarak baklada tane sayısı adet olarak belirlenmiştir.

Biyolojik verim (kg da⁻¹)

Her parselden kenar tesirleri atıldıktan sonra geri

kalan kısımlar hasat edilip, torbalara doldurulmuş ve önce açık havada daha sonra 35°C'ye ayarlı kurutma fırınında kurutulmuştur. Daha sonra bu bitkiler tartılarak toplam ağırlıkları biyolojik verim olarak kg da⁻¹ cinsinden hesaplanmıştır (Açıkgöz, 2001).

Tohum verimi (kg da⁻¹)

Biyolojik verimleri belirlenen bitkiler harmanlandıktan sonra parsellerde elde edilen tohumlar hassas terazide tartılarak önce parsele verim daha sonrasında ise basit bir eşitlik vasıtasıyla dekara tohum verimleri belirlenmiştir (Timurağaoğlu ve ark., 2004; Açıkgöz ve ark., 2007).

Saman verimi (kg da⁻¹)

Harmandan sonra elde edilen tohum ağırlıkları biyolojik verimden çıkartılarak saman verimleri bulunmuştur (Açıkgöz, 2001).

Hasat indeksi (%)

Her parselden elde edilen tohum verimleri biyolojik

verime oranlanıp çıkan değerler 100 ile çarpılarak hasat indeksi (%) bulunmuştur.

Bin tane ağırlığı (g)

Tohum hasadından sonra her parselde 4 kez 100 adet (4 x 100) tohum sayılarak hassas terazide tartılmış ve elde edilen değerlerin ortalamaları alınarak 10 ile çarpılıp, bin dane ağırlıkları hesaplanmıştır (Timurağaoğlu ve ark., 2004; Açıkgöz ve ark., 2007).

İstatistik Analizler

Araştırma verileri JMP 5.0.1 paket programına göre yıl tekrarlamalı tesadüf bloklarında bölünmüş parseller deneme desenine göre varyans analizleri yapılmış ve önemli çıkan ortalamaların karşılaştırmaları LSD (% 5) testine göre yapılmıştır. Ayrıca ortalamalarla birlikte standart hataları sunulmuştur (Yıldız ve Bircan, 1991).

Çizelge 3. Farklı yıl, ekim zamanı ve çeşitlere göre yem bezelyesinin tohum olgunlaştırma süreleri
Table 3. Maturation time of feed peas according to different year, planting time and variety

Yıl (Y)	Ekim zamanı (EZ)	Çeşit (Ç)				Yıl Ort.
		Gap Pembesi	Kirazlı	Özkaynak	Taşkent	
2018- 2019	EZ-1	112.3±1.33 ^m	112.3±1.33 ^m	114.0±1.00 ^m	114.0±1.00 ^m	166.7±7.7
	EZ-2	100.3±0.33 ^o	100.3±0.33 ^o	107.0±0.00 ⁿ	100.3±0.33 ^o	
	EZ-3	93.0±0.00 ^a	93.0±0.00 ^a	93.0±0.00 ^a	93.0±0.00 ^a	
	EZ-4	247.3±0.88 ^d	246.7±2.60 ^d	251.0±0.00 ^c	251.0±0.00 ^c	
	EZ-5	220.0±0.00 ^k	220.0±0.00 ^k	229.0±0.00 ^g	229.0±0.00 ^g	
	EZ-6	221.0±0.00 ^k	212.0±0.00 ^l	221.0±0.00 ^k	221.0±0.00 ^k	
2019-2020	EZ-1	106.7±0.33 ⁿ	107.0±0.00 ⁿ	106.0±0.58 ⁿ	105.7±0.88 ⁿ	166.7±8.4
	EZ-2	95.0±1.15 ^p	92.7±1.45 ^a	99.0±3.21 ^o	99.7±0.88 ^o	
	EZ-3	85.0±0.00 ^t	85.0±0.00 ^t	89.7±0.67 ^r	87.3±1.20 ^s	
	EZ-4	252.0±0.00 ^{bc}	253.0±0.58 ^b	257.0±0.00 ^a	258.0±0.00 ^a	
	EZ-5	227.0±0.00 ^h	225.0±0.00 ⁱ	233.0±0.00 ^f	235.0±0.00 ^e	
	EZ-6	225.0±0.00 ⁱ	223.0±0.00 ^j	228.0±0.00 ^{gh}	228.0±0.00 ^{gh}	
Çeşit Ort.		165.4±20.5 ^b	164.1±20.3 ^c	168.9±20.8 ^a	168.5±21.1 ^a	
EZ Ort		LSD değeri ve Önemlilik				
EZ-1	109.7±0.77 ^d	Y			0.6776 ^d	
EZ-2	99.3±0.91 ^e	EZ			1.16 ^{**}	
EZ-3	89.9±0.72 ^f	Y x Ez int.			1.63 ^{**}	
EZ-4	252.0±0.84 ^a	Ç			0.57 ^{**}	
EZ-5	227.3±1.06 ^b	Y x Ç int.			0.80 [*]	
EZ-6	222.4±0.99 ^c	EZ x Ç int.			1.39 ^{**}	
		Y x EZ x Ç int.			1.96 ^{**}	

EZ-1: Mart başında, EZ-2: Mart sonunda, EZ-3: Nisan başında, EZ-4: Ekim sonu, EZ-5: Kasım başı, EZ-6: Kasım sonu, öd: önemli değil, **: P<0.01, *: P<0.05, aynı harflerle gösterilen veriler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Olgunlaşma süreleri bakımından çeşitler arasında önemli fark olmuştur (P<0.01). En erken olgunlaşan çeşit 164.1 gün ile Kirazlı, en geç olgunlaşan çeşit ise 168.9 gün ve 168.5 gün ile sırasıyla Özkaynak ve Taşkent çeşitleri olmuştur (Çizelge 3). Farklı ekolojik bölgelerde yürütülen araştırmalarda yem bezelyesi çeşitlerinin olgunlaşma süreleri 195.0-209.0 gün (Sayar ve Anlarsal, 2008), 197.5-206.3 gün (Sayar ve ark., 2009), 116.8-154.4 gün (Alan ve Geren, 2012), 102.0-116.5 gün (Tan ve ark., 2012) ve 181.4-194.0 gün (Kavut ve Çelen, 2017) arasında olmuştur. Genetik

BULGULAR ve TARTIŞMA

Olgunlaşma süresi

Mart ayı başında (EZ-1), Mart ortasında (EZ-2) ve Nisan başında (EZ-3) yem bezelyeleri tarlada sırasıyla 109.7 gün, 99.3 gün ve 89.9 günde olgunlaşmalarını tamamlamışlardır. Sonbahar ekimleri olan Ekim ayı sonu (EZ-4), Kasım ayı başı (EZ-5) ve Kasım ayı sonu (EZ-6) yem bezelyeleri tarlada sırasıyla 252.0 gün, 227.3 gün ve 222.4 gün'de olgunlaşmalarını tamamlamışlardır. İlkbahar ekimleri arasında 15'er gün olmasına rağmen, olgunlaşma süreleri arasında ise 10'ar gün aralık bulunmaktadır. Sonbahar ekimlerinde ise Ekim ayı sonu ile Kasım ayı başı arasında 20 gün ve Kasım ayı başı ile Kasım sonu arasında 10 gün fark olmasına rağmen, olgunlaşma süreleri arasında sırasıyla 25 gün ve 5 gün fark olmuştur (Çizelge 3).

özellik ve farklı iklim şartlarına göre çeşitlerin olgunlaşma sürelerindeki bu değişimlerin olması beklenen bir durumdur.

Yıl, ekim zamanı ve çeşit etkisi olarak en erken olgunlaşma 85 gün ile 2019 yılının 3. ekim zamanında Gap Pembesi ve Kirazlı çeşitlerinde tespit edilmiştir. En geç olgunlaşma ise 2019 yılının 4. ekim zamanında 257.0 ve 258.0 gün ile sırasıyla Özkaynak ve Taşkent çeşitlerinde elde edilmiştir (Çizelge 3).

Bitkide bakla sayısı

Yıllara göre bitkide bakla sayısında önemli değişimler olmuştur. Denemenin ikinci yılında (2019 yılı) 17.6

adet ile en yüksek bitkide bakla sayısı elde edilirken, 2018 yılında 15.3 adet ile en düşük bakla sayısı elde edilmiştir (Çizelge 4).

Çizelge 4. Farklı yıl, ekim zamanı ve çeşitlere göre yem bezelyesinin bitkide bakla sayıları

Table 4. Number of pods per plant of feed peas according to different year, planting time and variety

Yıl (Y)	Ekim zamanı (EZ)	Çeşit (Ç)				Yıl Ort.
		Gap Pembesi	Kirazlı	Özkaynak	Taşkent	
2018- 2019	EZ-1	15.5±0.45 ^{h-r}	14.8±0.62 ^{k-t}	16.4±0.99 ^{e-p}	13.7±0.93 ^{n-v}	15.3±0.45 ^b
	EZ-2	14.5±0.42 ^{l-m}	11.4±0.28 ^{u-x}	12.0±0.77 ^{t-x}	19.5±1.41 ^{e-e}	
	EZ-3	13.3±0.84 ^{p-w}	9.7±0.89 ^x	13.0±1.12 ^{q-w}	15.0±1.30 ^{j-t}	
	EZ-4	17.0±0.94 ^{e-m}	16.2±1.21 ^{f-p}	25.1±1.10 ^a	22.5±0.47 ^{a-c}	
	EZ-5	14.0±0.84 ^{m-v}	10.4±1.21 ^{w-x}	15.4±0.23 ^{h-r}	18.1±2.25 ^{d-j}	
	EZ-6	12.6±1.11 ^{r-x}	11.0±0.88 ^{v-x}	17.9±0.58 ^{d-k}	17.8±1.06 ^{d-k}	
2019-2020	EZ-1	20.3±1.90 ^{b-d}	24.7±2.37 ^a	16.6±0.62 ^{e-o}	16.9±1.07 ^{e-n}	17.6±0.41 ^a
	EZ-2	23.3±1.39 ^{ab}	18.4±2.09 ^{d-h}	24.3±1.79 ^a	17.3±1.11 ^{d-l}	
	EZ-3	18.9±1.18 ^{d-g}	15.4±1.51 ^{h-r}	14.5±1.46 ^{l-u}	15.2±0.87 ^{s-s}	
	EZ-4	17.6±0.23 ^{d-l}	18.6±0.79 ^{d-h}	19.4±0.68 ^{c-f}	17.7±0.75 ^{d-k}	
	EZ-5	17.3±0.29 ^{d-l}	13.4±1.17 ^{o-w}	17.2±0.31 ^{d-l}	18.3±3.60 ^{d-ı}	
	EZ-6	14.9±0.29 ^{k-t}	12.0±0.54 ^{s-x}	15.1±0.75 ^{j-t}	16.0±0.07 ^{g-q}	
Çeşit ort.		16.5±0.99 ^a	14.6±1.37 ^b	17.2±1.24 ^a	17.3±0.82 ^a	
EZ Ort		LSD değeri ve Önemlilik				
EZ-1	17.3±0.78 ^b	Y				0.58 ^{**}
EZ-2	17.5±1.0 ^b	EZ				1.01 ^{**}
EZ-3	14.3±0.61 ^d	Y x Ez int.				1.42 ^{**}
EZ-4	19.2±0.64 ^a	Ç				0.92 ^{**}
EZ-5	15.5±0.62 ^c	Y x Ç int.				1.30 ^{**}
EZ-6	14.6±0.55 ^{cd}	EZ x Ç int.				2.25 ^{**}
		Y x EZ x Ç int.				3.18 ^{**}

EZ-1: Mart başında, EZ-2: Mart sonunda, EZ-3: Nisan başında, EZ-4: Ekim sonu, EZ-5: Kasım başı, EZ-6: Kasım sonu, öd: önemli değil, **: P<0.01, *: P<0.05, aynı harflerle gösterilen veriler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Ekim zamanlarına göre bakla sayılarında önemli değişimler olmuştur. Sonbahar ve ilkbahar ekim zamanlarının geciktirilmesiyle bitkide bakla sayısının da azaldığı belirlenmiştir. En yüksek bitkide bakla sayısı 19.2 adet ile sonbaharda Ekim ayının sonunda (EZ-4) ekilen yem bezelyelerinde, en düşük bitkide bakla sayısı ise 14.3 adet ile ilkbaharda Nisan ayı başında (EZ-3) ekilen yem bezelyelerinde tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalarda ekim zamanlarına bağlı olarak yem bezelyesinin bitkide bakla sayısını etkilediği belirlenmiştir (Önder ve Ceyhan, 2001; Alan ve Geren, 2012). Hem sonbaharda ve hem de ilkbaharda tohum ekimlerin geciktirilmesi ile bitkide bakla sayısının azalması, bitkilerin daha kısa bir vejetasyon süresinde iklim ve toprak şartlarından yararlanmasından kaynaklandığı tahmin edilmektedir.

Araştırmada kullanılan bitkilerin bakla sayıları çeşit bazında 14.6 adet ile 17.3 arasında değişmiştir. Bitkideki en yüksek bakla sayısı Özkaynak ve Taşkent çeşitlerinde sırasıyla 17.2 adet ve 17.3 adet, en düşük bakla sayısı ise 14.6 adet ile Kirazlı çeşidinde belirlenmiştir. Yem bezelyesinde bakla sayılarının 5-12 adet/bitki (Timurağaoğlu ve ark., 2004), 5.6-9.0 adet/bitki (Sayar ve Anlarsal, 2008), 6.4-10.0 adet/bitki (Sayar ve ark., 2009), 26.7-28.3 adet/bitki (Alan ve

Geren, 2012), 10.4-15.5 adet/bitki (Tan ve ark., 2012), 8.7-11.4 adet/bitki (Uzun ve ark., 2012), 8.2-9.2 adet/bitki (Kavut ve Çelen, 2017), 3.3-9.0 adet/bitki (Özköse, 2017) ve 5.8-11.0 adet/bitki (Kadioğlu ve Tan, 2018) arasında gerçekleştiği ve çeşitlerin farklı miktarlarda bakla sayılarına sahip oldukları belirlenmiştir.

Yıl, ekim zamanı ve çeşit etkileşimlerine göre bitkideki en yüksek bakla sayısı 24.7 adet ile 2019 yılında 1. ekim zamanı (EZ-1)'nda ekilen Kirazlı çeşidinde, en düşük bitkide bakla sayısı ise 9.7 adet ile 2018 yılında 3. ekim zamanında ekilen Kirazlı çeşidinde tespit edilmiştir.

Baklada tane sayısı

Yılların baklada tane sayısına etkisi önemli olmamıştır. Çeşit ve ekim zamanlarının ortalamasına göre 2018-2019 yılında 3.31 adet, 2019-2020 yılında ise 3.58 adet baklada tane sayıları tespit edilmiştir (Çizelge 5).

Ekim zamanlarına göre bakladaki tane sayıları farklılık göstermiştir. Buna göre bakladaki en fazla tane sayıları EZ-1 ve EZ-2'de sırasıyla 3.91 ve 3.76 adet elde edilmiş olup, aynı istatistik grupta yer almışlardır. Bakladaki en düşük tane sayıları ise EZ-

4 ve EZ-6'da sırasıyla 3.00 adet ve 2.95 adet elde edilmiştir. İlkbahar ekimlerinde (EZ-1, EZ-2 ve EZ-3) elde edilen baklada tane sayıları, sonbahar ekimlerine (EZ-4, EZ-5 ve EZ-6) göre daha yüksek olmuştur. Yapılan bir araştırmada farklı ekim zamanlarında

ekimi yapılan yem bezelyesinde 5.4 ile 6.6 arasında baklada tane sayıları elde edilmiş olup, ekim zamanlarına göre bakladaki tane sayılarının önemli derecede etkilendiği belirlenmiştir (Önder ve Ceyhan, 2001; Alan ve Geren, 2012).

Çizelge 5. Farklı yıl, ekim zamanı ve çeşitlere göre yem bezelyesinin baklada tane sayıları

Table 5. The number of seeds per pod of feed peas according to different year, planting time and variety

Yıl (Y)	Ekim zamanı (EZ)	Çeşit (Ç)				Yıl Ort.
		Gap Pembesi	Kirazlı	Özkaynak	Taşkent	
2018-2019	EZ-1	4.57±0.32 ^{b-d}	4.90±0.32 ^{ab}	3.37±0.12 ^{j-o}	3.60±0.20 ^{h-l}	3.31±0.11
	EZ-2	4.23±0.03 ^{c-f}	4.30±0.29 ^{c-f}	2.53±0.18 ^{c-f}	3.80±0.15 ^{f-j}	
	EZ-3	3.93±0.19 ^{e-1}	4.20±0.35 ^{c-g}	3.37±0.24 ^{j-o}	3.10±0.06 ^{l-p}	
	EZ-4	3.63±0.30 ^{h-k}	2.10±0.06 ^{tu}	2.00±0.12 ^u	2.40±0.29 ^{s-u}	
	EZ-5	2.57±0.18 ^{q-t}	4.23±0.52 ^{c-f}	2.90±0.56 ^{n-s}	3.37±0.12 ^{j-o}	
	EZ-6	2.10±0.12 ^{tu}	4.23±0.09 ^{c-f}	1.90±0.06 ^u	2.27±0.15 ^{tu}	
2019-2020	EZ-1	3.67±0.03 ^{h-k}	4.07±0.28 ^{d-h}	3.63±0.09 ^{h-k}	3.53±0.18 ^{r-m}	3.58±0.07
	EZ-2	3.40±0.26 ^{j-n}	5.12±0.27 ^a	3.07±0.13 ^{m-q}	3.63±0.09 ^{h-k}	
	EZ-3	3.23±0.24 ^{k-p}	4.67±0.26 ^{a-c}	3.40±0.06 ^{j-n}	3.27±0.30 ^{k-p}	
	EZ-4	3.97±0.22 ^{e-1}	3.70±0.21 ^{g-k}	3.00±0.06 ^{n-r}	3.20±0.15 ^{k-p}	
	EZ-5	3.40±0.06 ^{j-n}	4.57±0.23 ^{b-d}	2.83±0.17 ^{p-s}	3.60±0.10 ^{h-l}	
	EZ-6	3.07±0.18 ^{m-q}	4.33±0.18 ^{c-e}	2.90±0.06 ^{n-s}	2.87±0.19 ^{o-s}	
Çeşit Ort.		3.48±0.21 ^b	4.20±0.25 ^a	2.90±0.17 ^d	3.21±0.16 ^c	
EZ Ort		LSD değeri ve Önemlilik				
EZ-1	3.91±0.12 ^a	Y			0.18öd	
EZ-2	3.76±0.16 ^a	EZ			0.32**	
EZ-3	3.64±0.12 ^{ab}	Y x Ez int.			0.45**	
EZ-4	3.00±0.15 ^c	Ç			0.15**	
EZ-5	3.43±0.16 ^b	Y x Ç int.			0.22**	
EZ-6	2.95±0.18 ^c	EZ x Ç int.			0.37**	
		Y x EZ x Ç int.			0.53**	

EZ-1: Mart başında, EZ-2: Mart sonunda, EZ-3: Nisan başında, EZ-4: Ekim sonu, EZ-5: Kasım başı, EZ-6: Kasım sonu, öd: önemli değil, **: P<0.01, *: P<0.05, aynı harflerle gösterilen veriler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Araştırmada kullanılan yem bezelyesi çeşitlerinin bakladaki tane sayıları arasında önemli farklar görülmüştür. En yüksek baklada tane sayısı 4.20 adet ile Kirazlı yem bezelyesi çeşidinden elde edilmiştir. Diğer yem bezelyeleri Gap Pembesi, Taşkent ve Özkaynak çeşitlerinde ise sırasıyla 3.48 adet, 3.21 adet ve 2.90 adet baklada tane sayıları elde edilmiştir. Yem bezelyesinde baklada tane sayıları 4-6 adet/bakla (Timurağaoğlu ve ark., 2004), 4.1-5.1 adet/bakla (Sayar ve Anlarsal, 2008), 4.0-5.2 adet/bakla (Sayar ve ark., 2009), 5.4-6.6 adet/bakla (Alan ve Geren, 2012), 4.3-5.0 adet/bakla (Uzun ve ark., 2012), 4.9-5.7 adet/bakla (Kavut ve Çelen, 2017), 3.6-5.9 adet/bakla (Özköse, 2017) ve 4.8-7.6 adet/bakla (Kadioğlu ve Tan, 2018) arasında değişmiştir. Bölgelere göre çeşitlerde baklada tane sayılarının değişik olarak elde edildiği görülmektedir.

Yıl, ekim zamanı ve çeşitlerin interaksyonuna göre, bakladaki tane sayıları 2.00 adet ile 5.12 adet arasında değişmiştir. En yüksek baklada tane sayısı 5.12 adet ile 2019 yılında 2. ekim zamanında ekilen Kirazlı çeşidinde, en düşük baklada tane sayısı ise 2.00 adet ile 2018 yılında 4. ekim zamanında ekilen Özkaynak çeşidinde tespit edilmiştir.

Biyolojik Verim

Biyolojik verim üzerine yılların etkisi önemli olmuştur. Araştırmanın ikinci yılındaki (2019) biyolojik verim (522.8 kg da⁻¹), birinci yıldaki (2018) biyolojik verimden (472.8 kg da⁻¹) daha yüksek olmuştur (Çizelge 6).

