



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



İZMİR KARABURUN YARIMADASINA ÖZGÜ HURMA ZEYTİNLERDEN İZOLE EDİLEN ENDOFİT FUNGAL TÜRLERİN SAPTANMASI

Yüksek Lisans Tezi

Şenay ŞENTÜRK

Biyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**İZMİR KARABURUN YARIMADASINA ÖZGÜ
HURMA ZEYTİNLERDEN İZOLE EDİLEN ENDOFİT
FUNGAL TÜRLERİN SAPTANMASI**

Şenay ŞENTÜRK

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı

İZMİR
2019

Şenay ŞENTÜRK tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “İzmir Karaburun Yarımadasına Özgü Hurma Zeytinlerden İzole Edilen Endofit Fungal Türlerin Saptanması” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 15.03.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

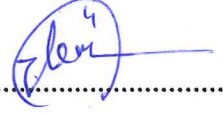
Jüri Üyeleri:

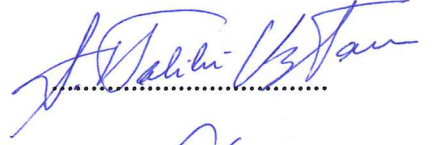
İmza

Jüri Başkanı : Doç. Dr.Özlem ABACI GÜNYAR

Raportör Üye : Prof. Dr. Alev HALİKİ UZTAN

Üye : Doç. Dr. Fatih KALYONCU







EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca **Yüksek Lisans Tezi** olarak sunduğum **“İzmir Karaburun Yarımadasına Özgü Hurma Zeytinlerden İzole Edilen Endofit Fungal Türlerin Saptanması”** başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

15 /03/2019

Şenay ŞENTÜRK

ÖZET

**İZMİR KARABURUN YARIMADASINA ÖZGÜ HURMA
ZEYTİNLERDEN İZOLE EDİLEN ENDOFİT FUNGAL TÜRLERİN
SAPTANMASI**

ŞENTÜRK, Şenay

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

Mart 2019, 123 sayfa

Hurma zeytin, dalında olgunlaştıktan sonra tüketiciye sunulan ve Türkiye’de sadece Karaburun Yarımadasında görülen bir zeytin türüdür. Zeytin taneleri ağaçta iken yörenin ekolojik koşullarının da yardımıyla kendiliğinden olgunlaşarak yenebilecek duruma gelir. Bu durumun bugüne dek zeytin henüz ağaç üzerinde iken taneleri infekte eden *Phoma oleae* ile gerçekleştiği vurgulanmıştır. Yaptığımız bu çalışmada zeytinlerin kabuklarının iç kısmından ve etli kısmından endofitik fungus izolasyonu yapılmış ve farklı fungal türler izole edilmiştir. Endofitler, bitkilerin canlı iç dokularında kolonize olan ve herhangi önemli bir semptoma neden olmadan yaşayan organizmalar olarak bilinmektedir. Çalışmamızda İzmir Karaburun Yarımadasından toplanan hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungusların fenotipik ve genotipik yöntemler ile tanısı yapılmıştır. Ayrıca karşılaştırma yapmak amacı ile diğer bölgelerden toplanan zeytin örneklerinden de endofitik fungus izolasyonu gerçekleştirilerek endofitik fungal türler belirlenmiştir. Yapılan fenotipik ve genotipik tanılama sonucunda Hurma zeytin örneklerinin izolatlarından belirlediğimiz türler; *Stemphylium vesicarium*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Dothiora oleae*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium chrysogenum* ve *Bartalinia* sp. olmuştur. Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinin izolatlarından belirlediğimiz türler ise *Alternaria alternata* ve *Cladosporium ramotenellum* olmuştur. Yapılan çalışmalarda da olduğu gibi çalışmamızda Hurma olan zeytin türlerinden izole edilen fungal türler Hurma olmayan diğer zeytin türlerine göre daha zengindir. Bu da bize Hurma zeytinlerdeki endofitik fungal türlerin çeşitliliğinin fazla olduğunu göstermektedir. Endofitik türler biyoteknolojik vb. olarakta önemlidir. Bizim

saptadığımız türler de biyoteknolojik olarak önemli ürünlerin potansiyel üreticisi olabilir. Çalışmamız bu anlamda gelecekte bu organizmalardan üretilecek ürünlerle ilgili çalışmalara ışık tutacaktır.

