**T.C.**
**HARRAN ÜNİVERSİTESİ**
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

# ELMA MAVİKÜF (*Penicillium expansum*) HASTALIK ETMENİNİN GLUKOZ, SUKROZ VE VİTAMİN C'YE KARŞI DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

**Beritan ÇAPA**

**BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA**
**2022**

# İÇİNDEKİLER

**Sayfa No**


ÖZET ..... i
ABSTRACT ..... ii
TEŞEKKÜR ..... iii
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... iv
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... v
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ ..... vi
1. GİRİŞ ..... 1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR ..... 9
3. MATERYAL ve YÖNTEM ..... 12
3.1. Materyal ..... 12
3.2. Yöntem ..... 13
3.2.1. Toplam spor sayımı ..... 14
3.2.2. Misel ağırlığı ..... 15
3.2.3. Fungusların pH ölçümü ..... 15
3.2.4. Funguslarda elektriksel iletkenlik (EC) değerlerinin belirlenmesi ..... 16
3.2.5. Fungal etmenin geliştiği ortamın protein içeriğinin belirlenmesi ..... 16
3.2.6. Proteaz aktivitesi ..... 18
3.2.7. Lakkaz enzim ölçümü ..... 19
3.2.8. Proline ölçümü ..... 20
3.2.9. MDA (Malondialdehide) ..... 21
3.2.10. Melanin analizi ..... 21
3.2.11. İstatistiksel analiz ..... 23
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA ..... 24
4.1. Fiziksel Parametreler ..... 24
4.1.1. Toplam spor sayısı ..... 24
4.1.2. Fungusun miselyal ağırlığı ..... 25
4.1.3. Fungusun EC ve pH değerleri ..... 26
4.2. Biyokimyasal Parametreler ..... 29
4.2.1. Fungusun geliştiği ortamın protein içeriğinin belirlenmesi ..... 29
4.2.2. Fungusun proteaz ve lakkaz aktivitelerinin belirlenmesi ..... 29
4.2.3. Proline ve MDA değerleri ..... 33
4.2.4. Fungal etmenin melanin değerleri ..... 35
4.3. Tartışma ..... 37
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER ..... 43
KAYNAKLAR ..... 45
ÖZGEÇMİŞ ..... 51

# ÖZET


**Yüksek Lisans Tezi**

## ELMA MAVİKÜF (*Penicillium expansum*) HASTALIK ETMENİNİN GLUKOZ, SUKROZ VE VİTAMİN C'YE KARŞI DUYARLILIKLARININ BELİRLENMESİ

**Beritan ÇAPA**

**Harran Üniversitesi**
**Fen Bilimleri Enstitüsü**
**Bitki Koruma Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ**
**YIL: 2022, Sayfa:52**

Bu tez çalışmasında farklı konsantrasyonlarda şeker (glukoz ve sukroz) ve vitamin C içeren sıvı ortamlarda *Pencillium expansum* patojeninin fizyolojik, biyokimyasal tepkileri değerlendirilerek *in vitro* şartlar değiştiğinde patojenin davranışının (fizyolojik ve biyokimyasal) ne yönde olacağı araştırılmıştır. Bu çalışmada ele alınan şeker ve vitaminlerin *in vivo* koşullarda yansıması elma meyvesi ile uyumlu olduğu için elma meyvesi model meyve olarak ele alınmıştır. Bu sebeple elmanın vitamin, glukoz ve sukroz değerlerini simüle ederek *in vitro* koşullarda patojenin fizyolojik (miselyal ağırlığı, sporulasyon, pH ve EC değerleri) ve biyokimyasal (protein, proteaz, proline, MDA, lakkaz ve melanin) karakterinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir. Çalışmada kullanılan PDB ortamları için; glukoz, sukroz ve vitamin C; 0-, 5-, 20-, 25-, 50-, 75-, 100-, 125-, 150-, ve 200 g/L konsantrasyonları kullanılmış ve her bir konsantrasyon için 4 tekerrür oluşturulup negatif kontrol grupları için saf su kullanılmıştır. Pozitif kontrol ise PDB içeren ancak ilgili kimyasal maddeyi içermeyen ortam olarak hazırlanmıştır. Patojenin *in vitro* şartlarında miselyal gelişimi ve sporolasyonu artan şeker ve vitamin konsantrasyonlarına bağlı olarak artmış ancak miselyal gelişim sukroz içeren ortamda 50 g/L, vitamin C içeren ortamda ise 25 g/L konsantrasyonundan sonra azalmıştır. Yine artan ortam koşullarında pH değeri azalırken EC değeri önemsiz bulunmuştur. Yüksek şeker ve vitamin konsantrasyonlarında 25 g/L konsantrasyonlarına kadar ki protein ve proteaz miktarı artmış daha yüksek konsantrasyonlardaki değerler istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur. Proline miktarı ise kısmen proteine bağlı olarak artmıştır. Melanin, artan şeker ve vitamin konsatrasyonlarına paralel olarak artmıştır. Ancak glukoz ve vitamin C içeren ortamlar sukroz içeren ortamlara göre melanin üretimi açısından daha etkili bulunmuştur. MDA ve lakkaz enzimleri ise istatistiksel olarak anlamsız bulunmuştur.



**ANAHTAR KELİMELER:** *Penicillium expansum*, elma, Vitamin C, Glukoz, Sukroz

# ABSTRACT

**MSc Thesis**

## RESPONSES OF APPLE BLUE MOLD (*Penicillium expansum*) AGENT AGAINST GLUCOSE, SUCROSE AND VITAMIN C COMPONENTS

**Beritan ÇAPA**

**Harran University**
**Graduate School of Natural and Applied Sciences**
**Department of Plant Protection**

**Supervisor: Assoc. Prof. Murat DİKİLİTAŞ**
**Year:2022, Page:52**

In this thesis, the physiological and biochemical responses of *Pencillium expansum* pathogen were evaluated in liquid media containing different concentrations of sugar (glucose and sucrose) and vitamin C, and the behavior of the pathogen (physiological and biochemical) was investigated when in vitro conditions were changed. In this study, apple fruit was considered as a model fruit because the reflection of sugar and vitamins in vivo was compatible with apple fruit. For this reason, it is aimed to reveal the physiological (mycelial weight, sporulation, pH and EC values) and biochemical (protein, protease, proline, MDA, laccase and melanin) character of the pathogen in vitro by simulating the vitamin, glucose and sucrose values of apples. For the PDB environments used in the study; glucose, sucrose and vitamin C; Concentrations of 0-, 5-, 20-, 25-, 50-, 75-, 100-, 125-, 150-, and 200 g/L were used and 4 replications were created for each concentration, using pure water for the negative control groups. The positive control was prepared as a medium containing PDB but not containing the relevant chemical substance. Mycelial growth and sporolation of the pathogen increased in vitro due to increased sugar and vitamin concentrations however, mycelial growth decreased after 50 g/L concentration in sucrose-containing medium and 25 g/L concentration in vitamin C containing medium. Again, under increasing ambient conditions, the pH value decreased, while the EC value was found to be insignificant. At high sugar and vitamin concentrations, the amount of protein and protease increased up to 25 g/L concentrations, and the values at higher concentrations were found to be statistically insignificant. The amount of proline increased partially due to protein. Melanin increased in parallel with increasing sugar and vitamin concentrations. However, media containing glucose and vitamin C were found to be more effective in terms of melanin production than media containing sucrose. MDA and laccase enzymes were found to be statistically insignificant.

**KEYWORDS:** *Penicillium expansum*, apple, Vitamin C, Glocuse, Sucrose

# TEŞEKKÜR

Bu tez çalışma konumun belirlenmesinde, yürütülüp, sonuçlanmasında bana çalışma imkânı sunan, tezimin tüm aşamasında uzman görüşleri ve tecrübeleri ile bana yol gösterip gelişmeme katkıda bulunan danışmanım sayın Doç. Dr. Murat DİKİLİTAŞ'a en derin saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmanın yürütülmesi için gerekli olan laboratuvar analizlerinin yapılmasında yardımlarını esirgemeyen sayın Dr. Öğr. Üyesi Sema KARAKAŞ DİKİLİTAŞ'a, yüksek lisans eğitimim boyunca, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli yardımcı olan sayın Ziraat Yüksek Mühendisi Behzat BARAN'a, doktora öğrencileri Havva GÜMÜŞ ve Hümeyra AYVACI'ya, yüksek lisans öğrencileri Ayşe Hümeyra KOÇAKOĞLU ve Sıdıka DURMUŞ'a ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

# ŞEKİLLER DİZİNİ

**Sayfa No**

Şekil 1.1. *Penicillium*'un elektron mikroskobundaki ve besi ortamındaki görüntüsü ..... 5
Şekil 3.1. PDA ortamındaki *Penicillium expansum* fungal etmeni ..... 12
Şekil 3.2. PDB ortamına fungal etmenin eklenmesi ..... 13
Şekil 3.3. PDB ortamda fungal etmenin gelişmeye bırakılması ..... 13
Şekil 3.4. pH ölçümü ..... 15
Şekil 3.5. EC ölçümü ..... 16
Şekil 3.6. Protein ölçümü için supernatantlara Coomassie Brilliant Blue ilavesi ..... 17
Şekil 3.7. Proteaz analizi hazırlık aşamaları (a) Proteaz ölçümü için supernatantlara trichloro acetik asit (TCA) ilavesi (b) supernatantlara azocasein ilavesi ..... 18
Şekil 3.8. Lakkaz ölçümü için santrifüj işlemi ..... 19
Şekil 3.9. Proline analizi hazırlık aşamaları (a) Sulfosalisilik asit solüsyonunun hazırlanması (b) Supernatantların su banyosunda kaynatılması ..... 20
Şekil 3.10. MDA analizi hazırlık aşamaları (a) MDA supernatantlarının plate'ye alınması (b) Supernatantların spektrofotometrede okutulması ..... 21
Şekil 3.11. Melanin hazırlık aşamaları (a) Supernatantlara NaOH ilave edilmesi (b)Supernatantlara HCL ilavesi ..... 22
Şekil 3.12. Melanin ölçümü için tüplerin 1 gece bekletilmesi ..... 22

# ÇİZELGELER DİZİNİ

**Sayfa No**

Çizelge 1.1. *Penicillium expansum* fungusunun sınıflandırılması ..... 4
Çizelge 4.1. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un misel ağırlığı ve toplam spor sayısı ..... 27
Çizelge 4.2. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un pH ve EC değerleri ..... 27
Çizelge 4.3. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un geliştiği ortamın protein içeriği (fungusun ortama bıraktığı protein içeriği)..... 31
Çizelge 4.4. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un geliştiği ortamdaki ortama bırakılan proteaz ve lakkaz enzimlerinin seviyeleri ..... 32
Çizelge 4.5. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un geliştiği ortamdaki ortama bırakılan proline ve MDA seviyeleri..... 34
Çizelge 4.6. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un geliştiği ortamdaki ortama bırakılan melanin seviyeleri ..... 36

# SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|---|
| ABTS | 2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic asit |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| °C | Sıcaklık (Santigrad derece) |
| EC | Elektriksel İletkenlik |
| g | Gram |
| M | Molar |
| MDA | Malondialdehid |
| Mg | Miligram |
| Ml | Mililitre |
| mM | Milimolar |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| nm | Nanometre |
| µg | Mikrogram |
| µl | Mikrolitre |
| PDA | Patates Dekstroz Agar |
| PDB | Patates Dekstroz Broth |
| pH | Power of Hydrogen |
| TBA | Trichloro tiobarbiturik acid |
| TCA | Trichloro acetic acid |
| Tris-HCI | Hidroksimetil-Hidroklorik asit |
| % | Yüzde oranı |

# 1.GİRİŞ

Bu tez çalışmasında farklı konsantrasyonlarda şeker (glukoz ve sukroz) ve vitamin içeren sıvı ortamlarda *Pencillium expansum* patojeninin fizyolojik, biyokimyasal tepkileri değerlendirilerek *in vitro* şartlar değiştiğinde patojenin davranışının (fizyolojik ve biyokimyasal) ne yönde olacağı araştırılmıştır. Böylece organik tarım ya da iyi tarım uygulamalarında kimyasal yöntemler gibi radikal yöntemlerin kullanılmadığı durumlarda patojenin potansiyel tehlikesi üzerinde durulmuştur. Bu çalışmada ele alınan şeker ve vitaminlerin *in vivo* koşullarda yansıması elma meyvesi ile uyumlu olduğu için elma meyvesi model meyve olarak ele alınmış, literatürde bu meyve ile ilgili çalışmalara sıklıkla yer verilmiştir. Bu sebeple elmanın vitamin, glukoz ve sukroz değerlerini simüle ederek *in vitro* koşullarda patojenin miselyal gelişimi, sporulasyonu, fizyolojik ve biyokimyasal karakterini ortaya koymak için farklı konsantrasyonlarda bu molekülerin ihtiva ettiği solusyon ortamları hazırlanmış, patojenin fizyolojik ve biyokimyasal karakterinin ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

Elma (*Malus domestica* L.) Dünyada ve Türkiye'de yetiştiriciliği yapılan ekonomik açıdan önemli bir yeri olan meyvelerin başında gelmektedir (Spengler, 2019). Ilıman iklim meyvesi olup *Rosales* takımının *Rasaceae* familyasının *Malus* cinsindendir. Tarımı çok eski zamanlara dayanmaktadır ve bulunduğu ekolojiye çok çabuk adapte olduğundan yayılım alanı oldukça geniştir. Ülkemiz birçok gen merkezine ev sahipliği yapmasından dolayı pek çok meyvenin tür ve çeşidi bakımından oldukça zengindir (Farinati ve ark., 2017). Ayrıca elma meyvesinin Anadolu Avrupa ve uzey Amerika gibi birçok farklı gen merkezlerine de geniş bir yayılım gösterdiği ve 48 türe sahip olduğu saptanmıştır (Duan ve ark., 2017; Spengler, 2019).

Dünyada elma üretiminde Çin, ABD, Polonya, Hindistan, Türkiye, İtalya, İran, Şili, Rusya ve Fransa gibi ülkeler başta gelmektedir. Türkiye 174 640 ha alanda 4 300 486 ton elma üretimi ile bu ülkeler arasında 4. sıradadır (TÜİK, 2020).

Elma, içerisindeki karbonhidratlar, esansiyel yağlar ve zengin antioksidan bileşenlerle besin içeriği, tadı ve diyet lifi açısından tüketicilerde önemli bir yer edinmiştir (Slavin ve Lloyd, 2012). Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler, flavanoidler, β karoten, antosiyaninler, C ve E vitaminleri, gibi bileşenler antioksidan etkiye sahiptir (Petkovsek ve ark., 2012). Elmada ise antioksidan aktiviteye sahip olan bileşenler; floretin, prociyanidin $B_2$, quercetin, epikatechin ve klorogenik asit gibi bileşenlerdir (Acquavia, 2021). Ayrıca elma, yapısında bulunan azot, fosfor, bor, potasyum vb. gibi makro ve mikro elementler açısından da oldukça zengin bir meyvedir. Elmadaki bu makro ve mikro elementler insan sağlığı için hayati bir öneme sahiptir (Kangueehi ve ark., 2013).

Elmada; şeker alkoller, organik asitler, amino asitler ve fenolik bileşikler gibi insan sağlığı için yararlı olan şekerler bulunur. Elmanın meyve kalitesinden birincil ve ikincil metabolitler önemli bir role sahiptir. Elmanın lezzetini ve tadını şekerler ve organik asitler arasındaki denge belirlerken fenolik bileşikler ve C vitamini elmanın antioksidan kapasitesinden sorumludur (Acquavia, 2021).

İnsan gıda ihtiyacının önemli bir kısmını oluşturan yaş meyve ve sebzeler temel besin kaynakları arasında yer almaktadır ve bu besinlere talep her geçen gün artmaktadır. Bu meyve ve sebzelerin içerisindeki vitamin, mineral ve antioksidan içeriğiyle insan beslenmesinde oldukça önemlidir (Pinela ve Ferreira, 2012; Aghdam ve ark., 2018).

Elmada, uzun süre depolanan bir meyve olmasından dolayı depolama aşamasında biyotik (fungal, bakteriyel) ya da abiyotik kaynaklı (don ve sıcaklık zararı, yetersiz havalandırma, mineral element eksikliği ya da toksisitesi, şiddetli basınç, darbe ve yaralanma vb. gibi) hasat sonrası meydana gelen bozulmalar görülmektedir (Gine-Bordonaba ve ark., 2019).

Elma üretiminde başta gelen ülkeler arasında bulunmamıza rağmen yetiştirilen çeşitlerin ekolojik şartları ve sonrasında bakım ve muhafaza durumu hakkında kesin bilgi sahibi olunmaması ülkemizin dünya pazarında amaçladığı hedefe ulaşmasında

engeller teşkil etmektedir. Ayrıca meyvenin hasattan tüketime kadarki periyodunda meyvenin fizyolojik özelliklerinin araştırılması önemli bir husustur (Gong ve ark., 2019).

Depolanan ürünlerde zamanla patojenlere karşı direnç azaldığından birtakım çürüklükler meydana gelmektedir. Hastalığa neden olan patojenler ürünlere yaralardan ve doğal açıklıklardan giriş yapabilmektedir. Bu yara patojenlerinin başında; *Penicillium* spp., *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Aspergillus* spp., *Rhizopus* spp. ve *Geotrichum* spp. gelmektedir. Bu patojenlerden kaynaklı hastalanan ürünlerin yanı sıra fungal patojenler zamanla sağlıklı ürünleri de enfekte edebilmektedir. Hasat sonrası ürünlerin muhafaza ve depolama aşamasında önemli ürün kayıplarına yol açmaktadır (Köhn ve ark., 2018; Naets ve ark., 2018).

