



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 25 Sayı-Number 1 Yıl-Year: 2022



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGISİ

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

Cilt-Volume **25**

Sayı-Number **1**

Yıl-Year **2022**



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 ÇİMRİN](#)

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 SAHİN](#)

KSÜ Ziraat Fak.
Tarımsal Biyoteknoloji Böl.
ms66@ksu.edu.tr

Alan Editörü/Associate Editor

[Doc.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. 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 HOSEİN-ZADEH University of Guilan, Rasht, IRAN | Prof.Dr. Jose Cola ZANUNCIO Federal Univ. of Vicos, 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. Rüştü 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

ARAŞTIRMA MAKALESİ - RESEARCH ARTICLE

- Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Ethanol Extracts of *Momordica charantia* and *Datura stramonium*** 1-9
Momordica charantia ve Datura stramonium Etanol Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesi ve Fenolik Kompozisyonu
Mehlika ALPER Cennet ÖZAY
- Determination of Antioxidant Activity of Different Extracts From Bark of *Pinus* spp. grown in Giresun (Turkey) Province – Phenolic analysis by RP-HPLC-DAD** 10-18
Giresun (Türkiye) İlinde Yetiştirilen *Pinus* spp.'nin Kabuğundan Elde Edilen Farklı Ekstraktların Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi – RP-HPLC-DAD ile Fenolik Analizi
Ayça AKTAŞ KARACELİK Mehmet Emin ŞEKER Mustafa KARAKÖSE
- Recombinant Production of *E. coli* NAD⁺-dependent DNA ligase as a Target for Antibacterial Drug Discovery** 19-24
Antibakteriyel İlaç Keşfi İçin Bir Hedef Olarak *E. Coli* NAD⁺-Bağımlı DNA Ligazın Rekombinant Üretimi
Özlem KAPLAN Rizvan İMAMOĞLU İsa GÖKÇE
- Nutrient Content of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. Grown on Some Local Lignocellulosic Wastes** 25-30
Bazı Lokal Lignoselülozik Atıklar Üzerinde Kültürü Yapılan *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.'in Besin İçeriği
Mehmet AKYÜZ Şule İNCİ Sevda KIRKBAĞ
- Farklı Sürelerde Bakır Etkisinde Kalan Tatlısu Midyelerinde (*Unio tigridis*) Antioksidan Enzim Tepkilerinin İncelenmesi** 31-41
Investigations on the Responses of Antioxidant Enzymes in Freshwater Mussels (*Unio tigridis*) Exposed to Copper in Differing Durations
Esin Gülnaz CANLI
- Bazı Orkide Taksonlarında Labellum Mikromorfolojisi** 42-48
Labellum Micromorphology in Some Orchid Taxa
Mehmet AYBEKE
- Morus nigra* L. (Karadut) cv. 'Ekşi Kara' 'nın Mikroçoğaltımı** 49-56
Micropropagation of the *Morus nigra* L. (Black Mulberry) cv. 'Ekşi Kara'
Duygu ÖZELÇİ Emel YİĞİT
- Türkiye'nin 2020-2045 Döneminde Ceviz Üretim ve Gereksemin Projeksiyonu** 57-65
Projections of Production and Demand for Walnut in The Period 2020-2045 in Turkey
İsmail GÜVENÇ Gürkan PURLU
- Macromycetes Determined in Tonya (Trabzon) District** 66-77
Tonya (Trabzon) Yöresinde Belirlenen Makromantarlar
Yasin UZUN Abdullah KAYA
- Contribution to the Alien Flora of Turkey: *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae)** 78-82
Türkiye'nin Yabancı Florasına Bir Katkı: *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae)
Salih TERZİOĞLU Kamil COŞKUNÇELEBİ



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

- Yabani Zehirli Mantar *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm 'un (Boletales) Biyolojik Aktiviteleri** 83-87
Biological Activities of Wild Poisonous Mushroom *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm (Boletales)
Celal BAL Hayri BABA İlğaz AKATA Mustafa SEVİNDİK Zeliha SELAMOĞLU Hasan AKGÜL
- Seed Morpho-Anatomical Characters of Some Cardamine taxa from Turkey** 88-99
Türkiye'den Bazı Cardamine Taksonlarının Tohum Morfo-Anatomik Karakterleri
Cengiz KARAİSMAİLOĞLU
- Biyolojik Preparatların *Halyomorpha halys* (Stål, 1885) (Hemiptera: Pentatomidae)'a Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi** 100-104
Determination of Biological Preparations Efficacy Against *Halyomorpha halys* (Stål, 1885) (Hemiptera: Pentatomidae)
Ali Kaan AŞKIN Şeyma YİĞİT İslam SARUHAN İzzet AKÇA
- Efficacies of Entomopathogenic Fungi from *Metarhizium*, *Beauveria* and *Isaria* on German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Blattaria: Blattellidae)** 105-112
Metarhizium, *Beauveria* ve *Isaria*'ya Bağlı Entomopatojen Fungusların Alman Hamamböceğine, *Blattella germanica* (L.) (Blattaria: Blattellidae), Etkinlikleri
Mehmet Kubilay ER Hasan TUNAZ Ali İŞİKBER
- Rezene ve Defne Uçucu Yağ Karışımlarının Kimyasal Bileşenlerinin ve *Pestalotiopsis funerea*'ya Karşı Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi** 113-126
Determination of Chemical Composition and Antifungal Activities of Fennel and Laurel Essential Oil Mixtures Against *Pestalotiopsis funerea*
Merve KARA Musa TÜRKMEN Soner SOYLU
- A New System for Relaxing the Dry Insects** 127-132
Kuru Böcekler İçin Yeni Bir Yumuşatma Sistemi
Mürşit Ömür KOYUNCU Murat KÜTÜK
- Evaluation of Cercopidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadomorpha) Species Distributed in Sinop and Kastamonu (Turkey) in Taxonomic Terms** 133-139
Sinop ve Kastamonu (Türkiye)'de Dağılım Gösteren Cercopidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadomorpha) Türlerinin Taksonomik Yönden Değerlendirilmesi
Rukiye TANYERİ Ünal ZEYBEKOĞLU
- Additional Notes on the Genus *Bledius* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) Fauna of Turkey** 140-143
Türkiye *Bledius* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) Faunası Üzerine Ek Notlar
Enes Zafer KACAR Semih ÖRGEL Sinan ANLAŞ
- A New Record and a New Locality for the Genus *Chlorophyllum* Masee in Turkey** 144-149
Türkiye'deki *Chlorophyllum* Masee Cinsi İçin Yeni Bir Kayıt ve Yeni Bir Lokalite
Yasin UZUN Abdullah KAYA
- The Influence of Age and Exposure Time on the Susceptibility of *Carpophilus hemipterus* Pupa to High Carbon Dioxide with Low Oxygen Treatment** 150-157
Carpophilus hemipterus (L.) Pupasının Düşük Oksijenli Yüksek Karbondioksit Uygulamasına Duyarlılığı Üzerinde Yaşın ve Uygulama Süresinin Etkisi
Şule TÜTÜNCÜ



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

- Akdeniz İklim Kuşağında, Sulamadan Dönen Suların Sulamada Kullanılmasının Taban Suyu Kalitesi ve Derinliği Üzerine Etkilerinin Araştırılması: Aşağı Seyhan Ovası Yemişli Sulama Sahası Örneği 158-165
Investigating the Potential Impacts of Using Irrigation Return Flows in Irrigation on the Quality and Quantity of Groundwater in the Mediterranean Landscapes: A Study in Yemisli Irrigation Area of Lower Seyhan Plain, Turkey
Harun KAMAN Mahmut ÇETİN Sertan SESVEREN
- Sulama Performans Göstergeleri ve TOPSİS Yöntemi ile Asi Havzası Sulama Birliklerinin Analizi 169-180
Analysis of Water User Associations in Asi Basin with Irrigation Performance Indicators and TOPSIS Method
Şaban ÇİFÇİ Hasan DEĞİRMENCİ
- The Effects of Two-Step Tempering Treatment on the Physical, Chemical and Technological Properties of Flour in Bread Wheats (*Triticum aestivum* L.) 181-190
Ekmeklik Buğdaylara (*Triticum aestivum* L.) İki Aşamalı Uygulanan Tavlama İşleminin Unun Fiziksel, Kimyasal ve Teknolojik Özelliklerine Etkileri
Mustafa KURT Halef DİZLEK
- Is It Possible to Improve the Fermentation and Nutritional Quality of Wheat Straw Silage by Replacing Commercial Inoculant with Kefir? 191-197
Ticari İnokulantların Yerine Kefir Kullanarak Buğday Samanı Silajının Fermentasyon ve Besin Kalitesini İyileştirmek Mümkün müdür?
Berrin OKUYUCU Selim ESEN
- Anason Tohumu İlavesinin Yumurtacı Tavukların Performans, İç ve Dış Yumurta Kalite Özellikleri ve Yumurta Sarısı Kolesterol Konsantrasyonuna Etkisi 198-205
The Effect of Anise Seed (*Pimpinella anisum* L.) Supplement on Performance, Internal and External Egg Quality Traits and Egg Yolk Cholesterol Concentration Level of Laying Hens
Erkan ÇINAR Asuman ARSLAN DURU



KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

TARIM ve DOĞA DERGİSİ

HAKEMLER/Referees*

| | |
|------------------------------------|--|
| Dr. Öğr. Üyesi Mikail AÇAR | Munzur Üniv. Tunceli MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim Böl. Tunceli |
| Prof. Dr. Cuma AKBAY | KSÜ Ziraat Fak. Tarım Ekonomisi Böl. Kahramanmaraş |
| Dr. Öğr. Üyesi Mustafa EMRE AKÇAY | Van Yüzüncü Yıl Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Van |
| Doç. Dr. Davut Soner AKGÜL | Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Adana |
| Prof. Dr. Hasan AKGÜL | Akdeniz Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Antalya |
| Dr. Öğr. Üyesi Adile AKPINAR | Gaziantep Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. |
| Doç. Dr. Kamuran AKTAŞ | Manisa Celâl Bayar Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Manisa |
| Doç. Dr. Sinan AKTAŞ | Selçuk Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Konya |
| Doç. Dr. Sinan AKTAŞ | Selçuk Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Konya |
| Doç. Dr. Turgut ATAY | Tokat Gaziosmanpaşa Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Tokat |
| Prof. Dr. Murat AYDEMİR | Dicle Üniv. Fen Fak. Kimya Böl. Diyarbakır |
| Doç. Dr. Tugay AYŞAN | Osmaniye Korkut Ata Üniv. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fak. Osmaniye |
| Doç. Dr. Tugay AYŞAN | Osmaniye Korkut Ata Üniv. Kadirli Uygulamalı Bilimler Fak. Osmaniye |
| Doç. Dr. Barış BANİ | Kastamonu Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Kastamonu |
| Prof. Dr. Mustafa COŞKUN | Adıyaman Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Adıyaman |
| Prof. Dr. Mustafa COŞKUN | Adıyaman Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Adıyaman |
| Dr. Öğr. Üyesi Üzeyir ÇAĞLAR | Gazi Üniv. Sağlık Hizmetleri MYO Dişçilik Hizmetleri Böl. Ankara |
| Dr. Öğr. Üyesi A. Sinan ÇOLAKOĞLU | KSÜ Mühendislik-Mimarlık Fak. Gıda Mühendisliği Böl. Kahramanmaraş |
| Doç. Dr. Asime Filiz ÇALIŞKAN KEÇE | Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Adana |
| Prof. Dr. İlknur DAĞ | Eskişehir Osmangazi Üniv. Sağlık Hizmetleri MYO Eskişehir |
| Prof. Dr. Necdet DAĞDELEN | Aydın Adnan Menderes Üniv. Ziraat Fak. Biyosistem Mühendisliği Böl. Aydın |
| Prof. Dr. Bestami DALKILIÇ | Gaziantep Üniv. Teknik Bilimler MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim Böl. Gaziantep |
| Dr. Öğr. Üyesi Tuğba DEMİR | Sivas Cumhuriyet Üniv. Veteriner Fak. Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Böl. Sivas |
| Doç. Dr. Mustafa Kürşat DEMİR | Nemettin Erbakan Üniv. Mühendislik Fak. Gıda Mühendisliği Böl. Konya |
| Dr. Öğr. Üyesi DERYA ŞENAL | Bilecik Şeyh Edebali Üniv. Ziraat ve Doğa Bilimleri Fak. Bitki Koruma Böl. Bilecik |
| Prof. Dr. Harun DIRAMAN | Afyon Kocatepe Üniv. Mühendislik Fak. Gıda Mühendisliği Böl. Afyon |
| Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN | Çankırı Karatekin Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Çankırı |
| Prof. Dr. Ahmet DURSUN | Amasya Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Amasya |
| Doç. Dr. İsmail EKER | Bolu Abant İzzet Baysal Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Bolu |
| Prof. Dr. Güray ERENER | Ondokuz Mayıs Üniv. Ziraat Fak. Zootekni Böl. Samsun |
| Prof. Dr. Ayhan GÖKÇE | Niğde Ömer Halisdemir Üniv. Tarım Bilimleri ve Teknolojileri Fak. Niğde |
| Prof. Dr. İlhami GÜLÇİN | Atatürk Üniv. Fen Fak. Kimya Böl. Erzurum |
| Prof. Dr. İsmayil Safa GÜRCAN | Ankara Üniv. Veteriner Fak. Zootekni ve Hayvan Besleme Böl. Ankara |
| Dr. Öğr. Üyesi Seher GÜVEN | Recep Tayyip Erdoğan Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Rize |
| Dr. Öğr. Üyesi Abdussamat GÜZEL | İnönü Üniv. Sağlık Hizmetleri MYO Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Böl. Malatya |
| Prof. Dr. Ali Arda IŞIKBER | KSÜ Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Kahramanmaraş |

* Soyada göre sıralanmıştır.



- Doç. Dr. Gülay KAÇAR
Doç. Dr. Gülay KAÇAR
Prof. Dr. Yıldız KAÇAR
Prof. Dr. Turan KARADENİZ
Prof. Dr. Yakup KASKA
Prof. Dr. Yusuf KAYA
Prof. Dr. Ahmet KAZANKAYA
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet KEÇECİ
Dr. Öğr. Üyesi Memiş KESDEK
Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR
Doç. Dr. Dursun KISA
Prof. Dr. Ömer KILIÇ
Prof. Dr. Mustafa KIZILŞİMŞEK
Prof. Dr. Müberra KOŞAR
Dr. Öğr. Üyesi HASAN MARAL
Prof. Dr. Figen MERT
Doç. Dr. Selin MURADİYE AKÇAY
Doç. Dr. Çetin MUTLU
Prof. Dr. Ahmet Regaib OĞUZ
Dr. Semih ÖRGEL
Doç. Dr. Taner ÖZCAN
Prof. Dr. Nihal ÖZDER
Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE
Prof. Dr. İnanç ÖZGEN
Prof. Dr. Celaleddin ÖZTÜRK
Prof. Dr. Nilgün ÖZTÜRK
Dr. Öğr. Üyesi Murat PEKMEZ
Prof. Dr. Oğuzhan SARIKAYA
Prof. Dr. Selami SELVİ
Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL
Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL
Prof. Dr. İbrahim TÜRKEKUL
Prof. Dr. Yusuf UÇAR
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Sabri ÜNSAL
Doç. Dr. Neşe ÜZEN
Dr. Saravanan V SATHASIVAMPILLAI
Dr. Saravanan V SATHASIVAMPILLAI
Prof. Dr. Z. Servet YALÇIN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Bolu
Bolu Abant İzzet Baysal Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Bolu
Çukurova Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Böl. Adana
Bolu Abant İzzet Baysal Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Böl. Bolu
Pamukkale Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Denizli
Atatürk Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Erzurum
Kırşehir Ahi Evran Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Böl. Kırşehir
Malatya Turgut Özal Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Malatya
Muğla Sıtkı Koçman Üniv. Fethiye Ali Sıtkı-Mefharet Koçman MYO Muğla
Ankara University, Faculty of Agriculture, Field Crops. Ankara
Bartın Üniv. Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Böl. Bartın
Adıyaman Üniv. Eczacılık Fak. Eczacılık Meslek Bilimleri Böl. Adıyaman
KSÜ Ziraat Fak. Tarla Bitkileri Böl. Kahramanmaraş
Doğu Akdeniz Üniv. Eczacılık Fak. Eczacılık Pr. KIBRIS
Karamanoğlu Mehmetbey Üniv. Ermenek MYO Karaman
Çanakkale Onsekiz Mart Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Çanakkale
Aydın Adnan Menderes Üniv. Ziraat Fak. Biyosistem Mühendisliği Böl. Aydın
Harran Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Şanlıurfa
Van Yüzüncü Yıl Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Van
Manisa Celâl Bayar Üniv. Demirci Meslek Yüksekokulu Ormancılık Böl. Manisa
Balıkesir Üniv. Necatibey Eğitim Fak. Balıkesir
Tekirdağ Namık Kemal Üniv. Ziraat Fak. Bitki Koruma Böl. Tekirdağ
Ondokuz Mayıs Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Samsun
Fırat Üniv. Baskil Meslek Yüksekokulu Bitkisel ve Hayvansal Üretim Böl. Elazığ
Selçuk Üniv. Fen Fak. Biyoloji Böl. Konya
Anadolu Üniv. Eczacılık Fak. Temel Eczacılık Bilimleri Böl. Eskişehir
İstanbul Üniv. Fen Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Böl. İstanbul
Bursa Teknik Üniv. Orman Fak. Orman Mühendisliği Böl. Bursa
Balıkesir Üniv. Altınoluk MYO Bitkisel ve Hayvansal Üretim Böl. Balıkesir
Tokat Gaziosmanpaşa Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Tokat
Tokat Gaziosmanpaşa Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Tokat
Tokat Gaziosmanpaşa Üniv. Fen-Edebiyat Fak. Biyoloji Böl. Tokat
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniv. Ziraat Fak. Isparta
Harran Üniv. Mühendislik Fak. Gıda Mühendisliği Böl. Şanlıurfa
Dicle Üniv. Ziraat Fak. Tarımsal Yapılar ve Sulama Böl. Diyarbakır
KnowledgeLink Group, Inc., Waltham, MA 02451, USA
KnowledgeLink Group, Inc., Waltham, MA 02451, USA
Ege Üniv. Ziraat Fak. Zootekni Böl. İzmir

Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Ethanol Extracts of *Momordica charantia* and *Datura stramonium*

Mehlika ALPER^{1*}, Cennet ÖZAY²

¹Muğla Sıtkı Koçman University, Faculty of Science, Department of Molecular Biology and Genetics, Muğla 48000, Turkey, ²Izmir Katip Celebi University, Faculty of Pharmacy, Department of Basic Pharmaceutical Sciences, Izmir 35620, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0001-6193-346X>, ²<https://orcid.org/0000-0002-1120-6122>

✉: mehlikaalper@mu.edu.tr

ABSTRACT

Medicinal plants in the world are natural antioxidant sources as they contain some secondary metabolites such as phenolic acids and flavonoids. Therefore, they are used to prevent or treat many diseases in many parts of the world. However, the use of antioxidants in cancer treatment is still controversial. Accordingly, the phenolic composition and antioxidant potential of the ethanol extracts of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) and *Datura stramonium* L. (Solanaceae), which are used traditionally in Turkey and have cytotoxic potential on human cancer cells, were investigated. The antioxidant assays (DPPH, metal chelating, phosphomolybdenum, and ferric reducing power) were applied to the ethanol extracts of the fruits of *M. charantia* and the leaves of *D. stramonium*. The total phenolic and flavonoid contents were determined. The phenolic compounds contained in ethanolic extracts were identified using HPLC method. Fifteen phenolic compounds were identified in the extracts. Caffeic acid was the major constituent in both extracts. The amount of caffeic acid was detected to be 6282.51 and 15183.36 µg g⁻¹ extract in *M. charantia* extract and the *D. stramonium* extracts, respectively. *D. stramonium* leaf extract showed higher antioxidant activity than *M. charantia* fruit extract and this activity may be associated with high phenolic compound concentrations. Hence, further studies about screening of bioactive compounds from various part of these plants will be a great importance for obtaining of source of novel natural antioxidants.

Research Article

Article History

Received : 31.12.2020

Accepted : 09.04.2021

Keywords

Momordica charantia

Datura stramonium

Antioxidant activity

Total phenolic and flavonoid content

HPLC

Momordica charantia ve *Datura stramonium* Etanol Ekstraktlarının Antioksidan Aktivitesi ve Fenolik Kompozisyonu

ÖZET

Dünyadaki tıbbi bitkiler, fenolik asitler ve flavonoidler gibi bazı sekonder metabolitler içerdikleri için doğal antioksidan kaynaklarıdır. Bu nedenle dünyanın pek çok yerinde birçok hastalığı önlemek veya tedavi etmek için kullanılmaktadırlar. Bununla birlikte, antioksidanların kanser tedavisinde kullanımı hala tartışmalıdır. Bu doğrultuda, Türkiye'de geleneksel olarak kullanılan ve insan kanser hücreleri üzerinde sitotoksik potansiyele sahip *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) ve *Datura stramonium* L. (Solanaceae) 'un etanol ekstraktlarının fenolik bileşimi ve antioksidan potansiyeli araştırılmıştır. Antioksidan deneyler (DPPH, metal şelatlama, fosfomolibdenyum ve demir indirgeme gücü), *M. charantia*'nın meyvelerinin ve *D. stramonium*'un yapraklarının etanolik ekstraktlarına uygulandı. Toplam fenolik ve flavonoid içerikler belirlendi. Etanolik ekstraktlarda bulunan fenolik bileşikler HPLC yöntemi kullanılarak tespit edildi. Ekstraktlarda on beş fenolik bileşik tanımlandı. Kafeik asit, her iki ekstraktta da ana bileşendi. *M. charantia* ekstraktı ve *D. stramonium* ekstraktında kafeik asit miktarları sırasıyla 6282.51 ve

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 31.12.2020

Kabul Tarihi : 09.04.2021

Anahtar Kelimeler

Momordica charantia

Datura stramonium

Antioksidan aktivite

Toplam fenolik ve flavonoid içerik

HPLC

15183.36 µg g⁻¹ olarak tespit edildi. *D. stramonium* yaprak ekstraktı, *M. charantia* meyve ekstraktından daha yüksek antioksidan aktivite gösterdi ve bu aktivite yüksek fenolik bileşik konsantrasyonları ile bağlantılı olabilir. Bu nedenle, bu bitkilerin çeşitli kısımlarından biyoaktif bileşiklerin taranması ile ilgili daha ileri çalışmalar, yeni doğal antioksidan kaynaklarının elde edilmesi için büyük önem taşıyacaktır.

To Cite: Alper M, Özyay C 2022. Antioxidant Activity and Phenolic Composition of Ethanol Extracts of *Momordica charantia* and *Datura stramonium*. KSU J. Agric Nat 25 (1): 1-9. DOI: 10.18016/ksutarimdoge.vi.851251.

INTRODUCTION

Free radicals are generated by mitochondria, peroxisomes, inflammatory processes, ischemia and physical exercise during normal metabolism (Lobo et al., 2010). It is known that the balance between the production and neutralization of Reactive Oxygen Species (ROS) with antioxidant systems is essential. When an imbalance occurs, cells can be exposed to oxidative stress due to increased ROS production (Krishnaiah et al., 2011; López-Alarcón and Denicola, 2013). This imbalance might harm molecules (e.g. nucleic acids, lipids, proteins.), causing metabolic disorders and diseases like diabetes, cancer, atherosclerosis, neurological disorder, rheumatoid arthritis, hypertension stroke due to oxidative stress (Carocho and Ferreira, 2013; Alam et al., 2013).

Plants produce secondary metabolites with different biological and pharmacological properties. Due to this, antioxidant molecules, which may be obtained from fruits and vegetables, are important to keep oxidative balance (Armendáriz-Barragán et al., 2016). In this way, the identification of compounds is an important study field together with their isolation (Rajendran et al., 2014).

Momordica charantia L. (Cucurbitaceae), which is a common plant in tropical and sub-tropical regions, including Brazil, India, China, Africa, Australia and Turkey (Krishnaiah et al., 2011; Güneş et al., 2019), are known as bitter melon or bitter gourd. *M. charantia* has been widely used as food and medicine and contains a great diversity of secondary metabolites such as polyphenols, flavonoids, triterpenoids, saponins and alkaloids. Its diverse biological activities include anti-diabetic, anti-cancer, anti-inflammatory, antimicrobial, anti-helminthic, antioxidant and anti-ulcer activities (Villarreal-La Torre et al., 2020). Studies on *M. charantia* have revealed that its components with pharmaceutical importance are phenolic compounds and triterpenes (Cuong et al., 2018).

Datura L. genus is a member of Solanaceae, possesses poisonous properties, and is represented in Turkey by three species, *Datura stramonium* L., *D. metel* L. and *D. innoxia* Mill. *Datura stramonium* L. is a widespread medicinal herbaceous plant throughout the World, which is commonly known as thorn-apple or jimson weed (Öz Arık, 2017). Researches have

determined that *D. stramonium* contains alkaloids, phenols, glycosides, tannins and saponins. Alkaloids, atropine, and scopolamine are the primary biologically active substances in *D. stramonium*. Some medicinal features of *D. stramonium* containing its different activities like antimicrobial, anti-inflammatory, antioxidant, anticancer, antiviral, antiepileptic, antiasthmatic, insecticidal, and analgesic were investigated (Singh and Singh, 2013; Al-Snafi, 2017; Alper, 2019).

Although studies have been conducted on the alkaloids of *D. stramonium* (Berkov et al., 2006; El Bazaoui et al., 2011; Ally and Mohanlall, 2020), studies regarding its phenolic compounds are relatively few. It is known that the biosynthesis and accumulation of secondary metabolites depend upon different environmental factors as well as genetic, ontogenic, morphogenetic features. Content of different secondary metabolites does not stay steady since several biotic (fungi, bacteria, nematodes, etc.) and abiotic (location, temperature, soil, etc.) factors play a significant role in their synthesis (Verma and Shukla, 2015). Also, the uses of antioxidants in cancer therapy have still been debated (Fuchs-Tarlovsky, 2013; Dastmalchi et al., 2020). Among the ethanolic extracts of the aerial parts of *M. charantia* (Güneş et al., 2019) and *D. stramonium* (Alper, 2019) collected from Edirne, it was determined that the fruit extract of *M. charantia* and, the leaf extract of *D. stramonium* have more cytotoxic potential on human cancer cells tested, unlike seed extracts. All these factors considered, we aimed to determine phenolic contents of ethanol extracts of *M. charantia* fruits and *D. stramonium* leaves from Edirne (Turkey) and also to assign their potential antioxidant properties. In addition, for two extracts obtained from similar geography originating from our country, with this study, the potential of *D. stramonium* extract, whose bioactive properties are less known than *M. charantia* extract, may be able to be evaluated comparatively.

MATERIALS and METHODS

Chemicals

All chemicals and reagents used in the antioxidant assays were bought from Sigma-Aldrich (Germany) and Merck (Germany).

Plant Materials and Extraction

M. charantia and *D. stramonium* were gathered from the Center of Edirne-Turkey in 2015. *M. charantia* and *D. stramonium* were collected from Hıdırağa village and, İstasyon neighbourhood and its surroundings, respectively. The botanical identity of the both species was authenticated by Prof. Dr. Fatma Güneş from Trakya University (Edirne, Turkey). Voucher specimens were preserved at her herbarium. The fruits of *M. charantia* and the leaves of *D. stramonium* were air-dried in shadow, brought separately into fine powder. These plant parts were individually extracted with ethanol. The filtered extracts were concentrated with a rotary evaporator (IKA RV10D, Staufen, Germany). After the lyophilization process, the crude extracts were placed in light-protected bottles and stored at -20°C until use.

Antioxidant Activity Assays

DPPH Radical Scavenging Activity: For studied of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) activity of the extracts, each extract solution (1 mL) was mixed with methanolic DPPH radical solution (0.004%, 4 mL). Then, the mixture was left to incubate at room temperature for 30 minutes protected from light. The same processes were done in the standard Trolox. The absorbances at 517 nm were taken. The radical scavenging activity of the extracts was given as equivalent of Trolox (mg TEs g⁻¹ extract) (Ceylan et al., 2016).

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) Assay: The method was done by the method of Zengin and Aktumsek (2014) after slight modifications. Sample solutions were mixed with freshly prepared working FRAP reagent (acetate buffer-0.3 M, TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine-10 mM, FeCl₃-20 mM). After 30 minutes of incubation at room temperature was completed, the absorbance at 593 nm was recorded. The same procedures were achieved for Trolox, which is used as a standard. FRAP activity of the extracts was reported as equivalents of Trolox (mg TEs g⁻¹ extract)

Phosphomolybdenum Assay: Total antioxidant capacities of the extracts were evaluated by phosphomolybdenum method explained by Berk et al. (2011). In short, each sample solution was reacted with reagent solution (0.6 M H₂SO₄, 28 mM Na₃PO₄ and 4 mM (NH₄)₂MoO₄), and held at 95°C for 90 minutes. The absorbance at 695 nm was recorded after each mixture was brought to room temperature. The antioxidant property of each extract was given as Trolox equivalents (mg TEs g⁻¹ extract).

Metal Chelating Activity : For this assay, sample

solutions were mixed with FeCl₂ solution (0.05 mL, 2 mM). The absorbance of the reaction starting after adding 5 mM ferrozine was read at 562 nm following incubation at room temperature for 10 minutes. The results for the extracts were stated as EDTA (mg EDTAEs g⁻¹ extract) equivalents (Zengin et al., 2016).

Total Phenolic and Flavonoid Contents

Colourimetric assays were employed to achieve total phenolic and flavonoid contents in the extracts (Ozay and Mammadov, 2016). Folin-Ciocalteu reagent (1 mL) was mixed with the extract (1 mg/mL) and sodium carbonate (2%). After 2 h incubation, the formation of the coloured mixture is determined spectrophotometrically at 760 nm and the total phenolic content was given as gallic acid equivalents (mg GAEs g⁻¹). After mixing the extract solution (1 mL) with an equal volume of aluminium trichloride solution (1mL), the absorbance at 415 nm was read. The outcomes were reported as quercetin equivalents (mg QEs g⁻¹ of extract).

Phenolic Compound Analyses

Analysis of phenolic contents of the extracts was conducted by reversed-phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC, Shimadzu, Japan) according to the procedure of Caponio et al. (1999) with some modifications. HPLC system was furnished with pump (LC-20AT), Photo-diode array detector (SPDM20A), and auto sampler (SIL-20AACHT). The analysis was done with the C-18 column (Agilent Eclipse XDB, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm) by a mobile phase at 30°C. The mobile phase consisted of a mixture of two solvents, solvent A (the formic acid solution 3%) and solvent B (methanol). 0.2 g of sample dissolved in the mobile phase were filtered (0.45 µm) before injection (10 µL) into the HPLC. The gradient conditions were as stated in a previous study (Alper et al., 2021). 15 compounds shown in Table 2 were standards. Phenolic compounds in the extracts were given as µg per gram of the extract.

Statistical Analysis

Statistical analysis was done with the software SPSS version 22.0 program. Statistical significance between the extracts was analyzed with One-Way ANOVA and Tukey's multiple comparison test. Data were presented as a mean ± SE. Significance was considered as *P≤0.05.

RESULTS and DISCUSSION

Determination of Antioxidant Capacity, Total Phenolic and Flavonoid Contents

The different antioxidant assays were performed with the ethanol extracts of the fruits of *M. charantia* and

the leaves of *D. stramonium*. The results of these assays are presented in Table 1. All antioxidant assays applied in our study were significantly

different between the two plants ($P \leq 0.05$). *D. stramonium* extract had higher antioxidant activity compared to *M. charantia* extract.

Table 1. Antioxidant activities of *M. charantia* and *D. stramonium* extracts (mean \pm SE)

Çizelge 1. *M. charantia* ve *D. stramonium* ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri (ortalama \pm SE)

| Plants | DPPH (mg TEs g ⁻¹) | FRAP assay (mg TEs g ⁻¹) | Phosphomolybdenum assay (mg TEs g ⁻¹) | Metal chelating activity (mg EDTAEs g ⁻¹) |
|----------------------|-----------------------------------|---|--|--|
| <i>M. charantia</i> | 50.07 \pm 0.18 ^b | 57.32 \pm 0.23 ^b | 41.02 \pm 0.13 ^b | 08.47 \pm 0.02 ^b |
| <i>D. stramonium</i> | 63.19 \pm 1.02 ^a | 71.02 \pm 1.10 ^a | 65.11 \pm 0.35 ^a | 21.52 \pm 0.09 ^a |

TEs: Trolox equivalents, EDTAEs: EDTA equivalents. Different letters in each column demonstrate significant difference ($*P \leq 0.05$)

Also, the total phenolic and flavonoid contents for each extract were detected. Total phenolic and flavonoid contents of the ethanolic extracts of *M. charantia* and *D. stramonium* were given in Figure 1. When these results were examined, the ethanolic extract obtained from *D. stramonium* was determined

to have the highest total phenolic content (25.77 mg GAEs g⁻¹). Total flavonoid contents of the extracts from these plants were not significantly different ($P > 0.05$), but their phenolic contents were significantly different ($P \leq 0.05$) (Figure 1).

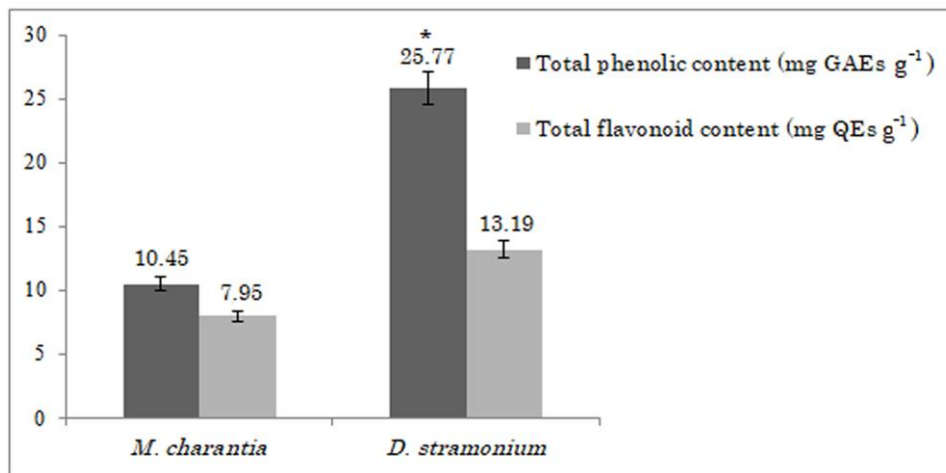


Figure 1. Total phenolic and flavonoid contents of *M. charantia* and *D. stramonium* extracts. Each bar indicates the mean of contents (\pm SE) in each species. (GAEs: Gallic acid equivalents, QEs: Quercetin equivalents). $*P \leq 0.05$.

Şekil 1. *M. charantia* ve *D. stramonium* ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid içerikleri. Her çubuk, her türdeki içeriğin ortalamasını (\pm SE) gösterir. (GAEs: Gallik asit eşdeğerleri, QEs: Kuersetin eşdeğerleri). $*P \leq 0.05$.

Phenolics are the most widely distributed secondary metabolites in plants. Plant polyphenols have been reported to take increased attention owing to their effective antioxidant features and their pronounced effects in preventing various oxidative stress-related diseases (Dai and Mumper, 2010). Cai et al. (2006) revealed that conventional Chinese medicinal plants related to anticancer had a great variety of natural phenolic compounds with different constructive properties as well as drastically different antioxidant activity.

It was found that *M. charantia* and *D. stramonium* possess antioxidant activity based on the results of various antioxidant assays *in vitro*. The antioxidant activity of *M. charantia* was confirmed in previous studies (Kubola and Siriamornpun, 2008; Choi et al.,

2012; Ozusaglam and Karakoca, 2013; Chen et al., 2019). Antioxidant compounds in *M. charantia* pulp showed potential natural antioxidant activity to inhibit the lipid peroxidation (Padmashree et al., 2010). It was reported that a wild *M. charantia* alcohol variety and aqueous extract had effects in the elimination of DPPH free radical at 300 μ g mL⁻¹, and metal chelating activity at 100, 250, 500 μ g mL⁻¹ compared with Vitamin E (Wu and Ng, 2008). In another study, total phenolic contents of the ripe fruit of *M. charantia* extracted in 80% ethanol were detected as 14.9 mg GAEs g⁻¹ extract (Horax et al., 2010).

D. stramonium has both poisonous and medicinal properties and has been proven to have important pharmacological potency with a great benefit and usage in traditional folk medicine in nearly all parts

of the World. (Soni et al., 2012). The methanol extracts of *D. stramonium* leaves were reported to show the DPPH scavenging activity with the IC₅₀ value of 6.7 µg mL⁻¹ (Sreenivasa et al., 2012). Benabderrahim et al. (2019) investigated the antioxidant activity and total phenolic and flavonoids contents of *Datura innoxia*, collected from Isparta, Turkey. The total phenolics and flavonoids results and DPPH, FRAP, phosphomolybdenum assay results of *D. innoxia* methanolic aerial parts were found to be higher than *D. stramonium*, which we examined in this study. However metal chelating activity of *D. stramonium* was found to be higher than *Datura innoxia*. In a previous study, where the methanolic leaf extracts of *D. innoxia* and *D. metel* were examined for their total phenolics and flavonoids content, the highest total phenolic and total flavonoid content were found in *D. innoxia* leaf extract as 70.26 ± 1.12 mg GAE g⁻¹ and 34.24 ± 1.28 mg RE g⁻¹ respectively (Bhardwaj et al., 2016).

The antioxidant activity of the plants in this study may be explained by the phenolic compounds they contain. Caffeic acid was determined to be a major constituent in both extracts and therefore, it may be mainly responsible for the antioxidant activity

observed (Masek et al., 2016). There are various studies in the literature that reveal a significant relationship between total phenolic contents and antioxidant activities (Ozay and Mammadov, 2016; El-Hawary et al., 2019).

Determination of Phenolic Composition

The phenolic compound amount determined by HPLC analysis in these extracts was summarized in Table 2 and the chromatograms were illustrated in Figure 2 and 3. All of the 15 phenolic compounds used as the standards were detected in varying amounts according to the extracts. Caffeic acid was clearly the most abundant phenolic acid in both extracts although its amount was very different (6282.51 µg g⁻¹ extract in *M. charantia* fruit extract and 15183.36 µg g⁻¹ extract in *D. stramonium* leaf extract). The main phenolic compounds of *M. charantia* fruit extract, after caffeic acid were 2,5 dihydroxybenzoic acid, epicatechin, gallic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid, respectively. However, 2,5 dihydroxybenzoic acid, epicatechin, vanillic acid, gallic acid and chlorogenic acid were detected as the main phenolic compounds of *D. stramonium* leaf extract, depending on their amounts, respectively following caffeic acid.

Table 2. Phenolic compounds of *M. charantia* and *D. stramonium* extracts (µg g⁻¹ extract) (mean ± SE)

Çizelge 2. *M. charantia* ve *D. stramonium* ekstraktlarının fenolik bileşikleri (µg g⁻¹ ekstrakt) (ortalama ± SE)

| No | Phenolic Compounds (Fenolik Bileşikler) | RT (min) | UV _{max} | <i>M.charantia</i> (µg g ⁻¹ extract) | <i>D. stramonium</i> (µg g ⁻¹ extract) |
|----|--|----------|-------------------|--|--|
| 1 | Gallic acid | 6.8 | 280 | 549.34 ± 3.83 | 680.89 ± 4.64 |
| 2 | 3,4-dihydroxybenzoic acid | 10.7 | 280 | 540.18 ± 3.22 | 21.54 ± 0.48 |
| 3 | 4-hydroxybenzoic acid | 15.7 | 280 | 25.11 ± 0.54 | 311.73 ± 3.54 |
| 4 | 2,5-dihydroxybenzoic acid | 17.2 | 320 | 1477.58 ± 12.75 | 4721.82 ± 80.55 |
| 5 | Chlorogenic acid | 18.2 | 320 | 81.28 ± 0.76 | 410.70 ± 2.88 |
| 6 | Vanillic acid | 19.2 | 320 | 101.90 ± 1.41 | 1411.50 ± 11.13 |
| 7 | Epicatechin | 21.3 | 260 | 599.45 ± 4.01 | 1928.60 ± 15.17 |
| 8 | Caffeic acid | 22.7 | 280 | 6282.51 ± 135.5 | 15183.36 ± 271.0 |
| 9 | <i>p</i> -coumaric acid | 26.1 | 320 | 1.18 ± 0.02 | 31.83 ± 0.23 |
| 10 | Ferulic acid | 30.1 | 320 | 3.15 ± 0.09 | 45.42 ± 0.38 |
| 11 | Rutin | 45.6 | 360 | 24.07 ± 0.47 | 2.47 ± 0.11 |
| 12 | Ellagic acid | 47.7 | 240 | 208.64 ± 3.25 | 190.75 ± 2.85 |
| 13 | Naringin | 49.7 | 280 | 18.00 ± 0.45 | 5.18 ± 0.11 |
| 14 | Cinnamic acid | 67.8 | 280 | 232.17 ± 3.42 | 227.94 ± 3.36 |
| 15 | Quercetin | 71.1 | 360 | 9.94 ± 0.19 | 7.66 ± 0.15 |

RT: retention time (*ahkonma zamanı*)

When the main compounds aforementioned were compared, the amount of chlorogenic acid, 4-hydroxybenzoic acid, 2,5 dihydroxybenzoic acid, vanillic acid, caffeic acid and epicatechin were remarkably higher in *D. stramonium* leaf extract than *M. charantia* fruit extract, whereas 3,4-dihydroxybenzoic acid was importantly determined higher in *M. charantia* fruit extract than that of *D. stramonium* leaf extract. Also, both extract were found to be rich in ellagic acid and cinnamic acid. Quercetin was a little in both extracts. In addition, *p*

coumaric acid and rutin were detected in the lowest level of concentration in *M. charantia* fruit extract and *D. stramonium* leaf extract, respectively.

The phytochemical compounds in plants were demonstrated to have different biological activities like antioxidant, anticancer, antibacterial, antiinflammatory, cardioprotective properties, which have potential beneficial effects for human health. The research about phenolic compounds has increased in recent, due to their potential ability (Tungmunnithum et al., 2018).

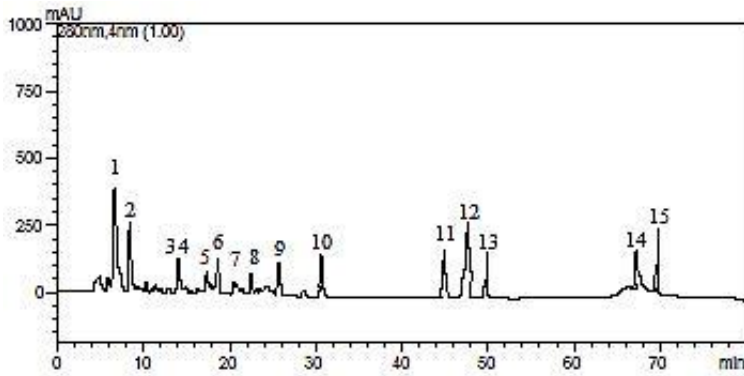


Figure 2. The HPLC chromatogram of *M. charantia* extract
Şekil 2. *M. charantia* ekstraktının HPLC kromotogramı

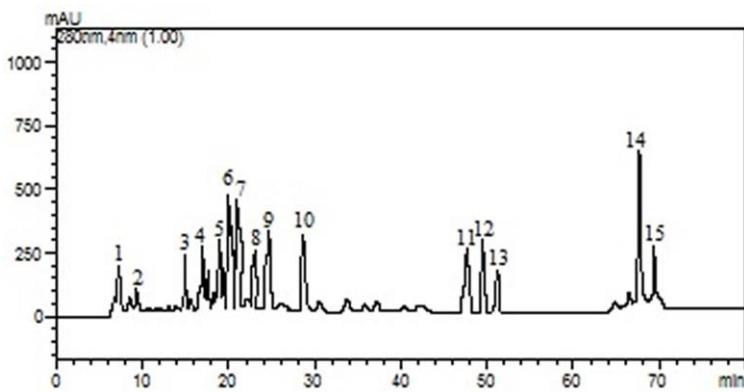


Figure 3. The HPLC chromatogram of *D. stramonium* extract
Şekil 3. *D. stramonium* ekstraktının HPLC kromotogramı

There are various reports revealed the phenolic composition of *M. charantia*. Horax et al. (2010) extracted the phenolics, using ethanol and water solvent systems, from pericarp (fleshy portion) and seeds of *M. charantia* collected at three maturation stages as immature, mature, and ripe and reported that catechin, gallic acid, gentisic acid, chlorogenic acid and epicatechin were the main phenolic components in the extracts. Choi et al. (2012) evaluated the phytochemical contents from the 80% methanol extracts of roasted and unroasted *M. charantia* fruits, leaves, stems, and roots from Korea Farms. They expressed that epigallocatechin was the most abundant phytochemical compound in both extracts of *M. charantia* fruits and leaves. On the contrary our findings, they showed that the amount of caffeic acid in unroasted fruits (34.39 ± 0.11 mg kg⁻¹ d.w) and in roasted fruits (46.16 ± 0.31 mg kg⁻¹ d.w) was significantly lower than that of our extract. Also, they were detected neither rutin nor quercetin in their fruit extract. In addition, gallic acid and epicatechin in our extract were relatively more than those found in their fruit extracts and the opposite was true for *p*-coumaric acid and ferulic acid. The amounts of vanillic acid and chlorogenic acid in their fruit extracts were similar to our extract. In another

study, chlorogenic acid, gallic acid, catechin, epicatechin, protocatechuic acid and gentisic acid were found as the main phenolic compounds in the fruit extract of *M. charantia* (Ghaima et al., 2013). In bitter melon (*M. charantia*) fruit extracts with increasing maturation, the contents of gallic acid, chlorogenic acid and catechin were stated to be increase, whereas the contents of ferulic acid, *p*-coumaric acid and caffeic acid were denoted to be reduce (Lee et al., 2017). In a different study, epicatechin was indicated to be a highly accumulated phenolic compound in flowers and fruits of bitter melon, while the highest content in leaves was reported to be rutin (Cuong et al., 2018). These differences in the results may be attributed to the location and harvesting time of the plants, chosen solvent, extraction procedure, analysis method and genetic variability.

Several previous reports demonstrated the phenolic composition of different *Datura* species. Fatima et al. (2015) notified, based on HPLC-DAD quantitative analysis, that catechin and apigenin were prominently detected in the methanol (5.41 and 2.11 µg mg⁻¹ dry weight (DW), respectively) and methanol-chloroform (1.28 and 1.78 mg g⁻¹ DW, respectively) extract among the extracts of *Datura innoxia* leaves.

They also showed that catechin and apigenin were present in the ethanolic extract of *D. innoxia* fruit, and its amounts were 2.65 and 2.46 mg g⁻¹ dry weight (DW), respectively. Rahmoune et al. (2017) announced that *D. stramonium* included five (luteolin, quercetin, trans-caffeic acid, trans-ferulic acid and dihydroferulic acid) phenylpropanoid compounds, whereas *D. innoxia* contained eight (luteolin, quercetin, trans-caffeic acid, trans-ferulic acid, cis-caffeic acid, cis-4-hydroxy-cinnamic acid, trans-4-hydroxy-cinnamic acid and trans-sinapic acid) compounds, and the phenylpropanoids concentration in leaves of both species were emphasized to be notably higher than in the roots. Based on LC-ESI-MS/MS method, the major flavonoids identified in methanol extract of aerial parts of *D. innoxia* from Turkey were reported to be (+)-catechin, (-)-epicatechin and hyperoside (Benabderrahim et al., 2019). According to their study, the phenolic compounds detected in very high concentrations in *D. innoxia* were (+)-catechin and (-)-epicatechin, also the amount of (-)-epicatechin (24147.64 ± 2512.35 µg g⁻¹ of dry plant) was importantly higher than the extract of *D. stramonium* evaluated in the present study. Partap et al. (2019) determined and quantified of chlorogenic acid and caffeic acid from the root and seed parts of *Datura* spp for the first time by HPTLC analysis. The total concentration of phytotoxins (phenolics) in aqueous extract of *D. stramonium* was displayed as 28.96 mg L⁻¹ and these compounds detected by HPLC analysis, among 11 different allelopathic compounds, were shown to be quercetin (0.66 mg L⁻¹), chlorogenic acid (9.44 mg L⁻¹), sinapinic acid (2.03 mg L⁻¹), caffeic acid (6.67 mg L⁻¹) and benzoic acid (10.16 mg L⁻¹) (Raza et al., 2019). As far as we know, the study is the first one to report the contents of phenolic compounds of ethanol extracts of leaves of *D. stramonium* from Edirne Turkey. When all the results are evaluated together, it is clear that the antioxidant capacity and the contents of the phenolic compound may differ depending on plant species, the parts of the plants used, the region where the plants are obtained, and the solvent chosen for extraction.

CONCLUSION

The results of the present work showed that the ethanol extracts of *M. charantia* fruit and *D. stramonium* leaf are a potential natural antioxidant source, and these plants may consider as prominent species in pharmaceutical research, because they contain different phenolic compounds associated with pharmaceutical and medicinal properties. Further studies are needed for the isolation and identification of active phytoconstituents in extracts that might be used for pharmaceutical use.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Burdur Mehmet Akif Ersoy University Scientific and the Technology Application and Research Center for HPLC analysis, and Scientific Research Projects (15/006) of Muğla Sıtkı Koçman University for financial support for HPLC analysis. They would also like to thank Prof. Dr. Hatice Güneş from Muğla Sıtkı Koçman University for her helpful advice throughout the work, and Prof. Dr. Fatma Güneş from Trakya University for providing the plant species. Some of the results given in the present study about ethanol extract of the leaves of *D. stramonium* were presented as a poster at the 3rd International Eurasian Biodiversity Symposium (SEAB-2017) as a summary.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Alam MdN, Bristi NJ, Rafiquzzaman Md 2013. Review on In Vivo and In Vitro Methods Evaluation of Antioxidant Activity. Saudi Pharm J 21(2): 143-152.
- Ally F, Mohanlall, V 2020. An Overview of Tropane Alkaloids from *Datura stramonium* L.. J Pharmacogn Phytochem 9(3): 5-13.
- Alper M, Özay C, Güneş H, Mammadov R 2021. Assessment of Antioxidant and Cytotoxic Activities and Identification of Phenolic Compounds of *Centaurea solstitialis* and *Urospermum picroides* from Turkey. Braz Arch Biol Technol 64: e21190530.
- Alper M 2019. Investigation of Potential Anti-cancer and Anti-inflammatory Effects of *Datura stramonium* Ethanolic Extracts Against Selected Human Cancer Cell Lines. Fresen Environ Bull 28(12): 8993-9003.
- Al-Snafi AE 2017. Medical Importance of *Datura fastuosa* (syn: *Datura metel*) and *Datura stramonium* - A Review. IOSR J Pharm 7(2): 43-58.
- Armendáriz-Barragán B, Zafar N, Badri W, Galindo-Rodríguez SA, Kabbaj D, Fessi H, Elaissari H 2016. Plant Extracts: From Encapsulation to Application. Expert Opin Drug Del 13(8): 1165-1175.
- Benabderrahim MA, Sarikurkcu C, Elfalleh W, Özer MS 2019. *Datura innoxia* and *Dipsacus laciniatus*: Biological Activity and Phenolic Composition. Biocatal Agric Biotechnol 19: 101163.
- Berk S, Tepe B, Arslan S, Sarikurkcu C 2011. Screening of The Antioxidant, Antimicrobial and DNA Damage Protection Potentials of The

- Aqueous Extract of *Asplenium ceterach* DC. Afr J Biotechnol 10(44): 8902-8908.
- Berkov S, Zayed R, Doncheva T 2006. Alkaloid Patterns in Some Varieties of *Datura stramonium*. Fitoterapia 77(3): 179-182.
- Bhardwaj K, Kumar S, Ojha S 2016. Antioxidant Activity and FT-IR Analysis of *Datura innoxia* and *Datura metel* Leaf and Seed Methanolic Extracts. Afr J Tradit Complement Altern Med 13(5): 7-16.
- Cai YZ, Sun M, Xing J, Luo Q, Corke H 2006. Structure-Radical Scavenging Activity Relationships of Phenolic Compounds from Traditional Chinese Medicinal Plants. Life Sci 78(25): 2872-2888.
- Caponio F, Alloggio V, Gomes T 1999. Phenolic Compounds of Virgin Olive Oil: Influence of Paste Preparation Techniques. Food Chem 64(2): 203-209.
- Carocho M, Ferreira ICFR 2013. A Review on Antioxidants, Prooxidants and Related Controversy: Natural and Synthetic Compounds, Screening and Analysis Methodologies and Future Perspectives. Food Chem Toxicol 51: 15-25.
- Ceylan R, Katanić J, Zengin G, Matic S, Aktumsek A, Boroja T, Stanić S, Mihailović V, Guler GO, Boga M, Yilmaz MA 2016. Chemical and Biological Fingerprints of Two Fabaceae Species (*Cytisopsis dorycniifolia* and *Ebenus hirsuta*): Are They Novel Sources of Natural Agents for Pharmaceutical and Food Formulations? Ind Crop Prod 84: 254-262.
- Chen F, Huang G, Yang Z, Hou Y 2019 Antioxidant Activity of *Momordica charantia* Polysaccharide and Its Derivatives. Int J Biol Macromol 138: 673-680.
- Choi JS, Kim HY, Seo WT, Lee JH, Cho KM 2012. Roasting Enhances Antioxidant Effect of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) Increasing Inflavan-3-ol and Phenolic Acid Contents. Food Sci Biotechnol 21(1): 19-26.
- Cuong DM, Kwon SJ, Jeon J, Park YJ, Park JS, Park SU 2018. Identification and Characterization of Phenylpropanoid Biosynthetic Genes and Their Accumulation in Bitter Melon (*Momordica charantia*). Molecules 23(2): 469.
- Dai J, Mumper RJ 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. Molecules 15(10): 7313-7352.
- Dastmalchi N, Baradaran B, Latifi-Navid S, Safaralizadeh R, Khojasteh SMB, Amini M, Roshani E, Lotfinejad P 2020. Antioxidants with Two Faces toward Cancer. Life Sci 258: 118186.
- El-Hawary SS, El-Hefnawy HM, Osman SM, El-Raey MA, Mokhtar Ali FA 2019. Phenolic Profiling of Different *Jasminum* Species Cultivated in Egypt and Their Antioxidant Activity. Nat Prod Res 14: 1-6.
- El Bazaoui A, Bellimam, MA, Soulaymani A 2011. Nine New Tropane Alkaloids from *Datura stramonium* L. Identified by GC/M. Fitoterapia 82(2): 193-197.
- Fatima H, Khan K, Zia M, Ur-Rehman T, Mirza B, Haqi IU 2015. Extraction Optimization of Medicinally Important Metabolites from *Datura innoxia* Mill.: An In Vitro Biological and Phytochemical Investigation. BMC Complement Altern Med 15: 376.
- Fuchs-Tarlovsky V 2013. Role of Antioxidants in Cancer Therapy. Nutrition 29(1): 15-21.
- Ghaima KK, Nader MI, Taqi RA, Ghraibit SA 2013. Extraction and Identification of Phenol Compounds from Bitter Melon *Momordica charantia* Fruits and Their Role as Antioxidants. J Biotech Res Cent 7(1): 41-47.
- Güneş H, Alper M, Çelikoğlu N 2019. Anticancer Effect of The Fruit and Seed Extracts of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) on Human Cancer Cell Lines. Trop J Pharm Res 18(10): 2057-2065.
- Horax R, Hettiarachchy N, Chen P 2010. Extraction, Quantification, and Antioxidant Activities of Phenolics from Pericarp and Seeds of Bitter Melons (*Momordica charantia*) Harvested at Three Maturity Stages (Immature, Mature, and Ripe). J Agric Food Chem 58(7): 4428-4433.
- Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R 2011. A Review of The Antioxidant Potential of Medicinal Plant Species. Food Bioprod Process 89: 217-233.
- Kubola J, Siriamornpun S 2008. Phenolic Contents and Antioxidant Activities of Bitter Gourd (*Momordica charantia* L.) Leaf, Stem and Fruit Fraction Extracts In Vitro. Food Chem 110: 881-890.
- Lee SH, Jeong YS, Song J, Hwang KA, Noh GM, Hwang IG 2017. Phenolic Acid, Carotenoid Composition, and Antioxidant Activity of Bitter Melon (*Momordica charantia* L.) at Different Maturation Stages. Int J Food Prop 20: sup3, S3078-S3087.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N 2010. Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health. Phcog Rev 4: 118-126.
- López-Alarcón C, Denicola A 2013. Evaluating The Antioxidant Capacity of Natural Products: A Review on Chemical and Cellular-Based Assays. Anal Chim Acta 763: 1-10.
- Masek A, Chrzescijanska E, Latos M 2016. Determination of Antioxidant Activity of Caffeic Acid and *p*-Coumaric Acid by Using Electrochemical and Spectrophotometric Assays. Int J Electrochem Sci 11: 10644-10658.
- Ozay C, Mammadov R 2016. Assessment of Some Biological Activities of *Alyssum* L. Known as Madwort. Acta Pol Pharm 73(5): 1213-1220.
- Ozusaglam MA, Karakoca K 2013. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Momordica charantia* from Turkey. Afr J Biotechnol 12: 1548-1558.

- Öz Arık U 2017. The Antifungal Effects of *Datura stramonium* L., *D. metel* L., *D. innoxia* Mill. in Flora of Turkey. *Mugla J Sci Technol* 3(2): 96-103.
- Padmashree A, Sharma GK, Semwal AD, Bawa AS 2010. Studies on Antioxygenic Activity of Bitter Gourd (*Momordica charantia*) and Its Fractions Using Various In Vitro Models. *J Sci Food Agric* 91: 776-782.
- Partap M, Gupta RC, Pradhan SK 2019. Comparative Analysis of Morphology and Phytochemical Constituents in Different Populations and Morphotypes of *Datura innoxia* Mill. and *Datura metel* L. from Punjab Plains. *Asian J Pharm Clin Res* 12(1): 193-199.
- Rahmoune B, Zerrouk IZ, Morsli A, Slaoui MK, Khelifi L, Do Amarante L 2017. Phenylpropanoids and Fatty Acids Levels in Roots and Leaves of *Datura stramonium* and *Datura innoxia*. *Int J Pharm Pharm Sci* 9(7): 150-154.
- Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki I 2014. Antioxidants and Human Diseases. *Clin Chim Acta* 436: 332-347.
- Raza A, Kamran M, Safdar ME, Ali HH, Abbas T, Asif M, Ali L, Rehman A 2019. Management Tactics for The Handling of *Parthenium hysterophorus* L. in Non-Native Environment Through Phytotoxic Compounds of Local Species. *Int J Agric Biol* 21(1): 215-222.
- Singh LR, Singh OM 2013. *Datura stramonium*: An Overview of Its Phytochemistry and Pharmacognosy. *Res J Pharmacogn Phytochem* 5(3): 143-148.
- Soni P, Siddiqui AA, Dwivedi J, Soni V 2012. Pharmacological Properties of *Datura stramonium* L. as A Potential Medicinal Tree: An Overview. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(12): 1002-1008.
- SPSS 2013. IBM SPSS Statistics 22.0 for Windows. Armonk, NY
- Sreenivasa S, Vinay K, Mohan NR 2012. Phytochemical Analysis, Antibacterial and Antioxidant Activity of Leaf Extract of *Datura stramonium*. *Int J Sci Res* 1(2): 83-86.
- Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A 2018. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. *Medicines* 5(93): 1-16.
- Verma N, Shukla S 2015. Impact of Various Factors Responsible for Fluctuation in Plant Secondary Metabolites. *J Appl Res Med Aromat Plants* 2(4): 105-113.
- Villarreal-La Torre VE, Sagástegui Guarniz W, Silva-Correa C, Cruzado-Razco L, Siche R 2020. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of *Momordica Charantia*: A Review. *Pharmacog J* 12(1): 213-22.
- Wu SJ, Ng LT 2008. Antioxidant and Free Radical Scavenging Activities of Wild Bitter Melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. *LWT-Food Sci Technol* 41: 323-330.
- Zengin G, Aktumsek A 2014. Investigation of Antioxidant Potentials of Solvent Extracts from Different Anatomical Parts of Asphodeline anatolica E. Tuzlaci: An Endemic Plant to Turkey. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 11(2): 481-488.
- Zengin G, Nithiyantham S, Locatelli, M, Ceylan R, Uysal S, Aktumsek A, Selvi PK, Maskovic P 2016. Screening of *In Vitro* Antioxidant and enzyme Inhibitory Activities of Different Extracts from Two Uninvestigated Wild Plants: *Centranthus longiflorus* subsp. *longiflorus* and *Cerintho minor* subsp. *auriculata*. *Eur J Integr Med* 8(3): 286-292.

Determination of Antioxidant Activity of Different Extracts From Bark of *Pinus* spp. grown in Giresun (Turkey) Province – Phenolic analysis by RP-HPLC-DAD

Ayça Aktaş KARAÇELİK¹, Mehmet Emin ŞEKER^{2*}, Mustafa KARAKÖSE³,

¹Department of Food Processing, Giresun University, Giresun, Turkey, ^{2,3}Department of Medicinal and Aromatic Plants, Giresun University, Giresun, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0001-5381-2924>, ²<https://orcid.org/0000-0003-4463-6898>, ³<https://orcid.org/0000-0003-0534-3996>,

✉: mehmetemin_seker@hotmail.com

ABSTRACT

This study aimed to investigate the phenolic compounds, total phenolic content, and antioxidant activities of *Pinus sylvestris* L. var *hamata* Steven, *Pinus pinaster* Aiton subsp. *pinaster*, and *Pinus pinea* L. bark extracts prepared with hot water. The phenolic composition and total phenolic content (TPC) of extracts were determined by Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (RP-HPLC-DAD) and Folin-Ciocalteu method, respectively. The antioxidant activity was determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) radical scavenging and ferric ion (III) reducing / antioxidant power (FRAP) assays. Besides, the highest total phenolic content was detected in *P. pinea* bark extract [984.46±4.08 µg mL⁻¹ gallic acid equivalent (GAE) and 1163.33±4.04 µg mL⁻¹ catechin equivalent (CE)] and the lowest result was detected in *P. sylvestris* bark extract (361.53±3.52 µg mL⁻¹ GAE and 427.26±4.17 µg mL⁻¹ CE). Among the tested materials, the most abundant phenolic compounds in *P. pinea* bark extract were catechin (3.586±0.114 mg g⁻¹) and taxifolin (1.866±0.096 mg g⁻¹). According to the antioxidant results, *P. pinea* bark extract exhibited remarkable antioxidant activity than standard BHT and Trolox [SC₅₀: 1.64310±0.00003 µg mL⁻¹ for DPPH and 1428.75±5.62 µM Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) for FRAP]. The obtained results indicated that pine bark extracts can be used as an easily obtainable natural source of antioxidants for the food and pharmaceutical industry.

Research Article

Article History

Received : 06.02.2021
Accepted : 29.04.2021

Keywords

Pine bark
Antioxidant activity
Phenolic compounds
RP-HPLC-DAD
Total phenolic content

Giresun (Türkiye) İlinde Yetiştirilen *Pinus* spp.'nin Kabuğundan Elde Edilen Farklı Ekstraktların Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi – RP-HPLC-DAD ile Fenolik Analizi

ÖZET

Bu çalışmada, sıcak su ile hazırlanan *Pinus sylvestris* L. var *hamata* Steven, *Pinus pinaster* Aiton subsp. *pinaster* ve *Pinus pinea* L. kabuk ekstraktlarının fenolik bileşikleri, toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Ekstraktların fenolik bileşimi ve toplam fenolik içeriği sırasıyla Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi-Diyot Array Dedektörü (RP-HPLC-DAD) ve Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlendi. Antioksidan aktivite, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikal temizleme ve demir (III) indirgeme / antioksidan kuvvet (FRAP) metotları ile belirlendi. Numuneler arasında en yüksek toplam fenolik içerik *P. pinea* kabuk ekstraktında [984.46±4.08 µg mL⁻¹ gallik asit eşdeğeri (GAE) ve 1163.33±4.04 µg mL⁻¹ kateşin eşdeğeri (CE)] ve en düşük sonuç *P. sylvestris* kabuk ekstraktında tespit edilmiştir (361.53±3.52 µg mL⁻¹ GAE ve 427.26±4.17 µg mL⁻¹ CE). *P. pinea* kabuk ekstraktlarında en bol bulunan fenolik bileşikler kateşin (3.586±0.114 mg g⁻¹) ve taksifolindir (1.866±0.096 mg g⁻¹). Antioksidan sonuçlarına göre, *P. pinea* kabuk ekstraktı standart BHT ve Trolox'a göre kayda değer antioksidan aktivite gösterdi [SC₅₀: DPPH için 1.64310±0.00003 µg mL⁻¹ ve FRAP için

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 06.02.2021
Kabul Tarihi : 29.04.2021

Anahtar Kelimeler

Çam kabuğu
Antioksidan aktivite
Fenolik bileşikler
RP-HPLC-DAD
Toplam fenolik içerik

1428.75±5.62 µM Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite (TEAC)]. Elde edilen sonuçlar, çam kabuğu ekstraktlarının gıda ve ilaç endüstrisi için kolayca elde edilebilen doğal bir antioksidan kaynağı olarak kullanılabileceğini gösterdi.

To Cite: Karaçelik AA, Şeker ME, Karaköse M 2022. Determination of Antioxidant Activity of Different Extracts From Bark of *Pinus* spp. grown in Giresun (Turkey) Province – Phenolic analysis by RP-HPLC-DAD. KSU J. Agric Nat 25 (1): 10-18. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.875313>.

INTRODUCTION

Secondary metabolites with important functions for plants consist of many important biochemicals such as phenolic compounds, flavonoids, terpenes, and carotenoids (Gülçin, 2012; Tohma et al., 2017; Gülçin, 2020). In recent years, many studies have been conducted to obtain extracts rich in secondary metabolites and to discover their natural antioxidant properties. These products, which show different bioactivity due to their different chemical structures, have increased the interest in different industries such as medicine, cosmetics, dyes, textiles, food, and pharmaceuticals. The vast majority of plants, which are considered natural resources, are distributed in forest areas. Turkey is one of the world's most important and richest centers of plant sources, due to the presence at the junction of three different flora in terms of plant geography, geographic location, topography, water sources, the microclimate of diversity, geological structure (Avcı, 2005). This potential has enabled the local people to benefit from herbal resources in various ways from past to present. Turkey's forest area is in a rising trend from the past to the present. According to the latest data (Terzioğlu et al., 2012), Turkey has 22.6 million hectares of forest areas, and this area covers 28.6% of its land. Turkey forests, spatially 48% of pure coniferous, 33% of pure broadleaf, while the remaining portion is mixed coniferous-broadleaf forest structure. In a pine tree, while the amount of average bark ranges from 8-14% (Harkin and Rowe, 1971; Öktem, 1976), the average bark ratio of the pine species in Turkey is defined as 12.5% (Kurt and Mengeloğlu, 2006). Thus, the average is about 1,250,000 m³ of bark left in the forest as waste material each year in Turkey. However, many studies have reported that forestry residues, especially the bark, are a rich source of secondary metabolites containing biologically active compounds (Kızıllarslan and Sevgi, 2013; Çakır, 2017). In addition, pine bark extracts contain a large number of phenolic compounds such as catechins, epicatechins, taxifolin, and phenolic acids (Drózd and Pyrzyńska, 2019; Hamad et al., 2019). The effect of pine bark extract comes from these components (D'Andrea, 2010). A group of active substances found in French maritime bark (*Pinus pinaster* Aiton subsp. *pinaster*) is called Pycnogenol and is also a trademark. It is stated that pine bark extract is good for many diseases such as cough, pertussis (Güzel et al., 2015), asthma (Özüdoğru et al., 2011),

tuberculosis (Sezik et al., 1997), milk enhancer, tuberculosis, urinary tract diseases, hemorrhoids, memory weakness, wound healing, strengthening, painkillers (Everest and Öztürk, 2005) and used in treatments (Maimoona et al., 2011; Taner et al., 2014). *Pinus*, a member of Pinaceae, has three pine species grown naturally (*Pinus sylvestris* L. var. *hamata* Steven) and artificially grown (*Pinus pinea* L. and *Pinus pinaster* Aiton subsp. *pinaster*) in Giresun province in Turkey. Phenolic content and antioxidant activity of various extracts of the genus of *Pinus* members have been previously reported by a number of researchers (Yeşil-Çeliktaş et al., 2009a; Hamad et al., 2019; Skrypnik et al., 2019). However, there are very few studies in the literature about the *Pinus* species grown in northern Turkey. As is known, chemical compositions and antioxidant activities depend on many factors such as geographical region, climatic, experimental conditions, and diversity. In this respect, the aim of the study is to identify new natural antioxidant extracts or compounds. In line with this goal, phenolic composition analysis barks of three pine species (*Pinus sylvestris* L. var. *hamata* Steven, *Pinus pinaster* Aiton subsp. *pinaster*, and *Pinus pinea* L.) were quantified by Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (RP-HPLC-DAD). In order to investigate *in vitro* antioxidant activities of these samples, ferric ion (III) reducing / antioxidant power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) tests were applied. Also, total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu method.

MATERIALS and METHOD

Reagents and chemicals

Catechin, epicatechin, taxifolin, gallic acid, vanillin, vanillic acid, ferulic acid, caffeic acid, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, and ellagic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Solvents in analytical purity of methanol, acetonitrile, ethyl acetate, chloroform, and acetic acid were purchased from Merck. Sodium sulfate and sodium chloride were obtained from Merck (Darmstadt, Germany). DPPH, 2,4,6-Tripyridyl-s-triazine (TPTZ), Folin-Ciocalteu reagent phenol, and Trolox® (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were purchased from Sigma Aldrich (Munich, Germany). HPLC syringe filters (polyvinylidene difluoride, 0.45 µm) were purchased from ISOLAB

(Germany). The ultrapure deionized water used in the experiments was obtained from the Sartorius ultrapure water purification system.

Analysis of phenolic compounds by Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector (RP-HPLC-DAD).

Stock solutions of the phenolic standards (1000 ppm) were prepared in 40% methanol-ultra pure water or %100 methanol, depending on their solubility. Analysis of phenolic compounds was performed by Thermo Scientific Dionex Ultimate™ 3000 system (Thermo Scientific, Bremen, Germany) using a reversed-phase C₁₈ column (150 mm x4.6 mm, 5µ; Fortis). The mobile phase consists of A: 2% acetic acid-ultrapure water, C: 50-50% acetonitrile-ultrapure water solution in 0.5% acetic acid, and D: acetonitrile. For the separation of phenolic

compounds, gradient elution with a flow rate of 0.7 mL/min was applied as followed: 0-8 min (7% C), 8-18 min (12% C), 18-23 min (23% C), 23-25 min (40% before returning to the initial conditions C), 25-35 min (45% C), 35-40 min (55% C), 40-43 min (92% C), 43-46 min (25% C). The column temperature was set to 25 °C and the injection volume was adjusted to 20 µL. Standards of eleven phenolic compounds (catechin, epicatechin, taxifolin, gallic acid, vanillin, vanillic acid, ferulic acid, caffeic acid, protocatechuic acid, protocatechuic aldehyde, and ellagic acid) were detected at four different wavelengths (260, 280, 308, 324 nm) comparatively. The wavelengths determined in the DAD were selected based on the wavelength of maximum absorption of phenolic standards in the literature. The Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) were calculated for the phenolic compounds in the extracts (Table 1).

Table 1. Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector validation parameters
 Çizelge 1. Ters Faz-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diyot Array Dedektörü doğrulama parametreleri

| No | Compound | RT (min.) | m ^a | R ² | LOD ^b | LOQ ^b |
|----|-------------------------|-----------|----------------|----------------|------------------|------------------|
| 1 | Gallic acid | 7.15 | 1.0597 | 0.9973 | 0.0417 | 0.1004 |
| 2 | Protocatechuic acid | 13.04 | 2.0259 | 0.9965 | 0.0105 | 0.0327 |
| 3 | Protocatechuic aldehyde | 19.20 | 0.6452 | 0.9961 | 0.1140 | 0.3031 |
| 4 | Catechin | 22.17 | 4.6834 | 0.9974 | 0.0032 | 0.0089 |
| 5 | Vanillic acid | 24.87 | 1.5219 | 0.9964 | 0.0137 | 0.0487 |
| 6 | Caffeic acid | 25.58 | 1.0534 | 0.9993 | 0.0542 | 0.1312 |
| 7 | Epicatechin | 27.82 | 4.2632 | 0.9971 | 0.0030 | 0.0091 |
| 8 | Vanillin | 30.03 | 0.8083 | 0.9964 | 0.0762 | 0.2257 |
| 9 | Ellagic acid | 31.75 | 0.3390 | 0.9968 | 0.1142 | 0.3445 |
| 10 | Taxifolin | 32.94 | 0.8500 | 0.9999 | 0.2035 | 0.6334 |
| 11 | Ferulic acid | 33.51 | 1.1052 | 0.9947 | 0.0297 | 0.0917 |

a, b: values are given in mg L⁻¹.

Sample preparation and extraction

Analyzed pine barks (*P. pinea*, *P. sylvestris*, and *P. pinaster*) were collected from harvesting areas in the Giresun province in Turkey. The identification of the gathered plant samples was done by Dr. Mustafa KARAKÖSE. Information on *Pinus* species is given in Table 2. Each pine bark was ground separately and pulverized. The powdered sample 10 g was extracted in 150 mL of boiling water for 15 minutes. It was then left to cool to room temperature. The extract was centrifuged, and the liquid fraction was separated. Solid sodium chloride was added to the red-brown

solution until saturation and high molecular weight molecules were allowed to precipitate (Masquelier, 1987). The solution was filtered to remove the precipitate. The remaining solution was extracted 3 times with 25 mL of ethyl acetate. The water and ethyl acetate phases were separated, and residual water was removed by the addition of sodium sulfate. Unlike Masquelier's method, the ethyl acetate phase was completely evaporated at 40 °C using a rotary evaporator. The resulting beige-colored solid was dissolved in a 25% (v/v) methanol/water mixture and injected into the RP-HPLC-DAD system.

Table 2. Locations, common names and collector numbers of the plant specimens

Çizelge 2. Bitki örneklerinin toplanma alanları, yaygın isimleri ve toplayıcı numaraları

| Taxon name | Common name | Location | Collector no |
|--|---------------|--|------------------|
| <i>Pinus pinaster</i> Aiton subsp. <i>pinaster</i> | Maritime pine | 4 m, Espiye district, dune afforestation area, 23.VI.2015. | M. Karaköse 1471 |
| <i>Pinus pinea</i> L. | Stone pine | 5 m, Espiye district, dune afforestation area, 23.VI.2015. | M. Karaköse 1472 |
| <i>Pinus sylvestris</i> L. var. <i>hamata</i> Steven | Scots pine | 1754 m, Alucra district, <i>Pinus sylvestris</i> forest, 23.VI.2015. | M. Karaköse 1470 |

Determination of total phenolic content by Folin-Ciocalteu method

The pine bark extracts were evaluated in terms of

total phenolic compounds by using the Slinkard and Singleton method with some modifications (Slinkard and Singleton, 1977). All samples were prepared by

diluting (1:4) the stock solution. A sample solution of 50 µL was diluted with 2500 µL of distilled water. The sample was mixed with 250 µL of 0.2 normal Folin–Ciocalteu reagent by vortexing for three minutes. Then 750 µL sodium carbonate (7.5%) was added into the solution and vortexed again. After incubation for 2 h at room temperature, the absorbance of samples was measured at 765 nm. Each sample and standard concentration were studied in three parallel runs. In addition, sample and reagent blank were studied for each sample and each concentration of the standard. Total phenolic contents were expressed as µg gallic acid or catechin equivalent per mL sample using calibration graph plotted separately in the concentration range of 15.6 to 1000 µg mL⁻¹ of gallic acid and catechin standards.

Ferric reducing antioxidant power assay

The FRAP method is based on the measurement of the absorbance given by the TPTZ-Fe (II) complex developed later (Benzie and Strain, 1996; Karaçelik et al., 2015). The activities of all samples were defined as micromolar Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC). The calibration graph was constructed by using Trolox at a concentration range of 62.5-1000 µM. All samples were diluted from the concentrated solution (1:50). Briefly, 50 µL of the sample was mixed with a 1.5 mL FRAP reagent. The FRAP solution was prepared according to the method defined by Karaçelik et al. (2015). The mixtures were incubated at 24 °C for 20 min and measured spectrophotometrically at 595 nm.

2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity

Radical scavenging activity was tested according to the method defined by Brand-Williams et al. (1995). The working interval was determined by pretesting

all samples and standards (Trolox and BHT) prepared in different concentrations. Firstly, samples were mixed with an equal volume (750 µL) of 100 µM methanolic DPPH solution by vortexing and then they were incubated for 50 min at 24 °C. The maximum absorbances that DPPH gave were recorded at 517 nm. According to the SC₅₀ values given as mg mL⁻¹, high radical scavenging potential is seen at a low SC₅₀ value (Gülçin, 2006b; a; Ak and Gülçin, 2008).

RESULTS and DISCUSSION

Identification and quantification analysis of phenolic compounds by RP-HPLC-DAD

Previously some phenolic compounds in the bark of the pine species in Turkey were examined (İnce et al., 2009; Yeşil-Çeliktaş et al., 2009a; Yeşil-Çeliktaş et al., 2009b). However, these studies are very limited and local. Previously phenolic content of *P. pinaster* in Turkey has not been determined. There are also few studies on the phenolic content of other pine bark species (Kıvrak et al., 2013; Şeker et al., 2021). Normal phase and reverse phase liquid chromatographic methods were used in studies with pine bark.

Eleven phenolic compounds were analyzed in three different pine bark extracts with the RP-HPLC-DAD method. The chromatograms of three pine bark extracts are given in Figure 1. Catechin, protocatechuic acid, and taxifolin were found in three pine barks. Ferulic acid, gallic acid, and ellagic acid were not detected in any pine bark. Quantitative results of phenolic constituents in pine barks are given in Table 3. Among the highest amounts, catechin and taxifolin (3.586 and 1.866 mg g⁻¹) in *P. pinea* and catechin in *P. pinaster* (1.231 mg g⁻¹) are noteworthy. Separation of all phenolic compounds was completed within 33 minutes.

Table 3. Quantitative results of phenolic compounds in pine barks

Çizelge 3. Çam kabuklarındaki fenolik bileşiklerin kantitatif sonuçları

| Phenolics | mg g ⁻¹ | | |
|-------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| | <i>P. pinea</i> | <i>P. sylvestris</i> | <i>P. pinaster</i> |
| Catechin | 3.586±0.114 | 0.681±0.008 | 1.231±0.078 |
| Epicatechin | 0.022±0.001 | n.d. | 0.011±0.001 |
| Protocatechuic acid | 0.041±0.001 | 0.271±0.010 | 0.138±0.005 |
| Protocatechuic aldehyde | n.d. | 0.030±0.001 | n.d. |
| Vanillic acid | n.d. | 0.018±0.001 | 0.010±0.001 |
| Vanillin | n.d. | 0.024±0.001 | n.d. |
| Caffeic acid | 0.104±0.006 | n.d. | n.d. |
| Taxifolin | 1.866±0.096 | 0.500±0.006 | 0.360±0.004 |
| Ferulic acid | n.d. | n.d. | n.d. |
| Gallic acid | n.d. | n.d. | n.d. |
| Ellagic acid | n.d. | n.d. | n.d. |

n.d.: not detected.

Data are represented as means ±SD (standard deviation) of triple measurements.

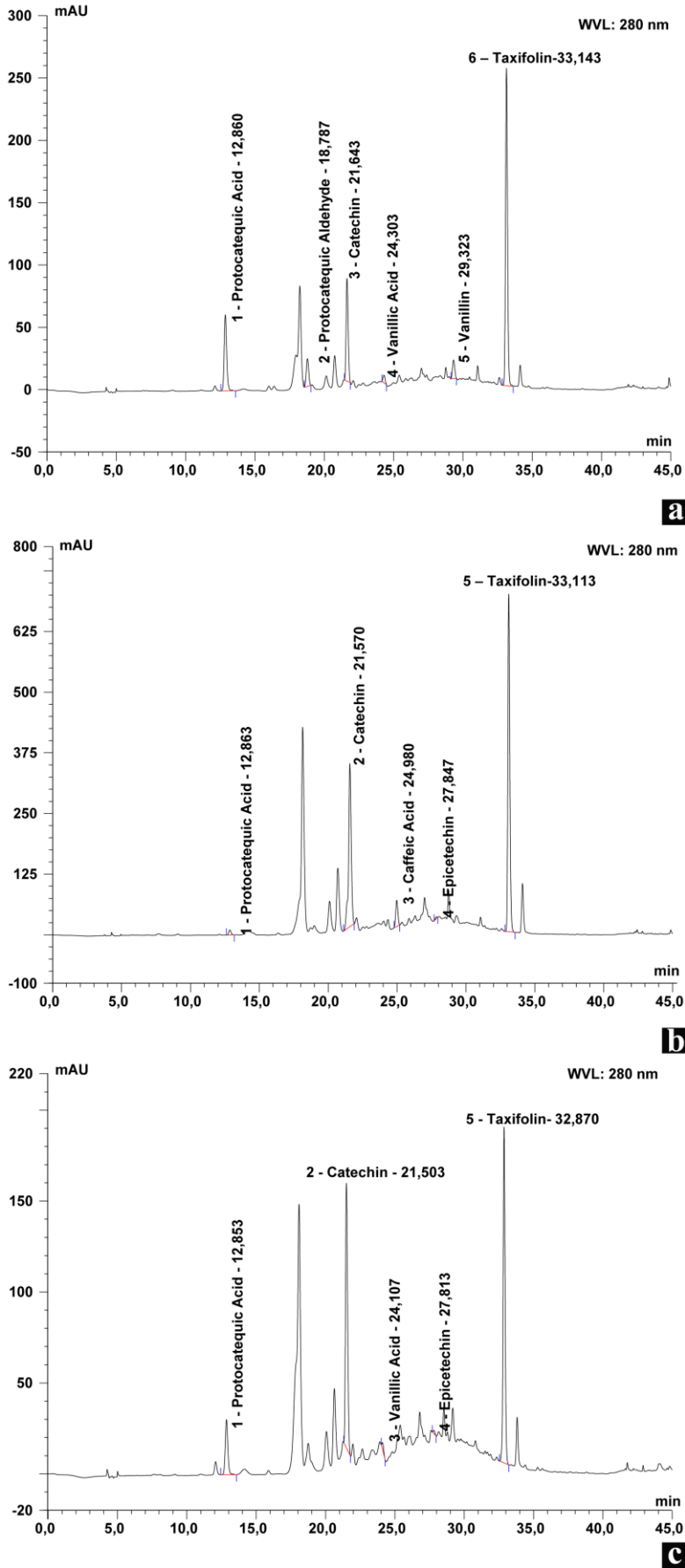


Figure 1. Chromatograms of (a) *P. sylvestris*, (b) *P. pinea*, and (c) *P. pinaster*
Şekil 1. (a) *P. sylvestris*, (b) *P. pinea* ve (c) *P. pinaster*'in kromatogramları

While the amount of catechin in *P. pinaster*, known as the French maritime bark, was found to be 7.92 mg g⁻¹ (İnce et al., 2009), the amount of taxifolin ranged between 17-33 mg g⁻¹ (İnce et al., 2009; Yeşil-Çeliktaş et al., 2009a). However, the amount of catechin and taxifolin in *P. pinaster* analyzed in the study was found to be far below these rates. This is probably because the tree does not grow in the area where it grows normally. Although these rates are quite low in *P. pinaster* obtained from the Espiye district, the amount of catechin in *P. pinea* is close to that in French *P. pinaster*. While the results given in the literature are the amount of gram phenolic per gram extract, it should be noted that the results given in Table 3 are the gram phenolic amount per gram pine bark. When evaluated in this way, it will be better understood that the amount of catechin in *P. pinea* is quite high. When compared with *P. pinea* and other *Pinus* species analyzed in other studies in the literature, the amount of catechin obtained from *P. pinea* barks collected from Espiye is quite high. Especially taxifolin appears to be 13.36 times higher than the values that were found in a study conducted by Yeşil-Çeliktaş et al. (2009b). In addition, the amount of taxifolin found in *P. sylvestris* collected from the Alucra region is also ten times higher when the other studies were examined. Compared to the same research, the catechin values obtained from *P. sylvestris* in Alucra are higher than the catechin values for *P. sylvestris* collected from Germany. However, compared to French maritime pine (*P. pinaster*), the values obtained from the analysis are about fifty times lower, especially for epicatechin and taxifolin (İnce et al., 2009). When compared to *P. pinea*, which was collected from Bilecik and analyzed, although the amount of taxifolin in the *P. pinea* in Espiye was almost the same, the amount of catechin was found approximately twice. In both studies, the results are given as gram phenolic per gram pine bark (Şeker et al., 2021). When compared with *P. sylvestris* analyzed in the same study, the catechin and taxifolin contents of *P. sylvestris* collected from the Alucra region were found to be quite high.

On the other hand, the remarkable result is that protocatechuic acid was found in all three types. Unlike our benchmarking studies, protocatechuic acid was analyzed for the first time in pine barks. Also, caffeic acid was found in *P. pinea*. Catechin and taxifolin, which are found in high amounts in pine bark compared to others, are important compounds for human health. In experiments, it has been observed that taxifolin prevents enzyme increases due to inflammatory reactions similar to hydrocortisone (Gupta et al., 1971). In addition, taxifolin is recommended for the development of new drugs, as it has anti-tumors, anti-oxidants, anti-cardiovascular,

and, more importantly, anti-cancer effects (Sunil and Xu, 2019). Likewise, anti-carcinogenic and antioxidant effects of catechin are known (Lotito and Fraga, 1998; Menon et al., 1999). As can be seen from the results obtained, pine bark is a rich source of catechin and taxifolin.

In addition, both normal phase and reversed-phase HPLC methods are used for pine bark analysis in the literature. Although it is stated that reverse phase analysis is more complicated and very successful chromatograms were obtained with the reverse phase method. For extraction, the boiling water method, which does not harm the environment, was used. Thus, only water-soluble species were obtained. Then they were easily taken to the ethyl acetate phase and the ethyl acetate phase was evaporated at 50°C. The remaining solid portion was easily dissolved in 25% methanol solution and injected into the device. Considering the studies made with pine bark in the literature, it is seen that the ratio of the same phenolic components found in the bark of the same type of pine can vary between 10 and 100 times. These rates vary according to the environment in which the tree grows.

Determination of total phenolic contents

In this study, the total phenolic contents of extracts were determined by Folin–Ciocalteu method. Total phenolic content results were given in Table 4. The total phenolic content results were presented as µg gallic acid equivalent per mL sample (GAE, µg mL⁻¹) and µg catechin equivalent per mL sample (CE, µg mL⁻¹). The total amounts of phenolic contents ranged from 361.53±3.52 to 984.46±4.08 µg mL⁻¹ in terms of GAE and ranged from 427.26±4.17 to 1163.33±4.04 µg mL⁻¹ in terms of CE. The order of total phenolic contents of pine bark extracts was *P. pinea* > *P. pinaster* > *P. sylvestris*. Hamad et al. (2019) reported that the phenolic contents were about 88 µg mL⁻¹ GAE for pine bark (*P. sylvestris*) extracts prepared by using a methanol-water mixture as solvent (Hamad et al., 2019). Skrypnik et al. (2019) prepared water extract by using whole bark and outer bark of *P. sylvestris* L. and found the total phenolic contents of extract between 4 mg GAE g⁻¹ and 12 mg GAE g⁻¹ (Skrypnik et al., 2019).

Antioxidant activity

Many antioxidant assays based on the methodological differences have been used for screening antioxidant activities of plant extracts in the literature. FRAP and DPPH• radical scavenging activities were used to test the antioxidant activities of pine bark extracts. The results of the DPPH• assay were expressed as SC₅₀ (Table 4) means the effective concentration of test samples required for 50% antioxidant activity

under the experimental conditions. Lower SC₅₀ values indicated higher radical scavenging activity. *P. pinea* bark extract showed higher values than the other two pine barks. *P. pinea* bark extract demonstrated the higher DPPH• radical scavenging activities (SC₅₀: 1.64310±0.00003 µg mL⁻¹), while *P. sylvestris* bark extract exhibited the lowest antioxidant activities (SC₅₀: 6.04765±0.09043 µg mL⁻¹). It was found that the DPPH scavenging activities of all pine bark extracts were higher than BHT standard antioxidant. In addition, the DPPH• scavenging activities of *P. pinea* and *P. pinaster* bark extracts were found to be higher than BHT and Trolox standard antioxidants. To compare study results with literature, the DPPH• scavenging activity of the extracts was also evaluated as %scavenging of DPPH• at 0.00300 mg mL⁻¹ [*P. pinea* (91,7 %), *P. pinaster* (70,4 %), *P. sylvestris* (27,0 %)]. Results obtained are higher than those achieved in many studies (Yeşil-Çeliktaş et al., 2009a; Skrypnik et al., 2019).

The higher TEAC values in the FRAP test indicate higher antioxidant activity (Table 4). The results of three pine bark extracts were ranged from 549.37±8.59 to 1428.75±5.62 µM TEAC. While the highest FRAP value of pine bark extracts was found in *P. pinea* bark extract (1428.75±5.62 µM TEAC), the lowest value was in *P. sylvestris* bark extract (549.37±8.59 µM TEAC). According to all antioxidant

assays, all extracts exhibited an antioxidant activity with the order of activity as *P. pinea* > *P. pinaster* > *P. sylvestris*. The extract of *P. pinea* bark showed strong DPPH• radical scavenging and FRAP activities possessing a high amount of total phenolic compounds was identified. It was also found that there was a good positive correlation between SC₅₀ values of DPPH• radical scavenging and TEAC values (R²: 0.9951).

In recent years, the number of publications for the qualitative and quantitative determination of biological activity potentials and active compounds of extracts obtained from forest residues has increased. In literature, there have been few studies on the biological activity research on the *P. pinea*, *P. pinaster*, and *P. sylvestris* bark extracts. *P. pinaster* and *P. sylvestris* bark extracts prepared with polar solvents such as ethanol or aqueous mixtures containing ethanol were found to have the highest phenolic compound contents and the highest antioxidant activity (Drózd and Pyszynska, 2019; Skrypnik et al., 2019; Ferreira-Santos et al., 2020). The correlation coefficient between the results of the phenolic content and antioxidant assays (DPPH and FRAP) showed a good positive correlation with R² values of 0.9624 and 0.9844. These findings suggested that high antioxidant activity might be due to high phenolic contents.

Table 4. Antioxidant activity and total phenolic content of pine bark extracts and standards

Çizelge 4. Çam kabuğu ekstraktlarının ve standartların antioksidan aktivite ve toplam fenolik içeriği

| Sample and standards | Total phenolic content (GAE, µg mL ⁻¹) | Total phenolic content (CE, µg mL ⁻¹) | DPPH radical scavenging (SC ₅₀ , µg mL ⁻¹) | FRAP (TEAC, µM) |
|----------------------|--|---|---|-----------------|
| <i>P. pinea</i> | 984.46±4.08 | 1163.33±4.04 | 1.64310±0.00003 | 1428.75±5.62 |
| <i>P. sylvestris</i> | 361.53±3.52 | 427.26±4.17 | 6.04765±0.09043 | 549.37±8.59 |
| <i>P. pinaster</i> | 816.92±2.31 | 965.45±2.73 | 1.83300±0.01108 | 1279.68±3.97 |
| BHT | n.d. | n.d. | 8.52667±0.01528 | n.d. |
| Trolox | n.d. | n.d. | 5.04667±0.00577 | n.d. |

n.d.: not detected.

Data are represented as means ±SD (standard deviation) of triple measurements.

CONCLUSION

This is the first study to evaluate phenolic content of barks of pine grown in Giresun. In the study, the standard extraction method was cut short and chemical and time savings were achieved. According to the results of RP-HPLC-DAD system some of the high peaks in the chromatograms were not identified. Therefore, identification of these peaks can be identified in further studies. The results of this study will provide information to the literature about the content of pine bark. It may also form the basis for further research on alternative medical practices regarding the compounds it contains.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Ak T, Gülçin İ 2008. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem-Biol Interact* 174: 27–37.
- Avcı M 2005. Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü. *Coğrafya Dergisi* 27–55.
- Benzie IF, Strain JJ 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 70–76.
- Brand-Williams W, Cuvelier M-E, Berset C 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci Technol* 28: 25–30.

- Çakır EA 2017. A comprehensive review on ethnomedicinal utilization of gymnosperms in Turkey. *Eurasian J Forest Sci* 5: 35–47.
- D'Andrea G 2010. Pycnogenol: a blend of procyanidins with multifaceted therapeutic applications? *Fitoterapia* 81: 724–736.
- Drózd P, Pyrzyńska K 2019. Extracts from pine and oak barks: phenolics, minerals and antioxidant potential. *Int J Environ Anal Chem* 101: 1–9.
- Everest A, Öztürk E 2005. Focusing on the ethnobotanical uses of plants in Mersin and Adana provinces (Turkey). *J Ethnobiol Ethnomed* 1: 1–6.
- Ferreira-Santos P, Genisheva Z, Botelho C, Santos J, Ramos C, Teixeira JA, Rocha CM 2020. Unravelling the biological potential of pinus pinaster bark extracts. *Antioxidants* 9: 1–22.
- Gupta M, Bhalla T, Gupta G, Mitra C, Bhargava K 1971. Anti-inflammatory activity of taxifolin. *Jap J Pharmacol* 21: 377–382.
- Gülçin İ 2006a. Antioxidant activity of caffeic acid (3, 4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology* 217: 213–220.
- Gülçin İ 2006b. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 78: 803–811.
- Gülçin İ 2012. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol* 86: 345–391.
- Gülçin İ 2020. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Arch Toxicol* 94: 651–715.
- Güzel Y, Güzelşemme M, Miski M 2015. Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: a multicultural district in Hatay Province of Turkey. *J Ethnopharmacol* 174: 118–152.
- Hamad AMA, Ates S, Olgun Ç, Gur M 2019. Chemical composition and antioxidant properties of some industrial tree bark extracts. *BioResources* 14: 5657–5671.
- Harkin JM, Rowe JW 1971. Bark and its possible uses. (Research note FPL: 091). US Forest Service p. 56.
- İnce I, Yeşil-Çeliktaş O, Karabay-Yavaşoğlu N, Elgin G 2009. Effects of Pinus brutia bark extract and Pycnogenol® in a rat model of carrageenan induced inflammation. *Phytomedicine* 16: 1101–1104.
- Karaçelik AA, Küçük M, İskefiyeli Z, Aydemir S, De Smet S, Miserez B, Sandra P 2015. Antioxidant components of Viburnum opulus L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI–MS methods. *Food Chem* 175: 106–114.
- Kıvrak İ, Kıvrak Ş, Harmandar M, Çetintaş Y 2013. Phenolic compounds of Pinus brutia Ten.: chemical investigation and quantitative analysis using an ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with electrospray ionization source. *Rec Nat Prod* 7: 313–319.
- Kızılarlan Ç, Sevgi E 2013. Ethnobotanical uses of genus Pinus L.(Pinaceae) in Turkey. *Indian J Tradit Knowl* 12: 209–220.
- Kurt R, Mengeloğlu F 2006. Potential utilization of bark residues in Turkey, 1st International Non-wood Forest Products Symposium 1-4 November. In. Trabzon
- Lotito SB, Fraga CG 1998. (+)-Catechin prevents human plasma oxidation. *Free Radical Biol Med* 24: 435–441.
- Maimoona A, Naeem I, Saddiqe Z, Jameel K 2011. A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract. *J Ethnopharmacol* 133: 261–277.
- Masquelier J 1987. Plant extract with a proanthocyanidins content as therapeutic agent having radical scavenger effect and use thereof. In. US Patent 4,698,360
- Menon LG, Kuttan R, Kuttan G 1999. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin. *Cancer Lett* 141: 159–165.
- Öktem E 1976. Kabuktan faydalanma olanakları ve yonga levha yapımında kabuk. *Orm Araş Ens Dergi* 2: 94–101.
- Özüdoğru B, Akaydın G, Erik S, Yeşilada E 2011. Inferences from an ethnobotanical field expedition in the selected locations of Sivas and Yozgat provinces (Turkey). *J Ethnopharmacol* 137: 85–98.
- Sezik E, Yeşilada E, Tabata M, Honda G, Takaishi Y, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y 1997. Traditional medicine in Turkey VIII. Folk medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır provinces. *Econ Bot* 51: 195–211.
- Skrypnik L, Grigorev N, Michailov D, Antipina M, Danilova M, Pungin A 2019. Comparative study on radical scavenging activity and phenolic compounds content in water bark extracts of alder (Alnus glutinosa (L.) Gaertn.), oak (Quercus robur L.) and pine (Pinus sylvestris L.). *Eur J Wood Wood Prod* 77: 879–890.
- Slinkard K, Singleton VL 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *J Enol Vitic* 28: 49–55.
- Sunil C, Xu B 2019. An insight into the health-promoting effects of taxifolin (dihydroquercetin). *Phytochemistry* 166: 112066.
- Şeker ME, Çelik A, Dost K, Erdoğan A 2021. Investigation of Pycnogenol Content in Five Different Pine Barks Species Grown in Turkey by HPLC-UV and LC-MS. *J Chromatogr Sci* bmab022.
- Taner G, Aydın S, Bacanlı M, Sarıgöl Z, Şahin T, Başaran AA, Başaran N 2014. Modulating effects of Pycnogenol® on oxidative stress and DNA damage induced by sepsis in rats. *Phytother Res* 28: 1692–1700.
- Terzioğlu S, Bilgili E, Karaköse M 2012. Türkiye Ormanları (Forests of Turkey). *Orman Genel*

- Müdürlüğü, Orman Genel Müdürlüğü Dış ilişkiler, Eğitim ve Araştırma Dairesi Başkanlığı, Ankara, p. 98.
- Tohma H, Gülçin İ, Bursal E, Gören AC, Alwasel SH, Köksal E 2017. Antioxidant activity and phenolic compounds of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) determined by HPLC-MS/MS. *J Food Meas Charact* 11: 556–566.
- Yeşil-Çeliktaş Ö, Ganzera M, Akgün İ, Sevimli C, Korkmaz KS, Bedir E 2009a. Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different *Pinus* species. *J Sci Food Agric* 89: 1339–1345.
- Yeşil-Çeliktaş Ö, Otto F, Parlar H 2009b. A comparative study of flavonoid contents and antioxidant activities of supercritical CO₂ extracted pine barks grown in different regions of Turkey and Germany. *Eur Food Res Technol* 229: 671–677.

Recombinant Production of *E. coli* NAD⁺-dependent DNA ligase as a Target for Antibacterial Drug Discovery

Özlem KAPLAN¹, Rizvan İMAMOĞLU², İsa GÖKÇE³

¹Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Istanbul University, 34134, Vezneciler, İstanbul, Turkey, ²Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science, Bartın University, Turkey, ³Department of Genetics and Bioengineering, Faculty of Engineering and Natural Sciences, Tokat Gaziosmanpaşa University, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0002-3052-4556>, ²<https://orcid.org/0000-0002-6306-4760>, ³<https://orcid.org/0000-0002-5023-9947>

✉: ozlem.kaplan@istanbul.edu.tr

ABSTRACT

The increase in the frequency of drug resistance in bacterial infections has led to the research of new antibacterial agents targeting new mechanisms. Many of the functions of NAD⁺-dependent DNA ligase have made it a remarkable target for antibacterial drug discovery. *Escherichia coli* (*E. coli*) NAD⁺-dependent DNA ligase is presented as a potential target due to its unique substrate specificity compared to the ATP-dependent human DNA ligase. In this study, it was aimed to produce and purify the *E. coli* NAD⁺ dependent DNA ligase enzyme, which is frequently used in antibacterial drug discovery. The *E. coli* DNA ligase gene sequence was cloned into pTOLT vector system. *E. coli* DNA ligase enzyme was purified after the production in *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cells. It was clearly demonstrated by the activity test that the DNA ligase enzyme produced in this study can ligate the DNA fragments. As a result, it was revealed that the effect of candidate inhibitors can be studied simply on the enzyme.

Research Article

Article History

Geliş Tarihi : 21.02.2021

Kabul Tarihi : 20.04.2021

Keywords

NAD⁺-dependent DNA ligase
TolAIII peptide
Antibacterial Drug Discovery

Antibakteriyel İlaç Keşfi İçin Bir Hedef Olarak *E. Coli* NAD⁺-Bağımlı DNA Ligazın Rekombinant Üretimi

ÖZET

Bakteriyel enfeksiyonlarda ilaç direnci frekansındaki artış, yeni mekanizmaları hedefleyen yeni antibakteriyel ajanların araştırılmasına yol açmıştır. NAD⁺-bağımlı DNA ligazın fonksiyonlarının bir çoğu, onu antibakteriyel ilaç keşfi için dikkate değer bir hedef haline getirmiştir. *Escherichia coli* (*E. coli*) NAD⁺ bağımlı DNA ligazı, ATP bağımlı insan DNA ligazı ile karşılaştırıldığında, benzersiz substrat özgüllüğü nedeniyle potansiyel bir hedef olarak görülmektedir. Bu çalışmada antibakteriyel ilaç keşiflerinde sıklıkla kullanılan *E. coli* NAD⁺ bağımlı DNA ligaz enziminin, yüksek miktarda ve saflıkta üretilmesi amaçlanmıştır. *E. coli* DNA ligaz gen dizisi, pTOLT vektör sistemine klonlanmıştır. *E. coli* DNA ligaz enzimi, *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücrelerinde üretildikten sonra saflaştırılmıştır. Bu çalışmada üretilen DNA ligaz enziminin DNA fragmanlarının ligasyonunu sağlayabildiği, aktivite testi ile açıkça gösterilmiştir. Sonuç olarak, bu enzim üzerinde aday inhibitörlerin etkisinin basitçe incelenebileceği ortaya koyulmuştur.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Received : 21.02.2021

Accepted : 20.04.2021

Anahtar Kelimeler

NAD⁺-bağımlı DNA ligaz
TolAIII peptid
Antibakteriyel İlaç Keşfi

To Cite : Kaplan Ö, İmamoğlu R, Gökçe İ 2022. Recombinant Production of *E. coli* NAD⁺-dependent DNA ligase as a Target for Antibacterial Drug Discovery. KSU J. Agric Nat 25 (1): 19-24. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdoge.vi.884279>

INTRODUCTION

DNA ligase is important in DNA repair and replication (Cardona-Felix et al. 2010). DNA synthesis in one strand may be continuous in DNA replication, while synthesis is not continuous in the other strand. DNA ligase is crucial for joining Okazaki fragments and fulfilling DNA synthesis (Timson et al. 2000). Nicks

caused by environmental factors such as radiation, oxidants and alkylating agents which are repaired by the activity of the DNA ligase (Crut et al. 2008). DNA ligase is an essential protector of genome integrity (Odell et al. 2000). Various organisms such as *E. coli* (Wilkinson et al. 2005), *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) (Srivastava et al. 2007),

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) (Kaczmarek et al. 2001) have NAD⁺-dependent DNA ligase. T7 bacteriophage, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) (Doherty et al. 1996), *Staphylothermus marinus* (*S. marinus*) (Seo et al. 2007) have ATP-dependent DNA ligase. In addition, all known eukaryotic DNA ligases are ATP dependent (Wilkinson et al. 2001). Bacterial genomes sequenced so far contain at least one NAD⁺-dependent DNA ligase. NAD⁺-dependent ligase has been cloned from various bacterial sources and sequenced. These sequences appear to be significantly similar and all have almost the same size (75 kDa) (Timson et al. 2000). These enzymes have two functional domains: the C terminal domain is the domain of binding to DNA. It is seen that a zinc ion is bound in the C terminal domain of these enzymes. The N terminal domain is responsible for the self-adenylating reaction and NAD⁺ binding (Wilkinson et al. 2001). The DNA sequence of the DNA ligase gene of a wide range of bacterial species (Jonsson et al. 1994; Lauer et al. 1991; Subramanya et al. 1996; Timson et al. 2000) has been identified, and some conserved regions have been determined and compared with the discovery regions in *E. coli*. Alignment of amino acid sequences displays that *S. aureus* NAD⁺-dependent DNA ligase has 47% and 60% amino acid identity with *E. coli* and *Bacillus stearothermophilus* NAD⁺-dependent DNA ligase, respectively. It has been displayed in further studies that these DNA ligases have motifs preserved in other bacteria (Kaczmarek et al. 2001).

E. coli DNA is a protein encoded by the LigA gene, the enzyme has 671 amino acids and its molecular weight is 73,690 kDa. Wilkinson et al. (2005) found that *E. coli* LigA protein has contains zinc-finger, oligomer-binding (OB) h-barrel, helix-hairpin-helix motif (HhH) and BRCT domain. In the same study, *E. coli* LigA gene was cloned into the pET16b vector. The vector contains a 10-His-Tag containing 21 extra amino acids at the N-terminal of protein. Also, it was stated that the presence of His-Tag at the N-terminal or C-terminal end did not affect enzyme activity (Wilkinson et al. 2005).

NAD⁺-dependent DNA ligases are considered to be possible targets for broad spectrum antibacterial compounds (Gong et al. 2004; Kaczmarek et al. 2001; Lee et al. 2000; Sriskanda and Shuman 2002; Swift and Amaro 2009), because they are unavoidable for many basic processes of DNA metabolism, including replication, recombination processes and repairs that require re-synthesis of DNA connection of Okazaki fragments in the pathway (Timson et al. 2000). The ligase inhibitors developed are generally competitive inhibitors and can bind to hydrophobic pockets near the NAD⁺ substrate binding site (Swift and Amaro 2009). They inhibit the LigA activity of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), *H. influenzae*, *E. coli*,

Mycoplasma and *S. aureus*. Their inhibitory activities are very high (in the nanomolar range) and are selective for bacterial DNA ligase (Mills et al. 2011). There are several studies in the literature on the inhibition of *E. coli* DNA LigA. Gong et al. found that pyropyrone compounds strongly inhibited the ligation activity of *E. coli* DNA LigA (IC₅₀ = 0.6 μM) (Gong et al. 2004). Dwivedi et al. have demonstrated that Quinacrine (9-aminoacidine) is a strong candidate for inhibition of *E. coli* DNA LigA (Dwivedi et al. 2008). Mills et al. have described several adenosine analogs as inhibitors of LigA. These compounds have been shown to be effective in *H. influenzae* as well as *E. coli* DNA LigA (Alomari 2019; Mills et al. 2011).

In this study, *E. coli* NAD⁺-dependent DNA ligase enzyme, which is frequently used in antibacterial drug discoveries, was aimed at high level production and purification. First, the *E. coli* DNA ligase gene was cloned into the pTOLT vector system and then expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cells. The enzyme was purified by affinity chromatography and its activity was demonstrated.

MATERIALS and METHOD

Cloning of the *E. coli* DNA Ligase Gene into the pTOLT Vector System

The gene was first amplified for cloning the *E. coli* DNA Ligase gene into the pTOLT vector (Anderluh et al. 2003). PCR (polymerase chain reaction) mixture was prepared using primers of *ligABamHIsense* 5'TTTTGGATCCATGGAATCAATCGAACAAAC3' and *ligAKpnIreverse* 5'TTTTGGTACCGCTACCCAGCAAACGCAG3'.

After PCR reaction, 10 μl of PCR mixture was taken and analyzed in 1% agarose gel. The obtained PCR products were purified with the PCR products cleaning kit and digested with *BamHI* and *KpnI* restriction enzymes. The pTOLT plasmid which was used for cloning was also cut with the same restriction enzymes. *E. coli* DNA Ligase gene and pTOLT plasmid digestion by restriction enzymes were ligated with T4 DNA ligase enzyme at room temperature for 16 hours. The ligation products were transferred to *E. coli* DH5α cells and spread on ampicillin (100 μg ml⁻¹) containing LB medium. Plasmid DNA was isolated from the colonies, and diagnostic restriction digest and diagnostic PCR were performed on plasmids. The obtained products were analyzed in 1% agarose gel.

Expression of *E. coli* DNA Ligase Protein

Protein expression and purification was carried out similar to the protocol detailed in our previous work (Kuduğ et al. 2019; Kaplan et al. 2021). In summary, for protein expression, pTOLT clones were transformed into *E. coli* BL21 (DE3) pLysE and spread on LB medium containing ampicillin (100 μg ml⁻¹).

After overnight incubation, the colonies were transferred to the 4 mL LB liquid medium containing antibiotics. Then the cells were inoculated instead of 600 mL antibiotic LB liquid medium and protein expression was induced by IPTG when OD₆₀₀: 0.7. The cells were collected by centrifugation 4 hours after induction and lysed by sonicator. The lysate was centrifuged, supernatant was taken and proteins were purified by affinity chromatography (Ni-NTA Agarose Resin). Each fraction taken from the column was analyzed in SDS-PAGE.

Activity Test of *E. coli* DNA Ligase enzyme

The pET28b vector was digested for 3 hours with *Bam*HI and *Apa*I enzyme. After 3 hours, it was purified with the “Biobasic Gel and PCR Clean-Up” kit. The digested and purified pET28b vector was ligated with different amounts of *E. coli* DNA ligase enzyme elutions for 2 hours at 25°C.

RESULTS and DISCUSSION

Cloning of the *E. coli* DNA Ligase Gene into the pTOLT Vector System

As a result of the PCR reaction, it was observed in the 1% agarose gel that the *E. coli* DNA ligase gene (LigA) was amplified in the 2016 bp size (Figure 1).

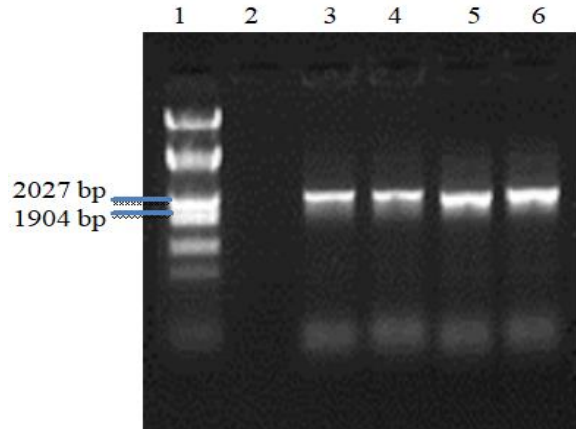


Figure 1. Analysis of the colony PCR results in 1% agarose gel. Column 1 is λDNA/EcoRI/ HindIII Marker, Columns 3-6 is 2016 bp PCR product.

Şekil 1. Koloni PCR sonuçlarının %1 agaroz jelde analizi. Sütun 1, λDNA/EcoRI/ HindIII markeridir, Sütun 3-6, 2016 bç PCR ürünüdür.

Confirmation of cloning was performed by diagnostic restriction digestion using *Mlu*I and *Xho*I restriction enzymes. As seen in Figure 2, it is revealed with the presence of the *E. coli* Lig A gene region around 2016 bp and the pTOLT vector around 4300 bp.

Diagnostic PCR was also performed with *ligABam*HI sense and *ligAKpn*I reverse primers using plasmid DNAs that were found to be positive in the diagnostic restriction digestion process (Figure 3).

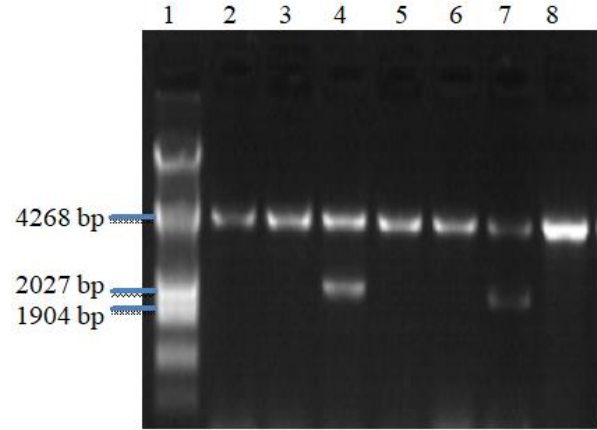


Figure 2. Analysis of the diagnostic digestion results in 1% agarose gel. Column 1 is λDNA/EcoRI/Hind III Marker, Columns 4 and 7 are plasmids containing the *E. coli* LigA gene, and columns 2, 3, 5, 6, 8 are plasmids that do not contain the *E. coli* LigA gene.

Şekil 2. Doğrulama kesim sonuçlarının %1 agaroz jelde analizi. Sütun 1, λDNA/EcoRI/ HindIII markeridir, Sütun 4 ve 7, *E. coli* LigA genini içeren plazmitlerdir ve sütun 2, 3, 5, 6, 8, *E. coli* LigA genini içermeyen plazmitlerdir.

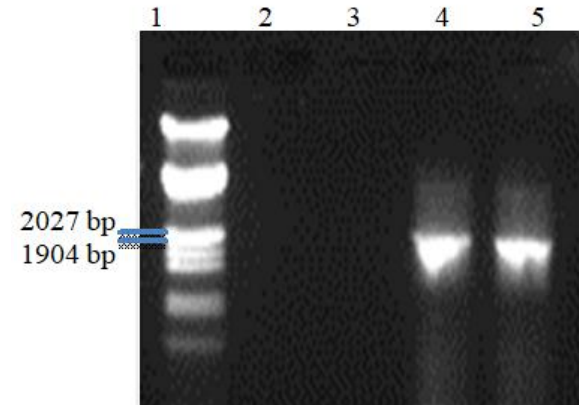


Figure 3 Analysis of diagnostic PCR results in 1% agarose gel. Column 1 is λDNA/EcoRI/HindIII Marker and columns 4, 5 are PCR products.

Şekil 3. Doğrulama PCR sonuçlarının %1 agaroz jelde analizi. Sütun 1, λDNA/EcoRI/ HindIII markeridir ve 4. 5. sütunlar PCR ürünleridir.

As a result of diagnostic PCR and diagnostic restriction analysis, *E. coli* LigA gene has been successfully cloned into pTOLT vector and, the pTOL-*E. coli* DNA Ligase plasmid was obtained (Figure 4).

Expression of *E. coli* DNA Ligase Protein

The pTOLT plasmid has a DNA sequence encoding the TolAIII peptide of 9 kDa as fusion. TolAIII is a small domain, expressed in high yields of soluble proteins in the cytoplasm of *E. coli*. The *E. coli* DNA ligase enzyme is 74 kDa in size and appears to be 83 kDa with the 9 kDa TolAIII peptide in SDS-PAGE gel (Figure 5).

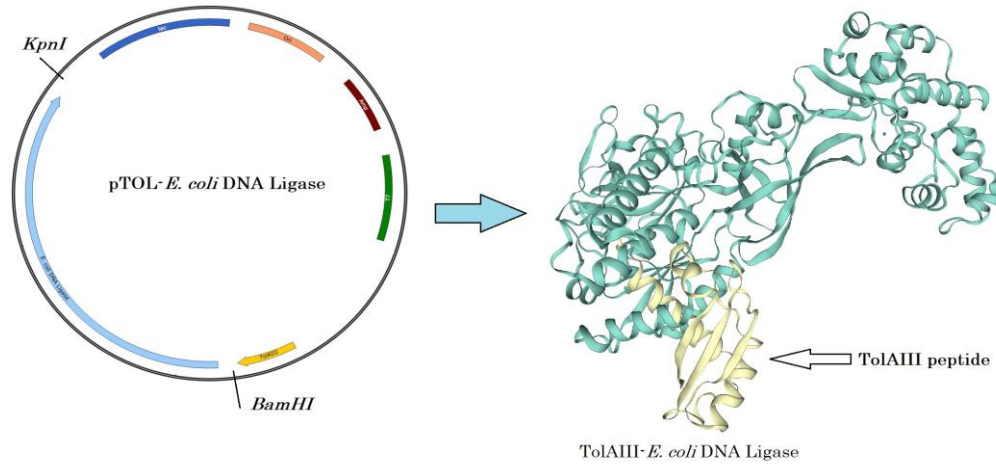


Figure 4. Plasmid map of pTOL-*E. coli* DNA Ligase construct to produce TolAIII and *E. coli* DNA Ligase fusion
Şekil 4. TolAIII ve *E. coli* DNA Ligaz füzyonunu oluşturan pTOL-*E. coli* DNA Ligaz'ın plazmid haritası

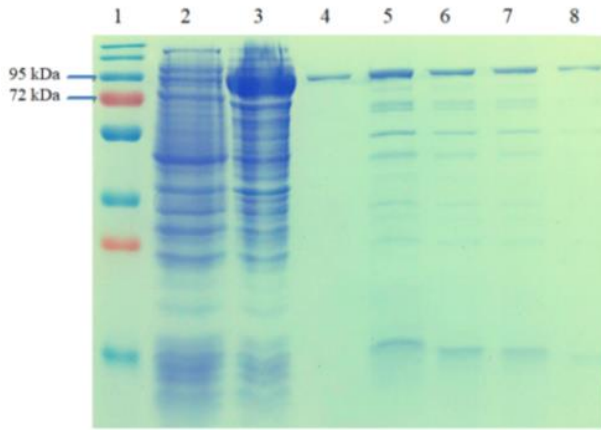


Figure 5. Analysis of the purified *E. coli* DNA Ligase protein in 12% SDS-PAGE gel. 1. Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder 2. *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cell lysates before IPTG addition, 3. *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cell lysates after IPTG addition, 4-8. purified Tol-III-A-DNA Ligase fusion protein.

Şekil 5. Safaştırılan *E. coli* DNA Ligaz proteininin % 12 SDS-PAGE jelinde analizi. 1. Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder 2. IPTG ilavesinden önce *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücre lizatları, 3. IPTG ilavesinden sonra *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücre lizatları, 4-8. safaştırılmış Tol-III-A-DNA Ligaz füzyon proteini.

The protein obtained in column 4 is > 95% purity. Protein concentration was determined as 2 mg ml⁻¹ by the Bradford method.

Activity Test of *E. coli* DNA Ligase enzyme

The activity test was performed by taking different concentrations of *E. coli* DNA ligase enzyme purified by affinity chromatography. As a negative control, an enzyme-free sample and a sample containing elution (1 µl) from *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cells without plasmid were used. As a positive control, T4 DNA

Ligase enzyme was used (Figure 6). It was clearly seen that the DNA ligase enzyme produced in this study ligated the DNA fragments. These results reveal that the effect of inhibitors on *E. coli* DNA ligase enzyme can be demonstrated simply in agarose gel electrophoresis.

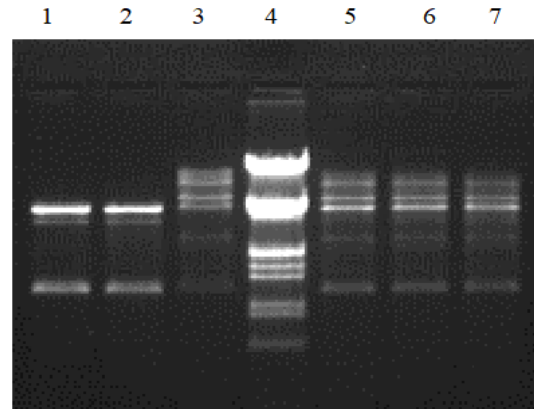


Figure 6. Analysis of the activity test of the purified protein in 1% agarose gel. 1. Enzyme-free sample. 2. Sample containing elution (1 µl) from *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cells without plasmid. 3. Sample containing T4 DNA Ligase enzyme (1 µl). 4. λDNA/EcoRI/HindIII Marker. 5, 6, 7 are samples containing 1, 2, 3 µl of *E. coli* DNA Ligase elution, respectively.

Şekil 6. Safaştırılan proteinin aktivite testinin % 1 agaroz jelde analizi 1. Enzim içermeyen numune. 2. Plazmid içermeyen *E. coli* BL21 (DE3) pLysE hücrelerinden elde edilen elüsyonu içeren örnek (1 µl). 3. T4 DNA Ligaz enzimi (1 µl) içeren örnek. 4. λDNA /EcoRI/HindIII Marker. 5, 6, 7 sırasıyla 1, 2, 3 µl *E. coli* DNA Ligaz elüsyonu içeren örneklerdir.

CONCLUSION

DNA ligase plays an important role in DNA recombination, replication, and repair of all living organisms. The bacterial NAD⁺-dependent DNA ligase

(LigA) has high potential as a broad spectrum antibacterial target. Bacterial NAD⁺-dependent DNA ligase is essential for the viability of all Gram-positive and Gram-negative bacteria tested so far, including *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis* (Dermody et al. 1979; Kaczmarek et al. 2001; Meier et al. 2008; Shuman 2009). NAD⁺-dependent DNA ligases were not detected in humans, which led to the research that it could be the target for broad-spectrum antibiotics (Brotz-Oesterhelt et al. 2003;

Georlette et al. 2003; Gong et al. 2004; Kaczmarek et al. 2001; Lee et al. 2000; Sriskanda and Shuman (2002) spectrum antibiotics (Brotz-Oesterhelt et al. 2003; Georlette et al. 2003; Gong et al. 2004; Kaczmarek et al. 2001; Lee et al. 2000; Sriskanda and Shuman 2002). NAD⁺-dependent DNA Ligases have low similarity with eukaryotic DNA ligase, and the need for NAD⁺ as a substrate for ligase activity makes the bacterial ligase unique, thus limiting toxicity for humans (Korycka-Machala et al. 2007). Ligases are found in all three systems of life (bacteria, archaea and eukaryotes), while NAD⁺-dependent enzymes are only present in bacteria (Wilkinson et al. 2001). At least one NAD⁺-dependent DNA ligase is found in each bacterium. Genetic studies have demonstrated that the LigA gene is required for *E. coli* growth (Shuman 2009). NAD⁺-dependent ligase (LigA) is an essential enzyme for the survival of *E. coli* and its homologous protein may be required for all bacteria (Wilkinson et al. 2001).

In this study, the *E. coli* DNA ligase gene fragment was cloned into the pTOLT vector system. The protein expression was performed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysE cells and the protein was purified. The *E. coli* DNA ligase protein was highly expressed by fusion with the TolAIII peptide. The greatest advantage of expression in combination with TolAIII is that it provides high efficiency protein production in *E. coli* (Anderluh et al. 2003). The TolAIII peptide significantly increased the production of *E. coli* DNA ligase protein. The activity of the purified protein was confirmed by an activity test. It has been revealed that the effect of selected inhibitors can be studied simply on the enzyme we produce within the scope of this study. In addition, the produced *E. coli* DNA ligase enzyme can also be used in molecular cloning processes.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was supported by the Turkish Scientific and Technical Research Council (TUBITAK) (TUBITAK-2209A)

Researchers Contribution Rate Declaration Summary

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

Conflicts of Interest Statement

Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Alomari A, Allen, M 2019. Clone, purify and 1D Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of the BRCT Domain of *E. coli* DNA Ligase LigA. Iraqi Journal of Biotechnologies 18: 2.
- Anderluh G, Gokce I, Lakey JH 2003. Expression of proteins using the third domain of the *Escherichia coli* periplasmic-protein TolA as a fusion partner. Protein Expr Purif 28: 173-181. doi:10.1016/s1046-5928(02)00681-2.
- Brotz-Oesterhelt H, Knezevic I, Bartel S, Lampe T, Warnecke-Eberz U, Ziegelbauer K, Habich D, Labischinski H 2003. Specific and potent inhibition of NAD⁺-dependent DNA ligase by pyridochromones. J Biol Chem 278:39435-39442. doi:10.1074/jbc.M306479200.
- Cardona-Felix CS, Pastor-Palacios G, Cardenas H, Azuara-Liceaga E, Brieba LG 2010. Biochemical characterization of the DNA ligase I from *Entamoeba histolytica*. Mol Biochem Parasitol 174: 26-35. doi:10.1016/j.molbiopara.2010.06.010.
- Crut A, Nair PA, Koster DA, Shuman S, Dekker NH 2008. Dynamics of phosphodiester synthesis by DNA ligase. Proc Natl Acad Sci U S A 105:6894-6899. doi:10.1073/pnas.0800113105.
- Dermody JJ, Robinson GT, Sternglanz R 1979. Conditional-lethal deoxyribonucleic acid ligase mutant of *Escherichia coli*. J Bacteriol 139:701-704.
- Doherty AJ, Ashford SR, Wigley DB 1996. Characterization of proteolytic fragments of bacteriophage T7 DNA ligase. Nucleic Acids Res 24:2281-2287. doi:10.1093/nar/24.12.2281.
- Dwivedi N, Dube D, Pandey J, Singh B, Kukshal V, Ramachandran R, Tripathi RP (2008) NAD(+)-dependent DNA ligase: a novel target waiting for the right inhibitor. Med Res Rev 28:545-568. doi:10.1002/med.20114.
- Georlette D, Blaise V, Dohmen C, Bouillenne F, Damien B, Depiereux E., Gerday C, Uversky VN, Feller G 2003. Cofactor binding modulates the conformational stabilities and unfolding patterns of NAD(+)-dependent DNA ligases from *Escherichia coli* and *Thermus scotoductus*. J Biol Chem 278:49945-49953. doi:10.1074/jbc.M307761200.
- Gong C, Martins A, Bongiorno P, Glickman M, Shuman S 2004. Biochemical and genetic analysis of the four DNA ligases of mycobacteria. J Biol Chem 279: 20594-606. doi:10.1074/jbc.M401841200
- Jonsson ZO, Thorbjarnardottir SH, Eggertsson G, Palsdottir A 1994. Sequence of the DNA ligase-encoding gene from *Thermus scotoductus* and conserved motifs in DNA ligases. Gene 151: 177-180. doi:10.1016/0378-1119(94)90652-1.
- Kaczmarek FS, Zaniewski RP, Gootz TD, Danley DE, Mansour MN, Griffor M, Kamath AV, Cronan M,

- Mueller J, Sun D, Martin PK, Benton B, McDowell L, Biek D, Schmid MB 2001. Cloning and functional characterization of an NAD(+)-dependent DNA ligase from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 183: 3016-3024. doi:10.1128/JB.183.10.3016-3024. 2001.
- Kaplan Ö, İmamoğlu R, Şahingöz İ, Gökçe İ 2021. Recombinant production of *Thermus aquaticus* single-strand binding protein for usage as PCR enhancer. *International Advanced Researches and Engineering Journal*. 5(1): 42-46. doi:10.35860/iarej.766741.
- Korycka-Machala M, Rychta E, Brzostek A, Sayer HR, Rumijowska-Galewicz A, Bowater RP, Dziadek J 2007. Evaluation of NAD(+)-dependent DNA ligase of mycobacteria as a potential target for antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2888-2897. doi:10.1128/AAC.00254-07.
- Kuduğ H, Ataman B, İmamoğlu R, Düzgün D, Gökçe İ 2019. Production of red fluorescent protein (mCherry) in an inducible *E. coli* expression system in a bioreactor, purification and characterization. *International Advanced Researches and Engineering Journal*. 3(1): 20-25.
- Lauer G, Rudd EA, McKay DL, Ally A, Ally D, Backman KC 1991. Cloning, nucleotide sequence, and engineered expression of *Thermus thermophilus* DNA ligase, a homolog of *Escherichia coli* DNA ligase. *J Bacteriol* 173: 5047-5053. doi:10.1128/jb.173.16.5047-5053.1991.
- Lee JY, Chang C, Song HK, Moon J, Yang JK, Kim HK, Kwon ST, Suh SW 2000. Crystal structure of NAD(+)-dependent DNA ligase: modular architecture and functional implications. *EMBO J* 19: 1119-1129. doi:10.1093/emboj/19.5.1119.
- Meier TI, Yan D, Peery RB, McAllister KA, Zook C, Peng SB, Zhao G 2008. Identification and characterization of an inhibitor specific to bacterial NAD(+)-dependent DNA ligases. *FEBS J* 275:5258-5271. doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06652.x.
- Mills SD, Eakin AE, Buurman ET, Newman JV, Gao N, Huynh H, Johnson KD, Lahiri S, Shapiro AB, Walkup GK, Yang W, Stokes SS 2011. Novel bacterial NAD(+)-dependent DNA ligase inhibitors with broad-spectrum activity and antibacterial efficacy in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1088-1096. doi:10.1128/AAC.01181-10.
- Odell M, Sriskanda V, Shuman S, Nikolov DB 2000. Crystal structure of eukaryotic DNA ligase-adenylate illuminates the mechanism of nick sensing and strand joining. *Mol Cell* 6:1183-1193. doi:10.1016/s1097-2765(00)00115-5.
- Seo MS, Kim YJ, Choi JJ, Lee MS, Kim JH, Lee JH, Kwon ST 2007. Cloning and expression of a DNA ligase from the hyperthermophilic archaeon *Staphylothermus marinus* and properties of the enzyme. *J Biotechnol* 128:519-530. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.09.024.
- Shuman S 2009. DNA ligases: progress and prospects. *J Biol Chem* 284:17365-17369. doi:10.1074/jbc.R900017200.
- Sriskanda V, Shuman S 2002. Conserved residues in domain Ia are required for the reaction of *Escherichia coli* DNA ligase with NAD+. *J Biol Chem* 277:9695-9700. doi:10.1074/jbc.M111164200.
- Srivastava SK, Dube D, Kukshal V, Jha AK, Hajela K, Ramachandran R 2007. NAD(+)-dependent DNA ligase (Rv3014c) from *Mycobacterium tuberculosis*: novel structure-function relationship and identification of a specific inhibitor. *Proteins* 69:97-111. doi:10.1002/prot.21457.
- Subramanya HS, Doherty AJ, Ashford SR, Wigley DB 1996. Crystal structure of an ATP-dependent DNA ligase from bacteriophage T7. *Cell* 85:607-615. doi:10.1016/s0092-8674(00)81260-x.
- Swift RV, Amaro RE 2009. Discovery and design of DNA and RNA ligase inhibitors in infectious microorganisms. *Expert Opin Drug Discov* 4:1281-1294. doi:10.1517/17460440903373617.
- Timson DJ, Singleton MR, Wigley DB 2000. DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutat Res* 460: 301-318. doi:10.1016/s0921-8777(00)00033-1.
- Wilkinson A, Day J, Bowater R 2001. Bacterial DNA ligases. *Mol Microbiol* 40: 1241-1248. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02479.x.
- Wilkinson A, Smith A, Bullard D, Lavesa-Curto M, Sayer H, Bonner A, Hemmings A, Bowater R 2005. Analysis of ligation and DNA binding by *Escherichia coli* DNA ligase (LigA). *Biochim Biophys Acta* 1749: 113-122. doi:10.1016/j.bbapap.2005.03.003.

Nutrient Content of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. Grown on Some Local Lignocellulosic Wastes

Mehmet AKYÜZ¹, Şule İNCİ², Sevda KIRBAĞ³

¹Bitlis Eren University, Science & Arts Faculty, Department of Biology, Bitlis – Turkey, ^{2,3}Fırat University, Science Faculty, Department of Biology, Elazığ – Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0003-3986-3498>, ²<https://orcid.org/0000-0002-4022-5269>, ³<https://orcid.org/0000-0002-4337-8236>

✉: makyuz@beu.edu.tr

ABSTRACT

The aim of study as to determine the effects of some composts on the nutritional value of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. The energy, dry matter, moisture, crude protein, fat, ash, organic matter, and nitrogen free extract were 311.3-313.9 (kcal 100 g⁻¹), 91.8-92.5, 7.5-8.2, 27.3-38.6, 1.5-1.9, 5.3-6.4, 35.9-46.8 and 86.0-87.1 (g 100 g⁻¹) of dry weight, respectively. The contents of polymeric substance were determined 13.6-16.2% of cellulose, 20.4-21.8% of hemicellulose and 0.1-0.3% of lignin. It was observed that the crude fat, energy, lignin and hemicellulose contents of *P. pulmonarius* were not statistically significant depending on the substrates used in the culture ($p>0.05$), but there were variations in other nutrients ($p<0.05$). It is highly valued as a good source of proteins, energy and carbohydrates, but rather low in their fat, lignin and hemicellulose contents. It supports that the substrate products used in the culture of *P. pulmonarius* can affect the nutrient composition of the mushroom such as energy, crude protein and carbohydrate.

Research Article

Article History

Received : 03.03.2021

Accepted : 06.05.2021

Keywords

Nutritive value

Pleurotus pulmonarius

Lignocellulosic wastes

Cultivation

Edible mushrooms

Bazı Lokal Lignoselülozik Atıklar Üzerinde Kültürü Yapılan *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.'in Besin İçeriği

ÖZET

Bu çalışmanın amacı, bazı kompost ortamlarının *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel'in besin değeri üzerindeki etkilerini belirlemektir. Enerji, kuru madde, nem, ham protein, yağ, kül, organik madde ve azotsuz öz madde miktarları kuru ağırlığın; 311.3-313.9 (kcal 100 g⁻¹), 91.8-92.5, 7.5-8.2, 27.3-38.6, 1.5-1.9, 5.3-6.4, 35.9-46.8 ve 86.0-87.1 (g 100 g⁻¹) olarak bulunmuştur. Polimerik madde içeriği ise % 13.6-16.2 selüloz, % 20.4-21.8 hemiselüloz ve % 0.1-0.3 lignin olarak belirlenmiştir. Mantarın; ham yağ, enerji, lignin ve hemiselüloz içeriğinin, kültürde kullanılan substratlara bağlı olarak istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmadığı ($p>0.05$), fakat diğer besin öğelerinde ise değişkenlikler olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). *P. pulmonarius*, iyi bir karbonhidrat, enerji, protein kaynağı olarak oldukça değerlidir, ancak yağ, lignin ve hemiselüloz içerikleri bakımından oldukça düşüktür. *P. pulmonarius*'un kültüründe kullanılan substrat ürünlerin mantarın enerji, ham protein ve karbonhidrat gibi besin bileşimini etkileyebileceğini desteklemektedir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 03.03.2021

Kabul Tarihi : 06.05.2021

Anahtar Kelimeler

Besin değeri

Pleurotus pulmonarius

Lignoselülozik atıklar

Kültür

Yenilebilir mantarlar

To Cite: Akyüz M, İnci Ş, Kırbağ S 2022. Nutrient Content of *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel. Grown on Some Local Lignocellulosic Wastes. KSU J. Agric Nat 25 (1): 25-30. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.890663>.

INTRODUCTION

Mushrooms are natural edible gift for humankind with unique taste, flavor and medicinal properties (Maity et al., 2021). Edible mushrooms have drawn remarkable interest of the food industry. They were called the “Food of the Gods” (Valverde et al., 2015)

and serve as good source of many nutraceutical compounds such as protein, unsaturated fatty, carbohydrate, mineral substances, vitamins, amino acids, dietary fiber, volatile organic compounds etc (Corrêa et al., 2016; Bach et al., 2017; Sardar et al., 2017; Ma et al., 2018). It has been recently shown that mushrooms have bioactive compounds exhibiting

antioxidant, antiviral, antifungal, antimicrobial, hepatoprotective, antimutagenic, anticarcinogenic, antituberculous, cytotoxic, antitumor, immunological, antidiabetic, hypolipidemic, antiinflammatory etc. making them as alternatives to synthetic drugs (Wasser and Weis, 1999; Wasser, 2011, 2014; Carrasco-González et al., 2017; Finimundy et al., 2018; Barbosa et al., 2020).