Ekim zamanlarına göre biyolojik verimleri 429.1 kg da⁻¹ ile 572.1 kg da⁻¹ arasında değişmiştir. En yüksek biyolojik verimi 572.1 kg da⁻¹ ile EZ-1'de, en düşük biyolojik verimi 429.1 kg da⁻¹ ile EZ-6'da tespit edilmiştir.

En yüksek biyolojik verim 570.5 kg da⁻¹ ile Kirazlı çeşidinde, en düşük biyolojik verim ise 432.5 kg da⁻¹ ve 463.3 kg da⁻¹ ile sırasıyla Taşkent ve Özkaynak çeşitlerinde tespit edilmiştir. Değişik ekolojik şartlarda yem bezelyesi çeşitlerinin biyolojik verimleri 391-496 kg da⁻¹ (Timurağaoğlu ve ark., 2004) ve 204.0-540.4 kg da⁻¹ (Sayar ve Anlarsal, 2008) aralıklarında belirlenmiş olup çeşitlerin biyolojik verim üzerine önemli etki yaptığı tespit edilmiştir.

Yıl, ekim zamanı ve çeşit interaksyonuna göre biyolojik verimleri 332.4 kg da⁻¹ ile 910.2 kg da⁻¹ arasında değişmiştir. En yüksek biyolojik verimi 910.2

kg da⁻¹ ile 2019 yılında ilkbaharda 1. ekim olarak ekilen Kirazlı çeşidinde, en düşük biyolojik verimi 332.4 kg da⁻¹ ile 2018 yılında ilkbaharda 2. ekim

zamanı (EZ-2) olarak ekimi yapılan Özkaynak çeşidinde belirlenmiştir.

Çizelge 6. Farklı yıl, ekim zamanı ve çeşitlere göre yem bezelyesinin biyolojik verimleri

Table 6. Biological yield of feed peas according to different year, planting time and variety

Yıl (Y)	Ekim zamanı (EZ)	Çeşit (Ç)			Yıl Ort.
		Gap Pembesi	Kirazlı	Özkaynak	
2018-2019	EZ-1	602.2±62.1 ^{b-g}	694.0±55.7 ^b	476.2±58.8 ^{h-r}	371.1±36.2 ^{p-t}
	EZ-2	590.1±38.9 ^{b-h}	434.8±4.9 ^{i-t}	332.4±20.5 ^t	588.1±25.2 ^{b-h}
	EZ-3	548.1±36.2 ^{d-j}	481.6±32.0 ^{g-q}	394.6±39.3 ^{n-t}	443.8±59.3 ^t
	EZ-4	522.7±20.2 ^{f-m}	353.3±22.0 ^{r-t}	562.0±42.8 ^{c-1}	468.2±63.4 ^{h-s}
	EZ-5	417.6±13.0 ^{k-t}	474.9±59.8 ^{h-r}	443.2±23.2 ^t	522.7±62.7 ^{f-m}
	EZ-6	372.5±29.7 ^{p-t}	467.8±42.0 ^{h-s}	404.6±17.2 ^{m-t}	382.0±30.7 ^{o-t}
2019-2020	EZ-1	550.1±39.7 ^{d-j}	910.2±165.8 ^a	565.0±20.0 ^{c-1}	407.7±21.1 ^{1-t}
	EZ-2	531.4±32.6 ^{d-k}	676.8±54.0 ^{b-c}	649.1±38.9 ^{b-e}	359.8±23.7 ^{q-t}
	EZ-3	590.2±40.4 ^{b-h}	641.6±40.4 ^{b-f}	342.4±16.6 ^t	348.7±18.7 st
	EZ-4	558.4±5.4 ^{c-1}	652.5±68.2 ^{b-d}	534.4±27.0 ^{d-k}	415.7±32.6 ^{k-t}
	EZ-5	513.1±20.1 ^{g-n}	528.8±37.6 ^{e-1}	474.9±7.2 ^{h-r}	490.2±6.2 ^{g-p}
	EZ-6	503.6±8.1 ^{g-o}	530.3±11.6 ^{d-1}	380.5±6.6 ^{o-t}	391.5±8.0 ^{n-t}
Çeşit ort	.	524.9±24.5 ^b	570.5±51.6 ^a	463.3±31.5 ^c	432.5±26.6 ^c
EZ Ort		LSD değeri ve Önemlilik			
EZ-1	572.1±39.7 ^a	Y			22.8**
EZ-2	520.3±27.2 ^b	EZ			39.5**
EZ-3	473.9±24.4 ^c	Y x Ez int.			55.9öđ
EZ-4	508.4±21.8 ^{b-c}	Ç			35.6**
EZ-5	483.2±12.9 ^{b-c}	Y x Ç int.			50.4**
EZ-6	429.1±13.8 ^d	EZ x Ç int.			87.3**
		Y x EZ x Ç int.			123**

EZ-1: Mart başında, EZ-2: Mart sonunda, EZ-3: Nisan başında, EZ-4: Ekim sonu, EZ-5: Kasım başı, EZ-6: Kasım sonu, öđ: önemli değil, **: P<0.01, *: P<0.05, aynı harflerle gösterilen veriler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Tohum verimi

Tohum verimi üzerine yılların etkisi önemli olmuştur. Araştırmanın ikinci yılındaki (2019 yılı) tohum verimi (238.7 kg da⁻¹), birinci yıldaki (2018 yılı) tohum verimi (208.1 kg da⁻¹)'nden daha yüksek olmuştur (Çizelge 7). Yem bezelyesi üzerine yapılan araştırmalarda yıllara göre tohum veriminde önemli farklar olduğu belirlenmiştir (Çakmakçı ve ark., 1999).

En yüksek tohum verimi 263.0 kg da⁻¹ ile EZ-1'de, en düşük tohum verimi 179.9 kg da⁻¹ ile EZ-3'de tespit edilmiştir. Farklı ekim zamanlarında yem bezelyesinin ekilmesi durumunda 97-168 kg da⁻¹ (Ceyhan ve Önder 2001), 152.7-213.5 kg da⁻¹ (Demirci ve Ünver, 2005), ve 143-349 kg da⁻¹ (Alan ve Geren, 2012) tohum verimleri alınmış ve ekim zamanlarının tohum verimleri üzerine önemli etki yapmıştır.

Mevcut çalışmada en yüksek tohum verimi 286.1 kg da⁻¹ ile Kirazlı çeşidinden, en düşük tohum verimi ise 181.9 kg da⁻¹ ve 187.3 kg da⁻¹ ile sırasıyla Taşkent ve Özkaynak çeşitlerinden elde edilmiştir. Yem bezelyesi üzerine yapılan araştırmalarda çeşitlere göre elde edilen tohum verimleri 217-195 kg da⁻¹ (Timurağaoğlu ve ark., 2004), 132.4-200.5 kg da⁻¹ (Demirci ve Ünver, 2005), 71.6-246.3 kg da⁻¹ (Sayar ve Anlarsal, 2008), 115.4-210.4 kg da⁻¹ (Sayar ve ark., 2009), 219-285 kg da⁻¹ (Alan ve Geren, 2012), 150-221 kg da⁻¹ (Tan ve

ark., 2012), 257.4-362.0 kg da⁻¹ (Uzun ve ark., 2012), 95.6-309.8 kg da⁻¹ (Kavut ve Çelen, 2017), 69.6-189-2 kg da⁻¹ (Özköse, 2017), 33.8-180.2 kg da⁻¹ (Çaçan ve ark., 2018) ve 196.5-314.7 kg da⁻¹ (Kadioğlu ve Tan, 2018) arasında tespit edilmiştir. Ayrıca 2012, 2013 ve 2014 yıllarında farklı ekolojik koşullarda ve bazı yem bezelyesi çeşitleri ile yapılan tescil denemelerindeki raporlara göre çeşitler arasında, farklı ekolojiler arasında ve yıllara göre tohum verimlerinde önemli farkların olduğu belirlenmiştir. Üç yıllık rapora göre çeşitlere, farklı ekolojilere ve yıllara göre yem bezelyesi çeşitlerinin tohum verimleri 43.2 kg/da ile 435.8 kg/da arasında değişmiştir (Anonim, 2015).

Yıl, ekim zamanı ve çeşit interaksyonuna göre tohum verimleri 85.8 kg da⁻¹ ile 476.2 kg da⁻¹ arasında değişmiştir. En yüksek tohum verimi 476.2 kg da⁻¹ ile 2019 yılında ilkbaharda 1. ekim olarak ekilen Kirazlı çeşidinde, en düşük tohum verimi 85.8 kg da⁻¹ ile 2018 yılında ilkbaharda 2. ekim zamanı (EZ-2) olarak ekilen Özkaynak çeşidinde tespit edilmiştir.

Saman verimi

Saman verimi üzerine yılların etkisi önemli olmuştur. Araştırmanın ikinci yılındaki (2019 yılı) saman verimi (284.0 kg da⁻¹), birinci yıldaki (2018 yılı) saman verimi (264.7 kg da⁻¹)'nden daha yüksek olmuştur (Çizelge 8).

Çizelge 7. Farklı yıl, ekim zamanı ve çeşitlere göre yem bezelyesinin tohum verimleri
Table 7. Seed yield of feed peas according to different year, planting time and variety

Yıl (Y)	Ekim zamanı (EZ)	Çeşit (Ç)				Yıl Ort.
		Gap Pembesi	Kirazlı	Özkaynak	Taşkent	
2018-2019	EZ-1	303.4±70.8 ^{cd}	299.8±39.7 ^{c-f}	168.8±14.1 ^{l-r}	144.2±11.8 ^{p-s}	208.1±7.96 ^b
	EZ-2	277.9±15.5 ^{c1}	185.0±8.6 ^{k-r}	85.8±6.8 ^s	237.6±17.8 ^{d-n}	
	EZ-3	212.5±12.0 ^{h-q}	155.7±14.8 ^{n-s}	129.8±18.1 ^{rs}	166.5±21.4 ^{m-s}	
	EZ-4	223.0±13.4 ^{d-p}	194.6±16.7 ^{j-r}	227.0±17.2 ^{d-o}	203.7±36.9 ^{r-r}	
	EZ-5	190.9±13.2 ^{j-r}	300.6±16.0 ^{c-e}	192.4±34.2 ^{j-r}	249.4±35.0 ^{c-l}	
	EZ-6	191.3±6.9 ^{j-r}	301.0±30.4 ^{c-e}	190.6±6.7 ^{j-r}	162.8±20.3 ^{m-s}	
2019-2020	EZ-1	278.9±22.0 ^{c1}	476.2±136.5 ^a	260.0±13.2 ^{c-k}	173.0±4.1 ^{l-r}	238.7±10.98 ^a
	EZ-2	218.1±13.2 ^{f-p}	396.5±29.7 ^{ab}	298.0±14.2 ^{c-g}	173.8±7.7 ^{l-r}	
	EZ-3	248.9±23.3 ^{c-l}	265.1±18.2 ^{c-k}	133.3±2.4 ^{q-s}	127.3±7.3 ^{rs}	
	EZ-4	268.4±14.2 ^{c-j}	323.5±54.4 ^{bc}	218.6±8.7 ^{f-p}	173.6±14.5 ^{l-r}	
	EZ-5	229.0±5.3 ^{d-o}	294.0±16.8 ^{c-h}	192.1±14.1 ^{j-r}	220.1±3.3 ^{e-p}	
	EZ-6	217.6±5.0 ^{g-p}	240.6±7.8 ^{d-m}	151.2±5.4 ^{o-s}	152.2±3.9 ^{o-s}	
Çeşit Ort.		238.3±10.0 ^b	286.1±33.0 ^a	187.3±18.3 ^c	181.9±13.6 ^c	
EZ Ort		LSD değeri ve Önemlilik				
EZ-1	263.0±26.8 ^a	Y			17.3 ^{**}	
EZ-2	234.1±18.7 ^{ab}	EZ			30.0 ^{**}	
EZ-3	179.9±11.7 ^d	Y x Ez int.			42.5 [*]	
EZ-4	229.1±12.0 ^{bc}	Ç			23.7 ^{**}	
EZ-5	233.5±10.5 ^{ab}	Y x Ç int.			33.5 ^{**}	
EZ-6	200.9±10.8 ^{cd}	EZ x Ç int.			57.9 ^{**}	
		Y x EZ x Ç int.			81.9 ^{**}	

EZ-1: Mart başında, EZ-2: Mart sonunda, EZ-3: Nisan başında, EZ-4: Ekim sonu, EZ-5: Kasım başı, EZ-6: Kasım sonu, öd: önemli değil, **: P<0.01, *: P<0.05, aynı harflerle gösterilen veriler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Yapılan bir araştırmada yıllara göre saman veriminde önemli farklar olduğu ve iki yılın ortalamasına göre saman veriminin 358.6 kg da⁻¹ olduğu belirlenmiştir (Çakmakçı ve ark., 1999).

Ekim zamanlarına göre saman verimleri 228.2 kg da⁻¹ ile 309.0 kg da⁻¹ arasında değişmiştir. İlkbaharda ekilen (EZ-1, EZ-2 ve EZ-3) yem bezelyelerinin saman verimleri, sonbaharda ekilen (EZ-4, EZ-5 ve EZ-6) yem bezelyelerinin saman verimlerinden daha yüksek olmuştur. En yüksek saman verimi 309.0 kg da⁻¹ ile EZ-1'de, en düşük saman verimi 228.2 kg da⁻¹ ile EZ-6'da tespit edilmiştir.

En yüksek saman verimleri Gap Pembesi, Kirazlı ve Özkaynak çeşitlerinde sırasıyla 286.6 kg da⁻¹, 284.4 kg da⁻¹ ve 275.9 kg da⁻¹ olarak elde edilmiş olup, bu çeşitler arasında saman verimi yönünden önemli fark görülmemiştir. En düşük saman verimi ise 250.4 kg da⁻¹ ile Taşkent çeşidinde belirlenmiştir. Farklı ekolojik bölgelerde yem bezelyesinin farklı çeşitleri ile yapılan araştırmalarda saman verimi 160-887 kg da⁻¹ (Çaçan ve ark., 2018) ve 335-453 kg da⁻¹ (Tan ve ark., 2012) arasında bulunmuştur.

Yıl, ekim zamanı ve çeşit interaksyonuna göre saman verimleri 158.7 kg da⁻¹ ile 434.0 kg da⁻¹ arasında değişmiştir. En yüksek saman verimi 434.0 kg da⁻¹ ile 2019 yılında ilkbaharda 1. ekim olarak ekilen Kirazlı çeşidinde, en düşük saman verimi 158.7 kg da⁻¹ ile 2018 yılında sonbaharda 1. ekim zamanı (EZ-4)'nda

ekilen Kirazlı çeşidinde görülmüştür.

Hasat İndeksi

Yıllara göre yem bezelyesi hasat indeksinde önemli bir değişim olmamıştır. Denemenin birinci yılında (2018 yılı) hasat indeksi %43.8, ikinci yılında (2019 yılı) ise hasat indeksi %44.8 olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 9).

Ekim zamanlarına göre hasat indeksleri %37.6 ile %48.3 arasında değişmiştir. Ekim zamanlarına göre hasat indeksinde önemli değişimler olmuştur. Sonbahar ekimi (EZ-4, EZ-5 ve EZ-6) yapılan yem bezelyelerinin hasat indeksleri, ilkbahar ekimi (EZ-1, EZ-2 ve EZ-3) yapılan hasat indekslerinden daha yüksek olmuştur. En yüksek hasat indeksi %48.3 ile sonbaharda Kasım ayı başında (EZ-5) ekilen yem bezelyelerinde, en düşük hasat indeksi ise %37.6 ile ilkbaharda Nisan ayı başında (EZ-3) ekilen yem bezelyelerinde tespit edilmiştir. Ekim zamanlarına bağlı olarak hasat indeksinin %45.4-56.8 arasında değiştiği rapor edilmiştir (Demirci ve Ünver, 2005)

Araştırmada kullanılan hasat indeksi %39.8 ile %50.1 arasında değişmiştir. En yüksek hasat indeksi %50.1 ile Kirazlı çeşidinde, en düşük hasat indeksi ise %39.8 ile Özkaynak çeşidinde belirlenmiştir. Farklı ekolojik şartlarda yapılan denemelerde yem bezelyesi çeşitlerinin hasat indeksleri %30.0-41.0 (Timurağaoğlu ve ark., 2004), %42.7-54.6 (Demirci ve Ünver, 2005), %30.7-51.5 (Sayar ve Anlarsal, 2008),

%27.5-35.9 (Tan ve ark., 2012) ve %21.0-35.7 (Kadioğlu ve Tan, 2018) arasında değişmiş olup çeşitlerin hasat indeksi üzerine önemli etki yaptığı belirlenmiştir.

Çizelge 8. Farklı yıl, ekim zamanı ve çeşitlere göre yem bezelyesinin saman verimleri

Table 8. Straw yields of feed peas according to different year, planting time and variety

Yıl (Y)	Ekim zamanı (EZ)	Çeşit (Ç)				Yıl Ort.
		Gap Pembesi	Kirazlı	Özkaynak	Taşkent	
2018- 2019	EZ-1	298.8±15.5 ^{d-1}	394.2±26.2 ^{ab}	307.4±46.5 ^{d-j}	227.0±25.6 ^{n-v}	264.7±8.28 ^b
	EZ-2	312.2±23.4 ^{d-1}	249.7±12.4 ^{i-r}	246.6±15.4 ^{k-r}	350.4±7.4 ^{b-e}	
	EZ-3	335.6±24.4 ^{b-g}	326.0±17.6 ^{c-h}	264.8±25.0 ^{i-r}	277.3±38.1 ^{g-p}	
	EZ-4	299.7±6.8 ^{d-1}	158.7±5.3 ^w	335.0±25.7 ^{b-g}	264.5±26.6 ^{i-r}	
	EZ-5	226.7±7.9 ^{n-v}	174.3±44.2 ^{u-w}	250.8±28.0 ^{i-r}	273.8±28.5 ^{h-q}	
	EZ-6	181.2±24.8 ^{t-w}	166.7±12.1 ^{vw}	214.0±22.4 ^{q-w}	219.3±22.6 ^{p-w}	
2019-2020	EZ-1	271.2±17.7 ^{h-q}	434.0±29.3 ^a	305.0±8.7 ^{d-k}	234.7±21.1 ^{m-u}	284.0±7.28 ^a
	EZ-2	313.3±20.2 ^{d-1}	280.2±24.5 ^{g-o}	351.1± 32.6 ^{g-o}	186.0±16.0 ^{s-w}	
	EZ-3	341.2±27.1 ^{b-f}	376.5±25.7 ^{a-c}	209.1±15.9 ^{r-w}	221.4±11.9 ^{o-v}	
	EZ-4	289.9±10.7 ^{e-m}	329.0±13.9 ^{c-h}	315.8±19.3 ^{d-1}	242.1±19.0 ^{l-s}	
	EZ-5	284.1±15.5 ^{f-n}	234.8±21.6 ^{m-u}	282.8±7.6 ^{f-n}	270.1±3.9 ^{h-q}	
	EZ-6	286.0±12.4 ^{f-n}	289.7±10.1 ^{f-m}	229.3±5.6 ^{m-u}	239.3±10.4 ^{l-t}	
Çeşit ort.		286.6±15.23 ^a	284.4±28.23 ^a	275.9±17.18 ^a	250.4±15.15 ^b	
EZ Ort		LSD değeri ve Önemlilik				
EZ-1	309.0±15.93 ^a	Y			9.9**	
EZ-2	286.1±12.63 ^b	EZ			17.1**	
EZ-3	293.9±13.77 ^{ab}	Y x Ez int.			24.2**	
EZ-4	279.3±12.45 ^b	Ç			17.5**	
EZ-5	249.6±10.02 ^c	Y x Ç int.			24.7**	
EZ-6	228.2±9.85 ^d	EZ x Ç int.			42.9**	
		Y x EZ x Ç int.			60.6**	

EZ-1: Mart başında, EZ-2: Mart sonunda, EZ-3: Nisan başında, EZ-4: Ekim sonu, EZ-5: Kasım başı, EZ-6: Kasım sonu, öd: önemli değil, **: P<0.01, *: P<0.05, aynı harflerle gösterilen veriler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Çizelge 9. Farklı yıl, ekim zamanı ve çeşitlere göre yem bezelyesinin hasat indeksleri

Table 9. Harvest index of feed peas according to different year, planting time and variety

Yıl (Y)	Ekim zamanı (EZ)	Çeşit (Ç)				Yıl Ort.
		Gap Pembesi	Kirazlı	Özkaynak	Taşkent	
2018-2019	EZ-1	49.1±6.37 ^{d-g}	42.9±2.19 ^{h-p}	35.9±2.50 ^{r-t}	39.0±1.34 ^{o-r}	43.8±1.14
	EZ-2	47.2±0.50 ^{e-1}	42.6±2.31 ^{r-q}	25.8±1.21 ^u	40.3±1.35 ^{m-r}	
	EZ-3	38.8±0.56 ^{o-s}	32.2±1.00 ^t	32.8±2.14 st	37.6±0.72 ^{p-t}	
	EZ-4	42.6±0.87 ^{i-q}	54.9±1.27 ^{b-d}	40.4±0.20 ^{m-r}	43.0±1.85 ^{g-p}	
	EZ-5	45.6±2.21 ^{e-n}	64.4±4.33 ^a	43.2±7.01 ^{g-p}	47.4±1.25 ^{e-k}	
	EZ-6	51.7±2.77 ^{c-e}	64.2±0.83 ^a	47.4±3.30 ^{e-k}	42.5±3.67 ^{r-q}	
2019-2020	EZ-1	50.7±0.33 ^{c-f}	50.0±6.61 ^{c-f}	46.0±0.96 ^{e-m}	42.7±2.47 ^{r-p}	44.8±0.71
	EZ-2	41.1±0.64 ^{l-r}	58.6±0.48 ^{ab}	46.1±2.26 ^{e-m}	48.4±1.13 ^{e-1}	
	EZ-3	42.2±2.40 ^{i-q}	41.4±1.35 ^{k-r}	39.1±1.76 ^{o-r}	36.5±0.65 ^{q-t}	
	EZ-4	48.0±2.23 ^{e-j}	48.9±3.24 ^{d-h}	40.9±0.90 ^{m-r}	41.8±0.98 ^{k-r}	
	EZ-5	44.7±0.99 ^{f-q}	55.7±1.13 ^{bc}	40.4±2.43 ^{m-r}	44.9±0.36 ^{f-q}	
	EZ-6	43.2±1.60 ^{g-p}	45.4±1.33 ^{f-n}	39.7±1.17 ^{n-r}	38.9±1.57 ^{o-s}	
Çeşit Ort.		45.4±1.55 ^b	50.1±3.09 ^a	39.8±2.12 ^d	41.9±1.30 ^c	
EZ Ort		LSD değeri ve Önemlilik				
EZ-1	44.5±1.49 ^b	Y			1.72öd	
EZ-2	43.7±1.85 ^b	EZ			2.98**	
EZ-3	37.6±0.83 ^c	Y x Ez int.			4.21**	
EZ-4	45.1±1.11 ^b	Ç			1.78**	
EZ-5	48.3±1.80 ^a	Y x Ç int.			2.52**	
EZ-6	46.6±1.73 ^{ab}	EZ x Ç int.			4.37**	
		Y x EZ x Ç int.			6.18**	

EZ-1: Mart başında, EZ-2: Mart sonunda, EZ-3: Nisan başında, EZ-4: Ekim sonu, EZ-5: Kasım başı, EZ-6: Kasım sonu, öd: önemli değil, **: P<0.01, *: P<0.05, aynı harflerle gösterilen veriler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Yıl, ekim zamanı ve çeşit interaksyonuna göre en yüksek hasat indeksi %64.4 ve %64.2 ile 2018 yılında Kirazlı çeşidinin EZ-5 ve EZ-6 ekim zamanlarında ekilmesiyle, en düşük hasat indeksi ise %32.2 ile 2018 yılında 3. ekim zamanında ekilen Kirazlı çeşidinde tespit edilmiştir.