Dünya genelinde patojenik fungal hastalıklardan kaynaklanan çok sayıda hastalık ve zararlı besin maddelerini tehdit etmektedir. Hasat sonrası ürünlerdeki fungal ve bakteriyal kaynaklı bulaşmalar sonucunda %50'ye varan ürün kayıpları olduğu tahmin edilmektedir (Dukare ve ark., 2019; Wang, 2021). Küfler her ortamda varolabilen hidrolitik enzim sentezi ile gıdalara bulaşan biyolojik ajanlardır. Küflerin gelişmeleri sıcaklık, pH, su aktivitesi ($a_W$), zaman ve atmosfer gibi birçok faktörlere bağlıdır. Hasat sonrasında *Rhizopus, Aspergillus* ve *Penicillium* spp. sebze ve meyvelerin bozulmasını hızlandırarak raf ömürlerinin kısalmasına kadar kalite kayıplarına neden olmaktadır (Vidal ve ark., 2019).

Hasat sonrası meyvelerin raf ömrünü azaltan ve kalitesini düşüren hastalık etmenlerinin başında funguslar gelmektedir. Hasat edilen meyveler içeriğindeki bol su ve besin maddelerinden dolayı patojen saldırılarının hedefi olmaktadır. Enfekteli meyvelerde etilen sentezi sonucu artan solunum ve ısı üretimi meyvelerin olgunlaşmasını hızlandırır. Funguslar enfekte olmuş meyvelerden sağlıklı meyvelere de bulaşmaktadır (Wang ve ark., 2021).

Hasat sonrası elmalarda büyük ekonomik kayıplara neden olan fungal patojenlerin başında *Penicillium expansum* yer almaktadır. Bu etmen olgunlaşmış

meyvelerin stomalarından, lentisellerinden ya da hasat sırasında veya depolama aşamasında üzerinde hasar oluşmuş meyvelerin yaralarından dokulara penetre olabilmektedir. Enfekteli meyvelerde zamanla yumuşamalar ve çürümeler meydana gelmektedir ve bu da meyvenin hem tekstür hem de kimyasal içeriğinde birtakım bozulmalara neden olmaktadır (Çapa ve Dikilitaş, 2021).

Sistematik sınıflandırmada *Penicillium* cinsine ait türler Ascomycota şubesine dahildir. Sebze ve meyvelerde çürümeye yol açan önemli bitki patojenlerinden birkaçı *Penicillium* cinsine ait türlerdir. *Penicillium expansum*'un özellikle 21 bitki cinsinde hastalığa neden olduğu bilinmektedir (Tannous ve ark., 2018). Elmalarda *P. expansum* olmak üzere *P. solitum* Westling., *P. commune* Thom., *P. chrysogenum* Thom. ve *P. verrucosum* Dierckx. gibi fungus türleri maviküf hastalığına neden olmaktadır. Bu hastalığın depolanmış meyvelerde %50'ye varan ürün kayıplarına neden olduğu saptanmıştır. *P. expansum* tarafından üretilen patulin adlı mikotoksini insan sağlığında olumsuz akut ve kronik etkilere neden olmaktadır (Gonçalves ve ark., 2018).

Pitt ve ark. (2000), tarafından *Penicillium expansum*'a ait son sınıflandırma yapılmış olup 225 tür tescillenmiştir. *Penicillium*'a ait son sınıflandırma Çizelge 1.1. de verilmiştir.

Çizelge 1.1. *Penicillium expansum* fungusunun sınıflandırılması

| **Alem** | **Mantar** |
|---|---|
| Şube | Ascomycota |
| Dizi | Eurotiales |
| Sınıf | Eurotiomycetes |
| Aile | Trichocomaeate |
| Cins | Penicillium |
| Alt cins | Penicillium |
| Grup | Expansa |
| Tür | Expansum |

*P. expansumun* tarafından dokularda üretilen mavi renkli konidilerden kaynaklı olarak bu hastalığa ‘‘mavi çürüklüklük’’ adı verilmiştir. Bu hastalık etmeni ilk başta şeffaf bir görünüme sahiptir ve daha sonra çürümüş dokularda yumuşak çürüklük meydana getirmektedir (Luciano-Rosario ve ark., 2020). Etmenin konidi ve konidioforlarının genel yapısı el şekline benzer ve bu yapının uç kısmında konidioforlar yer almaktadır (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. *Şekil 1.1. Penicillium'*un elektron mikroskobundaki ve besi ortamındaki görüntüsü (Özgönen, 2009)

Elma meyvesi patojenlere karşı çeşitli savunma mekanizmaları ile reaksiyona girmektedir. Patojen saldırıları veya yaralamalara en hızlı yanıt oksidatif patlama adı verilen reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesidir. Kolayca diğer hücrelere yayılarak $H_2O_2$ üretir, burada plazma zarına ve mitokondriyal proteinlere zarar vererek doğrudan patojene etki edebilir veya konukçudaki farklı savunma yollarını dolaylı olarak aktive etme yeteneğine sahiptir. ROS oldukça reaktiftir; proteinler ve nükleik asitler başta olmak üzere çeşitli biyomolekülleri okside edebilir ve daha fazla miktarda konukçu hücrelerin tahrip olmasına neden olabilmektedir. Hücre yıkımından kaçınmak için, bitki hücreleri yüksek konsantrasyonda ROS aktivitesi için mekanizmalar geliştirmektedir. Bir mekanizma aşırı ROS'un detoksifikasyonuna yol açarken, diğeri ise sinyal amaçlı düşük ROS seviyelerinin ince modülasyonunu sağlamaktadır (Marconas ve Ratajczak, 2014).

Hasat sonrası depolanan elmalar fungal patojenlere karşı hassas yapıdadır ve zamanla çürüme eğilimindedir. Elmaların besin içeriği hasat sonrasında görülen *Penicillium expansum* etmeninin gelişmesi için uygun ortam koşulları sağlamaktadır (Vilanova ve ark., 2014; Touhami ve ark., 2018; Naets ve ark., 2020).

Şekerler, enerji kaynağı ve sinyal molekülleri olarak fungal etmenlerin neden olduğu enfeksiyonlarda önemli bir role sahiptir. Şeker içeriği patojenlerin virülensliği üzerinde farklı etkilere sahiptir (Ziv ve ark., 2020).

Meyvelerde; glukoz, sukroz ve fruktoz gibi çözünür şekerler büyüme ve gelişme yanında meyve kalitesi için de oldukça önemli bir role sahiptirler. Meyvenin tadı, aroması, şeker bileşimi, konsantrasyonu ve asit dengesi gibi meyve kriterleriyle yakından ilişkilidir (Li ve ark., 2018).

Vitamin C insanlar ve bitkiler için önemli bir antioksidan ve kofaktör kaynağıdır. Elmalarda C vitamini seviyesi düşüktür ve bu da elma mahsullerinin iyileştirilmesi için önemli bir özelliktir. Yüksek C vitaminli elma çeşitleri yetiştirmek amacıyla elma içeriğindeki doğal biyoçeşitlilik hakkında fikir sahibi olmak oldukça önemlidir (Lemmens ve ark., 2020).

Meyvelerin protein, vitamin ve karbonhidrat içeriklerinin meyve kalitesi ve fungusa karşı dayanıklılıkta önemli rol oynadığı bilindiği gibi bu içeriklerin fungal etmenin virulensliğinde rol oynayan enzimler üzerinde de etkili olduğu düşünülmektedir. Örneğin, proteaz enzimi fungal etmenlerin virulensliğinde etkili olduğu kanıtlanmış bir enzimdir (Dikilitas ve ark., 2018). Proteazlar; hayvanlarda, insanlarda ve mikroorganizmalarda bulunan ve fizyolojik olarak gerekli olan bir enzimdir (Rao ve ark., 1998; Sevinç, 2010). Fungusların ve bakterilerin de dahil olduğu birçok mikroorganizmalar proteaz üretmektedir (Mitra ve ark., 1996; Manjeet ve ark., 1998). Proteazlar, canlı organizmaların metabolizmasında ve fizyolojisinde ayrıca proteinlerin ve peptitlerin sindiriminde önemli bir role sahiptir. Bu enzimler; protein sentezi, protein aktivasyonu-inaktivasyonu, sinyalleşme ve protein döngüsü

gibi birçok aşamayı kontrol altında tutarak fizyolojik süreçlerin düzenlenmesinde de aktif rol oynamaktadır (Bond, 2019). Proteaz enzimleri virülenslikte ve bitkinin savunma mekanizmasında oldukça önemlidir. Konukçu dokularda proteinleri etkisiz hale getirerek bitkilerin savunma mekanizmalarının bozulmasında rol oynarlar (Kılıç, 2019).

Yine bir diğer önemli enzim olarak kaydedilen lakkaz enzimi de virulenslikte etkin görev almaktadır. Lakkaz, doğada oldukça yaygın bulunan bir enzimdir. Lakkaz, çoğunlukla elma, armut, şalgam, lahana ve patates gibi sebze ve meyvelerde bulunur. Lakkaz, proteinleri parçalar ve patojenisite, sporulasyon, lignin bozulması gibi birçok biyolojik aktivitede önemli rol oynar. Lakkazlar yaygın olarak çeşitli funguslarda bitkilerde ve bazı böceklerde bulunur. Lakkazlar, fungus virülensliğinde, bitkilerin odunlaşmasında rol almaktadır, ayrıca bitkilerdeki yaralanmalara karşı koruyucu bir görev üstlenmektedir (Riva, 2006; Singh ve Gupta, 2019). Fungal lakkazlar ligninin parçalanmasında etkilidir. Bunun yanı sıra sporulasyon, morfogenez ve pigmentasyon fonksiyonlarına da sahiptir (Zhang ve ark., 2006; Minussi ve ark., 2007). Lakkaz enzimleri bitkinin savunma mekanizmasını etkileyerek hastalıklara karşı virulens bir etkiye sahiptir (Mayer ve Staples, 2002; Zhang ve ark., 2006). Karbonhidratların funguslarda sadece enerji sağlamadığı aynı zamanda yapısal olarak değişime girerek melanin adı verilen pigmentlerin yapısında da yer aldığı görülmektedir. Melanin insanlarda olduğu gibi funguslarda da renk koyuluğundan sorumlu olan bir pigmenttir. İnsanların güneş ışınlarına karşı dayanıklılığını arttırdığı gibi funguslarda bulunan melanin de hücrelerin daha koyu bir hal almasına yol açarak onları uç sıcaklık dereceleri olarak tabir edilen aşırı sıcak ve soğuk ortamlara karşı koruma görevi üstlenmektedir. Aynı zamanda funguslarda pestisit direncinin ve virulensliğin de melanin ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Wang ve ark., 2021). İnsanlarda ve bitkilerde önemli olan patojenlerin birçoğu melanin üretmektedir. Melaninler stres şartlarında gelişen fungusların hayatta kalma yeteneğini artırır. Birçok fungus fenolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu sonucu kahverengi ya da siyah pigmentlerden oluşan melaninleri üretmektedir. Yapılan çalışmaların melaninlerin funguslarda virülensliği ve ilaç direncini artırdığını göstermektedir (Zhdanova ve ark., 2000; Rosa ve ark., 2010).

Diğer bileşikler gibi vitaminler de önemli bir yere sahiptir. Vitaminler, insanlar ve hayvanlar tarafından sentezlenemeyen dışarıdan alınması gereken karmaşık yapılı biyokimyaya sahip bileşiklerdir. İnsan sağlığı ve besin açısından önemli yere sahip olan vitaminler bitkiler ve mikroorganizmalar için de aynı öneme sahiptir. Meyveler, özellikle C ve E vitamini açısından yüksek değerlere sahiptirler (Roje, 2007; Esteban ve ark., 2009). En yaygın bulunan hücresel antioksidan askorbattır (vitamin C). Askorbat, bitkilerin savunma mekanizmasında önemli bir role sahiptir. Hücre içinde meydana gelen hidrojen peroksit miktarını kontrol etmek için askorbat-glutatyon döngüsünde mitokondri, kloroplast ve enzimatik antioksidanlarla yakından ilişkilidir (Smirnoff ve Wheeler, 2008; Asensi-Fabado ve Munne-Bosch, 2010). Dolayısı ile yüksek oranda vitamin C içeriğine sahip meyvelerin hastalıklara karşı durumu da ıslah çalışmaları açısından büyük önem arz etmektedir.

Organik tarımda ürün kalitesi esas alındığından ve bu ürünlerin pestisit yolu ile korunması mümkün olmadığından yüksek şeker, vitamin ve metabolit içeren meyve ve sebzelere vejetatif aksamlı bitkilere fungal etmenlerin bu koşullarda potansiyel patolojik etkisinin ne yönde olacağı değerlendirilmemiştir. Dolayısı ile bu patojenler ile mücadele esas alınmadan önce mevcut şeker ve vitamin içeren ortamlarda ve geniş bir konsantrasyon aralığında *in vitro* koşullarda fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler olarak bu patojenlerin tepkileri değerlendirilmelidir.

# 2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Davey ve ark. (2007), Belçika'da yetişen *Malus domestica* çeşitlerinden elde edilen meyvelerin hasat tarihi ile ortalama C vitamini (L corascorbate, LAA) içeriği arasında güçlü bir korelasyon olduğunu bildirmiştir. Çalışma, bu korelasyonun meyvenin diğer üretim yıllarında da tutarlı kaldığını ve hasat tarihinin meyve LAA ve toplam antioksidan aktiviteleri arasında önemli ölçüde korele olduğunu, ancak bu korelasyonun glutatyon (GSH) seviyeleri ya da meyvelerdeki diğer fizyolojik parametrelerde önemli olmadığını göstermiştir. Ayrıca, farklı genotiplere sahip elma meyvelerinde *Botrytris cinerea* ile hasat sonrası enfeksiyona karşı duyarlılığının artan hasat tarihiyle zamanla azaldığı ve bu duyarlılığın GSH seviyeleri ile değil de meyve içeriğindeki C vitamini ile ilişkili olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlar, gelişmiş antioksidan savunma kabiliyetine sahip meyvelerin seçilmesiyle, gelişmiş meyve kalitesi ve hastalık direnci için ıslah çalışmalarının yapılabileceğini ortaya koymuştur.

Elma yetiştirme programlarında hastalıklara karşı dirençli çeşitlerin yetiştirilmesi her zaman önemli bir faktör olmuştur (Janick ve ark., 1996). Fakat, hasat sonrası meyve direncine yeterince dikkat edilmemiştir (Sansavini ve ark., 2004). Meyvelerdeki çürümeye karşı toleransta hafif bir iyileşme bile diğer tedavi yöntemlerinde meyvelerin verimliliğini artırabilir; buna ilave olarak sinerjistik bir etkiye de neden olabilir (Janisiewicz ve ark., 2008).

Elma meyvelerindeki hasat sonrasında görülen ürün kayıpları öncelikle fungal hastalıklarının varlığına atfedilebilinir (Narayanasamy, 2006) ve bu kayıpların %80'ine *Penicillium expansum* neden olmaktadır (Spotts ve ark., 1999). Bu fungus, mücadelesinde kullanılan bazı fungisitlere karşı da direnç geliştirmektedir (Baraldi ve ark., 2003). Bu nedenle düzenleyici kurumlar bu ürünlerin kullanımına bazı kısıtlamalar getirmektedir (Palou ve ark., 2009).

Meyvelerdeki şeker metabolizması ve birikimi meyvenin tadını etkiler ve meyvenin olgunlaşmasında ve kalitesinde önemli bir rol oynar. Örneğin, sukrozun çilek meyvesinde Askorbik asit üretimini ve birikimini uyararak meyvenin olgunlaşmasını kolaylaştıran bir sinyal görevi gördüğü tespit edilmiştir (Jia ve ark., 2013).

Patojen-bitki sisteminde, bitki dokularındaki yüksek şeker oranı bitki direncini artırmaktadır. "Yüksek şekere direnç" mekanizmalarını açıklamak için çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. Şekerler, bitkilerdeki savunma tepkimeleri için enerji ve yapısal malzeme sağlayan birincil substratı oluştururken, bitki bağışıklık sistemini düzenleyen hormonal sinyal ağı ile etkileşime giren sinyal molekülleri olarak da işlev görebilmektedirler. Şekerler, enfeksiyonun erken safhasında oksidatif patlamayı arttırır, hücre duvarlarının lignifikasyonunu arttırır, flavonoidlerin sentezini uyarır ve bazı PR proteinlerini uyararak dayanıklılık mekanizmasını harekete geçirir (Decker ve Kleczkowski, 2019). Bazı şekerler, patojenlere karşı daha yüksek bitki direncine neden olan hazırlama maddeleri olarak da işlev görmektedir (Morkunas ve Ratajczak, 2014). Örneğin, Barad ve ark. (2016), tarafından yapılan bir çalışmaya göre; elmaların yüksek şeker içeriği ve yüksek sukroz konsantrasyonunun patulin birikimini azalttığı ileri sürülmüş, artan sukroz konsantrasyonu ile patulin seviyesi arasında negatif korelasyon tespit edilmiştir. Sukrozun, glukoz ve fruktoza oranla daha etkili bulunduğu ve daha az patulin üretiminde etkili olduğu tespit edilmiştir (Kumar ve ark., 2017). Ancak, düşük molekül ağırlıklı yani mosakkarit olan glukoz şekerinin disakkarit olan sukroz şekeri ile kıyaslandığında fungal etmenler tarafından daha hızlı ve etkin şekilde monosakkarit şekerlerini parçalayabileceği öngörüldüğünden uzun dönem depolanan meyvelerde karbonhidrat degredasyonu sonucu glukoz birikiminin patojenin virulenslik ve patojenisite üzerine etkileri yanında kalite kaybına da neden olacağı öngörülmektedir. Çünkü, *Penicillium expansum* ile enfekteli meyveler birincil metabolitlerin dengesinin bozulmasına neden olmakta ve askorbat-glutatyon döngüsünü etkilemektedir. Her ne kadar yukarıda belirtildiği gibi *Botrytis cinerea*'nın elmalarda depolama süresi arttıkça duyarlılığın azaldığı belirtilse de (Davey ve ark., 2007) bu durumun soğuk koşullarda muhafaza edilen meyvelerde patojen inaktivasyonu veya meyvelerde azalan su içeriği ile birlikte patojenin enfeksiyon

kabiliyetinin azalmasına bağlamak mümkündür. Zengin şeker içeriğinin muhafaza koşullarında, özellikle oda sıcaklığında muhafaza koşullarında ve meyveler yara oluşturmuş ise de saprofit patojenler için önemli bir substrat olacağı bilinmektedir. Genel olarak, enfekteli meyvelerde; fruktoz, malik asit, şikimik asit ve toplam askorbat içeriğinde düşüş meydana gelirken, toplam glutatyon içeriğinde ise önemli artışlar görülmektedir (Zebeljan ve ark., 2019). Genel olarak, belirgin sukroz artışı, glukoz ve askorbat içeriğinde düşüşe de eşlik etmektedir. Şikimik asit ve vitamin C içeriği meyvedeki semptom gelişimi ile kademeli olarak azalmaktadır. Dolayısı ile sukroz ve askorbat-glutatyon arasında negatif bir korelasyon olduğu görülmektedir. Diğer metabolitler ve lezyon büyüklüğü arasında güçlü bir korelasyon olup, elma meyvelerinin çürümesinde rol oynayabileceği ya da önemli olabileceği görülmektedir (Zebeljan ve ark., 2019).