Anahtar Kelimeler: Endofitik fungi, Hurma zeytin, *Olea europaea*, Karaburun, İzmir



ABSTRACT**DETERMINATION OF ENDOPHYTE FUNGAL SPECIES FROM
HURMA OLIVES IN KARABURUN PENINSULA, IZMIR**

SENTURK, Senay

MSc in Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR

March 2019, 123 pages

Hurma olive is an olive species that is offered to consumers after ripening on the olive branch and seen only in Karaburun Peninsula in Turkey. While the olive grains are in the trees, they can be eaten by maturing with the help of the ecological conditions of the region. It has been emphasized that this situation has been carry out with *Phoma oleae*, which has infected the grains since it is still on the tree. In this study, endophytic fungus was isolated from the interior and the flesh of the olives and the different fungal species were isolated. Endophytes are known as living organisms that are colonized in the living internal tissues of plants and without causing any significant symptoms. In our study, endophytic fungi isolated from Hurma olive samples collected from Karaburun Peninsula in Izmir were identified with phenotypic and genotypic methods. In addition, endophytic fungus was isolated from olive samples collected from other regions for comparison and endophytic fungal species were determined. As a result of the phenotypic and genotypic identification, the species we identified from the isolates of Hurma olive samples; *Stemphylium vesicarium*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Dothiora oleae*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium chrysogenum* and *Bartalinia* sp. The species identified from the isolates of other non-Hurma olive samples were *Alternaria alternata* and *Cladosporium ramotenellum*. As in previous studies, the fungal species isolated from Hurma which is an olive species is more rich than the other non-Hurma olive species. This shows us that the variety of endophytic fungal species in Hurma olives is high. Endophytic species biotechnology etc. is also important. The species we have identified may be a potential producer of biotechnologically important products. In this sense, our

study will shed light on the works related to the products to be produced from these organisms in the future.

Key Words: Endophytic fungi, Hurma Olive, *Olea europaea*, Karaburun, Izmir



ÖNSÖZ

Çalışmamızda İzmir Karaburun Yarımadasından toplanan hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungusların fenotipik ve genetik yöntemler ile tanımlanması amaçlanmıştır. Ayrıca karşılaştırma yapmak amacı ile diğer bölgelerden toplanan zeytin örneklerinden de endofitik fungus izolasyonu gerçekleştirilerek endofitik fungal türler araştırılmıştır.

Endofitik türler biyoteknolojik vb. olarak önemlidir. Bizim saptadığımız türler de biyoteknolojik olarak önemli ürünlerin potansiyel üreticisi olabilir. Çalışmamız bu anlamda gelecekte bu organizmalardan üretilcek ürünlerle ilgili çalışmalara ışık tutacaktır.

Çalışma konusunun belirlenmesinde ve çalışmanın hazırlanma sürecinin her aşamasında bilgilerini ve tecrübelerini esirgemeyerek bana her fırsatta yardımcı olan danışman hocam Sayın Doç. Dr. Özlem ABACI GÜNYAR'a teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