It is estimated that over 2300 mushroom species have some medical and nutritional value, but only around 25 are widely accepted as food and few are commercially cultivated. However, the global mushroom cultivation industry and economy is based on five species: button mushroom *Agaricus bisporus* (J.E. Lange) Imbach, oyster mushroom *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., shiitake mushroom *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler, wood ear mushroom *Auricularia auricula-judae* (Bull.) Quél., enoki mushroom *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer and its cultivars (Mleczeek et al., 2020). According to the FAO data, global mushroom cultivation amounted almost 9 million tons in 2018, indicating that it was one of the fastest growing branches of horticulture. In the last 10 years, the harvest of fruiting bodies has doubled together with an increase in species diversity (FAO, 2018).

The genus *Pleurotus* (Fries) Kummer (Basidiomycota, Agaricales) is probably the best known edible mushroom genus in the world due to its gastronomic, nutritional importance and also medicinal properties (Knop et al., 2015; Correa et al., 2016), as much as they achieved the second position in the production of edible mushrooms (Royse et al., 2017). It is estimated that there are more than 200 species of fungi of the genus *Pleurotus* spp., all of which are edible and appreciated for their taste, aroma, and texture, as well as the health enhancing bioactive potentials (Bazanella et al., 2013; Valverde et al., 2015). The most important *Pleurotus* species cultivated in large scale are *P. ostreatus* and *P. pulmonarius*. The second often marketed by spawn manufacturers and cultivators under the incorrect name "*P. sajor-caju*". The real *P. sajor-caju* is in fact a separate species of mushroom, which was returned to the genus *Lentinus* by Pegler (1975), and is correctly named *L. sajor-caju* (Buchanan, 1993).

P. pulmonarius, also known as the Indian Oyster, Italian Oyster, Phoenix Mushroom, or the Lung Oyster, is most commonly known as the grey oyster mushroom, which is characterized by a grayish colored sporophore, which has a fleshy texture and produces an aromatic, not anise-like aroma (Stamets, 2010). It is widely marketable and sells well in several other countries (Lechner et al., 2004; Li et al., 2015; Wu et al., 2019).

The most produced commercial mushroom in Turkey, which known and constituting market share, are

generally *A. bisporus* and *P. ostreatus*. Although the *P. pulmonarius*, known as *P. sajor-caju*, has been studied in the academic field for years, it is not sufficiently recognized by consumers and has no market share. The simplicity of cultivation of this species, its completion in a short time (2 months), as a result of obtaining 4 harvests, spreading it in terms of earliness and diversity and increasing its market share are important for producers. Determining that it has important nutritional values as a food source increases the importance of the subject.

In this study, it was aimed to determine the nutritional values of the *P. pulmonarius* by evaluating the *Medicago sativa* L. straw, *Prangos pabularia* Lindl. wastes and Poplar sawdust residues, which can be provided abundantly and cheaply in our region, and to spread the production of this species as a cultivated mushroom and to establish a market share.

MATERIAL and METHODS

Obtaining The Materials

The mushroom samples used in this study were obtained from the previous culture work (Akyuz et al., 2019). For the formation of basidiocarp, *Medicago sativa* L. (MS), *Prangos pabularia* Lindl. (PP) and *Poplar sawdust* (PS) were used as culture media. These local lignocellulosic wastes were obtained from the vicinity of Bitlis, Turkey. Three types of compost were prepared, consisting of a mixture of MS-PP (1:1), MS-PS (1:1) and MS. In addition, MS was used as the control treatment. The samples were harvested, dried at room temperature for 15 days, placed in locked bags, stored at 25°C in lab, and then samples used in this study.

Methods

The energy, nutrient contents (moisture, protein, ash, fat, carbohydrate) and lignocellulosic content (hemicellulose, cellulose, lignin) were performed in the Faculty of Veterinary Medicine, Firat University, Turkey. The selected biochemical properties moisture, ash, crude protein, fat, ash (AOAC, 1990) crude cellulose (Crampton and Maynard, 1983) and lignocellulosic contents (Vansoest et al., 1991) were determined by appropriate methods. The lipid content was analysed by the Soxhlet extraction method using ethyl ether as the extraction solvent. Protein content was determined by the Kjeldahl method using 6.25 as converting factor to protein. Calculations were made with the following formulas:

$$\text{Nitrogen-free extract: \% dry matter} - (\% \text{ crude fat} + \% \text{ crude ash} + \% \text{ crude protein} + \% \text{ crude cellulose}) \quad (1)$$

$$\text{Organic matter: \% dry matter} - \% \text{ crude ash} \quad (2)$$

$$\text{The energy (kcal): } 4 \times (\text{protein} + \text{carbohydrate}) + 9 \times \text{fat} \quad (3)$$

$$\text{Cellulose: ADF} - \text{Lignin} \quad (4)$$

$$\text{Hemicellulose: NDF} - \text{ADF} \quad (5)$$

RESULTS and DISCUSSION

Nutritive value of various lignocellulosic residues are changeable in dry matter, moisture, crude proteins, ash, nitrogen free extract, polymeric substances, organic matter and energy values. They have high lignocellulosic content, but have low fat contents. The nutritional value and bioactive compounds content of mushrooms are change according to the species, the stage of maturation, the substrate and used the growing conditions. Various lignocellulosic wastes used in this study are contained 92.1-94.5% dry

matter, 112-161 kcal energy, 8.2-15.9% crude protein, 1.4% crude fat, 3.4-10.3% crude ash, 81.8-91.1% organic matter and 12.7-24.4% nitrogen free extract. They are also contained the polymeric substances, cellulose, hemicellulose and lignin in the range of 37.2-51.8%, 12.9-17.6% and 12.6-23.1%, respectively (see Table 1). The dry matter, moisture, energy, crude protein, crude fat, crude ash, nitrogen free extract, organic matter, cellulose, lignin and hemicellulose content of lignocellulosic wastes were significantly different among substrates ($p < 0.05$) shown in Table 1.

Table 1. Nutritive values of *P. pulmonarius* grown on some lignocellulosic residues (% , air-dried basis)

Çizelge 1. Bazı lokal lignoselülozik atıklar üzerinde kültürü yapılan *P. pulmonarius*'un besin içeriği (% , havada kuru esasında)

| Material | Dry Matter | Moisture | Energy (kcal) | Crude Protein | Crude Fat | Crude Ash | Organic Matter | Nitrogen-Free Extract | Lignocellulosic content (%) | | |
|---|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|------------------------|-----------------------|
| | | | | | | | | | Hemicellulose | Cellulose | Lignin |
| Nutrient content of substrates | | | | | | | | | | | |
| PP | 94.5±0.3 ^b | 5.5±0.3 ^a | 143.2±1.9 ^b | 8.2±0.3 ^a | 1.4±0.3 ^a | 3.4±0.1 ^a | 91.1±0.4 ^c | 24.4±0.6 ^c | 17.6±0.2 ^c | 51.8±0.3 ^c | 12.6±0.1 ^a |
| PS | 94.2±0.2 ^b | 5.8±0.2 ^a | 112.4±1.3 ^a | 12.3±0.1 ^b | 1.4±0.2 ^a | 5.7±0.3 ^b | 88.5±0.4 ^b | 12.7±0.5 ^a | 12.9±0.3 ^a | 48.2±0.2 ^b | 23.1±0.1 ^c |
| MS | 92.1±0.9 ^a | 7.9±0.9 ^b | 161.0±1.3 ^c | 15.9±0.2 ^c | 1.4±0.3 ^a | 10.3±0.6 | 81.8±0.4 ^a | 21.1±0.3 ^b | 13.8±0.3 ^b | 37.2±0.2 ^a | 13.7±0.1 ^b |
| F values | 17.7 | 17.7 | 788.8 | 1164.9 | 0.048 | 278.3 | 442.6 | 455.6 | 336.8 | 2970.9 | 9702.8 |
| p values | 0.003 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.953 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Nutritive value of <i>P. pulmonarius</i> grown on some local residues | | | | | | | | | | | |
| MS PP (1:1) | 91.8±0.3 ^x | 8.2±0.3 ^y | 311.3±4.9 ^x | 30.9±2.7 ^x | 1.5±0.6 ^x | 5.3±0.2 ^x | 86.4±0.2 ^x | 43.6±3.5 ^y | 20.4±2.1 ^x | 16.2±1.6 ^y | 0.1±0.1 ^x |
| MS-PS (1:1) | 92.4±0.1 ^y | 7.6±0.1 ^x | 313.9±4.4 ^x | 27.3±1.6 ^x | 1.9±0.6 ^x | 6.4±0.1 ^y | 86.0±1.0 ^x | 46.8±1.1 ^y | 20.4±1.6 ^x | 13.6±0.2 ^x | 0.3±0.1 ^x |
| MS | 92.5±0.2 ^y | 7.5±0.2 ^x | 313.5±5.1 ^x | 38.6±1.1 ^y | 1.7±0.2 ^x | 5.4±0.4 ^x | 87.1±0.4 ^y | 35.9±2.1 ^x | 21.8±1.0 ^x | 15.2±0.7 ^{xy} | 0.1±0.1 ^x |
| F value | 9.2 | 9.2 | 0.2 | 27.2 | 0.7 | 34.5 | 12.4 | 15.6 | 0.7 | 4.8 | 4.8 |
| p value | 0.015 | 0.015 | 0.785 | 0.001 | 0.514 | 0.001 | 0.007 | 0.004 | 0.534 | 0.046 | 0.057 |

MS: *Medicago sativa* L., PP: *Prangos pabularia* Lindl., PS: *Poplar* sawdust.

Each value is expressed as mean ± SD of triplicate analysis (n=3).

Values with different small letters in the same column are significantly different at the level of 0.05 ($p < 0.05$)

Nitrogen free extract: % dry matter - (% crude fat + % crude ash + % crude protein + % crude cellulose)

Organic matter: % dry matter - % crude ash

Cellulose: ADF- Lignin, Hemicellulose: NDF - ADF

^{a,b,c} : Comparison between substrates, ^{x,y,z} : comparison in different culture media

The energy (kcal): 4 x (protein + carbohydrate) + 9 x fat

The fruit bodies of *P. pulmonarius* grown on culture medium obtained from different agricultural wastes and their mixture in the present study were determined 91.8-92.5% dry matter, 311.3-313.9 kcal energy, 27.3-38.6% crude protein, 1.5-1.9% crude fat, 5.3-6.4% crude ash, 86.0-87.1% organic matter and 35.9-46.8% nitrogen free extract of dry weight, respectively. At the same time cellulose, hemicellose and lignin contents were determined as 13.6-16.2%, 20.4-21.8% and 0.1-0.3% (see Table 1). The crude fat, energy, lignin and hemicellulose contents of fruiting bodies were not significantly different among substrates ($p > 0.05$), but can changeable in other nutrient composition and polymeric substance ($p < 0.05$) as shown in Table 1. Because analysis of the main components of *P. pulmonarius* has been revealed differences in their values as depending on the nature of the cultivation substrates.

The highest value of dry matter contents was obtained from MS (92.5%) and MS-PS (1:1) (92.4%), while lowest value was obtained from MS-PP (1:1) substrate (91.8%). In previous studies, it was reported that fresh mushrooms have approximately 90% moisture and 10% dry matter, and dried mushrooms have approximately 90% dry matter and 10% moisture (Ragunathan et al., 1996; Manzi et al., 1999; Ragunathan and Swaminathan, 2003; Kırbağ and Volkan, 2014; Sardar et al., 2017; Finimundy et al.,

2018). It is seen that the values obtained in the study are consistent when compared with the previous reports. The variation in the moisture percentage of the mushroom depends on the species, time of harvest, growth, storage condition, substrate and other parameters related to the growth environment such as temperature and relative humidity (Guillamon et al., 2010; Reis et al., 2012).

Ash contents ranged from 5.3% to 6.4% and were significantly different on all substrates ($p < 0.05$, see Table 1). Ash contents were previously reported 4.4-13.7% in *Pleurotus* spp., *A. bisporus* and *L. edodes* (Ragunathan et al., 1996; Mau et al., 1998; Manzi et al., 1999; Yang et al., 2001; Wang et al., 2001; Rashad and Abdou, 2002; Ragunathan and Swaminathan, 2003; Oyetayo and Akindahunsi, 2004; Furlani and Godoy, 2007; Akyüz and Kırbağ, 2009; Akyüz and Kırbağ, 2010ab; Kırbağ and Volkan, 2014; Finimundy et al., 2018). It has been observed that the ash content of *P. pulmonarius* was similar to with the ash content in those studies.

In general, mushrooms are very low in fat; the fat fraction is mainly composed of unsaturated fatty acids. The crude fat contents of *P. pulmonarius* were not significantly different among substrates ($p > 0.05$, see Table 1). Minimum fat level was 1.5% on MS-PP (1:1) and maximum was 1.9% on MS-PS (1:1) as seen in Table 1. Fat contents were previously reported

0.95-3.16% in *Pleurotus* spp. (Ragunathan and Swaminathan, 2003), 0.3-4.1% in *P. eryngii* var. *eryngii* and *P. eryngii* var. *ferulae* (Akyüz and Kırbag, 2009; Akyüz and Kırbag, 2010a), 0.5-4.5% in *Pleurotus* spp. (Kırbag and Volkan, 2014), 1.1-4.0% in *Pleurotus* spp. (Ragunathan et al., 1996), 1.16% in *P. sajor-caju* (Finimundy et al., 2018), 2.6-4.7% in *P. sajor-caju* (Oyetayo and Akindahunsi, 2004), 2.16% in *P. ostreatus* (Yang et al., 2001), 4.36-6.4% in *P. ostreatus* (Rashad and Abdou, 2002), 4.3-4.7% (Wang et al., 2001), 4.30-5.42% in *Pleurotus* spp., *A. bisporus* ve *L. edodes* (Furlani and Godoy, 2007). It has been observed that the fat content of *P. pulmonarius* was similar to with the fat contents in those studies.

Organic matters were determined the highest (87.1%) on MS substrate, while the minimum values (86.0% and 86.4%) were determined from MS-PP (1:1) and MS-PS (1:1) substrates ($p < 0.05$, see Table 1). Organic matters contents were previously reported 76.0-84.0% in *A. bisporus* and *Pleurotus* spp. (Akyüz and Kırbag, 2010b), 85.1-87.4% in *P. eryngii* var. *eryngii* and *P. eryngii* var. *ferulae* (Akyüz and Kırbag, 2009; Akyüz and Kırbag, 2010a). The findings obtained were supported by previous findings in the aforementioned studies.

Recently, mushroom origin proteins have been gained the attention of food industry players and scientific community, their rich essential amino acid and high nutritional value when compared to vegetables (Bach et al., 2017). Therefore, the use of edible mushrooms for the development of protein-rich food products can encourage its utilization while offering an attractive alternative to an animal protein source (Gonzales et al., 2021). In this study, the highest value of crude protein (38.6%) was obtained from MS while the lowest value (27.3% and 30.9%) was obtained from MS-PS (1:1) and MS-PP (1:1) substrates and was found to be significantly different ($p < 0.05$, see Table 1). Protein contents were previously reported 25.6-44.3% in *Pleurotus* spp. (Ragunathan and Swaminathan, 2003), 8.5-29.9% in *P. eryngii* var. *eryngii* and (Akyüz and Kırbag, 2009; Akyüz and Kırbag, 2010a), 26.3-39.3% in *Pleurotus* spp. (Kırbag and Volkan, 2014), 27.8-41.6% in *A. bisporus* and *Pleurotus* spp. (Akyüz and Kırbag, 2010b), 26.9-42.5% in *Pleurotus* spp. (Ragunathan et al., 1996), 17.29% in *P. sajor-caju* (Finimundy et al., 2018), 14.55-26.34% in *P. sajor-caju* (Oyetayo and Akindahunsi, 2004), 23.9% in *P. ostreatus* (Yang et al., 2001), 29.91-38.01% in *P. ostreatus* (Rashad and Abdou, 2002), 41-53% in *P. ostreatus* (Wang et al., 2001), 18.98-28.45% in *Pleurotus* spp., *A. bisporus* and *L. edodes* (Furlani and Godoy, 2007). In this study, it is seen that the crude protein value of *P. pulmonarius* is higher than some (Yang et al., 2001; Rashad and Abdou, 2002; Oyetayo and Akindahunsi, 2004; Furlani and Godoy, 2007; Akyüz and Kırbag, 2009; Akyüz and Kırbag,

2010; Finimundy et al., 2018) and more variable than some (Ragunathan et al., 1996; Wang et al., 2001; Ragunathan and Swaminathan, 2003; Akyüz and Kırbag, 2010; Kırbag and Volkan, 2014) compared to previous studies. It is known that the protein content of mushrooms varies according to the genetic structure of the species, physical and chemical differences in the growing environment, the nature and nutrient content of the substrate used for cultivation, the mushroom strain, the post harvest analysis time, and the development stage (Jiskani, 2001; Gothwal et al., 2012).

Edible mushrooms are highly valued as a good source of carbohydrate and their contents varies usually range from 26.7% to 76.2% of dry weight (Ragunathan et al., 1996; Yang et al., 2001; Wang et al., 2001; Rashad and Abdou, 2002; Ragunathan and Swaminathan, 2003; Oyetayo and Akindahunsi, 2004; Furlani and Godoy, 2007; Akyüz and Kırbag, 2010ab; Kırbag and Volkan, 2014; Finimundy et al., 2018). The highest value (46.8% and 43.6%) for nitrogen free extract contents were obtained from MS-PS (1:1) and MS-PP (1:1) and was significantly different from other substrate ($p < 0.05$), while the lowest value (35.9%) for nitrogen free extract content was obtained from MS substrate (Table 1). Nitrogen free extracts are similar to that reported in the previous studies (Ragunathan et al., 1996; Wang et al., 2001; Rashad and Abdou, 2002; Ragunathan and Swaminathan, 2003; Oyetayo and Akindahunsi, 2004; Kırbag and Volkan, 2014), lower than that reported earlier (Yang et al., 2001; Furlani and Godoy, 2007; Finimundy et al., 2018), and higher than previously reported (Akyüz and Kırbag, 2010ab).

Based on the crude protein, carbohydrate and fat contents, the energy value of fruit bodies of *P. pulmonarius* were calculated ($p > 0.05$, see Table 1). The energy values of *P. pulmonarius* were calculated to be 311.3, 313.5 and 313.9 (kcal), for MS-PP (1:1), MS and MS-PS (1:1), respectively. The energy values were observed to be 272, 316, 288, and 304 kcal for *P. sajor-caju*, 280, 298, 287, and 284 kcal for *Pleurotus platypus* Sacc., and 295, 274, 307, and 325 kcal for *Pleurotus citrinopileatus* Singer (Ragunathan and Swaminathan, 2003), 267, 292, 308, 285, and 329 kcal for *P. sajor-caju*, 298, 302, 286, 291, and 293 kcal for *P. platypus*, and 277, 319, 269, 313, and 327 kcal for *P. citrinopileatus* (Ragunathan et al., 1996), 384 kcal for *P. sajor-caju* (Finimundy et al., 2018). When the obtained results are compared with previous studies (Ragunathan et al., 1996; Ragunathan and Swaminathan, 2003), it has been observed that the energy value of *P. pulmonarius* is higher. But some values are different than those reported by other researchers (Ragunathan et al., 1996; Ragunathan and Swaminathan, 2003; Finimundy et al., 2018).

The highest lignin content of *P. pulmonarius* was seen in the MS-PS (1: 1) substrate (0.3%), while the lowest value was seen in the MS and MS-PP (1: 1) substrate (0.1%). Cellulose contents ranged from 13.6% to 16.2% and was changeable on all substrates ($p < 0.05$, see Table 1). Hemicellulose were determined to be the highest (21.8%) on MS substrate, while the minimum values (20.4%) were determined from MS-PP (1:1) and MS-PS (1:1) substrates ($p > 0.05$, see Table 1). In previous studies, cellulose, hemicellulose, and lignin of the fruit bodies contents were reported as 28.4-44.8%, 27.3-41.2% and 13.0-20.0% respectively (Ragunathan et al., 1996). In another study, the same values were reported 27.4-46.2%, 23.40-40.30%, and 14.00-20.40% (Ragunathan and Swaminathan, 2003). The levels of polymeric substance of fruit bodies of *P. pulmonarius* were relatively low compared to earlier published reports (Ragunathan et al., 1996; Ragunathan and Swaminathan, 2003).

CONCLUSION and RECOMMENDATION

In the present study, it was observed that the type of substrate used for cultivation of *P. pulmonarius* could influence the nutrient composition such as energy, crude protein and nitrogen free extract of the fruit bodies (shown Table 1). *P. pulmonarius* contain different amounts of energy, protein, nitrogen free extract, polymeric substance such as cellulose and lignin depending on the composition of the substrates used for cultivation. The use of *P. pulmonarius* as food or ingredient for processing functional products is promising because of its nutritional attributes and potential benefits on health.

ACKNOWLEDGMENTS

The second author thanks to Turkey's Council of Higher Education (YÖK) for 100/2000 PhD National Scholarship Program.

Researchers' Contribution Rate Statement

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

- Akyuz M, Kırbağ S 2009. Nutritive value of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. var. *eryngii* grown on various agrowastes. Philipp Agric Sci 92(3): 327-331.
- Akyuz M, Kırbağ S 2010a. Effect of various agro-residues on nutritive value of *Pleurotus eryngii* (DC. ex Fr.) Quel. var. *ferulae* Lanzi. J Agric Sci 16(2): 83-88.
- Akyüz M, Kırbağ S 2010b. Nutritive value of edible wild and cultured mushrooms. Turk J Biol 34(1): 97-102.
- Akyüz M, Oruk İ, Kırbağ S 2019. Farklı yetiştirme ortamlarının kültür mantarı *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer'in gelişimi ve verimi üzerine etkileri, presented at the International Engineering and Science Symposium, 20-22 June 2019, Siirt, Turkey.
- AOAC 1990. Official methods of analysis, Association of Official Analytical Chemists. Agric Chemicals; Contaminants; Drugs. Helrich K (Editors). 15th, 1990.
- Bach F, Helm CV, Bellettini MB, Maciel GM, Haminiuk CWI 2017. Edible mushrooms: a potential source of essential amino acids, glucans and minerals. Inter J Food Sci Tech 52(11): 2382-2392.
- Barbosa JR, dos Santos Freitas MM, da Silva Martins LH, de Carvalho Junior RN 2020. Polysaccharides of mushroom *Pleurotus* spp.: New extraction techniques, biological activities and development of new technologies. Carbohydr Polymer 229: 115550.
- Bazanella GCS, Souza DF, Castoldi R, Oliveira RF, Bracht A, Peralta RM 2013. Production of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus pulmonarius* in solid-state cultures and application in dye decolorization. Folia Microbiol 58: 641e647.
- Buchanan PK 1993. Identification, names and nomenclature of common edible mushrooms. In S. T. Chang, J. A. Buswell, & S. Chiu (Eds.), Mushroom biology and mushroom products (pp. 21e32). Hong Kong: The Chinese University Press.
- Carrasco-González JA, Serna-Saldívar SO, Gutiérrez-Urbe JA 2017. Nutritional composition and nutraceutical properties of the *Pleurotus* fruiting bodies: Potential use as food ingredient. J Food Compos Anal 58: 69-81.
- Corrêa RCG, Brugnari T, Bracht A, Peralta RM, Ferreira IC 2016. Biotechnological, nutritional and therapeutic uses of *Pleurotus* spp. (Oyster mushroom) related with its chemical composition, A review on the past decade findings. Trend Food Sci Technol 50: 103-117.
- Crampton EW, Maynard LA 1983. The relation of cellulose and lignin content to nutritive value of animal feeds. J Nutr 15: 383-395.
- FAO 2018. Mushrooms and truffles world production. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (12.02.2018).
- Finimundy TC, Barros L, Calhelha RC, Alves MJ, Prieto MA, Abreu RM, ... & Ferreira IC 2018. Multifunctions of *Pleurotus sajor-caju* (Fr.) Singer: A highly nutritious food and a source for bioactive compounds. Food Chem 245: 150-158.

- Furlani RPZ, Godoy HT 2007. Valor nutricional de cogumelos comestíveis nutritional value of edible mushrooms. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27(1): 154-157.
- González A, Nobre C, Simões LS, Cruz M, Loredo A, Rodríguez-Jasso RM, Belmares R 2021. Evaluation of functional and nutritional potential of a protein concentrate from *Pleurotus ostreatus* mushroom. *Food Chem* 346: 128884.
- Gothwal R, Gupta A, Kumar A, Sharma S, Alappat BJ 2012. Feasibility of dairy waste water (DWW) and distillery spent wash (DSW) effluents in increasing the yield potential of *Pleurotus flabellatus* (PF 1832) and *Pleurotus sajor-caju* (PS 1610) on bagasse. *3 Biotech* 2: 249-257.
- Guillamon E, García-Lafuente A, Lozano M, Rostagno MA, Villares A, Martínez JA 2010. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia* 81: 715-723.
- Jiskani MM 2001. Energy potential of mushrooms. *DAWN Econ. Bus Rev* Oct 15-21, p.4.
- Kırbağ S, Korkmaz V 2014. Değişik tarımsal atıkların bazı kültür mantarı türlerinin besin değerleri üzerine etkisi. *Artvin Çoruh Üniv Orman Fak Derg* 15: 126-131.
- Knop D, Yarden O, Hadar Y 2015. The ligninolytic peroxidases in the genus *Pleurotus*: divergence in activities, expression, and potential applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 99: 1025-1038.
- Lechner BE, Wright JE, Alberto E 2004. The genus *Pleurotus* in Argentina. *Mycologia* 96(4):845-858.
- Li Y, Li TH, Yang ZL, Tolgor Bau, Dai YC 2015. Atlas of Chinese macrofungal resources. Central Plains farmers Press, Henan, 1351 pp.
- Ma G, Yang W, Zhao L, Pei F, Fang D, Hu Q 2018. A critical review on the health promoting effects of mushrooms nutraceuticals. *Food Sci Human Wellness* 7: 125-133.
- Maity P, Sen IK, Chakraborty I, Mondal S, Bar H, Bhanja SK, Maity GN 2021. Biologically active polysaccharide from edible mushrooms: A review. *Int J Biol Macromol* 172: 408-417.
- Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L 1999. Nutrients in edible mushrooms: an inter species comparative study. *Food Chem* 65: 477-482.
- Mleczek M, Budka A, Siwulski M, Mleczek P, Gąsecka M, Jasińska A, ... Rzymiski P 2020. Investigation of differentiation of metal contents of *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* and *Pleurotus ostreatus* sold commercially in Poland between 2009 and 2017. *J Food Comp Anal* 90: 103488.
- Oyetayo FL, Akindahunsi AA 2004. Nutrient distribution in wild and cultivated edible mushroom, *Pleurotus sajor-caju*. *J Food Agr Environ* 2(2): 166-168.
- Pegler DN 1975. The classification of the genus *Lentinus* Fr. (Basidiomycota). *Kavaka* 3: 11-20.
- Ragunathan R, Gurusamy R, Palaniswamy M, Swaminathan K 1996. Cultivation of *Pleurotus* spp. on various agro-residues. *Food Chem* 55(2): 139-144.
- Ragunathan R, Swaminathan K 2003. Nutritional status of *Pleurotus* spp. grown on various agro-wastes. *Food Chem* 80(3): 371-375.
- Rashad MM, Abdou HM 2002. Production and evaluation of *Pleurotus ostreatus* mushroom cultivated on some food processing wastes. *Adv Food Sci* 24(2): 79-84.
- Reis FS, Barros L, Martins A, Ferreira IC 2012. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food Chem Toxicol* 50(2): 191-197.
- Royse DJ, Baars J, Tan Q 2017. Current overview of mushroom production in the world. In: Daniel J. Edible and medicinal mushrooms: technology and applications. John Wiley & Sons. USA.
- Sardar H, Ali MA, Anjum MA, Nawaz F, Hussain S, Naz S, Karimi SM 2017. Agro-industrial residues influence mineral elements accumulation and nutritional composition of king oyster mushroom (*Pleurotus eryngii*). *Scientia Horticulturae* 225: 327-334.
- Stamets P 2000. Growth Parameters for Gourmet and Medicinal Mushroom Species". Growing gourmet and medicinal mushrooms = [Shokuyo oyobi yakuyo kinoko no sabai] (3rd ed.). Berkeley, California, USA: Ten Speed Press. Chapter 21, pp. 316-320, ISBN 978-1-58008-175-7.
- Valverde ME, Hernández-Pérez T, Paredes-López O 2015. Edible mushrooms: improving human health and promoting quality life. *Int J Microbiol* 2015:1-14.
- Wang D, Sokada A, Suzuki M 2001. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. *Bioresource Technology* 78: 293-300.
- Wasser SP 2011. Current findings, future trends, and unsolved problems in studies of medicinal mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1323-1332.
- Wasser SP 2014. Medicinal mushroom science, current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomed J* 37: 345-356.
- Wasser SP, Weis AL 1999. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms, current perspective (review). *Int J Med Mushrooms* 1: 31-62.
- Wu N, Tian F, Moodley O, Song B, Jia C, Ye J, Li C 2019. Optimization of agro-residues as substrates for *Pleurotus pulmonarius* production. *AMB Express* 9(1): 1-9.
- Yang JH, Lin HC, Mau JL 2001. Non-volatile taste components of several commercial Mushrooms. *Food Chem* 72: 465-471.



Farklı Sürelerde Bakır Etkisinde Kalan Tatlısu Midyelerinde (*Unio tigridis*) Antioksidan Enzim Tepkilerinin İncelenmesi

Esin G. CANLI[✉]

Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Niğde/Türkiye
<https://orcid.org/0000-0002-0132-3712>

✉: egcanli@gmail.com

ÖZET

Bu çalışmada, tatlısu midyeleri (*Unio tigridis*) bakırın (CuSO_4 olarak) farklı derişimlerine (0, 30, 90 $\mu\text{g L}^{-1}$) farklı sürelerde (0, 7, 14, 21gün) maruz bırakıldıktan sonra, hepatopankreas ve solungaç dokularında katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon redüktaz (GR) ve glutatyon S-transferaz (GST) gibi antioksidan enzimlerinin tepkileri incelenmiştir. Midyeler 21 gün süren deneyler esnasında kültür ortamında yetiştirilen tek hücreli algler (*Chlorella vulgaris*) ile (yaklaşık 300,000 alg/ml) beslenmişlerdir. Kontrol midyelerde 0-21 günler arasında hiçbir enzim aktivitesinde anlamlı ($P>0.05$) değişim olmamıştır. Deneyler sonunda bakır etkisiyle herhangi bir mortalite gözlenmezken, midyelerin solungaç ve hepatopankreas dokularında antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı ($P<0.05$) artışlar olmuştur. Buna göre antioksidan enzim aktivitelerindeki en fazla anlamlı artış en uzun etki süresinde olmuştur. CAT ve SOD gibi enzimler, antioksidan savunma sisteminin öncül enzimleri olması nedeniyle en fazla anlamlı artışın görüldüğü enzimler olmuşlardır. Buna rağmen, solungaç ve hepatopankreas dokularının toplam protein düzeyinde anlamlı bir değişim olmamıştır ($P>0.05$). Bu çalışma, letal olmayan bakırın midyelerde oksidatif strese neden olduğunu vurgulamıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 05.10.2021

Kabul Tarihi : 15.11.2021

Anahtar Kelimeler

Metal

Bakır

Midye

Antioksidan

Toksosite

Investigations on the Responses of Antioxidant Enzymes in Freshwater Mussels (*Unio tigridis*) Exposed to Copper in Differing Durations

ABSTRACT

In this study, freshwater mussels (*Unio tigridis*) were exposed to different concentrations (0, 30, 90 $\mu\text{g L}^{-1}$) of copper (as CuSO_4) for different durations (0, 7, 14, 21 days) and then the responses of the antioxidant enzymes such as, catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) were investigated. Mussels were fed with the unicellular algae (*Chlorella vulgaris*) (approximately 300,000 algae ml^{-1}) cultured in the laboratory conditions. There was no mussel mortality following copper exposures. Likewise, there was no significant ($P>0.05$) change in enzyme activities of control mussels between 0-21 days. There were significant ($P<0.05$) increases in antioxidant enzyme activities in the gill and hepatopankreas, exposure durations playing predominant roles. Since enzymes such as CAT and SOD are the first defense lines of the antioxidant systems, the most increases were observed in the activities of these enzymes. Despite this, there was no significant change in total protein levels of tissues ($P>0.05$). This study showed that that sublethal and low copper concentrations could have toxic effects for mussels, emphasizing oxidative stress of mussels.

Research Article

Article History

Received : 05.10.2021

Accepted : 15.11.2022

Keywords

Metal

Copper

Mussel

Antioxidant

Toxicity

Atıf İçin: Canlı EG 2022. Farklı Sürelerde Bakır Etkisinde Kalan Tatlısu Midyelerinde (*Unio tigridis*) Antioksidan Enzim Tepkilerinin İncelenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 31-41. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.1005168.

To Cite: Canlı EG 2022. Investigations on the Responses of Antioxidant Enzymes in Freshwater Mussels (*Unio tigridis*) Exposed to Copper in Differing Durations. KSU J. Agric Nat 25 (1): 31-41. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.1005168.

GİRİŞ

Çevreye salınan her türlü kirleticinin son durağı genellikle sucul ortamlardır. Bu nedenle sucul ortamları ve bu ortamlarda yaşayan organizmaların sağlığını kontrol etmek çevrebilimcilerin önem verdikleri konuların başında gelmektedir. Metaller insanlar tarafından çok uzun yıllardır kullanılmış olmasına karşın, çevreye fazla miktarda salınmaları sanayileşme devrimiyle başlamıştır. Bunun anlamı, 20. yüzyılın başlamasıyla birlikte metal kirliliği de başlamıştır. Clark (1989) sulara kirlilik ve kontaminasyon terimleri arasında bazı farklar olduğunu belirtmiştir. Buna göre su kirliliği, metallerin insan tarafından doğrudan veya dolaylı olarak çevreye salınması sonucu sucul organizmaların çeşitli şekillerde zarar görmesi şeklinde açıklanırken, kontaminasyon sudaki metal seviyelerinin normal değerlerden daha yüksek olması şeklinde açıklanmaktadır. Başka bir deyişle, kontaminasyon bir uyarı sinyali verebilir, ancak kirlilik olabilmesi için insan faaliyetlerinden kaynaklanmış olması ve organizmalar üzerinde olumsuz etkilerinin gözlenmesi gerekir. Tatlı sular denizlere göre çok küçük hacimlere sahip olduklarından, kirlenmenin etkilerine çok daha fazla maruz kalabilmektedirler. Bunun anlamı, tatlı sular denize göre daha hassas ekolojik ortamlardır.

Sucul ortamların metal kontaminasyonunun etkisini doğrudan gözlemleyebilmek genellikle zordur. Bunun için biyobelirteç denilen çeşitli enzimatik veya enzimatik olmayan moleküller kirleticilerin etkilerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Böylece sucul organizmaların yaşadığı stres ve içinde buldukları fizyolojik durum hakkında somut veriler elde edilebilmektedir (Wood ve ark., 2012a ve b). Midyeler çok önemli indikatör organizmalardır ve çevresel kirliliğin veya kontaminasyonunun belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Nugroho ve Frank, 2012; Goswami ve ark., 2014; Zhou ve ark., 2021). Bunun en önemli nedenleri, midyelerin beslenme şekilleri ve yerleşik yaşam tarzlarıdır. Suyu filtre ettiklerinden suda bulunan metallerin midyeler tarafından yoğun bir şekilde alınması ve besin zinciri yoluyla taşınması, diğer sucul canlılara göre daha fazla olabilmektedir. Bu bakımdan midyeler besin zinciri açısından da çok önemli organizmalardır. Kirliliğin potansiyel etkilerini belirlemek için midyelerin solungaç ve hepatopankreas gibi aktif organlarında biyobelirteç analizleri yaparak hem midye biyolojisi açısından hem de insanların bir besin kaynağı olması açısından önemli veriler elde edilebilir (Doyotte ve ark., 1997; Sukhovskaya ve ark., 2019). Bu nedenle, farklı sistemlere özgü enzim aktivitelerinin çeşitli organlarda belirlenmesi daha sonra meydana gelebilecek çok ciddi hasarlar açısından “erken uyarı sinyali” olarak kullanılabilmesi öne sürülmüştür (Canli ve Stagg, 1996).

Antioksidan enzimler aerobik organizmalarda gerek organizmasının kendi metabolizmasının ürettiği, gerekse dışarıdan alınan kimyasalların neden olduğu oksidatif stresi engellemek için çalışan bir enzim grubudur. Bu enzimler ve görevleri kısaca şu şekilde açıklanabilir. SOD, süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksit'e dönüştürür. CAT hidrojen peroksiti suya indirger. GPX, hidrojen peroksiti azaltır, peroksitleri ve süperoksit radikallerini giderir ve ayrıca okside glutasyonu, indirge glutatona dönüştürür. GST, GSH'nin ksenobiyotiklerle konjugasyonunu katalize eder. GR, okside olmuş glutasyonu bir elektron donörü görevi gören GSH'ye indirger. Organizmalarda serbest radikaller ve antioksidan savunma sistemleri arasında doğal bir denge söz konusudur. Bu dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (Winston, 1991). Bu bakımdan antioksidan sistemin enzimleri çevresel faktörlerin neden olduğu oksidatif stres ile başa çıkmada önemlidir (Goswami ve ark., 2014; Canli ve ark., 2019; Zhou vd, 2021). Antioksidan enzim aktiviteleri sucul ve karasal organizmaların karşılaştığı stres hakkında bilgi vermesi açısından önemlidir ve bu nedenle toksikolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Wood ve ark., 2012a ve b).

Doğal sucul ortamlarda midyelerdeki metal birikimi ve toksitesi üzerine yapılmış çalışmalar, büyük şehirler ve sanayii bölgeleri dışında midyelerdeki metal birikimini toksik düzeylerde olmadığını vurgulamıştır. Benzer şekilde, bu çalışmada kullanılan kontrol midyelerin dokularında da metal birikimi çok az miktarlarda ölçüldüğünden, midyelerin doğal ortamlarında da metal kirliliği olmadığını vurgulamıştır (Canli ve Canli, 2021a). Laboratuvar deneyleri bakır dahil metal etkisinde kalmanın midyelerin antioksidan sistemini harekete geçirdiği ve antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı artışların yanında azalışların da olduğunu göstermiştir (Rajalakshmi ve Mohandas, 2005; Company ve ark., 2008; Jorge ve ark., 2013; Mlouka ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2021; Canli ve Canli, 2021b). Bu çalışmalar, metallerin midyelerde antioksidan savunma sistemini etkilerken metal derişiminin yanında, etki süresi, suyun kimyasal özellikleri ve türün biyolojik özelliklerinin de önemli olduğunu vurgulamıştır. Böylece, bakırın süreye bağlı olarak tatlısu midyelerinin antioksidan sistem enzimleri üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla bu çalışma planlanmıştır. Bunun için, *U. tigridis* türü tatlısu midyeleri farklı bakır derişimlerine (0, 30, 90 µg/L) farklı sürelerde (0, 7, 14 ve 21 gün) maruz bırakılarak CAT, SOD, GPX, GR ve GST gibi antioksidan enzim aktiviteleri solungaç ve hepatopankreas dokularında ölçülmüştür. Böylece, düşük derişimlerde kronik bakır etkisinin midye antioksidan sistemine olan toksik etkileri değerlendirilmiştir.

MATERYAL ve METOD

Deney Şartları

Bu çalışmada Unionidae familyasına ait midyeler (*Unio tigridis*) kullanılmıştır. Midyeler profesyonel dalğıçlar yardımıyla Gölbaşı gölünden (Hatay) 1-6 metre derinliklerde toplanmıştır (36° 30'17.6 "N 36° 29'10.8" E). Toplanan midyeler uygun şartlarda hızlı bir şekilde laboratuvara getirilip, iki hafta süresince laboratuvar şartlarına uyumları sağlanmıştır. Bunun için midyeler cam akvaryumlara (40x40x120 cm; 120 L) alınarak deneyin yapılacağı su (pH; 8.3±0.08, toplam sertlik; 304.2±21.2 mg CaCO₃ L⁻¹, alkalinite; 195±11.4 mg Ca₂CO₃L⁻¹, iletkenlik; 580±10.8 µS cm⁻¹) şartlarına adaptasyonları sağlanmıştır. Deneyler 22±1.0 °C laboratuvar sıcaklığında yapılmış olup, midyelere oksijen sağlamak (6.0±1.0 mg L⁻¹) için hava motorları ile havalandırma yapılmıştır. Suyun fiziksel ve kimyasal kontrolleri Thermo Scientific Orion 5-Star cihazı ile düzenli olarak yapılmıştır. Deney ortamı 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyodu ile aydınlatılmıştır. Bütün kimyasalların analitik saflıkta olmasına dikkat edilmiş olup, Sigma şirketinden sağlanmıştır.

Tek Hücreli Alg Üretimi

Midyelerin hem adaptasyon hem de deneyler esnasında beslenmelerini sağlamak amacıyla tek hücreli tatlısu alg (*Chlorella vulgaris*) üretimi yapılmıştır. Alg kültürleri, 8 L kültür ortamı içeren cam kavanozlarda tutulmuştur. Alg üretim ortamları (3NBBM+V ortamı) sürekli olarak hava ile karıştırılmış olup, ortam sıcaklığı ortalama 22±2 °C'de olmuştur. Aydınlatma floresan lambalar (Philips TLM 40W/54RS) ile 80 µmol/m²/s ışık şiddeti seviyesinde 16:8 (U:D) fotoperiyodu ile yapılmış olup, ışınım seviyesi, bir radyasyon sensörü LI-COR (LI-250) kullanılarak belirlenmiştir. Alg sayıları UV-vis spektrofotometre (Schimadzu UV-1800) kullanılarak 680 nm'de optik yoğunluk ölçümleri ile günlük olarak belirlenmiş olup, alg üretimi 680 nm'de 1513±30 rakamlarına ulaşmaya kadar bir hafta boyunca devam etmiştir. Bu algler stok algler olarak adlandırılmış ve midye beslemesinde kullanılmıştır.

Deney Protokolü

Adaptasyon sonunda, midyeler 33x33x40 cm ebatlarında olan ve 20 L çeşme suyu içeren cam akvaryumlara dağıtılmıştır. Bu dağıtımlar rastgele yapıldığından gruplar arasında midyelerin ağırlığı (30,21±1,33 g) ve uzunluğu (58,65±0,97 mm) bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir (P>0.05). Daha sonra midyeler bakırın (CuSO₄ olarak) farklı derişimlerine (0, 30, 90 µg L⁻¹) farklı sürelerde (0, 7, 14, 21 gün) maruz bırakılmıştır. Deneylerde her bir koşul için 12 midye kullanılmıştır. Deneyler sırasında, cam yüzeye tutunma, suyun buharlaşması ve bakırın dibe çökmesi gibi nedenlerle akvaryumlardaki bakır

derişimleri ve akvaryum suları her ikinci günde yenilenmiştir. Midyeler her su değişiminden önce tek hücreli tatlısu algleri (*Chlorella vulgaris*) ile beslenmiştir (yaklaşık 300,000 alg ml⁻¹ olacak şekilde). Midyelerin beslenmeleri karanlık ortamda 5 saat süre ile yapılmıştır. Farklı zaman dilimlerinde akvaryumlardan çıkartılan midyelerin önce canlı olup olmadıkları not edilmiştir. Midyelerin kabukları sıkıca kapalıysa canlı kabul edilmiştir. Ayrıca, disseksiyon sırasında da hayvanların canlılığı onaylanmıştır. Daha sonra midyeler kabukları birbirine bağlayan ön ve arka addüktör kaslarının kesilmesiyle açılmış ve dokular dissekte edilerek kullanılacakları zamana kadar -85 °C'de (Esco UUS-480A) saklanmıştır.

Antioksidan Enzim Aktivite Ölçümleri

Enzim aktivitelerinin ölçümünün yapılabilmesi için solungaç ve hepatopankreas dokuları öncelikle homojenize edilmiştir. Her deney grubu için kullanılan 12 midyenin solungaç ve hepatopankreas dokuları ikiye bölünmüş ve birleştirilmiş olup, böylece her dokudaki ölçümler 6 tekrarlı olarak yapılmıştır. Bunun için, derin dondurucuda (-85 °C) saklanan dokular eritilip tartıldıktan sonra 1/10 (w/v) oranında 100 mM KCl ve 100 mM KH₂PO₄ içeren bir tampon ile (pH 7.4) 9500 rpm'de 5 dakika süre ile buz içerisinde homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenatlar 30 dakika süre ile 10,000 rpm'de santrifüj (Hettich Universal 30 RF) edilmiş ve süpernantantlar enzim aktivitelerinin belirlenmesinde kullanılmıştır.

Antioksidan enzim aktivitelerinin ölçümü için aşağıdaki metotlar kullanılmıştır; SOD aktivitesi, 1 mL 50 mM fosfat tamponu (pH 7,8), 0,1 mM EDTA, 10 mM sitokrom c, 0,05 mM hipoksantin, 1,87 mU mL⁻¹, supernatant ve ksantin oksidaz içeren reaksiyon ortamında, 1 dk süre boyunca sitokrom c redüksiyonunun 550 nm'deki inhibisyonunun gözlemlendiği yöntemle ölçülmüştür (McCord ve Fridovich, 1969). GPX aktivitesi, 1 L son hacimde 100 mM fosfat tamponu (pH 7.4), 2 mM GSH, 0.12 mM NADPH, 2 U GR, supernatant 3 mM CHP içeren ortamda NADPH absorpsiyonunun azalışının 340 nm'de gözlenmesi sonucu ölçülmüştür (ε=6.22 µmol⁻¹ cm²) (Livingstone ve ark.,1992). CAT aktivitesi, 1 dk süreyle son hacmi 1 mL olan 75 mM fosfat tamponu (pH 7,4), 25 mM H₂O₂ ve 20 µL supernatant içeren ortamda absorpsiyonunun azalışının 240 nm'de kaydedilmesi ile ölçülmüştür (ε=0,0392 µmol⁻¹ cm²) (Lartillot ve ark., 1988; Bessey ve ark., 1946). GST aktivitesi, 1 mL'lik 100 mM fosfat tamponu (pH 7.4), 1 mM GSH, 1 mM CDNB ve supernatant içeren reaksiyon ortamındaki 340 nm'de 1 dk süreyle GSH ve CDNB konjugasyonuna bağlı absorpsiyon artışına bağlı olarak ölçülmüştür (Habig ve ark., 1974). GR aktivitesi de aynı esasa dayalı olarak 100 mM fosfat tamponu (pH 7.4), 0.1 mM NADPH, supernatant ve 1 mM GSSG içeren reaksiyon ortamında ölçülmüştür (Carlberg ve

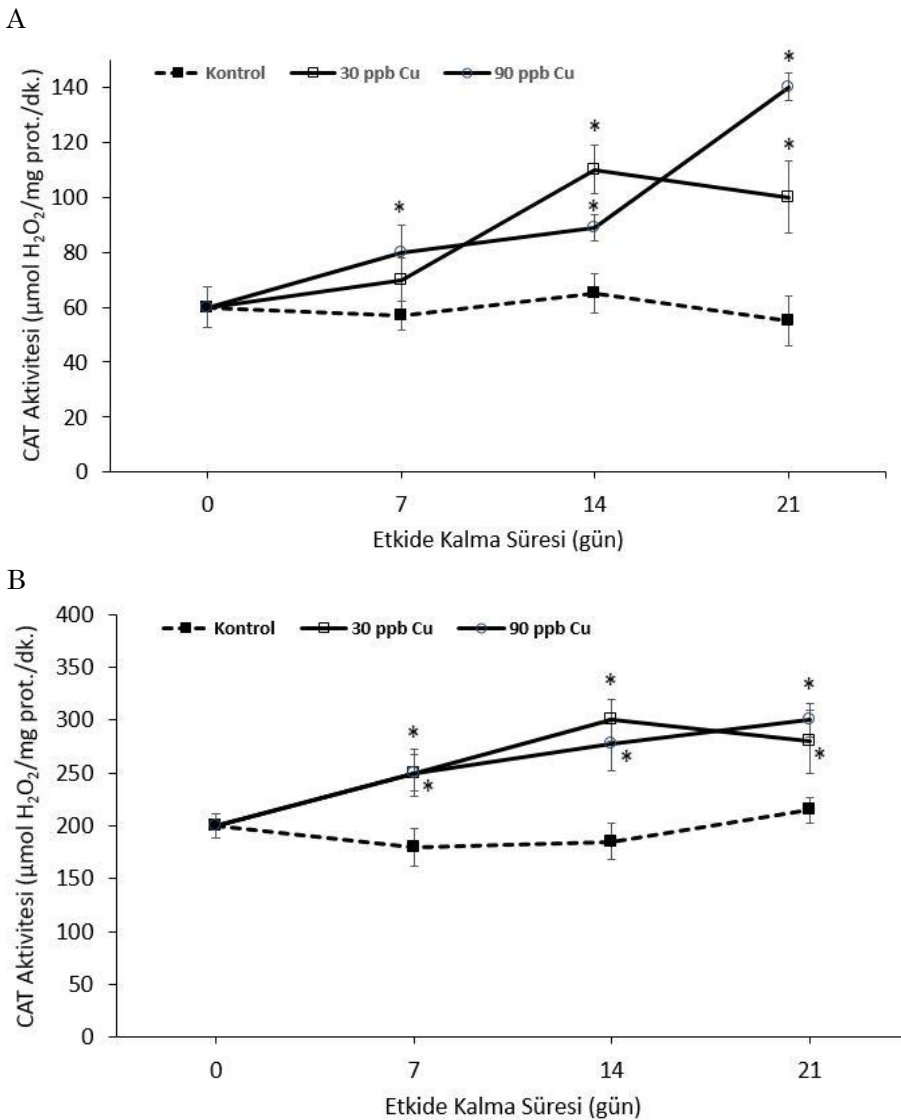
Mannervik, 1975). Protein düzeyleri Lowry ve ark. (1951) yöntemi kullanılarak ölçülmüştür.

İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin öncelikle dağılım şekilleri belirlenerek buna göre uygun istatistik testler kullanılmıştır (SPSS 20). Nonparametrik veriler Kruskal Wallis ve/veya Mann-Witney U testi ile, normal dağılım gösteren veriler ise One Way Anova ve/veya T testi ile analiz edilmiştir. Sonuçlarda verilen P değerleri Mann-Witney U testi veya T testinden elde edilen verilerdir. Elde edilen verilerin (ortalama±standart hata) grafikleri Microsoft Excel Programı ile çizildikten sonra grafik üzerinde istatistiksel önem düzeyleri de belirtilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Yirmi bir gün süren deneyler sırasında bakır etkisinde kalan midyelerde ve kontrol gruplarında herhangi bir ölüm olayı gözlenmemiştir. Deney sonuçları solungaç ve hepatopankreas dokularında bakırın oksidatif strese neden olduğunu ve bütün enzim aktivitelerinde anlamlı ($P<0.05$) artışlara neden olduğunu göstermiştir. Ancak kontrol midyelerde 0-21 gün arasında antioksidan enzim aktivitelerinde dalgalanmalar olsa da, bu değişimlerin hiçbiri istatistiki olarak anlamlı ($P>0.05$) olmamıştır. Kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreasında CAT aktivitesi ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{mg prot./dk.}$) sırasıyla 60.0 ± 7.59 ve 199.8 ± 12.03 olarak ölçülmüştür. Her iki dokuda da CAT aktivitesi anlamlı ($P<0.05$) artışlar göstermiştir (Şekil 1).

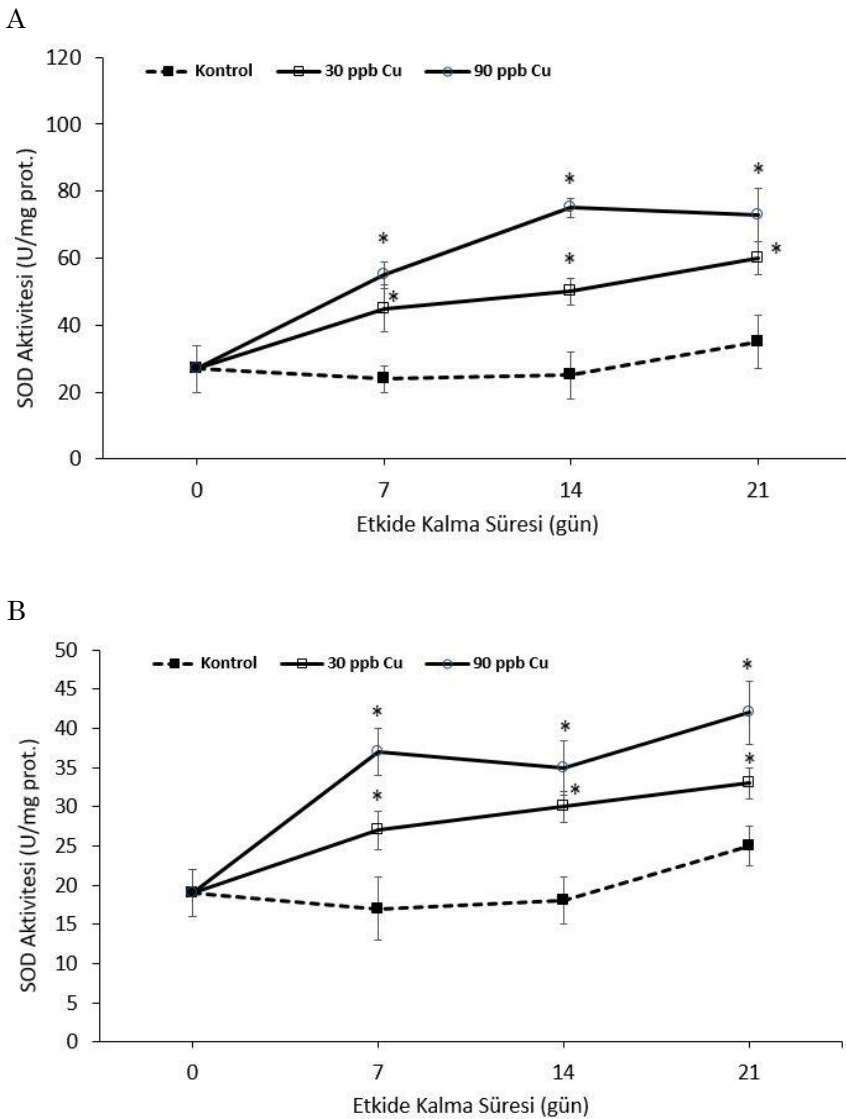


Şekil 1. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında CAT aktivitesi. * işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ($P<0.05$) farkı göstermektedir.

Figure 1. Activities of CAT in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. * indicates significant differences ($P<0.05$) among individual control group and its copper exposure groups.

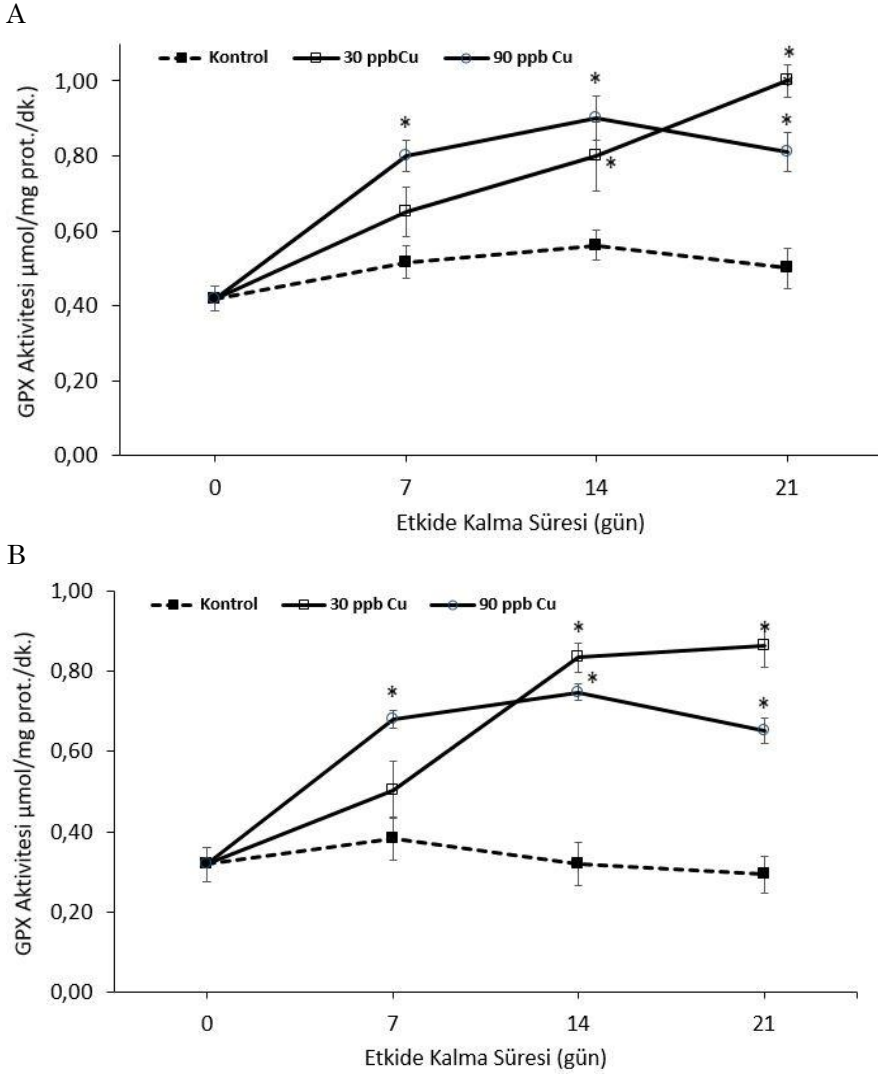
SOD aktivitesi (U/mg prot.) kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreasında sırasıyla 26.98±7.03 ve 18.98±2.95 olarak ölçülmüştür. SOD aktivitesi her iki dokuda bakır etkisiyle anlamlı artışlar ($P<0.05$) göstermiştir (Şekil 2). Kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreasında GPX aktivitesi ($\mu\text{mol/mg prot./dk.}$) sırasıyla 0.42±0.03 ve 0.32±0.04 olarak ölçülmüş olup, bakır etkisinde kalan gruplarda GPX aktivitesinde anlamlı ($P<0.05$) artışlar gözlenmiştir (Şekil 3). GR aktivitesi ($\mu\text{mol/mg prot./dk.}$) kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreasında sırasıyla 0.045±0.05 ve 0.065±0.01 olarak ölçülmüştür. Her iki dokuda da bakır etkisiyle GR aktivitesinde anlamlı

($P<0.05$) artışlar olmuştur (Şekil 4). Kontrol midyelerde GST aktivitesi ($\mu\text{mol/mg prot./dk.}$) solungaç ve hepatopankreas dokularında sırasıyla 0.11±0.032 ve 0.08±0.021 olarak ölçülmüş olup, bakır etkisinde kalan midyelerde GST aktivitesinde anlamlı ($P<0.05$) artışlar gözlenmiştir (Şekil 5). Deney başlangıcında (0. gün), kontrol midyelerin solungaç ve hepatopankreas dokularındaki toplam protein düzeyleri (mg protein/g y.a.) sırasıyla 8.03±0.97 ve 20.0±1.98 olarak ölçülmüştür. Yedinci, 14. ve 21. gün sonunda yapılan ölçümlerde toplam protein düzeylerinde dalgalanmalar olsa da, bu değişimler istatistiki olarak anlamlı ($P>0.05$) olmamıştır (Şekil 6).



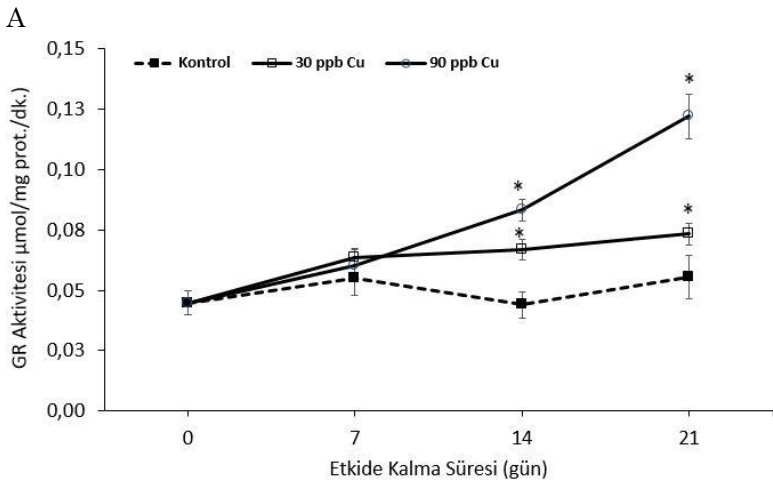
Şekil 2. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında SOD aktivitesi. * işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ($P<0.05$) farkı göstermektedir.

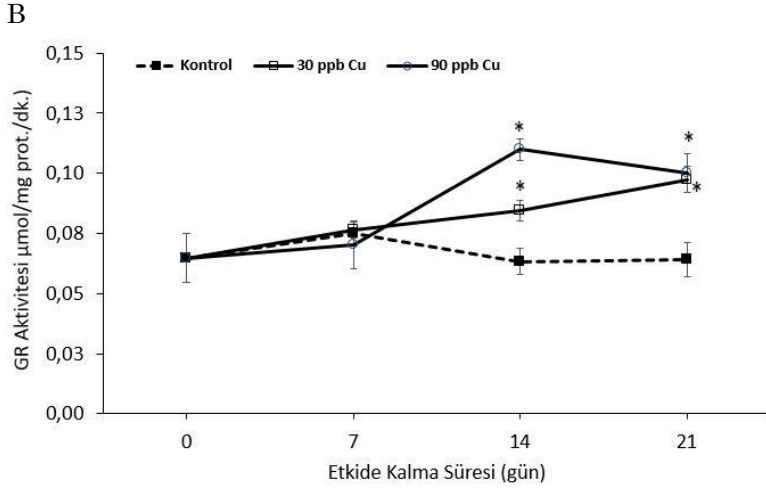
Figure 2. Activities of SOD in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. * indicates significant differences ($P<0.05$) among individual control group and its copper exposure groups.



Şekil 3. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında GPX aktivitesi. * işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ($P<0.05$) farkı göstermektedir.

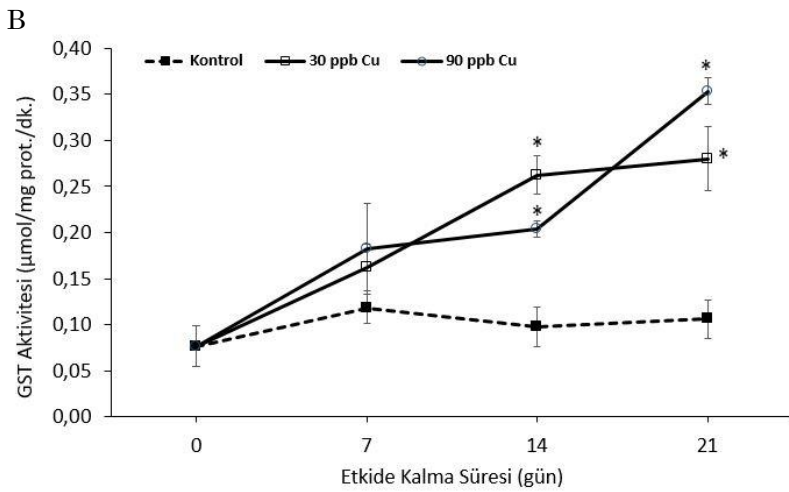
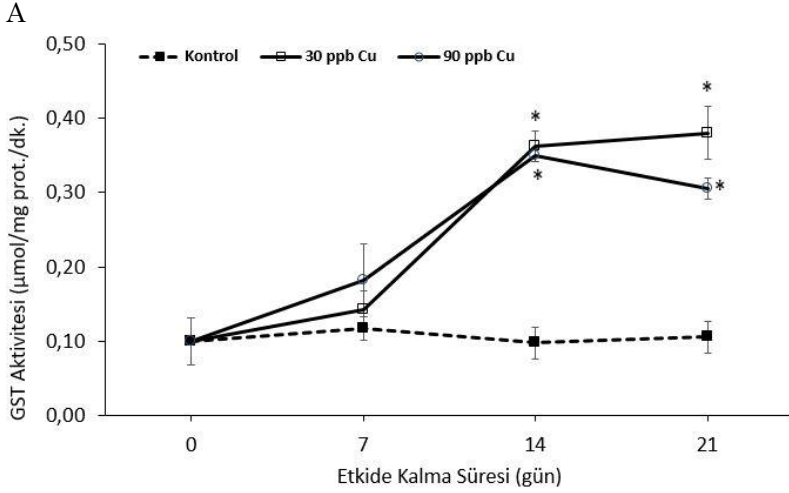
Figure 3. Activities of GPX in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. * indicates significant differences ($P<0.05$) among individual control group and its copper exposure groups.





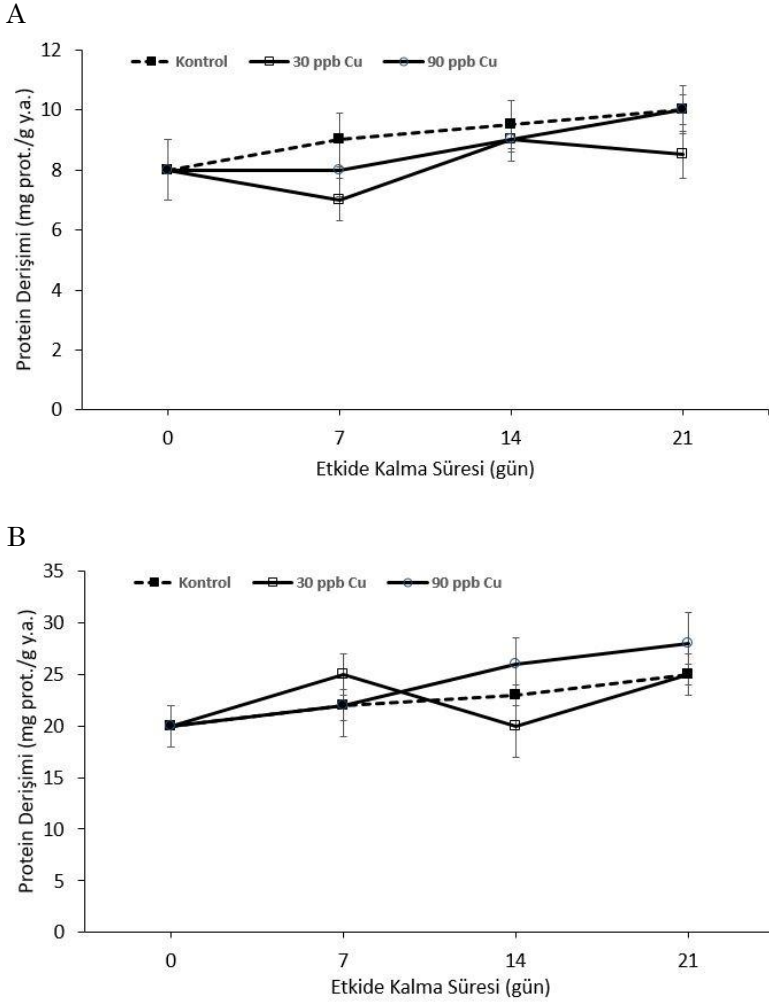
Şekil 4. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında GR aktivitesi. * işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ($P<0.05$) farkı göstermektedir.

Figure 4. Activities of GR in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. * indicates significant differences ($P<0.05$) among individual control group and its copper exposure groups.



Şekil 5. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında GST aktivitesi. * işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ($P<0.05$) farkı göstermektedir.

Figure 5. Activities of GST in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. * indicates significant differences ($P<0.05$) among individual control group and its copper exposure groups.



Şekil 6. Farklı derişim ve sürelerde bakır etkisinde kalan midyelerin solungaç (A) ve hepatopankreas (B) dokularında toplam protein derişimi. * işareti her etki süresinde kontrol grubu ile bakır etkisinde kalan midyelerdeki anlamlı ($P<0.05$) farkı göstermektedir.

Figure 6. Concentrations of total proteins in the gill (A) and digestive gland (B) of mussels exposed to copper in differing concentrations and durations. * indicates significant differences ($P<0.05$) among individual control group and its copper exposure groups.

Bu çalışmada, 21 gün süresince bakır etkisinde kalan midyelerde herhangi bir mortalitenin görülmemesi, kullanılan bakır derişimlerinin subletal olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada kullanılan bakır derişimlerinin subletal olduğu başka midyelerde de gösterilmiştir (Rajalakshmi ve Mohandas, 2005; Company ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2021). Ancak, deneylerde midye ölümlerinin gözlenmemesi, midyelerin bakır maruziyetinden etkilenmediği anlamına gelmez. Zira hem solungaç hem de hepatopankreas dokularında bütün antioksidan enzimlerin aktivitelerinde anlamlı artışlar görülmüş olması midye metabolizmasının bakıra karşı tepki verdiğini ve oksidatif stres ile başa çıkmaya çalıştığını göstermektedir.

Bilindiği gibi oksidatif stres tüm aerobik canlılar için potansiyel bir tehlikedir. Doğal olan oksidatif stres ile birlikte, çevresel kirlenmeler de oksidatif stresi artırabilmektedir (Winston, 1991). Böylece, doğal ve laboratuvar koşullarında kirlenici maddelere maruz

kalan sucul hayvanlarda meydana gelen oksidatif stresi belirlemek için antioksidan sistemlerin enzimleri kullanılmaktadır. Tatlı su midyeleri su kirliliği için iyi bir biyobelirteçleri kullanılarak doğal ve laboratuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılmışlardır (Doyotte ve ark.,1997; Labieniec ve Gabryelak, 2007; Al-Fanharawi ve ark., 2019; Falfushynska ve ark., 2018).

Literatürde *U. tigridis* türünde antioksidan enzimlerinin bakıra karşı verdiği tepkileri gösteren çalışma sayısı sınırlı olsa da, diğer tatlı su midyeleri ve deniz midyeleri ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Jorge ve ark. (2013) genç tatlısu midyesi *Lampsilis siliquoidea* ile yaptıkları çalışmada çok düşük derişimlerdeki bakırın (2 ve 12 $\mu\text{g/L}$) kronik süreçte bile serbest radikal oluşumunu, antioksidan kapasiteyi, GST aktivitesini ve glutatyon düzeylerini anlamlı şekilde değiştiremeye de lipid peroksidasyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir.

Zhou ve ark. (2021) 7 günlük bir deney protokolünde derin deniz midyesi *Bathymodiolus platifrons*'u 100 ve 500 µg/L derişimlerdeki bakır ve kadmiyumun etkisine bıraktıktan sonra, çeşitli biyobelirteçlerin düzeylerini incelemişlerdir. Araştırmacılar her iki metalin midyelerde biriktiğini belirtirken, bakırın ve kadmiyumun etkisinin farklı olduğunu vurgulamışlardır. Örneğin, SOD aktivitesi her iki metal tarafından da değiştirilemezken, CAT aktivitesi bakır tarafından artırılmış, GSH düzeyleri ise kadmiyum tarafından artırılmıştır. Company ve ark. (2008) deniz midyesi *Bathymodiolus azoricus* 24 gün düşük düzeydeki bakırın (25 µg/L) etkisine bıraktıktan sonra 6 gün eliminasyon sürecine tabii tutmuşlar ve solungaç ve manto dokusunda bazı biyobelirteç moleküllerin davranışını incelemişlerdir.

Deney sonuçları midyelerde 24 günde biriken bakırın 6 günlük eliminasyon süresine rağmen azalmadığını göstermiştir. Ayrıca, CAT, GPX ve SOD aktivitelerinde zamana bağlı olarak bir artış eğilimi olduğunu gösterirken, bu çalışmayı da desteklemiştir. Antioksidan enzimlerin aktiviteleri metallerin yanında ekolojik faktörlerle de değişebilmektedir (Mlouka ve ark., 2019). Araştırmacılar Akdeniz midyesi (*Mytilus galloprovincialis*) ve mavi midyeleri (*Mytilus edulis*) sıcaklık ve bakırın etkisine bırakarak antioksidan enzimlerin tepkilerini incelemişlerdir. Sonuçlar bakırın etkisinin sıcaklıkla beraber daha da arttığını ve midyelerin CAT, SOD ve GST aktivitelerinde artışlar olduğunu göstermiştir. Xu ve ark. (2018) çok düşük bakır derişiminin (8 µg/L) bile *Mytilus coruscus*'un hemositlerinde CAT ve SOD aktivitesini artırdığını, fakat daha düşük bakır derişiminin (2 µg/L) anlamlı değişime neden olmadığını vurgulamışlardır. Bakır gibi kadmiyumun da midyelerin antioksidan enzimler üzerine etkili olduğu bilinmektedir (Sukhovskaya ve ark., 2019). Araştırmacılar kuğu midyeleri (*Anodonta cygnea*) ile yaptıkları bir çalışmada 10-100 µg/L derişimlerdeki kadmiyumun midyelerde yüksek miktarlarda kadmiyum birikimine neden olmakla beraber, midyelerin ölümüne neden olmadığını, ancak oksidatif strese neden olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmanın süresi 72 saat olmakla beraber, CAT, SOD ve GPX aktiviteleri ve GSH düzeyleri değerlendirildiğinde kadmiyumun düşük derişimlerde ve kısa sürede midyelerin antioksidan sistemini etkileyebildiğini göstermiştir. Goswami ve ark. (2014) bakır (60 µg/L) ve kadmiyumun (150 µg/L) birlikte etkilerini (21 gün) deniz yeşil midyelerinde (*Perna viridis*) incelemişlerdir. Çalışmanın sonuçları SOD, GPX ve GST aktivitelerinde anlamlı artışlar olduğunu belirtirken, bu çalışmanın bulgularını da desteklemektedir. Diğer yandan metal nanopartiküllerinin midyelerinin antioksidan enzimlerine olan etkileri de birkaç çalışma ile gösterilmiştir. Midyelerin antioksidan sistem tepkisi

üzerine yapılan çalışmalar daha çok deniz midyelerinden, özellikle *Mytilus* türlerinden gelmektedir. Gomes ve ark. (2011) *Mytilus galloprovincialis*'i 15 gün boyunca Cu nanopartiküllere maruz bırakmışlar ve hayvanların oksidatif stres biyobelirteç moleküllerindeki değişimleri gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar midyelerin hem iyonik hem de NP formlarında solungaçlarda bakır biriktirdiğini ve bu iki bakır formunun antioksidan savunma sistemini değiştirerek midyelerde oksidatif strese neden olduğunu belirtmişlerdir. Benzer çalışmalar Ruiz ve ark. (2015) tarafından da yapılmıştır. Araştırmacılar, Cu nanopartiküllerine maruz kalan *Mytilus galloprovincialis*'in hepatopankreasında antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde farklı etkiler yaptığını ve genel olarak antioksidan aktiviteyi arttırdığını göstermişlerdir. Bakır nanopartikülleri CAT ve SOD aktivitelerini önemli ölçüde artırırken solungaçlarda bu etkinin daha az olduğunu vurgulamışlardır. Laboratuvarımızda daha önce yapılan bir çalışmada (Canlı ve Canlı, 2021b), Cu nanopartiküllerinin *U. tigridis*'de CAT ve SOD aktivitelerini azalttığını, ancak glutatyon metabolizması enzimleri olan GPX ve GST aktivitelerini ise artırdığını gösterilmiştir. Buda, bakırın iyonik ve nanopartikül formlarında farklı etkilere sahip olabileceğini göstermekle beraber her iki durumda da oksidatif strese neden olduğunu vurgulamaktadır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Tatsız midyesi olan *U. tigridis* ile yapılan bu çalışmada bakır etkisinde 21 gün süre ile kalan hayvanların hem hepatopankreasında hem de solungaç antioksidan enzim aktivitelerinde anlamlı artışların olması, bakırın neden olduğu oksidatif strese göstermesi bakımından önemlidir. Bu durum, doğal sucul ortamlarda metal etkisinde kalan midyelerde oluşabilecek kronik hasarı vurgulaması bakımından anlamlı görülmüştür. Birçok doğal sucul ortamlarda metal derişimleri subletal düzeylerde dir. Ancak, düşük bakır derişimlerinin bile midyelerde oksidatif strese neden olması çevre duyarlılığı konusunu bir kez daha vurgulamaktadır. Bu çalışmanın devamı olarak midyelerde bakır toksitesi farklı yönlerden de incelenebilir. Örneğin besin zincirinde metallerin taşınması doğal sucul ortamlardaki durumu temsil etmesi bakımından önemli çalışmalar arasında görülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada alg üretiminde desteklerini gördüğüm Dr. Uslu'ya teşekkürlerimi iletirim. Bu çalışmanın deneysel aşamaları Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde yapılmıştır. Bunu sağladıkları için yönetimlere ve Dr. M. Canlı'ya teşekkür ederim.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarı herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Al-Fanharawi AA, Rabee AM, Al-Mamoori AM 2019. Multi-biomarker responses after exposure to organophosphates chlorpyrifos in the freshwater mussels *Unio tigridis* and snails *Viviparous benglensis*. Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal, 25(5): 1137-1156.
- Canli M, Stagg RM (1996) The effects of in vivo exposure to cadmium, copper and zinc on the activities of gill ATPases in the Norway lobster, *Nephrops norvegicus*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 31(4): 494-501.
- Canli, E.G., İla, H.B., Canli, M., 2019. Response of the antioxidant enzymes of rats following oral administration of metal-oxide nanoparticles (Al₂O₃, CuO, TiO₂). Environ. Sci. Pollut. Res. 26, 938-945.
- Canli EG, Celenk A, Canli M 2021a. Accumulation and distribution of nanoparticles (Al₂O₃, CuO, TiO₂) in tissues of freshwater mussel (*Unio tigridis*). Bull. Environ. Contam Toxicol. (in press).
- Canli EG, Canli M 2021b. Antioxidant system biomarkers of freshwater mussel (*Unio tigridis*) respond to nanoparticle (Al₂O₃, CuO, TiO₂) exposures. Biomarkers, 26: 434-442.
- Carlberg I, Mannervik B 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. J. Biol. Chem. 250: 5475-5480.
- Clark RB 1989. Marine pollution. Oxford: Oxford Scientific Publications, Clarendon Press.
- Company R, Serafim A, Cosson RP, Fiala-Médioni A, Camus L, Colaço A, Bebianno MJ 2008. Antioxidant biochemical responses to long-term copper exposure in *Bathymodiolus azoricus* from Menez-Gwen hydrothermal vent. Sci. Tot. Environ. 389(2-3): 407-417.
- Doyotte A, Cossu C, Jacquin MC, Babut M, Vasseur P 1997. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. Aquat. Toxicol. 39(2): 93-110.
- Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Ivanina AV, Sokolova IM, Stoliar O B 2018. Detoxification and cellular stress responses of unionid mussels *Unio tumidus* from two cooling ponds to combined nano-ZnO and temperature stress. Chemosphere, 193: 1127-1142.
- Gomes T, Pinheiro JP, Cancio I, Pereira CG, Cardoso C, Bebianno MJ 2011. Effects of copper nanoparticles exposure in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. Environ. Sci. Technol. 45(21): 9356-9362.
- Goswami P, Hariharan G, Godhantaraman N, Munuswamy N 2014. An integrated use of multiple biomarkers to investigate the individual and combined effect of copper and cadmium on the marine green mussel (*Perna viridis*). J. Environ. Sci. Health Part A, 49(13): 1564-1577.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249: 7130-7139.
- Jorge MB, Loro VL, Bianchini A, Wood CM, Gillis PL 2013. Mortality, bioaccumulation and physiological responses in juvenile freshwater mussels (*Lampsilis siliquoides*) chronically exposed to copper. Aquat Toxicol. 126: 137-147.
- Labieniec M, Gabryelak T, Falcioni G 2003. Antioxidant and pro-oxidant effects of tannins in digestive cells of the freshwater mussel *Unio tumidus*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 539(1-2): 19-28.
- Lartillot S, Kedziora P, Athias A 1988. Purification and characterization of a new fungal catalase. Prep. Biochem. 18: 241-246.
- Livingstone DR, Lips F, Martinez PG, Pipe RK 1992. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 112: 265-276.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- McCord JM, Fridovich I 1969. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. J. Biol. Chem. 244(22): 6049-6055.
- Mlouka R, Cachot J, Boukadida K, Clérandeau C, Gourves PY, Banni M 2019. Compared responses to copper and increased temperatures of hybrid and pure offspring of two mussel species. Sci. Tot. Environ. 685: 795-805.
- Nugroho AP, Frank H 2012. Effects of copper on lipid peroxidation, glutathione, metallothionein, and antioxidative enzymes in the freshwater mussel *Anodonta anatina*. Toxicol. Environ. Chem. 94(5): 918-929.
- Rajalakshmi S, Mohandas A 2005. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. Ecotox. Environ. Safe. 62(1): 140-143.
- Ruiz P, Katsumiti A, Nieto JA, Bori J, Jimeno-Romero A, Reip P, Cajaraville MP 2015. Short-term effects on antioxidant enzymes and long-term genotoxic and carcinogenic potential of CuO nanoparticles compared to bulk CuO and ionic copper in mussels *Mytilus galloprovincialis*. Marine Environmental Research, 111, 107-120
- Sukhovskaya IV, Borvinskaya EV, Kochneva AA, Slukovsky ZI, Kurpe SR, Xu K, Tang Z, Liu S, Xia H, Liu L, Wang Z, Qi P 2018. Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel

- Mytilus coruscus*. Fish Shellfish immunology, 82: 77-83.
- Xu K, Tang Z, Liu S, Xia H, Liu L, Wang Z, Qi P 2018. Effects of low concentrations copper on antioxidant responses, DNA damage and genotoxicity in thick shell mussel *Mytilus coruscus*. Fish Shellfish Immun. 82: 77-83.
- Zhou L, Li M, Zhong Z, Chen H, Wang X, Wang M, Li C 2021. Biochemical and metabolic responses of the deep-sea mussel *Bathymodiolus platifrons* to cadmium and copper exposure. Aquat. Toxicol. 236: 105845.
- Winston GW 1991. Oxidants and Antioxidants in Aquatic Animals. Comp. Biochem. Physiol. C-Pharma. Toxicol. Endocrin.100: 173-176.
- Wood CM, Farrel AP, Brauner CJ 2012a. Homeostasis and toxicology of essential metals. Fish Physiology 31A. Academic Press, London pp 497.
- Wood CM, Farrel AP, Brauner CJ 2012b. Homeostasis and toxicology of non-essential metals. Fish Physiology 31B. Academic Press, London pp 507.

Bazı Orkide Taksonlarında Labellum Mikromorfolojisi

Mehmet AYBEKE[✉]

Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Balkan Yerleşkesi, Merkez, EDİRNE.
https://orcid.org/0000-0001-9512-5313
✉: mehmetaybeke@trakya.edu.tr

ÖZET

Çalışmada 5 cinse (*Cephalanthera* Rich., *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski, *Epipactis* Zinn, *Serapias* L., *Platanthera* Rich.) ait 6 taksonda labellum mikromorfolojisi Taramalı Elektron mikroskobu (SEM) yöntemi ile incelenmiş ve sonuçlar karşılaştırmalı tablolar halinde sunulmuştur. Örnekler, araziden toplandığı sırada % 70 alkole alınmış, bir kısmı da herbaryum kurallarına göre kurutularak teşhisleri yapılmıştır. Alkolden çıkarılan labellum örnekleri, bisturi ve iğnelerle stereomikroskop altında disekte edilerek doğrudan üzeri çift taraflı yapışkan bantlar bulunan ve SEM cihazına ait çelik aparatlara yerleştirilmiştir. Bir gece kadar bekletilen örnekler, doğrudan (SEM) ile incelenmiş ve labellum mikrofotografı çekilmiştir. Bulgulara göre; *Platanthera chlorantha* labellumunun tüm bazal, lateral ve medyan bölgelerinde düzensiz hücreli, yüzeyi mikro rugulate ve yoğun ruminant şeklinde bir morfolojiye sahip olduğu ve bu özellikleri ile diğer tüm incelenen taksonlardan oldukça farklı olduğu tespit edilmiştir. Konikal papilla oluşumları, *Cephalanthera epipactoides* ve *Dactylorhiza romana*'nın farklı labellum bölgelerinde bulunmuştur. Epikil ve Hipokil özellikli *Epipactis* ve *Serapias* taksonları ise birbirlerinden epidermal hücre şekli, yanıl çeper özellikleri ve yüzey özellikleri ile farklılık göstermiştir. Sonuçta labellum ayrıntılı yüzey morfolojisi ve mahmuz özelliklerinin, taksonların ayırımında faydalı olduğu görülmüştür.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 18.02.2021
Kabul Tarihi : 27.04.2021

Anahtar Kelimeler

Orchidaceae
Çiçek
Labellum
Morfoloji
Petal

Labellum Micromorphology in Some Orchid Taxa

ABSTRACT

In this study, micromorphology of labellum in 6 taxa belonging to 5 genera (*Cephalanthera* Rich., *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski, *Epipactis* Zinn, *Serapias* L., *Platanthera* Rich.) was examined by Scanning Electron Microscopy (SEM) and the results were presented in comparative tables. While the samples were collected from the field, they were taken to 70% alcohol, some of them were dried according to the herbarium rules and diagnosed. The labellum samples extracted from alcohol were dissected under the stereomicroscope with scalpel and needles and placed directly into the steel apparatus of the SEM with double-sided adhesive tapes. The samples, from which alcohol was completely evaporated by waiting for one night, were examined directly with Scanning Electron Microscope (SEM) and labellum microphotographs were taken. According to the findings; It has been determined that *Platanthera chlorantha* labellum has an irregular cell, micro rugulate surface and dense ruminant morphology in all basal, lateral and median regions, and it is quite different from all other examined taxa with these features. Conical papillae formations have been found in different labellum regions of *Cephalanthera epipactoides* and *Dactylorhiza romana*. *Epipactis* and *Serapias* taxa with epicile and hypocile featured differ from each other with their epidermal cell shape, lateral wall features and surface features. As a result, labellum detailed surface morphology and spur features were found to be useful in distinguishing taxa.

Research Article

Article History

Received : 18.02.2021
Accepted : 27.04.2021

Keywords

Orchidaceae
Flower
Labellum
Morphology
Petal

| | |
|-------------------|---|
| Atıf İçin: | Aybeke M 2022. Bazı Orkide Taksonlarında Labellum Mikromorfolojisi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 42-48. https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.882554 . |
| To Cite: | Aybeke M 2022. Labellum Micromorphology in Some Orchid Taxa. KSU J. Agric Nat 25 (1): 42-48. https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.882554 . |

GİRİŞ

Şekil ve renk açısından değişime uğramış yapılar olan orkidelerin labellumları, histolojik doku ve koku bakımından da oldukça çeşitlidir (Bradshaw ve ark., 2010). İlâveten labellum, tozlaşmayı sağlayan böcekleri cezbedmede en dikkat çekici çiçek yapısıdır ve böcek-bitki ilişkileri üzerindeki ortak evrimsel hipotezlerin kurulmasında da en önemli odak noktasıdır (Bradshaw ve ark., 2010). Örneğin *Ophrys* L. üyelerinde labellum spekulumunun yanı sıra labellumun üç boyutlu morfolojik özelliklerinin ve yaydığı kokunun, dişi böceğin salgıladığı kokuya ve onun duruşuna benzediğinden tozlaşmada erkek böcekleri çekimlemede çok önemli olduğu ifade edilmiştir (Bradshaw ve ark., 2010).

Labellum varyasyonlarının (özellikle şekil ve renk bakımından) geniş bir yelpazede olacak şekilde çokluğundan dolayı bazı taksonların teşhisi çok zordur; bu nedenle halen birçok sistematik problem çözülememiştir (Sezik, 1984; Delforge, 2005). Bilhassa farklı çevre koşullarındaki örneklerde bu labellum varyasyonları, bilinen morfolojik yapıdan daha büyük sapmalara yol açmaktadır (Tutin ve ark., 1968; Rossi ve ark., 1992). Dolayısıyla labellum mikromorfolojisi aşağıda belirtildiği gibi, araştırmacıların odak noktası olmuştur:

Örneğin; *Maxillaria* Ruiz & Pav. cinsinden 75 taksonun labellum mikromorfolojisi incelenmiş ve bu çalışmada papilla tipi ve tüy dağılımı gibi karakterlerin tür ayırımında kısmen faydalı olduğu ifade edilmiştir (Davies ve Turner, 2004). Diğer bir çalışmada; Bradshaw ve ark. (2010) 32 değişik *Ophrys* taksonunda labellum mikromorfolojisini araştırmış ve bu çalışmada spekulum özellikleri, epidermis yapısı, tüy tipleri, epidermal hücrelerin ultrasütrüktürel özellikleri tespit edilmiştir. Hatta labellum mikromorfolojisi üzerinden filogenetik çalışmalara da yer verilmiştir (Bradshaw ve ark., 2010). Farklı bir araştırmada; *Platanthera* Rich., *Gymnadenia* R.Br., *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski, *Anacamptis* Rich., *Orchis* Tourn. ex L. cinslerine ait 21 değişik taksonda mahmuz mikromorfolojisine değinilmiştir (Bell ve ark., 2009). Çünkü mahmuz abaksiyal epidermal hücrelerinin nektar üretimi fonksiyonları vardır (Stpiczynska, 2003) ve tozlaşmayı sağlayan böceklerin, çiçeği ziyaretleri sırasındaki davranışlarının, mahmuz morfolojisi ile yakından ilişkisi vardır (Box ve ark., 2008). Bu nedenle mahmuz, tozlaşma açısından oldukça önemli bir labellum organıdır. Benzer bir diğer araştırmada; *Ophrys fusca* Link ve *O. lutea* Cav. türlerinde labellum mikromorfolojisi çalışılmış ve sonuçta trikrom ve/veya papilla özelliklerinin,

epidermis hücre yüzey yapılarının türler arasındaki farklılıkların tespitinde faydalı olduğu belirtilmiştir (Ascensao ve ark., 2005). Başka bir araştırmada değişik *Serapias* L. taksonlarında labellum mikromorfolojisi incelenmiş ve sonuçların (tüyler, hücreler, papilla özellikleri) türlerin ayırımında faydalı olduğu gibi, polinatör böceklerin cezbedilmesi ve seçiminde de önemli olabileceği saptanmıştır (Lumaga ve ark., 2012).

Yukarıda verilen bu örnek çalışmalar ışığında; labellum mikromorfolojisinin, orkide sistematiği, taksonomisi, filogenisi ve üreme biyolojisinde çok önemli verilere sahip olduğu anlaşılmaktadır (Lumaga ve ark., 2012). Literatür taramalarına göre Türkiye’de yapılan benzer bir çalışmada 14 farklı orkide taksonunda labellum mikromorfolojisi incelenmiştir (Süngü Şeker ve ark., 2016) ve halen bazı Orchidinae taksonlarının labellum yüzeyinin bilinmediği tespit edilmiştir. Çalışmanın hipotezi; tür ayırımında sorun olması durumunda labellum mikromorfolojisinin çok önemli bir karakter olabileceğidir. Bu boşluğu doldurmak üzere, bu çalışmada bazı değişik orkide taksonlarının labellum mikromorfolojisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışmada kullanılan materyal listesi aşağıdadır (Çizelge 1). Örnekler, araziden toplandığı sırada % 70 alkol içine alınmıştır. Örneklerin bir kısmı da herbaryum kurallarına göre kurutularak teşhisleri yapılmıştır (Tutin ve ark., 1968; Sezik, 1984; Delforge, 2005). Alkolden çıkarılan ve yarı nemli olan çiçeklerden labellum, bisturi ve iğnelerle Olympus SZ 71 stereomikroskop altında disekte edilerek doğrudan üzeri çift taraflı yapışkan bantlar bulunan SEM cihazına ait çelik aparatlara yerleştirilmiştir. Bir gece kadar bekletilen bu örnekler, doğrudan Trakya Üniversitesi Teknoloji Araştırma Merkezi (TUTAGEM) bünyesindeki Zeiss Evo LS 10 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ile incelenmiş ve labellum mikrofotografı çekilmiştir. Mikrofotografardan labellum yüzey morfolojik özellikleri karşılaştırmalı olarak tablolar halinde sunulmuştur.

BULGULAR ve TARTIŞMA

İncelenen değişik orkide taksonlarına ait labellum mikromorfolojik özellikleri aşağıda özetlenmiş ve ayrıca Çizelge 2’de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Cephalanthera epipactoides’de her bölge (mahmuz hariç) konikal papilla ile kaplıdır (Şekil 1a-b).

Dactylorhiza romana’da apeks hariç hemen hemen her yer konikal papilla ile kaplıdır (Şekil 1c-d).

Çizelge 1. Kullanılan orkide taksonlarının listesi

Table 1. List of orchid taxa used

| Takson | Herbarium No | Lokalite |
|---|--------------|---------------------------|
| <i>Dactylorhiza romana</i> (Sebast.& Mauri) Soo | 8341 | Edirne, Keşan, Gökçetepe |
| <i>Cephalanthera epipactoides</i> Fisch. and C. A. Mey. | 8345 | Edirne, Keşan, Gökçetepe, |
| <i>Epipactis helleborine</i> (L.) Crantz | 8378 | Edirne, Keşan, Yerlisu |
| <i>Platanthera chlorantha</i> (Custer) Rehb. | 8377 | Edirne, Keşan, Yerlisu, |
| <i>Serapias orientalis</i> (Greuter) H.Baumann and Künk | 8237 | Kırklareli, Kastro, |
| <i>Serapias vomeracea</i> (Burm. f.) Briq. | 8205 | Edirne, Enez, Abdürrahim |

Çizelge 2. İncelenen orkide taksonlarının labellum mikromorfolojik özellikleri

Table 2. Labellum micromorphological characteristics of the orchid taxa examined

| Takson | labellum mikromorfolojik özellikleri |
|-----------------------------------|---|
| <i>Cephalanthera epipactoides</i> | apeks: konikal papillalı; mahmuz: hücrelerde yoğun favulariate çizgiler mevcut |
| <i>Dactylorhiza romana</i> | medyan: konikal papillalı; lateral: konikal papillalı; apeks: düz yüzeyli; mahmuz: düz yüzeyli, uzun hücreli |
| <i>Epipactis helleborine</i> | Epikil ve hipokil, medyana yakın bölgelerde kare hücreli, düz yüzeyli, dik yanal çeperli; diğer tüm bölgelerde tamamıyla düzensiz hücreli düz yüzeyli, dik yanal çeperli |
| <i>Serapias orientalis</i> | Epikil: düzensiz hücreli, yoğun rugose yüzeyli; hipokil: retikulat hücreli, düz yüzeyli, yanal çeperler yukarı doğru dik |
| <i>Serapias vomeracea</i> | Epikil: retikulat hücreli, yanal çeperler yukarı doğru dik, düz yüzeyli ve üzerinde hafif rugulate kırışıklıklar vardır, Tüylet :viloz. Hipokil: hücreler düzensiz, çeperler yukarı doğru dik ve üzerinde hafif rugulate kırışıklıklar var. Tüylet: viloz |
| <i>Platanthera chlorantha</i> | Düzensiz hücreli, yüzey mikro rugulate, ve yoğun ruminat; medyan: düzensiz hücreli, yüzey mikro rugulate, ve yoğun ruminat; lateral: düzensiz hücreli, yüzey mikro rugulate, ve yoğun ruminat; mahmuz: düzensiz hücreli, hücreler dikdörtgenimsi, çeperler yüzeyden yukarı doğru dik, favulariate kırışıklı, mikro rugulate |

Epipactis helleborine: Epikil ve hipokil, medyana yakın bölgelerde kare hücreli, düz yüzeyli, dik yanal çeperli, diğer tüm bölgelerde ise tamamıyla düzensiz hücreli, düz yüzeyli, dik yanal çeperlidir (Şekil 1e-f).

Serapias orientalis'de epikil düzensiz hücreli ve rugose yüzeyli olurken hipokil retikulat hücreli, düz yüzeylidir. *S. vomeracea*'da epikil retikulat hücreli, düz yüzeyli ve üzerinde hafif rugulate kırışıklıklar ve viloz tüylü iken, hipokil ise düzensiz hücreli olup üzerinde hafif rugulate kırışıklıklar vardır (Şekil 2a-d).

Platanthera chlorantha: hepsinden çok farklı. Bazal, lateral ve medyan bölgeler de her yer "düzensiz hücreli, yüzey mikro rugulate, ve yoğun ruminat" şeklindedir (Şekil 2e-f).

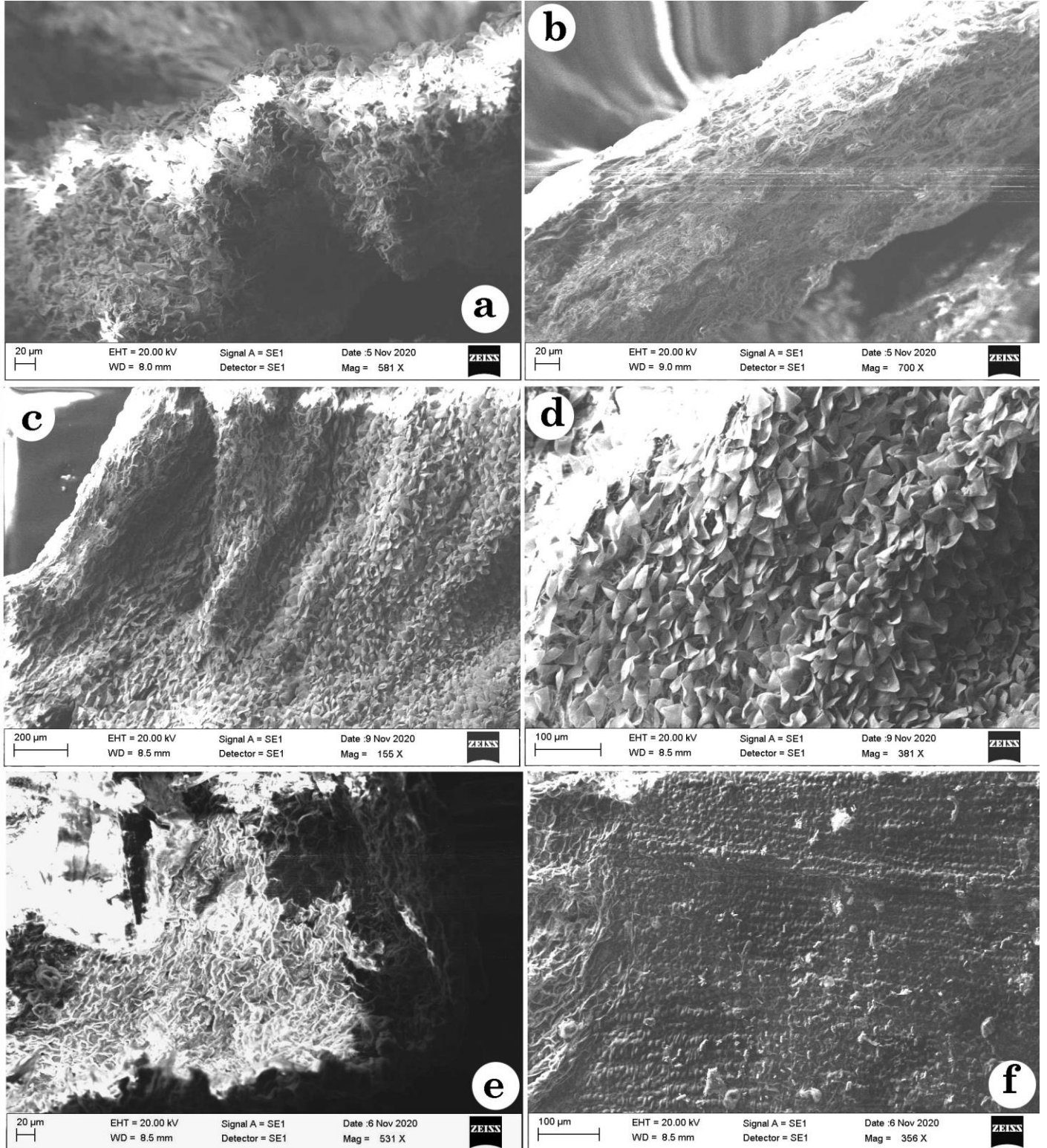
Mahmuz özelliklerine göre; *Cephalanthera epipactoides*'de yoğun favulariate çizgili, *Dactylorhiza romana*'da düz yüzeyli, *Platanthera chlorantha*'da düzensiz hücreli favulariate ve mikro rugulate yüzeylidir (Şekil 1b, 2f).

Cinsler farklı labellum özellikleri ile birbirinden ayrılmıştır: Konikal papilla, *Cephalanthera epipactoides* de tüm labellum yüzeyinde, *Dactylorhiza romana*'da ise apeks hariç her yerde bulunmuştur. Diğer incelenen taksonlarda konikal papilla

bulunmamıştır. Değişik araştırmalara göre; labellar papilla yapısının konikal, obpyriform, villiform, fusiform veya clavate şekillerinde olduğu gibi büyük bir çeşitlilik gösterdiği ve bunların dağılımının önemli olduğu vurgulanmıştır (Davies ve Turner, 2004). İlâveten papilla şeklinin onun altında yatan bir fizyolojik görevle muhakkak alakalı olduğuna dair bilgiler de mevcuttur (Davies ve Turner, 2004). Bu çalışmanın bulgularında da papil yapısı ve dağılımı dikkatlice belirtilmiştir.

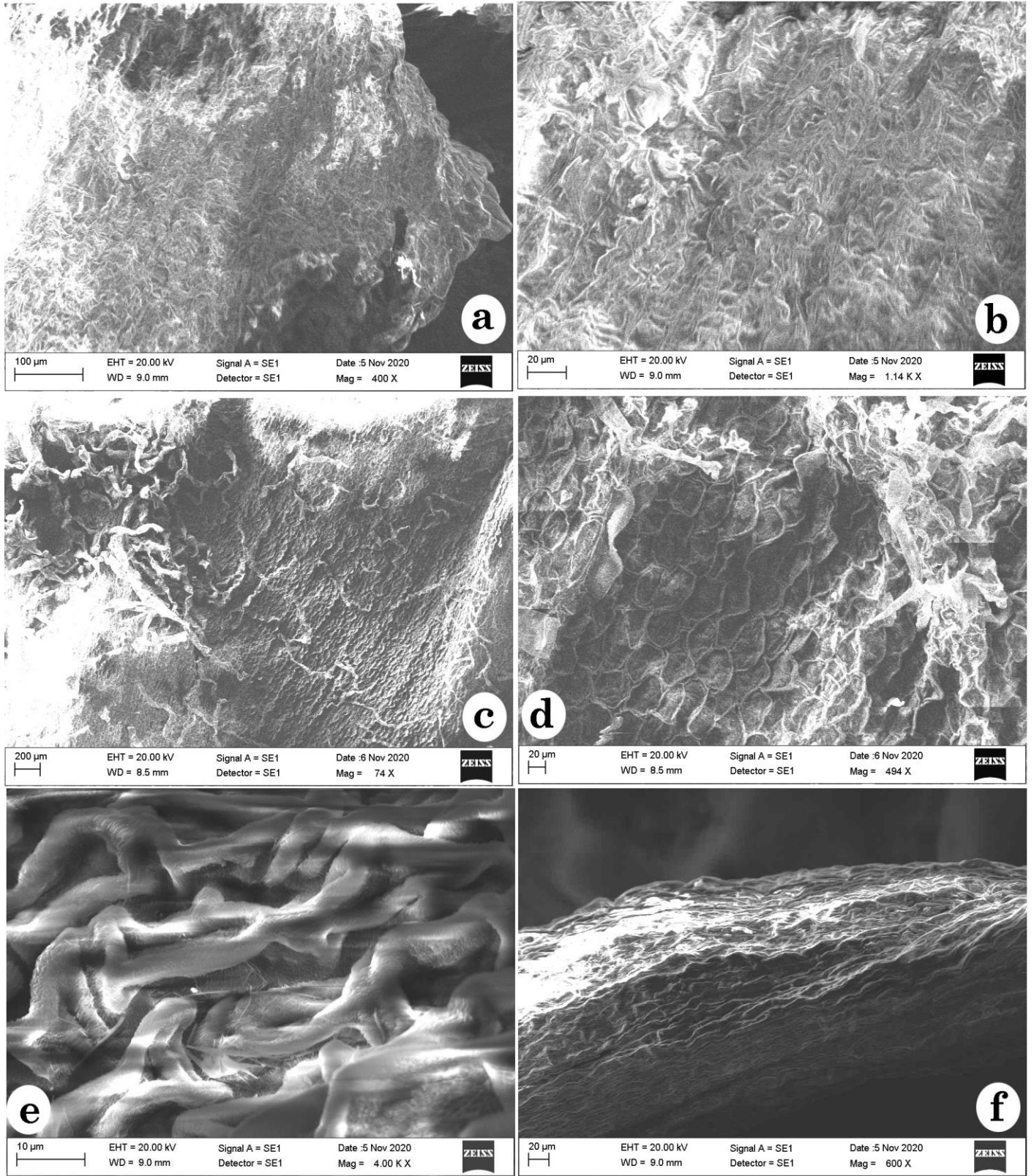
Bulgulara göre; *Epipactis helleborine* epikil ve hipokil medyan kısımlarında daha düzenli hücreler varken, lateral ve apeks bölgelerinde hücreler düzensizleşmektedir. *Serapias* taksonları kendi arasında farklılık göstermektedir. Her iki *Serapias* taksonu (*S.orientalis*, *S.vomeracea*) epikil ve hipokil özellikleri (hücre şekli, yanal çeper özellikleri ve yüzey özellikleri) ve *Serapias vomeracea*'da viloz tüylenme nedeniyle birbirinden farklılık göstermiştir.

Bu özelliklerle ayrıca epikil / hipokil yapılı *Epipactis helleborine* labellum mikromorfolojisinden de farklıdır. *Platanthera chlorantha* diğer tüm cinslerdekinden farklı bir mikromorfolojiye sahiptir. Bu taksonda tüm bazal, lateral ve medyan bölgelerde hücreler düzensiz, yüzeyi mikro rugulate ve yoğun ruminat şeklindedir.



Şekil 1: Labellum mikromorfolojik özellikleri. *Cephalanthera epipactoides*: konikal papillalı labellum yüzeyi (a), mahmuz hücrelerinde yoğun favulariate çizgiler mevcut (b); *Dactylorhiza romana*: konikal papilla ile labellum yüzeyi (c-d); *Epipactis helleborine*: hipokil apeks (büyütülmüşü) (e), epikil: düz yüzeyli, genelde kare hücreli (f)

Figure 1: Labellum micromorphological features. *Cephalanthera epipactoides*: labellum surface with conical papillae (a), dense favulariate lines in spur cells (b); *Dactylorhiza romana*: labellum surface with conical papillae (c-d); *Epipactis helleborine*: hypococcal apex (enlarged) (e), epicycle: smooth-faced, usually square cell (f)



Şekil 2: Labellum mikromorfolojik özellikleri. *Serapias orientalis*: epikil (a-b); *Serapias vomeracea*: epikil, retikulat hücreli, çeperler yukarı doğru çıkıntılı, düz yüzeyle ve üzerinde hafif rugulate kırışıklıklar var, villos tüyler (c), epikil büyütülmüşü (d); *Platanthera chlorantha*: labellum (e), mahmuz (büyütülmüş) (f)

Figure 2: Labellum micromorphological features. *Serapias orientalis*: epichil (a-b); *Serapias vomeracea*: epichil, reticulate cells, protruding walls upward, smooth surface with slightly rugulate wrinkles on it, villous hairs (c), epichil enlarged (d); *Platanthera chlorantha*: labellum (e), spur (enlarged) (f)

Çalışmada mahmuz özellikleri de incelenmiştir. Çünkü mahmuz, polinatör böceklerin davranışlarına rehberlik etmede önemli bir role sahiptir ve orkidelerde tür zenginliğinin ana nedenlerinden biri olarak önem kazanmaktadır (Rudall ve Bateman, 2002; Box ve ark., 2008). Mahmuz özelliklerine göre de taksonlar birbirinden farklıdır: *Cephalanthera epipactoides*'de yoğun favulariate çizgili, *Dactylorhiza romana*'da düz yüzeyle, *Platanthera chlorantha*'da düzensiz hücreli favuolariate ve mikro rugulate yüzeyle. Kısacası; mahmuzda hücre şekli, yüzey yapısı ile taksonlar farklılık göstermiştir. Literatür taramalarına göre incelenen taksonlardan sadece *Serapias vomeracea*'nın labellum morfolojisi ile ilgili bilgilere rastlanılmıştır:

Süngü Şeker ve ark. (2016)'na göre *Serapias vomeracea*'da yoğun striate yapılı sekresyon hücreleri ve 2 loblu tüyler ve kubbe benzeri çıkıntılar belirtilmiştir. Ayrıca *Platanthera chlorantha*'da tüy/papilla bulunmadığı ve hücre çeperlerinin derin undulat, yüzeyinin ise retikulat olduğu bildirilmiştir (Süngü Şeker ve ark., 2016).

Özetle; *S. vomeracea*'da epikilde düz, hipokilde hafif rugulate kırışıklık ve her iki bölgede de yanıl çeperlerin yukarı doğru dik olduğu tespit edilmiştir. *Platanthera chlorantha*'da hücrelerin düzensiz ve yüzeyinin mikro rugulate ve yoğun ruminat olduğu görülmüştür. Sözkonusu farklılıkların muhtemelen değişen çevre koşullarından ve özellikle polinatör davranışlarına bağlı olarak geliştiği düşünülmektedir. Zira labellumda nektar üretiminin, epidermal papilla ve epidermal çizgi özellikleri ile alakalı olduğu tespit edilmiştir (Bell ve ark., 2009). Elde edilen bulgular ışığında labellum mikromorfolojisi ve mahmuz morfolojisinin, türlerin ayırımında önemli olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak; burada elde edilen sonuçların taksonların labellum mikromorfolojisine göre ayırımını sağladığı gibi ayrıca evrimsel üreme biyolojisine ve filogenisine de katkıda bulunacağına inanılmaktadır.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Beş farklı cinse (*Cephalanthera*, *Dactylorhiza*, *Epipactis*, *Serapias*, *Platanthera*) ait 6 taksondaki örneklerden elde edilen sonuçlara göre; 1) *Platanthera chlorantha* düzensiz hücreli, yüzeyi mikro rugulate ve yoğun ruminat şeklinde bir yüzey morfolojisine sahip olduğu ve bu nedenle diğer tüm incelenen taksonlardan oldukça farklı olduğu, 2) konikal papillaların *Cephalanthera epipactoides* ve *Dactylorhiza romana*'nın birbirinden farklı labellum bölgelerinde bulunduğu, 3) epikil/hipokil yapılı *Epipactis* ve *Serapias* taksonlarının ise epidermal hücre şekli, yanıl çeper özellikleri ve yüzey özellikleri ile birbirlerinden farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuçta labellum ayrıntılı yüzey morfolojisi ve

mahmuz özelliklerinin, tür veya alt tür altı kategorisinde en yakın taksonların ayırımında bile faydalı olduğu gibi evrimsel üreme biyolojisi ve filogeni araştırmalarına da katkıda bulunacağına inanılmaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi TÜBAP 2020 /94 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazar (tek yazar) tüm çalışmayı kendi yapmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazar (tek yazar) tüm çalışmayı kendi yapmış olup herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

KAYNAKLAR

- Ascensao L, Francisco A, Cotrim H and Pais MS 2005. Comparative structure of the labellum in *Ophrys fusca* and *O. lutea* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* (7): 1059–1067.
- Bell AK, Roberts DL, Hawkins JA, Rudall PJ, Box MS and Bateman RM 2009. Comparative micromorphology of nectariferous and nectarless labellar spurs in selected clades of subtribe Orchidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 160: 369–387.
- Box MS, Bateman RM, Glover BJ, Rudall PJ 2008. Floral ontogenetic evidence of repeated speciation via paedomorphosis in subtribe Orchidinae (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society Soc* 157: 429–454.
- Bradshaw E, Rudall PJ, Devey DS, Thomas MM, Glover BJ and Bateman RM 2010. Comparative labellum micromorphology of the sexually deceptive temperate orchid genus *Ophrys*: diverse epidermal cell types and multiple origins of structural colour. *Botanical Journal of the Linnean Society* 162: 504–540.
- Davies KL and Turner MP 2004. Morphology of floral papillae in *Maxillaria* Ruiz. & Pav. (Orchidaceae). *Ann of Bot* 93: 75-86.
- Delforge P 2005. Guide des orchidees d'Europe, d'Afrique du Nord et du Proche Orient. Delachaux et Niestle, Paris, pp 82-95
- Lumaga MRB, Pellegrino G, Bellusci F, Perrotta E, Perrotta I, Musacchio A 2012. Comparative floral micromorphology in four sympatric species of *Serapias* (Orchidaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 169: 714-724.
- Rossi W, Corrias B, Ardurino P, Cianchi R, Bullini L 1992. Gene variation and gene flow in *Orchis morio* (Orchidaceae) from Italy. *Plant Systematics and Evolution* 179: 43-58.

- Rudall PJ, Bateman RM 2002. Roles of synorganization, zygomorphy and heterotopy in floral evolution: the gynostemium and labellum of orchids and other lilioid monocots. *Biological Reviews* 77: 403–441.
- Sezik E 1984. Orkidelerimiz, Türkiye'nin Orkideleri. Sandoz Kültür Yayınları, no. 6, İstanbul.
- Stpiczynska M 2003. Nectar resorption in the spur of *Platanthera chlorantha* (Custer) Rchb. Orchidaceae: structural and microautoradiographic study. *Plant Systematics and Evolution* 238: 119–126.
- Süngü Şeker Ş, Akbulut MK, Şenel G 2016. Labellum micromorphology of some orchid genera (Orchidaceae) distributed in the Black Sea region in Turkey. *Turkish Journal of Botany* 40: 1-14.
- Tutin TG, Heywood VH, Burges NA, Moore DM, Valentine DH, Walters SM, Webb DA 1968. *Flora Europaea*, Vol. 5, Alismataceae to Orchidaceae (Monocotyledones). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 344-348.

Morus nigra L. (Karadut) cv. 'Ekşi Kara' 'nın Mikroçoğaltımı

Duygu ÖZELÇİ¹, Emel YİĞİT^{2*}

^{1,2}İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü /MALATYA

¹<https://orcid.org/0000-0003-1621-1980>, ²<https://orcid.org/0000-0001-6333-8437>

✉: emel-yigit@windowslive.com

ÖZET

Bu çalışmada, ülkemizin önemli gen kaynaklarından karadutun (*Morus nigra* L.), doku kültürü yöntemi ile çoğaltılması için en uygun protokolün belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun için en uygun eksplant alma zamanı, kültür başlatma ve sürgün çoğaltımı için en iyi 6-Benzilaminopürin (BAP) konsantrasyonu ve köklenmeyi sağlamak için en elverişli Indol-3-Bütirik Asit (IBA) konsantrasyonu araştırılmıştır. Kültür başlatmak için Haziran ayının uygun zaman olduğu, besi ortamına 0.75 mg L⁻¹ BAP ilavesinin en iyi sonuç verdiği ve sürgün çoğaltımı için 1 mg L⁻¹ BAP'ın öne çıktığı saptanmıştır. 1.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasında %95 köklenme başarısı elde edilmiştir. Eksplantın alınmasından aklimatizasyonun tamamlanması arasında geçen süre 20-25 hafta sürmüştür. Geliştirilen mikroçoğaltım protokolü ile sürdürülebilir, hızlı ve ekonomik çoğaltım yapılabileceği kanıtlanmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 21.01.2021

Kabul Tarihi : 27.04.2021

Anahtar Kelimeler

Morus nigra L.

Hormon

Mikroçoğaltım

Doku kültürü

In vitro

Micropropagation of the *Morus nigra* L. (Black Mulberry) cv. 'Ekşi Kara'

ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the most suitable protocol for the propagate of black mulberry (*Morus nigra* L.), one of the important gene resources of our country, by tissue culture method. For this, the most suitable explant taking time, the best concentration of 6-Benzylaminopurine (BAP) for culture initiation and the shoot propagation and the best Indole-3-Butyric Acid (IBA) concentration to achieve rooting was investigated. It was determined that June is the right time for culture initiation, 0.75 mg L⁻¹ BAP addition to the nutrient medium gives the best results and 1 mg L⁻¹ BAP comes into prominence for shoot propagation. Overall, 95% rooting success was achieved in 1.5 1 mg L⁻¹ IBA application. The period between the receipt of the explant and the completion of acclimatization lasted 20-25 weeks. It has been proved that sustainable, fast and economical propagation can be made with the developed micropropagation protocol.

Research Article

Article History

Received : 21.01.2021

Accepted : 27.04.2021

Keywords

Morus nigra L.

Hormone

Micropropagation

Tissue culture

In vitro

Atf İçin: Özelçi D, Yiğit E 2022. *Morus nigra* L. (Karadut) cv. 'Ekşi Kara' 'nın Mikroçoğaltımı. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 49-56. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.865910.

To Cite: Özelçi D, Yiğit E 2022. Micropropagation of the *Morus nigra* L. (Black Mulberry) cv. 'Ekşi Kara'. KSU J. Agric Nat 25 (1): 49-56. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.865910.

GİRİŞ

Morus nigra L. (Karadut), Urticales takımı, Moraceae familyası, *Morus* cinsinin içinde bulunmaktadır (Datta, 2002). Karadut, lezzetli meyvelerinin yanı sıra, peyzajda süs bitkisi olarak, ayrıca farmakolojik ve kozmetik sanayide kullanımı için de yetiştirilmektedir (Benedetta ve ark., 2007; Vijayan ve ark., 2011, Vijayan ve ark., 2012). Meyvesi bakımından değerli olan *M. nigra*'nın, *M. alba* L. (Beyaz dut) gibi fazla çeşidi yoktur. *M. nigra* türünün, İran ve Kafkaslar'dan orijinlendiği bildirilmektedir

(Gökmen, 1973). Sürgünleri koyu kahverengi, hafif tüylü olup kesildiğinde lateks salgılar. *M. nigra*'nın adaptasyon kabiliyeti iyidir. Bu özelliği sayesinde farklı iklim ve toprak şartlarına uyum yeteneği yüksek olduğu için ılıman ve subtropik iklim bölgelerinde yetişebilir.

Karadut fidan üretiminde; aşılama, hava daldırma, çelik ve doku kültürü ile çoğaltım yöntemleri kullanılmaktadır. Karadutların aşısı ile çoğaltılmasında genellikle anaç olarak yabancı beyaz dut kullanılmaktadır. Anaçların aşısı kalınlığına

gelmesi yaklaşık iki yıl sürmekte ve bu zaman kaybına neden olmaktadır. Aşı ile çoğaltılmada göz (T ve ters T) ve kalem (yarma, kakma) aşuları kullanılır. Beyaz dut anaçlarına aşılardan karadut fidanlarında aşı tuttuktan sonra aşı bölgesinde şişkinlik olarak ortaya çıkan kısmi uyuşmazlık görülebilir. Bu kısmi uyuşmazlık, ağacın erken meyveye yatmasını da etkilemektedir Çok sık görülmemekle birlikte, ileri safhalarda aşı atması olayı meydana gelebilir. (Vural ve ark., 2008; Güneş ve Çekiç, 2011). Ayrıca dutun lateks çıkarması, göz aşısında alınan aşı gözünün altında genellikle boşluk bulunması, aşı gözlerinin iri olması ve aşı uyuşmazlığı gibi nedenler aşı tutma oranının azalmasına neden olmaktadır. Genel olarak beyaz dut ve mordutlarda aşı tutma oranı %90'nın üzerindeyken karadutlarda bu oran %20-40 arasındadır (Anonim, 2010). Karadutlarda aşı ile çoğaltmanın başarısı bir yana özellikle uyuşmazlık konusu nedeniyle karadutta fidan üretiminde diğer vejetatif çoğaltım yöntemleri tercih edilmelidir.

Hava daldırması ile çoğaltma, fazla işçilik ve masraf gerektirdiğinden bu yöntem ticari üretim için yavaş ve pahalı olmaktadır. Karadutun çelikle çoğaltılmasında istenilen başarı henüz elde edilememiştir. Ayfer ve ark. (1986) ile Koyuncu ve ark. (2004) karadutun yeşil çelikle çoğaltımında, hiç köklenme sağlayamamışlardır. Karadutların çelikle çoğaltımında, farklı yöntemler kullanarak Ünal ve ark. (1992) %4-20, Özkan ve ark. (1996) %57, Koyuncu ve Şenel (2003) %0-33, Karadeniz ve Şişman (2004) %1-23 oranında köklenme elde ettiklerini bildirmişlerdir. Aşılama, hava daldırması ve çelikle çoğaltımın dezavantajları nedeniyle *in vitro* çoğaltım gibi daha avantajlı alternatif çoğaltma metodlarının araştırılması ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca, diğer klonal çoğaltım yöntemleri ile karşılaştırıldığında *in vitro* çoğaltım, en hızlı olanıdır (Bhojwani ve Razdan, 1996; Nas ve Read, 2004; Suttie, 2002).

Bitki organ, doku ve hücrelerinin *in vitro* koşullarda manipüle edilerek kültüre alınması ve çoğaltılması, bitki doku kültürü olarak adlandırılır. Steril şartlarda ve geliştirilmiş besi ortamı üzerinde kültüre alınmak suretiyle, bitkinin çeşitli kısımlarından (meristem, yaprak vb.), hücrelerinden veya bir hücreden tam bir bitki *in vitro* şartlarda elde edilebilir. Böylelikle, elit bitki çeşitleri klonal çoğaltılabilir, tehlike altındaki bitkiler muhafaza edilebilir, meristem kültürü ile virüsten arı bitkiler elde edilebilir, bitkisel gen kaynakları saklanabilir ya da bitki hücrelerinden sekonder metabolitler üretilebilir (Stewart, 2016). Ayrıca, piyasaya yeni sürülen çeşitlerin fidanlarının hızlı bir şekilde üreticilere dağıtılmasında önemli avantajlar sağlamaktadır. Doku kültürünün bitkilerde uygulanmasındaki amaç, bitkisel üretimde bilinen klasik yöntemlerle çözümü güç olan veya

çözümlemeyen problemlere çözüm getirmek, bitkisel üretimin ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha yüksek olmasına yardımcı olmaktır (Hatipoğlu, 2018).

Bu araştırmanın amacı, ülkemizin önemli gen kaynaklarından karadutun (*Morus nigra* L.) doku kültürü yöntemi ile çoğaltılması için en uygun protokolü belirlemektir. Üretim için, en uygun eksplant alım zamanı, başlangıç, sürgün proliferasyonu ve köklendirme aşamaları için elverişli bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Kullanım alanları genişleyen ve ticari olarak da önemi artan karaduta olan talep son zamanlarda artmaktadır. Artan bu talebi karşılayabilecek hızda ve yeterli miktarda fidan üretimi, ülkemizde henüz bulunmamaktadır. Karadutta ticari kapama bahçe kurma ihtiyacının ortaya çıkması, fidan talebinin yüksek olması gibi nedenlerden dolayı hızlı çoğaltmaya imkân veren *in vitro* çoğaltım gibi alternatif metodların geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

MATERYAL ve METOD

Bitki Materyalinin Alınması

Bu araştırma, 2017-2019 yıllarında Kayısı Araştırma Enstitüsü'ne ait Doku Kültürü Laboratuvarı'nda ve İnönü Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü ile birlikte koordineli bir şekilde yürütülmüştür. Araştırmada kullanılan *M. nigra* eksplantları, Kayısı Araştırma Enstitüsü arazisinde bulunan Ülkesel Dut Genetik Kaynakları Parseli'ndeki karadutun tescilli tek çeşidi olan "Ekşi kara" çeşidinden temin edilmiştir.

Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Doku kültürü, bütün aşamaların aseptik koşullarda yapılması gerektiği ve sterilizasyonun çok önemli olduğu çalışmalardır. Çalışmada, polikarbonat gövdeli ve polipropilen kapaklı kültür kapları (Magenta Vessel GA-7) kullanılmıştır. Pens ve bisturiler her kullanımdan önce alüminyum folyoya sarılarak otoklavda sterilize edilerek kullanılmıştır. Araştırmada inokulasyon işlemleri için steril kabin kullanılmıştır.

Eksplantların Alınması

Eksplantlar, *M. nigra*'nın *in vitro* çoğaltımında uygun vejetasyon dönemini belirlemek için; Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında bir yıllık sürgünlerdeki nodal tomurcuklardan alınmıştır. Sürgünlerin uç kısımlarından 5-10 cm uzunluğunda çeliklerden yararlanılmıştır. Çelikler alındıktan sonra, saf su içerisine konulup hızla doku kültürü laboratuvarına getirilerek sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur.

Yüzey Sterilizasyonu

Çelikler laboratuvara getirildikten sonra yapraklar kesilerek sürgünden uzaklaştırılmıştır. Çelikler nodyumları içerecek şekilde 2-3 cm boyunda kesilerek mikroçelikler elde edilmiştir (Şekil 1). Mikroçeliklerin üst kısmı alt tarafa göre daha kısa bırakılmıştır. Tüm eksplantlar 3 kez saf suda yıkandıktan sonra sterilizasyon aşamalarına steril kabinde devam edilmiştir. Eksplantlar %3'lük CuSO_4 çözeltisinde,



Şekil 1. Sürgünlerin alınması ve sterilizasyona hazırlanması
Figure 1. Taking shoots and preparing them for sterilization

Başlangıç Kültürü Aşaması

Kültürü başlatma aşamasında; 4.4 g L^{-1} vitaminli Murashige ve Skoog (MS, M0222 Duchefa) 30 g L^{-1} sukroz, 7 g L^{-1} agar, 0.01 mg L^{-1} indol-3-bütirik asit (IBA), 0.2 mg L^{-1} giberellik asit (GA_3), 3 mg L^{-1} AgNO_3 , 0.5 mg L^{-1} Proclin içeren besi ortamı kullanılmıştır. Ayrıca 6-Benzilaminopürin (BAP)'ın tomurcukların sürmesi üzerine etkisini belirlemek için besi ortamına 0.75, 1 ve 3 mg L^{-1} konsantrasyonlarında BAP eklenmiştir. Besi ortamlarının pH'sı, 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanılarak 5.75'e ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlar, manyetik karıştırıcı üzerinde agar tamamen eriyinceye kadar tutularak kültür kaplarına yaklaşık 15 mL olacak şekilde doldurularak 121 °C'de 1.1 atm basınçta 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Her kaptaki dört eksplant olacak şekilde dikim yapılmıştır. Dikim sonrası 4 hafta süreyle 25±1°C'de, 16 saat fotoperiyotta, 4000 lux floresan lamba altında kültüre alınmıştır. 4 haftalık gelişme periyodu sonunda sürgün çoğaltım aşamasına transfer edilmiştir.

Sürgün Çoğaltımı Aşaması

Sürgün çoğaltım aşamasında, başlangıç ortamından elde edilen sağlıklı sürgünler kullanılmıştır. 4.4 g L^{-1} MS, 30 g L^{-1} sukroz, 7 g L^{-1} agar, 0.01 mg L^{-1} IBA, 0.2 mg L^{-1} GA_3 , 3 mg L^{-1} AgNO_3 , 0.5 mg L^{-1} Proclin içeren besi ortamında sürgünlerin gelişmesi sağlanmıştır. Ayrıca sürgün çoğaltımında uygun BAP konsantrasyonunu belirlemek için besi ortamına 0.75, 1 ve 3 mg L^{-1} konsantrasyonlarında BAP ilave edilmiştir. Besin ortamlarının pH'sı, 0.1 N HCl ve 0.1 N NaOH kullanılarak 5.75'e ayarlanmıştır. Hazırlanan ortamlar kültür kaplarına doldurularak ve 121 °C'de 1.1 atm basınçta 20 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Sürgünler 4 hafta süreyle 25±1

manyetik karıştırıcıda çalkalanarak 20 dk bekletilmiş, daha sonra %70'lik etil alkolde ise 1 dk tutulmuştur. Bu uygulamalardan sonra steril saf su ile çalkalanan eksplantlar, %30'luk NaOCl ve 5-6 damla Tween 20 içeren çözeltiye alınarak burada 15 dk tutulmuştur. %5 Proclin (ProClin 200, Sigma) içeren suda 5 dk bekletildikten sonra 3'er kez 5 dk olacak şekilde steril saf su ile yıkanarak yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

°C'de, 16 saat fotoperiyotta floresan lamba altında kültüre alınmıştır.

Köklendirme Aşaması

Köklendirme aşamasında, 4.4 g L^{-1} MS, 30 g L^{-1} sukroz, 7 g L^{-1} agar, 3 mg L^{-1} AgNO_3 , 0.5 mg L^{-1} Proclin içeren besi ortamı kullanılmıştır. Ayrıca besi ortamına, köklenmede uygun IBA dozunu belirlemek üzere 0.5, 1.5 ve 2.5 mg L^{-1} konsantrasyonlarında IBA eklenmiştir.

Kültür başlatma ve sürgün çoğaltım aşamasında eklenen 0.01 mg L^{-1} IBA, 0.2 mg L^{-1} GA_3 ile kültür başlatma, sürgün çoğaltımı ve köklenme aşamalarında eklenen 3 mg L^{-1} AgNO_3 , 0.5 mg L^{-1} proclin sabit tutulmuştur, sadece BAP ve IBA konsantrasyonları değişmiştir.

Aklimatizasyon Aşaması

In vitro koşullarda köklendirilen bitkiler, aklimatizasyona alınmıştır. Köklenmiş bitkiler, akan musluk suyu altında yıkanarak besi yeri kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Bu işlem, mikroorganizma kaynaklı çürümelere en aza indirmek için yapılmıştır. Aklimatizasyon kabı olarak altına tek delik açılmış plastik bardak kullanılmıştır. Ortam harcı olarak otoklavlanmış %80 torf %20 perlit karışımı kullanılmıştır. Bitkiler, plastik bardaklara dikildikten sonra otoklavlanmış distile su ile sulanmıştır ve boş bir plastik bardak ile üzeri kapatılmıştır. 3 hafta sonra kademeli olarak üzeri açılarak aklimatizasyon aşaması tamamlanmıştır.

İstatistiksel Analizler

Araştırmada elde edilen verilerin analizleri, SPSS (Statistical Program in Social Sciences) 25 programı ile gerçekleştirilmiştir. Test sonuçları için, anlamlılık

düzeyi (p) 0.05 olarak alınmıştır. Çalışmada verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk Testi ile, varyansların homojenliği ise LEVENE testi ile kontrol edilmiştir. Veriler normal dağılım sağladığı için, çok gruplu değişkenlerin analizinde parametrik test yöntemlerinden ANOVA testi kullanılmış ve gruplar arası ikili karşılaştırmalar için Duncan çoklu karşılaştırma testi yapılmıştır. Tekrarlı gözleme sahip verilerde ise, tekrarlayan ölçümlerde ANOVA analizi yapılmış çoklu karşılaştırmalarda ise, LSD Testi kullanılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Yüzey Sterilizasyonu ve Başlangıç Kültürü

Aylara ve BAP konsantrasyonlarına bağlı sterilizasyon ve kültür başlatma sonuçlarının saptanan değerleri Çizelge 1’de verilmiştir. Haziran, Temmuz ve Ağustos aylarında alınan eksplantlar, aynı sterilizasyon yöntemine tabi tutulmuştur. Haziran ayında başlatılan kültürler %91 sürme ve %8.67 kontaminasyon oranı ile daha başarılı bulunmuştur. Ağustos ayında kontaminasyon oranı

%13.33 ile en yüksek ve sürme oranı %79.33 ile en düşük saptanmıştır. Bu durum, Temmuz ve Ağustos aylarında karadut ağaçlarında tomurcukların büyüerek tomurcuk pullarında daha fazla toz tutması ve artan sıcaklığa bağlı inhibitör hormonların bitkide sentezi ile olabileceğini düşündürmüştür. Ayrıca bu aylarda sürgünler tüylerle kaplanarak kalınlaşmıştır. Tüylerin tuttuğu mikroorganizmalar, besi ortamında çoğalmaları için uygun koşul bularak hızla çoğalmıştır. Kışın yaprağını döken türlerin yeşil çelikleri için en iyi sonuçlar genellikle, çeliklerin mümkün olduğu kadar erken alınmasıyla elde edilir. Ancak bu sırada yapraklar tam bütünlüğünü almış ve sürgünler bir dereceye kadar olgunlaşmış olmalıdır. Birçok elma çeşitlerinde, yeşil çeliklerin köklenmesi üzerinde yapılan araştırmalarda, köklenmeyi uyarıcı kimyasal maddelerin optimum etkilerinde, çelik yaşının bir ay artmasıyla bile azalma olduğu bulunmuştur. En iyi sonuç, çeliklerin Mayıs ayında, sürgünler 10-17 cm boyunda iken alınmaları halinde elde edilmiştir (Hartman ve Kester, 1975).

Çizelge 1. Başlangıç kültürü sonuçlarının BAP değerlerine göre değişimi
Table 1. Change of culture initiation results by BAP values

| Gruplar Groups | Aylar Months | 0.75 mg L ⁻¹ BAP 0.75 mg L ⁻¹ BAP | 1 mg L ⁻¹ BAP 1 mg L ⁻¹ BAP | 3 mg L ⁻¹ BAP 3 mg L ⁻¹ BAP | BAP (A) p değeri BAP (A) p value | Aylar (B) p değeri Months (B) p value | BAP*Aylar (A*B) p değeri BAP *Months (A*B) p value |
|---|-----------------|--|--|--|---|--|---|
| Sürme oranı (%) Sprout rate (%) | Haziran | a91.0 ± 1.0a | a88 ± 1b | a85.0 ± 1.0a | 0.001* | 0.001* | 0.134** |
| | Temmuz | b88.0 ± 2.0a | b85 ± 1b | b79.67 ± 0.58a | | | |
| | Ağustos | c84.33 ± 1.15a | c83 ± 2b | c79.33 ± 0.58a | | | |
| Kontaminasyon oranı (%) Contamination rate (%) | Haziran | a8.67 ± 0.58a | a10.33 ± 1.53b | a9.0 ± 1.0ab | 0.001* | 0.030* | 0.080** |
| | Temmuz | b10.0 ± 1.0a | b14.33 ± 1.53b | b13.67 ± 0.58c | | | |
| | Ağustos | c13.33 ± 1.53a | c15.0 ± 2.0b | c13.33 ± 0.58c | | | |
| Sürgün uzunluğu (mm) Shoot length (mm) | Haziran | a24.0 ± 1.0a | a22.0 ± 1.0a | a15.33 ± 0.58b | 0.001* | 0.001* | 0.089** |
| | Temmuz | b22.33 ± 0.58a | b22.0 ± 1.0b | b16.67 ± 0.58a | | | |
| | Ağustos | c21.67 ± 0.58a | c21.67 ± 0.58a | c15.33 ± 0.58a | | | |
| Sürgün sayısı (Adet) Shoot number | Haziran | a3.67 ± 0.58a | a2.67 ± 0.58a | a1.33 ± 0.58a | 0.001* | 0.001* | 0.932** |
| | Temmuz | b2.67 ± 0.58a | b2.33 ± 0.58a | a1.33 ± 0.58a | | | |
| | Ağustos | c3.0 ± 0.0a | c2.0 ± 0.0a | a1.33 ± 0.58b | | | |
| Boğum sayısı (Adet) Node number | Haziran | a2.67 ± 0.58a | a2.33 ± 0.58a | a2.33 ± 0.58a | 0.001* | 0.001* | 0.513** |
| | Temmuz | b3.0 ± 1.0a | a2.33 ± 0.58b | b2.0 ± 1.0a | | | |
| | Ağustos | c3.67 ± 0.58.0a | b2.0 ± 0.0b | b2.0 ± 1.0c | | | |

p değeri; Tekrarlı ölçümlerde ANOVA testi sonucu. *p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı fark vardır. **p>0.05 istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur. Sol tarafta yer alan harfler aylara göre değişimi gösterirken, sağ tarafta yer alan harfler gruplar arası değişimi göstermektedir.

p value; ANOVA test result in repeated measurements. * p <0.05 statistically significant difference, ** p > 0.05 no statistically significant difference. While the letters on the left show the change according to the months, the letters on the right show the change between groups.