*Penicillium expansum*'un neden olduğu maviküf dünya çapında meyveler için büyük bir tehdit oluşturmaktadır ve her yıl milyonlarca dolarlık kayıplara neden olmaktadır. Bu etmen meyvelerde kalite kayıplarına neden olmakla birlikte insan sağlığı içinde zararlı mikotoksinler de üretmektedir. Mücadelesinde fungisitler ya yetersiz olmakta ya da bazı kısıtlamalar uygulanmaktadır bunun için yeni mücadele yöntemlerine ya da araçlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Luciano-Rosario ve ark., 2020). Ancak, öncelikle hastalık etmeninin hangi koşullar altında daha etkili olabileceği değişen iklim ve depolama koşullarında daha uzun süre muhafaza edilen meyvelerde meydana gelebilecek biyokimyasal değişimlerin ya da organik tarımda ilaç ve suni gübre kullanmadan yapılan tarımsal faaliyetler sonucu zengin içeriğe sahip meyvelerin tepkilerini ortaya koymak için *in vitro* koşullarda *Penicillium expansum* fungusu farklı glukoz, sukroz ve ve vitamin C konsantrasyonlarına sahip fungal gelişim ortamında yetiştirilerek sprolusayon, miselyal gelişim ve virulenslikte önemli rol oynayan biyokimyasal enzimlerin seviyesinin belirlenmesi hedeflenmiştir.

# 3. MATERYAL ve YÖNTEM

## 3.1. Materyal

Bu çalışma, Harran Üniversitesinde Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü laboratuvarlarında yürütülmüştür. Çalışmada kulanılan *Penicillium expansum* Doç. Dr. Murat Dikilitaş'ın kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. Hastalık etmeninin virulensliğini devam ettirebilmesi için soğuk koşullarda muhafaza edilen (+4 °C) etmen zaman zaman elma meyvesine inokule edilerek yeniden izole edilmiş ve Koch's pastulate uyarınca yeniden izole edilerek muhafaza altına alınmıştır, Şekil 3.1.

Hastalık etmeninin morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal gelişimi farklı konsantrasyonlarda glukoz, sukroz ve vitamin C içeriklerinin sıvı patates gelişme (PDB) ortamında test edilmiştir.



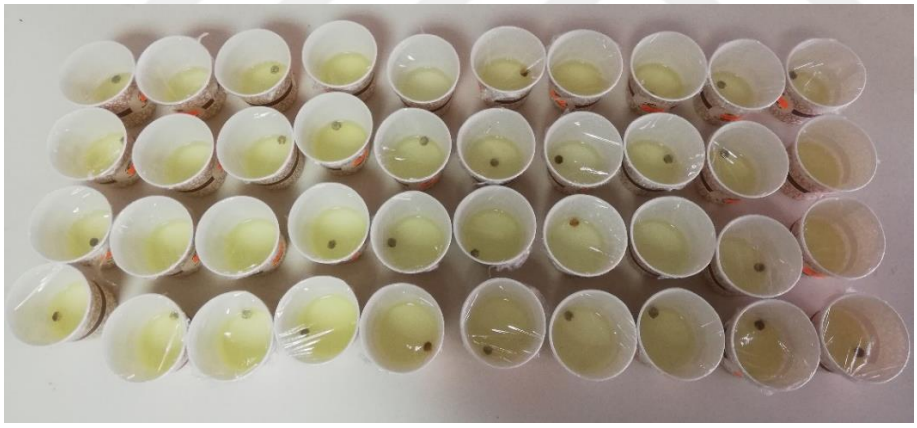

Şekil 3.1. PDA ortamındaki *Penicillium expansum* fungal etmeni

Çalışmada kullanılan glukoz, sukroz ve vitamin C; 0-, 5-, 20-, 25-, 50-, 75-, 100-, 125-, 150-, ve 200 g/L konsantrasyonlarda hazırlanarak ayrı ayrı PDB ortamına ilave edilmiş, her bir konsantrasyon için 4 tekerrür oluşturulup negatif kontrol grupları için saf su kullanılmıştır. Pozitif kontrol ise PDB içeren ancak ilgili kimyasal maddeyi içermeyen ortam olarak hazırlanmıştır. Çalışmada incelenen fiziksel parametreler;

fungusun miselyal gelişim değerleri, toplam spor sayısı, pH ve EC değerleri olarak ölçülmüştür. Biyokimyasal parametreler ise fungusun geliştiği ortamın protein içeriğinin belirlenmesi, fungusun proteaz ve lakkaz aktivitesinin belirlenmesi, fungal etmenin melanin değerlerinin belirlenmesi, proline ve malonadialdehit (MDA) değerleri olacak şekilde tesadüf parselleri deneme desenine göre 4 tekerrürlü olarak ölçülmüştür.

## 3.2. Yöntem

Fungal gelişim için hazırlanan sıvı besi ortamı oda sıcaklığında fungal gelişim için hazır hale getirilmiştir. Yaklaşık 3 mm çapında *P. expansum* disk'i bir cork barer yardımı ile alınarak 50 ml patates dextrose broth (PDB) içeren kaplara aseptik koşullarda konularak karanlıkta 8 gün süre ile inkübasyona bırakılmışlardır, Şekiller 3.2 ve 3.3.



Şekil 3.2. PDB ortamına fungal etmenin eklenmesi



Şekil 3.3. PDB ortamda fungal etmenin gelişmeye bırakılması

Çizelge 3.1. Patates dekstroz Broth (PDB)

| İçerik | Konsantrasyon (g/L) |
|---|---|
| Kabuğu soyulmuş, doğranmış patates | 200 |

Yaklaşık 200 g kabuğu soyulmuş ve küçük parçalara ayrılmış patates, dilimlenerek 1000 ml'lik saf su ile 30 dakika kaynatılmış elde edilen solüsyon mira bezinden (Calbiochem) süzülmüş, ve ortamın içine uygun konsantrasyon ve kimyasallar ayrı ayrı konularak solusyon saf su ile 1 litreye tamamlanmış ve otoklavda 15 dakika 121.5 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir, Çizelge 3.1. Yalnız farklı konsantrasyonlarda vitamin içeren ortamın içine 20 gram glukoz ilave edilerek ortamın şeker içeriği sabit tutulmuştur. Böylece fungal etmenin enerji alması sağlanmış ve farklı konsantrasyonlardaki vitamin içeriğinin patojen üzerine etkisi değerlendirilmiştir.

### 3.2.1. Toplam spor sayımı

İnkübasyona bırakılan fungal izolatlar gelişim gösterdikten sonra spor sayımı için, her kültürdeki fungus koloni kütlesi alınarak tüplere konmuş, misellerin dağılması için tüpler vibratörde çalkalanarak sporlar homojen şekilde 100 ml solüsyon içerisinde dağıtılmıştır. Elde edilen spor süspansiyonundan 100 µl hacminde alınan kısım heamocytometer (Thoma) üzerine alınarak koloni sayımı yapılmıştır. Daha sonra sonuçlar 100 ml içerisinde toplam spor olarak ifade edilmiştir.

### 3.2.2. Misel ağırlığı

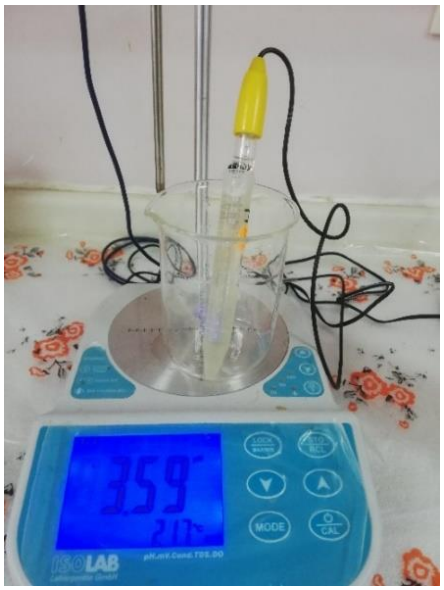
İnkübasyonun 8. gününde sıvı kültürlerden elde edilen misellerin ağırlığın belirlenerek fungusun günlük orantılı büyüme oranı (RGR) aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$RGR\ (Gün^{-1}) = \frac{[\ell n\ (\text{Misel yaş ağırlığı 8.gün}) - \ell n\ (\text{Misel Yaş ağırlığı 0.gün})]}{\text{Gün}} \quad (3.1)$$

Misel yaş ağırlığı 8. gün: İnkübasyonun 8. gününde belirlenen yaş ağırlık
Misel yaş ağırlığı 0. gün: İnkübasyonun 0. gününde belirlenen yaş ağırlık

### 3.2.3. Fungusların pH ölçümü

Sıvı ortamda (PDB ortamında) farklı koşullarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişmeye bırakılan patojenin geliştiği ortamın pH değerleri pH metre ile ölçülerek, ortamın içerisine katılan kimyasal maddelerin, ortamın pH'sına etkisi ve patojen gelişimi açısından farklılık oluşturup oluşturmayacağı belirlenmiştir.




Şekil 3.4. pH ölçümü

### 3.2.4. Funguslarda elektriksel iletkenlik (EC) değerlerinin belirlenmesi

Sıvı ortamda (PDB ortamında) farklı koşullarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişmeye bırakılan fungusun geliştiği ortamın EC değerleri, EC metre (AD 31 EC/TDS) ile ölçülmüştür. Sonuçlar dS $m^{-1}$ olarak ifade edilmiştir.



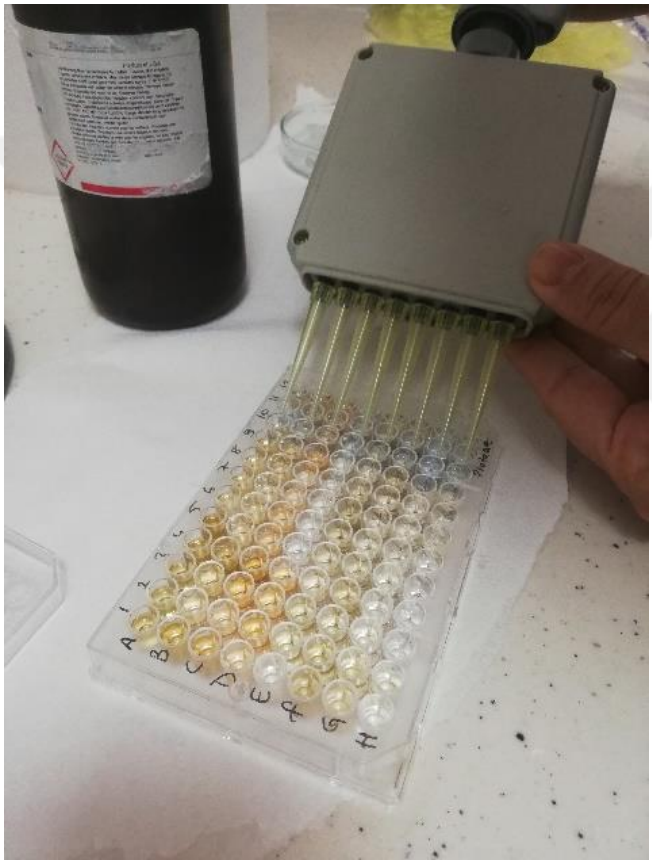

Şekil 3.5. EC ölçümü

### 3.2.5. Fungal etmenin geliştiği ortamın protein içeriğinin belirlenmesi

Çözünebilir protein ölçümü; sıvı ortamda gelişen fungal kültürlerden elde edilen supernatantlar (500 µl) sodyum fosfat çözeltisi (1.0 ml, pH 7.0) ile karıştırılmış ve solusyon 10 000 *g*'de 10 dakika boyunca +4 °C'de santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatant içerisinden Bradford (1976)'ya göre protein okuması yapılmıştır.

Protein ölçümü Coomassie Brilliant Blue G-250 boya maddesi kullanarak Bradford (1976) yöntemine göre yapılmıştır. Bu yönteme göre, 20 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 10 ml 95%lik ethanol içinde çözüldükten sonra solusyon 20 ml 85%'lik w/v fosforik asit ($H_3PO_4$) ile karıştırılmış ve saf su ile 200 ml'ye tamamlanmıştır. Protein içeren örnekler (300 µl), 5 ml hacminde Coomassie Brilliant

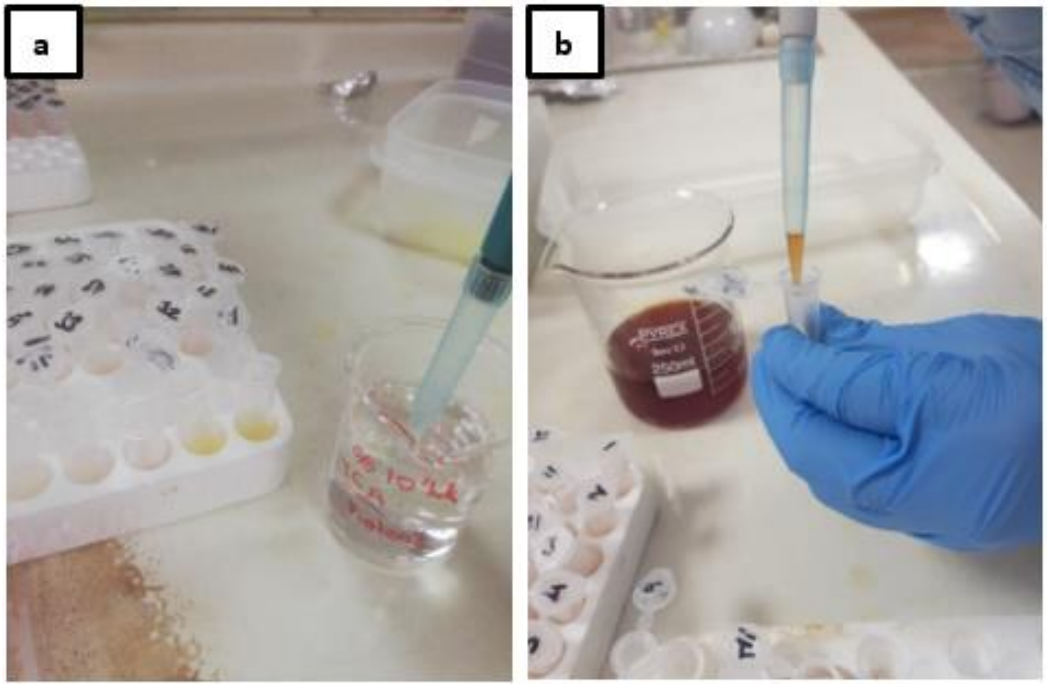
Blue reagent ile karıştırılarak 10 dakika ya da 1 saat arasında değişen sürelerde ölçüldükten sonra 595 nm'de spektrofotometrede (Epoch spektrofotometre) ölçülmüştür. Protein ölçümünde Bovine Serum Albumin (BSA) fraction V kalibrasyon için kullanılmış ve 10-100 µg arasında değişen protein konsantrasyonları (stok solusyon, 1 mg/ml) 595 nm'de ölçülerek elde edilen linear grafiğe göre örneklerin protein değerleri hesaplanmıştır ve sonuçlar mg protein $g^{-1}$ misel ağırlık olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.6. Protein ölçümü için supernatantlara Coomassie Brilliant Blue ilavesi

### 3.2.6. Proteaz aktivitesi

Proteaz enzimi Girard ve Michaud (2002) ve Dikilitaş ve ark. (2018) metoduna göre azocasein tabanlı amino asitlerin ve küçük peptitlerin fungal kültürde açığa çıkması temeline dayanarak gerçekleştirilmiştir. Bunun için, PDB ortamında geliştirilen funguslardan alınan 20 µl supernatant, 1.5 ml hacmindeki Eppendorf tüplere yerleştirildikten sonra Bu tüplere 150 µl Tris-HCl (pH 8.8) içinde hazırlanan, 1% lik (w/v) azocasein ilave yapılmıştır (hacim, 120 µl). Fungal gelişim ve azocasein hidrolizi için tüpler oda sıcaklığında (+ 23 °C) 1 saat inkübe edilmiş ve proteolysis (protein hidrolizasyonu) aşaması, ortama 300 µl (10%, w/v) soğuk trichloro acetik asit (TCA) ilavesi ile sonlandırılmıştır. Tüpler daha sonra 15 000 *g*'de 10 dakika santrifuj edildikten sonra, 350 µl supernatant alınıp 30 µl 1 mol $L^{-1}$ NaOH ile karıştırılmış ve bir kez daha yukarıda bahsedilen yönteme göre santrifuj işleminden sonra proteaz aktivitesi 440 nm spektrofotometrede (Epoch spektrofotometre) ölçülen sonuçlar, A440 $dak^{-1}$ $mg^{-1}$ protein olarak ifade edilmiştir.