Bin tane ağırlığı

Bin tane ağırlığı üzerine yılların etkisi önemli olmamıştır. Araştırmanın birinci yılındaki (2018 yılı) bin tane ağırlığı 135.4 g, ikinci yıldaki (2019 yılı) bin tane ağırlığı 133.2 g olmuştur (Çizelge 10).

Çizelge 10. Farklı yıl, ekim zamanı ve çeşitlere göre yem bezelyesinin bin tane ağırlıkları

Table 10. Thousand grain weight of feed peas according to different year, planting time and variety

Yıl (Y)	Ekim zamanı (EZ)	Çeşit (Ç)				Yıl Ort.
		Gap Pembesi	Kirazlı	Özkaynak	Taşkent	
2018-2019	EZ-1	146.0±9.13 ^{d-h}	137.6±7.59 ^{e-1}	109.5±5.44 ^{n-s}	100.0±2.09 ^{r-t}	135.4±3.60
	EZ-2	159.6±1.56 ^d	132.7±6.56 ^{g-1}	96.6±6.39 st	110.8±6.48 ^{m-s}	
	EZ-3	145.9±9.42 ^{d-h}	135.3±7.19 ^{g-k}	103.0±1.44 ^{o-s}	102.4±8.03 ^{q-s}	
	EZ-4	135.6±4.50 ^{f-j}	153.9±10.16 ^{de}	132.8±4.05 ^{g-1}	119.1±8.90 ^{k-o}	
	EZ-5	207.7±10.31 ^a	178.8±4.44 ^b	127.0±6.49 ^{r-m}	102.7±2.95 ^{p-s}	
	EZ-6	182.7±8.80 ^b	177.6±3.32 ^b	131.8±4.22 ^{h-1}	121.6±1.77 ^{r-n}	
2019-2020	EZ-1	153.1±2.53 ^{de}	153.8±9.96 ^{de}	117.3±4.63 ^{l-q}	117.4±5.83 ^{l-q}	133.2±2.90
	EZ-2	160.9±4.63 ^{cd}	146.1±3.97 ^{d-h}	112.2±10.49 ^{m-s}	118.8±3.41 ^{l-p}	
	EZ-3	153.3±11.52 ^{de}	151.9±7.05 ^{d-f}	114.6±3.72 ^{m-r}	85.2±5.21 ^t	
	EZ-4	144.9±0.92 ^{d-h}	148.5±6.59 ^{d-g}	119.9±4.71 ^{j-n}	112.2±2.41 ^{m-s}	
	EZ-5	176.0±3.74 ^{bc}	152.5±3.51 ^{de}	111.9±2.60 ^{m-s}	110.7±2.77 ^{m-s}	
	EZ-6	160.6±7.52 ^{cd}	154.9±0.38 ^d	116.5±2.61 ^{l-q}	103.1±4.81 ^{o-s}	
Çeşit ort.		160.5±6.54 ^a	151.9±5.05 ^b	116.1±3.87 ^c	108.6±3.75 ^d	
EZ Ort		LSD değeri ve Önemlilik				
EZ-1	129.3±4.49 ^{bc}	Y			4.3öd	
EZ-2	129.7±4.99 ^{bc}	EZ			7.5**	
EZ-3	123.9±5.51 ^c	Y x Ez int.			10.6**	
EZ-4	133.3±3.46 ^b	Ç			4.7**	
EZ-5	145.9±7.69 ^a	Y x Ç int.			6.7öd	
EZ-6	143.6±5.93 ^a	EZ x Ç int.			11.5**	
		Y x EZ x Ç int.			16.3*	

EZ-1: Mart başında, EZ-2: Mart sonunda, EZ-3: Nisan başında, EZ-4: Ekim sonu, EZ-5: Kasım başı, EZ-6: Kasım sonu, öd: önemli değil, **: P<0.01, *: P<0.05, aynı harflerle gösterilen veriler arasında fark istatistiksel olarak önemli değildir.

Ekim zamanlarına göre bin tane ağırlıkları 123.9 g ile 145.9 g arasında değişmiştir. İlkbaharda ekilen (EZ-1, EZ-2 ve EZ-3) yem bezelyelerinin bin tane ağırlıkları, sonbaharda ekilen (EZ-4, EZ-5 ve EZ-6) yem bezelyelerinin bin tane ağırlıklarından daha düşük olmuştur. En yüksek bin tane ağırlığı 145.9 g ile EZ-5'de, en düşük bin tane ağırlığı 123.9 g ile EZ-3'de tespit edilmiştir. Yapılan araştırmalarda ekim zamanlarına bağlı olarak bin tane ağırlıklarının önemli derecede etkilendiği belirlenmiştir (Demirci ve Ünver, 2005; Alan ve Geren, 2012).

En yüksek bin tane ağırlığı 160.5 g ile Gap Pembesi çeşidinde, en düşük bin tane ağırlığı ise 108.6 g ile Taşkent çeşidinde belirlenmiştir. Yapılan birçok araştırmada bin tane ağırlıkları çeşitlere göre önemli miktarda değiştiği belirlenmiştir (Timurağaoğlu ve ark., 2004; Demirci ve Ünver, 2005; Sayar ve Anlarsal, 2008; Sayar ve ark., 2009; Alan ve Geren, 2012; Tan et al., 2012; Uzun ve ark., 2012; Kavut ve Çelen, 2017; Özköse, 2017; Çağan ve ark., 2018).

Yıl, ekim zamanı ve çeşit interaksyonuna göre bin tane ağırlıkları 85.2 g ile 207.7 g arasında değişmiştir.

En yüksek bin tane ağırlığı 207.7 g ile 2018 yılında sonbaharda ikinci ekim (EZ-5) olarak ekilen Gap Pembesi çeşidinde, en düşük bin tane ağırlığı 85.2 g ile 2019 yılında ilkbaharda üçüncü ekim zamanı (EZ-3) olarak ekilen Taşkent çeşidinde görülmüştür.

SONUÇ

Bu araştırmada, Iğdır ekolojik şartlarında 2018 ve 2019 yıllarında 6 ekim zamanında tohum amacıyla yetiştirilen 4 yem bezelyesinin tohum ve saman verimleri incelenmiştir.

Yıllara göre, bitkide bakla sayısı, baklada tane sayısı, saman verimi, tohum verimi ve biyolojik verimde değişim gözlenirken, incelenen diğer verim unsurlarında önemli bir değişim olmamıştır. Araştırmanın birinci yılına (2018) göre, ikinci yılında (2019) bitkide bakla sayısı, baklada tane sayısı, saman verimi, tohum verimi ve biyolojik verim daha yüksek tespit edilmiştir.

Ekim zamanları yem bezelyesinin tohum verimi ve verim öğelerini önemli derecede etkilediği belirlenmiştir. Yem bezelyeleri en erken

olgunlaşmalarını Nisan başında yapılan ekimlerde sağlamışlardır. Sonbahar ekimlere göre, ilkbahar tohum ekimlerinde baklada tane sayısı, saman verimi, tohum verimi, biyolojik verim daha yüksek olmuştur. Bitkide bakla sayısı Ekim ayı sonundaki (EZ-4) ekimlerde, baklada tane sayısı Mart ayı başında ve Mart ayı sonundaki (EZ-1 ve EZ-2) ekimlerinde, saman verimi, tohum verimi ve biyolojik verim Mart ayı başında (EZ-1) ekimlerde, hasat indeksi Kasım ayı başındaki (EZ-5), bin tane ağırlığı Kasım ayı başında ve Kasım ayı sonundaki (EZ-5 ve EZ-6) ekimlerde verim ve bazı verim unsurları yönleriyle diğer ekim zamanlarına göre daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

İncelenen tüm verim ve özellikleri yem bezelyesi çeşitlerine göre önemli derecede farklılıklar göstermiştir. En erken olgunlaşma Özkaynak ve Taşkent çeşitlerinde görülmüştür. Bitkide bakla sayısı Taşkent, Özkaynak ve Gap Pembesi çeşitlerinde, baklada tane sayısı, tohum verimi, biyolojik verim ve hasat indeksi Kirazlı çeşidinde, saman verimi Gap Pembesi, Kirazlı ve Özkaynak çeşitlerinde, bin tane ağırlığı Gap Pembesi çeşidinde en iyi değerlerine ulaşmıştır.

Sonuç olarak bölge şartlarında Kirazlı çeşidinin seçilmesi ve bu çeşidin Mart ayı başında ekilmesi durumunda daha yüksek saman, tohum ve biyolojik verim elde edileceği belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma 2019-FBE-A26 nolu proje olarak Iğdır Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenerek yürütülmüştür.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Açıkgöz E 2001. Yem Bitkileri. Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı, No: 182.
- Açıkgöz E, Üstün A, Gül İ, Anlarsal AE, Tekeli AS, Nizam İ, Avcıoğlu R, Geren H, Çakmakçı S, Aydınoglu B, Yücel C, Avcı M, Acar Z, Ayan İ, Uzun A, Bilgili U, Sincik M, Yavuz M 2007. Yem Bezelyesi (*Pisum sativum* L.)'nde Genotip X Çevre İlişkileri ve Kuru Madde İle Tohum Veriminde Stabilitate Analizleri. Türkiye 7. Tarla Bitkileri Kong., Erzurum, s: 79-82.
- Alan Ö, Geren H 2012. Bezelyede (*Pisum sativum* L.) Farklı Ekim Zamanlarının Tane Verimi ve Diğer

Bazı Tarımsal Özellikler Üzerine Etkisi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 49(2): 127-134.

- Anonim 2001. Tarımsal Değerleri Ölçme Denemeleri Teknik Talimatı (Baklagil Yem Bitkileri). T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Koruma ve Kontrol Genel Müd., Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkezi Müdürlüğü, Ankara,
- Anonim 2015. Çayır, Mera ve Yem Bitkileri, Yeşil Alan Çim Bitkileri ve Yemlik Tane Baklagiller Çeşit Tescil Raporları. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Bitkisel Üretim Genel Müdürlüğü Tohumluk Tescil ve Sertifikasyon Merkez Müdürlüğü, Ankara.
- Anonim 2020. T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı Meteoroloji Genel Müdürlüğü.
- Avcıoğlu R, Hatipoğlu R, Karadağ Y 2009. Yem bitkileri Baklagil Yem bitkileri Cilt II, T.C. Tarım ve Köyişleri Bakanlığı Tarımsal Üretim ve Geliştirme Genel Müdürlüğü, s: 440-445, İzmir.
- Çaçan E, Kaplan M, Kökten K, Tutar H 2018. Evaluation of Some Forage Pea (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) Lines and Cultivars in Terms of Seed Yield and Straw Quality. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitü Dergisi, 8(2): 275-284.
- Çakmakçı S, Çeçen S, Aydınoglu B 1999. Antalya'da Sonbahar Ekimlerinde Bazı Tek Yıllık Baklagil Yem Bitkilerinin Tane ve Kes Verimleri Yönünden Ekim Nöbetine Girebilme Olanakları. Turkish. Journal of Agriculture and Forestry, 23 (ek sayı 3): 679-684.
- Ceyhan E, Önder M 2001. Bezelye (*Pisum sativum* L.) Çeşitlerinde Farklı Ekim Zamanlarının Tane Verimi İle Bazı Agronomik Karakterler Üzerine Etkileri. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(25): 159-172.
- Demirci G, Ünver S 2005. Ankara Koşullarında Bezelyede (*Pisum Sativum* L.) Farklı Ekim Zamanlarının Verim ve Verim Ögelerine Etkileri. Anadolu Dergisi, 15 (1): 49-60.
- Ekiz H 1983. Türkiye'de Yetiştirilen Bazı Burçak (*Vicia ervilia* (L.) Willd.) Çeşitlerinin Önemli Morfolojik Biyolojik ve Tarımsal Karakterleri Üzerinde Araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Kadioğlu S, Tan M 2018. Erzurum Şartlarında Bazı Yem Bezelyesi Hat ve Çeşitlerinin Tohum Verimleri ile Bazı Özelliklerinin Belirlenmesi. Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 49 (2): 143-149,
- Kaplan M, Kökten K, Arslan M, Özdemir S, Seydoşoğlu S 2014. Farklı yem bezelyesi (*Pisum arvense*) Genotiplerinin Tanelerinin Yem İçeriği Yönünden Karşılaştırılması, Türkiye 5. Uluslararası Katılımlı Tohumculuk Kongresi, Diyarbakır, Türkiye, 19 - 23 Ekim 2014, ss.363-368.
- Kavut YT, Çelen AE 2017. Kimi Yem bezelyesi Çeşitlerinde (*Pisum arvense* L.) Sıra Arası

- Mesafelerinin Tohum Verimi ile Bazı Verim Özelliklerine Etkisi Üzerinde Bir Araştırma. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 54 (1):79-83.
- Önder M, Ceyhan E 2001. Orta Anadolu Şartlarında Farklı Ekim Zamanlarında Ekilen Bezelye (*Pisum sativum* L.) Çeşitlerinde Tane Verimi İle Bazı Morfolojik Özellikler Arasındaki İlişkiler. Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 15(25): 173-183.
- Özkan U, Demirbağ NŞ 2016. Türkiye’de Kaliteli Kaba Yem kaynaklarının Mevcut Durumu. Türkiye Bilimsel Derlemeler Dergisi, 9(1):23-27.
- Özköse A 2017. Farklı Ekim Derinliklerinin Yem Bezelyesinin Verim ve Bazı Verim Özellikleri Üzerine Etkileri. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 21(6): 1188-1200.
- Sayar MS, Anlarsal AE 2008. Diyarbakır Ekolojik Koşullarında Bazı Yem Bezelyesi (*Pisum arvense* L.) Hat ve Çeşitlerinin Verim ve Verim Öğelerinin Belirlenmesi Üzerine Bir Araştırma. Ç.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, 17 (4): 78-88.
- Sayar MS, Anlarsal AE, Açıkgöz E, Başbağ M, Gül İ 2009. Diyarbakır Koşullarında Bazı Yem Bezelyesi (*Pisum arvense* L.) Hatlarının Verim ve Verim Unsurlarının Belirlenmesi. Türkiye VIII. Tarla Bitkileri Kongresi, 19-22 Ekim 2009, s: 646-650, Hatay.
- Tan M 2018. Baklagil ve Buğdaygil Yem Bitkileri. Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Ders Yayınları No: 190, Erzurum, 286 s.
- Tan M, Koc A, Dumlu Gul Z 2012. Morphological Characteristics and Seed Yield of East Anatolian Local Forage Pea (*Pisum sativum* ssp. *arvense* L.) Ecotypes. Turkish Journal of Field Crops, 17(1): 24-30.
- Timurağaoğlu KA, Genç A, Altınok S 2004. Ankara Koşullarında Yem Bezelyesi Hatlarında Yem ve Tane Verimleri. Tarım Bilimleri Dergisi, 10(4): 457-461.
- TÜİK 2020. Türkiye İstatistik Kurumu Resmi Web Sitesi. <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=101&locale=tr>
- Uzun A, Gün H, Açıkgöz E 2012. Farklı Gelişme Dönemlerinde Biçilen Bazı Yem Bezelyesi (*Pisum sativum* L.) Çeşitlerinin Ot, Tohum ve Ham Protein Verimlerinin Belirlenmesi. U.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi, 26(1): 27-38.
- Yıldız N, Bircan H 1991. Araştırma ve Deneme Metodları. Atatürk Üniversitesi yayınları no:697, Ziraat Fakültesi No:305, Ders kitapları serisi no:57, s:243.

The Effect of Feeding With Pumpkin Seed Membrane on Survival, Development and Longevity in Model Organism

Eda GÜNEŞ^{1*}, Şerife Bayram BIÇER²

¹Necmettin Erbakan Üniversitesi, Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları, Konya, Türkiye, ²Necmettin Erbakan Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Anabilim Dalı, Konya, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0001-7422-9375>, ²<https://orcid.org/0000-0002-5199-4100>

✉: egunes@erbakan.edu.tr

ABSTRACT

Most wastes generated during food production in the world are released to nature. However, the target and non-target species take these wastes into their organisms through nutrition although their bioavailability is unknown. In this study, the aim was to determine the bioavailability of wasted pumpkin seed membrane (PSM) for species in nature through its effects on the *Drosophila* obesity model along with the increased fat intake. For this purpose, either fat (20%) and PSM (0-2 g) were added to the *Drosophila melanogaster* diet. Survival-development, sex ratio, and adult lifespan were evaluated. As a result, the survival rate decreased and development time increased in insects depending on the amount of PSM added to the food. In the study, fed with PSM and fat intake negatively affected the insect in terms of survival-development and lifespan.

Research Article

Article History

Received : 15.12.2020

Accepted : 19.02.2021

Keywords

Drosophila melanogaster

Fat diet

Seed membrane

Development time

Nutrition

Model Organizmanın Kabak Çekirdeği Membranı ile Beslemenin Yaşama, Gelişme ve Ömür Uzunluğuna Etkisi

ÖZET

Dünyada gıda üretimi esnasında oluşan atıkların neredeyse birçoğu doğaya bırakılmaktadır. Çevre ve canlılar açısından kullanılabilirliği bilinmeyen ürünlerin beslenme yoluyla organizmaya alınması hedef ve hedef olmayan canlılar açısından önemlidir. Çalışmada hem atık olarak kabak çekirdeği membranının (KÇM) çevre ve doğada yaşayan türler açısından kullanılabilirliği, hem de artan yağ alımı ile obezite modeli olarak kullanılan *Drosophila*'da etkinin belirlenerek çıkarımlar yapılması amaçlanmıştır. Bu amaçla *Drosophila melanogaster* diyetine yağ (%20) ve KÇM (0-2 g) eklenmiştir. Böcekte yaşama-gelişme, eşey oranı ve ergin ömür uzunluğu değerlendirilmiştir. Sonuç olarak besine ilave edilen KÇM miktarına bağlı olarak böceklerde yaşama oranı azalırken, gelişim süresi artmıştır. Çalışmada beslenmeyle KÇM ve yağ alınması böceği yaşama-gelişim ve ömür uzunluğu açısından olumsuz etkilemiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 15.12.2020

Kabul Tarihi : 19.02.2021

Anahtar Kelimeler

Drosophila melanogaster

Yağlı diyet

Tohum membranı

Gelişim süresi

Beslenme

To Cite : Güneş E, Biçer ŞB 2021. The Effect of Feeding With Pumpkin Seed Membrane on Survival, Development and Longevity in Model Organism. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1327-1332. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.839884.