15/03/2019

Şenay ŞENTÜRK



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	IX
ÖNSÖZ.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVII
TABLolar DİZİNİ.....	XXI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XXIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Zeytin (<i>Olea europaea</i>)	6
2.1.1. Zeytinin tanımı.....	6
2.1.2. Zeytinin coğrafi yeri	6
2.1.3. Zeytinin kullanıldığı alanlar ve önemi.....	8
2.1.4. Zeytinin fenolik bileşikleri	9
2.1.4.1. Fenolik madde	9
2.1.4.2. Oleuropeinin kimyası.....	15
2.1.5. Zeytinin gelişimi ve olgunlaşması	16
2.1.5.1. Olgunlaşma döneminde zeytindeki değişimler.....	17
2.1.5.2. Olgunlaşma sırasında enzimatik aktiviteler.....	19
2.1.6. Hurma zeytin	21
2.2. Endofitler	23
2.2.1. Fungal endofitler.....	24
2.2.2. Fungal endofitlerin önemi	24
2.2.3. Bitki-endofit etkileşimleri.....	26
2.2.3.1. Konak bitki faktörleri ve endofitik yaşam tarzı.....	26
2.2.3.2. Bitkisel bağışıklık sisteminin endofitlerle modülasyonu.....	28
2.2.3.3. Biyotik ve abiyotik streslere karşı direnç artışı	29
2.2.3.4. Bitkisel sekonder metabolitlerin üretiminde endofitlerin metabolomiji ve rolü.....	33

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3. MATERYAL VE METOD.....	35
3.1. Materyal.....	35
3.1.1. Çalışma materyalleri	35
3.1.2. Kullanılan besiyerleri	35
3.1.3. Tamponlar ve çözeltiler	39
3.1.3.1. Yüzey sterilizasyonunda kullanılan tamponlar ve çözeltiler	39
3.1.3.2. Fenotipik tanılamada kullanılan çözeltiler	39
3.1.3.3. DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar ve çözeltiler	40
3.1.3.4. PCR işleminde kullanılan tamponlar ve çözeltiler.....	42
3.1.3.5. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler.....	42
3.1.4. Kullanılan başlıca cihazlar	44
3.1.5. DNA izolasyon kiti	45
3.2. Metod.....	46
3.2.1. Örneklerin alımı ve laboratuvara getirilmesi	46
3.2.2. Zeytin örneklerinin yüzey sterilizasyon işlemi	46
3.2.3. Endofitik fungusların izolasyon işlemi	46
3.2.4. Endofitik fungusların saflaştırılması	47
3.2.5. Endofitik fungusların fenotipik tanınması	47
3.2.6. Endofitik fungusların genotipik tanınması.....	48
3.2.6.1. DNA izolasyon işlemi	48
3.2.6.2. Total DNA'ların agaroz jel elektroforezi.....	50
3.2.6.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	51
3.2.6.4. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi	53
3.2.6.5. DNA dizi analizi ve sonuçların değerlendirilmesi	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Genel Bulgular.....	54
4.1.1. Zeytinlerden endofitik fungusların izolasyon işlemleri	55
4.2. Zeytinlerden İzole Edilen Endofitik Fungus Türleri.....	56
4.2.1. Endofitik fungus türlerin istatistiksel verileri	59

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.3. Endofitik Fungus Türlerinin Fenotipik Tanısı	60
4.3.1. <i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	61
4.3.2. <i>Stemphylium vesicarium</i>	63
4.3.3. <i>Dothiora oleae</i>	64
4.3.4. <i>Rhizopus stolonifer</i>	65
4.3.5. <i>Penicillium chrysogenum</i>	67
4.3.6. <i>Bartalinia</i> sp.	70
4.3.7. <i>Alternaria alternata</i>	72
4.3.8. <i>Cladosporium ramotenellum</i>	74
4.4. Endofitik Fungus Türlerinin Genotipik Tanısı.....	76
4.4.1. ITS PCR sonuçlarının değerlendirilmesi	76
4.4.2. 28S PCR sonuçlarının değerlendirilmesi.....	78
4.5. Endofitik Fungus Türlerinin DNA Dizi Analizi Sonuçlarının	
Değerlendirilmesi.....	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	81
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	101
TEŞEKKÜR.....	122
ÖZGEÇMİŞ.....	123