Şekil 3.7. Proteaz analizi hazırlık aşamaları (a) Proteaz ölçümü için supernatantlara Trichloro acetik asit (TCA) ilavesi (b) Supernatantlara azocasein ilavesi

### 3.2.7. Lakkaz enzim ölçümü

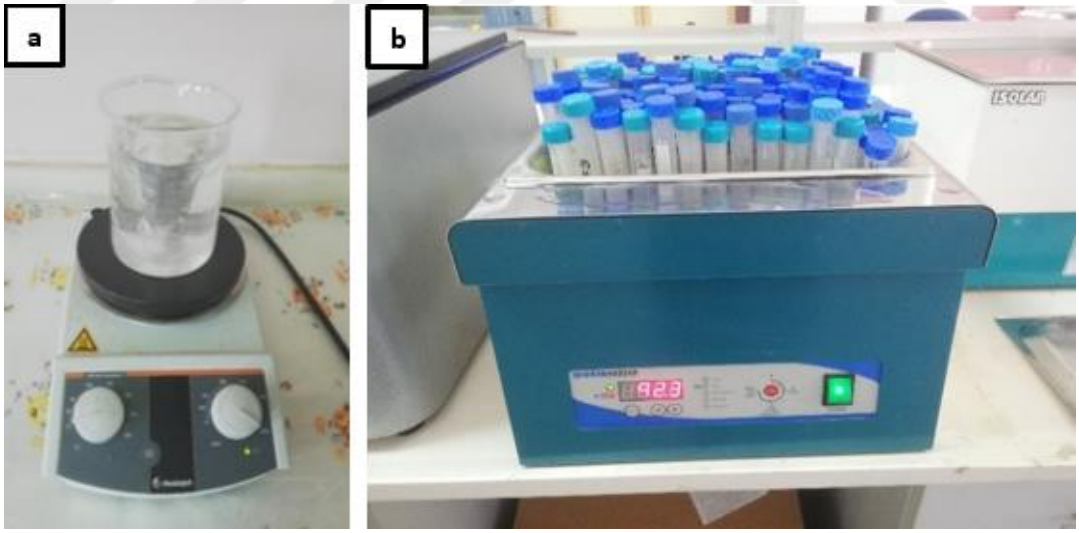
Lakkaz aktivitesi ABTS (2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic asit) molekülünün okside olması temeline dayanarak ölçülmüştür (More ve ark., 2011). Nonfenolik boya olan ABTS, lakkaz enzimi tarafından okside edilerek daha stabil bir hale getirilmektedir. Lakkaz enziminin belirlenmesi için hazırlanan karışım, 5 mmol $L^{-1}$ ABTS, 0.1 mol $L^{-1}$ sodium acetate (pH 5.0) ve uygun enzim miktarından oluşmaktadır. Bunun için, hazırlanan 5 mmol $L^{-1}$'lık bir ABTS stok solüsyonundan 100 µl alınarak üzerine 1 ml 0.1 mol $L^{-1}$'lık sodyum asetat buffer (pH 5.0) solüsyonu ilavesi yapılmıştır. Bu karışımın üzerine 300 µl enzim (supernatant) eklenmiş ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra karışım 10 000 $g$'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra örnek içermeyen karışıma karşı supernatanttaki absorbans artışı 420 nm'de okunmuştur. Sonuçlar, A420 $dak^{-1}$ $mg^{-1}$ protein olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.8. Lakkaz ölçümü için santrifüj işlemi

### 3.2.8. Proline ölçümü

Fungal etmenin proline içeriği, Bates ve ark. (1973)'nın geliştirdiği metoda göre yapılmıştır. Bunun için, *Penicillium expansum*'un geliştiği farklı konsantrasyonlarda glukoz, sukroz veya vitamin C içeren PDB ortamdan 400 µl alınarak Eppendorf tüp içinde 1000 µl sulfosalisilik asit (%3) ile karıştırılmıştır. Daha sonra hazırlanan karışımdan santrifüj tüplerine 1 ml alınıp üzerine 1 ml asetik asit ve 1 ml ninhidrin ilave edilerek 100 °C'de su banyosunda kaynatılmıştır. Reaksiyon daha sonra buz içinde sonlandırılmıştır (15- 20 dakika). Reaksiyon karışımına 2.5 ml toluen ilave edildikten sonra vortex ile karıştırılmıştır (30 saniye). Daha sonra iki faz oluşması için 20 dakika karanlık ortamda bekletilmiştir. Üst faz mikropipetle alınarak absorbans değerleri spektrofotometrede saf toluen kontrolüne karşı 515 nm'de okutulmuştur. Standart olarak daha önceden hazırlanan L-prolin solüsyonu kullanılmıştır. Ninhidrin solusyonu için; 1.25 g ninhidrin, 30 ml glasial asetik asit ve 20 ml 6 mol $L^{-1}$ fosforik asit içinde çözülerek reaksiyona girecek karışım hazırlanmıştır (karışım +4°C'de 24 saat stabil kalabilmektedir).

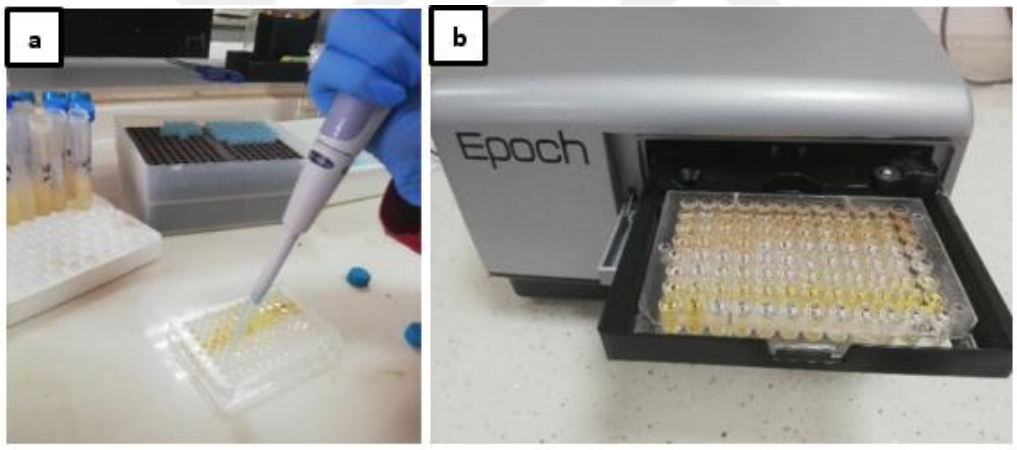



Şekil 3.9. Proline analizi hazırlık aşamaları (a) Sulfosalisilik asit solüsyonunun hazırlanması (b) Supernatantların su banyosunda kaynatılması

### 3.2.9. MDA (Malondialdehide)

Malonadialdehit analizi için Saiam ve Saxena (2000) yöntemi kullanılmıştır. Buna göre, 400 µl supernatant ilgili ortamlardan alınıp, 10 ml %1'lik trichloro asetik asit (TCA) ile karıştırılmış ve 12 000 *g*'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatant 1ml olunca, hazırlanan %20'lik TCA çözeltisine 5 g TBA eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan bu karışımdan 4 ml alınarak üzerine 1 ml supernatant ilave edilmiştir. Elde edilen karışım 95 °C'de 30 dakika kaynatılmıştır. Daha sonra 15 dakika buz banyosunda soğutulmuştur. MDA sonucları 532 ve 600 nm'de spektrofotometrede okunmuş ve okuma sonucundaki değerlerin MDA miktarı aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{MDA (nmol g}^{-1}\text{ misel)} = \frac{\text{Ekstrakt hacmi (ml)} \times \text{(A532-A600)}\ x10^{3}}{(155\ \text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1})]\ \text{Örnek miktarı (g)}} \qquad (3.2)$$

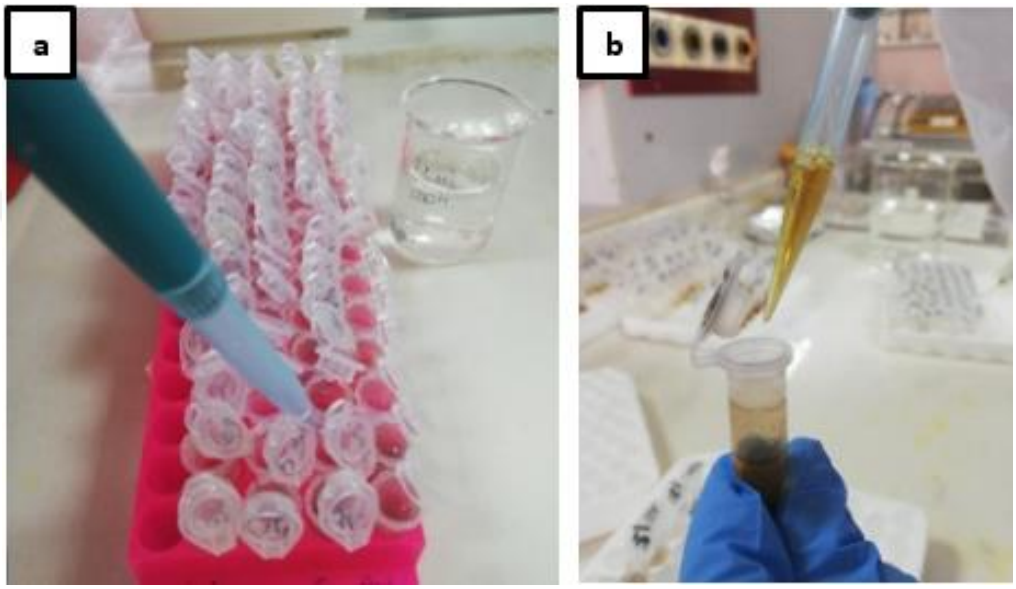



Şekil 3.10. MDA analizi hazırlık aşamaları (a) MDA supernatantlarının plate'ye alınması (b) Supernatantların spektrofotometrede okutulması

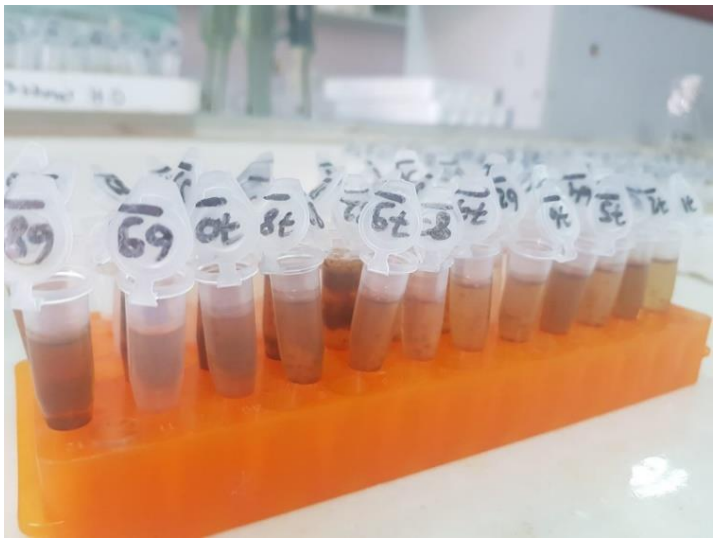
### 3.2.10. Melanin analizi

Melaninin ekstraksiyonu ve analizi için Gadd (1982) metodu kullanlmıştır. Yukarıda belirtilen fungus yetiştirme ortamından 300 µl alınıp Eppendorf tüp içinde, karışım 120 °C'de 15 dakika otoklav edilmiştir. Bir diğer yöntemde ise 300 µl supernatant yine 900 µl 1 mol $L^{-1}$ NaOH ile karıştırılmış, 90 °C'de 3 saat su banyosunda kaynatılmıştır. Bu işlemleri takiben, alkalin pigment ekstraktının

konsantre HCl ile asitlendirilmesi (pH) ile melanin çökertilmiştir. Çökelti nemden arındırılmış şartlarda bir gece boyunca 20 °C'de kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulan pelletler spektrofotometrik analiz için 1 ml NaOH (1 mol $L^{-1}$) içerisinde 80 °C'de 3 saat boyunca çözündürüldükten sonra 12 000 *g*'da 10 dakika santrifüj edilmiştir. İşlemden sonra supernatantlar yeni Eppendorf tüplerine aktarılmış absorbans 405 nm'de ölçülmüştür.




Şekil 3.11. Melanin hazırlık aşamaları (a) Supernatantlara NaOH ilave edilmesi (b) Supernatantlara HCLilavesi



Şekil 3.12. Melanin ölçümü için tüplerin 1 gece bekletilmesi

### 3.2.11. İstatistiksel analiz

İstatiksel analizler SPSS No. 23 ile varyans analizi (One-way ANOVA) ile yapılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan's Multiple Range Test ile belirlenmiştir. İstatistiksel olarak 0.05 ($p<0.05$) olan değerler önemli kabul edilmiştir.

# 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

## 4.1. Fiziksel Parametreler

Farklı gelişme koşullarında (glukoz, sukroz ve vitamin C içeren PDB ortamlarında) fungal etmenlerin fiziksel paramatreleri ölçülmüştür. Toplam spor sayısı ile miselyal ağırlığı belirlenmiştir. Buna göre, fungusun farklı ortamlarda fiziksel gelişimi belirlenmiş ayrıca bu gelişim aşamasında *Penicillium expansum* fungusunun gelişme ortamındaki pH ve EC değerlerini nasıl etkilediğini de ortaya konmuştur. Böylece fizyolojik tepkisi de belirlenmiştir.

### 4.1.1. Toplam spor sayısı

*P. expansum* fungusunun farklı ortamlardaki (glukoz, sukroz ve vitamin C) konsantrasyonlarındaki reaksiyonlarını belirlemek amacıyla inkübasyonun sekizinci gününde yapılan ölçümler sonucunda mikroskop altında PDB ortamından alınan (1 ml) solüsyondan yapılan konidi sayımı ve konodi yoğunluğu (Çizelge 4.1)'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, ortamdaki şeker ve vitamin C konsantrasyonu arttıkça spor sayısında da artış görülmüştür. Fungal etmenin herhangi bir kimsayal içermeyen saf su içinde sporları sayılmış olup diğer konsantrasyonlara kıyaslandığında minimal sayıda spor oluşturduğu tespit edilmiştir. Ortam hiç şeker içermeyen veya artan şeker konsantrasyonları ile kıyaslandığında ise üretilen spor miktarının (glukoz, sukroz veya vitamin C) konsantrasyon artışı ile arttığı tespit edilmiştir. Şeker konsantrasyonları 5 g/L veya yukarı konsantrasyonlarda spor sayısının ciddi artışına katkı sağlamıştır. Ortamlar arasında (glukoz, sukroz ve vitamin C) kıyaslama yapıldığında ise glukoz içeren ortamın sporulasyona daha ciddi katkı sunduğu belirlenmiştir. Örneğin, glukoz içermeyen ortamda spor sayısı 56 iken, 5 g/L şeker ihtiva eden ortamda spor sayısı 792 olmuştur. Bu şekilde artan glukoz konsantrasyonunun fungal etmenin patolojisine katkıda bulunacağı tespit edilmiştir. Şekersiz ortam sukroz şekeri ile kıyaslandığında

54 olan spor sayısı, 5 g/L şeker ortamında 88 olmuştur. Glukoz şekeri ile kıyaslandığında daha az konidi oluşumuna katkıda bulunmuştur. Yine, 5 g/L vitamin içeren ortamda da aynı durum tespit edilmiş, 56 konididen 82 konidiye artış tespit edilmiştir. Bu durumda her üç ortamda da artan şeker veya vitamin C konsantrasyonlarının sporulasyona katkı sunduğu görülmekle birlikte glukoz şekerinin sporulasyona daha fazla katkı sunduğu görülmüştür. Kısaca, ortama ilave edilen minimal düzeydeki şeker miktarının bile fungal sporulasyonunu aktive ettiği göze çarpmıştır.

### 4.1.2. Fungusun miselyal ağırlığı

Farklı şeker ve vitamin koşullarında geliştirilen fungal patojenin sıvı kültür ortamı içerisindeki miselyal ağırlığı da belirlenmiştir. Sıvı kültürlerden filtrasyon ile elde edilen misel yumaklarının yaş ağırlığı filtre kâğıdı kullanılarak fazla su drene edildikten sonra hassas terazide tartılmış, elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir. Buna göre, fungal etmenin başlangıçta miselyal ağırlığı 3 mm çapındaki disk ile tartıldığında 0.1 g olarak belirlenmiş, 8 günlük inkübasyon sonunda saf su içerisinde fungal etmenin miselyal disk ile ağırlığı her üç ortamda da 0.12-0.14 g olarak tespit edilmiştir. Tıpkı sporulasyonda olduğu gibi fungal etmenin saf su içeren ortamda gelişemediği görülmüştür. Ortam şeker ya da vitamin içermeyecek şekilde hazırlandığında ise (şekersiz PDB ortamı) yine sporulasyonda olduğu gibi miselyal ağırlıkta artış göze çarpmış 0.43-0.69 g olarak belirlenmiştir. Bu durum, 100 g/L konsantrasyonuna kadar devam etmiş ancak daha sonra aynı trendi sürdürememiştir. Yine ortamlar arası kıyaslama yapıldığında, glukoz içeren ortamın artan şeker miktarı ile miselyal ağırlığa istatistiksel olarak daha önemli katkı sunduğu görülmüştür, $p<0.05$. Çizelge 4.1'de istatistik olarak önemli bulunan değerler koyu yapılarak belirtilmiştir.

### 4.1.3. Fungusun EC ve pH değerleri

Sıvı ortamda (PDB) farklı ortam koşullarında (şeker ve vitamin) gelişmeye bırakılan fungusun geliştiği ortamların 0-, 5-, 10-, 20-, 25-, 50-, 75-, 100-, 150- ve 200 g/L konsantrasyonundaki pH ve EC değerleri (Çizelge 4.2)'te verilmiştir.