INTRODUCTION

Worldwide, pumpkin is cultivated for food (vegetable-nuts) industry, cosmetic industry, animal nutrition, and medical use (oil industry) (Tuncer and Yanmaz, 2011). When examining international cuisine, pumpkin has a wide range of uses in Turkish and regional cuisines. This crop is used extensively, especially in the kitchens of the regions as ingredient from soup to dessert (Cesur and Avcıkurt, 2019; Güleç and Durlu Özkaya, 2019; Kahraman et al., 2019). In Turkey, it is observed that the pumpkin cultivation is growing for nut pumpkins production. In particular,

the reasons for this increase of cultivation in recent years are low production costs and longer seed storage time (Altınok et al., 2019). Pumpkin seeds (*Cucurbita pepo* L.) are known to be nutritious and beneficial for health because of being rich in protein, fiber, vitamins, and minerals such as iron, zinc, calcium, magnesium, and copper (Syed et al., 2019; Valdez-Arjona and Ramírez-Mella, 2019; Alshehry, 2020). Pumpkin seeds and its oil are used in herbal medicine for the treatment of different diseases. Some studies show their positive effects on diseases such as diabetes, high cholesterol, liver functions, gallbladder, prostate

gland, depression, and gastrointestinal parasites (Syed et al., 2019; Valdez-Arjona and Ramírez-Mella, 2019; Alshehry, 2020; Majid et al., 2020). The wastes generated in food production from the agricultural origin are often used as animal feed or disposed (Konca, 2014; Yanmaz, 2014). Pumpkin seed is surrounded by a soft shell and a natural membrane. It is known that this natural membrane has the potential to pollute the environment after the seeds are roasted (Çankaya and Özcan, 2017; Syed et al., 2019; Alshehry, 2020). Nuts with a high rate of waste formation are pumpkin seeds, pistachios, hazelnuts, almonds, carobs, peanuts, and sunflower seeds (Gültepe and Bayram, 2019; Valdez-Arjona and Ramírez-Mella, 2019; Gültekin Özgüven et al., 2020). As the nuts industry wastes contain some nutrients required for animal, the objective of this study aimed to evaluate the use of PSM. The PSM is surrounded by a thin membrane-coating separated from the core during roasting. It cannot be used in human and animal nutrition in contrast to the other plant seed wastes. According to recent studies, these membrane structures are powdered with a special application and found to be available as natural additives in the clothing and paper industries. This substance has high water retention properties, which makes PSM usable (Çankaya and Özcan, 2017). Most bioactive phytochemicals are found in the outer shell of the seed (Liu et al., 2014). Thus, in this study, it was aimed to test the bioavailability of pumpkin seed membrane (PSM) in an animal model. In nutritional research, the fruit fly *Drosophila melanogaster* Meigen is used as an important model organism. This fly is fed by a daily standard diet that includes glaze or potatoes, yeast, sugar sucrose, fungicide, and agar. The number of replicates has no ethical concern, its easy supply and cultivating in laboratory conditions make it the preferred model. To perform studies on diseases such as obesity and diabetes, which are the result of poor nutrition today, necessary research can be done by adding the desired products (high-fat diet, high sugar diet, etc.) to the standard diet (Lüersen et al., 2019; Poças et al., 2020). This study also evaluated the effect of feeding with PSM on the model organism's development and lifespan. Besides, the use of PSM in the laboratory was tested by using its water retention capacity. As recycling has become an important issue, this study also aimed to determine whether the PSM can be disposed of in the soil.

MATERIAL and METHOD

In this study, commercial (Pınar Nuts Products, Nevşehir type, pointed pumpkin) PSM produced in 2018-2019 was used by adding to the standard insect diet (SD) without freezing and after sterilization (30-40°C) and removal of rough parts. The flies used in the experiments were the White type (*W¹¹¹⁸*) strain of *D.*

melanogaster (Drosophilidae). This stock had been maintained for five years in the Laboratory. The flies were kept at a constant temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$ on an SD composed of potato flour, sucrose, dried yeast, agar, nipagin, and vitamin C (Güneş, 2016). The flies were kept in 12 hours at the light and 12 hours at darkness except during the transfers onto a fresh medium (usually once weekly). The humidity of the experimental chamber was 70-60%.

Experimental Design

In this study, for a High-fat diet (HFD), palmitic acid was dissolved within Tween-80 (1%) and added 20% to the hot SD (Sun et al., 2010). HFD groups were added to experiments because of the increased fat intake in non-target organisms such as humans. Similar to the previous study (Güneş and Biçer Bayram, 2019), the upper and lower limits of PSM use were determined. The six different amounts of PSM (0.05, 1 and 2 g) were added to 100 ml of SD. All of the experiments were carried out under conditions where the stock culture of insects was grown. From the culture, the females and males (5 virgin/7 male; N: 100/each of trials) with the same age were used for experiments, they mated and the eggs were collected after six hours. The culture vials containing only the SD were used as negative control; high fat containing diets were used as a positive control (PC). Firstly, newly 1st stage larvae (72 hour, N: 100) were grown up to the adult stage by inoculating on the experimental pattern. The larvae of the insect were grown up to the adult stage with the PSM in different concentrations and the developmental stages were followed daily. After pupation, pupae were removed, offsprings were counted every day, and sexes were determined by Stereomicroscope (SZ61, Olympus, C3X33, Japan). Secondly, the same age mated adults were raised in the vials including SD, PSM, and PC. The effects of PSM on longevity were studied separately in 25 females and 25 males, which were grown in the experimental nutrients. Foods were replaced with fresh ones twice a week, and dead-alive adults were recorded. The experiment was conducted until the last fly died. The experiments were repeated 4 times in thermal cabins (Çolak et al., 2014).

Statistical analyses

One-way Variance Analysis (ANOVA; SPSS version 18.0, Inc., Chicago, IL, USA) and LSD tests were used to determine the importance of the difference between averages. Survival rates and longevity were analyzed by the Chi-square test. The longevity values of the experimental groups were subjected to Duncan's one-way range test ($P < 0.05$).

RESULTS

The development, sex ratio, and longevity data are

presented in the table below (Table 1; Figure 1). As data were evaluated in pupae fed by PSM, the highest survival ratio was obtained in pupae fed with 0.05 g PSM (99.5%). It was observed that increasing the rate of PSM (1 and 2 g) reduced the rate of larval survival or even reduced the lethal concentration below 50, and this decrease cannot be prevented by adding PSM with the HFD added to the feed. In larval developmental times; although only PSM additions were statistically very similar compared to control, it was found that the development of the insects fed with the HFD group increased 2-fold, and with the addition of PSM, the developmental time extended 3 times of the normal developmental time (approximately 12days) (Table 1). The survival rate in the pupal period was found to be 100% in 0.05 g PSM, 70% at 1 g and 20% at 2 g. These rates changed with HFD and the rate of pupae decreased from 70% in 1 g PSM to 50% with the addition of HFD to the feed. In terms of the

developmental time of being pup; contrary to what was observed in the larval phase, the addition of PSM extended the pupal development period and even reached 3-3.5 times the duration with the addition of HFD and PSM to the feed (Table 1). While the rate of adult life in the group fed with 0.05 g PSM was around 99%, its increased amount in the feeding (2 g) was found to reduce the survival ratio by 4.5 times. With the addition of HFD to the feed, the survival rates of adults remained the same when 2 g PSM was added. When adult development times were evaluated, they were extended 3-4 days with PSM addition, 5 days with HFD addition, and approximately 11 days in the adult when both were added (Table 1). Although the change in sex ratio was not statistically different between PSM and the other groups, the proportion of male individuals in HFD-fed insects was greater than the proportion of females (Güneş and Biçer Bayram, 2019).

Çizelge 1. Kabak çekirdeği membranı (KÇM) ile oluşturulan besin gruplarının D. melanogaster yaşama, gelişim ve cinsiyet oranına etkisi

Table 1. Effect of nutritional groups formed with pumpkin seed membrane (PSM) on D. melanogaster survival, development time and sex ratio

(g/L)	Survival to third instar (%) (M*± S.E)	Time to third instar (days) (M*±S.E)	Survival to pupal stage (%) (M*±S.E)	Time to pupal stage (days) (M*±S.E)	Survival to adult stage (%) (M*± S.E)	Time to adult stage (days) (M*± S.E)	Sex ratio (%) Female/Male (M*± S.E)
Control	98.8 ± 0.1 ^a	3.81 ± 0.2 ^{ab}	90.8 ± 0.1 ^a	4.80 ± 0.2 ^a	80.4 ± 0.2 ^b	7.35 ± 0.1 ^a	55/54±0.5 ^d
HFD	40.3 ± 1.7 ^{cd}	6.57 ± 2.2 ^c	40.0 ± 0.8 ^c	9.14 ± 0.5 ^c	40.0 ± 2.3 ^c	12.75 ± 0.2 ^c	26/74±0.4 ^a
PSM 0.05g/L	99.5 ± 0.1 ^a	4.4 ± 0.2 ^b	99.5 ± 0.1 ^a	7.8 ± 0.2 ^b	99.5 ± 0.2 ^a	10.8 ± 0.1 ^b	50/50±0.5 ^c
PSM 1 g/L	70.0 ± 0.1 ^b	4.7 ± 0.2 ^b	70.0 ± 0.1 ^b	8.4 ± 0.2 ^{bc}	70.0 ± 0.2 ^b	10.7 ± 0.1 ^b	43/57±0.5 ^b
PSM 2 g/L	20.0 ± 0.1 ^d	3.0 ± 0.2 ^a	20.0 ± 0.1 ^d	8.0 ± 0.2 ^b	20.0 ± 0.2 ^d	11.5 ± 0.1 ^c	50/50±0.5 ^c
PSM 0.05g/L+HFD	71.3 ± 1.8 ^b	7.8 ± 0.2 ^c	70.5 ± 2.1 ^b	11.0 ± 0.2 ^d	70.3 ± 2.1 ^b	14.3 ± 0.4 ^d	50/50±2.1 ^c
PSM 1 g/L + HFD	51.3 ± 1.8 ^c	10.3 ± 0.2 ^d	50.5 ± 2.1 ^c	13.1 ± 0.4 ^e	50.3 ± 2.1 ^c	16.3 ± 0.4 ^e	50/50±1.73 ^c
PSM 2 g/L + HFD	21.0 ± 1.8 ^d	11.8 ± 0.2 ^e	20.5 ± 2.1 ^d	15.3 ± 0.4 ^f	20.0 ± 2.1 ^d	18.3 ± 0.4 ^f	50/50±1.29 ^c

*Average of four replicates, 100 larvae used for each repeat, ^{a,b,c,d,e,f} Values within a row with different superscripts differ significantly at P<0.05 (χ^2 test, LSD Test), Control: Standard insect diet, M: Mean, HFD: Hihg-fat diet (20%), PSM: Pumpkin seed membrane, S.E (Standart Error)

Çizelge 2. Kabak çekirdeği membranı (KÇM) ile oluşturulan beslenme gruplarının böceğin ömür uzunluğuna etkisi

Table 2. The effect of feeding groups formed with pumpkin seed membrane (PSM) on the lifespan of the insect

(g/L)	Female	Female life span (days) (M. ± S.E)	Male	Male life span (days) (M. ± S.E)
	Max. Life Span (N:100)		Max. Life span (N:100)	
Control	62.5	60.0 ± 1.2 ^a	65.0	62.0 ± 1.5 ^a
HFD	21.5	18.0 ± 1.6 ^b	18.5	18.0 ± 0.3 ^b
PSM 0.05g/L	43.0	43.0 ± 0.1 ^c	43.0	43.0 ± 0.1 ^c
PSM 1 g/L	62.5	60.0 ± 1.2 ^a	59.5	58.0 ± 0.6 ^a
PSM 2 g/L	60.5	60.0 ± 0.3 ^a	60.0	60.0 ± 0.1 ^a
PSM 0.05g/L + HFD	18.0	18.3 ± 0.1 ^b	18.0	18.3 ± 0.1 ^b
PSM 1 g/L + HFD	39.0	20.0 ± 1.0 ^b	36.0	20.0 ± 0.8 ^b
PSM 2 g/L + HFD	18.3	18.0 ± 1.0 ^b	18.3	18.0 ± 1.0 ^b

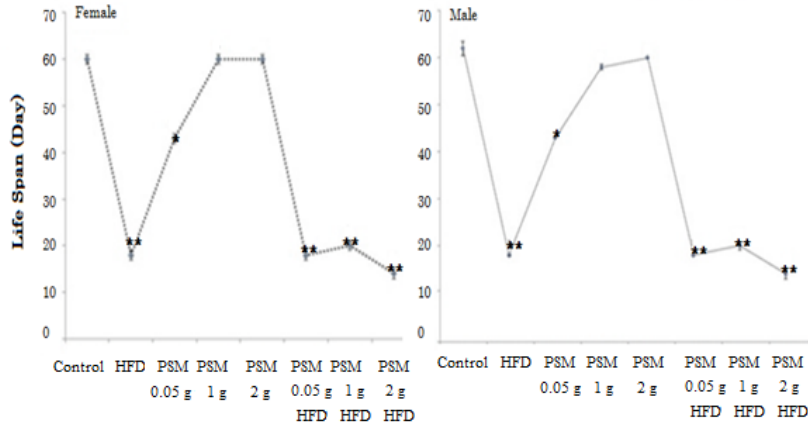
^{a,b,c,d,e,f} Values within a row with different superscripts differ significantly at P<0.05 (Duncan test), Max=Maximum, Control: Standard insect diet, M: Mean, HFD: Hihg-fat diet (20%), PSM: Pumpkin seed membrane, S.E (Standart Error)

As for females, while the control group is statistically similar and had near-average longevity compared to

groups fed with 1 and 2 g PSM, HFD was found to negatively affect the length of life and reduced it

approximately 2-3 times. In the PSM and HFD group, it was determined that there were individuals between 18-20 days old and that the length of life decreased by 3% compared to other groups without changes in male and female ratio (Table 2). If the longevity of male

individuals was evaluated, similar results occurred in females, but the maximum longevity of males fed with fat and 1 g PSM was 3 days shorter than females (Table 2; Figure 1).



Şekil 1. Kadınların ve erkeklerin ortalama ömür uzunluğu (gün); * P < 0.05, ** P < 0.01,
Figure 1. The average life span of females and males (days); *P < 0.05, **P < 0.01,

DISCUSSION

Under normal circumstances, the rate of survival of *Drosophila melanogaster* can be as low as 98% in larvae and up to 80% in the development of the adult stage. The duration of development is about 7-8 days in total from larvae to adults (Güneş et al., 2017). In the study, it was determined that 2 g PSM prevented the development of the insects, decreased the rate of survival with the addition of HFD, and delayed the developmental period by 3-3.5 times in 18 days. This experiment was designed in line with the increased prevalence of obesity and fat intake in humans. Studies with *Drosophila* species showed that *Cucurbita pepo* L. led to 79% survival (Goñi et al., 1998). Nutrients and their ingredients can reduce or increase the rate of survival (Güneş, 2016). Palmitic acid, especially used in HFD, is known to negatively affect the development of life (Güneş et al., 2019). Feeding with a low amount of PSM increased the survival rate by approximately 5% compared to control group, and addition of PSM to the HFD caused a 14% decrease in the survival rate of adult insects. In the developmental period of the same individuals fed with 0.05 g PSM, the duration of adulthood increased by approximately 3 days compared to control, while the duration of development increased by 6 days to 14 days in those fed with fat-added diet.

In the study, there was no significant difference in sex ratios except for those fed HFD although nutrition affects sex ratio (Güneş et al., 2019). Research on nutrition and photoperiods supports the results of the present study (Koç and Gülel, 2006). However, while some nutrients increase the female ratio (Güneş et al., 2019), sometimes an increase in the male ratio can be observed (Arıca et al., 2017). Since sex ratio

determines the population density, amount, and variety of nutrients affect the survival, reproduction, and egg-laying of the species, thereby directly influence population size (Koç and Gülel, 2006).

The addition of HFD to the diet causes the larvae to become a gel and remain small, which decreases the percentage of survival, but the nutrients taken during the larval period are known to affect survival, adult size, and rate of development (Chippindale et al., 1997). In insects, environmental factors such as stress, temperature, climate, light, nutrition, humidity as well as genetic factors such as mutation or inter-species diversity affect life longevity and aging (Carey et al., 2002; Çakır and Sarıkaya, 2004; Uysal et al., 2015). Population density affects body size and maturity, while maturity affects the length of life in individuals (Benli and Türkoğlu, 2017). Therefore, in this study, life-longevity experimental groups were designed where only the nutrition varied among groups. Under normal circumstances, the life length of female and male individuals can vary between 60-80 days (Uysal and Semerdöken, 2011; Uysal et al., 2015). In this study, it was determined that females lived an average of 62 days and males lived about 65 days, and these lengths were not affected by the addition of PSM to the diet. However, with HFD added to the diet, it was determined that the life span was shorter 47 days in individuals, the addition of PSM did not affect the longevity (Table 1). Although it is known that under normal circumstances males live longer than females (Lints et al., 1983; Good and Tatar, 2001; Koç and Gülel, 2006), in this study females live a day or two more when the average days of life were compared between males and females. Similar nutritional experiments with different herbal extracts (Çolak et

al., 2014) support in this study results of female and male life longevity in the study. Factors such as dietary content, egg formation, and early maturation are thought to be the factors that reduce the length of life of females (Prowse and Partridge, 1997; Good and Tatar, 2001; Arking et al., 2002; Novoseltsev et al., 2003). In this study, there was a negative correlation between PSM+HFD and lifetime in female and male individuals (R=0.110 for males and R=0.180 for females).

CONCLUSION

Vegetable wastes are either re-used as animal feed or disposed, with or without processing, directly or indirectly to nature. In this study, the effects of PSM, which is known to cause discomfort in the lungs of animals when taken through inhalation, were investigated to determine whether swallowing/eating would cause similar negative outcomes. Only the addition of PSM at a low amount (0.05 and 1 g) to the diet was determined not to adversely affect the development of the insects and their longevity. However, the intake of PSM together with HFD prevented the formation of eggs, reducing the population density and survival-development. PSM, which can hold water, is considered not to be available in the laboratory due to usage limitation at low amounts (g/L) and a high amount of toxic properties. Detailed studies are needed to evaluate its safe use as animal feed. With this approach presented in this study, the basis for advancing studies is thought to be established.

ACKNOWLEDGMENT

The study was produced from the second author's master's thesis.

Researchers' Contribution Rate Statement Summary

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

Conflict of Interest Statement

There is no conflict of interest between the article authors.

KAYNAKLAR

Alshehry GA 2020. Preparation and nutritional properties of cookies from the partial replacement of wheat flour using pumpkin seeds powder. World 9: 48-56.
Altınok H, Çolak EŞ, Altınok MA 2019. Kayseri ili çerezlik kabak meyvelerinde çürüme: risk faktörleri ve öneriler. Ziraat Fakültesi Derg 14: 166-176.
Arıca ŞÇ, Demirci S, Özyılmaz A, et al. 2017. The effects of some macroalgae on viability of

Drosophila melanogaster. Su Ürünleri Derg 34: 451-454.