Kültürde kullanılan 0.75 mg L⁻¹ BAP dozunun, en iyi sürme oranı, sürgün uzunluğu, sürgün sayısı ve boğum sayısı ile etkili olduğu saptandı. BAP konsantrasyonunun artması sürgünlerin daha kısa olmasına neden olurken yaprak alanını artırdığı

gözlemlendi. 3 mg L⁻¹ BAP içeren besi ortamında çoğaltılan eksplantlarda en kısa sürgünler ölçüldü. Balakrishnan ve ark. (2009) *M. alba*'nın nodal tomurcuklarını kullanarak yaptıkları çalışmada, besin ortamındaki BAP konsantrasyonu arttıkça

sürgün uzunluğunda azalma olduğunu bildirmişlerdir. Ahalya ve ark. (2020) farklı dut genotiplerinden (*Morus* spp.) alınan nodal eksplantların sürme oranını, en yüksek M-5 genotipinde %83 ile 1 mg L⁻¹ BAP ve 1 mg L⁻¹ NAA dozlarını içeren MS besi ortamında bulmuşlardır. En düşük sürme oranının ise % 56 ile Mysore genotipinde, 0.5 mg L⁻¹ BAP ve 1 mg L⁻¹ NAA dozlarını içeren ortamda bulunduğunu belirtmektedirler. Araştırmacılar, tomurcukların sürme oranının, genotipik farklılığa ve bitki büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonuna bağlı olduğunu bildirmektedirler.

Sürgün Çoğaltımı

Sürgün çoğaltımında farklı BAP konsantrasyonlarının etkisi Çizelge 2’te verilmiştir (Şekil 2).

Besi ortamına eklenen BAP konsantrasyonunun artması vitrifikasyon oranını artırmıştır. 3 mg L⁻¹ BAP uygulamasında %9.67 ile en yüksek vitrifikasyon oranı, 22.6 mm ile en düşük sürgün uzunluğu ve 2.33 adet ile en düşük boğum sayısı bulunmuştur. Sürgün uzunluğunun en yüksek 30.87 mm ve boğum sayısının en fazla 5.3 adet olması ile

sürgün çoğaltımı için uygun konsantrasyonunun 1 mg L⁻¹ BAP olduğu belirlenmiştir. Gogoi ve ark. (2017) *M. indica*’nın çoğaltımında, nodal eksplant kullanmışlardır. Sürgün çoğaltımı için MS besi ortamına 0.5, 1, 1.5, 2 ve 2.5 mg L⁻¹ BAP eklemişlerdir. Bu araştırmaya benzer olarak, BAP konsantrasyonunun artması ile, sürgün uzunluğunu azaldığını, en uzun sürgünün (2 cm) 0.5 mg L⁻¹ BAP ve en kısa sürgünün ise (1.2 cm) 2.5 mg L⁻¹ BAP ilavesinde gözlemişlerdir. İnternodyum sayısı en fazla (4.2 adet) 1.5 mg L⁻¹ BAP, en az (3.3 adet) ise 2.5 mg L⁻¹ BAP konsantrasyonunda bulmuşlardır. Zaki ve ark. (2011) *M. nigra* bitkisinin *in vitro* çoğaltımında, MS besi ortamına eklenen 0.5 mg L⁻¹ ve 1.5 mg L⁻¹ BAP dozlarının sürgün proliferasyon oranlarını sırası ile %80 ve %90 olarak belirlemişlerdir. Araştırma bulgularına göre sürgün proliferasyon oranları her üç ayda da yüksek bulunmuştur. En yüksek değer, Haziran ayında 0.75 mg L⁻¹ BAP uygulanan grupta %91 olarak saptanmıştır (Çizelge 1). Odunsu bitkilerin *in vitro* koşullardaki çoğaltımında BAP konsantrasyonunun yanı sıra bitkilerin besi ortamına tutunmasını sağlayan agar gibi jel yapıcı maddeler de vitrifikasyona sebep olabilmektedir.

Çizelge 2. Sürgün çoğaltımının BAP değerlerine göre değişimi

Table 2. Change of shoot propagation according to BAP values

| Gruplar Groups | 0.75 mg L ⁻¹ BAP 0.75 mg L ⁻¹ BAP | 1 mg L ⁻¹ BAP 1 mg L ⁻¹ BAP | 3 mg L ⁻¹ BAP 3 mg L ⁻¹ BAP |
|--|--|--|--|
| Alt kültüre alınabilir eksplant (%) Explant that can be subcultured (%) | a95.33 ± 1.15 | a94.33 ± 2.08 | b85.00 ± 1.00 |
| Vitrifikasyon oranı (%) Vitrification rate (%) | a2.33 ± 0.58 | a2.67 ± 0.58 | b9.67 ± 0.58 |
| Sürgün uzunluğu (mm) Shoot length (mm) | a27.9 ± 0.26 | b30.87 ± 0.91 | c22.6 ± 0.36 |
| Boğum sayısı (adet) Node number | a3.33 ± 0.58 | b5.33 ± 0.58 | a2.33 ± 0.58 |

Harfler satır içindeki değişimleri göstermektedir.

Letters indicate the changes within the line.



Şekil 2. *M. nigra*’da sürgün çoğaltımı
Figure 2. Shoot propagation in *M. nigra*

Ekşi kara çeşidinde boğum sayısı değişimi en yüksek 1 mg L⁻¹ BAP grubunda 5.33 adet olup, en düşük ise 3 mg L⁻¹ BAP grubunda 2.33 adet ölçülmüştür. Đurkovič ve ark. (2012) *M. nigra*’da sürgün proliferasyonunda MS besi ortamına eklenen 0.5 mg L⁻¹ BAP ve 0.1 mg L⁻¹ IBA kombinasyonunun en iyi sonuç verdiğini; Mn1 genotipinde 5.3 adet/sürgün ve Mn2 genotipinde 6.9 adet/sürgün elde ettiklerini bildirmişlerdir. Yıldız ve Yılmaz (1999) *M. nigra*’nın

doku kültürü ile çoğaltımında MS besi ortamına 5 mg L⁻¹ kinetin ilavesi ile eksplant başına en fazla sürgün (4.1 adet) saptamışlardır. Kalkışım ve ark. (2013) *M. nigra*’nın çoğaltımı için MS besi ortamına 1.0 ve 2.0 mg L⁻¹ BAP eklenmesinin; rejenerasyonu, sürgün sayısını, sürgün uzunluğunu ve yaprak sayısını artırdığını bildirmişlerdir. Araştırma bulgularına göre sürgün sayısı, en yüksek 3.67 adet olarak 0.75 mg L⁻¹ BAP uygulanan grupta saptanmıştır.

Çeşitli dut türleri ile yapılan çalışmalarda; sürgün gelişimi ve çoğaltımı için BAP diğer sitokininler ile karşılaştırıldığında daha etkili olduğu belirlenmiştir (Yadav ve ark. 1990; Pattnaik ve Chand 1997). Bununla birlikte yüksek BAP konsantrasyonunun sürgün çoğaltımını engellediği, düşük konsantrasyonlarda daha başarılı sonuçların elde edildiği belirtilmektedir (Bhau ve Wakhlu 2003; Channuntapipat ve ark. 2003; Rugini ve Verma 1983; Tabachnik ve Kester 1977). *M. nigra*'nın sürgün ucu ve koltuk tomurcuğu eksplantlarında en iyi sürgün gelişiminin 1 mg L⁻¹ BAP uygulamasında elde edildiğini belirtmektedir (Yadav ve ark., 1990). Dagman (2019) Myrobolan anacının mikroçoğaltımında 1 mg L⁻¹ BAP içeren MS besi ortamında kardeş sayısını 5.25 adet/ bitki ve sürgün boyunu 2.25 cm ölçmüştür. Yapılan çalışmada da benzer şekilde 0.75 mg L⁻¹ BAP uygulanan gruplarda karadutun gelişiminin daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Köklendirme

Köklenme üzerine IBA konsantrasyonlarının etkisi, Çizelge 3'de verilmiştir. *In vitro*'da bitkicikler 3-4 haftada köklenmişlerdir (Şekil 3).



Şekil 3. *M. nigra*'da köklendirme

Çizelge 3. Köklendirme sonuçlarının IBA konsantrasyonlarına göre değişimi

Table 3. Variation of rooting results according to IBA concentrations

| Gruplar Groups | 0.75 mg L ⁻¹ IBA 0.75 mg L ⁻¹ IBA | 1.5 mg L ⁻¹ IBA 1.5 mg L ⁻¹ IBA | 2.5 mg L ⁻¹ IBA 2.5 mg L ⁻¹ IBA |
|--|--|--|--|
| Köklenme oranı (%) <i>Rooting rate (%)</i> | ab92.00 ± 1.00 | a95.00 ± 1.00 | b87.33 ± 3.06 |
| Kök uzunluğu (mm) <i>Root length (mm)</i> | a52.8 ± 1.11 | b66.6 ± 1.18 | c55.83 ± 0.57 |
| Sürgün uzunluğu (mm) <i>Shoot length (mm)</i> | a34.97 ± 1.00 | b52.5 ± 1.50 | a34.37 ± 1.27 |
| Kök sayısı/Sürgün (Adet) <i>Root Number/Shoot (Number)</i> | ab5.33 ± 0.58 | a6.67 ± 0.58 | b4.67 ± 0.58 |

Harfler satır içindeki değişimleri göstermektedir.

Letters indicate the changes within the line.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Karadutun gıda sanayisinde ön plana çıkması ve antosiyanin içeriği ile ilaç sanayisinde kullanılması, karadut yetiştiriciliğine talebi artırmıştır. Diğer çoğaltım yöntemleri ile karşılaştırıldığında, birçok avantajı bulunan *in vitro* çoğaltım için en uygun yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. Karadutun mikroçoğaltım protokolünün belirlendiği bu çalışmada, eksplant olarak nodal tomurcuklar kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre,

Figure 3. Rooting in *M. nigra*

En iyi köklenme oranı %95 ile 1.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasında tespit edilmiştir. Bu konsantrasyon; sürgün uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu kriterleri ile de önemli bulunmuştur. Kök uzunluğu değişiminde en düşük değer, 52.8 mm ile 0.75 mg L⁻¹ IBA grubunda olup, en yüksek değer 66.6 mm ile 1.5 mg L⁻¹ IBA grubunda ölçülmüştür. Sürgün uzunluğu değişiminde en yüksek değer, 52.5 mm ile 1.5 mg L⁻¹ IBA grubunda olup, en düşük değer ise 34.37 mm ile 3 mg L⁻¹ IBA grubunda ölçülmüştür. Kök sayısı/sürgün değişiminde en düşük değer, 3 mg L⁻¹ IBA grubunda 4.67 adet iken en yüksek değer 1.5 mg L⁻¹ IBA grubunda 6.67 adet olarak ölçülmüştür.

Özkul (2014) urmu dutunun (*M. nigra*) çoğaltımında %84 köklenme oranı ile 1 mg L⁻¹ IBA'nın köklenme için en uygun doz olduğu bildirmiştir. Habib ve ark. (2003) *M. alba*'nın çoğaltımı üzerine yaptıkları çalışmada, en yüksek köklenmeyi MS ortamında, 0.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasında elde etmişlerdir. Şengül (2012) *M. nigra*'nın *in vitro* köklendirilmesinde, MS besi ortamına eklenen 0.5 mg L⁻¹ IBA ile %29.6 köklenme başarısı sağladığını, 1 mg L⁻¹ IBA'da başarının %25'e düştüğünü bildirmiştir. 0.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasının 3.8 adet kök sayısı, 67.2 mm kök uzunluğu ve 24.8 mm sürgün uzunluğu ile daha başarılı olduğunu belirtmektedir. Gökdere (2019) *Prunus domestica*'nın köklendirilmesinde, IBA konsantrasyonunun kök sayısı üzerine etkisini araştırıldığı çalışmada kök sayısını, 0.3 mg L⁻¹ IBA uygulamasında 1.25 adet, 1 mg L⁻¹ IBA'da 2.5 adet ve 2 mg L⁻¹ IBA'da ise 2 adet olarak saptamıştır. Ekşi kara çeşidinde *in vitro* ortamda kök gelişimi için, 1.5 mg L⁻¹ IBA uygulamasının en uygun konsantrasyon olduğu bulunmuştur (Çizelge 3).

eksplantların alınması için Haziran ayının uygun olduğu, kültür başlatma için 0.75 mg L⁻¹ BAP, sürgün çoğaltımı için 1 mg L⁻¹ BAP ve köklenme için 1.5 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonlarının uygun olduğu belirlenmiştir. Doku kültüründe nodal eksplanttan bu mikroçoğaltım protokolü kullanılarak 20-25 haftada tam bir bitki elde edilmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmada karadutun mikroçoğaltım yöntemi ile hızlı çoğaltılması için uygun protokolün bulunduğunu ve bundan sonra yapılacak araştırmalar için

bulguların bilim insanlarına önemli katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma Duygu ÖZELÇİ'nin doktora tezinin bir bölümüdür. Araştırmayı maddi olarak destekleyen İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje birimine (Proje No FDK-2017-682), Laboratuvar imkanları ve örneklerin temininin sağlanmasındaki katkılarından dolayı Kayısı Araştırma Enstitüsü'ne teşekkür ederiz.

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 2010. Tarımsal yapı (üretim, fiyat, değer). T.C. Başbakanlık Devlet İstatistik Enstitüsü.
- Ahalya, BN 2020. Varietal response for *in vitro* shoot development in mulberry (*Morus* spp.). Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 9(4): 1405-1407.
- Ayfer M, Gülşen Y, Kantarcı M 1986. Ayaş dutunun çelikle çoğaltımı üzerine bir araştırma. Ank. Ü. Ziraat Fak. Yıllığı, 35: 289-297.
- Balakrishnan V, Ram Latha M, Ravindran KC, Philip Robinson J 2009. Clonal propagation of *Morus alba* L. through nodal and axillary bud explants. Botany Research International, 2 (1): 42-49.
- Benedetta C, Germana P, Germana MA 2007. *In vitro* response of two Sicilian genotypes of *Morus* (L.) through axillary bud culture. Caryologia, 60(1-2): 178-181.
- Bhau BS, Wakhlu AK 2003. Rapid micropropagation of five cultivars of mulberry. Biologia Plantarum, 46 (3):349-355.
- Bhojwani SS, Razdan MK 1996. Plant tissue culture: Theory and practice, a revised edition. Elsevier: Amsterdam, S. 1-766.
- Channuntapipat C, Wirthensohn M, Ramesh SA, Battle I, Arus P, Sedgly M, Collins G 2003. Identification of incompatibility in genotypes of almond (*Prunus dulcis*) using specific primers based on the intrones of the s-alleles. Plant Breed., 122: 164- 168.
- Dagman FHA 2019. Bazı meyve anaçlarının klasik doku kültürü ve yeni nesil geçici daldırma biyoreaktör sistemi ile mikroçoğaltımı. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 62 sy.
- Datta RK 2002. Mulberry cultivation and utilization in India. Mulberry for animal production. FAO

- animal production and health paper, 147: 45-62.
- Đurković J, Kaňuchová A., Kačík F, Solár R, Lengyelová A 2012. Genotype-and age-dependent patterns of lignin and cellulose in regenerants derived from 80-year-old trees of black mulberry (*Morus nigra* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC): 108(3): 359-370.
- Gogoi G, Borua PK, Al-Khayri JM 2017. Improved micropropagation and *in vitro* fruiting of *Morus indica* L.(K-2 cultivar). Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 15(1): 249-256.
- Gökdere S 2019. *In vitro* sürgün ucu yöntemiyle erik (*Prunus domestica* l.) anacinin klonal çoğaltımı. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 56 sy.
- Gökmen H 1973. Kapalı tohumlular. Şark Matbaası. Ankara, 1, 186-190.
- Güneş M, Çekiç Ç 2011. Effects of various rootstocks, budding times and techniques on budding success of black mulberry. Propagation of Ornamental Plants, 11(1): 44-46.
- Habib A, Ali MR, Amin MN, Rahman MM 2003. Clonal propagation of white mulberry (*Morus alba* L.) using *in vitro* technique. Journal of Biological Sciences 3 (12): 1181-1187.
- Hartman HT, Kester DE 1975. Plant propagation principles and practices, 3rd ed. Prentice-Hall. INC. U.S.A.
- Hatipoğlu R 2018. Bitki biyoteknolojisi. Ç.Ü. Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190. Ders kitapları yayın no: A-58.
- Kalkışım Ö, Turan A, Azeri FN, Özdeş D 2013. Kara dut (*Morus nigra* L.) bitkisinin *in vitro* çoğaltımı. Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 3(2): 77-84.
- Karadeniz T, Şişman T 2004. Beyaz dut ve karadutun meyve özellikleri ve çelikle çoğaltılması. Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu Kitabı, Trabzon, S: 428 - 432.
- Koyuncu F, Şenel E 2003. Rooting of black mulberry (*Morus nigra* L.) hardwood cuttings. J. Fruit Ornament. Plant Res., 11: 53-57.
- Koyuncu F, Vural E, Çelik M 2004. Kara dut (*Morus nigra* L.) çeliklerinin köklendirilmesi üzerine araştırmalar. Ulusal Kivi ve Üzümsü Meyveler Sempozyumu Kitabı, s: 424-427, Trabzon.
- Nas MN, Read PE 2004. Hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. Sci. Hort. 101: 189-200.
- Özkan Y, Arslan A 1996. Kara dut'un (*Morus nigra* L.) odun ve yeşil çelikle çoğaltılması üzerine araştırmalar. GOP Ü. Ziraat Fak. Dergisi, 13(1): 15-27.
- Özkul M 2014. Urnu dutunun (*Morus nigra* L.) *in vitro* mikroçoğaltımı. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe

- Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 67 sy.
- Pattnaik SK, Chand PK 1997. Rapid clonal propagation of three mulberries, *Morus cathayana* Hemsl., *M. lhou* Koiz. and *M. serrata* Roxb., through *in vitro* culture of apical shoot buds and nodal explants from mature trees. Plant Cell Rep. 16: 503-508.
- Rugini E, Verma DC 1983. Micropropagation of a difficult-to-propagate almond (*Prunus amygdalus*, Batsch) cultivar. Plant Sci. Lett. 28: 273-281.
- Stewart N 2016. Bitki biyoteknolojisi ve genetik İlkeler, teknikler ve uygulamalar (Çev. H.A. Öktem, M.Yücel). Nobel Akademik Yayıncılık. (orijinal yayın tarihi 2008).
- Suttie JM 2002. *Morus alba* L. (http://www.fao.org/WAICENT/FAOINFO/AGRI_CULT/AGP/agpc/doc/GBASE/data/pf000542.htm).
- Şengül E 2012. Karadutun (*Morus nigra* L.) *in vitro* çoğaltımı. Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 60 sy.
- Tabachnik L, Kester DE 1977. Shoot culture for almond and almond-peach hybrid clones *in vitro*. HortScience 12: 545-547.
- Ünal A, Özçağırın R, Hepaksoy S 1992. Karadut ve mordut çeşitlerinde odun çeliklerinin köklenmesi üzerinde bir araştırma. Türkiye, İzmir, I. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 13- 16 Ekim 1992, Cilt 1, 267-270. Vijayan K, Tikader A, Weiguo Z, Nair CV, Ercisli S, Tsou CH 2011. *Morus*. In wild crop relatives: genomic and breeding resources (pp. 75-95). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Vijayan K, Srivastava PP, Raju PJ, Saratchandra B 2012. Breeding for higher productivity in mulberry, Czech J. Genet. Plant Breed. 48:147-156.
- Vural U, Dumanoğlu H, Erdoğan V 2008. Effect of grafting/budding techniques and time on propagation of black mulberry (*Morus nigra* L.) in cold temperate zones. Propagation of Ornamental Plants, 8(2): 55-58.
- Yadav U, Lal M, Jaiswal VS 1990. Micropropagation of *Morus nigra* L. from shoot tip and nodal explants of mature trees. Scientia Horticulturæ, 44(1-2): 61-67.
- Yıldız K, Yılmaz H 1999. *In vitro* kültüre alınan karadut (*Morus nigra* L.) eksplantlarında farklı hormon ve dozlarının sürgün oluşumuna etkileri üzerinde bir araştırma. 11. Kükem-Biyoteknoloji Kongresi Özel Sayısı, 23 (2): 211-216.
- Zaki M, Kaloo ZA, Sofi MS 2011. Micropropagation of *Morus nigra* L. from nodal segments with axillary buds. World Journal of Agricultural Sciences, 7(4): 496-503.

Türkiye'nin 2020-2045 Döneminde Ceviz Üretim ve Gereksinim Projeksiyonu

İsmail GÜVENÇ^{1*}, Gürkan PURLU²

¹ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Kahramanmaraş, Türkiye, ² Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Ana Bilim Dalı, Kahramanmaraş, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0002-4686-9487>, ²<https://orcid.org/0000-0002-0573-480X>

✉: Sorumlu Yazar e-posta: ismailguvenc@ksu.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'nin cevizde mevcut üretim ile gelecekteki üretim ve gereksinim tahmini incelenmiştir. Bu amaçla 1999-2019 döneminde gerçekleşen üretim ve talep verilerinden yararlanarak, 2020-2045 yılı üretim ve gereksinim miktarı tahmin edilmiştir. Türkiye'de ceviz üretim miktarı 1999 yılında 120 bin ton iken, 2019 yılında % 87.50 oranında artarak 225 bin ton olarak gerçekleşmiştir. Türkiye'de bu üretim artışa rağmen, 2019 yılında iç ceviz talebi 289 bin ton olup, Türkiye kendi üretimi ile bu talebi karşılayamamaktadır. Bu nedenle Türkiye ceviz gereksinimini ithalat yoluyla temin etmekte olup, ceviz dış ticaretinde açık vermektedir. Nitekim 2018 yılında Türkiye'nin ceviz ithalatı 103 bin ton iken, ihracatı ise 30 bin ton civarındadır. Türkiye'de meyve veren ağaç sayısı 1999 yılında 3.525 bin adet iken 2019 yılında % 319.18 artışla 11.251 bin adete yükselmiştir. 1999-2019 döneminde ceviz üretimi ile meyve veren ağaç sayısı arasında yüksek düzeyde bir ilişkinin ($r=0.870$) olduğu belirlenmiştir. Aynı dönemde meyve vermeyen ağaç sayısında ise % 769.54 artış olmuştur. İncelemenin sonuçlarına göre 2020-2045 döneminde ceviz üretiminde ve gereksinimde artış olacağı öngörülmektedir. Türkiye'de ceviz üretimi 2045 yılına kadar 550-600 bin tona yükseleceği tahmin edilmektedir. Gereksinim miktarının ise dönemsel eğilim ve talep artışına göre 500-560 bin ton civarında olması öngörülmüştür. Sonuç olarak, 2020-2045 döneminde Türkiye'nin cevizde kendine yeterli bir ülke konumuna geleceği tahmin edilmektedir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 28.12.2020

Kabul Tarihi : 02.04.2021

Anahtar Kelimeler

Ceviz

Üretim

Talep

Projeksiyon

Projections of Production and Demand for Walnut in The Period 2020-2045 in Turkey

ABSTRACT

In this study, current production rate as well as the projections of production and needs for walnuts in the period of 2020-2045 in Turkey were evaluated. For this purpose, the production and demand amount of 2020-2045 was estimated by making use of the production and demand data obtained in the period of 1999-2019. While the amount of walnut production in Turkey in 1999 was about 120 thousand tons, it became 225 thousand tons as increased by 87.50% in 2019. Despite this increase in production, domestic demand of walnut in 2019 was about 289 thousand tons, and Turkey could not meet its own demand. Therefore, Turkey has imported walnuts and there has been foreign trade deficit for the country. In fact, while Turkey's imports for walnuts in 2018 were around 103 thousand tons, the exports were about 30 thousand tons. Although the number of fruiting trees was about 3 millions 525 thousands in Turkey in 1999, it increased with the rate of 319.18 % up to 11 million and 251 thousands in 2019. It was determined that there was a high level of relationship ($r = 0.870$) between walnut production and the number of fruit-bearing trees in the period of 1999-2019. In the same period, there was a 769.54% increase in the number of trees that did not bear fruit. According to the results of this study, it is estimated that there will be an increase in the demand and the

Research Article

Article History

Received : 28.12.2020

Accepted : 02.04.2021

Keywords

Walnut

Production

Demand

Projection

production of walnuts in the 2020-2045 period. In fact, walnut production in Turkey is estimated to rise to 550-600 thousand tons by 2045. As for demand, it is calculated to be around 500-560 thousand tons according to the periodic trend and demand increment. As a result, it is expected that Turkey will have a feature of self-sufficiency for walnuts during the period of 2020-2045.

Atıf İçin: Güvenç İ, Purlu G 2022. Türkiye'nin 2020-2045 Döneminde Ceviz Üretim ve Gereksinim Projeksiyonu. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25(1): 57-65. DOI: 10.18016/ksutarimdog.a.vi.848460.
To Cite Güvenç İ, Purlu G 2022. Projections of production and demand for walnut in the period 2020-2045 in Turkey. KSU J. Agric Nat 25(1): 57-65. DOI: 10.18016/ksutarimdog.a.vi.848460.

GİRİŞ

Ekonomik faaliyetlerin hareket noktası insan gereksinimleri ve isteklerinden oluşmaktadır. İnsanların gereksinimlerini karşılama yönünde davranışta bulunması talebi oluşturur. Talep karşısında işletmelerin mal ve hizmet sunumunda bulunmaları arz olarak nitelenir. İnsan gereksinim ve isteklerini karşılamaya yarayan somut araçlara mal denilmektedir (Karalar, 2003). Gıda maddeleri ekonomik bir kavram olarak tüketim malları içerisinde değerlendirilmektedir. Türkiye'de 80 kadar bahçe ürününün üretimi (arz) yapılmakta ve bu bahçe ürünlerine yüksek düzeyde talep edilmektedir. Bu ürünlerden biri de cevizdir. Ceviz uzun ömürlü bir ağaçtır. Üretim esnekliği birçok meyve gibi düşüktür. Yani üretim sürecinin tüketici gereksinimlerine hızla cevap verme yeteneği azdır. Bahçe kurulumu tam meyve verebilmesi için yıllar gerekir.

Cevizin anavatanı arasında Türkiye'nin de bulunduğu sert kabuklu bir meyve türüdür. Bu tür dünyada Anadolu veya İran cevizi olarak da bilinmektedir (Özçağırın ve ark., 2007). Ceviz latince tür ismi (*Juglans regia* L.) Juglans adlı bir kelimedenden gelmekte olup, bu kelime Tanrının meyvesi anlamındadır. Türkiye'de de ceviz yetiştiriciliği oldukça eski tarihlere dayanır. Nitekim Osmanlı Tahrir Defterleri'nin bazılarında (Yinanç ve Elibüyük, 1988) Anadolu'da on beşinci yüzyılda ceviz yetiştiriciliğinin var olduğuna dair bilgilere rastlanılmaktadır.

Ceviz besin olarak değerli bir kuru meyvedir. Ceviz taze veya kuru olarak tüketilmekte şekerleme ve sıra ürünlerinin yapımında da hammadde olarak kullanılmakta ve gövde ve dallarında elde edilen kerestesi mobilya sanayinde oldukça değerlendirilmektedir (Özçağırın ve ark., 2007; Şen, 2011; Yücer, 2013).

Dünya ceviz üretiminin % 5.20'i Türkiye'de üretilmektedir. Son yıllarda cevizde üretimi artırıcı politikalara önem verilmektedir. Bu doğrultuda 1999-2019 döneminde meyve veren ve vermeyen ağaç sayısında yüksek bir artış olmuştur (Anonim, 2020). Bu durumda gelecekteki üretim miktarının iç ve dış pazar üzerine nasıl bir etkisi olacağını değerlendirilmesi önemlidir.

Ülke nüfusunun ve ceviz tüketiminin hızla artması (talep genişlemesi) cevizde yeterlilik derecesinde azalmaya neden olmuştur. Nitekim cevizde yeterlilik 2000 yılında %93.9 iken 2018 yılında %74.2'e gerilemiştir (Anonim, 2020).

Türkiye ceviz ihtiyacının bir kısmını ithalat yoluyla temin etmektedir. Türkiye ceviz dış ticaretinde açık veren bir ülke durumundadır. Bundan dolayı Türkiye ithalatçı ülke konumundadır (Güvenç ve Kazankaya, 2019). Ancak Türkiye kendi üretimi ile iç pazar taleplerini karşılama yanında ihraç etme potansiyeli vardır. Ancak mevcut analizler Türkiye'nin ceviz dış ticaretinde rekabeti açısından zayıf olduğunu göstermektedir. Türkiye'de kaliteli ceviz çeşitleri üretimi pazarlarda uygun fiyat oluşumu ve ticaretinde rekabeti artırmaya yardımcı olacaktır (Ketenci ve Bayramoğlu, 2018; Güvenç ve Kazankaya, 2019). İhracatta yapılacak iyileştirme çalışmaları için üretim miktarındaki artış da önemlidir.

Cevizde üretim projeksiyonunu inceleyen çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bununla birlikte Türkiye'de ekonomik olarak yetiştiriciliği yapılan bazı sert çekirdekli meyvelerin üretim projeksiyonu yapılmıştır: Bu çalışmada 2008-2017 yılı verilerinden yararlanarak şeftali, nektarin ve erik, kayısı, kiraz ve vişne meyvelerinin 2018-2027 yılları arasındaki üretim miktarı öngörülme çalışılmıştır (Uzun ve ark., 2018). Bu incelemede Türkiye'de önemli bir kuru meyve olan cevizin 1999-2019'daki mevcut üretimi ile 2020-2045'deki üretim ve gereksinim (talep) projeksiyonu yapılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Bu çalışmada, Türkiye'nin cevizde mevcut ve gelecekteki üretim tahmini etmek amacıyla Dünya Gıda ve Tarım Teşkilatı (Anonymous, 2020) ve Türkiye İstatistik Kurumu (Anonim, 2020) verilerinden de yararlanılmıştır.

Gereksinim duyulan üretim miktarı; Türkiye İstatik Kurumundaki 1999-2019 dönemi cevizde yeterlilik derecesi(%) ve mevcut üretim miktarı verilerini göz önünde bulundurarak basit orantıyla hesaplanmıştır.

Araştırmada fert başına ve ortalama üretim (kg fert⁻¹) miktarını ise Türkiye'nin 1999-2019 dönemindeki mevcut nüfus ve cevizde mevcut üretim miktarı verilerinden yararlanarak hesaplanmıştır.

Projeksiyon: Bu çalışmada üretim ve gereksinim (talep) olmak üzere iki öngörü belirlenmiştir. İncelenen 2020-2045 döneminde üretim tahmini 1999-2019 döneminde gerçekleşen ceviz üretiminden yararlanarak iki yöntemle yapılmıştır. Bunlar; dönemsel hesaplama yapma özelliği olan Excel Eğilim Programı (EEP) ile basit ve çoklu doğrusal regresyon yöntemleridir. Bağımlı değişken olarak üretim (Y) ile bağımsız değişken ağaç sayısı (X_1) arasında basit regresyon ($Y=a + bX_1$); üretim ile ağaç sayısı ve ağaç başına verim (X_2) arasında çoklu doğrusal regresyon ($Y= a + bX_1 + cX_2$) hesaplamaları yapılmıştır.

Gereksinim tahmini incelenen 2020-2045 dönemi için ise üç farklı şekilde yapılmıştır:

1-1999-2019 dönemindeki mevcut üretim miktarlarından yararlanarak 2020-2045 dönemindeki tahmini ceviz üretim miktarını dönemseliği dikkate alarak Excel Eğilim Programında (EEP) hesaplanmıştır (Dönemsel Eğilim Projeksiyonu).

2- Nüfus ile gereksinim arasında yakın bir ilişki vardır. Bu nedenle Türkiye'nin 2020-2045 dönemindeki nüfus tahmini (Anonim, 2020) ve 2015-2019 döneminde fert başına düşen ortalama ceviz gereksinimine ($kg\ fert^{-1}$) göre 2020-2045 dönemindeki tahmini üretim miktarı hesaplanmıştır (Ortalama tüketime göre projeksiyon).

3-Talebi de yansıtması için 1999-2019 dönemindeki fert başına düşen ortalama gereksinim miktarı ve

2020-2045 dönemindeki tahmini nüfus ile 2020-2045 dönemindeki toplam ceviz gereksinimi üzerine öngörü yapılmıştır (Talebe göre projeksiyon).

Bağımlı değişkendirdeki değişimin ne kadarının bağımsız değişkence açıklanabileceğini gösteren 'Belirlilik Katsayısı' (BK); korelasyon katsayısının karesi alınarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada yapılan tahminler ve yukarıda belirtilen kurum kayıtlarından elde edilen verilerden ihtiyaç duyulan hesaplamalar [Regresyon, Korelasyon (r). (%), Değişim Katsayısı (DK)] Microsoft Excel ve SPSS istatistik programından yararlanarak gerçekleştirilmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Mevcut Üretim ve Gereksinim

Türkiye'de 1999-2019 döneminde ceviz üretimi Çizelge 1'de verilmiştir. 1999'da 120 bin ton kadar olan üretim miktarı % 87.50 oranında artarak 2019 yılında 225 bin tona yükselmiştir. Gereksinim duyulan ceviz miktarı da 1999 yılı verisi ile karşılaştırıldığında 2020 yılında % 224.80 oranında (2.24 katı) artarak 289 bin tona ulaşmıştır. Bu durum ceviz olan talebin arttığını göstermektedir.

1999-2019 döneminde üretim % 87.5 artarken gereksinim% 124.80 oranında artmıştır. Dolayısıyla 2019 ceviz üretimi 225 bin ton olmasına rağmen yeterlilik daha düşüktür (Çizelge 1). Bu durum talep genişlemesi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 1. Türkiye'de 1999-2019 döneminde cevizde üretim, yeterlilik ve gereksinim miktarı.

Table 1. Production, sufficiency, and demand of walnuts in Turkey in the 1999-2019 period.

| Yıllar Years | Mevcut üretim (ton) Prevailing production(ton) | Değişim (%) Changing (%) | Yeterlilik (%) Sufficiency (%) | Gereksinim miktarı ⁽¹⁾ (ton) Demand (tone) | Değişim (%) Changing (%) |
|-----------------|---|-----------------------------|-----------------------------------|--|-----------------------------|
| 1999 | 120.000 | 100.00 | 93.1 | 128.893,00 | 100.00 |
| 2000 | 116.000 | 96.67 | 93.9 | 123.535,67 | 95.84 |
| 2001 | 116.000 | 96.67 | 94.0 | 123.404,25 | 95.74 |
| 2002 | 120.000 | 100.00 | 86.2 | 139.211,13 | 108.01 |
| 2003 | 130.000 | 108.33 | 83.6 | 155.502,39 | 120.64 |
| 2004 | 126.000 | 105.00 | 77.8 | 161.953,72 | 125.65 |
| 2005 | 150.000 | 125.00 | 84.1 | 178.359,09 | 138.38 |
| 2006 | 129.614 | 108.01 | 83.1 | 155.973,52 | 121.01 |
| 2007 | 172.572 | 143.81 | 82.1 | 210.197,32 | 163.08 |
| 2008 | 170.897 | 142.41 | 84.3 | 202.724,79 | 157.28 |
| 2009 | 177.298 | 147.75 | 81.4 | 217.810,81 | 168.99 |
| 2010 | 178.142 | 148.45 | 88.0 | 202.434,09 | 157.06 |
| 2011 | 183.240 | 152.70 | 84.6 | 216.595,74 | 168.04 |
| 2012 | 203.212 | 169.34 | 87.6 | 231.977,16 | 179.98 |
| 2013 | 212.140 | 176.78 | 92.7 | 228.845,73 | 177.55 |
| 2014 | 180.807 | 150.67 | 87.2 | 207.347,47 | 160.87 |
| 2015 | 190.000 | 158.33 | 76.8 | 247.395,83 | 191.94 |
| 2016 | 195.000 | 162.50 | 76.7 | 254.237,28 | 197.25 |
| 2017 | 210.000 | 175.00 | 74.5 | 281.879,19 | 218.69 |
| 2018 | 215.000 | 179.17 | 74.2 | 289.757,41 | 224.80 |
| 2019 | 225.000 | 187.50 | 74.4 | 289.757,00 | 224.80 |

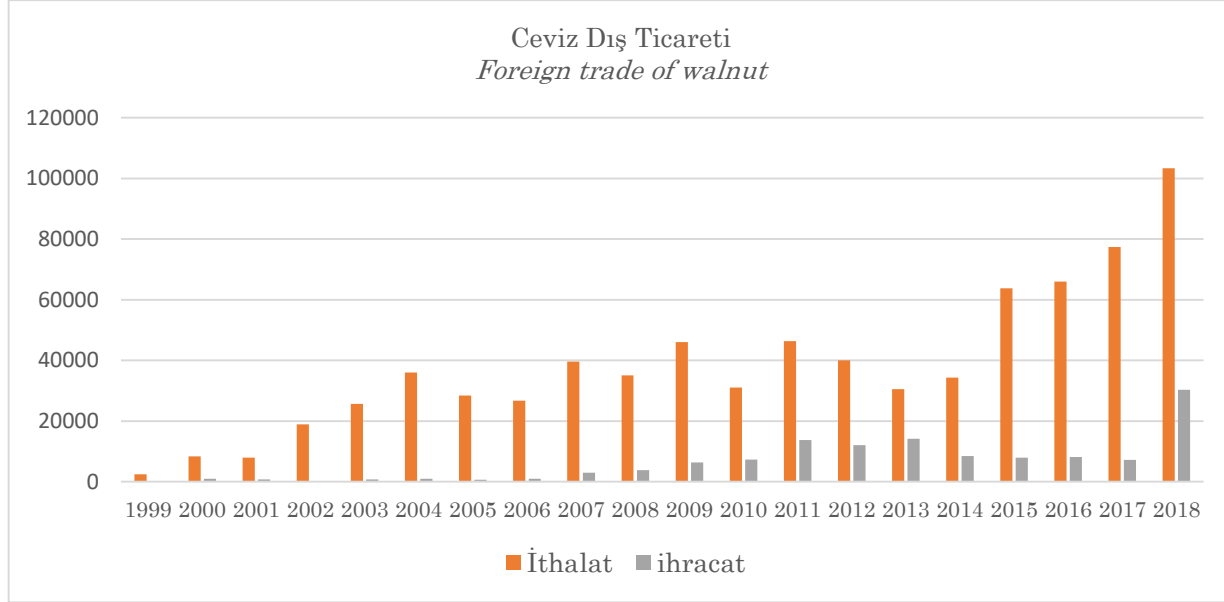
Kaynak: Anonim 2020 (TUİK) veri tabanından yararlanarak hazırlanmıştır.

(1)-Yeterlilik seviyesine göre ihtiyaç duyulan toplam üretimi göstermektedir.

Mevcut Yeterlilik ve Talep

Türkiye'nin 1999-2019 döneminde cevizde yeterlilik durumu Çizelge 1'de verilmiştir. İncelenen dönemde cevizde yeterlilik durumu 1999'da % 93.1 iken 2019'da % 74.4'e düşmüştür. Türkiye'nin mevcut üretimi tüketimi (talebi) karşılayamadığı için ithalat

yoluna gidilmektedir. Bundan dolayı Türkiye ceviz dış ticaretinde açık vermektedir. Nitekim 2018 yılında ithalatı 103 bin, ihracatı ise 30 bin ton civarındadır (Şekil 1). Yeterli oranındaki bu azalma ithalat yoluyla karşılanmaktadır.



Şekil 1. 1999-2018 döneminde Türkiye ceviz dış ticareti (ton yıl⁻¹) (Anonim, 2020; Anonym, 2020).

Figure 1. Amount of foreign trade (import and export) of walnut by Turkey in the 1999-2018 period (Tons Year⁻¹) (Anonim, 2020; Anonym 2020).

Ağaç Sayısı ve Verim

Türkiye'de 1999-2019 yılları arasında cevizde meyve veren ve vermeyen ağaç sayısı ve artış oranları Çizelge 2'de verilmiştir. Türkiye'de meyve veren ceviz ağaç sayısı 1999 yılında 3.525 bin iken 2019 yılında % 319.18 artışla 11.251 bin adete yükselmiştir. Aynı dönemde meyve vermeyen ağaç sayısında ise % 769.54 bir artış olmuştur.

Ceviz üretimindeki artış büyük ölçüde ağaç sayısındaki artıştan kaynaklanmaktadır. Bu çalışmada ceviz üretimi ile meyve veren ağaç sayısı arasında yüksek düzeyde bir ilişkinin ($r=0.870$) olduğu belirlenmiştir. Ceviz üretimi ile meyve veren ağaç sayısı arasında %75.69 oranında bir etkileşim [belirlilik katsayısı (r^2)= 0.7569] vardır.

Meyve veren ağaç sayısı 1999 yılına göre 2019 yılında 3.19 katı oranında bir artış göstermiştir. Meyve vermeyen ağaç sayısındaki artış ise 7.69 katı şeklindedir (Çizelge 2). Sadece son 5 yıldaki artış (2015'den beri) dikkate alınsa bile 2 katı bir ağaç sayısında artış olmuştur. Bu durum gelecekte ceviz üretiminde önemli artışları olacağını göstermektedir. Bu ağaçların bir kısmı henüz gençlik devresindedir. Tam gelişme döneminde üretim miktarı daha da artacaktır. Ağaç başına verimde düşüş olması meyve veren ağaçların tam verim çağına erişmemeleri ile açıklanabilir.

Üretim artışı sağlayacak bir diğer faktör ise ağaç başına verimdir. Ağaç başına verim 1999'da 34.04 kg iken 2019'da 19.99 kg'dır. İncelenen üretim döneminde (1999-2019) ağaç başına verim özellikle son yıllarda azalmıştır. Şöyle ki cevizde 1999-2013 döneminde ağaç başına verim 30 kg üstündedir. 1999-2019 döneminde ağaç başına ortalama verim 25.01 kg; 2014-2019 döneminde ise 23.4 kg'dır (Çizelge 2). Bu durum yeni bahçelerin kurulması nedeniyle gençlik döneminde olmaları ve kültürel işlemlerdeki eksiklikle açıklanabilir. Ceviz üretimi ile meyve veren ağaç verimi arasında % 26.41 oranında bir etkileşim [belirlilik katsayısı (r^2)= 0.264] vardır. Ceviz üretim ile meyve veren ağaç sayısı ve ağaç verimi arasındaki BK (r^2)= 0, 957 (% 95.70) olarak belirlenmiştir.

Nüfus ve Gereksinim

Türkiye'nin 1999-2019 döneminde nüfus ile fert başına ceviz üretim ve gereksinimi Çizelge 3'de sunulmuştur. İncelenen dönemde nüfus artışı yanında ceviz üretim ve gereksiniminde de artış söz konusudur. 1999-2019 döneminde nüfus ile ceviz gereksinimi arasında korelasyon katsayısı (r)= 0,962503 ve BK (r^2)= % 92.64 (0,926) olarak belirlenmiştir.

Çizelge 2. Türkiye’de 1999-2019 döneminde cevizde meyve veren ve vermeyen ağaç sayısı.
Table 2. The number of trees bearing or not bearing fruit of walnuts in Turkey in the 1999-2019 period.

| Yıllar | Meyve veren ağaç sayısı(1000)(adet) number of trees that bears fruit | Değişim (%) Changing (%) | Ağaç başına verim (kg ağaç ⁻¹) (yield tree ⁻¹) | Meyve vermeyen ağaç sayısı (1000) (adet) number of fruitless trees | Değişim(%) Changing (%) |
|--------|---|-----------------------------|---|---|----------------------------|
| 1999 | 3.525 | 100.00 | 34.04 | 1.300 | 100.00 |
| 2000 | 3.550 | 100.71 | 32.67 | 1.490 | 114.62 |
| 2001 | 3.640 | 103.26 | 31.86 | 1.780 | 136.92 |
| 2002 | 3.850 | 109.22 | 31.16 | 2.030 | 156.15 |
| 2003 | 4.100 | 116.31 | 31.70 | 2.100 | 161.54 |
| 2004 | 4.200 | 119.15 | 30.00 | 2.200 | 169.23 |
| 2005 | 4.535 | 128.65 | 33.07 | 2.245 | 172.69 |
| 2006 | 4.595 | 130.35 | 28.20 | 2.353 | 181.00 |
| 2007 | 4.927 | 139.77 | 35.02 | 2.788 | 214.46 |
| 2008 | 5.095 | 144.54 | 33.54 | 2.952 | 227.08 |
| 2009 | 5.192 | 147.29 | 34.14 | 3.200 | 246.15 |
| 2010 | 5.441 | 154.35 | 32.74 | 3.643 | 280.23 |
| 2011 | 5.594 | 158.70 | 32.75 | 4.045 | 311.15 |
| 2012 | 5.977 | 169.56 | 33.99 | 4.541 | 349.31 |
| 2013 | 6.526 | 185.13 | 32.50 | 4.878 | 375.23 |
| 2014 | 7.001 | 198.61 | 25.82 | 5.374 | 413.38 |
| 2015 | 7.596 | 215.49 | 25.01 | 5.560 | 427.69 |
| 2016 | 8.171 | 231.80 | 23.86 | 6.873 | 528.69 |
| 2017 | 8.767 | 248.71 | 23.95 | 7.895 | 607.31 |
| 2018 | 9.875 | 280.14 | 21.77 | 8.897 | 684.38 |
| 2019 | 11.251 | 319.18 | 19.99 | 10.004 | 769.54 |

(*)Üretim ile meyve veren ağaç sayısı arasındaki Korelasyon katsayısı $r=0,870$; BK (r^2)= 0,7569 (%75.69).

Ceviz üretimi ile ağaç verimi arasındaki Korelasyon katsayısı $r= -0,514$ ve BK 0,264 (%26.41); Doğrusal regresyon eşitliği $Y=80.987 + 14.74X$; $-0,513952295$

Not: 2014-2019 ortalama verimi 23.4 kg; 1999-2019 ortalama verim 25.01 kg.

Çizelge 3. 1999-2019 döneminde Türkiye’de nüfus ile fert başına gerçekleştirilen ve gereksinim duyulan ceviz üretimi.
Table 3. Prevailing Population as well as the production and the demand of walnut per capita in Turkey in the period of 1999-2019.

| Yıl Years | Nüfus Population | Üretim (kg Fert ⁻¹) Production of (kg person ⁻¹) | Değişim (%) Changing (%) | Gereksinim ⁽¹⁾ (kg Fert ⁻¹) Demand (kg person ⁻¹) | Değişim (%) Changing (%) |
|--------------|---------------------|---|-----------------------------|---|-----------------------------|
| 1999 | 62.243.779 | 1.9 | 100.00 | 2.07 | 100.00 |
| 2000 | 64.729.501 | 1.6 | 82.90 | 1.90 | 91.79 |
| 2001 | 65.603.160 | 1.6 | 82.90 | 1.88 | 90.82 |
| 2002 | 66.401.851 | 1.8 | 93.26 | 2.09 | 100.97 |
| 2003 | 67.187.251 | 2.0 | 103.63 | 2.31 | 111.59 |
| 2004 | 68.010.215 | 2.0 | 103.63 | 2.38 | 114.98 |
| 2005 | 68.860.539 | 6.0 | 310.88 | 2.59 | 125.12 |
| 2006 | 69.729.967 | 6.0 | 310.88 | 2.23 | 107.73 |
| 2007 | 70.586.256 | 2.8 | 145.08 | 2.97 | 143.48 |
| 2008 | 71.517.100 | 2.7 | 139.90 | 2.83 | 136.71 |
| 2009 | 72.561.312 | 2.9 | 150.26 | 3.00 | 144.93 |
| 2010 | 73.722.988 | 2.6 | 134.72 | 2.74 | 132.37 |
| 2011 | 74.724.269 | 2.8 | 145.08 | 2.89 | 139.61 |
| 2012 | 75.627.384 | 2.9 | 150.26 | 3.06 | 147.83 |
| 2013 | 76.667.864 | 2.8 | 145.08 | 2.98 | 143.96 |
| 2014 | 77.695.904 | 2.5 | 129.53 | 2.66 | 128.50 |
| 2015 | 78.741.053 | 3.0 | 155.44 | 3.14 | 151.69 |
| 2016 | 79.814.871 | 3.0 | 155.44 | 3.18 | 153.62 |
| 2017 | 80.810.525 | 3.3 | 170.98 | 3.48 | 168.12 |
| 2018 | 82.003.882 | 3.4 | 176.17 | 3.53 | 170.53 |
| 2019 | 82.886.421 | 2.7 | 140.40 | 3.50 | 170.56 |

Kaynak: Anonim 2020 (TUIK) veri tabanından yararlanılarak hazırlanmıştır. Korelasyon 1999-2019 döneminde nüfus ile ceviz gereksinimi arasında korelasyon katsayısı (r)= 0,963 ve BK (r^2)= % 92.64 (0,926). (1): 1999-2019 dönemi fert başı ortalama gereksinim 2.73 kg;

Üretim Projeksiyon

Türkiye’de 2020-2045 döneminde ceviz üretimi projeksiyonu ve tahmini gereksinim miktarı Çizelge 4’de sunulmuştur. Üretim miktarının incelenen dönemde düzenli artması beklenilmektedir. 1999-2019 döneminde gerçekleşen üretime göre Dönemsel Eğilim Projeksiyonu ile 2045’de yılda toplam 371.038 kadar ceviz üretilmesi öngörülmektedir.

Basit ve çoklu doğrusal regresyon ile ceviz üretiminin; ağaç sayısı ve verim dikkate alınarak da öngörülmesi mümkündür. Bu çalışmada üretim üzerine ağaç sayısının %75.69; ağaç sayısı ve verim birlikte dikkate alındığında ise % 95.70 (BK (r^2)= 0, 957) oranının da etkisi vardır. 2019 yılında meyve veren ve vermeyen ceviz ağaç sayısı toplam olarak 21.255 adettir (Çizelge 2). Bu ağaç sayısı ile doğrusal regresyon eşitliğinden ($Y=80.987 + 14.74X_1$) yararlanarak yapılacak hesaplamada da 394.285 ton üretime erişileceği öngörülmektedir. Bu tahmine göre hiç yeni ceviz fidanı dikilmese bile ortalama 400 bin tona yakın ceviz üretilmesi beklenilmektedir. Ancak yeni bahçe veya fidan dikiminin olacağını öngörebiliriz. Üretim; ağaç sayısı (X_1) ve verim (X_2) ile ilişkisi ($Y=-191.546 + 26.78X_1 + 6753X_2$) dikkate alındığında ağaç sayısı 21.255 adet (Çizelge 2) ve ağaç başına verim 1999-2019 döneminde 25.01 kg

alındığında 549.156 ton üretime erişilecektir. Diğer yandan ortalama verimin 30 kg yükseldiği düşünülürse üretim miktarı 583 bin ton olarak belirlenecektir. Bu öngörülere göre Türkiye ceviz üretimi dikilen ağaçların gençlik dönemlerinden tam verim çağına geçmeleri ve iyi bakım tedbirleri ile 550-600 bin tona yükselmesi beklenilmelidir.

Gereksinim Projeksiyonu

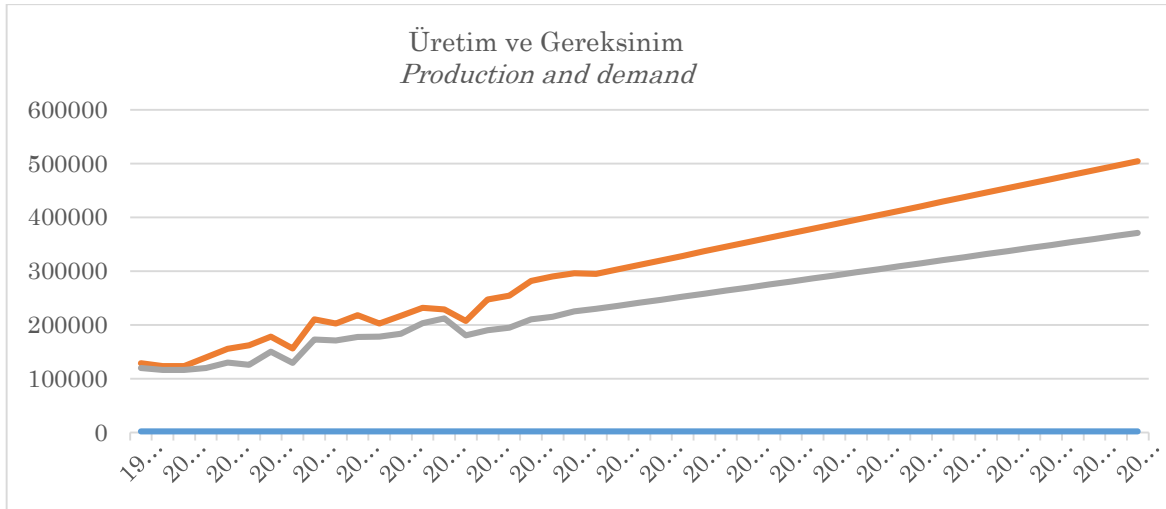
Dönemsel eğilime göre: Türkiye’nin 2020-2045 dönemine ait 1999-2019 verilerinden (Çizelge 1) yararlanarak EEP ile belirlenen gereksinim tahmini Çizelge 4’de sunulmuştur. Bu dönemde gereksinimin artması beklenilmekte ve 2045’de ceviz gereksiniminin 504 bin ton civarında yükselmesi tahmin edilmiştir. Dönemsel Eğilim Projeksiyona göre gerçekleşen üretimin gereksinimden az olacağı tahmin edilmektedir (Şekil 2). Yani, 1999-2019 yıllarına kıyasla gelecekteki 25 yıllık süreçte gereksinim duyulan miktar üretim miktarından fazla olacağı öngörülmektedir (Şekil 2). Ancak Türkiye’nin gereksinimin bir kısmını ithalat yolu ile karşıladığı (Şekil 1) dikkate alındığında kendi üretimi ile yeterli hale gelmek için üretimi artırmaya devam edilmelidir.

Çizelge 4. Türkiye’de 2020-2045 döneminde üretim ve gereksinim projeksiyonu.

Table 4. Projection of the production and the demand of walnut for Turkey in 2020-2045.

| Yıllar Years | Üretim (1) (ton) Production (tone) | Değişim (%) Changing (%) | Gereksinim (1) (ton) Demand (tone) | Değişim (%) Changing (%) |
|-----------------|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|
| 2020 | 229.805,4 | 100.00 | 294.824,143 | 100.00 |
| 2021 | 235.454,7 | 102.46 | 303.211,688 | 102.84 |
| 2022 | 241.104,0 | 104.92 | 311.599,234 | 105.69 |
| 2023 | 246.753,3 | 107.37 | 319.986,779 | 108.53 |
| 2024 | 252.402,6 | 109.83 | 328.374,325 | 111.38 |
| 2025 | 258.051,9 | 112.29 | 336.761,870 | 114.22 |
| 2026 | 263.701,3 | 114.75 | 345.149,416 | 117.07 |
| 2027 | 269.350,6 | 117.21 | 353.536,961 | 119.91 |
| 2028 | 274.999,9 | 119.66 | 361.924,506 | 122.76 |
| 2029 | 280.649,2 | 122.12 | 370.312,052 | 125.60 |
| 2030 | 286.298,5 | 124.58 | 378.699,597 | 128.45 |
| 2031 | 291.947,8 | 127.04 | 387.087,143 | 131.29 |
| 2032 | 297.597,1 | 129.50 | 395.474,688 | 134.14 |
| 2033 | 303.246,4 | 131.96 | 403.862,234 | 136.98 |
| 2034 | 308.895,7 | 134.41 | 412.249,779 | 139.83 |
| 2035 | 314.545,1 | 136.87 | 420.637,325 | 142.67 |
| 2036 | 320.194,4 | 139.33 | 429.024,870 | 145.52 |
| 2037 | 325.843,7 | 141.79 | 437.412,416 | 148.36 |
| 2038 | 331.493,0 | 144.25 | 445.799,961 | 151.21 |
| 2039 | 337.142,3 | 146.70 | 454.187,506 | 154.05 |
| 2040 | 342.791,6 | 149.16 | 462.575,052 | 156.90 |
| 2041 | 348.440,9 | 151.62 | 470.962,597 | 159.74 |
| 2042 | 354.090,2 | 154.08 | 479.350,143 | 162.59 |
| 2043 | 359.739,5 | 156.54 | 487.737,688 | 165.43 |
| 2044 | 365.388,9 | 159.00 | 496.125,234 | 168.28 |
| 2045 | 371.038,2 | 161.45 | 504.512,779 | 171.12 |

(1):1999-2019 verilerinden (Çizelge 1) EEP ile belirlenmiştir.



Şekil 2. 1999-2045 döneminde cevizde mevcut (gerçekleşen) ve öngörülen üretim ve gereksinim miktarı (ton).

Figure 2. Amount of prevailing and predicted production and demand of walnut for Turkey in the period of 1999-2045 (Tons).

Ortalama tüketime göre: Türkiye'nin 2020-2045 dönemindeki nüfus projeksiyonu ve ortalama ceviz tüketimi dikkate alınarak yapılan ikinci projeksiyon ise Türkiye'de önümüzdeki 25 yıllık nüfusta artış göstereceği öngörülmüştür (Çizelge 5). 1999-2019 dönemindeki tüketim ortalamasına 2020-2045 dönemine ait ceviz gereksinimi Çizelge 5'de sunulmuştur. 2045'de nüfusunun 102 milyon kadar olup ceviz gereksiniminin 280 bin ton (yılda 2.73 kg

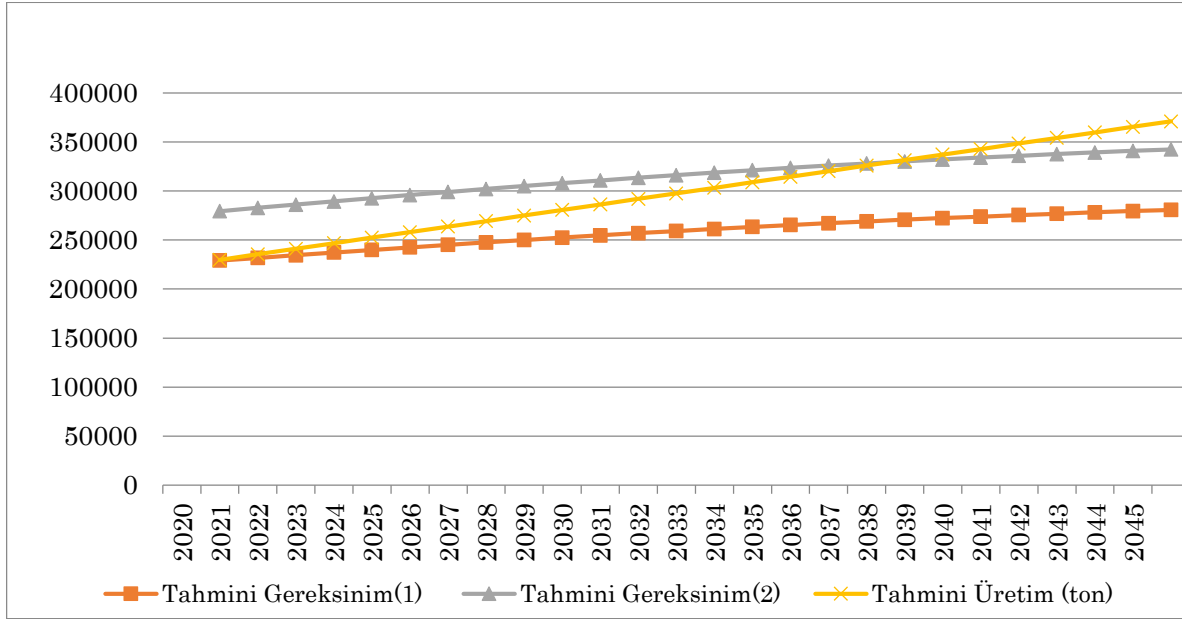
fert⁻¹ tüketime göre) veya 342 bin ton (yılda 3.33 kg fert⁻¹ tüketime göre olması) Şekil 2'de öngörülmüştür. Bu tahminde talep genişlemesi dikkate alınmamıştır. Ortalama tüketime göre gelecekte ceviz üretiminin (Şekil 2) gereksinimden fazla olacağı tahminde belirlenmiştir. Bu öngörü meyve vermeyen ağaç sayısındaki hızlı artış ve meyve veren ağaçların tam olgunluk dönemine ulaşması ile gerçekleşmesi mümkündür.

Çizelge 5. 2020-2045 döneminde Türkiye'de nüfus ve ortalama tüketime göre gereksinim projeksiyonu.

Table 5. Projection of production and demand of walnut by estimated population and average consumption in Turkey in the period of 2020-2045.

| Yıllar Years | Tahmini nüfus ⁽¹⁾ Predicted population | Tahmini gereksinim ⁽²⁾ (ton) Predicted demand (tone) | Değişim(%) Changing (%) |
|-----------------|--|--|----------------------------|
| 2021 | 84.908.658 | 231.801 | 101.21 |
| 2022 | 85.911.035 | 234.537 | 102.40 |
| 2023 | 86.907.367 | 237.257 | 103.59 |
| 2024 | 87.885.571 | 239.928 | 104.75 |
| 2025 | 88.844.931 | 242.547 | 105.90 |
| 2026 | 89.784.581 | 245.112 | 107.02 |
| 2027 | 90.703.600 | 247.621 | 108.11 |
| 2028 | 91.601.117 | 250.071 | 109.18 |
| 2029 | 92.476.323 | 252.460 | 110.23 |
| 2030 | 93.328.571 | 254.787 | 111.24 |
| 2031 | 94.153.776 | 257.040 | 112.23 |
| 2032 | 94.951.512 | 259.218 | 113.18 |
| 2033 | 95.721.347 | 261.319 | 114.09 |
| 2034 | 96.463.090 | 263.344 | 114.98 |
| 2035 | 97.176.768 | 265.293 | 115.83 |
| 2036 | 97.862.519 | 267.165 | 116.65 |
| 2037 | 98.520.720 | 268.962 | 117.43 |
| 2038 | 99.151.467 | 270.684 | 118.18 |
| 2039 | 99.754.923 | 272.331 | 118.90 |
| 2040 | 100.331.233 | 273.904 | 119.59 |
| 2041 | 100.882.655 | 275.410 | 120.25 |
| 2042 | 101.409.507 | 276.848 | 120.87 |
| 2043 | 101.911.980 | 278.220 | 121.47 |
| 2044 | 102.390.159 | 279.525 | 122.04 |
| 2045 | 102.843.989 | 280.764 | 122.58 |

Anonim 2020'nin nüfus projeksiyonu; (2) Ortalama fert başı tüketim 2.73 kg alınıp nüfus göre hesaplanmıştır.



Şekil 3. 2020-2045 döneminde Türkiye’de cevizde öngörülen üretim miktarı ve gereksinim (Ton yıl⁻¹). (1)fert başına gereksinim 2.73 kg ve (2) 3.33 kg’a göre ihtiyaç duyulan gereksinim)

Figure 3. Projection of production and demand of walnut by average consumption in Turkey in for 2020-2045 (Tones/Year). In 2020-2045 period, the amount foreseen in walnut production and demand in Turkey (tons year⁻¹). (1) the demand per capita is 2.73 kg and (2) the need to meet 3.33 kg demand)

Çizelge 6. 2020-2045 döneminde Türkiye’de fert başına gereksinime (tüketime/talep) göre toplam ceviz gereksinimi.

Table 6. Projection of production and demand of walnut by estimated population in Turkey in for 2020-2045.

| Yıl Years | Gereksinim ⁽¹⁾ (kg fert ⁻¹) Demand (kg person ⁻¹) | Değişim (%) Changing (%) | Toplam gereksinim ⁽²⁾ (Ton) Total demand (tone) | Değişim (%) Changing (%) |
|--------------|---|-----------------------------|---|-----------------------------|
| 2020 | 3.58 | 100.00 | 300.778,8 | 100.00 |
| 2021 | 3.66 | 102.16 | 310.963,4 | 103.39 |
| 2022 | 3.74 | 104.32 | 321.282,0 | 106.82 |
| 2023 | 3.82 | 106.48 | 331.732,6 | 110.29 |
| 2024 | 3.89 | 108.63 | 342.266,7 | 113.79 |
| 2025 | 3.97 | 110.79 | 352.877,5 | 117.32 |
| 2026 | 4.05 | 112.95 | 363.556,8 | 120.87 |
| 2027 | 4.13 | 115.11 | 374.296,5 | 124.44 |
| 2028 | 4.20 | 117.27 | 385.087,9 | 128.03 |
| 2029 | 4.28 | 119.43 | 395.922,8 | 131.63 |
| 2030 | 4.36 | 121.58 | 406.793,0 | 135.25 |
| 2031 | 4.44 | 123.74 | 417.675,1 | 138.86 |
| 2032 | 4.51 | 125.90 | 428.561,0 | 142.48 |
| 2033 | 4.59 | 128.06 | 439.442,2 | 146.10 |
| 2034 | 4.67 | 130.22 | 450.311,4 | 149.72 |
| 2035 | 4.75 | 132.38 | 461.162,2 | 153.32 |
| 2036 | 4.82 | 134.53 | 471.988,8 | 156.92 |
| 2037 | 4.90 | 136.69 | 482.786,5 | 160.51 |
| 2038 | 4.98 | 138.85 | 493.549,4 | 164.09 |
| 2039 | 5.06 | 141.01 | 504.271,9 | 167.66 |
| 2040 | 5.13 | 143.17 | 514.948,5 | 171.21 |
| 2041 | 5.21 | 145.33 | 525.584,7 | 174.74 |
| 2042 | 5.29 | 147.48 | 536.176,2 | 178.26 |
| 2043 | 5.36 | 149.64 | 546.718,5 | 181.77 |
| 2044 | 5.44 | 151.80 | 557.206,4 | 185.25 |
| 2045 | 5.52 | 153.96 | 567.633,8 | 188.72 |

(1): 1999-2019 dönemi gereksinim verilerinden EEP ile hesaplanmıştır. (2): Sütun 1 ve nüfus projeksiyonundan yararlanarak hesaplanmıştır.

Talebe göre: 2020-2045 dönemi için öngörülen cevizde ortalama fert başı gereksinim (talep) ve nüfustaki değişime göre belirlenen toplam gereksinim miktarı 2020-2045 döneminde ceviz gereksinimi Çizelge 6 ve Şekil 3'de sunulmuştur. Nüfustaki artışta dikkate alındığında 2045 yılında ceviz talebinin 567 bin tona yükseleceği öngörülmektedir. Buna göre öngörülen gereksinim miktarının (talep) da artması beklenilmektedir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

İncelenen 1999-2019 döneminde üretilen cevizin büyük kısmı iç pazarda olmak üzere talep edilmektedir. Satış potansiyelinin pazar tarafından tümüyle karşılanmasına tam talep denilmektedir (Tenekecioğlu ve ark., 2006). Türkiye artan talep nedeniyle kendi gereksiniminin bir kısmını da ithalat yoluyla karşılamaktadır. Bu doğrultuda gelecek 25 yıllık süreçte Türkiye'nin cevizde üretim potansiyelinin iç ve dış ticaret üzerine etkisi incelenmiştir. İncelenen 2020-2045 dönemi için cevizde üretim ve gereksinimin artması öngörülmektedir. Türkiye ceviz üretimi dikilen ağaçların gençlik dönemlerinden tam verim çağına geçmeleri ve iyi bakım tedbirleri ile 550-600 bin tona yükselmesi beklenilmelidir. Bu çalışmada incelenen iki üretim tahmininin ortalaması alınsa bile 460 bin ton civarında bir üretime ulaşılacağı tahmin edilmiştir. Dönemsel eğilime göre tahmini üretim miktarı 371 bin ton ve gereksinim miktarı 504 bin ton civarında olması öngörülmüştür. Ancak ortalama tüketim göre hesaplanan gereksinim 280 bin ton (yılda 2.73 kg fert⁻¹ tüketime göre) ve 342 bin ton (yılda 3.33 kg fert⁻¹ tüketime göre) olarak öngörülmüştür. Türkiye nüfusunda artma ve cevizde beklenen talep genişlemesi dikkate alındığında düşüktür. Bununla birlikte gereksinimi ortalaması 470 bin tondur. Cevize yapılan teşvikler ile yeni kapama bahçelerin kurulması, verimliliği artıran kültürel tedbirlerin yaygınlaşması ile 2020-2045 döneminde Türkiye iç talebi kendi üretimi ile karşılayacak kendi kendine yeterli bir ülke durumuna gelmesi beklenilmez.

Çıkar Çatışması Beyanı

Makale yazarları herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Statement of Conflict of Interest

Author has declared no conflict of interest.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyanı

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamış olduklarını beyan ederler.

KAYNAKLAR

- Anonim 2020. Bitkisel Üretim İstatistikleri. Türkiye İstatistik Kurumu (TUIK). http://www.tuik.gov.tr/PreTablo.do?alt_id=1001. Erişim Tarihi: 20.05.2020.
- Anonymous 2020. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). FAOSTAT, <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP>. Erişim Tarihi: 15.05.2020.
- Güvenç İ, Kazankaya A 2019. Türkiye'de Ceviz Üretimi, Dış Ticareti ve Rekabet Gücü. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi 29(3): 418-424.
- Karalar R 2003. Genel İşletme. Anadolu Üniversitesi Yayını NO:1268, S: 307.
- Ketenci CK, Bayramoğlu Z 2018. Türkiye'de Ceviz Üretimine Rekabet Analizi. Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi 5(3): 339-347.
- Özçağırın R, Ünal A, Özeker E, İsfendiyeroğlu M 2007. İlman İklim Meyve Türleri: Sert Kabuklu Meyveler, Cilt III, EÜ Ziraat Fakültesi Yayınları No: 566, S: 308.
- Şen SM 2011. Ceviz. ÜÇM yayıncılık Ankara, S: 220.
- Tenekecioğlu B, Tokol T, Çalık N, Karalar R, Timur N, Öztürk AS 2006. Pazarlama Yönetimi. Anadolu Üniversitesi Yayını NO:1478, S: 307.
- Uzun A, Yaman M, Pınar H, Çetin N, Say A, 2018. Türkiye'de Ekonomik Olarak Yetiştiriciliği Yapılan Sert Çekirdekli Meyvelerin Üretim Projeksiyonu. BAHÇE 47 (Özel Sayı 2: Uluslararası Tarım Kongresi (UTAK 2018)): 79-83.
- Yınanç R, Elibüyük M 1988. Maraş Tahrir Defteri. Osmanlı Tarihi Araştırma ve Uygulama Merkezi Yayınları No: 1, S: 468.
- Yücer MM 2013. Ceviz. Hasad yayıncılık, İstanbul, S: 92.

Macromycetes Determined in Tonya (Trabzon) District

Yasin UZUN¹, Abdullah KAYA^{2*}

¹Karamanoğlu Mehmetbey University, Ermenek Uysal and Hasan Kalan Health Services Vocational School, Department of Pharmacy Services Karaman, Turkey, ²Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, Ankara, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0002-6423-6085>, ²<https://orcid.org/0000-0002-4654-1406>

✉: kayaabd@hotmail.com

ABSTRACT

This study is based on the macrofungi specimens collected from Tonya district of Trabzon province. As a result, 216 macromycete species belonging to 150 genera, 73 families, 23 orders, and 8 classes, within Ascomycota and Basidiomycota were determined. The list of the determined taxa was provided together with their habitats, collection dates, and collector numbers.

Research Article

Article History

Received : 09.01.2021

Accepted : 09.04.2021

Keywords

Biodiversity

Macrofungi

Taxonomy

Turkey

Tonya (Trabzon) Yöresinde Belirlenen Makromantarlar

ÖZET

Bu çalışma Trabzon ilinin Tonya ilçesinden toplanan makromantar örneklerine dayanmaktadır. Sonuç olarak, Askomikota ve Bazidyomikota bölümleri içinde yer alan 8 sınıf, 23 takım, 73 familya ve 150 cinse ait 216 makromantar türü tespit edilmiştir. Belirlenen taksonların listesi, türlerin habitatları, toplanma tarihleri ve toplayıcı numaraları ile birlikte verilmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 09.01.2021

Kabul Tarihi : 09.04.2021

Anahtar Kelimeler

Biyçeşitlilik

Makromantarlar

Taksonomi

Türkiye

To Cite : Uzun Y, Kaya A 2022. Macromycetes Determined in Tonya (Trabzon) District. KSU J. Agric Nat 25 (1): 66-77. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.857201.

INTRODUCTION

Macrofungi are the group of fungi having visible fruiting bodies with saprotrophic, parasitic, or symbiotic lifestyles. Besides their ecological importance, they also serve as food for lots of animals as well as mankind. Tough more than 50.000 macrofungi species have been estimated (Mueller et al., 2007), and more than 15.000 species have been determined in Europe (Lukic, 2008), only a small portion of them (approximately 2.700 species) are currently known from Turkey. Starting from the first quarter of the 20th century, many studies (Sesli et al., 2020) have been conducted to determine the macrofungal biodiversity of Turkey. But the majority of the territory of Turkey could still be regarded among the unstudied or less studied regions, and need to be studied in a detailed manner.

Tonya is a district of Trabzon province within Eastern Black Sea Region of Turkey (Fig. 1). According to Davis' (1965) grid system, it takes place in A7, between 40°42'-40°58' northern latitudes and 39°12'-

39°23' eastern longitudes. Phytogeographically the area falls in Euro-Siberian floristic area within Holarctic flora kingdom (Davis, 1965). The plant cover of Tonya is mainly characterized by forest areas. *Abies nordmanniana* Stev., *Picea orientalis* Link., *Pinus sylvestris* L., *Juglans regia* L., *Tilia tomentosa* Moench., *Platanus orientalis* L., *Juniperus oxycedrus* L., *Castanea sativa* Mill., *Alnus glutinosa* L., *Salix alba* L., *Populus tremula* L., *Corylus avellana* L., *Quercus ilex* L., *Fraxinus oxycarpa* L., *Carpinus betulus* L., *Rhododendron ponticum* L., *Daphne pontica* L., *Fagus orientalis* Lipsky., *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, *Rubus idaeus* L., *Crataegus monogyna* Jack., *Buxus sempervirens* L., *Prunus laurocerasus* L., *Acacia* L., and *Arbutus* L. sp. are the common tree and shrubby forms in the region.

Though some local lists (Sesli, 1993; Baydar and Sesli, 1994; Akata et al., 2014, 2016) were presented at neighboring districts and provinces, and some new records or new distributions were reported from the region, a detailed research has not so far been conducted on the mycobiota of Tonya.

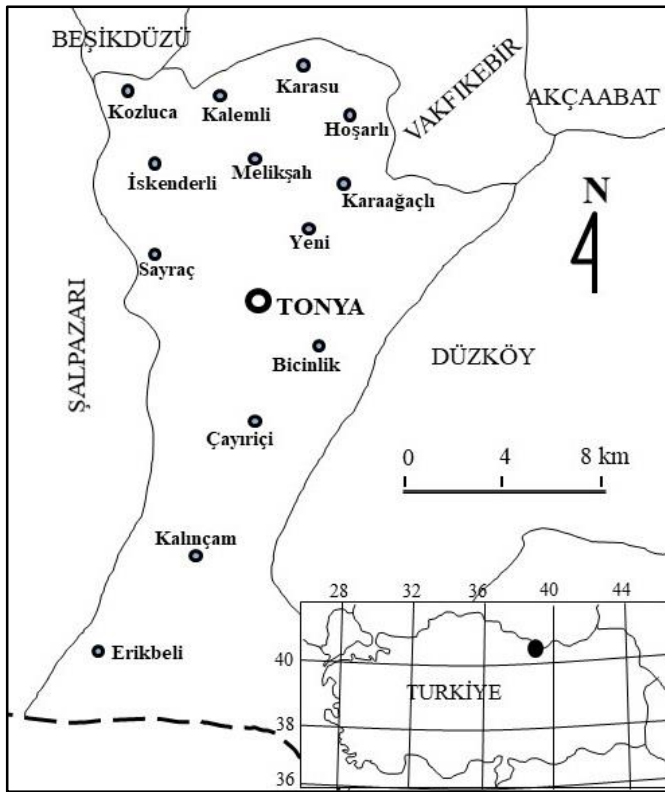


Figure 1. Map of the research area
Şekil 1. Araştırma alanının haritası

The study aims to determine the macrofungal biodiversity of the region and to contribute to the mycobiota of Turkey.

MATERIALS and METHOD

Field studies were carried out in Tonya district of Trabzon province during the period 2014- 2017. The object of investigations was the suitable habitats for macrofungal growth. During the field study, information about the ecology and geographic position of the samples was collected and they were photographed at their natural habitats. GPS data for the localities of fungi were obtained using a Magellan SporTrack Pro GPS Receiver (Table 1), and color photographs were taken by a Sony HX-400V digital camera. Microscopic investigations were carried out on dried samples. Microscopic measurements were made from preparations mounted in water or 3% KOH. A Nikon Eclipse Ci-S trinocular light microscope was used for microscopic investigations. Identification of the collected materials was confirmed using the works of Caillet and Moyne (1980), Breitenbach and Kränzlin (1984-2000), Benkert (1995, 2007), Miller and Miller (1988), Candusso and Lanzoni (1990), Wang and Kimbrough (1992), Courtecuisse and Duhem (1995), Pegler et al. (1995), Bessette et al. (1997, 2007), Cappelli (1997), Ellis and Ellis (1997), Hansen and Knudsen (1992, 1997, 2000), Heilmann-Clausen et al. (1998), Montecchi and Sarasini (2000), Arroyo et al. (2005), Kränzlin (2005),

Medardi (2006), Trappe et al. (2007), Hausknecht (2009), Jaklitsch (2009), Antonin and Noordeloos (2010), Philips (2010), Thompson (2013), Beug et al. (2014), Cripps et al. (2016) and Siegel and Schwarz (2016). The samples are kept in Karamanoğlu Mehmetbey University, Science Faculty, Department of Biology, Karaman.

RESULTS

The determined taxa are listed alphabetically, in accordance with Index Fungorum (www.indexfungorum.org; accessed 10 December 2020, together with their habitats, collection dates, and accession numbers.

Ascomycota Whittaker

Eurotiomycetes O.E. Erikss. & Winka

Eurotiales G.W. Martin ex Benny & Kimbr.

Elaphomycetaceae Tul. ex Paol.

1. *Elaphomyces citrinus* Vittad.: (Uzun and Kaya, 2020).
2. *Elaphomyces cyanosporus* Tul. & C. Tul.: In soil under mixed forest, locality 11, 13.04.2017, Yuzun 5536; in soil under *Fagus* L. sp., locality 18, 12.11.2016, Yuzun 5464; locality 15, 17.09.2015, Yuzun 4547.
3. *Elaphomyces granulatus* Fr.: (Uzun and Kaya, 2019a).
4. *Elaphomyces muricatus* Fr.: In soil under mixed forest, locality 40, 12.04.2017, Yuzun 5527; locality 7, 11.04.2017, Yuzun 5518; locality 28, 21.05.2016, Yuzun 5112.

Leotiomycetes O.E. Erikss. & Winka

Helotiales Nannf.

Cenangiaceae Rehm

5. *Heyderia abietis* (Fr.) Link: On *Picea* Link sp. needles, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4706.

Chlorociboriaceae Baral & P.R. Johnst.

6. *Chlorociboria aeruginascens* (Nyl.) Kanouse ex C.S. Ramamurthi, Korf & L.R. Batra: On decaying *Alnus* Mill. sp. branches, locality 8, 07.09.2014, Yuzun 1604.

Gelatinodiscaceae S.E. Carp.

7. *Ascocoryne cylichnium* (Tul.) Korf: On decaying *Picea* sp. stump, locality 33, 01.11.2015, Yuzun 4710.

Helotiaceae Rehm

8. *Bisporella citrina* (Batsch) Korf & S.E. Carp.: On dead *Fagus* sp. branches, locality 33, 01.11.2015, Yuzun 4714; locality 14, 19.09.2015, Yuzun 4573.
9. *Hymenoscyphus fagineus* (Pers.) Dennis: On decaying *Fagus* sp. cone, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4708.

Lachnaceae Raitv.

10. *Lachnum pygmaeum* (Fr.) Bres.: On decaying herb stem, locality 25, 20.06.2016, Yuzun 5157.
11. *Lachnum virgineum* (Batsch) P. Karst.: On dead *Corylus* L. sp. twigs, locality 37, 20.06.2017, Yuzun 5558.

Table 1. Collection localities of the macrofungal samples

Çizelge 1. Makromantar örneklerinin toplanma lokaliteleri

| Loc. No | Locality name | Coordinates | Altitude (m) |
|---------|-----------------------|-----------------|--------------|
| 1 | Bicinlik village | 40°50'N-39°16'E | 1070 |
| 2 | Bicinlik village | 40°51'N-39°17'E | 1150 |
| 3 | Büyük village | 40°53'N-39°16'E | 1070 |
| 4 | Büyük village | 40°54'N-39°16'E | 960 |
| 5 | Çamlı village | 40°54'N-39°17'E | 915 |
| 6 | Çayırbağ village | 40°50'N-39°19'E | 1160 |
| 7 | Çayırçı village | 40°49'N-39°17'E | 1300 |
| 8 | Çayırçı village | 40°50'N-39°18'E | 1040 |
| 9 | Çayırçı village | 40°50'N-39°17'E | 1070 |
| 10 | Erikbeli village | 40°45'N-39°14'E | 1420 |
| 11 | Erikbeli village | 40°46'N-39°14'E | 1500 |
| 12 | Erikbeli yaylası | 40°46'N-39°13'E | 1650 |
| 13 | Hoşarlı village | 40°55'N-39°18'E | 850 |
| 14 | Hoşarlı village | 40°56'N-39°18'E | 910 |
| 15 | Hoşarlı village | 40°56'N-39°19'E | 1100 |
| 16 | İskenderli village | 40°56'N-39°13'E | 780 |
| 17 | İskenderli village | 40°55'N-39°13'E | 800 |
| 18 | İskenderli village | 40°55'N-39°14'E | 760 |
| 19 | Kadralak high plateau | 40°50'N-39°15'E | 1280 |
| 20 | Kalemlı village | 40°56'N-39°16'E | 830 |
| 21 | Kalemlı village | 40°56'N-39°17'E | 700 |
| 22 | Kalınçam village | 40°46'N-39°16'E | 1500 |
| 23 | Kalınçam village | 40°47'N-39°16'E | 1110 |
| 24 | Kalınçam village | 40°47'N-39°17'E | 1300 |
| 25 | Karaağaçlı village | 40°55'N-39°17'E | 640 |
| 26 | Karaağaçlı village | 40°55'N-39°18'E | 1000 |
| 27 | Karasu village | 40°56'N-39°18'E | 845 |
| 28 | Karasu village | 40°57'N-39°18'E | 900 |
| 29 | Kayacan village | 40°56'N-39°16'E | 870 |
| 30 | Kozluca village | 40°56'N-39°13'E | 1000 |
| 31 | Kösecik village | 40°57'N-39°17'E | 600 |
| 32 | Melikşah village | 40°54'N-39°16'E | 910 |
| 33 | Melikşah village | 40°55'N-39°15'E | 1040 |
| 34 | Sağrı village | 40°57'N-39°18'E | 780 |
| 35 | Sayraç village | 40°53'N-39°14'E | 1060 |
| 36 | Sayraç village | 40°54'N-39°13'E | 1100 |
| 37 | Sayraç village | 40°54'N-39°14'E | 1100 |
| 38 | Yakçukur village | 40°54'N-39°14'E | 960 |
| 39 | Yakçukur village | 40°54'N-39°15'E | 1000 |
| 40 | Yeni köy village | 40°53'N-39°18'E | 1200 |
| 41 | Yeni köy village | 40°54'N-39°18'E | 1150 |

12. *Neodasyscypha cerina* (Pers.) Spooner: On *Prunus* L. sp. stump, locality 26, 07.11.2016, Yuzun 5371; on *Castanea* Mill. stump, locality 32, 26.03.2016, Yuzun 4965.

Mollisiaceae Rehm

13. *Mollisia cinerea* (Batsch) P. Karst.: On decaying *Fagus* sp. twigs, locality 27, 21.06.2017, Yuzun 5595;

locality 34, 17.05.2016, Yuzun 5092.

14. *Mollisia ventosa* P. Karst.: On decaying *Fagus* sp. stump, locality 27, 21.06.2017, Yuzun 5594.

15. *Tapesia fusca* (Pers.) Fuckel: On decaying *Fagus* sp. twigs, locality 17, 24.03.2016, Yuzun 4896.

Rutstroemiaceae Holst-Jensen, L.M. Kohn & T. Schumach.

16. *Lanzia echinophila* (Bull.) Korf: On dead cupules of *Castanea* sp., locality 8, 07.09.2014, Yuzun 1615.
Sclerotiniaceae Whetzel
17. *Ciboria caucus* (Rebent.) Fuckel: On dead spikes of *Alnus* sp., locality 8, 06.02.2015, Yuzun 3269.
Tricladaceae P.R. Johnst. & Baschien
18. *Cudoniella acicularis* (Bull.) J. Schröt.: On decaying stump in mixed forest, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4699.
Leotiales Korf & Lizoň
Leotiaceae Corda
19. *Leotia lubrica* (Scop.) Pers: On soil in mixed forest, locality 11, 28.10.2015, Yuzun 4626; locality 38, 26.08.2015, Yuzun 4453.
Orbiliomycetes O.E. Erikss. & Baral
Orbiliales Baral, O.E. Erikss., G. Marson & E. Weber
Orbiliaceae Nannf.
20. *Hyalorbilia inflatula* (P. Karst.) Baral & G. Marson: On dead *Acacia* Martius sp. branches, locality 33, 08.09.2014, Yuzun 1667.
Pezizomycetes O.E. Erikss. & Winka
Pezizales J. Schröt.
Ascobolaceae Boud. ex Sacc.
21. *Ascobolus furfuraceus* Pers.: On cow dung, locality 35, 27.03.2016, Yuzun 4975; locality 32, 26.03.2016, Yuzun 4926.
22. *Saccobolus glaber* (Pers.) Lambotte: On cow dung, locality 36, 27.03.2016, Yuzun 4978; locality 37, 28.08.2015, Yuzun 4514.
23. *Thecotheus pelletieri* (P. Crouan & H. Crouan) Boud.: On cow dung, locality 36, 28.08.2015, Yuzun 4515; locality 18, 23.07.2015, Yuzun 4364.
Discinaceae Benedix
24. *Gyromitra infula* (Schaeff.) Quél.: On decaying *Picea* sp. stump, locality 23, 09.10.2014, Yuzun 1966.
Helvellaceae Fr.
25. *Dissingia leucomelaena* (Pers.) K. Hansen & X.H. Wang: On soil among needle litter, locality 32, 12.04.2017, Yuzun 5526.
26. *Helvella acetabulum* (L.) Quél.: On soil among grasses under *Corylus* sp., locality 34, 17.05.2016, Yuzun 5088; locality 14, 25.03.2016, Yuzun 4950.
27. *Helvella atra* J. König: On soil among grasses under *Corylus* sp., locality 20, 22.06.2017, Yuzun 5605; locality 27, 07.11.2016, Yuzun 5369.
28. *Helvella crispa* (Scop.) Fr.: On soil among grasses under *Corylus* sp., locality 26, 07.11.2016, Yuzun 5367.
29. *Helvella elastica* Bull.: On soil under *Corylus* sp., locality 38, 10.11.2016, Yuzun 5440; on soil under mixed forest, locality 10, 19.09.2015, Yuzun 4571.
30. *Helvella lactea* Boud.: On soil under *Corylus* sp., locality 31, 22.06.2017, Yuzun 5609.
31. *Helvella lacunosa* Afzel.: On soil under mixed forest, locality 34, 17.05.2016, Yuzun 5090.
32. *Helvella macropus* (Pers.) P. Karst.: On soil under *Corylus* sp., locality 38, 10.11.2016, Yuzun 5432.
33. *Helvella phlebophora* Pat. & Doass.: On soil among grasses under *Corylus* sp., locality 31, 22.06.2017, Yuzun 5612.
Pezizaceae Dumort.
34. *Adelphella babingtonii* (Sacc.) Pfister, Matočec & I. Kušan: On *Fagus* sp. stump, locality 39, 20.06.2017, Yuzun 5575; locality 38, 26.08.2015, Yuzun 4452.
35. *Hydnobolites cerebriformis* Tul. & C. Tul.: (Uzun and Kaya, 2018).
36. *Pachyella clypeata* (Schwein.) Le Gal: (Uzun and Kaya, 2019b).
37. *Pachyphloides citrina* (Berk. & Broome) Doweld: (Uzun and Kaya, 2018).
38. *Peziza michelii* (Boud.) Dennis: On soil under mixed forest, locality 22, 21.07.2015, Yuzun 4296.
39. *Peziza phyllogena* Cooke: On soil at roadside, locality 19, 20.07.2015, Yuzun 4268.
40. *Peziza saniosa* Schrad.: On soil in mixed forest, locality 22, 21.07.2015, Yuzun 4307.
41. *Peziza succosa* Berk.: On soil under *Corylus* sp., locality 31, 22.06.2017, Yuzun 5611.
42. *Peziza violacea* Pers.: On burned ground, locality 33, 12.04.2017, Yuzun 5524.
43. *Plicaria carbonaria* Fuckel: (Kaya and Uzun, 2018).
44. *Terfezia cistophila* Ant. Rodr., Bordallo, V. Kaounas, & Morte: (Uzun and Kaya, 2019b).
Pyronemataceae Corda
45. *Aleuria aurantia* (Pers.) Fuckel: On soil under mixed forest, locality 10, 22.09.2015, Yuzun 4609; 19.09.2015, Yuzun 4567; locality 22, 21.07.2015, Yuzun 4315.
46. *Anthracobia melaloma* (Alb. & Schwein.) Boud.: On ash on burned ground, locality 30, 27.03.2016, Yuzun 4988; 13.11.2016, Yuzun 5471.
47. *Cheilymenia vitellina* (Pers.) Dennis: On herbaceous remains among mosses, locality 38, 10.11.2016, Yuzun 5445.
48. *Humaria hemisphaerica* (F.H. Wigg.) Fuckel: On soil under *Picea* sp., locality 22, 21.07.2015, Yuzun 4312.
49. *Lamprospora campylopodis* W.D. Buckley: (Uzun and Kaya, 2019b).
50. *Lamprospora dictydiola* Boud.: On moss, locality 31, 07.11.2016, Yuzun 5398.
51. *Melastiza cornubiensis* (Berk. & Broome) J. Moravec: On soil at roadside, locality 10, 19.09.2015, Yuzun 4568.
52. *Neottiella rutilans* (Fr.) Dennis: On moss under *Corylus* sp., locality 31, 22.06.2017, Yuzun 5607; locality 2, 10.04.2017, Yuzun 5513; locality 38, 10.11.2016, Yuzun 5436; locality 26, 07.11.2016, Yuzun 5375.
53. *Octospora axillaris* (Nees) M.M. Moser: On moss under *Corylus* sp., locality 26, 07.11.2016, Yuzun 5381.
54. *Octospora rustica* (Velen.) J. Moravec: On moss

at roadside, locality 14, 22.07.2015, Yuzun 4343.

55. *Octospora tuberculatella* (Seaver) Caillet & Moyne: (Uzun and Kaya, 2019b).

56. *Pulvinula alba* (Velen.) Svrček: On damp soil among mosses and liverworts in *Corylus* L. garden, locality 35, 23.07.2015, Yuzun 4390.

57. *Pulvinula convexella* (P. Karst.) Pfister: (Uzun and Kaya, 2019b).

58. *Pyronema omphalodes* (Bull.) Fuckel: On burned ground, locality 11, 13.04.2017, Yuzun 5535; locality 28, 21.05.2016, Yuzun 5110.

59. *Scutellinia armatospora* Denison: On damp soil, locality 31, 22.06.2017, Yuzun 5608; on damp soil among mosses, locality 34, 17.05.2016, Yuzun 5080; on damp soil under *Corylus* sp., locality 20, 14.05.2016, Yuzun 5039.

60. *Tarsetta catinus* (Holmsk.) Korf & J.K. Rogers: On soil under *Corylus* sp., locality 38, 10.11.2016, Yuzun 5439.

61. *Tarsetta cupularis* (L.) Svrček: On soil under *Corylus* sp., locality 13, 21.09.2015, Yuzun 4590.

Sarcoscyphaceae Le Gal ex Eckblad

62. *Sarcoscypha coccinea* (Gray) Boud.: On decaying *Corylus* sp. twigs, locality 2, 06.02.2015, Yuzun 3237.

Sarcosomataceae Kobayasi

63. *Plectania rhytidia* (Berk.) Nannf. & Korf: On *Corylus* sp. wood, locality 15, 22.06.2017, Yuzun 5631; locality 20, 14.05.2016, Yuzun 5037; On soil, locality 28, 25.03.2016, Yuzun 4933.

Tuberaceae Dumort.

64. *Tuber puberulum* Berk. & Broome: Erikbeli village, in soil under broadleaved forest, locality 10, 22.09.2015, Yuzun 4605.

Sordariomycetes O.E. Erikss. & Winka

Hypocreales Lindau

Hypocreaceae De Not.

65. *Trichoderma alni* Jaklitsch: On decaying *Alnus* Mill. sp. branches, locality 9, 07.09.2014, Yuzun 1603.

Nectriaceae Tul. & C. Tul.

66. *Neonectria coccinea* (Pers.) Rossman & Samuels: On decaying woody remains, locality 33, 08.09.2014, Yuzun 1679.

Xylariales Nannf.

Diatrypaeae Nitschke

67. *Diatrype stigma* (Hoffm.) Fr.: On decaying *Fagus* sp. twigs, locality 7, 07.09.2014, Yuzun 1581.

Xylariaceae Tul. & C. Tul.

68. *Daldinia concentrica* (Bolton) Ces. & De Not.: On decaying *Alnus* Mill. sp. remains, locality 36, 08.11.2016, Yuzun 5418.

69. *Hypoxylon fragiforme* (Pers.) J. Kickx f.: On decaying *Fagus* sp. branches, locality 30, 13.11.2016, Yuzun 5474.

70. *Hypoxylon fuscum* (Pers.) Fr.: On dead *Corylus* sp. twigs, locality 2, 06.02.2015, Yuzun 3244.

71. *Kretzschmaria deusta* (Hoffm.) P.M.D. Martin: On *Alnus* Mill. sp. stump, locality 9, 06.02.2015, Yuzun 3260.

72. *Nemania serpens* (Pers.) Gray: On *Castanea* sp. stump, locality 2, 06.02.2015, Yuzun 3243.

73. *Xylaria hypoxylon* (L.) Grev.: On *Fagus* sp. stump, locality 31, 22.06.2017, Yuzun 5622; locality 38, 26.08.2015, Yuzun 4450; on *Corylus* sp. stump, locality 25, 20.06.2016, Yuzun 5166.

74. *Xylaria longipes* Nitschke: On *Fagus* sp. stump, locality 25, 17.09.2015, Yuzun 4551.

75. *Xylaria polymorpha* (Pers.) Grev.: On *Fagus* sp. stump, locality 27, 21.06.2017, Yuzun 5593.

Basidiomycota R.T. Moore

Agaricomycetes Doweld

Agaricales Underw.

Agaricaceae Chevall.

76. *Coprinus comatus* (O.F. Müll.) Pers.: On soil among grass, locality 6, 09.10.2014, Yuzun 1913.

77. *Echinoderma asperum* (Pers.) Bon: On soil under mixed forest, locality 6, 09.10.2014, Yuzun 1933.

78. *Leucoagaricus nymphaeum* (Kalchbr.) Bon: On soil among grass under mixed forest, locality 18, 23.07.2015, Yuzun 4374.

79. *Macrolepiota mastoidea* (Fr.) Singer: On soil among grass, locality 33, 08.09.2014, Yuzun 1686.

80. *Macrolepiota procera* (Scop.) Singer: On soil among grass, locality 4, 11.11.2016, Yuzun 5457.

81. *Tulostoma brumale* Pers.: On soil among mosses, locality 2, 10.04.2017, Yuzun 5512; on soil among grass, locality 33, 01.11.2015, Yuzun 4717.

Amanitaceae R. Heim ex Pouzar

82. *Amanita citrina* Pers.: On soil under mixed forest, locality 11, 28.10.2015, Yuzun 4623.

83. *Amanita gemmata* (Fr.) Bertill.: On soil under mixed forest, locality 11, 28.10.2015, Yuzun 4621.

84. *Amanita muscaria* (L.) Lam.: On soil under *Picea* sp., locality 23, 19.09.2015, Yuzun 4584.

85. *Amanita pantherina* (DC.) Krombh.: On soil under mixed forest, locality 6, 09.10.2014, Yuzun 1917.

86. *Amanita phalloides* (Vaill. ex Fr.) Link: On soil under mixed forest, locality 31, 07.11.2016, Yuzun 5385; locality 11, 28.10.2015, Yuzun 4625.

87. *Amanita rubescens* Pers.: On soil under mixed forest, locality 15, 22.06.2017, Yuzun 5632; locality 18, 23.07.2015, Yuzun 4361.

Chromocyphellaceae Knudsen

88. *Chromocyphella muscicola* (Fr.) Donk: On mosses, locality 20, 07.09.2014, Yuzun 1620.

Clavariaceae Chevall.

89. *Clavaria acuta* Sowerby: On soil at roadside, locality 31, 07.11.2016, Yuzun 5392.

Cortinariaceae R. Heim ex Pouzar

90. *Protoglossum niveum* (Vittad.) T.W. May: In soil under mixed forest, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4692; locality 33, 01.11.2015, Yuzun 4711.

Entolomataceae Kotl. & Pouzar

91. *Entoloma chalybeum* (Pers.) Noordel.: On soil among grass, locality 19, 20.07.2015, Yuzun 4275.

92. *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm.: On soil

under mixed forest, locality 39, 20.06.2017, Yuzun 5573.

Hydnangiaceae Gäum. & C.W. Dodge

93. *Laccaria amethystina* Cooke: On soil among leaf litter, locality 1, 07.09.2014, Yuzun 1652.

94. *Laccaria laccata* (Scop.) Cooke: On soil under *Corylus* sp., locality 26, 07.11.2016, Yuzun 5382; on soil under mixed forest, locality 31, 07.11.2016, Yuzun 5390.

Hygrophoraceae Lotsy

95. *Ampulloclitocybe clavipes* (Pers.) Redhead, Lutzoni, Moncalvo & Vilgalys: On soil among grass, locality 6, 09.10.2014, Yuzun 1950.

96. *Cuphophyllus virgineus* (Wulfen) Kovalenko: On soil among grass, 22, 09.10.2014, Yuzun 1962.

97. *Hygrocybe acutoconica* (Clem.) Singer: On soil among grass, locality 25, 21.06.2015, Yuzun 4107.

98. *Hygrocybe cantharellus* (Schwein.) Murrill: On soil among grass, locality 24, 07.09.2014, Yuzun 1638.

99. *Hygrocybe conica* (Schaeff.) P. Kumm.: On soil among grass, locality 6, 09.10.2014, Yuzun 1915.

100. *Hygrophorus eburneus* (Bull.) Fr.: On soil under mixed forest, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4694.

Hymenogastraceae Vittad.

101. *Galerina marginata* (Batsch) Kühner: On *Picea* sp. stump, locality 22, 09.10.2014, Yuzun 1954.

102. *Hymenogaster citrinus* Vittad.: In soil under mixed forest, locality 33, 01.11.2015, Yuzun 4713; locality 22, 28.10.2015, Yuzun 4641; locality 13, 21.09.2015, Yuzun 4592; locality 10, 19.09.2015, Yuzun 4565.

103. *Hymenogaster hessei* Soehner: In soil under mixed forest, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4698; locality 33, 01.11.2015, Yuzun 4712.

104. *Hymenogaster luteus* Vittad.: In soil and rotting plant residues under mixed forest, locality 34, 17.05.2016, Yuzun 5085.

Incertae Sedis

105. *Calyptella capula* (Holmsk.) Quéf.: On dead *Sambucus* L. sp. stem, locality 20, 07.09.2014, Yuzun 1617.

106. *Clitocybe gibba* (Pers.) P. Kumm.: On soil among needle litter under *Picea* sp., locality 37, 21.06.2015, Yuzun 4098.

107. *Clitocybe nebularis* (Batsch) P. Kumm.: On soil under mixed forest, locality 23, 09.10.2014, Yuzun 1987.

108. *Crucibulum laeve* (Huds.) Kambly: On decaying woody remains, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4696.

109. *Cyathus olla* (Batsch) Pers.: On decaying woody remains, locality 20, 22.06.2017, Yuzun 5603.

110. *Cyathus striatus* (Huds.) Willd.: On wood chips at roadside, locality 31, 22.06.2017, Yuzun 5620; on soil among woody debris, locality 5, 26.08.2015, Yuzun 4463.

111. *Delicatula integrella* (Pers.) Fayod: On dead *Alnus* sp. branches, locality 20, 07.09.2014, Yuzun 1622.

112. *Fistulina hepatica* (Schaeff.) With.: On *Castanea* sp. stump, locality 15, 17.09.2015, Yuzun 4534.

113. *Lepista nuda* (Bull.) Cooke: On soil among needle-litter, locality 25, 21.06.2015, Yuzun 4119.

114. *Panaeolus papilionaceus* (Bull.) Quéf.: On decaying cow dung, locality 37, 20.06.2017, Yuzun 5564.

115. *Tricholomopsis rutilans* (Schaeff.) Singer: On *Picea* sp. stump, locality 23, 09.10.2014, Yuzun 1979.

Lycoperdaceae Chevall.

116. *Bovista nigrescens* Pers.: On soil among grass, locality 1, 07.09.2014, Yuzun 1663.

117. *Bovista plumbea* Pers.: On soil among grass, locality 37, 21.06.2015, Yuzun 4105.

118. *Lycoperdon echinatum* Pers.: On soil under *Picea* sp., locality 22, 21.07.2015, Yuzun 4309.

119. *Lycoperdon excipuliforme* (Scop.) Pers.: On soil under mixed forest, locality 18, 12.11.2016, Yuzun 5461.

120. *Lycoperdon perlatum* Pers.: On soil among grass, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4693.

121. *Lycoperdon pyriforme* Schaeff.: On *Picea* sp. stump, locality 23, 09.10.2014, Yuzun 1974.

122. *Lycoperdon utriforme* Bull.: On soil among grass, locality 15, 22.06.2017, Yuzun 5633.

Marasmiaceae Roze ex Kühner

123. *Marasmius curreyi* Berk. & Broome: On grass remains in *Corylus* sp. Garden, locality 25, 20.06.2016, Yuzun 5156.

124. *Marasmius oreades* (Bolton) Fr.: On soil among grass, locality 3, 20.07.2015, Yuzun 4280.

125. *Marasmius rotula* (Scop.) Fr.: On *Fagus* sp. stump, locality 27, 21.06.2017, Yuzun 5598; locality 15, 17.09.2015, Yuzun 4541.

Mycenaceae Roze

126. *Mycena acicula* (Schaeff.) P. Kumm.: On dead herbaceous stem, locality 20, 07.09.2014, Yuzun 1618.

127. *Mycena haematopus* (Pers.) P. Kumm.: On decaying *Picea* stump, locality 1, 07.09.2014, Yuzun 1653.

128. *Mycena pura* (Pers.) P. Kumm.: On leaf litter under mixed forest, locality 22, 21.07.2015, Yuzun 4305.

129. *Mycena renati* Quéf.: On decaying woody remains, locality 13, 21.09.2015, Yuzun 4598.

130. *Mycena rosea* Gramberg: On leaf litter under mixed forest, locality 33, 01.11.2015, Yuzun 4715.

131. *Panellus stipticus* (Bull.) P. Karst.: On *Alnus* sp. stump, locality 30, 27.03.2016, Yuzun 4984; locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4701.

Omphalotaceae Bresinsky

132. *Gymnopus dryophilus* (Bull.) Murrill: On soil under mixed forest, locality 29, 21.06.2017, Yuzun 5582; locality 37, 20.06.2017, Yuzun 5561; locality 14, 25.03.2016, Yuzun 4949.

133. *Gymnopus foetidus* (Sowerby) P.M. Kirk: On *Quercus* L. sp. twigs, locality 39, 20.06.2017, Yuzun

5572.

134. *Marasmiellus ramealis* (Bull.) Singer: On dead herbaceous stem, locality 27, 21.06.2017, Yuzun 5596.

135. *Marasmiellus vaillantii* (Pers.) Singer: On decaying *Rhododendron* twigs, locality 29, 21.06.2017, Yuzun 5587.

136. *Mycetinis scorodonius* (Fr.) A.W. Wilson & Desjardin: On *Rhododendron* L. sp. twigs, locality 37, 21.06.2015, Yuzun 4100.

Physalacriaceae Corner

137. *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm.: On *Castanea* sp. stump, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4702.

138. *Armillaria ostoyae* (Romagn.) Herink: On *Alnus* Mill. sp. stump, locality 13, 21.09.2015, Yuzun 4596.

139. *Hymenopellis radicata* (Relhan) R.H. Petersen: On soil under mixed forest, locality 25, 17.09.2015, Yuzun 4556.

Pleurotaceae Kühner

140. *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm.: On *Populus* L. sp. stump, locality 8, 07.11.2016, Yuzun 5411.

Psathyrellaceae Vilgalys, Moncalvo & Redhead

141. *Coprinellus micaceus* (Bull.) Vilgalys, Hopple & Jacq. Johnson: On soil around decaying stump, locality 17, 24.03.2016, Yuzun 4907.

142. *Parasola auricoma* (Pat.) Redhead, Vilgalys & Hopple: On soil under mixed forest, locality 19, 20.07.2015, Yuzun 4274.

Schizophyllaceae Qué. l.

143. *Schizophyllum commune* Fr.: On decaying *Fagus* sp. branches, locality 30, 13.11.2016, Yuzun 5476; locality 3, 11.11.2016, Yuzun 5450; locality 17, 24.03.2016, Yuzun 4906.

Strophariaceae Singer & A.H. Sm.

144. *Agrocybe praecox* (Pers.) Fayod: On soil among grass, locality 40, 12.04.2017, Yuzun 5531; locality 30, 27.03.2016, Yuzun 4989.

145. *Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm.: On decaying *Corylus* sp. stump, locality 23, 07.11.2016, Yuzun 5402; locality 23, 25.03.2016, Yuzun 4952; On *Castanea* sp. stump, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4704; locality 18, 23.07.2015, Yuzun 4370.

146. *Kuehneromyces mutabilis* (Schaeff.) Singer & A.H. Sm.: On decaying *Picea* sp. stump, locality 13, 21.09.2015, Yuzun 4600.

147. *Pholiota populnea* (Pers.) Kuyper & Tjall.-Beuk.: On *Salix* sp. stump, locality 36, 08.11.2016, Yuzun 5421.

148. *Stropharia rugosoannulata* Farl. ex Murrill: On woody sawdust, locality 25, 20.06.2016, Yuzun 5158.

Amylocorticiales K.H. Larss., Manfr. Binder & Hibbett

Amylocorticaceae Jülich

149. *Plicaturopsis crispa* (Pers.) D.A. Reid: On decaying *Alnus* sp. stump, locality 9, 06.02.2015, Yuzun 3262.

Auriculariales J. Schröt.

Auriculariaceae Fr.

150. *Exidia glandulosa* (Bull.) Fr.: On decaying stump under mixed forest, locality 2, 10.04.2017, Yuzun 5509; on *Quercus* sp. stump, locality 4, 11.11.2016, Yuzun 5454.

Incertae Sedis

151. *Pseudohydnum gelatinosum* (Scop.) P. Karst.: On decaying stump under mixed forest, locality 23, 07.11.2016, Yuzun 5399.

Boletales E.-J. Gilbert

Boletaceae Chevall.

152. *Aureoboletus gentilis* (Qué. l.) Pouzar: On soil under mixed forest, locality 11, 28.10.2015, Yuzun 4624.

153. *Boletus edulis* Bull.: On soil under mixed forest, locality 6, 09.10.2014, Yuzun 1918.

154. *Boletus erythropus* Pers.: On soil among leaf litter, locality 35, 21.06.2015, Yuzun 4106.

155. *Leccinum pseudoscabrum* (Kallenb.) Šutara: On soil under *Corylus* sp., locality 33, 08.09.2014, Yuzun 1672.

156. *Octaviania asterosperma* Vittad.: In soil under mixed forest, locality 30, 13.11.2016, Yuzun 5479; locality 33, 01.11.2015, Yuzun 4717; locality 11, 28.10.2015, Yuzun 4628; locality 23, 28.10.2015, Yuzun 4639.

157. *Xerocomellus chrysenteron* (Bull.) Šutara: On soil among needle litter, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4707.

Diplocystidiaceae Kreisel

158. *Astraeus hygrometricus* (Pers.) Morgan: On soil under mixed forest, locality 2, 10.04.2017, Yuzun 5505; locality 4, 11.11.2016, Yuzun 5458; locality 30; 27.03.2016, Yuzun 4986; on soil under *Corylus* sp., locality 26, 07.11.2016, Yuzun 5379.

Paxillaceae Lotsy

159. *Alpova diplophloeus* (Zeller & C.W. Dodge) Trappe & A.H. Sm.: (Yakar et al., 2019).

160. *Gyrodon lividus* (Bull.) Sacc.: On soil under *Corylus* sp., locality 13, 21.09.2015, Yuzun 4595.

161. *Melanogaster ambiguus* (Vittad.) Tul. & C. Tul.: In soil under mixed forest, locality 20, 19.05.2016, Yuzun 5100.

162. *Melanogaster broomeanus* Berk.: In soil under *Corylus* sp., locality 28, 22.06.2017, Yuzun 5628; locality 25, 20.06.2016, Yuzun 5162.

163. *Melanogaster variegatus* (Vittad.) Tul. & C. Tul.: In soil under mixed forest, locality 37, 20.06.2017, Yuzun 5566.

164. *Paxillus involutus* (Batsch) Fr.: On soil among leaf litter, locality 8, 07.09.2014, Yuzun 1598.

Rhizopogonaceae Gäum. & C.W. Dodge

165. *Rhizopogon obtextus* (Spreng.) R. Rauschert: In soil among leaf litter under mixed forest, locality 34, 17.05.2016, Yuzun 5091.

Sclerodermataceae Corda

166. *Scleroderma areolatum* Ehrenb.: In soil under *Corylus* sp., locality 26, 07.11.2016, Yuzun 5380.

167. *Scleroderma citrinum* Pers.: On soil among leaf litter, locality 10, 22.09.2015, Yuzun 4607.
Sclerogastraceae Locq.
168. *Sclerogaster candidus* (Tul. & C. Tul.) Zeller & C.W. Dodge: In soil under mixed forest, locality 28, 22.06.2017, Yuzun 5625.
Suillaceae Besl & Bresinsky
169. *Suillus lakei* (Murrill) A.H. Sm. & Thiers: On soil under *Pseudotsuga* Carrière sp., locality 26, 07.11.2016, Yuzun 5376.
Tapinellaceae Locq.
170. *Tapinella atrotomentosa* (Batsch) Šutara: On *Quercus* sp. stump, locality 28, 22.06.2017, Yuzun 5629; on *Rhododendron* sp. stump, locality 25, 17.09.2015, Yuzun 4548.
Cantharellales Gäum.
Cantharellaceae J. Schröt.
171. *Cantharellus cibarius* Fr.: On soil under mixed forest, locality 31, 22.06.2017, Yuzun 5615; on soil among grass, locality 1, 07.09.2014, Yuzun 1659.
Hydnaceae Chevall.
172. *Clavulina cinerea* (Bull.) J. Schröt.: On soil among needle-litter, locality 22, 21.07.2015, Yuzun 4313.
173. *Clavulina rugosa* (Bull.) J. Schröt.: On soil among needle-litter, locality 22, 21.07.2015, Yuzun 4319.
174. *Craterellus cornucopioides* (L.) Pers.: On soil under mixed forest, locality 31, 07.11.2016, Yuzun 5387.
175. *Craterellus lutescens* (Fr.) Fr.: On soil under mixed forest, locality 1, 07.09.2014, Yuzun 1660.
176. *Hydnum repandum* L.: On soil under mixed forest, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4705.
177. *Pseudocraterellus undulatus* (Pers.) Rauschert: On soil under mixed forest, locality 7, 07.09.2014, Yuzun 1590.
Geastrales K. Hosaka & Castellano
Geastraceae Corda
178. *Geastrum minimum* Schwein.: On soil among needle litter, locality 38, 10.11.2016, Yuzun 5441.
179. *Geastrum saccatum* Fr.: On soil under *Picea* sp., locality 38, 26.08.2015, Yuzun 4454.
Gomphales Jülich
Clavariadelphaceae Corner
180. *Clavariadelphus truncatus* Donk: On soil under *Picea* sp., locality 23, 09.10.2014, Yuzun 1969.
Gomphaceae Donk
181. *Gautieria graveolens* Vittad.: In soil under mixed forest, locality 8, 11.04.2017, Yuzun 5517.
Hymenochaetales Oberw.
Hymenochaetaceae Imazeki & Toki
182. *Hymenochaete rubiginosa* (Dicks.) Lév.: On *Castanea* sp. stump, locality 38, 10.11.2016, Yuzun 5433.
Incertae sedis
183. *Trichaptum abietinum* (Dicks.) Ryvarden: On dead *Rhododendron* sp. stump, locality 7, 06.02.2015, Yuzun 3272.
Rickenellaceae Vizzini
184. *Rickenella fibula* (Bull.) Raitelh.: On mosses under *Corylus* sp., locality 13, 21.09.2015, Yuzun 4591.
Hysterangiales K. Hosaka & Castellano
Hysterangiaceae E. Fisch.
185. *Hysterangium clathroides* Vittad.: In soil under *Picea* sp., locality 18, 12.11.2016, Yuzun 5462.
186. *Hysterangium nephriticum* Berk.: In soil under mixed forest, locality 11, 28.10.2015, Yuzun 4629; in soil under *Fagus* sp., locality 25, 17.09.2015, Yuzun 4557.
Phallales E. Fisch.
Phallaceae Corda
187. *Clathrus ruber* P. Micheli ex Pers.: On soil among needle litter, locality 31, 07.11.2016, Yuzun 5391; on soil under *Corylus* sp, locality 25, 20.06.2016, Yuzun 5147; on soil in bean grow, locality 14, 22.05.2016, Yuzun 5129.
188. *Phallus impudicus* L.: On soil under mixed forest, locality 10, 22.09.2015, Yuzun 4606.
189. *Pseudocolus fusiformis* (E. Fisch.) Lloyd: On soil under *Corylus* sp., locality 37, 28.08.2015, Yuzun 4525.
Polyporales Gäum.
Fomitopsidaceae Jülich
190. *Daedalea quercina* (L.) Pers.: On *Castanea* sp. stump, locality 25, 20.06.2016, Yuzun 5148.
191. *Fomitopsis pinicola* (Sw.) P. Karst.: On *Picea* sp. stump, locality 32, 26.03.2016, Yuzun 4958.
Meripilaceae Jülich
192. *Meripilus giganteus* (Pers.) P. Karst.: On *Fagus* sp. stump, locality 33, 01.11.2015, Yuzun 4716.
Phanerochaetaceae Jülich
193. *Bjerkandera adusta* (Willd.) P. Karst.: On *Alnus* sp. stump, locality 8, 07.09.2014, Yuzun 1585.
194. *Terana coerulea* (Lam.) Kuntze: On *Castanea* sp. stump, locality 38, 10.11.2016, Yuzun 5435.
Polyporaceae Fr. ex Corda
195. *Cerioporus leptcephalus* (Jacq.) Zmitr.: On *Fagus* sp. stump, locality 37, 20.06.2017, Yuzun 5563.
196. *Polyporus arcularius* (Batsch) Fr.: On dead *Corylus* sp. twigs, locality 7, 06.02.2015, Yuzun 3277.
197. *Trametes gibbosa* (Pers.) Fr.: On decaying *Fagus* sp. stump, locality 36, 08.11.2016, Yuzun 5417.
198. *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd: On *Fagus* sp. stump, locality 2, 10.04.2017, Yuzun 5511; locality 28, 25.03.2016, Yuzun 4943; on *Corylus* sp. branch, locality 26, 07.11.2016, Yuzun 5370; locality 17, 24.03.2016, Yuzun 4902.
199. *Trametes versicolor* (L.) Lloyd: On *Quercus* sp. stump, locality 17, 24.03.2016, Yuzun 4905.
Russulales Kreisel ex P.M. Kirk, P.F. Cannon & J.C. David
Albatrellaceae Nuss
200. *Leucogaster nudus* (Hazsl.) Hollós: In soil and rotting plant residues under mixed forest, locality 10,

28.10.2015, Yuzun 4620.

Hericiaceae Donk

201. *Hericium erinaceus* (Bull.) Pers.: On *Quercus* sp. stump, locality 18, 12.11.2016, Yuzun 5466; locality 23, 28.10.2015, Yuzun 4637.

Russulaceae Lotsy

202. *Lactarius decipiens* Quél.: On soil under *Quercus* sp., locality 14, 22.05.2016, Yuzun 5125.

203. *Lactarius deliciosus* (L.) Gray: On soil under *Picea* sp., locality 1, 07.09.2014, Yuzun 1654.

204. *Lactarius piperatus* (L.) Pers.: On soil under mixed forest, locality 28, 22.06.2017, Yuzun 5623.

205. *Lactarius stephensii* (Berk.) Verbeken & Walley: In soil under mixed forest, locality 7, 11.04.2017, Yuzun 5519.

206. *Lactarius volemus* (Fr.) Fr.: On soil under mixed forest, locality 28, 22.06.2017, Yuzun 5627; locality 25, 20.06.2016, Yuzun 5150.

207. *Russula cyanoxantha* (Schaeff.) Fr.: On soil among grasses under *Corylus* sp., locality 25, 20.06.2016, Yuzun 5163.

Stereaceae Pilát

208. *Stereum hirsutum* (Willd.) Pers.: On decaying *Castanea* Mill. sp. stump, locality 4, 11.11.2016, Yuzun 5449; locality 17, 24.03.2016, Yuzun 4903.

209. *Stereum ochraceoflavum* (Schwein.) Sacc.: On decaying *Castanea* Mill. sp. stump, locality 8, 07.09.2014, Yuzun 1579.

Thelephorales Corner ex Oberw.

Bankeraceae Donk

210. *Hydnellum caeruleum* (Hornem.) P. Karst.: On soil under mixed forest, locality 25, 20.06.2016, Yuzun

5153.

211. *Sarcodon imbricatus* (L.) P. Karst.: On soil among needle litter, locality 23, 19.09.2015, Yuzun 4579.

Dacrymycetes Doweld

Dacrymycetales Henn.

Dacrymycetaceae J. Schröt.

212. *Calocera cornea* (Batsch) Fr.: On dead *Fagus* sp. branches, locality 29, 21.06.2017, Yuzun 5586.

213. *Dacrymyces capitatus* Schwein.: On dead *Fagus* sp. branches, locality 2, 10.04.2017, Yuzun 5510.

214. *Guepiniopsis buccina* (Pers.) L.L. Kenn.: On dead *Fagus* sp. branches, locality 29, 21.06.2017, Yuzun 5585; on *Corylus* sp. stump, locality 3, 01.11.2015, Yuzun 4700.

Tremellomycetes Doweld

Tremellales Fr.

Tremellaceae Fr.

215. *Tremella foliacea* Pers.: On dead *Corylus* sp. branch, locality 9, 06.02.2015, Yuzun 3273.

216. *Tremella mesenterica* Retz.: On dead *Erica* L. stem, locality 2, 06.02.2015, Yuzun 3241.

DISCUSSION

A list of 216 macrofungi species was presented from Tonya district. Seventy five of them (%34.72) belong to Ascomycota and 141 (%65.28) to Basidiomycota. The taxa are distributed in 8 classes. The class-wise distribution of the determined taxa is presented in Figure 2.

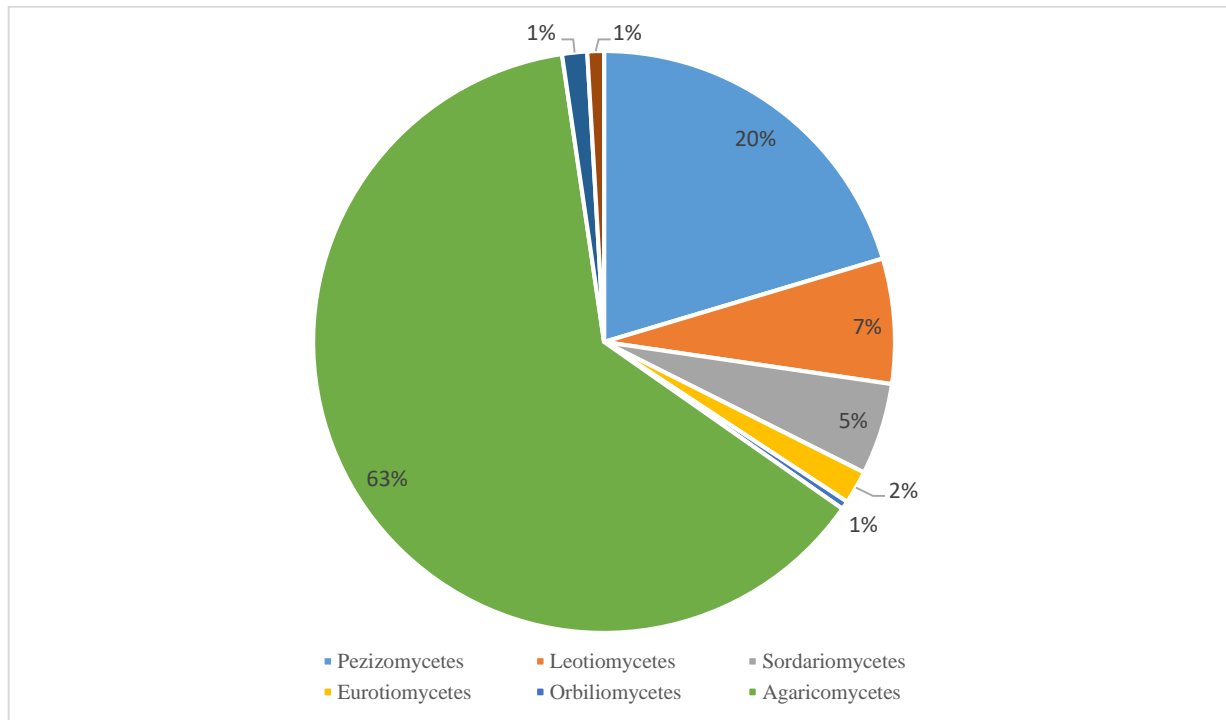


Figure 2. Class-wise distribution of the determined taxa

Şekil 2. Tespit edilen taksonların sınıf bazında dağılımı

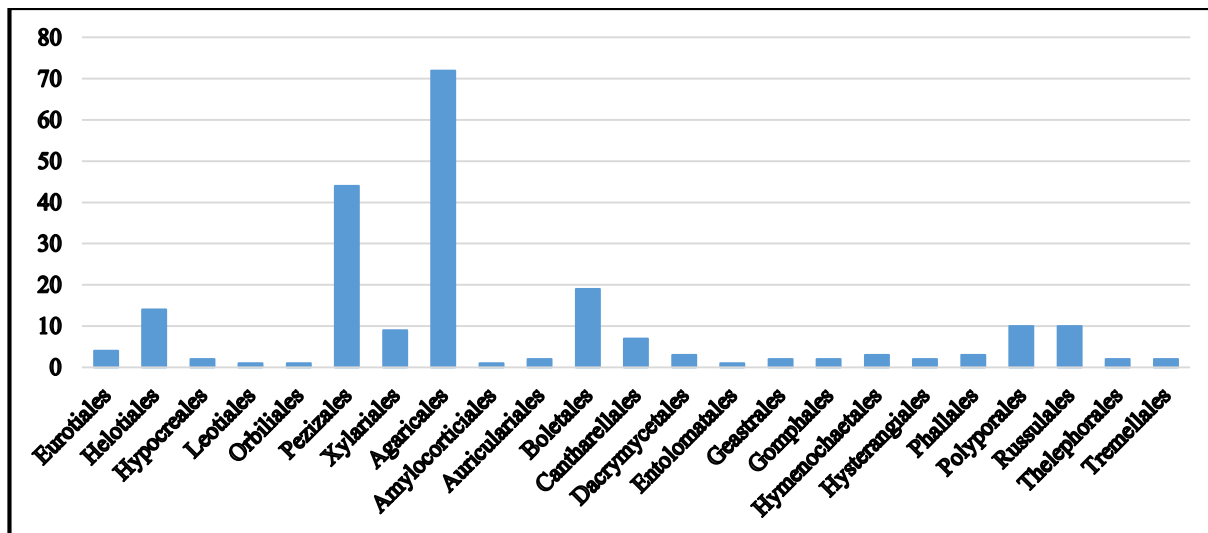


Figure 3. Order-wise distribution of the determined taxa
Şekil 3. Tespit edilen taksonların takım bazında dağılımı

Considering the determined taxa, 23 orders were found to be represented in the region, and the order-wise distribution of the taxa is given in Figure 3. Except for previously presented new records (*Elaphomyces citrinus*, *E. granulatus*, *Helvella phlebophora*, *Hydnobolites cerebriformis*, *Lactarius stephensii*, *Lamprospora campylopodis*, *Marasmiellus vaillantii*, *Marasmius curreyi*, *Octospora tuberculatella*, *Pachyella clypeata*, *Pachyphlodes citrina*, *Plicaria carbonaria*, *Pulvinula alba*, *P. convexella*, *Sclerogaster candidus*, *Terfezia cistophila*) and new locality records (*Alpova diplophloeus*, *Hymenogaster luteus*, *Leucogaster nudus*, *Tuber puberulum*) all the taxa are new for the region.

The macromycete taxa determined in Tonya district are distributed in 73 families and 150 genera. The most crowded 5 families are Pyronemataceae, Pezizaceae, Helvellaceae, Xylariaceae, and Lycoperdaceae with 17, 11, 9, 8 and 7 taxa respectively. Likewise *Helvella*, *Amanita*, *Lactarius*, *Lycoperdon*, *Mycena*, *Peziza* and *Elaphomyces* were found to be the most crowded genera in the region with 8, 6, 5, 5, 5, 5, and 4 taxa respectively.

According to the current literature, 52 of the determined taxa are edible. Eight of them are collected, with different names, and consumed by

locals. Locally consumed taxa and their local names are as follows: *Cantharellus cibarius* (yumurta mantarı, tavuk tirmiti, sarı mantar), *Craterellus cornucopioides* (huni mantarı, borazan mantarı), *Fistulina hepatica* (karaciğer mantarı, biftek mantarı), *Hydnum repandum* (sığır dili), *Lactarius volemus* (sütlü mantar), *Lepista nuda* (mor mantar), *Macrolepiota procera* (turna bacağı, kartal kanadı) and *Pleurotus ostreatus* (kavak mantarı). Among them *C. cibarius*, *C. cornucopioides*, *L. volemus* and *M. procera* also have regional economic importance. They are collected and sold in public bazaars. Fifteen of the determined taxa are more or less poisonous while 149 are regarded as inedible.

One hundred and twenty one of the determined taxa are terricolous, 72 are lignicolous, 8 are bryophilous, 4 are coprophilous, 4 are herbicolous and 4 are pyrophilous. Twenty five of them were also determined to be hypogeous or semi-hypogeous.

The determined taxa were also compared with the studies carried out in close environs and some similarities were observed. These studies and the similarity percentages are given in Table 2. The reason for this similarity may be the common climate and vegetation.

Table 2. Similarity percentages of neighbouring studies with Tonya district
Çizelge 2. Tonya bölgesi ile komşu çalışmaların benzerlik yüzdeleri

| | # of Identical taxa | Total taxa | Similarity (%) |
|--------------------------|---------------------|------------|----------------|
| Pekşen and Karaca (2003) | 56 | 169 | 33,14 |
| Demirel et al. (2010) | 31 | 126 | 24,60 |
| Keleş and Demirel (2010) | 33 | 191 | 17,28 |
| Akata et al. (2014) | 104 | 236 | 44,07 |
| Keleş et al. (2014) | 35 | 127 | 27,56 |
| Akata et al. (2016) | 84 | 166 | 50,60 |
| Akata and Uzun (2017) | 95 | 205 | 46,34 |
| Demirel et al. (2017) | 39 | 172 | 22,67 |

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Karamanoğlu Mehmetbey University Research Fund for supporting the Project 02-M-15 financially, and Doğançan KUDUBAN, Ömer UZUN, Yücel UZUN, Hasan UZUN, and Murat Çelebi EROL for their kind help during field studies.

Author's Contributions

Authors declare the contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

The authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Akata I, Uzun Y, Kaya A. 2014. Macromycetes determined in Yomra (Trabzon) district. *Turkish Journal of Botany*, 38(5): 999-1012.
- Akata I, Uzun Y, Kaya A. 2016. Macrofungi diversity of Zigana Mountain (Gümüşhane/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 9(2): 57-69.
- Akata I, Uzun Y. 2017. Macrofungi Determined in Uzungöl Nature Park (Trabzon). *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18(1): 15-24.
- Antonín V, Noordeloos ME. 2010. A Monograph of marasmioid and collybioid fungi in Europe. IHW-Verlag.
- Arroyo BM, Fernández JG, Calmaestra EP. 2005. Tesoros de nuestro montes. Trufas de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Córdoba.
- Baydar S, Sesli E. 1994. The macromycetes determined in Akçaabat District of Trabzon Province. *Turkish Journal of Botany*, 18: 99-101.
- Benkert D. 1995. Becherlinge als Moosparasiten. *Boletus*, 19: 97-127.
- Benkert D. 2007. Zur Kenntnis des Vorkommens bryophiler Pezizales (Ascomycota) in Südost-Europa. *Mycologia Montenegrina*, 10: 7-21.
- Bessette AE, Bessette AR, Fischer DW. 1997. *Mushrooms of northeastern North America*. Hong Kong, Syracuse University Press.
- Bessette AE, Roody WC, Bessette AR, Dunaway DL. 2007. *Mushrooms of the Southeastern United States*.
- Beug MW, Bessette AE, Bessette AR. 2014. *Ascomycete Fungi of North America. A Mushroom Reference Guide*. Pp. 502.
- Breitenbach, J, Kränzlin, F. 1984-2000. *Fungi of Switzerland*, vols. 1-5 Lucerne, Verlag Mykologia.
- Caillet M, Moyne G. 1980. Contribution a l'étude du genre *Octospora* Hedw. ex S.F. Gray emend. Le Gal. especes a spores ornementées, globuleuses ou subglobuleuses. *Bulletin de la Société Mycologique de France*, 96: 175-211.
- Candusso M, Lanzoni G. 1990. *Lepiota*. Saronno, Libreria editrice Biella Giovanna.
- Cappelli A. 1997. *Agaricus*. Libreria editrice Biella Giovanna, Saronno, Pp: 558.
- Courtecuisse R, Duhem B. 1995. *Collins Field Guide, Mushrooms and Toadstools of Britain and Europe*. Harper Collins, Italy.
- Cripps CL, Evenson VS, Kuo M (2016). *The essential guide to Rocky Mountain mushrooms by habitat*. University of Illinois Press.
- Davis PH. 1965. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press.
- Demirel K, Erdem Ö, Uzun Y, Kaya A. 2010. Macrofungi of Hatila Valley National Park (Artvin, Turkey). *Turkish Journal of Botany*, 34(5): 457-465.
- Demirel K, Uzun Y, Keleş A, Akçay ME, Acar İ. 2017. Macrofungi of Karagöl-Sahara National Park (Şavşat-Artvin/Turkey). *Biological Diversity and Conservation*, 10(2): 32-40.
- Ellis BM, Ellis PJ. 1997. *Microfungi on Land Plants, An Identification Handbook*. The Richmond publishing Co. Ltd, Slough-UK.
- Hailmann-Clausen J, Verbeken A, Vesterholt J. 1998. *The Genus Lactarius. Fungi of Northern Europe-Vol-2*.
- Hansen L, Knudsen H. 1992. *Nordic Macromycetes. Volume 2. Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales*. Nordsvamp, Copenhagen, Denmark.
- Hansen L, Knudsen H. 1997. *Nordic Macromycetes. Volume 3. Heterobasidioid, Aphyllophoroid, and Gastromycetoid Basidiomycetes*. Nordsvamp (1. Basım). Copenhagen-Denmark: Nordsvamp.
- Hansen L, Knudsen H. 2000. *Nordic Macromycetes. Volume 1. (Ascomycetes)*. Nordsvamp, Copenhagen, Denmark.
- Hausknecht A. 2009. A monograph of the genera *Conocybe* Fayod *Pholiotina* Fayod in Europe, Vol-11 (1. Basım). Alassio SV-Italia.
- Index Fungorum. 2020: <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Accessed 10 December 2020.
- Jaklitsch MW. 2009. European species of *Hypocrea*. Part I. The green-spored species. *Studies in Mycology* 63: 1-91.
- Kaya A, Uzun Y. 2018. New Contributions to the Turkish Ascomycota. *Turkish Journal of Botany*, 42(5): 644-652.
- Keleş A, Demirel K, Uzun Y, Kaya A. 2014. Macrofungi of Ayder (Rize/Turkey) high plateau. *Biological Diversity and Conservation*, 7(3): 177-183.
- Keleş A, Demirel K. 2010. Macrofungi Diversity of Erzincan Province (Turkey). *International Journal of Botany*, 6(4): 383-393.