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Dünyadaki zeytin üretim alanları.....	7
2.2 Ülkelerin sofralık zeytin üretim oranları	8
2.3 Oleuropeinin kimyasal yapısı	15
2.4 Dhokar meyvesi ekstraktlarında β -glukozidaz ve esteraz aktivitelerinin olgunlaşma aşamalarındaki oranları	20
2.5 Oleuropein ve türevleri, β -glukozidaz ve esteraz ile enzimatik hidrolizden sonrası.....	21
4.1 Hurma zeytinin enine kesiti	55
4.2 Hurma zeytinlerin kabuk içi ve etli kısım görüntüsü.....	56
4.3 Hurma zeytinlerden alınan kazıntı ve parçaların inkübasyonu sonucu PDA ortamındaki görüntüleri	56
4.4 <i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> , OA ve MEA besiyerleri görüntüleri .	62
4.5 <i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> , mikroskop görüntüleri.....	62
4.6 <i>Stemphylium vesicarium</i> , OA ve MEA besiyerleri görüntüler	63
4.7 <i>Stemphylium vesicarium</i> , mikroskop görüntüleri	63
4.8 <i>Dothiora oleae</i> , OA ve MEA besiyerleri görüntüleri.....	64
4.9 <i>Dothiora oleae</i> , mikroskop görüntüleri	64

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.10 <i>Rhizopus stolonifer</i> , MEA ve PDA25 besiyerleri görüntüleri	66
4.11 <i>Rhizopus stolonifer</i> , PDA37 besiyerleri görüntüleri	66
4.12 <i>Rhizopus stolonifer</i> , mikroskop görüntüleri.....	66
4.13 <i>Penicillium chrysogenum</i> , CYA25, CYA5, MEA, G25N, CSN ve CYA37 besiyerleri görüntüleri	68
4.14 <i>Penicillium chrysogenum</i> , CYA25, CYA5, MEA, G25N, CSN ve CYA37 besiyerleri görüntüleri (tersi)	69
4.15 <i>Penicillium chrysogenum</i> , mikroskop görüntüleri	69
4.16 <i>Bartalinia</i> sp., OA ve MEA besiyerleri görüntüleri.....	71
4.17 <i>Bartalinia</i> sp., mikroskop görüntüleri.....	71
4.18 <i>Alternaria alternata</i> , PDA ve MEA besiyerleri görüntüleri	73
4.19 <i>Alternaria alternata</i> , mikroskop görüntüleri	73
4.20 <i>Cladosporium ramotenellum</i> , PDA, MEA ve OA besiyerleri görüntüleri	75
4.21 <i>Cladosporium ramotenellum</i> , mikroskop görüntüleri.....	76
4.22 Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin ITS PCR jel görüntüsü	77
4.23 Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin ITS PCR jel görüntüsü (devam).....	77

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

4.24 Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin ITS PCR jel görüntüsü..... 77

4.25 Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin 28S PCR jel görüntüsü 78

4.26 Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin 28S PCR jel görüntüsü (devam) 78

4.27 Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin 28S PCR jel görüntüsü..... 79



TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Zeytin fenolikleri	11
2.2 Zeytin yaprağındaki önemli fenolik bileşenlerin konsantrasyonları	12
2.3 Natürel sızma zeytinyağındaki önemli fenolik bileşiklerin konsantrasyonları	12
2.4 Oleuropeinin biyolojik aktiviteleri ve etkileri	16
3.1 ITS PCR mix tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları	51
3.2 Amplifikasyonun sağlandığı ITS- PCR koşulları	52
3.3 28S PCR mix tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları	52
3.4 Amplifikasyonun sağlandığı 28S PCR koşulları	53
4.1 Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus sayıları.....	54
4.2 Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus sayıları.....	55
4.3 Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türleri.....	57
4.4 Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türleri.....	58

TABLÖLAR DİZİNİ (devam)TabloSayfa

4.5 Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin DNA dizi analizi sonuçları	79
4.6 Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin DNA dizi analizi sonuçları.....	80