Fungusun her üç ortamda da pH değerleri ortama ilave edilen şeker ve vitamin C ile düşüş göstermiş, ortamın şeker ve vitamin C konsantrasyonu yanında fungal gelişim ile pH değerinin pH 6.8'den 3.2'ye indiği tespit edilmiştir.

Ortamların EC değerleri ele alındığında ise saf su ortamının EC değerinin 0.1 dS/m'den 2 dS/m' çıktığı görülmüş ancak bu durumun artan konsantrasyonlar ile ilgili olmadığı sadece PDB ortamının içeriğinden kaynaklanan mineral madde ve iyonların elektriksel iletkenliği arttırmasından kaynaklandığı tespit edilmiş artan şeker veya vitamin C miktarının EC değerlerine istatiksel olarak önemli katkı yapmadığı belirlenmiştir. pH ve EC değerlerinin arasında bir bağlantı bulunamamıştır. Bunun nedenini de şeker içeriği ortamın alkali ve asidik görev yapmasında etkili olmaktadır. Yüksek şeker içeriğinin ortamı asidize etmesi sonucu glukozun asidik ortamı tercih eden patojenler tarafından glukoz oksidaz 2 (gox2) enzimi vasıtası ile glukonik aside dönüşmesi sonucunda ortamın daha da asidize olmasına yol açarken ortamın EC değerini etkilememiştir.

Çizelge 4.1. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un misel ağırlığı ve spor sayısı

| Konsantrasyon (g/L) | Glukoz | | Sukroz | | Vitamin C | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | M.A. (g) | Toplam spor sayısı (x $10^6$) | M.A. (g) | Toplam spor sayısı (x $10^6$) | M.A. (g) | Toplam spor sayısı (x $10^6$) |
| N | 0.12 ± 0.04 | 72 | 0.14± 0.01 | 36 | 0.13± 0.01 | 32 |
| 0 | 0.43 ± 0.02$^{a}$ | 56$^{a}$ | 0.57± 0.42$^{a}$ | 54$^{a}$ | 0.69± 0.08$^{a}$ | 56$^{a}$ |
| 5 | **1.76 ± 0.25**$^{b}$ | **792**$^{b}$ | **2.26± 0.29**$^{b}$ | **88**$^{b}$ | **1.53± 0.09**$^{b}$ | **82**$^{b}$ |
| 10 | **1.73 ± 0.20**$^{b}$ | **936**$^{b}$ | **2.30± 0.49**$^{b}$ | **540**$^{c}$ | **1.87± 0.11**$^{b}$ | **168**$^{b}$ |
| 20 | **1.79 ± 0.33**$^{b}$ | **1964**$^{c}$ | **2.38± 0.34**$^{b}$ | **648**$^{c}$ | **1.69± 0.20**$^{b}$ | **252**$^{b}$ |
| 25 | **2.52 ± 0.40**$^{c}$ | **2008**$^{c}$ | **2.45± 0.48**$^{b}$ | **1168**$^{c}$ | **1.96± 0.07**$^{b}$ | **484**$^{b}$ |
| 50 | **2.44 ± 0.54**$^{c}$ | **2232**$^{c}$ | **2.67± 0.50**$^{b}$ | **1724**$^{d}$ | **1.92± 0.08**$^{b}$ | **1380**$^{c}$ |
| 75 | **3.96 ± 0.41**$^{c}$ | **2632**$^{c}$ | **2.10± 0.71**$^{b}$ | **2036**$^{d}$ | **2.02± 0.11**$^{b}$ | **1764**$^{c}$ |
| 100 | **3.97 ± 0.24**$^{c}$ | **3440**$^{d}$ | **1.77± 0.33**$^{b}$ | **2744**$^{e}$ | **1.89± 0.20**$^{b}$ | **2204**$^{d}$ |
| 125 | **3.77 ± 0.29**$^{c}$ | **4044**$^{d}$ | **1.68± 0.30**$^{b}$ | **3310**$^{e}$ | **1.93± 0.29**$^{b}$ | **3272**$^{d}$ |
| 150 | **3.68 ± 0.56**$^{c}$ | **5452**$^{d}$ | **1.37± 0.69**$^{b}$ | **4162**$^{e}$ | **1.40± 0.24**$^{b}$ | **3776**$^{d}$ |
| 200 | **3.72 ± 0.24**$^{c}$ | **7268**$^{e}$ | **1.49± 0.29**$^{b}$ | **6162**$^{f}$ | **1.49± 0.27**$^{b}$ | **5032**$^{e}$ |

M.A; misel ağırlığı (g); N: saf su; 0: Şekersiz PDB ortamı; Sonuçlar, ortalama ± Standard hata olarak ifade edilmiştir. Koyu renkli rakamlar $P<0.05$ düzeyinde diğerlerinden önemli bulunmuştur. Misel verilerinin ilk değerleri aynı olduğu için RGR yapılmasına gerek kalmamıştır. Sonuçlar ağırlık olarak ifade edilmiştir. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak $P\leq0.05$ değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir

Çizelge 4.2. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un pH ve EC değerleri

| Konsantrasyon (g/L) | Glukoz | | Sukroz | | Vitamin C | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | pH | EC (dS $m^{-1}$) | pH | EC (dS $m^{-1}$) | pH | EC (dS $m^{-1}$) |
| N | 6.8 | 0.11 | 6.5 | 0.10 | 6.7 | 0.10 |
| 0 | 4.6 | 2.04 | 4.6 | 2.14 | 4.7 | 2.11 |
| 5 | 4.3 | 2.04 | 3.9 | 2.13 | 3.7 | 1.85 |
| 10 | 3.9 | 2.11 | 3.9 | 2.14 | 3.6 | 2.14 |
| 20 | 3.9 | 2.17 | 4.0 | 2.17 | 3.7 | 2.11 |
| 25 | 3.7 | 2.11 | 3.6 | 2.17 | 3.7 | 2.13 |
| 50 | 3.6 | 2.13 | 3.6 | 2.11 | 3.7 | 2.15 |
| 75 | 3.3 | 2.15 | 3.5 | 2.14 | 3.4 | 2.13 |
| 100 | 3.3 | 2.15 | 3.5 | 2.12 | 3.8 | 2.08 |
| 125 | 3.3 | 2.17 | 3.5 | 2.14 | 3.6 | 2.19 |
| 150 | 3.1 | 2.14 | 3.4 | 2.14 | 3.6 | 2.16 |
| 200 | 3.2 | 2.11 | 3.5 | 2.16 | 3.5 | 2.28 |

pH: *P. expansum*'un yetiştiği ortamın pH derecesi; EC: *P. expansum*'un yetiştiği ortamın elektriksel iletgenlik (EC) derecesi; N: saf su; 0: Şekersiz PDB ortamı

## 4.2. Biyokimyasal Parametreler

### 4.2.1. Fungusun geliştiği ortamın protein içeriğinin belirlenmesi

PDB ortamında gelişmeye bırakılan fungus solüsyonlarının protein içeriği Bradford (1976) yöntemi esas alınarak ölçülmüştür. Elde edilen supernatantlar spektrofotometre okuyucuda 595 nm'de okutularak fungusun protein içerikleri mg protein $g^{-1}$ misel ağırlık olarak ifade edilmiştir (Çizelge 4.3). Artan konsantrasyonlardaki glukoz, sukroz ve vitamin C içeriklerinin protein değerleri her üç ortamda da 25 g/L konsantrasyonuna kadar artmıştır. Bu konsantrasyon üzerindeki uygulamalarda ise fungusun ortama verdiği protein içeriği ya değişmemeiş ya da göreceli olarak azalmıştır. Ortamlar kendi aralarında kıyaslandığında ise glukoz içeren ortamdaki protein değerlerinin diğer ortamlara oranla daha yüksek olduğu saptanmıştır; $p<0.05$. Çizelge 4.3'te istatistiksel olarak önemli bulunan değerler koyu renk ile belirtilmiştir.

### 4.2.2. Fungusun proteaz ve lakkaz aktivitelerinin belirlenmesi

PDB ortamında yetiştirilen fungus solüsyonların proteaz ve lakkaz aktiviteleri belirlenmiştir (Çizelge 4.4). Buna göre, farklı konsantrasyonlarda glukoz ve sukroz içeren ortamların proteaz değerlerindeki artış protein artışındaki trende benzer bulunmuş, farklı vitamin C konsantrasyonları içeren glukoz tabanlı PDB ortamında ise önemli bir değişiklik tespit edilememiştir. En yüksek proteaz değerleri glukoz ve sukroz içeren ortamlarda 25 g/L konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. Bu konsantrasyon değerinin üzerindeki glukoz ve sukroz konsantrasyonlarının ortama verilen proteaz değerleri önemsiz bulunmuştur; $p<0.05$. Çizelge 4.4'te istatistik olarak önemli bulunan değerler koyu renk ile belirtilmiştir.

Fungal patojenin lakkaz aktivitesi ABTS (2, 2'-Azino-Bis-3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic asit) molekülünün okside olması prensibine dayanarak belirlenmiştir. Sonuçlar, Çizelge 4.4'te ifade edilmiştir. Her üç ortamda da

solusyona verilen lakkaz aktivitesi minimal düzeyde kalmış, artan şeker ve vitamin konsantrasyonlarının lakkaz enzim aktivitesi üserine etkisi belirlenememiştir.

Çizelge 4.3. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un geliştiği ortamın protein içeriği (fungusun ortama bıraktığı protein içeriği)

| Konsantrasyon (g/L) | Glukoz | Sukroz | Vitamin C |
|---|---|---|---|
| | Ortamın protein içeriği (mg protein $ml^{-1}$) | Ortamın protein içeriği (mg protein $ml^{-1}$) | Ortamın protein içeriği (mg protein $ml^{-1}$) |
| N | 0.18±0.01 | 0.18±0.01 | 0.19± 0.01 |
| 0 | 0.22±0.01$^{a}$ | 0.21±0.01$^{a}$ | 0.22±0.01$^{a}$ |
| 5 | 0.20±0.01$^{a}$ | 0.22±0.00$^{b}$ | 0.22±0.00$^{a}$ |
| 10 | 0.23±0.01$^{b}$ | 0.22±0.00$^{b}$ | 0.22±0.01$^{a}$ |
| 20 | 0.25±0.02$^{b}$ | 0.24±0.01$^{b}$ | 0.22±0.00$^{a}$ |
| 25 | **0.25±0.01**$^{b}$ | **0.23±0.00**$^{b}$ | **0.22±0.00**$^{a}$ |
| 50 | 0.24±0.01$^{b}$ | 0.22±0.01$^{b}$ | **0.23±0.01**$^{b}$ |
| 75 | 0.23±0.01$^{b}$ | 0.22±0.02$^{b}$ | 0.22±0.01$^{a}$ |
| 100 | 0.23±0.01$^{b}$ | 0.22±0.01$^{b}$ | 0.22±0.00$^{a}$ |
| 125 | 0.20±0.00$^{a}$ | 0.21±0.02$^{a}$ | 0.22±0.01$^{a}$ |
| 150 | 0.19±0.00$^{a}$ | 0.20±0.05$^{a}$ | 0.20±0.01$^{a}$ |
| 200 | 0.21±0.00$^{a}$ | 0.19±0.03$^{a}$ | 0.19±0.02$^{a}$ |

N: saf su; 0: Şekersiz PDB ortamı; Sonuçlar, ortalama ± Standard hata olarak ifade edilmiştir. Koyu renkli rakamlar P<0.05 düzeyinde diğerlerinden önemli bulunmuştur. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak P≤0.05 değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir

Çizelge 4.4. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un geliştiği ortamdaki ortama bırakılan proteaz ve lakkaz enzimlerinin seviyeleri

| Konsantrasyon (g/L) | Glukoz | | Sukroz | | Vitamin C | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Proteaz ($A_{440}$ $dak^{-1}$ mg $protein^{-1}$) | Lakkaz ($A_{420}$ $dak^{-1}$ mg $protein^{-1}$) | Proteaz ($A_{40}$ $dak^{-1}$ mg $protein^{-1}$) | Lakkaz ($A_{420}$ $dak^{-1}$ mg $protein^{-1}$) | Proteaz ($A_{440}$ $dak^{-1}$ mg $protein^{-1}$) | Lakkaz ($A_{420}$ $dak^{-1}$ mg $protein^{-1}$) |
| N | 0.19±0.03 | 0.05±0.00 | 0.15±0.03 | 0.05±0.00 | 0.19±0.02 | 0.05±0.00 |
| 0 | 0.16±0.01$^{a}$ | 0.07±0.00 | 0.13±0.03$^{a}$ | 0.08±0.00 | 0.20±0.01$^{a}$ | 0.06±0.01 |
| 5 | 0.16±0.01$^{a}$ | 0.06±0.00 | 0.17±0.04$^{b}$ | 0.08±0.01 | 0.21±0.01$^{b}$ | 0.10±0.00 |
| 10 | 0.14±0.02$^{a}$ | 0.06±0.00 | 0.17±0.01$^{b}$ | 0.13±0.01 | 0.19±0.01$^{a}$ | 0.10±0.01 |
| 20 | 0.18±0.02$^{a}$ | 0.06±0.00 | 0.23±0.01$^{b}$ | 0.15±0.01 | 0.20±0.02$^{a}$ | 0.10±0.02 |
| 25 | **0.24±0.02**$^{b}$ | 0.08±0.01 | **0.24±0.01**$^{b}$ | 0.15±0.01 | 0.19±0.03$^{a}$ | 0.10±0.01 |
| 50 | 0.17±0.01$^{a}$ | 0.09±0.01 | 0.23±0.03$^{b}$ | 0.15±0.01 | 0.17±0.01$^{b}$ | 0.10±0.01 |
| 75 | 0.17±0.02$^{a}$ | 0.09±0.00 | 0.23±0.01$^{b}$ | 0.16±0.04 | 0.16±0.01$^{b}$ | 0.08±0.01 |
| 100 | 0.19±0.03$^{b}$ | 0.09±0.01 | 0.23±0.05$^{b}$ | 0.13±0.02 | 0.16±0.02$^{b}$ | 0.08±0.00 |
| 125 | 0.19±0.02$^{b}$ | 0.07±0.00 | 0.23±0.01$^{b}$ | 0.15±0.05 | 0.16±0.02$^{b}$ | 0.06±0.00 |
| 150 | 0.18±0.02$^{b}$ | 0.07±0.01 | 0.20±0.03$^{b}$ | 0.15±0.03 | 0.16±0.02$^{b}$ | 0.07±0.00 |
| 200 | 0.25±0.01$^{b}$ | 0.07±001 | 0.23±0.33$^{b}$ | 0.18±0.04 | 0.15±0.02$^{b}$ | 0.07±0.00 |

N: saf su; 0: Şekersiz PDB ortamı; Sonuçlar, ortalama ± Standard hata olarak ifade edilmiştir. Koyu renkli rakamlar $P<0.05$ düzeyinde diğerlerinden önemli bulunmuştur. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak $P\leq0.05$ değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir

### 4.2.3. Proline ve MDA değerleri

Farklı ortam şartlarına maruz bırakılan fungustan çeşitli parametreler alınarak fungusun biyokimyasal değişikliklerinin izlenmesi amaçlanmıştır. Bu parametrelerden biri olan proline ölçümü yapılmıştır. Bir amino asit olan proline fungusta hem biyotik hem de abiyotik stres göstergesidir ve fungusun maruz bırakıldığı farklı ortam koşullarına karşı doğrudan belirleyici rolü olmamasına rağmen stresin seviyesi hakkında önemli ipuçları vermektedir (Karakaş Dikilitaş., 2013). Sonuçlar, Çizelge 4.5'te ifade edilmiştir. Artan glukoz, sukroz ve vitamin C konsantrasyonları ele alındığında protein verilerinde olduğu gibi 25 g/L glukoz konsantrasyona negatif korelasyon gösteren şekilde proline miktarında artış tespit edilmiştir. Bu durum sukroz şekerinde de tespit edilmiş, artan şeker konsantrasyonunun proline artışına neden olduğu görülmüştür. Belirli bir konsantrasyondan sonra proline artışının protein azalışı ile korele olması fungal etmenin ortama proline sentezinden ziyade mevcut proteinin parçalanması ve ortama verilmesi olarak değerlendirilmiştir. Yine, protein sonuçlarında görüldüğü gibi glukoz şekerinin daha fazla etkili olduğu görülmüştür.

Malondialdehid (MDA); hücre membranlarda doymamış lipit asitlerinin parçalanması sonucu ortaya çıkan bir ara üründür. MDA miktarının artması, stres koşullarında toleransın belirlenmesi açısından önemli bir parametredir (Dolatabadian ve ark., 2008). Sonuçlar, Çizelge 4.5'te verilmiştir.

Hem şeker hem de vitamin içeren ortamlarda MDA değerlerinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu saptanmıştır. Çünkü fungusun değil ortamın stres şartları gözlemlenmiş ve bunun sonucunda da her üç ortam içeriğinin de stres oluşturmadığı tespit edilmiştir. Artan organik madde miktarının ortama stres metabolit salınımına katkı yapmadığı hatta artan şeker ve vitamin miktarlarının fungal etmenin stres metabolitleri üzerinde tetikleyici etki oluşturmadığı görülmüştür. Dolayısı ile istatistik olarak değerler arasında fark görülmememiştir.