- Arking R, Buck S, Novoseltsev V, et al. 2002. Genomic plasticity, energy allocations, and the extended longevity phenotypes of *Drosophila*. Ageing Research Reviews 1: 209-228.
Benli D, Türkoğlu Ş 2017. The effect of some food preservatives on percentage of survival and longevity in *Drosophila melanogaster*. Cumhuriyet Science Journal 38: 461-472.
Carey J, Liedo P, Harshman L, et al. 2002. Life history response of mediterranean fruit flies to dietary restriction. Aging Cell 1: 140-148.
Cesur R, Avcıkurt C 2019. Gastronomi turizmi kapsamında doğu karadeniz yerel yiyeceklerinin tanınma ve deneyimlenme durumları üzerine bir araştırma. IVth International Gastronomy Tourism Studies Congress 19-21 September (Ugtak), pp.698-705, Nevşehir.
Chippindale A, Alipaz J, Chen H, et al. 1997. Experimental evolution of accelerated development in *Drosophila*. 1. developmental speed and larval survival. Evolution 51: 1536-1551.
Çakır Ş, Sarıkaya R 2004. Bazı organik fosforlu insektisitlerin *Drosophila melanogaster*'in yaşama yüzdesi üzerine etkisi. Gazi Eğitim Fakültesi Derg24: 71-80.
Çankaya N, Özcan M 2017. A new functional additive obtained by using jet pulse filters: pumpkin seed membrane. Tabkon pp.343.
Çolak DA, Ayar A, Uysal H 2014. The effects of *Punica granatum* L ethanol extract including the antioxidant flavonoids on *Drosophila melanogaster* lifespan. Journal of Applied Biological Sciences 8: 06-09.
Goñi B, Martinez M, Valenta V et al. 1998. Preliminary data on the *Drosophila* species (Diptera, Drosophilidae) from Uruguay. Revista Brasileira de Entomologia 42: 131-140.
Good T, Tatar M 2001. Age-specific mortality and reproduction respond to adult dietary restriction in *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Physiology 47: 1467- 1473.
Güleç H, Durlu-Özkaya F 2019. Gastronomi turizminde Bursa. IVth International Gastronomy Tourism Studies Congress 19-21 September 2019. pp.329-336, Nevşehir.
Gültepe E, Bayram İ 2019. Bitkisel ve endüstriyel atıkların ruminant beslemede etkin kullanımının hayvan verimi üzerine etkileri. Türkiye Klinikleri Animal Nutrition and Nutritional Diseases-Special Topics 5: 14-21.
Güneş E 2016. Besinler ve beslenme çalışmalarında *Drosophila*. KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi 19: 236-243.
Güneş E, Biçer Bayram Ş 2019. Kabak çekirdeği zararının in vivo kullanımı. Ganud International Conference On Gastronomy, Nutrition And

- Dietetics pp.303-310. Gaziantep.
- Güneş E, Biçer Bayram Ş, Erçetin H 2019. Palm yağının in vivo kullanımı. Ulusal Çevre Bilimleri Araştırma Dergisi 2: 61-68.
- Güneş E, Erdal MO, Gemi L 2017. The effect of nanofiber on the biological traits of *Drosophila melanogaster*. Sakarya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Derg 21: 1608-1612.
- Kahraman Ü, Etyemez S, Gençoğlu U 2019. Hatay mutfağında tatlı ve reçeller. IVth International Gastronomy Tourism Studies Congress 19-21 September (Ugtak). pp.512-520, Nevşehir.
- Koç Y, Gülel A 2006. Fotoperiyot ve besin çeşidinin *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830 (Diptera: Drosophilidae) un gelişim süresi, ömür uzunluğu, verim ve eşey oranına etkisi. Anadolu Tarım Bilimleri Derg 21: 204-212.
- Konca Y 2014. Çekirdek Kabağı Artıklarından Silaj Yapma İmkanları. Çerezlik Kabak Çalıştayı pp.88-98.
- Lints FA, Bourgois M, Delalieux A, et al. 1983. Does the female life span exceed that of the male: a study in *Drosophila melanogaster*. Gerontology 29: 336-352.
- Liu T, Han Yu X, Gao E, et al. 2014. Hepatoprotective effect of active constituents isolated from mung beans (*Phaseolus radiatus*) in an alcohol induced liver injury mouse model. Journal of Food Biochemistry 38: 453-459.
- Luersen K, Röder T, Rimbach G 2019. *Drosophila melanogaster* in nutrition research the importance of standardizing experimental diets. Genes Nutrition 14: 1-5.
- Majid AK, Ahmed Z, Khan R 2020. Effect of pumpkin seed oil on cholesterol fractions and systolic/diastolic blood pressure. Food Science and Technology 40: 1-10
- Novoseltsev V, Novoseltseva J, Boyko S et al. 2003. What fecundity patterns indicate about aging and longevity: Insights from *Drosophila* studies. Journals of Gerontology Series A-Biological Sciences and Medical Sciences 58: 484-494.
- Özgüven M, Beyde B, Özçelik B 2020. Atıkların değerlendirilmesi: fındık (*Corylus avellana* L.) ve antep fıstığı (*Pistacia vera* L.) iç zarlarından elde edilen fenolikçe zengin ekstraktlara lipozomal taşıma sistemlerinin uygulanabilirliği. Avrupa Bilim ve Teknoloji Derg 19: 241-246.
- Poças GM, Crosbie AE, Mirth CK 2020. When does diet matter? the roles of larval and adult nutrition in regulating adult size traits in *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Physiology 104051.
- Prowse N, Partridge L 1997. The effects of reproduction on longevity and fertility in male *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Physiology 43: 501-512.
- Sun X, Seeberger J, Alberico T et al. 2010. Açai palm fruit (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves survival of flies on a high fat diet. Experimental gerontology 45: 243-251.
- Syed QA, Akram M, Shukat R 2019. Nutritional and therapeutic importance of the pumpkin Seeds. Seed 21: 15798-15803.
- Tuncer B, Yanmaz R 2011. Hibrid çerezlik kabak (*Cucurbita pepo* L.) tohumlarında yağ asitleri ve e vitamini içeriğinin belirlenmesi. Türkiye 6. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 383-386.
- Uysal H, Semerdöken S 2011. Sentetik Gıda Boyalarının *Drosophila melanogaster*'in Oregon R Soyunda Larval Toksikite ve Ergin Ömür Uzunluğu Üzerine Etkilerinin Belirlenmesi. Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 4: 71-87.
- Uysal H, Unver S, Kizilet H 2015. The effects of neonicotinoids on the longevity of the male and female populations of *Drosophila melanogaster*. Ekoloji Dergisi 24: 57-63.
- Valdez-arjona LP, Ramírez-Mella M 2019. Pumpkin waste as livestock feed: impact on nutrition and animal health and on quality of meat, milk, and egg. Animals 9: 769.
- Yanmaz R 2014. Türkiye'nin çekirdek potansiyeli. Çerezlik Kabak Çalıştayı Bildirileri pp.1-12.

Embriyonik Dönemde Döngüsel Aydınlatma Yapılan Etlik ve Yumurtacı Cıvcıvlerinin Purkinje Hücrelerinde Bazı AgNOR Parametrelerinin Karşılaştırılması

Gamze TURGAY-İZZETOĞLU¹, İrem Nur SERBESTOĞLU², Sezen ÖZKAN³, Servet YALÇIN⁴

¹Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bornova-İZMİR, ²Ege Üniversitesi Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi Bornova-İZMİR, ^{3,4}Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü Bornova-İZMİR

¹<https://orcid.org/0000-0001-9828-2402>, ²<https://orcid.org/0000-0002-7425-8325>, ³<https://orcid.org/0000-0002-9637-882X>

⁴<https://orcid.org/0000-0003-4194-0536>

✉: gamze.turgay@ege.edu.tr

ÖZET

Aydınlatma, modern tavuk yetiştiriciliğinde, üreme, büyüme, vücut sıcaklığı, yem tüketimi ve sindirim olayları da dahil olmak üzere birçok fizyolojik süreci etkileyen ve metabolik olaylarda belirleyici rol oynayan önemli unsurlardan biridir. Aydınlatmaya bağlı olarak oluşan değişiklikler, sinir sistemi ve endokrin sistemin görev aldığı fizyolojik olaylar sonucu meydana gelmektedir. Purkinje hücreleri, merkezi sinir sisteminin en iri hücrelerindedir. Bu hücreler, tavuk embriyosunun ilk günlerinde beyincik korteksine göç edip, kendilerine ait hücre tabakasını meydana getirmektedirler. DNA'nın rRNA sentezleyen genlerini içeren ve nukleolusu oluşturan bölgeleri, nukleolus düzenleyici bölgeler (NOR) olarak adlandırılmaktadır. NOR'ların gümüşleme metoduyla (AgNOR) aktif olarak transkripsiyon yapan bölgelerinin boyanması sırasında rRNA bölgeleri de boyanarak, ışık mikroskopunda küçük, koyu benekler halinde görünmektedirler. Bu çalışmada; etlik ve yumurtacı damızlık yumurtalarına kuluçkada uygulanan günlük döngüsel aydınlatmanın (16 saat aydınlık/8 saat karanlık) beyincikte Purkinje hücrelerinde hem histolojik (luxol fast blue & cresyl violet) hem de bu hücrelerin nukleus çap ve alanları ile NOR alanları (AgNOR gümüş boyama yöntemi ve istatistiksel analiz) üzerine etkisi incelenerek ileride yapılacak olan benzeri çalışmalara temel veriler sağlanması amaçlanmıştır. Kuluçkada aydınlatmanın kontrol grubuna göre etlik cıvcıvlerde Purkinje hücrelerinde nukleus alanı ile NOR alanını, yumurtacılar da ise nukleus çapını artırdığı saptanmıştır. Sonuç olarak, kuluçkada aydınlatmanın etlik cıvcıvlerde Purkinje hücrelerinde protein sentezini artırdığı dolayısı ile sitoplazmalarındaki protein miktarında artışa bağlı olarak nukleus alanının genişlediği yargısına varılmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 23.12.2020

Kabul Tarihi : 11.02.2021

Anahtar Kelimeler

Cıvcıv beyinciği

Purkinje hücresi

NOR (Nukleolus Düzenleyici Bölgeler)

Luxol fast blue&Cresyl violet

AgNOR

The Comparasion of Some AgNOR Parameters of Purkinje Cells in The Laying and Broiler Chicks Exposed to Daily Cyclic Lighting During The Embryonic Period

ABSTRACT

Lighting, in modern poultry breeding, is one of the most important factors affecting the physiology of birds, including reproduction, growth, body temperature, feed consumption and digestion, also plays an impressive role in metabolic events in the body. Changes caused by lighting occur as a result of physiological events associated with the nervous system and the endocrine system. Purkinje cells are one of the largest cells of the central nervous system. In the early days of the chicken embryo, these cells migrate to the cerebellum cortex and form their own cell layer. The regions of DNA that contain rRNA-synthesizing genes and form the nucleolus called Nucleolar Organizer Regions (NOR). During the staining of actively transcribing regions of NORs with the silvering method (AgNOR), the rRNA regions are also stained and appear as small, dark spots under light microscope. This study aimed to determine the effect of 16 h light:8 h dark lighting

Research Article

Article History

Received : 23.12.2020

Accepted : 11.02.2021

Keywords

Chick cerebellum

Purkinje cell

NOR (Nucleolar Organizer Regions)

Luxol fast blue&Cresyl violet

AgNOR

during incubation on histology, nucleus diameter, areas of these cells and NOR areas of the Purkinje cells of the cerebellum of chicks to provide basic data for similar studies to be carried out in the future. The results showed that lighted incubation increased nucleus areas and NOR areas of the Purkinje cells of the broiler chicks compared to control and increased nucleus diameters of laying chicks. It was concluded that, lighting during incubation increased protein synthesis in the Purkinje cells of broiler chicks and the amount of protein in their cytoplasm resulting in an increase in nucleus area.

- Atıf İçin:** Turgay İzzetoğlu G, Serbestoğlu İN, Özkan S, Yalçın S 2021. Embriyonik Dönemde Döngüsel Aydınlatma Yapılan Etlik ve Yumurtacı Cıvıvlerinin Purkinje Hücrelerinde Bazı AgNOR Parametrelerinin Karşılaştırılması. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 24 (6): 1333-1342. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.845203.
- To Cite:** Turgay İzzetoğlu G, Serbestoğlu İN, Özkan S, Yalçın S 2021. The Comparison of Some AgNOR Parameters of Purkinje Cells in The Laying and Broiler Chicks Exposed to Daily Cyclic Lighting During The Embryonic Period. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1333-1342. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.845203.

GİRİŞ

Kanathlı sinir sistemi de memelilerde olduğu gibi ektodermden köken alır. *Kanalis nörالیş*in ön ucunun kapanması ve gelişmesiyle beyin vezikülü ya da beyin kabarcığı şekillenir. *Ensefalon* adını alan bu yapının boğumlanması ile meydana gelen *rombensefalon* (arka beyin), 72 saatlik tavuk embriyosunda, morfolojik olarak *metensefalon* (art beyin) ve *miyelensefalon* (son beyin) olmak üzere ikiye ayrılmıştır. Embriyonik dönemin sonuna doğru dorsal metensefalik bölgeden ise beyincik gelişir. Beyincik; sağ ve sol *serebral hemisferler* (yarıküreler), ortada iki yarıküreyi bağlayan *vermis serebelli* ve hemisferlerin dış yüzündeki *folya* adı verilen derin kıvrımlardan meydana gelmektedir. Beyincik hasarları, ince motor becerilerin kaybı ile ilişkilidir. Bu sebeple, beyin motor merkezi olarak kabul edilen beyincik dengeyi sağlamak ve kas hareketlerini koordine etmek gibi önemli işlevlere sahiptir (Herrup ve Kuemerle, 1997; Koral-Taşçı ve Bingöl, 2018).

Gelişimini tamamlamış bir beyincik, *korteks* (gri madde) ve *medulla* (ak madde) olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Korteks tabakası, tekrar üç tabakaya ayrılır. Bunlar dıştan içe doğru; en az hücre sayısına sahip olan moleküler tabaka (*stratum molekulare*), ortada Purkinje hücreleri ile bunları çevreleyen sepet hücrelerinden oluşan Purkinje hücresi tabakası (*stratum gangliosum*) ve içte en yoğun hücre popülasyonuna sahip olan granüler tabaka (*stratum granulosum*)'dır (Koral-Taşçı ve Bingöl, 2018; Öber ve Turgay-İzzetoğlu, 2020). Bütün bu korteks tabakaları; 8 tip nöron (*Purkinje hücreleri*, *Lugaro hücreleri*, *sepet hücreleri*, *unipolar fırçamsı hücreler*, *yıldız hücreleri*, *Candelebrum hücreleri*, *Golgi hücreleri*, *granüler hücreler*), gliya hücreleri, bu hücrelerin uzantıları ve kan damarlarını içermektedir. Medulla tabakasında ise nöron bulunmaz. Beyinciğin genel histolojik yapısının kuluçka çıkışından sonra tamamlandığı bilinmektedir (Akar ve Sur, 2010; Koral-Taşçı ve Bingöl, 2018).

Purkinje hücreleri, merkezi sinir sisteminin en iri

hücrelerindedir. Bu hücreler, tavuk embriyosunun 3. ve 5. günleri arasında şekillenmeye başlar ve beyincik korteksine göç edip, kendilerine ait hücre tabakasını (*stratum gangliosum*) meydana getirirler. Yapılan çalışmalarda, 13. günde Purkinje hücrelerinin üç sıra halinde dizildiği ve altlarındaki granüler tabakanın henüz tam düzenlenmediği; 17. günde ise, Purkinje hücrelerinin tek sıra halinde düzenlendiği ve moleküler tabakanın belirginleştiği bildirilmiştir (Espinar ve ark., 1997; Luo ve ark., 2004; Akar ve Sur, 2010). Purkinje hücreleri beyinciğin tek eferent hücreleridir. Aşırı dallanma gösteren dendritleri moleküler tabakaya uzanırken, aksonları ise medullaya kadar ulaşarak orada yer alan nöronların nukleusları ile bağlantı kurup iletimi sağlamaktadır. Purkinje hücreleri sitoplazmalarında bol miktarda iri Nissl tanecikleri içermektedirler (Akar ve Sur, 2010; Karol ve ark., 2010; Kandel ve ark., 2013).

Aydınlatma, modern tavuk yetiştiriciliğinde; üreme, büyüme, vücut sıcaklığı, yem tüketimi ve sindirim olayları da dahil olmak üzere birçok metabolik olaya etki eden unsurlardan biridir. Işık, kanathlılarda retinal ve ekstra retinal bölgelerdeki fotoreseptör hücreler üzerinden algılanarak hipotalamus ve hipofiz bezini harekete geçirmekte böylece büyüme, cinsel olgunluk ve yumurta verimini etkilemektedir (Lewis ve Morris, 2006). Kontrollü aydınlatmayla kanathlılarda oluşan değişikliklerin, sinir sistemi ve endokrin sistem arasındaki fizyolojik olaylar sonucu meydana geldiği düşünülmektedir. Düşük yoğunlukta sürekli aydınlatılan piliçler daha uysal olmakta ve çeşitli uyarıcı aydınlatma programlarına maruz kalan piliçlere göre daha az hareket etmektedirler (Kristensen ve ark., 2006). Piliçlere karanlık dönem sağlayan programların ise fizyolojik stresi azalttığı, bağışıklık yanıtını iyileştirdiği, uyuma davranışını düzenlediği, hayvanların hareketliliğini arttırdığı ve hızlı gelişme sonucu oluşan ani ölümleri azalttığı gösterilmiştir (Bayram ve Özkan, 2010; Prescott ve ark., 2004; Schwan-Lardner ve ark., 2016). Bu kapsamda başta AB olmak üzere bazı ülkelerde piliç üretimini düzenleyen yasalar, üretim dönemi boyunca

4 saati kesintisiz olmak üzere en az 6 saatlik bir karanlık periyodu zorunlu kılmıştır (Schwean-Lardner ve ark., 2016). Piliçlere karanlık periyotların sunulması ile ortaya çıkan olumlu etkilerin, gece karanlığında salınımı artan melatonin hormonu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Kliger ve ark., 2000). Tavuklara, embriyo döneminden itibaren 6 saatin üzerinde karanlık döngü içeren bir aydınlatma programının, yumurtadan çıkış sonrasında stres etmenlerine uyumu arttırdığı, gelişmeyi ve refahı olumlu etkilediği saptanmıştır (Archer ve ark., 2009; Özkan ve ark., 2012). Öte yandan Riedstra ve Groothuis (2004) embriyo dönemi aydınlatmanın civcivlerin çıkış sonrası davranışlarında değişiklik oluşturduğunu ve aydınlatma yapılan gruplarda tüy gagalama davranışının arttığını saptamışlardır. Benzer şekilde Dayıoğlu ve Özkan (2013) kuluçka döneminde aydınlatma uygulaması ile etlik civcivlerin erken yaşta (2 haftalık) daha hızlı geliştiğini, yem tüketim ve sosyal gagalama davranışları sergileme sıklığının daha yüksek olduğunu ve korkaklıkla ilişkili davranışların ise azaldığını bildirmiştir. Bu nedenle fizyolojik ve davranışsal değişiklikler ile sinir sisteminin aktivite ile ilişkilendirilen beyin bölgelerindeki hücrelerin gelişimi arasındaki ilişki araştırmaya değer niteliktedir.

Öte yandan sirkadiyen salınım gösteren melatonin hormonunun salgılanma ritminin (aydınlıkta düşük, karanlıkta yüksek) erken oluşması da gelişme ve davranışsal değişikliklerle ilişkilendirilebilmektedir (Kozanoğlu, 2010; Özkan ve ark., 2012).

Hücrede ribozomal alt birimler nukleolusta sentezlenmektedir. Ökaryotik ribozomal RNA'ları sentezleyen genler, canlı türlerinde belirli kromozomlarda yer alırlar. Bu kromozomların ribozomal RNA (rRNA) sentezleyen bölümleri, interfazdaki bir hücrenin nukleusunda belirli bölgelerde toplanarak koyu bölgeleri oluştururlar. Buna göre DNA'nın rRNA sentezleyen genlerini içeren ve nukleolusu oluşturan bölgeleri nukleolus düzenleyici bölgeler (*Nucleolus Organizer Regions* veya NORs) olarak adlandırılmaktadır. rRNA genleri protein sentezinde önemli rol oynamaktadır. Bundan dolayı NOR'ların sayıları ve görünüşleri hücrelerin nukleer aktivitesini ve ribozom yapım ve protein sentez hızına bağlı olarak, hücre çoğalma hızını yansıtır (Trerè, 2000; Kuş ve ark., 2003; Aydın ve Çelik, 2005; Akar ve Sur, 2010). Türler arasında kromozom sayısı bakımından farklar olduğu gibi NOR içeren kromozom sayısı ve hücrelerdeki AgNOR (NOR'lar ile etkileşimde bulunan ve gümüşle boyanan proteinler) sayıları bakımından da farklar vardır (Sur ve ark., 2003; 2011). Örneğin, tavuk genomu 9 çift makro ve 30 çift de mikro-kromozom olmak üzere toplam 78 kromozomdan oluşmakta; NOR sayısı da 2 olup, bunlar 16 numaralı mikro-kromozom çifti üzerinde yer almaktadır (Masabanda ve ark., 2004).

AgNOR'ların nukleustaki lokalizasyonları ve yerleşimleri de farklı olabilmektedir. Bu durum, nukleusun yapısı ve aktivitesi ile ilgilidir. Özellikle merkezi sinir sistemindeki nöronlar, büyüklük ve dolayısıyla da nukleus büyüklükleri bakımından birbirlerinden oldukça farklı hücreler oldukları için, AgNOR yerleşimleri de bu hücrelerde farklılıklar göstermektedir (Gündüz ve Öznurlu, 2014; Akbulut ve ark., 2015).

Hücre nukleusunda NOR'ların gümüşleme metoduyla boyanması, basit ve ucuz olması nedeniyle son yıllarda sitogenetik çalışmalarda sıklıkla tercih edilen önemli bir yöntemdir (Aydın, 2004). Gümüşleme metoduyla aktif olarak transkripsiyon yapan NOR bölgelerinin boyanması sırasında rRNA bölgeleri de boyanarak, ışık mikroskopunda küçük, koyu benekler halinde görünmektedirler. Gümüş boyama ile bu bölgelerdeki asidik proteinik yapılar (AgNOR) boyanmaktadır (Kuş ve ark., 2003; Aydın ve Çelik, 2005).

Bu çalışmada; yumurtacı ve etlik damızlık yumurtalarına kuluçkada aydınlatma uygulaması ile civcivlerin beyinciklerindeki Purkinje hücrelerinde histolojik açıdan ve bu hücrelerin nukleus çap ve alanları ile AgNOR alanları bakımından herhangi bir farklılığın olup olmadığını belirleyerek, ileride yapılacak olan benzeri çalışmalara temel veriler sağlanması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Etik Onay

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 59/2013 Protokol numarası ile onaylanmıştır.

Hayvan Materyali

Çalışmada Hyline Brown genotipe sahip yumurtacı ve Ross 308 genotipe sahip etlik damızlıklardan elde edilen 576'şar adet toplam 1152 adet yumurtadan elde edilen civcivler kullanılmıştır.

Grupların Oluşturulması

Her genotipe sahip yumurtaların yarısı Victoria Combi Model I 12+H marka kuluçka makinesinde optimum kuluçka koşullarında ve karanlıkta inkübe edilirken (kontrol grubu); diğer yarısı ise yine optimum kuluçka koşullarında ancak bu defa günlük 16 saat aydınlatmanın uygulandığı (aydınlatma grubu) şartlarda inkübasyona bırakılmıştır.