- Kränzlin F. 2005. Fungi of Switzerland, Volume 6, Russulaceae 2. Verlag Mykologia, Switzerland, 319 pp.
- Lukić N. 2008. The distribution and diversity of *Boletus* genus in central Serbia. Kragujevac Journal of Science, 31: 59-68.
- Medardi G. 2006. Atlante fotografico degli Ascomiceti d'Italia (1. Basım). Italia: A.M.B. Fondazione, Centro Studi Micologici.
- Miller OK, Miller HH. 1988. Gasteromycetes. Morphological and Development Features with Keys to the Orders, Families, and Genera Eureka, Mad River Pres.
- Montecchi A, Sarasini M. 2000. Fungi Ipogei D'Europa. Vicenza: Fondazione Centro Studi Micologici dell'AMB.
- Mueller GM, Schmit JP, Leacock PR, Buyck B, Cifuentes J, Desjardin DE, Halling RE, Hjortstam K, Iturriaga T, Larsson KH, Lodge DJ, May TW, Minter D, Rajchenberg M, Redhead SA, Ryvarden L, Trappe JM, Watling R, Wu Q. 2007. Global diversity and distribution of macrofungi. Biodiversity and Conservation, 16: 37-48.
- Pegler DN, Læssøe T, Spooner BM. 1995. British Puffballs, Earthstars and Stinkhorns. Royal Botanic Gardens, Whitstable.
- Pekşen A, Karaca GH. 2003. Macrofungi of Samsun Province. Turkish Journal of Botany, 27(3): 173-184.
- Philips R. 2010. Mushrooms and Other Fungi of North America. The most comprehensive mushroom guide with over 1000 colour photographs.
- Sesli E, Asan A, Selçuk F. (edlr.) Abacı Günyar Ö, Akata I, Akgül H, Aktaş S, Alkan S, Allı H, Aydoğdu H, Berikten D, Demirel K, Demirel R, Doğan HH, Erdoğan M, Ergül CC, Eroğlu G, Giray G, Halikî Uztan A, Kabaktepe Ş, Kadaifçiler D, Kalyoncu F, Karaltı İ, Kaşık G, Kaya A, Keleş A, Kırbağ S, Kıvanç M, Ocak İ, Ökten S, Özkale E, Öztürk C, Sevindik M, Şen B, Şen İ, Türkekul İ, Ulukapı M, Uzun Ya, Uzun Yu, Yoltaş A. 2020. Türkiye Mantarları Listesi. Ali Nihat Gökyiğit Vakfı Yayını. İstanbul.
- Sesli E. 1993. The macrofungi of Maçka District in Trabzon Province. Turkish Journal of Botany, 17: 179-182
- Siegel N, Schwarz C. 2016. Mushrooms of the redwood coast: a comprehensive field guide to the fungi of coastal northern California. Ten Speed Press. Berkeley.
- Thompson PI. 2013. Ascomycetes in Colour. Found and Photographed in Mainland. Xlibris Corporation, USA.
- Trappe M, Evans F, Trappe J. 2007. Field Guide to North American Truffles. Hunting, Identifying and Enjoying the World's Most Prized Fungi (1. Basım). Newyork-USA: Ten Speed Press.
- Uzun Y, Kaya A. 2018. First Records of *Hydnobolites* and *Pachyphlodes* species from Turkey. Mycotaxon, 133(3): 415-421.
- Uzun Y, Kaya A. 2019a. *Elaphomyces granulatus*, A New Hypogeous Ascomycete Record for Turkey. KSU J. Agric Nat, 22(1): 85-88.
- Uzun Y, Kaya A. 2019b. New Additions to Turkish Pezizales from the Eastern Black Sea Region. Turkish Journal of Botany, 43(2): 262-270.
- Uzun Y, Kaya A. 2020. *Elaphomyces citrinus* and *E. cyanosporus*, new for Turkey. Mycotaxon, 135(2): 339-344.
- Wang YZ, Kimbrough JW. 1992. Monographic studies of North American species of *Octospora* previously ascribed to *Lamprospora* (Pezizales, Ascomycetes). Special Publication no. 4, National Museum of Natural Science (Taiwan).
- Yakar S, Uzun Y, Çevik FT. 2019. New locality records for two hypogeous basidiomycete species in Turkey. Anatolian Journal of Botany, 3(1): 28-33.

Contribution to the Alien Flora of Turkey: *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae)

Kamil COŞKUNÇELEBİ¹, Salih TERZİOĞLU²

¹Karadeniz Technical University, Faculty of Science, Department of Biology, Trabzon, Turkey, ²Karadeniz Technical University, Faculty of Forestry, Department of Forest Botany, Trabzon, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0001-5713-6628>, ²<https://orcid.org/0000-0003-4146-3514>

✉: sterzi@ktu.edu.tr

ABSTRACT: During a few decades, rapidly increasing number of studies have documented about the spread and expansion of alien plant species all over the world. These species are either introduced intentionally or unintentionally outside of their natural ranges. *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae) introduced in Europe intentionally as garden and nectar-producing plant but later it was spread and became a highly invasive annual species in many parts of Europe. This species was collected from outside of gardens in two close localities in Giresun (Turkey). So, we reported it as a new alien vascular plant for the Flora of Turkey. As well, the description together with Turkish name and photographs of the taxon are presented in the present study.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 28.01.2021

Kabul Tarihi : 06.05.2021

Anahtar Kelimeler

Anatolia

Invasive species

New record

Türkiye'nin Yabancı Florasına Bir Katkı: *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae)

ÖZET: Yabancı bitki türlerinin dünya üzerindeki yayılış ve dağılımları artan sayıdaki çalışmalarla ortaya konmaktadır. Bu türler, kasıtlı veya kasıtsız olarak kendi doğal alanlarının dışına taşınırlar. *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae), kasıtlı olarak bahçe ve nektar üreten bitki olarak Avrupa'ya ulaştı, ancak daha sonra yayıldı ve Avrupa'nın birçok yerinde oldukça istilacı bir tür haline geldi. Bu türü, Giresun'da (Türkiye) birbirine yakın iki doğal habitattan topladık ve Türkiye Florası için yeni bir yabancı vasküler bitki olarak rapor ettik. Ayrıca bu makalede, taksonun Türkçe adı ve fotoğraflarıyla birlikte betimi verildi.

Research Article

Article History

Received : 28.01.2021

Accepted : 06.05.2021

Keywords

Anadolu

İstilacı tür

Yeni kayıt.

To Cite : Coşkunçelebi K, Terzioğlu S 2022. Contribution to the Alien Flora of Turkey: *Impatiens glandulifera* Royle (Balsaminaceae). KSU J. Agric Nat 25 (1): 78-82. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.870316>.

INTRODUCTION

Today, 3.9% (13168 species) of the plants in the world have naturalized outside their natural habitats as a result of human activity (van Kleunen et al., 2015). Increased introduction and movement of alien species were started by human activities around the planet since the 18th century (Emer et al., 2015). The number of alien species in Europe has increased by 76% in the last 40 years (CABI, 2021). Prolific seed production and high spread capability of alien species make them invasive outside their habitats. Unwary people around the world have contributed to move these taxa from their natural habitats to outside their native ranges. With its moderate climatic conditions (especially heavy rainfall and frequent mist throughout the year), NE Anatolia has hitherto hosted many of alien species (Terzioğlu and Anşın, 2001). Many people from this region of Turkey have stayed at different European countries, and spent their holidays in hometown, nearly every year. Both intentionally and unintentionally, these people have carried some seeds, bulbs or plants from Europe to

their localities. Although it is difficult and complex to explain the real factors of the naturalization process and the vectors of alien species, some ornamental plants were able to escape from gardens to natural and planted/naturalized habitats.

As a garden ornamental and nectar-producing plant, *Impatiens glandulifera* Royle (Himalayan balsam) was introduced into Europe from the Himalayas in the first half of the 19th century (Pyšek and Prach, 1995). It is included along with the 17 other terrestrial plant species in Europe's top 100 invasive species (DAISIE, 2010) and on the EPPO List of IAS since 2004 (Pacanoski and Saliji, 2014). It is reported as a highly invasive annual species spread in 18 European countries, North America and Russia (from northern regions to the Caucasus in the south) after its introduction as an ornamental (CABI, 2021; Pacanoski and Saliji, 2014; Cockel and Tannel, 2011; Tanner et al., 2013).

The genus *Impatiens* is represented with a native *I. noli-tangere* L. and many cultivars of *I. walleriana*

Hook. in Flora of Turkey (Güner, 2012). *I. glandulifera* is distributed as an invasive alien species in northern and western neighboring countries of Turkey (CABI, 2021), and has never been recorded from Turkey before.

MATERIAL and METHOD

Specimens were collected from Çamlıca village (Keşap/Giresun) in 2020. All specimens were labelled, numbered, annotated with the date of collection, the locality, and the name of the collector during the field studies. After identification, voucher specimens were deposited in both KATO (Karadeniz Technical University, Faculty of Forestry) and KTUB (Karadeniz Technical University, Faculty of Science, Department of Biology) Herbariums in Trabzon. Materials were collected from two close populations around the settlement areas and, coordinated by GPS (UTM 50 Datum) which were given below. This species was named in Turkish according to the guidelines of Menemen et al. (2013).

RESULTS and DISCUSSION

Impatiens glandulifera Royle, Ill. Pl. Himal. Mount. 151. t. 28, f. 2. (1834). (Figure 1)

Syn.: *I. glanduligera* Lindl., *I. macrochila* Lindl., *I. moschata* Edgew., *I. royleana* Payer, *I. roylei* Walp., *I. taprobanica* Hiern, *Balsamina glandulifera* (Royle) Ser., *B. macrochila* (Lindl.) Ser., *B. roylei* Hook. (TPL, 2021).

Annual, plant, robust, somewhat woody up to 2 m (-sometimes 3 m) in height, glabrous. Stem simple or rarely branching, hollow, green with a reddish tinge. Simple leaves opposite (upper ones verticillate, mostly by threes), wide up to 7 cm, 4-5 times longer than wide, ovate-lanceolate, base cuneate, glandular stipitate, petiole up to 5 cm. Sweetly scented flowers hermaphrodite, zygomorphic, peduncle 1 mm thick; calyx colored, central sepal enlarged and flaring, lateral sepals oblique-cordate, to 9 mm long, lower one saccate and abruptly ending in a 5-6 mm incurved spur; petals three, pinkish to purplish-red, often purple spotted, about 1.5 cm in length and 7 mm in width, central one widened. Fruits loculicide-fleshy capsule, clavate, up to 25 mm in length, nodding, slightly 5-angled. Seeds depressed, sub globose, 3 mm broad, pale grey-brown, ejected explosively. *Fl.*: July-August, *Fr.*: August-September, river banks, disturbed area.

Type: W. Himalayas, Kashmir.

Turkish Name: Himalaya Kınaçiçeği

Collected locality

A7 Giresun – Keşap district, Çamlıca village, edge of stream, 492 m, 12.08.2020, UTM: 0461015, 4515291, KATO 24449!, KTUB (Coşkunçelebi 1404a!); Same village, disturbed area, 579 m, 12.08.2020, UTM: 0460893, 4514718, KATO 24450!, KTUB (Coşkunçelebi 1404b!) (Figure 2).

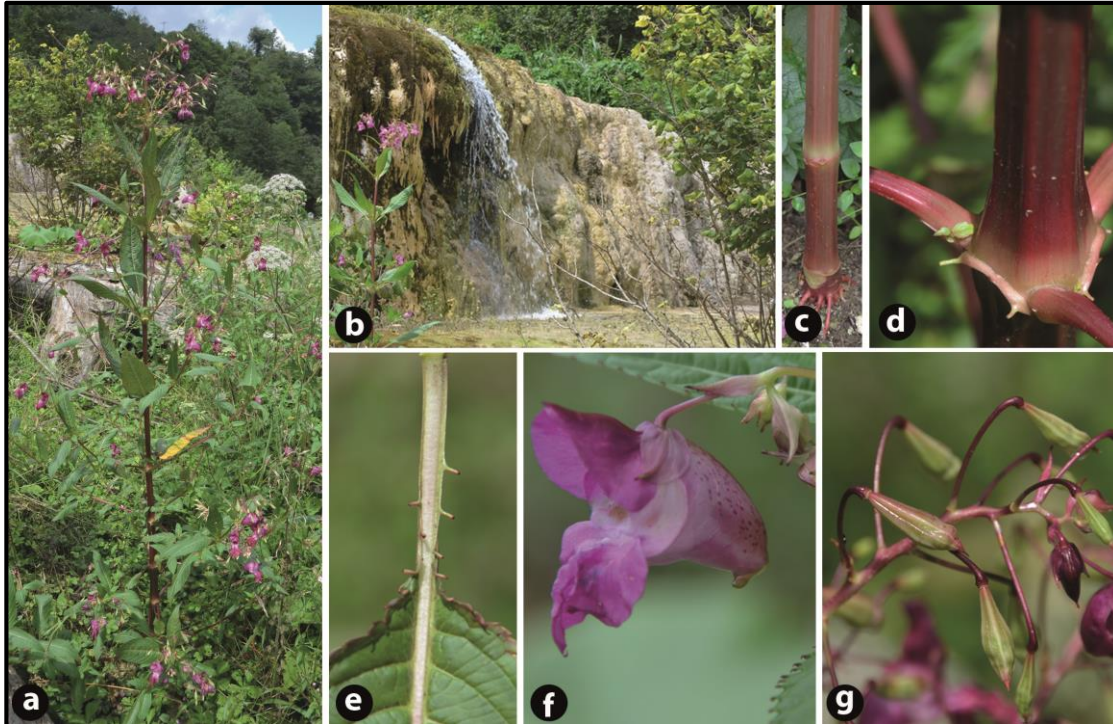


Figure 1. *Impatiens glandulifera*: **a**-Habit of plant, **b**-Habitat-edge of stream, **c**-Somewhat woody base of stem, **d**-Stem node with glandular stipules, **e**-Base of leaf and petiole, **f**-Flower-side view, **g**- Fruit.

Şekil 1. *Impatiens glandulifera*: **a**- Bitkinin habitusu, **b**-Akarsu kenarındaki habitat, **c**-Kısmen odunsu kök boğazı, **d**-Gövde nodunda salgı tüylü kulakçık, **e**- Yaprak tabanı ve yaprak sapı, **f**- Çiçeğin yan görünüşü, **g**-Meyve.

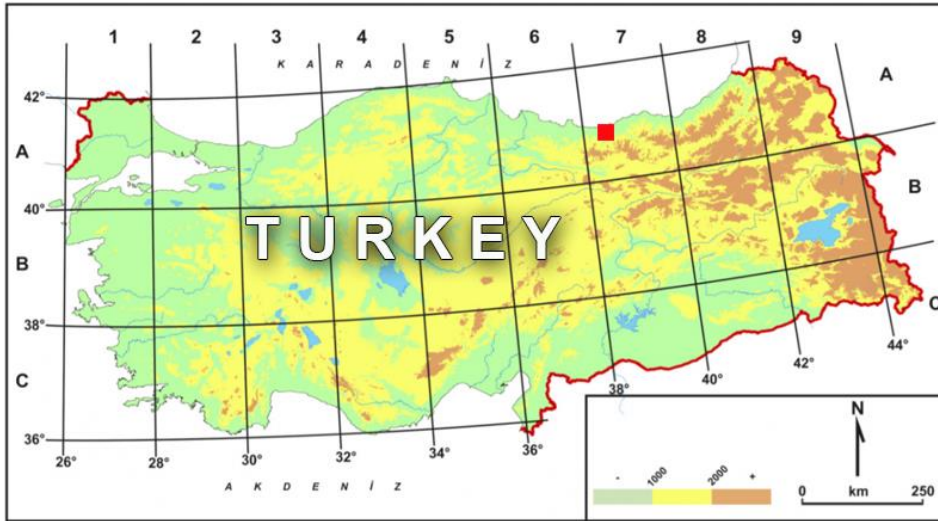


Figure 2. Distribution of *Impatiens glandulifera* (■) in Turkey (Adapted from Güner, 2014).

Şekil 2. *Impatiens glandulifera* (■)'nin Türkiye'deki yayılışı (Güner 2014'den uyarlanmıştır).

According to Uludağ et al. (2017), the number of alien plant species in Turkey is 340 however literature surveys show that the number is ca. 450. This study aimed to give one more new alien species, *Impatiens glandulifera*, for Turkish Flora. As strongly emphasized, it is an extreme invasive alien species in Europe (Schönfelder and Bresinsky, 1990; Perrins et al., 1990; Bohušová, 1992; Beerling and Perrins, 1993; Pacanoski and Saliji, 2014; CABI, 2021) and Canada (Clements et al., 2008). To date, a doubtful presence of this species reported without any herbaria, vouchers and locality information from Black Sea Region of Turkey by Aksoy and Uludağ (2016). At the same time, this species was not listed in the first comprehensive compilation and analysis of all available records on alien plant taxa in Turkey by Uludağ et al. (2017). So, this species was not recorded/published before based on any confirmed materials from Turkey.

The introduction of the species is the result of its use as decorative plant and as a source of nectar to pollinators including bumblebees, honeybees, moths, and wasps (Beerling and Perrins, 1993, Helmisaari, 2010; ISSG, 2021). Considering its main pathway, in order to prevent its introduction to new ecosystems, public awareness is extremely important. As a tallest annual plant species of Europe (Pyšek and Prach, 1995), its high holocellulose contented stems persist until spring season and suppress competing seedlings of natural taxa in the following spring (ISSG, 2021). Because of its general distribution in damp woodlands near streams (as its new location in Turkey), water is an important vector for dispersing diaspores of the species, and the lower altitudes are in risk of easy invasion. Furthermore, the capacity of an individual to produce 2500 seeds (Koenies and Glavac, 1979), the ability to explosive ejection of seeds up to 5 (Fitch, 1976; Clements et al., 2008), a seed

rain of up to 6000 seeds/m² (Beerling and Perrins, 1993) and its ability surviving longer than a year (Perrins et al., 1990) extremely increase the invasion capacity of *I. glandulifera*. Though its young shoots are sensitive to frost (Beerling, 1993), the rapid growth rate of both its seedlings and young individuals (Koenies and Glavac, 1979) result shading other plants living in close vicinity of this tallest annual species.

During the field studies an ongoing project of "Addressing of Invasive Alien Species Threats in Terrestrial Areas and Inland Waters in Turkey", *I. glandulifera* was detected soon after its introduction to Anatolian ecosystems with the present study. It has already been known only from two close vicinities in Çamlıdere village, Keşap (Giresun) in NE Anatolian ecosystem where the populations are very sparse. Thus, it is easy to control its spreading and eradicate it from Turkey.

The best way in order to manage the *I. glandulifera*'s dispersal is to prevent flowering and the formation and spread of the seeds (Shaw, 2003). For this, mechanical eradication is quite easy due to the modest root system of the species (Pacanoski and Saliji, 2014), and effective especially before than seed ripen. In the one hand, sheep and cattle grazing is reported as a good method to manage this species (Larsson and Martinsson, 1998) on the other hand grazing helps the explosive ejection of the seed which helps its invasion. The rust, *Puccinia komarovii* Tranzschel ex P.Syd. & Syd. var. *glanduliferae* R.A. Tanner, C.A. Ellison, L. Kiss & H.C. Evans, is reported as a classical biological control agent for *I. glandulifera* in its invasive ranges and this rust negatively impacts on the growth of infected plants (Tanner et al., 2015; Varia et al., 2016). As well, Glyphosate application is effective against *I. glandulifera* (Stensones and Garnett, 1994). All the

methods above should be used for controlling this species in its different invasion steps, but in its small Turkish populations we strictly recommend the mechanical eradication.

ACKNOWLEDGEMENT

Authors want to express their special thanks to EU funding (139606/IH/SER/TR) for financial supports.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

Author has declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Aksoy N, Uludağ A 2016. New records and distribution of vascular plants alien to northern regions of Turkey. Book of abstracts of the 2nd Croatian Symposium on Invasive Species with International Participation, 21-22 November 2016, Zagreb, Croatia: 49.
- Beerling DJ 1993. The impact of temperature on the northern distribution limits of the introduced species, *Fallopia japonica* and *Impatiens glandulifera*. *Journal of Biogeography* 20: 45-53.
- Beerling DJ, Perrins JM 1993. Biological flora of the British Isles. *Impatiens glandulifera* Royle (*Impatiens roylei* Walp). *Journal of Ecology* 81: 367-382.
- Bohušová K 1992. The spread of *Impatiens glandulifera* Royle in the territory of Slovakia. *Bulletin Slovenskej Botanickéj Spoločnosti*, 14: 7-15 (in Slovak with English summary).
- CABI, 2021. <https://www.cabi.org/isc/datasheet/28766> (available; 23.01.2021).
- Clements DR, Feenstra KR, Jones K, Staniforth R 2008. The Biology of Invasive Alien Plants in Canada. 9. *Impatiens glandulifera* Royle. *Canadian Journal of Plant Science* 88: 403-417.
- Cockel CP, Tanner RA 2011. *Impatiens glandulifera* Royle (Himalayan balsam). In: Francis RA. editor. *A Handbook of Global Freshwater Invasive Species*. Earthscan: London, UK. pp. 67-77.
- DAISIE, 2010. European Invasive Alien Species Gateway. *Impatiens glandulifera*. Available from: http://www.europe-aliens.org/species/Factsheet.do?species_Id=17367# (Accessed: 22 January 2021).
- Emer C, Vaughan IP, Hiscock S, Memmott J 2015. The Impact of the Invasive Alien Plant, *Impatiens glandulifera*, on Pollen Transfer Networks. *PLoS One*, 10(12): e0143532.
- Fitch IC 1976. Dispersal of Himalayan balsam, *Impatiens glandulifera*. *North Western Natur.*, 13.
- Güner A 2012. Balsaminaceae. In: Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M. & Babaç, MT (Eds.). *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler)*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği, Yayın No: 1, İstanbul.
- Helmisaari H 2010. NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Impatiens glandulifera*. Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS. <https://www.noban.is.org/> (Accessed 23 January 2021).
- ISSG 2021. <http://www.iucngisd.org/gisd/species.php?sc=942> (Accessed: 23 January 2021).
- Koenies H, Glavac V 1979. The ability of *Impatiens glandulifera* to compete on the banks of the River Fulda near Kassel, West Germany. *Philippia* 4, 47-9.
- Larsson C, Martinsson K 1998. Jättebalsamin *Impatiens glandulifera* i Sverige: invasionsart eller farligt trädgårtsflykting? *Svensk Botanisk Tidskrift* 92: 329-345.
- Menemen Y, Aytaç Z, Kandemir A 2013. Türkçe Bilimsel Bitki Adları Yönergesi. *Bağbahçe* 47: 28-31.
- Pacanoski Z, Saliji A 2014. The invasive *Impatiens glandulifera* Royle (Himalayan balsam) in the Republic of Macedonia: first record and forecast. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 44 (1): 87-93.
- Perrins J, Fitter A, Williamson M 1990. What makes *Impatiens glandulifera* invasive? In *The biology and control of invasive plants*, ed. J. Palmer. University of Wales, Cardiff, pp. 8-33.
- Pyšek P, Prach K 1995. Invasion dynamics of *Impatiens glandulifera* – a century of spreading reconstructed. *Biological Conservation* 74: 41-48.
- Schönfelder P, Bresinsky A 1990. *Verbreitungsatlas der Farn- und Blatnpflanzen Bayerns*. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Shaw RH 2003. Biological control of invasive weeds in the UK: opportunities and challenges. In: Child LE, Brock JH, Brundu G, Prach K, Pysek P, Wade PM & Williamson M (eds.). *Plant invasions: Ecological Threats and Management Solutions*, pp. 337-354. Backhuys Publisher, Leiden (NL).
- Stenones A, Garnett RP 1994. Controlling invasive weeds using glyphosate. In: de Waal LC et al. (eds.). *Ecology and Management of Invasive Riverside Plants*. pp. 183-188. John Wiley & Sons, Chichester (GB).
- Tanner RA, Pollard KM, Varia S, Evans HC, Ellison CA 2015. First release of a fungal classical biocontrol agent against an invasive alien weed in Europe: biology of the rust, *Puccinia komarovii* var. *glanduliferae*. *Plant Pathology* 64: 1130-1139.
- Tanner RA, Varia S, Eschen R, Wood S, Murphy ST, Gange AC 2013. Impacts of an Invasive Non-Native Annual Weed, *Impatiens glandulifera*, on Above- and Below-Ground Invertebrate Communities in the United Kingdom. *PlosOne* 8(6): e67271.
- Terzioğlu S, Anşın R 2001. A Chorological Study on

- Taxa Naturalized in The Eastern Black Sea Region. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 25: 305-309.
- TPL 2021. The Plant List. Retrieved in January, 21, 2021 from [http:// www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2862533](http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2862533) (Accessed: 20 January 2021).
- Uludağ A, Aksoy N, Yazlık A, Arslan ZF, Yazmış E, Üremiş İ, Cossu TA, Groom Q, Pergl J, Pyšek P, Brundu G 2017. Alien flora of Turkey: Checklist, taxonomic composition and ecological attributes. *NeoBiota* 35:61-85.
- van Kleunen M, Dawson W, Essl F, Pergl J, Winter M, Weber E, Kreft H, Weigelt P, Kartesz J, Nishino M, Antonova AL, Barcelona JF, Cabezas FJ, Ca'rdenas D, Ca'rdenas-Toro J, Castan˜o N, Chaco'n E, Chatelain C, Ebel AL, Figueiredo E, Fuentes N, Groom QJ, Henderson L, Inderjit, Kupriyanov A, Masciadri S, Meerman J, Morozova O, Moser D, Nickrent DL, Patzelt A, Pelter PB, Baptiste MP, Poopath M, Schulze M, Seebens H, Shu W, Thomas J, Velayos M, Wieringa JJ, Pys'ek P 2015. Global exchange and accumulation of non-native plants. *Nature* 525(7567):100–103.
- Varia S, Polard K, Ellison C, CABI UK, Lane B, Surrey E 2016. Implementing Novel Weed Management Approach for Himalayan Balsam: Progress on Biological Control in the UK. *Outlooks on Pest Management* 27(5):198-203.

Biological Activities of Wild Poisonous Mushroom *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm (Boletales)

Celal BAL¹, Hayri BABA², Ilgaz AKATA³, Mustafa SEVINDIK⁴, Zeliha SELAMOĞLU⁵, Hasan AKGÜL⁶

¹Gaziantep University, Oğuzeli Vocational School, Gaziantep, Turkey, ²Hatay Mustafa Kemal University, Faculty of Science and Literature, Department of Biology, Hatay, Turkey, ³Ankara University, Science Faculty Department, Biology, Ankara, Turkey, ⁴Department of Food Processing, Bahçe Vocational School, Osmaniye Korkut Ata University, Osmaniye, Turkey, ⁵Nigde Ömer Halisdemir University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biology, Nigde, Turkey, ⁶Akdeniz University, Science Faculty, Biology Department, Antalya, Turkey.

¹<https://orcid.org/0000-0001-6856-3254>, ²<https://orcid.org/0000-0002-1837-4321>, ³<https://orcid.org/0000-0002-1731-1302>

⁴<https://orcid.org/0000-0001-7223-2220>, ⁵<https://orcid.org/0000-0001-9056-6435>, ⁶<https://orcid.org/0000-0001-8514-9776>

✉: bal@gantep.edu.tr

ABSTRACT

In many studies conducted in recent years, it has been found that the beneficial natural ingredients found in mushrooms are very important in curing various diseases and eliminating disease factors. It has been reported that fungi that spread in different countries have biological activities. In this study, antioxidant level (TAS), oxidant level (TOS), and antibacterial and antifungal activity of *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm were determined. Ethanol extract of the mushroom was extracted in a Soxhlet apparatus. Antioxidant and oxidant levels were determined using Rel Assay TAS and TOS kits. Also, antimicrobial activity was tested against bacterial and fungal strains using the agar dilution method. As a result of the studies, the TAS value of the mushroom was determined 2.64±0.15, the TOS value was 6.58±0.23, and the OSI (Oxidative stress index) value was 0.25±0.02. In addition, it was determined that the ethanol extract of the mushroom was effective against bacteria at 200 and 400 µg/mL, and against fungi at 50 µg/mL concentrations. As a result, it was determined that *E. sinuatum* is a natural antioxidant and antimicrobial agent.

Research Article

Article History

Received : 14.02.2021

Accepted : 06.05.2021

Keywords

Antibacterial
Antifungal
Antioxidant
Entoloma sinuatum,
Medicinal mushroom

Yabani Zehirli Mantar *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm 'un (Boletales) Biyolojik Aktiviteleri

ÖZET

Son yıllarda yapılan birçok çalışmada mantarlarda bulunan faydalı doğal bileşenlerin çeşitli hastalıkları iyileştirmede ve hastalık etkenini ortadan kaldırmada çok önemli olduğu bulunmuştur. Farklı ülkelerde yayılış gösteren mantarların biyolojik aktivitelerinin olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada Türkiye'de *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm'un antioksidan seviyesi, oksidan seviyesi ve antimikrobiyal aktivitesi belirlendi. Mantarın etanol özütü soxhlet cihazında çıkarıldı. Antioksidan ve oksidan seviyeleri Rel Assay TAS ve TOS kitleri kullanılarak belirlendi. Ayrıca antibakteriyel ve antifungal aktivite agar dilüsyon metodu kullanılarak bakteri ve fungus suşlarına karşı test edildi. Yapılan çalışmalar sonucunda mantarın TAS değeri 2.64±0.15, TOS değeri 6.58±0.23 ve OSI (Oksidatif stres indeksi) değeri 0.25±0.02 olarak belirlendi. Ayrıca mantarın etanol özütünün bakterilere karşı 200 ve 400 µg/mL, funguslara karşı 50 µg/mL konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlendi. Sonuç olarak *E. sinuatum*'un doğal antioksidan ve antimikrobiyal ajan olduğu belirlendi.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 14.02.2021

Kabul Tarihi : 06.05.2021

Anahtar Kelimeler

Antibakteriyel
Antifungal
Antioksidan
Entoloma sinuatum
Tıbbi mantarlar

To Cite : Bal C, Baba H, Akata I, Sevindik M, Selamoğlu Z, Akgül H 2022. Biological Activities of Wild Poisonous Mushroom *Entoloma sinuatum* (Boletales). KSU J. Agric Nat 25 (1): 83-87. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.880151>.

INTRODUCTION

In terms of nutritional values of mushrooms, it has been utilized in the treatment of cancer, cholesterol-

lowering, stress, insomnia, asthma, allergies, and diabetes, and it has been included in studies that it is effective. Besides, mushrooms contain various

secondary metabolites, including phenolic compounds, polyketides, terpenes, and steroids that act as antioxidants (Ahmed et al., 2015; İnci and Kirbağ, 2018; Krupodorova and Sevindik, 2020). In studies on natural mushrooms in different parts of the world, it has been reported that mushrooms have different biological activities such as antioxidant, antimicrobial, anticancer, antitumor, antiproliferative, anti-inflamatuvar, DNA protective, anti-aging, and antiallergic (Bae et al., 2007; Bal et al., 2017; Garcia-Lafuentea, et al., 2010; Osman and Toliba, 2019; Sevindik et al., 2017; Zhang et al., 2019; Umaña et al., 2020). In this context, the discovery of new natural products has been inevitable, especially in recent years, due to the interest of people in natural products and the possible side effects of synthetic drugs. In this study, wild poisonous mushroom *Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm was used as a material.

E. sinuatum (livid entoloma, livid agaric, livid pinkgill, leaden entoloma, and lead poisoner) is a poisonous fungus that has been detected in many regions of the world. Fruiting bodies of the mushroom appear in late summer and autumn (Zeitlmayr, 1976). It is seen in deciduous woodlands covered with clay and calcareous soils, usually Oak and Beech, rarely in birch or in nearby park areas. Sometimes it meets in the form of a fairy ring. It can be seen alone or in groups and most members of the genus are saprotrophic. In young form, it can be mixed with the edible *Calocybe gambosa* or *Clitopilus prunulus*. Also, an ordinary observer might confuse *E. sinuatum* with the meadow mushroom *Agaricus campestris* (Lamaison and Polese, 2005). For this reason, it has played a leading role in many mushroom poisoning cases in Europe. *E. sinuatum* poisoning is generally not fatal. Following consumption of mushrooms, the gastrointestinal syndrome is observed. Depression and delirium are rare sequelae (Bastida et al., 1987). In this study, the antioxidant, oxidant, and antimicrobial activities of wild poisonous mushroom *E. sinuatum* were determined.

MATERIALS and METHODS

Sample extraction

Mushroom samples were collected from the Belgrad forest (41°10'56.63"N- 28°59'5.91"E, 145m) (Istanbul/Turkey). After the samples were collected, they were dried in a dryer (Profilo, PFD2350W) for about 12 hours at 45 °C and 10 g of each mushroom sample was taken and ground into powder (WANXINGBO, Grinder). Powder samples were extracted with 200 mL of ethanol for 6 h in the Soxhlet apparatus then obtained by filtration through filter paper (ISOLAB, 125mm) and the solvent was removed on a rotary evaporator (Heidolph Laborota 4000 Rotary Evaporator) at 40 °C. Crude extracts were stored at + 4 °C until further conducting experiments.

Antibacterial activities

The antimicrobial activity tests of ethanol extract of the mushroom sample were determined by the agar dilution method. The lowest concentration of the extract preventing the growth of microorganisms was determined as the MIC (Minimum Inhibitor Concentration) value. Extract concentrations were set at 6.25 to 800 µg/mL in distilled water (CLSI, 2002; CLSI, 2003). *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) were used as test bacteria. Bacteria were pre-cultured in Muller Hinton Broth medium. Amikacin, Ampicillin, and Ciprofloxacin were used as positive controls (Hindler et al., 1992).

Antifungal activities

Candida albicans (ATCC 10231) and *C. tropicalis* (ATCC 13803) were used as test fungi. Fungi were pre-cultured in RPMI 1640 Broth medium. Fluconazole and Amphotericin B were used as positive controls (Hindler et al., 1992).

Antioxidant activities

The total antioxidant status, total oxidant status, and oxidative stress index of ethanol extracts of mushrooms were evaluated using Rel Assay TAS and TOS kits. Trolox was utilized as a calibrator in antioxidant studies. Hydrogen peroxide was used as a calibrator in oxidant studies (Erel, 2004; Erel, 2005). The OSI (Oxidative stress index) value is determined by proportioning the TAS value to the TOS value. The following formula was used for the OSI value (Sevindik, 2018).

RESULTS and DISCUSSION

Antibacterial and Antifungal activities

Antibacterial and antifungal drugs used today are inadequate due to the antibiotic resistance that microorganisms have gained in recent years. Moreover, people turned to natural products due to the possible side effects of antibacterial and antifungal drugs (Liu et al., 2017; Abdalla et al., 2020). This trend has made the discovery of new antibacterial and antifungal natural products. In this study, the antibacterial and antifungal activities of the ethanol extract of *E. sinuatum* was determined. The findings obtained were shown in Table1.

In previous studies on *Entoloma* species, the methanol extract of *Entoloma speculum* was reported to be effective against *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Klebsiella pneumonia*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptomyces pneumoneae*, *Candida albicans*,

Chrysosporium merdarium, *Trichophyton rubrum*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Fusarium solani*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus flavus* and *A. niger* in different concentrations (Kodiyalmath and Krishnappa, 2018). In another study, ethanol extract of *Entoloma nubigenum* was reported to be effective against *Bacillus subtilis*, *Escherichia faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Penicillium notatum*, and *Ceratocystis pilifera* (Reinoso et al., 2013). In our study, the antibacterial and antifungal activities of

ethanol extract of *E. sinuatum* was determined. As a result of this, it has been determined to be effective against *S. aureus* and *P. aeruginosa* in 400 µg/mL concentration, *E. faecalis* and *E. coli* at 200 µg/mL concentration, *C. albicans* and *C. tropicalis* at 50 µg/mL concentration. In other words, the antifungal activity of the mushroom extract appears to be higher. It was also determined that the fungus can be used as a natural antibacterial and antifungal source.

Table 1. Antibacterial and antifungal activities of ethanol extract of *E. sinuatum*

Çizelge 1. *E. sinuatum*'un etanol ekstresinin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri

| Sample | Antibacterial (µg/mL) | | | | Antifungal (µg/mL) | |
|--------------------------|-----------------------|--------------------|----------------|----------------------|--------------------|----------------------|
| | <i>S. aureus</i> | <i>E. faecalis</i> | <i>E. coli</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>C. albicans</i> | <i>C. tropicalis</i> |
| <i>Entoloma sinuatum</i> | 400 | 200 | 200 | 400 | 50 | 50 |
| Flukonazole | - | - | - | - | 1.56 | 3.12 |
| Ampicillin | 3.12 | 1.56 | 3.12 | - | - | - |
| Ciprofloxacin | 0.78 | 0.78 | 1.56 | 3.12 | - | - |

Antioxidant activities

Antioxidant compounds are found in many natural products including mushrooms that spread in many different ecosystems. Mushrooms are very vital sources of antioxidants with their numerous antioxidant-effective enzymes and phenolic compounds (Lu et al., 2018; İnci et al., 2019).

Table 2. TAS, TOS and OSI Values of ethanol extract of *E. sinuatum*

Çizelge 2. *E. sinuatum*'un etanol ekstresinin TAS, TOS ve OSI Değerleri

| Sample | TAS (mmol/L) | TOS (µmol/L) | OSI |
|--------------------|--------------|--------------|-----------|
| <i>E. sinuatum</i> | 2.64±0.15 | 6.58±0.23 | 0.25±0.02 |

Values are presented as mean±S.D

Many studies have shown that mushrooms have high antioxidant activities. The total antioxidant and total oxidant status of used in our study were determined for the first time. In previous TAS and TOS studies on wild mushrooms, TAS value of *Tricholoma virgatum* was reported as 3.754, TOS value was 8.362 and OSI value was 0.223 (Selamoğlu et al., 2020). The TAS value of *Cerioporus varius* was reported as 2.312, TOS value was 14.358 and OSI value was 0.627 (Sevindik, 2019). TAS value of *Suillus granulatus* was reported as 3.143, TOS value was 18.933 and OSI value was 0.603 (Mushtaq et al., 2020). The TAS value of *Lactifluus rugatus* was reported as 3.237, the TOS value was 8.178 and the OSI value was 0.254 (Sevindik, 2020). The TAS value of *Infundibulicybe geotropa* was reported as 1.854, TOS value was 30.385 and OSI value was 1.639 (Sevindik et al., 2020). The TAS value of *Lepista nuda* was reported as 3.102, the TOS value was 36.920, and the OSI value was 1.190 (Bal et al., 2019). Compared to these studies, the TAS value of *E. sinuatum* was found to be higher than *I. geotropa* and

C. varius, lower than *L. rugatus*, *L. nuda*, *S. granulatus* and *T. virgatum*. TAS value shows the whole of the antioxidant compounds produced within the mushroom (Krupodorova and Sevindik, 2020). The difference in TAS values determined in studies on different mushrooms draws attention. The difference in TAS value between species is due to the difference in the potential of fungi to produce compounds with antioxidant properties.

When TOS values were examined, *E. sinuatum* was determined to be lower than *C. varius*, *L. rugatus*, *I. geotropa*, *L. nuda* and *T. virgatum*. The TOS value indicates the whole of the oxidant compounds produced by the fungus as a result of environmental effects metabolic activities (Krupodorova and Sevindik, 2020). TOS value of *E. sinuatum* used in our study was generally found to be low. In addition, the OSI value shows how much the oxidant compounds produced in the mushroom's body are suppressed by the endogenous antioxidants (Krupodorova and Sevindik, 2020). *E. sinuatum* suppressed better than *I. geotropa*, *L. rugatus*, *S. granulatus*, *L. nuda*, and *C. varius*, less than *T. virgatum*. Determining the oxidative stress index is important in determining the antioxidant potential of the mushroom. The OSI value shows the success of suppressing the oxidant compounds produced by the fungus by the antioxidant defence system. In this context, it is seen that the antioxidant defence system of *E. sinuatum* is successful in suppressing oxidant compounds. As a result, it was determined that *E. sinuatum* has antioxidant potential.

CONCLUSION

In this study, the antioxidant, oxidant, and antimicrobial potential of wild poisonous mushroom *E. sinuatum* was determined. As a result, it was found that the antioxidant potential of the mushroom was at

normal levels. It was also found that the oxidant level was low, yet, fungi were more effective against fungi. Besides, it was determined that *E. sinuatum* could be a natural antioxidant and antimicrobial source.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thanks to Osmaniye Korkut Ata University, Central Research Laboratory for their support.

Researchers Contribution Rate Declaration Summary

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

Conflicts of Interest Statement

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

REFERENCES

- Abdalla SSI, Katas H, Chan JY, Ganasan P, Azmi F, Busra MFM 2020. Antimicrobial activity of multifaceted lactoferrin or graphene oxide functionalized silver nanocomposites biosynthesized using mushroom waste and chitosan. RSC Advances 10(9): 4969-4983.
- Ahmed, A, Kamran Taj M, Yongliang Z, Taj I, Hassani MT, Sajid M, Ahmed Z, Ullah AU, Menga MA, Liping, S 2015. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Eight Wild Edible Boletaceae Mushrooms Growing in Yunnan Province of China. Jökull Journal 65(12): 146-167.
- Bae MJ, Kim KJ, Kim SJ, Ye EJ 2007. Effect of mycelia extracts from *Lentinus edodes* mushroom-cultured *Astragalus membranaceus* Bunge on anti-cancer and anti-allergy activities. J Korean Soc Food Sci Nutr 36(1): 8-13.
- Bal C, Akgul H, Sevindik M, Akata I, Yumrutas O 2017. Determination of the anti-oxidative activities of six mushrooms. Fresenius Environ Bull 26(10): 6246-6252.
- Bal C, Sevindik M, Akgul H, Selamoglu Z 2019. Oxidative stress index and antioxidant capacity of *Lepista nuda* collected from Gaziantep/Turkey. Sigma, 37(1): 1-5.
- Bastida J, Viladomat F, Llabrés JM, Codina C 1987. Screening of higher fungi from Catalonia for alkaloids-II. Int J Crude Drug Res 25(3): 129-132.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2002. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Second Edition. NCCLS document M27-A2 (ISBN 1-56238-469-4). NCCLS Pennsylvania USA.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Seventh Edition, CLSI Document M7-A7, Pennsylvania USA.
- Erel O 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin biochem 37(4): 277-285.
- Erel O 2005. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. Clin biochem 38(12): 1103-1111.
- Garcia-Lafuentea A, Moro C, Villares A, Guillamon E, Rostagno MA, D'Arrigo M, Alfredo Martinez J 2010. Mushrooms as a source of anti-inflammatory agents. Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem 9(2): 125-141.
- Hindler J, Hochstein L, Howell A 1992. Preparation of routine media and reagents used in antimicrobial susceptibility testing. Part 1. McFarland standards, p. 5.19.1-5.19.6. In H. D. Isenberg (ed) Clinical microbiology procedures handbook, vol. 1. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- İnci Ş, Kırbağ S 2018. *Terfezia clavaryi* Chatin'in besinsel içeriği, antioksidan ve antimikrobiyal aktivitesi. Artvin Çoruh Univ Orman Fak Derg 19(2): 138-143.
- İnci Ş, Kadioğlu Dalkılıç L, Dalkılıç S, Kırbağ S 2019. *Helvella leucomelaena* (Pers.) Nannf.'in antimikrobiyal ve antioksidan Etkisi. Artvin Çoruh Univ Orman Fak Derg 20(2): 249-253.
- Kodiyalmath JK, Krishnappa M 2018. Evaluation of Antimicrobial Activity of Mycelia and Sporocarp of *Entoloma speculum*. Int J Pharm Sci Res 9(3): 1237-1241.
- Krupodorova T, Sevindik M 2020. Antioxidant Potential and Some Mineral Contents of Wild Edible Mushroom *Ramaria stricta*. AgroLife Sci J 9(1): 186-191
- Lamaison JL, Polese JM 2005. The Great Encyclopedia of Mushrooms. Königswinter, Germany: Könenmann. p. 116.
- Liu K, Xiao X, Wang J, Chen CYO, Hu H 2017. Polyphenolic composition and antioxidant, antiproliferative, and antimicrobial activities of mushroom *Inonotus sanghuang*. LWT-Food Sci Tech 82: 154-161.
- Lu X, Brennan MA, Serventi L, Liu J, Guan W, Brennan CS 2018. Addition of mushroom powder to pasta enhances the antioxidant content and modulates the predictive glycaemic response of pasta. Food Chem 264: 199-209.
- Mushtaq W, Baba H, Akata I, Sevindik M 2020. Antioxidant potential and element contents of wild edible mushroom *Suillus granulatus*. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 23(3): 592-595.
- Osman A, Toliba AO 2019. Hepatoprotective Effects of Crude Phenolic-rich Extract from Oyster Mushroom (*Pleurotus ostreatus*). Egypt J Food Sci 47(1): 157-164.
- Reinoso R, Cajas-Madriaga D, Martinez M, San Martin A, Perez C, Fajardo V, Becerra J 2013. Biological

- activity of macromycetes isolated from Chilean subantarctic ecosystems. *J Chil Chem Soc* 58(4): 2016-2019.
- Selamoglu Z, Sevindik M, Bal C, Ozaltun B, Sen İ, Pasdaran A 2020. Antioxidant, antimicrobial and DNA protection activities of phenolic content of *Tricholoma virgatum* (Fr.) P. Kumm. *Biointerface Res. Appl Chem* 10(3): 5500-5506
- Sevindik M 2018. Investigation of antioxidant/oxidant status and antimicrobial activities of *Lentinus tigrinus*. *Adv Pharmacol Sci* 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1718025>
- Sevindik M 2019. The novel biological tests on various extracts of *Cerioporus varius*. *Fresenius Environ Bull* 28(5): 3713-3717.
- Sevindik M 2020. Antioxidant and antimicrobial capacity of *Lactifluus rugatus* and its antiproliferative activity on A549 cells. *Indian J Tradit Know* 19(2): 423-427.
- Sevindik M, Akgul H, Bal C, Selamoglu Z 2018. Phenolic contents, oxidant/antioxidant potential and heavy metal levels in *Cyclocybe cylindracea*. *Indian J Pharm Educ Res* 52(3): 437-441.
- Sevindik M, Akgul H, Selamoglu Z, Braidly N 2020. Antioxidant and antigenotoxic potential of *Infundibulicybe geotropa* mushroom collected from Northwestern Turkey. *Oxid Med Cell Longev* 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5620484>
- Umaña M, Eim V, Garau C, Rosselló C, Simal S 2020. Ultrasound-assisted extraction of ergosterol and antioxidant components from mushroom by-products and the attainment of a β -glucan rich residue. *Food Chem* 332: 127390.
- Zeitlmayr L 1976. *Wild Mushrooms: An Illustrated Handbook*. Hertfordshire, UK: Garden City Press. p. 80.
- Zhang J, Zhang J, Zhao L, Shui X, Wang LA, Wu Y 2019. Antioxidant and anti-aging activities of ethyl acetate extract of the coral tooth mushroom, *Hericium coralloides* (Agaricomycetes). *Int J Med Mushrooms* 21(6): 561-570.

Seed Morpho-Anatomical Characters of Some *Cardamine* taxa from Turkey

Mehmet Cengiz KARAIŞMAILOĞLU¹*

¹Siirt University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Siirt, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0002-6856-2742>

✉: cengiz.karaismailoglu@siirt.edu.tr

ABSTRACT

This manuscript includes morphological and anatomical characters of seeds of 7 taxa of *Cardamine* genus from Turkey and the importance of these characteristics from a systematic perspective. The outcomes demonstrate that the taxa vary in terms of seed shape and dimension. The seed dimension varies between 0.91 mm and 2.20 mm in length and between 0.41 mm and 1.65 mm in width, *Cardamine graeca* having the biggest and *C. tenera* having the smallest seeds. The seed surface ornamentation is categorized into five types: reticulate-alveolate, scalariform, reticulate, foveate and reticulate-foveate. The most common type is scalariform and reticulate, however; foveate, reticulate-foveate and reticulate-alveolate ornamentation types have been noticed to be taxon-specific. The testa is mostly occurred with 3 layers: the outer epidermis, the inner epidermis, and the parenchyma layer. However, *C. tenera* and *C. graeca* taxa have an additional inner testa layer under the outer testa. The shapes and thicknesses of the outer epidermis and the inner epidermis, presence of the inner testa and the parenchyma layer are very important characteristics that disclose inter-specific relations within the studied species. Moreover, a key is offered for the identification of the studied taxa based on seed characters.

Research Article

Article History

Received : 18.02.2021
Accepted : 07.05.2021

Keywords

Anatomy
Cardamine
Seed
Turkey
UPGMA

Türkiye'den Bazı *Cardamine* Taksonlarının Tohum Morfo-Anatomik Karakterleri

ÖZET

Bu makale Türkiye'den *Cardamine* cinsinin 7 taksonunun tohumlarının morfolojik ve anatomik karakterlerini ve bu karakterlerin sistematik bir bakış açısıyla önemini içermektedir. Sonuçlar taksonların tohum şekli ve boyut açısından farklı olduğunu göstermiştir. Tohum boyutları boyda 0.91 mm ile 2.20 mm ve ende 0.41 mm ile 1.65 mm arasında değişmiş, *Cardamine graeca* en büyük tohumlara, *C. tenera* ise en küçük tohumlara sahiptir. Tohum yüzey ornamentasyonu beş tipe ayrılır: retikulat-alveolat, scalariform, retikulat, foveat and retikulat-foveat. En yaygın tip scalariform ve retikulattır, buna karşın; foveat, retikulat-foveat ve retikulat-alveolat ornamentasyon tiplerinin taksona özgü olduğu not edilmiştir. Testa çoğunlukla 3 katmanla oluşmuştur: dış epidermis, iç epidermis ve parenkima katmanı. Bununla birlikte, *C. tenera* ve *C. graeca* taksonlarının dış testa altında ek bir iç testa tabakası vardır. Dış epidermis ve iç epidermisin şekilleri ve kalınlıkları, iç testa varlığı ve parenkima tabakası incelenen türler arası ilişkileri ortaya koyan çok önemli özelliklerdir. Ayrıca, incelenen taksonların tohum karakterlerine göre tanımlanması için bir anahtar sunulmuştur.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 18.02.2021
Kabul Tarihi : 07.05.2021

Anahtar Kelimeler

Anatomi
Cardamine
Tohum
Türkiye
UPGMA

To Cite: Karaismailoğlu MC 2022. Seed Morpho-Anatomical Characters of Some *Cardamine* taxa from Turkey. KSU J. Agric Nat 25 (1): 88-99. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.882821>.

INTRODUCTION

The family Brassicaceae is one of the greatest flowering plant families containing economic importance includes more than 340 genera and 3350

species the world (Al-Shehbaz, 1988; Karaismailoğlu, 2017). Taxa in this family are placed in worldwide, particularly in the North temperate areas and Southwestern and Central Asia. The family has 85 genera and 458 taxa in Turkey (Al-Shehbaz, 2012).

The genus *Cardamine* L. is taxonomically problematic, widespread genus with over 200 Arctic, alpine, and boreal taxa, and is one of the largest genera of the family in terms of number of species (Hewson, 1982; Al-Shehbaz, 1988; Webb et al., 1988; Al-Shehbaz et al., 2006; Carlsen et al., 2009). The number of acknowledged species differs noticeably among various researchers, because of the taxonomic complexity of the genus (Carlsen et al., 2009). As a result of the performed some studies such as Schulz (1903), Al-Shehbaz (1988) and Carlsen et al. (2009), it has been seen that the diversity center of the genus is Eurasia. Genus has about 95 species in Eurasian, 48 species in China and 25 species in Europe involving the Caucasus (Carlsen et al., 2009). Some species of the genus are widely distributed, for example *C. hirsuta* L., *C. flexuosa* With., *C. parviflora* L. and *C. impatiens* L. The new taxa have been discovered since the first revision of the genus (Schulz, 1903); however, species restriction is impractical and the total number of species in *Cardamine* is still controversial (Carlsen et al., 2009). The first sectional division of genus (Schulz, 1903) has been condemned by some researchers for over-emphasis some morphological features (Al-Shehbaz, 1988; Rashid & Ohba, 1993; Carlsen et al., 2009). Some species in *Cardamine* have been analyzed widely with cytological and molecular markers (Lihova et al., 2000, 2003, 2004; Carlsen et al., 2009; Kučera et al., 2010; Karaismailoğlu, 2021). However, the taxonomic usability of the detailed morphological and anatomical characters in the genus has been ignored so far.

The seed coat features are known as important characteristics in taxonomical investigations of the Brassicaceae family (Karaismailoğlu & Erol, 2018). It

is mainly used to resolve classification difficulties regarding closely correlated species, determine their evolutionary connections, and describe their adaptive importance (Kaya et al., 2011; Karaismailoğlu & Erol, 2018). Moreover, many studies have shown that macro and micro characters of the seeds has systematic significance in separating the taxa within the family Brassicaceae (Khalik and Maesen, 2002; Tantawy et al., 2004; Kaya et al., 2011; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a). Also, the anatomical features of the seed coat can contribute to solving the taxonomic problems regarding family. This statement has been supported by performed works on several genera of the family (Vaughan et al., 1976; Ghaempanah et al., 2013; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a). However, there is no study on seed morphology and anatomy of the genus *Cardamine* from Turkey, where is one of the diversity centers of genus with 14 taxa (Mutlu, 2012), so far.

The aim of this investigation is to contribute to the seed morphological and anatomical characteristics of seven *Cardamine* taxa containing *C. bulbifera* Crantz, *C. hirsuta* L., *C. impatiens* var. *pectinata* (Pall. ex DC.) Trautv., *C. lazica* Boiss. & Bal., *C. tenera* Gmel ex Mey., *C. uliginosa* Bieb. and *C. graeca* L. from Turkey and to examine taxonomic uses of these characters at the interspecies level.

MATERIAL and METHODS

This study was planned with 50 seeds belonging to 10 individuals for each taxon taken from different regions of Turkey during the fruiting time. The examined taxa were deposited at SUFAF (Siirt University Flora and Fauna) and given in Table 1.

Table 1. The examined taxa and their locations

Çizelge 1. İncelenen taksonlar ve lokasyonları

| | |
|--|---|
| <i>Cardamine bulbifera</i> Crantz | Ağrı, Patnos, Kizkapan village, stone slopes, 1650 m, 16.5.2015, Karaismailoğlu 160 |
| <i>C. hirsuta</i> L. | Bursa, Uludağ, Aras valley, roadside stony areas, 1650 m, 2.7.2016, Karaismailoğlu 302 |
| <i>C. impatiens</i> var. <i>pectinata</i> (Pall. ex DC.) Trautv. | Bolu, Abant, roadsides, 801 m, 30.4.2015, Karaismailoğlu 132b |
| <i>C. lazica</i> Boiss. & Bal. | Artvin, Hopa, roadsides, stone slopes, 350 m, 6.3.2015, Karaismailoğlu 100b |
| <i>C. tenera</i> Gmel ex Mey. | Kütahya, Gediz, Murat mountain, 1700 m, 23.6.2016, Karaismailoğlu 286 |
| <i>C. uliginosa</i> Bieb. | İstanbul, Büyükçekmece, Beykent, meadows, 80-120 m, 6.7.2016, Karaismailoğlu 310 |
| <i>C. graeca</i> L. | Muğla, Marmaris, Kırzeytin mountain, serpentine rocks, 490 m, 3.4.2015, Karaismailoğlu 122b |

Macromorphological features of the seeds involving color, shape, dimension, and surface characters were analyzed by utilizing an Olympus SZX7 stereomicroscope and Kameram Imaging Software (Figure 1). Micromorphological examinations of the seeds involving surface ornamentation, anticlinal and periclinal cell walls, and the form of epidermal cell

were studied with a JEOL Neoscope-5000 Scanning Electron Microscope (Figure 2). For micromorphological observations, seeds were pasted on the stub with silver adhesive and enclosed with platinum-gold.

Findings of anatomical features were obtained on samples well-preserved in 70% alcohol. Cross-sections

were taken from midpoint of seeds with an automatic microtome (Thermo Shonda Met Finesse). After, they were treated with series of alcohol and xylene, and dyed with hematoxylin in a staining tool (ASC 720 Medite) and covered with Entellan (Figure 3)

(Karaismailoğlu, 2015, 2019a; Karaismailoğlu & Erol, 2018). Anatomical characteristics were detected using an Olympus CX21FS1 microscope and Kameram Imaging Software.



Figure 1. Seeds of the studied taxa: 1- *C. bulbifera*, 2- *C. hirsuta*, 3- *C. impatiens* var. *pectinata*, 4- *C. lazica*, 5- *C. tenera*, 6- *C. uliginosa*, 7- *C. graeca* (scales bars=1 mm)

Şekil 1. Çalışılan taksonların tohumları: 1- *C. bulbifera*, 2- *C. hirsuta*, 3- *C. impatiens* var. *pectinata*, 4- *C. lazica*, 5- *C. tenera*, 6- *C. uliginosa*, 7- *C. graeca* (ölçekler=1 mm)

The terminology of morphological and anatomical characters was performed in accordance with Stearn (1985), Ghaempanah et al. (2013) and Karaismailoğlu and Erol (2018).

The findings were evaluated with SPSS. Duncan's multiple-range test was utilized to define the statistical importance of variations among the quantitative values acquired for taxa (SPSS Inc, 2006). Grouping of taxa was performed with using the clustering assessment method (UPGMA) in accordance with 38 characters in Tables 2 (Figure 4) (Karaismailoğlu and Erol, 2018). Moreover, the

similarity matrix of the examined taxa was created in MVSP (Kovach, 2007).

RESULTS

The seed features of the studied taxa involving color, shape, dimension, and surface from are macromorphologically assessed. Seed colors of the examined taxa are noticed as brown and its tones. *C. impatiens* var. *pectinata* and *C. lazica* taxa are distinctly different from other taxa with their light brown seeds. It has been seen six seed shapes: ovatus in *C. bulbifera*, ellipticus-rectangularis in *C. hirsuta*, rectangularis in *C. impatiens* var. *pectinata*, circularis-

rectangularis in *C. lazica*, ellipticus-late in *C. tenera* and *C. uliginosa*, and ellipticus in *C. graeca*. Seed shape is characteristic in studied taxa, except for *C. tenera* and *C. uliginosa*. The seed dimension varies between 0.91 mm and 2.20 mm in length and between 0.41 mm and 1.65 mm in width. *Cardamine bulbifera*

and *C. graeca* are markedly separate from the rest of the studied taxa in terms of seed dimension. Seed surface structures are smooth, except for *C. graeca* that is of slightly striped. *Cardamine impatiens* var. *pectinata*, *C. tenera* and *C. uliginosa* have raphe on seeds, but not others (Figure 1 and Table 3).

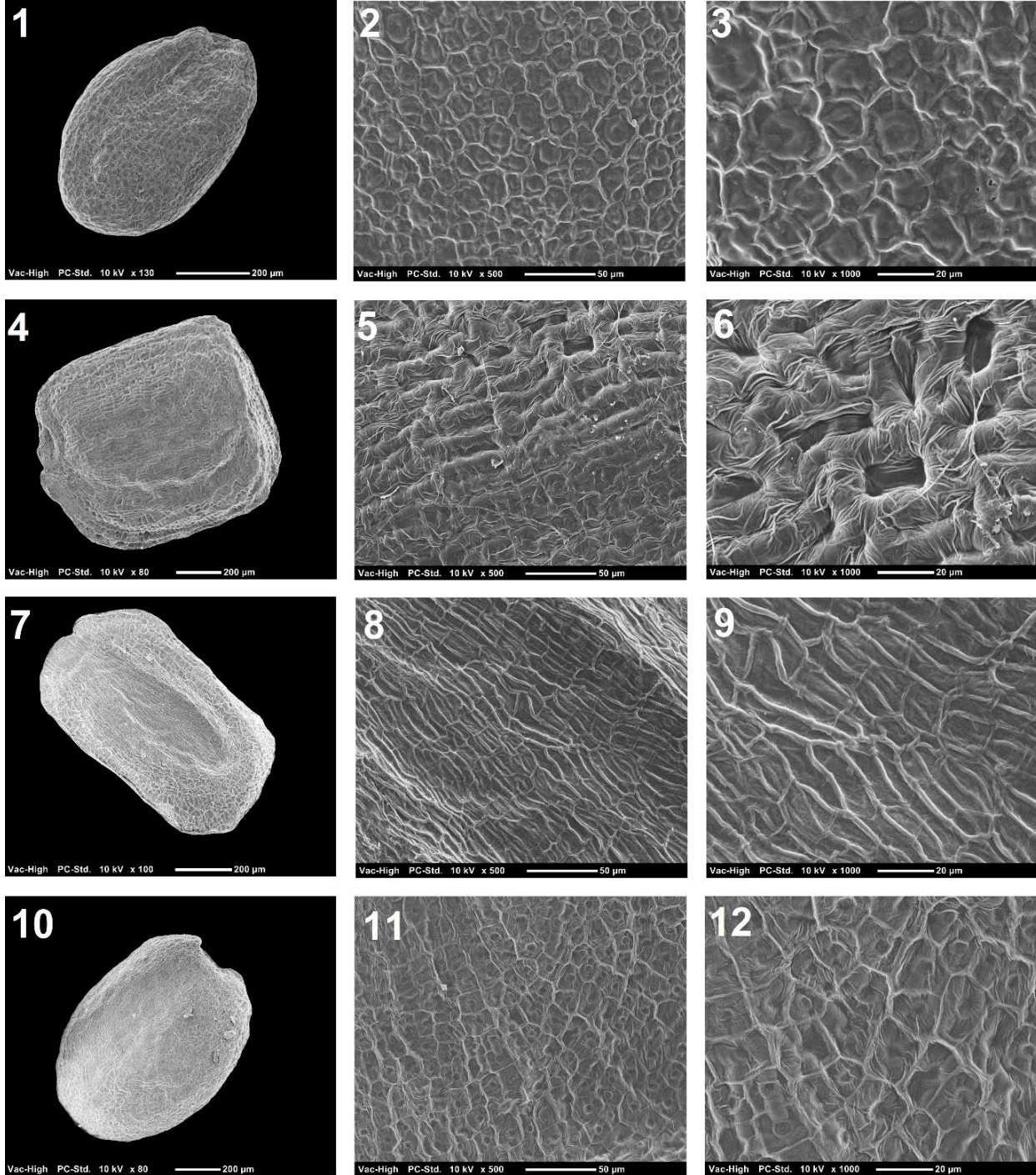


Figure 2. The micromorphological structures of the studied taxa: 1-3 *C. bulbifera*, 4-6 *C. hirsuta*, 7-9 *C. impatiens* var. *pectinata*, 10-12 *C. lazica*.

Şekil 2. Çalışılan taksonların mikromorfolojik yapıları: 1-3 *C. bulbifera*, 4-6 *C. hirsuta*, 7-9 *C. impatiens* var. *pectinata*, 10-12 *C. lazica*.

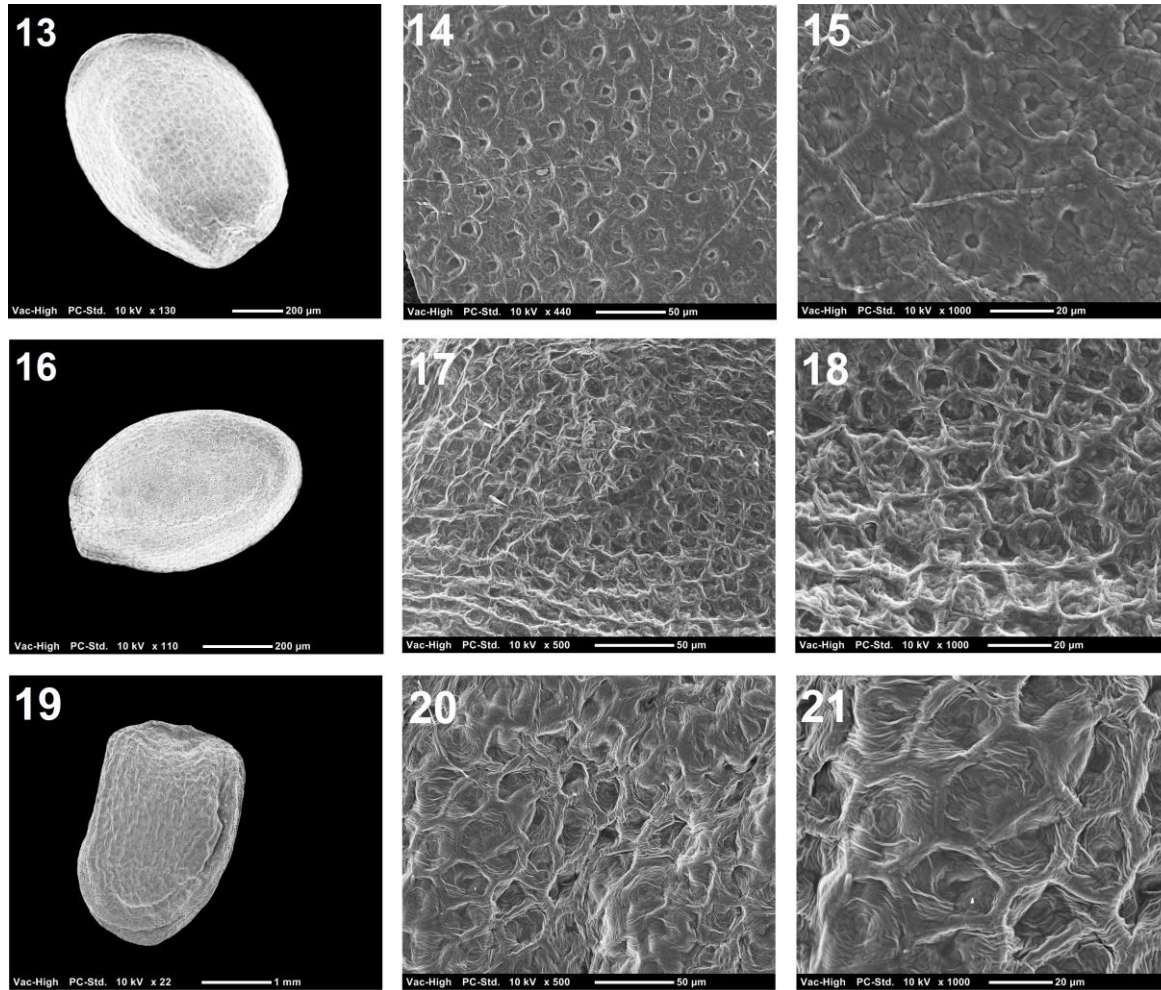


Figure 2. The micromorphological structures of the studied taxa: 13-15 *C. tenera*, 16-18 *C. uliginosa*, 19-21 *C. graeca*.

Şekil 2. Çalışılan taksonların mikromorfolojik yapıları: 13-15 *C. tenera*, 16-18 *C. uliginosa*, 19-21 *C. graeca*.

Table 2. Characters used in statistical analysis and their codes

Çizelge 2. İstatistik analizlerde kullanılan karakterler ve kodları

| Characters (Karakterler) | Codes (Kodlar) |
|---|---|
| Seed color | Dark brown or brown (1), Light brown (2) |
| Seed shape | Ovatus (3), Ellipticus-rectangularis (4), Rectangularis (5) Circularis-rectangularis (6), Ellipticus-late (7), Ellipticus (8) |
| Seed surface | Smooth (9), Slightly striped (10) |
| Seed size | Length (11), Width (12) |
| Raphe | Presence (13) |
| Surface ornamentation | Reticulate-alveolate (14), Scalariform (15), Reticulate (16), Foveate (17), Reticulate-foveate (18) |
| Anticlinal cell walls | Raised (19) |
| Periclinal cell walls | Convex (20), Concave (21) |
| Epidermal cell structure | Polygonal (22), Alveolar (23), Rectangular (24) |
| Anatomical structure of the outer epidermis | Flattened (25), Rectangular (26), Cubic (27) |
| Anatomical structure of the inner epidermis | Flat (28), Rectangular (29), Elongated rectangular (30), Outer testa thickness (31) |
| Inner testa structures | Presence (32), Crushed (33), Flat (34), Thickness (35) |
| Parenchyma cell structures | Flat (36), Thickness (37) |
| Mucilage cell | Presence (38) |

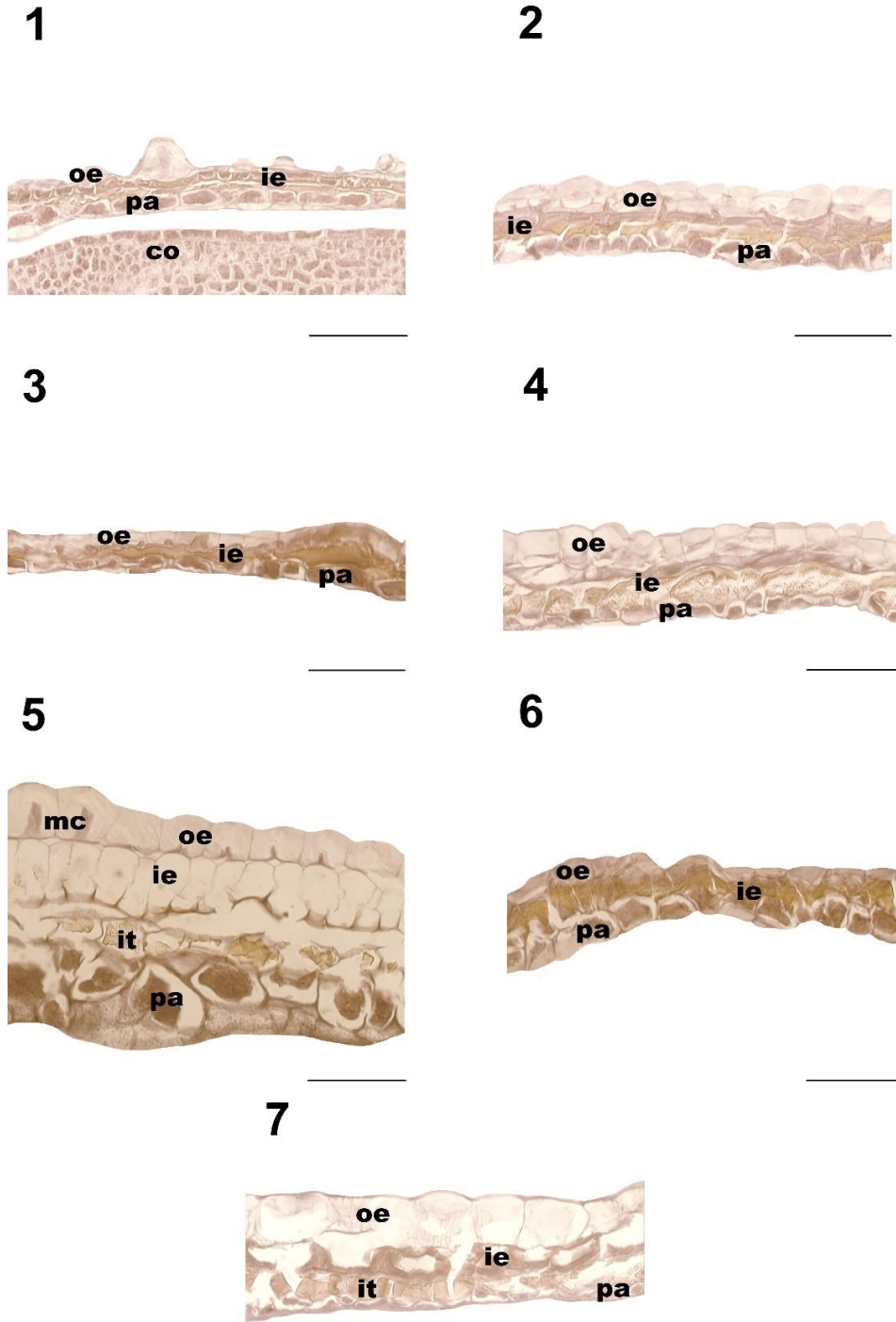


Figure 3. The anatomical structures of the seed testa of the studied taxa: 1- *C. bulbifera*, 2- *C. hirsuta*, 3- *C. impatiens* var. *pectinata*, 4- *C. lazica*, 5- *C. tenera*, 6- *C. uliginosa*, 7- *C. graeca* (oe: outer epidermis, ie: inner epidermis, it: inner testa, co: cotyledon, pa: parenchyma, mc: mucilage cells, scale bars: 100 µm)

Şekil 3. Çalışılan taksonların tohum testalarının anatomik yapıları: 1- *C. bulbifera*, 2- *C. hirsuta*, 3- *C. impatiens* var. *pectinata*, 4- *C. lazica*, 5- *C. tenera*, 6- *C. uliginosa*, 7- *C. graeca* (oe: dış epidermis, ie: iç epidermis, it: iç testa, co: kotyledon, pa: parenkima, mc: musilaj hücreleri, ölçekler: 100 µm)

The surface ornamentation types, anticlinal-periclinal cell walls, and epidermal cell forms of the seeds are micromorphologically researched. The seed surface ornamentation is categorized into five types:

reticulate-areolate, scalariform, reticulate, foveate, reticulate-foveate (Figure 2 and Table 3). The most common types are reticulate and scalariform, seen in *C. hirsuta*, *C. impatiens* var. *pectinata*, *C. lazica* and *C. graeca*. The reticulate-alveolate (in *C. bulbifera*),

foveate (in *C. tenera*), and reticulate-foveate (in *C. uliginosa*) types are each characterized by solely one taxon. While the forms of anticlinal cell walls in the studied taxa are raised, periclinal cell walls are concave except *C. bulbifera* (convex). Moreover, cell shapes on surfaces are very different: polygonal, alveolar and rectangular. The most common cell type is polygonal, whereas rectangular is quite rare types (Table 3).

The outcomes of the anatomical examinations of the seeds are demonstrated in Figure 3 and Table 4. The seed testa of the studied taxa consists of the outer epidermis and inner epidermis (outer testa), rarely inner testa and parenchyma layers. The epidermis layers in outer testa are of either parenchymatic or sclerenchymatic form and occur with two layers involving the outer epidermis and the inner epidermis. According to the obtained observations from the cross-sections, the outer epidermis differs considerably in cell shape (flattened, rectangular or cubic), and wall formation (undulated or straight and thick or thin-walled) (Figure 3). The two most common types are flattened and cubic, however; the rarest one is the rectangular form (Table 4). The inner epidermis includes 1 layer of flat, rectangular and elongated rectangular cells. The average thickness of the outer testa varies between 25.64 μm (in *C. impatiens* var. *pectinata*) and 98.75 μm (in *C. tenera*). The inner testa, which is a compressed tissue under the outer testa, has 1–2 layers of flat, or crushed cells. This layer is seen only in 2 taxa studied, *C. graeca* and *C. tenera*. Its thickness ranges from 21.19 μm (in *C. graeca*) to 48.25 μm (in *C. tenera*) (Figure 3 and Table 4). The parenchyma layer of the examined taxa is 1-layered and comprises of flat cells. The thickness of the parenchyma layer ranges from 11.18 μm to 44.65 μm ; the largest endosperm is observed in *C. tenera* and the thinnest in *C. graeca* (Table 4). In addition, mucilage cells are observed in epidermis layers in seeds of *C. tenera* unlike other taxa (Figure 3 and Table 4).

The numerical assessment of the seed morphological and anatomical features allows the form of a dendrogram, which reveals the variations or resemblances among the studied taxa. A dendrogram is created as a consequence of the cluster analysis of the examined taxa of *Cardamine* built on the difference of 38 characteristics in 7 taxa. The cophenetic correlation coefficient is designed to discover the correlation between the dendrogram and dissimilarity matrix (Table 5 and Figure 4). The cophenetic correlation between the dissimilarity matrix and dendrogram has been computed as 0.68, representing a good match. As a result of the cluster analysis, 2 clusters have emerged; A and B. Cluster A consists of *C. graeca*, *C. impatiens* var. *pectinata* and *C. lazica*. Cluster B contains *C. bulbifera*, *C. tenera*, *C. hirsuta*

and *C. uliginosa* (Figure 4). *C. hirsuta* and *C. tenera* are the most closely related taxa (dissimilarity coefficient: 0.88), as *C. graeca* and *C. uliginosa* are the most distantly related taxa (dissimilarity coefficient: 2.39) (Table 5).

DISCUSSION

The morphological features of the seeds offer valuable data regarding the evolutionary relations of the angiosperms (Corner, 1976). The seed surface, shape, color, and dimension in Brassicaceae family are precious features in separation of the taxa (Barthlott, 1981; Koul et al., 2000; Karaismailoğlu and Erol, 2018). *Cardamine* taxa vary among the species in terms of the seed morphological characters. Seed shape is almost sufficient to distinguish among the examined taxa, it is the same in only *C. tenera*-*C. uliginosa* taxa, different in others. Seed color in the studied taxa is brown and its tones. *C. impatiens* var. *pectinata* and *C. lazica* are easily distinguished from other taxa by having light brown seeds. Seed surface morphology is of the taxonomic importance at the genus and species levels (Brochmann, 1992; Karaismailoğlu and Erol, 2018). *C. graeca* is separated with its slightly striped seed surfaces from other taxa, which have a smooth surface. The macromorphological results of this research are compatible with the former works performed with macromorphological features on seeds of Brassicaceae family (Khalik and Maesen, 2002; Kasem et al., 2011; Kaya et al., 2011; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a, 2019b; Şirin and Karaismailoğlu, 2020).

The significance and efficiency of scanning electron microscopy in explaining of the taxonomic difficulties (Heywood, 1971). Many studies have shown that seed micromorphological features are helpful characteristics to utilize in discriminating of the taxa in Brassicaceae family (Barthlott, 1981; Koul et al., 2000; Kasem et al., 2011; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2016, 2019a, 2019b; Şirin and Karaismailoğlu, 2020). In this work, it has utilized scanning electron microscopy to explain difficulties in taxonomy of taxa, and reveal adaptive significance of seed coat. All of the studied taxa have been examined for the first time. 5 different surface types have found: reticulate, reticulate-foveate, foveate, reticulate-alveolate, and scalariform. Reticulate seed ornamentation type is the most common in Brassicaceae, as indicated in this work (Tantawy et al., 2004). The scalariform ornamentation type has found in the genus *Thlaspi* L., *Aethionema* W.T. Aiton (Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a). Earlier seed exomorphic investigations have demonstrated that the structures of anticlinal-periclinal cell walls are well identification factors at the species level (Barthlott, 1981; Tantawy et al., 2004). Also, the structures of anticlinal-periclinal cell

Table 3. Macro and micro morphological characters of the seeds of the studied taxa.

Çizelge 3. Çalışılan taksonların tohumlarının makro ve mikro morfolojik karakterleri

| Taxa Taksonlar | Color Renk | Shape Şekil | Seed surfaces Tohum yüzeyleri | Seed Sizes* Tohum boyutları L (mm) W (mm) | | Raphe presence Rafe varlığı | Seed surface ornamentations Tohum yüzey ornamentasyonları | Anticlinal cell wall Antiklinal hücre duvarı | Periclinal cell wall Periklinal hücre duvarı | Epidermal cell structures Epidermal hücre yapıları |
|--|----------------|------------------------------|--|---|------------|--------------------------------------|--|--|---|---|
| <i>C. bulbifera</i> | Light Brown | Ovatus | Smooth | 1.03±0.15bc | 0.41±0.04d | - | Reticulate- Alveolate | Raised | Convex | Polygonal and Alveolar cells |
| <i>C. hirsuta</i> | Brown | Ellipticus- Rectangularis | Smooth | 1.09±0.10b | 0.95±0.08b | - | Scalariform | Raised | Concave | Rectangular cells |
| <i>C. impatiens</i> var. <i>pectinata</i> | Light Brown | Rectangularis | Smooth | 0.92±0.08c | 0.63±0.04c | + | Scalariform | Raised | Concave | Rectangular cells |
| <i>C. lazica</i> | Light Brown | Circularis- Rectangularis | Smooth | 1.05±0.06b | 0.91±0.04b | - | Reticulate | Raised | Concave | Polygonal cells |
| <i>C. tenera</i> | Dark Brown | Ellipticus- Late | Smooth | 0.91±0.08c | 0.84±0.06b | + | Foveate | Raised | Concave | Alveolar cells |
| <i>C. uliginosa</i> | Brown | Ellipticus-late | Smooth | 1.14±0.21b | 1.03±0.10b | + | Reticulate-Foveate | Raised | Concave | Polygonal and Alveolar cells |
| <i>C. graeca</i> | Brown | Ellipticus | Slightly striped | 2.20±0.18a | 1.65±0.12a | - | Reticulate | Raised | Concave | Polygonal cells |

*Average value ± standard deviation; means with dissimilar letters are important at P = 0.05 by Duncan's multiple range test, + =present, - =absent, L=length, W=width.

*Ortalama değer ± standard sapma; Farklı harflere sahip ortalamalar Duncan'ın çoklu aralık testine göre P = 0.05'te önemlidir, + =var, - =yok, L=uzunluk, W=genişlik.

Table 4. Testa anatomical characters of the studied taxa

Çizelge 4. Çalışılan taksonların testa anatomik karakterleri.

| Taxa Taksonlar | Outer testa (Dış testa) | | | Inner testa (İç testa) | | Parenchyma layer | | Presence or absence of mucilage cells Musilaj hücrelerinin varlığı veya yokluğu |
|--|--|---|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|--|
| | Outer epidermis structures Dış epidermis yapıları | Inner epidermis structures İç epidermis yapıları | Thickness* (µm) Kalınlık | Structure Yapı | Thickness* (µm) Kalınlık | Structure Yapı | Thickness* (µm) Kalınlık | |
| <i>C. bulbifera</i> | 1 layer, flattened cells | 1 layer, flat cells | 32.17±2.54e | - | - | 1 layer, flat cells | 24.16±1.09b | - |
| <i>C. hirsuta</i> | 1 layer, cubic cells | 1 layer, rectangular cells | 51.29±2.35c | - | - | 1 layer, flat cells | 23.79±1.35b | - |
| <i>C. impatiens</i> var. <i>pectinata</i> | 1 layer, rectangular cells | 1 layer, flat cells | 25.64±2.21f | - | - | 1 layer, flat cells | 15.84±2.16c | - |
| <i>C. lazica</i> | 1 layer, cubic cells | 1 layer, flat cells | 44.93±1.78d | - | - | 1 layer, flat cells | 16.11±1.38c | - |
| <i>C. tenera</i> | 1 layer, cubic cells | 1 layer, elongated rectangular cells | 98.75±9.56a | 1-2 layer, crushed cells | 48.45±2.56a | 1 layer, flat cells | 44.65±5.65a | - |
| <i>C. uliginosa</i> | 1 layer, flattened cells | 1 layer, elongated rectangular cells | 55.62±2.55bc | - | - | 1 layer, flat cells | 40.09±2.35a | - |
| <i>C. graeca</i> | 1 layer, cubic cells | 1 layer, flat cells | 60.15±4.17b | 1 layer, flat cells | 21.19±2.09b | 1 layer, flat cells | 11.18±0.58d | - |

*Average value ± standard deviation; means with dissimilar letters are important at P = 0.05 by Duncan's multiple range test, + =present, - =absent.

*Ortalama değer ± standard sapma; Farklı harflere sahip ortalamalar Duncan'ın çoklu aralık testine göre P = 0.05'te önemlidir, + =var, - =yok.

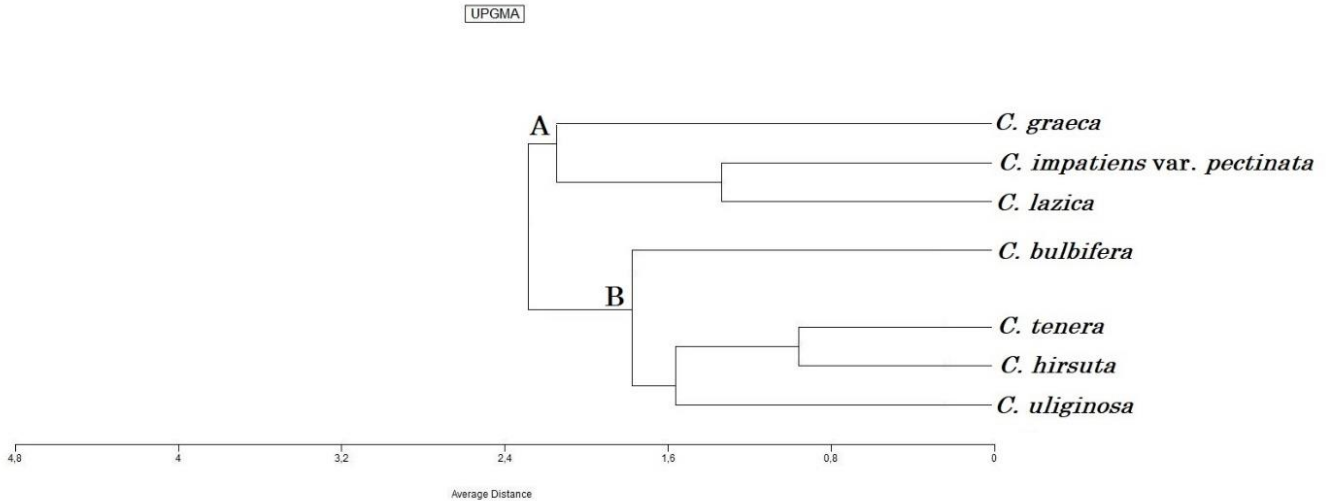


Figure 4. Cluster analysis of the studied taxa.
Şekil 4. Çalışılan taksonların kümeleme analizi

Table 5. The dissimilarity matrix of the studied taxa
Çizelge 5. İncelenen taksonların benzemezlik matrisi.

| Taxa (Taksonlar) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|------|------|------|------|------|------|---|
| <i>C. bulbifera</i> (1) | 0 | - | - | - | - | - | - |
| <i>C. hirsuta</i> (2) | 1.87 | 0 | - | - | - | - | - |
| <i>C. impatiens var. pectinata</i> (3) | 2.11 | 2.33 | 0 | - | - | - | - |
| <i>C. lazica</i> (4) | 2.13 | 2.17 | 1.45 | 0 | - | - | - |
| <i>C. tenera</i> (5) | 1.88 | 0.88 | 2.24 | 1.57 | 0 | - | - |
| <i>C. uliginosa</i> (6) | 1.95 | 1.44 | 1.82 | 1.59 | 1.36 | 0 | - |
| <i>C. graeca</i> (7) | 2.29 | 2.35 | 2.16 | 2.36 | 2.31 | 2.39 | 0 |

walls are active in discrimination of the taxa. The type of the anticlinal cell wall is raised, as the type of the periclinal cell wall is concave or convex. Taxa of *Cardamine* are different in terms of epidermal cell shapes. Epidermal cells are polygonal, rectangular or alveolar types. Generally, scanning electron microscope works have revealed that the comprehensive assessment of seed structures of the *Cardamine* taxa is considerably valuable in discriminating taxa from each other.

The performed works on the seed coat anatomy in the Brassicaceae have used to overcome of the taxonomic difficulties (Vaughan et al., 1976; Ghaempanah et al., 2013; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a, 2019b). It has been informed that the seed coat characters can be utilized as consistent characteristics in the taxonomy of the taxa (Koul et al., 2000; Karaismailoğlu and Erol, 2018). The seed testa structures belonging to some genera in Brassicaceae have anatomically defined by Vaughan et al. (1976), Meyer (1973, 1991), Karaismailoğlu and Erol (2018), Karaismailoğlu (2019a, 2020). The seed coat mostly comprises 4 layers, which are the epidermis, the subepidermis, the sclerotic or palisade, and the parenchymatic layers (Bouman, 1975; Ghaempanah et

al., 2013; Karaismailoğlu and Erol, 2018). In this work, anatomical structures of seed coats of the examined taxa have been analyzed in detail for the first time, and it is debated whether the anatomical features of the seeds are able to be utilized for the studied taxa to resolve reported systematic difficulties. The seed coat occurs from discriminated layers as the outer epidermis, the inner epidermis (outer testa) and the parenchymal layer. Contrary to the literature information, there is no inner testa except for *C. tenera* and *C. graeca* taxa.

The anatomical works performed on seed coats of species belonging various genera in Brassicaceae have showed that seed epidermis cell types can be used as a reliable taxonomic character. This character has been found in 15 different types by Vaughan and Whitehouse (1971), and 4 different types by Karaismailoğlu and Erol (2018). In this research, the type of the epidermis quite differs among the taxa. This 1-layered epidermis layers can occur from flat, rectangular, cubic or elongated rectangular. As flat and cubic cells are commonly observed, rectangular cells are the rarest in the studied taxa. The inner testa is the sclerotic or palisade structure, which is a compressed tissue under the outer testa. This layer is

found in only two of the studied taxa (*C. tenera* and *C. graeca*). It consists of 1–2 layers and its cells are be flat or crushed.

The parenchyma thickness of seed coats of the taxa has also been systematically analyzed for the first time in this work, and it is noticed that its features differ among the taxa. The parenchyma thickness ranges from 11.18 µm (*C. graeca*) to 44.65 µm (*C. tenera*). However; The number of layers and cell shape are the same in all taxa examined. Notwithstanding the often mentioned convergence on flowers and fruits in Brassicaceae, epidermis layers, and parenchymal thickness of the seed testa of the studied taxa have demonstrated to be more useful characters than the traditional ones utilized in taxonomy of *Cardamine*. Karaismailoğlu and Erol (2018) had similar outcomes with studying anatomically of *Thlaspi* L. from Turkey. Also, the presence of mucilage cells distinguishes *C. tenera* from others.

A dendrogram was created to assess the morphological and anatomical features of the seeds of the studied *Cardamine* taxa with UPGMA cluster analysis. The dendrogram, showing 2 main groups, was partly similar with the results of Cullen (1965). The morphological and anatomical characters of the seeds have maintained the characters utilized in the ranking of *Cardamine* taxa in the flora of Turkey (Figure 4).

In conclusion, studying the morphological and anatomical characteristics of seeds of the studied taxa of *Cardamine* offers major assists in terms of the systematics of taxa within the genus.

Key to examined *Cardamine* taxa, based on seed characteristics

1. Seed color is light brown 2
2. Seed surface ornamentation is scalariform
C. impatiens var. *pectinata*
2. Seed surface ornamentation is reticulate .*C. lazica*
1. Seed color is brown or dark brown 3
3. Seed shape is ovatus *C. bulbifera*
3. Seed shape is ellipticus, ellipticus-late, ellipticus-
rectangularis 4
4. Seed surface ornamentation is scalariform
C. hirsuta
4. Seed surface ornamentation is foveate, reticulate,
reticulate-foveate 5
5. Outer testa consists of flattened cells *C. uliginosa*
5. Outer testa does not consist of flattened cells .6
6. Mucilage cells are presence *C. tenera*
6. Mucilage cells are absence *C. graeca*

Statement of Conflict of Interest

Author has declared no conflict of interest.

REFERENCES

Al-Shehbaz IA 1988. The genera of Arabideae (Cruciferae, Brassicaceae) in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 69: 85-166.
Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA 2006.

Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): An overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259: 89-120.
Al-Shehbaz IA 2012. A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, 61(5): 931-954.
Barthlott W 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordic Journal of Botany*, 1: 345-355.
Bouman F 1975. Integument initiation and testa development in some Cruciferae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 70: 213-299.
Brochmann C 1992. Pollen and seed morphology of Nordic *Draba* (Brassicaceae): phylogenetic and ecological implications. *Nordic Journal of Botany*, 12: 657-673.
Carlsen T, Bleeker W, Hurka H, Elven R, Brochmann C 2009. Biogeography and Phylogeny of *Cardamine* (Brassicaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(2): 215-236.
Corner EJ 1976. *The Seeds of Dicotyledons*. Cambridge: Cambridge University Press.
Cullen J 1965. *Cardamine*. In: Davis, P.H., editor. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 1, Edinburgh: Edinburgh University Press, 438-444 pp.
Ghaempanah S, Ejtehadi H, Vaezi J, Farsi M 2013. Seed-coat anatomy and microsculpturing of the genus *Erysimum* (Brassicaceae) in Northeast of Iran. *Phytotaxa*, 150: 41-53.
Hewson HJ 1982. *Flora of Australia*. Canberra: Australian Government Publishing Service.
Heywood VH 1971. *Scanning Electron Microscopy*. London: Systematic and Evolutionary Applications.
Karaismailoğlu MC 2016. Addition to characters of endemic *Aubrieta canescens* subsp. *canescens* Bornm. (Brassicaceae) from Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*, 45: 509-515.
Karaismailoğlu MC 2017. Palynological features of eleven *Aethionema* taxa from Turkey and their systematic implications. *Bangladesh J Plant Taxon*, 24: 197-204.
Karaismailoğlu MC, Erol O 2018. Seed structure and its taxonomic implications for genus *Thlaspi* sensu lato sections *Nomisma*, *Thlaspi*, and *Pterotropis* (Brassicaceae). *Turkish Journal of Botany*, 42: 591-609.
Karaismailoğlu MC 2019a. Comparative morphology and anatomy of seeds of some *Aethionema* W.T. Aiton (Brassicaceae) taxa from Turkey. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 26(1): 1-12.
Karaismailoğlu MC 2019b. Taxonomical, morphological, palynological, anatomical and ecological investigations on monotypic genus *Pachyphragma* from Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 51: 1021-1026.
Karaismailoğlu MC 2020. Petiole Anatomy of 21

- Representatives of Tribe *Alysseae* (Brassicaceae) from Turkey. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 23: 1535-1544.
- Karaismailoğlu MC 2021. New Chromosome Numbers in Five *Cardamine* Taxa from Turkey. *Cytologia*, 86:11-13.
- Kasem WT, Ghareeb A, Marwa E 2011. Seed morphology and seed coat sculpturing of 32 taxa of family Brassicaceae. *Journal of American Science*, 7: 166-178.
- Kaya A, Ünal M, Özgökçe F, Doğan B, Martin E 2011. Fruit and seed morphology of six species previously placed in *Malcolmia* (Brassicaceae) in Turkey and their taxonomic value. *Turkish Journal of Botany*, 35: 653-662.
- Khalik K, Maesen LJG 2002. Seed morphology of some tribes of Brassicaceae (implication for taxonomy and species identification for the flora of Egypt). *Blumea*, 47: 363-83.
- Koul KK, Ranjna N, Raina SN 2000. Seed coat microsculpturing in *Brassica* and allied genera (subtribes Brassicinae, Raphaninae, Moricandiinae). *Annals of Botany*, 86: 385-97.
- Kovach WL 2007. MVSP - A MultiVariate Statistical Package for Windows, Ver. 3.1. Pentraeth: Kovach Computing Services.
- Kučera J, Marhold K, Lihová J 2010. *Cardamine maritima* group (Brassicaceae) in the amph-Adriatic area: A hotspot of species diversity revealed by DNA sequences and morphological variation. *Taxon*, 59(1): 148-164.
- Lihová J, Marhold K, Neuffer B 2000. Taxonomy of *Cardamine amara* (Cruciferae) in the Iberian Peninsula. *Taxon*, 49: 747-763.
- Lihová J, Tribsch A, Marhold K 2003. The *Cardamine pratensis* group (Brassicaceae) in the Iberian Peninsula: Taxonomy, polyploidy and distribution. *Taxon*, 52: 783-802.
- Lihová J, Fuertes Aguilar J, Marhold K, Nieto Feliner G 2004. Origin of the disjunct tetraploid *Cardamine amporitana* (Brassicaceae) assessed with nuclear and chloroplast DNA sequence data. *American Journal of Botany*, 91: 1231-1242.
- Meyer FK 1973. *Conspectus der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens*. Feddes Repertorium, 84: 449-470 (in German).
- Meyer FK 1991. Seed-coat anatomy as a character for a new classification of *Thlaspi*. *Flora et Vegetatio mundi*, 9: 9-15.
- Mutlu B 2012. *Cardamine*. In: Guner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babac MT (eds) Türkiye bitkileri listesi (damarlı bitkiler). [A Checklist of the Flora of Turkey (Vascular Plants)]. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
- Rashid A, Ohba H 1993. A revision of *Cardamine loxostemonoides* O. E. Schulz (Cruciferae). *Journal of Japanese Botany*, 68: 199-208.
- Schulz OE 1903. Monographie der Gattung *Cardamine*. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 32: 280-623.
- SPSS Inc 2006. SPSS Base 15.0 for Windows. Chicago: SPSS Inc.
- Stearn WT 1985. *Botanical Latin: History, Grammar Syntax, Terminology, and Vocabulary*. London: David & Charles.
- Şirin E, Karaismailoğlu MC 2020. Contribution to the systematic knowledge of endemic *Aubrieta pinardii* Boiss. (Brassicaceae) from Turkey. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 27(1): 27-35.
- Tantawy ME, Khalifa SF, Hassan SA, Al-Rabiai GT 2004. Seed exomorphic characters of some Brassicaceae (LM and SEM Study). *International Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6: 821-830.
- Vaughan JG, Whitehouse JM 1971. Seed structure and the taxonomy of the Cruciferae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 64: 383-409.
- Vaughan JG, Phelan JR, Denford KE 1976. *Seed studies in the Cruciferae*. In: Vaughan JG, Macleod AJ, Jones BMG (editors) *The Biology and Chemistry of the Cruciferae*. London: Academic Press, 119-144 pp.
- Webb CJ, Sykes WR, Garnock-Jones PJ 1988. *Flora of New Zealand*. Christchurch: Botany Division, Department of Scientific and Industrial Research.

Seed Morpho-Anatomical Characters of Some *Cardamine* taxa from Turkey

Mehmet Cengiz KARAIŞMAILOĞLU¹*

¹Siirt University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Siirt, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0002-6856-2742>

✉: cengiz.karaismailoglu@siirt.edu.tr

ABSTRACT

This manuscript includes morphological and anatomical characters of seeds of 7 taxa of *Cardamine* genus from Turkey and the importance of these characteristics from a systematic perspective. The outcomes demonstrate that the taxa vary in terms of seed shape and dimension. The seed dimension varies between 0.91 mm and 2.20 mm in length and between 0.41 mm and 1.65 mm in width, *Cardamine graeca* having the biggest and *C. tenera* having the smallest seeds. The seed surface ornamentation is categorized into five types: reticulate-alveolate, scalariform, reticulate, foveate and reticulate-foveate. The most common type is scalariform and reticulate, however; foveate, reticulate-foveate and reticulate-alveolate ornamentation types have been noticed to be taxon-specific. The testa is mostly occurred with 3 layers: the outer epidermis, the inner epidermis, and the parenchyma layer. However, *C. tenera* and *C. graeca* taxa have an additional inner testa layer under the outer testa. The shapes and thicknesses of the outer epidermis and the inner epidermis, presence of the inner testa and the parenchyma layer are very important characteristics that disclose inter-specific relations within the studied species. Moreover, a key is offered for the identification of the studied taxa based on seed characters.

Research Article

Article History

Received : 18.02.2021
Accepted : 07.05.2021

Keywords

Anatomy
Cardamine
Seed
Turkey
UPGMA

Türkiye'den Bazı *Cardamine* Taksonlarının Tohum Morfo-Anatomik Karakterleri

ÖZET

Bu makale Türkiye'den *Cardamine* cinsinin 7 taksonunun tohumlarının morfolojik ve anatomik karakterlerini ve bu karakterlerin sistematik bir bakış açısıyla önemini içermektedir. Sonuçlar taksonların tohum şekli ve boyut açısından farklı olduğunu göstermiştir. Tohum boyutları boyda 0.91 mm ile 2.20 mm ve ende 0.41 mm ile 1.65 mm arasında değişmiş, *Cardamine graeca* en büyük tohumlara, *C. tenera* ise en küçük tohumlara sahiptir. Tohum yüzey ornamentasyonu beş tipe ayrılır: retikulat-alveolat, scalariform, retikulat, foveat and retikulat-foveat. En yaygın tip scalariform ve retikulattır, buna karşın; foveat, retikulat-foveat ve retikulat-alveolat ornamentasyon tiplerinin taksona özgü olduğu not edilmiştir. Testa çoğunlukla 3 katmanla oluşmuştur: dış epidermis, iç epidermis ve parenkima katmanı. Bununla birlikte, *C. tenera* ve *C. graeca* taksonlarının dış testa altında ek bir iç testa tabakası vardır. Dış epidermis ve iç epiderminin şekilleri ve kalınlıkları, iç testa varlığı ve parenkima tabakası incelenen türler arası ilişkileri ortaya koyan çok önemli özelliklerdir. Ayrıca, incelenen taksonların tohum karakterlerine göre tanımlanması için bir anahtar sunulmuştur.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 18.02.2021
Kabul Tarihi : 07.05.2021

Anahtar Kelimeler

Anatomi
Cardamine
Tohum
Türkiye
UPGMA

To Cite: Karaismailoğlu MC 2022. Seed Morpho-Anatomical Characters of Some *Cardamine* taxa from Turkey. KSU J. Agric Nat 25 (1): 88-99. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.882821>.

INTRODUCTION

The family Brassicaceae is one of the greatest flowering plant families containing economic importance includes more than 340 genera and 3350

species the world (Al-Shehbaz, 1988; Karaismailoğlu, 2017). Taxa in this family are placed in worldwide, particularly in the North temperate areas and Southwestern and Central Asia. The family has 85 genera and 458 taxa in Turkey (Al-Shehbaz, 2012).

The genus *Cardamine* L. is taxonomically problematic, widespread genus with over 200 Arctic, alpine, and boreal taxa, and is one of the largest genera of the family in terms of number of species (Hewson, 1982; Al-Shehbaz, 1988; Webb et al., 1988; Al-Shehbaz et al., 2006; Carlsen et al., 2009). The number of acknowledged species differs noticeably among various researchers, because of the taxonomic complexity of the genus (Carlsen et al., 2009). As a result of the performed some studies such as Schulz (1903), Al-Shehbaz (1988) and Carlsen et al. (2009), it has been seen that the diversity center of the genus is Eurasia. Genus has about 95 species in Eurasian, 48 species in China and 25 species in Europe involving the Caucasus (Carlsen et al., 2009). Some species of the genus are widely distributed, for example *C. hirsuta* L., *C. flexuosa* With., *C. parviflora* L. and *C. impatiens* L. The new taxa have been discovered since the first revision of the genus (Schulz, 1903); however, species restriction is impractical and the total number of species in *Cardamine* is still controversial (Carlsen et al., 2009). The first sectional division of genus (Schulz, 1903) has been condemned by some researchers for over-emphasis some morphological features (Al-Shehbaz, 1988; Rashid & Ohba, 1993; Carlsen et al., 2009). Some species in *Cardamine* have been analyzed widely with cytological and molecular markers (Lihova et al., 2000, 2003, 2004; Carlsen et al., 2009; Kučera et al., 2010; Karaismailoğlu, 2021). However, the taxonomic usability of the detailed morphological and anatomical characters in the genus has been ignored so far.

The seed coat features are known as important characteristics in taxonomical investigations of the Brassicaceae family (Karaismailoğlu & Erol, 2018). It

is mainly used to resolve classification difficulties regarding closely correlated species, determine their evolutionary connections, and describe their adaptive importance (Kaya et al., 2011; Karaismailoğlu & Erol, 2018). Moreover, many studies have shown that macro and micro characters of the seeds has systematic significance in separating the taxa within the family Brassicaceae (Khalik and Maesen, 2002; Tantawy et al., 2004; Kaya et al., 2011; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a). Also, the anatomical features of the seed coat can contribute to solving the taxonomic problems regarding family. This statement has been supported by performed works on several genera of the family (Vaughan et al., 1976; Ghaempanah et al., 2013; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a). However, there is no study on seed morphology and anatomy of the genus *Cardamine* from Turkey, where is one of the diversity centers of genus with 14 taxa (Mutlu, 2012), so far.

The aim of this investigation is to contribute to the seed morphological and anatomical characteristics of seven *Cardamine* taxa containing *C. bulbifera* Crantz, *C. hirsuta* L., *C. impatiens* var. *pectinata* (Pall. ex DC.) Trautv., *C. lazica* Boiss. & Bal., *C. tenera* Gmel ex Mey., *C. uliginosa* Bieb. and *C. graeca* L. from Turkey and to examine taxonomic uses of these characters at the interspecies level.

MATERIAL and METHODS

This study was planned with 50 seeds belonging to 10 individuals for each taxon taken from different regions of Turkey during the fruiting time. The examined taxa were deposited at SUFAF (Siirt University Flora and Fauna) and given in Table 1.

Table 1. The examined taxa and their locations

Çizelge 1. İncelenen taksonlar ve lokasyonları

| | |
|--|---|
| <i>Cardamine bulbifera</i> Crantz | Ağrı, Patnos, Kizkapan village, stone slopes, 1650 m, 16.5.2015, Karaismailoğlu 160 |
| <i>C. hirsuta</i> L. | Bursa, Uludağ, Aras valley, roadside stony areas, 1650 m, 2.7.2016, Karaismailoğlu 302 |
| <i>C. impatiens</i> var. <i>pectinata</i> (Pall. ex DC.) Trautv. | Bolu, Abant, roadsides, 801 m, 30.4.2015, Karaismailoğlu 132b |
| <i>C. lazica</i> Boiss. & Bal. | Artvin, Hopa, roadsides, stone slopes, 350 m, 6.3.2015, Karaismailoğlu 100b |
| <i>C. tenera</i> Gmel ex Mey. | Kütahya, Gediz, Murat mountain, 1700 m, 23.6.2016, Karaismailoğlu 286 |
| <i>C. uliginosa</i> Bieb. | İstanbul, Büyükçekmece, Beykent, meadows, 80-120 m, 6.7.2016, Karaismailoğlu 310 |
| <i>C. graeca</i> L. | Muğla, Marmaris, Kırzeytin mountain, serpentine rocks, 490 m, 3.4.2015, Karaismailoğlu 122b |

Macromorphological features of the seeds involving color, shape, dimension, and surface characters were analyzed by utilizing an Olympus SZX7 stereomicroscope and Kameram Imaging Software (Figure 1). Micromorphological examinations of the seeds involving surface ornamentation, anticlinal and periclinal cell walls, and the form of epidermal cell

were studied with a JEOL Neoscope-5000 Scanning Electron Microscope (Figure 2). For micromorphological observations, seeds were pasted on the stub with silver adhesive and enclosed with platinum-gold.

Findings of anatomical features were obtained on samples well-preserved in 70% alcohol. Cross-sections

were taken from midpoint of seeds with an automatic microtome (Thermo Shonda Met Finesse). After, they were treated with series of alcohol and xylene, and dyed with hematoxylin in a staining tool (ASC 720 Medite) and covered with Entellan (Figure 3)

(Karaismailoğlu, 2015, 2019a; Karaismailoğlu & Erol, 2018). Anatomical characteristics were detected using an Olympus CX21FS1 microscope and Kameram Imaging Software.



Figure 1. Seeds of the studied taxa: 1- *C. bulbifera*, 2- *C. hirsuta*, 3- *C. impatiens* var. *pectinata*, 4- *C. lazica*, 5- *C. tenera*, 6- *C. uliginosa*, 7- *C. graeca* (scales bars=1 mm)

Şekil 1. Çalışılan taksonların tohumları: 1- *C. bulbifera*, 2- *C. hirsuta*, 3- *C. impatiens* var. *pectinata*, 4- *C. lazica*, 5- *C. tenera*, 6- *C. uliginosa*, 7- *C. graeca* (ölçekler=1 mm)

The terminology of morphological and anatomical characters was performed in accordance with Stearn (1985), Ghaempanah et al. (2013) and Karaismailoğlu and Erol (2018).

The findings were evaluated with SPSS. Duncan's multiple-range test was utilized to define the statistical importance of variations among the quantitative values acquired for taxa (SPSS Inc, 2006). Grouping of taxa was performed with using the clustering assessment method (UPGMA) in accordance with 38 characters in Tables 2 (Figure 4) (Karaismailoğlu and Erol, 2018). Moreover, the

similarity matrix of the examined taxa was created in MVSP (Kovach, 2007).

RESULTS

The seed features of the studied taxa involving color, shape, dimension, and surface from are macromorphologically assessed. Seed colors of the examined taxa are noticed as brown and its tones. *C. impatiens* var. *pectinata* and *C. lazica* taxa are distinctly different from other taxa with their light brown seeds. It has been seen six seed shapes: ovatus in *C. bulbifera*, ellipticus-rectangularis in *C. hirsuta*, rectangularis in *C. impatiens* var. *pectinata*, circularis-

rectangularis in *C. lazica*, ellipticus-late in *C. tenera* and *C. uliginosa*, and ellipticus in *C. graeca*. Seed shape is characteristic in studied taxa, except for *C. tenera* and *C. uliginosa*. The seed dimension varies between 0.91 mm and 2.20 mm in length and between 0.41 mm and 1.65 mm in width. *Cardamine bulbifera*

and *C. graeca* are markedly separate from the rest of the studied taxa in terms of seed dimension. Seed surface structures are smooth, except for *C. graeca* that is of slightly striped. *Cardamine impatiens* var. *pectinata*, *C. tenera* and *C. uliginosa* have raphe on seeds, but not others (Figure 1 and Table 3).

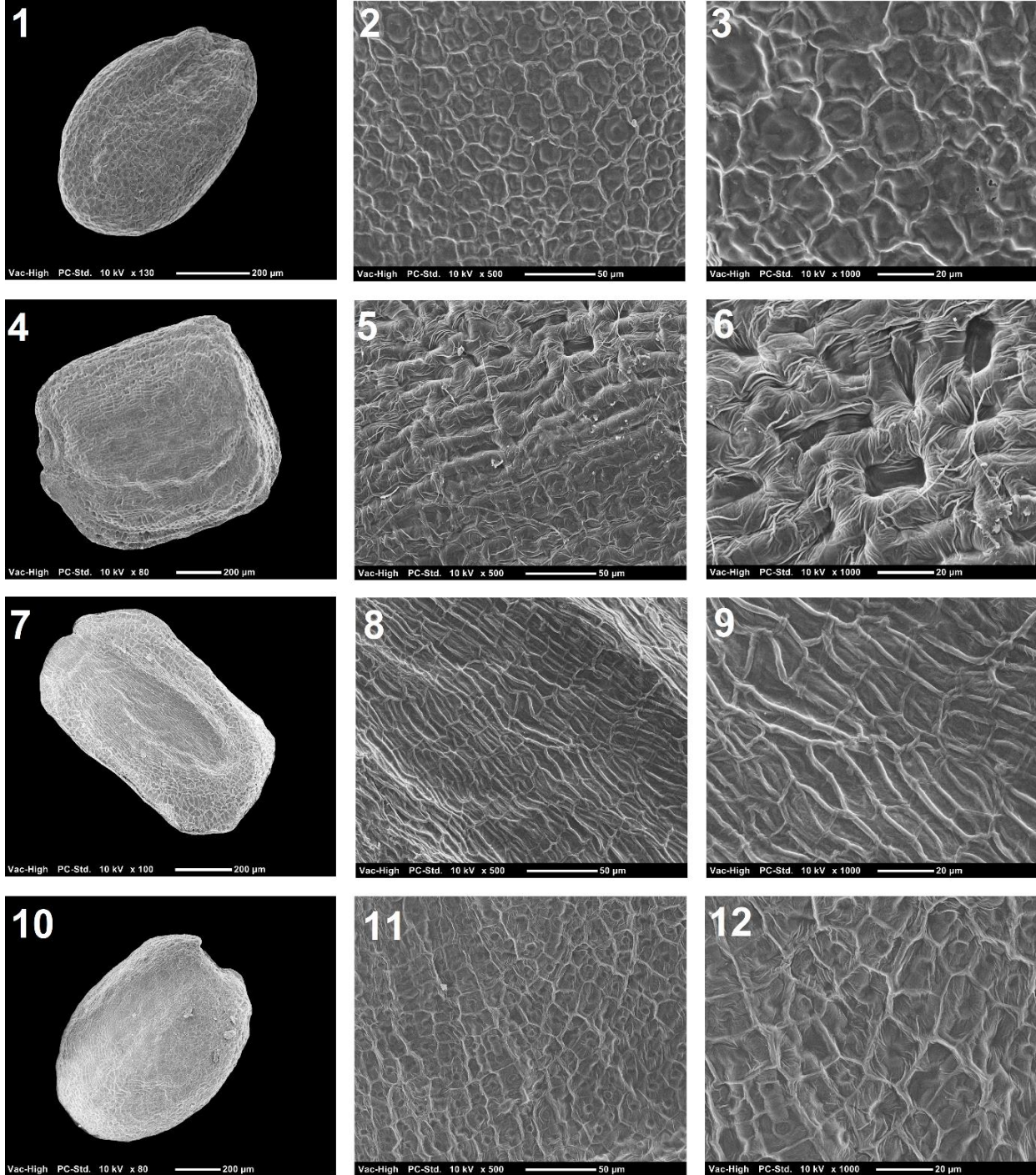


Figure 2. The micromorphological structures of the studied taxa: 1-3 *C. bulbifera*, 4-6 *C. hirsuta*, 7-9 *C. impatiens* var. *pectinata*, 10-12 *C. lazica*.

Şekil 2. Çalışılan taksonların mikromorfolojik yapıları: 1-3 *C. bulbifera*, 4-6 *C. hirsuta*, 7-9 *C. impatiens* var. *pectinata*, 10-12 *C. lazica*.

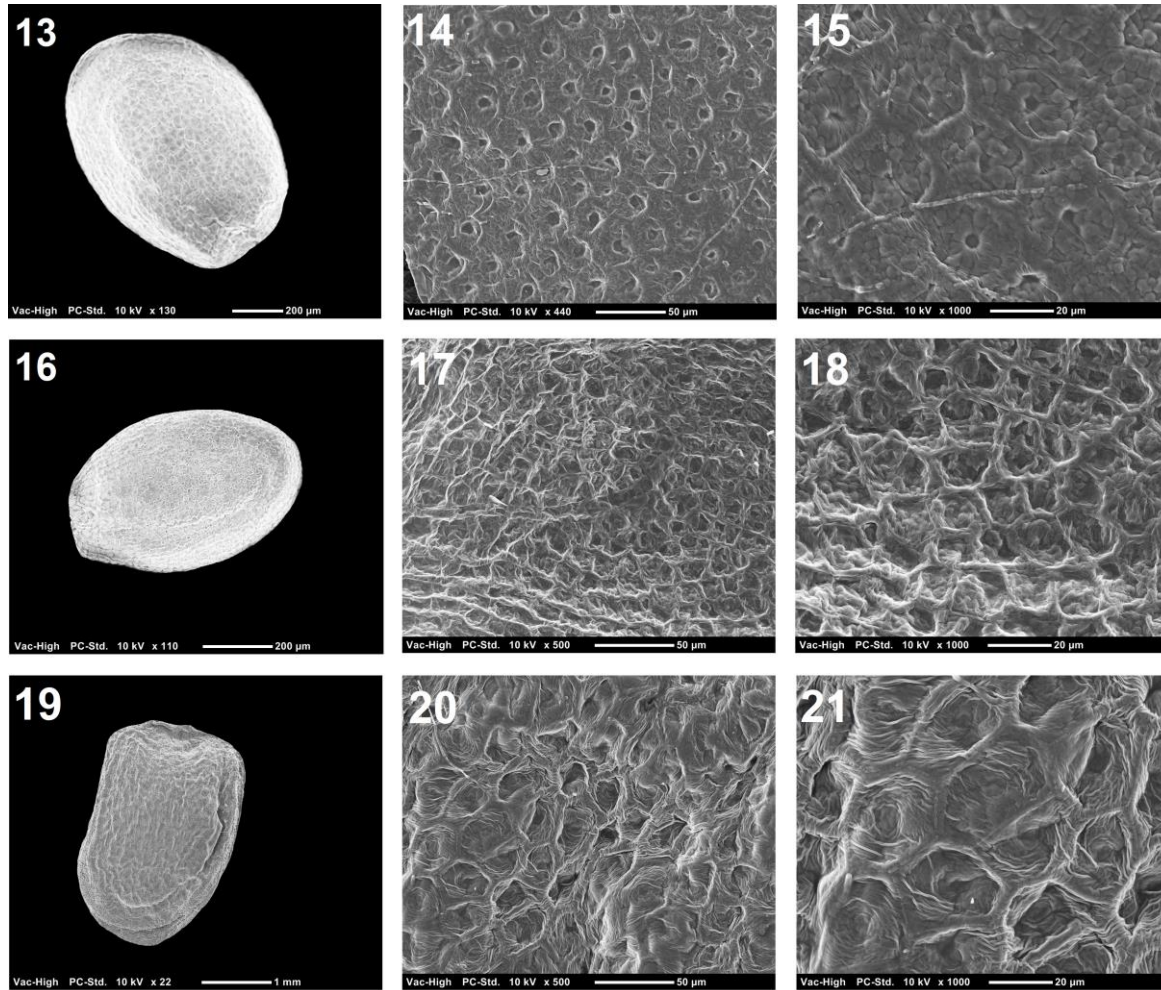


Figure 2. The micromorphological structures of the studied taxa: 13-15 *C. tenera*, 16-18 *C. uliginosa*, 19-21 *C. graeca*.

Şekil 2. Çalışılan taksonların mikromorfolojik yapıları: 13-15 *C. tenera*, 16-18 *C. uliginosa*, 19-21 *C. graeca*.

Table 2. Characters used in statistical analysis and their codes

Çizelge 2. İstatistik analizlerde kullanılan karakterler ve kodları

| Characters (Karakterler) | Codes (Kodlar) |
|---|---|
| Seed color | Dark brown or brown (1), Light brown (2) |
| Seed shape | Ovatus (3), Ellipticus-rectangularis (4), Rectangularis (5) Circularis-rectangularis (6), Ellipticus-late (7), Ellipticus (8) |
| Seed surface | Smooth (9), Slightly striped (10) |
| Seed size | Length (11), Width (12) |
| Raphe | Presence (13) |
| Surface ornamentation | Reticulate-alveolate (14), Scalariform (15), Reticulate (16), Foveate (17), Reticulate-foveate (18) |
| Anticlinal cell walls | Raised (19) |
| Periclinal cell walls | Convex (20), Concave (21) |
| Epidermal cell structure | Polygonal (22), Alveolar (23), Rectangular (24) |
| Anatomical structure of the outer epidermis | Flattened (25), Rectangular (26), Cubic (27) |
| Anatomical structure of the inner epidermis | Flat (28), Rectangular (29), Elongated rectangular (30), Outer testa thickness (31) |
| Inner testa structures | Presence (32), Crushed (33), Flat (34), Thickness (35) |
| Parenchyma cell structures | Flat (36), Thickness (37) |
| Mucilage cell | Presence (38) |

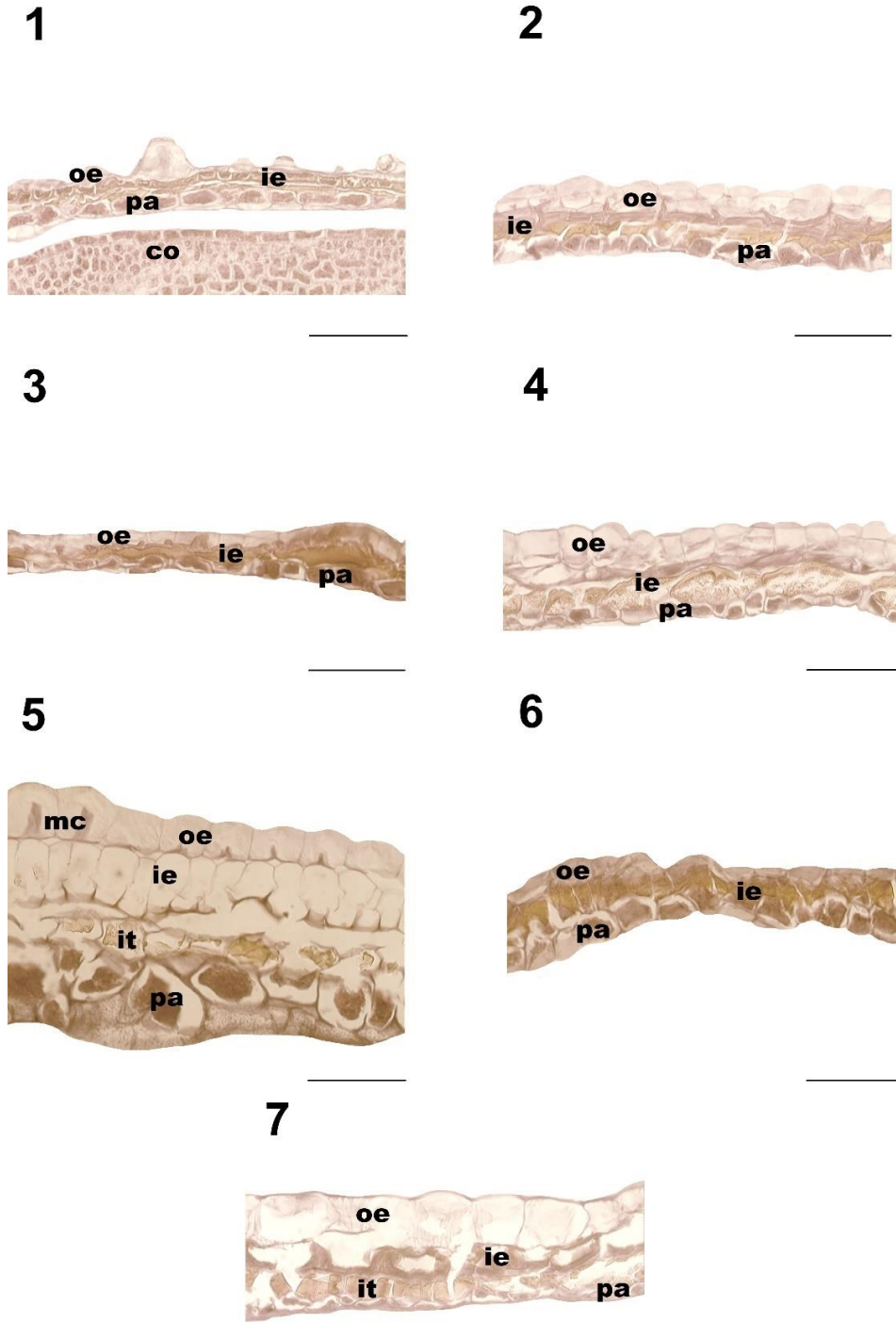


Figure 3. The anatomical structures of the seed testa of the studied taxa: 1- *C. bulbifera*, 2- *C. hirsuta*, 3- *C. impatiens* var. *pectinata*, 4- *C. lazica*, 5- *C. tenera*, 6- *C. uliginosa*, 7- *C. graeca* (oe: outer epidermis, ie: inner epidermis, it: inner testa, co: cotyledon, pa: parenchyma, mc: mucilage cells, scale bars: 100 µm)

Şekil 3. Çalışılan taksonların tohum testalarının anatomik yapıları: 1- *C. bulbifera*, 2- *C. hirsuta*, 3- *C. impatiens* var. *pectinata*, 4- *C. lazica*, 5- *C. tenera*, 6- *C. uliginosa*, 7- *C. graeca* (oe: dış epidermis, ie: iç epidermis, it: iç testa, co: kotyledon, pa: parenkima, mc: musilaj hücreleri, ölçekler: 100 µm)

The surface ornamentation types, anticlinal-periclinal cell walls, and epidermal cell forms of the seeds are micromorphologically researched. The seed surface ornamentation is categorized into five types:

reticulate-areolate, scalariform, reticulate, foveate, reticulate-foveate (Figure 2 and Table 3). The most common types are reticulate and scalariform, seen in *C. hirsuta*, *C. impatiens* var. *pectinata*, *C. lazica* and *C. graeca*. The reticulate-alveolate (in *C. bulbifera*),

foveate (in *C. tenera*), and reticulate-foveate (in *C. uliginosa*) types are each characterized by solely one taxon. While the forms of anticlinal cell walls in the studied taxa are raised, periclinal cell walls are concave except *C. bulbifera* (convex). Moreover, cell shapes on surfaces are very different: polygonal, alveolar and rectangular. The most common cell type is polygonal, whereas rectangular is quite rare types (Table 3).

The outcomes of the anatomical examinations of the seeds are demonstrated in Figure 3 and Table 4. The seed testa of the studied taxa consists of the outer epidermis and inner epidermis (outer testa), rarely inner testa and parenchyma layers. The epidermis layers in outer testa are of either parenchymatic or sclerenchymatic form and occur with two layers involving the outer epidermis and the inner epidermis. According to the obtained observations from the cross-sections, the outer epidermis differs considerably in cell shape (flattened, rectangular or cubic), and wall formation (undulated or straight and thick or thin-walled) (Figure 3). The two most common types are flattened and cubic, however; the rarest one is the rectangular form (Table 4). The inner epidermis includes 1 layer of flat, rectangular and elongated rectangular cells. The average thickness of the outer testa varies between 25.64 μm (in *C. impatiens* var. *pectinata*) and 98.75 μm (in *C. tenera*). The inner testa, which is a compressed tissue under the outer testa, has 1–2 layers of flat, or crushed cells. This layer is seen only in 2 taxa studied, *C. graeca* and *C. tenera*. Its thickness ranges from 21.19 μm (in *C. graeca*) to 48.25 μm (in *C. tenera*) (Figure 3 and Table 4). The parenchyma layer of the examined taxa is 1-layered and comprises of flat cells. The thickness of the parenchyma layer ranges from 11.18 μm to 44.65 μm ; the largest endosperm is observed in *C. tenera* and the thinnest in *C. graeca* (Table 4). In addition, mucilage cells are observed in epidermis layers in seeds of *C. tenera* unlike other taxa (Figure 3 and Table 4).

The numerical assessment of the seed morphological and anatomical features allows the form of a dendrogram, which reveals the variations or resemblances among the studied taxa. A dendrogram is created as a consequence of the cluster analysis of the examined taxa of *Cardamine* built on the difference of 38 characteristics in 7 taxa. The cophenetic correlation coefficient is designed to discover the correlation between the dendrogram and dissimilarity matrix (Table 5 and Figure 4). The cophenetic correlation between the dissimilarity matrix and dendrogram has been computed as 0.68, representing a good match. As a result of the cluster analysis, 2 clusters have emerged; A and B. Cluster A consists of *C. graeca*, *C. impatiens* var. *pectinata* and *C. lazica*. Cluster B contains *C. bulbifera*, *C. tenera*, *C. hirsuta*

and *C. uliginosa* (Figure 4). *C. hirsuta* and *C. tenera* are the most closely related taxa (dissimilarity coefficient: 0.88), as *C. graeca* and *C. uliginosa* are the most distantly related taxa (dissimilarity coefficient: 2.39) (Table 5).

DISCUSSION

The morphological features of the seeds offer valuable data regarding the evolutionary relations of the angiosperms (Corner, 1976). The seed surface, shape, color, and dimension in Brassicaceae family are precious features in separation of the taxa (Barthlott, 1981; Koul et al., 2000; Karaismailoğlu and Erol, 2018). *Cardamine* taxa vary among the species in terms of the seed morphological characters. Seed shape is almost sufficient to distinguish among the examined taxa, it is the same in only *C. tenera*-*C. uliginosa* taxa, different in others. Seed color in the studied taxa is brown and its tones. *C. impatiens* var. *pectinata* and *C. lazica* are easily distinguished from other taxa by having light brown seeds. Seed surface morphology is of the taxonomic importance at the genus and species levels (Brochmann, 1992; Karaismailoğlu and Erol, 2018). *C. graeca* is separated with its slightly striped seed surfaces from other taxa, which have a smooth surface. The macromorphological results of this research are compatible with the former works performed with macromorphological features on seeds of Brassicaceae family (Khalik and Maesen, 2002; Kasem et al., 2011; Kaya et al., 2011; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a, 2019b; Şirin and Karaismailoğlu, 2020).

The significance and efficiency of scanning electron microscopy in explaining of the taxonomic difficulties (Heywood, 1971). Many studies have shown that seed micromorphological features are helpful characteristics to utilize in discriminating of the taxa in Brassicaceae family (Barthlott, 1981; Koul et al., 2000; Kasem et al., 2011; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2016, 2019a, 2019b; Şirin and Karaismailoğlu, 2020). In this work, it has utilized scanning electron microscopy to explain difficulties in taxonomy of taxa, and reveal adaptive significance of seed coat. All of the studied taxa have been examined for the first time. 5 different surface types have found: reticulate, reticulate-foveate, foveate, reticulate-alveolate, and scalariform. Reticulate seed ornamentation type is the most common in Brassicaceae, as indicated in this work (Tantawy et al., 2004). The scalariform ornamentation type has found in the genus *Thlaspi* L., *Aethionema* W.T. Aiton (Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a). Earlier seed exomorphic investigations have demonstrated that the structures of anticlinal-periclinal cell walls are well identification factors at the species level (Barthlott, 1981; Tantawy et al., 2004). Also, the structures of anticlinal-periclinal cell

Table 3. Macro and micro morphological characters of the seeds of the studied taxa.

Çizelge 3. Çalışılan taksonların tohumlarının makro ve mikro morfolojik karakterleri

| Taxa Taksonlar | Color Renk | Shape Şekil | Seed surfaces Tohum yüzeyleri | Seed Sizes* Tohum boyutları L (mm) W (mm) | | Raphe presence Rafe varlığı | Seed surface ornamentations Tohum yüzey ornamentasyonları | Anticlinal cell wall Antiklinal hücre duvarı | Periclinal cell wall Periklinal hücre duvarı | Epidermal cell structures Epidermal hücre yapıları |
|--|----------------|------------------------------|--|---|------------|--------------------------------------|--|--|---|---|
| <i>C. bulbifera</i> | Light Brown | Ovatus | Smooth | 1.03±0.15bc | 0.41±0.04d | - | Reticulate- Alveolate | Raised | Convex | Polygonal and Alveolar cells |
| <i>C. hirsuta</i> | Brown | Ellipticus- Rectangularis | Smooth | 1.09±0.10b | 0.95±0.08b | - | Scalariform | Raised | Concave | Rectangular cells |
| <i>C. impatiens</i> var. <i>pectinata</i> | Light Brown | Rectangularis | Smooth | 0.92±0.08c | 0.63±0.04c | + | Scalariform | Raised | Concave | Rectangular cells |
| <i>C. lazica</i> | Light Brown | Circularis- Rectangularis | Smooth | 1.05±0.06b | 0.91±0.04b | - | Reticulate | Raised | Concave | Polygonal cells |
| <i>C. tenera</i> | Dark Brown | Ellipticus- Late | Smooth | 0.91±0.08c | 0.84±0.06b | + | Foveate | Raised | Concave | Alveolar cells |
| <i>C. uliginosa</i> | Brown | Ellipticus-late | Smooth | 1.14±0.21b | 1.03±0.10b | + | Reticulate-Foveate | Raised | Concave | Polygonal and Alveolar cells |
| <i>C. graeca</i> | Brown | Ellipticus | Slightly striped | 2.20±0.18a | 1.65±0.12a | - | Reticulate | Raised | Concave | Polygonal cells |

*Average value ± standard deviation; means with dissimilar letters are important at P = 0.05 by Duncan's multiple range test, + =present, - =absent, L=length, W=width.

*Ortalama değer ± standard sapma; Farklı harflere sahip ortalamalar Duncan'ın çoklu aralık testine göre P = 0.05'te önemlidir, + =var, - =yok, L=uzunluk, W=genişlik.

Table 4. Testa anatomical characters of the studied taxa

Çizelge 4. Çalışılan taksonların testa anatomik karakterleri.

| Taxa Taksonlar | Outer testa (Dış testa) | | | Inner testa (İç testa) | | Parenchyma layer | | Presence or absence of mucilage cells Musilaj hücrelerinin varlığı veya yokluğu |
|--|--|---|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------------|--|
| | Outer epidermis structures Dış epidermis yapıları | Inner epidermis structures İç epidermis yapıları | Thickness* (µm) Kalınlık | Structure Yapı | Thickness* (µm) Kalınlık | Structure Yapı | Thickness* (µm) Kalınlık | |
| <i>C. bulbifera</i> | 1 layer, flattened cells | 1 layer, flat cells | 32.17±2.54e | - | - | 1 layer, flat cells | 24.16±1.09b | - |
| <i>C. hirsuta</i> | 1 layer, cubic cells | 1 layer, rectangular cells | 51.29±2.35c | - | - | 1 layer, flat cells | 23.79±1.35b | - |
| <i>C. impatiens</i> var. <i>pectinata</i> | 1 layer, rectangular cells | 1 layer, flat cells | 25.64±2.21f | - | - | 1 layer, flat cells | 15.84±2.16c | - |
| <i>C. lazica</i> | 1 layer, cubic cells | 1 layer, flat cells | 44.93±1.78d | - | - | 1 layer, flat cells | 16.11±1.38c | - |
| <i>C. tenera</i> | 1 layer, cubic cells | 1 layer, elongated rectangular cells | 98.75±9.56a | 1-2 layer, crushed cells | 48.45±2.56a | 1 layer, flat cells | 44.65±5.65a | - |
| <i>C. uliginosa</i> | 1 layer, flattened cells | 1 layer, elongated rectangular cells | 55.62±2.55bc | - | - | 1 layer, flat cells | 40.09±2.35a | - |
| <i>C. graeca</i> | 1 layer, cubic cells | 1 layer, flat cells | 60.15±4.17b | 1 layer, flat cells | 21.19±2.09b | 1 layer, flat cells | 11.18±0.58d | - |

*Average value ± standard deviation; means with dissimilar letters are important at P = 0.05 by Duncan's multiple range test, + =present, - =absent.

*Ortalama değer ± standard sapma; Farklı harflere sahip ortalamalar Duncan'ın çoklu aralık testine göre P = 0.05'te önemlidir, + =var, - =yok.

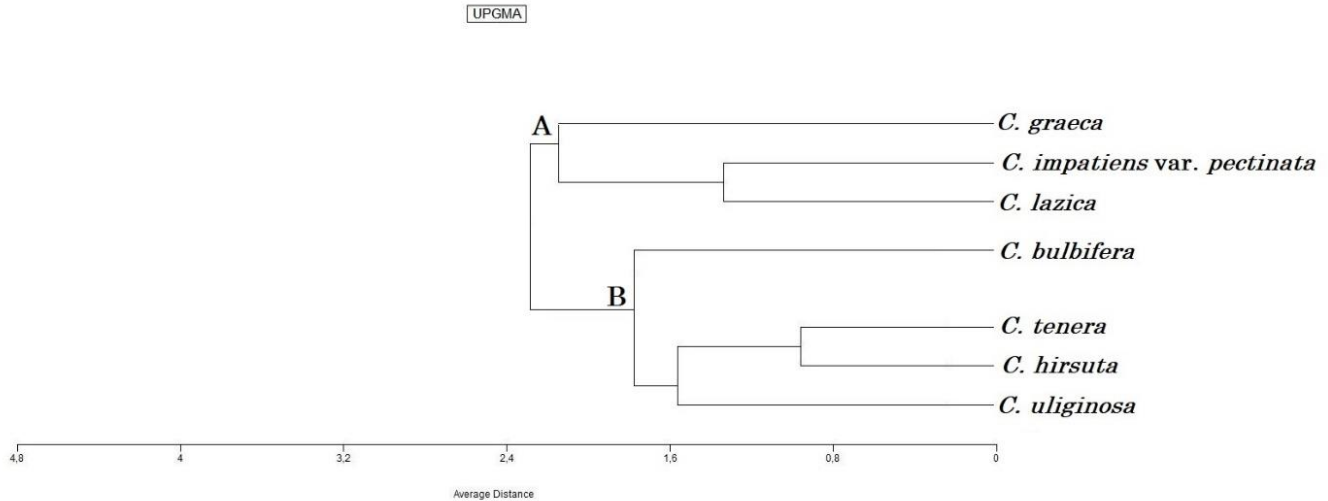


Figure 4. Cluster analysis of the studied taxa.
Şekil 4. Çalışılan taksonların kümeleme analizi

Table 5. The dissimilarity matrix of the studied taxa
Çizelge 5. İncelenen taksonların benzemezlik matrisi.

| Taxa (Taksonlar) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|--|------|------|------|------|------|------|---|
| <i>C. bulbifera</i> (1) | 0 | - | - | - | - | - | - |
| <i>C. hirsuta</i> (2) | 1.87 | 0 | - | - | - | - | - |
| <i>C. impatiens var. pectinata</i> (3) | 2.11 | 2.33 | 0 | - | - | - | - |
| <i>C. lazica</i> (4) | 2.13 | 2.17 | 1.45 | 0 | - | - | - |
| <i>C. tenera</i> (5) | 1.88 | 0.88 | 2.24 | 1.57 | 0 | - | - |
| <i>C. uliginosa</i> (6) | 1.95 | 1.44 | 1.82 | 1.59 | 1.36 | 0 | - |
| <i>C. graeca</i> (7) | 2.29 | 2.35 | 2.16 | 2.36 | 2.31 | 2.39 | 0 |

walls are active in discrimination of the taxa. The type of the anticlinal cell wall is raised, as the type of the periclinal cell wall is concave or convex. Taxa of *Cardamine* are different in terms of epidermal cell shapes. Epidermal cells are polygonal, rectangular or alveolar types. Generally, scanning electron microscope works have revealed that the comprehensive assessment of seed structures of the *Cardamine* taxa is considerably valuable in discriminating taxa from each other.