Çizelge 4.5. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un geliştiği ortamdaki ortama bırakılan proline ve MDA seviyeleri

| Konsantrasyon (g/L) | Glukoz | | Sukroz | | Vitamin C | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Proline (µmol mg protein$^{-1}$) | MDA (nmol mg protein$^{-1}$) | Proline (µmol mg protein$^{-1}$) | MDA (nmol mg protein$^{-1}$) | Proline (µmol mg protein$^{-1}$) | MDA (nmol mg protein$^{-1}$) |
| N | 0.19±0.01 | 0.12±0.01 | 0.24±0.04 | 0.10±0.00 | 0.13±0.02 | 0.12±0.01 |
| 0 | 0.20±0.20 $^{a}$ | 0.12±0.16 | 0.35±0.06 $^{a}$ | 0.12±0.01 | 0.13±0.05 $^{a}$ | 0.16±0.03 |
| 5 | 0.26±0.04 $^{b}$ | 0.12±0.01 | 0.22±0.02 $^{b}$ | 0.12±0.02 | 0.25±0.08 $^{b}$ | 0.13±0.02 |
| 10 | 0.55±0.31 $^{b}$ | 0.11±0.01 | 0.26±0.07 $^{b}$ | 0.12±0.02 | 0.29±0.02 $^{b}$ | 0.11±0.03 |
| 20 | 0.53±0.05 $^{b}$ | 0.12±0.02 | 0.32±0.07 $^{a}$ | 0.13±0.01 | 0.27±0.07 $^{b}$ | 0.11±0.02 |
| 25 | **0.59±0.04** $^{b}$ | 0.13±0.01 | **0.34±0.06** $^{a}$ | 0.13±0.01 | **0.26±0.03** $^{b}$ | 0.15±0.04 |
| 50 | 0.59±0.02 $^{b}$ | 0.12±0.20 | 0.40±0.09 $^{b}$ | 0.13±0.04 | 0.26±0.03 $^{b}$ | 0.17±0.01 |
| 75 | 0.56±0.02 $^{b}$ | 0.12±0.01 | 0.40±0.05 $^{b}$ | 0.13±0.02 | 0.26±0.05 $^{b}$ | 0.12±0.02 |
| 100 | 0.59±0.04 $^{b}$ | 0.14±0.01 | 0.45±0.02 $^{b}$ | 0.13±0.04 | 0.20±0.02 $^{b}$ | 0.13±0.02 |
| 125 | 0.52±0.02 $^{b}$ | 0.12±0.01 | 0.48±0.03 $^{b}$ | 0.14±0.15 | 0.23±0.05 $^{b}$ | 0.15±0.04 |
| 150 | 0.51±0.04 $^{b}$ | 0.15±0.04 | 0.40±0.10 $^{b}$ | 0.13±0.07 | 0.20±0.04 $^{b}$ | 0.16±0.03 |
| 200 | 0.56±0.03 $^{b}$ | 0.12±0.02 | 0.52±0.10 $^{b}$ | 0.15±0.17 | 0.20±0.01 $^{b}$ | 0.15±0.02 |

N N: saf su; 0: Şekersiz PDB ortamı; Sonuçlar, ortalama ± Standard hata olarak ifade edilmiştir. Koyu renkli rakamlar $P<0.05$ düzeyinde diğerlerinden önemli bulunmuştur. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak $P\leq0.05$ değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir

### 4.2.4. Fungal etmenin melanin değerleri

Organizmada birden fazla koruyucu roller üstlenen melanin ekstraksiyonu ve analizi Gadd (1982)'a göre belirlenmiştir. Birçok fungus fenolik bileşiklerin oksidatif polimerizasyonu sonucu oluşan koyu kahverengi ve siyah renklerdeki pigmentlerden oluşan melaninleri üretir. Melaninler, organizmaların hayatta kalma ve rekabet yeteneğini arttırır. Organizmaları çeşitli çevresel faktörlerden korur (Zhdanova ve ark., 2000; Rosa ve ark., 2010). Sonuçlar, Çizelge 4.6'da ifade edilmiştir. Melanin değerlerinde de artan şeker konsantrasyonlarına paralel olarak artış tespit edilmiştir. Glukoz ve vitamin C içeren ortamlar sukroz içeren ortamlara göre melanin üretimi açısından daha etkili bulunmuştur. Bunun temel nedenlerinden birinin düşük molekül ağırlıklı karbohidratların yine karbohidrat olan melanin miktarına katkı sunması olarak değerlendirilmiştir. İki farklı yöntemle ölçülen melanin değerlerininde Otoklav ve su banyosu arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı ortamlarda (glukoz, sukroz ve vitamin C) gelişen *P. expansum* 'un geliştiği ortamdaki ortama bırakılan melanin seviyeleri

| onsantrasyon (g/L) | Glukoz | | Sukroz | | Vitamin C | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Melanin (Δ Absorbans mg protein$^{-1}$) | | Melanin (Δ Absorbans mg protein$^{-1}$) | | Melanin (Δ Absorbans mg protein$^{-1}$) | |
| | Otoklav | Su banyosu | Otoklav | Su banyosu | Otoklav | Su banyosu |
| N | 0.06±0.00 | 0.07±0.00 | 0.08±0.01 | 0.08± 0.00 | 0.08±0.01 | 0.10±0.01 $^{a}$ |
| 0 | 0.15±0.02 $^{a}$ | 0.20±0.01 $^{a}$ | 0.15±0.03 $^{a}$ | 0.14±0.02 $^{a}$ | 0.21±0.04 $^{a}$ | 0.19±0.03 $^{a}$ |
| 5 | 0.17±0.02 $^{a}$ | 0.17±0.03 $^{a}$ | 0.15±0.03 $^{a}$ | 0.14±0.02 $^{a}$ | 0.16±0.11 $^{a}$ | 0.15±0.06 $^{a}$ |
| 10 | 0.15±0.02 $^{a}$ | 0.18±0.02 $^{a}$ | 0.14±0.03 $^{a}$ | 0.16±0.02 $^{a}$ | 0.15±0.07 $^{a}$ | 0.18±0.06 $^{b}$ |
| 20 | 0.23±0.02 $^{b}$ | 0.24±0.03 $^{b}$ | 0.15±0.02 $^{b}$ | 0.13±0.02 $^{b}$ | 0.21±0.05 $^{b}$ | 0.21±0.08 $^{b}$ |
| 25 | **0.22±0.01 $^{b}$** | **0.24±0.07 $^{b}$** | **0.13±0.03 $^{b}$** | **0.16±0.02 $^{b}$** | **0.23± 0.16 $^{b}$** | **0.20±0.02 $^{b}$** |
| 50 | 0.29±0.07 $^{b}$ | 0.29±0.15 $^{b}$ | 0.15±0.03 $^{b}$ | 0.14±0.03 $^{b}$ | 0.24±0.04 $^{b}$ | 0.26±0.01 $^{b}$ |
| 75 | 0.50±0.10 $^{b}$ | 0.44±0.24 $^{b}$ | 0.13±0.11 $^{b}$ | 0.16±0.03 $^{b}$ | 0.35±0.04 $^{b}$ | 0.29±0.02 $^{b}$ |
| 100 | 0.65±0.17 $^{c}$ | 0.45±0.12 $^{c}$ | 0.11±0.07 $^{c}$ | 0.14±0.13 $^{c}$ | 0.57±0.12 $^{c}$ | 0.49±0.04 $^{c}$ |
| 125 | 0.66±0.08 $^{c}$ | 0.60±0.21 $^{c}$ | 0.12±0.10 $^{c}$ | 0.12±0.20 $^{c}$ | 0.61±0.04 $^{c}$ | 0.60±0.01 $^{c}$ |
| 150 | 0.63±0.41 $^{c}$ | 0.39±0.16 $^{c}$ | 0.20±0.08 $^{c}$ | 0.13±0.13 $^{c}$ | 0.62±0.11 $^{c}$ | 0.60±0.03 $^{c}$ |
| 200 | 0.68±0.52 $^{c}$ | 0.46±0.20 $^{c}$ | 0.16±0.16 $^{c}$ | 0.16±0.16 $^{c}$ | 0.57±0.01 $^{c}$ | 0.56±0.04 $^{c}$ |

N: saf su; 0: Şekersiz PDB ortamı; Sonuçlar, ortalama ± Standard hata olarak ifade edilmiştir. Rakamlar üzerinde yer alan farklı harflendirmeler istatistik olarak P≤0.05 değerine göre kontrol grubundan farklı olarak kabul edilmiştir

## 4.3. Tartışma

PDB gelişme ortamında farklı şeker ve vitamin C içeren konsantrasyonlarda *P. expansum* fungusunun miselyal gelişimi yanında sporulasyonu da ölçülerek fungal gelişim 8 günlük inkubasyon periyodu boyunca test edilmiştir. Bütün ortamların fungal gelişime katkıda bulunduğu belirlenmiş ancak glukoz içeren ortamın artan konsantrasyonlarının fungal miselyal ağırlığa ve sporulasyona daha fazla katkı sunduğu görülmüştür. Bunun temel nedenlerinden birinin glukozun moleküler ağırlığının diğer moleküllerden daha düşük olması ve sukroz ve vitamin C ile kıyaslandığında *P. expansum*'un glukozu daha etkin bir şekilde kullanarak hızlı metabolize ettiği ve bu durumun miselyal ağırlığa ve sporulasyona yansıdığı tespit edilmiştir. Glukoz miktarı arttıkça miselyal ağırlık da istatiksel olarak önemli düzeyde artmıştır ($p<0.05$). Glukoz şekeri PDB ortamında kullanıldığında normal konsantrasyon değeri 20-25 g/L olarak önerilmektedir. Bu değer miselyal gelişmeye istatistiksel olarak önemli katkı sunarken bu değerin üzerindeki şeker miktarlarında glukoz ortamında görülen miselyal ağırlık artışı tespit edilmiştir. Ancak, miselyal ağırlık artışı artan sukroz konsantrasyonlarında glukoz şekerinde olduğu gibi belirgin olarak görülmemiş, hatta 50 g/L sukroz konsantrasyonundan sonra misel ağırlıkta azalış tespit edilmiştir. Benzer durum 20 g/L sabit glukoz içeren farklı konsantrasyonlardaki vitamin C muamelesinde de tespit edilmiştir. Bunun temel nedeninin molekül ağırlığı yüksek olarak bulunan kimyasal bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Fungusun kimyasal maddeleri metabolizmaya uğratma kapasitesinin ortamdaki kimyasal maddelerin bileşenleri ve molekül ağırlıkları ile ilgili olduğu öngörülmüştür. Örneğin, Chao ve ark. (2011), tıbbi amaç için kullanılan *Rigidoporus ulmarius* fungusunun farklı karbon kaynakları ve pH ortamlarında miselyal gelişimini analiz etmişler, maksimum miselyal gelişimin 20.9 g/L glukoz konsantrasyonunda elde etmişler, pH derecesini de 4.5 olarak kaydetmişlerdir. Artan glukoz ve sukroz konsantrasyonlarının misellerin polisakkarit sentezini arttırdığını rapor etmişlerdir. Yine, Zhou ve ark. (2009), glukoz kaynağının fruktoz ve sukroz şekerlerine göre funguslar tarafından daha çok tercih edilen karbon kaynağı olduğunu belirtmişlerdir. Bir diğer çalışmada, Lee ve ark. (2007), *Cladosporium phlei* fungus gelişme ortamına glukoz, fruktoz, galaktoz ve sukroz ilave

edilmesi ile misel gelişimi ve misel ağırlığı artmış ancak diğer karbon kaynakları olarak bilinen gliserol ve sorbitol ile herhangi bir artış ya da miselyal gelişim saptanamamıştır. Barborakova ve ark. (2012), *Penicillium scabrosum* fungal gelişim ortamının glukoz konsantrasyonu arttığında fungal gelişime olumlu katkı yaptığını fakat yüksek sayılacak glukoz konsantrasyonlarının 30 g/L ve üstü konsantrasyonların *P. scabrosum* tarafından üretilen fumagillin toksininin sentezini olumsuz etkileyerek sınırlandırdığını ifade etmişlerdir. Ayrıca, artan glukoz konsantrasyonlarının ortamın pH değerini düşürdüğünü de rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda, bütçe ve zaman kısıtlığından dolayı toksin analizi yapılamamıştır. Ancak artan inkübasyon süresi ve şeker içeriğinin toksin üretimi üzerine etkili olabileceği değerlendirilmiştir. Örneğin, Salomao ve ark. (2019), Golden Supreme ve McIntosh elma çeşitlerinde patulin toksininin konsantrasyonunu meyvelerin depolama süresine ve şeker içeriğine bağlı olduğunu tespit etmişler, uzun süreli depolama ve yüksek şeker içeriğinin toksin ve patolojik enzim konsantrasyonlarının artışında etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Bizim çalışmamızda artan şeker konsantrasyonunun miselyal gelişimi glukoz şekerinde konsantrasyon boyunca arttırdığını, sukroz şekerinde ise belli bir dereceye kadar arttırdığını belirledik. Çalışmamızda miselyal gelişim ve sporulasyon için kaydedilen 8 günlük inkübasyon süresinden daha fazla inkubasyon süresi ilave edildiğinde miselyal gelişim ve sporulasyonu glukoz şartlarında pozitif olarak etkileyeceğini diğer ortamlarda da (sukroz, vitamin C) enzim ve diğer metabolitlerin artışına neden olacağını değerlendirdik. Çünkü, kısa süre önce yapılan bir çalışmada Ziv ve ark. (2020), domates meyvelerinde glukonik asit ile yüksek şeker içeriğini sentezleyen *P. expansum*'un patojenisitesinin hızlandığını belirtmişlerdir. Aynı genetik geçmişe ve özelliğe sahip domates hatlarının farklı şeker içerikleri bulundurması durumunda fungal kolonizasyonun meyvelerdeki yüksek şeker içeriği ile artış gösterdiğini karbonhidrat mekanizmasının hızlandığını göstermişlerdir. Ancak bu durumun her zaman ve her koşulda geçerli olmadığını, örneğin *Colletotrichum gloeosporioides*, domates antraknozu, fungusunun kolonizasyon sırasında amonyak sentezlediğini ve dolayısı ile düşük şeker içeriğine ihtiyaç duyduğunu ve sentezlediğini ispat etmişlerdir. Her iki fungusun şeker sentezi ile ilgili genlerinin farklı görüntülendiğini ifade etmişlerdir. Bu yapılanmadan dolayı doğada farklı

patojenlerin farklı konukçuları olduğunu öne sürerek biyoçeşitiliğin bu şekilde olabileceğini rapor etmişlerdir.

Thanh ve ark. (2005), basal minimal ortamlarda artan glukoz konsantrasyonlarının ancak fosfat ile birlikte ortama verildiğinde miselyal gelişim ve sporulasyona katkı sağladığını aksi durumlarda ise etkisinin çok az olduğunu bildirmişlerdir. Glukozun karbon kaynağı ile enerji sağlama gücü bilinmesine rağmen hücrelerde ATP sentezinin yapılabilmesi için fosfor veya fosforlu bileşiklere ihtiyaç duyulduğu bilindiğinden fosfatın spor çimlenmesini hızlandırdığı düşünülmektedir.

Farklı ortamlarda gelişmeye bırakılan fungusun pH değerleri ölçülmüş ortamdaki glukoz, sukroz ve vitamin C konsantrasyonlarının artması ile pH değerinin düştüğü gözlemlenmiştir. Benzer sonuçlar Jiao ve ark. (2021), tarafından da ifade edilmiş, fungus patojenisitesi ve pH değeri arasında yakın bir ilişki olduğu saptanmıştır. Özellikle pH değerinin fungusların büyümesinde ve gelişmesinde oldukça önemli bir rol oynadığını fungusun patojenisitesini artırdığını ifade etmişlerdir. Patojenlerin enfeksiyon aşamasında konukçu dokuları asitleştirdiği ve bitkinin hücre duvarlarını parçalayan enzimleri aktive etmek için uygun pH şartları sağladığını göstermişlerdir. Yine, Huang ve ark. (2021), tarafından meyve ve sebzelerde yüksek besin maddeleri, yüksek nem ve düşük pH'nın patojenlerin gelişimi için uygun bir ortam ifade edilmiş, bu nedenle meyve ve sebzelerin hasat sonrası fungal patojenlerin neden olduğu çeşitli hastalıklara karşı hassas olduklarını bildirmişlerdir. Funguslar ile yapılan birçok çalışma yüksek şeker içeriğinin fungusların gelişim ve patojenisitesini belirleyen önemli unsurlardan biri olduğunu göstermiştir. Şeker içeriği ortamın alkali ve asidik görev yapmasında önemli roller üstlenmektedir (Prusky ve ark., 2016). Ziv ve ark. (2020), bu mekanizmayı meyvelerdeki ya da ortamdaki yüksek şeker içeriğinin ortamı asidize etmesi sonucu glukozun asidik ortamı tercih eden patojenler tarafından glukoz oksidaz 2 (*gox2*) enzimi vasıtası ile glukonik aside dönüşmesi ortamın daha da asidize olmasına yol açmaktadır şeklinde açıklamışlardır. Dolayısı ile meyvelerdeki şeker seviyesinin hasat sonrası konukçu-patojen ilişkisinin önemli bir belirleyicisi olduğu ortaya çıkmaktadır. Meyvelerdeki şeker seviyesi hem tarla hem de muhafaza koşullarında dinamik olarak

değişmektedir. Meyveler, olgunlaşma aşamasında ya da olgunlaştıktan sonra hücre duvarlarını ya da nişaştalarını parçalayarak glukoz gibi basit şekerleri biriktirirler. *Penicillium* gibi hasat sonrası patojenler ise bu değişen çevre şartları ve koşullarında yaşamak ve çoğalmak için uyum sağlamak ve adapte olmak zorundadırlar. Küçük moleküllere ayrılan nişasta gibi büyük karbonhidrat kaynakları, funguslar için zengin karbon kaynağı oluştururlar. Bu kaynaklar da saprofit patojen fungusların patojenisitesini arttırır. Bu durum meyvelerdeki yüksek şeker içeriğinin fungal virulensi arttırmasını kaçınılmaz kılar. Birçok meyve glukoz, sukroz ve fruktozu farklı oranlarda ihtiva etmektedir ki bu oran çoğunlukla toplam çözünen katı maddenin %75-85'i civarındadır (Prusky, 1996). Bu üç şeker tipinin oranı meyvenin patojene hassasiyetinde önemli rol oynamaktadır.