Aydınlatma Uygulaması

Günlük 8 saat karanlık şartlarda inkübe edilen deneme grubundaki yumurtalar günün geri kalan 16 saatlik diliminde 150-200 Lux arasında değişen ışık şiddeti oluşturulan, 520 nm dalga boyunda (yeşil renk) ışık yayan LED ampullerin kullanıldığı aydınlatmaya maruz bırakılmıştır. Kuluçka işlemleri, her iki grupta

da standart koşullarda, giriş bölümünde (0-18 gün) 37.7°C sıcaklık ve %60 nem, çıkış bölümünde (18-21 gün) 37.5°C sıcaklık ve %65 nem altında yapılmıştır.

Hayvanların Seçimi

Bu çalışmada iki farklı genotip ve iki farklı aydınlatmanın uygulandığı etlik ve yumurtacı damızlıklara ait yumurtalardan çıkan civcivler ikisi kontrol ikisi deneme olmak üzere toplam dört gruba ayrılmıştır. Çalışmada en az sayıda hayvan kullanımı esası dikkate alınmıştır. Buna göre ticari yumurtacılar erkekler üretimde kullanılmadığı ve elde edilen veriler de pratiğe aktarılamadığından dişi civcivler kullanılırken; etlik genotiplerde ise erkekler dişilere göre daha hızlı gelişip daha yüksek canlı ağırlığa ulaştığı; buna karşın yüksek canlı ağırlıkları nedeniyle de metabolik problemler (asites, ani ölüm, bacak problemleri vb.) erkeklerde dişilere göre daha fazla görüldüğü için erkek civcivler tercih edilmiştir.

Beyincik Dokularının Temini

Kuluçka çıkışını takiben her gruptan rastgele seçilen 5'er civciv servikal dislokasyonla sakrifiye edilmiştir. Beyinleri total olarak çıkartılan civcivlerin beyincik dokuları ayrılarak %10'luk formaldehit solüsyonuna aktarılmıştır.

Histolojik İşlemler

%10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde 24 saat süreyle tespit edilen beyincik dokuları rutin doku takibi aşamalarından sonra parafinde bloklanmıştır. Parafin bloklardan alınan 5 µm kalınlığındaki sagittal seri kesitlere, genel yapının belirlenebilmesi için Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması (Humason, 1962; Presnell ve Schreibman, 1997; Öber, 2009) yapılırken;

Nukleolus Düzenleyici Bölgeler (Nucleolar Organizer Regions, NORs)'in belirlenmesi için ise AgNOR boyama metodu (Patkin ve Sorokin, 1983) uygulanmıştır. Hazırlanan preparatlar Zeiss Axio Scope A1 marka mikroskopta incelendikten sonra gerekli görülen bölgelerin fotoğrafları histometrik analizler için ZEN görüntü analiz yazılımı kullanılarak elektronik ortamda kaydedilmiştir.

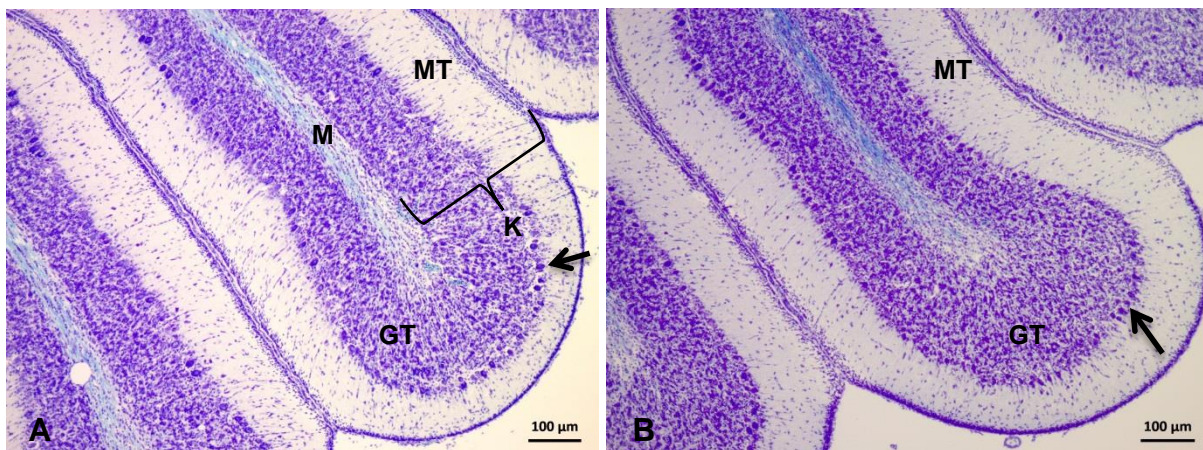
Histometrik Analizler

Her gruptan 15'er adet Purkinje hücrelerinin nükleus çapları, nükleus alanları ve NOR alanları Zeiss Axio Scope A1 marka mikroskopta ZEN görüntü analiz yazılımı kullanılarak ölçülmüştür. İstatistiksel analizler PASW Statistics programında bağımsız T testi ile gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR

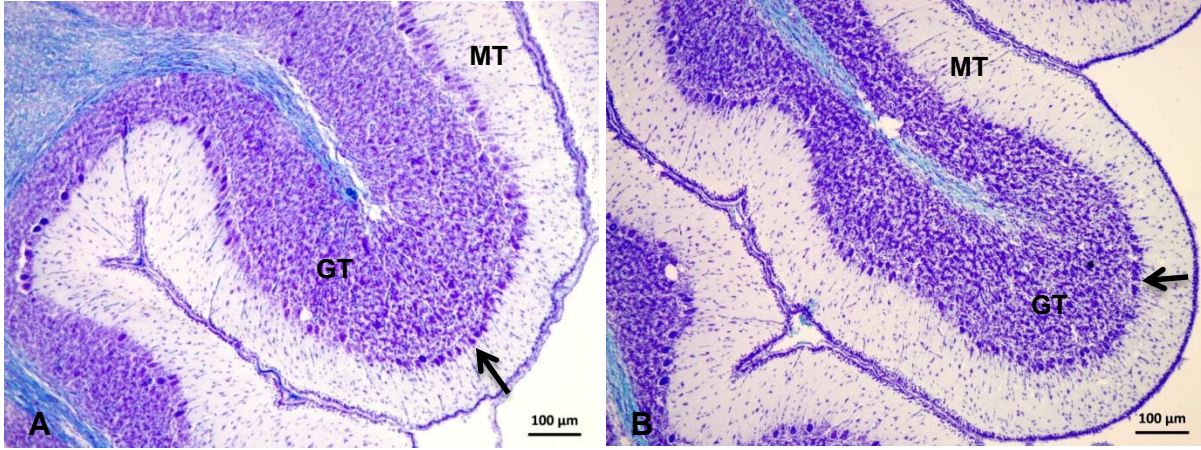
Luxol fast blue & Cresyl violet uygulanmış kesitler üzerinde yapılan ışık mikroskopik değerlendirmelerde beyincik dokusunun yaprak benzeri katlantılar olan ve derin oluklarla birbirinden ayrılan folyumlardan oluştuğu görülmüştür. Tüm gruplarda beyincik korteks ve medulla tabakalarının bilinen histolojik organizasyonda düzenlenmiş oldukları görülürken (Şekil 1 ve 2); beyincik korteksindeki moleküler tabaka ve granüler tabaka arasında tek sıra dizilimleri ile göze çarpan armut şekilli Purkinje hücreleri ise belirgin nükleus ve nukleoluslarının yanı sıra sitoplazmalarında yer alan Nissl tanecikleri ile dikkat çekmiştir (Şekil 3 ve 4).

Kontrol ve aydınlatma uygulanan gruplar arasında histolojik organizasyon bakımından herhangi bir fark belirlenmemiştir (Şekil 3 ve 4).



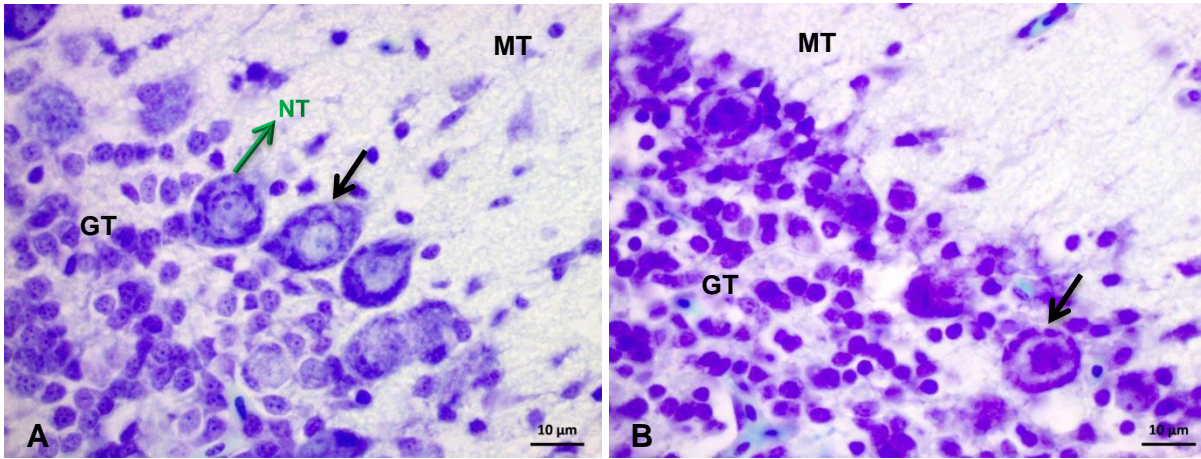
Şekil 1. Etlik civcivlerde beyincik folyumunun genel görünümü. A. Aydınlatma uygulanan grup, B. Kontrol grubu. GT: Granüler Tabaka, K: Korteks, M: Medulla, MT: Moleküler Tabaka, →: Purkinje hücreleri tabakası (Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması).

Figure 1. General appearance of the cerebellar folium in broiler chicks. A. Lighting group, B. Control group. GT: Granular Layer, K: Cortex, M: Medulla, MT: Molecular Layer, →: Layer of Purkinje cells (Luxol fast blue & Cresyl violet staining).



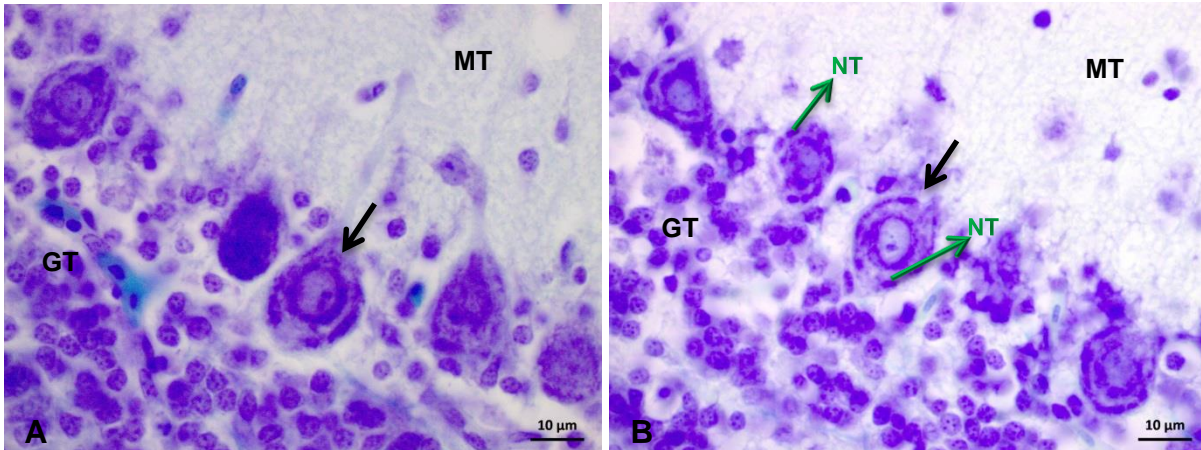
Şekil 2. Yumurtacı civcivlerde beyincik folyumunun genel görünümü. A. Aydınlatma uygulanan grup, B. Kontrol grubu. GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka, →: Purkinje hücreleri tabakası (Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması).

Figure 2. General appearance of the cerebellar folium in egg laying breed chicks. A. Lighting group, B. Control group. GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer, →: Layer of Purkinje cells (Luxol fast blue & Cresyl violet staining).



Şekil 3. Etlik civcivlerin beyinciklerindeki Purkinje hücreleri (→). A. Aydınlatma uygulanan grup, B. Kontrol grubu. GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka, NT: Nissl Tanecikleri (Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması).

Figure 3. Purkinje cells in the cerebellum of broiler chicks (→). A. Lighting group, B. Control group. GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer, NT: Nissl Bodies (Luxol fast blue & Cresyl violet staining).

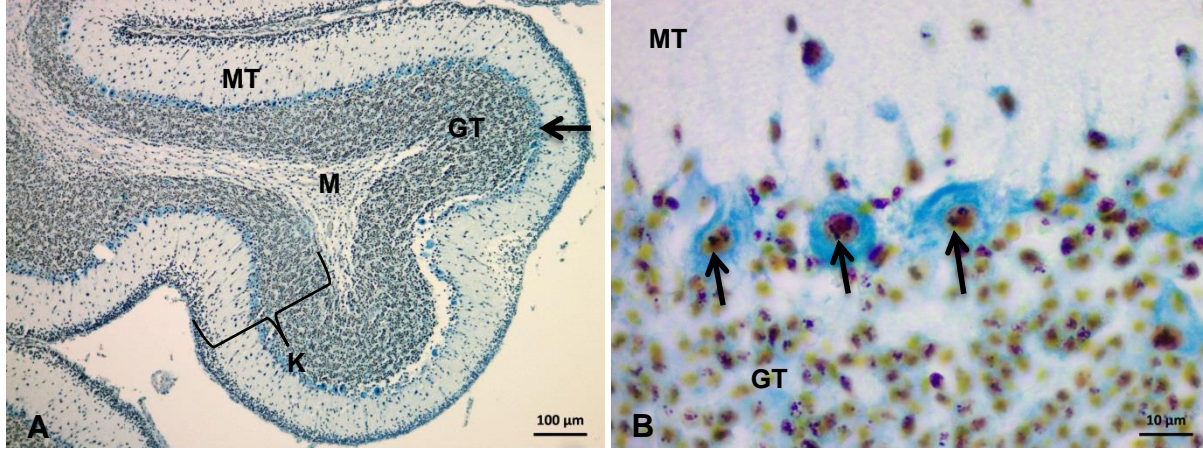


Şekil 4. Yumurtacı civcivlerin beyinciklerindeki Purkinje hücreleri (→). A. Aydınlatma uygulanan grup, B. Kontrol grubu. GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka, NT: Nissl Tanecikleri (Luxol fast blue & Cresyl violet boyaması).

Figure 4. Purkinje cells in the cerebellum of egg laying breed chicks (→). A. Lighting group, B. Control group. GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer, NT: Nissl Bodies (Luxol fast blue & Cresyl violet staining).

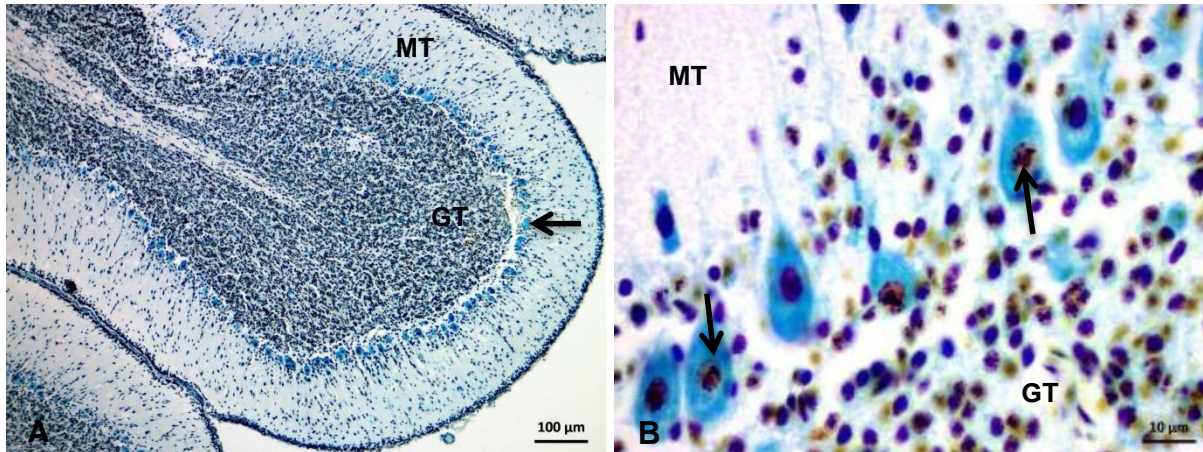
Patkin ve Sorokin (1983)'e göre uygulanan AgNOR boyası ile hazırlanan preparatlar üzerinde yapılan histometrik değerlendirmeler sonucunda kuluçka döneminde aydınlatmaya maruz kalan etlik civcivlerde Purkinje hücrelerinin nukleus çapındaki sayısal artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilirken; Purkinje hücrelerinde nukleus alanı

ve NOR alanındaki artışın önemli olduğu görülmüştür (Şekil 5A-8A). Yumurtacı civcivlerde ise aydınlatma uygulanan grupta Purkinje hücrelerinin nukleus çaplarının, kontrol grubuna göre arttığı belirlenmiştir. Ancak, aydınlatmanın yumurtacı civcivlerde Purkinje hücrelerinin nukleus alanı ve NOR alanı üzerine etkisi önemsiz bulunmuştur (Şekil 5B-8B). (Tablo 1, $p < 0,05$).



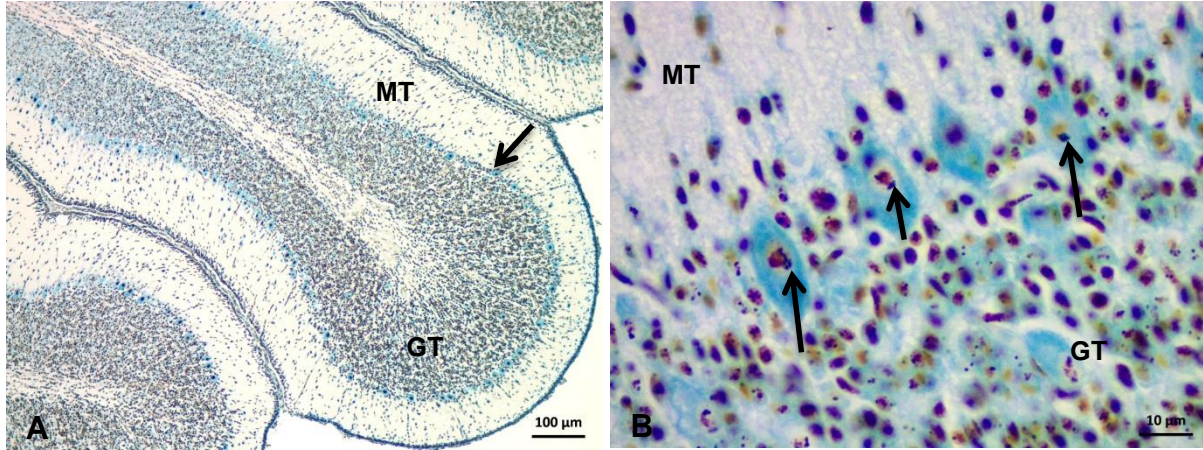
Şekil 5. Kontrol grubu etlik civcivlerde beyincik folyumu. A. Genel görünüm, →: Purkinje hücreleri tabakası. B. Purkinje hücrelerinin nukleusları ve içindeki NOR'lar (→). GT: Granüler Tabaka, K: Korteks, M: Medulla, MT: Moleküler Tabaka (AgNOR boyaması).

Figure 5. The cerebellar folium of broilers chicks in control group. A. General appearance, →: Layer of Purkinje cells. B. Nuclei of Purkinje cells and NORs (→). GT: Granular Layer, K: Cortex, M: Medulla, MT: Molecular Layer (AgNOR staining).



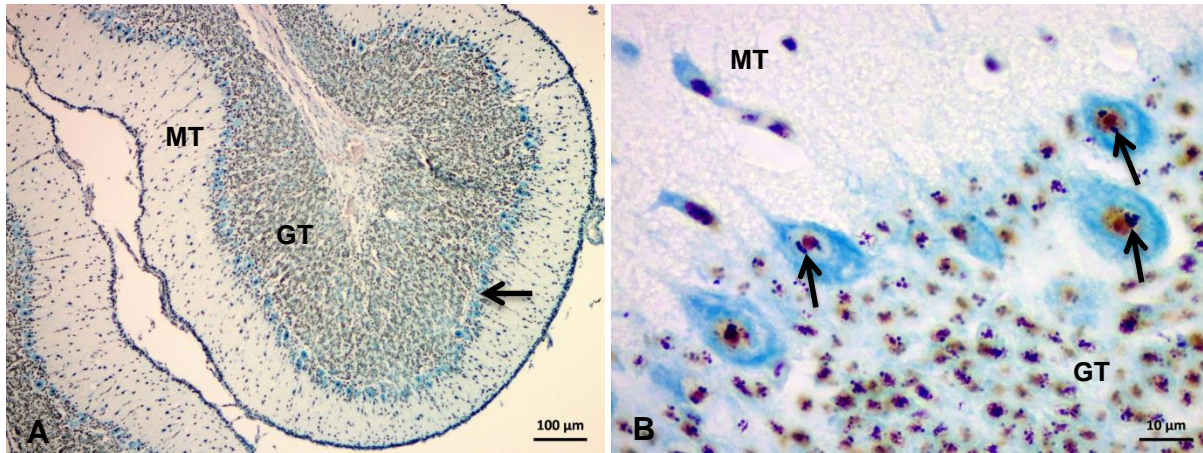
Şekil 6. Kontrol grubu yumurtacı civcivlerde beyincik folyumu. A. Genel görünüm, →: Purkinje hücreleri tabakası. B. Purkinje hücrelerinin nukleusları ve içindeki NOR'lar (→). GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka (AgNOR boyaması).