The performed works on the seed coat anatomy in the Brassicaceae have used to overcome of the taxonomic difficulties (Vaughan et al., 1976; Ghaempanah et al., 2013; Karaismailoğlu and Erol, 2018; Karaismailoğlu, 2019a, 2019b). It has been informed that the seed coat characters can be utilized as consistent characteristics in the taxonomy of the taxa (Koul et al., 2000; Karaismailoğlu and Erol, 2018). The seed testa structures belonging to some genera in Brassicaceae have anatomically defined by Vaughan et al. (1976), Meyer (1973, 1991), Karaismailoğlu and Erol (2018), Karaismailoğlu (2019a, 2020). The seed coat mostly comprises 4 layers, which are the epidermis, the subepidermis, the sclerotic or palisade, and the parenchymatic layers (Bouman, 1975; Ghaempanah et

al., 2013; Karaismailoğlu and Erol, 2018). In this work, anatomical structures of seed coats of the examined taxa have been analyzed in detail for the first time, and it is debated whether the anatomical features of the seeds are able to be utilized for the studied taxa to resolve reported systematic difficulties. The seed coat occurs from discriminated layers as the outer epidermis, the inner epidermis (outer testa) and the parenchymal layer. Contrary to the literature information, there is no inner testa except for *C. tenera* and *C. graeca* taxa.

The anatomical works performed on seed coats of species belonging various genera in Brassicaceae have showed that seed epidermis cell types can be used as a reliable taxonomic character. This character has been found in 15 different types by Vaughan and Whitehouse (1971), and 4 different types by Karaismailoğlu and Erol (2018). In this research, the type of the epidermis quite differs among the taxa. This 1-layered epidermis layers can occur from flat, rectangular, cubic or elongated rectangular. As flat and cubic cells are commonly observed, rectangular cells are the rarest in the studied taxa. The inner testa is the sclerotic or palisade structure, which is a compressed tissue under the outer testa. This layer is

found in only two of the studied taxa (*C. tenera* and *C. graeca*). It consists of 1–2 layers and its cells are be flat or crushed.

The parenchyma thickness of seed coats of the taxa has also been systematically analyzed for the first time in this work, and it is noticed that its features differ among the taxa. The parenchyma thickness ranges from 11.18 µm (*C. graeca*) to 44.65 µm (*C. tenera*). However; The number of layers and cell shape are the same in all taxa examined. Notwithstanding the often mentioned convergence on flowers and fruits in Brassicaceae, epidermis layers, and parenchymal thickness of the seed testa of the studied taxa have demonstrated to be more useful characters than the traditional ones utilized in taxonomy of *Cardamine*. Karaismailoğlu and Erol (2018) had similar outcomes with studying anatomically of *Thlaspi* L. from Turkey. Also, the presence of mucilage cells distinguishes *C. tenera* from others.

A dendrogram was created to assess the morphological and anatomical features of the seeds of the studied *Cardamine* taxa with UPGMA cluster analysis. The dendrogram, showing 2 main groups, was partly similar with the results of Cullen (1965). The morphological and anatomical characters of the seeds have maintained the characters utilized in the ranking of *Cardamine* taxa in the flora of Turkey (Figure 4).

In conclusion, studying the morphological and anatomical characteristics of seeds of the studied taxa of *Cardamine* offers major assists in terms of the systematics of taxa within the genus.

Key to examined *Cardamine* taxa, based on seed characteristics

1. Seed color is light brown 2
2. Seed surface ornamentation is scalariform
C. impatiens var. *pectinata*
2. Seed surface ornamentation is reticulate .*C. lazica*
1. Seed color is brown or dark brown 3
3. Seed shape is ovatus *C. bulbifera*
3. Seed shape is ellipticus, ellipticus-late, ellipticus-rectangularis 4
4. Seed surface ornamentation is scalariform
C. hirsuta
4. Seed surface ornamentation is foveate, reticulate, reticulate-foveate 5
5. Outer testa consists of flattened cells *C. uliginosa*
5. Outer testa does not consist of flattened cells .6
6. Mucilage cells are presence *C. tenera*
6. Mucilage cells are absence *C. graeca*

Statement of Conflict of Interest

Author has declared no conflict of interest.

REFERENCES

Al-Shehbaz IA 1988. The genera of Arabideae (Cruciferae, Brassicaceae) in the southeastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum*, 69: 85-166.
Al-Shehbaz IA, Beilstein MA, Kellogg EA 2006.

Systematics and phylogeny of the Brassicaceae (Cruciferae): An overview. *Plant Systematics and Evolution*, 259: 89-120.
Al-Shehbaz IA 2012. A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, 61(5): 931-954.
Barthlott W 1981. Epidermal and seed surface characters of plants: systematic applicability and some evolutionary aspects. *Nordic Journal of Botany*, 1: 345-355.
Bouman F 1975. Integument initiation and testa development in some Cruciferae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 70: 213-299.
Brochmann C 1992. Pollen and seed morphology of Nordic *Draba* (Brassicaceae): phylogenetic and ecological implications. *Nordic Journal of Botany*, 12: 657-673.
Carlsen T, Bleeker W, Hurka H, Elven R, Brochmann C 2009. Biogeography and Phylogeny of *Cardamine* (Brassicaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 96(2): 215-236.
Corner EJ 1976. *The Seeds of Dicotyledons*. Cambridge: Cambridge University Press.
Cullen J 1965. *Cardamine*. In: Davis, P.H., editor. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Vol. 1, Edinburgh: Edinburgh University Press, 438-444 pp.
Ghaempanah S, Ejtehadi H, Vaezi J, Farsi M 2013. Seed-coat anatomy and microsculpturing of the genus *Erysimum* (Brassicaceae) in Northeast of Iran. *Phytotaxa*, 150: 41-53.
Hewson HJ 1982. *Flora of Australia*. Canberra: Australian Government Publishing Service.
Heywood VH 1971. *Scanning Electron Microscopy*. London: Systematic and Evolutionary Applications.
Karaismailoğlu MC 2016. Addition to characters of endemic *Aubrieta canescens* subsp. *canescens* Bornm. (Brassicaceae) from Turkey. *Bangladesh Journal of Botany*, 45: 509-515.
Karaismailoğlu MC 2017. Palynological features of eleven *Aethionema* taxa from Turkey and their systematic implications. *Bangladesh J Plant Taxon*, 24: 197-204.
Karaismailoğlu MC, Erol O 2018. Seed structure and its taxonomic implications for genus *Thlaspi* sensu lato sections *Nomisma*, *Thlaspi*, and *Pterotropis* (Brassicaceae). *Turkish Journal of Botany*, 42: 591-609.
Karaismailoğlu MC 2019a. Comparative morphology and anatomy of seeds of some *Aethionema* W.T. Aiton (Brassicaceae) taxa from Turkey. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 26(1): 1-12.
Karaismailoğlu MC 2019b. Taxonomical, morphological, palynological, anatomical and ecological investigations on monotypic genus *Pachyphragma* from Turkey. *Pakistan Journal of Botany*, 51: 1021-1026.
Karaismailoğlu MC 2020. Petiole Anatomy of 21

- Representatives of Tribe *Alysseae* (Brassicaceae) from Turkey. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg*, 23: 1535-1544.
- Karaismailoğlu MC 2021. New Chromosome Numbers in Five *Cardamine* Taxa from Turkey. *Cytologia*, 86:11-13.
- Kasem WT, Ghareeb A, Marwa E 2011. Seed morphology and seed coat sculpturing of 32 taxa of family Brassicaceae. *Journal of American Science*, 7: 166-178.
- Kaya A, Ünal M, Özgökçe F, Doğan B, Martin E 2011. Fruit and seed morphology of six species previously placed in *Malcolmia* (Brassicaceae) in Turkey and their taxonomic value. *Turkish Journal of Botany*, 35: 653-662.
- Khalik K, Maesen LJG 2002. Seed morphology of some tribes of Brassicaceae (implication for taxonomy and species identification for the flora of Egypt). *Blumea*, 47: 363-83.
- Koul KK, Ranjna N, Raina SN 2000. Seed coat microsculpturing in *Brassica* and allied genera (subtribes Brassicinae, Raphaninae, Moricandiinae). *Annals of Botany*, 86: 385-97.
- Kovach WL 2007. MVSP - A MultiVariate Statistical Package for Windows, Ver. 3.1. Pentraeth: Kovach Computing Services.
- Kučera J, Marhold K, Lihová J 2010. *Cardamine maritima* group (Brassicaceae) in the amphiadriatic area: A hotspot of species diversity revealed by DNA sequences and morphological variation. *Taxon*, 59(1): 148-164.
- Lihová J, Marhold K, Neuffer B 2000. Taxonomy of *Cardamine amara* (Cruciferae) in the Iberian Peninsula. *Taxon*, 49: 747-763.
- Lihová J, Tribsch A, Marhold K 2003. The *Cardamine pratensis* group (Brassicaceae) in the Iberian Peninsula: Taxonomy, polyploidy and distribution. *Taxon*, 52: 783-802.
- Lihová J, Fuertes Aguilar J, Marhold K, Nieto Feliner G 2004. Origin of the disjunct tetraploid *Cardamine amporitana* (Brassicaceae) assessed with nuclear and chloroplast DNA sequence data. *American Journal of Botany*, 91: 1231-1242.
- Meyer FK 1973. *Conspectus der "Thlaspi"-Arten Europas, Afrikas und Vorderasiens*. Feddes Repertorium, 84: 449-470 (in German).
- Meyer FK 1991. Seed-coat anatomy as a character for a new classification of *Thlaspi*. *Flora et Vegetatio mundi*, 9: 9-15.
- Mutlu B 2012. *Cardamine*. In: Guner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, Babac MT (eds) Türkiye bitkileri listesi (damarlı bitkiler). [A Checklist of the Flora of Turkey (Vascular Plants)]. İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını.
- Rashid A, Ohba H 1993. A revision of *Cardamine loxostemonoides* O. E. Schulz (Cruciferae). *Journal of Japanese Botany*, 68: 199-208.
- Schulz OE 1903. Monographie der Gattung *Cardamine*. *Botanische Jahrbücher für Systematik*, 32: 280-623.
- SPSS Inc 2006. SPSS Base 15.0 for Windows. Chicago: SPSS Inc.
- Stearn WT 1985. *Botanical Latin: History, Grammar Syntax, Terminology, and Vocabulary*. London: David & Charles.
- Şirin E, Karaismailoğlu MC 2020. Contribution to the systematic knowledge of endemic *Aubrieta pinardii* Boiss. (Brassicaceae) from Turkey. *Bangladesh Journal of Plant Taxonomy*, 27(1): 27-35.
- Tantawy ME, Khalifa SF, Hassan SA, Al-Rabiai GT 2004. Seed exomorphic characters of some Brassicaceae (LM and SEM Study). *International Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 6: 821-830.
- Vaughan JG, Whitehouse JM 1971. Seed structure and the taxonomy of the Cruciferae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 64: 383-409.
- Vaughan JG, Phelan JR, Denford KE 1976. *Seed studies in the Cruciferae*. In: Vaughan JG, Macleod AJ, Jones BMG (editors) *The Biology and Chemistry of the Cruciferae*. London: Academic Press, 119-144 pp.
- Webb CJ, Sykes WR, Garnock-Jones PJ 1988. *Flora of New Zealand*. Christchurch: Botany Division, Department of Scientific and Industrial Research.

Biyolojik Preparatların *Halyomorpha halys* (Stål, 1885) (Hemiptera: Pentatomidae)'a Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi

Ali Kaan AŞKIN¹, Şeyma YİĞİT², İzzet AKÇA³, İslam SARUHAN⁴

^{1,2,3,4}Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Samsun, Türkiye

³Agrobigen Ltd. Şti, SamsunTeknopark, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0002-8296-166X>, ²<https://orcid.org/0000-0003-2268-5103>, ³<https://orcid.org/0000-0001-9617-8820>

⁴<https://orcid.org/0000-0003-0229-9627>

✉: ali.askin@omu.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada Nibortem (*Verticillium lecani*), Nostalgist BL (*Beauveria bassiana*) ve Biomagic (*Metarhizium anisopliae*) entomopatojen fungusları içeren ticari preparatlar ile bitkisel ekstraktlı preparat Azadiractin, sentetik insektisit olan Decis'in laboratuvar koşullarında *Halyomorpha halys*'a karşı biyolojik etkinlikleri belirlenmiştir. Çalışmada Azadiractin'in 1.25 ml, 2.5 ml ve 5 ml/500ml su dozları, Nostalgist, Nibortem ve Bio-Magic preparatlarının 1.25 ml/500ml su dozu (1×10^9 kob ml⁻¹) ve Decis'in 0.15 ml/500ml su dozu kullanılmıştır. Her bir tekerrüre 2 ml olacak şekilde spreyleme yapılmıştır. Denemeler 26±2 C° sıcaklık ve %60±2 orantılı nem koşullarında yürütülmüştür. Ticari entomopatojenler içinde Nibortem 7.gün sonunda %72.2 etki göstererek zararlı üzerinde en etkili preparat olarak belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan diğer preparatlardan Bio-Magic %55.6, Nostalgist %38.9 etki göstermiştir. Azadiractin ise en etkili preparat olmuş olup; 5 ml dozda %94.4 etki sağlamıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 04.03.2021

Kabul Tarihi : 07.05.2021

Anahtar Kelimeler

Halyomorpha halys

Biyolojik preparat

Fındık

Determination of Biological Preparations Efficacy Against *Halyomorpha halys* (Stål, 1885) (Hemiptera: Pentatomidae)

ABSTRACT

In this study, the biological efficacy of commercial entomopathogenic fungi, Nibortem (*Verticillium lecani*), Nostalgist BL (*Beauveria bassiana*) and Bio Magic (*Metarhizium anisopliae*), and botanical insecticide Azadiractin, and synthetic insecticide Decis against *Halyomorpha halys* were determined in laboratory conditions. Overall, 1.25 ml, 2.5 ml and 5 ml/500 ml water concentration of Azadiractin, 1.25 ml/500ml water (1×10^9 kob ml) concentration of Nibortem, Nostalgist BL and Bio-Magic, for each, and 0.15 ml/500 ml water concentration of Decis were applied in the study. The 2 ml dose from each of the commercial bioinsecticides were sprayed on *H. halys* for each replication. The experiments were conducted in 26±2 °C temperature and 60±2% humidity conditions. Among the commercial entomopathogens, Nibortem was determined as the most effective preparation on the pest with a 72.2% at the end of the 7th day. Bio-Magic was revealed 55.6 % and Nostalgist BL sustained 38.9% effectiveness. Overall, Azadiractin was conclude as the most effective preparation by 94.4% effectiveness on *Halyomorpha halys* at 5 ml/500 water doses.

Research Article

Article History

Received : 04.03.2021

Accepted : 07.05.2021

Keywords

Halyomorpha halys

Biological preparation

Hazelnut

Atıf İçin: Aşkın AK, Yiğit Ş, Akça İ, Saruhan İ 2022. Biyolojik Preparatların *Halyomorpha halys* (Stål, 1885) (Hemiptera: Pentatomidae)'a Karşı Etkinliğinin Belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 100-104. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.891237>.

To Cite: Aşkın AK, Yiğit Ş, Akça İ, Saruhan İ 2022. Determination of Biological Preparations Efficacy Against *Halyomorpha halys* (Stål, 1885) (Hemiptera: Pentatomidae). KSU J. Agric Nat 25 (1): 100-104. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.891237>.

GİRİŞ

Fındık, sistematikte Fagales takımının Betulaceae familyasının, Coryleae alt familyasının, *Corylus* cinsine dahil olup kuzey yarımkürenin ılıman bölgelerinde yetişmektedir. Fındığın kültür çeşitleri, Türkiye, İtalya, İspanya, ABD, Çin, İran, Yunanistan, Fransa, Rusya Federasyonu, Kırgızistan, Portekiz, Beyaz Rusya, Moldova, Tacikistan, Gürcistan, Azerbaycan, Ukrayna, Tunus, Macaristan, Kıbrıs ve Kamerun'da yetiştirilmektedir (Hızır, 2014). Türkiye 675 bin ton üretim ile dünya fındık üretiminde ve ihracatında lider ülke durumundadır. Dünya fındık üretiminin ortalama %70'ini gerçekleştiren Türkiye'yi, sırasıyla İtalya, Kafkas Ülkeleri (Azerbaycan+Gürcistan), İran, ABD ve İspanya izlemektedir (FAO, 2019).

Dünyada fındık üretiminin bakımından en büyük üretici ülke Türkiye olmasına rağmen, verim bakımından fındık üretimi yapan diğer üretici ülkelerin gerisindedir. Dünya Gıda Örgütü (FAO) verilerine göre 2014-2018 yılları arasındaki ortalama fındık verimi ABD'de 236 kg da, Gürcistan'da 180 kg da, İtalya'da 153 kg da iken, Türkiye'de TÜİK (2019)'e göre 2014-2018 yılları arasındaki verim 76 kg da'dır (Anonim, 2018a). Türkiye'de fındık veriminin düşük olmasının en önemli neden, fındığın çok sayıda zararlısının olması ve bu zararlılar ile mücadelenin tam ve etkili bir şekilde yapılamamasından kaynaklanmaktadır. Dünyada fındık üretiminin yapıldığı ülkelerde, fındığa zarar veren 250 böcek türü belirlenmiş olup, bunların bazıları her yıl önemli miktarda ekonomik zarara neden olmaktadır (Tuncer, 2013; Kılıç, 2014). Fındıklarda görülen en önemli sorunlardan birisi lekeli iç zararı olup, fındık meyvelerinde kalite ve kantite kaybıyla sonuçlanmaktadır. Lekeli iç zararını meydana getiren fındık üretim alanlarında bulunan bazı sokucu-emici böcekler olup, bunların önemli bir kısmı Hemiptera takımı, Heteroptera alttakımında; Pentatomidae, Coreidae ve Acanthosomatidae familyaları içinde yer almaktadır. Bu familyalardan bugüne kadar fındık bahçelerinde 17 türün varlığı tespit edilmiştir. Bu zararlılar türler fındık meyvelerini sokup emmek suretiyle verim ve iç kalitesinin düşmesine neden olmaktadır (Kurt, 1975; Saruhan, 2004; Tuncer ve ark., 2005). Ülkemizde sokucu emici böcekler içerisinde uzun yıllardan beri bilinen en önemli tür *Palomena prasina* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) olmasına karşın, son yıllarda Gürcistan sınır bölgesinden Türkiye'ye giriş yapan ve günden güne fındık üretim alanlarına yayılan Kahverengi kokarca türü önem kazanmaya başlamıştır.

Kahverengi kokarca, [*Halyomorpha halys* (Stål) (Hemiptera: Pentatomidae)] en bilinen istilacı ve sokucu-emici zararlı böceklerden biridir. Çin, Japonya, Kore ve Tayvan'a özgüdür. Dünya çapında yüksek bir

istila yeteneğine ve yayılma oranına sahiptir (Zhu ve ark., 2016). Bu istilacı tür ilk olarak 1990'ların ortalarında Pennsylvania'da (ABD) kaydedilmiş ve şu anda ABD'nin 44 eyaleti ve Kanada'nın 4 bölgesinde bulunmaktadır (Hoebeke ve Carter, 2003; Anonim, 2018b).

Avrupa'da, ilk olarak 2004 yılında İsviçre'de tespit edilmiştir (Haye ve ark., 2015). Daha sonra bir çok Avrupa ve Asya ülkesinde *H. halys*'in varlığı bildirilmiştir. Kahverengi kokarca Türkiye'de ilk kez İstanbul'da Cerçi ve Kocak (2017) ve Gürcistan sınırına yakın Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yer alan Artvin'de 2017 yılında Güncan ve Gümüş (2019) tarafından kaydedilmiştir. Özellikle son yıllarda Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Artvin'den Trabzon Hayrat ilçesine kadar yayıldığı bildirilmiştir (Ak ve ark., 2019). *H. halys*, kışı ergin halde çoğunlukla ev, depo gibi kapalı mekânların korunaklı kısımlarında geçirmektedir. Kışlayan erginler ortalama sıcaklık 17°C'ye ulaştığında kışladığı yerlerden çıkarak 2-3 hafta beslendikten sonra çiftleşerek genellikle yumurtalarını yaprakların alt yüzeyine 14 veya 28'lik kümeler halinde bırakmaktadırlar. İlk dönem nimfler yumurta paketi etrafında toplu halde kümelenir, ikinci nimf döneminden itibaren dağılır. 5 nimf dönemi geçirdikten sonra ergin olmaktadır. Dağılan nimf ve erginler konukçularının yeşil aksam, meyvelerinde beslenmeye başlar ve haziran, temmuz ve ağustos aylarında devam etmektedir. Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yılda 1-2 döl verir (Anonim, 2021). *H. halys*'in ergin ve nimfleri konukçu bitkilerin öz suyunu emerek zarar yapmaktadırlar. Meyve ile beslenmesi sonucunda meyvede yara izleri, çukurlar, şekilsizlikler ve renk değişimleri meydana gelmekte, böceğin beslenme esnasında salgıladığı salgılar meyvede acılaşıma ve taşlaşmaya neden olduğu bildirilmiştir (Nielsen ve Hamilton, 2009; Leskey ve ark., 2012a,b; Rice ve ark., 2014; Scheihing ve ark., 2016). Bu zararlı tür, Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve Gürcistan'da meyve ve sebzelere verdiği zarar sonucu milyonlarca dolarlık ekonomik kayba neden olmuştur (Leskey ve ark., 2012a). *H. halys* ile mücadelede zararlı olarak kapalı alanları (ev, depo, işyeri vb.) tercih ettiği için kışlaklara çekilme döneminin başlamasından itibaren kümelendiği noktalardan toplanıp imha edilerek mekanik mücadele yapılmalıdır. Kimyasal mücadele ise fındığın iç doldurma döneminde ilk erginler görüldüğünde zararlıya karşı 1. ilaçlama yapılır. Yumurtadan çıkan 1. dönem nimflerin görülmesiyle birlikte fındığın iç doldurma döneminde 2. ilaçlama, yeni nesil erginlere karşı da fındığın olgunlaşma döneminde 3. ilaçlama önerilir. Türkiye'de *H. halys* zararlısına karşı ruhsatlı bir bitki koruma ürünü bulunmamaktadır. Ancak geçici tavsiye ile kullanılabilen çeşitli aktif maddeli (Acetamiprid ve Deltamethrin) preparatlar bulunmaktadır. Kimyasal mücadelede kullanılan

ilaçların insan ve hayvan sağlığına, çevreye olan olumsuz etkilere neden olmaktadır.

Bu nedenle ele alınan bu çalışmada Azadirachtin, Nibortem, Nostalgist BL ve Bio-Magic gibi biyolojik preparatlar *Halyomorpha halys* erginlerine laboratuvar koşullarında biyolojik etkinlikleri belirlenmiştir.

Çizelge 1. Denemede kullanılan preparatlar ve etken maddeleri

Table 1. Materials and active ingredients used in the experiment

| Izolot ve insektisitler <i>Isolates and insecticides</i> | Etken Madde <i>Active ingredient</i> | Etken Madde Oranı <i>Rate of active ingredient</i> | Formülasyon <i>Formulation</i> | Doz (ml/500ml su) <i>Dose</i> |
|---|---|---|-----------------------------------|-------------------------------------|
| Bio- Magic | <i>Metarhizium anisopliae</i> strain Ma-1 | 1x10 ⁹ kob ml ⁻¹ | SL | 1.25 |
| Nibortem | <i>Verticilium lecanii</i> strain V1-1 | 1x10 ⁹ kob ml ⁻¹ | SL | 1.25 |
| Nostalgist BL | <i>Beauveria bassiana</i> strain Bb-1 | 1x10 ⁹ kob ml ⁻¹ | SL | 1.25 |
| Nimbecidine | Azadirachtin | 0,3 g l ⁻¹ | EC | 1.25, 2.5, 5 |
| Decis | Deltamethrin | 25 g l ⁻¹ | EC | 0.15 |

Halyomorpha halys Erginlerinin Elde Edilmesi

Çalışmada kullanılan *Halyomorpha halys* erginleri Artvin ili Kemalpaşa ilçesi 2020 yılı Eylül ayı itibariyle fındık, turuncgil ve fasulye bitkisinden darbe (3*3,5 metre ebatlarında bez örtü) ve atrap yöntemleri kullanılarak toplanmış ve laboratuvar ortamına getirilmiştir (Anonim, 2021).

Ticari Preparatların Uygulanması

Çalışmada püskürtme yöntemi kullanılmıştır. Denemeler 26±2 C° sıcaklık ve %60±2 orantılı nem koşullarında yürütülmüştür. Deneme için 1 kg'lık kaplar kullanılmış ve bu kaplar içerisine saf su ile nemlendirilmiş kurutma kağıtları konulmuş ve erginlerin beslenmesi için belli miktarda yem olarak fasulye bitkisi konulmuştur. Sonra her bir kaba 5 ergin konulmuştur. Her bir tekerrüre 2 ml olacak şekilde farklı dozları hazırlanarak spreyleme yapılmış ve kontrol uygulamasında sadece saf su kullanılmıştır (Çizelge 1). Her preparatın denemesi 4 tekerrür olarak kurulmuştur. İlk sayım 24 saat sonra, sonraki sayımlar 24 saatte bir yapılmış ve 7 gün boyunca sayıma devam edilmiştir. Çizelge oluşturulup canlı, ölü sayımları kaydedilmiştir. Ancak verilerin değerlendirilmesinde 3., 5. ve 7. gün elde edilen veriler dikkate alınmıştır.

Verilerin Değerlendirilmesi

Ölüm oranlarının belirlenmesinde; elde edilen verilere tek yönlü varyans analizi uygulanmış ve ortalamalar arasındaki fark Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir. Ayrıca yüzde ölüm oranlarına Abbot formülü uygulanarak preparatların biyolojik etkinlik oranları (% etki) belirlenmiştir (Abbott, 1925). Çalışmada ölüm zamanları (LT₅₀ ve LT₉₀) belirlenmesi için Probit analiz programı kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde SPSS (ver. 21) paket programından yararlanılmıştır.

MATERYAL ve METOT

Halyomorpha halys erginlerine karşı biyoinsektisitler ve sentetik insektisitlerden Decis çalışmada kullanılmıştır (Çizelge 1.).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Halyomorpha halys erginlerine karşı yapılan çalışma sonucunda elde edilen biyolojik etkinlik verileri Çizelge 2. 'de verilmiştir. Azadirachtin'in farklı dozlarının *H. halys* erginlerine etkisi Çizelge 2.'de görüldüğü üzere doz arttıkça ve zaman bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Çalışmada 7. günün sonunda Azadirachtin'in 1.25 ml, 2.5 ml ve 5 ml dozlarında meydana getirdiği biyolojik etkiye bakıldığında sırasıyla %33.3, %66.7 ve %94.4 etki olduğu tespit edilmiştir. Lethal time değerleri ise doz'a bağlı olarak kısalmıştır. En yüksek doz olan 5 ml dozunda LT₅₀ ve LT₉₀ değerleri sırasıyla 2.59 ve 5.96 olarak tespit edilmiştir. Entomopatojen fungus içeren preparatlar Nibortem, Nostalgist BL ve Bio-Magic'in 7. gün sonunda biyolojik etkinlik oranları sırasıyla %72.2, %38.9 ve %55.6 olarak tespit edilmiştir. Zamana bağlı olarak her üç preparatta da biyolojik etkinlik oranlarının arttığı gözlenmiş olup, LT₅₀ değerleri sırasıyla 5.57, 7.42 ve 6.40 bulunmuştur. LT₉₀ değer ise 9.12, 10.32 ve 10.14 olarak belirlenmiştir. Sentetik insektisit olan Decis ise 3. günde %95, 5. günde %100 ölüm görülmüştür.

H. halys; konukçu dizini geniş, polifag bir zararlıdır. Bu zararlı Karadeniz bölgesi üretiminde önemli sırada yer alan fındıkta da ciddi kayıplara neden olma potansiyeli vardır. Türkiye'ye son yıllarda giriş yapması itibariyle yapılan çalışmalar sınırlı sayıdadır. Morehead ve Kuhar (2017) *H. halys* mücadelesinde pyrethrin, azadirachtin, spinosad gibi biyolojik preparatların ve kombinlerinin kullanıldığı çalışmada azadirachtinin büyük oranda etkili olduğunu belirtmektedirler. Diğer Pentatomidae'lerin mücadelesinde azadirachtin ve biyolojik preparatların kullanımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Yiğit ve Saruhan (2020) yaptıkları çalışmada bazı entomopatojen fungus içeren [*Paecilomyces fumosoroseus* (Priority), *M. anisopliae* (Bio-Magic),

Verticillium lecanii strain V1-1 8 (Nibortem), *Beauveria bassiana* strain Bb-1 (Nostalgist BL)], entomopatojen bakteri içeren ticari preparatlar [Spinosa (*Saccharopolyspora spinosa*), *Bacillus thuringiensis* (27-1A) ve *B. megaterium* (Akça)], bitkisel kökenli preparat Azadiractin ve sentetik insektisit olan Proteus 'un laboratuvar koşullarında *Graphosoma lineatum* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae)'a karşı biyolojik etkinliklerini belirlemiştir. Çalışmada

kullanılan ticari entomopatojen preparatlar 250 ml/da dozda (1×10^9 kob ml^{-1}); Priority %95.45, Bio Magic %81.82, Nibortem %68.18 ve Nostalgist %100 etki gösterdiği bildirilmiştir. Azadiractin ise sentetik insektisite benzer olarak %90 etkili olmuştur. Biyolojik kökenli insektisitlerden *S. spinosa* sentetik kökenli insektisitler kadar etki gösterdiği belirtilmiştir. Bunun böcek mücadelesinde etkin bir rol oynadığı belirlenmiştir.

Çizelge 2. Çalışmada kullanılan materyallerin *Halyomorpha halys*'e karşı biyolojik etkinlikleri
Table 2. Biological efficacy of the preparations used in the study against *Halyomorpha halys*

| Biyolojik etkinlik oranı (%) (Biological activity rate(%)) | | | | | | |
|--|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------|------------------|
| Preparatlar Materials | Dozlar (ml 500 ml su) Doses | 3. gün 3 th Day | 5.gün 5 th Day | 7.gün 7 th Day | LT ₅₀ | LT ₉₀ |
| | 1.25 | 0.0±0.0 d | 11.8±3.9 ef | 33.3±0.0 d* | 7.80 | 10.47 |
| Azadiractin | 2.5 | 10.0±5.8 cd | 31.6±5.3 cd | 66.7±6.4 bc | 6.04 | 9.01 |
| | 5 | 55.0±5.0 b | 84.2±5.3 b | 94.4±5.5 a | 2.59 | 5.96 |
| Nibortem | 1.25 | 20.0±0.0 c | 36.8±0.0 c | 72.2±5.5 b | 5.57 | 9.12 |
| Nostalgist | 1.25 | 0.0±0.0 d | 21.1±5.3 de | 38.9±5.5 d | 7.42 | 10.32 |
| Biomagic | 1.25 | 10.0±5.8 cd | 36.8±8.6 c | 55.6±9.1 c | 6.40 | 10.14 |
| Decis | 0.15 | 95.0±5.0 a | 100.0±0.0 a | 100.0±0.0 a | 1.09 | 2.60 |

*Verilere tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup, ortalamalar arasındaki farklılıklar 0.05 önem seviyesinde DUNCAN testine göre ortaya konulmuştur. Aynı sütundaki farklı küçük harfler istatistiksel açıdan farklılık ifade eder.

*One-way analysis of variance was applied to the data and the differences between the means were determined according to DUNCAN test at 0.05 significance level. Different lowercase letters in the same column represent statistical differences.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışma kimyasal mücadelenin zararları etkilerini azaltıp, kullanımı sınırlayacak şekilde bazı biyolojik preparatların etkisinin belirlenmesi amacıyla yapılmıştır. Çalışma sonucunda bitkisel kökenli preparat olan Azadiractin'in farklı dozları ve entomopatojen fungus preparatları olan Nibortem, Nostalgist BL ve Bio-Magic preparatları arasında Nibortem'in tek uygulama dozu olan 1.25 ml/500ml (1×10^9 kob ml^{-1}) su dozunda ve Azadiractin'in 5 ml/500ml su dozunun *Halyomorpha halys* erginlerine karşı önemli düzeyde etkili olduğu bulunmuştur. *H. halys* ülkemiz tarımsal yetiştiricilik alanlarında son yıllarda görülen istilacı bir zararlıdır. Bu zararlıyla mücadelede öncelikle mekanik yöntemler ön plana çıkmaktadır. Bu zararlının kışlaklara çekilme döneminin başlamasından itibaren kümelendiği noktalardan kitle halinde toplanıp imha edilmesi, popülasyon yoğunluğunun azaltılması açısından önerilmektedir. *H. halys*'le kimyasal mücadelede ülkemizde geçici ruhsat almış Acetamiprid ve Deltamethrin aktif maddeli ticari preparatlar, geçici tavsiye ile sınırlı bir süre fındık alanlarında *H. halys* zararlısına karşı kullanılmıştır. Fındıkta görülen zararlı ve hastalıklara karşı kimyasal mücadelenin yapıldığı ve günden güne de arttığı görülmektedir. Ancak son yıllarda kullanılan kimyasalların başta insanlar olmak üzere çevreye olan olumsuz etkilerinden dolayı kısıtlanmasına gidilerek alternatif yöntemler önem kazanmaktadır.

Yapılan bu çalışmada da elde edilen sonuçlar kimyasal mücadeleye alternatif olacak niteliktedir. Ancak yapılan bu laboratuvar çalışmaları, arazi çalışmaları ile desteklendiği zaman daha başarılı sonuçlar alınacağı 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

- Abbott WS 1925. A Method of Computing the Effectiveness of An Insecticide. J. Econ. Entomol 18(2): 265-267.
- Ak K, Uluca M, Aydın Ö, Gokturk T 2019. Important Invasive Species and Its Pest Status in Turkey: *Halyomorpha halys* (Stål) (Heteroptera: Pentatomidae). J Plant Diseases and Protec 126(5): 401-408.
- Anonim 2018a. Fındık Değerlendirme Raporu. <https://www.tarimorman.gov.tr/BUGEM/Belgeler/FındıkDeğerlendirmeRaporu.pdf>. (Alınma Tarihi: 22.02.2021).
- Anonim 2018b State-by-state Stop *Halyomorpha halys*: Management of Brown Marmorated Stink Bug in US Specialty Crops. <https://www.stopbmsb>.

- org/ whereis-bmsb/state-by-state/ (Alınma tarihi: 20.02.2021).
- Anonim 2021. Bitki Zararlıları Zirai Mücadele Teknik Talimatları. <https://www.tarimorman.gov.tr/TAGEM/Belgeler/BitkiSagligi/Bitki%20Zarar%C4%B1lar%C4%B1%20Zirai%20M%C3%BCcadele%20Teknik%20Talimatlar%C4%B1.pdf>. (Alınma Tarihi: 20.02.2021).
- Cerci B, Kocak O 2017. Further Contribution to The Heteroptera (Hemiptera) Fauna of Turkey with A New Synonymy. *ActaBiologica Turcica* 30(4): 121-127.
- Fao 2019. Dünyada Fındık Üretimi, 2014-2018. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC> (Alınma Tarihi: 20.02.2021).
- Guncan A, Gumus E 2019. Brown Marmorated Stink Bug, *Halyomorpha halys* (Stål, 1855) (Hemiptera: Heteroptera, Pentatomidae) A New and Important Pest in Turkey. *Entomol News* 128(2): 204-210.
- Haye T, Garipey T, Hoelmer K, Rossi JP, Streito JC, Tassus X, Desneux N 2015. Range Expansion of The Invasive Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys*: An Increasing Threat to Field, Fruit and Vegetable Crops Worldwide. *Journal of Pest Science* 88(4): 665-673.
- Hızır 2014. Düzce İli Fındık Bahçelerinde Zararlı Böcek Türlerinin Tespiti. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 92sy.
- Hoebeke ER, Carter ME 2003. *Halyomorpha halys* (Stal) (Heteroptera: Pentatomidae): a polyphagous plant pest from Asia newly detected in North America. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 105(1): 225-237.
- Kılıç B 2014. Giresun İli Merkez, Bulancak, Espiye, Görele, Keşap ve Tirebolu İlçelerinde Fındık Üreticilerinin Bitki Koruma Yönünden Karşılaştıkları Sorunlar ile Tarımsal İlaç Kullanım Durumunu Etkileyen Faktörlerin Değerlendirilmesi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 109sy.
- Kurt MA 1975. Doğu Karadeniz Fındıklarında Zarar Yapan *Palomena prasina* (Heteroptera: Pentatomidae)'nın Biyo-Ekolojisi Üzerine Araştırmalar. Gıda-Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Zirai Mücadele ve Zirai Karantina Genel Müdürlüğü, Samsun Bölge Zirai Mücadele Araştırma Enstitüsü Yayınları No: 25, Samsun.
- Leskey TC, Hamilton GC, Nielsen AL, Polk DF, Rodriguez-Saona C, Bergh JC, Wright SE 2012a. Pest Status of The Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys* in The USA. *Outlooks on Pest Management* 23(5): 218-226.
- Leskey TC, Wright SE, Short BD, Khirmian A 2012b. Development of Behaviorally Based Monitoring Tools for The Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys* (Stål)(Heteroptera: Pentatomidae) in Commercial Tree Fruit Orchards. *J. Entomol. Sci* 47: 76-85.
- Morehead JA, Kuhar TP 2017. Efficacy of Organically Approved Insecticides Against Brown Marmorated Stink Bug *Halyomorpha halys* and Other Stink Bugs. *Journal of Pest Science* 90(4): 1277-1285.
- Nielsen AL, Hamilton GC 2009. Seasonal Occurrence and Impact of *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in Tree Fruit. *Journal of Economic Entomology* 102(3): 1133-1140.
- Rice KB, Bergh CJ, Bergmann EJ, Biddinger DJ, Dieckhoff C, Dively G, Tooker JF 2014. Biology, Ecology, and Management of Brown Marmorated Stink Bug (Hemiptera: Pentatomidae). *Journal of Integrated Pest Management* 5(3): A1-A13.
- Saruhan İ 2004. Karadeniz Bölgesi Fındık Üretim Alanlarında Görülen Fındık Kokarcası (*Palomena prasina* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae))'nin Biyoloji, Popülasyon Yoğunluğu ve Zarar Şekli Üzerine Araştırmalar. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, 122sy.
- Scheihing B, Estes KA, McCravy KW 2016. First Record of The Invasive Pest *Halyomorpha halys* (Hemiptera: Pentatomidae) in McDonough County, and Its Current Distribution in Illinois. *Illinois State Academy of Science, Illinois*, 109 p.
- SPSS I. (2012). SPSS version 21.0. IBM SPSS, Chicago, Illinois, USA.
- Tuncer C 2013. Fındık Zararlıları Web Sitesi. Hazelnut Pests Homepage. <http://www.findikci.net>. (Alınma tarihi: 15.01.2021).
- Tuncer C, Saruhan I, Akca I 2005. The Insect Pest Problem Affecting Hazelnut Kernel Quality in Turkey. VI International Congress on Hazelnut 27-28 July 2005, Spain.
- Tüik 2019. Bitkisel Üretim İstatistikleri, 2014-2018. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2020-33737> (Alınma Tarihi: 20.02.2021).
- Yiğit Ş, Saruhan İ 2020. Evaluation of Biocontrol Agents for *Graphosoma lineatum* (L.) (Hemiptera: Pentatomidae) in Experimental Conditions. *International Journal of Tropical Insect Science* 1-6.
- Zhu G, Garipey TD, Haye T, Bu W 2016. Patterns of Niche Filling and Expansion Across The Invaded Ranges of *Halyomorpha halys* in North America and Europe. *J Pest Sci* 90(4): 1045-1057.

Efficacies of Entomopathogenic Fungi from *Metarhizium*, *Beauveria* and *Isaria* on German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Blattaria: Blattellidae)

Mehmet Kubilay ER¹, Hasan TUNAZ², Ali Arda IŞIKBER³

^{1,2,3}KSÜ, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Avşar Kampüsü, 46100 Onikişubat/ Kahramanmaraş

¹<https://orcid.org/0000-0003-1568-8656>, ²<https://orcid.org/0000-0003-4942-6056>, ³<https://orcid.org/0000-0003-1236-4648>

✉: mker@ksu.edu.tr

ABSTRACT

Blattella germanica is an important pest and able to transmit various pathogens and parasites of human, cause allergic reactions and food contamination. Due to risks and problems related to currently employed chemicals for their control, use of entomopathogenic fungi as alternative control approach has been under investigation. In this study, seven entomopathogenic fungi isolated from soil samples and five fungal isolates obtained from entomopathogenic fungal cultures have been tested against *B. germanica*. The fungi belong to the species *Beauveria bassiana* (3 isolates), *Metarhizium anisopliae* (4 isolates), *Isaria tenuipes* (1 isolate), *I. fumosorosea* (3 isolates), and *I. farinosa* (1 isolate). Conidial suspensions of all twelve isolates were applied at 1×10^7 conidia ml^{-1} concentration to ten insects in each replication. Tests were carried out at $26 \pm 2^\circ\text{C}$, $65 \pm 5\%$ relative humidity in darkness with three replications. Eight isolates were found effective on *B. germanica* with mortalities varying between 60.0% and 96.7% in 14 days. The results indicated that *Metarhizium* isolates had the highest efficacies (83.3-95.8%) followed by *Beauveria* isolates (70.8-79.2%) and the isolates of *Isaria* had the lowest efficacies (50.0-70.8%). These isolates were as effective as the previously reported isolates of the same species with higher efficacy values. The most effective two isolates of *M. anisopliae* (S8-2 and S11-6) appear to be worth investigating further for developing a microbial control agent against cockroaches.

Research Article

Article History

Received : 16.02.2021

Accepted : 29.03.2021

Keywords

Cockroaches
Biological control
Microbial control
Hypocreales
Cordysipitaceae

Metarhizium, *Beauveria* ve *Isaria*'ya Bağlı Entomopatojen Fungusların Alman Hamamböceğine, *Blattella germanica* (L.) (Blattaria: Blattellidae), Etkinlikleri

ÖZET

Blattella germanica önemli bir zararlı olup insanların patojen ve parazitlerini taşıyabilmekte, alerjik reaksiyonlara ve yiyecek kontaminasyonlarına neden olabilmektedir. Mücadelesinde bugün için kullanılan kimyasallarla ilişkili riskler ve problemlerden dolayı alternatif yaklaşım olarak entomopatojen fungusların kullanımı araştırılmaktadır. Bu çalışmada, toprak örneklerinden izole edilmiş yedi ve entomopatojen fungus kültürlerinden beş entomopatojen fungus izolatu *B. germanica*'ya karşı test edilmiştir. Bu funguslar *Beauveria bassiana* (3 izolat), *Metarhizium anisopliae* (4 izolat), *Isaria tenuipes* (1 izolat), *I. fumosorosea* (3 izolat), ve *I. farinosa* (1 izolat) türlerinde yer almaktadır. Tüm izolatlara ait konidi süspansiyonları 1×10^7 konidi ml^{-1} konsantrasyonunda her tekrerde on böceğe uygulanmıştır. Testler $26 \pm 2^\circ\text{C}$, $\%65 \pm 5$ nispi nemde karanlıkta üç tekrerli olarak yürütülmüştür. *B. germanica*'ya karşı etkili bulunan sekiz izolat 14 günde $\%60.0$ ve $\%96.7$ arasında değişen ölümlere neden olmuştur. Sonuçlar *Metarhizium* izolatlarının en yüksek etkinliğe ($\%83.3-95.8$) sahip olduğunu, bunu *Beauveria* izolatlarının ($\%70.8-79.2$) izlediğini ve en düşük etkinliğe *Isaria* izolatlarının ($\%50.0-70.8$) sahip olduğunu işaret etmektedir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 16.02.2021

Kabul Tarihi : 29.03.2021

Anahtar Kelimeler

Hamamböceği
Biyolojik mücadele
Mikrobiyal mücadele
Hypocreales
Cordysipitaceae

Bu izolatlar aynı türden raporlanmış önceki izolatlar kadar virulent olup daha yüksek etkinlik değerleri elde edilmiştir. *M. anisopliae*'nin en etkili iki izolatı (S8-2 ve S11-6) hamamböceğine karşı mücadele etmeni olarak geliştirilmek için üzerinde çalışılmaya değer mikrobiyal mücadele etmenleri olarak tespit edilmiştir.

To Cite: Er MK, Tunaz H, Işıkber AA 2022. Efficacies of entomopathogenic fungi from *Metarhizium*, *Beauveria* and *Isaria* on German cockroach, *Blattella germanica* (L.) (Blattaria: Blattellidae). KSU J. Agric Nat 25 (1): 105-112. DOI: 10.18016/ksutarimdogva.vi.881220.

INTRODUCTION

Blattella germanica (L.) (Blattaria: Blattellidae), the German cockroach, is an important pest as it is able to transmit various bacterial and fungal pathogens and parasites of human being, and therefore spread serious diseases (Ahmad et al., 2011; Graczyk et al., 2005; Kassiri et al., 2018; Salehzadeh et al., 2007; Saitou et al., 2009; Wannigama et al., 2014). Furthermore, cockroaches cause allergic reactions by their secretions and remaining after death (Sheih et al., 2017; Pomes and Schal, 2020), and food contamination by various microorganisms that they carry (Yang et al., 2019). The primary control method of cockroaches depends mostly on chemical insecticides that poses risks to human and environment. Especially, chemical applications increase the concern for human health risk. Furthermore, the use of such insecticides has also been reported causing development of resistance in cockroach populations (Chang et al., 2009, 2010; DeVries et al., 2019; Fardisi et al., 2019; Wu and Appel, 2017; Zhu et al., 2016). All these have been directing researchers to explore alternative control methods of cockroaches, and biological control has been considered and studied as an alternative, safe and environmentally friendly technique (Suiter, 1997; Pereira et al., 2017; Pan and Zhang, 2020; Yang et al., 2021).

Several species of entomopathogenic fungi have potential for biological control of cockroaches, especially those belong to *Metarhizium* and *Beauveria* (Abedi & Dayer 2006; Hubner-Campos et al., 2013; Gutierrez et al., 2015, 2016; Lopes and Alves, 2011; Quesada-Moraga et al. 2004). *M. anisopliae*, *M. blattodeae*, *M. robertsii*, *M. frigidum*, *B. bassiana*, *Isaria fumosoroseus* and *Hirsutella thompsonii* have pathogenicity against cockroaches (Mohan et al., 1999; Pachamuthu et al., 1999; Montalva et al., 2016; Chaurasia et al., 2015; Zhang et al., 2018b). Although pathogenic effects of these fungi were demonstrated by assays conducted under laboratory conditions, there are few reported cases of such cockroach infections in nature (Montalva et al., 2016).

The main way of fungal infection initiation is penetration through the insect cuticle. However, *M. anisopliae* conidia were given to cockroaches per os by mixing in bait (Lopes and Alves, 2011) and Zhang et

al. (2018a) added the conidia in water for ingestion. In both studies, cockroach mortalities were rather low, especially comparing to topical, dust or spray applications. There are studies showing the possibility of *M. anisopliae* transmission horizontally among a German cockroach population (Kaakeh et al., 1996, Quesada-Moraga et al., 2004). This was attributed to some behavioral features of the cockroaches like preference for humid places and aggregation (Kaakeh et al., 1996). This may also facilitate the spread of entomopathogenic fungi increasing the effect of fungal applications. This preference for places with high humidity by cockroaches is also in favor of germination of fungal conidia and sporulation of fungi on cadavers.

The utilization of entomopathogenic fungi combined with chemical insecticides and compounds has also been considered for controlling insect pests. Combination of *M. anisopliae* and some insecticides was more effective against *B. germanica* (Kaakeh et al., 1997; Pachamuthu et al., 1999; Pachamuthu and Kamble, 2000). Zurek et al. (2002) tested application of *M. anisopliae* and boric acid together and *B. germanica* mortalities increased while time to death decreased significantly. Dayer and Karvandian (2016) also found reduction of time to death by combining *M. anisopliae* and boric acid in baits. This synergism was found to be due to deleterious effect of boric acid on peritrophic membrane allowing *M. anisopliae* penetration and alteration in gut microbiome creating a better environment for *M. anisopliae* survival in *B. germanica* gut (Yang et al., 2021). All the authors highlighted promising potential of this combination for cockroach management.

All the previous studies show that entomopathogenic fungi have great potential for cockroach management either alone or in combination with other means and can reduce the use of hazardous chemicals that has been in use. In their review on biological control of *B. germanica*, Pan and Zhang (2020) emphasized the requirement for more studies including search for more virulent or better suited fungal strains of entomopathogenic fungi. In order to contribute to explore fungal strains, in this study, seven entomopathogenic fungi isolated from soil samples and five fungal isolates obtained from entomopathogenic fungal cultures have been tested against *B. germanica*.

MATERIALS AND METHODS

Insect culture

The *Blattella germanica* culture was maintained at 25±2°C and 60±5% relative humidity in darkness in a conditioned room. The insects were kept in large plastic containers (50 Lt in capacity) aerated by small holes on the lids. The upper inside of the containers were greased to prevent insect escapes. Paper egg cartons were placed inside the containers together with dog food and water, which were renewed as required in regular maintaining visits.

Fungal cultures

Five of the entomopathogenic fungal cultures (ARSEF 1512, 2488, 4045, 5855, 6646) were kindly provided by Dr Richard A. Humber from USDA ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Cultures. The other seven fungal cultures (S7-1, S7-2, S7-3, S8-2, S11-2, S11-6, S12-1) were chosen from entomopathogenic fungal culture collection in our department. All these seven cultures were originally isolated from soil samples collected from Turkey. Isolates 6646, S7-2, 1512 belong to the species *Beauveria bassiana* (Balsamo-Crivelli) Vuillemin, isolates S12-1, S7-3, S11-6, S8-2 to *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) Sorokin and isolate 2488 to *Isaria tenuipes* Peck, isolates S11-2, S7-1, 5855 to *Isaria fumosorosea* Wize, isolate 4045 to *Isaria farinosa* (Holmsk.) Fries. All the fungi are in Cordysipitaceae (Sordariomycetes: Hypocreales). The fungi were grown on potato dextrose agar (PDA) in sealed Petri dishes at 25±2°C in darkness.

Preparing conidial suspensions

In order to collect conidia the fungal cultures on PDA were kept at 25±2°C in darkness until sporulation is completed (about 4 weeks). Ten ml of sterile 0.02% Tween 80 solution was added in each Petri dish and a conidial suspension was formed by dislodging conidia by the help of a glass spreader. The suspension was vortexed to disperse conidial clumps and then passed through a double layer of sterile cheese cloth to remove any debris from fungal cultures. The concentrations of these conidial suspensions were determined by counting conidia using a haemocytometer under a light microscope. By adding sterile 0.02% Tween 80 solution, the concentrations were adjusted to the required 1x10⁷ conidia ml⁻¹ to be used in biological assays. Conidial viability was measured by a germination test for each suspension. A small amount of suspension was spread on 1.5% water agar and incubated in sealed Petri dishes at 25±2°C in darkness for 24 hours. Thereafter, spores were examined under a light microscope for germination. Conidia with germ tubes equal or longer than the spore length or diameter were considered germinated.

Pathogenicity tests

All twelve entomopathogenic fungal isolates were tested on German cockroach adults under controlled conditions. Viability of conidia were checked as described above and all the conidial suspensions utilized in bioassays had conidial germination ratio above 98%. The insects in control groups were treated with sterile 0.02% Tween 80 solution instead of conidium suspension. German cockroach adults were individually dipped into 20 ml of relevant conidial suspension at the concentration of 1x10⁷ conidia ml⁻¹ for 10 seconds. They were placed in sterile glass jars (1 liter) with a small amount of food and water. As the purpose of bioassays were to demonstrate the pathogenic ability of the fungi, all treatments were kept at high humidity in the first day of experiments by placing them inside a sealed large plastic container (36x55x22 cm) with sterile distilled water. Thereafter, they were transferred to a conditioned room at 65±5% relative humidity. The bioassays were conducted according to complete randomized design with three replications. Each replication had ten mixed gender German cockroach adults. All the tests were carried out at 26±2 °C in darkness. In daily inspections food and water were added when required. Number of dead insects in treatments were recorded for two weeks starting the third day with two-day intervals and dead insects were removed.

After calculating mortality ratios, all data were transformed by using arcsine transformation. They were subjected to one way ANOVA and Tukey multiple comparison tests using Minitab statistics program. Furthermore, to allow comparison of only the effective isolates' pathogenicity levels, the related data were corrected for control mortalities according to Abbott's formula (Abbott, 1925) before further statistical analyses.

RESULTS AND DISCUSSION

Blattella germanica adult mortalities caused by the tested twelve entomopathogenic fungus isolates within 3-14 days post-treatment are presented in Tables 1-3. In treatments with four of the tested isolates (S12-1, 6646, 5855, 4045), the mortalities were constantly low and statistically not different from the control mortalities. The rest of the isolates generally caused an increasing mortality as post-treatment time was extended, and they all resulted in significantly high mortalities before the end of the experimental time. Especially the isolates in Table 1 required a longer initial time for significant cockroach mortality, while those in Table 3 started causing significant insect mortalities on the third or the latest fifth day.

Efficacies of entomopathogenic fungal isolates against *Blattella germanica* for the same duration were illustrated as corrected mortalities in Figure 1.

Table 1. *Blattella germanica* adult mortalities (%) (\pm s.e.) due to applications of first group entomopathogenic fungal isolates

Çizelge 1. Birinci grup entomopatojen fungus izolatlarının uygulaması sonucu *Blattella germanica* ergin ölümleri (%) (\pm s.h.)

| Isolates İzolatlar | Post-treatment time (days) Uygulama sonrası süre (gün) | | | | | |
|-----------------------|--|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 14 |
| S 12-1 | 13.3 \pm 3.3 a | 16.7 \pm 3.3 a | 23.3 \pm 3.3 bc | 23.3 \pm 3.3 bc | 23.3 \pm 3.3 b | 23.3 \pm 3.3 c |
| 2488 | 13.3 \pm 3.3 a | 26.7 \pm 8.8 a | 40.0 \pm 5.8 abc | 43.3 \pm 8.8 bc | 56.7 \pm 6.7 ab | 60.0 \pm 5.8 b |
| 6646 | 16.7 \pm 8.8 a | 20.0 \pm 5.8 a | 20.0 \pm 5.8 c | 20.0 \pm 5.8 bc | 23.3 \pm 6.7 b | 26.7 \pm 8.8 c |
| S 7-3 | 23.3 \pm 6.7 a | 36.7 \pm 12.0 a | 50.0 \pm 10.0 ab | 53.3 \pm 6.7 ab | 83.3 \pm 3.3 a | 86.7 \pm 3.3 ab |
| S 11-6 | 6.7 \pm 6.7 a | 30.0 \pm 0.0 a | 40.0 \pm 5.8 abc | 63.3 \pm 8.8 a | 80.0 \pm 10.0 a | 93.3 \pm 3.3 a |
| S 7-2 | 16.7 \pm 3.3 a | 33.3 \pm 6.7 a | 53.3 \pm 3.3 a | 60.0 \pm 10.0 a | 76.7 \pm 6.7 a | 76.7 \pm 6.7 ab |
| Control Kontrol | 6.7 \pm 3.3 a | 10.0 \pm 0.0 a | 16.7 \pm 3.3 c | 16.7 \pm 3.3 c | 16.7 \pm 3.3b | 20.0 \pm 0.0 c |
| F | 1.17 | 2.3 | 6.56 | 7.65 | 12.67 | 24.88 |
| P | 0.374 | 0.093 | 0.002 | 0.001 | 0.000 | 0.000 |

- Different letters in each column represent statistically significant differences amongst insect mortalities according to Tukey multiple comparison tests, $P \leq 0.05$, $n=3$ (F and P values from ANOVA tests are presented in the last two rows; D.F.=6, 14).

- Tukey çoklu karşılaştırma testine göre her sütundaki farklı harfler böcek ölümlerinde istatistiksel önemli farkları belirtir $P \leq 0.05$, $n=3$ (ANOVA testi sonucu F ve P değerleri son iki satırda verilmiştir; S.D.=6, 14).

Table 2. *Blattella germanica* adult mortalities (%) (\pm s.e.) due to applications of second group entomopathogenic fungal isolates

Çizelge 2. İkinci grup entomopatojen fungus izolatlarının uygulaması sonucu *Blattella germanica* ergin ölümleri (%) (\pm s.h.)

| Isolates İzolatlar | Post-treatment time (days) Uygulama sonrası süre (gün) | | | | | |
|-----------------------|--|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 14 |
| 5855 | 6.7 \pm 3.3 | 13.3 \pm 3.3 | 23.3 \pm 3.3 | 33.3 \pm 6.7 | 33.3 \pm 6.7 | 33.3 \pm 6.7 |
| 4045 | 13.3 \pm 6.7 | 16.7 \pm 3.3 | 20.0 \pm 5.8 | 23.3 \pm 8.8 | 23.3 \pm 8.8 | 26.7 \pm 8.8 |
| Control Kontrol | 3.3 \pm 3.3 | 13.3 \pm 8.8 | 16.7 \pm 6.7 | 16.7 \pm 6.7 | 16.7 \pm 6.7 | 16.7 \pm 6.7 |
| F | 0.65 | 0.31 | 0.46 | 1.31 | 1.31 | 1.28 |
| P | 0.554 | 0.743 | 0.649 | 0.338 | 0.338 | 0.344 |

- According to ANOVA tests, there are not statistically significant differences amongst treatments in each column, $n=3$ (F and P values from ANOVA tests are presented in the last two rows; D.F.=2, 6).

- ANOVA sonucuna göre her sütundaki uygulamalar arasındaki farklar istatistiksel olarak önemli değildir, $n=3$ (ANOVA testi sonucu F ve P değerleri son iki satırda verilmiştir; S.D.=2, 6).

Table 3. *Blattella germanica* adult mortalities (%) (\pm s.e.) due to applications of third group entomopathogenic fungal isolates

Çizelge 3. Üçüncü grup entomopatojen fungus izolatlarının uygulaması sonucu *Blattella germanica* ergin ölümleri (%) (\pm s.h.)

| Isolates İzolatlar | Post-treatment time (days) Uygulama sonrası süre (gün) | | | | | |
|-----------------------|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | 3 | 5 | 7 | 9 | 11 | 14 |
| 1512 | 30.0 \pm 5.8 a | 63.3 \pm 3.3 a | 63.3 \pm 3.3 ab | 73.3 \pm 3.3 ab | 76.7 \pm 3.3 ab | 83.3 \pm 3.3 ab |
| S8-2 | 40.0 \pm 5.8 a | 66.7 \pm 12.0 a | 83.3 \pm 6.7 a | 83.3 \pm 6.7 a | 90.0 \pm 0.0 a | 96.7 \pm 3.3 a |
| S 11-2 | 20.0 \pm 11.5 ab | 46.7 \pm 12.0 a | 70.0 \pm 5.8 ab | 70.0 \pm 5.8 ab | 73.3 \pm 3.3 ab | 76.7 \pm 3.3 b |
| S7-1 | 13.3 \pm 3.3 ab | 43.3 \pm 12.0 a | 53.3 \pm 8.8 b | 53.3 \pm 8.8 b | 56.7 \pm 6.7 b | 60.0 \pm 5.8 b |
| Control Kontrol | 0.0 \pm 0.0 b | 3.3 \pm 3.3 b | 13.3 \pm 3.3 c | 13.3 \pm 3.3 c | 16.7 \pm 6.7 c | 20.0 \pm 5.8 c |
| F | 6.74 | 9.33 | 19.3 | 20.37 | 33.91 | 28.41 |
| P | 0.007 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |

- Different letters in each column represent statistically significant differences amongst insect mortalities according to Tukey multiple comparison tests, $P \leq 0.05$; $n=3$ (F and P values from ANOVA tests are presented in the last two rows; D.F.=4, 10).

- Tukey çoklu karşılaştırma testine göre her sütundaki farklı harfler böcek ölümlerinde istatistiksel önemli farkları belirtir $P \leq 0.05$, $n=3$ (ANOVA testi sonucu F ve P değerleri son iki satırda verilmiştir; S.D.=4, 10).

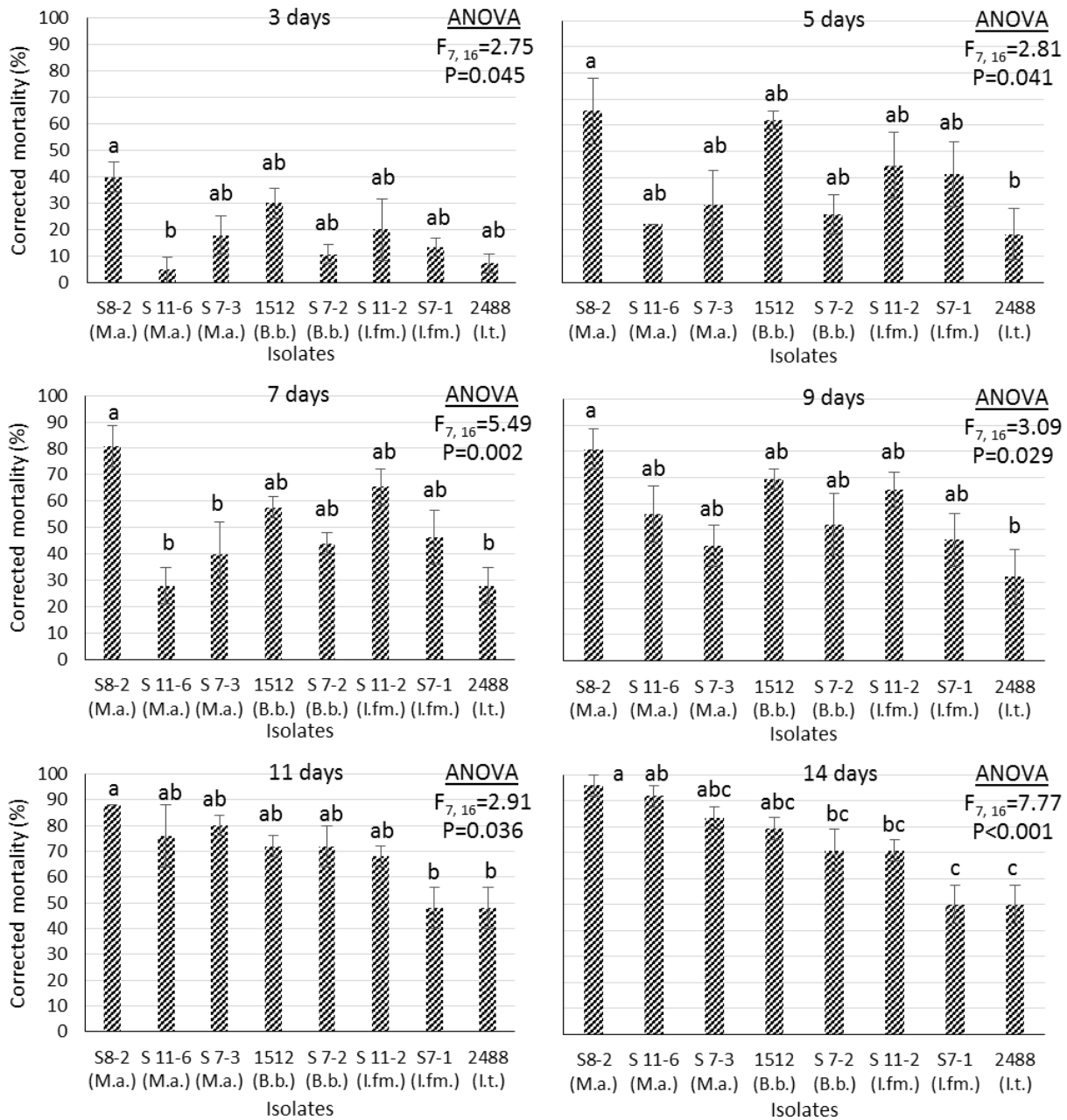


Figure 1. Corrected mortalities of *Blattella germanica* adults during two weeks after the application of entomopathogenic fungal isolates (Mortality corrections are according to Abbott's formula; bars represent standard errors; n=3; Different letters represent statistically significant differences amongst insect mortalities in each graph according to Tukey multiple comparison tests, $P \leq 0.05$) (M.a.: *Metarhizium anisopliae*, B.b.: *Beauveria bassiana*, I.fm.: *Isaria fumosorosea*, I.t.: *Isaria tenuipes*)

Şekil 1. Entomopatojen fungus izolatları uygulandıktan sonraki iki hafta süresinde *Blattella germanica* erginlerinin düzeltilmiş ölüm oranları (Ölüm oranlarının düzeltilmesi Abbott formülüne göre; barlar standart hatayı belirtir; n=3; her grafikteki farklı harfler Tukey çoklu karşılaştırma testine göre böcek ölüm oranları arasındaki istatistiksel önemli farkları belirtmektedir, $P \leq 0.05$) (M.a.: *Metarhizium anisopliae*, B.b.: *Beauveria bassiana*, I.fm.: *Isaria fumosorosea*, I.t.: *Isaria tenuipes*)

As above mentioned four isolates (S12-1, 6646, 5855, 4045) did not cause cockroach mortality higher than control at any time, these isolates were omitted from efficacy evaluation. In Figure 1, it is apparent that the efficacies of the eight remaining isolates increased

in time with varying rates. The efficacies of different fungal isolates showed significant variation during the experiment (Figure 1). The efficacy of *M. anisopliae* S8-2 was constantly causing the greatest mortality with 95.8% on the 14th day. The differences

amongst the rest of the isolates, however, were not statistically significant until the 14th day. On the 14th day, along with the isolate S8-2, the isolate S11-6 showed significantly better efficacy than two *Isaria* isolates (S7-1 and 2488) did. At the end of the experiment, the efficacies of the tested isolates varied with corrected mortalities between 50.0% and 95.8%. This variation was due to differences at isolate level, as different isolates from the same species showed significant diversity. While one *M. anisopliae* isolate (S12-1) and one *B. bassiana* isolate (6646) had no effect on *B. germanica* adults, the other three *M. anisopliae* isolates (over 80% adult mortality) and, the other two *B. bassiana* isolates (70 to 80% adult mortality) had significant efficacies. Amongst the eight effective isolates, however, the corrected mortality values on the 11th and especially on the 14th days indicated that *Metarhizium* isolates had the greatest efficacies followed by *Beauveria* isolates and the isolates of *Isaria* had the least efficacies. The results of this study are in parallel with the results of previous studies, and the efficacies of some tested isolates can well be considered even better than previously tested entomopathogenic fungi. *Metarhizium anisopliae* has been one of the most tested fungal species on cockroaches. *Periplaneta americana* mortalities were 100% (Hubner-Campos et al., 2013) in 10 days and 56.23% in 48 hours (Chaurasia et al., 2015) after application of *M. anisopliae*. Pachamuthu et al. (1999) reported 86.3% German cockroach mortality in 21 days at the tested highest spore concentration of strain ESC-1. In other studies, *B. germanica* adult mortalities due to *M. anisopliae* applications reached 83.8% (Lopes and Alves, 2011), 93.3% (Gutierrez et al., 2014) and 83.33% (Zhang et al., 2018b) in 15 days. All these studies on German cockroach were carried out in similar ambient conditions with high doses but using different application methods. However, considering the doses together with delivery methods, the results are comparable with the ones reported in this study. German cockroach adult mortalities caused by *M. anisopliae* in the present study varied according to isolates and the most effective isolate S8-2 killed 96.7% adults in 14 days with corrected mortality of 95.8%. This isolate appear to be as effective as the previously tested isolates if not better. Effects of other species of entomopathogenic fungi on cockroaches have been reported in limited literature. *Beauveria bassiana* caused 75% mortality on *P. americana* in 10 days (Mohan et al., 1999). Gutierrez et al. (2014) reported 80% *B. germanica* mortality in *B. bassiana* treatment in 15 days. Hubner-Campos et al. (2013) tested two isolates of *B. bassiana* on *P. americana* nymphs and one isolate killed 58.3% and 81.7% in 10 and 25 days, respectively. In the same study, *Isaria farinosa* and *I. cateniolobliqua* did not kill any insects, while a closely related fungus *Purpureocillium*

lilacinum caused 18.3% mortality in 25 days. In the present study, more effective isolates of both *B. bassiana* and *Isaria* are found although their efficacies were lower than *Metarhizium anisopliae* isolates.

This study demonstrates interspecific and intraspecific variation in the virulence of different entomopathogenic fungi on German cockroach under controlled conditions. This finding supports the suggestion of Pan and Zhang (2020) to continue searching more effective isolates of entomopathogenic fungi as better isolates could always be encountered. Although high efficacies were recorded from different species, *M. anisopliae* seems to have superior isolates such as S8-2, S11-6 and thus should be considered for further studies to develop a microbial control agent to be utilized in the control of cockroaches, either alone or in combination with other means.

ACKNOWLEDGMENT

This study was a part of a project supported by TUBİTAK (Project no: 110O159). Thanks to Dr. Richard A. Humber for providing entomopathogenic fungal cultures from USDA ARS Collection of Entomopathogenic Fungal Culture Collection.

Author Contributions

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

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

- Abbott WS 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Abedi A, Dayer MS 2006. Evaluation of the effect of the fungus *Metarhizium anisopliae*, as a biological control agent, on German cockroaches *Blattella germanica*. *Pathobiology Research*, 8: 31-36.
- Ahmad A, Ghosh A, Schal C, Zurek L 2011. Insects in confined swine operations carry a large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiology*, 11: 23.
- Chaurasia A, Lone Y, Wani O, Gupta US 2015. Effect of certain entomopathogenic fungi on oxidative stress and mortality of *Periplaneta americana*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 127: 28-37.
- Chang KS, Jung JS, Park C, Lee HI, Lee WG, Lee DK, Shin EH 2009. Insecticide susceptibility and resistance of *Blattella germanica* (Blattaria: Blattellidae) in Seoul, Republic of Korea, 2007. *Entomological Research*, 39, 243-247.
- Chang KS, Shin EH, Jung JS, Park C, Ahn YJ 2010. Monitoring for insecticide resistance in field-

- collected populations of *Blattella germanica* (Blattaria: Blattellidae). Journal of Asia-Pacific Entomology, 13: 309–312.
- Dayer MS, Karvandian K 2016. Toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycota: Hyphomycetes) and boric acid against nosocomial cockroaches, *Blattella germanica*. Arthropods, 5: 114–124.
- DeVries ZC, Santangelo RG, Crissman J, Suazo A, Kakumanu ML, Schal C 2019. Pervasive resistance to pyrethroids in German cockroaches (Blattodea: Ectobiidae) related to lack of efficacy of total release foggers. Journal of Economic Entomology, 112: 2295–2301.
- Fardisi M, Gondhalekar AD, Ashbrook AR, Scharf ME 2019. Rapid evolutionary responses to insecticide resistance management interventions by the German cockroach (*Blattella germanica* L.). Scientific Reports, 9: 8292.
- Graczyk TK, Knight R, Tamang L 2005. Mechanical transmission of human protozoan parasites by insects. Clinical Microbiology Reviews, 18: 128–132.
- Gutierrez AC, Garcia JJ, Alzogaray RA, Urrutia MI, López Lastra CC 2014. Susceptibility of different life stages of *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) and *Periplaneta fuliginosa* (Blattodea: Blattidae) to entomopathogenic fungi. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3: 614-621.
- Gutierrez AC, Golebiowski M, Pennisi M, Peterson G, Garcia JJ, Manfrino RG, López Lastra CC 2015. Cuticle fatty acid composition and differential susceptibility of three species of cockroaches to the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota, Hypocreales). Journal of Economic Entomology, 108: 752–760.
- Gutierrez AC, Machado JAR, Hubner-Campos R, Pennisi MA, Rodrigues J, Lopez Lastra CC, Garcia JJ, Fernandes EKK, Luz C 2016. New insights into the infection of the American cockroach *Periplaneta americana* nymphs with *Metarhizium anisopliae* s.l. (Ascomycota: Hypocreales). Journal of Applied Microbiology, 121: 1373–1383.
- Hubner-Campos RF, Leles RN, Rodrigues J, Luz C 2013. Efficacy of entomopathogenic hypocrealean fungi against *Periplaneta americana*. Parasitology International, 62: 517–521.
- Kaakeh W, Reid BL, Bennett GW 1996. Horizontal transmission of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Imperfect Fungi: Hyphomycetes) and hydramethylnon among German cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae). Journal of Entomological Science, 31: 378–390.
- Kaakeh W, Reid BL, Bohnert TJ, Bennett GW 1997. Toxicity of imidacloprid in the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae), and the synergism between imidacloprid and *Metarhizium anisopliae* (Imperfect fungi: Hyphomycetes). Journal of Economic Entomology, 90: 473–482.
- Kassiri H, Zarrin M, Veys-Behbahani R 2018. Pathogenic fungal species associated with digestive system of *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattidae) trapped from residential dwellings in Ahvaz city, southwestern Iran. Journal of Arthropod Borne Diseases, 12: 16–23.
- Lopes RB, Alves SB 2011. Differential susceptibility of adults and nymphs of *Blattella germanica* (L.) (Blattodea: Blattellidae) to infection by *Metarhizium anisopliae* and assessment of delivery strategies. Neotropical Entomology, 40: 368–374.
- Mohan CM, Lakshmi KA, Devi KU 1999. Laboratory evaluation of the pathogenicity of three isolates of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuillemin on the American cockroach (*Periplaneta americana*). Biocontrol Science and Technology, 9: 29-33.
- Montalva C, Collier K, Rocha LFN, Inglis PW, Lopes RB, Luz C, Humber RA 2016. A natural fungal infection of a sylvatic cockroach with *Metarhizium blattodeae* sp. nov., a member of the *M. flavoviride* species complex. Fungal Biology, 120: 655–665.
- Pachamuthu P, Kamble ST, Yuen GY 1999. Virulence of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 to the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) and its compatibility with insecticides. Journal of Economic Entomology, 92: 340–346.
- Pachamuthu P, Kamble ST 2000. In vivo study on combined toxicity of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) strain ESC-1 with sublethal doses of chlorpyrifos, propetamphos, and cyfluthrin against German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). Journal of Economic Entomology, 93: 60–70.
- Pan XY, Zhang F 2020. Advances in Biological Control of the German cockroach, *Blattella germanica* (L.). Biological Control, 142: 104104.
- Pereira RM, Oi DH, Baggio MV, Koehler PG 2017. Microbial control of structural insect pests. In: L A Lacey (Ed.), Microbial Control of Insect and Mite Pests: From Theory to Practice, Elsevier, New York, pp. 431–442.
- Pomes A, Schal C 2020. Cockroach and other inhalant insect allergens. In: R F Lockey, D K Ledford (Eds.), Allergens and Allergen Immunotherapy: Subcutaneous, sublingual, and oral. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton.
- Quesada-Moraga E, Santos-Quiros R, Valverde-Garcia P, Santiago-Alvarez C, 2004. Virulence, horizontal transmission, and sublethal reproductive effects of *Metarhizium anisopliae* (anamorphic fungi) on the German cockroach (Blattodea: Blattellidae). Journal of Invertebrate Pathology, 87: 51-58.

- Saitou K, Furuhashi K, Kawakami Y, Fukuyama M 2009. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from cockroaches Captured in hospitals in Japan, and their antibiotic susceptibility. *Biocontrol Science*, 14: 155–159.
- Salehzadeh A, Tavacoli P, Mahjub H 2007. Bacterial, fungal and parasitic contamination of cockroaches in public hospitals of Hamadan, Iran. *Journal of Vector Borne Diseases*, 44: 105–110.
- Sheih A, Parks WC, Ziegler SF 2017. GM-CSF produced by the airway epithelium is required for sensitization to cockroach allergen. *Mucosal Immunology*, 10: 705–715.
- Suiter DR 1997. Biological suppression of synanthropic cockroaches. *Journal of Agricultural Entomology*, 14: 259–270.
- Wannigama DL, Dwivedi R, Zahraei-Ramazani A 2014. Prevalence and antibiotic resistance of gram-negative pathogenic bacteria species isolated from *Periplaneta americana* and *Blattella germanica* in Varanasi, India. *Journal of Arthropod-Borne Diseases*, 8: 10–20.
- Wu X, Appel AG 2017. Insecticide resistance of several field-collected German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae) strains. *Journal of Economic Entomology*, 110: 1203–1209.
- Yang CL, Zhu HY, Zhang F 2019. Comparative proteomics analysis between the short-term stress and long-term adaptation of the *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) in response to beta-cypermethrin. *Journal of Economic Entomology*, 112: 1396–1402.
- Yang R, Zhang M, Schal C, Jiang M, Cai T, Zhang F 2021. Boric acid enhances *Metarhizium anisopliae* virulence in *Blattella germanica* (L.) by disrupting the gut and altering its microbial community. *Biological Control*, 152: 104430.
- Zhang F, Sun XX, Zhang XC, Zhang S, Lu J, Xia YM, Huang YH, Wang XJ 2018a. The interactions between gut microbiota and entomopathogenic fungi: a potential approach for biological control of *Blattella germanica* (L.). *Pest Management Science*, 74: 438–447.
- Zhang XC, Li XX, Gong YW, Li YR, Zhang KL, Huang YH, Zhang F 2018b. Isolation, identification, and virulence of a new *Metarhizium anisopliae* strain on the German cockroach. *Journal of Economic Entomology*, 111: 2611–2616.
- Zhu F, Lavigne L, O'Neal S, Lavigne M, Foss C, Walsh D 2016. Insecticide resistance and management strategies in urban ecosystems. *Insects*, 7: 2.
- Zurek L, Watson DW, Sehal C 2002. Synergism between *Metarhizium anisopliae* (Deuteromyeota: Hyphomycetes) and boric acid against the German cockroach (Dictyoptera: Blattellidae). *Biological Control*, 23: 296–302.

Rezene ve Defne Uçucu Yağ Karışımlarının Kimyasal Bileşenlerinin ve *Pestalotiopsis funerea*'ya Karşı Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi

Merve KARA¹, Musa TÜRKMEN², Soner SOYLU³

^{1,3}Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü 31034 Antakya-HATAY, ²Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü 31034 Antakya-HATAY

¹<https://orcid.org/0000-0001-7320-3376>, ²<https://orcid.org/0000-0001-9914-9523>, ³<https://orcid.org/0000-0003-1002-8958>

✉: soylu@mku.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada, farklı oranlarda harmanlanmış rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.) ve defne (*Laurus nobilis* L.) uçucu yağ karışımlarının kimyasal bileşimleri ve *P. funerea*'ya karşı antifungal etkileri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır. Uçucu yağların kimyasal bileşimleri, GC-MS analizi kullanılarak belirlenmiştir. Uçucu yağların buhar fazındaki farklı konsantrasyonların misel gelişimi ve konidi çimlenmesinin engellemesi üzerine antifungal etkileri *in vitro* koşullarda belirlenmiştir. Uçucu yağ karışımlarının en etkili olduğu konsantrasyonlarda fungus hifi ve konidi morfolojisinde neden olduğu etkileri ışık mikroskobu altında incelenmiştir. GC-MS ile yapılan kimyasal analizler sonucunda eucalyptol (%52.88) ve *trans*-anethole (%81.55)'ün defne ve rezene uçucu yağlarının ana bileşenleri olduğu belirlenmiştir. Tek başlarına kullanıldığında rezene ve defne uçucu yağları *P. funerea*'nın misel gelişimini 20.0 ve 25.0 µl petri⁻¹ konsantrasyonlarında tamamen engellemiştir. Rezene/defne uçucu yağlarının harmanlanması ile misel gelişimi ve konidi çimlenmesinin engellenmesinde sinerjik antifungal etki görülmüştür. Rezene/defne uçucu yağların 3:1 oranında harmanlanması antifungal etkinliği önemli düzeyde artırmış olup, nispeten düşük konsantrasyonda (10 µl petri⁻¹) daha yüksek düzeyde antifungal etkinlik göstermiştir. Işık mikroskobu ile yapılan gözlemlerde uçucu yağ harmanlarının en etkili konsantrasyonuna maruz kalan hifler ve konidilerde, sitoplazmik pıhtılaşma, vakuolleşme ve protoplazmik içeriğin hücre dışına akıntısı şeklinde gerçekleşen önemli yapısal deformasyonları gözlenmiştir. Sonuçlar, sinerjik antifungal etki gösteren rezene ve defne uçucu yağ karışımının bitki fungal hastalık etmenlerle mücadelede etkili bir biyofungisit olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 29.03.2021

Kabul Tarihi : 06.05.2021

Anahtar Kelimeler

Uçucu yağ karışımı

Antifungal etkinlik

Sinerjik etki

Pestalotiopsis funerea

Determination of Chemical Composition and Antifungal Activities of Fennel and Laurel Essential Oil Mixtures Against *Pestalotiopsis funerea*

ABSTRACT

In this study, chemical compositions and antifungal activities of different blended essential oils obtained from fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and laurel (*Laurus nobilis* L.) were investigated against *P. funerea* *in vitro* conditions. Chemical compositions of essential oils were determined using GC-MS analysis. Antifungal volatile phase effects of different concentrations of essential oils mixtures were determined on inhibition of mycelial growth and conidial germination *in vitro* conditions. The effect of most effective concentrations of essential oil mixtures on the morphology of fungal hypha and conidia were also investigated using light microscope. GC-MS analysis of essential oils revealed that eucalyptol (52.88%) and *trans*-anethole (81.55%) were the major components of laurel and fennel essential oils. Individual use of fennel and laurel essential oils were found to completely inhibit mycelial growth at 20.0 and 25.0 µl petri⁻¹ concentrations, respectively. Dual blending fennel/laurel essential oil

Research Article

Article History

Received : 29.03.2021

Accepted : 06.05.2021

Keywords

Blended essential oil

Antifungal activity

Synergistic effect

Pestalotiopsis funerea

mixtures showed synergistic antifungal activity on inhibition of mycelial growth and conidial germination. By blending fennel and laurel essential oils at proportion of 3:1, antifungal activities were significantly increased that complete mycelial growth and conidial inhibition were recorded at relatively lower concentration (10 µl petri⁻¹). Microscopic observations on hyphae, exposed to volatile phase of the most efficient concentrations of essential oil mixtures, revealed considerable structural deformations such as cytoplasmic coagulation, vacuolization and protoplast leakage from fungal hyphae and conidia. The results showed that blending of fennel and laurel essential oils, which have synergistic antifungal effects, might be used as an effective bio fungicide in management of fungal plant disease agents.

Atıf İçin: Kara M, Türkmen M, Soylu S 2022. Rezene ve Defne Uçucu Yağ Karışımlarının Kimyasal Bileşenlerinin ve *Pestalotiopsis funerea*'ya Karşı Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 113-126. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.904966.

To Cite: Kara M, Türkmen M, Soylu S 2022. Determination of Chemical Composition and Antifungal Activities of Fennel and Laurel Essential Oil Mixtures Against *Pestalotiopsis funerea*. KSU J. Agric Nat 25 (1): 113-126. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.904966.

GİRİŞ

Monteri servi'si olarak bilinen limoni servi ağacı (*Cupressus macrocarpa* L.) *Cupressaceae* (Servigiller) familyasında yer alan Kuzey Amerika orijinli, yaprakları limon kokusuna sahip, Akdeniz Bölgesi'nden Himalaya'lara kadar olan bölgede doğal olarak yetişen bir orman ağacıdır. Son yıllarda, park bahçe düzenlemelerinde kozalaklı ağaç türlerinin önem kazanmasıyla limoni servi ağaçlarının şehir park, bahçe, refüj düzenlemelerinin yanısıra, yazlık siteler, tatil köyleri ve otellerin peyzaj düzenlenmelerinde de kullanımı ciddi düzeyde artış göstermiştir (Salem ve ark., 2018). Kültür bitkilerinde olduğu gibi orman ağaçlarında yaprak, kök, kök boğazı ve gövdelerde farklı fungal türler tarafından çeşitli hastalıklar oluşturulmaktadır (Gordon ve ark., 2015). Bu hastalıklardan biride *Pestalotiopsis* spp.'nin sebep olduğu yapraklarda ve sürgün uçlarında kurumalara neden olan fungal hastalıktır (Uysal ve ark., 2021). Söz konusu hastalıklar, özellikle orman fidanlıklarında kozalaklı ağaç türleri ve servi ağacı üretimini sınırlayan faktörlerin başında gelir. *Pestalotiopsis* spp. arasında yer alan *Pestalotiopsis funerea*, konukçusu olduğu kozalaklı ağaç türlerinde kök çürüklüğü, sürgün ya da sürgün uç yanıklığı, geriye doğru ölüm ve gövde kanseri olarak adlandırılan hastalıklara sebep olmaktadır (Sinclair ve ark., 1993; Bajo ve ark., 2008). Hastalık etmeninin kompleks yapısının yanısıra, farklı fungal türler ile etkileşime girmesi nedeniyle hastalığın görüldüğü ülkelerde hastalıkla mücadelede etkili olabilecek herhangi bir fungusit tavsiyesi bulunmamaktadır. Orman ağaçlarında sorun olan diğer hastalık etmenlerinin mücadelesinde kullanılan fungusitlerin sınırlı etkinliği, kullanılan fungusitlere karşı etmenlerin dayanıklı izolatlarının gelişimi, fungusitlerin hedef dışı yararlı mikroorganizmalara olan yan etkileri bu tür hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerin araştırılması gerekliliğini ortaya koymaktadır (Staub, 1991).

Hastalıklarla kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlerden biride antifungal etkinlik gösteren bitki ekstrakt ve uçucu yağlarının kullanılmasıdır (Bakkali ve ark., 2008; Nazzaro ve ark., 2017). Günümüzde bu konuda yapılan çalışmalar daha çok uçucu yağların kimyasal bileşenleri ve antimikrobiyal etkinliklerinin araştırılması üzerine kurgulanmıştır. Farklı türlere ait uçucu yağların antimikrobiyal etkinlikleri farklılık gösterebilir. Bazı bitkilerden elde edilen uçucu yağ verimleri (birim miktardaki bitki materyalinden elde edilen uçucu yağ miktarı) yüksek olmasına rağmen uçucu yağların antimikrobiyal etkinlikleri düşük olabilirken, bazı bitkilerin uçucu yağlarının yüksek antimikrobiyal etkinliklerine kıyasla uçucu yağ verimleri oldukça düşük olabilir. Lauraceae familyasına dahil olan defne (*Laurus nobilis* L.) her daim yeşil kalan, yaprak ve meyveleri ilaç ve parfümeri sanayisinde yoğun olarak kullanılan bir ağaç türü olup (Chahal ve ark., 2017), ülke genelinde özellikle Akdeniz, Ege ve Karadeniz sahil kesimlerinde yoğun şekilde yetişmektedir (Demir ve ark., 2004). Rezene (*Foeniculum vulgare* Mill.) Umbellifera famiyasına dahil tıbbi, aromatik ve mutfaklarda baharat olarak yoğun şekilde kullanılan bitkidir. Yakın zamanda yapılmış olan çalışmada, rezene ve defne uçucu yağlarının kimyasal bileşenleri belirlenmiş olup, uçucu yağların hastalık etmeni *P. funerea*'nın misel gelişiminin engellenmesi üzerine olan etkinlikleri arasında önemli farklılığın olduğu ortaya konulmuştur (Kara ve ark., 2020). Uçucu yağlar veya ana bileşenleri tek başına kullanıldığı durumlarda test edildikleri mikroorganizmalara karşı düşük antimikrobiyal etkinlik gösterirken, başka uçucu yağlar veya bileşenler ile karışım şeklinde kullanıldıklarında etkinliklerinde büyük oranda farklılık görülebilir. Antimikrobiyal etkinlikte gözlenen bu değişim genellikle etkinliği düşük olan bileşen(ler)in başka bir bileşen(ler)le birlikte sinerjik etkileşime girmesinden kaynaklandığı bilinir. Yapılan

literatür araştırmasında uçucu yağların karışım halinde kullanılması durumunda antimikrobiyal etkinliklerinde olası değişimlerin belirlenmesi üzerine oldukça kısıtlı sayıda çalışmanın bulunduğu görülmüştür. Uçucu yağların karıştırılmalarıyla elde edilen bileşiklerin sinerjik etkileşimleri sonucunda hastalık etmenlerinin fungusitlere karşı olan direncin önlediği, maliyet ve/veya toksik yan etkilerinin azaldığı, farklı mikrobiyal türlere karşı antifungal etki ve etki spektrumlarının arttığı, yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarla bildirilmiştir (Nazzaro ve ark., 2013; Türkmen, 2015; Swamy ve ark., 2016; Hongratanaworakit ve ark., 2017). Rezene ve defne uçucu yağlarının birçok bitki fungal ve bakteriyel hastalık etmenlerine karşı antimikrobiyal etkinliği önceden yapılmış olan çalışmalarda bildirilmiş olup, bitkilerden karışım şeklinde elde edilmiş uçucu yağların limoni servi ağacında sorun hastalık etmeni *P. funerea*'ya karşı antifungal etkinliğinin belirlenmesine yönelik yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, defne (*L. nobilis*) ve rezene (*F. vulgare*) bitkilerinden farklı yöntemler kullanılmak suretiyle elde edilen uçucu yağ karışımlarının kimyasal bileşenleri belirlenmiş ve *in vitro* koşullarda limoni servi sürgün uç yanıklık hastalığı etmeni *P. funerea*'nın misel gelişimi ve konidi çimlenmesi üzerine olan antifungal etkinliği araştırılmıştır. Uçucu yağların fungal etmenin konidi ve misellerinde sebep olduğu morfolojik ve sitoyapısal değişiklikler ayrıca ışık mikroskobu altında araştırılmıştır.

MATERYAL ve METOD

Uçucu Yağların Elde Edilmesi

Çalışmalarda kullanılan rezene tohumları Antakya ilçesindeki aktarlardan satın alınmış olup, defne yaprakları Samandağ ilçesinde (36°07'56"N 35°56'48E) doğal olarak yetişen bitkilerden 2019 yılı Haziran ayında toplanmıştır. Her iki bitki materyali oda sıcaklığında kurutulduktan sonra 200 gr tartılarak 500 ml damıtılmış su (çözücü) içeren cam balonlar içerisine ayrı ayrı konulmuş ve yaklaşık 3-4 saat kaynatılarak Neo-Clevenger aparatı sistemin yan kolunda uçucu yağın toplanması sağlanmıştır (Türkmen ve Mert, 2020). Elde edilen uçucu yağ koyu renkli (amber) cam şişelere konularak; GC-MS analizine kadar buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilmiştir.

Uçucu Yağ Karışımlarının Hazırlanması

Su buharı distilasyon yönteminin kullanıldığı uçucu yağ karışımlarında elde edilmesinde iki farklı yöntem uygulanmıştır. İlk yöntemde (Mix-1), rezene tohumları ve defne yaprakları tartılarak sırasıyla % 75:25, % 50:50 ve % 25:75 oranlarında karıştırılmış ve cam balon içerisinde birlikte kaynatılarak uçucu yağları çıkarılmıştır. İkinci yöntemde (Mix-2), ayrı ayrı elde

edilen rezene ve defne uçucu yağları sırasıyla % 75:25, % 50:50 ve % 25:75 oranlarında Eppendorf tüpler içinde doğrudan karıştırılmak suretiyle ayrı ayrı hazırlanmıştır.

Uçucu Yağ ve Karışımlarının Kimyasal Bileşenlerinin Belirlenmesi

Uçucu yağlar Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresinde (Thermo Scientific Focus) otomatik örnekleyici (TR-5MS, 5% phenyl-polisilfenilenesiloxan, 60 m x 0.25 mm iç çapı, film kalınlığı 0.25) kullanılarak analiz edilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL/dakika akış hızına sahip Helyum (99.9%) kullanılmış; iyonlaşma enerjisi 70 eV ve kütle aralığı m/z 50-650 amu olarak belirlenmiştir. Kütle spektrometresinin transfer hattı ve enjeksiyon bloğu giriş sıcaklığı 220 °C olarak belirlenmiş ve örneklerin enjeksiyonu 250 split oranı ile gerçekleştirilmiştir. Örneklerin enjeksiyon hacmi 1 µL'dir. Fırın sıcaklığı 3 °C dak.⁻¹ artışla 50 °C'den 220 °C'ye kadar artacak şekilde programlanmıştır. Her bir bileşenin oluşturduğu spektrumlar, GC-MS'te Wiley 9 kütüphanesi ile eşleştirilmeleri sonucu tanımlanmıştır (Adam, 2007). Veriler Xcalibur yazılımı kullanılarak işlenmiştir.

Fungal Hastalık Etmeninin İzolasyonu

Fungal hastalık etmeni *P. funerea*, Hatay orman fidalıklarında yetişen enfekteli *C. macrocarpa* fidanlarının gövdelerinden izole edilmiştir. Kurumaların gözlemlendiği dallarda sağlıklı/hastalıklı noktalardan alınan sürgün dokuları öncelikle sodyum hipoklorit (NaOCl) ile 2 dakika süreyle yüzey dezenfeksiyon işlemine tabi tutulmuştur. Dezenfekte edilen bu doku parçaları, steril saf suda birkaç dakika durulandıktan sonra steril kurutma kağıtlarında kurumaya bırakılmıştır. Dezenfekte edilen bitki dokuları, streptomisin sülfat (100 mg mL⁻¹) içeren Patates Dekstroz Agar (PDA) içeren petri kaplarına aktarılmış, daha sonra 25 °C'de 5 gün süreyle inkübe edilerek gelişen kolonilerden PDA'ya saflaştırma işlemleri yapılmıştır. Tür teşhisi, koloni ve sporlarının morfolojik özelliklerine göre yapılmıştır (Mordue, 1976). Denemelerde tek spordan geliştirmiş fungus izolatu kullanılmıştır.

Uçucu Yağların *P. funerea*'nın Misel Gelişimi ve Konidi Çimlenmesi Üzerine Antifungal Etkisi

Defne ve rezene uçucu yağ karışımlarının *P. funerea*'nın misel gelişimi üzerine buhar fazında antifungal etkileri *in vitro* koşullarda araştırılmıştır (Soylu ve ark., 2010). Etmeninin tek spor kültürü, 3-5 gün boyunca 25°C'de Potato Dextrose Agar (PDA) ortamında geliştirilmiştir. PDA besi ortamları, steril 90 mm'lik cam petri kaplarına (20 ml petri⁻¹) dökülmüştür. Uçucu yağ karışımlarının farklı konsantrasyonları (0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 µl

petri⁻¹) her bir petri kapağının iç kısmına mikropipet yardımıyla konulmuştur. Hastalık etmeninin 5 günlük kültüründen diskler (6 mm) alınarak PDA besi yeri içeren her bir petri kapının ortasına yerleştirilmiştir. Kontrol olarak uçucu yağ uygulanmayan PDA içeren petri kapları kullanılmıştır.

Uçucu yağ ve karışımların fungal konidilerin çimlenmeleri üzerine olan etkinliği benzer şekilde yapılmıştır. PDA besi ortamları üzerine fungusun steril distile su içerisinde 10⁴ konidi ml⁻¹ konsantrasyonunda hazırlanmış spor süspanسیونlarından 100 µl alınarak PDA besi yeri üzerine steril cam baget ile yayılmıştır. Uçucu yağ karışımlarının farklı konsantrasyonları (0.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0 µl petri⁻¹) her bir petri kapağının iç kısmına mikropipet yardımıyla konulmuştur. Kontrol olarak uçucu yağ uygulanmayan PDA içeren petri kapları kullanılmıştır.

Gerek misel gelişimi gerekse konidi çimlenmesinin engellenmesi üzerine olan etkinlik çalışmalarında uygulama yapılan petri kaplarının etrafı parafilm ile sarılarak inkübatörde 25°C'de inkübe edilmiştir. Her bir uçucu yağ ve karışımların farklı konsantrasyonlarının bulunduğu petrilere misel gelişimi günlük takip edilmiş, misel gelişim çapları ölçülmüş ve kontrol uygulamasına göre misel gelişiminin engellenme oranı MGI (%)=(MGc-MGt)/MGc)x100 formülüyle belirlenmiştir. Uçucu yağ ve karışımlarının misel gelişimi üzerine olan etkinliği uygulamadan 4-5 gün sonra, konidi çimlenmeleri üzerine olan etkinlikleri uygulamadan 24 saat sonra yapılan gözlemlerle değerlendirilmiştir. Her uygulamada 100 adet konidi, çim borucuğu oluşturup oluşturumaması yönünden değerlendirilmiştir. Konidi boyu kadar çim borucuğu oluşturan konidilerin çimlendiği kabul edilmiştir.

Uçucu Yağ Karışımlarının Misel ve Konidi Morfolojileri Üzerine Etkisi

Uçucu yağ karışımlarının en etkili konsantrasyonlarının hif morfolojisi üzerindeki etkisi de ışık mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir (Soylu ve ark., 2010; Kara ve ark., 2020). Taze kültürden alınan misel diskleri PDA besi yerine yerleştirildikten sonra herhangi bir yağ karışım uygulaması yapılmaksızın 2-3 gün ön gelişime bırakılmış ve misellerin 20-30 mm çapında gelişimi sağlanmıştır. Benzer şekilde inkübasyondan 24 saat sonra çimlenen konidilerin yer aldığı petrilere, 2-3 gün ön gelişime bırakılmış misellerin yer aldığı petrilere, *in vitro* etkinlik çalışmalarında fungus gelişimini tamamen engelleyen uçucu yağ karışımlarına ait konsantrasyonlar mikropipet yardımıyla petri kapaklarına konulmuş ve kapaklar parafilm ile sarıldıktan sonra tekrar 2 gün 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda PDA besi yerleri üzerinde daha önceden gelişmiş olan misel ve

çimlenmiş konidiler üzerindeki morfolojik değişiklikler Nomarski/DIC ataçmanlı ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Tokyo, Japonya) altında değerlendirilmiştir.

İstatistik Analiz

In vitro koşullarda yapılan antifungal etkinlik çalışmalarında, her bir uçucu yağ ve karışım konsantrasyonunun antifungal etkinlikleri üç farklı petride ölçülmüştür. Denemeler 2 farklı zamanda tekrar edilmiştir. Antifungal etkinliğinin belirlendiği petrilere misel gelişim çapları ve çimlenen konidi sayıları % engellenme oranlarına çevrilmeden SPSS istatistik programı (Versiyon 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile varyans analizi yapılmış ve uygulamalar ve konsantrasyonlar arasındaki farklılık Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile karşılaştırılmıştır (P≤0.05). Uçucu yağların farklı konsantrasyonlarda misel gelişimini ve konidi çimlenmesini %50 düzeyinde engelleyen etkili konsantrasyonları (EC₅₀) SPSS istatistik programı (Versiyon 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) yardımı ile Probit analizi yapılarak belirlenmiştir.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Uçucu Yağ ve Karışımlarının Kimyasal Bileşenlerinin Belirlenmesi

Defne yapraklarından ve rezene tohumlarından elde edilen uçucu yağları ile bu bitkilerden elde edilen uçucu yağ karışımlarının (Mix-1 ve Mix-2) kimyasal bileşenleri GC-MS ile belirlenmiş, elde edilen sonuçlar Çizelge 1 ve Çizelge 2'de gösterilmiştir. Defne yaprağı uçucu yağında toplam 41 bileşen belirlenmiş olup, en yüksek oranda bulunan ana (temel) bileşenlerin sırasıyla aynı zamanda 1,8 cineole olarakta bilinen eucalyptol (%52.88), α-terpinyl acetate (%11.77) ve sabinene (%8.05) olduğu belirlenmiştir. Rezene uçucu yağında toplam 14 farklı kimyasal bileşen belirlenmiş olup, en yüksek oranda tespit edilen ana bileşenler sırasıyla *trans*-anethole (%81.55), estragole (%4.75) ve limonene (%5.88) olarak belirlenmiştir (Şekil 1). Çalışmada kullanılan defne ve rezene uçucu yağlarında belirlenen ana bileşenler daha önceden yapılmış bir çok farklı çalışmada da bildirilmiştir. Elkiran ve ark. (2018) tarafından yapılan çalışmada defne tohum ve yapraklarından elde edilen uçucu yağ içeriğinin ana bileşenlerinin eucalyptol ve α-terpinyl acetate olduğu bildirilmiştir. Benzer ana bileşenlerin Türkiye'nin farklı bölgelerinde yetişen defne uçucu yağında bulunduğu dair yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır (Ozcan ve Chalchat, 2005; Soylu ve ark., 2006; Türkmen, 2015; Yılmaz ve Deniz, 2017; Taban ve ark., 2018; Kara ve ark., 2020). Önceden yapılmış olan çalışmalarla bu çalışmada elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, bileşenlerin oranlarında küçük değişiklikler görülmekle birlikte büyük oranda benzerliğin olduğu görülmüştür. Diğer ana bileşen

Çizelge 1. Mix-1 karışımlarına ait uçucu yağlarda belirlenen kimyasal bileşenlerin oranları (%)
 Table 1. Chemical compounds (%) determined in Mix-1 essential oil mixtures

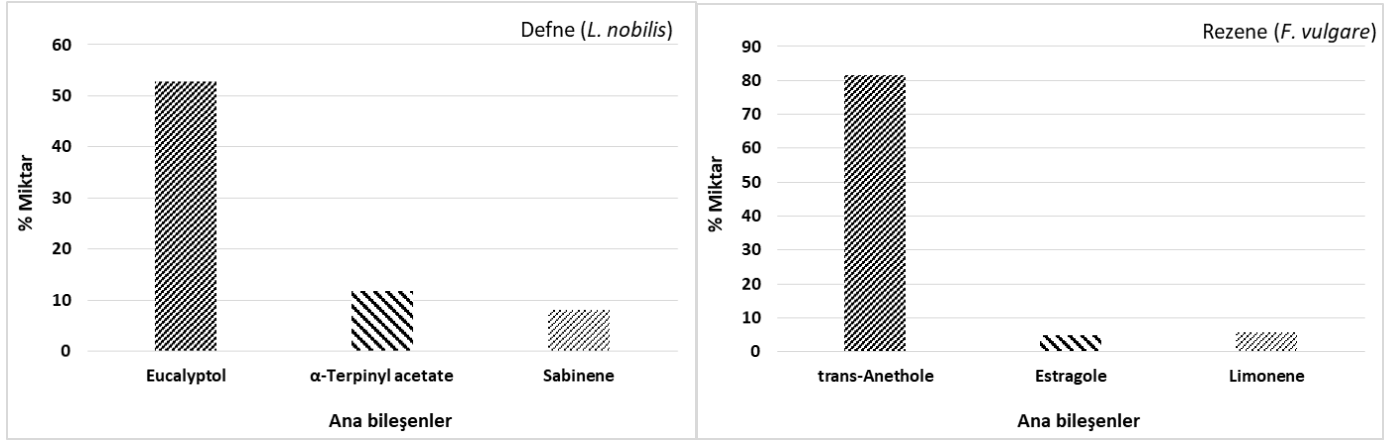
| RT | Bileşenler | Uçucu Yağ | | Mix-1 | | |
|--------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| | | Rezene* % | Defne* % | R ₇₅ D ₂₅ % | R ₅₀ D ₅₀ % | R ₂₅ D ₇₅ % |
| 3.87 | α-Pinene | 0.53 | 5.32 | 2.22 | 3.30 | 4.10 |
| 4.64 | Camphene | - | 0.22 | 0.10 | 0.14 | 0.18 |
| 5.49 | β-Pinene | 0.16 | 3.65 | 1.40 | 2.28 | 3.05 |
| 5.8 | Sabinene | 0.20 | 8.05 | 3.63 | 5.54 | 7.98 |
| 6.91 | β-Myrcene | - | 0.67 | 0.30 | 0.49 | - |
| 7.33 | α-Terpinene | - | 0.35 | 0.14 | 0.32 | 0.29 |
| 7.59 | 1,8-Epoxy-p-menth-2-ene | - | 0.29 | 0.06 | 0.10 | 0.12 |
| 7.88 | Limonene | 5.88 | 1.33 | 3.26 | 2.45 | 2.39 |
| 8.08 | Eucalyptol | 0.30 | 52.88 | 15.25 | 34.15 | 42.33 |
| 9.35 | γ-Terpinene | 0.09 | 0.31 | 0.27 | 0.54 | 0.49 |
| 9.59 | cis-Ocimene | 0.26 | 0.09 | 0.11 | - | - |
| 10.21 | o-Cymene | 0.26 | 1.99 | 0.46 | 0.67 | 0.80 |
| 10.58 | α-Terpinolene | - | 0.14 | - | - | 0.23 |
| 14.65 | Fenchone | 1.53 | - | 0.84 | 0.46 | 0.26 |
| 17.26 | trans Sabinene hydrate | - | 0.28 | 0.24 | 0.31 | 0.58 |
| 20.45 | cis-Sabinene hydrate | - | 0.19 | 0.18 | 0.20 | 0.40 |
| 20.6 | Linalool | - | 0.79 | 0.52 | 0.75 | 1.34 |
| 21.03 | Terpineol | - | 0.15 | 0.08 | 0.09 | 0.13 |
| 21.15 | Pinocarvone | - | 0.12 | 0.06 | 0.06 | - |
| 21.62 | Endobornyl acetate | - | 0.15 | 0.07 | 0.09 | 0.14 |
| 21.99 | β-Elemene | - | 0.58 | 0.15 | 0.19 | 0.28 |
| 22.12 | trans-Caryophyllene | - | 0.92 | 0.07 | 0.10 | 0.17 |
| 22.54 | Terpinen-4-ol | 0.05 | 2.83 | 0.68 | 1.71 | 1.46 |
| 23.43 | Myrtenal | - | 0.20 | - | - | - |
| 23.55 | Verbenol | - | 0.28 | 0.19 | 0.20 | 0.36 |
| 24.31 | β-Fenchyl alcohol | - | 0.55 | 0.21 | - | 0.37 |
| 24.46 | trans-Pinocarveol | - | 0.20 | 0.06 | 0.09 | 0.10 |
| 25.23 | Estragole | 4.75 | - | 2.87 | 1.80 | - |
| 26.03 | α-Terpinyl acetate | - | 11.77 | 4.38 | 6.95 | 9.44 |
| 26.3 | Germacrene -D | - | 0.29 | - | - | - |
| 26.64 | β-Chamigrene | - | 0.15 | - | - | - |
| 26.85 | α-Selinene | - | 0.11 | - | - | - |
| 27.22 | γ-Elemene | - | 0.38 | 0.07 | 0.09 | - |
| 27.38 | Carvone | 0.94 | - | 0.59 | 0.37 | 0.17 |
| 27.5 | Limonene oxide | - | 0.14 | - | 0.08 | 0.17 |
| 28.22 | Germacrene A | - | 0.56 | - | - | - |
| 28.84 | α-Humulene | - | 0.23 | - | - | - |
| 29.51 | Myrtenol | - | 0.13 | - | - | 0.08 |
| 30.9 | trans-Anethole | 81.55 | - | 59.32 | 34.42 | 18.36 |
| 35.72 | Caryophyllene oxide | - | 0.28 | 0.09 | 0.11 | 0.18 |
| 37.24 | Methyleugenol | - | 0.71 | 0.46 | 0.54 | 1.22 |
| 37.51 | P-Anisaldehyde | 1.76 | - | 0.26 | 0.55 | - |
| 40.4 | Spathulenol | - | 0.13 | 0.08 | 0.15 | 0.20 |
| 41.49 | Cinnamyl Acetate | - | 0.08 | 0.1 | - | 0.21 |
| 41.99 | Eugenol | - | 0.32 | 0.23 | 0.28 | - |
| 43.56 | β-Eudesmol | - | 0.13 | 0.13 | 0.11 | 0.15 |
| | Toplam bileşen sayısı | 14 | 41 | 37 | 35 | 33 |
| | Toplam bileşen % | 98.26 | 97.94 | 99.13 | 99.68 | 97.73 |

RT: alıkonma zamanı (dak.), *: Kara ve ark., (2020)

Çizelge 2. Mix-2 karışımlarına ait uçucu yağlarda belirlenen kimyasal bileşenler (%)
Table 2. Chemical compounds (%) determined in Mix-2 essential oil mixtures

| RT | Bileşenler | Uçucu Yağ | | Mix-2 | | |
|-------------|------------------------------|--------------|--------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | Rezene* | Defne* | R ₇₅ D ₂₅ | R ₅₀ D ₅₀ | R ₂₅ D ₇₅ |
| | | % | % | % | % | % |
| 3.87 | α-Pinene | 0.53 | 5.32 | 1.49 | 2.10 | 4.22 |
| 4.64 | Camphene | - | 0.22 | 0.10 | - | 0.16 |
| 5.49 | β-Pinene | 0.16 | 3.65 | 1.02 | 1.59 | 2.64 |
| 5.8 | Sabinene | 0.20 | 8.05 | 1.82 | 3.15 | 4.15 |
| 6.91 | β-Myrcene | - | 0.67 | - | 0.32 | 0.52 |
| 7.33 | α-Terpinene | - | 0.35 | 0.11 | 0.13 | 0.25 |
| 7.59 | 1.8-Epoxy-p-menth-2-ene | - | 0.29 | 0.10 | - | - |
| 7.88 | Limonene | 5.88 | 1.33 | 4.97 | 3.27 | 2.72 |
| 8.08 | Eucalyptol | 0.30 | 52.88 | 11.58 | 25.23 | 38.50 |
| 9.35 | γ-Terpinene | 0.09 | 0.31 | 0.22 | 0.26 | 0.41 |
| 9.59 | cis-Ocimene | 0.26 | 0.09 | 0.22 | 0.14 | - |
| 10.21 | o-Cymene | 0.26 | 1.99 | 0.63 | 1.03 | 1.52 |
| 10.58 | α-Terpinolene | - | 0.14 | - | - | - |
| 14.65 | Fenchone | 1.53 | - | 1.19 | 0.87 | 0.45 |
| 17.26 | trans Sabinene hydrate | - | 0.28 | 0.08 | 0.10 | 0.20 |
| 20.45 | cis-Sabinene hydrate | - | 0.19 | - | - | - |
| 20.6 | Linalool | - | 0.79 | 0.19 | 0.37 | 0.58 |
| 21.03 | Terpineol | - | 0.15 | 0.60 | - | 0.08 |
| 21.15 | Pinocarvone | - | 0.12 | - | - | - |
| 21.62 | Endobornyl acetate | - | 0.15 | - | - | - |
| 21.99 | β-Elemene | - | 0.58 | 0.16 | 0.25 | 0.41 |
| 22.12 | trans-Caryophyllene | - | 0.92 | 0.18 | 0.42 | 0.64 |
| 22.54 | Terpinen-4-ol | 0.05 | 2.83 | - | 1.23 | 1.66 |
| 23.43 | Myrtenal | - | 0.20 | 0.07 | - | - |
| 23.55 | Verbenol | - | 0.28 | 0.11 | 0.14 | 0.19 |
| 24.31 | β-Fenchyl alcohol | - | 0.55 | 0.14 | 0.25 | 0.41 |
| 24.46 | trans-Pinocarveol | - | 0.20 | 0.07 | 0.08 | 0.18 |
| 25.23 | Estragole | 4.75 | - | 2.80 | 2.08 | 1.57 |
| 26.03 | α-Terpineneyl acetate | - | 11.77 | 2.43 | 6.57 | 9.24 |
| 26.3 | Germacrene -D | - | 0.29 | 0.08 | 0.17 | 0.22 |
| 26.64 | β-Chamigrene | - | 0.15 | 0.06 | - | - |
| 26.85 | α-Selinene | - | 0.11 | - | - | - |
| 27.22 | γ-Elemene | - | 0.38 | - | 0.16 | 0.23 |
| 27.38 | Carvone | 0.94 | - | 0.73 | 0.51 | 0.25 |
| 27.5 | Limonene oxide | - | 0.14 | - | - | - |
| 28.22 | Germacrene A | - | 0.56 | - | - | - |
| 28.84 | α-Humulene | - | 0.23 | 0.07 | 0.12 | 0.17 |
| 29.51 | Myrtenol | - | 0.13 | - | - | - |
| 30.9 | trans-Anethole | 81.55 | - | 66.86 | 47.80 | 26.56 |
| 35.72 | Caryophyllene oxide | - | 0.28 | - | 0.13 | 0.19 |
| 37.24 | Methyleugenol | - | 0.71 | 0.16 | 0.34 | 0.50 |
| 37.51 | P-Anisaldehyde | 1.76 | - | 1.38 | 0.97 | 0.50 |
| 40.4 | Spathulenol | - | 0.13 | - | - | - |
| 41.49 | Cinnamyl Acetate | - | 0.08 | - | - | - |
| 41.99 | Eugenol | - | 0.32 | - | - | 0.23 |
| 43.56 | β-Eudesmol | - | 0.13 | - | - | - |
| | Toplam bileşen sayısı | 14 | 41 | 30 | 29 | 31 |
| | Toplam bileşen % | 98.26 | 97.94 | 99.62 | 99.78 | 99.55 |

RT: alıkonma zamanı (dak.), *: Kara ve ark., (2020)

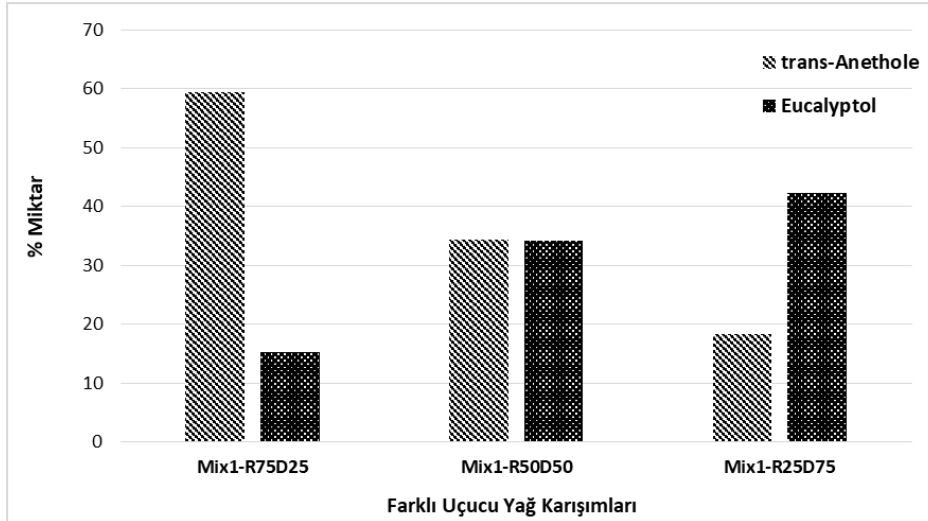


Şekil 1. Defne ve rezene bitki uçucu yağlarında tespit edilen temel bileşenler (%)

Figure 1. Major compounds (%) determined in fennel and laurel essential oils

olan *trans*-anethole'un rezene, yıldız anason ve anason gibi tıbbi, baharat ve aromatik bitkilerin ana bileşeni olduğu önceden yapılmış çalışmalarda da bildirilmiştir (Mimica-Dukic ve ark., 2003; Soylu ve ark., 2006; Acimovic ve ark., 2015; Ahmed ve ark., 2019; Wodnicka ve ark., 2019; Kara ve ark., 2020). Çalışmada elde edilen uçucu yağlar içinde yer alan kimyasal bileşenler ve % oranlarında tespit edilen farklılıkların, uçucu yağın çıkartıldığı bitkilerin genetik özelliklerinin yanı sıra, bu bitkilerin yetiştiği bölge ve iklim koşulları, ekstraksiyon yöntemleri ve bitki materyallerinin toplandığı zaman ile bitkinin fenolojik döneminin önemli düzeyde rol oynadığı bildirilmiştir (Woolf, 1999; Türkmen ve ark., 2021).

Aynı cam balon içerisinde farklı oranlarda (%) karıştırılıp birlikte kaynatılmak suretiyle elde edilen rezene (R) ve defne (D) uçucu yağ ($R_{75}:D_{25}$, $R_{50}:D_{50}$, $R_{25}:D_{75}$) karışımlardaki (Mix-1) kimyasal bileşenler benzer şekilde GC-MS'te belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Çizelge 1'de gösterilmiştir. Yapılan GC-MS analiz sonucunda Mix-1 karışımları içerisinde toplam 33-37 farklı kimyasal bileşen belirlenmiştir. Farklı oranda hazırlanan ($R_{75}:D_{25}$, $R_{50}:D_{50}$, $R_{25}:D_{75}$) Mix-1 karışımları içerisinde rezene ve defne uçucu yağların ana bileşenlerinden olan *trans*-anethole ve eucalyptol'un % bulunuş oranları; $R_{75}:D_{25}$ için %59.32:15.25, $R_{50}:D_{50}$ için %34.42:34.15, $R_{25}:D_{75}$ için %18.36:42.33 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 1, Şekil 2).

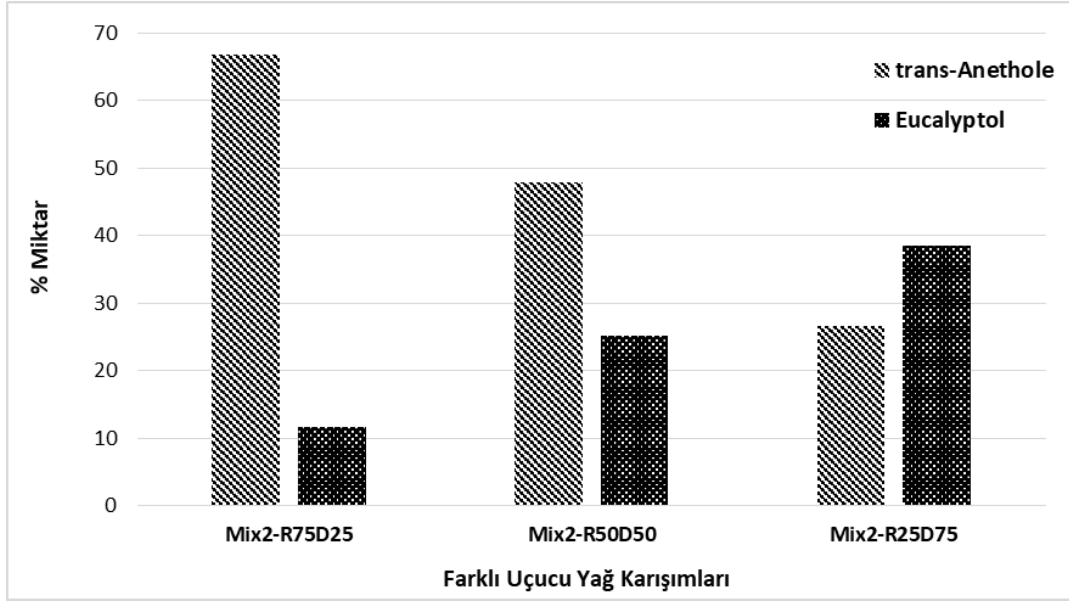


Şekil 2. Mix-1 uçucu yağ karışımında belirlenen ana bileşenler

Figure 2. Major compounds determined in Mix-1 essential oil mixtures

Uçucu yağların ayrı ayrı çıkartılarak, farklı oranlarda ($R_{75}:D_{25}$, $R_{50}:D_{50}$, $R_{25}:D_{75}$) karıştırılmasıyla elde edilen karışımlarının (Mix-2) GC-MS ile analizi sonucu belirlenen bileşenleri Çizelge 2'de verilmiştir. Yapılan GC-MS analiz sonucunda Mix-2 karışımları içerisinde toplam 29-31 farklı kimyasal bileşen belirlenmiştir.

Farklı oranda hazırlanan ($R_{75}:D_{25}$, $R_{50}:D_{50}$, $R_{25}:D_{75}$) Mix-2 karışımları içerisinde rezene ve defne uçucu yağların ana bileşenlerinden olan *trans*-anethole ve eucalyptol'un % bulunuş oranları; $R_{75}:D_{25}$ için %66.86:11.58, $R_{50}:D_{50}$ için %47.80:25.23, $R_{25}:D_{75}$ için %26.56:38.50 olarak tespit edilmiştir (Çizelge 2, Şekil 3).



Şekil 3. Mix-2 uçucu yağ karışımında belirlenen ana bileşenler

Figure 3. Major compounds determined in Mix-2 essential oil mixtures

Farklı yöntemlerle hazırlanan karışımlar içerisinde tespit edilen kimyasal bileşenler ve bulunuş oranları birlikte değerlendirildiğinde, Mix-1 karışımında bulunan bileşen sayısının Mix-2 karışımına kıyasla daha fazla olduğu belirlenmiştir. Birlikte kaynatılarak elde edilen Mix-1 karışım yağında rezene uçucu yağının ana bileşeni olan *trans*-anethole %18.36-59.32 oranları arasında bulunurken, elle karıştırılarak elde edilen Mix-2 karışım yağında *trans*-anethole'un %26.56-66.86 arasında değişen nispeten daha yüksek oranlarda olduğu tespit edilmiştir. Defne yağının ana bileşeni olan eucalyptol'un Mix-1 deki bulunuş oranı %15.25-42.33 oranında değişirken, Mix-2 karışımında eucalyptol'un bulunuş oranı %11.58-38.50 arasında değişmiştir. Mix-2 yağında *trans*-anethole oranı Mix-1 yağına kıyasla daha yüksek düzeyde bulunurken, eucalyptol oranı Mix-1 karışımında Mix-2 karışımına kıyasla biraz daha yüksek oranda tespit edilmiştir. Karışımlar içerisinde bulunan bileşenlerin sayı ve oranlarında tespit edilen farklılıkların karışım esnasında kimyasallar arasında ortaya çıkan reaksiyonların yanı sıra, oldukça düşük oranlarda (<%0.6) bulunan bazı minör bileşenlerin karışım oranlarındaki miktarlarında olan azalmalar sonucunda GC-MS yöntemi ile belirlenebilme sınırları altında kalabildiği düşünülmektedir.

Uçucu Yağ ve Karışımların *P. funerea*'nın Misel Gelişi ve Konidi Çimlenmesi Üzerine Antifungal Etkisi

Uçucu yağların teksel ve karışımlarının farklı konsantrasyonlarının buhar fazında fungal hastalık etmeni *P. funerea*'nın misel gelişimi üzerine olan antifungal etkinliği *in vitro* koşullarda belirlenmiş olup elde edilen sonuçlar Şekil 4, Çizelge 3 ve 4'te verilmiştir. *P. funerea*'ya karşı rezene ve defne

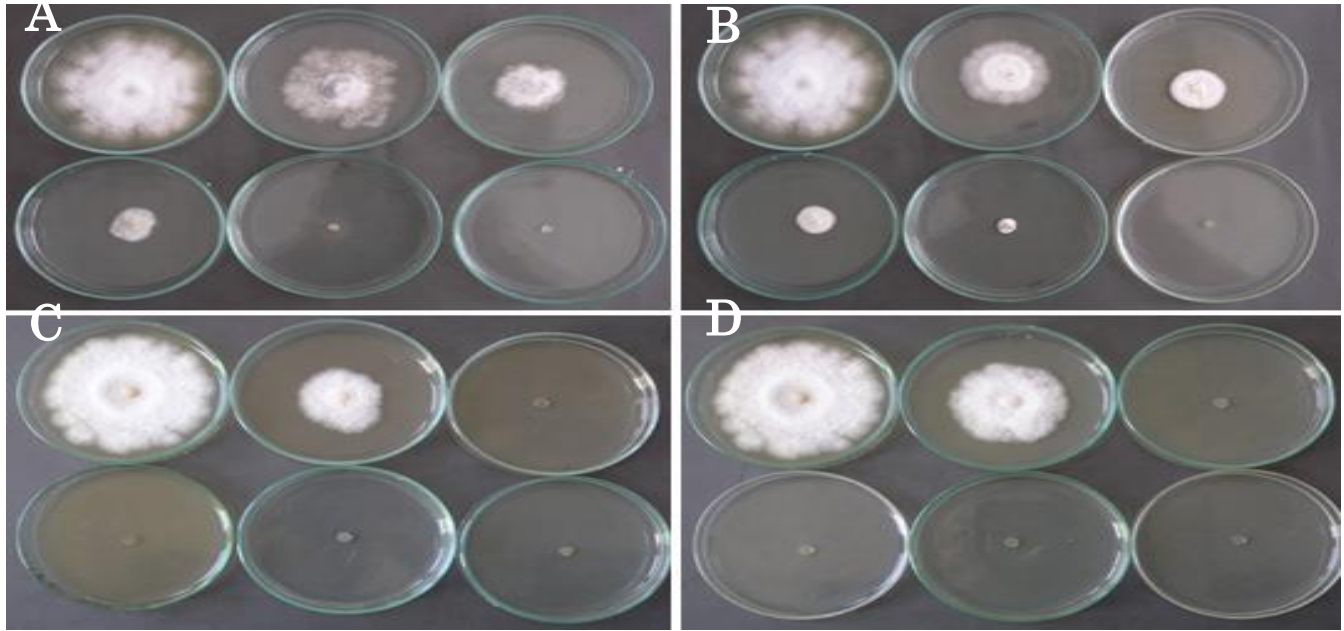
yağlarının tek başlarına kullanıldıklarında miselyal gelişimini tamamen engelleyen konsantrasyonlar sırasıyla 20 ve 25 µl petri⁻¹ olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuç daha önceden yapılmış çalışma sonucuna paralellik göstermiştir (Kara ve ark., 2020).

İki farklı şekilde elde edilen uçucu yağ karışımları, kullanılan karışımın içerisindeki *trans*-anethole:eucalyptol oranları ve konsantrasyonlarına bağlı olarak miselyal gelişimini değişen oranlarda engellemiştir. Rezene yağı tek başına kullanıldığında fungal etmenin misel gelişimini 20 µl petri⁻¹ konsantrasyonda tamamen engellerken, kaynatılarak hazırlanan Mix-1 olarak adlandırılan karışımındaki KR₇₅D₂₅ konsantrasyonunda misel gelişimi 15 µl petri⁻¹ konsantrasyonda engellenmiştir. Uçucu yağların elle karıştırılmak suretiyle hazırlanan ve Mix-2 olarak adlandırılan diğer karışım ise %100 engellemeyi gösterdiği antifungal etkinliğin 10 µl petri⁻¹ gibi nispeten daha düşük konsantrasyonda gözlenmiştir (Çizelge 3 ve Çizelge 4).

Antifungal etkinliğin defne uçucu yağı yönünden değerlendirildiğinde daha önemli olduğu, defne yağının tek başına uygulandığında 25 µl petri⁻¹ konsantrasyonunda gösterilen %100 engelleme etkinliğinin karışımlarla 10 µl petri⁻¹ konsantrasyonuna çekildiği tespit edilmiştir (Çizelge 3). Rezene ve defne uçucu yağlarının tek başına kullanıldığı uygulamalardaki misel gelişimini %50 engelleyen en düşük etkili konsantrasyonun (EC₅₀) yapılan Probit analizinde 5.66 ve 4.31 µl petri⁻¹ olarak belirlenmiş olup, bu değerlerin en düşük olduğu uygulamanın 4.82 µl petri⁻¹ ile Mix-2 formülasyonundaki R₇₅D₂₅ karışımının olduğu belirlenmiştir.

Fungal etmenin konidi çimlenmesinin engellenmesi üzerine yapılan çalışmada misel gelişimi üzerine olan etkilere benzer sonuçlar tespit edilmiştir. Konidilerin çimlenmesini azaltan konsantrasyonlar ile misel gelişimini azaltan konsantrasyonlar karşılaştırıldığında, uçucu yağ ve karışımlarının spor çimlenmesinin engelleyici etkisinin, misel gelişiminin engellenmesinde gözlenen değerlere nispeten daha yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 5 ve Çizelge 6).

Rezene ve defne uçucu yağlarının teksele kullanıldığında konidi çimlenmesini tamamen engelleyen konsantrasyonlar sırasıyla 15 ve 20 µl/petri olarak belirlenmiştir. Rezene ve defne uçucu yağları tek başına kullanıldığında fungal etmenin konidi çimlenmesini sırasıyla 15 µl petri⁻¹ ve 20 µl petri⁻¹ konsantrasyonda tamamen engellerken, Mix-2



Şekil 4. Farklı konsantrasyonlarda defne (A) ile rezene (B) uçucu yağlarının teksele, Mix2-R₇₅D₂₅ (C) ve Mix2-R₂₅D₇₅ (D) karışım uygulamalarında görülen misel gelişimlerinin engellenmeleri

Figure 4. Inhibition of mycelial growth by different concentrations of fennel (A), laurel (B), Mix2-R₇₅D₂₅ (C) and Mix2-R₂₅D₇₅ (D) blended essential oil treatments

Çizelge 3. Rezene (R) ve Defne (D) uçucu yağ ve karışımlarının *P. funerea*'nın misel gelişimi (mm) üzerine antifungal etkisi

Table 3. Antifungal effect of fennel and laurel essential oils and blended mixtures on mycelial growth (mm) of *P. funerea*

| Dozlar (µl petri ⁻¹) | Farklı uçucu yağ ve karışımların misel gelişimi (mm) üzerine etkinliği | | | | | | | |
|-------------------------------------|--|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Rezene | Defne | Mix-1 | | | Mix-2 | | |
| | | | R ₇₅ D ₂₅ | R ₅₀ D ₅₀ | R ₂₅ D ₇₅ | R ₇₅ D ₂₅ | R ₅₀ D ₅₀ | R ₂₅ D ₇₅ |
| 0.0 | 81.00d | 81.00f | 80.33d | 80.33e | 80.33e | 79.00c | 79.00c | 79.00c |
| 5.0 | 41.33cB | 33.33eA | 56.67cC | 70.33dD | 66.00dD | 36.00bAB | 42.66bB | 53.00bC |
| 10.0 | 21.66bB | 20.67dB | 36.33bC | 35.33cC | 52.00cD | 0.00aA | 0.00aA | 0.00aA |
| 15.0 | 18.00bB | 14.66cB | 0.00aA | 31.00cC | 42.33bD | 0.00aA | 0.00aA | 0.00aA |
| 20.0 | 0.00aA | 10.00bB | 0.00aA | 23.33bC | 0.00aA | 0.00aA | 0.00aA | 0.00aA |
| 25.0 | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a |
| EC ₅₀ | 5.66 | 4.31 | 7.25 | 10.52 | 10.66 | 4.82 | 5.08 | 5.48 |
| EC ₉₀ | 16.34 | 19.96 | 13.79 | 26.41 | 22.79 | 6.86 | 6.97 | 7.44 |

Elde edilen değerler 3 farklı petride gelişen fungus koloni çap (mm) değerlerinin ortalamasıdır. Aynı sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük harfler veya satır içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer büyük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, P<0.05). EC₅₀ ve EC₉₀, Probit analiz sonucunda fungusun misel gelişimini %50 ve %90 oranında engellediği tahmin edilen etkili konsantrasyon değerini gösterir.

Çizelge 4. Rezene (R) ve Defne (D) uçucu yağ ve karışımlarının *P. funerea*'nın misel gelişiminin engellenmesi (%) üzerine antifungal etkisi

Table 4. Antifungal effect of fennel and laurel essential oils and blended mixtures on inhibition of mycelial growth (%) of *P. funerea*

| Dozlar (μ l petri ⁻¹) | Farklı uçucu yağ ve karışımların misel gelişiminin engellenmesi (%) üzerine etkinliği | | | | | | | |
|---|---|--------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Uçucu Yağlar | | Uçucu Yağ Karışımları | | | | | |
| | Rezene | Defne | Mix-1 | | | Mix-2 | | |
| | | | R ₇₅ D ₂₅ | R ₅₀ D ₅₀ | R ₂₅ D ₇₅ | R ₇₅ D ₂₅ | R ₅₀ D ₅₀ | R ₂₅ D ₇₅ |
| 0.0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5.0 | 48.98 | 58.85 | 29.45 | 12.45 | 17.84 | 54.43 | 46.00 | 32.91 |
| 10.0 | 73.26 | 74.48 | 54.77 | 56.02 | 35.27 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 15.0 | 77.78 | 81.90 | 100.00 | 61.41 | 47.30 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 20.0 | 100.00 | 87.65 | 100.00 | 70.96 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 25.0 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

Çizelge 5. Rezene (R) ve Defne (D) uçucu yağ ve karışımlarının *P. funerea*'nın konidi çimlenmesi üzerine antifungal etkisi

Table 5. Antifungal effect of fennel and laurel essential oils and blended mixtures on conidial germination of *P. funerea*

| Dozlar (μ l petri ⁻¹) | Farklı uçucu yağ ve karışımların bulunduğu petride çimlenen konidi sayısı | | | | | | | |
|---|---|---------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Uçucu Yağlar | | Uçucu Yağ Karışımları | | | | | |
| | Rezene | Defne | Mix-1 | | | Mix-2 | | |
| | | | R ₇₅ D ₂₅ | R ₅₀ D ₅₀ | R ₂₅ D ₇₅ | R ₇₅ D ₂₅ | R ₅₀ D ₅₀ | R ₂₅ D ₇₅ |
| 0.0 | 94.33d | 94.33e | 93.67d | 93.67f | 93.67e | 92.33c | 92.33c | 92.33c |
| 5.0 | 31.33cC | 48.67dD | 54.33cD | 78.67eE | 74.33dE | 11.33bA | 20.33bB | 22.33bB |
| 10.0 | 14.00bB | 34.33cD | 21.67bC | 32.67dD | 36.67cD | 0.00aA | 0.00aA | 0.00aA |
| 15.0 | 0.00aA | 19.33bB | 0.00aA | 24.67cC | 22.00bBC | 0.00aA | 0.00aA | 0.00aA |
| 20.0 | 0.00aA | 0.00aA | 0.00aA | 13.67bB | 0.00aA | 0.00aA | 0.00aA | 0.00aA |
| 25.0 | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a | 0.00a |
| EC ₅₀ | 4.02 | 6.07 | 5.82 | 8.94 | 8.33 | 3.17 | 3.76 | 3.85 |
| EC ₉₀ | 9.60 | 17.04 | 11.92 | 20.45 | 17.05 | 5.36 | 6.16 | 6.33 |

Elde edilen değerler 3 farklı petride çimlenen konidi sayısının ortalamasıdır. Aynı sütun içinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer küçük harfler veya satır içerisinde yer alan ortalama değerlerin yanındaki benzer büyük harfler uygulamalar arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olmadığını gösterir (Duncan's Multiple Range Test, P \leq 0.05).