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu

NCBI : National Center of Biotechnology Information

PDA : Potato Dextrose Agar

CYA : Czapek Yeast Agar

MEA : Malt Extract Agar

CZ : Czapek Dox Agar

G25N : %25 Glycerol Nitruate Agar

CSN : Nötral Kreatin Sukroz Agar

OA : Oatmeal Agar

TBE : Tris Borik Asit Edta

ITS : Internal Transcribed Spacer

LSU : Large Subunit

dNTP : Deoksinükleotidtrifosfat

UV : Ultraviyole



1. GİRİŞ

Dünyanın bilinen en eski meyve ağacı olan zeytin ağacı (*Olea europaea*, L.) varlığının % 98'i, Türkiye'nin de içinde bulunduğu Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yer alır. Bu ağacın meyvesi olan zeytinden elde edilen zeytin yağı ve sofralık zeytin de Akdeniz diyetinin temel unsurlarını oluşturur (Mora et al., 2007). Sofralık zeytin, içerdiği doğal fenolik bileşikler dolayısıyla yüksek antioksidan etkiye sahiptir (Marsilio et al., 2000; Bianchi, 2003).

Zeytin meyvesi; belli aşamalardan geçerek sofralık zeytin veya zeytinyağı gibi gıda maddeleri olarak kullanılabilirdiği gibi ilaç sanayi, kozmetik ve hayvan beslenmesinde de kullanılabilir. Zeytin yaprağının ilk olarak Eski Mısır'da ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir. Yüzyıllardır yetiştirilen zeytin ağacının sağlığa yararlı etkileri son zamanlarda yapılan araştırmalarla daha da aydınlatılmaktadır (Durlu-Özkaya ve Özkaya, 2011; Ünlüel ve Aydın, 2016).

Zeytin meyvesi yüksek miktarda fenolik bileşik içermektedir. Son yıllarda, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, sağlık ve duyuşal özellikleri nedeniyle zeytin fenoliklerine ilgi daha da artmaktadır. Fenolik bileşikler, beslenme özelliklerini, duyuşal özelliklerini ve zeytinyağının raf ömrünü düzenlemektedir. Bu bileşikler, anti-enflamatuar, anti-alerjik, antimikrobiyal, kanserojen ve antiviral aktivitelerinden dolayı insan sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Aktaş, 2013). Oleuropein, zeytin meyvesinin pulpa kısmında bulunan ana fenolik bileşiktir. Bu bileşik, zeytin meyvesinin doğrudan tüketilmesini engelleyen acı tattan sorumludur. Bu nedenle, zeytinde çeşitli işlemlerin uygulanmasıyla oleuropein meyveden uzaklaştırılmalıdır. Sofralık zeytinlerin işlenmesinde ve işlenmiş zeytinlerin korunmasında tuz yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu, diyetlerinde tuz alımını düzenlemeye ihtiyaç duyan bireyler için özellikle çok önemli bir durumdur (Vinha et al., 2005; Jemai et al., 2009; Ramirez et al., 2014).

Karaburun Yarımadası'nda Erkence zeytin çeşidinin (*Olea europaea* L.) meyvelerinin ağaç üzerindeyken acılıklarının kaybolarak yenabilir hale gelmeleri sonucu oluşan zeytin meyvesine "Hurma" zeytin denmektedir. Hurma zeytinin

bu olgunlaşma süreci ise ‘‘Hurmalaşma’’ olarak ifade edilmektedir. Bu işlemin sonunda, zeytin hala ağaçta iken acı tadını kaybeder ve içeride koyu kahverengimsi bir renge ve buruşuk bir dış tabakaya sahip olup, bu işleme girmeyen diğer zeytinlerden farklı fiziksel özellikleri göstermektedir. Hurma zeytin diğer çeşit zeytinlerden fenolik bileşiklerin özellikle oleuropeinin sebep olduğu acılığı, dalında olgunlaşması sırasında kaybetmesi ile ayrılır. Böylece hasat edildiğinde herhangi bir acılık giderme işlemine gerek duymadan doğrudan tüketilebilir. Bu nedenle, hipertansiyon gibi sağlık sorunları olan tüketiciler, bu zeytin türünü daha yüksek tuz içeriğine sahip olan sofralık zeytin yerine tercih etmektedirler (Aktaş vd., 2014).