Figure 6. The cerebellar folium of egg laying breed chicks in control group. A. General appearance, →: Layer of Purkinje cells. B. Nuclei of Purkinje cells and NORs (→). GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer (AgNOR staining).



Şekil 7. Aydınlatma uygulanan etlik civcivlerde beyincik folyumu. A. Genel görünüm, →: Purkinje hücreleri tabakası. B. Purkinje hücrelerinin nukleusları ve içindeki NOR'lar (→). GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka (AgNOR boyaması).

Figure 7. The cerebellar folium of broilers chicks in lighting group. A. General appearance, →: Layer of Purkinje cells. B. Nuclei of Purkinje cells and NORs (→). GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer (AgNOR staining).



Şekil 8. Aydınlatma uygulanan yumurtacı civcivlerde beyincik folyumu. A. Genel görünüm, →: Purkinje hücreleri tabakası. B. Purkinje hücrelerinin nukleusları ve içindeki NOR'lar (→). GT: Granüler Tabaka, MT: Moleküler Tabaka (AgNOR boyaması).

Figure 8. The cerebellar folium of egg laying breed chicks in lighting group. A. General appearance, →: Layer of Purkinje cells, B. Nuclei of Purkinje cells and NORs (→). GT: Granular Layer, MT: Molecular Layer (AgNOR staining).

Tablo 1. Kontrol ve aydınlatma uygulanan civcivlere ait Purkinje hücrelerinin nukleus ve NOR parametreleri (±standart hata).

Table 1. Nucleus and NOR parameters of the Purkinje cells of chicks in the control and lighting treated groups (±standart error).

	Etlik civcivler		Yumurtacı civcivler	
	Kontrol grubu	Aydınlatma uygulanan grup	Kontrol grubu	Aydınlatma uygulanan grup
Purkinje hücresi nukleus çapı (µm)	5.637 ± 0.166	ÖD 5.773 ± 0.1660	5.184 ± 0.166	* 5.606 ± 0.166
Purkinje hücresi nukleus alanı (µm ²)	28.388±1.255	* 32.487±1.255	28.876±1.255	ÖD 29.862±1.255
NOR alanı (µm ²)	3.907±0.337	* 4.917±0.337	3.775±0.337	ÖD 3.931±0.337

* Aynı satırda etlik ya da yumurtacı civcivler için kontrol ve aydınlatma uygulanan gruplar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir (P<0.05)

ÖD İstatistik olarak önemli değil (P>0.05)

TARTIŞMA ve SONUÇ

Bir hücredeki kromozomların ribozomal RNA (rRNA) genlerini taşıyan bölgeleri, interfaz aşamasında nukleolusları oluşturmak üzere bir araya gelerek ışık mikroskopuyla nukleus içinde iri, yuvarlak ve belirgin cisimcikler halinde görünmektedirler. Kromozomların, nukleolusları oluşturan bu bölgeleri Nukleolus Düzenleyici Bölgeler (Nucleolar Organizer Regions, NORs) olarak bilinmektedir. Bu bölgelerde bulunan ribozomal genlerle (rDNA) ilişkili olan nukleolar argirofilik (gümüş seven) ve histonik olmayan (asidik) proteinlere ise AgNOR proteinleri adı verilmektedir. Bir nukleustaki AgNOR'ların sayısı, hücre kinetiğini ve proliferatif aktiviteyi güvenilir bir şekilde yansıtmaktadır. NOR'lardaki argirofil proteinleri, rRNA transkripsiyonunda ve ribozomal biyogenezde önemli rol oynamaktadır. Bu proteinlerin miktarı, hücrenin ribozom sentezine göre aktivite durumunu göstermektedir (Ploton ve ark., 1986; Khanna ve Dutta, 2002; Aydın ve Çelik, 2005; Çelik ve ark., 2018).

İnterfaz sırasındaki bir nukleusun, NOR'larının gümüşleme metoduyla boyanması yöntemi, son yıllarda sitogenetik çalışmalarda kendine geniş yer bulan önemli, basit ve ucuz bir metottur. İnterfaz ya da mitoz sırasında transkripsiyonel olarak aktif olan AgNOR'ların yerleşimi, gümüş boyama metoduyla gösterilebilmektedir. Gümüş boyama tekniği; gümüş nitratın, asidik bir ortamda AgNOR proteinleri tarafından metalik gümüş indirgenmesine dayanmaktadır (Ploton ve ark., 1986; Aydın ve Çelik, 2005; Özparlak ve ark., 2015). AgNOR boyama metodu sayesinde hayvanlarda değişik verim özellikleri hakkında önemli ipuçları elde edilerek uzun süre beklemeden yüksek verimli hayvanların önceden tespit edilip seleksiyona tabi tutulabileceği öngörülmektedir (Akbulut ve ark., 2015).

Babcock-B-380 yumurtacı tavuklarla yürütülen bir çalışmada, kuluçkadan çıkış gününde alınan beyinciklerin Purkinje nukleus çapları ortalama $5.59 \pm 0.04 \mu\text{m}$, Purkinje nukleus alanları ortalama $32.44 \pm 0.81 \mu\text{m}^2$, AgNOR alanları ise ortalama $2.25 \pm 0.17 \mu\text{m}^2$ olarak ölçülmüştür. Ancak söz konusu çalışmada örnekler kuluçka sırasında herhangi bir ışık uygulamasına maruz bırakılmamıştır (Akar ve Sur, 2010).

Bir nukleustaki NOR alanının, nukleus alanıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir (Goodpasture ve ark., 1976; Mikelsaar ve ark., 1977; Alberts ve ark., 1989). Bir organizmanın farklı hücrelerinin veya farklı organizmaların benzer hücrelerinin genomlarında bulunan aktif NOR'ların sayıları arasında belirgin farklar bulunmaktadır (Sur ve ark., 2003; 2011). Aktif NOR sayılarının hücrenin protein sentezi ihtiyacı ve çevre şartlarına göre değişiklik gösterdiğine dair ortak bir görüş bulunmaktadır (Goodpasture ve ark., 1976;

Mikelsaar ve ark., 1977; Alberts ve ark., 1989). Bu görüş, sunulan bu çalışmada kuluçka döneminde aydınlatmaya maruz bırakılan etlik civcivlerin Purkinje hücrelerinin nukleus ve NOR alanlarındaki artma yönündeki eğilimiyle desteklenmektedir. Genel olarak, etlik civcivlerin, daha yüksek nukleus alanı ve NOR alanı değerlerine sahip oldukları görülmüştür. Aktif olarak çoğalan ve transkripsiyon yapan hücrelerin NOR'larının daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu bilgi ışığında NOR alanı değerinin fazla ölçülmesi, sentez aktivitesinin fazla olduğu bilinen tipik sinir hücrelerinden biri olan Purkinje hücrelerinde protein sentezinin fazla olduğunu, bunun da nukleuslarının daha büyük olmasına sebep olabileceğini akla getirmektedir. Ancak bu durumun yumurtacı civcivler için söz konusu olmadığı tespit edilmiştir. Bu bulgu yumurtacı ve etlik civcivlerin kuluçka döneminde uygulanan aydınlatmaya tepkilerinin farklı olabileceği bu farklılığın da etlik ve yumurtacı genotiplerin sahip oldukları farklı gelişim hızları ile ilişkili olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Çünkü, etlik genotipler başlıca hızlı gelişme ve yüksek canlı ağırlık, yumurtacı genotipler ise yüksek yumurta verimi yönünde geliştirilmektedir (Thiruvankadan ve Prabakaran, 2017). Ancak bu konuda kesin bir yargıya varabilmek için daha fazla araştırmaya gereksinim vardır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan eder.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları aralarında herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Akar S, Sur E 2010. The Development of Chicken Cerebellar Cortex and The Determination of Agnor Activity of The Purkinje Cell Nuclei. Belg J Zool 140(2): 214-22.
- Akbulut B, Sur E, Okur DN 2015. Determination of the AgNOR Parameters, MN Frequency, ANAE and ACP-ase Positivity of PBL in Pregnants. Selçuk Tıp Derg 31(4): 344-350.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD 1989. Molecular Biology of The Cell. Garland Publishing, Newyork, 1146 pp.
- Archer G, Shivaprasad HL, Mench JA 2009. Effect of Providing Light During Incubation on The Health, Productivity and Behavior of Broiler Chickens. Poult Sci 88(1): 29-37.
- Aydın MF 2004. Yumurta ve Et Tavuklarının Farklı Dokularında Gümüşleme Metoduyla Boyanan Nukleolus Organizer Bölgelerin (AgNOR) Dağılımının Belirlenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji

- Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 104 sy.
- Aydın F, Çelik İ 2005. Yumurta ve Et Tavuklarının Karaciğerlerinde Gümüşleme Metoduyla Boyanan Nucleolus Organizer (AgNOR) Bölgeleri Dağılımının Belirlenmesi. *Vet Bil Derg* 21(1-2): 91-99.
- Bayram A, Özkan S 2010. Effects of 16L:8d Lighting Schedule on Behavioral Traits and Performance in Male Broiler Chickens. *J App Poult Res* 19: 263-273.
- Çelik İ, Şeker M, Salbacak A 2018. Histological and Histomorphometric Studies on The Cerebellar Cortex and Silver Stained Nucleolus Organizer Regions of Purkinje Neurons in Chronic Morphine-Treated Rats. *Veterinarski Arhiv* 88(1): 75-88.
- Dayıoğlu M, Özkan S 2013. The Effect of Lighted Incubation on Growth, Behavior, and Welfare of Broiler Chickens. 9th. European Symposium on Poultry Welfare, 17-20 June, 2013 Uppsala, Sweden. WPSA J Book of Abstracts, p:100.
- Espinar A, Piera V, Carmona A, Guerrero JM 1997. Histological Changes During Development of The Cerebellum in The Chick Embryo Exposed to A Static Magnetic Field. *Bioelectromagnetics* 18(1): 36-46.
- Goodpastuer C, Bloom SE, Hsu TC, Arrighi FE 1976. Human Nucleolus Organizers The Satellites or The Stalks. *Am J Hum Genet* 28: 559-566.
- Gündüz N, Öznurlu Y 2014. Adverse Effects of Aflatoxin B1 on Skeletal Muscle Development in Broiler Chickens. *British Poultry Science* 55(5): 684-692.
- Herrup K, Kuemerle B 1997. The Compartmentalization of The Cerebellum. *Annu Rev Neurosci* 20: 61-90.
- Humason GL 1962. *Animal Tissue Techniques*. WH Freeman and Company, USA, 468 pp.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM 2013. *Principles of Neural Science*. 5th edition, The McGraw-Hill Companies, 1747 pp.
- Karol S, Suludere Z, Ayvalı C 2010. *Biyoloji Terimleri Sözlüğü*. Türk Dil Kurumu Yayınları, 5. baskı, Ankara, 1067 sy.
- Khanna A, Dutta J 2002. Effect of Enrofloxacin on AgNOR Counts in Chick Bone Marrow Nuclei. *Indian J Exp BioI* 40(3): 345-348.
- Kliger CA, Gehad AE, Hulet RM, Roush WB, Lillehoj HS, Mashaly MM 2000. Effects of Photoperiod and Melatonin on Lymphocyte Activities in Male Broiler Chickens. *Poult Sci* 79(1): 18-25.
- Koral-Taşçı S, Bingöl S 2018. Histological and Histometric Structure of Goose (*Anser anser*) Cerebellum. *Van Vet J* 29(2): 63-66.
- Kozanoğlu H 2010. Farklı Aydınlatma Programlarına Bağlı Olarak Değişen Endojen Melatonin Döngüsünün Etlik Piliçler Üzerindeki Etkileri. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 96 sy.
- Kristensen HH, Aets JM, Leroy T, Wathes CM, Berckmans D 2006. Modelling The Dynamic Activity of Broiler Chickens in Response to Step-Wise Changes in Light Intensity. *Appl Anim Behav Sci* 101: 125-143.
- Kuş İ, Öner J, Songur A, Özen OA, Sarsılmaz M 2003. Sıçanlarda Melatonin Hormonunun Tiroid Folliküler Hücreleri Üzerine Etkisi: AgNOR Boyama ve Elektron Mikroskopik Çalışma. *SÜ Tıp Fak Derg* 19: 1-8.
- Lewis P, Morris T 2006. *Poultry Lighting: The Theory and Practice*. Northcut Publishing, Wiltshire, 176pp.
- Luo J, Treubert-Zimmermann U, Redies C 2004. Cadherins Guide Migrating Purkinje Cells to Specific Parasagittal Domains During Cerebellar Development. *Mol Cell Neurosci* 25(1): 138-152.
- Masabanda JS, Burt DW, O'Brien PCM, Vignal A, Fillon V, Walsh PS 2004. Molecular Cytogenetic Definition of The Chicken Genome: The First Complete Avian Karyotype. *Genetics* 166: 1367-1373.
- Mikelsaar AV, Schmid M, Krone W, Schwarzacher HG, Schnedl W 1977. Frequency of Ag-Stained Nucleolus Organizer in The Acrocentric Chromosomes of Man. *Hum Genet* 37: 73-77.
- Öber A 2009. *Zoolojide Laboratuvar Teknikleri*. Ege Üniversitesi Basımevi, 3. Baskı. Bornova, İzmir, 210 sy.
- Öber A, Turgay-İzzetoğlu G 2020. *Histoloji*, Nobel Yayın No: 2255, 4. Baskı, Ankara, 326 sy.
- Özkan S, Yalçın S, Babacanoğlu E, Kozanoğlu H, Karadaş F, Uysal S 2012. Photoperiodic Lighting (16 h light: 8 h dark) Programs During Incubation: 1. Effects on Growth and Circadian Physiological Traits of Embryos and Early Stress Response of Broiler. *Poult Sci* 91: 2912-2921.
- Özparlak H, Akgül C, Çelik İ 2015. Effect of Nifedipine on Histology and AgNOR Parameters of Liver. *International Journal of Scientific and Technological Research* 1(8): 8-23.
- Patkin EL, Sorokin AV 1983. Nucleolus-Organizing Regions of Chromosomes in Early Embryogenesis of Laboratory Mice. *Bull Exp Biol Med* 96(2): 1142-1144.
- Ploton D, Menager M, Jeanesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ 1986. Improvement in The Staining and in The Visualisation of The Argyrophilic Proteins of The Nucleolus Organizer Region at The Optical Level. *Histochem J* 18(1): 5-14.
- Prescott NB, Kristensen HH, Wathes CM 2004. *Light. (Measuring and Auditing Broiler Welfare)*, CABI Publishing, Cambridge, MA: Ed. Weeks CA, Butterworths A) 101-115.
- Presnell JK, Schreiberman MP 1997. *Humason's Animal Tissue Techniques*. The Johns Hopkins University Press Ltd, London, 573 pp.
- Riedstra B, Groothuis TGG 2004. Prenatal Light

- Exposure Affects Early Feather-Pecking Behaviour in The Domestic Chick. *Animal Behaviour* 67: 1037-1042.
- Schwean-Lardner K, Vermette C, Leis M, Classen HL 2016. Basing Turkey Lighting Programs on Broiler Research: A Good Idea? A Comparison of 18 Daylength Effects on Broiler and Turkey Welfare. *Animals* 6(27): 1-16.
- Sur E, Çelik İ, Öznurlu Y, Aydın MF, Şen İ, Özparlak H 2003. Enzyme Histochemistry and AgNOR Numbers in the Peripheral Blood Leukocytes of 6-Month-old Kangal Bred Anatolian Shepherd Dogs. *Revue Méd Vét* 154(10): 591-598.
- Sur E, Öznurlu Y, Özaydın T, Çolakoğlu F, Ünsal S, Yener Y 2011. Comparative Histometrical Study of the Cerebellum and the Determination of Some AgNOR Parameters in Different Avian Species. *Bull Vet Inst Pulawy* 55: 261-265.
- Thiruvankadan A, Prabakaran R 2017. Recent Approaches in Poultry Breeding. *Appro Poult Dairy & Vet Sci* 2(2): APDV.000533.
- Trerè D 2000. AgNOR Staining and Quantification. *Micron* 31(2): 127-131.

Relationship Between Production Characteristics and Proportion of Body Measurements of Holstein Cows

Ahmet Refik ÖNAL¹, Ersin DAMA², Yahya Tuncay TUNA³

^{1,3}Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootečni Bölümü 59030 Tekirdağ-Türkiye, ²Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootečni ABD 59030 Tekirdağ-Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-9125-7412>, ²<https://orcid.org/0000-0001-9642-0672>, ³<https://orcid.org/0000-0002-4074-2282>,

✉: aronal@nku.edu.tr

ABSTRACT

The objective of this study was to determine Holstein Cattle body measurements using digital imaging (DIPM) methods. The ratios were calculated by dividing each measurement by another and the relationship between the ratios and the output characteristics were evaluated. For this reason, the body measurements of the 198 heads of Holstein cattle breed dairy cows were calculated by the Set Object Video System (SOVS) process. The ratios were calculated by dividing each body measurement to another then the relationship between these ratios and the characteristics including the daily average milk yield (DAMY), the number of inseminations per calving (NIPC), the age at insemination (AFI) and the age at first calving (AFC) were evaluated. The relationship between DAMY, NIPC, AFI, AFC and body measurements were; withers height (WH), back height (BH), rump height (RH), pin bone height (PBH), chest depth (CD), body length (BL), trunk length (TL), body area (BA) and body perimeter (BP) was low, negative and not statistically significant ($p>0.05$). The highest R^2 measured for DAMY by WH (0.389 ($p<0.01$), for NIPC by BA (0.344 ($p<0.05$)), for AFI by BP (0.266 ($p<0.05$)) and for AFC by BP (0.249 ($p<0.05$)) used in multiple regression equations. It can be stated that the use of DIPM is more convenient than TM for the body measurement of milking cows. The estimated power of regression equations for estimating milk and reproductive output, such as DAMY, NIPC, AFI and AFC, were low for Holstein cattle breeding cows.

Research Article

Article History

Received : 12.12.2020

Accepted : 28.01.2021

Keywords

Holstein cattle breed

Body Measurements

Image Processing

Number of insemination per conception

Age at first calving

Siyah Alaca Süt Sığırlarında Vücut Ölçülerinin Birbirlerine Oranlarının Verim Özellikleri ile İlişkisi

ÖZET

Çalışmada, Görüntü İşleme Metotları kullanarak Siyah Alaca süt sığırlarının vücut ölçülerinin ortaya konması, elde edilen vücut ölçülerinin birbirlerine bölünerek oranlar elde edilmesi ve bu oranların verim özellikleri ile ilişkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır. Bu amaçla 198 büyük baş Siyah Alaca süt sığırının Sabit Nesne Video Metodu yardımıyla vücut ölçüleri tespit edilmiştir. Tespit edilen vücut ölçüleri birbirlerine bölünerek oranlar elde edilmiş ve bu oranlar ile Günlük Ortalama Süt Verimi (GOSV), Gebelik Başına Tohumlama Sayısı (GBTS), İlkine Tohumlama Yaşı (İTY) ile İlkine Buzağılama Yaşı (İBY) arasındaki ilişkileri ortaya konmuştur. Araştırmada, GOSV, GBTS, İTY ve İBY ile vücut ölçülerinden cidago yüksekliği (CY), sırt yüksekliği (SY), sağrı yüksekliği (SGY), oturak yumru yüksekliği (OYY), göğüs derinliği (GD), vücut uzunluğu (VU), gövde uzunluğu (GU), vücut alanı (VA) ve vücut çevresi (VÇ) arasındaki ilişkinin tüm laktasyon guruplarında düşük, negatif yönlü ve istatistik olarak önemli olmadığı gözlemlenmiştir ($p>0.05$). Vücut ölçülerinden elde edilen oranlar modele dahil edilerek GOSV, GBTS, İTY ve İBY'nin tahmini için oluşturulan çoklu regresyon denklemlerine ilişkin en yüksek

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 17.12.2020

Kabul Tarihi : 28.01.2021

Anahtar Kelimeler

Siyah Alaca süt sığırı

Vücut ölçüleri

Görüntü işleme

Gebelik Başına Tohumlama Sayısı

İlkine buzağılama yaşı

Determinasyon Katsayısı (R^2) değerlerinin GOSV için CY (0.389 ($p<0.01$)), GBTS için VA (0.344 ($p<0.05$)), İTY için VÇ (0.266 ($p<0.05$)) ve İBY için VÇ ile edilen oranların kullanıldığı çoklu regresyon denklemleri olduğu gözlenmiştir. Süt sığırlarında vücut ölçülerinin belirlenmesinde GİM uygulamalarının Klasik Ölçüm Metotları'na (KM) göre daha pratik olduğu söylenebilir. Siyah Alaca süt sığırlarında GOSV, GBTS, İTY ve İBY gibi süt ve döl verimlerinin tahmini için vücut ölçülerinden elde edilen oranlar kullanılarak oluşturulan regresyon denklemlerinin tahmin gücünün düşük olduğu belirlenmiştir.