EC₅₀ ve EC₉₀, Probit analizi sonucunda fungusun konidi çimlenmesini %50 ve %90 oranında engellediği tahmin edilen etkili konsantrasyon (μ l petri⁻¹) değerini gösterir.

Çizelge 6. Rezene (R) ve Defne (D) uçucu yağ ve karışımlarının *P. funerea*'nın konidi çimlenmesinin engellenmesi (%) üzerine antifungal etkisi

Table 6. Antifungal effect of fennel and laurel essential oils and blended mixtures on % inhibition of conidial germination of *P. funerea*

| Dozlar (μ l petri ⁻¹) | Farklı uçucu yağ ve karışımlarının konidi çimlenmesini % engelleme oranları | | | | | | | |
|---|---|--------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | Uçucu Yağlar | | Uçucu Yağ Karışımları | | | | | |
| | Rezene | Defne | Mix-1 | | | Mix-2 | | |
| | | | R ₇₅ D ₂₅ | R ₅₀ D ₅₀ | R ₂₅ D ₇₅ | R ₇₅ D ₂₅ | R ₅₀ D ₅₀ | R ₂₅ D ₇₅ |
| 0.0 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5.0 | 66.78 | 48.41 | 41.99 | 16.02 | 20.64 | 87.73 | 77.98 | 75.81 |
| 10.0 | 85.16 | 63.60 | 76.87 | 65.13 | 60.86 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 15.0 | 100.00 | 79.50 | 100.00 | 73.67 | 76.51 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 20.0 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 85.41 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |
| 25.0 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 |

karışımındaki uygulamaların tamamında konidi çimlenmesinin engellenmesi 10 µl petri⁻¹ konsantrasyonlarında görülmüştür (Çizelge 5 ve Çizelge 6). Elde edilen sonuçlara göre antifungal etkinliğin defne uçucu yağı yönünden değerlendirildiğinde daha önemli olduğu, normalde 20 µl petri⁻¹ konsantrasyonunda gösterilen %100 engelleme etkinliğinin karışımlarla 10 µl petri⁻¹ konsantrasyonuna çekildiği tespit edilmiştir (Çizelge 5 ve Çizelge 6). Rezene ve defne uçucu yağlarının tek başına kullanıldığı uygulamalarda konidi çimlenmesini %50 engelleyen en düşük etkili konsantrasyonlar (EC₅₀) rezene için 4.02 µl petri⁻¹, defne içinse 6.07 µl petri⁻¹ olarak belirlenmiştir. Karışımlar içinde en düşük EC₅₀ değeri ise 3.17 µl petri⁻¹ konsantrasyon ile Mix-2 formülasyonundaki R₇₅D₂₅ karışımında belirlenmiştir.

Yapılan literatür araştırmasında limoni servi ağacında sorun olan sürgün uç yanıklık hastalığı etmeni *P. funerea*'ya karşı bitki uçucu yağlarının antifungal etkinliğinin araştırıldığı oldukça sınırlı sayıda yapılmış çalışma bulunmaktadır. Cheng ve ark. (2011) servi ailesine dahil bir ağaç olan *Cunninghamia konishii* uçucu yağının ana bileşenlerini GC-MS analizleri ile araştırdıkları çalışmalarında, uçucu yağın aralarında *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* ve *Pestalotiopsis funerea*'nında bulunduğu fungal hastalık etmenlerine karşı oldukça yüksek düzeyde antifungal etkinliğinin olduğunu bildirmişlerdir. Ho ve ark. (2012) Tayvan'a özgü endemik bir ağaç türü olan yalancı servi (*Chamaecyparis formosensis* Matsum) uçucu yağının ana bileşenin β-eudesmol (%25.1) olduğunu, uçucu yağın 500 µg ml⁻¹ konsantrasyonunda *Fusarium oxysporum*, *Pestalotiopsis funerea* ve *Ganoderma austral*, hastalık etmenlerine karşı sırasıyla %92.7, 71.1, ve 87.7 engelleme oranlarıyla yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir. *Sequoia sempervirens* uçucu yağın antifungal etkinliğinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise *Pestalotiopsis funerea* misel gelişimin 0.417 mg ml⁻¹ konsantrasyonunda %73 oranında engellendiğini bildirmişlerdir (Espinosa-garcia ve ark., 1993).

Uçucu yağların teksel olarak antifungal etkinliklerinin araştırıldığı birçok çalışma olmasına rağmen, karışımların antifungal etkinliklerinin araştırıldığı oldukça sınırlı sayıda yapılmış çalışma bulunmaktadır. Tadtong ve ark. (2012) lavanta, petigrain, misk adaçayı, ylang ylang ve yasemin uçucu yağlarından harmanlanmış iki farklı uçucu yağ karışımlarının bakteriyel *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Escherichia coli* ile fungal etmen *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal etkinliklerinin araştırıldığı çalışmalarında, uçucu yağların karışım halinde kullanıldıklarında teksel olarak kullanıldıklarına kıyasla daha güçlü antimikrobiyal

etkinlik gösterdiklerini belirlemişlerdir. Daha önceden yapılmış olan çalışmalarda farklı yöntemlerle elde ettiği rezene defne uçucu yağ karışımlarının beyaz çürüklük hastalığı etmeni *Sclerotinia sclerotiorum*'un misel gelişimini tek tek kullanılan dozlarından %50 daha az dozlarda engellediğini belirlemiştir (Türkmen, 2015; Türkmen ve Kaya, 2021). Söz konusu çalışmalardan elde edilen sonuçların mevcut çalışmada elde edilen sonuçları destekler nitelikte olduğu görülmüştür.

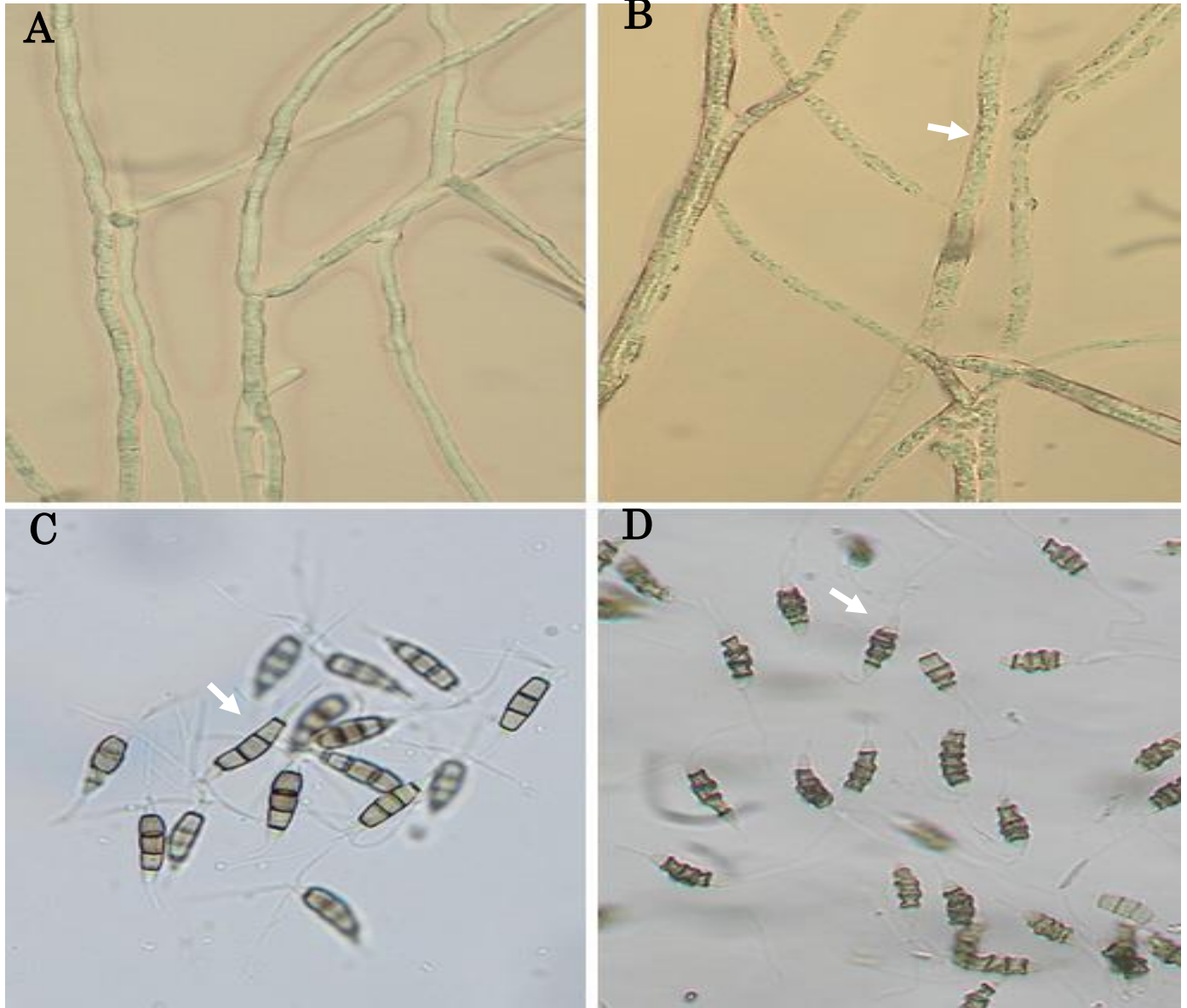
Uçucu yağlar içerisinde yer alan ana bileşenlerin, gösterilen biyoetkinliklerden sorumlu olduğu yaygın olarak bilinen bir durumdur. Yapılan literatür araştırmasında, defne ve rezene uçucu yağının ana bileşenleri olan eucalyptol ve *trans*-anethole bileşenlerin sinerjik antifungal etkinliğinin araştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre, karışımlarda değişen *trans*-anethole ve eucalyptol oranlarının uçucu yağlarının antifungal etkinlikleri üzerinde önemli düzeyde etkisinin bulunduğu açıkça görülmüştür. Söz konusu antifungal etkinliğin artışında, *trans*-anethole'ün daha belirgin bir role sahip olduğu belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda *trans*-anethole ve eucalyptol'ün ana bileşen olarak tek başlarına antifungal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Mimica-Dukic ve ark., 2003). Fujita ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, *trans*-anethole'ün polygodial ve (2E)-undecenal'in fungusitatik olan etkinliğini sinerjik olarak artırmak suretiyle *Saccharomyces cerevisiae* ve *Candida albicans*'a karşı fungusidal etkinliğe çevirdiğini bildirmişlerdir. Huang ve ark. (2010) star anason bitkisinin uçucu yağı ve ana bileşeni *trans*-anethole'ün fungal hastalık etmenlerinden *A. solani*, *B. maydis*, *F. graminearum*, *P. aphanidermatum* ve *R. solani*'ye karşı yüksek düzeyde antifungal etkinlik gösterdiğini, uçucu yağın antifungal etkinliğinin sahip olduğu %99.5 gibi yüksek orandaki *trans*-anethol'den kaynaklandığını bildirmişlerdir. Morcia ve Terzi (2012) terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1,8-cineole (eucalyptol) ve thymol'ün ana bileşen olarak *in vitro* antifungal etkinliğini fungal hastalık etmenlerinden *Fusarium subglutinans*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus carbonarius*, *Alternaria alternata* ve *Penicillium* sp. karşı araştırdıkları çalışmalarında tüm ana bileşenlerin antifungal etkinliğe sahip olduğunu, antifungal etkinlik sıralamasının thymol > eugenol > carvone > terpinen-4-ol > 1,8-cineole şeklinde gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Uçucu Yağ Karışımlarının Misel ve Konidi Morfolojileri Üzerine Antifungal Etkisi

Uçucu yağ karışımları uygulanan petrilere fungus

hiflerinde ve konidiler üzerinde yapılan mikroskopik gözlemler sonucunda, karışımların %100 engelleyen konsantrasyonlarında fungus hifleri ve konidilerin morfolojik yapılarında önemli yapısal değişimlere neden olduğu görülmüştür (Şekil 5). Karışımlar içerisinde bulunan uçucu bileşik(ler)in plazma membranına zarar vererek sitoplazmik pıhtılaşma, hif

çapının daralması ve hif çeperinin parçalanması gibi deformasyonlara sebep olmuştur. Yakın zamanda yapılmış olan çalışmada rezene ve defne uçucu yağının fungal etmenin misel yapısında benzer deformasyonlara neden olduğu belirlenmiş olup (Kara ve ark., 2020), mevcut çalışmada farklı olarak uçucu yağların teksele kullanılmalarının yanı sıra uçucu yağ



Şekil 5. Fungal etmenin hif ve konidilerin morfolojik yapıları üzerine uçucu yağ karışımlarının etkileri. (A) Kontrol petrisinde gelişen fungus hifi, (B) karışım (Mix2-R75D25) uygulaması yapılan petride gelişen hiflerin sitoplazmalarında pıhtılaşma (ok) şeklinde görülen morfolojik değişiklikler. (C) Uçucu yağ karışımı (Mix2-R75D25) konulmadan önce petride çimlenen sağlıklı konidiler (ok). (D) Uçucu yağ karışımı (Mix2-R75D25) eklendikten sonra önceden çimlenmiş konidilerde gözlenen morfolojik değişiklikler ve büzüşmeler (ok)

Figure 5. Effect of essential oil mixtures on morphological structures of hyphae and conidia of fungal agent. (A) Hyphae on control petri. (B) Morphological deformations such as cytoplasmic coagulation (arrow) occurring on hyphae developed in essential oil blend (Mix2-R75D25) treated petri. (C) Healthy germinated conidia on petri plate before adding essential oil blend (Mix2-R75D25). (D) Morphological deformations and shrinkage observed in pre-germinated conidia after the addition of essential oil blend (Mix2-R75D25)

karışımlarında sadece misel yapısında değil aynı zamanda konidilerin morfolojisi üzerinde önemli yapısal bozulmalara neden olduğu tespit edilmiştir.

Yapılmış olan önceki çalışmalarda da özellikle *Thymra* spp., *Thymus* spp., *Origanum* spp., ve *Foeniculum* spp. ait bitki uçucu yağların fungal ve

bakteriyel hastalık etmenlerin morfolojik yapılarında bu tür modifikasyonlara neden olduğu, söz konusu yapısal bozulmaların uçucu yağlardaki ana bileşenlerin mikroorganizmanın hücre membranına zarar vermek suretiyle hücre duvar sentezini düzenleyen enzimatik reaksiyonlar üzerine etkisiyle ilgili olabileceği bildirilmiştir (Soylu ve ark., 2007; Soylu ve ark., 2010; Lucas ve ark., 2012; Yong ve ark., 2015; da Silva ve ark., 2019; Kachur ve Suntres, 2020, Türkmen ve ark., 2021).

SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak rezene / defne uçucu yağ karışımlarının teksele kullanılmalarına kıyasla nispeten daha düşük konsantrasyonlarda daha yüksek antifungal etkinlik göstermiş olmaları, gelecekte planlanacak olan etkili, doğal yeni biyofungisit(ler)in tasarlanmasına katkı sağlayacağı şüphesizdir. Çalışma sonuçları, bu alanda çalışan araştırmacılara uçucu yağların ve/veya ana bileşenlerinin kombinasyon halinde kullanılması halinde sinerjik etkinlik göstereceğini, uygulamanın sadece bitki koruma alanında değil mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için gıda alanında da kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

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

Acimovic M, Tesevic V, Todosijevic M, Djisalov J, Oljaca S 2015. Compositional characteristics of the essential oil of *Pimpinella anisum* and *Foeniculum vulgare* grown in Serbia. *Botanica Serbica*, 39: 9-14.

Adams RP 2007. Identification of Essential Oils by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. Allured Publ. Corp., Carol Stream.

Ahmed AF, Shi MJ, Liu CY, Kang WY 2019. Comparative Analysis of Antioxidant Activities of Essential Oils and Extracts of Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) Seeds From Egypt and China. *Food Science and Human Wellness*, 8: 67-72.

Bajo J, Santamaria O, Diez JJ 2008. Cultural Characteristics and Pathogenicity of *Pestalotiopsis funerea* on *Cupressus arizonica*. *Forest Pathology*, 38: 263-274.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Waomar M 2008. Biological Effects of Essential Oils-A Review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.

Chahal KK, Kaur M, Bhardwaj U, Singla N, Kaur A 2017. A Review on Chemistry and Biological Activities of *Laurus nobilis* L. Essential Oil. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6: 1153-

1161.

Cheng SS, Lin CY, Gu HJ, Chang ST 2011. Antifungal Activities and Chemical Composition of Wood and Leaf Essential Oils from *Cunninghamia konishii*. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 31:204-217.

Demir V, Gunhan T, Yagcioglu AK, Degirmencioglu A 2004. Mathematical Modelling and the Determination of Some Quality Parameters of Air-Dried Bay Leaves. *Biosystems Engineering*, 88: 325-335.

Elkiran O, Akbaba E, Bagcı E 2018. Constituents of Essential Oils from Leaves and Seeds of *Laurus nobilis* L.: A Chemotaxonomic Approach. *Bangladesh Journal of Botany*, 47(4): 893-901.

Espinosagarcia FJ, Saldivargarcia P, Langenheim, JH 1993. Dose-Dependent Effects In vitro Of Essential Oils on the Growth of 2 Endophytic Fungi in Coastal Redwood Leaves. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21:185-194.

Fujita K, Fujita T, Kubo I 2007. Anethole, a Potential Antimicrobial Synergist, Converts a Fungistatic Dodecanol to a Fungicidal Agent. *Phytotherapy Research*, 21:47-51

Gordon TR, Swett CL, Wingfield MJ 2015. Management of Fusarium Diseases Affecting Conifers. *Crop Protection*, 73: 28-39.

Ho CL, Hua KF, Hsu KP, Wang EIC, Su YC 2012. Composition and Antipathogenic Activities of the Twig Essential Oil of *Chamaecyparis formosensis* from Taiwan. *Natural Product Communications*, 7:933-936.

Hongratanaworakit T, Srimuang P, Wichanpreechar A, Akarapattaranithi T, Taorang B, Rawdlaurh P 2017. Chemical Composition and Effects of Blended Essential Oil on Humans. *Journal of Applied Pharmacy Science*, 7 (01): 165-170.

Huang Y, Zhao J, Zhou L, Wang J, Gong Y, Chen X, Sun Z-X, Wang Q, Jiang W 2010. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Illicium verum* Fruit and Its Main Component *trans*-Anethole. *Molecules*, 15(11):7558-7569.

Kachur K, Suntres Z 2020. The Antibacterial Properties of Phenolic Isomers, Carvacrol and Thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60:3042-3053.

Kara M, Soylu S, Türkmen M, Kaya DA 2020. Determination and Antifungal Activities of Laurel and Fennel Essential Oils Against Fungal Disease Agents of Cypress Seedlings. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 17: 264-275.

Lucas GC, Alves E, Pereira RB, Perina FJ, de Souza RM 2012. Antibacterial Activity of Essential Oils on *Xanthomonas vesicatoria* and Control of Bacterial Spot in Tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(39): 351-359.

Morcia C, Terzi V 2012. *In vitro* Antifungal Activity of Terpinen-4-ol, Eugenol, Carvone, 1,8-Cineole

- (Eucalyptol) and Thymol Against Mycotoxigenic Plant Pathogens. Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 29(3):415-22
- Mordue JEM 1976. *Pestalotiopsis funerea*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria, 514: 1-2.
- Nazzaro F, Fratianni F, Martino LD, Coppola R, Feo VD 2013. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. Pharmaceuticals, 6: 1451-1474.
- Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, Feo VD 2017. Essential Oils and Antifungal Activity. Pharmaceuticals, 10: 86.
- Ozcan MM, Chalchat JC, Arslan D, Ates A, Unver A 2006. Comparative Essential Oil Composition and Antifungal Effect of Bitter Fennel (*Foeniculum vulgare* ssp. *piperitum*) Fruit Oils Obtained During Different Vegetation. Journal of Medicinal Food, 9: 552-561.
- Ozcan M, Chalchat JC 2005. Effect of Different Locations on the Chemical Composition of Essential Oils of Laurel (*Laurus nobilis* L.) Leaves Growing Wild in Turkey. Journal of Medical Food, 8 (3): 408-411.
- Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L 2009. Antifungal Activity of the Clove Essential Oil From *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and Dermatophyte Species. Journal of Medical Microbiology, 58: 1454-1462.
- Salem MZM, Elansary HO, Ali HM, El-Settawy AA, Elshikh MS, Abdel-Salam EM, Sklacka-Wozniak K 2018. Bioactivity of Essential Oils Extracted From *Cupressus macrocarpa* Branchlets and *Corymbia citriodora* Leaves Grown in Egypt. BMC Complementary and Alternative Medicine, 18:23
- Sinclair WA, Lyon HH, Johnson WT 1993. Diseases of Trees and Shrubs. New York: Cornell University Press.
- Soylu EM, Soylu S, Kurt Ş 2006. Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Various Plants Against Tomato Late Blight Disease Agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia, 161: 119-128.
- Soylu S, Yigitbas H, Soylu EM, Kurt S 2007. Antifungal Effects of Essential Oils from Oregano and Fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology, 103(4): 1021-1030.
- Soylu EM, Kurt S, Soylu S 2010. *In vitro* and *in vivo* Antifungal Activity of Essential Oils of Various Plants Against Tomato Grey Mould Disease Agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, 143(3): 183-189.
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR 2016. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils Against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016: 3012462.
- Staub T 1991. Fungicide Resistance: Practical Experience with Antiresistance Strategies and the Role of Integrated Use. Annual Review of Phytopathology, 29:421-442.
- Taban A, Saharkhiza MJ, Niakousaric M 2018. Sweet Bay (*Laurus nobilis* L.) Essential Oil and Its Chemical Composition, Antioxidant Activity and Leaf Micromorphology Under Different Extraction Methods. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 9:12-18.
- Tadtong S, Suppawat S, Tintawee A, Saramas P 2012. Antimicrobial Activity of Blended Essential Oil Preparation. Natural Product Communications, 7(10):1401-1404.
- Türkmen M 2015. Farklı Yöntemlerle Elde Edilen Uçucu Yağ Karışımlarının Antifungal Etkinliklerinin Belirlenmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, 55 sayfa.
- Türkmen M, Mert A 2020. Farklı Azot Dozlarının Kişniş (*Coriandrum sativum* L.) Yaş Herba Uçucu Yağ Bileşenleri Üzerine Etkisi. Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 25(3):309-315.
- Türkmen M, Kaya DA 2021. Antifungal effect of some essential oil combinations. International Journal of Chemistry and Technology, 5(1): 6-10.
- Türkmen M, Kara M, Maral, H, Soylu S 2021. Determination of chemical component of essential oil of *Origanum dubium* plants grown at different altitudes and antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Food Processing and Preservation, 45: e15787.
- Uysal A, Kurt Ş, Kara M, Soylu S, Soylu EM 2021. Bazı Fidanlıklarda Görülen Toprak Kökenli Fungusların Belirlenmesi. Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi, 31: 142-149.
- Wodnicka A, Huzar E, Dzieciol M, Krawczyk M 2019. Comparison of the Composition and Fungicidal Activity of Essential Oils from Fennel Fruits Cultivated in Poland and Egypt. Polish Journal of Chemical Technology, 21: 38-42.
- Woolf A 1999. Essential Oil Poisoning. Journal of Toxicology: Clinical Toxicology, 37: 721-727.
- Yılmaz B, Deniz İ 2017. The Effects of Cultivation Area and Altitude Variation on the Composition of Essential Oil of *Laurus nobilis* L. Grown in Eastern, Western and Central Karadeniz Region. International Journal Secondary Metabolite, 4: 187-194.
- Yong AL, Ooh KF, Ong HC, Chai TT, Wong FC 2015. Investigation of Antibacterial Mechanism and Identification of Bacterial Protein Targets Mediated by Antibacterial Medicinal Plant Extracts. Food Chemistry, 186: 32-36.

Kuru Böcekler İçin Yeni Bir Yumuşatma Sistemi

Mürşit Ömür KOYUNCU¹, Murat KÜTÜK²

^{1,2}Department of Biology, Faculty of Science and Arts, Gaziantep University, 27310 Gaziantep, Turkey,

¹<https://orcid.org/0000-0002-0789-6925>, ²<https://orcid.org/0000-0003-1567-1002>

✉: mursitkoyuncu@hotmail.com

ÖZET

Bu çalışma kurumuş böcek örneklerini yumuşatmak için yeni bir yöntem sunar. Sistem ısıya dayanıklı cam malzemeden yapılmış 4 ana bölümden oluşur. Sistemin ana mantığı kuru böcekleri izole bir alanda sıcak buharla yumuşatmaktır. Sistemin en önemli başarıları, kuru böcek örneklerini çok kısa bir zamanda yumuşatması, mantarlaşmayı minimuma indirmesi ve ekstremite kayıplarını önlemesidir. Yumuşatma süresi böceğin boyutuna, kitin tabakasının yoğunluğuna ve böceğin ne kadar kuru kaldığına bağlı olarak değişir. Yapılan denemelerde böcek takımlarının bu sistemde yumuşatması 2 saatten fazla sürmez. Sistem 5 mm– 120 mm uzunluğundaki böcekler için kullanılabilir. Tasarlanan bu sistemle 2950 kuru ergin böcek yumuşatılmıştır.

A New System for Relaxing the Dry Insects

ABSTRACT

The paper presents a new system for relaxing dry adult insect specimens. The system was designed with 4 main parts built with high temperature resistant glass material. The main logic of the system was to relax dry adult insects in an isolated chamber with hot steam. The most important achievements of the system included relaxing the dry insect samples in a very short time, minimizing fermentation and preventing extremity losses. The relaxing duration varies based on the insect size, the density of the chitin layer and the degree of dryness. The experimental results show that it does not take more than 2 hours for the insect orders to relax in this system. The system can be used for insects of 5 mm to 120 mm in length. With the designed system, about 2950 dry adult insects were relaxed and prepared.

To Cite: Koyuncu MÖ, Kütük M 2022. A New System for Relaxing to Dry Insects. KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi 25 (1): 127-132. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.852124.

INTRODUCTION

According to the literature, slightly over 1 million insect species were described (Gullan and Cranston 2012). In other words, these species were reported in a taxonomic publication as “new” to science. Since certain insect species were noted as new more than once in the literature due to the failure of the recognition of a variation or the neglect of previous studies, it is not possible to ascertain the actual number of described species. Ongoing various studies on insect diversity are published globally. Certain, but not all, recent reanalysis studies reported lower estimates based on the calculations conducted by taxonomists and extrapolations from regional sampling methods rather than calculations based on ecological scaling. It would be safe and realistic to propose a figure of between 4 and 6 million species of insects to be described (Gullan and Cranston 2012).

Generally, insect materials are identified morphologically and diagnostic procedures are usually performed on adult specimens with classical methods when adult insect specimens are either fresh or relaxed. If the specimens are collected more than a few days before the processing, they may be hard, brittle, and it is almost impossible to pin them without breaking or damaging them. Certain extremities including antenna, mouthparts, wing, abdomen, and legs or all material that are used in the identification of insects, may be destroyed due to fragility. In the preparation process, the adult insect should remain fresh or moistened for a certain period. The process of relaxing the dried adult insects is very important since dry specimens could suffer from negative morphological properties and discoloration, which complicate the morphological diagnosis of the taxon. Especially during the relaxing of butterfly

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi :
Kabul Tarihi :

Anahtar Kelimeler

Yumuşatma sistemi
Böcekler
Yeni yöntem

Research Article

Article History

Received :
Accepted :

Keywords

Relaxing system
Insects
New System

(Lepidoptera) specimens, extremities loss is more than other insect orders. Relaxing the dry insect samples using several traditional methods takes a long time and mold is formed during the relaxing process. This is a serious challenge in taxonomic studies.

Any dry insect to pin should be relaxed, that is, remoistened sufficiently to prevent breaking when the pin is inserted or to allow the rearrangement or repositioning of the parts of the specimen. Insects, especially Lepidoptera with spread wings should be relaxed even when they have died only recently. Once the rigor mortis sets in, the muscles of Lepidoptera stiffen in a matter of minutes, preventing any desired adjustment. However, when treated in a relaxing chamber, the procedure becomes much easier. In typical cases eight hours in a relaxing chamber should provide sufficient relaxation; however, larger specimens may require 24 hours or more. Storing the specimens in a cyanide jar for a short period could relax them; however, the method is far from being reliable (Lane, 1965).

High humidity must be provided in a relaxing chamber for periods between several hours and up to about 3 days, based on the circumstances, without completely wetting the specimens. Mold growth should also be avoided, since it may destroy the specimens that are left for too long in relaxing chambers unless a chemical mold inhibitor is introduced. Insects killed with cyanide could usually be relaxed more easily; however, certain terminating agents, especially chloroform, ether, and carbon tetrachloride may stiffen muscles extremely, leading to brittle specimens that resist the humidity in the relaxing chamber. For instance, very hot water is injected into butterfly thoracic muscles using a fine hypodermic needle before spreading in Korea. However, certain specimens could not be relaxed sufficiently using any method (Schauff, 2001).

Insect relaxing is a procedure that has been conducted for many years. Some different studies performed in the past years are as follows.

Kılıç (1987) adopted a relaxing method for dry insect samples. In this method, a layer of moistened thin sand was placed in a large chamber and the sand was covered with a blotting paper. Then, dry adult insects were placed on the blotting paper for relaxing during 1-2 days. Doğanlar (2003) placed the dry butterfly specimens in a petri dish, the base of which was covered with a blotting paper, and moistened the surface of the blotting paper. Then, dry insect adults were placed on the blotting paper for relaxing during 24 hours. Doğruöz (2005), placed a water-saturated sponge and covered the sponge with blotting paper in a large chamber. In this System, the samples did not come into direct contact with the water and were allowed to relax for 1-2 days. In another relaxing

process for bees, Plant and Dubitzky (2008) placed a Styrofoam in a large chamber and added hot water. As the Styrofoam floated on the water, the chamber lid was closed and dried adult bee samples were relaxed for 12-24 hours.

In this paper, it was aimed to relaxing dry insects quickly, undamaged, without fungus and sustainable.

MATERIALS and METHODS

Equipment: High-temperature resistant glass chamber, high-temperature resistant glass pipe, high-temperature resistant glass lid, heater, cloth barrier, net barrier.

In a relaxing system, heat-resistant glass material was used. However, it can be used instead in other heat-resistant materials (eg. heat-resistant metal)

Procedure: Based on the process principle, the system includes 4 sections. The laboratory type of electric heater at the bottom, 15x15x15 heat-resistant glass cube on the top of the heater, 2 cm diameter pipe on the top of the glass cube that provides both the cover and the vapor passage. At the top there is a glass cube of 15x15x15, which is connected to the pipe and at the top where the vapor reaches.

The heater should be at 100 °C until relaxation is finished, because distilled water needs to boil until relaxing is finished and Distilled water is placed in the glass cube above the heater and the lid must be closed. The water evaporating from this glass cube passes through the steam pipe and reaches the upper part ensuring the formation of the steam at the bottom to go up quickly and directly. There is a cloth barrier with a network barrier in the top glass cube which is also used to prevent the steam coming from below from directly touching the insects. There is a network barrier where dry insects are placed 5 cm above the cloth barrier. Approximately 20 minutes after the relaxing system is started, the vapor transfer through the vapor pipe to the upper chamber begins.

RESULTS

In this study, most of the insect specimens were collected with Robinson Type Light Trap and an insect net in different provinces of Turkey. For insect specimens preparation, they should be fresh; however, it could delay since it could take a very long time in certain cases. This situation makes the preparation process impossible without losing extremities. During the PhD research of the first author, most adult Geometridae specimens were collected and stored in the Gaziantep University Entomology Laboratory (GUGT). For the preparation process, a designed relaxing system was used (Figure 1). Several methods were reported to relax tissues

and chitin structures during the preparation of dry insects. However, in many methods reported by different researchers, the relaxing process could take up to 2 days, which causes insect fermentation or extremity loss. The present study aims to shorten the

relaxing process and to prevent both mold and extremity loss. In this study, dried insect adult sizes varied between 5-120 mm. The number of relaxed insects, average relaxing time, testes insect orders are presented in Table 1.

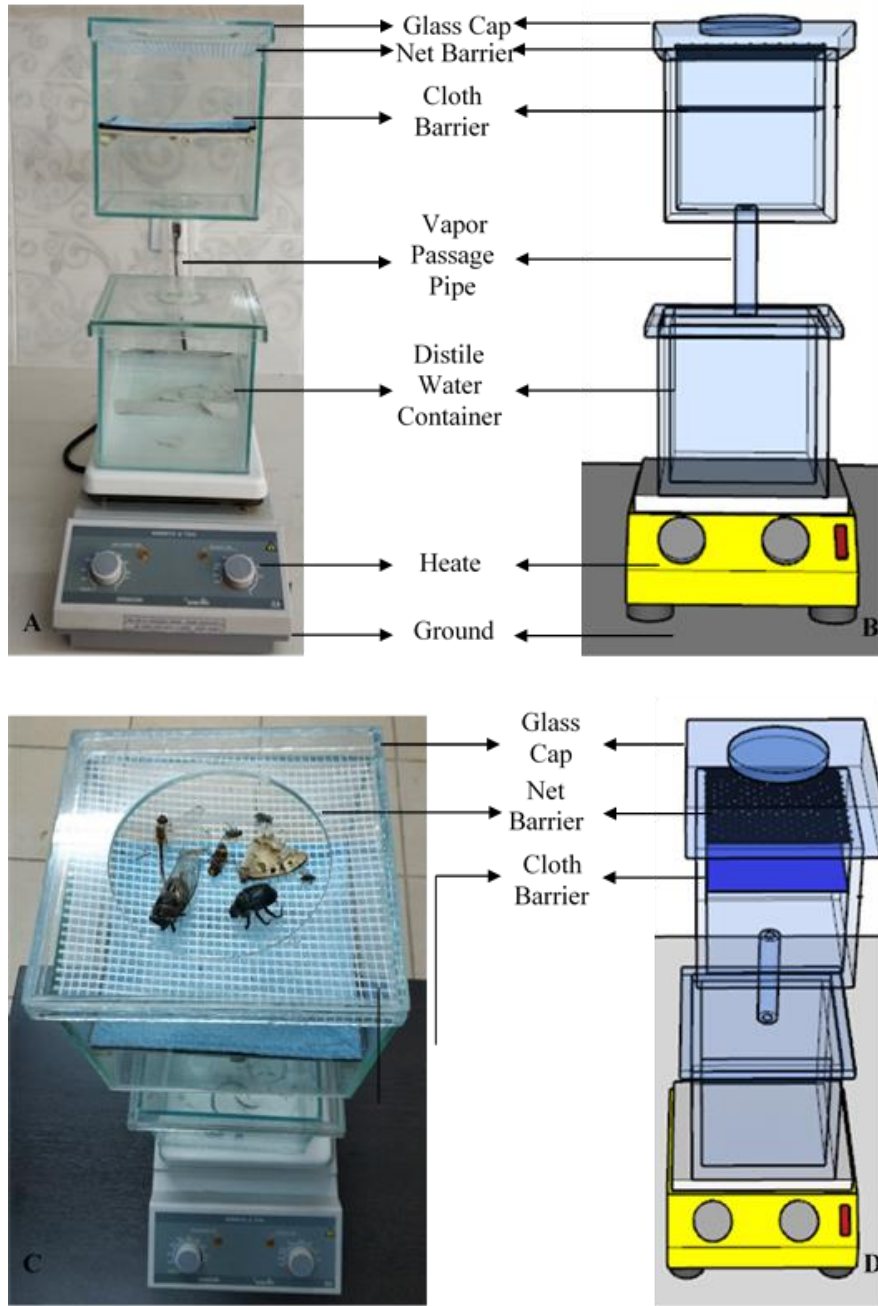


Figure 1: *Relaxing system A: Overview (photo), B: Overview (illustrated), C: Top view (photo), D: Top view (illustrated).*

Şekil 1: Yumuşatma sistemi A: Genel bakış (fotoğraf), B: Genel bakış (çizim), C: Üstten görünüş (fotoğraf), D: Üstten görünüş (çizim).

The relaxing times of insects were measured as follows: measurements started with the beginning of the vapor transfer and the specimens were placed on the net barrier and finished with the preparation process. An average of 2300 adult butterfly specimens could be relaxed with the steam produced in the lower

chamber, which was initially half-filled with distilled water and also the relaxing system was tested with different insect orders to determine the average relaxing time.

A review of the times presented in Table 1

demonstrates that there was a direct correlation between the thickness of the chitin layers and the relaxing time. It is known that the Coleoptera order species had the thickest chitin layer among all insect orders and due to the thick chitin layer, the relaxing process took a maximum of 2 hours. For Lepidoptera, Diptera, and Neuroptera orders, the average relaxing

time was approximately 25-35 minutes due to the thin chitin layers. The relaxing times varied based on the insect size, the drying time, and the proportion of the chitin; however, the relaxing period never exceeded 120 minutes and no specimen loss was experienced because of the system during the relaxing process.

Table 1. Average relaxing times for insect orders.

Tablo 1: Böcek takımlarının ortalama yumuşatma süreleri.

| <i>Insect Order</i> <i>Böcek takımları</i> | <i>Relaxed Specimens Count (~n)</i> <i>Yumuşatılan Böcekler</i> | <i>Average Relaxing Time (minutes)</i> <i>Ortalama Yumuşatma süreleri (dakika)</i> |
|---|--|---|
| Lepidoptera | 2300 | (25 – 35) |
| Diptera | 100 | |
| Neuroptera | 100 | |
| Heteroptera | 50 | (45 – 60) |
| Hymenoptera | 100 | |
| Odonata | 100 | |
| Orthoptera | 100 | (100 – 120) |
| Coleoptera | 100 | |

Relaxing of dry specimens by using the system and preparation process for the tested insect orders are explained in Figure 2. Using the system designed in the present study, adult insects were relaxed then prepared and stored in insect drawers.

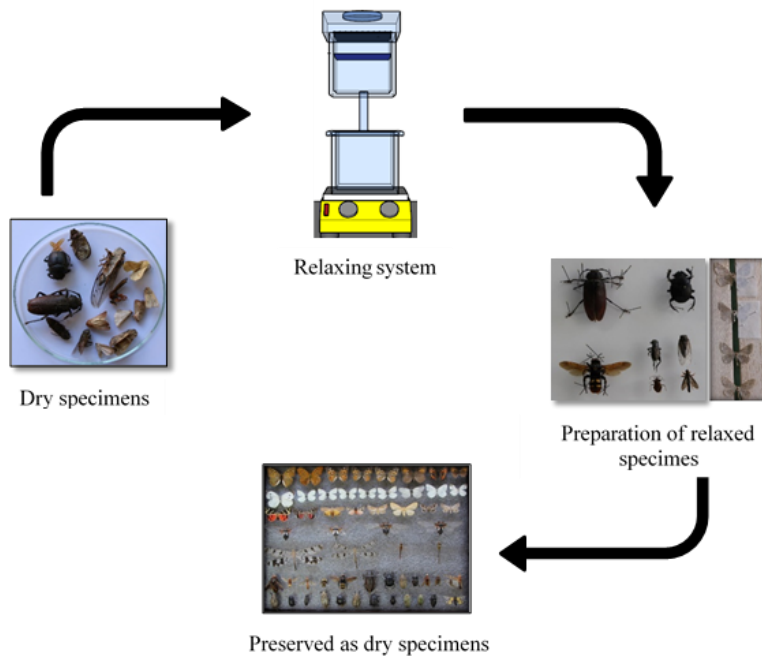


Figure 2: The relaxing and preparing process.

Şekil 2 : Yumuşatma ve preparasyon işlemi.

The appearance of adult insect specimens (Figure 3) was not different when compared to that of the fresh specimens. The most important challenge during the preparation of butterfly specimens is the loss of wing scales and indirect loss of wing patterns. It was clear that these problems were not experienced in our system. Furthermore, during the preparation of dried adult specimens of other insect orders, negative conditions such as breaking, rupturing and tearing of insect head, antenna, abdomen, leg or wing were

minimized.

DISCUSSION

It is not possible to prepare all insect samples collected from nature without being transferred to the laboratory or it takes a long time to prepare and convert the specimens into museum-ready material in a short time after transfer to the laboratory. During this period, several insects are known to dry quickly and their body parts become fragile. This requires the

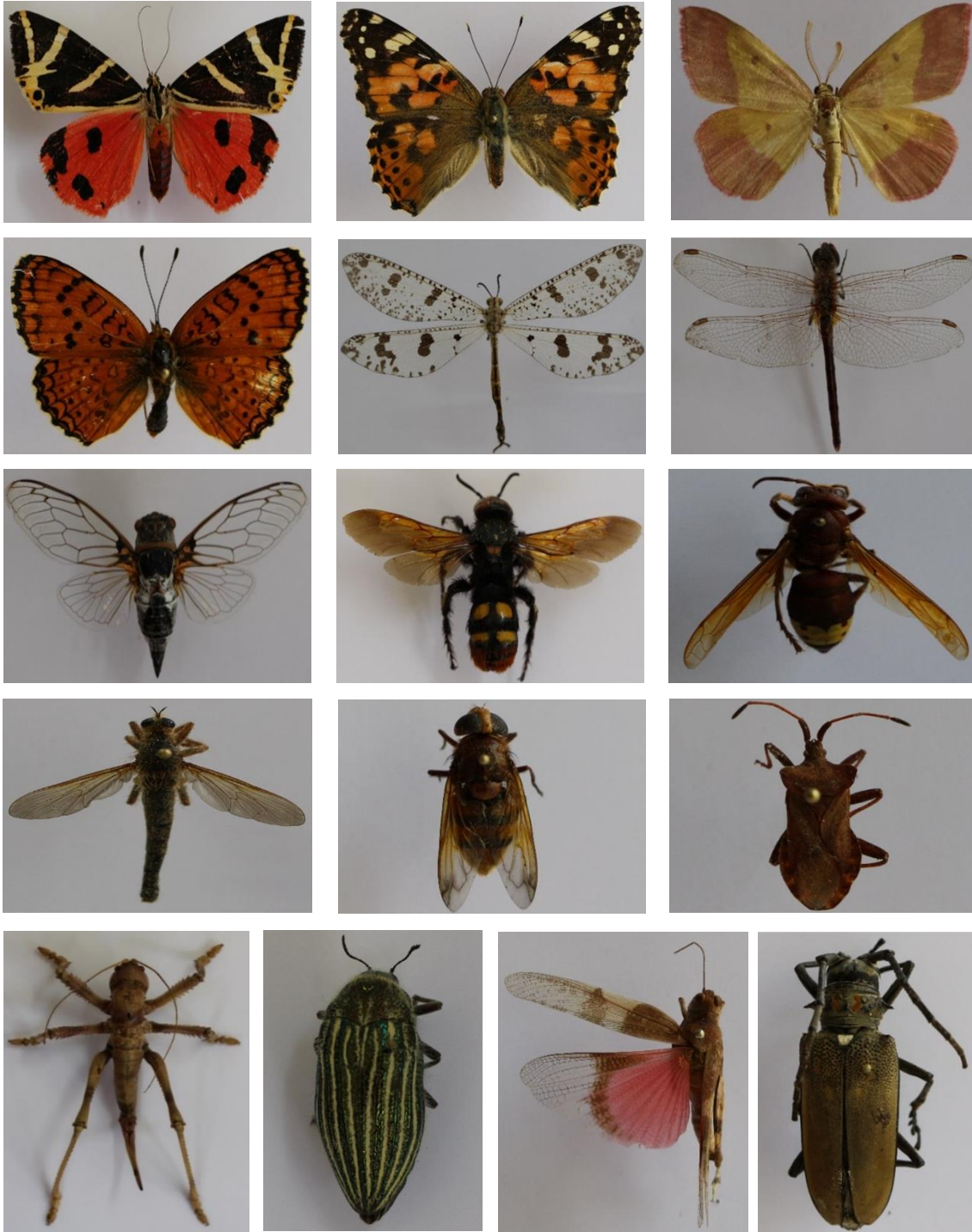


Figure 3: Adult specimens of different insect orders that were prepared by using a relaxing system developed in the present study.

Şekil 3: Bu çalışmada geliştirilen yumuşatma sistemi kullanılarak hazırlanan farklı böcek takımlarına ait ergin örnekler.

relaxation of insect adults to prepare them for study. In the literature, reported relaxing methods take a minimum of 12 and a maximum of 48 hours, in which various chemicals are used to prevent mold growth (Kılıç, 1987). The application of these methods is difficult because the specimens should be monitored

continuously for the conditions, ie. molding, over-relaxation, which leads to serious problems with the material.

The priority in entomological studies is to conduct preparations in a laboratory environment without losing the colour, texture and morphological

properties of dry adult specimens collected from nature. In the proposed relaxing system, all specimens in various insect orders were relaxed in the present study. Since the relaxing process was continuous and the dry specimens were kept in a hot area during relaxing, no mold growth was observed and the relaxing process took only a short time. No specimen loss was observed due to mold formation or systemic factors. Furthermore, the system only requires distilled water and no chemicals are used.

The basic rationale of the system was relaxing the specimens in an isolated environment with hot steam and the system was designed for use with all insect orders. The system could be used for Coleoptera with a thick chitin layer and Lepidoptera, which is one of the most delicate insect orders. Thus, the system could be considered as the most comprehensive and practical system where a higher number of adult insect preparations could be produced in a very short time without material loss.

ACKNOWLEDGMENT

We thank the Gaziantep University Scientific Research Projects Department (BAP) for all support (Project Number: FEF.DT. 17.06). This study is part of the first author's PhD. We also extend our gratitude to Assoc. Prof. Dr. Emrah Cinkara (Gaziantep University, English Language Teaching Dept.) for his language review of the article.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal

REFERENCES

- Doğanlar F 2003. Doğu Akdeniz Bölgesi Geometridae (Lepidoptera) Familyası Üzerine Faunistik Araştırmalar. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bitki Koruma Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi, 275 sy.
- Doğruöz M 2005. Çatak Vadisinin (Van) Pyralidae (Lepidoptera) Faunası ve Ekolojisi Üzerine Araştırmalar. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 85 sy.
- Gullan PJ, Cranston PS 2012. The Insects an Outline of Entomology Australia. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara, 495- 496 sy.
- Kılıç Y 1987. Gökçe Ada (İmröz) Lepidoptera Faunasının Tespiti. Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 66 sy.
- Lane J 1965. The Preservation and Mounting of Insects of Medical Importance. WHO/Vector Control 152.65, 27 pp.
- Plant J, Dubitzky A 2008. Relaxing Bee Specimens: A Quick and Easy Method, Entomologica Austriaca 15: 41-44.
- Schauff ME 2001. Collecting and Preserving Insects and Mites: Techniques and Tools Systematic Entomology Laboratory National Museum of Natural History, Washington, 69 pp.

Sinop ve Kastamonu (Türkiye)'da Dağılım Gösteren Cercopidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadomorpha) Türlerinin Taksonomik Yönden Değerlendirilmesi

Rukiye TANYERİ¹, Ünal ZEYBEKOĞLU²

¹Department of Biology, Faculty of Arts and Science, Sinop University, Sinop, Turkey, ²Department of Biology, Faculty of Arts and Science, Ondokuz Mayıs University, Samsun, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0001-9994-8783>, ²<https://orcid.org/0000-0003-1646-5999>

✉: rtanyeri@sinop.edu.tr

ÖZET

Bu çalışmada 2016-2018 yıllarında Sinop ve Kastamonu'dan toplanan Cercopidae familyasına ait örnekler incelenmiştir. *Cercopis* ve *Triechphorella* cinslerine ait 3 tür tespit edilmiştir. Tespit edilen türlerin genel morfolojik özellikleri, dişi ve erkek genital yapılarının çizimleri, bazı vücut kısımlarının ölçümleri, Türkiye ve dünyadaki dağılımları verilmiştir. Örneklerle ilgili kısa ekolojik notlardan bahsedilmektedir. Ayrıca tespit edilen türlerin elitral renk/desen varyasyonuna dair veriler de incelenmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 22.01.2021

Kabul Tarihi : 06.05.2021

Anahtar Kelimeler

Cercopidae

Türkiye

Taksonomi

Evaluation of Cercopidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadomorpha) Species Distributed in Sinop and Kastamonu (Turkey) in Taxonomic Terms

ABSTRACT

In this study, specimens belonging to Cercopidae collected from Sinop and Kastamonu in 2016-2018 were evaluated. Three species belonging to to genus *Cercopis* and *Triechphorella* were identified. General morphological characteristics, drawings of male and female of genital structures, measurements of some body parts, distributional data (Turkey and in the world) and collection localities of the species were given. Brief ecological notes on examples are mentioned. The data about the elytral color/pattern variation of identified species were also examined.

Research Article

Article History

Received : 22.01.2021

Accepted : 06.05.2021

Keywords

Cercopidae

Turkey

Taxonomy

To Cite: Tanyeri R, Zeybekoğlu Ü 2022. Evaluation of Cercopidae (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cicadomorpha) Species in Sinop and Kastamonu (Turkey) in Taxonomic Terms. KSU J. Agric Nat 25 (1): 133-139. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.866486.

INTRODUCTION

Cercopidae is the most diverse group in the Cercopoidea (Hemiptera: Auchenorrhyncha) superfamily. This family includes xylem-sucking insects containing 1500 species belonging to 150 genera. Since Cercopidae nymphs produce a frothy secretion, the family name is foamy cicadas or spittlebugs and also known as froghoppers because adults have well jumping ability (Cryan and Svenson, 2010). This group has a dominant distribution in tropical and subtropical areas of the world. Almost 70% of the identified species have tropical distribution. In most species, adults are characterized by having colorful elytral patterns. Adults feed on leaves and stems of various plants, and nymphs on the roots (Liang and Fletcher, 2002; Liang and Webb, 2002). The family of members is 6-12 mm in size and characterized by their colored elytra. There are two simple eyes on the vertex. The femur is not thick in the front legs. Pronotum is usually flat, slightly curved.

The posterior tibia is round, has 1-2 spines. The head is narrower than the pronotum (Holzinger et al., 2003). Some Cercopidae species have potential to cause significant damage to economically important plants. In particular, they cause harm in rice either through by feeding or as a vector of phytoplasmas (Paladini et al., 2018). Several species are known to cause significant damage to forage grasses and sugarcane by feeding (Peck et al., 2001).

The first records from our country belonging to the Cercopidae family, which has 93 species in the Palearctic Region, were given by Fieber (1872) and Fahringer (1922). Metcalf (1961), listed 4 species from Turkey. Lodos and Kalkandelen (1981), prepared a checklist of Cercopidae family of Turkey. Kartal et al., (1994) conducted a taxonomic study on Cercopidae species in Samsun and its surroundings. Turkey Cercopidae fauna comprises of 7 species: *Cercopis distincta* (Melichar, 1896), *C. intermedia* Kirschbaum, 1868, *C. sanguinolenta* (Scopoli, 1763), *C.*

septemmaculata (Melichar, 1903), *C. vulnerata* Rossi, 1807, *Haematoloma dorsata* (Ahrens, 1812) and *Trieophorella geniculata* (Horvath, 1881) (Lodos and Kalkandelen, 1988; Önder et al., 2011).

The purpose of this study is to determine the species of Cercopidae distributed in Sinop and Kastamonu provinces in the West Black Sea Region of Turkey. And it has also been intended to evaluate the species in taxonomic terms and take data about the elytral color/pattern variation of the species.

MATERIAL and METHOD

The specimens were collected from Sinop and Kastamonu provinces in the West Black Sea Region of Turkey between 2016 and 2018 (Figure 1). The sampling of the adults was implemented biweekly

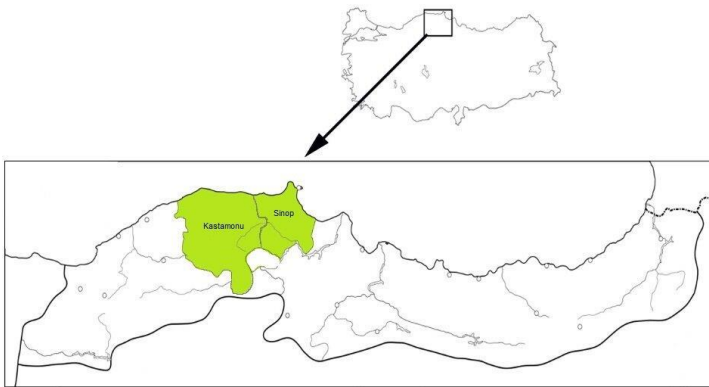


Figure 1. Study area
Şekil 1. Çalışma alanı

RESULTS

The specimens collected during fieldwork in Sinop and Kastamonu provinces were identified, and it has been determined that 3 species were found in the region belonging to Cercopidae family. One of these *Cercopis intermedia* Kirschbaum, 1868 is that has a large distribution area in Turkey; the other is *Cercopis vulnerata* Rossi, 1807 and the third one is *Trieophorella geniculata* (Horvath, 1881). It was determined that the samples belonging to the *Cercopis* genus have a high rate of color and pattern variation (Figures 2, 4). Morphometric measurements some body parts of species are shown in Table 1, 2 and 3. With this study, it can be stated that *C. intermedia* is recorded for the first time from Sinop and Kastamonu, *T. geniculata* is the first record for the local fauna of Kastamonu.

Genus: *Cercopis* Fabricius, 1775

***Cercopis intermedia* Kirschbaum, 1868**

(Figures 2-3)

Material

Sinop: 18.06.2016, 41° 56' 995" N 34° 48' 238" E (32 ♀♀); 13.05.2017, 41° 52' 31.3" N 34° 51' 00.6" (15 ♂♂,

intervals between May and July. The spittlebugs were frequently collected from the herbaceous plants in humid habitats near water sources, such as mini-meadows, streamsides and roadsides. In the sampling of the adults, a standard sweeping net and a handheld aspirator were used. The specimens were prepared by standard insect preparation and identified according to (Dusolier, 2004; Holzinger, 2003; 2008) by the first author. An overview photograph of dry samples was taken with Canon EOS 70D model camera connected to Zeiss Stem 2000-C stereomicroscope. The shapes of genital structures were drawn using Zeiss discovery V-20 stereomicroscope attached drawing attachment.

The specimens are deposited in Sinop University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology, Invertebrata Laboratory.

42 ♀♀); 14.05.2017, 41° 53' 05.9" N 34° 33' 53.6" E (24 ♂♂, 37 ♀♀); 27.05.2017, 41° 44' 52.0" N 34° 57' 40.9" E (23 ♂♂, 38 ♀♀), 41° 32' 45.1" N 34° 47' 0.01" E (17 ♂♂, 13 ♀♀), 41° 50' 22.0" N 35° 03' 02.2" E (75 ♂♂, 54 ♀♀); 01.06.2017 41° 44' 21.9" N 35° 13' 53.1" E (8 ♂♂, 3 ♀♀); 09.06.2017 42° 00' 52.1" N 34° 58' 24.4" E (8 ♂♂, 13 ♀♀), 41° 59' 41.7" N 34° 54' 00.2" E (83 ♂♂, 13 ♀♀)

Kastamonu: 18.05.2017 41° 27' 35.2" N 33° 39' 38.9" E (63 ♂♂, 47 ♀♀); 19.05.2017 41° 42' 08.7" N 33° 28' 56.3" E (78 ♂♂, 67 ♀♀), 41° 42' 08.4" N 33° 26' 37.0" E (53 ♂♂, 33 ♀♀), (48 41° 38' 35.8" N 33° 07' 13.9" E (♂♂, 34 ♀♀), 41° 39' 33.2" N 33° 08' 02.2" E (73 ♂♂, 54 ♀♀), 41° 36' 45.4" N 33° 07' 02.9" E 41° 58' 25.00" N 33° 48' 27.9" E (23 ♂♂, 13 ♀♀); 20.05.2017 41° 58' 10.7" N 34° 05' 22.7" E 41° 55' 31.9" N 34° 10' 56.2" E (54 ♂♂, 33 ♀♀), 41° 41' 34.8" N 33° 57' 43.3" E (90 ♂♂, 65 ♀♀)

Distribution in Turkey: Adıyaman, Amasya, Artvin, Ankara, Antalya, Bitlis, Çanakkale, Çorum, Diyarbakır, Elazığ, Eskişehir, Gaziantep, Giresun, Hakkari, Hatay, Isparta, İstanbul, İzmir, Kahramanmaraş, Kayseri, Konya, Kütahya, Kırklareli, Mardin, Niğde, Rize, Samsun, Siirt, Şanlıurfa, Trabzon, Uşak (Önder et al., 2011; Demir, 2019)

Zoogeographic distribution: Albania, Algeria, Austria, Bulgaria, Czech Republic, France, Germany, Greece, Hungary, Iran, Israel, Italy, Lebanon, Morocco, North

Africa, Poland, Portugal, Romania, Russia, Slovakia, Syria, Spain, Switzerland, Turkey, Yugoslavia (Önder et al., 2011; Anonymous, 2021)



Figure 2. *Cercopis intermedia* Kirschbaum, 1868 (♂) (scale bars: 1 mm)
Şekil 2. *Cercopis intermedia* Kirschbaum, 1868 (♂) (ölçek çubukları: 1 mm)

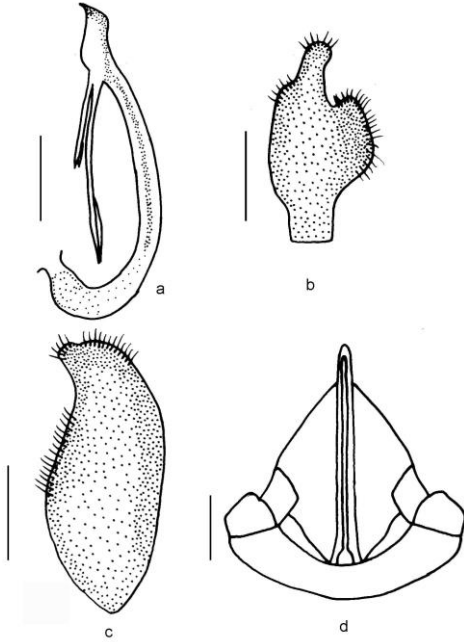


Figure 3. Genital structures of *Cercopis intermedia* a, aedeagus from lateral; b, stylus; C, genital plate; d, the tip of the female abdomen from ventral (scale bars: 0,5 mm)
Şekil 3. *Cercopis intermedia* türünün genital yapıları a, aedeagus yandan; b, stilus; C, genital plak; d, dişide abdomenin uç kısmı ventralden (ölçek çubukları: 0,5 mm)

Table 1. Measurements of body parts of *Cercopis intermedia* (N=number of individuals).

Çizelge 1. *Cercopis intermedia*'nin vücut kısımlarının ölçüleri (N= birey sayısı).

| Body parts (mm) | Male (N=50) | | | Female (N=50) | | |
|------------------|-------------|------|------|---------------|------|------|
| | Min. | Max. | Ave. | Min. | Max. | Ave. |
| Body length | 8 | 9.55 | 8.7 | 8.25 | 9.50 | 8.8 |
| Head width | 2 | 2.25 | 2.15 | 2.1 | 2.5 | 2.2 |
| Vertex length | 0.5 | 0.75 | 0.6 | 0.6 | 0.75 | 0.7 |
| Pronotum length | 1.5 | 1.75 | 1.6 | 1.5 | 1.7 | 1.35 |
| Mesonotum length | 1.05 | 1.6 | 1.25 | 1.25 | 1.5 | 1.35 |

Table 2. Measurements of body parts of *Cercopis vulnerata* (N=number of individuals).

Çizelge 2. *Cercopis vulnerata*'nin vücut kısımlarının ölçüleri (N=birey sayısı).

| Body parts (mm) | Male (N=30) | | | Female (N=30) | | |
|------------------|-------------|------|------|---------------|------|------|
| | Min. | Max. | Ave. | Min. | Max. | Ave. |
| Body length | 9.5 | 10.7 | 9.9 | 9 | 11 | 9.74 |
| Head width | 2 | 2.3 | 2.2 | 2.1 | 2.5 | 2.3 |
| Vertex length | 0.5 | 0.7 | 0.6 | 0.5 | 0.7 | 0.6 |
| Pronotum length | 1.4 | 1.9 | 1.7 | 1.6 | 2 | 1.7 |
| Mesonotum length | 1.2 | 1.7 | 1.5 | 1.4 | 1.7 | 1.5 |

Table 3. Measurements of body parts of *Trichophorella geniculata* (mm) (N=number of individuals).

Çizelge 3. *Trichophorella geniculata*'nin vücut kısımlarının ölçüleri (mm) (N=birey sayısı).

| Body parts (mm) | Male (N=31) | | | Female (N=14) | | |
|------------------|-------------|------|------|---------------|------|------|
| | Min. | Max. | Ave. | Min. | Max. | Ave. |
| Body length | 6 | 7 | 6.57 | 6.5 | 7.1 | 6.8 |
| Head width | 1.6 | 1.8 | 1.7 | 1.7 | 1.9 | 1.8 |
| Vertex length | 0.3 | 0.5 | 0.46 | 0.4 | 0.5 | 0.48 |
| Pronotum length | 1 | 1.3 | 1.2 | 1.2 | 1.4 | 1.3 |
| Mesonotum length | 1 | 1.2 | 1.06 | 0.9 | 1.3 | 1.1 |

Cercopis vulnerata Rossi, 1807

(Figures 4-5)

Material

Sinop: 13.05.2017 41° 53' 05.9" N 34° 33' 53.6" E (6 ♂♂)

Kastamonu: 20.05.2017 41° 52' 48.9" N 33° 42' 38.0" E (83 ♂♂, 13 ♀♀), 41° 58' 25.00" N 33° 48' 27.9" E (52 ♂♂, 28 ♀♀), 41° 55' 31.9" N 34° 10' 56.2" E (57 ♂♂, 54 ♀♀), 41° 41' 34.8" N 33° 57' 43.3" E (2 ♂♂, 1 ♀), 41° 39' 33.2" N 33° 08' 02.2" E (6 ♀♀); 15.06.2017 41° 52' 49.0" N 33° 42' 38.1" E (1 ♂); 16.06.2017 41° 34' 34.1" N 33° 12' 44.1" E (1 ♂), 19.05.2017 41° 38' 35.8" N 33° 07' 13.9" E (28 ♂♂, 15 ♀♀), 41° 39' 33.2" N 33° 08' 02.2" E (1 ♂, 1 ♀)

41° 36' 45.4" N 33° 07' 02.9" E (6 ♂♂, 2 ♀♀).

Distribution in Turkey: Antalya, Balıkesir, Bartın, Bursa, Eskişehir, Kastamonu, Kocaeli, Konya, Sakarya, Sinop (Altınayar, 1981; Demir, 2005; 2006; Önder et al., 2011; Tanyeri and Zeybekoğlu, 2020)

Zoogeographic distribution: Albania, Austria, Belgium, Britain, Bulgaria, Croatia, Czech Republic, France, Germany, Greece, Hungary, Italy, Moldova, The Netherlands, Norway, Spain, Switzerland, Poland, Romania, Russia (Central Europe), Russia (Southern Europe), Slovakia, Slovenia, Turkey, Yugoslavia (Önder et al., 2011; Anonymous, 2021).



Figure 4. *Cercopis vulnerata* Rossi, 1807 (♂) (scale bar: 1 mm)

Şekil 4. *Cercopis vulnerata* Rossi, 1807 (♂) (ölçek çubuğu: 1 mm)

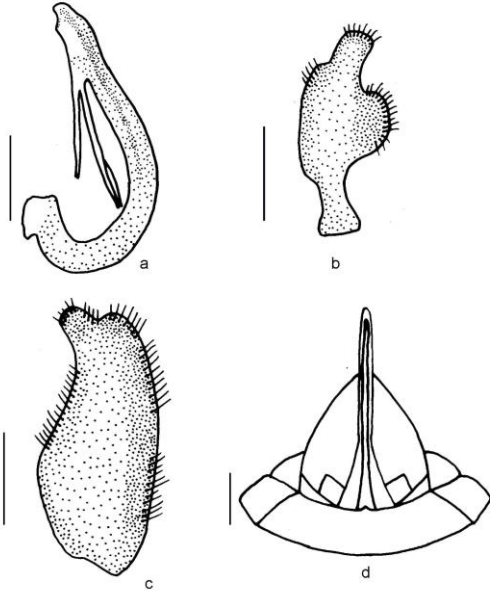


Figure 5. Genital structures of *Cercopis vulnerata* a, aedeagus from lateral; b, stylus; c, genital plate; d, the tip of the female abdomen from ventral (scale bars: 0,5 mm)

Şekil 5. *Cercopis vulnerata* türünün genital yapıları a, aedeagus yandan; b, stilus; c, genital plak; d, dişide abdomenin uç kısmı ventralden (ölçek çubukları: 0,5 mm)



Figure 6. *Triechphorella geniculata* (Horvath, 1881) (♂) (scale bar: 1 mm)

Şekil 6. *Triechphorella geniculata* (Horvath, 1881) (♂) (ölçek çubuğu: 1 mm)

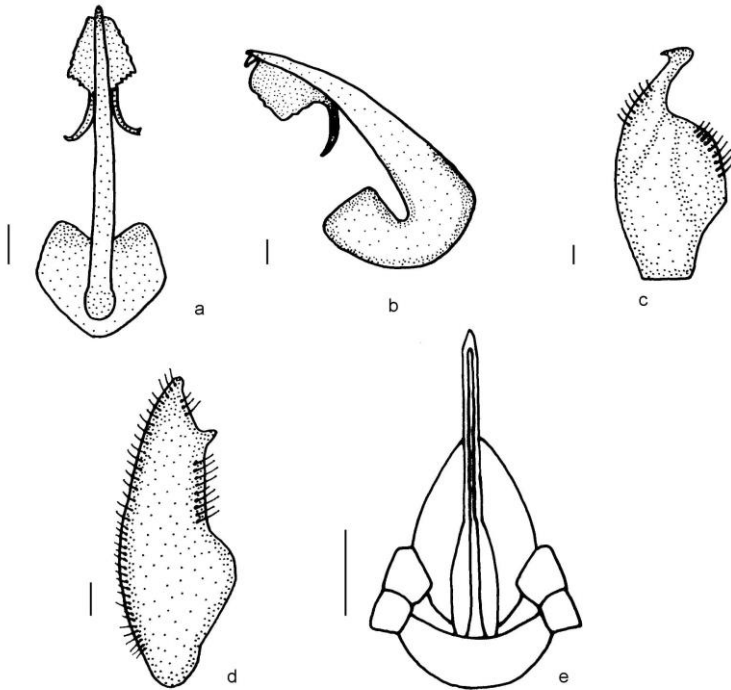


Figure 7. Genital structures of *Triechphorella geniculata* a, aedeagus from ventral; b, aedeagus from lateral; c, stylus; d, genital plate; e, the tip of the female abdomen (scale bars: a, b, c, d: 0,1 mm; d: 0,5 mm)

Şekil 7. *Triechphorella geniculata* türünün genital yapıları a, aedeagus ventralden; b, aedeagus yandan; c, stilus; d, genital plak; e, dişide abdomenin uç kısmı ventralden (ölçek çubukları: a, b, c, d: 0,1 mm; d: 0,5 mm)

Genus: *Triecphorella* Nast, 1933

***Triecphorella geniculata* (Horvath, 1881)**

(Figures 6-7)

Material

Kastamonu: 19.05.2017, 41° 39' 33.2" N 33° 08' 02.2" E
(64 ♂♂, 45 ♀♀)

Distribution in Turkey: Adana, Amasya, Antalya, Balıkesir, Kahramanmaraş, Konya, Osmaniye, Samsun (Demir, 2005; 2006; Önder et al., 2011; Zeybekoğlu and Karavin, 2010)

Zoogeographic distribution: Croatia, Greece, Near East, Turkey, Yugoslavia (Önder et al., 2011; Anonymous, 2021).

DISCUSSION

Cercopidae which is characterized by their bright color patterns consists of 7 species belonging to 3 genera in Turkey. 3 species, *C. vulnerata*, *C. intermedia*, and *T. geniculata* were determined from the study area.

Because of the elytral color/pattern variation, the diagnosis of the Cercopidae species must be done according to their genital structures. According to color/pattern, 4 variants belonging to *C. intermedia* were determined. Variation of *C. vulnerata* evaluated from the authors before (Tanyeri & Zeybekoğlu 2020). *T. geniculata*, has a transverse thin red band in the rear part of the fore wings and this feature did not show variation. When these data are evaluated, it is seen that the first results reported regarding the color/pattern variation displayed by *C. intermedia*.

C. vulnerata was collected on sunny slopes, pastures, dry or humid areas with rich herbaceous vegetation and around Kastamonu Hamidiye village over apple trees. Other taxa were collected from herbaceous vegetation. The first adult specimens were collected in the second week of May. It has been observed that adults belonging to the species of this genus exist in nature for a very short time. It has been determined that population densities have decreased considerably since the second week of June, but a few individuals could be collected.

According to literature, *Cercopis* fauna of Turkey consists of 5 species. *C. vulnerata* distinguished from other *Cercopis* taxa by following character; in males, the anterior pair of processes on the apex of the aedeagus is two-thirds the length of posterior pair. In *C. sanguinolenta* and *C. intermedia* the anterior pair is half the length of the posterior pair. *C. sanguinolenta* differs from *C. intermedia* having totally black legs. *C. intermedia* has red knees (Holzinger et al., 2003).

C. septemmaculata closely looks like *C. sanguinolenta* and *C. intermedia* in terms of genital structures. It is known with limited records from Turkey. However,

there is different information about this taxon in the literature. *C. septemmaculata* originally described by Melichar, 1903, was accepted as the morph of *C. sanguinolenta* by Lindberg (1923). The intermittent red band behind the wings resembles 3 points. Nast (1933) accepted *C. septemmaculata* as the synonym of *C. intermedia*. Similarly, Lallemand (1949) evaluated this taxon as a morph. Dlabola (1965) evaluated *C. septemmaculata* as a separate taxon and gave the drawings of the lateral view of the aedeagus by stating its differences with *C. intermedia*. However, in the drawings, the differences between the two taxa are not fully understood. *C. septemmaculata* recorded from Kastamonu (Lodos and Kalkandelen, 1988) was not determined

in this study.

Members of the *Triecphorella* genus have a black-red pattern like *Cercopis* species. However, it is much smaller than *Cercopis* taxa in size. The only known taxon of this genus is *T. geniculata*. It is sampled from an area rich in herbaceous vegetation such as Graminae, Cyperidaceae at the base, at the edge of the river in Kastamonu (Ilıca). The specimens collected in a single locality are associated with the low population density. This may result from specialization to the host plant. However, there is no data on the ecology of this taxon.

Acknowledgements

This study is a part of the first author's phd thesis approved by the Graduate School of Sciences of Ondokuz Mayıs University in August 2019 and supported by Ondokuz Mayıs University Research Fund (Project number: PYO.FEN.1904.16.013).

Contribution of the Authors as Summary

Authors declare the contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

There is no conflict of interest between the article authors.

REFERENCES

- Anonymous 2021f. Fauna Europe (<http://faunaeurope.org>) (Access date: 10.01.2021).
Altınayar G 1981. Orta Anadolu Bölgesi Tahıl Tarlalarındaki Böcek Faunasının Saptanması Üzerinde Çalışmalar. Türkiye Bitki Koruma Dergisi 21(2): 53- 88.
Cryan JR and Svenson GJ 2010. Family-level Relationships of the Spittlebugs and Froghoppers (Hemiptera: Cicadomorpha: Cercopoidea). Systematic Entomology 35: 393-415.

- Demir E 2005. Antalya ilinin Auchenorrhyncha (Homoptera) Fauna ve Taksonomisi Üzerine Araştırmalar. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 235 sy.
- Demir E 2006. Preliminary Report on the Auchenorrhyncha (Hemiptera) Fauna of Kazdağı National Park with Two New Records for Turkey. *Acta Entomologica Slovenica* 14: 89-102.
- Demir E 2019. Biodiversity and Zoogeography of Cicadomorpha (excl. Deltocephalinae) Species from Southwestern Turkey (Insecta: Hemiptera). *Munis Entomology and Zoology* 14:1: 236-243.
- Dlabola J 1965. Jordanische Zkaden (Homopetra, Auchenorrhyncha). *Acta Entomologica Musei Nationalis* 36: 24-57.
- Dusolier F 2004. Hemipteres Nouveaux ou rares pou le Massif Armorican (Hexapoda, Hemiptera). *Bulletin de Societe des Sciences Nturelles Quest de la France* 26: 128-137.
- Fahringer J 1922. Eine Rhynchoten Ausbeute aus der Türkei, Kleinasien und den Benaehbarten. *Gebieten* 1: 296-307.
- Fieber, FX 1872. Katalog der Europaischen Cieaden nach Originalen Mit Benützung Der Neustes Literatur. Wien I-IV, 1-19.
- Holzinger WE, Kammerlander I and Nickel H. 2003. The Auchenorrhyncha of Central Europe. Fulgoromorpha, Cicadomorpha excl. Cicadellidae. (Volume:1) Koninklijke Brill NV, 673 p.
- Holzinger WE 2008. Die Gemeine Blutzikade (*Cercopis vulnerata*) das Insekt des Jahres 2009 (Hemiptera: Auchenorrhyncha: Cercopidae) *Beitrage zur Entomofaunistik*, 8: 193-203.
- Kartal V, Zeybekoğlu Ü and Özdemir G 1994. Samsun Çevresinde Cercopidae Leach, 1815 (Homoptera, Auchenorrhyncha) Familyası Türleri Üzerine Taksonomik Bir Araştırma. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Dergisi* 5:1: 147-157.
- Lallemand V 1949. Revision Des Cercopinæ (Homoptera) Premiere Partie. *Memories de l'Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique* 32:1-193.
- Liang AP and Fletcher MJ 2002. Morphology of the Antennal Sensilla in Four Australian Spittlebug Species (Hemiptera: Cercopidae) with implications for phylogeny. *Australian Journal of Entomology* 41: 39-44.
- Liang AP and Webb MD 2002. New Taxa and Revisionary Notes in Rhinaulacini Spittlebugs From Southern Asia (Homoptera: Cercopidae). *Journal of Natural History* 36: 729-756.
- Lindberg H 1923. Zur Kenntnis der Palaarktischen, Cicadina I. Cercopidae. *Entomologischen Helsingfors* 3: 34-43.
- Lodos N and Kalkandelen A 1981. Preliminary List of Auchenorrhyncha with Notes on Distribution and Importance of Species in Turkey VI. Families Cercopidae and Membracidae. *Türkiye Bitki Koruma Dergisi* 5:3:133-149.
- Lodos N and Kalkandelen A 1988. Preliminary List of Auchenorrhyncha with Notes on Distribution and Importance of Species in Turkey XXVII (Addenda and Corrigena). *Türkiye Entomoloji Dergisi* 12 (1): 11-22.
- Metcalf ZP 1961. General Catalogue of the Homoptera. Fas VII. Cercopoidea Pt. 2 Cercopidae. North Carolina State College, Raleigh, United States of America, 607 p.
- Nast J 1933. Beitrage Zur Morhologie und Geographisehen Verbreitung Der Mitteleuropaischen und Mediterranen Arten Aus der Subfamilie Cercopinæ (Homoptera, Cercopidae). *Annales Musei Zoologici Polonici* 10: 7-32.
- Önder F, Tezcan S, Karsavuran Y and Zeybekoğlu Ü 2011. Türkiye Cicadomorpha, Fulgoromorpha ve Sternorrhyncha Kataloğu, Meta Basım, 157, İzmir.
- Paladini A, Domahovski AC, Krinski D and Foerster LA 2018. Reports of New Wing Color Polymorphism and Taxonomic Information to Cercopids (Auchenorrhyncha: Cercopidae) from Upland Rice Crop, Pará State, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 78:4: 728-735.
- Peck D, Castro U, Lopez F, Morales A, Rodriguez J 2001. First Records of the Sugar Cane Forage Grass Pest, *Prosapia simulans* (Homoptera: Cercopidae) from South America. *The Florida Entomologist* 84:3: 402-409.
- Tanyeri R and Zeybekoğlu Ü 2020. Color/Pattern Variation of *Cercopis vulnerata* Rossi, 1807 (Auchenorrhyncha: Cercopidae) Populations of Northwestern Turkey. *Karadeniz Fen Bilimleri Dergisi* 10(2): 266-273.
- Zeybekoğlu Ü and Karavin M 2010. Özellikleri Az Bilinen *Triechphorella geniculata* Horvath, 1881 (Hemiptera, Cicadomorpha, Cercopidae) Üzerine Taksonomik Araştırma. 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Ağustos, Bildiri Özetleri Kitabı, 698-699, Denizli, Türkiye.

Additional Notes on the Genus *Bledius* 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, total of 70 specimens of the genus *Bledius* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) were collected from different regions of Turkey between 2006 and 2020. As a result of the study, 10 species were determined from the study areas in Turkey. Among them, *Bledius (Astycops) opacus* (Block, 1799), *B. (Bargus) secessus* Bondroit, 1912 and *B. (Elbius) diota* (Schiodte, 1866) are recorded for the first time from Turkey. In addition, *B. (Astycops) subterraneus* Erichson, 1839 from Aegean Region, *B. (Hesperophilus) cribricollis* Heer, 1839 from Eastern Black Sea Region, *B. (Pucerus) verres* Erichson, 1840 from Aegean Region and Southeastern Anatolia Region, *B. (s.str.) spectabilis* Kraatz, 1858 from Central Anatolian Region and *B. (s.str.) unicornis* (Germar, 1825) from Aegean Region are recorded for the first time.

Research Article

Article History

Received : 11.02.2021

Accepted : 25.03.2021

Keywords

Staphylinidae

Oxytelinae

Bledius

New records

Turkey

Türkiye *Bledius* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) Faunası Üzerine Ek Notlar

ÖZET

Bu çalışmada, 2006-2020 yılları arasında Türkiye'nin farklı bölgelerinden *Bledius* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) cinsine ait toplam 70 örnek toplanmıştır. Çalışma sonucunda Türkiye'deki çalışma alanlarından 10 tür tespit edildi. Bunlardan *Bledius (Astycops) opacus* (Block, 1799), *B. (Bargus) secessus* Bondroit, 1912 ve *B. (Elbius) diota* (Schiodte, 1866) Türkiye'den ilk kez kaydedildi. Ayrıca, Ege Bölgesi'nden *B. (Astycops) subterraneus* Erichson, 1839 Doğu Karadeniz Bölgesi'nden *B. (Hesperophilus) cribricollis* Heer, 1839 Ege Bölgesi ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nden *B. (Pucerus) verres* Erichson, 1840 *B. (s.str.) spectabilis* Kraatz, 1858 Orta Anadolu Bölgesi'nden ve Ege Bölgesi'nden *B. (s.str.) unicornis* (Germar, 1825) ilk kez kayıt altına alınmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 11.02.2021

Kabul Tarihi : 25.03.2021

Anahtar Kelimeler

Staphylinidae

Oxytelinae

Bledius

Yeni kayıtlar

Türkiye

To Cite: Kacar EZ, Örgel S, Anlaş S 2022. Additional notes on the genus *Bledius* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) fauna of Turkey. KSU J. Agric Nat 25 (1): 140-143. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.878610.

INTRODUCTION

The genus *Bledius* Leach, 1819 (Staphylinidae: Oxytelinae) comprises 449 species all over the world (Newton, 2019). In the Palearctic region, this genus is represented by 192 species and subspecies in 11 subgenera, with 18 of them listed as incertae sedis. Also, four species are known as nomina dubia (Schülke and Smetana, 2015). Anlaş, (2009: updated) recorded 22 species and subspecies belonging to this genus from Turkey. These species belong to nine subgenera: the nominal subgenus (five species); *Astycops* Thomson, 1859 (one species); *Bargus* Schiodte, 1866; (two species); *Belidus* Mulsant & Rey, 1878 (one species); *Elbidus* Mulsant & Rey, 1878 (three species);

Euceratobledius Znojko, 1929 (three species) *Hesperophilus* Stephens, 1829 (four species); *Pucerus* Mulsant & Rey, 1878 (two species) and, *Teratobledius* Adam, 2001 (one species).

Bledius species can be found in dung, seashores, salt marshes, sandy, clayey places, decaying plants, and nests in ants. They are mostly found in dung and decaying organic matters. However, they are localized according to their habitats and generally only occur to the limited suitable habitats (Tottenham, 1954; Makranczy, 2006). But, it has been reported that the larvae of some *Bledius* species also feed on algae and diatom (Paulian, 1941).

The present paper is to supplement the knowledge of the Turkey *Bledius* fauna based on the material of different localities of Turkey.

MATERIAL and METHODS

Field trips were conducted from different regions of Turkey between 2006 and 2020. The specimens in the study were collected using aspirator (under the stone), sifter, and lighter traps. The material referred to in this study was deposited in the Alaşehir Zoological Museum Manisa (AZMM). Classification and nomenclature were made according to Schülke and Smetana (2015).

RESULTS

As a result of the examination of the material total of 10 species belonging to *Bledius* were determined maintained in the collection of AZMM. Among of which, *Bledius (Bargus) secessus* Bondroit, 1912, *Bledius (Astycops) opacus* (Block, 1799), and *Bledius (Elbius) diota* (Schjødte, 1866) are the first records for the Turkish *Bledius* Fauna. Moreover, first records have been given for many regions and provinces of Turkey.

Oxytelinae Fleming, 1821

Tribüs Blediini Ádám, 2001

Bledius (Astycops) opacus (Block, 1799)

Material examined: **Trabzon:** 2♂♂, 2♀♀, 06.VI.2006, Maçka, Sümele road, leg. Anlaş (Figure 1).

Distribution in Turkey: New record for Turkey.

Distribution in the world: *B. opacus* is widely distributed in Europe and also known from Algeria, Eastern and Western Siberia, Iran, Mongolia and Yunnan (China) (Schülke & Smetana, 2015).

Bionomics: The specimens have been found at an altitude of 600 m near the forest under the stone.

Bledius (Astycops) subterraneus Erichson, 1839

Material examined: **Aydın:** 2♂♂, 16.VI.2013, Koçarlı, Mersinbeleni, 37°40'23"N, 27°41'25"E, 770 m, leg. Yağmur & Örgel. **Manisa:** 1♂, 1♀, 08.IV.2008, Soma, 39°20'07"N, 27°40'34"E, 256 m, leg. Anlaş.

Distribution in Turkey: Rize, Trabzon (Assing, 2007, 2009). This species is recorded from Aegean Region for the first time.

Distribution in the world: *B. subterraneus* is widely distributed in Europe and known from Siberia and Turkey (Schülke & Smetana, 2015).

Bionomics: The specimens were collected by sifting the leaf litter of shrubs and trees at altitudes of 256 and 700 m.

Bledius (Bargus) secessus Bondroit, 1912

Material examined: **Muğla:** 7♂♂, 10♀♀, 21.V.2015, Dalaman, 36°53'37"N, 28°53'25"E, leg. Örgel & Altın (Figure 1).

Distribution in Turkey: New record for Turkey.

Distribution in World: According to Schülke and Smetana (2015), *B. secessus* is known from Croatia, Czech Republic, Italy and Germany in the Palaearctic Region.

Bionomics: The specimens have been found at an altitude of 100 m in the dried creek under the stone.

Bledius (Elbidus) diota Schjødte, 1866

Material examined: **Afyonkarahisar:** 3♂♂, 1♀, 31.V.2014, Dazkırı, Acıgöl, 37°51'30"N, 29°52'59"E, leg. Örgel & Altın (Figure 1).

Distribution in Turkey: New record for Turkey.

Distribution in the world: *B. diota* occurs in Belgium, Denmark, Estonia, Finland, Great Britain, Germany, Romania, Sweden, Algeria and Egypt in the Palaearctic Region, also in the Afrotropical Region (Schülke & Smetana, 2015).

Bionomics: The specimens have been found at an altitude of 841 m in the near seasonal creek under the stone.

Bledius (Euceratobledius) furcatus (Olivier, 1811)

Material examined: **Afyonkarahisar:** 4♂♂, 31.V.2014, Dazkırı, Acıgöl, 37°48'12"N, 29°43'21"E, leg. Örgel & Altın. **Aydın:** 1♂, 15.V.2013, Söke, light trap. **İzmir:** 1♂, 01.VIII.2013, Seferihisar, light trap.

Distribution in Turkey: Ankara, Aydın, Balıkesir, Diyarbakır, İzmir, Manisa (Anlaş, 2009; Anlaş & Rose, 2009; Kılıç & Yoldaş, 2012; Özgen et al., 2010; Scheerpeltz, 1961a; Varlı et al., 2018).

Distribution in the world: *B. furcatus* is widespread in Europe, North Africa, Cyprus, Iran, Kazakhstan, Syria, Turkey in the Palearctic region. It is also known from the Afrotropical Region (Schülke & Smetana, 2015).

Bionomics: The specimens were collected by light trap and near the lake under the stone.

Bledius (Hesperophilus) cribricollis Heer, 1839

Material examined: **Giresun:** 1♂, 27.IV.2013, Tirebolu, Kuşkaya, leg. Örgel. **Ordu:** 1♂, 14.VI.2020, Aybastı, Uzundere, 40°35'36"N, 37°24'56"E, 897 m, leg. Örgel & Kacar; 1♀, 14.VI.2020, Ulubey, Ohtamış waterfall, 40°48'43"N, 37° 39'38"E, 436 m, leg. Örgel & Kacar.

Distribution in Turkey: Amasya, Balıkesir (Anlaş, 2009; Heyden, 1890). This species is recorded from Eastern Black Sea Region for the first time.

Distribution in the world: According to Schülke and Smetana (2015), *B. cribricollis* is known from Europe, Algeria, Morocco, Tunisia, Iraq, Mongolia and Turkey in the Palaearctic Region.

Bionomics: The specimens have been found in at altitudes of 836 and 897 m near the waterfall in decay leaf material.



Figure 1. Distributions of *Bledius (Astycops) opacus* Block (square), *Bledius (Bargus) secessus* Bondroit (triangle), and *Bledius (Elbidus) diota* Schiødte (Circles) in Turkey.

Şekil 1. *Bledius (Astycops) opacus* Block (kare), *Bledius (Bargus) secessus* Bondroit (üçgen) ve *Bledius (Elbidus) diota* Schiødte (Yuvarlak) türlerinin Türkiye'deki yayılışları.

***Bledius (Pucerus) verres* Erichson, 1840**

Material examined: **Aydın:** 1♂, 3♀♀, 10.VIII.2010, Çine, 37°30'45"N, 28°06'36"E, leg. Anlaş. **Manisa:** 4♂♂, 4♀♀, 11.X.2013, Alaşehir, Kiraz-Alaşehir road, 38°13'35"N, 28°33'39"E, sifted, leg. Yağmur & Örgel. **Tunceli:** 5♂♂, 5♀♀, 14.IX.2007, Çemişgezek, Orman road, 39°04'06"N, 38°54'18"E, 948 m, leg. Anlaş. **Siirt:** 1♂, 1♀, 16.V.2011, Bostansuyu valley, 37°52'43"N, 42°02'33"E, 507 m, leg. Yağmur.

Distribution in Turkey: Adana and Tunceli (Anlaş, 2009; Anlaş & Rose, 2009). This species is recorded from Aegean and Southeastern Anatolia Region for the first time.

Distribution in the world: According to Schülke and Smetana (2015), *B. verres* is known from Eastern and Southern Europe, North Africa, Middle East, South and Middle Asia, Cyprus, Iran, Turkey in the Palaearctic Region and in addition to the Afrotropical and Oriental Region.

Bionomics: The specimens were collected by sifting the leaf litter of shrubs and trees at altitudes of 507 and 948 m.

***Bledius (s.str.) spectabilis* Kraatz, 1858**

Material examined: **Konya:** 2♂♂, 1♀, 05.III.2018, Cihanbeyli, Böllük lake, 38°30'49"N, 32°54'00"E, 988 m, leg. Örgel & Yaman; 1♀, 25.II.2019, Cihanbeyli, Böllük lake, 38°31'00"N, 32°58'52"E, 994 m, leg. Örgel & Yaman.

Distribution in Turkey: Adana, Afyonkarahisar, İstanbul (Anlaş, 2009; Scheerpeltz, 1961b; Schülke,

2009). This species is recorded from Central Anatolian Region for the first time.

Distribution in the world: According to Schülke and Smetana (2015), *B. spectabilis* is known from Europe, Tunisia, Middle East and Asia, Mongolia, Turkey and Western Siberia.

Bionomics: The specimens have been found in at altitudes 988 and 994 m near the lake under the stone.

***Bledius (s.str.) tricornis* (Herbst, 1784)**

Material examined: **Denizli:** 1♂, 11.IV.2015, Tavas, 37°39'36"N, 28°52'06"E, 1131 m, leg. Örgel & Altın.

Distribution in Turkey: *B. tricornis* was known from Turkey, without precise locality record (Anlaş, 2009). Thus, the above record is the first precise locality record for Turkey.

Distribution in the world: This species is widely distributed in Europe and known from Algeria, Morocco, Afghanistan, Japan, China, Mongolia, Middle Asia, Iran, Syria, and Western Siberia (Schülke & Smetana, 2015).

Bionomics: The specimen has found in a nearby forest at an altitude of 1131 m under the stone.

***Bledius (s.str.) unicornis* (Germar, 1825)**

Material examined: **İzmir:** 1♂, 01.VIII.2013, Seferihisar, light trap. **Konya:** 2♂♂, 17.IV.2015, Meke Lake, leg. Yağmur.

Distribution in Turkey: Adana, Tunceli (Anlaş, 2009; Anlaş & Deveci, 2011). This species is recorded from Aegean Region for the first time.

Distribution in the world: *B. unicornis* occurs in Europe, North Afrika, Middle Asia, Middle East,

Cyprus, Saudi Arabia, and Turkey in the Palaearctic Region. It is also known from the Afrotropical Region (Schülke & Smetana, 2015).

Bionomics: The specimens have been found in the light trap and near a lake in under stone.

ACKNOWLEDGMENTS

We are most grateful to Michael Schülke (Berlin, Germany) for identification/confirmation of parts of the material and to our colleagues for making their staphylinid collections available to us.

Statement of Conflict of Interest

Author has declared no conflict of interest.

Author's Contributions

The contribution of the authors is equal.

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.
- Anlaş S, Deveci Ö 2011. New records of Staphylinidae from Turkey, Syria and Iran. *Turkish Journal of Zoology* 35 (3): 433-435.
- Assing V 2007. New species and additional records of Staphylinidae from Turkey V (Coleoptera). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde Serie A (Biologie)* 700: 1-64.
- Assing V 2009. On the Staphylinidae of Turkey. VI. Thirteen new species and additional records (Coleoptera). *Koleopterologische Rundschau* 79: 117-172.
- Heyden L 1890. Beiträge zur Coleopteren-Fauna von Amasia und Samsoun in Nord-Kleinasien. *Deutsche Entomologische Zeitschrift*: 361-374.
- Kılıç T, Yoldaş Z 2012. Insect Pests Determined In Fresh Onion Fields In İzmir Province. *Türkiye Entomoloji Dergisi*, 36(2), 287-298.
- Makranczy G Y 2006. Systematics and phylogenetic relationships of the genera in the *Carpelimus* group (Coleoptera: Staphylinidae: Oxytelinae). *Annales Historico-Naturales Musei Nationalis Hungarici* 98: 29-119.
- 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.
- Paulian R 1941. Les premiers états des Staphyloidea (Coleoptera). Étude de morphologie comparée. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle, Nouvelle série* 15: 1-361.
- Scheerpeltz O 1961a. Wissenschaftliche Ergebnisse der zoologischen Explorationen des Gebietes von Aspromonte im südlichsten Calabrien in den Jahren 1957/58 durch Prof. Dr. S. Ruffo und Dr. M. Magistretti (Col. Staphylinidae). *Memorie del Museo Civico di Storia Naturale, Verona*, 9: 115-154.
- Scheerpeltz O 1961b. Die von den Herren W. Richter und Dr. F. Schäuuffele in den Jahren 1954 und 1956 im Sudiran aufgefundenen Staphyliniden (Col.). *Stuttgarter Beiträge zur Naturkunde* 50: 1-31.
- Schülke M 2009. Zur Taxonomie und Faunistik westpaläarktischer Staphylinidae (Coleoptera: Staphylinidae: Omaliinae, Oxytelinae et Tachyporinae). *Linzer biologische Beiträge*, 41: 803-844.
- Schülke M, Smetana A 2015. Staphylinidae. In: Löbl I, Löbl D (editors). *Catalogue of Palaearctic Coleoptera. Volume 2. Hydrophiloidea Staphyloidea*. Revised and Updated Edition. Leiden, the Netherlands: Brill, pp. 304-1134.
- Tottenham C E 1954. Coleoptera, Staphylinidae (part). *Handbooks for the Identification of British Insects IV (8a)*, 1-79. Royal Entomological Society of London.
- Varlı S V, Tuven A, Örgel S, Surgut H, Jansson N 2018. Additional faunistic records the family Staphylinidae (Coleoptera) from Balıkesir province of Turkey. *Türkiye Entomoloji Bülteni* 8 (1-2): 23-34.

A New Record and a New Locality for the Genus *Chlorophyllum* Masee in Turkey

Yasin UZUN¹, Abdullah KAYA²

¹Karamanoğlu Mehmetbey University, Ermenek Uysal and Hasan Kalan Health Services Vocational School, Department of Pharmacy Services Karaman, Turkey, ²Gazi University, Science Faculty, Department of Biology, Ankara, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0002-6423-6085>, ²<https://orcid.org/0000-0002-4654-1406>

✉: kayaabd@hotmail.com

ABSTRACT

This paper was carried out on two secotioid macrofungi taxa within the order *Agaricales*. One of them, *Chlorophyllum lusitanicum* G. Moreno, Muñ.-Moh., Manjón, Carlavilla & Altés is reported as new record for Turkish and Asian mycobiota. A new locality was given for the second one, *Chlorophyllum agaricoides* (Czern.) Vellinga, which is also a rare taxon in Turkey. *Chlorophyllum lusitanicum* was described briefly, and the localities, voucher numbers are provided together with macro and micro photographs of fruit bodies and basidiospores of both taxa. A synoptic key for Turkish *Chlorophyllum* was also prepared.

Research Article

Article History

Received : 05.03.2021

Accepted : 29.04.2021

Keywords

Agaricaceae
biodiversity
secotioid fungi
Turkey

Türkiye'deki *Chlorophyllum* Masee Cinsi İçin Yeni Bir Kayıt ve Yeni Bir Lokalite

ÖZET

Bu makale *Agaricales* takımına ait iki sekotioid makromantar taksonu üzerinde gerçekleştirilmiştir. Bunlardan birisi, *Chlorophyllum lusitanicum* G. Moreno, Muñ.-Moh., Manjón, Carlavilla & Altés, Türkiye ve Asya mikobiyotası için yeni kayıt olarak rapor edilmiştir. Türki'de nadir yayılış gösteren ikinci takson, *Chlorophyllum agaricoides* (Czern.) Vellinga, için ise Trabzon'dan yeni bir lokalite verilmiştir. *Chlorophyllum lusitanicum* kısaca betimlenerek her iki taksona ait lokaliteler, toplayıcı numaraları, fruktifikasyon organları ve bazidiyosporlara ilişkin makro ve mikro fotoğraflar ile birlikte verilmiştir. Türkiye'deki *Chlorophyllum* cinsine ait sinoptik anahtar da hazırlanmıştır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 05.03.2021

Kabul Tarihi : 29.04.2021

Anahtar Kelimeler

Agaricaceae
biyoçeşitlilik
sekotioid mantarlar
Türkiye

To Cite: Uzun Y, Kaya A 2022. A New Record and a New Locality for the Genus *Chlorophyllum* Masee in Turkey. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 144-149. DOI: 10.18016/ksutarimdog.vi.891567

INTRODUCTION

Chlorophyllum Masee is a genus within the family *Agaricaceae*. Members of the genus are characterized by agaricoid to secotioid, or gasteroid habit; white, green, brownish or brown spore deposit; basidiospores without germ pore or with a germ pore caused by a depression in the episporium without a hyaline covering (Ge and Yang 2006; Crous et al. 2015, Carlavilla et al. 2018; Ge et al. 2018; Alves et al. 2019).

The genus was first typified by *Chlorophyllum molybdites* (G. Mey.) Masee. Later on some species from the genera *Chlorophyllum* Masee, *Endoptychum* Czern., *Lepiota* (Pers.) Gray and *Macrolepiota* Sing. were transferred to the genus based on morphological similarities and molecular evidences (Carlavilla et al. 2018; Ge et al. 2018; Alves et al. 2019).

Kirk et al (2008) reports the existance of 16 members

of *Chlorophyllum*, but Index Fungorum (Accessed 15 December 2020) currently lists 26 conformed species of the genus. Until the end of 2020, four species, *C. agaricoides* (Czern.) Vellinga (Işıloğlu, 1994), *C. brunneum* (Farl. & Burt) Vellinga (Aşkun and Işıloğlu, 1997), *C. molybdites* (G. Mey.) Masee (Demirel and Uzun, 1997), *C. rhacodes* (Vittad.) Vellinga (Vlaev, 1915), of the genus have so far been reported from Turkey. According to the checklists (Sesli and Denchev, 2014; Solak et al., 2015) on Turkish higher fungi and the latest contributions (Akata et al., 2014; Dizkırıcı et al., 2019; Keleş, 2019; Işık, 2020; Kaya and Uzun, 2020; Çağlı and Öztürk, 2020; Sesli, 2020; Sesli et al., 2020) *C. lucitanicum* hasn't been reported before from Turkey.

The study, reports the first record of *C. lusitanicum* and a new distribution locality for *C. agaricoides* and aims to make a contribution to the mycobiota of Turkey.

MATERIALS and METHOD

The study materials were collected in 2018 during routine field trips in Kemalpaşa district of İzmir province and Of district of Trabzon province. First they were photographed at their natural habitats, and notes were taken related to their ecology, morphology and geographic position etc. After collection, the fruit bodies were put in paper boxes and transferred to the fungarium. Microscopic investigations were carried out in fungarium. A Nikon Eclipse Ci-S trinocular microscope was used for microscopic investigation and a DS-Fi2 digital camera was used to obtain microstructural photographs. A Hitachi SU5000 scanning electron microscope were used for SEM images. The samples were identified according to Ge and Yang (2006), Dörfelt and Gube (2007), Crous et al., (2015), Carlavilla et al., (2018), Ge et al. (2018) and Loizides et al. (2020). The samples are kept at Karamanoğlu Mehmetbey University, Kamil Özdağ Science Faculty, Department of Biology.

RESULTS

Basidiomycota R.T. Moore

Agaricales Underw.

Agaricaceae Chevall.

Chlorophyllum lusitanicum G. Moreno, Muñ.-Moh., Manjón, Carlavilla & Altés, in Crous et al., Persoonia 35: 297 (2015) (Turkish name: Çayır yumurtası).

Macroscopic and microscopic features: Basidiocarps 16-33 mm in diam., globose, subglobose to pyriform. Stipe absent or rudimentary with a thick whitish mycelial cord that includes sandy substrate. Peridium whitish to light brownish cream, smooth or breaking into polygonal to irregular patches at maturity, some with small brownish scales. Columella white, variable in length and morphology, up to 8 mm wide in some samples. Gleba whitish at first, then whitish cream to pale yellowish or straw coloured (Figure 1). Taste and odor not detected. Basidia 33-44 × 15-18 µm, clavate to broadly ellipsoid. Basidiospores (8.6)9-12(13) µm, globose to subglobose, more rarely ovoid to ellipsoid, germ pore absent, hyaline, smooth with a hilar appendix (Figure 2).

Ecology: Grassland areas used for cattle grazing, where oaks (*Quercus ilex* L. subsp. *ballota* (Desf.) Samp. and *Q. suber* L.) are the dominant trees (Crous et al., 2015).

Specimen examined: İzmir, Kemalpaşa, Nazarköy Village, meadow, 38°22'N-27°26'E, 300 m, 13.10.2018, Yuzun 6779.



Figure 1. Basidiocarps of *Chlorophyllum lusitanicum*
Şekil 1. *Chlorophyllum lusitanicum*'ün bazidiyokarpları.

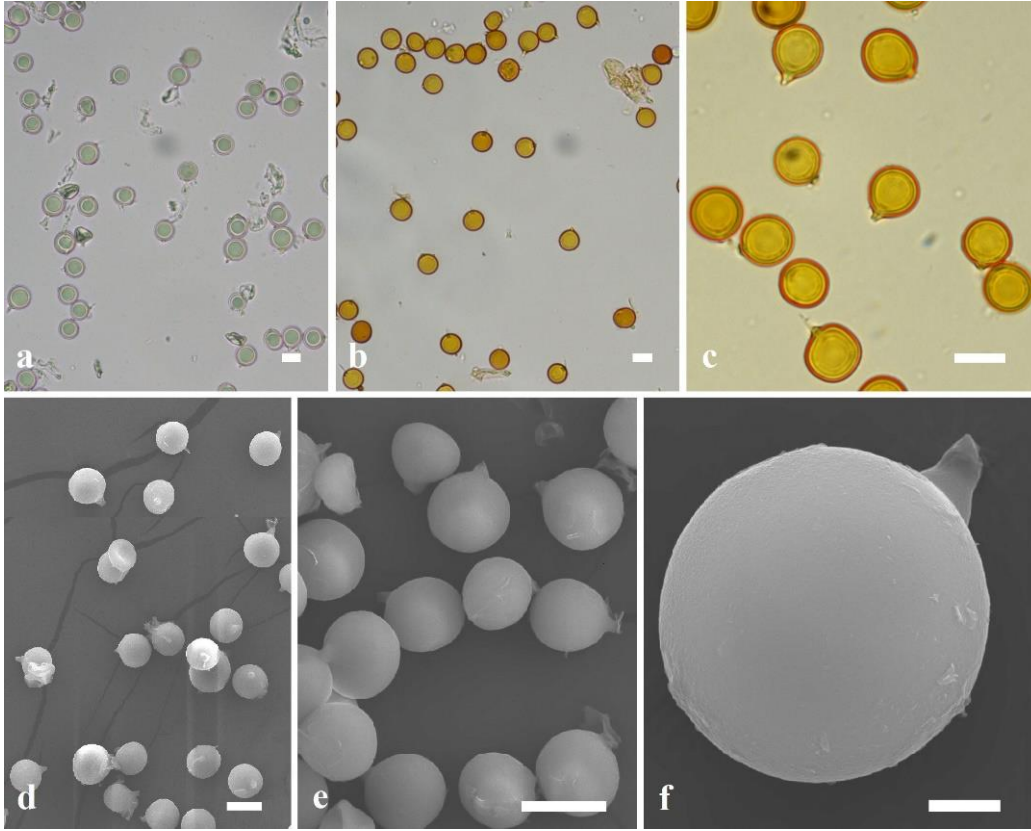


Figure 2. Light microscope (a-c) and scanning electron microscope (d-f) images of basidiospores of *Chlorophyllum lucitanicum* (a: in water, b-c: in Melzer) (Bars, a-e: 10 µm, f: 2 µm)

Şekil 2. *Chlorophyllum lucitanicum*'ün bazidiyosporlarının ışık mikroskobu (a-c) ve taramalı elektron mikroskobu (d-f) görüntüleri (a: su, b-c: Melzer) (Barlar, a-e: 10 µm, f: 2 µm)

Chlorophyllum agaricoides (Czern.) Vellinga, Mycotaxon 83: 416 (2002) (Turkish name: Koç yumurtası)

Syn.: *Endoptychum agaricoides* Czern., *Secotium agaricoides* (Czern.) Hollós,

Specimen examined: Trabzon, Of, Yazlık Village, meadow, 40°54'N-40°14'E, 130 m, 23.02.2018, Yuzun 6221.

Previous collections in Turkey: Mersin (Işıloğlu, 1994); Van (Demirel et al., 2015; Demirel and Koçak, 2016); Bingöl (Uzun et al., 2017).

Key to species of *Chlorophyllum* in Turkey:

- 1 Fruit bodies sequestrate (either secotioid or gasteroid) 2
- 1 Fruit bodies agaricoid 3
- 2 Basidiocarps secotioid, the margin of the pileus does not break free from the stipe, hymenophore (gleba) labyrinthiform to sub-lamellate *C. agaricoides*
- 2 Basidiocarps gasteroid, stipe absent or rudimentary with a thick whitish mycelial cord *C. lusitanicum*
- 3 Fruit bodies small to large; lamellae white or brownish with age; spore print, never green 4
- 3 Fruit bodies large; lamellae becoming greenish when mature; spore print green. *C. molybdites*
- 4 Stipe abruptly to marginately bulbous at the base; annulus simple, apices of spores often truncated; cheilocystidia clavate, to narrowly clavate *C. brunneum*

4 Stipe widened at the base, annulus complex, with double crown; apices of spores rounded or truncated; cheilocystidia clavate to broadly clavate. *rhacodes*.

DISCUSSION

Chlorophyllum lusitanicum was added as new record for the mycobiota of Turkey. This is the fifth member of the genus to be reported in Turkey. In general, the macro and micromorphological characteristics of our collection are in agreement with Moreno et al. (2015) and Carlavilla et al., (2018). Both *C. lusitanicum* and *C. agaricoides* have sequestrate habits and close to each other, but the latter species differs from *C. lusitanicum* by its stipitate to percurrent basidiomata, well-developed columella, dark brown gleba at maturity, and greenish to yellowish brown, ellipsoid spores, not larger than 10 µm long (Crous et al. 2015).

So far four members of the genus *Chlorophyllum* have been reported from Turkey. Among them *C. agaricoides* was reported from Mediterranean (Işıloğlu, 1994) and Eastern Anatolian (Demirel et al., 2015, 2016; Uzun et al., 2017) regions. This will be the first report of *C. agaricoides* from Black Sea Region of Turkey. *Chlorophyllum brunneum* seems to exist only in Marmara Region (Aşkun and Işıloğlu, 1997) while *C. molybdites* was reported from Aegean



Figure 3. Basidiocarps of *Chlorophyllum agaricoides*
Şekil 3. *Chlorophyllum agaricoides*'in bazidiyokarları

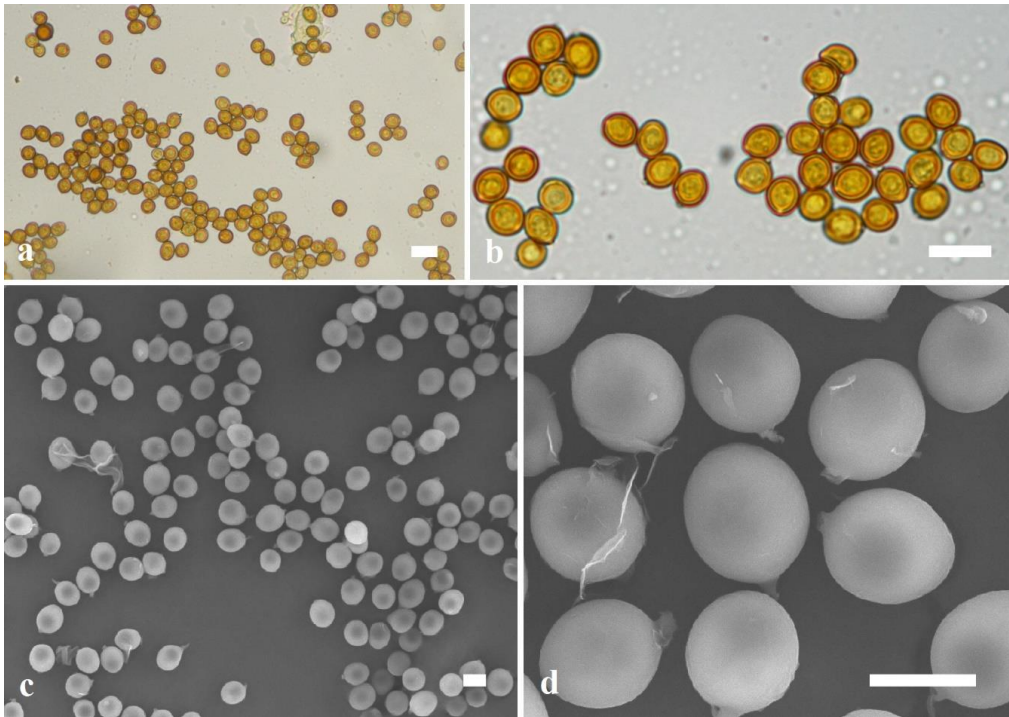


Figure 4. Light microscope (a-b) and scanning electron microscope (c-d) images of basidiospores of *Chlorophyllum agaricoides*
(a-b: in Melzer) (Bars, a-c: 10 μ m, d: 5 μ m)

Şekil 4. *Chlorophyllum agaricoides*'in bazidiyosporlarının ışık mikroskobu (a-b) ve taramalı elektron mikroskobu (c-d) görüntüleri (a-b: Melzer) (Barlar, a-c: 10 μ m, d: 5 μ m)

(Demirel and Allı, 2019) and Black Sea (Demirel and Uzun, 1997) regions. *Chlorophyllum rhacodes* is the most common member of the genus in Turkey and it was reported from almost all regions except Southeastern Anatolian Region

With the addition of *C. lusitanicum*, current taxa number of the genus *Chlorophyllum* in Turkey increased to five.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank Ömer UZUN for his kind help during field study.

Author's Contributions

Authors declares the contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Akata I, Uzun Y, Kaya A. 2014. Macromycetes determined in Yomra (Trabzon) district. *Turkish Journal of Botany* 38(5): 999-1012.
- Alves MH, Cruz MO, Nascimento CC. 2019. First record of *Chlorophyllum molybdites* (G. Mey.) Masee (Basidiomycota, Agaricaceae) from Piauí state, Brazil. *Check List*, 15(4): 695-699.
- Aşkun T, Işıloğlu M. 1997. Macrofungi of Balya (Balıkesir) county. *Turkish Journal of Botany*, 21(5): 279-284.
- Carlavilla JR, Moreno G, Mohedano JM. 2018. *Chlorophyllum lusitanicum* a rare species from the Iberian Peninsula. *Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid*, 42: 99-105.
- Crous PW, Wingfield MJ, Le Roux JJ, Richardson DM, Strasberg D, Shivas RG, Alvarado P, Edwards J, Moreno G, Sharma R, Sonawane MS, Tan YP, Altés A, Barasubiye T, Barnes CW, Blanchette RA, Boertmann D, Bogo A, Carlavilla JR, Cheewangkoon R, Daniel R, de Beer ZW, de Jesús Yáñez-Morales M, Duong TA, Fernández-Vicente J, Geering AD, Guest DI, Held BW, Heykoop M, Hubka V, Ismail AM, Kajale SC, Khemmuk W, Kolařík M, Kurli R, Lebeuf R, Lévesque CA, Lombard L, Magista D, Manjón JL, Marinowitz S, Mohedano JM, Nováková A, Oberlies NH, Otto EC, Paguigan ND, Pascoe IG, Pérez-Butrón JL, Perrone G, Rahi P, Raja HA, Rintoul T, Sanhueza RM, Scarlett K, Shouche YS, Shuttleworth LA, Taylor PW, Thorn RG, Vawdrey LL, Solano-Vidal R, Voitk A, Wong PT, Wood AR, Zamora JC, Groenewald JZ. 2015. Fungal Planet description sheets: 371-399. *Persoonia*, 35: 264-327.
- Çağlı G, Öztürk A. 2020. Macromycetes determined in Muradiye (Van) district. *Anatolian Journal of Botany*, 4(1): 57-64.
- Demirel GN, Allı H. 2019. Macrofungi Determined in Köyceğiz (Muğla) District. *The Journal of Fungus*, 10(2): 133-142.
- Demirel K, Koçak MZ. 2016. Zilan Vadisi'nin (Erciş-VAN) Makrofungal Çeşitliliği. *Mantar Dergisi*, 7(2): 122-134.
- Demirel K, Uzun Y, Akçay ME, Keleş A, Acar İ, Efe V. 2015. Van Yöresi Makromantarlarına Katkılar. *Mantar Dergisi*, 6(2): 13-23.
- Demirel K, Uzun, Y. 1997. Two new and poisonous fungi for the mycoflora of Turkey. *Bulletin of Pure and Applied Sciences*, 16B(2): 103-104.
- Dizkırıncı A, Kalmer A, Acar İ. 2019. Morphologic and Molecular Diagnosis of Some *Leucoagaricus* Species and Revealing a New Record from Turkey. *The Journal of Fungus*, 10(2): 143-150.
- Dörfelt H, Gube M. 2007. Secotioid Agaricales (Basidiomycetes) from Mongolia. *Feddes Repertorium*, 118(3-4): 103-112.
- Ge ZW, Jacobs A, Vellinga EC, Sysouphanthong P, Wald R, Lavorato C An YF, Yang ZL. 2018. A multi-gene phylogeny of *Chlorophyllum* (Agaricaceae, Basidiomycota): new species, new combination and infrageneric classification. *MycKeys*, 32: 65-90.
- Ge ZW, Yang ZL. 2006. The genus *Chlorophyllum* (Basidiomycetes) in China. *Mycotaxon*, 96: 181-191.
- Index Fungorum (2020). <http://www.indexfungorum.org/Names/Names.asp>. Accessed 15 August 2020.
- Işık H. 2020. New *Agaricus*, *Steccherinum*, and *Typhula* species for Turkey. *Mycotaxon*, 135(1): 213-222.
- Işıloğlu M. 1994. A new record for the fungus flora of Turkey. *Turkish Journal of Botany* 18: 451-452.
- Kaya A, Uzun Y. 2020. *Bryoperdon*, A New Gasteromycete Genus Record for Turkey. *KSÜ Tarım ve Doğa Dergisi*, 23(3): 596-599.
- Keleş, A. 2019. Three new records for Turkish mycobiota. *Applied Ecology and Environmental Research*, 17(1): 983-988.
- Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. 2008. *Dictionary of the Fungi*, 10th ed., Wallingford: CAB International.
- Loizides M, Alvarado P, Polemis E, Dimoud DM, Zervakis GI, Thines M, Telle S, Konstantinou G, Gube M. 2020. Multiple evolutionary origins of sequestrate species in the agaricoid genus *Chlorophyllum*. *Mycologia*, 112(2): 400-422.
- Moreno G, Mohedano JM, Manjón JL, Carlavilla JR, Alté A. 2015. *Chlorophyllum lusitanicum* G. Moreno, Mohedano, Manjón, Carlavilla & Altés, sp. nov. *Persoonia* 35: 296-297.

- Sesli E, Denchev CM. 2014. Checklists of the myxomycetes, larger ascomycetes, and larger basidiomycetes in Turkey. 6th ed. Mycotaxon, Checklists Online. 136 p. (<http://www.mycotaxon.com/resources/checklists/sesli-v106-checklist.pdf>).
- Sesli E, Asan A, Selçuk F (edits.), Abacı Günyar Ö, Akata I, Akgül H, Aktaş S, Alkan S, Allı H, Aydoğdu H, Berikten D, Demirel K, Demirel R, Doğan HH, Erdoğan M, Ergül CC, Eroğlu G, Giray G, Haliki Uztan A, Kabaktepe Ş, Kadaifçiler D, Kalyoncu F, Karaltı İ, Kaşık G, Kaya A, Keleş A, Kırbağ S, Kıvanç M, Ocak İ, Ökten S, Özkale E, Öztürk C, Sevindik M, Şen B, Şen İ, Türkekul İ, Ulukapı M, Uzun Ya, Uzun Yu, Yoltaş A 2020. Türkiye mantar listesi (The Checklist of Fungi of Turkey). Ali Nihat Gökyiğit Vakfı Yayını. İstanbul.
- Sesli E. 2020. Presence of *Cortinarius atroalbus* M.M.Moser and *C. duracinobtus* Rob. Henry (Basidiomycota, Cortinariaceae) in Turkey. *Anatolian Journal of Botany* 4(2): 92-95.
- Solak MH, Işıloğlu M, Kalmış E, Allı H. 2015. Macrofungi of Turkey, Checklist, Vol. 2. Turkey: Üniversiteler Ofset, İzmir, 280p.
- Uzun Y, Acar İ, Akçay ME, Kaya A. 2017. Contributions to the macrofungi of Bingöl, Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 41(5): 516-534.
- Vlaev K. 1915. Contribution to the higher fungus flora of Turkish Thrace. *Travaux de la Société Bulgare des Sciences Naturelles*, 8: 199-207.

The Influence of Age and Exposure Time on the Susceptibility of *Carpophilus hemipterus* Pupa to High Carbon Dioxide with Low Oxygen Treatment

Şule TÛTÛNCÛ¹

Ankara University Kalecik Vocational School, Kalecik/Ankara,06870

¹<https://orcid.org/0000-0001-7277-2307>

✉: stutuncu@ankara.edu.tr

ABSTRACT

Modified/controlled atmosphere applications, as an alternative to the chemical treatments, are an effective technique in controlling pest of stored products, especially dried fruits. In gas tight units, it is applied with the principle of preventing the insect respiration by changing the oxygen (O₂), carbon dioxide (CO₂) and nitrogen (N₂) gas levels of the atmosphere. In the study, 1-, 2- and 3- d-old pupae of dried fruit beetle, *Carpophilus hemipterus* (L.), which is an important dried fruit pest, were exposed to the modified / controlled atmosphere. The modified/controlled atmosphere consisting of 2.1% O₂ + 90% CO₂ + 7.9% N₂ gas mixture was applied for 48, 72, 96 and 120 h at 20°C and 75 ± 5% relative humidity. One, two and three d old pupae responded similarly to modified/controlled atmosphere application. Mortality rates remained close in each exposure time and no significant difference was found between age groups. Unlike the age factor, the exposure time was found to be statistically significant and the mortality rates increased as the exposure time increased in each age group. The highest mortality rates were found as 38, 60 and 47% in 1-, 2- and 3-d old pupae after 120 h of application, respectively.

Research Article

Article History

Received : 01.02.2021

Accepted : 22.04.2021

Keywords

Nitidulidae
Modified Atmosphere
Dried Fruit
Sap Beetle
Mortality

Carpophilus hemipterus (L.) Pupasının Düşük Oksijenli Yüksek Karbondioksit Uygulamasına Duyarlılığı Üzerinde Yaşın ve Uygulama Süresinin Etkisi

ÖZET

Kuru meyveler başta olmak üzere depolanmış ürün zararlılarıyla mücadelede, kimyasal kullanımına alternatif olarak, değiştirilmiş / kontrollü atmosfer uygulamaları etkili bir savaşım tekniğidir. Gaz geçirmez ünitelerde, atmosferin oksijen (O₂), karbondioksit (CO₂) ve nitrojen (N₂) gazı seviyelerinin değiştirilmesi sayesinde solunumun engellenmesi prensibiyle uygulanır. Araştırmada, önemli bir kuru meyve zararlısı olan ekşilik böceği, *Carpophilus hemipterus* (L.)'un 1, 2 ve 3 günlük pupaları değiştirilmiş / kontrollü atmosfere maruz bırakılmışlardır. Gaz karışımı %2.1 O₂ + %90 CO₂ + %7.9 N₂' den oluşan değiştirilmiş / kontrollü atmosfer 48, 72, 96 ve 120 saat süreyle 20°C sıcaklık ve 75 ± 5% orantılı nem koşullarında uygulanmıştır. Bir, iki ve üç günlük pupalar değiştirilmiş / kontrollü atmosfer uygulamasına benzer tepki vermişlerdir. Ölüm oranları değiştirilmiş / kontrollü atmosfer uygulamasının her bir uygulama süresinde yakın seyretmiş ve yaş grupları arasında önemli bir fark tespit edilmemiştir. Yaş faktörünün aksine, uygulama süresi istatistiki anlamda önemli bulunmuş ve her bir yaş grubunda uygulama süresi arttıkça ölüm oranları artmıştır. En yüksek ölüm oranları 120 saatlik uygulama sonucu 1, 2 ve 3 günlük pupalarda sırasıyla %38, 60 ve 47 olarak tespit edilmiştir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 01.02.2021

Kabul Tarihi : 22.04.2021

Anahtar Kelimeler

Nitidulidae
Değiştirilmiş Atmosfer
Kuru Meyve
Ekşilik Böceği
Mutlak Ölüm

INTRODUCTION

Sap beetles cause economic losses by feeding on many stored products, especially in the postharvest or ripening period of fruits and grains (Emekci and Moore, 2015). In addition, they play a role in the occurrence of serious health problems due to toxin formation (Öksüztepe and Erkan, 2016) by contaminating harmful microorganisms (Rodriguez-Del-Bosque et al., 1998; Emekci and Moore, 2015). Dried fruit beetle, *Carpophilus hemipterus* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Nitidulidae) is commonly found in figs and dates (Turanlı, 2003; Burks et al., 2015; Emekci and Moore, 2015; Rosi et al., 2019), which are economically important dried fruits for world trade. According to the data of 2019, approx. 479 (1000 US\$) of the world dried fruit export value of 1.461 (1000 US\$) is provided by dried fig alone. In addition, dates that can be consumed in fresh and dried form have an important world export value (2.001.634 US\$) (Anonymous, 2020). The common preferred method of disinfestation of stored product pests is the use of synthetic chemicals. However, the long-term implementation of synthetic chemicals can cause negative effects on the practitioners, consumers and the environment due to their residue. In addition, pests can develop resistance to the insecticides (Collins, 2006; Jagadeesan et al., 2012) as another negative effect. Therefore, it is necessary to turn to alternative pest management techniques in order to reduce the negative effects on risk groups. Non-chemical control methods have been tried and developed to remove or reduce pest populations from stored products, especially dried fruits (Emekci and Ferizli, 2000; Bagci et al., 2006; Finkelman et al., 2006; Kavallieratos et al., 2012; Abo-El-Saad and El-Shafie, 2013; Burks et al., 2015; Navarro and Navarro, 2015; Karakoç et al., 2018; Rosi et al., 2019; Tutuncu and Emekci, 2019; Yilmaz et al., 2020). Among these alternative methods, modified / controlled atmosphere treatment is applied by changing the CO₂ and / or O₂ levels of the normal atmosphere to the levels at which insects cannot perform normal respiration and metabolic activity, in a gas-tight environment, by giving N₂ or CO₂ gas or by using an exothermic gas generator (Navarro, 2012). The important factors that determine the mortality time in low O₂ or high CO₂ atmospheres are specified as the level of gas concentration, the ambient temperature and humidity at which the application takes place, the species of the insect, its biological stage and the age of the stage (Navarro, 2012). The egg stage, which is the embryological development period, and the pupal stage, which is the metamorphosis period, are relatively more resistant to modified / controlled atmosphere application compared to other active biological stages (Gbaye and Odeyemi, 2005; Riudavets et al., 2009; Wong-Corral

et al., 2013; Tutuncu and Emekci, 2019). In these stages where metabolic activity is low, a U-shaped curve of oxygen consumption indicates that oxygen demand changes with development / age (Fink, 1925; Odell, 1998). Therefore, 1-, 2- and 3- d-old pupae were tested in present study. There are very few studies of modified / controlled atmosphere applications related to control of *C. hemipterus* (Donahaye et al., 1994; Emekci et al., 2003; Gbaye and Odeyemi, 2005). In these studies, the effects of the atmosphere consisting of relatively high CO₂ with low O₂ (1, 2 and 3% O₂ +14, 13.3 and 12% CO₂, respectively, balance N₂) and high CO₂ with low O₂ (0 - 1.2% O₂ + 95-100% CO₂, balance N₂) on different biological stages of *C. hemipterus* under high temperature (26-35°C) were investigated. Under these conditions, exposure times required for the death of half or all of the population are reported as 137 h (50% mortality) at 2% O₂, 5 d (100% mortality) at approx. 1% O₂ and 39.8 h (50% mortality) at 0% O₂, respectively.

This study was carried out on 1-, 2- and 3-d-old pupae of *C. hemipterus* for 48-120 h at low temperature (20°C) and high CO₂ with low O₂ atmosphere (2.1% O₂ + 90% CO₂ + 7.9% N₂). The objective of the study, rather than determining the complete mortality time, was to determine whether the lethal effect would make a difference according to age and also how effective the exposure times up to 5 d at 20°C in controlling the pupal stage.

MATERIAL and METHOD

Insect Culture and Pupal Stage

Carpophilus hemipterus was grown on artificial feed consisting of water (1 liter), corn flour (125 g), glucose (90 g), sugar (44 g), yeast (50 g), agar agar (18 g), propionic acid (3.1 ml) and methyl 4 - hydroxybenzoate (1 g) (Donahaye and Navarro, 1989) at 25 ± 5°C and 75 ± 5% relative humidity (r.h) under a dark condition. Food preparation and obtaining pupae are as described in the previous study (Tutuncu and Emekci, 2014). Briefly, food slices (7x7x1cm) prepared by cooking were placed in sterile jars (1 liter) and 100 adults of mixed sex were transferred on the food. The jars were closed by sterile American cotton cloth cut and folded in half instead of the jar lid. Eggs left between American cotton cloth by adults were taken after 24 h and were transferred to new jars containing food and their age (0-24 h old) and date were recorded. By following the biological stages, 12-d-old (from egg hatching) mature larvae were obtained from these jars. Then, the new jars containing these mature larvae were monitored daily and 1-d-old (0-24-h-old) pupae were obtained. Pupae aged 2 (24-48-h-old) and 3 (48-72-h-old) d were obtained by keeping 1-d-old pupae in acclimatized laboratory conditions. Pupae aged 1, 2 and 3 d were

used in the experiments.

Experimental Equipment and Setup

Gas cylinders containing 2.1% O₂ + 90% CO₂ + 7.9% N₂ gas composition were used in the experiments (Linde Gas, Ankara). The experimental setup and gas washing procedure were as mentioned in Tutuncu and Emekci (2017). Briefly, Plexiglas test tube (10 ml) containing test pupae, and humidity solution tube (50 ml KOH) were placed in gas washing bottles (8 cm diameter and 25 cm height) with a capacity of 550 ml. After inserting the tubes, the lid of the gas washing bottle was closed. Gas was supplied from the gas cylinder connected to the gas flushing valve of the gas washing bottle at a flow rate of 100 ml min⁻¹ in 15 min. At the end of the period, the desired gas value (2.1% O₂) was measured with the oxygen meter (OxyCheq Expedition O₂ Analyzer, OA-01-01, OxyCheck, Marianna, FL, USA) connected to the outlet valve of the gas washing bottle. After the measurement, the gas inlet and outlet valves were closed and the gas flushing process was completed. Afterwards the gas washing bottles were put into incubators at a temperature of 20 ± 0.5°C and 75 ± 5% r.h, and measurements were made with a temperature / humidity meter (Hobo® UX100-003, Onset Computer Corporation, MA, USA) inside the gas washing bottles during the exposure period. The control groups were prepared in the same way and placed in the incubator under normal atmospheric conditions, leaving the valves of the gas washing bottles open. The experiments were carried out with 3 repetitions (3 parallels x 3 replicates) using 30 pupae in each. Dead/live pupae were counted at 0 (control), 48, 72, 96 and 120 h of exposure time.

Post-treatment Evaluation

At the end of the exposure period, the gas washing bottles were removed from the incubator and the Plexiglas test tube containing the test pupae were removed and aerated. In addition, 1 g of food was added to the test tubes in order to prevent the adult cannibalism. The test tubes were kept in the acclimatized insect rearing room at 25 ± 5°C and 75 ± 5% r.h until the end of the observation after the experiment. After daily count, pupae become adult were removed from the Plexiglas test tubes and recorded as alive. The observations were continued until the pupae did not have any signs of vitality (i.e., they dried up and darkened). The numbers of alive and dead in the control groups were performed using the same method as the test groups.

Statistical Analysis

Since the mortality rate in the control group was less than 5%, no correction was applied to the control. Factorial ANOVA was used for the statistical analysis

of mean mortality rates. The mean differences between exposure times and pupal ages was made according to the Duncan's multiple range test ($P < 0.05$). Statistical calculations were made using the Statistica 7.0 (StatSoft, 2004) program.

RESULTS

Mortality rates of *C. hemipterus* pupae, aged 1, 2 and 3 d, exposed to gas composition of high CO₂ with low O₂ at 20°C and 75 ± 5% r.h were shown in Figure 1.

According to the statistical values of "exposure time" ($F(4; 14) = 28.195, P=0.0001$), "age" ($F(2; 14) = 0.800, P=0.4684$) and "exposure time x age" interaction ($F(8; 14) = 1.626, P=0.2036$), only the exposure time was found to have significant effect on mortality rates of *C. hemipterus* pupae. The mortality rate increased with the increase in exposure time in each pupal age group. However, the statistically difference was generally seen between 120 h and other exposure times (Table 1). For 1-d-old pupa, although ≥96 h of exposure time resulted in significantly higher pupal mortality compared to the control group, 120 h of exposure was not sufficient to achieve complete pupal mortality, and 38% mortality was obtained. In the comparison of 1-, 2- and 3-d-old pupae, there was no statistically significant difference between ages. However, at 72 and 96 h of exposure times, low mortality rates were observed in 2- and 3-d-old pupae, while the mortality rate for 1-d-old pupae increased up to 33%, was remarkable. The opposite situation was observed at 120 h of exposure. The highest mortality rate was observed at approx. 60% for 2-d old pupae. This was followed by 3-d-old pupae and 1-d-old pupae (Table 1 and Figure 1).