Fungusun spor sayısı da artan şeker ve vitamin konsantrasyonlarında kademeli olarak artış göstermiştir. Örneğin; Belisario ve ark. (2002), ortalama fungal etmen gelişimi; *in vitro* büyüme hızı ve birim alandaki spor yoğunluğunun, bitki patolojisinde konukçu-patojen ilişkisinde virülensliğin bir göstergesi olarak kullanılabileceğini ifade etmişlerdir. Yine, Costa ve Nahas (2012), topraklarda glukoz ve glukoz içermeyen fungal kültür ortamında fungal büyümesi ve spor üretimini değerlendirmiş, glukoz ilavesi *Penicillium* sp.'nin büyüme hızını arttırmış ancak spor sayısını 3.5 kat azalttığını rapor etmişlerdir. Yine, fungusun misel ağırlığı da şeker ve vitamin konsantrasyonuna bağlı olarak artmıştır. Benzer olarak McCallum ve ark. (2002), patulin ile misel ağırlığı arasında pozitif bir korelasyon olduğunu ve en yüksek patulin seviyelerini, yoğun misel gelişiminin eşlik ettiği agresif büyüme (hızla artan asitlik ile karakterize edilen) gösteren izolatlar olduğunu saptamışlardır. Benzer olarak, Barborakova ve ark. (2021), tarafından da artan glukoz konsantrasyonunun fungusun miselyal ağırlığı üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Kılıç (2017), sıvı ortamda (PDB) geliştirilen *P. expansum* fungusunun farklı tuz konsantrasyonlarında EC ve pH değerlerinde artış olduğunu ve fungusun tuzlu ortam koşullarını tolere ettiğini bildirmiştir. Fungal etmenin geniş bir stres skalasına sahip olduğu görülmüştür. Şeftalide *Penicillium expansum*'un sıcaklık ve antogonistik maya etkinliği üzerine yapılan çalışmada farklı parametreler ölçülmüştür. Bu

parametrelerden biri olan elektriksel iletkenlikte en önemli azalmalar kombinasyonla muamele edilen meyvelerde gözlemlenmiştir (Zhao ve ark., 2018).

Farklı ortamların (glukoz, sukroz ve vitamin C) enzim değerlerine bakılmıştır. Her üç ortamda da protein değerleri 25 g/L konsantrasyonuna kadar artış göstermiştir. 25 g/L konsantrasyonundan sonraki konsantrasyonlarda ise protein değerleri önemsiz bulunmuştur. Ortamlar kendi aralarında kıyaslandığında ise glukoz içeren ortamdaki protein değerlerinin diğer ortamlara oranla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Proline değerlerindeki artışın ise protein degradasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir. Meghnous ve ark. (2019), tarafından *Aspergillus tubingensis*'in toksik bir metaloid olan antimona karşı stresini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. *A. tubingensis*'in artan toksik madde miktarıyla proline değerleri arasında pozitif bir korelasyona sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer olarak Zhao ve ark. (2021), şeftali sakkaroz taşıyıcıları transgenetik tütün bitkilerine aktarmışlardır. Düşük sıcaklık ve kuraklık gibi stres koşullarına maruz bırakıldıktan sonra transgenetik aşılı ekspesyon bitkilerinde proline ve çözünür şeker içeriğinde artış olduğu gözlemlenmiştir.

Glukoz ve sukroz konsantrasyonlarını içeren ortamların proteaz değerleri artmış olmasına rağmen vitamin C konsantrasyonları içeren ortamda önemli bir değişikliğe rastlanmamıştır. Yine 25 g/L konsantrasyonundan sonraki değerler önemsiz bulunmuştur. Banani ve ark. (2014), tarafından proteaz aktivitesini *in vitro* koşullarda elma meyvesi üzerinde *Penicillium expansum, Botrytis cinerea, Monilinia fructicola* ve *Alternaria alternata*'ya karşı araştırmışlardır. En yüksek düzeyde proteaz etkinliği *M. fructicola* ve *B. cinerea*'*ya* karşı gözlemlenirken, *Penicillium expansum* ve *A. alternata*'ya karşı daha düşük etkinlik gözlemlenmiştir. Yine Koak ve ark. (2011), aşırı olgunlaşmış meyvelerin proteaz değerlerini tespit etmişlerdir. Kivi en yüksek proteaz aktivitesini (921.08 birim) ve üzüm orta aktiviteyi (225.86 birim) gösterirken, armut ve elma daha düşük değerler (sırasıyla 97.75 ve 78.29 birim) göstermiştir. İki hafta sonra, aşırı olgunlaşmış tüm meyvelerin proteaz aktivitesi yaklaşık %16.9 artmış ve maksimum proteaz aktivitesi meyve özüne bağlı olarak 50–60° C sıcaklık aralığında ortaya çıkmıştır. Zhan ve ark. (2013), fungal patojenlerden salgılanan proteaz

enziminin *in vitro* şartlarda ortamın içeriğine, sıcaklık ve pH değerlerine göre değişiklik gösterebileceğini ifade etmiştir.

Melanin değerlerinde de artış gözlemlenmiştir. Glukoz ve vitamin C içeren ortamların fungus için daha fazla melanin sentezine yol açtığı görülmüştür. Bunu da ortamdaki şekerlerin de melanin gibi karbonhidrat olmasına bağlayabiliriz. Melanin üretiminde otoklav ve su banyosu arasında önemli bir fark olmadığı tespit edilmiştir. Her üç ortamda da lakkaz aktivitesine rastlanmamıştır. Nagai ve ark. (2003), melaninin sentezinde lakkaz enziminin bir rolü olduğunu bildirmişlerdir. Yine Galhaup ve ark. (2002), *Trametes pubescens* tarafından lakkaz oluşumu ancak glukozun kültür ortamından tamamen tüketildiğinde başladığını bildirmişlerdir. Dolayısı ile ortamın zengin şeker içeriğine sahip olması lakkaz enziminin üretilmesine fırsat vermediği öngörülmüştür.

Hem şeker hem de vitamin içeren ortamlarda MDA değerlerinin önemsiz olduğu saptanmıştır. Xylia ve ark. (2021), elmada *P. expansum*'a karşı *in vitro* koşullarda okaliptüs ve biberiye uçucu maddelerinin etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Yapılan çalışma sonucunda işlem görmemiş meyvelerin MDA değerleri işlem gören meyvelere kıyasla daha düşük çıkmıştır. Bu da *P. expansumun* uçucu maddelere karşı stres oluşturduğunu ve MDA değerinin bir stres faktörü olduğunu göstermektedir. Ancak bizim çalışmamızda fungusun değil ortamın stres şartları gözlemlenmiş ve bunun sonucunda da her üç ortam içeriğinin de stres oluşturmadığı tespit edilmiştir.

# 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Bitki hastalıkları küresel anlamda ürün verimini ve kaliteyi kısıtlayan önemli faktörlerden biridir. Yaklaşık üretimin %30 nun kaybına yol açmaktadır. Bir diğer yandan nüfüs artışı ve üretim artışının arzu edilen düzeyde bulunmaması nedeni ile bu yüzyılın ortalarına doğru üretim alanındaki baskı daha da artacak gibi görünüyor. Bitkisel üretim alanındaki kayıplar ile ilgili çalışmaların büyük çoğunluğu vejatatif dönem, çiçeklenme ve meyve aşamasını konu almaktadır. Ancak bu aşamaya kadar gelen kayıpların bir bu kadarı da hasat sonrası muhafaza, depolama ve nakletme aşamasında meydana gelmektedir. Hasat sonrası patojenler, hasat öncesi dönemde hastalık yapan patojenler ile hemen hemen aynı davranışı sergilemekte hasat sonrası konukçu sebze ve meyvelerin içeriği patojen mikroorganizmaların davranışını etkilemektedir. Patojen veya saprofit patojen mikroorganizmaların davranışında ortamın etkisinin olduğu bilindiğinden meyve veya sebze içinde besin ve şeker içeriğine bağlı olarak görülecek değişikliklerin *in vitro* koşullarda simule edilmesi ile patojenin davranış şekli daha iyi anlaşılmış olacak ve mücadele imkanı yanında ıslah çalışmalarınının da patojenin tercih etmeyeceği şekilde yapılması büyük önem arz etmektedir.

Mikroorganizmaların, özellikle fungal mikroorganizmaların, enerji kaynağı olarak karbonu kullandığı bilinmektedir. Karbon kaynağının konsantrasyonunun fungal gelişimi nasıl etkilediği de bilinmelidir. Ancak yüksek karbon kaynağının hatta kompleks karbon kaynağının tahmin edilenin aksine fungusun ortama verdiği protein, enzim ve stres metabolitelerinin üretimini doğrusal olarak etkilememiş, hatta belli bir seviyeden sonra düşmesine neden olmuştur. Burada karbon kaynağı olarak glukozun daha etkili olduğu belirlenmiş, bu durumun basit karbon kaynağını fungal etmenin daha çabuk ve etkili şekilde metabolize ettiği şeklinde yorumlanmıştır. Burada dikkat edilmesi gereken husus, şekerlerin meyve ve bitkilerde *in vitro* çalışmada gösterildiği gibi depolandığı bilindiğinden patojenin sporulasyonunda ve virulensinde önemli rol oynadığı görülmektedir. Ortamdaki şeker ve vitamin konsantrasyonları arttıkça

fungusun gelişme hızı artmış ve buna bağlı olarak misel ağırlığında artış meydana gelmiştir. Şeker ve vitamin konsantrasyonları arttıkça ortamın pH değerinde düşüş görülmüş ve asidik ortamda fungus daha iyi gelişmiştir. Bu durum fungal etmenin virulensliğini de potansiyel olarak etkileyecek güce sahiptir.

Meyveler hasat edildikten sonra, şeker içeriği yaklaşık 100 gün sonra yeniden ölçülmüş olup; 100. günde şeker oranının %8.64, ve 128. günde ise %10.65 arttığı belirlenmiştir (Kvikliene, 2006). Dolayısı ile yüksek şeker içeren meyvelerin patojen saldırısına ve virulensine açık olduğu görülmekte olup, ıslah çalışmalarında bu durumun göz ardı edilmemesi gerekmektedir. Ayrıca hasat sonrası depolanan meyvelerin uzun süre bekletilmemesi de patojen saldırısı açısından oldukça önemlidir.

## KAYNAKLAR


ACQUAVIA, M.A., PASCALE, R., FOTI, L., CARLUCCI, G., SCRANO, L., MARTELLI, G., BRIENZA, M., COVIELLO, D., BIANCO, G., and LELARIO, F., 2021. Analytical Methods for Extraction and Identification of Primary And Secondary Metabolites Of Apple (*Malus domestica*) Fruits: A Review. Separations, 8(7):91

AGHDAM, M.S., JANNATIZADEH, A., LUO, Z., and PALIYATH, G., 2018. Ensuring Sufficient İntracellular ATP Supplying And Friendly Extracellular ATP Signaling Attenuates Stresses, Delays Senescence And Maintains Quality İn Horticultural Crops During Postharvest Life. Trends İn Food Science And Technology, 76, 67– 81.

ASENSI-FABADO, M.A., and MUNNÉ-BOSCH, S., 2010. Vitamins İn Plants: Occurrence, Biosynthesis And Antioxidant Function. Trends İn Plant Science, 15(10), 582-592.

BAI, Q., HUANG, Y., and SHEN, Y., 2020. The Physiological And Molecular Mechanism Of Abscisic Acid İn Regulation Of Fleshy Fruit Ripening. Frontiers İn Plant Science, 11, 2153.

BANANI, H., SPADARO, D., ZHANG, D., MATIC, S., GARIBALDI, A., and GULLINO, M. L., 2014. Biocontrol Activity Of An Alkaline Serine Protease From Aureobasidium Pullulans Expressed İn Pichia Pastoris Against Four Postharvest Pathogens On Apple. International Journal Of Food Microbiology, 182, 1-8.

BARAD, S., ESPESO, E.A., SHERMAN, A. and PRUSKY, D., 2016. Ammonia Activates Pacc And Patulin Accumulation İn An Acidic Environment During Apple Colonization By *Penicillium expansum*. Mol. Plant Pathol. 17, 727–740.

BARALDI, E., CHIERICI, M.E., PONDRELLI, M., BERTOLINI, P., PRATELLA, G.C., 2003. Studies On Thiabendazole Resistance Of *Penicillium expansum* Of Pears: Pathogenic Fitness And Genetic Characterization. Plant Pathol. 52: 362–370.

BARBORÁKOVÁ, Z., LABUDA, R., HÄUBL, G., and TANČİNOVÁ, D., 2021. Effect Of Glucose Concentration And Growth Conditions On The Fungal Biomass, Ph Of Media And Production Of Fumagillin By A Non-Pathogenic Strain *Penicillium scabrosum*. Journal Of Microbiology, Biotechnology And Food Sciences, 2021, 466-477.

BATES, L.S., WALDREN, R.P. and TEARE, I.D., 1973. Rapid Determination of Free Proline For Water Stress Studies. Plant Soil. 39:205–207.

BOND, J. S., 2019. Proteases: History, Discovery, And Roles İn Health And Disease. Journal Of Biological Chemistry, 294(5), 1643-1651.

BRADFORD, M.M., 1976. A Rapid And Sensitive Method For The Quantitation Of Microgram Quantities Of Protein Utilizing The Principle Of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72(1-2), 248-254.

CHAO, C.H., WU, H.J., and LU, M.K., 2011. Promotion Of Fungal Growth And Underlying Physiochemical Changes Of Polysaccharides İn Rigidoporus

Ulmarius, An Edible *Basidiomycete mushroom*. Carbohydrate polymers, 85(3), 609-614.

CHEN, Z., YU, L., LIU, W., ZHANG, J., WANG, N., and CHEN, X., 2021. Research Progress Of Fruit Color Development İn Apple (*Malus Domestica* Borkh.). Plant Physiology And Biochemistry.

ÇAPA, B., DİKİLİTAŞ, M., 2021. Elma Maviküf (*Penicillium expansum*) Hastalık Etmeninin Glukoz, Sukroz ve Vitamin C'ye Karşı Duyarlılıklarının Belirlenmesi. 4th International Congress On Agriculture, Environment And Health, 20-22 May 2021, Aydın, 26s.

DAVEY, M.W., AUWERKERKEN A., KEULEMANS J., 2007. Relationship of Apple Vitamin C And Antioxidant Contents To Harvest Date And Postharvest Pathogen İnfection. Journal of the Science of Food and Agriculture. 87:802–813.

DECKER, D., and KLECZKOWSKİ, L. A., 2019. UDP-Sugar Producing Pyrophosphorylases: Distinct And Essential Enzymes With Overlapping Substrate Specificities, Providing De Novo Precursors For Glycosylation Reactions. Frontiers in Plant Science, 9, 1822.

DİKİLİTAS, M., OĞUZ, A.Ç., and KARAKAYA, A., 2018. Extracellular Protease Activity And Glucose Production İn İsolates Of Net Blotch Pathogens Differing İn Virulence. Zemdirbyste-Agriculture, 105(1).

DİKİLİTAŞ, M., OĞUZ, A.Ç. AND KARAKAYA, A., 2018. Extracellular Protease Activity And Glucose Production İn İsolates Of Net Blotch Pathogens Differing İn Virülence. Zemdirbysite-Agriculture,105(1): 89-94.

DOLATABADIAN, A., SANAVY, S.M., and CHASHMI, N. A., 2008. The Effects Of Foliar Application Of Ascorbic Acid (Vitamin C) On Antioxidant Enzymes Activities, Lipid Peroxidation And Proline Accumulation Of Canola (*Brassica napus* L.) Under Conditions Of Salt Stress. Journal Of Agronomy And Crop Science, 194(3), 206-213.

DUAN, N., BAI, Y., SUN, H., WANG, N., MA, Y., LI, M., and CHEN, X., 2017. Genome Re-Sequencing Reveals The History Of Apple And Supports A Two-Stage Model For Fruit Enlargement. Nature Communications, 8(1), 1-11.

DUKARE, A.S., PAUL, S., NAMBI, V.E., GUPTA, R.K., SINGH, R., SHARMA, K., and VISHWAKARMA, R. K., 2019. Exploitation Of Microbial Antagonists For The Control Of Postharvest Diseases Of Fruits: A Review. Critical Reviews İn Food Science And Nutrition 59 (9):1498–513.

EISENMAN, H.C., GREER, E. M., and M.C., GRAIL, C.W., 2020. The Role Of Melanins İn Melanotic Fungi For Pathogenesis And Environmental Survival. Applied Microbiology And Biotechnology, 104(10), 4247-4257.

ESTEBAN, R., OLANO, J.M., CASTRESANA, J., FERNÁNDEZ-MARIN, B., HERNÁNDEZ, A., BECERRIL, J.M., and GARCIA-PLAZAOLA, J.I., 2009. Distribution And Evolutionary Trends Of Photoprotective İsoprenoids (Xanthophylls And Tocopherols) Within The Plant Kingdom. *Physiologia plantarum*, 135(4), 379-389.

FARINATI, S., RASORI, A., VAROTTO, S., and BONGHI, C., 2017. Rosaceae Fruit Development, Ripening And Post-Harvest: An Epigenetic Perspective. Frontiers İn Plant Science, 8, 1247.

GADD, G.M., 1982. Effect Of Media Composition And Light On Colony Differentation And Melanin Synthesis İn Microdochium Bollei. Trans. Br. Mycol. Soc., 78:115122.

GALHAUP, C., WAGNER, H., HINTERSTOISSER, B., and HALTRICH, D., 2002. Increased Production Of Laccase By The Wood-Degrading Basidiomycete Trametes Pubescens. Enzyme And Microbial Technology, 30(4), 529-536.

GIRARD C., MICHAUD D., 2002. Direct Monitoring Of Extracellular Protease Activities İn Microbial Cultures. Analytical Biochemistry, 38: 388-391.