Susamcı vd., 2017 yılında yaptıkları çalışmada, Hurma zeytinlerinde fenolik bileşiklerin konsantrasyonunun, özellikle de oleuropeinin, Erkence zeytin meyvesine kıyasla daha düşük olduğunu doğrulamıştır. Oleuropein aglikon, hidrokşitirozol glukozitler ve geri kalan fenolik bileşiklerin içerikleri de Hurma zeytinlerde Erkence zeytinlerine göre çok daha düşüktür (Susamcı vd., 2017).

Endofitik fungusların yaşam döngüsünün bir bölümünde bitkilerin içinde yaşadığı ve konukçularına zarar vermediği bilinmektedir. Her ne kadar yapılan endofitik fungus çalışmaları ılıman iklim bitki türleri üzerinde gerçekleştirilmiş olsa da, bazı çalışmalar tropikal bitki türlerinin daha büyük bir fungal biyolojik çeşitliliğine ev sahipliği yaptığını göstermiştir (Boerema et al., 2004; Ferraro et al., 2008; Sia et al., 2013).

Fungal endofitler; bitki büyüme hormonları, enzimler ve sideroforlar üreterek konakçılara yardımcı olmada önemli roller oynayabilir ve bitki hastalıklarına ve böcek zararlılarına karşı etkili olabilirler (Arnold et al., 2003; Berg et al., 2014; Materatski et al., 2019). Bir milyon kadar farklı endofit türü olabileceği tahmin edilmektedir, ancak bunlardan sadece birkaçı tanımlanmıştır, bu, endofitlerin metabolitlerinin araştırılmasının, yeni antimikrobiyal doğal ürünler bulma şansını artırabileceği anlamına gelmektedir. Şimdiye kadar yapılan araştırmalar da, büyük bir kısmı antimikrobiyal aktiviteler göstermiş yüzlerce biyoaktif doğal ürünün endofitlerden izole edildiğini bildirmiştir (Yu et al., 2010).

Akdeniz Havzası, önemli ekolojik ve sosyo ekonomik öneme sahip kuraklığa dayanıklı bir ürün olan zeytin ağacının (*Olea europaea*) yetiştirilmesi açısından dünya çapında üne sahiptir. Endofit olarak içerdikleri funguslar ile ilgili çalışmalar çok sınırlıdır (Martins et al., 2016; Malhadas et al., 2017).

Yapılan çalışmalar zeytinden izole edilmiş zengin bir mikrobiyotanın potansiyelini göstermektedir, bu da zeytinlerin farklı sektörlerde biyoteknoloji ve enzim üretiminde avantaj sağlamak için kullanılabileceğini düşündürmektedir. Tanımlanan türler ve enzimleri, sadece zeytinyağı endüstrisinde değil, biyolojik dönüşüm ve tarımsal yan ürünlerin kullanımı için biyoteknolojik süreçleri kullanan diğer endüstrilerde de kullanılabilir (Baffi et al., 2012).

Sadece İzmir’ in Karaburun Yarımadasında yetişen Hurma zeytin meyveleri daha dalında iken toplanarak tüketilebilmektedir. Bu şekilde acılığın giderilmesi için uygulanan endüstriyel acılık giderme yöntemlerine ihtiyaç kalmamaktadır. Sağlık için uygunluğunun yanı sıra ekonomik olarakta önem arz etmektedir (Aktaş, 2013).