DISCUSSION and CONCLUSION

The highest mortality (60%) was achieved in 2-d-old pupae of *C. hemipterus* for 5 d of exposure time under high CO₂ with low O₂ atmosphere. This highest mortality rate (60%) detected at 20°C is supported by the result of Donahaye et al. (1994), carried out at 26°C. Researchers determined the lethal time 50 (LT₅₀) values of the 1- and 2-d-old *C. hemipterus* pupa in a low O₂ atmosphere (2% O₂ with 12% CO₂) at 26, 30 and 35°C as 137, 43 and 36 h, respectively (Donahaye et al., 1994). Due to the low O₂ level (<1% O₂ + 97% CO₂) and the high temperature (average 27.97°C), the mortality rate obtained in the mixed culture of *C. hemipterus* is higher than that found in the current study. In the study, 100% mortality was achieved after 5 d of modified atmosphere application (Emekci et al., 2003). As in the current study, low mortality rates were also observed in 2-4-d-old pupae of *Carpophilus dimidiatus* (Fabricius, 1972) (Coleoptera: Nitidulidae) after 8 h hours of modified atmosphere (pure CO₂ + ≤1% O₂) application at 29.5°C, and 33.3% mortality was obtained (Odeyemi

et al., 2004). However, complete mortality was achieved by applying pure (100%) CO₂ to *C. hemipterus* pupae (2-4-d-old) for 8 h at 29.0 ± 2°C and 90 ± 5 r.h (Gbaye and Odeyemi, 2005). Although both studies were performed at nearly the same temperature, gas concentration and exposure time, the high mortality rate in *C. hemipterus* for such a short exposure time, is probably due to the difference

in species. Also, complete mortality for *C. hemipterus* pupae achieved for 8 h of exposure time (Gbaye and Odeyemi 2005) is not similar to the result of the current study. This could be explained by the difference in temperature and gas concentration among the parameters explained below. As the temperature increases, the critical O₂ level

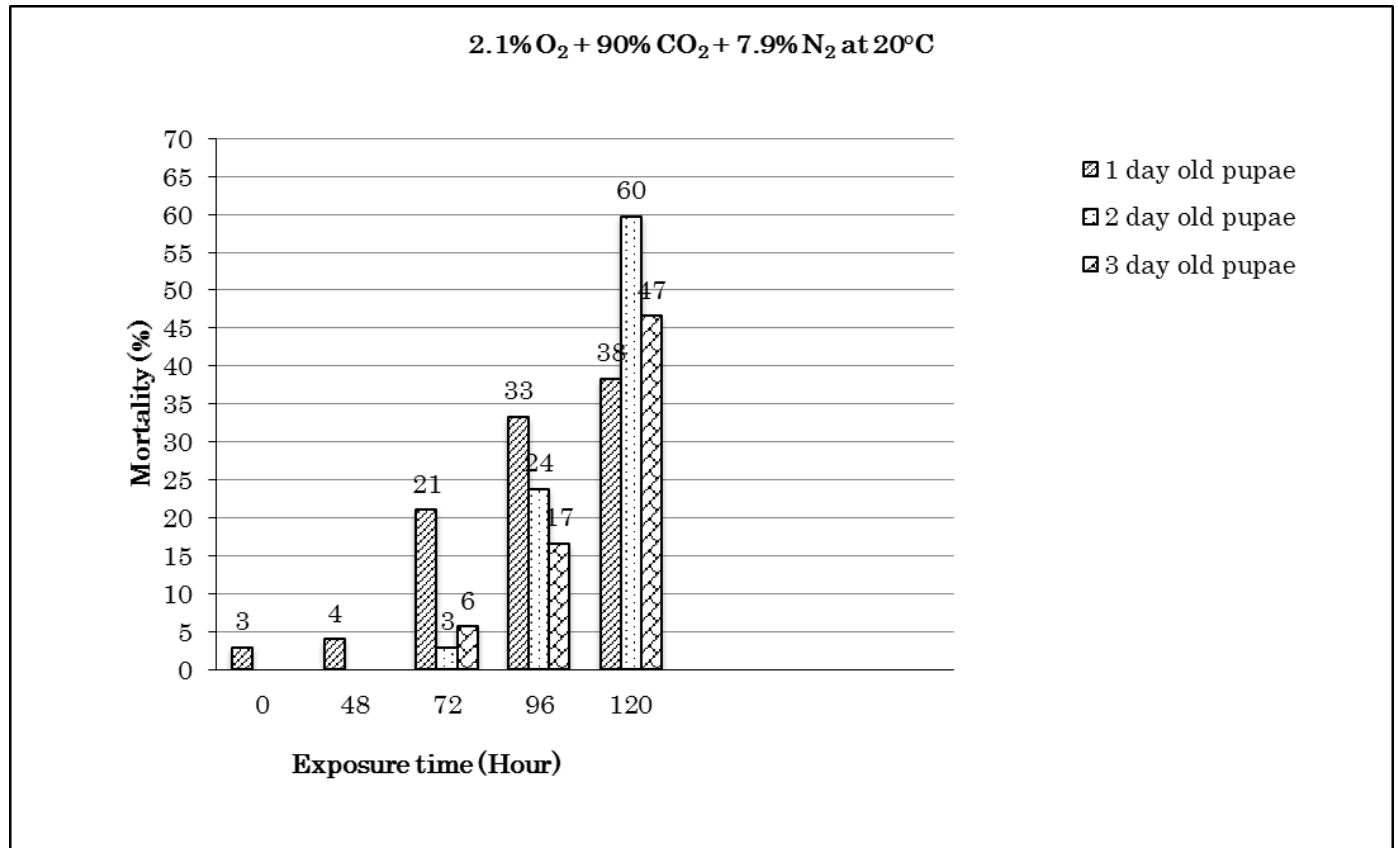


Figure 1. Mortality rates of different aged pupae of *Carpophilus hemipterus*, exposed to high carbon dioxide with low oxygen (2.1% O₂ + 90% CO₂ + 7.9% N₂) treatment for different periods at 20°C

Şekil 1. Düşük oksijenli yüksek karbondioksit atmosfer uygulamasına farklı uygulama sürelerinde ve 20°C sıcaklıkta maruz bırakılan değişik yaşlı *Carpophilus hemipterus* pupalarının ölüm oranları

Table 1. Mean ± SE mortality (%) of different aged pupae of *Carpophilus hemipterus* exposed to high carbon dioxide with low oxygen (2.1% O₂ + 90% CO₂ + 7.9% N₂) treatment for 48, 72, 96 and 120 hours at 20 °C

Çizelge 1. Düşük oksijenli yüksek karbondioksit (%2.1 O₂ + %90 CO₂ + %7.9 N₂) uygulamasına 20 °C sıcaklıkta 48, 72, 96 ve 120 saat süreyle maruz kalan *Carpophilus hemipterus* 'un değişik yaşlı pupalarına ait ortalama ± SH ölüm oranı (%)

| Exposure time (hours) | Biological stage | | | | | |
|-----------------------|------------------|------------------|-----|-----------------|-----|-----------------|
| | n | 1-day-old pupae | n | 2-day-old pupae | n | 3-day-old pupae |
| 0 (control) | 360 | 2.94 ± 9.32 aA | 360 | 0.00 ± 6.59 aA | 360 | 0.00 ± 6.59 aA |
| 48 | 270 | 4.0 ± 9.32 aA | 270 | 0.00 ± 9.32 aA | 270 | 0.00 ± 9.32 aA |
| 72 | 270 | 21.05 ± 9.32 abA | 270 | 2.94 ± 9.32 aA | 270 | 5.71 ± 9.32 aA |
| 96 | 270 | 33.33 ± 5.38 bA | 270 | 23.79 ± 5.28 aA | 270 | 16.66 ± 5.38 aA |
| 120 | 270 | 38.33 ± 5.38 bA | 270 | 59.72 ± 5.38 bA | 270 | 46.66 ± 5.38 bA |

*In each column, the same lowercase letters and in each row, the same uppercase letters mean that the difference between the means for exposure times and pupal age is not significant (Duncan's) ($P > 0.05$)

Her bir kolona ait aynı küçük harfleri ve her bir satıra ait aynı büyük harfleri içeren ortalamalar arasındaki fark Duncan testine göre istatistiki olarak önemli değildir ($P > 0.05$)

needed by the insect to survive increases (Zhou et al., 2000), and also insect metabolism accelerates and the effect of CO₂ increases (Navarro, 2012). Both the fact indicate that the increase in temperature shortens the mortality time or mortality rate in modified / controlled atmosphere applications. Sen et al. (2010) showed that the application of low O₂ (1% O₂ + 12% CO₂) in a high temperature (41°C) may be sufficient to provide complete mortality for a short exposure time. Sixteen hours of application in the study conducted at 41°C, was sufficient to complete mortality in the mixture culture of *Carpophilus* spp. At similar gas level tested by Sen et al. (2010) the LT₉₅ value was found as 60 h for the pupae of *C. hemipterus* at 35°C (Donahaye et al., 1994). It can be commended that the main factor affecting the difference between complete mortality times in these two studies conducted at similar gas concentrations, is temperature. In addition, the effect of temperature on the exposure time in modified atmosphere applications is also emphasized by Donahaye et al. (1994). In these two studies (Donahaye et al., 1994; Sen et al., 2010), the mortality rates determined in short exposure times are considerably higher than the mortality rate of 60% after 120 h of exposure in this study. The parameters affecting this difference are seen as temperature and O₂ / CO₂ gas levels. Increase in mortality rate and the shortening of the complete mortality time due to the increase in CO₂ levels have been reported in previous studies (Navarro et al., 2002; Hashem et al., 2012; Wong-Corral et al., 2013). Also, in another study complete mortality could not be achieved in some species even with 12 d of exposure at 50% CO₂ (with 3% O₂) concentration, while was achieved in 12 d with 90% CO₂ (with 3% O₂) (Riudavets et al., 2009). In addition, relationship between O₂ level increase and mortality time increase or mortality rate decrease, was observed in different stage of *C. hemipterus*, *Urophorus humeralis* (Fabricius, 1798) (Coleoptera: Nitidulidae), *Cadra cautella* (Walker, 1863) (Lepidoptera: Pyralidae), *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) and partly *Sitophilus oryzae* (Linnaeus, 1763) (Coleoptera: Curculionidae) (Navarro, 1978; Donahaye et al., 1994). Humidity level, such as temperature and gas concentration, is a physical parameter that affects the mortality rate / complete mortality time in modified / controlled atmosphere applications. While it is stated that low humidity conditions increase the mortality rate in modified / controlled atmosphere applications (Ofuya and Reichmuth, 2002), it is seen that this effect should be evaluated on the basis of species (Soderstrom et al., 1986). Although various relative humidity levels were not studied in present study, it is not thought that the humidity level of the study

has a decreasing or increasing effect on mortality. Because, the humidity level in which this study was conducted is optimal for the survival, reproduction and development of *C. hemipterus* (James and Vogele, 2000; Kumkum, 2017). In addition, mortality rates were below 5% in the control group exposed to the normal atmosphere under the same temperature and humidity conditions as the experimental groups.

According to the present results of the study, the mortality was increased by the increasing exposure time. However, the significant difference started from 96 h of exposure in 1-d-old pupae, while it was between 120 h of exposure and shorter exposure times for 2- and 3- d-old pupae. Similarly, the positive correlation between exposure time and increase of mortality in 2-4-d-old pupae of *C. hemipterus* exposed to 100% CO₂ (Gbaye and Odeyemi, 2005) supports the results obtained from present study. In the study increase in mortality (from approx. 10% to 100%) with increased exposure from 6 to 8 h was found to be significant. In *C. dimidiatus* pupae, the mortality rate increased with the increase in the exposure time, but this increase was not found to be statistically significant (Odeyemi et al., 2004). Such differences between species belonging to the same genus have also been seen in previous studies (Lindgren and Vincent, 1970; Conyers and Bell, 2007). As the exposure time increases, the mortality rate increases in other stored product pest species were also observed. In a study involving many species *Lasioderma serricornis* (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Anobiidae), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens, 1831) (Coleoptera: Cucujoidea), *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Silvanidae), *Tribolium confusum* (Jacquelin du Val, 1868) (Coleoptera: Tenebrionidae), *S. oryzae* and *Rhyzopertha dominica* (Fabricius, 1792) (Coleoptera: Bostrichidae) of the order Coleoptera, *Plodia interpunctella* (Hübner, 1813) (Lepidoptera: Pyralidae) and *Ephestia kuehniella* (Zeller, 1879) (Lepidoptera: Pyralidae) of the Lepidoptera, a psocid and mite *Liposcelis bostrychophila* (Badonnel, 1831) (Psocoptera: Liposcelididae), *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) (Astigmata: Acaridae), this situation was generally observed in all species (Riudavets et al., 2009). Similarly, as the exposure time increased, an increase in mortality rate was observed in the modified atmosphere application performed in 3-96 h interval in 3-d-old pupae of *O. surinamensis* (Hashem et al., 2012). In another study performed at 50-90% CO₂ (in air) concentration between 3-9 d, this correlation was demonstrated in the pupae of *Callosobruchus maculatus* (Fabricius, 1775) (Coleoptera: Chrysomelidae), *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831) (Coleoptera: Chrysomelidae) and *Zabrotes subfasciatus* (Bohemann, 1833) (Coleoptera:

Chrysomelidae) (Wong-Corral et al., 2013). In addition, are other studies Locatelli and Daolio (1993 and Husain et al. (2017) reported that the mortality rate increases significantly with the increase in exposure time in Coleopteran and Lepidopteran species. The effect of modified / controlled atmosphere application on the development of pupae at different ages has been shown in *Sarcophaga crassipalpis* (Macquart, 1839) (Diptera: Sarcophagidae) (Kukal et al., 1991). In the study, while 1-5-d-old pupae exposed to low O₂ atmosphere for 4 d could not complete their development, 5 to 8-d-old pupae were able to complete their development and eclose to adult stage. In another study, at 90% CO₂, 1-d-old *C. cautella* pupae were found to be more resistant, while at 96% CO₂ 1- and 3-d-old pupae were more resistant than 2-d-old pupae (Tutuncu and Emekci, 2019). Similarly, in Storey's (1975) study, it was observed that resistance changes in pupae of *P. interpunctella* and *C. cautella* depending on their age. However, according to the results of this study, mortality rates in 1, 2 and 3-d-old pupae of *C. hemipterus* were found to be similar in all exposure times and no significant difference was detected between 1-, 2- and 3-d-old pupae.

In this study, the effect of high CO₂ with low O₂ atmosphere treatment for up to 5 d of exposure time on different aged pupae of *C. hemipterus* has been demonstrated at low temperature. These results are thought to contribute to the preference of modified / controlled atmosphere application and determination of application parameters for the control of *C. hemipterus*.

Statement Contribution of the Authors

Authors declares the contribution of the authors is equal.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCE

- Abo-El-Saad M, El-Shafie H 2013. Insect Pests of Stored Dates and Their Management. (Dates: Postharvest Science, Processing Technology and Health Benefits. John Wiley & Sons, Ltd.: Ed. Siddiq M, Aleid SM, Kader AA) 81-104.
- Anonymous 2020. Crops and Livestock Products, 2019-2019. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/TP> (Date Accessed: 20.01.2021)
- Bagci F, Ferizli A, Navarro S 2006. Mortality of All Life Stages of Saw Toothed Grain Beetle Held under Vacuum. Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions. 6-9 November, Orlando, Florida 76-3.
- Burks CS, Yasin M, El-Shafie HAF, Wakil W 2015. Pests of Stored Dates. (Sustainable Pest Management in Date Palm: Current Status and Emerging Challenges. Springer International Publishing, Cham: Ed. Wakil W, Romeno Faleiro J, Miller TA) 237-286.
- Collins P 2006. Resistance to Chemical Treatments in Insect Pests of Stored Grain and Its Management. 9th International Working Conference on Stored Product Protection 15-18 October, Campinas, São Paulo, Brazil 277-282.
- Conyers ST, Bell CH 2007. A Novel Use of Modified Atmospheres: Storage Insect Population Control. Journal of Stored Products Research 43(4): 367-374.
- Donahaye E, Navarro S 1989. Sensitivity of Two Dried Fruit Pests to Methyl Bromide Alone, and in Combination with Carbon Dioxide or under Reduced Pressure. Tropical Science 29(1): 9-14.
- Donahaye E, Navarro S, Rindner M 1994. The Influence of Temperature on the Sensitivity of Two Nitidulid Beetles to Low Oxygen Concentrations. 6th International Working Conference on Stored-Product Protection. 17-23 April Canberra, Australia 88-90.
- Emekci M, Ferizli A 2000. Current Status of Stored Products Protection in Turkey. IOBC-WPRS Bulletin 23(10): 39-46.
- Emekci M, Ferizli AG, Tütüncü S, Navarro S 2003. Modified Atmosphere as an Alternative to Mbr in the Dried Fig Sector in Turkey. Annual International Research Conference on Methyl Bromide Alternatives and Emissions Reductions San Diego, California 079-2.
- Emekci M, Moore D 2015. Sap Beetles. (Sustainable Pest Management in Date Palm: Current Status and Emerging Challenges. Springer International Publishing, Cham: Ed. Wakil W, Romeno Faleiro J, Miller TA) 205-235.
- Fink DE 1925. Metabolism during Embryonic and Metamorphic Development of Insects. Journal of General Physiology 7(4): 527-543.
- Finkelman S, Navarro S, Rindner M, Dias R 2006. Use of Heat for Disinfestation and Control of Insects in Dates: Laboratory and Field Trials. Phytoparasitica 34(1): 37-48.
- Gbaye OA, Odeyemi OO 2005. Evaluation of Hypercarbia Atmosphere on the Mortality of Dried-Fruit Beetle, *Carpophilus hemipterus* (Linnaeus). Journal of Food, Agriculture and Environment 3(3&4): 43-46.
- Hashem MY, Ahmed SS, El-Mohandes MA, Gharib MA 2012. Susceptibility of Different Life Stages of Saw-Toothed Grain Beetle *Oryzaephilus surinamensis* (L.) (Coleoptera: Silvanidae) to Modified Atmospheres Enriched with Carbon Dioxide. Journal of Stored Products Research 48: 46-51.
- Husain M, Sukirno S, Mehmood K, Tufail M, Rasool

- KG, Alwaneen WS, Aldawood AS 2017. Effectiveness of Carbon Dioxide against Different Developmental Stages of *Cadra cautella* and *Tribolium castaneum*. *Environmental Science and Pollution Research* 24(14): 12787-12795.
- Jagadeesan R, Collins PJ, Daglish GJ, Ebert PR, Schlipalius DI 2012. Phosphine Resistance in the Rust Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae): Inheritance, Gene Interactions and Fitness Costs. *PLoS One* 7(2):e31582.
- James DG, Vogele B 2000. Development and Survivorship of *Carpophilus hemipterus* (L.), *Carpophilus mutilatus* Erichson and *Carpophilus humeralis* (F.) (Coleoptera: Nitidulidae) over a Range of Constant Temperatures. *Australian Journal of Entomology* 39(3): 180-184.
- Karakoç Ö, Alkan M, Şimşek Ş, Gokce A, Cam H 2018. Fumigant Activity of Some Plant Essential Oils and Their Components against to *Stegobium paniceum* (L.) and *Lasioderma serricorne* (F.) (Coleoptera: Anobiidae). *Plant Protection Bulletin* 58(3): 163-169.
- Kavallieratos NG, Athanassiou CG, Vayias BJ, Tomanović Z 2012. Efficacy of Insect Growth Regulators as Grain Protectants against Two Stored-Product Pests in Wheat and Maize. *J. Food Prot.* 75(5): 942-950.
- Kukul O, Denlinger DL, Lee RE 1991. Developmental and Metabolic Changes Induced by Anoxia in Diapausing and Non-Diapausing Flesh Fly Pupae. *Journal of Comparative Physiology B* 160(6):683-689.
- Kumkum MR 2017. Biology of Dried Fruit Beetle, *Carpophilus hemipterus* (L) and Its Damage Assessment on Different Dried Fruits in Storage. Sher-e-Bangla Agricultural University Department of Entomology, Master Thesis, 83.
- Lindgren DL, Vincent LE 1970. Effect of Atmospheric Gases Alone or in Combination on the Mortality of Granary and Rice Weevils. *Journal of Economic Entomology* 63(6): 1926-1929.
- Locatelli DP, Daolio E 1993. Effectiveness of Carbon Dioxide under Reduced Pressure against Some Insects Infesting Packaged Rice. *Journal of Stored Products Research* 29(1): 81-87.
- Navarro H, Navarro S 2015. Post-Harvest Processing of Dates: Drying, Disinfestation and Storage. (Sustainable Pest Management in Date Palm: Current Status and Emerging Challenges. Springer, Cham: Ed. Wakil W, Romeno Faleiro J, Miller TA) 391-409.
- Navarro S 1978. The Effects of Low Oxygen Tensions on Three Stored-Product Insect Pests. *Phytoparasitica* 6(2): 51-58.
- Navarro S 2012. The Use of Modified and Controlled Atmospheres for the Disinfestation of Stored Products. *Journal of Pest Science* 85: 301-322.
- Navarro S, Finkelman S, Sabio G, Isikber A, Dias R, Rindner M, Azrieli A 2002. Quarantine Treatment of Storage Insect Pests under Vacuum or CO₂ in Transportable Systems. *International Conference on Alternatives to Methyl Bromide*. Sevilla
- Odell JP 1998. Energetics of Metamorphosis in Two Holometabolous Insect Species: *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae) and *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Experimental Zoology* 280(3):344-353.
- Odeyemi O, Gbaye O, Aborisade A 2004. Mortality of Life Stages of *Carpophilus dimidiatus* (F) Exposed to Carbon Dioxide Atmosphere. *The International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*. 8-13 August, Gold-Coast, Australia,
- Ofuya TI, Reichmuth C 2002. Effect of Relative Humidity on the Susceptibility of *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Bruchidae) to Two Modified Atmospheres. *Journal of Stored Products Research* 38(5): 139-146.
- Öksüztepe G, Erkan S 2016. Mikotoksinler ve Halk Sağlığı Açısından Önemi. *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 5: 190-195.
- Riudavets J, Castane C, Alomar O, Pons MJ, Gabarra R 2009. Modified Atmosphere Packaging (Map) as an Alternative Measure for Controlling Ten Pests That Attack Processed Food Products. *Journal of Stored Products Research* 45(2): 91-96.
- Rodriguez-Del-Bosque LA, Leos-Martinez J, Dowd PF 1998. Effect of Ear Wounding and Cultural Practices on Abundance of *Carpophilus freemani* (Coleoptera: Nitidulidae) and Other Microcoleopterans in Maize in Northeastern Mexico. *Journal of Economic Entomology* 91(4): 796-801.
- Rosi MC, Garbati Pegna F, Nencioni A, Guidi R, Bicego M, Belcari A, Sacchetti P 2019. Emigration Effects Induced by Radio Frequency Treatment to Dates Infested by *Carpophilus hemipterus*. *Insects* 10(9): 273-286.
- Sen F, Meyvaci KB, Turanlı F, Aksoy U 2010. Effects of Short-Term Controlled Atmosphere Treatment at Elevated Temperature on Dried Fig Fruit. *Journal of Stored Products Research* 46(1): 28-33.
- Soderstrom EL, Mackey BE, Brandl DG 1986. Interactive Effects of Low-Oxygen Atmospheres, Relative Humidity, and Temperature on Mortality of Two Stored-Product Moths (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Economic Entomology* 79(5): 1303-1306.
- StatSoft 2004. Statistica (Data Analysis Software System). StatSoft. Inc. Tulsa, USA.
- Storey CL 1975. Mortality of Three Stored Product Moths in Atmospheres Produced by an Exothermic Inert Atmosphere Generator. *Journal of Economic Entomology* 68(6): 736-738.
- Turanlı F 2003. Aydın ve İzmir İllerinde Kuru

- Incirlerde Zararlı Böcek Türlerinin Bulaşıklılık Oranları. Türkiye Entomoloji Dergisi 27(3): 171-180.
- Tutuncu S, Emekci M 2014. The Toxicity of Phosphine Gas to Life Stages of the Dried Fruit Beetle, *Carpophilus hemipterus* (L.) (Coleoptera: Nitidulidae). Turkish Journal of Entomology 38(2): 215-225.
- Tutuncu S, Emekci M 2017. Inhibition of Egg Development by Hypercarbia and Hypoxia in Almond Moth, *Ephestia cautella* (Walker, 1863) (Lepidoptera: Pyralidae). Turkish Journal of Entomology 41(1): 27-41.
- Tutuncu S, Emekci M 2019. Comparative Efficacy of Modified Atmospheres Enriched with Carbon Dioxide against *Cadra* (= *Ephestia*) *cautella*. J. Sci. Food Agric. 99(13): 5962-5968.
- Wong-Corral FJ, Castane C, Riudavets J 2013. Lethal Effects of CO₂-Modified Atmospheres for the Control of Three Bruchidae Species. Journal of Stored Products Research 55: 62-67.
- Yılmaz T, Tütüncü Ş, Toprak U, Emekci M, Ferizli AG 2020. Insecticidal Efficacy of Spinetoram against *Sitophilus zeamais*: Influence of Dose, Exposure Interval and Temperature. Journal of Stored Products Research 89: 101731.
- Zhou S, Criddle RS, Mitcham EJ 2000. Metabolic Response of *Platynota stultana* Pupae to Controlled Atmospheres and Its Relation to Insect Mortality Response. Journal of Insect Physiology 46(10): 1375-1385.

Akdeniz İklim Kuşağında, Sulamadan Dönen Suların Sulamada Kullanılmasının Taban Suyu Kalitesi ve Derinliği Üzerine Etkilerinin Araştırılması: Aşağı Seyhan Ovası Yemişli Sulama Sahası Örneği

Harun KAMAN¹, Mahmut ÇETİN², Sertan SESVEREN³

¹Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü, 07058 Kampüs, Antalya, Türkiye. ²Çukurova Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü, 01330 Balcalı, Adana, Türkiye. ³Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Biyosistem Mühendisliği Bölümü, Avşar Yerleşkesi 46100 Kahramanmaraş, Türkiye.

¹<https://orcid.org/0000-0001-9308-3690>, ²<https://orcid.org/0000-0001-5751-0958>, ³<https://orcid.org/0000-0002-5163-7066>

✉: hkaman@akdeniz.edu.tr

ÖZET

Bu araştırma, Türkiye'nin güneyinde, Aşağı Seyhan Ovası'nda yer alan düşük kota sahip Yemişli sulama sahasında yürütülmüştür. Araştırma alanındaki çiftçiler, sulamadan dönen düşük kaliteli drenaj sularını yüzey sulama yöntemleriyle kullanmaktadırlar. Araştırmada, sulamadan dönen düşük kaliteli suların sulamada kullanılmasının neden olabileceği muhtemel taban suyu seviyesi ve taban suyu kalitesi sorunlarının örneklerle irdelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada, 3 m derinlikteki 55 adet drenaj gözlem kuyusunda ölçülen taban suyu (TS) derinlikleri ve taban suyu tuzluluğu gözlemleri kullanılmıştır. Drenaj gözlem kuyuları, alan üzerine homojen dağılacak şekilde tesis edilmiştir. Kuyulardaki taban suyu derinlik (m) ölçümleri şubat, nisan, temmuz ve eylül aylarında yapılmıştır. Drenaj gözlem kuyularında, derinlik ölçümleri yapılan tarihlerde su örnekleri de alınmış ve laboratuvarında kimi su kalitesi analizleri yapılmıştır. Araştırmada, TS derinliğinin alansal ortalamaları kışın ve yazın hemen hemen aynı (1.14 m) bulunmuştur. Şiddetli drenaj sorunu olan alanlar (TS <1.0 m), şubat ve temmuz aylarında toplam alanın %27'sinden daha fazla dağılım göstermiştir. Yıl boyunca, toplam alanın neredeyse %60'ından daha büyük bir alanda taban suyu derinliği 1.0 ile 1.5 m arasında bulunmuştur. Araştırma alanında, taban suyu ortalama tuzluluğu (EC) 20 dS m⁻¹'den daha büyük değerler almıştır. TS ortalama tuzluluğunun neredeyse Akdeniz'deki tuzluluk değerinin yarısına eşit olduğu belirlenmiştir. Akdeniz'e yakın olan araştırma alanında, düşük topoğrafyanın ve pompajla olan yetersiz drenajın taban suyu kalitesi üzerine olan negatif etkisi ortaya konulmuştur. Drenaj mühendisliği bakımından kritik değer olan EC>5 dS m⁻¹ alanlar, toplam alanın %90'ı ve üzerinde bulunmuştur. TS ortalama SAR değerinin, kritik SAR değerinin (13 (meq L⁻¹)^{0.5}) üzerinde olduğu belirlenmiştir. TS kalite ve kantitesine dair bulgular, drenaj sularının tarımda kullanılmasının negatif etkilerini açıkça ortaya koymuştur. Ortaya çıkan sorunların hafifletilebilmesi için, pompajla drenajın yıl boyunca etkin olarak yapılması; kış yağışlarının seyreltme etkisi için fırsat yaratılması, drenajda düşük topoğrafyanın dikkate alınması ve açık drenajın kapalı drenlerle desteklenmesi; sulama suyunun daha randımanlı sulama yöntemleri ile uygulanması gerekmektedir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihiçesi

Geliş Tarihi : 15.02.2021

Kabul Tarihi : 05.05.2021

Anahtar Kelimeler

Sulama yönetimi

Drenaj

Drenaj gözlem kuyusu

Su tablası

Pompajla drenaj

Investigating the Potential Impacts of Using Irrigation Return Flows on Quality and Quantity of Groundwater in the Mediterranean Landscapes: A Study in Yemisli Irrigation Area of Lower Seyhan Plain, Turkey

ABSTRACT

This study was conducted in Yemisli irrigation area of the Lower Seyhan Plain, the south of Turkey, Adana. Overall, farmers in the study area use IRFs for irrigation with practicing surface irrigation methods characterized by low irrigation efficiency. Objective of this

Research Article

Article History

Received : 15.02.2021

Accepted : 05.05.2021

study was to examine the potential problems regarding groundwater (GW) quality and quantity that may be caused by using IRFs having poor quality in irrigation. In this context, GW depths and qualities were observed in 55 drainage observation wells with the depth of 3 m. Observation wells were installed in the study area with an almost homogeneous distribution. Groundwater depth (m) were recorded in winter (February), autumn (April), peak irrigation season (July) and at end of irrigation season (September). Concurrently, with GW depth observations, GW water samples were taken and certain water quality analyzes were performed in the laboratory. In the study, the areal averages of groundwater depth were surprisingly found almost equally (1.14 m) in winter and summer seasons. Areas of severe drainage problems (GD depth <1.0 m) covered more than 27% of the total area in February and July. On the other hand, more than 60% of the total area had a GW depth varying between 1.0 and 1.5 m, indicating severe drainage problem. Areal mean GW salinity, i.e. EC, was found to be greater than 20 dS m⁻¹. This indicates clearly that average GW salinity is almost equal to the half of salinity value of the Mediterranean Sea. This result indicate that the negative impacts of low topography and insufficient drainage with pumping on GW quality and quantity are incontrovertible in the research area. More than 90% of the area has EC values greater than 5 dS m⁻¹, in terms of drainage engineering principles, known as a threshold value. Furthermore, average groundwater SAR values were found to be above 13 (meq L⁻¹)^{0.5} which is considered as a critical value for sodicity hazard. Research findings have clearly revealed that the use of IRFs of inferior quality has had substantial negative impacts on GW quality and quantity. In order to mitigate the problems that have arisen in the study area, it is essential that drainage pumping units should be run accordingly for ensuring efficient drainage that winter rainfalls may wash out the salts accumulated in the root-zone by facilitating water storage function of root-zone. Low topographical situation of the study area should be considered in drainage and open drainage system should be reinforced with tile drains, that irrigation water should be applied with maximum efficiency.

Keywords

Irrigation management
Drainage
Drainage observation well
Water table
Drainage with pumping

Atıf İçin: Kaman H, Çetin M, Sesveren S 2022. Akdeniz İklim Kuşağında, Sulamadan Dönen Suların Sulamada Kullanılmasının Taban Suyu Kalitesi ve Derinliği Üzerine Etkilerinin Araştırılması: Aşağı Seyhan Ovası Yemışli Sulama Sahası Örneği. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 158-168. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.880516>.

To Cite: Kaman H, Çetin M, Sesveren S 2022. Investigating the Potential Impacts of Using Irrigation Return Flows in Irrigation on the Quality and Quantity of Groundwater in the Mediterranean Landscapes: A Study in Yemışli Irrigation Area of Lower Seyhan Plain, Turkey. KSU J. Agric Nat 25 (1): 158-168. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.880516>.

GİRİŞ

Akdeniz iklim kuşağında, yağışların zaman ve mekan boyutundaki dağılımı düzensizdir. Bu kuşakta yer alan ülkeler, kuraklıktan en çok etkilenen kategoridedir. Yaz aylarında bitkisel üretimi kısıtlayan en önemli faktör, yağış yetersizliğidir. Bu nedenle, Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz iklim zonunda, yaz aylarındaki yağış yetersizliği tarımsal üretimin sulama ile yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Sulama, yüksek tarımsal üretimi güven altına alan son derece gerekli ve önemli bir uygulamadır. Tarımın diğer sektörlerinde olduğu gibi, üretim aşamasında sulama sektöründe de çeşitli sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu sorunların temel

nedeni, toprak-bitki-su ilişkileri arasındaki ortaya çıkan dengesizliktir. Üreticilerin ne zaman, ne kadar ve hangi yöntemle sulama suyu uygulamasının yapılacağı konusunda yeterli bilgi ve deneyime sahip olmamaları, yanlış sulama uygulamalarına yol açmaktadır. Damla ve yağmurlama sulama yöntemlerinin uygulanmasına dair iyi örnekler olmakla birlikte, yetiştiriciler tarafından randımanı düşük ilkel sulama yöntemlerinin kullanımı halihazır durumda oldukça yaygındır. Bu durum, sürdürülebilir sulu tarım için ciddi bir engel oluşturmaktadır. Çünkü sulama randımanı düşük olan sulama yöntemlerinin kullanılması tuzluluk ve alkalilik sorunlarına yol açarak toprakların elden çıkmasına neden

olabilmektedir. Türkiye’de, Akdeniz ikliminin hakim olduğu zon ile güneydoğu Anadolu ve iç Anadolu bölgelerindeki sulama şebeke alanlarında (Çetin ve Özcan, 1999; Cetin, 2020) bu tür sorunlara sıkça rastlanılmaktadır.

Hangi yöntemle olursa olsun, fazla sulama suyu uygulaması taban suyunun yükselmesine yol açmakta; bu durum, iklimin evaporatif gücüne ek olarak yetersiz drenaj koşullarında toprak tuzluluğunu artırmaktadır (Cetin ve Kirda, 2003). Toprakta bitki kök bölgesindeki tuz birikimi, sulama suyu kalitesi yanında kullanılan sulama yöntemleriyle de yakından ilgilidir (Tuzcu ve ark., 1988; Kaman ve ark., 2011a). Yanlış sulama uygulamaları, iyi kaliteli sularla yapılsa dahi, tarım topraklarının tuzlanmasına veya uzun vadede sodyumlaşmasına (alkalileşmesine) bile yol açabilmektedir (Kaman ve ark., 2011b). Amezketa (2006) tarafından da vurgulandığı üzere topoğrafik özellikler, doğal drenaj yapısı, iklim, jeolojik yapı, ana materyal ve denizden uzaklık gibi doğal faktörler de toprak tuzluluğuna neden olmaktadır. Drenaj sorununa ek olarak, taban suyu ve toprak tuzluluğu sulu tarımın sürekliliğini engelleyen ve bitkisel verimi sınırlayan çok önemli bir sorundur. Tuzluluk kontrol altına alınamadığı takdirde, ekilebilir tarım arazilerinin tarım dışında kalma riski daima vardır. Kaman ve ark (2011b) tarafından belirtildiği gibi, tuzluluk nedeniyle tarım alanlarındaki kayıplar her yıl tedrici olarak artmaktadır. Dünyada tarım yapılan alanların %37’si alkali, %23’ü tuzlu ve %40’ı da sorunsuz toprak karakteri göstermektedir. Sürdürülebilir sulu tarım ve sulama yönetimi için taban suyu derinlik ve taban suyu kalitesinin izlenmesi ve değerlendirilmesi gerekmektedir. İzleme ve değerlendirme sonucunda elde edilecek bulgular, alınabilecek önlemlerin türüne ışık tutacaktır (Büyükçangaz ve Değirmenci, 2002). Çünkü, taban suyu seviyesi, taban suyu kalitesi ve toprak tuzluluğu tarım alanlarında üretimi etkileyen en önemli sınırlayıcı faktörler arasında yer alır. Kurak dönemlerde, taban suyu bitki kök bölgesine kadar yükselerek kritik değerlere ulaşıyor ise, taban suyunun sulamalarla beslendiği; dolayısıyla şebeke bazında sulama randımanının düşük olduğu ve sulama yönetiminde de bir sorun olduğu sonucuna varılabilir (DSİ, 1982; Cetin ve Diker, 2003). Taban suyu derinlik ve taban suyu kalitesi, düz ve düze yakın sulu tarım alanlarında 3–4 m derinliğe kadar tesis edilen drenaj gözlem kuyuları kullanılarak izlenip değerlendirilebilir.

Türkiye’nin en büyük sulama alanlarından biri olan Aşağı Seyhan Ovası (ASO); 1942 yılında Seyhan regülatörü, 1956 yılında Seyhan barajının inşaatı ile bölümler halinde kısmen sulamaya açılmış (Çetin ve Özcan, 1999); bir kısım alan halihazır durumda sulamaya açılmamıştır. Sulu tarımın bölgede uygulanmaya başlamasıyla birlikte sulanan ve

sulanmayan alanlarda sulama oranlarının ve randımanlarının düşük olması yanında drenaj, tuzluluk ve alkaliliğe ilişkin sorunlar da meydana gelmeye başlamıştır (Çetin ve Özcan, 1999). Bu problemler, ASO IV. Proje alanında, topoğrafik yetersizliğin tetikleyici etkisi nedeniyle daha yaygın durumdadır (Cetin ve Kirda, 2003; Cetin, 2020). Ele alınan bu araştırma, Türkiye’nin güneyinde Aşağı Seyhan Ovası’nda yer alan pompajla drenajı yapılan ve 7100 ha’ı kapsayan Yemişli sulama sahasında yürütülmüştür. Söz konusu sahada çiftçiler, genel olarak sulama randımanı düşük olan yüzey sulama yöntemleriyle sulamadan dönen düşük kaliteli drenaj sularını kullanmaktadırlar. Bu çalışmada, sulamadan dönen düşük kaliteli suların sulamada kullanılmasının neden olabileceği muhtemel taban suyu seviyesi ve taban suyu kalitesi sorunlarının zaman ve mekan boyutunda irdelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Araştırma alanı ve genel özellikleri

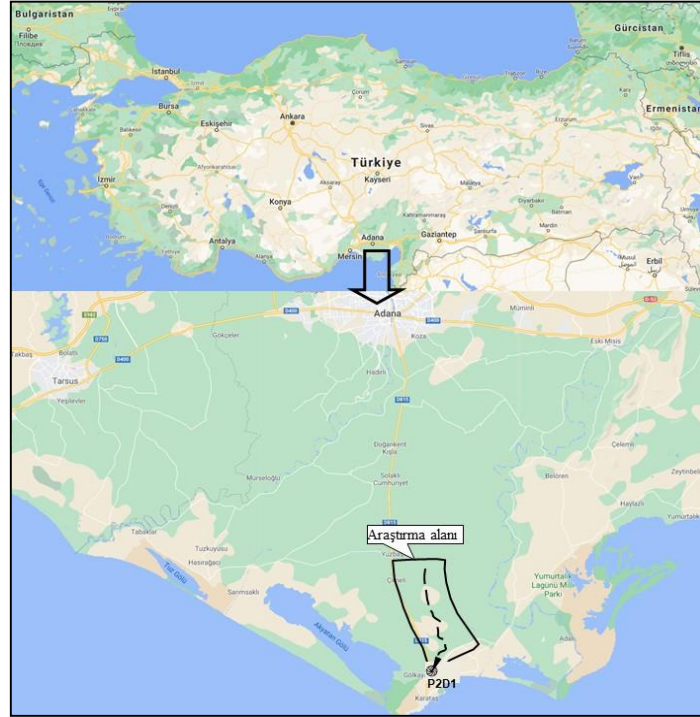
Araştırma, Türkiye’nin güneyinde ve doğu Akdeniz bölgesinde; Adana il sınırları içerisinde yer alan Yemişli sulama sahasında 2008 yılında yürütülmüştür (Şekil 1). Yemişli sulama sahası Aşağı Seyhan Ovası içerisinde olup, topoğrafik yetersizlikleri nedeniyle drenajı pompajla yapılan 7100 ha genişliğindeki verimli tarım arazilerinden oluşmaktadır. Araştırma alanı coğrafi olarak 36° 43' 32" ve 36° 38' 07" N enlemleri ile 35° 20' 08" ve 35° 27' 12" E boylamları arasında yer almaktadır.

Akdeniz ikliminin hüküm sürdüğü araştırma alanında yazlar sıcak ve kurak, kışlar ılık ve yağışlıdır. Araştırma alanına en yakın (11 km) meteoroloji istasyonu Karataş ilçesinde bulunmaktadır (Şekil 1). Karataş meteoroloji istasyonunun uzun yıllar (1960-2020) sıcaklık ortalaması 18.8 °C’dir. Ağustos ayı 28.1 °C ile en sıcak ay iken, 9.9 °C ile ocak ayı en soğuk aydır. Yağışların tamamına yakını kış aylarında ve yağmur olarak düşmektedir. Yıllık ortalama yağış 649.5 mm’dir. Ancak yağışların yıl içerisinde dağılımı türdeş değildir. Oransal nem genellikle yaz aylarında sıcaklığın artması ve tarım arazilerinde sulama yapılması nedeniyle yüksek değerlere (%80-95) çıkmakta, kış aylarında ise düşüş göstermektedir.

Yemişli Sulama sahası, *Aşağı Seyhan Ovası IV. Merhale Projesi* kapsamında inşa edilmiş ve işletmeye açılmış olan P2D1 drenaj kanalı servis alanı içerisinde yer almaktadır. Araştırma alanı kapalı havza karakteri göstermekte olup, havzanın çıkışında Şekil 1’de gösterildiği gibi P2D1 drenaj pompa istasyonu bulunmaktadır. Dinç ve ark. (1988) tarafından bildirildiğine göre, araştırma alanında Helvacı toprak serisi yaygındır; topraklar, Seyhan nehrinin taşıdığı sedimentin delta tabanı çukurlarında depolanması sonucu oluşan alüvyal materyallerden oluşmuştur.

Mevcut durumda, sulama açısından toprak geçirgenliğinin düşük olması ortaya çıkan en önemli sınırlamadır. Diğer taraftan, araştırma alanındaki çiftçilerin büyük çoğunluğu ana drenaj kanalı boyunca

ve kanalın kollarından sahaya saptırılan sulamadan dönen düşük kaliteli suları sulama amaçlı kullanmaktadırlar.



Şekil 1. Çalışma alanının Türkiye'deki yeri ve Adana iline göre konumu.
Figure 1. Geographical location of the study areas in Turkey and Adana province.

Araştırma alanı sulama suyu genel özellikleri

Araştırma alanı, çıkış ağız koşulları nedeniyle yetersizlik göstermektedir. Bu nedenle araştırma sahası küvet şeklinde bir alandır. Bu özelliğinden dolayı, pompajla drenaj sağlanmaktadır. Saha, ASO sulama projesinin mansabında kaldığından, sulama şebekesi tesis edilmemiş olup şebeke harici alan olarak değerlendirilmektedir. Araştırma alanının membasında yer alan ve sulama suyuna kavuşmuş olan arazilerin drenaj suları araştırma alanı içinden geçmektedir. Araştırma alanında bulunan çiftçilerin sulama yapabileceği başka bir su kaynağı olmadığından, sulamadan dönen suları sulama suyu olarak kullanmaktadırlar. Bu nedenle, araştırma alanının tamamı, sulamadan dönen sularla sulanmaktadır.

Drenaj kanalları üzerindeki 7 farklı noktadan araştırma alanına drenaj suyu saptırılmaktadır. Saptırılan bu drenaj sularının elektriksel iletkenlik, TDS ve SAR değerleri farklılıklar göstermektedir. Bu suların ortalama elektriksel iletkenliği 1.20 dS m^{-1} olup minimum ve maksimum EC değerleri $0.83-3.10 \text{ dS m}^{-1}$ arasında değişmektedir. Suların SAR değerleri düşük olup ortalaması 2.4, minimum ve maksimum değerleri sırasıyla 1.11 ve 8.04 bulunmuştur. ABD tuzluluk laboratuvarı sulama suyu kalitesi sınıflandırma standartları esas alındığında, araştırma alanında kullanılan sulama sularının ortalama

değerler dikkate alındığında C3S1 sınıfında olduğu belirlenmiştir. Bu suların yüksek tuzlu sulama suları sınıfında olduğu tartışmasızdır. Zira, sulama sularının TDS değerleri ortalama 953 mg L^{-1} olup, $640-1815 \text{ mg L}^{-1}$ arasında değişim göstermektedir.

Araştırma alanı genel bitki deseni karakteri

Araştırma alanı Türkiye'de çok sayıda değişik türden bitkisel üretimin en yoğun olarak yapıldığı sulu tarım alanlarından biridir. Aşağı Seyhan Ovası'nda 1964 yılında pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) bitkisi en fazla ekim oranı ile birinci sırada yer almıştır (Çizelge 1). Çizelge 1'deki veriler, araştırma alanının önemli bir tarımsal üretim potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ancak; 1990'lardan sonra pamuk (*Gossypium hirsutum* L.) ekim oranında azalma ile birlikte birinci ve ikinci ürün mısır (*Zea mays* L.) ekim oranında önemli artışlar kaydedilmiştir. Yörede, kış aylarında buğday ekimi en yaygın olan bitki olup, kış sezonunda yetiştirilen buğday (*Triticum* spp) kış ve bahar yağışlarının genel olarak yeterli olması nedeniyle sulanmamaktadır. Ancak, yaz sezonunda tarımı yapılan pamuk (*Gossypium hirsutum* L.), mısır (*Zea mays* L.), karpuz (*Citrullus vulgaris*) ve diğer bitkiler randımanı düşük yüzey sulama yöntemleriyle sulanmaktadır. Karık sulama, en yaygın yüzey sulama yöntemidir.

Table 1. Temporal changes in cropping pattern (%) in the Lower Seyhan Plain (1964-2000) covering the research area (Kaman et al., 2017).

Çizelge 1. Araştırma alanını içine alan Aşağı Seyhan Ovası'nda (1964-2000) ürün desenindeki zamansal değişimler (%) (Kaman ve ark., 2017).

| Yetiştirilen bitkiler | Yıllar | | | | |
|-----------------------|--------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 1964 | 1974 | 1985 | 1995 | 2000 |
| Buğday | – | 0.6 | 2.9 | 1.0 | 0.04 |
| Sebze | – | 0.3 | 1.1 | 2.0 | 2.82 |
| Kavun ve Karpuz | – | 0.6 | 7.4 | 5.0 | 4.66 |
| Pamuk | 94 | 96.5 | 50.3 | 35.0 | 9.98 |
| Birinci ürün Mısır | – | 0.1 | 9.0 | 40.0 | 56.43 |
| İkinci ürün Mısır | – | – | – | – | 5.22 |
| Narenciye | 1.0 | 1.0 | 2.7 | 10.0 | 11.28 |
| Meyveler | 2.0 | 0.4 | 5.9 | 6.0 | 4.58 |
| Soya Fasulyesi | – | – | 17.6 | – | 1.44 |
| Yerfıstığı | – | – | – | – | 0.85 |
| Soğan ve Sarımsak | – | – | – | – | 0.59 |
| Yonca | – | – | – | – | 0.04 |
| Pirinç | 1.0 | 0.4 | 1.4 | – | – |
| Diğerleri | 2.0 | – | 1.7 | 1.0 | 2.07 |
| TOPLAM | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

Taban suyu derinliği örnekleme

Araştırma alanı toprakları, yaklaşık 40 yıldan fazla süredir sulanmasına rağmen sulama ve drenaj alt yapısı tamamlanmamıştır. Sulama suyu, drenaj kanallarından sağlanmaktadır. Buna karşın, bu araştırmada elde edilen taban suyu verileri hariç, alanın taban suyu kalite ve kantitesine yönelik bir bilgi elde edilememiştir. Bu nedenle, araştırma alanının sulama, taban suyu derinliği ve tuzluluğu ile ilgili yeterli bilgi mevcut değildir. ASO IV. Merhale Projesi Planlama Drenaj Raporunda (DSİ, 1982), araştırma alanı ve çevresinde sulama randımanının düşük olduğu bildirilmiştir. Drenaj kanallarından sağlanan düşük kaliteli sulama suyu ile yapılan sulamalar sonucu ortaya çıkan drenaj sorununu ortaya koymak ve taban suyu kalitesinin zamansal değişimlerini belirlemek için derinlikleri 3-4 m arasında değişen 55 adet drenaj gözlem kuyusu tesis edilmiştir (Şekil 2). Drenaj gözlem kuyuları gözleme alınarak taban suyu (TS) derinliği ve TS tuzluluğu izlenmiştir.

Gözlem kuyuları yerlerinin seçiminde drenaj kanallarının konumları, sulama şekli ve yönü, arazideki bitki türleri ve dağılımları, toprak özellikleri ile ulaşılabilirlik gibi temel faktörler göz önüne alınmıştır. Çalışma alanındaki drenaj gözlem kuyularının koordinatları GPS ile Datum=ED50 baz alınarak UTM olarak yerinde belirlenmiştir. Konum belirlenmesinde, Magellan Explorist 600 Reference Manual (Thales, 2005)'da verilen bilgiler kullanılmıştır. TS gözlem kuyularındaki taban suyu derinliği (m) gözlem ve ölçümleri Cetin ve Diker (2003)'de belirtilen esaslara göre yapılmıştır. TS derinliği ve kalite gözlemleri; yağış ve sulamalar dikkate alınarak şubat, nisan, temmuz ve eylül

aylarında olmak üzere yılda dört farklı dönemi içerecek şekilde yapılmıştır.

Taban suyu kalitesi analizleri

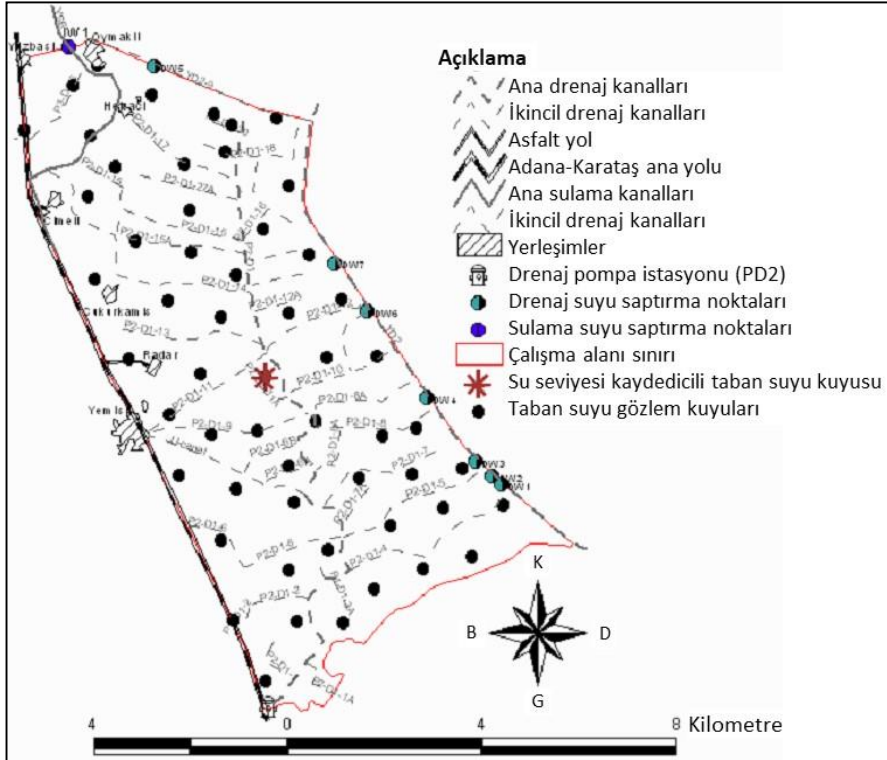
TS derinliği ölçümü esnasında gözlem kuyularından su örnekleri de alınarak laboratuvarında EC, katyon (Ca, Mg, Na, K) ve anyon (Cl, CO₃, HCO₃ ve SO₄) analizleri Richards (1954)'te verilen yöntemlere uygun olarak yapılmıştır. Alınan su örneklerinin sodyum adsorpsiyon {SAR, (meq L⁻¹)^{0.5}} ve suda çözülmüş toplam eriyebilir maddeler (TDS, g L⁻¹) Said ve ark. (2021)'e göre hesaplanmıştır.

Taban suyu nicelik ve niteliklerinin haritalanması

Ölçülen TS elektriksel iletkenliği (EC, dS m⁻¹), hesaplanan taban suyundaki toplam çözülmüş tuzlar (TDS, g L⁻¹) ile taban suyu SAR {(meq L⁻¹)^{0.5}} değerleri Cetin ve Diker (2003), Ritzema ve ark. (1996) ve Keckler (1995)'te belirtildiği şekilde coğrafi bilgi sistemi (ArcView 3.0a GIS) (ESRI, 1996) ortamında haritalanmıştır. Bu haritaların zonal istatistikleri kullanılarak, değişkenlerin kapladığı alanlar ve oranları (%) Cetin ve Diker (2003)'teki gibi hesaplanmış ve çizelgeler halinde sunulmuştur.

BULGULAR ve TARTIŞMA

Bu araştırmada, Yemişli sulama sahasında sulamadan dönen düşük kaliteli suların sulamada kullanılmasının taban suyu kalitesi ve taban suyu derinliği üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Bu bağlamda, sadece taban suyu derinliği ve taban suyunun kimi kalite özelliklerinin (EC, TDS ve SAR) mekansal ve zamansal dağılımları değerlendirilmiştir.



Şekil 2. Yemişli Sulama Birliği sahasında taban suyu gözlem kuyuları ve su saptırma yerleri (Kaman ve ark., 2011a).

Figure 2. Groundwater observation wells and water diversion sites in the Yemişli ID (Kaman et al., 2011a).

Taban suyu derinliği analiz sonuçları

Coğrafi bilgi sistemleri (CBS) ortamında ters uzaklık enterpolasyon (IDWI) yöntemi uygulanarak üretilen TS derinlik haritalarının zonal istatistikleri yardımıyla taban suyu derinliğinin alansal ortalamaları elde edilmiştir. TS derinliği alansal ortalamaları, kış mevsiminde (şubat ayında) ve yazın (temmuz ayında) hemen hemen aynı (1.14 m) bulunmuştur (Çizelge 2). Çizelge 2'den açıkça görülebileceği gibi, sulama mevsimi sonunda (eylül-

ekim aylarında) alansal ortalama taban suyu derinliği 1.41 m elde edilmiştir. Bu değer, çalışma alanındaki taban suyu derinliğinin sulama mevsimi sonunda diğer aylara kıyasla daha derinlere düştüğüne işaret etmektedir. Bunun temel nedeni, sahada genellikle pamuk ekimi yapılması ve pamuk sulamalarının ağustos ayı itibari ile tamamlanmasıdır. Dolayısıyla, alana sulama suyu saptırılmadığından, TS derinliği kök bölgesinin altına doğru düşme eğilimine girmektedir.

Table 2. Areal coverages (%) of groundwater depths (m) in Yemişli ID.

Çizelge 2. Yemişli sulama sahasında farklı taban suyu derinlikleri (m) ve alansal dağılımları (%).

| Zaman | Taban suyu derinliği (m) Alansal ortalamalar ve standart sapmaları | Kapladığı alan (%) | | | |
|-----------|---|--------------------|---------|---------|------|
| | | <1.0 | 1.0-1.5 | 1.5-2.0 | 2.0< |
| Şubat/08 | 1.14±0.26 | 27.5 | 66.6 | 5.5 | 0.4 |
| Nisan/08 | 1.30±0.22 | 4.5 | 77.3 | 17.3 | 0.9 |
| Temmuz/08 | 1.14±0.23 | 28.7 | 66.2 | 4.4 | 0.7 |
| Eylül/08 | 1.41±0.25 | 3.2 | 59.4 | 36.4 | 1.0 |

Araştırma alanında, şiddetli drenaj sorunu olan alanlar (TS derinliği<1.0 m), şubat ve temmuz aylarında toplam alanın yaklaşık %27'sinin üzerinde gerçekleşmiştir. Buradan anlaşılacağı gibi, araştırma alanında kışın yağışlardan yaz mevsiminde ise sulama

uygulamalarından kaynaklı drenaj sorunu yaşanmaktadır. Öte yandan, araştırma alanının %4.5'inde sulama mevsiminin başlangıcında (nisan ayında) ve %3.2'inde sulama mevsimi sonunda (eylül ayında) şiddetli drenaj sorunu gözlenmiştir. TS

derinliğinin yıl boyunca 1.0-1.5 m arasında dalgalanma gösterdiği alanlar arazinin %59-%77'sini oluşturmuştur. Dolayısıyla, araştırma alanının, %60'ından daha fazla bir kesiminde drenaj sorunu saptanmıştır. Taban suyu derinliği bakımından, en risksiz dönemin sonbahar olduğu sonucuna varılmıştır. Bu durum, yağışın ve sulama suyunun çalışma sahasında taban suyu derinliği üzerine ciddi anlamda olumsuz etki ettiğini göstermektedir. Arazinin düşük topoğrafyada olması nedeniyle doğal drenaj hızının yetersiz olduğu açıktır. Ancak, araştırmaya konu olan 7100 ha'lık sahada drenajın pompajla yapıldığı dikkate alındığında, pompaj programının arazideki TS derinliğini istenilen düzeylere getirecek şekilde yapılmadığı ya da açık drenaj sisteminin etkin çalışmadığı sonucuna varılmaktadır.

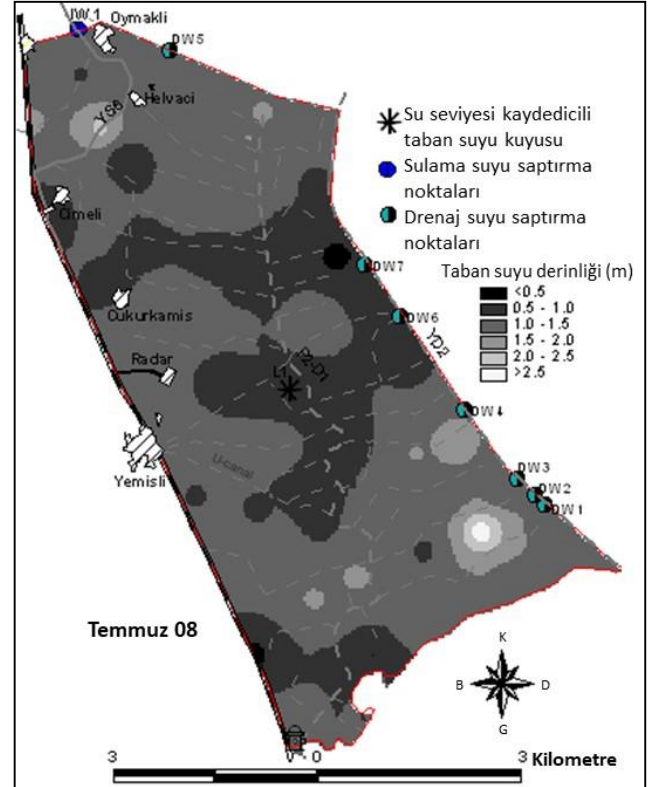
Demir ve Antepli (2004) tarafından da belirtildiği gibi araştırmanın yürütüldüğü Çukurova yöresinde sulama suyu kullanımı temmuz ayında en yüksek değerlere ulaşmaktadır. Araştırmada elde edilen bulgular, Çetin ve ark. (2007; 2008) ve Demir ve Antepli (2004)'de verilen bulgularla benzerlik göstermiştir. Araştırma alanında kullanılan sulama suyunun (sulamadan dönen su: drenaj suyu) elektriksel iletkenliği $EC=1.2-4.0 \text{ dS m}^{-1}$ arasında değişmektedir. Bu kalitedeki drenaj suları sulamada kullanıldığında, drenaj sorunu yanında TS kalitesindeki bozunmanın da izlenmesi ve alınacak önlemlerde su kalitesi unsurunun da dikkate alınması kaçınılmaz olacaktır. Çünkü, Kaman ve ark. (2011a) tarafından işaret edildiği gibi, bu tür suların kullanılmasının çevre üzerine bir takım negatif etkileri olmaktadır. Tarım alanlarında toprakların alkalileşmesi ve düşük geçirgenlik istenmeyen en belirgin yan etkiler arasındadır.

Sulamanın en yüksek olduğu temmuz ayında, taban suyu derinliklerinin alan üzerindeki değişimi Şekil 3'te verilmiştir. Bu haritada, taban suyu derinliğinin 0.0-1.0 m arasında olduğu şiddetli drenaj problemi olan alanlar, topoğrafik olarak en çukur konumlarda yer almaktadır. Bu harita, kapalı havza karakterindeki drenajı pompajla yapılan sahalarda mikro topoğrafyanın önemini açıkça göstermektedir. Çimlenme probleminin yaşanmaması için, uygulanacak ekim-dikim tekniğinde bu duruma dikkat edilmesi gerekmektedir. Arazideki doğal eğim 0.0001-0.0008 arasında değiştiğinden, doğal drenaj kısıtlanmıştır. Pompajla yapılacak olan drenaj, hidrolik eğimin artırılmasını sağlayan tek çare olmaktadır. Optimal ürün eldesi için, taban suyunun bitki kök bölgesi altında tutulması gerektiğinden, Şekil 3 irdelendiğinde, araştırma alanının pompajla drene edilmesi zorunlu olmaktadır.

Taban suyu kalitesi analiz sonuçları

Taban suyu gözlem kuyularından alınan su

örneklerinin elektriksel iletkenlik ($EC, \text{dS m}^{-1}$) ölçümleri CBS ortamında değerlendirilerek haritalanmıştır. Şubat, nisan, temmuz ve eylül ayları için taban suyu tuzluluğunun bir göstergesi olan elektriksel iletkenlik haritaları üretilmiştir. Bu haritalar, TS tuzluluğunun çok yüksek değerler aldığı ve arazi üzerindeki değişkenliğinin yüksek olduğuna işaret etmiştir.



Şekil 3. Araştırma alanında, sulamanın en yoğun olduğu temmuz ayında taban suyu derinliğinin (m) mekansal dağılımı.

Figure 3. Spatial distribution of GW depths in the research area, i.e. Yemisli ID, in July.

Alansal ortalama EC değerleri (dS m^{-1}) dikkate alındığında, TS elektriksel iletkenliğinin her zaman 20 dS m^{-1} 'in üzerinde olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3). Söz konusu değerler, kritik taban suyu tuzluluk değerinin (5 dS m^{-1}) en az dört katına eşit ya da bundan daha büyük olduğunu göstermektedir. Yıl boyunca taban suyu tuzluluk riski olmayan alanlar, toplam alanın %10'undan daha az bir orana sahiptir. Diğer bir ifadeyle, toplam alanın yaklaşık %90'ı ve üzerindeki alanlarda taban suyu tuzluluğu aşırı yüksek değerler almıştır. Bu durum, TS tuzluluğunun oldukça konsantre olduğuna işaret etmektedir. Bu nedenle, araştırma alanında TS derinliğinin daima bitki kök bölgesi altında tutulmasına yönelik bir strateji izlenmesi gerekmektedir. Bu işe, etkin bir pompaj programının devreye sokulmasıyla mümkün olabilecektir.

Table 3. Areal coverages (%) with groundwater EC (dS m⁻¹) values in Yemisli ID.

Çizelge 3. Yemişli sulama sahasında taban suyu elektriksel iletkenliği (EC, dS m⁻¹) değerleri ve kapladığı alanlar (%).

| Zaman | Taban suyu tuzluluğu (EC, dS m ⁻¹) Alansal ortalamalar ve standart sapmaları | Kapladığı alan (%) | | | | | |
|-----------|---|--------------------|-----|-----|------|-------|------|
| | | <2 | 2-3 | 3-5 | 5-10 | 10-30 | 30< |
| Şubat/08 | 21.81±15.36 | 0.0 | 0.3 | 1.8 | 14.3 | 62.8 | 20.7 |
| Nisan/08 | 19.80±13.46 | 0.7 | 1.5 | 4.1 | 17.7 | 55.1 | 20.9 |
| Temmuz/08 | 22.24±16.45 | 1.5 | 1.9 | 4.3 | 18.9 | 48.0 | 25.3 |
| Eylül/08 | 21.88±15.98 | 1.8 | 2.2 | 5.7 | 16.0 | 51.1 | 23.2 |

Akdeniz bölgesindeki kış yağışlarının sulu tarım alanlarındaki tuzluluk kontrolünde etkin olduğu ifade edilmektedir (Çetin ve Özcan, 1999). Ancak, Çizelge 3'ten açıkça görüleceği gibi, bu beklenti araştırma alanında karşılanamamış; yağışların kış ve ilkbaharda taban suyu tuzluluğu üzerinde seyreltme etkisi olmamıştır. Bunun temel nedeni, kış yağışları öncesinde pompa istasyonunun devreye sokularak taban suyunun düşürülmemesi; dolayısıyla, yıkama için toprakta yeterli su depolamam rezervinin oluşturulamamasıdır. Ancak, yaz aylarında sulama amaçlı drenaj hendeklerinden su çekilmesi taban suyu akımında bir sirkülasyon meydana getirmektedir. Bunun sonucunda da çiftçiler tarafından sulamada düşük kaliteli (EC>1.2 dS m⁻¹) suların kullanılmasıyla taban suyu düzeyi yükselmekte, TS tuzluluğunda hafif bir seyreltme etkisi gözlenmektedir. Çünkü drenaj hendeklerinden sulama suyu alındığında ya da pompajla drenaj sağlandığında, memba arazilerin drenaj suları bu hendeklere akarak taban suyuna kıyasla daha kaliteli olan drenaj suları araştırma alanına akmaktadır.

Çizelge 3'de verilen TS tuzluluk değerleri ve alanları değerlendirildiğinde, TS kalitesinde ciddi bir bozuluma olduğu açıktır. Sulamada kullanılan su kaynağının ortalama tuzluluğu (EC) 1.2–4.0 dS m⁻¹ olduğu göz önüne alınırsa taban suyunun sulama suyu tuzluluğunun en az on (10) katı, bazı bölgelerde kırk (40) katı oranında konsantre hale geldiği söylenebilir. Çetin ve Özcan (1999) tarafından yapılan bir araştırmada, ASO'da sulama şebekesi olmayan alanlarda bu tür sorunların ortaya çıkabileceği ifade edilmiştir. DSİ (1982)'de, araştırma alanını da içine alan ASO IV. Merhale Proje alanlarında, Akdeniz'in tuzluluğunun iki katına eşit olan (≈120 dS m⁻¹) yüksek taban suyu tuzluluğu gözlemlendiği rapor edilmiştir.

Araştırma alanındaki taban suyu ortalama tuzluğu, 20 dS m⁻¹'den daha büyük değerler almıştır (Çizelge 3). Tuzluluğun 30 dS m⁻¹'den daha büyük olduğu alanlar araştırma alanının %25'inden daha fazla bir alanda yıl boyunca etkili olmuştur. Böylece, taban suyu ortalama tuzluluğunun neredeyse Akdeniz'in deniz suyu tuzluluk değerinin yarısına denk olduğu ortaya çıkmıştır. Bunun temel nedeni, arazinin çukur topoğrafyası ve doğal drenajın topoğrafik yetersizlik nedeniyle kısıtlanmış olmasıdır. Bu nedenle,

araştırma alanının drenajının pompajla yapılması kaçınılmaz olmaktadır. Bir başka açıdan değerlendirildiğinde; araştırma alanının %90'ından daha fazla bir alandaki TS tuzluluğu, drenaj mühendisliği bakımından kritik değer (DSİ, 1982; Çetin ve Özcan, 1999; Cetin ve Kirda, 2003; Cetin ve Diker, 2003) olarak kabul edilen EC=5 dS m⁻¹ değerinden daha büyük değerler almıştır (Çizelge 3).

TS kalitesine yönelik olarak yapılan değerlendirmelerde, EC değerlerinin yanında taban suyundaki çözünmüş toplam tuzların (TDS) da irdelenmektedir. Araştırma alanında, taban suyundaki TDS'nin alansal ortalama değerleri yıl boyunca 13 g L⁻¹'in üzerinde bulunmuştur (Çizelge 4). Taban suyunda toplam çözünmüş tuzların değeri oldukça yüksek ve kritik sınırların üzerinde olmasına rağmen, en düşük değerler sulama mevsiminin başlangıcında gözlenmiştir. Araştırma alanının %53'ünden daha fazla bir alanda TS TDS değeri >10 g L⁻¹ saptanmıştır. Bu değer, Akdeniz'in deniz suyu tuzluluğunun neredeyse üçte birine eşittir. Ayrıca, araştırma alanının %13.6'sında şubat ayı TDS değerleri Akdeniz'in deniz suyu tuzluluğu olan 30 g L⁻¹ değerinden daha büyük değerler almıştır. Bu değerler, araştırma alanındaki drenaj yetersizliği açık bir şekilde ortaya koymaktadır. Bu sorunların giderilebilmesi için: a) Çiftçilere iyi kalitede sulama suyu sağlanması, b) Sulama suyunun, randımanı yüksek sulama yöntemleriyle uygulanması, c) Kapalı dren sistemiyle desteklenmiş etkin bir "açık derin drenaj sistemi"nin devreye sokulması, d) Pompajın kış yağışları ve sulamalara göre planlanıp uygulanması gerekmektedir.

Tarım alanlarında, taban suyu tuzluluğu yanında suyun sodyum içeriğinin, dolayısıyla SAR değerlerinin de irdelenmesi yararlı olmaktadır. Bu bağlamda bir değerlendirme yapıldığında, araştırma alanındaki TS örneklerinin SAR değerlerinin de oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Taban suyundaki SAR değerleri, temmuz ve eylül aylarında benzer bir dağılım göstermiştir (Çizelge 5). Ancak, şubat ve nisan aylarındaki SAR değerleri birbirinden oldukça farklı bulunmuştur. Taban suyu ortalama SAR değerleri araştırma süresince, Said ve ark. (2021) tarafından belirtilen kritik SAR değerinin {13 (meq L⁻¹)^{0.5}} üzerinde saptanmıştır (Çizelge 5).

Table 4. Areal coverage (%) with groundwater TDS (g L^{-1}) values in the study area.

Çizelge 4. Çalışma alanında taban suyunda toplam çözünmüş tuzluluk (TDS, g L^{-1}) değerleri ile kapladığı alanlar (%).

| Zaman | Toplam çözünmüş tuzlar (TDS, g L^{-1}) | | | | |
|-----------|--|------|------|-------|------|
| | Alansal ortalamalar ve standart sapmaları | <5 | 5-10 | 10-30 | >30 |
| Şubat/08 | 17.83±12.95 | 4.6 | 24.6 | 57.2 | 13.6 |
| Nisan/08 | 13.20±9.10 | 15.0 | 31.8 | 47.4 | 5.8 |
| Temmuz/08 | 14.33±11.12 | 19.8 | 23.7 | 47.4 | 9.1 |
| Eylül/08 | 14.95±11.27 | 15.9 | 24.6 | 47.8 | 11.7 |

Table 5. Areal coverage (%) with different groundwater SAR values in the research area.

Çizelge 5. Araştırma alanında taban suyunda SAR değerleri ve alansal dağılımı (%).

| Zaman | Taban suyunda SAR | | | | | |
|-----------|---|-----|-----|------|-------|------|
| | Alansal ortalamalar ve standart sapmaları | <3 | 3-6 | 6-13 | 13-20 | 20< |
| Şubat/08 | 25.45±10.02 | 0.1 | 0.4 | 8.7 | 23.6 | 67.3 |
| Nisan/08 | 19.33±9.35 | 0.8 | 3.7 | 24.8 | 25.7 | 45.1 |
| Temmuz/08 | 22.71±10.80 | 0.9 | 4.1 | 12.3 | 28.7 | 54.1 |
| Eylül/08 | 21.15±9.45 | 0.9 | 4.0 | 14.4 | 25.9 | 54.8 |

Araştırmada, SAR değerinin $20 (\text{meq L}^{-1})^{0.5}$ ve daha büyük olduğu alanlar sahasının %45-%67'i arasında değişim göstermiştir. Anlaşılacağı üzere, araştırma alanının en %50'sinde TS SAR değeri $>20 (\text{meq L}^{-1})^{0.5}$ 'dir. Bu değer, Akdeniz'in deniz suyu ortalama SAR değerinin neredeyse %40'ına eşittir. Bu değerlendirmeler, araştırma alanındaki TS tuzluluğu ve SAR değerlerinin normal bir tarım alanında beklenen değerlere (FAO, 2001; Cetin ve Kirda, 2003; Demir ve Antepli, 2004; Çetin ve ark., 2008) kıyasla oldukça yüksektir. Araştırma alanında, gelecekte daha şiddetli düzeylerde düşük toprak geçirgenliği beklenmelidir. Ayrıca, TS SAR değerlerinin topraklardaki alkaliliği arttıracığı unutulmamalıdır. Değinilen bu hususların, tarımsal bakımdan zayıf çimlenme oranları yanında, ürün verim ve kalitesinde de düşüşleri beraberinde getirmesi beklenmelidir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu araştırmadan elde edilen bulgular doğrultusunda ulaşılan sonuçlar ve öneriler şöyle özetlenebilir:

Taban suyu derinliğinin 1 m'den daha az olan alanlar şiddetli drenaj sorunu olan alanlar olarak bilinmektedir. Araştırmada, şiddetli drenaj sorunu olan alanlar şubat ve temmuz aylarında toplam alanın yaklaşık %27'si ve üzerindeki bir alanda gerçekleşmiştir. Öte yandan, sulama mevsiminin başlangıcında (nisan ayında) alanın %4.5'inde ve sulama mevsimi sonunda (eylül ayında) ise alanın %3.2'sinde şiddetli drenaj sorunu gözlenmiştir.

Araştırma alanının %60'ından daha büyük bir alanda, TS derinliği yıl boyunca 1.0 ile 1.5 m arasında değişim göstermiştir. Diğer bir ifadeyle, toplam alanın yaklaşık %60'ından daha fazlasında yıl boyunca drenaj sorunu tespit edilmiştir. Özellikle topoğrafik bakımdan çukur olan alanlarda, drenaj sorunu şiddetlenmiştir.

Araştırma alanında, TS tuzluluğu yüksek değişkenlik tavrı göstermiştir. Alansal ortalama EC değerleri (dS m^{-1}), tüm örnekleme dönemlerinde $>20 \text{ dS m}^{-1}$ bulunmuştur. Söz konusu değerler, kritik taban suyu tuzluluk değerinin (5 dS m^{-1}) en az dört katına karşılık gelmektedir. Taban suyu tuzluluk riskinin bulunduğu alanların, araştırma alanının %90'nından daha fazlasını oluşturduğu belirlenmiştir.

Araştırma alanında, taban suyunda toplam çözünmüş tuzların (TDS) alansal ortalama değerleri yıl boyunca 13 g L^{-1} 'in üzerinde bulunmuştur. Taban suyu TDS değerleri oldukça yüksek ve kritik sınırların üzerinde kaydedilmiştir. Araştırma alanın %53'ünden daha fazlasında taban suyu TDS değerlerinin 10 g L^{-1} 'den fazla olduğu saptanmıştır. Çalışma alanının %13'ünden daha büyük bir kısmında, şubat ayında Akdeniz'in deniz suyu tuzluluğuna eşit olan 30 g L^{-1} 'den daha büyük TDS elde edilmiştir.

Taban suyu sodyum zararı (SAR) etkisi göz önüne alındığında, araştırma alanındaki taban suyu SAR değerleri kritik değerin üzerinde bulunmuştur. Taban suyundaki SAR değerleri, temmuz ve eylül aylarında benzer bir dağılım göstermiş; şubat ve nisan

aylarındaki SAR değerleri birbirinden farklı tavrı göstermiştir.

Düşük kaliteli su kaynaklarının tarımda kullanılması, taban suyu elektriksel geçirgenliğinin aşırı yükselmesine; SAR değerlerinin kritik değerlerin oldukça üstüne çıkmasına neden olmuştur. Drenaj sularının, randımanı düşük olan sulama yöntemleriyle kullanılması TS kalite ve kantitesi üzerine olumsuz etki yapmıştır. Topoğrafik yetersizlikler ve uygun olmayan drenaj pompaj programı, araştırma alanındaki taban suyu kalitesi ve derinliğindeki bozunmayı hızlandırmış; kış yağışlarının beklenen yıkama etkisini engellemiştir.

Özetlenen sorunların giderilebilmesi için: a) Çiftçilere iyi kalitede sulama suyu sağlanması, b) Sulama suyunun, randımanı yüksek sulama yöntemleriyle uygulanması, c) Kapalı dren sistemiyle desteklenmiş etkin bir "açık derin drenaj sistemi"nin devreye sokulması ve sürekli işlevsel kılınması, d) Pompajın kış yağışları ve sulamalar ile ürünlerin yetiştirme dönemlerine uygun olarak planlanıp uygulanması gerekmektedir.

Araştırma alanında kullanılan sulama suyunun drenajdan sağlandığı dikkate alındığında, toprakta tuz birikimi riski yüksektir. Tarımsal üretimin sürdürülebilirliği göz önüne alındığında, yaz aylarında tuzluluğa nispeten daha dayanıklı olan mısır ve pamuk bitkilerinin; kış aylarında ise arpa vb. bitkilerinin yetiştirilmesi önerilmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu araştırma, Avrupa Birliği 6. Çerçeve Programı kapsamında QUALIWATER: Diagnosis and Control of Salinity and Nitrate Pollution in Mediterranean Irrigated Agriculture isimli proje (Proje No: INCO-CT-2005- 015031) ve Çukurova Üniversitesi Katılımlı Araştırma Projesi (Proje No: ZF2006KAP1) ile finanse edilmiştir. Hakkın rahmetine kavuşan Sayın Prof. Dr. Cevat KIRDA Hocamıza, QUALIWATER projesindeki katkıları ve emekleri için sonsuz şükranlarımızı 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

Amezket E 2006. An Integrated Methodology for Assessing Soil Salinization, a Pre-condition for Land Desertification. Journal of Arid Environments 67: 594-606.

Büyükcangaz H, Değirmenci H 2002. Drenaj Sularının Sulamada Yeniden Kullanılması. Su Havzalarında Toprak ve Su Kaynaklarının Korunması, Geliştirilmesi ve Yönetimi Sempozyumu, 18-20 Eylül 2002, Antakya.

Cetin M 2020. Agricultural Water Use. In: N. B. Harmancioglu, D. Altinbilek (eds.), Water Resources of Turkey, Chapter 9, World Water Resources, Springer Nature Switzerland AG 2020, Vol. 2: 257-302.

Cetin M, Diker K 2003. Assessing Drainage Problem Areas by GIS: A Case Study in the Eastern Mediterranean Region of Turkey. Irrigation and Drainage 52: 343-353.

Cetin M, Kırdı C 2003. Spatial and Temporal Changes of Soil Salinity in a Cotton Field Irrigated with Low-quality Water. Journal of Hydrology 272: 238-249.

Çetin M, Kırdı C, Efe H, Topçu S 2007. Aşağı Seyhan Ovasında Taban Suyu Derinliği Sulama İlişkilerinin Coğrafi Bilgi Sistemi ile İrdelenmesi. V. Ulusal Hidroloji Kongresi Bildiriler Kitabı, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 5-7 Eylül 2007, Ankara.

Çetin M, Kırdı C, Efe H, Topçu S 2008. Düşük Kaliteli Suların Sulamada Kullanılmasının Neden Olabileceği Olası Tuzluluk Sorunlarının Coğrafi Bilgi Sistemi Ortamında İrdelenmesi. TMMOB 2. Su Politikaları Kongresi Bildiriler Kitabı, Sayfa: 471-481, İMO Kültür ve Kongre Merkezi, 20-22 Mart 2008, Ankara.

Çetin M, Özcan H 1999. Aşağı Seyhan Ovasında Sulanan ve Sulanmayan Alanlarda Meydana Gelen Sorunlar ve Çözüm Önerileri: Örnek Bir Çalışma. TÜBİTAK Turkish Journal of Agriculture and Forestry 23(1): 207-217.

Demir N, Antepli N 2004. Aşağı Seyhan Ovası Sulaması Taban Suyu ve Tuzluluk Problemleri Değerlendirme Çalışması. Sulanan Alanlarda Tuzluluk Yönetimi Sempozyumu, 20-21 Mayıs 2004, DSİ Genel Müdürlüğü, Ankara.

Dinç U, Sarı M, Şenol S, Kapur S, Sayın M, Derici MR, Çavuşgil V, Gök M, Aydın M, Ekinci H, Ağca N, Schlinchting E 1988. Çukurova Bölgesi Toprakları, Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yardımcı Ders Kitabı, No: 26, 2. Baskı, Adana, Türkiye.

DSİ 1982. ASO IV. Merhale Projesi Planlama Drenaj Raporu, DSİ Genel Müdürlüğü Basımevi, Ankara.

ESRI 1996. Using Arcview GIS. Environmental System Research Institute, Inc.: Redlands, CA, USA.

FAO 2001. Drainage and Sustainability. IPTRID Issues Paper No. 3, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Kaman H, Çetin M, Kırdı C 2011a. Monitoring and Assessing of Changes in Soil and Groundwater Salinity of Yemisli Irrigation District of Turkey Using Low Quality Irrigation Water. Scientific Research and Essays, 6(6): 1388-1396.

- Kaman H, Kurunc A, Sonmez NK, Cetin M, Uz BY, Aslan GE 2011b. Preliminary Investigation of Seawater Intrusion into Inland through Acisu Creek in Antalya, Turkey. *Journal of Food Agriculture & Environment* 9(2): 612-617.
- Kaman H, Cetin M, Kirda C 2017. Monitoring and Assessment of Irrigation Management in a Large Irrigation Project Area. *Fresenius Environmental Bulletin* 26(6): 3986-3994.
- Keckler D 1995. *The Surfer Manual*. Golden, CO, USA.
- Richards LA 1954. *Diagnosis and Improving of Saline and Alkali Soils*. United States Department of Agriculture, Hand Book 60, Washington DC, USA.
- Ritzema HP, Kselik RAL, Chanduvi F 1996. *Drainage of Irrigated Lands*. FAO Irrigation Water Management Training Manual Rome, Italy., p. 9.
- Said AA, Yurtal R, Cetin M, Golpinar MS 2021. Evaluation of Some Groundwater Quality Parameters Using Geostatistics in the Urban Coastal Aquifer of Bosaso Plain, Somalia. *Journal of Agricultural Sciences* 27(1): 88-97.
- Thales 2005. *Magellan Explorist 600 Reference Manual*. Thales S. A., USA, pp. 123.
- Tuzcu Ö, Çevik B, Kaplankiran M, Kirda C 1988. Influence of Different Irrigation Methods on Nutrient Uptake of Lemon Trees. *Adv. Hort. Sci.* 2: 79-83.

Sulama Performans Göstergeleri ve TOPSİS Yöntemi ile Asi Havzası Sulama Birliklerinin Analizi

Şaban ÇİFÇİ¹, Hasan DEĞİRMENCİ^{2*}

¹DSİ 12. Bölge Müdürlüğü 123. İşletme Bakım Şube Müdürlüğü, Yozgat, ²Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniv. Ziraat Fak. Biyosistem Mühendisliği Bölümü, Kahramanmaraş

¹<https://orcid.org/0000-0002-4953-5706>, ²<https://orcid.org/0000-0002-6157-816X>

✉: hdegirmenci46@gmail.com

ÖZET

Bu çalışma kapsamında Asi havzasında bulunan sulama birliklerinin performansları 2013-2017 yılları verileri ile analiz edilmiştir. Analizde performans göstergeleri ve TOPSİS yöntemi ile sulama birliklerinin başarıları tespit edilmiştir. Araştırmada sulama alanına dağıtılan yıllık sulama suyu miktarı 14681-2318 m³ ha⁻¹ arasında değişmiş, sulanan alana dağıtılan yıllık sulama suyu miktarı 17715-2678 m³ ha⁻¹, yıllık su temin oranı 0.29-1.61 arasında hesaplanmış, sulama oranı %48-111 aralığında değişmiştir. Mali yeterlilik oranı %18-86 arasında değişirken, bakım-onarım masraflarının gelire oranı %9-181, sulama alanına düşen işletme-bakım ve yönetim masrafları 49.17-343.75 \$ ha⁻¹, su ücreti toplama performansı değeri %24-83, sulama alanına düşen enerji masrafları 0-233.96 \$ ha⁻¹, sulanan alana düşen enerji masrafları 0-394.94 \$ ha⁻¹ ve sulama suyu miktarına karşılık enerji masrafları 0-0.03494 \$ m⁻³ olarak hesaplanmıştır. Sulama alanı üretim değeri 1509-7398 \$ ha⁻¹, sulanan alan üretim değeri 1948-11262 \$ ha⁻¹, şebekeye alınan sulama suyuna karşılık üretim değeri 0.190-2.019 \$ m⁻³ ve bitki su ihtiyacına karşılık üretim değeri 0.203-0.950 \$ m⁻³ olarak saptanmıştır. TOPSİS yöntemi ile analizde su kullanım başarısı %6-100, finansal başarı %15-80 ve üretim başarısı %0-100 arasında değişmiştir. Sonuç olarak sulama birliklerinin başarısında üretim değeri ve işletme bakım giderleri önemli rol oynamaktadır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 23.02.2021

Kabul Tarihi : 05.05.2021

Anahtar Kelimeler

Sulama yönetimi
Asi havzası
Performans Göstergeleri
Sulama birlikleri
TOPSİS yöntemi

Analysis of Water User Associations in Asi Basin with Irrigation Performance Indicators and TOPSIS Method

ABSTRACT

In this study, water user associations (WUAs) were assessed with the data between the dates 2013-2017 in Asi Basin. Success of WUAs was determined with the TOPSIS method. The range of annual irrigation water per unit command area, annual irrigation water per unit irrigated area, annual relative water supply and irrigation intensity were changed 14681-2318 m³ ha⁻¹, 17715-2678 m³ ha⁻¹, 0.29-1.61 and 48-111%, respectively. Calculated financial adequacy ratio, total maintenance expenditure cost, revenue ratio, revenue collection performance, energy cost per unit command area, energy cost per unit irrigated area, and energy cost per unit volume irrigation water were %18-86, %9-181, \$49.17-343.75 ha⁻¹, %24-83, \$0-233.96 ha⁻¹, \$0-394.94 ha⁻¹ and \$0-0.03494 m⁻³, respectively. Output per unit command area was between \$1509-7398 ha⁻¹, output per unit irrigated area was between \$1948-1262 ha⁻¹, output per unit irrigation water supplied to users changed between \$0.190-2.019 m⁻³ and output per unit irrigation water requirement was between \$0.203-0.950 m⁻³. In the analyzing with TOPSIS method, water use success, financial success and production success changed between 6-100%, 15-80% and 0-100%, respectively. As a conclusion, output and maintenance-operation costs played important role in success of water user associations.

Research Article

Article History

Received : 23.02.2021

Accepted : 05.05.2021

Keywords

Water management
Asi Basin
Performance indicators
Water user associations
TOPSIS method

| | |
|-------------------|---|
| Atıf İçin: | Çiftçi Ş, Değirmenci H 2022. Sulama Performans Göstergeleri ve TOPSİS Yöntemi ile Asi Havzası Sulama Birliklerinin Analizi. KSÜ Tarım ve Doğa Derg 25 (1): 169-180. https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.885525 . |
| To Cite: | Çiftçi Ş, Değirmenci H 2022. Analysis of Water User Associations in Asi Basin with Irrigation Performance Indicators and TOPSIS Method. KSU J. Agric Nat 25 (1): 169-180. https://doi.org/10.18016/ksutarimdogavi.885525 . |

GİRİŞ

İklim değişikliği ve kuraklık nedeniyle artan tarımsal su kullanımı, içme ve kullanma suyu ve sanayi gereksinimleri su kaynaklarının etkin ve sürdürülebilir kullanımını gerektirmektedir. Su, yenilenebilir bir kaynak olmasına rağmen sınırlı kullanıma sahip temel yaşam maddelerinin başında gelir (Ağca ve ark., 2014). Su yönetimi; su kaynaklarının planlı bir biçimde geliştirilmesi, suyun dağıtımı ve kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Sulama projelerinin amacı, çiftçi gelirinin artırılması ve su kaynaklarının etkin bir biçimde kullanımının gerçekleştirilmesidir. Sulama yönetimi ise tarımda suyun istenilen zaman ve miktarda dağıtım ve kullanımını sağlayan bir organizasyon biçimi olarak tanımlanabilir (Aküzüm ve ark., 2010).

Türkiye’de tarımsal sulamada ihtiyaç duyulandan daha fazla su kullanılmaktadır. Fazla su kullanımının en önemli nedenlerinden biri, sulama şebekelerindeki su kayıplarının fazlalığıdır (Çakmak ve Aküzüm, 2006). Türkiye’de DSİ tarafından inşa edilen ve yönetilen sulama şebekelerinin yönetimi 1993 yılından itibaren su kullanıcı örgütlerine (sulama birlikleri, kooperatifler) devredilmiştir. Devir sonrası sulama şebekelerinin işletme bakım ve yönetim performanslarının izlenmesi ve değerlendirilmesi önemli bir konu olmuştur.

Sulama şebekelerinin performans değerlendirilmesinde çeşitli araştırmacılar tarafından çok sayıda gösterge geliştirilmiş ve uygulanmıştır. Abernethy (1986) suyun dağıtımında eşitlik, düzenlilik, devamlılık ve güvenilirlik parametrelerini, Smith (1990) verim ve sulama randımanını, Beyribey ve ark. (1997) su temini oranı, sulama oranı, karlılık oranı ve sürdürülebilir sulama alanı oranı göstergelerini, Kartal ve ark. (2020) sulama şebekelerinde şebeke alanı brüt üretim değeri, sulanan alan brüt üretim değeri, saptırılan suya karşılık brüt üretim değeri, bitki su ihtiyacına karşılık brüt üretim değeri, su temin oranı ve sulama oranı göstergelerini, Arslan ve Değirmenci (2018) dışsal (su iletim kapasitesi, yatırımın geri dönüş oranı) ve içsel göstergeleri, Aktürk ve ark. (2010) masrafları karşılama oranı, bakım masrafının gelire oranı, su ücreti toplama performansı, birim alana düşen toplam işletme bakım yönetim masrafı, birim alana düşen personel sayısı ve su dağıtımında istihdam edilen kişi başına düşen toplam masrafı, Kartal ve ark. (2021) bakım masrafı, planlanan bakım masrafı, toplam gelir ve toplam gider ile ilgili

göstergeleri kullanmışlardır.

Sulama performans göstergelerinin değerlendirilmesinde çeşitli istatistiksel yöntemler kullanılmaktadır. Değirmenci ve ark. (2017) sulama birliğinin sulama oranlarını, yıllık bakım onarım oranı ve ortalama su ücreti göstergelerini kümeleme analizi ile, Kartal ve Değirmenci (2019a) çok değişkenli istatistiksel yöntemlerle temel bileşenler analizi ile (PCA), Büyükcangaz ve ark. (2018) sulama performans göstergelerini veri zarflama analizi ile (VZA), Rodríguez-Díaz ve ark. (2008) temel bileşenler analizi, kümeleme analizi ve kalite indeksleri ile, Kartal ve Değirmenci (2019b) kalite indeksi ile, Alcon ve ark. (2017) panel veri regresyon modeli ile, Zema ve ark. (2018) performans göstergeleri arasındaki korelasyon katsayısı ile, Zema ve ark. (2020) parametrik olmayan çok değişkenli permütasyonel varyans analizi (PERMANOVA) ile değerlendirmişlerdir.

Çok kriterli karar verme yöntemlerinden birisi olan TOPSIS (Technique For Order Preference By Similarity To An Ideal Solution) yöntemi birçok alanda kullanılmaktadır. Tsaur ve ark. (2002) havaalanlarında hizmet kalitesi, Madumjar ve ark. (2005) pamuk lif kalitesinin değerlendirilmesinde, Yurdakul ve İç (2005) üretim şirketlerine yönelik performans ölçüm modeli geliştirilmek, Shyith ve ark. (2008) tekstil sanayisinde en uygun bakım teknolojilerinin seçiminde, Lin ve ark. (2008) ürün tasarım süreçlerinde, Ustasüleyman (2009) bankacılık sektöründe hizmet kalitesinin belirlenmesinde, Wang ve ark. (2009), tedarikçi seçiminde, Özfidaner ve ark. (2020) kuraklık analizinde AHP ve TOPSIS yöntemlerini kullanmışlardır. TOPSIS yöntemi kullanılarak sulama performans değerlendirilmesi konusunda çok kısıtlı çalışma bulunmaktadır.

Bu çalışmanın amacı Asi havzasında faaliyet gösteren Kırıkhan, Hassa, Yarseli ve Samandağ sulama birliklerini 2013-2017 yılı verileri kullanılarak su kullanım etkinliği, finansal etkinlik ve üretim etkinliğine yönelik sulama performans göstergeleri ve TOPSIS yöntemi ile değerlendirmektir.

MATERYAL ve METOD

Materyal

Araştırmada Asi havzasında yer alan Kırıkhan, Hassa, Yarseli ve Samandağ sulama şebekelerinin işletme ve bakım sorumluluğunu devir alan 4 sulama birliğinin 2013-2017 yılı verileri materyal olarak

alınmıştır (Anonim, 2013-2017). Asi Havzası, Türkiye'nin güneyinde yer alır. Batıda Akdeniz, güneyde Suriye, doğuda Fırat Havzası ve kuzeyde ise Ceyhan Havzası yer alır. Bu havza coğrafi olarak; 36°

21' Kuzey, 35° 48' Güney enlemleri, 36° 41' Doğu ve 35° 53' Batı boylamları arasındadır. Sulama birlikleri ile ilgili bilgiler Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Sulama birlikleri ile ilgili bilgiler

Table 1. Information on irrigation associations

| Birlik Adı <i>Name of Associations</i> | Kırıkhan | Hassa | Yarseli | Samandağ |
|--|---|---|---|--|
| Sulama Alanı (ha) <i>Irrigation area (ha)</i> | 7300 | 3400 | 6800 | 1575 |
| Cazibe (ha) <i>Gravity (ha)</i> | 7300 | 3400 | 5364 | - |
| Pompaj (ha) <i>Pumping (ha)</i> | - | - | 1436 | 1575 |
| Bitki Çeşidi ve Ekim Oranı <i>Crop Variety and Cropping ratio</i> | Pamuk (%42) Hububat (%34) Mısır (%12) | Hububat (%38) Pamuk (%12) Meyve(%7) | Pamuk (%44) Mısır (%26) Hububat (%25) | Narenciye (%60) Sebze (%10) Meyve (%3) |

Metot

Performans göstergelerinin hesaplanması

Bu çalışmada Uluslararası Su Yönetimi Enstitüsü (IWMI) tarafından geliştirilen sulama performans göstergeleri kullanılmıştır. Sulama performans göstergeleri ve hesaplama yöntemleri Çizelge 2'de verilmiştir (Molden ve ark.,1998; Burt, 2001).

TOPSİS yöntemi: Asi havzasında bulunan her bir sulama birliği için sulama performans göstergeleri kullanılarak ayrı ayrı her bir yıl için hesaplama yapılmıştır. Her bir sulama performans göstergesine göre her sulama birliği diğerlerine göre daha başarılı görünmektedir. Farklı sulama performans göstergelerine göre farklı sulama birliklerinin daha başarılı görünmesi, en başarılı sulama birliğinin belirlenmesinde sorun yaratmaktadır. Doğru bir yaklaşım ile en başarılı sulama birliğini belirleyebilecek analiz yapmak ve bu analize tüm sulama performans göstergelerini dahil etmek ancak performans göstergelerini ortak paydada birleştirebilecek bir çoklu karar verme tekniği kullanılarak yapılabilir. Bunun için uygulanabilecek en iyi analiz yöntemlerinden bir tanesi de TOPSİS'tir. Çoklu karar verme tekniklerinden biri olan TOPSİS yöntemi bütün karar noktaları için değerlendirme faktörlerini aynı anda çözüme katmakta ve karar vericiye tek bir dağılım sunmaktadır (Yükçü ve Atağan (2010). Bu nedenle çalışmada sulama performans göstergeleri su kullanım etkinlik başarısı, finansal etkinlik başarısı ve tarımsal etkinlik başarısı yönünden TOPSİS yöntemi ile analiz edilmiştir. TOPSİS yöntemi 6 adımdan oluşmaktadır (Chen ve Hwang, 1992; Hwang ve Yoon, 1981).

Adım 1: Karar matrisinin (A) oluşturulması (Chen,

2000)

Adım 2: Standart karar matrisinin (R) Oluşturulması (Jadidi ve ark., 2008)

Adım 3: Ağırlıklı standart karar matrisinin (V) oluşturulması (Jadidi ve ark., 2008).

Adım 4: İdeal (A*) ve negatif ideal (A⁻) çözümlerinin oluşturulması (Abbasi ve ark., 2008)

Adım 5: Ayrım ölçülerinin hesaplanması (Jadidi ve ark., 2008)

Adım 6: İdeal çözüme göreli yakınlığın hesaplanması (Li, 2010)

Analitik Hiyerarşi Prosesi (AHP): 1977 yılında Profesör Thomas Lorie Saaty tarafından bir model olarak geliştirilerek karar verme problemlerinin çözümünde kullanılabilir hale getirilmiştir (Yaralıoğlu, 2001). AHP çok ölçütlü bir karar verme yöntemi olup belirlenen ölçütlere göre birden fazla seçeneğin önem sırasına göre sıralanmasını sağlamaktadır. AHP, alternatiflerin ortak bir ölçüte göre ikili karşılaştırmasına dayanan bir yöntemdir. AHP problemi birden fazla seviyeden meydana gelen bir hiyerarşik yapı ile oluşturulur. AHP çok ölçütlü ve çok seçenekli karar problemlerinde çözüme ulaşmada karar vericiye yardımcı olur. Karar destek sisteminin işleyiş adımları (Saaty,2004);

Adım 1: Sorun tanımlanır ve aranan bilginin türü belirlenir

Adım 2: Faktörler arası karşılaştırma matrisi oluşturulur

Adım 3: Faktörlerin yüzde önem dağılımları belirlenir

Adım 4: Faktör kıyaslamalarındaki tutarlılık ölçülür

Çizelge 2. Sulama performans göstergeleri
Table 2. Irrigation performance indicators

| | Kodu Code | Gösterge Indicator | Tanım Definition |
|--|--------------|---|--|
| Su Kullanım Etkinliği Water Use Efficiency | A1 | Sulama alanı sulama suyu miktarı (m ³ ha ⁻¹) | $\frac{\text{Toplam sulama suyu miktarı (m}^3\text{)}}{\text{Sulama alanı}}$ |
| | A2 | Sulanan alan sulama suyu miktarı (m ³ ha ⁻¹) | $\frac{\text{Toplam sulama suyu miktarı (m}^3\text{)}}{\text{Sulanan alan}}$ |
| | A3 | Yıllık su temini oranı | $\frac{\text{Toplam sulama suyu miktarı (m}^3\text{)}}{\text{Toplam sulama suyu ihtiyacı (m}^3\text{)}}$ |
| | A4 | Sulama Oranı (%) | $\frac{\text{Sulanan alan (ha)}}{\text{Sulama alanı (ha)}} * 100$ |
| Finansal Etkinlik Financial Efficiency | B1 | Mali yeterlilik oranı (%) | $\frac{\text{Toplanan su ücretleri (\$)}}{\text{Toplam İBY Masrafları (\$)}} * 100$ |
| | B2 | Bakım-onarım masraflarının gelire oranı (%) | $\frac{\text{Bakım masrafları (\$)}}{\text{Toplanan su ücretleri (\$)}} * 100$ |
| | B3 | Sulama alanı İBY masrafları (\$ ha ⁻¹) | $\frac{\text{Toplam İBY Masrafları (\$)}}{\text{Sulama alanı (ha)}}$ |
| | B4 | Su ücreti toplama performansı (%) | $\frac{\text{Tahsil edilen (\$)}}{\text{Tahakkuk eden (\$)}} * 100$ |
| | B5 | Sulama alanı enerji masrafları (\$ ha ⁻¹) | $\frac{\text{Toplam enerji giderleri (\$)}}{\text{Sulama alanı (ha)}}$ |
| | B6 | Sulanan alan enerji masrafları (\$ ha ⁻¹) | $\frac{\text{Toplam enerji giderleri (\$)}}{\text{Sulanan alan (ha)}}$ |
| | B7 | Sulama suyu enerji masrafları (\$ m ⁻³) | $\frac{\text{Toplam enerji giderleri (\$)}}{\text{Toplam sulama suyu miktarı}}$ |
| Üretim Etkinliği Production Efficiency | C1 | Sulama alanı brüt üretim değeri (\$ ha ⁻¹) | $\frac{\text{Brüt üretim değeri (\$)}}{\text{Sulama alanı (ha)}}$ |
| | C2 | Sulanan alan brüt üretim değeri (\$ ha ⁻¹) | $\frac{\text{Brüt üretim değeri (\$)}}{\text{Sulanan alan (ha)}}$ |
| | C3 | Sulama suyu brüt üretim değeri (\$ m ⁻³) | $\frac{\text{Brüt üretim değeri (\$)}}{\text{Toplam sulama suyu miktarı (m}^3\text{)}}$ |
| | C4 | Bitki su tüketimi brüt üretim değeri (\$ m ⁻³) | $\frac{\text{Brüt üretim değeri (\$)}}{\text{Bitki su tüketimi (m}^3\text{)}}$ |

Araştırmada sulama performans değerlendirmesi konusunda araştırmaları bulunan 5 uzmandan aşağıda belirtilen performans göstergelerinin bir sulama birliğinin başarısına katkı ağırlıkları görüşü alınıp, geometrik ortalaması hesaplanmış ve ortak görüş kısmına işlenmiştir. İkili karşılaştırmalar

sonucunda oluşan değerlerin yani önceliklerin birbirleri ile olan mantıksal ve/veya matematiksel ilişkisi tutarlılıktır (Ömürbek ve ark., 2015). Tutarlılık oranına göre hesaplanan sulama performans göstergeleri ağırlıkları Çizelge 3'te gösterilmiştir.

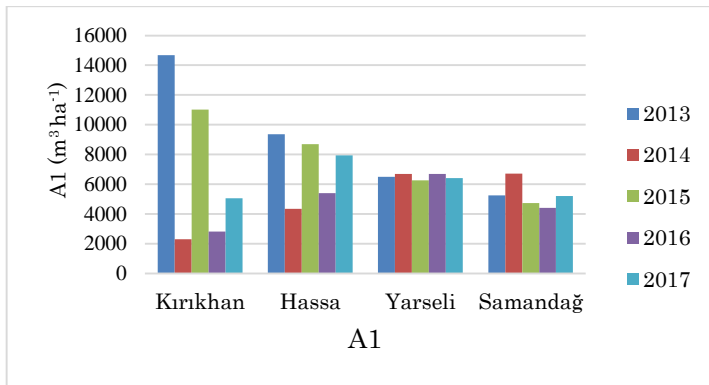
Çizelge 3. Sulama performans göstergeleri ağırlıkları
Table 3. Irrigation performance indicators weights

| | | | | | |
|--|----|-------|---|-------|-------|
| Su kullanım etkinlik göstergeleri Water use efficiency indicators | A1 | 0.097 | Finansal etkinlik göstergeleri Financial efficiency indicators | B1 | 0.145 |
| | A2 | 0.097 | | B2 | 0.058 |
| | A3 | 0.252 | | B3 | 0.075 |
| | A4 | 0.555 | | B4 | 0.421 |
| Üretim etkinliği göstergeleri Production efficiency indicators | C1 | 0.277 | B5 | 0.073 | |
| | C2 | 0.466 | B6 | 0.073 | |
| | C3 | 0.161 | B7 | 0.156 | |
| | C4 | 0.096 | | | |

BULGULAR ve TARTIŞMA

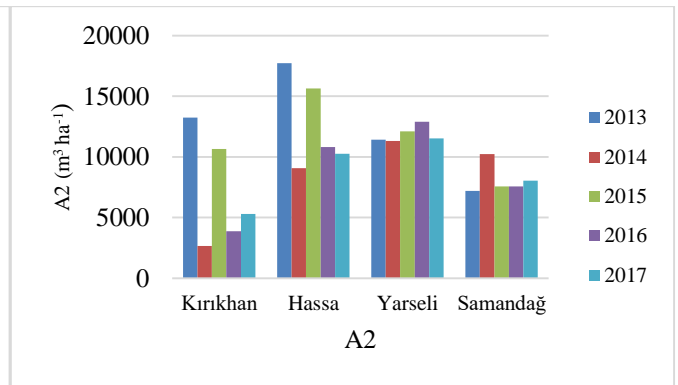
Sulama performans göstergelerinin analizi

Sulama alanı sulama suyu miktarı (A1) : A1 değeri 2013-2017 yılları arasında 14681 ve 2318 m³ ha⁻¹ arasında değişirken, ortalama değer 6530 m³ ha⁻¹'dir. Şekil 1 incelendiğinde 14681 m³ ha⁻¹ değeriyle en yüksek gözlemlendiği sulama birliği 2013 yılında Kırıkhan sulama birliğidir. En düşük A1 değeri ise Kırıkhan sulama birliğinde 2014 yılında 2318 m³ ha⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Arslan ve Değirmenci (2018) Kahramanmaraş'ta bulunan Kartalkaya Sol Sahil sulama şebekesinde 2015 yılında yaptıkları çalışmada bu değeri 6743.97 m³ ha⁻¹ olarak saptamışlardır.



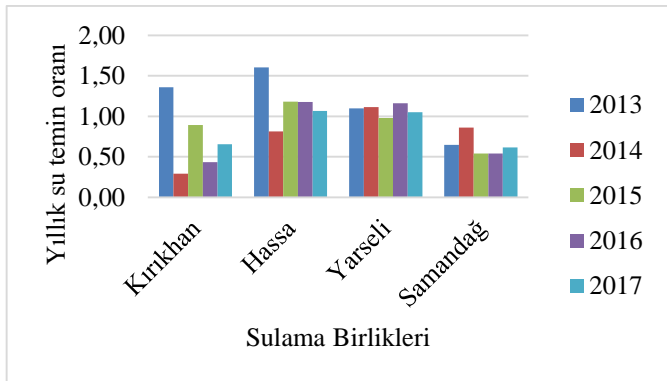
Şekil 1. Sulama alanı sulama suyu miktarı (A1)
Figure 1. Irrigation water per unit command area

Sulanan alan sulama suyu miktarı (A2): 2013-2017 yılları arasında A2 değeri 2678-17715 m³ ha⁻¹ arasında değişirken, ortalama değer 9913 m³ ha⁻¹'dir. Şekil 2' de görüldüğü gibi en yüksek değer 2013 yılında Hassa sulama birliğinde (17715 m³ ha⁻¹) gerçekleşmiştir. En düşük A2 değeri ise Kırıkhan sulama birliğinde 2014 yılında 2678 m³ ha⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Elicabuk ve Topak (2016), Gevrekli Sulama Birliği'nin 2008-2013 yılları verilerini kullanarak yaptıkları çalışmada birim sulanan alana dağıtılan yıllık sulama suyu miktarını 2.577-5.273 m³ ha⁻¹ olarak tespit etmişlerdir.



Şekil 2. Sulanan alan sulama suyu miktarı (A2)
Figure 2. Irrigation water per unit irrigated area

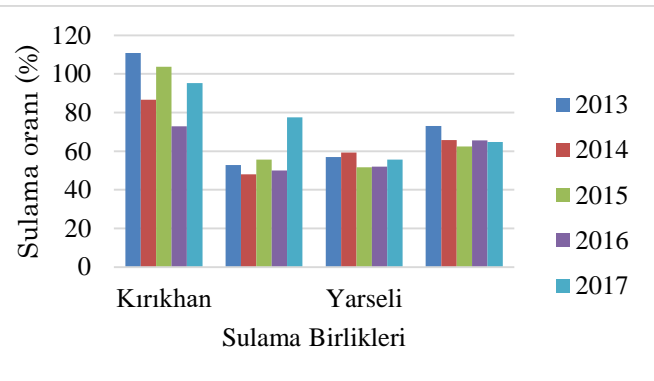
Yıllık su temin oranı (A3): Araştırma alanında 2013-2017 yılları arasında yıllık su temin oranı 0.29-1.61 arasında değişirken, ortalama A3 değeri ise 0.90'dır. A3 değeri en düşük 2014 yılında Kırıkhan sulama birliğinde 0.29 ile görülmüştür. Şekil 3 incelendiğinde Hassa sulama birliği 2013 yılında 1.61 su temin oranıyla en yüksek, Yarseli sulama birliği 2015 ve 2017 yılında 0.98 ve 1.05 ile optimal seviyeye en yakın A3 değerlerine sahip birlik olmuştur. Değirmenci (2001) 1998 yılı için sulama birliklerine devredilen sulama şebekelerinde A3 değerini 0.91-



Şekil 3. Su temin oranı (A3)
Figure 3. Relative water supply

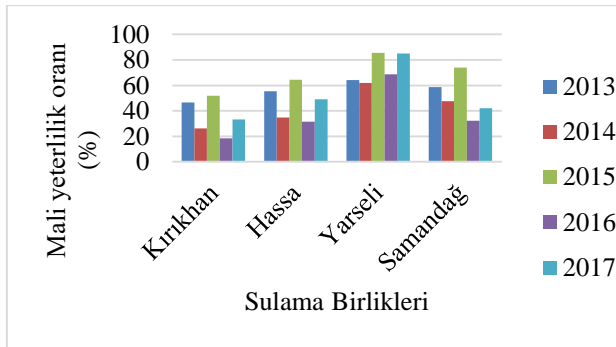
7.15 olarak tespit etmiştir.

Sulama oranı (%) (A4): Asi havzasında sulama oranı 2013-2017 yılları arasında %48-111 aralığında değişmiş ve ortalama A4 değeri %68 olarak hesaplanmıştır. Şekil 4'de gösterilen grafikte en yüksek A4 değeri 2013 yılında Kırıkhan sulama birliğinde gerçekleşirken, en düşük ise 2014 yılında Hassa sulama birliğinde %48 ile görülmüştür. Beyribey ve ark. (1997), 1984-1993 yıllarında için 21 bölgede yaptıkları çalışmalarda A4 değerini %24-105 arasında hesaplamışlardır.



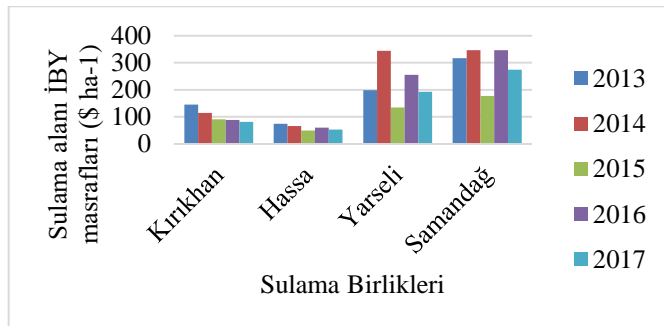
Şekil 4. Sulama oranı (A4)
Figure 4. Irrigation intensity

Mali yeterlilik oranı (%) (B1): B1 değeri 2013-2017 yılları arasında %18-86 arasında değişirken, ortalama B1 değeri %52 olarak hesaplanmıştır. Şekil 5'de gösterilen grafik incelendiğinde 2015 yılında Yarseli sulama birliği %86 ile en iyi B1 değerine sahipken, 2016 yılında Kırıkhan sulama birliği %18 ile en kötü düzeyde olduğu görülmektedir. Çakmak ve Beyribey (2003), Sakarya havzası sulama şebekelerinde yaptıkları çalışmada %8-300 olarak tespit etmişlerdir.



Şekil 1. Mali yeterlilik oranı (B1)
Figure 5. Financial adequacy ratio

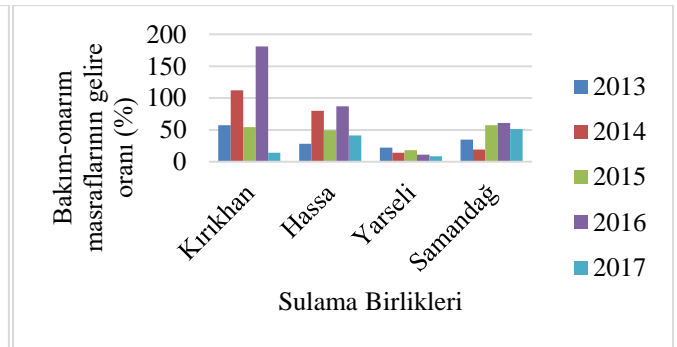
Sulama alanı işletme-bakım ve yönetim (İBY) masrafları (B3): Araştırma alanında tespit edilen sulama alanına düşen işletme-bakım ve yönetim masrafları 49.17-343.75 \$ ha⁻¹ aralığında değişmiş ve Şekil 7'de verilmiştir. Sulama alanına düşen işletme-bakım ve yönetim masrafları incelendiğinde en yüksek 2014 yılında 343.75 \$ ha⁻¹ ile Yarseli Sulama Birliği, en düşük ise 2015 yılında Hassa Sulama Birliğinin 49.17 \$ ha⁻¹ olarak gerçekleştiği görülmüştür. Arslan ve Değirmenci (2018), Kartalkaya Sol Sahil sulama şebekesinde 2015 yılında yaptıkları çalışmada B3 değerini 89.26 \$ ha⁻¹ olarak tespit etmişlerdir.



Şekil 2. Sulama alanı İBY masrafları(B3)
Figure 7. MOM expenditure cost

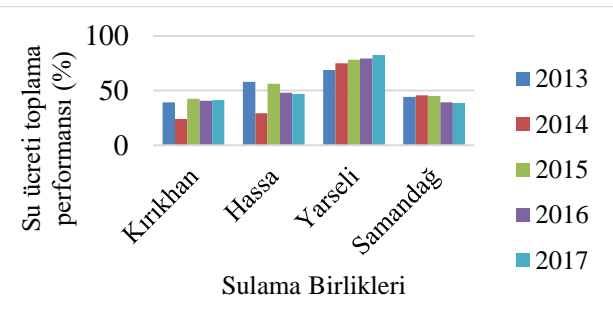
Sulama alanı enerji masrafları (B5): Araştırma alanında tespit edilen sulama alanına düşen enerji masrafları Şekil 9'da verilmiştir. Şekilde görüleceği

Bakım-onarım masraflarının gelire oranı (%) (B2): B2 değerleri 2013-2017 yılları arasında %9-181 aralığında değişmiş ve ortalama B2 değeri %50 olarak hesaplanmış ve Şekil 6'da verilmiştir. En yüksek B2 değeri 2016 yılında Kırıkhan sulama birliğinde %181 ile gerçekleşirken, en düşük ise 2017 yılında Yarseli sulama birliğinde %9 olarak saptanmıştır. Kapan (2010), Asartepe sulamasında yaptığı çalışmada B2 değerini %31-543 arasında saptamıştır.



Şekil 6. Bakım-onarım masraflarının gelire oranı (B2)
Figure 6. Maintenance expenditure cost - revenue ratio

Su ücreti toplama performansı (%) (B4): Asi havzasındaki sulama birliklerinin 2013-2017 yılına ilişkin su ücreti toplama performansı değeri %24-83 aralığında değişmiş ve Şekil 8'de verilmiştir. En düşük su ücreti toplama performansı 2014 yılında Kırıkhan Sulama Birliğinde %24 oranla belirlenirken, en yüksek oran ise Yarseli Sulama Birliği 2017 yılında %83 ile saptanmıştır. Yavuz ve ark. (2006) ise, Aşağı Seyhan ovasındaki 17 sulama birliğinde 1998-2002 yıllarına ilişkin B4 değerini %65-100 arasında hesaplamıştır.



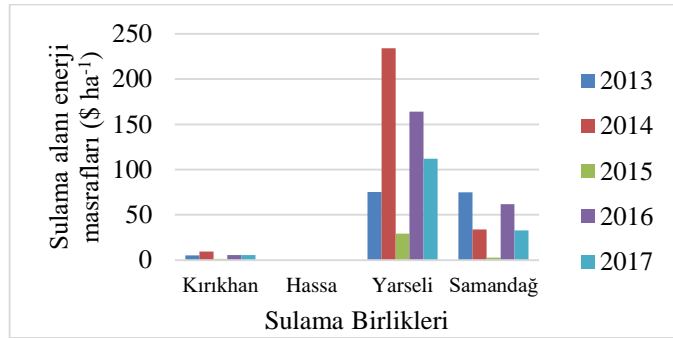
Şekil 3. Su ücreti toplama performansı (B4)
Figure 8. Revenue collection performance

üzere Hassa Sulama Birliğinin hiç enerji masraflarının olmadığı, Yarseli Sulama Birliğinin ise pompaj tesisi olduğundan enerji giderlerinin çok

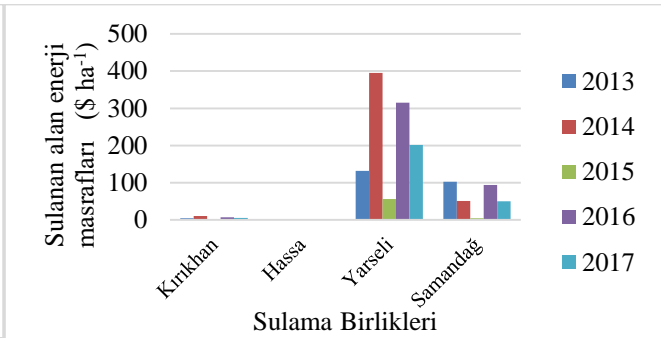
yüksek olarak saptanırken, bu gider en yüksek Yarseli Sulama Birliği 2014 yılında 233.96 \$ ha⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Diğer (2018) Aşağı Seyhan ovasında 18 sulama birliğinde sulama alanına düşen enerji masraflarını 2011-2015 verilerine göre 2.79 ile 123.94 \$ ha⁻¹ arasında değişmiş, ortalama 16.64 \$ ha⁻¹ bulmuştur.

Sulanan alan enerji masrafları (B6): Asi havzasında sulanan alana düşen enerji masrafları (B6) değerleri

2013-2017 yılları arasında 0–394.94 \$ ha⁻¹ aralığında değişmiş ve ortalama B6 değeri 71.65 \$ ha⁻¹ olarak hesaplanmış ve Şekil 10'da verilmiştir. En yüksek B6 değeri 2014 yılında Yarseli sulama birliğinde 394.94 \$ ha⁻¹ ile gerçekleşirken, Hassa sulama birliğinin hiç enerji masrafı olmadığı belirlenmiştir. Moreno ve ark. (2010) İspanya Castilla-La Mancha bölgesinde 15 sulama birliğinde sulanan alana düşen enerji masraflarını 34.74 ile 471.26 € ha⁻¹ arasında hesaplamışlardır.



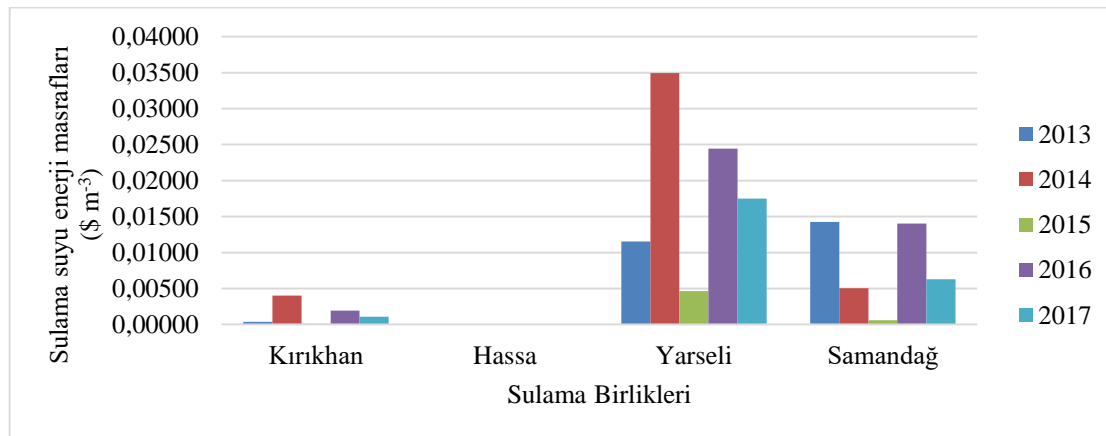
Şekil 4. Sulama alanı enerji masrafları(B5)
Figure 9. Energy cost per unit command area



Şekil 4.5. Sulanan alan enerji masrafları(B6)
Figure 10. Energy cost per unit irrigated area

Sulama suyu enerji masrafları (B7): Asi havzasında Sulama suyu miktarına karşılık enerji masrafları (B7) değerleri 2013-2017 yılları arasında 0–0.03494 \$ m⁻³ aralığında değişmiş ve ortalama B7 değeri 0.00704 \$ m⁻³ olarak hesaplanmış ve Şekil 11'de verilmiştir. En yüksek B7 değeri 2014 yılında Yarseli

sulama birliğinde 0.03494 \$ m⁻³ ile gerçekleşirken, Hassa sulama birliğinin hiç enerji masrafı olmadığı belirlenmiştir. Alcon ve ark. (2017) İspanya Murcia bölgesinde 5 sulama birliğinde sulama suyu miktarına karşılık enerji masrafını ortalama 0.04 € m⁻³ bulmuşlardır.



Şekil 6. Sulama suyu enerji masrafları (B7)

Figure 11. Energy cost per unit volume irrigation water

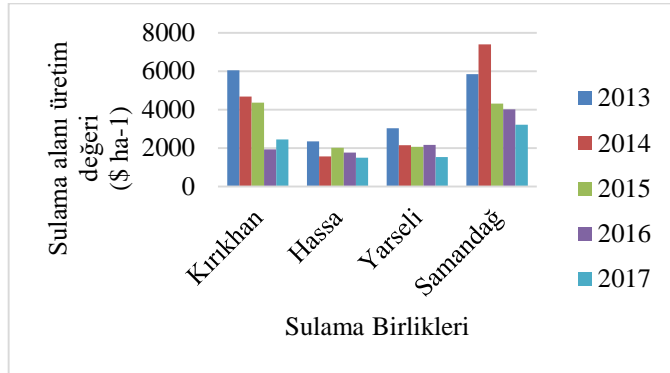
Sulama alanı üretim değeri (C1): Asi havzasında sulama alanı üretim değeri C1 değerleri 2013-2017 yılları arasında 1509–7398 \$ ha⁻¹ aralığında değişmiş ve ortalama C1 değeri 3224 \$ ha⁻¹ olarak hesaplanmış ve Şekil 12'de verilmiştir. En yüksek C1 değeri 2014 yılında Samandağ sulama birliğinde 7398 \$ ha⁻¹ ile gerçekleşirken, en düşük ise 2017 yılında Hassa sulama birliğinde 1509 \$ ha⁻¹ olarak saptanmıştır. Shrestha ve ark. (2014) Endonezya Telagasari sulama

alanında 2007 yılında 5 ayrı sektörde yapmış oldukları çalışmada sulama alanı üretim değerini 720-2962 \$ ha⁻¹ ve ortalama 1720 \$ ha⁻¹ bulmuşlardır.

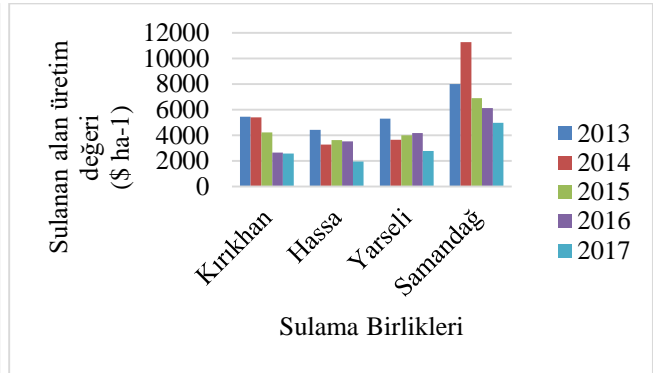
Sulanan alan üretim değeri (C2): Asi havzasında sulanan alan üretim değeri (C2) değerleri 2013-2017 yılları arasında 1948–11262 \$ ha⁻¹ aralığında değişmiş ve ortalama C2 değeri 4717 \$ ha⁻¹ olarak hesaplanmış ve Şekil 13'te verilmiştir. En yüksek C2

değeri 2014 yılında Samandağ sulama birliğinde 11262 \$ ha⁻¹ ile gerçekleşirken, en düşük ise 2017 yılında Hassa sulama birliğinde 1948 \$ ha⁻¹ olarak

saptanmıştır. Alcon ve ark. (2017) İspanya Murcia bölgesinde 5 sulama birliğinde sulanan alan üretim değerini ortalama 11.207 € ha⁻¹ bulmuşlardır.



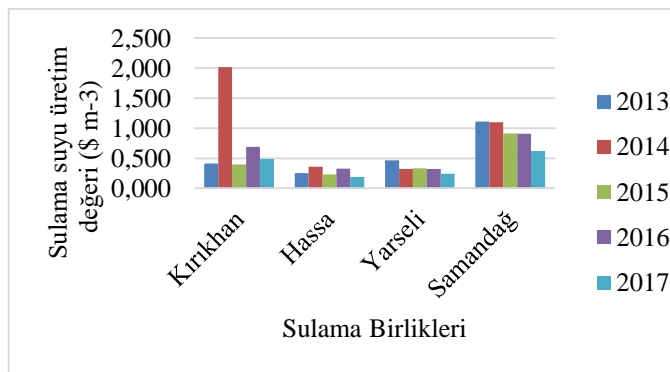
Şekil 7. Sulama alanı üretim değeri(C1)
Figure 12. Output per unit command area



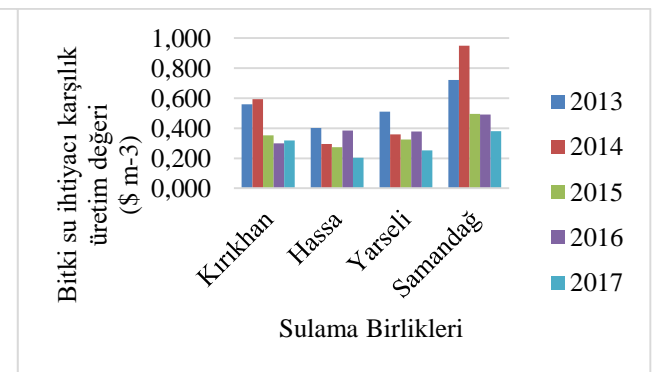
Şekil 8. Sulanan alan üretim değeri(C2)
Figure 13. Output per unit irrigated area

Şebekeye alınan sulama suyuna karşılık üretim değeri (C3): Asi havzasında şebekeye alınan sulama suyuna karşılık üretim (C3) değerleri 2013-2017 yılları arasında 0.190–2.019 \$ m⁻³ aralığında değişmiş ve ortalama C3 değeri 0.585 \$ m⁻³ olarak hesaplanmış ve Şekil 14'te verilmiştir. En yüksek C3 değeri 2014 yılında Kırıkhan sulama birliğinde 2.019 \$ m⁻³ ile gerçekleşirken, en düşük ise 2017 yılında Hassa sulama birliğinde 0.190 \$ m⁻³ olarak saptanmıştır. Córcoles ve ark. (2010) İspanya Castilla-La Mancha bölgesinde 7 sulama birliğinde 2006-2008 yılları verileri ile yapmış oldukları çalışmada şebekeye alınan sulama suyuna karşılık üretim değerini 1.5 ile 3.44 € m⁻³ arasında bulmuşlardır.

Bitki su ihtiyacına karşılık üretim değeri (C4): Asi havzasında bitki su ihtiyacına karşılık üretim değerleri (C4) 2013-2017 yılları arasında 0.203–0.950 \$ m⁻³ aralığında değişmiş ve ortalama C4 değeri 0.427 \$ m⁻³ olarak hesaplanmış ve Şekil 15'te verilmiştir. En yüksek C4 değeri 2014 yılında Samandağ sulama birliğinde 0.950 \$ m⁻³ ile gerçekleşirken, en düşük ise 2017 yılında Hassa sulama birliğinde 0.203 \$ m⁻³ olarak saptanmıştır. Tanrıverdi ve ark. (2011) Türkiye'de 22 sulama birlikleri tarafından işletilen sulama şebekeleri üzerine yapılmış bir çalışmada bitki su ihtiyacına karşılık üretim değerini 0.15-1.85 \$ m⁻³ ortalama ise 0.64 \$ m⁻³ olarak bulmuşlardır.



Şekil 9. Sulama suyu üretim değeri(C3)
Figure 14. Output per unit irrigation water supplied



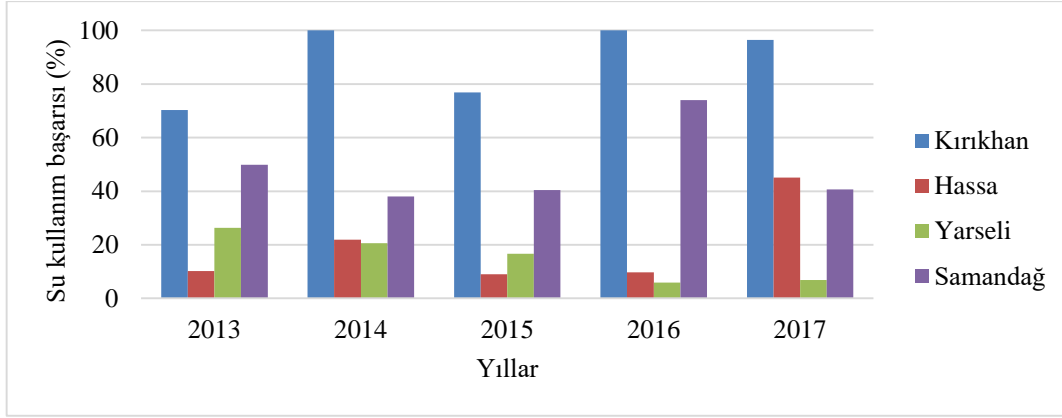
Şekil 10. Bitki su ihtiyacı üretim değeri(C4)
Figure 15. Output per unit irrigation water requirement

Sulama Birliklerinin TOPSİS Yöntemiyle Analizi

Sulama birlikleri su kullanım etkinliği, finansal etkinlik ve üretim etkinliği başarısı olmak üzere 3 performans gösterge grubu ile analiz edilmiştir.

Su kullanım başarısı (%): Araştırma alanında tespit edilen su kullanım başarısı Şekil 16'da verilmiştir. Şekil 16'da görüleceği üzere en düşük değer %

Yarseli Sulama Birliğinde saptanırken, en yüksek değer Kırıkhan Sulama Birliğinde %100 olarak hesaplanmıştır. Su kullanım başarısına etki eden sulama oranından dolayı Kırıkhan Sulama Birliği değerleri yüksek görülürken, pompaj sulaması olması nedeniyle Yarseli Sulama Birliği ile parçalı araziye sahip Hassa Sulama Birliği su kullanım başarısı değerinin çok düşük olduğu saptanmıştır.

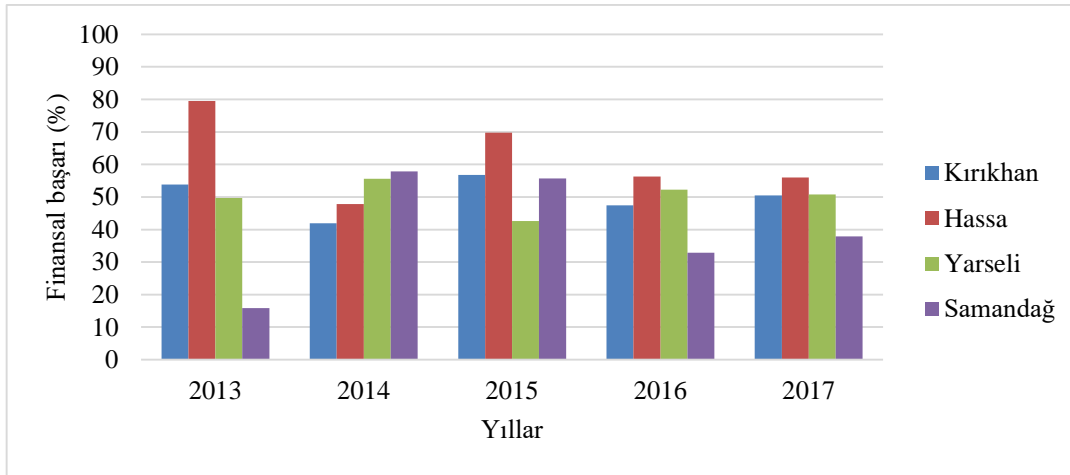


Şekil 11. Su kullanım başarısı

Figure 16. Water use success

Finansal başarı (%): Finansal başarı Asi havzasında 2013-2017 yılları arasında %15-80 arasında değişmiştir. Şekil 17'de gösterilen grafik incelendiğinde, 2013 yılında Hassa sulama birliği %80 ile en iyi finansal başarıya sahipken, 2013

yılında Samandağ sulama birliğinin %15 ile en kötü düzeyde olduğu görülmektedir. Hassa sulama birliğinde finansal başarıya etki eden enerji giderleri hiç olmadığı için, başarı değeri ortalamadan yüksek olarak saptanmıştır.



Şekil 12. Finansal başarı

Figure 17. Financial success

Üretim başarısı (%): Üretim başarısı Asi havzasında 2013-2017 yılları arasında %0-100 arasında değişiklik göstermiştir. Şekil 18'de gösterilen grafik incelendiğinde 2016-2017 yıllarında Samandağ sulama birliği %100 ile en iyi üretim başarısına sahipken, 2013, 2015 ve 2017 yıllarında Hassa sulama birliği %0 ile en kötü düzeyde olduğu görülmektedir. Samandağ sulama birliğinde narenciye bahçeleri bitki deseninde %80 düzeyinde bulunduğu için, üretim başarısına etki eden üretim değerleri yüksek düzeylerde iken, Hassa sulama birliğinde ise sulama oranı düşük olup bitki deseninde hububatın ağırlıklı olmasından dolayı üretim başarısının çok düşük olduğu görülmektedir.

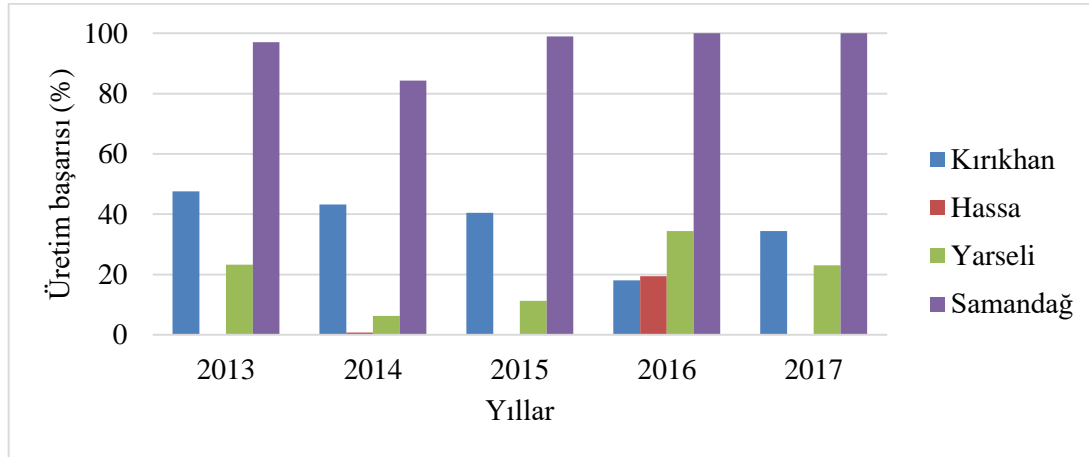
SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada Asi havzasında bulunan sulama şebekelerinde 2013-2017 yılları arasında sulama

alanına dağıtılan yıllık sulama suyu miktarı 14681-2318 m³ ha⁻¹, sulanan alana dağıtılan yıllık sulama suyu miktarı 17715-2678 m³ ha⁻¹, yıllık su temin oranı 0.29-1.61 ve sulama oranı %48-111 aralığında değişmiştir. Türkiye sulama şebekelerinde ortalama sulama oranı %65, 11. Kalkınma Planında 2023 hedefi %68'dir (Anonim, 2019). Bazı yıllarda sulama oranının yüksek olmasının nedeni, ikinci ürün ekimi ve sulama sahası dışında da sulama yapılmasıdır. Araştırma sonucunda sulama birliklerinin finansal etkinliğini belirlemede kullanılan mali yeterlilik oranı %18-86, bakım-onarım masraflarının gelire oranı %9-181, sulama alanına düşen işletme-bakım ve yönetim masrafları 49.17-343.75 \$ ha⁻¹, su ücreti toplama performansı değeri %24-83, sulama alanına düşen enerji masrafları 0-233.96 \$ ha⁻¹, sulanan alana düşen enerji masrafları 0-394.94 \$ ha⁻¹ ve sulama suyu miktarına karşılık enerji masrafları 0-0.03494 \$

m⁻³ olarak hesaplanmıştır. Bazı yıllarda bakım-onarıma istenilen miktarda kaynak ayrılmadığı, sulama ücret toplama oranlarının oldukça düşük olduğu ve enerji giderlerinin arttığı görülmektedir. Araştırmada Asi havzasında bulunan sulama şebekelerinde 2013-2017 yılları arasında sulama alanı üretim değeri 1509–7398 \$ ha⁻¹, sulanan alan

üretim değeri 1948–11262 \$ ha⁻¹, şebekeye alınan sulama suyuna karşılık üretim değeri 0.190–2.019 \$ m⁻³ ve bitki su ihtiyacına karşılık üretim değeri 0.203–0.950 \$ m⁻³ olarak saptanmıştır. Üretim değerleri yıllar ve sulama birlikleri düzeyinde önemli değişim gösterdiği görülmektedir. Bu durum bir üretim-fiyat istikrarsızlığı olarak yorumlanabilir.



Şekil 13. Üretim başarısı

Figure 18. Production success

Asi havzasında 2013-2017 yılları arasında performans göstergelerinin TOPSİS yöntemiyle analizi sonucunda; su kullanım başarısı olarak %6-100 olarak hesaplanırken, en düşük değer 2016 yılında Yarseli Sulama Birliğinde %6, en yüksek değer ise Kırıkhan Sulama Birliğinde 2014-2016 yıllarında %100 olarak hesaplanmıştır. Sulama birliklerinin Finansal başarısı %15-80 arasında değişirken, 2013 yılında Hassa sulama birliği %80 ile en yüksek, Samandağ sulama birliği ise yine 2013 yılında %15 olarak en düşük finansal başarıyı sergilemişlerdir. Üretim etkinliği başarısı %0-100 arasında değişirken, en yüksek 2016-2017 yıllarında Samandağ sulama birliği %100, en düşük 2013, 2015 ve 2017 yıllarında Hassa sulama birliği %0 olarak belirlenmiştir. Hassa sulama birliğinin sorumluluk sahasında sulama altyapı ve su yetersizliği görülmektedir. Bu konuda çalışmalar devam etmektedir. Performans gösterge sonuçları ile TOPSİS yöntemi sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde iki yaklaşımda uyumlu olduğu ve sulama şebekelerinin performanslarının analizinde kullanılmasının yararlı olacağı ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak, sulama birliklerinin başarısı suyun randımanlı kullanımına, sulama altyapısına gerekli bakım onarımın yapılmasına, ürünlerin pazar fiyatlarına bağlıdır. Araştırmada yer alan sulama şebekeleri hiç zaman kaybedilmeden açık kanal sisteminden basınçlı sistemlere dönüştürülmeli, su ücretleri zamanında toplanmalı ve elde edilen toplam gelir içerisinde bakım onarıma ayrılan pay artırılmalıdır. Başarılı bir sulama işletmeciliği için

sulama birliklerinin ve çiftçilerin basınçlı sulama sistemleri hibe destek programlarından yararlanmaları yönünde tarımsal yayım çalışmalarının yaygınlaştırılması ve elde edilecek sonuçların izlenmesi ve değerlendirilmesi önerilebilir.