GONÇALVES, B. L., COPPA, C.F.S.C., NEEFF, D.V.D., CORASSIN, C.H., and OLIVEIRA, C.A.F., 2019. Mycotoxins İn Fruits And Fruit-Based Products: Occurrence And Methods For Decontamination. Toxin Reviews, 38(4), 263-272.

GONG, D., BI, Y., JIANG, H., XUE, S., WANG, Z., LI, Y., and PRUSKY, D., 2019. A Comparison Of Postharvest Physiology, Quality And Volatile Compounds Of 'Fuji'and 'Delicious' Apples İnoculated With *Penicillium expansum*. Postharvest Biology And Technology, 150, 95-104.

HUANG, X., REN, J., LI, P., FENG, S., DONG, P., and REN, M., 2021. Potential Of Microbial Endophytes To Enhance The Resistance To Postharvest Diseases Of Fruit And Vegetables. Journal Of The Science Of Food And Agriculture, 101(5), 1744-1757.

JANICK, J., CUMMINS, J.N., BROWN, S.K., HEMMAT, M., 1996. Apples. In: Janick, J., Moore, J.N. (Eds.), Fruit Breeding, Volume I: Tree and Tropical Fruits, vol. I. John Wiley and sons, Inc., New York, NY, p. 632.

JANISIEWICZ, W.J., SAFTNER, R.A., CONWAY, W.S., FORSLINE, P.L., 2008. Preliminary Evaluation Of Apple Germplasm From Kazakhstan For Resistance To Postharvest Blue Mold İn Fruit Caused By *Penicillium expansum*. Hortic. Rev. (Am. Soc. Horticult. Sci.) 43:420–426.

JIA, H., WANG, Y., SUN, M., LI, B., HAN, Y., ZHAO, Y., and JIA, W., 2013. Sucrose Functions As A Signal İnvolved İn The Regulation Of Strawberry Fruit Development And Ripening. New Phytologist, *198*(2), 453-465.

JIAO, W., LIU, X., LI, Y., LI, B., DU, Y., ZHANG, Z., and FU, M., 2021. Organic Acid, A Virulence Factor For Pathogenic Fungi, Causing Postharvest Decay İn Fruits. Molecular Plant Pathology.

KANGUEEHI, G.N., STASSEN, P.J.C., THERON, K.I., and WOOLDRIDGE, J., 2011. Macro And Micro Element Requirements of Young And Bearing Apple Trees Under Drip Fertigation, South African Journal of Plant and Soil, 28:2.

KARAKAŞ DİKİLİTAŞ, S., 2013. Farklı Tuz Seviyelerindeki Topraklarda Yetiştirilen Domatesin Gelişimi ve Bazı Fizyolojik Özellikleri İle Toprak 55 İyileştirilmesi Üzerine Arkadaş Bitkilerin Etkileri. Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Şanlıurfa, 315s.

KILIÇ, G., 2019. Farklı Sıcaklık Değerlerinin *Penicillium expansum* Fungusunun Protein İçeriği Ve Proteaz Enzimi Üzerine Etkileri.Harran Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 62s.

KILIÇ, N., 2017. *Penicilium expansum* Fungusunun Farklı Nacı Ortamlarında Fizyolojik ve Biyokimyasal Parametrelerinin İncelenmesi. Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Şanlıurfa, 38s.

KOAK, J.H., KIM, H. S., CHOİ, Y.J., BAIK, M.Y., and KIM, B.Y., 2011. Characterization Of A Protease From Over-Matured Fruits And Development Of A Tenderizer Using An Optimization Technique. Food Science And Biotechnology, 20(2), 485-490.

KÖHL, J., WENNEKER, M., GROENENBOOM-DE HAAS, B.H., ANBERGEN, R., GOOSSEN-VAN DE GEİJN, H.M., LOMBAERS-VAN DER PLAS, C.H., PİNTO, F.A.M.F., KASTELEİN, P., 2018. Dynamics Of Post-harvest Pathogens Neofabraea Spp. And Cadophora Spp. İn Plant Residues İn Dutch Apple And Pear Orchards, Plant Pathol, 67 (2018), Pp. 1264-1277.

KUMAR, D., BARAD, S., CHEN, Y., LU, Y., TANNOU, J., DUBEY, A., MATANA, N.G., TIAN, S., LI, B., KELLER, N., and PRUSKY, D., 2017. Laea Regulation of Secondary Metabolism Modulates Virulence in *Penicillium expansum* And İs Mediated By Sucrose. Molecular Plant Pathology, 18(8), 1150–116.

KVILIENE, N., KVIKLYS, D., and VISKELIS, P., 2006. Changes İn Fruit Quality During Ripening And Storage İn The Apple Cultivarauksis'. Journal Of Fruit And Ornamental Plant Research, 14, 195.

LEE, J.K., KIM, B. T., KIM, J.A., CHUNG, H. J., PARK, S.M., YANG, M.S., and KIM, D.H., 2007. Cultural Characteristics And Extraction Of The Fungal Pigment Phleichrome From The Phytopathogenic Fungus cladosporium Phlei. Biotechnology And Bioprocess Engineering, 12(5), 508-515.

LEMMENS, A., ALOSA, E., RYMENANTSA, E., STORMEA, N., KEULEMANSA, W., 2020. Dynamics Of Ascorbic Acid Content İn Apple (*Malus X Domestica*) During Fruit Development And Storage. Plant Of Physiology And Biochemistry, 151,47-59.

LI, B., CHEN, Y., ZHANG, Z., QIN, G., CHEN, T., and TIAN, S. 2020. Molecular Basis And Regulation Of Pathogenicity And Patulin Biosynthesis İn *Penicillium expansum*. Comprehensive Reviews İn Food Science And Food Safety, 19(6), 3416–3438.

LUCIANO-ROSARIO, D., KELLER, N. P., and JURICK, W. M. 2020. *Penicillium expansum*: Biology, Omics, And Management Tools For A Global Postharvest Pathogen Causing Blue Mould Of Pome Fruit. Molecular Plant Pathology, 21(11), 1391-1404.

MANJEET, K., DHILLON, S., CHAUDHARY, S. and SINGH R., 1998. Production, Purification And Characterization Of A Thermostable Alkaline Protease From Bacillus Polymyxa. Indian. J. Microbiol, 38: 63-67.

MAYER, A.M. and STAPLES, R.C., 2002. Laccese: New Functions For And Old Enzyme, Phytochemistry, 60:551-565.

MEGHNOUS, O., DEHİMAT, L., DOUMAS, P., KASSA-LAOUAR, M., MOSBAH, F., and RACHED, O., 2019. Oxidative And Antioxidative Responses To Antimony Stress By Endophytic Fungus *Aspergillus tubingensis* İsolated From Antimony Accumulator Hedysarum Pallidum Desf. Biologia, 74(12), 1711-1720.

MIKULIC-PETKOVSEK, M., SCHMITZER, V., SLATNAR, A., STAMPAR, F., and VEBERIC, R., 2012. Composition Of Sugars, Organic Acids, And Total Phenolics İn 25 Wild Or Cultivated Berry Species. Journal Of Food Science, 77(10), C1064–C1070.

MINUSS, R.C., MIRANDA, M.A., SILVA, J.A., FERREIRA, HIROSHI, AOYAMA, C.V., MARANGONI, S., ROTILIO, D., PASTORE, G.M. and DURAN, N., 2007. Purification, Characterization And Application Of Laccase From Trametes Versicolor For Colour And Phenolic Removal Of Olive Mill

Wastewater İn The Presence Of 1-Hydroxybenzotriazole, Afr. J. Biotechnol, 6: 1248-1254.

MITRA, P., CHAKRAVERTY, R. and CHANDRA, A., 1996. Production Of Proteolytic Enzymes By Solid State Fermentation. J Sci Ind Res 1996:55: 439-42.

MORE, E.E., RENUKA, P.S., PRUTHUİ, K., SWETHA, M., MALINI, S. and VEENA, S.M., 2011. Isolation, Purification And Characterization Of Fungal Laccese from Pleurotus sp. SAGE-Hindawi Access to Research Enzyme Research, Artivle. 31p.

MORKUNAS, I., NAROZNA, D., NOWAK, W., SAMARDAKIEWICZ, W., REMLEIN-STAROSTA, D., 2011. Cross-Talk İnteractions Of Sucrose And Fusarium Oxysporum İn The Phenylpropanoid Pathway And The Accumulation And Localization of Flavonoids in Embryo Axes of Yellow Lupine. J Plant Physiol 168:424–433.

MORKUNAS, I., RATAJCZAK, L., 2014. The Role of Sugar Signaling İn Plant Defense Responses Against Fungal Pathogens. Acta Physiol Plant. 36:1607–1619.

NAETS, M., VAN DAEL, M., VANSTREELS, E., DAELEMANS, D., VERBOVEN, P., NICOLAI, B., KEULEMANS, W., and GEERAERD, A., 2018. To Disinfect Or Not To Disinfect İn Postharvest Research On The Fungal Decay Of Apple. International Journal Of Food Microbiology, *266*, 190–199.

NAGAI, M., KAWATA, M., WATANABE, H., OGAWA, M., SAITO, K., TAKESAWA, T., and SATO, T., 2003. Important Role Of Fungal İntracellular Laccase For Melanin Synthesis: Purification And Characterization Of An İntracellular Laccase From Lentinula Edodes Fruit Bodies. Microbiology, 149(9), 2455-2462.

NARAYANASAMY, P., 2006. Biocontrol Agents For Disease Management. In: Narayanasamy, P. (Ed.), Postharvest Pathogens And Disease Management. John Wiley and Sons, Hoboken, 282–291.

NASSARAWA, S.S., ABDELSHAFY A.M., XU, Y., LI, L., and LUO, Z., 2021. Effect Of Light-Emitting Diodes (Leds) on The Quality Of Fruits And Vegetables During Postharvest Period: a Review. Food and Bioprocess Technology, 14:388–414.

PALOU, L., SMILANICK, J. L., and CRISOSTO, C. H., 2009. Evaluation Of Food Additives As Alternative Or Complementary Chemicals To Conventional Fungicides For The Control Of Major Postharvest Diseases Of Stone Fruit. Journal Of Food Protection, 72(5), 1037-1046.

PATRIARCA, A., 2019. Fungi And Mycotoxin Problems İn The Apple İndustry. Current Opinion İn Food Science, 29, 42-47.

PINE-BORDONABA, J., ECHEVERRIA, G., DUAIGUES, E., BOBO, G., and LARRIGAUDIERE, C., 2019. A Comprehensive Study On The Main Physiological And Biochemical Changes Occurring During Growth And On-Tree Ripening Of Two Apple Varieties With Different Postharvest Behaviour. Plant Physiology And Biochemistry: PPB, 135, 601–610.

PITT, J.I., and HOCKING, A.D., 2000. Fungi And Food Spoilage Vol. II, ed. Pitt, J. I. And Hocking, A.D. London. Blackie Academic And Professional, 15-45.

PINELA, J., BARROS, L., CARVALHO, A. M., and FERREIRA, I. C., 2012. Nutritional Composition And Antioxidant Activity Of Four Tomato

(*Lycopersicon Esculentum* L.) Farmer'varieties İn Northeastern Portugal Homegardens. Food And Chemical Toxicology, 50(3-4), 829-834.

PRUSKY, D.B., BI, F., MORAL, J., and BARAD, S., 2016. How Does Host Carbon Concentration Modulate The Lifestyle Of Postharvest Pathogens During Colonization? Front Plant Sci 7: 1306.

RAO, M.B., TANKSALE, A.M., GHATGE, M.S. and DESHPANDE, V.V., 1998. Molecular And Biotechnological Aspects Of Microbial Proteases. Microbiology And Molecular Biology, 62:597-635.

ROJE, S., 2007. Vitamin B biosynthesis in plants. Phytochemistry, 68(14), 1904-1921.

ROSA, L.H., VIEIRA, L.M.A., SANTIAGO I.F., ROSA, C.A., 2010. Endophytic Fungi Community Associated With The Dicotyledonous Plant Colobanthus Quitensis (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) İn. FEMS Microbiol Ecol 73:178–189.

SAIRAM, R. K. and SAXENA, D. C., 2000. Oxidative Stress And Antioxidants in Wheat Genotypes: Possible Mechanism of Water Stress Tolerance. Journal of Agronomy And Crop Science, 184(1):55-61.

SANSAVINI, S., DONATI, F., COSTA, F., TARTARINI, S., 2004. Advances İn Apple Breeding For Enhanced Fruit Quality And Resistance To Biotic Stresses: New Varieties For The European Market. J. Fruit Ornamental Plant Res. 12:13–52.

SINGH, D., and GUPTA, N., 2020. Microbial Laccase: A Robust Enzyme And İts İndustrial Applications. Biologia, 75(8), 1183-1193.

SLAVIN, JL., and LLOYD, B., 2012. Health Benefits Of Fruits And Vegetables. Advancesin Nutrition3,506–516.

SMIRNOFF, N., and WHEELER, G. L., 2000. Ascorbic Acid İn Plants: Biosynthesis And Function. Critical Reviews İn Plant Sciences, 19(4), 267-290.

SPENGLER, R. N., 2019. Origins Of The Apple: The Role Of Megafaunal Mutualism in The Domestication Of Malus And Rosaceous Trees. Frontiers İn Plant Science, 10, 617.

SPOTTS, R.A., CERVANTES, L.A., MIELKE, E.A., 1999. Viability İn Postharvest Decay Among Apple Cultivars. Am. Phytopatol. Soc. 83:1051–1054.

TANNOUS, J., D. KUMAR, N. SELA, E. SIONOV, D. PRUSKY, and N. P. KELLER. 2018. Fungal Attack And Host Defence Pathways Unveiled İn Near-Avirulent İnteractions Of *Penicillium expansum* Crea Mutants On Apples. Molecular Plant Pathology 19 (12):2635–50.

TOUHAMI, N., SOUKUP, S. T., SCHMIDT-HEYDT, M., KULLING, S. E., and GEİSEN, R., 2018. Citrinin As An Accessory Establishment Factor Ofp.Expansum For The Colonization Of Apples.Internationaljournal Of Food Microbiology, 266, 224–233.

TÜIK, 2020. (www.tuik.com.tr.)

VELASCO, R., ZHARKIKH, A., AFFOURTIT, J., DHINGRA, A., CESTARO, A., KALYANARAMAN, A., and VIOLA, R., 2010. The Genome Of The Domesticated Apple (*Malus*× *Domestica* Borkh.). Nature Genetics, 42(10), 833-839.

VIDAL, A., OUHIBI, S., GHALI, R., HEDHILI, A., DE SAEGER, S., and DE BOEVRE, M. 2019. The Mycotoxin Patulin: An Updated Short Review On

Occurrence, Toxicity And Analytical Challenges. Food And Chemical Toxicology, 129, 249-256.

VILANOVA, L., I. VINAS, R. TORRES, J. USALL, G. BURON-MOLES, and N. TEIXIDO. 2014. Acidification Of Apple And Orange Hosts By *Penicillium digitatum* And *Penicillium expansum*. International Journal Of Food Microbiology 178:39–49.

WANG, K., NGEA, G. L. N., GODANA, E. A., SHI, Y., LANHUANG, B., ZHANG, X., and ZHANG, H., 2021. Recent Advances İn *Penicillium expansum* Infection Mechanisms And Current Methods İn Controlling P. Expansum İn Postharvest Apples. Critical Reviews İn Food Science And Nutrition, 1-14.

WANG, X., LU, D., and TİAN, C., 2021. Analysis Of Melanin Biosynthesis İn The Plant Pathogenic Fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. Fungal Biology.

XYLIA, P., CHRYSARGYRİS, A., AHMED, Z. F., and TZORTZAKIS, N., 2021. Application Of Rosemary And Eucalyptus Essential Oils And Their Main Component On The Preservation Of Apple And Pear Fruits. Horticulturae, 7(11), 479.

ZEBELJAN, A., VICOA, I., DUDUKA, N., ZIBERNAB, B., KRAJNC, A.U., 2019. Dynamic Changes İn Common Metabolites And Antioxidants During *Penicillium expansum*-Apple Fruit İnteractions. Physiological and Molecular Plant Pathology, 106:166-174.

ZHAN, J. and MCDONALD, B. A. 2013. Experimental Measures Of Pathogen Competition And Relative Fitness. Annu. Rev. Phytopathol, 51:131-153.

ZHANG, M., WU, F., WII, Z., XIAO, Y. and GONG, W., 2006. Characterization And Decolorization Ability Of A Laccase From Panus Rudis, Enzyme Microbial Technol, 39:92-97.

ZHAO, W., MENG, H., SHI, J., LIU, Y., YANG, Y., LI, L., and WU, G., 2021. Heterologous Expression Of The Peach Sucrose Transporter (Ppsut2) İn İncreased Cold And Drought Stress Tolerance İn Tobacco. The Journal Of Horticultural Science And Biotechnology, 1-13.

ZHDANOVA, N.N., ZAKHARCHENKO, V.A., VEMBER, V.A., NAKONECHNAYA, L.T., 2000. Fungi From Chernobyl: Mycobiota Of The İnner Regions Of The Containment Structures Of The Damaged Nuclear Reactor. Mycology Research 104:1421–1426.

ZHOU, Y., HONG-BO, S., and CHEN, D., 2009. Effects Of Organic Nitrogen And Carbon Sources On Mycelial Growth And Polysaccharides Production And Their Optimization İn The Submerged Culture Of Grifola Umbellate, A Chinese Medicinal Herb. African Journal Of Biotechnology, 8(20).

ZIV, C., KUMAR, D., SELA, N., ITKIN, M., MALITSKY, S., SCHAFFER, A. A., and PRUSKY, D. B., 2020. Sugar-Regulated Susceptibility Of Tomato Fruit To *Colletotrichum* And *Penicillium* Requires Differential Mechanisms Of Pathogenicity And Fruit Responses. Environmental Microbiology, 22(7), 2870–2891.