To Cite: Önal AR, Dama E, Tuna YT 2021. Relationship Between Production Characteristics and Proportion of Body Measurements of Holstein Cows. KSU J. Agric Nat 24 (6): 1343-1348. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.842397.

INTRODUCTION

Morphological characteristics of domestic animals are one of the main subjects of animal breeding and one of the most explored by animal scientists. Phenotypic characteristics are utilized as important selection criteria in animal breeding. Various measurement, such as body height, BH, WH, BL, and CD are important morphological features of the animal body that are utilized to evaluate the individual identity, structural capacities, the relationship to the fertility levels, morphological type assessment and in particular, the identification of breeds and breeds of characters.

Tien and Tripathi (1990) stated that body measurement heritability is categorized as moderate and high. The body weight and body type or shape of the animals are formed and changed according to particular breeding objectives. Dairy genotypes, particularly Holstein cattle, are known to have improved over several years in terms of udder or dairy characteristics and to demonstrate morphological differences as compared to other yield-oriented genotypes. Differences in the shape and morphological characteristics of livestock genotypes that were systematically improved over many years in milk or meat yield were observed. Morphological traits of dairy cattle were used as direct selection criteria for predicting type characteristics and longevity and indirect selection criteria as early herd life (Yavuz and Kaygisiz, 2015; Mimaryan and Yener, 2000). A prerequisite for the efficient production of dairy cattle is the production of a genotype of high yield. However, it is possible to obtain productivity from the individual for several years ahead. Body structures play an important role in the longevity of the individual.

In addition to the yield characteristics, the morphological properties of individual animals should be considered as selection criteria in the cattle breeding program. The main aim of the morphological assessment of the animal is to decide if in addition to their milk yield, they have an acceptable body structure. It is assumed that the only way where the optimal yield levels can be achieved through the

detection of healthy and well-visible cows (Alıç, 2007). The studies investigating the relationship between body measurements and individual productivity levels in cattle are generally focused on estimating live weight (LW) from body measurement. Body measurements such as BH, WH, BL, TL, CD and CW were also determined using standard body measurement tools. Regression equations were calculated using the body measurements obtained to estimate the production yields of the animals. Researchers reported that image processing is a simple and practical method for assessing body measurements of different animal species (Dogaroglu, 2006; Onal, 2011, Hyslop et al., 2008; Tazser et al., 2000; Negretti and Bianconi 2005).

The Holstein Cattle body measurements were calculated by the digital image processing methods and the proportions were obtained by dividing the body measurements taken by the digital image processing methods. The relation between the obtained proportions and the yield characteristics has been revealed.

MATERIALS and METHODS

Material

198 head Holstein cows of different ages and their production records and images formed the study material. The milking cows evaluated in the study were from the private dairy farm.

Method

The measurement points reported by Kok (1996), Dogaroglu (2006) and Onal (2011) were evaluated in this analysis. Seven body measurement points were evaluated: withers height (WH), back height (BH), rump height (RH), pin bone height (PBH), chest depth (CD), body length (BL), trunk length (TL), body area (BA) and body perimeter (BP).

Image Processing

Set Object Video System (SOVS) was used as an image processing method for the determination of body measurement points (Onal, 2011). During the

transition (walking) of the animals from the platform that was installed, the video recording was taken from the digital camera and via the digital platform. Digital photos captured in .jpeg format from a video record (Canon 600D; Canon, Tokyo, Japan). The digital images were measured on a PC with the

assistance of Image ProPlus software (Figure 1) (Figure 2) (Onal, 2011).

Daily average milk yield was used as milk production parameters and the number of insemination per calving, age at first insemination, and age at first calving as fertility parameters in the study.

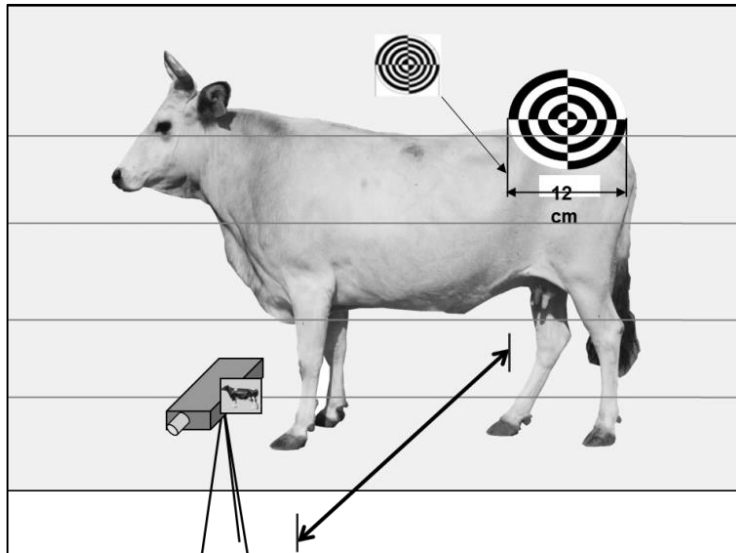


Figure 1. Image recording (Onal, 2011)
Şekil 1. Görüntülerin alınması (Onal, 2011)

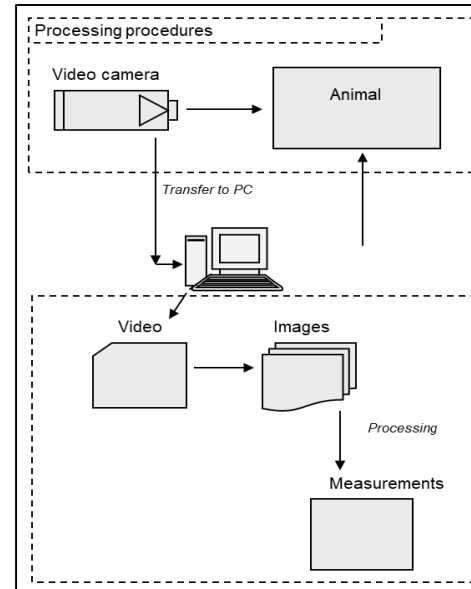


Figure 2. Image processing procedures
Şekil 1. Görüntülerin işlenmesi aşamaları

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using the SPSS program Ver. 15.0 (IBM, Armonk, NY, USA) for the evaluation of the data. Duncan's multiple comparison test was performed as a comparison test between categories. Basic statistics for body measurements and mean traits were obtained using the univariate. The technique was also used to evaluate Pearson correlations between body measurements and traits. The best regression equation estimating milk and fertility parameters was determined by Stepwise Linear Regression Analysis.

RESULTS and DISCUSSION

According to lactation numbers, descriptive statistics for milk and fertility yields of Holstein milking cows were given in Table 1. The statistical difference between the daily average milk yield and the number of insemination per pregnancy were calculated in terms of lactation number ($p < 0.01$). No statistical difference was observed between the first age of insemination and the first age of calving ($p > 0.05$).

The relationship between body measurements and production yields

During the first lactation between yield and body measurements, and r values for milking cows; there was usually a low negative association between yield

and body measurements.

In this study, the r values between the daily average milk yield (kg), and the pin bone height (PBH) were low and negative -0.267 ($p > 0.05$). While, r values between the daily average milk yield (kg) and the chest depth were 0.031 ($p > 0.05$) (Table 2). The weak r values for the number of inseminations per pregnancy were between 0.334 ($p < 0.05$) in chest depth and -0.061 ($p > 0.05$) in body length. There was a weak but statistically significant age at first insemination and chest depth -0.335 ($p < 0.05$) and a strong but not statistically significant age relationship at first insemination trunk length -0.093 ($p > 0.05$). The weak r between the back height and trunk length $r = -0.041$ ($p > 0.05$) and the strong r between the body length and trunk length $r = 0.975$ ($p < 0.01$) was determined when the body measurements were calculated between each other.

This study was conducted to determine the relationship between body measurement and milk yield, it was shown that the r values between milk production and body measurements as well as body height, body length and chest depth were -0.19 , -0.19 and -0.19 respectively for milking cows in the first lactation (Akbulut et al. 1998). Mimanyar and Yener (2000) stated that the r values between milk yield and milk height -0.09 . Orhan (2007) reported that r value calculated between 305 days milking yield and rump height -0.49 . It was indicated that the results

obtained in this research were generally consistent with the results published in the literature (Mimaryan and Yener, 2000; Orhan, 2007).

Table 1. Descriptive statistics of milk and fertility yields

Çizelge 1. Süt ve döl verimine ilişkin tanımlayıcı istatistikler

	Lactation Number		Mean	S.D.	S.E.	Min.	Max.	P
	<i>Laktasyon Sırası</i>	n						
Daily average milk yield (kg)	1	39	35.32 a	3.03	0.48	29.37	43.45	0.001
<i>Günlük Ortalama Süt Verimi (kg)</i>	2	104	40.33 c	5.64	0.55	24.06	54.39	
	3	29	39.99 bc	4.67	0.87	30.37	46.98	
	4	26	37.89 b	5.34	1.05	29.28	49.30	
	Total	198	38.97	5.39	0.38	24.06	54.39	
Number of Insemination Per Pregnancy	1	38	1.39 a	0.89	0.14	1.00	4.00	0.001
<i>Gebelik Başına Tohumlama Sayısı</i>	2	103	2.82 b	1.86	0.18	1.00	9.00	
	3	29	3.93 c	2.43	0.45	1.00	8.00	
	4	26	2.54 b	1.65	0.32	1.00	7.00	
	Total	196	2.67	1.93	0.14	1.00	9.00	
Age at first insemination (Day)	1	35	486.94	81.20	13.73	400.00	666.00	0.107
<i>İlkine Tohumlama Yaşı (Gün)</i>	2	91	497.12	81.17	8.51	401.00	760.00	
	3	29	519.45	69.51	12.91	439.00	736.00	
	4	26	527.27	48.73	9.56	445.00	629.00	
	Total	181	503.06	76.27	5.67	400.00	760.00	
Age at first calving (Day)	1	30	768.43	79.25	14.47	682.00	938.00	0.133
<i>İlkine Buzağılama Yaşı (Gün)</i>	2	90	773.04	76.55	8.07	680.00	992.00	
	3	28	790.04	56.29	10.64	717.00	983.00	
	4	26	805.62	47.30	9.28	723.00	912.00	
	Total	174	779.85	71.05	5.39	680.00	992.00	

Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$). SD: Standard Deviation, SE: Standard Error

Table 2. The correlation coefficient (r) values between body measurements and production yields

Çizelge 2. Vücut ölçüleri ile verim özellikleri arasındaki korelasyon katsayıları (r)

Lactation Number	Daily average milk yield (kg)				Number of Insemination Per Pregnancy			
	<i>Günlük Ortalama Süt Verimi (kg)</i>				<i>Gebelik Başına Tohumlama Sayısı</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4
WH/CY	-0.047	0.165	0.042	0.141	-0.104	-0.024	-0.207	-0.151
BH/SY	-0.014	0.117	0.223	0.165	-0.078	-0.025	-0.343	-0.087
RH/SGY	-0.168	0.044	0.000	0.053	-0.099	0.032	-0.107	-0.222
PBH/OYY	-0.267	0.017	0.069	0.035	-0.114	0.061	-0.231	-0.258
CD/GD	0.031	0.012	-0.244	-0.184	-0.334*	-0.043	0.128	-0.190
BL/VU	-0.171	-0.058	-0.023	-0.251	-0.061	0.110	-0.004	-0.062
BA/VA	-0.023	0.064	-0.234	0.056	-0.163	0.078	0.206	0.050
BP/VÇ	-0.112	0.135	-0.053	0.127	-0.237	0.034	0.201	0.086
	Age at first insemination (Day)				Age at first calving (Day)			
	<i>İlkine Tohumlama Yaşı (Gün)</i>				<i>İlkine Buzağılama Yaşı (Gün)</i>			
Lactation Number	1	2	3	4	1	2	3	4
WH/CY	-0.224	0.084	0.179	0.112	-0.262	-0.001	-0.115	0.008
BH/SY	-0.155	0.053	0.154	0.260	-0.250	-0.079	-0.082	0.156
RH/SGY	-0.305	0.025	-0.105	0.096	-0.292	-0.110	-0.281	0.054
PBH/OYY	-0.256	0.018	-0.139	0.093	-0.247	-0.075	-0.075	0.047
CD/GD	-0.335*	0.205	-0.049	-0.031	-0.346	0.066	-0.250	-0.084
BL/VU	-0.186	0.146	0.196	-0.064	-0.121	0.078	-0.033	-0.138
BA/VA	-0.182	0.132	0.028	-0.194	-0.205	0.036	-0.137	-0.230
BP/VÇ	-0.327	0.139	-0.006	-0.248	-0.387*	0.055	-0.131	-0.326

* $P < 0.05$

Relationship between the proportions and the output of production:

The R² values for multiple regression equations generated by lactation number to estimate the average daily milk yield, the number of inseminations per pregnancy, the first insemination age and the first calving age utilizing body proportion values were shown in Table 3. Lactation numbers were evaluated in four groups (1st, 2nd, 3th and 4th). Multiple regression equations for estimating the daily average milk yield, the number of inseminations per pregnancy, the first insemination age, and the first calving age were generated by including all

proportion values obtained by dividing each body size to other body measurements.

All of the traits were positively correlated with milk and fertility yields. The coefficient of determination (R²) of the multiple regressions of milk and fertility yields on body proportion measurements varied. According to the results, the highest R² value measured for multiple regression was 0.389 (p<0.01) for daily average milk yield at wither height, 0.344 (p<0.05) for body area for insemination number per pregnancy, 0.266 (p<0.05) for age at first insemination and 0.249 (p<0.05) for age at first calving (AFC) at body perimeter.

Table 3. The R² values of the multiple regression equation determined by the proportions of body measurements.
 Çizelge 3. Vücut ölçülerine ilişkin oranlar kullanılarak elde edilen çoklu regresyon denklemlerine ait R² değerleri

	Lactation Number <i>Laktasyon Sırası</i>	WH <i>CY</i>	BH <i>SY</i>	RH <i>SGY</i>	PBH <i>OYY</i>	CD <i>GD</i>	BL <i>VU</i>	BA <i>VA</i>	BP <i>VÇ</i>
Daily average milk yield (kg) <i>Günlük Ortalama Süt Verimi (kg)</i>	1	0.389**	0.381	0.361**	0.372**	0.217*	0.143*	0.371*	0.378*
	2	0.036	0.032	0.026	0.024	0.023	0.014	0.075	0.070
	3	0.339	0.269	0.075	0.073	0.052	0.020	0.433	0.426
	4	0.272	0.263	0.180	0.114	0.046	0.029	0.312	0.310
Number of Insemination Per Pregnancy <i>Gebelik Başına Tohumlama Sayısı</i>	1	0.187	0.188	0.179	0.117	0.093	0.004	0.213	0.164
	2	0.049	0.047	0.038	0.039	0.035	0.008	0.063	0.069
	3	0.285	0.246	0.127	0.124	0.076	0.072	0.344	0.335
	4	0.171	0.127	0.117	0.108	0.103	0.063	0.294	0.246
Age at first insemination (Day) <i>İlkin Tohumlama Yaşı (Gün)</i>	1	0.068	0.061	0.033	0.031	0.029	0.004	0.072	0.074
	2	0.059	0.054	0.049	0.043	0.003	0.001	0.069	0.053
	3	0.239	0.240	0.133	0.106	0.086	0.002	0.243	0.192
	4	0.168	0.089	0.034	0.028	0.002	0.001	0.259	0.266
Age at first calving (Day) <i>İlkin Buzağılama Yaşı (Gün)</i>	1	0.090	0.086	0.082	0.080	0.076	0.018	0.137	0.136
	2	0.086	0.057	0.050	0.034	0.001	0.001	0.100	0.067
	3	0.208	0.207	0.165	0.054	0.048	0.021	0.211	0.076
	4	0.137	0.075	0.042	0.034	0.040	0.001	0.242	0.248

$$WH \langle / \rangle Y_i = \beta + b_{WH/BH} + b_{WH/SGY} + b_{WH/PBH} + b_{WH/CD} + b_{WH/BL} + b_{WH/TL}$$

$$BH \langle / \rangle Y_i = \beta + b_{BH/SGY} + b_{BH/PBH} + b_{BH/CD} + b_{BH/BL} + b_{BH/TL}$$

$$RH \langle / \rangle Y_i = \beta + b_{RH/PBH} + b_{RH/CD} + b_{RH/BL} + b_{RH/TL}$$

$$PBH \langle / \rangle Y_i = \beta + b_{PBH/CD} + b_{PBH/BL} + b_{PBH/TL}$$

$$CD \langle / \rangle Y_i = \beta + b_{CD/BL} + b_{CD/TL}$$

$$BL \langle / \rangle Y_i = \beta + b_{BL/TL}$$

$$BA \langle / \rangle Y_i = \beta + b_{BA/WH} + b_{BA/BH} + b_{BA/RH} + b_{BA/PBH} + b_{BA/CD} + b_{BA/BL} + b_{BA/TL} + b_{BA/BP}$$

$$BP \langle / \rangle Y_i = \beta + b_{BP/WH} + b_{BP/BH} + b_{BP/RH} + b_{BP/PBH} + b_{BP/CD} + b_{BP/BL} + b_{BP/TL} + b_{BP/BA}$$

*(p<0.05), **(p<0.01)

CONCLUSION AND RECOMMENDATIONS

The objective of this study was to demonstrate the relationships among body proportions and production yields in different lactation numbers of holsteins fresian milking cows. The study indicated that the predictive power of multiple regression equations produced by the use of the proportion values obtained from body measurements for the estimate of the daily average milk yield, the number of inseminations per pregnancy, the first insemination age were low in

general, and similar studies would be useful for the research.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by Tekirdag Namik Kemal University Research Projects coordination unit with the project number: NKUBAP.03.YL.18.141. As a part of this long-term project, the MSc. thesis of Ersin Dama from Tekirdag Namik Kemal University Graduate School of Natural and Applied Sciences.

This article was produced from MSc. thesis of Ersin Dama.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

The Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Akbulut O, Tuzemen N, Yanar M, Aydin R 1998. Relationship of early live weight and body measurements with first lactation milk yield characteristics in brown swiss cattle. *Atatürk Üniv. Z.F.Der.*:29(2): 250-258.
- Alıç D 2007. Investigations on the conformation traits, herd life and milk yield holst Investigations on the conformation traits, herd life and milk yield holstein cows. ein cows. University of Ankara , Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Animal Science. PhD. Thesis. 96 Page, Ankara.
- Dogaroglu OK 2006. Image Processing Technology For Estimating Live Weight And Various Body Sizes In Butchering Cattle. University of Trakya, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Animal Science, Master Thesis. 58
- Negretti P, Bianconi G 2005. Indirect determination of live weight, dead weight, and yield at slaughtering of chianini beef by means of opto-informatic evaluation methods. 4th World It. Beef Cattle Gubbio Italy, 29 Apr.-1 May, 229-234
- Onal AR 2011. Comparison Of Different Methods Which Are Used For Estimating Morphometric Parameters Of Cattle And Water Buffalos By Digital Image Processing Technology. University of Namik Kemal, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Animal Science, PhD. Thesis. 153 Page. Tekirdag
- Orhan E. 2007. Researches on some physiological and morphological traits of Holstain fresian cows raised in registered herds in Konya. University of Page, Edirne.
- Hyslop JJ, Ross DW, Schofield CP, Navajas E, Roehe R, Simm G 2008. An assessment of the potential for live animal digital image analysis to predict the slaughter liveweights of finished beef cattle. *Proceedings of BSAS. Society's Annual Conference in Scarborough*, p:50, 31 March-2 April, Scarborough.
- Kok S 1996. Research on some morphological and genetical characteristics of water buffalo population in various region of Marmara and Karadeniz. University of Trakya, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Animal Science, PhD. Thesis. 206 Page, Edirne
- Kuchida K, Hamaya S, Saito Y, Suzuki M, Miyoshi S 1996. Development of a body dimension measurement method for dairy cattle by computer image analysis with video camera. *Ann. Sci. and Tech.*, 67: 878-881.
- Larroque H, Ducrocq V 2001. Relationship Between Type and Longevity in the Holstein Breed. *Genet. Sel. Evol.* 33: 39-59
- Mimaryan M, Yener SM 2000. Morpohological characteristics and correlations between live weight and milk yield in Holstein-Friesian cows and opportunities to benefit from them in selection. *Tarım Bilimleri Dergisi.* 6(2): 82-85.
- Selçuk, Institute of Natural and Applied Sciences, Department of Animal Science, PhD. Thesis. 112 Page. Konya
- Tien NQ, Tripathi VN 1990. Genetic parameters of body weight at different ages and fi rst lactation traits in Murrah buffalo heifers. *Indian Vet. J.*, 67(9): 821-825.
- Tozser J, Sutta J, Bedo S 2000. The evaluation of video pictures for measurements of cattle. *Allatteny Takarm.* 49: 385-392.
- Yavuz S, Kaygisiz A 2015. Relationships Between Some udder traits and Body Sizes and Somatic Cell Numbers in Holstein Cattle. *KSÜ J.of Natural Sciences.*, 18(3): 9-18.