TEŞEKKÜR

Bu Çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (2018/1-13YLS). Yüksek lisans tez çalışması sonuçlarını içermektedir.

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

- Abbasi M K, Hemati M, Abdolshah M 2008. Analysis and Prioritizing Bank Account with TOPSIS Multiple-Criteria Decision – A Study of Refah Bank in Iran. 21st Australasian Finance and Banking Conference, 25.08.2008, Sydney, Australia
- Abernethy CL 1986. Performance measurement in canal water management: a discussion. Overseas Development Institute (ODI).

- Ağca N, Karanlık S, Ödemiş B 2014. Assessment of Ammonium, Nitrate, Phosphate, and Heavy Metal Pollution in Groundwater from Amik Plain, Southern Turkey. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186(9):5921-5934.
- Aktürk D, Tekiner M, Savran F, Tatlıdil F 2010. Bayramiç-Ezine Sulama Birliğinin Ekonomik Göstergeler İle Sulama Sistem Performansının Değerlendirilmesi. *Türkiye IX. Tarım Ekonomisi Kongresi, Şanlıurfa*.
- Aküzüm T, Çakmak B, Gökalp Z 2010. Türkiye’de Su Kaynakları Yönetiminin Değerlendirilmesi *Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 3(1): 67-74.
- Alcon F, García-Bastida PA, Soto-García M, Martínez-Alvarez V, Martín-Gorriç B, Baille A 2017. Explaining the performance of irrigation communities in a waterscarce region. *Irrigation Science*, 35(3):193-203.
- Anonim, 2013-2017. DSİ’ce İşletilen ve Devredilen Sulama Tesisleri İzleme ve Değerlendirme Raporları, DSİ Genel Müdürlüğü, İşletme ve Bakım Dairesi Başkanlığı.
- Anonim, 2019. On Birinci Kalkınma Planı (2019-2023). Türkiye Cumhuriyeti Cumhurbaşkanlığı Strateji ve Bütçe Başkanlığı, <https://www.sbb.gov.tr/wp-content/uploads/2019/07/OnbirinciKalkinmaPlani.pdf>
- Arslan F, Değirmenci H 2018. Sulama Şebekelerinin İşletme-Bakım ve Yönetim Modernizasyonunda RAP-MASSCOTE Yaklaşımı: Kahramanmaraş Sol Sahil Sulama Şebekesi Örneği. *Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 49(1):45-51.
- Avcı M, Aşık Ş, Ünal HB 1997. Dağıtım Sistemi Performansının Değerlendirilmesine İlişkin Bir Yaklaşım. 6. Kültürteknik Kongresi, 5-8 Haziran, Kirazlıyayla-Bursa, s. 180-184.
- Beyribey M, Sönmez FK, Çakmak B, Oğuz M 1997. Sulama şebekelerinde Sistem Performansının Değerlendirilmesi. 6. Ulusal Kültürteknik Kongresi, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi ve Kültürteknik Derneği, s.172-179, Bursa.
- Burt, C 2001. Rapid Appraisal Process (RAP) and Benchmarking: Explanation and Tools. *Water Control. FAO/Thailand and WB Irrig. Institutions Window Rev. Oct 2002*: <http://www.itrc.org/papers/papersindex.html>
- Chen CT 2000. Extensions of the TOPSIS for Group Decision-Making under Fuzzy Environment. *Fuzzy Sets and Systems*, 114 (1):1-9.
- Chen SJ, Hwang C. 1992. *Fuzzy Multiple Attribute Decision Making: Methods and Applications*. Springer –Verlag- Berlin.
- Çakmak B, Aküzüm T 2006. Türkiye’de Tarımda Su Yönetimi, Sorunlar ve Çözüm Önerileri. *TMMOB İnşaat Mühendisleri Odası Su Politikaları Kongresi*. Ankara. 2, 349-359.
- Çakmak B, Beyribey M 2003. Sakarya Havzası Sulamalarında Sistem Performansının Değerlendirilmesi. *A.Ü. Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 9(1):116-124.
- Değirmenci, H. 2001. Devredilen Sulama Şebekelerinin Karşılaştırma Göstergeleri ile Değerlendirilmesi. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15:31-41.
- Değirmenci, H. 2004. Kahramanmaraş Bölgesinde Bazı Sulama Şebekelerinin Karşılaştırma Göstergeleri İle Değerlendirilmesi, *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi* 7(1):104-110.
- Değirmenci H, Tanrıverdi Ç, Arslan F 2017, Aşağı Seyhan Ovası Sulama Birliklerinin Kümeleme Analizi ile Karşılaştırılması, *KSÜ Doğa Bil. Derg.*, 20(4):326-333.
- Diker C 2018. Aşağı Seyhan Sulama Birliklerinin Değerlendirilmesi. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyosistem Mühendisliği Ana Bilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi*, 42s.
- Eliçabuk C, Topak R 2016. Gevrekli Sulama Birliği’nde Sulama Performansının Değerlendirilmesi. *Selçuk Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*. 3(2):191-199.
- Hwang CL, Yoon P 1981. “Multiple Attribute Decision Making In: Lecture Notes in Economics and Mathematical Systems”, Springer-Verlag-Berlin,
- Jadidi O, Hong TS, Firouzi F, Yusuf RM, Zulkifli N 2008. TOPSIS and Fuzzy Multi-Objective Model Integration for Supplier Selection Problem. *Journal of Achievements in Materials and Manufacturing Engineering*, 312:762-769.
- Kapan E 2010. Asartepe sulama Birliğinde Sulama Performansının Karşılaştırmalı Değerlendirilmesi. *A.Ü. Ziraat Fakültesi Tarımsal Yapılar ve Sulama ABD, Yüksek Lisans Tezi*, Ankara, 74s.
- Kartal S, Değirmenci H 2019a. Performans Göstergelerine Göre Sulama Şebekelerinin Değerlendirilmesi, *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 22(Ek Sayı 1): 222-229.
- Kartal S, Değirmenci H 2019b. Akdeniz Bölgesinde Bulunan Sulama Şebekelerinin Kalite İndeksi ile Değerlendirilmesi. *Mustafa Kemal Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 24:269 – 277.
- Kartal S, Değirmenci H, Arslan F 2020. Assessment of Irrigation Schemes with Performance Indicators in Southeastern Irrigation District of Turkey. *Journal of Agricultural Sciences*, 26 (2):138-146.
- Kartal S, Arslan F, Değirmenci H 2020. Sulama Şebekelerinde Bakım Performansının Değerlendirilmesi: Yozgat İli Örneği. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.*, 52(1):36-45.
- Li DF 2010. TOPSIS-Based Nonlinear-Programming Methodology for Multiattribute Decision Making with Interval-Valued Intuitionistic Fuzzy Sets. *IEEE Transactions on Fuzzy Systems*, 18(2):299-311.

- Lin MC, Wang CC, Chen MS, Chang CA 2008. Using AHP and TOPSIS approaches in customer-driven product design process. *Computers in Industry* 59:17-31.
- Madumjar A, Sarkar B, Madumjar PK 2005. Determination of quality value of cotton fibre using hybrid AHP-TOPSIS method of multi-criteria decision-making. *The Journal of The Textile Institute* 96(5):303-309.
- Molden DJ, Sakthivadivel R, Perry CJ, Fraiture CD, Kloezen WH 1998. Indicators for Comparing Performance of Irrigated Agricultural Systems. IWMI, Research Report 20, Colombo, 26 p.
- Moreno MA, Ortega F, Co'rcoles JI, Mart'inez A, Tarjuelo JM 2010. Energy analysis of irrigation delivery systems: monitoring and evaluation of proposed measures for improving energy efficiency. *Irrig Sci.*, 28:445-460.
- Ömürbek N, Makas Y, Ömürbek V 2015. AHP ve TOPSIS Yöntemleri ile Kurumsal Proje Yönetim Yazılımı Seçimi. *Süleyman Demirel Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü Dergisi*, 1(21):59-83.
- Özfidaner M, Gönen E, Kartal S 2020. Adana ilinde TOPSIS yöntemi ile kuraklık analizi. *Mediterranean Agricultural Sciences*, 33(1):101-106.
- Rodríguez-Díaz JA, Camacho-Poyato E, Lopez-Luque R, PérezUrrestarazu L 2008. Benchmarking and multivariate data analysis techniques for improving the efficiency of irrigation districts: an application in Spain. *Agri System*, 96(1-3): 250-259.
- Saaty Thomas L, 2004. Decision Making - The Analytic Hierarchy and Network Processes (AHP/ANP). *Journal of Systems Science and Systems Engineering*, 13(1):1-35.
- Shrestha S, Aquino FY, Pandey VP 2014. Performance Evaluation of the Telagasari Irrigation Scheme (TIS) of Karawang Regency, Indonesia. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 12 (3-4): 187-197.
- Shyjith K, Ilangkumaran M, Kumanan S 2008. Multi-criteria decision-making approach to evaluate optimum maintenance strategy in textile industry. *Journal of Quality in Maintenance Engineering* 14(4):375-386.
- Smith M 1990. Introduction to Irrigation System Performance: Comparative Analysis of Case Studies Studies. Improved Irrigation System Performance for Sustainable Agriculture, Proceedings of the Regional Workshop Organized by FAO in Bangkok, Thailand 22-26 October, p. 25-35, Rome.
- Tanrıverdi T, Degirmenci H, Sesveren S 2011. Assessment of irrigation schemes in Turkey based on management types. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 10(11), pp. 1997-2004.
- Tsaur SH, Chang TY, Yen CH 2002. The Evaluation of Airline Service Quality by Fuzzy MCDM. *Tourism Management*, 23: 07-115.
- Ustasüleyman T 2009. Bankacılık sektöründe hizmet kalitesinin değerlendirilmesi: Ahs-Topsis Yöntemi. *Bankacılar Dergisi* 69:33-43.
- Yavuz MY, Kavdır İ, Delice NY 2006. Performance Evaluation of Water Users Associations: A Case Study of The Lower Seyhan Basin. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 10 (3/4):35-45.
- Yaralıoğlu K 2001. Performans Değerlendirmede Analitik Hiyerarşi Prosesi. *Dokuz Eylül Üniversitesi İ.İ.B.F. Dergisi*, 16(1):129-142.
- Yurdakul M, İç YT 2003. Türk otomotiv firmalarının performans ölçümü ve analizine yönelik TOPSIS yöntemi kullanan bir örnek çalışma. *Gazi Üniversitesi Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Dergisi* 18(1):1-13.
- Yükçü S, Atağan G 2010. TOPSIS Yöntemine Göre Performans Değerleme. *Muhasebe ve Finansman Dergisi* 45:28-35.
- Zema DA, Filianoti P, D'Agostino D, Labate A, Lucas-Borja ME, Nicotra A, Zimbone SM 2020. Analyzing the Performances of Water User Associations to Increase the Irrigation Sustainability: An Application of Multivariate Statistics to a Case Study in Italy. *Sustainability* 12 (6327):1-18.
- Wang JW, Cheng CH, Kun-Cheng H 2009. Fuzzy hierarchical TOPSIS for supplier selection. *Applied Soft Computing* 9:377-386.

The Effects of Two-Step Tempering Treatment on the Physical, Chemical and Technological Properties of Flour in Bread Wheats (*Triticum aestivum* L.)

Mustafa KURT¹, Halef DIZLEK²

¹KOSGEB Osmaniye İl Müdürlüğü, Osmaniye, Türkiye, ²Osmaniye Korkut Ata Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, 80000 Osmaniye, Türkiye

¹<https://orcid.org/0000-0001-5849-6043>, ²<https://orcid.org/0000-0001-5873-5462>

✉: hdizlek@osmaniye.edu.tr

ABSTRACT

In this study, the effects of two-step tempering treatment on the physical, chemical and physicochemical characteristics of bread wheat (*Triticum aestivum* L.) flour were investigated. Two wheat varieties (Adana-99 and Russian) with different variety properties were used in the research. Each wheat variety was subjected to four different tempering treatments. These treatments were; a. no tempering (control), b. single-step tempering for 24 h, c. single-step tempering for 48 h and d. two-step tempering for 48 h. Following the treatment procedures, flour samples obtained from wheat samples fed to the mill were subjected to chemical and technological analyses two days after the flour samples were obtained. Results indicated that the tempering treatment had a limited improvement in the physical (flour yield and color) and chemical properties of the flour. It was found that, the tempering treatment reduced the ash and protein contents of the flour samples, however it resulted in an increase in the gluten quality. Tempering treatment for 48 h among single-step tempering treatments resulted in more improved flour quality. The findings conclude that, when water added to the wheat in the tempering process in two steps results in an improved flour quality. However, further studies are needed to elucidate the mechanism.

Research Article

Article History

Received : 11.02.2021
Accepted : 29.04.2021

Keywords

Bread wheat
Tempering process
Two-step tempering
Flour characteristics
Flour parity

Ekmeklik Buğdaylara (*Triticum aestivum* L.) İki Aşamalı Uygulanan Tavlama İşleminin Unun Fiziksel, Kimyasal ve Teknolojik Özelliklerine Etkileri

ÖZET

Bu çalışmada; ekmeklik buğdaya (*Triticum aestivum* L.) iki aşamalı uygulanan tavlama işleminin buğday ununun fiziksel, kimyasal ve fizikokimyasal özellikleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Araştırmada, çeşit özellikleri farklı iki buğday örneği (Adana-99 ve Rus) kullanılmıştır. Her bir buğday çeşidi tavlama ile ilgili dört ayrı muameleye tabi tutulmuştur. Bu uygulamalar; a. tavsız (kontrol), b. 24 saat süreyle tek aşamalı tavlama, c. 48 saat süreyle tek aşamalı tavlama ve d. 48 saat süreyle iki aşamalı tavlama. Söz konusu muameleler neticesinde değirmene beslenen buğday örneklerinden elde edilen un numuneleri iki gün sonra kimyasal ve teknolojik analizlere tabi tutulmuştur. Bulgular şu şekilde özetlenebilir: Tavlama muamelesi unun fiziksel (un randımanı ve renk) ve kimyasal özelliklerinde sınırlı iyileşme sağlamıştır. Yine, tavlama muamelesi un örneklerinin kül miktarında daha belirgin olmak üzere protein miktarında azalmaya, ancak gluten kalitesinde ise artışa yol açmıştır. Tek aşamalı tavlama örnekleri arasında 48 saat süreyle tavlama un niteliklerini daha fazla geliştirmiştir. Bulgular, tavlama prosesinde buğdaya verilen su miktarının kademeli olarak iki defada verilmesinin un niteliklerini geliştirme noktasında daha iyi sonuç sağladığını ortaya koymuştur. Ancak, bu mekanizmayı aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 11.02.2021
Kabul Tarihi : 29.04.2021

Anahtar Kelimeler

Ekmeklik buğday
Tavlama prosesi
İki aşamalı tavlama
Un özellikleri
Un paritesi

To Cite: Kurt M, Dizlek H 2022. The Effects of Two-Step Tempering Treatment on the Physical, Chemical and Technological Properties of Flour in Bread Wheats (*Triticum aestivum* L.). KSÜ J. Agric Nat 25 (1): 181-190. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.878636>

INTRODUCTION

Cereals are the main food raw materials that people have consumed since ancient times. Wheat is a major raw material used in the production of many bakery products, especially bread, and has a unique place in cereals due to its unique characteristics, unlike other cereal flours (Dunn et al., 2015). In Turkey, as in many countries, wheat ranks first among cereals in terms of both cultivation area and production quantity (20.5 million tones according to 2020-year data; [Anonim, 2021]). It is an important culture plant due to its ease of cultivation, its adaptability of conversion to wide variety of foods and its role in nutrition.

Wheat grain is anatomically formed from outside to inside bran (13-17%), germ (2-3%) and endosperm layers (80-85%; [Delcour and Hosney, 2010]). The aim of wheat milling is to separate the endosperm (flour or semolina) from the bran and germ layers. The processing of wheat in flour and semolina in milling can be grouped under three major groups: a) Preparation processes (buying and storing of wheat, cleaning, and separating it from foreign substances, blending, washing [if necessary], and tempering), b) Milling (grinding) operation (with the help of sieving tools and semolina-bran purification devices with crushing [breaking] and reducing rolls) and c) Flour storage and blending operations. All these process steps affect milling products' qualitative and quantitative properties (flour, semolina, starch, bran, germ, bran quality) to be obtained (Kent, 1984; Delcour and Hosney, 2010). Additionally, the labor and the rigor shown in the preparation processes help obtain high-quality flour and semolina. Also, there is overall reduction in energy consumption of the milling factory and these results in roller-sieve systems to be used efficiently and an increased life span. For these reasons, preparation processes in milling are the processes that need to be considered. In these processes, tempering has a special and important place in cereal industry.

The optimum amount of water is supplied to the grain by means of the tempering process to make the physical characteristics of the wheat grain suitable for milling and to improve the milling quality. Then the wheat stack is rested in the silos for a certain time to equilibrate the moisture content and allow evenly distribution, which will result in optimum properties for milling (until the optimum moisture distribution and milling properties are reached for milling). The water supplied to the wheat by tempering, enters the grain through diffusion and spreads (Keskinoglu et al., 2001). In this way, bran

(shell) having a very rigid structure is broken more easily by achieving an elastic structure (the energy consumption of the milling factory is reduced) and the loosening of the bond between the bran and the endosperm layers of the grain, which are tightly bonded to each other, is easier to separate from the flour (Cornell and Hoveling, 1998; Yoo et al., 2009; MacRitchie, 2010). Tempering process; it should be such that it balances flour extraction and bran ratio (Hook et al., 1982; Kweon et al., 2009). Many factors such as grain hardness, initial moisture of wheat, time to be applied, lying time, amount and temperature of water, quality and quantity of intermediate product to be obtained are effective on tempering (Cornell and Hoveling, 1998; MacRitchie, 2010).

As is known, the quality of the bread made from the new milled flour is relatively low. These flours need to be rested for a while to improve their bread making performance. For the flour to mature under normal conditions, the flour should be rested for 3-4 weeks after the milling process. Flour maturing and bleaching chemical agents (such as chlorine gas, benzoyl peroxide, potassium bromate and azodicarbonamide) may be carried out within a few hours of desirable improvements. The flours treated in this way are less resistant to long-time storage than those not treated (Dizlek and Kurt, 2017). Although these chemicals provide serious advantages to the wheat milling factories according to the natural bleaching of the flour; flour storage area and saving time, they have the potential risk / problem in terms of human health and thus limit the use of these substances today.

Tempering has a great effect, especially at the point of lowering the ash content of flour. Flour export in Turkey has an increasing momentum in recent years. At present, whiter flours with higher parity are preferred in flour exports to the Middle East from Turkey. Therefore, the importation of flour by wheat milling industry, which has started to make wheat importation and which provides value added by processing this wheat in particular flour and sometimes semolina, is the color of white matter which is emphasized by importers (Kurt and Dizlek, 2020). For this reason, in the study, an application was used (wheat has been tempered by two-steps) that can be important in terms of providing flour to support flour export. Thus - in the pilot scale - it is tried to produce high parity flour that has low color and ash values. Briefly, in the study it is aimed to bleach the flour with a natural method. The possible good results of this application may be an alternative to the use of chemicals which are frequently used in

bleaching of flour color but which are risky. In addition, improper tempering; increases the volume of tempering silos, extends the tempering period, increases the number of mechanization units; increases investment, labor and maintenance costs and increases the energy and cost spent for grinding.

The rate of moisture movement into the kernels, tempering time, tempering water temperature and different tempering methods (warm, hot, steam, microwave, ultrasound etc.) have been emphasized in the previous studies (Butcher and Stenvert, 1973; Stenvert and Kingswood, 1976; Moss, 1977; Finney and Bolte, 1985; Ertugay et al., 1995a; 1995b; 1995c; Cornell and Hoveling, 1998; Ibanoglu, 2001; Keskinoglu et al., 2002; Sünter, 2003; Kweon et al., 2009; Warechowska et al., 2016). The amount of water to be supplied to the wheat mass during tempering is usually given at single-step. However, in this study, two bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties with different degrees of hardness were subjected to the two-step tempering process as well as classical (single-step) tempering process. In this way, the effect of the two-step tempering process applied to the bread wheat on the physical, chemical and technological properties of the flour was investigated.

MATERIAL and METHODS

Materials

Wheat: In the study, two different bread wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties namely a low-protein, soft 'Russian' variety imported from Russia and a domestic, medium hard 'Adana-99' wheat variety were used. Both wheat samples are 2017 crop season; The Adana-99 variety was supplied from İslamoğlu Trade in Osmaniye (Turkey) and the Russian variety was supplied from Sunar Özlem Flour Factory (Osmaniye, Turkey). Approximately 100 kg of each wheat variety was supplied. The samples taken from the wheat masses in accordance with the sampling method were stored in 50 kg jute bags and stored in cold storage (+4 °C) until they were analyzed and ready for milling.

Flour: After applying different tempering processes to the two wheat varieties, the wheat varieties were milled according to method (Kurt and Dizlek, 2020) described in method section to obtain subsequent flours.

Water: Potable water supplied within the campus of University of Osmaniye Korkut Ata (Osmaniye, Turkey) was used in tempering process of the wheat samples.

Laboratory Type Mill: Wheat samples were milled into flour by using; the first three pieces of crushing (breaking), the last two reducing rolls, a total of five rolls of 'Chopin' brand 'CD1' model tempered wheat grinding mill (Chopin Technologies, Paris, France).

Formation of Experimental Wheat Groups

The target moisture content of the Adana-99 wheat used in the study was 17% and the Russian wheat was 16.5%. The amount of tempering water for given masses of wheat was calculated according to American Association of Cereal Chemists International (AACCI) Method 26-95.01 (AACCI, 2010). Wheat samples were tempered with cold tap water. Within the scope of this research, the experimental materials and the pattern were formed by applying the following different tempering treatments in each of the two bread wheat varieties whose qualities are different:

- a) no tempering (= control)
- b) single-step tempering for 24 h (The amount of water calculated according to the target moisture is given to the wheat at one time and tempered for 24 h)
- c) single-step tempering for 48 h (The amount of water calculated according to the target moisture was given to the wheat in one time and tempered for 48 h)
- d) two-step tempering for 48 h (Adana-99 and Russian wheat were initially treated with 15% and 15.5%, respectively, with the first tempering water and resting for 24 h. At the end of the 24 h period, second tempering water added to Adana-99 and Russian wheat to a target moisture of 17% and 16.5%, respectively (In summary, the wheat samples were tempered two times and the final moisture content of the wheat was adjusted to the percentage in b) and c)).
- e) The flour obtained from wheat, (tempered according to item d)), was rested in cool and dry room conditions for 30 days (Wheat flour that has been tempered two-step for 48 h and kept in room conditions for 30 days).

Milling Process

Optimally tempered wheat samples were separately milled into flour using a laboratory mill. The milling consisted of two parts: crushing and reduction. Cleaned and tempered wheat was first broken by the crushing system, and then semolina, coarse bran and some crushed flour were separated from crushed wheat. The semolina obtained as the main product was reduced to the flour by milling in the reduction system and divided into refined bran by-products. The separated refined bran was passed through the reduction system for a second time to obtain whole flour (breaking flour + first reduction flour + second reduction flour). These flour samples were used for chemical and technological analyses. Flour samples obtained from crushing and reduction systems were weighed and the flour yields were calculated as % by proportioning to the amount of milled wheat that was to the initial cleaned and tempered wheat (Kurt and Dizlek, 2020).

Analysis of Wheat Samples

To determine the physical properties of wheat samples; the percentage of sunn pest damaged grain (Dizlek and Ozer, 2016a); hectoliter weight, thousand kernel weights, kernel vitreousness analyses were established according to procedure Uluöz (1965); in addition, flour yield was calculated. The chemical properties of wheat samples were also determined. For this purpose; moisture, crude protein (AACCI Method 39-25.01 [AACCI, 2010]) and starch contents of the wheat samples were determined by using NIR method (Near infrared reflection spectroscopy; NIR Analysis System, Perten Diode Array 7250, Stockholm, Swedish).

Analysis of Flour Samples

In this study, in order to determine some of the chemical properties of the flour samples obtained from five different tempering treatment methods; the amounts of ash (AACCI Method 08-01.01 [AACCI, 2010]), crude protein and moisture (AACCI Method 39-11.01 [AACCI, 2010]) and damaged starch (by the NIR method) were determined. Color values of flour samples were also determined. For determination of the physicochemical properties of flour samples; which are important for bread-making, wet and dry gluten amounts (with near-infrared spectroscopy [Yildirim et al., 2018]), Zeleny sedimentation test (AACCI Method 56-60.01 [AACCI, 2010]), delayed Zeleny sedimentation test (Greenaway et al., 1965) and falling number values (AACCI Method 56-81.03 [AACCI, 2010]) were determined. All analyses applied to flour samples were determined two days after flour milling. In the study, tempered flour from each treatment group (single-step 24 h, single-step 48 h,

two-step 48 h, two-step 48 h and kept in room conditions for 30 days) was compared with the flour of non-tempered group (control).

Statistical Analysis

All experiments (different tempering treatments applied to wheat samples and analyses) were carried out in two replicates. In the experiments, variance of analysis (ANOVA) was used to obtain conclusion on measured characteristics of wheat and flour samples. When a significant difference was found between the treatments, Duncan's multiple comparison tests was used to determine the difference among treatment means at $P < 0.05$. Statistical analysis was performed using the statistical package program developed by the SAS statistical institute (The SAS System for Windows v6.12; SAS Institute, 1982).

RESULTS and DISCUSSION

Basic Characteristics of Wheat Samples

The average values for the physical and chemical properties of two different wheat samples used in the study are presented in Table 1. It has been determined that both wheat varieties are exposed to about 2% sun pest damage ratios. The weight of thousand kernels of both wheat samples was found to be relatively high. Hectoliter weight values indicate that both wheat samples according to Turkish Standards Institution wheat standard (TS 2974; TSE, 2018) are included in the first quality bread wheat class. The yield of Adana-99 wheat variety from wheat samples passed through only two reducing rolls was 52.3% and the flour yield of Russian wheat variety was 61.3%.

Table 1. The average values for the physical and chemical properties of two different wheat samples used in the study.
 Çizelge 1. Çalışmada kullanılan iki farklı buğday örneğinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine ait ortalama değerler.

| Wheat Variety (Buğday Çeşidi) | Sunn Pest Damage Ratio (Süne Emgi Oran) | Thousand Kernel Weight (1000 Tane) | Hectoliter Weight (Hektolitre Ağırlığı) | Flour Yield (Un Verimi) | Vitreous Kernel Ratio (Çamsı Tane) | Translucent Kernel Ratio (Dönme Tane) | Mealy Kernel Ratio (Unsu Tane) | Moisture Content (Nem Miktarı) | Protein Content (Prot ein Miktarı) | Starch Content (Nişasta Miktarı) |
|-------------------------------|---|------------------------------------|---|-------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|
| Adana-99 | 1.92±0.07 | 37.0±0.8 | 83.1±0.6 | 52.3±0.5 | 45±3 | 49±4 | 6±2 | 12.8±0.1 | 13.0±0.1 | 62±3 |
| Russian | 2.15±0.06 | 40.5±0.8 | 82.7±0.3 | 61.3±0.8 | 15±2 | 39±3 | 46±3 | 14.1±0.1 | 10.7±0 | 63±4 |

¹ Calculation based on dry matter basis.

² It was calculated by, milling with using 3 crushing and 2 reducing rolls in CD1 mill and sieving through the mill's own sieve.

The data of the kernel vitreousness analysis revealed that the Adana-99 wheat variety had a relatively hard grain structure whereas the Russian wheat variety had a soft grain structure (Table 1). Data on kernel vitreousness reveals that the characteristics of the two wheat samples discussed in the experiment are different from each other. This situation serves the purpose of planning and implementation of the study. From both wheat samples exposed to the same

number of crushing and reducing rolls, as expected, the flour yield of the Russian wheat variety was found to be as high as 17% compared to the Adana-99, which had a hard grain structure. This finding is consistent with the literature findings and reports (Kent, 1984; Delcour and Hosney, 2010). Namely; more energy is required to obtain a sufficient amount of flour and semolina yield by milling hard wheat. Yet, wheat samples were milled in the same

laboratory mill (they were exposed to the same energy consumption) and flour yield of Adana-99 wheat variety was found low.

The weight of hectoliter used in transport and storage of wheat varies depends on wheat type, variety, shape, density, foreign matter content, size and with the characteristics of the spring-winter. The weight of a thousand kernels varies depending on the wheat type and the climate, gives an idea of the size of wheat grains and that they are weak or plump (Uluöz, 1965). In milling, it is desirable to have high data for each of the two measurements. Because the thousand kernel and hectoliter weights are positively correlated with flour yield (Kinaci and Kinaci, 2004; Dizlek and Ozer, 2016a). Although it is a hard and soft feature of the grain depends on wheat variety, it also shows great changes according to growing conditions. Generally, the quality and quantity of gluten in hard-grained wheat is high. The amount of moisture is an important criterion for trade and storage of wheat; depends on climate and storage conditions where wheat grown. The amount of protein in wheat depends on the type, variety, environmental conditions (climate, soil, disease and pests) and production conditions (fertilization quantity and type, irrigation, machine farming) varies between 8-20%.

In wheat, the amount and composition of the ash vary depending on the type and varieties, the amount of mineral matter in the soil where the wheat grows, its ability to be taken by the plant, the condition of fertilization and the climate (Kent, 1984).

Moisture content of Adana-99 wheat is below 14%, which can be stored safely (Kent, 1984). The moisture content of Russian wheat is at the critical limit. The initial moisture content of both wheat samples was found to be relatively high. It was thought that it might be effective for the wheat to absorb some moisture from the environment during storage in the cold storage. The amount of protein varying depending on properties of wheat variety and genetic factors, as expected, high in Adana-99 wheat variety (13%), Russian wheat variety was found to be relatively low (10.7%). In relation to the amount of protein, the starch amount of Adana-99 wheat is relatively lower than that of Russian wheat (Table 1). By analyzing the data of Table 1 together; it is concluded that the wheat sample of Adana-99 is medium hard quality wheat, while Russian is relatively soft bread wheat. Both types have superior physical properties; in this sense, thousand kernel, hectoliter weights and flour yields were found to have high values.

Table 2. Some physical and chemical properties of wheat flours milled with different tempering treatments¹.

Çizelge 2. Farklı tavlama muameleleriyle öğütülmüş buğday unlarının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri¹.

| Wheat Variety (Buğday Çeşidi) | Tempering Treatment (Tavlama Muamelesi) | Moisture Content (Nem Miktarı) (%) | Ash Content (Kül Miktarı) (%) | Protein Content (Protein Miktarı) (%) | Damaged Starch (Zedelenmiş Nişasta) (%) ² | Color Properties (Renk Özellikleri) | | | Flour Yield (Un Verimi) (%) ³ |
|-------------------------------|---|------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------|----------|--|
| | | | | | | L* | a* | b* | |
| Adana-99 | non-tempered (control) | 13.0 ^c ±0.1 | 0.75 ^a ±0.02 | 11.5 ^a ±0.3 | 3.1 ^c ±0.1 | 90.38 ^d ±0.2 | 0.36 ^a ±0 | 8.46±0.5 | 52.3 ^c ±0.3 |
| | single-step tempered for 24 h | 5.7 ^a ±0.4 | 0.61 ^b ±0.02 | 10.9 ^a ±0 | 5.6 ^a ±0.2 | 93.43 ^a ±0.3 | 0.14 ^d ±0 | 7.65±0.5 | 53.6 ^b ±0.3 |
| | single-step tempered for 48 h | 5.2 ^a ±0.3 | 0.63 ^b ±0.02 | 11.1 ^b ±0.1 | 5.2 ^a ±0.2 | 92.54 ^b ±0.2 | 0.20 ^c ±0 | 7.74±0.6 | 55.7 ^a ±0.7 |
| | two-step tempered for 24 h | 5.4 ^a ±0.3 | 0.63 ^b ±0.01 | 11.3 ^{ab} ±0.2 | 4.4 ^b ±0.1 | 91.49 ^c ±0.3 | 0.29 ^b ±0 | 8.43±0.4 | 51.9 ^c ±0.5 |
| | two-step tempered for 48 h (rested for 30 days) | 3.5 ^b ±0.1 | 0.63 ^b ±0.02 | 10.9 ^c ±0.1 | 4.3 ^b ±0.1 | 92.77 ^{ab} ±0.2 | 0.17 ^{cd} ±0 | 8.06±0.6 | |
| Russian | non-tempered (control) | 4.2 ^b ±0.2 | 0.59 ^a ±0.01 | 8.8 ^{ab} ±0.2 | 4.5 ^d ±0 | 93.04 ^c ±0 | 0.12 ^a ±0 | 7.93±0.5 | 61.3 ^c ±0.3 |
| | single-step tempered for 24 h | 5.0 ^a ±0.1 | 0.56 ^b ±0 | 8.6 ^b ±0 | 5.4 ^b ±0.1 | 94.36 ^a ±0.3 | 0.08 ^b ±0 | 7.18±0.4 | 60.8 ^a ±0.5 |
| | single-step tempered for 48 h | 5.2 ^a ±0.3 | 0.54 ^c ±0 | 8.8 ^{ab} ±0.2 | 6.0 ^a ±0.1 | 94.14 ^a ±0.3 | 0.08 ^b ±0 | 7.61±0.3 | 63.4 ^a ±0.2 |
| | two-step tempered for 24 h | 5.5 ^a ±0.5 | 0.52 ^d ±0.01 | 9.0 ^a ±0.2 | 4.8 ^c ±0.1 | 93.19 ^b ±0.1 | 0.13 ^a ±0 | 8.15±0.5 | 62.8 ^b ±0.1 |
| | two-step tempered for 48 h (rested for 30 days) | 3.6 ^c ±0.1 | 0.52 ^d ±0 | 8.5 ^b ±0.1 | 4.8 ^c ±0.1 | 94.35 ^a ±0.2 | 0.06 ^c ±0 | 7.72±0.5 | |

¹ Mean values in the same column and same wheat varieties (Adana-99 or Russian) followed by different superscript letters are significantly different (P<0.05).

² It is given on the dry matter basis.

³ It was calculated by, milling with using 3 crushing and 2 reducing rolls in CD1 mill and sieving through the mill's own sieve.

Effects of Different Tempering Treatments on Physical and Chemical Properties of Flour

Some physical and chemical properties of wheat flour milled with different tempering treatments are given in Table 2. Applying tempering process to both wheat

samples and followed milling, moisture content of flour was found higher than non-tempered control sample. In the case of relatively high (15% to 15.7%) moisture values of flour samples; the fact that the flour was not rested and the moisture analysis was

carried out on the second day following the milling were effective. It was determined that the moisture content of the wheats was reduced to a reasonable rate (13.5%-13.6%) after the flour of the two-step tempered wheats were rested for 30 days.

As expected, the amount of ash obtained from wheat samples decreased with the application of tempering (Table 2). In the Adana-99 wheat, different number (1 and 2) and time (24 and 48 h) the tempering process did not cause a change in the amount of ash in itself, whereas in Russian wheat sample the amount of ash samples decreased in parallel with the increase in the number and duration of the tempering ($P < 0.05$). The finding obtained from the study of the tempering process which is easier to break the wheat by loosening the rigid bond between the shell and the endosperm layers of wheat and to obtain the high yield flour with low-ash color values is consistent with the literature finding (Ibanoglu, 2001). It was determined that the data of the ash analysis were consistent with the findings of the physical analysis of the samples. Accordingly, the ash content of Adana-99 wheat flour, which has a hard grain structure and low flour yield, is significantly higher than Russian wheat flour.

As expected in the Adana-99 sample, the amount of protein of non-tempered wheat samples was higher than that of tempered wheat samples. This indicates that the bran contamination of the non-tempered wheat is more. Different time and number of tempering treatments resulted in easier separation of the endosperm from the crust and thus decreased protein content of the flour samples. As a matter of fact, the shell (bran) layer of wheat contains higher rates of protein than the endosperm (flour) layer (Kent, 1984; Delcour and Hosney, 2010). There was no meaningful relationship between protein values of flour of Russian wheat samples. More limited variation was observed between the protein amounts of the tempering treatments of the Russian variety according to the Adana-99 sample (Table 2).

In both wheat samples, it was determined that the tempering treatment increased the amount of damaged starch compared to the control sample. It has been found that once made tempering has increased starch damage in both Adana-99 and Russian wheat more than the tempering process performed twice.

As expected, the tempering process was found to cause bleaching of flour color (Table 2). In both wheat flour samples, it was determined that the control sample had a darker color than the tempered samples. It was found that there was a significant relation between L^* values and ash amount of flour samples. Flour samples that were rested for 30 days were found to be lighter color compared to untreated flour samples. In this situation, it is thought that

resting with oxidation event is effective in natural bleaching of flour. The negative correlation was found between the amount of ash obtained from the study and the L^* value, and a positive correlation was found with a a^* value. It was observed that the data were consistent with the findings of Alfin and Çakmaklı (1999). Reduction in redness of flour samples was observed with the treatment of tempering. It has been found that this situation is consistent with the amount of ash as explained above. However, the redness value of the flours of wheat samples, two-step tempered for 48 h, increased. This increase led to the same red value as the control sample of the Russian wheat variety obtained by the said treatment. In both wheat flour samples; a meaningful relationship was not found between b^* color values and tempering treatments. However, in general, the control samples were observed to have a more yellowish color than the other three samples except sample with two-step tempered for 48 h. By examining the effect of different tempering treatments on the amount of flour obtained from wheat samples, it was determined that the samples which were tempered once for 48 h in both varieties had the highest flour yield. The tempering process did not affect flour yield in Adana-99 variety but increased the total flour yield by 1.5% in Russian variety. Investigation of flour yield findings together: the tempering process increases the flour yield of the wheat samples as can be expected, the two-step tempering process does not show the expected benefit at the point of increasing efficiency, once the tempering process is better, but it is more effective for 48 h - both wheat varieties. Hook et al. (1982); who study on the subject, reported that an increase in the amount of tempering water in wheat grain reduced the yield of flour. Therefore, the researchers stated that the tempering process should be balanced in such a way that the flour yield and the ratio of bran in the flour are acceptable. The data obtained from this study were partially conducted by Hook et al. (1982). This situation is thought to be caused by the different types of wheat used in the studies and the amount of water given in tempering process.

Effects of Different Tempering Treatments on the Technological Properties of Flour Physicochemical properties of flour samples are presented in Table 3. In Adana-99 sample, the wet gluten amount of non-tempered wheat flour was found to be higher than the tempered treatments. This situation is thought to be caused by easier treatment of crust-endosperm decomposition and easier obtaining of pure endosperm flour. The amount of the gluten proteins increases from the center outward in the endosperm (Delcour and Hosney, 2010). For this purpose, a relatively high concentration of aleurone layer and endosperm outer layer flours were found to be

relatively high in non-tempered wheat flour samples. It has been found that the wet gluten of wheat flour sample with two-step tempered for 48 h is relatively higher than the other tempered treatments. However, it was found that there was no significant difference ($P>0.05$) between the tempering treatments in terms of wet gluten content. In the Russian sample, it was observed that there was no statistical difference in wet gluten amount between five different treatments. Generally, dry gluten values were found to be compatible with wet gluten values and it was

determined that there was a limited variation in dry gluten content between tempering treatments. The quantity and quality of the gluten; is one of the most important quality criteria for wheat and it is one of the most important factors affecting the dough: kneading, processing properties, gas holding capacity and final product quality (Park et al., 2006; Delcour and Hosney, 2010; Dizlek and Ozer, 2016b; 2017; Girard et al., 2019). It is desirable for a bread flour to have high gluten quantity and quality (Dizlek and Ozer, 2016 a; b).

Table 3. Physicochemical properties of wheat flours milled with different tempering treatments¹.

Çizelge 3. Farklı tavlama muameleleriyle öğütülmüş buğday unlarının fizikokimyasal özellikleri¹.

| Wheat Variety (Buğday Çeşidi) | Tempering Treatment (Tavlama Muamelesi) | Wet Gluten Content (Yaş Gluten Miktarı) (%) | Dry Gluten Content (Kuru Gluten Miktarı) (%) | Sedimentation Value (Sedimentasyon Değeri) (ml) | Delayed Sedimentation Value (Gecikmeli Sedimentasyon Değeri) (ml) | Falling Number Value (Düşme Sayısı Değeri) (s) |
|-------------------------------|---|---|--|---|---|--|
| Adana-99 | non-tempered (control) | 28.5 ^a ±0.4 | 9.2 ^a ±0.1 | 38 ^a ±1 | 31 ^c ±0 | 337±21 |
| | single step tempered for 24 h | 27.0 ^b ±0.2 | 8.9 ^b ±0 | 36 ^{ab} ±1 | 41 ^a ±1 | 344±18 |
| | single step tempered for 48 h | 27.3 ^b ±0.2 | 9.0 ^{ab} ±0.1 | 38 ^a ±1 | 38 ^a ±2 | 344±21 |
| | two-step tempered for 24 h | 27.9 ^{ab} ±0.3 | 9.1 ^a ±0.1 | 34 ^b ±1 | 39 ^a ±2 | 349±19 |
| | two-step tempered for 48 h (rested for 30 days) | 27.3 ^b ±0.2 | 8.8 ^b ±0.1 | 30 ^c ±1 | 34 ^b ±1 | 362±20 |
| Russian | non-tempered (control) | 21.6±0.4 | 6.7 ^b ±0.1 | 32 ^a ±1 | 20 ^b ±1 | 356±24 |
| | single step tempered for 24 h | 21.5±0.5 | 6.8 ^{ab} ±0 | 30 ^a ±1 | 33 ^a ±2 | 351±19 |
| | single step tempered for 48 h | 21.5±0.3 | 6.9 ^a ±0.1 | 27 ^b ±0 | 34 ^a ±2 | 363±19 |
| | two-step tempered for 24 h | 22.0±0.4 | 7.0 ^a ±0.1 | 31 ^a ±1 | 32 ^a ±3 | 378±21 |
| | two-step tempered for 48 h (rested for 30 days) | 21.3±0.4 | 6.6 ^b ±0.1 | 25 ^c ±1 | 33 ^a ±3 | 364±18 |

¹ Mean values in the same column and same wheat varieties (Adana-99 or Russian) followed by different superscript letters are significantly different ($P<0.05$).

It is reported that there is correlation between sedimentation values, which is one of the most important criteria used in determining the quality of wheat and vary depending on protein (gluten) quality, and results of baking experiments (Faridi and Faubion, 1990; Dıraman, 2010). By examining the findings of the sedimentation value which is a very important quality criterion in flour milling and showing the gluten quantity-quality simultaneously, both wheat varieties had lower sedimentation value compared to the control sample and there was some decrease in gluten quantity and quality. Generally, the findings obtained from sedimentation value were found to be compatible with wet-dry gluten content values. It was observed that the flour obtained by milling the samples with tempered two-step for 48 h and rest 30 days in both wheat varieties had the lowest sedimentation value. According to the data of delayed sedimentation analysis, the tempering process results in improvement in gluten quantity and quality of the samples as expected, there is no significant difference ($P>0.05$) between the different

tempering times and numbers in terms of these improvements, but according to the control sample, both tempering for 24-48 h and tempering for 1-2 times showed a significant effect ($P<0.05$) on the gluten quality of the samples. This is due to the triggering of protease activity by the 30 °C temperature and 2 h time norms applied in the delayed sedimentation analysis in the control sample which has sunn pest damage but is not subjected to any tempering treatment. With the tempering process, gluten quality is improved (gluten structure firming) and hence the delayed sedimentation values of the flour of tempered samples are increased (Ertugay et al., 1995c; Dıraman et al., 2013; Dizlek and Islamoglu, 2015).

By analyzing the falling number values that provide information about the amylase activity of flour samples (Table 3), it was determined that there was no significant difference ($P>0.05$) between the tempering treatments applied in both wheat samples. This finding is consistent with the statement of Sünter (2003); which investigated the effect of

different tempering times and temperatures on wheat quality. The data on falling number analysis shows that it would be beneficial to add a certain (relatively less) amount of α -amylase preparation and / or malt flour to the dough formulation in the bread making with of both wheat samples flour.

In literature, there is a little information about two-step tempering. According to Buhler handbook (Buhler 2016); general rules for tempering in two-steps as follows: first tempering: 2/3 of total tempering time (water addition to about 1-2% lower than target moisture) and second tempering: 1/3 of total tempering time (it should be 8 – maximum 12 h, no longer leads to drying out of bran; water addition 1-2%). In this study, two-step tempering treatment was partially effective on the physical, chemical and technological properties of flour in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). However, further studies are needed to elucidate on two-step tempering process.

CONCLUSIONS and RECOMMENDATIONS

In this study, the effects of two-step tempering treatment on the physical, chemical and physicochemical characteristics of two different bread wheats were investigated. In this sense, the effects of two different tempering times (24 and 48 h) and two different tempering applications (once or twice) on the raw material (wheat) and intermediate product (flour) were investigated. In addition, the wheat flour with two-step tempered, for the purpose of setting a precedent for the market conditions, has been evaluated as analytically by resting for 30 days. The findings obtained from the study are summarized below:

The tempering treatment resulted in a limited improvement in the physical (flour yield and color), chemical and technological properties of the flour. It was found that, especially more evident in the ash content, the tempering treatment reduced the ash and protein contents of the flour samples, however it resulted in an increment in the gluten quality (The tempering treatment resulted in a significant increase in the value of delayed sedimentation according to the normal sedimentation value of flour samples). Tempering treatment for 48 h among single-step tempering treatments resulted in more improved flour quality. As a result, the findings include clues that, water when added to the wheat in the tempering process in two-steps results in an improved flour quality. However, further studies are required on this subject to elucidate the mechanism.

It is recommended that in subsequent studies, the kinetics of two-step tempering treatment applied to wheat and its effect on product properties can be examined more comprehensively. If this and similar studies are carried out on more wheat varieties, more inclusive analytical findings can be achieved. The

study was carried out by applying the cold tempering method. In the subsequent studies, the effect of two-step tempering on wheat, flour, dough, and bread quality can be investigated by use of warm and / or hot tempering methods. It is predicted that these practices will further improve the bread wheat quality. In addition, this study can be continued with a different research in terms of the energy spent in a pilot flour mill.

ACKNOWLEDGEMENT

This study was funded by the Scientific Research Projects Unit of Osmaniye Korkut Ata University (grant number OKUBAP-2017-PT3-033) and it is prepared from Mustafa KURT 's Master of Science thesis.

Author's Contributions

All authors contributed to the study conception and design. Mustafa KURT has provided research materials, milled the wheat groups and performed the laboratory work. Halef DIZLEK performed the statistical analysis, interpreted the results and drafted the manuscript. The first draft of the manuscript was written by Halef DIZLEK. Tempering process of wheat samples and writing - original draft preparation of the manuscript were written by Mustafa KURT and Halef DIZLEK; Writing - review and editing were performed by Halef DIZLEK. All authors commented on previous versions of the manuscript. Also all authors read and approved the final manuscript. Halef DIZLEK is the Master of Science supervisor of Mustafa KURT.

Statement of Conflict of Interest

Authors have declared no conflict of interest.

REFERENCES

- Alfin F, Çakmaklı Ü 1999. Ticari Değirmen ve Laboratuvar Tipi Bühler Değirmeninin Kümülatif Kül ve Protein Eğrileri Üzerine Bir Araştırma. Unlu Mamuller 8(4): 42-48.
- American Association of Cereal Chemists International (AACCI). 2010. Approved Methods of Analysis, 11th Ed. The Association (AACCI), St. Paul, MN.
- Anonim 2021. Tahıllar ve Diğer Bitkisel Ürünlerin Alan ve Üretim Miktarları. <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Bitkisel-Uretim-Istatistikleri-2020-33737>
- Buhler 2016. Wheat Conditioning Basic Guidelines. BMIN Wheat Conditioning IAOM District Meeting 2016, Buhler handbook, 30 pg.
- Butcher J, Stenvert NL 1973. Conditioning Studies on Australian Wheats. III. The Role of the Rate of Water Penetration into the Wheat Grain. J Sci Food Agr 24(9): 1077-1084.

- Cornell HJ, Hoveling AW 1998. Wheat: Chemistry and Utilization. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, 422 pg.
- Delcour JA, Hosney RC 2010. Principles of Cereal Science and Technology. AACCI, St. Paul, MN, 280 pg.
- Dıraman H, Boyacıoğlu MH, Boyacıoğlu D, Khan K 2013. Süne (*Eurygaster* spp) Hasarlı Buğdayların Bazı Protein Fraksiyonları ve Farinogram Değerleri Üzerine Buharla Tavlamanın Etkileri. Gıda 38(6): 359-365.
- Dıraman H 2010. Effect of Microwaves on Technological and Rheological Properties of Suni-Bug (*Eurygaster spp*) Damaged and Undamaged Wheat Flour. Food Sci Technol Res 16(4): 313-318.
- Dizlek H, Islamoglu M 2015. Effects of Sunn Pest (*Eurygaster maura* L. Heteroptera; Scutelleridae) Sucking Number on Physical and Physicochemical Characteristics of Wheat Varieties. J Appl Bot Food Qual 88: 10-15.
- Dizlek H, Kurt M 2017. An Important Phenomenon in the Production of Wheat Flour: Bleaching. In: D. Kovacevic (ed.), VIII International Agriculture Symposium 'Agrosym 2017' 05-08 October 2017, Jahorina, Bosnia and Herzegovina.
- Dizlek H, Ozer MS 2016a. Effects of Sunn Pest (*Eurygaster integriceps*) Damage Ratio on Physical, Chemical, and Technological Characteristics of Wheat. Qual Assur Saf Crop 8(1): 145-156.
- Dizlek H, Ozer MS 2016b. The Improvement of Bread Characteristics of Sunn Pest (*Eurygaster integriceps*) Damaged Bread Wheat by Blending Application and Using Additives. Qual Assur Saf Crop 8(3): 427-437.
- Dizlek H, Ozer MS 2017. Improvement of Physical, Physicochemical, and Rheological Characteristics of Sunn Pest (*Eurygaster integriceps*) Damaged Wheat by Blending. Qual Assur Saf Crop 9(1): 31-39.
- Dunn KL, Yang L, Girard A, Bean S, Awika JM 2015. Interaction of Sorghum Tannins with Wheat Proteins and Effect on In Vitro Starch and Protein Digestibility in a Baked Product Matrix. J Agr Food Chem 63(4): 1234-1241.
- Ertugay Z, Çelik İ, Elgün A, Ertugay MF 1995a. Süne (*Eurygaster* Spp.) Zararı Görmüş Buğday ile Görmemiş Buğdaya Farklı Tavlama Metodları Uygulamasının I. Öğütme Değeri ile Unun Bazı Kalitatif Özellikleri Üzerine Etkisi. Unlu Mamuller 4(2): 4-10.
- Ertugay Z, Çelik İ, Elgün A, Ertugay MF 1995b. Süne (*Eurygaster* Spp.) Zararı Görmüş Buğday ile Görmemiş Buğdaya Farklı Tavlama Metodları Uygulamasının II. Hamurun Reolojik Özellikleri Üzerine Etkisi. Unlu Mamuller 4(3): 4-10.
- Ertugay Z, Çelik İ, Elgün A, Ertugay MF 1995c. Süne (*Eurygaster* Spp.) Zararı Görmüş Buğday ile Görmemiş Buğdaya Farklı Tavlama Metodları Uygulamasının III. Ekmek Özellikleri Üzerine Etkisi. Unlu Mamuller 4(4): 10-12, 14-16.
- Faridi H, Faubion JM 1990. Dough Rheology and Baked Product Texture. AVI book, Published by Van Nostrand Reinhold, New York, 605 pg.
- Finney KF, Bolte LC 1985. Experimental Micromilling: Reduction of Tempering Time of Wheat 18-24 Hours to 30 Minutes. Cereal Chem 62(6): 454-458.
- Girard AL, Teferra T, Awika JM 2019. Effects of Condensed vs Hydrolysable Tannins on Gluten Film Strength and Stability. Food Hydrocoll 89: 36-43.
- Greenaway WT, Neustadt MH, Zeleny L 1965. A Test for Stink Bug Damage in Wheat. Cereal Chem 42(6): 577-579.
- Hook SCW, Bone GT, Fearn T 1982. The Conditioning of Wheat: The Influence of Varying Levels of Water Addition to UK Wheats of Flour Extraction Rate, Moisture and Color. J Sci Food Agr 33(7): 645-654.
- Ibanoglu S 2001. Influence of Tempering with Ozonated Water on the Selected Properties of Wheat Flour. J Food Eng 48(4): 345-350.
- Kent NL 1984. Technology of Cereals. Pergamon Press, Oxford, 221 pg.
- Keskinoglu R, Elgün A, Türker S 2001. Bir Un Değirmeninde Uygulanan Farklı Ilık Tavlama İşlemlerinin Öğütme Kalitesine Etkisi. Gıda 26(6): 419-427.
- Keskinoglu R, Elgün A, Türker S 2002. Bir Un Değirmeninde Uygulanan Farklı Ilık Tavlama İşlemlerinin Öğütme Kalitesine Etkisi, II. Topyekün Öğütme Kalitesi Kontrolünde Kümülatif Kül Kurvesinin Kullanılması. Gıda 27(2): 137-142.
- Kinaci E, Kinaci G 2004. Quality and Yield Losses due to Sunn Pest (*Hemiptera: Scutelleridae*) in Different Wheat Types in Turkey. Field Crop Res 89: 187-195.
- Kurt M, Dizlek H 2020. Ekmeklik Buğdaylara (*Triticum aestivum* L.) İki Aşamalı Uygulanan Tavlama İşleminin Unun Ekmeklik Özelliklerine Etkisi. EJOSAT 18: 445-453.
- Kweon M, Martin R, Souza E 2009. Effect of Tempering Conditions on Milling Performance and Flour Functionality. Cereal Chem 86(1): 12-17.
- MacRitchie F 2010. Concepts in Cereal Chemistry. CRC Press, Boca Raton, FL, 198 pg.
- Moss R 1977. The Influence of Endosperm Structure, Protein Content and Grain Moisture on the Rate of Water Penetration into Wheat during Conditioning. J Food Technol 12(3): 275-283.
- Park SH, Bean SR, Chung OK, Seib PA 2006. Levels of Protein and Protein Composition in Hard Winter Wheat Flours and the Relationship to Breadmaking. Cereal Chem 83(4): 418-423.
- SAS Institute 1982. SAS User's Guide to Statistical

- Analyses. SAS Institute, Raleigh.
- Stenvert NL, Kingswood K 1976. An Autoradiographic Demonstration of the Penetration of Water into Wheat during Tempering. *Cereal Chem* 53(2): 141-149.
- Sünter K 2003. Buğdayın Farklı Sıcaklık ve Sürelerde Tavlanması'nın Unun Bazı Özellikleri Üzerine Etkisi. İstanbul Teknik Üniversitesi Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 64 sy.
- TSE 2018. Wheat. Turkish Standards Institution, TS 2974, Ankara.
- Uluöz M 1965. Buğday, Un ve Analiz Metotları. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Ofset Tesisleri, İzmir, 91 sy.
- Warechowska M, Markowska A, Warechowski J, Mis A, Nawrocka A 2016. Effect of Tempering Moisture of Wheat on Grinding Energy, Middlings and Flour Size Distribution, and Gluten and Dough Mixing Properties. *J Cereal Sci* 69: 306-312.
- Yildirim M, Barutcular C, Koc M, Dizlek H, Hossain A, Islam MS, Toptas I, Basdemir F, Albayrak O, Akinci C, Sabagh AE 2018. Assessment of the Grain Quality of Wheat Genotypes Grown under Multiple Environments Using GGE Biplot Analysis. *Fresen Environ Bull* 27(7): 4830-4837.
- Yoo J, Lamsal BP, Haque E, Faubion JM 2009. Effect of Enzymatic Tempering of Wheat Kernels on Milling and Baking Performance. *Cereal Chem* 86(2): 122-126.

Is It Possible to Improve the Fermentation and Nutritional Quality of Wheat Straw Silage by Replacing Commercial Inoculant with Kefir?

Berrin OKUYUCU¹, Selim ESEN²

¹Tekirdağ Namık Kemal University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Tekirdağ, Turkey, ²Balikesir Directorate of Provincial Agriculture and Forestry, Republic of Turkey Ministry of Agriculture and Forestry, Balikesir, Turkey

¹<https://orcid.org/0000-0001-8322-5050>, ²<https://orcid.org/0000-0003-4953-7960>

✉: selim_esen01@hotmail.com

ABSTRACT

The current study aimed to determine fermentation quality, aerobic stability, and enzyme soluble organic matter (ELOS) of wheat straw silage by replacing homofermentative (^{HM}) and homofermentative+heterofermentative (^{HM+HT}) lactic acid bacteria (LAB) inoculants with kefir as silage additives. For this purpose, commercially available Biotal Plus II (^{HM}LAB), Biotal Buchneri 500 (^{HM+HT}LAB), and MYStarter KF (KF) were used as silage additives. Four kg of wheat straw, about 400 g/kg, and 6.0 log cfu of inoculants or kefir were used in each treatment group and replicate. Including the control group (CON), a total of 12 laboratory-type silos (3 replicates and 4 groups) were opened after 45 days. The dry matter (DM), crude ash (CA), acid detergent lignin (ADL), and water-soluble carbohydrate contents of silages were not affected by the addition of ^{HM}LAB, ^{HM+HT}LAB, and KF (P>0.05). The KF group had the lowest pH value (4.32), NH₃-N content (71.97 g/kg TN), and higher lactic acid content (43.11 g/kg DM). The crude protein (CP) ratio was decreased in ^{HM}LAB (5.95%) and ^{HM+HT}LAB (5.63%) groups and increased in the KF group (4.54%, P<0.001). An improvement (by lowering 17.02%) of NDF was only observed in the KF group (P<0.001). The ELOS and ME in ^{HM}LAB, ^{HM+HT}LAB, and KF groups were increased (P<0.001). The lowest carbon dioxide (3.42 g/kg DM) and yeast (5.50 log₁₀ cfu/g) were observed in the KF and CON group, respectively. According to research findings, kefir could be an alternative silage additive to commercially available inoculants and could improve wheat straw silage's nutritional quality instead of them.

Research Article

Article History

Received : 12.02.2021
Accepted : 29.04.2021

Keywords

Wheat straw silage
Kefir
Inoculant
Aerobic stability
ELOS

Ticari İnokulantların Yerine Kefir Kullanarak Buğday Samanı Silajının Fermentasyon ve Besin Kalitesini İyileştirmek Mümkün müdür?

ÖZET

Bu çalışma homofermentatif (^{HM}) ve homofermentatif + heterofermentatif (^{HM+HT}) laktik asit bakterileri (LAB) yerine kefir kullanımının buğday samanı silajlarının fermentasyon kalitesi, aerobic stabilitesi ve enzimde çözünen organik madde (EÇOM) miktarına olan etkisini araştırmayı amaçlamaktadır. Bu amaçla ticari olan kullanılan Biotal Plus II (^{HM}LAB), Biotal Buchneri 500 (^{HM+HT}LAB) ve MYStarter KF (KF) silaj katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Her muamele grubunda yaklaşık 400 g/kg kuru maddeye sahip 4 kg buğday samanı ve 6.0 log kob oranında silaj katkı maddesi yada kefir kullanılmıştır. Kontrol grubu (KON) dahil toplamda 12 adet laboratuvar tipi silo (3'er tekerrür ve 4 grup) 45 gün sonra açılmıştır. Silajların kuru madde (KM), ham kül (HK), asit deterjan lignin (ADL) ve suda çözünebilir karbondidrat içeriği ^{HM}LAB, ^{HM+HT}LAB ve KF ilavesi sonrası değişmemiştir (P>0.05). KF grubu en düşük pH (4.32) ve NH₃-N (71.97 g/kg TN) ve en yüksek laktik asit (43.11 g/kg KM) içeriğine sahiptir. Ham protein (HP) oranı ^{HM}LAB (%5.95) ve ^{HM+HT}LAB (%5.63) gruplarında azalırken KF

Araştırma Makalesi

Makale Tarihçesi

Geliş Tarihi : 12.02.2021
Kabul Tarihi : 29.04.2021

Anahtar Kelimeler

Buğday samanı silajı
Kefir
İnokulant
Aerobik stabilite
EÇOM

(%4.54) grubunda artmıştır ($P<0.001$). Nötral deterjan lif (NDF) içeriğinde iyileşme sadece KF (%17.02) grubunda gözlemlenmiştir ($P<0.001$). EÇOM ve ME değerleri ^{HM}LAB, ^{HM+HT}LAB ve KF gruplarında artmıştır ($P<0.001$). En düşük karbondioksit (3.42 g/kg KM) ve maya (5.50 log₁₀ kob/g) değerleri sırasıyla KF ve KON gruplarında gözlemlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, kefir ticari inokulantlar yerine silaj katkısı olarak alternatif olabilir ve ticari inokulantlar yerine kullanıldığında buğday samanı silajının besin değerini arttırabilir.

To Cite: Okuyucu B, Esen S 2022. Is It Possible to Improve Wheat Straw Silage's Fermentation and Nutritional Quality by Adding Kefir? KSU J Agric Nat 25 (1): 191-197. <https://doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.879170>.

INTRODUCTION

Wheat straw (WS), the second-largest agricultural residue, still contains some beneficial nutrients for ruminants and is mostly used as cost-effective animal feed in developing countries to cover the roughage deficiency. However, WS is classified as low-quality forages due to its high fiber fraction, low digestibility, and voluntary intake (Wiedmeier et al., 2002; Shahryari et al., 2018). WS's nutritional value which is also vary depending on the variety, growing conditions, and maturity stages, is far from meeting ruminants' dietary needs. On the other hand, its competitive prices make it a step forward to other commodities. However, intact WS is not an ideal feed source for ruminants (Chekani-Azar and Chekani-Azar, 2010). Thus, several methods are used to improve WS quality, such as physical (grinding, steam processing), chemical (alkaline treatments or other chemicals, such as sulfur dioxide, urea, or chlorine), and biological methods (fungal treatment, inoculants, or enzymes) either solitary or in combination (Eser, 2016; Gado et al., 2017; Ordaz, 2017; Ayaşan et al., 2020). It has not been enough progressed to improve WS quality by using physical or chemical methods. Therefore, the application of biological methods has become more common in this field.

Ensiling, a complex biochemical process, is based on the fermentation of water-soluble carbohydrates (WSC) by lactic acid bacteria (LAB) under anaerobic conditions (Kung et al., 2003). During the ensiling period, forage type, WSC content, lignification degree, and interaction between inoculants (LAB and/or enzymes) and ensiled forage affect fiber degradation. It was stated that the availability of volatile fatty acids (VFA) decreases the pH of ensiled forage and increased the availability of sugars fermented by the LAB population through ensiling process results in the nutritive quality of silage (Zwielehner et al., 2014). Moreover, fibrolytic enzymes and inoculants benefit animal performance, resulting in dry matter intake, improved organic matter digestibility, and microbial protein synthesis (Zwielehner et al., 2014).

Schnürer and Jonsson (2011) draw our attention to the ingredients of an excellent starter culture for

well-preserved silage, and they suggested using a combination form of yeast and lactic acid bacteria. A number of authors have considered the effects of yeast to control mould growth by depleting oxygen, especially the initial phase of the ensiling, and inhibiting mould growth by decreasing pH through the secretion of organic acids also support this suggestion (Gamba et al., 2016; Droby and Wisniewski, 2018; Gonda et al., 2019). Recent research findings have also shown that the addition of kefir, which has heterolactic properties, into silage reduces nutrient losses and positively affects aerobic stability (Gonda et al., 2019; Koç et al., 2020). Given this aspect, kefir can be used as a silage additive due to its unique aspects, cheap and its heterofermentative properties, as an alternative to commercial inoculants. This study aimed to investigate the improving possibilities of WS silage by replacing inoculants with kefir and comparing fermentation and nutritional quality.

MATERIALS and METHODS

The current study was conducted at the Animal Feed and Nutrition Laboratory of Tekirdag Namık Kemal University in 2017. WS (*Triticum aestivum* L.) straw, which dry matter (DM) contents were 931.3 g/kg, was obtained from the experimental area of the Field Crops Department and transferred into the laboratory for silage preparation and further analysis.

To prepare laboratory-scale silages, WS was chopped 2-3 cm long, water was added to yield approximately 400 g/kg DM content, and allowed WS at least 1 h to absorb added water (Nakashima et al., 1993). Then, approximately 4 kg of WS spread in a thin layer on a clean nylon cover with a 4 m² surface area. Commercially available Biotol Plus II (^{HM}LAB; Lallemand Inc., USA; contains *Pediococcus pentosaceus* 12455, *Propionibacterium freudenreichii* R2435 strains and β -glucanase, xylanase and glucotomanganase enzymes), Biotol Buchneri 500 (^{HM+HT}LAB; Lallemand Inc., USA; contains *Pediococcus pentosaceus* 12455, *Lactobacillus buchneri* NCIMB 40788 strains and β -glucanase, xylanase and glucotomanganase enzymes) inoculants, and MYStarter KF kefir (KF; contains *Lactococcus*

lactis subsp. *lactis* biovar diacetylactis, *Lactobacillus brevis*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* ve *Saccharomyces cerevisiae* strains) were applied at 6.0 log cfu/g theoretically, in each treatment group, and 3 replicates. A 0.074 g ^{HM}LAB, 0.039 g ^{HM+HT}LAB, and 1.5 g kefir were weighed and dissolved in 20 ml tap water. Homogenized inoculants and kefir were then applied by hand sprayer, mixed silage well with wearing sterile gloves in each replicate, and then vacuumed and sealed by a vacuum sealer (CAS CVP-260PD).

The vacuumed packs, stored at an ambient temperature of 25-30 °C, were opened at the end of 45 days ensiling, pH, DM, WSC, and lactic acid content of silages was determined immediately (Anonymous, 1986; Chen et al., 1994; Koç and Çoşkuntuna, 2003). The proximate analysis of WS silages was performed according to Weende's analysis by using AOAC (1990) methods. Briefly, DM of WS silages was determined by drying samples at 102 °C overnight, and crude ash (CA) content was determined by igniting the silage samples in a muffle furnace at 550 °C for 3 h. The nitrogen (N) content of WS silages was measured by the Kjeldahl method and multiplied by 6.25 to get the crude protein (CP) ratio. The Neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and acid detergent lignin (ADL) of WS silages was determined according to Van Soest et al. (1991). Enumeration of LAB, yeast, and mould of silages were determined using MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) and potato dextrose agar, according to Seale et al. (1990). The aerobic stability of WS silages was determined according to Ashbell et al. (1991). The two-stage enzymatic digestion method described by Tilley and Terry (1963) was used to evaluate enzyme soluble organic matter (ELOS) of WS silages. The cellulose, obtained from *Trichoderma viride* (Onozuka R-10, Merck, Darmstadt, Germany), and pepsin (0.7 FIP-U/g, Merck, Darmstadt, Germany) enzymes were used in enzymatic digestion studies. Approximately 300 mg of a sample taken into crucibles and added 30 ml pepsin (2 g of pepsin dissolved in 1 L of 0.1 N HCl) to pre-treated for 24 h at 40°C in the first stage. Then 30 ml cellulose buffer solution (3.3 g cellulose dissolved in 1 L of acetate buffer solution; Solution A: 5.9 ml Acetic acid in 1 L distilled water; Solution B: 13.6 g Sodium acetate + 1 L distilled water; w/w: 400/600) was added to crucibles and incubated. At the end of the incubation, samples were filtered, dried at 105 °C at least 3 h, and burned at 550 °C (Özkan, 2016). The ELOS was calculated between the weight differences of dried and burned samples after incubation. The following equations estimated the ELOS and ME of WS silages (Cömert Acar et al., 2018):

$$\text{ELOS, g/kg} = (\text{DW} - \text{BW}) / \text{SW} \times 1000 \quad (1)$$

$$\text{EULOS, g/kg} = 1000 - \text{ELOS} \quad (2)$$

$$\text{ME (MJ/kg DM)} = 14.27 - (0.0120 \times \text{EULOS}) + (0.0023 \times \text{CP}) - (0.0147 \times \text{CA}) \quad (3)$$

Where DW: dry weight of the sample (105 °C); BW: burn weight of sample (550°C); SW: sample weight; EULOS: enzyme insoluble organic matter; CP: crude protein; CA: crude ash.

The effect of treatments on fermentation quality and nutritive value of WS silages were analyzed using the GLM procedure of Minitab (2014) statistical package programs, and least-squares means were compared using Tukey's multiple comparison tests. The following statistical model was used:

$$Y_{ij} = \mu + a_i + e_{ij} \quad (4)$$

Where Y_{ij} = observed value; μ = overall mean; a_i = effect of inoculants or kefir; e_{ij} = effect of the experimental error.

RESULTS

The chemical and microbiological composition of pre-ensiling material and fermentation quality and chemical composition of WS silages is given in Table 1 and 2.

Table 1 Chemical and microbiological composition of pre-ensiling material

Çizelge 1. Başlangıç materyalinin kimyasal ve mikrobiyolojik kompozisyonu

| Parameters (<i>Parametreler</i>) | SM (<i>BM</i>) |
|---|------------------|
| DM, g/kg (<i>KM, g/kg</i>) | 387.3 |
| pH (<i>pH</i>) | 7.60 |
| CP, g/kg DM (<i>HP, g/kg KM</i>) | 58.7 |
| CA g/kg DM (<i>Ham kül, g/kg KM</i>) | 62.9 |
| NDF, g/kg DM (<i>NDF, g/kg KM</i>) | 624.8 |
| ADF, g/kg DM (<i>ADF, g/kg KM</i>) | 432.8 |
| ADL, g/kg DM (<i>ADL, g/kg KM</i>) | 42.6 |
| H _{cell} , g/kg DM (<i>Hemiselüloz, g/kg KM</i>) | 192 |
| Cell, g/kg DM (<i>Selüloz, g/kg KM</i>) | 390.2 |
| WSC, g/kg DM (<i>SÇK, g/kg KM</i>) | 18 |
| ELOS, g/kg DM (<i>EÇOM, g/kg KM</i>) | 312.9 |
| ME, MJ/kg DM (<i>ME, MJ/kg KM</i>) | 5.24 |
| <i>Lactobacilli</i> , log10 cfu/g | |
| (<i>Lactobacilli, log10 kob/g</i>) | 5.74 |
| Yeast, log10 cfu/g (<i>Maya, log10 kob/g</i>) | 5.69 |
| Mould, log10 cfu/g (<i>Küf, log10 kob/g</i>) | 0 |

SM: Starting Material, DM: Dry Matter, CP: Crude Protein, CA: Crude Ash, NDF: Neutral Detergent Fiber, ADF: Acid Detergent Fiber, ADL: Acid Detergent Lignin, H_{cell}: Hemicellulose, Cell: Cellulose, WSC: Water Soluble Carbohydrate, ELOS: Enzyme Soluble Organic Matter, ME: Metabolizable Energy

The DM, CA, ADL, and WSC contents of silages were not affected by the addition of ^{HM}LAB, ^{HM+HT}LAB, and KF (P>0.05). Compared to control silages (Table 2), the KF group had the lowest pH value; an increased pH value was observed in ^{HM}LAB while (P<0.001) ^{HM+HT}LAB did not affect pH (P>0.05). The CP ratio of silages was decreased in ^{HM}LAB (5.95%) and

^{HM+HT}LAB (5.63%) groups, while the CP ratio was increased by 4.54% in the KF group (P<0.001). The ADF contents of silages treated with inoculants and kefir were decreased (P<0.01). An improvement (by lowering 17.02%) of NDF was only observed in the KF group (P<0.001). The lowest hemicellulose (P<0.001) and cellulose (P<0.05) content was recorded in the KF group. The NH₃-N and LA contents of treated groups

were significantly different from the CON group (P<0.001). The KF group had lower NH₃-N content (71.97g/kg TN) and higher LA content (43.11 g/kg DM) than the control and other inoculated groups. Both inoculants and kefir significantly affected ELOS and ME of WS silages (P<0.001). The ELOS and ME in ^{HM}LAB, ^{HM+HT}LAB, and KF groups were increased 11.35, 8.38; 10.02, 7.08; 5.84, 4.28%, respectively.

Table 2 Fermentation quality and chemical composition of WS silages

Çizelge 2 Buğday samanı silajlarının fermantasyon kalitesi ve kimyasal bileşimi

| Parameters (<i>Parametreler</i>) | Treatments (<i>Muameleler</i>) | | | | P |
|--|----------------------------------|-----------------------------------|---|-------------------------|-----|
| | CON <i>KON</i> | ^{HM} LAB <i>HMLAB</i> | ^{HM+HT} LAB <i>HM+HTLAB</i> | KF <i>KF</i> | |
| DM, g/kg (<i>KM, g/kg</i>) | 382.2±12.3 | 384.0±2.8 | 385.4±2.2 | 381.5±0.8 | NS |
| pH (<i>pH</i>) | 4.50±0.02 ^b | 4.60±0.02 ^a | 4.52±0.00 ^b | 4.32±0.02 ^c | *** |
| CP, g/kg DM (<i>HP, g/kg KM</i>) | 63.9±1.3 ^b | 60.1±0.1 ^d | 60.3±1.4 ^c | 66.8±0.8 ^a | *** |
| CA, g/kg DM (<i>Kül, g/kg KM</i>) | 67.4±0.6 | 66.9±0.2 | 68.1±0.6 | 6.79±0.8 | NS |
| NDF, g/kg DM (<i>NDF, g/kg KM</i>) | 676.2±19.1 ^b | 718.9±36.6 ^{ab} | 738.3±4.8 ^a | 561.1±39.3 ^c | *** |
| ADF, g/kg DM (<i>ADF, g/kg KM</i>) | 416.0±11.4 ^a | 381.1±14.3 ^b | 380.9±16.3 ^b | 359.2±19.7 ^b | ** |
| ADL, g/kg DM (<i>ADL, g/kg KM</i>) | 49.1±6.1 | 41.4±4.7 | 45.7±5.2 | 41.7±3.7 | NS |
| H _{cell} , g/kg DM (<i>Hemiselüloz, g/kg KM</i>) | 260.2±18.3 ^b | 337.8±5.01 ^a | 357.5±21.1 ^a | 201.9±22.0 ^c | *** |
| Cell, g/kg DM (<i>Selüloz, g/kg KM</i>) | 366.9±6.4 ^a | 339.8±19.0 ^{ab} | 335.1±11.1 ^{ab} | 317.5±23.0 ^c | * |
| WSC, g/kg DM (<i>SÇK, g/kg KM</i>) | 5.91±1.21 | 8.12±1.55 | 7.33±1.20 | 5.94±1.59 | NS |
| NH ₃ -N, g/kg TN (<i>NH₃-N, g/kg TN</i>) | 125.06±7.50 ^a | 95.21±7.02 ^c | 113.84±0.06 ^b | 71.97±2.19 ^d | *** |
| LA, g/kg DM (<i>LA, g/kg KM</i>) | 20.86±0.26 ^c | 40.87±2.29 ^b | 38.40±2.34 ^{ab} | 43.11±2.93 ^a | *** |
| ELOS, g/kg DM (<i>EÇOM, g/kg KM</i>) | 328.4±12.9 ^c | 365.7±7.8 ^a | 361.3±5.9 ^{ab} | 347.6±0.5 ^b | *** |
| ME, MJ/kg DM (<i>ME, MJ/kg KM</i>) | 5.37±0.14 ^c | 5.82±0.09 ^a | 5.75±0.08 ^{ab} | 5.60±0.02 ^b | *** |

^{a,b,c} Values within a row with different superscripts differ significantly at P<0.05

DM: Dry Matter, CP: Crude Protein, CA: Crude Ash, NDF: Neutral Detergent Fiber, ADF: Acid Detergent Fiber, ADL: Acid Detergent Lignin, H_{cell}: Hemicellulose, Cell: Cellulose, WSC: Water Soluble Carbohydrate, NH₃-N: Ammonia Nitrogen, TN: Total Nitrogen, LA: Lactic Acid, ELOS: Enzyme Soluble Organic Matter, ME: Metabolizable Energy, NS: Not significant; *: P<0.05; **: P<0.01; ***: P<0.001

The microbiological composition and aerobic stability parameters of silages were given in Tables 3 and 4. In all treatment groups, mould was not detected (P>0.05). Compared to the control group, HMLAB, HM+HTLAB, and KF increased the Lactobacilli and decreased the yeast number of WS silages (P<0.001). The highest *Lactobacilli* and lowest yeast number was detected in the KF and ^{HM+HT}LAB group, respectively (Table 3). Compared to the CON group, the pH value decreased only in the KF group after 5 days of aerobic stability test (P<0.001). The lowest CO₂ (3.42 g/kg DM) and yeast (5.50 log₁₀ cfu/g) were observed in the KF and CON group, respectively (Table 4).

DISCUSSION

The current study set out to investigate the improving possibilities of WS silage by replacing inoculants with kefir and comparing fermentation and nutritional quality. Several reports have shown that an adequate substrate for LAB, DM, and WSC content is required to produce stable silages (Li et al., 2016; Tao et al., 2017; Zhang et al., 2018). While the pH and WSC content of starting material was decreased after 45 days of the ensiling period, the DM content was not affected. Also, silage additives affected WS silages' pH in all treated groups (P<0.001). The main objectives of adding enzymes into silages inoculants are to increase WSC supply

Table 3 Microbiological composition of WS silages

Çizelge 3 Buğday samanı silajlarının mikrobiyolojik kompozisyonu

| Parameters (<i>Parametreler</i>) | Treatments (<i>Muameleler</i>) | | | | P |
|---|----------------------------------|-----------------------------------|---|------------------------|-----|
| | CON <i>KON</i> | ^{HM} LAB <i>HMLAB</i> | ^{HM+HT} LAB <i>HM+HTLAB</i> | KF <i>KF</i> | |
| <i>Lactobacilli</i> , log ₁₀ cfu/g (<i>Lactobacilli, log₁₀ kob/g</i>) | 4.94±0.01 ^d | 5.82±0.01 ^b | 5.74±0.01 ^c | 5.92±0.01 ^a | *** |
| Yeast, log ₁₀ cfu/g (<i>Maya, log₁₀ kob/g</i>) | 5.60±0.02 ^a | 5.33±0.02 ^b | 5.07±0.01 ^d | 5.15±0.01 ^c | *** |
| Mould, log ₁₀ cfu/g (<i>Küf, log₁₀ kob/g</i>) | 0 | 0 | 0 | 0 | NS |

^{a,b,c} Means in the same row with different superscripts differ significantly at P<0.05

NS: Not significant; ***: P<0.001

Table 4 Aerobic stability parameters of WS silages

Çizelge 4 Buğday samanı silajlarının aerobik stabilite parametreleri

| Parameters (<i>Parametreler</i>) | Treatments (<i>Muameleler</i>) | | | | P |
|--|----------------------------------|--|--|------------------------|-----|
| | CON <i>KON</i> | ^{HM} LAB <i>HM^{HM}LAB</i> | ^{HM+HT} LAB <i>HM+HT^{HM}LAB</i> | KF <i>KF</i> | |
| pH (<i>pH</i>) | 4.59±0.01 ^c | 4.69±0.01 ^b | 4.75±0.01 ^a | 4.44±0.01 ^d | *** |
| CO ₂ , g/kg DM (<i>CO₂, g/kg KM</i>) | 5.14±0.15 ^a | 4.62±0.07 ^b | 5.08±0.23 ^a | 3.42±0.07 ^c | *** |
| Yeast, log ₁₀ cfu/g (<i>Maya, log₁₀ kob/g</i>) | 5.50±0.01 ^d | 5.68±0.01 ^c | 5.90±0.01 ^b | 6.68±0.00 ^a | *** |
| Mould, log ₁₀ cfu/g (<i>Küf, log₁₀ kob/g</i>) | 0 | 0 | 0 | 0 | NS |

^{a,b,c} Values within a row with different superscripts differ significantly at $P<0.05$

NS: Not significant; ***: $P<0.001$

and promote better fermentation by LAB and partial degradation of fiber during the ensiling period, especially when the WSC of pre-ensiled material was below the recommended value (Ordaz, 2017; Yuan et al., 2017). It was stated that the sugar content of silage was increased as a result of partial fermentation of fiber (hemicellulose and cellulose) by enzymatic activity during the ensiling period (Kung et al., 2003). The high sugar content of silages allows fermenting of them by the LAB population of silages and yielding lower pH results. The decrease in pH has also been reported by Filya and Sucu (2007) and Aktürk and Gümüş (2020).

The breakdown of proteins by plant enzymes was continued during the ensiling period; the decrease in pH increases due to extending the proteolytic activity during the active fermentation stage. The NH₃-N content, an indicator of protein breakdown, was significantly affected by ^{HM}LAB, ^{HM+HT}LAB, and KF ($P<0.001$). Due to the low NH₃-N amount in the KF group, the CP ratio is higher than the CON and inoculated groups (Todorov et al., 1997; Demirel et al., 2003). Also, it was stated that the CP ratio of silages could be increased in the reduction of NDF (Babaeinasab et al., 2015). Moreover, many researchers reported that the positive effect of addition LAB into silage increased the CP ratio (Nkosi and Meeske, 2010; Nkosi et al., 2011; Babaeinasab et al., 2015). These results are consistent with those research findings.

Results of cell wall components are summarized in Table 2. Numerically, but not significantly, the ADL content of treated groups was decreased ($P>0.05$). It was stated that LAB could degrade NDF and ADF content of forages due to increasing hydrolyzing capacity (Rajabi et al., 2017). Several researchers reported that LAB inoculation with or without enzyme could degrade cellulose into sugars and promote the LAB population, resulting in cell wall losses (Djordjevic et al., 2016; Liu et al., 2016). Moreover, a decrease in cell wall components generally results in higher OMD and ME content of silages. Thus, it expected that a decrease in the ADF and NDF ratio of silages. Parallel to this expectation, ADF content decreased by LAB and enzyme activity.

On the other hand, NDF only was reduced in the KF group. An increased in ^{HM}LAB and ^{HM+HT}LAB may be related to clustering the simple sugar after hydrolysis in the silo. The obtained results are partially consistent with those results.

Data obtained in the aerobic exposure are presented in Table 4. The highest CO₂ level was found in ^{HM} + ^{HT}LAB group with 5.08 ± 0.23 g/kg DM ($P<0.001$). As previously stated, the population of LAB, the composition of inoculants, concentration of organic acid, and WSC of ensiling material affect the aerobic stability of silages (Tao et al., 2017). Besides, several researchers have been reported that second-generation inoculants improve the aerobic stability of silages (Nishino et al., 2004; Reich and Kung, 2010). Second-generation inoculants, such as *L.buchneri* and *Propionibacteria*, are known as antimycotic agents and inhibit acid-tolerant yeasts in the silo by converting lactic acid into acetic acid and WSC into propionic acids (Weseh, 2013). It has also been indicated that silage's aerobic stability reduced when yeast was added into the silage with or without LAB (Weinberg et al., 1999). In the current study, the amount of yeast in the KF group is mainly related to *S. cerevisiae*, found in the kefir's natural flora, and improved aerobic stability of WS silages by decreasing pH.

In this study, a biological method was emphasized to improve plant-derived lignocellulosic material's nutritional value, rich in lignin and cellulose. The effect of the inoculation of ^{HM}LAB, ^{HM+HT}LAB, and kefir on fermentation and WS silages' nutritional quality was investigated. While a decrease in the ADF and ADL composition of silages was observed in all treated groups, the decrease in NDF was observed only in the KF group. In all treated groups, the ELOS and ME of silages were improved. Overall, this study strengthens the idea that the addition of kefir in WS silages increased their aerobic stability due to its significant effect on the pH and CO₂ level. Also, the findings of this research provide insights for kefir could be an alternative silage additive to commercially available inoculants and could improve WS's nutritional quality instead of them. However, further studies should also be examined by carrying

out *in sacco* degradability and *in vivo* digestibility experiments to better understand the implications of kefir on the nutritional quality of silage.

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

- Aktürk B, Gümüş H 2020. Effects of Lactic Acid Bacteria Inoculant on Quality, Fermentation Profile and Nutritive Value of Alfalfa Silage at Different Ensiling Period. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 67(3): 281-287.
- Anonymous 1986. *The Analysis of Agricultural Material*. Reference Book, London, UK, 427-428 pp.
- AOAC 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th Edition. Association of Official Analytical Chemist, Washington DC.
- Ashbell G, Weinberg ZG, Azrieli A, Hen Y, Horev B 1991. A Simple System to Study the Aerobic Deterioration of Silages. *Can Agric Eng* 33: 391-393.
- Ayaşan T, Cabi E, Esen S, Kader Esen V, Eseceli H 2020. Effect of Arbuscular Mycorrhizal Inoculation on the Quality and In Vitro Gas Production of Einkorn Wheat Straw. *S Afr J Anim Sci*, 50(3): 415-420.
- Babaeinasab Y, Rouzbehan Y, Fazaeli H, Rezaei J 2015. Chemical Composition, Silage Fermentation Characteristics, and *In Vitro* Ruminant Fermentation Parameters of Potato-Wheat Straw Silage Treated with Molasses and Lactic Acid Bacteria and Corn Silage. *J Anim Sci* 93(9): 4377-4386.
- Chekani-Azar V, Chekani-Azar S 2010. Utilization of Wheat Straw in Sheep: Using an Applicable Method of Chemical Treatment. *J Agrobio* 27(2): 93-102.
- Chen J, Stokes MR, Wallace CR 1994. Effects of Enzyme-Inoculant Systems on Preservation and Nutritive Value of Hay, Crop and Corn Silages. *J Dairy Sci* 77: 501-512.
- Cömert Acar M, Özelçam H, Şayan Y, Soycan Öneç S 2018. The Accuracy of Pepsin-Cellulase Technique for Estimating the In Vivo Metabolizable Energy Values of Maize Silage and Dry Forages. *J Anim Prod* 59 (2):49-53.
- Demirel M, Cengiz F, Erdoğan S, Çelik S 2003. A Study on Silage Quality and Rumen Degradability of Mixed Silages Containing Different Levels of Sudangrass and Hungarian Vetch. *Turk J Vet Anim Sci* 27(4): 853-859.
- Djordjevic S, Mandić V, Stanojevic D 2016. The Effect of Bacterial Inoculant on Chemical Composition and Fermentation of Alfalfa Silage. *Biotech Anim Hus* 32(4): 413- 423.
- Droby S, Wisniewski M 2018. The fruit microbiome: A new frontier for postharvest biocontrol and postharvest biology. *Postharvest Biol Technol* 140: 107-112.
- Eser S 2016. İnokulant ve Enzim İlavesinin Farklı Samanların Besleme Değeri Üzerine Etkileri. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 31 sy.
- Filya İ, Sucu E 2007. Bazı Biyolojik ve Kimyasal Katkı Maddelerinin Mısır, Sorgum ve Buğday Silajlarının Fermantasyon, Mikrobiyal Flora ve Aerobik Stabilité Üzerine Etkileri. 4. Ulusal Hayvan Besleme Kongresi 25-28 Haziran 2017, Bursa, 116-120 sy.
- Gado HM, Elghandour MMY, Cipriano M, Odongo NE, Salem AZM 2017. Rumen Degradation and Nutritive Utilization of Wheat Straw, Corn Stalks and Sugarcane Bagasse ensiled with Multienzymes. *J Appl Anim Res* 45(1): 485-489.
- Gamba RR, Caro CA, Martínez OL, Moretti, AF, Giannuzzi L, De Antoni GL, Peláez AL 2016. Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. *Int J Food Microbiol* 235: 859-92.
- Gonda M, Garmendia G, Rufo C, León Peláez Á, Wisniewski M, Droby S, Vero S 2019. Biocontrol of *Aspergillus flavus* in Ensiled Sorghum by Water Kefir Microorganisms. *Microorganisms* 7(8): 253.
- Koç F, Coşkuntuna L 2003. The Comparison of the Two Different Methods on the Determination of Organic Acids in Silage Fodders. *J Anim Prod* 44(2): 37-47.
- Koç F, Karapınar B, Okuyucu B, Korucu Erdem D 2020. Kefir İlavesinin Yonca Silajlarının Fermantasyon Özellikleri ve Aerobik Stabilitesi Üzerine Etkileri. *KSÜ Tarım ve Doğa Derg* 23 (2): 535-542.
- Kung JL, Stokes MR, Lin C 2003. *Silage Additives*. (Silage Science and Technology. American Society of Agronomy Inc., Crop Science Society of America Inc., Soil Science Society of America Inc., Publishers, Madison, Wisconsin, USA: Ed. Buxton DR, Muck RE and Harrison JH) 305-360.
- Li P, Ji S, Hou C, Tang H, Wang Q, Shen Y 2016. Effects of Chemical Additives on the Fermentation Quality and N Distribution of Alfalfa Silage in South of China. *Anim Sci J* 87(12):1472-1479.
- Liu Q, Li X, Seare TD, Zhang J, Shao T 2016. Effects of *Lactobacillus plantarum* and Fibrolytic Enzyme on the Fermentation Quality and In Vitro

- Digestibility of Total Mixed Rations Silage Including Rape Straw. *J Integr Agric* 15(9): 2087-2096.
- Minitab 2014. Minitab I: Statistical Software for Windows, Release 17. Minitab Inc. USA.
- Nakashima Y, Ørskov ER, Adebawale EA, Ambo K 1993. Enzymatic Manipulation of Straw Quality: Experience on Straw Upgrading. Proceeding of the International Conference on Increasing Livestock Production through Utilization of Local Resources 18-22 October 1993, Beijing-China, 139-152 pp.
- Nishino N, Wada H, Yoshida M, Shiota H 2004. Microbial Counts, Fermentation Products, and Aerobic Stability of Whole Crop Corn and a Total Mixed Ration Ensiled with and without Inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *J Dairy Sci* 87(8): 2563-2570.
- Nkosi BD, Kanengoni AT, Thomas R 2011. Effects of Ensiling Total Mixed Potato Hash Ration with or without Bacterial Inoculation on Silage Fermentation and Nutritive Value for Growing Pigs. *J Anim Vet Adv* 10(13): 1667-1672.
- Nkosi BD, Meeske R 2010. Effects of Ensiling Totally Mixed Potato Hash Ration with or without a Heterofermentative Bacterial Inoculant on Silage Fermentation, Aerobic Stability, Growth Performance and Digestibility in Lambs. *Anim Feed Sci Technol* 161(1-2): 38-48.
- Ordaz S 2017. Fibrolytic Enzymes and Silage Inoculants to Improve the Nutritive Value of Silage. University of Vermont, The Faculty of Graduate College, USA, MSc Thesis, 108 pp.
- Özkan M 2016. Hücre Duvarını ve Nişastayı Parçalayıcı Enzimlerin Fiğ-Yulaf Karışımı Silajların Fermentasyon, Aerobik Stabilitate ve *In Vitro* Organik Madde Sindirilebilirliği Üzerine Etkileri. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 18-19 sy.
- Rajabi R, Tahmasbi R, Dayani O, Khezri A 2017. Chemical Composition of Alfalfa Silage with Waste Date and its Feeding Effect on Ruminant Fermentation Characteristics and Microbial Protein Synthesis in Sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr* 101(3): 466-474.
- Reich LJ, Kung JL 2010. Effects of Combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with Various Lactic Acid Bacteria on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage. *Anim Feed Sci Technol* 159(3-4): 105-109.
- Schnürer J, Jonsson A 2011. *Pichia anomala* J121: a 30-year overnight near success biopreservation story. *AvL* 99: 5-12.
- Seale DR, Pahlow G, Spoelstra SF, Lindgren S, Dellaglio F, Lowe JF 1990. Methods for the Microbiological Analysis of Silage. Proceeding of The Eurobac Conference 12-16 August 1986, Uppsala-Sweden, 147 pp.
- Shahryari Z, Fazaelpoor MH, Setoodeh P, Nair RB, Taherzadeh MJ 2018. Utilization of Wheat Straw for Fungal Phytase Production. *Int J Recyc Org Waste Agric* 7: 345-355.
- Tao L, Zhou H, Zhang N, Si B, Tu Y, Ma T, Diao Q 2017. Effects of Different Source Additives and Wilt Conditions on the pH Value, Aerobic Stability, and Carbohydrate and Protein Fractions of Alfalfa Silage. *Anim Sci J* 88(1): 99-106.
- Tilley JMA, Terry RA 1963. A Two-Stage Technique for the In Vitro Digestion of Forage Crops. *J Brit Grassl Soc* 18(2): 104-111.
- Todorov NA, Pavlov DH, Djouvinov DS 1997. Effect of Hybrid, Maturity and Grain Content on Rumen Degradability of Maize Silage. Türkiye 1. Silaj Kongresi, 16-19 September 1997, Bursa, 127-134 pp.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA 1991. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci* 1991 74: 3583-3597.
- Weinberg ZG, Szakacs G, Ashbell G, Hen Y 1999. The Effect of *Lactobacillus buchneri* and *L. plantarum*, Applied at Ensiling, on the Ensiling Fermentation and Aerobic Stability of Wheat and Sorghum Silages. *J Indust Microbiol Biotechnol* 23(3): 218-222.
- Weseh A 2013. Effects of Silage Inoculants on Silage Fermentation, Aerobic Stability and Animal Performance. University of Alberta Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, Canada, PhD Thesis, 33-38 pp.
- Wiedmeier RD, Provenzat FD, Burritt EA 2002. Exposure to Ammoniated Wheat Straw as Suckling Calves Improves Performance of Mature Beef Cows Wintered on Ammoniated Wheat Straw. *J Anim Sci* 80(9): 2340-2348.
- Yuan X, Wen A, Dong Z, Desta ST, Shao T 2017. Effects of Formic Acid and Potassium Diformalate on the Fermentation Quality, Chemical Composition and Aerobic Stability of Alfalfa Silage. *Grass and Forage Sci* 72(4): 833-839.
- Zhang Q, Yu Z, Wang X, Tian J 2018. Effects of Inoculants and Environmental Temperature on Fermentation Quality and Bacterial Diversity of Alfalfa Silage. *Anim Sci J* 89(8):1085-1092.
- Zwiehler JC, Schoendorfer K, Schatzmayr G 2014. A Meta-analysis of *Lactobacillus kefir* DSM 19544 and *Lactobacillus brevis* DSM 23231 as Silage Inoculant in Whole Plant Maize Silage. Proceeding of the International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics 24-26 June 2014, Budapest-Hungary, 173 p.

Anason Tohumu İlavesinin Yumurtacı Tavukların Performans, İç ve Dış Yumurta Kalite Özellikleri ve Yumurta Sarısı Kolesterol Konsantrasyonuna Etkisi

Erkan ÇINAR¹, Asuman ARSLAN DURU²

¹Uşak Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Zootekni Anabilim Dalı, 64200, Uşak, Türkiye, ²Uşak Üniversitesi Ziraat Fakültesi Zootekni Bölümü, 64200, Uşak, Türkiye.

¹<https://orcid.org/0000-0001-8928-4043>, ²<https://orcid.org/0000-0002-7290-1719>

✉: duru.asuman@gmail.com

ÖZET

Bu çalışmada, anason (*Pimpinella anisum* L.) tohumu ilavesinin yumurtacı tavukların performans, yumurta iç ve dış kalitesi ve yumurta sarısı kolesterol konsantrasyonu üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. İlk olarak, çalışmada, alternatif yem katkı maddesi olarak kullanılan anason tohumunun toplam fenolik, toplam flavonoid bileşenleri ve antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Araştırmada, 36 haftalık yaşta 55 adet (deneme başı ortalama canlı ağırlıkları 1741.15 g) ticari Lohmann kahverengi yumurtacı tavuk kullanılmıştır. Hayvanların karma yemlerine kontrol (0), 1, 5, 10 ve 20 g kg⁻¹ anason tohumu ilave edilmiştir. Yem kısıtlı (110 g/hayvan), su ise *ad-libitum*, olarak verilmiştir. Deneme 8 hafta devam ettirilmiştir. Araştırma sonunda, anason tohumu ilavesiyle yumurtacı tavukların yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı bakımından görülen farklılıklar önemli bulunamamıştır (P>0.05). En düşük yumurta verimi, 1 g kg⁻¹ anason tohumu katkılı grupta gözlemlenmiştir (P<0.001). 10 g kg⁻¹ anason tohumu ilavesiyle yumurta ağırlığı artmıştır (P<0.001). Anason tohumu ilavesiyle yumurta sarısı kolesterol miktarı düşmüştür (P<0.05). Yumurta kolesterol düzeyini düşürmek için yeme 1 g kg⁻¹ anason tohumu kullanılabilir.

Araştırma Makalesi

Makale Tarihi

Geliş Tarihi : 04.03.2021

Kabul Tarihi : 20.04.2021

Anahtar Kelimeler

Anason tohumu

Yumurtacı tavuk

Katkı

Performans

Yumurta sarısı kolesterolü

The Effect of Anise Seed (*Pimpinella anisum* L.) Supplement on Performance, Internal and External Egg Quality Traits and Egg Yolk Cholesterol Concentration Level of Laying Hens

ABSTRACT

In this study, it was aimed to investigate the effects of dietary Anise (*Pimpinella anisum* L.) seed treatment on performance, external and internal egg quality and egg yolk cholesterol level of laying hens. First, total phenolic, total flavonoid compounds and antioxidant activity of anise seed as used alternative feed additive in the experiment were determined. In this study, a total number of fifty-five (initial body weight average 1741.15 g) 36-week-old Lohmann Brown laying hens were used commercially. Birds were fed basal (commercial) diets supplement with 0 (control), 1, 5, 10 and 20 g kg⁻¹ anise seed. Feed was offered limited (110 g/hen) and water was available *ad-libitum*. The experiment was continued for 8 weeks. At the end of the study, feed intake and feed conversion ratio of laying hens were not affected by treatments with the addition of anise seed (P>0.05). The lowest egg yield was observed with 1 g kg⁻¹ anise seed treatment (P<0.001). Egg mass increased by 10 g kg⁻¹ anise seed supplement. Egg yolk cholesterol decreased by anise seed supplement compared to control group (P<0.05). 1 g kg⁻¹ anise seed can use to reduce egg yolk cholesterol concentration.

Research Article

Article History

Received : 04.03.2021

Accepted : 20.04.2021

Keywords

Anise seed

Laying hens

Additive

Performance

Egg yolk cholesterol

To Cite: Çınar E, Arslan Duru A 2022. The Effect of Anise Seed (*Pimpinella anisum* L.) Supplement on Performance, Internal and External Egg Quality Traits and Egg Yolk Cholesterol Concentration Level of Laying Hens. KSU J. Agric Nat 25 (1): 198-205. doi.org/10.18016/ksutarimdog.vi.890836.

GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler antik çağlardan beri dünyanın birçok bölgesinde farklı amaçlarla kullanılmıştır. Esas olarak ikincil metabolit değişimi sırasında oluşan uçucu yağları çıkarmak için üretilmekte olup, bunlar genellikle eczacılıkta kullanılmaktadır. Genellikle kuru maddede ortalama % 0.1-2 oranında uçucu yağ bulunmaktadır (Öztekın ve Martinov, 2007). Birçok bitki ve baharat güçlü antioksidan aktiviteye sahip zengin bir fenolik bileşik kaynağıdır (Madsen ve Bertelsen, 1995; Bonanni ve ark., 2007). İnsan sağlığı üzerindeki yararlı etkilerinin yanı sıra, bu bitkiler doğal gıda koruyucuları olarak da kullanılabilirler (Hinneburg ve ark., 2006).

Anason (*Pimpinella anisum* L.) Apiaceae (Şemsiyeçiçekliler) familyasına ait tek yıllık otsu bir tıbbi ve aromatik bitkidir. Türkiye’de *Pimpinella* cinsine ait; 8 adedi endemik olmak üzere toplam 23 tür bulunmaktadır (Davis, 1972). Anasonun tohumlarındaki salgı kanalları içerisindeki kıymetli uçucu yağı sebebiyle; aromatik ve tedavi edici özelliklere sahiptir. Bugün Dünya’da Anason yetiştiren ülkelerin başında; Hindistan, Meksika, Mısır, İtalya, İspanya, Fransa, Bulgaristan, Tunus ve Türkiye gelmektedir (Reineccius, 1994; Arslan ve ark., 2004). Türkiye genelinde anason yetiştirilen bölgelerden toplanan 29 farklı anason tohumunun sahip oldukları uçucu yağ miktarının (% 1.3-3.7) arasında değiştiği ve temel uçucu yağ bileşeninin trans-anethole (% 78.63-95.21) olduğu belirlenmiştir (Arslan ve ark., 2004). Anason uçucu yağının, spazm giderici, antioksidan, mikrop öldürücü, tarımsal uygulamalarda böcek öldürücü veya kovucu; ayrıca antifungal özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir (Haşimi ve ark., 2014). Ayrıca diüretik, gaz giderici özellikleri sebebiyle hazmı ve sindirimi kolaylaştırdığı; antispazmodik etkiye sahip olduğu, hafif sindirim bozuklukları, mide bulantısı, kolik, dispeptik baş ağrısı ve şişkinlik tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir (Janahmadi ve ark., 2006).

Anason tohumlarından elde edilen yağın etlik piliçlerde büyümeyi teşvik ettiği (Çiftçi ve ark., 2005; Şimşek ve ark., 2007; Al-Kassie, 2008; Al-Beitawi ve ark., 2009), anason tohumunun canlı ağırlık ve karkas randımanını artırdığı ve yemden yararlanma oranını düşürdüğü (Mahmood ve ark., 2014), bildiricilerde da yumurta sarısını koyulaştırdığı ve serum kolesterolünü düşürdüğü bildirilmiştir (Christaki ve ark, 2011a; Christaki ve ark, 2011b). Ali ve ark. (2007), yumurtacı tavukların karma yemlerine % 0.25 anason ilavesiyle, yemden yararlanma oranının, yumurta sayısının ve plazmada antioksidan kapasitesinin iyileştiğini ancak kuluçka

randımanı ve fertilitenin azalma eğiliminde olduğunu tespit etmişlerdir. İrani ve ark. (2013), yumurtacı tavuklarda yaptıkları çalışmalarında, en iyi yemden yararlanma oranının ise % 0.4 anason tohumu, en yüksek yumurta ağırlığının % 0.2 anason tohumu katkılı grupta olduğunu ve yumurta verimi, kan kolesterol ve trigliserid konsantrasyonu bakımından gruplar arasında herhangi bir farklılığın olmadığını bildirmişlerdir.

Ülkemizde yetiştiriciliği yapılan ve bu çalışma kapsamında yem katkı maddesi olarak karma yemlere ilave edilen önemli bir tıbbi ve aromatik bitki olan anason tohumunun Gölhisar çeşidi (tek tescilli çeşit) kullanılmıştır. Bu çeşidin, temininin kolay olması ve sahada uygulanabilirliği dikkate alınarak araştırmada kullanılmış olup, yumurtacı tavuklarda bu çeşit ve bu dozlarda yapılan herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanılmamıştır.

Bu çalışma, özellikle bağışıklık sistemini kuvvetlendirici ve iştah açıcı özelliği bulunan ve ayrıca alternatif yem katkısı potansiyeline sahip olan anason tohumunun farklı düzeylerde kullanımı ile yumurtacı tavuklarda performans, yumurta kalitesi ve yumurta sarısı kolesterol düzeyleri üzerine etkilerinin araştırılması amacıyla planlanmış ve yürütülmüştür.

MATERYAL ve METOD

Yemler, hayvan materyali ve deneme düzeni

Bu araştırma, Uşak Üniversitesi Ziraat Fakültesi Kanatlı Hayvan Deneme Ünitesi’nde yürütülmüştür. Bu kapsamda, 36 haftalık yaşta ticari bir işletmeden temin edilen deneme başı ortalama canlı ağırlıkları 1741.15 g olan 55 adet Lohmann kahverengi yumurtacı tavuklar kullanılmıştır. Araştırmaya alınan yumurtacı tavuklar, 3 gözlü 4 katlı (200 cm x 97 cm x 46 cm) yumurtacı tavuk kafesinde bireysel olarak denemeye tabi tutulmuşlardır. Tavuklara çalışma boyunca (8 hafta) 8 saat karanlık, 16 saat aydınlık ışıklandırma programı uygulanmış ve araştırma ünitesinin sıcaklığının, ortalama 25 °C’ de kalması sağlanmıştır. Çalışmanın başlangıcından önce 2 hafta süreyle tavukların günlük yumurta verimleri kaydedilmiş ve 2. haftanın sonunda canlı ağırlıkları belirlenerek deneme modeline uygun olarak hayvanlar benzer canlı ağırlıkta ve benzer yumurta veriminde olacak şekilde deneme gruplarına tesadüfi olarak dağıtılmıştır. Hayvanların karma yemlerine kontrol (0), 1, 5, 10 ve 20 g kg⁻¹ anason tohumu ilave edilerek 5 grup oluşturulmuş ve her bir grupta 11 hayvan olmak üzere toplam deneme başı ortalama canlı ağırlıkları 1741.15 g olan 55 hayvan kullanılmıştır. Araştırmada kullanılan hayvan sayısı

ve yem katkı maddesi olarak kullanılan anason tohumunun düzeyleri benzer çalışmalar dikkate alınarak düzenlenmiştir. Yem kısıtlı (110 g/hayvan), su ise *ad-libitum* olarak verilmiştir. Çalışmaya ait yemin bileşimi Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Araştırma yeminin bileşimi (Faz I)
Table 1. Components of experimental layer diet (Phase I)

| Yemin bileşimi (Faz I) | % |
|--|------------|
| Mısır | 49 |
| Soya küspesi, %44 | 20.3 |
| Ayçiçeği küspesi, %32 | 9.6 |
| Buğday kepeği | 2.8 |
| Mısır gluten unu | 6 |
| Bitkisel yağ | 1 |
| CaCO ₃ | 8.5 |
| DCP (%17.5) | 1.6 |
| Lizin | 0.2 |
| Metiyonin | 0.2 |
| NaCl | 0.3 |
| Mineral madde ve Vitamin ön karışımı* | 0.5 |
| Hesaplanmış besin madde kompozisyonu | |
| ME (kcal kg ⁻¹) | 2730 |
| Ham protein, % | 16.4 |
| Lizin, % | 0.9 |
| Metiyonin + sistin, % | 0.8 |
| Ca, % | 3.7 |
| P (kullanılabilir), % | 0.4 |

* Yemin her kg'ında: 7000 IU Vitamin A, 2000 IU Vitamin D₃, 15 mg Vitamin E, 2 mg Vitamin K₃, 4 mg Vitamin B₂, 10 mg Vitamin B₁₂, 60 mg Mn, 50 mg Zn, 25 mg Fe, 15 mg Cu, 0.25 mg Co, 1 mg I, 0.2 mg Se bulunmaktadır.

Araştırmada katkı maddesi olarak kullanılan anason tohumu, ülkemizdeki tek tescilli çeşit olan Gölhisar çeşidi, ticari olarak faaliyet gösteren bir firmadan temin edilmiştir. İçinde bulunan sap ve yabancı maddeler uzaklaştırıldıktan sonra hayvanlara yedirmek üzere hazır hale getirilmiştir.

Performans parametreleri

Araştırmanın başlangıcında ve sonunda, yumurtacı tavukların canlı ağırlıkları belirlenmiş ve aralarındaki fark, canlı ağırlık değişimi olarak kaydedilmiştir. 8 hafta süren araştırma boyunca hayvanların yem tüketimleri, yumurta sayısı ve ağırlığı günlük olarak tespit edilmiş ve yemden yararlanma oranı ise aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır.

Yemden Yararlanma Oranı= Toplam Yumurta Ağırlığı / Toplam Tüketilen Yem

Araştırma süresince elde edilen yumurtalar her gün ve günde bir kez olmak üzere aynı saatte toplanmıştır. Yumurtalar toplandıktan hemen sonra

0,01 g hassasiyetli terazide tartılmış ve yumurta ağırlıkları tespit edilmiştir. Araştırma kapsamında, hayvanlara ait yumurta verimleri haftalık olarak ele alınmış ve aşağıda verilen eşitlikle hesaplanmıştır;

Yumurta Verimi= Toplam Yumurta Sayısı / Toplam Hayvan Sayısı

Laboratuvar analizleri

Anason tohumunun Elzaawely ve Tawata, (2012)'nin bildirdiği şekilde toplam fenolik madde tayini, alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile toplam flavonoid madde tayini (Chang ve ark., 2002) ve Villano ve ark. (2007) bildirdiği yöntemle göre antioksidan aktivite analizleri yapılmıştır (Çizelge 2 ve Çizelge 3).

Çizelge 2. Anason tohumunun toplam fenolik ve toplam flavonoid madde içerikleri

Table 2. Total phenolic and total flavonoid contents of anise seed

| Parametreler (Parameters) | Anason tohumu (Anise seed) |
|---|----------------------------|
| Toplam fenolik madde (mg GAE/ g D.W.) | 5.8 |
| Toplam flavonoid madde (mg CAE/ gr. D.W.) | 16.2 |

Çizelge 3. Anason tohumunun inhibisyonu (%)

Table 3. Inhibition of anise seed

| Parametreler (Parameters) | Inhibisyon (%) (Inhibition) |
|---------------------------|-----------------------------|
| Askorbik Asit | 80 |
| Anason tohumu | 25 |

Araştırma sonunda elde edilen yumurtaların sarılarında kolesterol miktarının tayini için araştırmanın tamamlandığı gün her gruptan 6 adet olmak üzere toplam 30 adet yumurta kolesterol analizi için ayrılmıştır. Toplanan yumurtalar haşlanmış ve haşlanan yumurtalardan sarıları alınarak ezilerek karıştırılmış ve homojenize edilerek analize hazır hale getirilmiştir. Hazırlanan örneklerden 0.1 g hassas terazide tartıldıktan sonra cam tüpe aktarılmış ve üzerine 4 ml izopropil alkol ilave edilmiştir. 3000 rpm/dak devirle 2-3 dakika vortekste karıştırılan örnekler daha sonra 37 °C'de su banyosunda 10 dakika bekletilmiş daha sonra 5 dakika süre ile 25 °C'de 3000 rpm/dak devirde santrifüj edilmiştir. Yumurta sarılarının kolesterol konsantrasyonu ticari kit ile spektrofotometrede belirlenmiş ve hesaplamalar Biochemical Analysis and Food Analysis'ın bildirdiği metoda göre yapılmıştır (Anonymous, 1989).

Yumurta İç-Dış Kalite Analizleri

Araştırmada yumurta iç-dış kalite analizleri anason tohumu ilaveli yemler verilmeye başlandığı haftadan itibaren araştırma sonuna kadar iki haftada bir kez olmak üzere toplam 4 defa yapılmıştır. İç ve dış kalite

özellikleri belirlenirken öncelikle her gruptan 6'şar adet yumurta toplanmış, yumurtanın ağırlığı 0.01 g hassasiyetli terazide tartılmış ve dijital kumpasla yumurtanın eni ve boyu mm olarak ölçülmüştür. Daha sonra yumurta kırılmış ve yaş kabuk ağırlığı tartılmıştır.

Kırılan yumurtanın sarı ve ak yüksekliği, sarı çapı ve ak çapı yine kumpas yardımıyla kayıt altına alınmıştır. Bu ölçüm sonrası yumurta akından yumurta sarısı ayrılmış ve tartılmış aynı zamanda yumurta sarısının renk derecesi Roche sarı renk yelpazesi kullanılarak numarası belirlenmiştir. Yumurta iç ve dış kalite kriterlerinden şekil indeksi Reddy ve ark. (1979), sarı indeksi Sharp ve Powell (1930), ak indeksi Heiman ve Carver (1936) ve Haugh birimi Haugh (1937)'nin bildirdikleri formüllere göre hesaplanmıştır.

Çizelge 4. Anason tohumunun yumurtacı tavukların deneme başı ve deneme sonu canlı ağırlık ortalamaları ve canlı ağırlık değişimine etkisi

Table 4. The effects of anise seed on the initial body weight, final body weight and change body weight of laying hens

| Parametreler (Parameters) | Anason Tohumu Düzeyleri (g kg ⁻¹) (Anise Seed Levels) | | | | | SEM | P |
|------------------------------|--|---------|---------|---------|---------|-------|------|
| | Kontrol (Control) | 1 | 5 | 10 | 20 | | |
| DBCA, g | 1740.91 | 1714.00 | 1757.50 | 1741.36 | 1752.00 | 21.84 | 0.98 |
| DSCA, g | 1721.82 | 1725.00 | 1709.00 | 1723.64 | 1729.50 | 20.53 | 0.99 |
| CAD, g | -19.09 | 11.00 | -48.50 | -17.52 | -22.50 | 15.16 | 0.84 |

DBCA: Deneme Başı Canlı Ağırlık; DSCA: Deneme Sonu Canlı Ağırlık; CAD: Canlı Ağırlık Değişimi.

Çizelge 5. Anason tohumunun yumurtacı tavukların yem tüketimi, yemden yararlanma oranı ve yumurta verimine etkisi

Table 5. The effects of anise seed on feed intake, feed conversion ratio, egg yield (number), egg mass (g) of laying hens

| Parametreler (Parameters) | Anason Tohumu Düzeyleri (g kg ⁻¹) (Anise Seed Levels) | | | | | SEM | P |
|------------------------------|--|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------|-------|
| | Kontrol (Control) | 1 | 5 | 10 | 20 | | |
| Yem tüketimi (g) | 98.27 | 96.43 | 97.85 | 101.27 | 98.57 | 0.53 | 0.24 |
| Yemden yararlanma oranı | 1.56 | 1.61 | 1.58 | 1.53 | 1.59 | 0.01 | 0.14 |
| Yumurta verimi (adet) | 5.22 ^a | 4.22 ^b | 4.86 ^{ab} | 5.24 ^a | 4.84 ^{ab} | 0.10 | 0.001 |
| Yumurta ağırlığı (g/gün) | 62.53 ^b | 59.98 ^c | 62.11 ^b | 66.74 ^a | 62.09 ^b | 0.25 | 0.001 |

^{a,b,c} Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grupların ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.001).

Araştırma sonunda, anason tohumu katkısının yumurtacı tavukların yem tüketimine etki etmediği belirlenmiştir (P>0.05). Bayram ve ark. (2007), anason tohumu ilavesiyle yumurtacı bildircinların günlük yem tüketiminin önemli düzeyde arttığını; çalışmaya benzer şekilde Ali ve ark. (2007), yumurtacı tavukların yemlerine % 0.25 düzeyinde anason tohumu ilavesiyle; Soltan ve ark. (2008), etlik

İstatistik Analizler

Araştırmada elde edilen veriler, SPSS paket programı kullanılarak One-Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) ile istatistik analiz ve muamele grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır (SPSS, 2013).

BULGULAR ve TARTIŞMA

Anason tohumu ilave edilen karma yemlerle beslenen yumurtacı tavukların deneme başı ve deneme sonu canlı ağırlık ortalamaları ve deneme sonu canlı ağırlık değişimlerine etkisi Çizelge 4' de verilmiştir.

Hayvanların deneme sonu canlı ağırlık ortalamalarına ve deneme sonu canlı ağırlık değişimine anason ilavesinin etki etmediği belirlenmiştir (P>0.05). Yumurtacı tavukların karma yemlerine farklı düzeylerde ilave edilen anason tohumunun yem tüketimi, yemden yararlanma oranı, yumurta verimine etkisi Çizelge 5' de verilmiştir.

piliçlerin karma yemlerine 1.5 g kg⁻¹ anason ilavesiyle yem tüketiminin değişmediğini belirtmişlerdir.

Yumurtacı tavuk karma yemlerine farklı düzeylerde anason tohumu ilavesiyle yemden yararlanma oranı bakımından önemli bir farklılık bulunmamıştır (P>0.05). 10 g kg⁻¹ anason tohumu katkılı grubun yemden yararlanma oranınının 1.53 seviyesine düştüğü belirlenmiş ve bu farklılık sayısal düzeyde kalsa da

diğer gruplara göre düşük bulunmuştur. Ertaş ve ark. (2005), etlik piliçlerin karma yemlerine içeriğinde anasonun yağının da bulunduğu esansiyel yağ karışımı ilavesiyle yemden yararlanma oranının değişmediğini; bununla birlikte, Irani ve ark. (2013) yumurtacı tavukların yemlerine % 0.4 anason tohumu ilavesiyle en iyi yemden yararlanma oranının elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, yumurta verimi ve yumurta ağırlığı, 1 g kg⁻¹ anason tohumu ilavesiyle önemli düzeyde düşmüştür (P<0.001). Yumurtacı tavukların karma yemlerine 10 g kg⁻¹ anason tohumu ilavesiyle yumurta ağırlığı diğer gruplara nazaran önemli düzeyde artmıştır (P<0.001). Yumurta ağırlığı bakımından görülen bu farklılık, anason tohumunun iştah açıcı özelliğinden (Eiben ve ark., 2004; Kosalec ve ark., 2005) ve o gruptaki hayvanların daha fazla yem tüketmesinden kaynaklanmış olabilir. Christaki ve ark. (2011a), yumurtacı bıldırcınların karma yemlerine anason tohumu ve 600 mg Alfa-tokoferol asetat (vitamin E) ilavesiyle; Bayram ve ark. (2007), yine yumurtacı bıldırcınların karma yemlerine % 0 (kontrol), 1, 2, 3, 4 ve 5 oranında anason tohumu ilavesiyle yumurta veriminin değişmediğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte, El-Deeb ve ark. (2007) bıldırcın karma

yemlerine anason ilavesiyle yumurta veriminin % 10 düzeyinde azaldığını belirtmişlerdir.

Yemin enerji ve protein içeriklerinin hayvanların yem tüketimi ve yumurta verimi üzerine etkisinin olduğu bilinmektedir (Kakengi ve ark. 2007). Bu nedenle yumurtacı tavukların yem tüketimi, yumurta verimi ve yemden yararlanma oranı bakımından anason tohumun ilavesiyle olumsuz etkilenmemesi yeterli miktarda protein ve enerji tüketimi ile açıklanabilir. Sonuç olarak, yumurtacı tavukların karma yemlerine anason tohumu ilavesinin yem tüketimi ve yemden yararlanma oranını bazı araştırmaların aksine özellikle yüksek dozları da dahil olmak üzere olumsuz etkilemediği, hatta yumurta verimi ve ağırlığı bakımından özellikle 10 g kg⁻¹ anason katkısıyla iyileştiği belirlenmiştir. Bununla birlikte, yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı bakımından kontrol grubuna göre artış olmaması da yemlere ilave edilen dozlarından ve/veya anason tohumunun herhangi bir işleme tabi tutulmadan direk karma yeme ilavesinden kaynaklanmış olabilir.

Anason tohumunun yumurta sarısı kolesterol konsantrasyonları etkisine ait sonuçlar Çizelge 6'da sunulmuştur.

Çizelge 6. Anason tohumunun yumurta sarısı kolesterol konsantrasyonuna etkisi

Table 6. The effects of anise seed on egg yolk cholesterol concentration

| Parametreler (Parameters) | Anason Tohumu Düzeyleri (g kg ⁻¹) (Anise Seed Levels) | | | | | | |
|---|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------|------|
| | Kontrol (Control) | 1 | 5 | 10 | 20 | SEM | P |
| Yumurta sarısı kolesterol konsantrasyonu, mg kg ⁻¹ | 61.20 ^a | 46.38 ^b | 51.06 ^b | 50.11 ^b | 52.75 ^b | 1.52 | 0.02 |

^{a,b} Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grupların ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir (P<0.01).

Anason tohumu ilave edilen bütün grupların yumurta sarısı kolesterol konsantrasyonunun, kontrol grubuna göre önemli düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir (P<0.05).

GC ve GC-MS cihazıyla yapılan analizlerde, anason bitkisinin içeriğinde % 93.6 trans-anetol ve % 2.4 düzeylerinde estragol olduğu belirlenmiştir (Ozcan ve Chalchat, 2006). Yapılan çalışmada anason katkılı tüm grupların kontrol grubuna göre daha düşük yumurta sarısı kolesterol değerleri göstermesi, anason tohumunun etken maddesi olan trans-anetolden kaynaklanmış olabilir. Bazı araştırmacılara göre, fitöstrojenik bitkiler, insanlarda ve hayvanlarda kolesterol konsantrasyonunda değişikliklere sebep olabileceği yönündedir (Knight ve Eden, 2006). Bayram ve ark. (2007), yumurtacı bıldırcınların karma yemlerine farklı düzeylerde anason tohumu ilavesiyle yumurta sarısının kolesterol miktarının düştüğünü ancak bu düşüşün sayısal düzeyde kaldığını saptamışlardır. Anason tohumu ilavesinin kan total kolesterolüne etkileri üzerine yapılan çalışmalarda; Saki ve ark. (2014), yumurtacı

tavukların karma yemlerine anason tohumunun da karışımında bulunduğu 0, 4, 8, 12 g kg⁻¹ düzeylerinde fitojenik yem katkısı ilavesiyle; Küçük Kurt ve ark. (2009), yumurtacı bıldırcınların karma yemlerine 0, 10, 20 30, 40 ve 50 g kg⁻¹ anason tohumu ilavesiyle kanda total kolesterol miktarının değişmediğini, Christaki ve ark. (2011a) 10 ve 20 g kg⁻¹ anason tohumu ilavesiyle; Al-Shammari ve ark. (2017), etlik piliçlerin sularına 0.25 ve 0.50 g kg⁻¹ anason tohumu ilavesiyle kanda total kolesterol miktarının azaldığını bildirmişlerdir.

Farklı düzeylerde ilave edilen anason tohumunun yumurta iç-dış kalite parametrelerine (yumurta ağırlığı, yumurta kabuk ağırlığı, sarı ağırlığı, yumurta kabuk kalınlığı, sarı renk derecesi, şekil indeksi, ak indeksi, sarı indeksi ve Haugh birimi) etkisi Çizelge 7'de verilmiştir.

10 g kg⁻¹ anason tohumu katkılı grubun yumurta ağırlığı; 10 ve 20 g kg⁻¹ anason tohumu katkılı grupların yumurta kabuk ağırlığı yüksek bulunmuştur (P<0.01). 5 g kg⁻¹ anason tohumu katkılı grubun sarı ağırlığı, 1 ve 10 g kg⁻¹ anason tohumu

katkılı gruplarla karşılaştırıldığında düşük olduğu gözlemlenmiştir ($P<0.01$). Kontrol grubunun Haugh biriminin, 1 g kg^{-1} anason tohumu katkı grup hariç diğer gruplar bakımından düşük olduğu sonucuna varılmıştır ($P<0.05$). Anason tohumu ilavesiyle

yumurtaların sarı renk derecesi, şekil indeksi, ak indeksi, sarı indeksi ve yumurta kabuğu kalınlığı bakımından önemli bir farklılık bulunmamıştır ($P>0.05$).

Çizelge 7. Anason tohumunun yumurta iç ve dış kalite parametrelerine etkisi

Table 7. Effect of anise seed on internal and external parameters of eggs

| Parametreler (Parameters) | Anason Tohumu Düzeyleri (g kg^{-1}) (Anise Seed Levels) | | | | | SEM | P |
|-------------------------------|---|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|-------|------|
| | Kontrol (Control) | 1 | 5 | 10 | 20 | | |
| Yumurta ağırlığı (g) | 60.56 ^b | 60.15 ^b | 60.20 ^b | 65.75 ^a | 60.61 ^b | 0.58 | 0.01 |
| Yumurta kabuk ağırl. (g) | 8.26 ^b | 8.24 ^b | 8.32 ^b | 8.98 ^a | 8.87 ^a | 1.10 | 0.01 |
| Sarı ağırlığı (g) | 15.35 ^{abc} | 15.53 ^{ab} | 14.84 ^c | 15.91 ^a | 15.12 ^{bc} | 0.10 | 0.01 |
| Yum. kabuk kalın. (μm) | 0.36 | 0.35 | 0.36 | 0.36 | 0.37 | 0.004 | 0.39 |
| Sarı renk derecesi | 11.94 | 11.48 | 11.09 | 11.25 | 11.81 | 0.15 | 0.36 |
| Şekil indeksi | 62.69 | 60.86 | 63.05 | 64.36 | 63.81 | 2.11 | 0.99 |
| Ak indeksi | 8.02 | 8.94 | 9.99 | 9.37 | 9.03 | 0.21 | 0.06 |
| Sarı indeksi | 35.78 ^a | 34.91 ^{ab} | 33.93 ^b | 35.88 ^a | 35.67 ^a | 0.19 | 0.01 |
| Haugh birimi | 87.08 ^b | 91.81 ^{ab} | 95.32 ^a | 93.15 ^a | 96.09 ^a | 0.94 | 0.02 |

^{a,b,c} Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grupların ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.001$).

^{a,b} Aynı satırda farklı harfleri taşıyan grupların ortalamaları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemlidir ($P<0.005$).

Çalışmaya benzer şekilde, araştırma sonunda Bayram ve ark. (2007), yumurtacı bildircinlerin karma yemlerine anason tohumu ilavesiyle Haugh birimi ve yumurta kabuk kalınlığı; Christaki ve ark. (2011b), yine yumurtacı bildircinlerin karma yemlerine anason ilavesiyle yumurta sarısı ağırlığı ve yumurta kabuk kalınlığı bakımından görülen farklılıkların önemli olmadığı sonucuna varmışlardır. Ali ve ark. (2007), yumurtacı tavukların karma yemlerine % 0.25 anason ilavesiyle araştırma sonunda, sarı indeksi, sarı renk derecesi, kabuk ağırlığı ve kabuk kalınlığı bakımından önemli bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir. Yumurta iç-dış kalite parametreleri bakımından çalışmalar arasında görülen farklılıklar, araştırmalarda kullanılan anason çeşidinin ve yumurtacı tavuk hatlarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir.

SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırma sonunda, farklı düzeylerde anason tohumu ilave edilen karma yemleri tüketen yumurtacı tavuklarda yem tüketimi ve yemden yararlanma oranı bakımından önemli bir değişiklik olmadığı ancak yumurta verimi ve ağırlığının arttığı belirlenmiştir.

Yumurta sarısı kolesterol düzeyini incelediğimizde, anason tohumunun ilave edildiği her grupta kolesterol düzeyinin kontrol grubuna göre düşük olduğu belirlenmiş olup, en iyi sonucu karma yeme eklenen 1 g kg^{-1} düzeyinde anason tohumunun verdiği ortaya çıkmıştır. Anason tohumun farklı dozlarda ve

farklı yöntemlerle ekstrakte edilen ve/veya farklı yem katkı maddeleriyle bir arada kullanılarak yumurtacı tavuklardaki etkisinin araştırılması önerilebilir. Bu çalışma kapsamında hem performans pozitif etkisi ve hem de yumurta sarısı kolesterol düzeyini düşürmek için 1 g kg^{-1} anason tohumu kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Erkan Çınar'ın Yüksek Lisans Tezinin özetidir ve Uşak Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 2017/TP006 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür. Ayrıca, bu çalışmanın deneysel çalışmaları için 2016/01-02 nolu karar ile Uşak Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yerel Etik Kurulu tarafından "Etik Kurul" izni alınmıştır.

Araştırmacıların Katkı Oranı Beyan Özeti

Yazarlar makaleye eşit oranda katkı sağlamışlardır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarları arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

KAYNAKLAR

- Al-Beitawi NA, El-Ghousein SS, Nofal AH 2009. Antibiotic growth promoters and anise seeds in broiler diets. Jordan J. Agri. Sci, 5(4): 472-481.
Ali MN, Hassan, MS, Abd El-Ghany FA 2007. Effect of strain, type of natural antioxidant and sulphate

- ion on productive, physiological and hatching performance of native laying hens. *Int. J. Poult. Sci.* 6(8): 539-554.
- Al-Kassie GAM 2008. The effect of anise and rosemary on broiler performance. *Int. J. Poult. Sci.* 7(3): 243-245.
- Al-Shammari KIA, Batkowska J, Gryzińska MM 2017. Effect of various concentrations of an anise seed powder (*Pimpinella Anisum* L.) supplement on selected hematological and biochemical parameters of broiler chickens. *Braz. J. Poult. Sci.* 19 (1): 41-46.
- Anonymous 1989. Boehringer manheim GmbH biochemica: Methods of biochemical analysis and food analysis, Mannheim-Germany. pp: 26-28
- Arslan N, Gürbüz B, Sarihan EO, Bayrak A, Gümüşçü A 2004. Variation in essential oil content and composition in Turkish Anise (*Pimpinella anisum* L.) Populations. *Turk J Agric For* 28 (3) :173-177.
- Bayram İ, Çetingül IS, Akkaya B, Uyarlar C 2007. Effects of aniseed (*Pimpinella anisum* L.), on egg production, quality, cholesterol levels, hatching results and the antibody values in blood of laying quails (*Coturnix coturnix japonica*), *Archiva Zootechn.* 10: 73-77.
- Bonanni A, Campanella L, Gatta T, Gregori E, Tomassetti M 2007. Evaluation of the antioxidant and prooxidant properties of several commercial dry spices by different analytical methods. *Food Chem.* 102 (3): 751-758.
- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10(3):178-182.
- Christaki, EV, Bonos EM, Florou-Paneri PC, 2011a. Use of anise seed and/or α -tocopheryl acetate in laying Japanese quail diets. *South African J Anim. Sci.* 41(2): 126-133.
- Christaki EV, Bonos EM, Florou-Paneri PC, 2011b. Comparative evaluation of dietary oregano, anise and olive leaves in laying Japanese quails. *Braz. J. Poult. Sci.* 13(2): 97-101.
- Çiftçi M, Güler T, Dalkılıç B, Ertaş N 2005. The effect of anise oil (*Pimpinella anisum* L.) on broiler performance. *Int. J. Poult. Sci.* 4(11): 851-855.
- Davis PH 1972. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 4. Edinburgh University Press, Edinburgh.
- Eiben CS, Rashwan AA, Kustos K, Gódor-Surmann K, Szendrő ZS 2004. Effect of anise and fenugreek supplementation on performance of rabbit Does. *Proceedings - 8th World Rabbit Congress - September 7-10, 2004 - Puebla, Mexico.*
- El-Deeb MA, Metwally MA, Galal AE 2007. The impact of botanical extract, capsicum (*Capsicum frutescens* L.), anise and molukhyia (*Corchorus olitorius*) supplementation and their interactions on productive and reproductive performance of Japanese quail (*Coturnix japonica*). 4th World Poultry Conference; 2007 March 27-30; Sharm El-Seikh. Egypt. 455-464.
- Elzaawely AA, Tawata S 2012. Antioxidant activity of phenolic rich fraction obtained from *Convolvulus arvensis* L. leaves grown in Egypt. *J. Crop. Sci.* 4(1): 32-40.
- Ertaş ON, Güler T, Çiftçi M, Dalkılıç B, Şimşek UG 2005. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. *Int. Journal of Poultry Sci.* 4(11): 879-884.
- Haşimi N, Tolan V, Kızıl S, Kılınç E 2014. Anason (*Pimpinella anisum* L.) ve kimyon (*Cuminum cyminum* L.) tohumlarının uçucu yağ kompozisyonu ile antimikrobiyal ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi, *Tarım Bilimleri Dergisi.* 20(1):19-26.
- Haugh RR 1937. The Haugh unit for measuring egg quality. *US Egg Poultry Mag.*, 43:522-555, 572-573.
- Heiman VA, Carver JS 1936. Albumen index as a physical measurement of observed egg quality, *Poult. Sci.* 15:141-148.
- Hinneburg I, Dorman D, Hiltunen R 2006. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. *Food Chem.*, 91(1): 122-129.
- Irani M, Varastegani A, Ziarlarimi A, Jadidi BI 2013. The effects different levels of aniseed (*Pimpinella anisum* L.) medicinal plant on laying hens performance. *Journal of Med. Plants Res.*, 7(18): 1249-1254.
- Janahmadi M, Niazi F, Danyali S, Kamalinejad M 2006. Effects of the fruit essential oil of Cumin seed Linn. (Apiaceae) on pentylene tetrazol induced epileptic form activity in F1 neurons of *Helix aspersa*. *Journal of Ethnopharma.* 104(1-2): 278-282.
- Kakengi AMV, Kaijage J, Sarwatt S, Mutayoba SK, Shem MN, Fujihara T 2007. Effect of *Moringa oleifera* leaf meal as a substitute for sunflower seed meal on performance of laying hens in Tanzania. *Livest Res Rural Dev.* 19.
- Knight DC, Edens JA 1996. A review of the clinical effects of phytoestrogens. *Obstet. Gynecol.* 87, 897-904.
- Kosalec I, Pepelnjak S, Kuštrak D 2005. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). *Acta Pharm.* 55(4): 377-385.
- Kucukkurt I, Avcı G, Eryavuz A, Bayram I, Çetingül IS, Akkaya AB, Uyarlar C 2009. Effects of supplementation of aniseed (*Pimpinella anisum* L.) at various amounts to diets on lipid peroxidation, antioxidant activity and some biochemical parameters in laying quails (*Coturnix coturnix*

- japonica*). Kocatepe Vet J. 2 (1): 1-5.
- Madsen HL, Bertelsen G 1995. Spices as antioxidants. Trends in Food Sci. and Techn. 6(8): 271-277.
- Mahmood MS, Ahmad MF, Hussain I, Abbas RZ, Khan A, Rafiq A 2014. Growth promoting effect of *Pimpinella anisum* (Aniseed) in broiler chickens. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 13(3): 278-284.
- Ozcan MM, Chalchat JC 2006. Chemical composition and antifungal effect of anise (*Pimpinella anisum* L.) fruit oil at ripening stage. Annals of Microbio. 56 (4): 353– 358.
- Oztekin S, Martinov M 2007. Medical and Aromatic Crops. New York: Haworth Food & Agricultural Product Press.
- Reddy PM, Reddy VR, Reddy CV And Rap PSP 1979. Egg weight, shape index and hatch ability in Khaki Campbell duck egg, Indian J. Poult. Sci. 14:26-31.
- Reineccius G 1994. Source Book of Flavours. 2nd ed. Chapman and Hall, New York.
- Saki AA, Aliarabi H, Siyar SAH, Salari J, Hashemi M, 2014. Effect of a phytogetic feed additive on performance, ovarian morphology, serum lipid parameters and egg sensory quality in laying hen. Vet. Res. Forum. 5 (4): 287-293.
- Sharp PF, Powell CK 1930. Decrease in internal quality of hen's eggs during storage as by the yolk, Ind. Eng. Chem. Res., 22:909- 910.
- Soltan MA, Shewita RS, El-Katcha MI 2008. Effect of dietary anise seeds supplementation on growth performance, immune response, carcass traits and some blood parameters of broiler chickens. Int. J. Poult. Sci., 7(11): 1078-1088.
- Şimşek ÜG, Çiftçi M, Dalkılıç B, Güler T, Ertaş, ON 2007. The effects of dietary antibiotic and anise oil supplementation on body weight, carcass characteristics and organoleptic analysis of meat in broilers. Revue de Médecine Vétérinaire, 158(10): 514-518.
- SPSS 2013. IBM SPSS Statistics 21.0 for Windows. Armonk, NY.
- Villano D, Fernandez-Pachon MS, Moya ML, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, Talanta, 71(1): 230-235.