Bu zeytin tipi için yıllarca *Phoma oleae* isimli bir fungusun, zeytine acı tadı veren fenolik glikozid oleuropeinin hidrolizinde etkili olduğu belirtilmiştir (Panagou, 2006). Uluslararası yayınlarda hurmalaşmaya etken olan *Phoma fallens* ve *Phoma insulana*’nın zeytinlerde olgunlaşmaya neden olduğu belirtilmektedir. Bunun dışında Aktaş 2013 yılında Hurma zeytinin mikrobiyolojik karakterizasyonu üzerine bir çalışma yapmıştır ve Hurma zeytinini üzerindeki mikrobiyal popülasyonun Erkence ve Gemlik zeytinini ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma döneminde Hurma zeytinindeki mikrobiyal büyüme, fenolik bileşikler parçalayan ve Hurma zeytinin hurmalaşma aşamalarına neden olan enzim aktivitelerinde artışa neden olduğu şeklinde bir yorum yapılmıştır (Aktaş, 2013).

Benzer bir zeytine Yunanistan’da rastlanır ve “Thrubolea” veya “Throuba Thassos” adıyla bilinmektedir. Başka bir çeşidi olan “Dhokar”, Tunuslu araştırmacılar tarafından da bildirilmektedir (Jemai et al., 2009; Rigane et al., 2011; Zoidou et al., 2010; Aktaş vd., 2014). Yunanistan’da bulunan benzer

tatlanmanın meydana geldiği, zeytin meyvelerinin ağaç üzerinden işlem görmeksizin tüketilebildiği bir zeytin çeşidi ile yapılan çalışmada, olgunlaşma işlemi sonucu tatlanmanın, oleuropeini hidrolize eden bir *Phoma olea* isimli fungusun varlığından kaynaklandığı belirtilmektedir. Bu yörelerde Hurmalanmış zeytinlerin daha yüksek ekonomik değer taşımamasından dolayı da genelde zeytinyağı üretimi ikinci planda kalmaktadır. Ağaç üzerindeki olgunlaşma sürecine iklim ve/veya toprağın etkisi de yerel halk tarafından parametre olarak belirtilmiştir, çünkü bu fenomen sadece belirli coğrafi konumlarla sınırlıdır (Aktaş vd., 2014; Sevim vd., 2013).

Yunanistan'ın Thassos Adası'nda yetişen tatlı Thassos zeytiniyle ilgili bir araştırma, acı tattan sorumlu olan oleuropeinin, olgunlaşma sırasında funguslar tarafından üretilen β -glukosidaz enzimi ile hidroksitirozol ve türevlerine hidrolize edildiğini göstermiştir. Yine, Tunus'un güney bölgesinde yetiştirilen Dhokar zeytinleri ile ilgili bir çalışmada da bu durum gözlenmiştir. Bu çalışmalara rağmen, doğal olgunlaşma olgusu hakkında bilgi çoğunlukla fenolik değişikliklerle sınırlıdır ve olgunlaşma sırasında zeytin bileşiminde meydana gelen diğer kimyasal değişiklikleri tanımlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Aktaş vd., 2014).

Abacı vd. (2014) yaptıkları bir çalışmada İzmir Karaburun Yarımadasından sadece bir bahçeden toplanan hurma zeytinden izole ettikleri fungal izolatu *Phoma multirostrata* olarak tanılamışlar ve *Olea europaea*' dan *Phoma multirostrata* izolasyonu için ilk kayıt olduğunu belirtmişlerdir (Abacı vd., 2014).

Tüm bu çalışmalar zeytinde fungal biyoçeşitliliğin araştırılmasının ve bu alanda daha ayrıntılı analizlere ihtiyaç duyulduğunun önemini vurgulamaktadır. Aynı zamanda yapılan çalışmalar zeytinden izole edilmiş zengin bir mikrobiyotanın potansiyelini göstermektedir, bu da zeytinlerin farklı sektörlerde biyoteknoloji ve enzim üretiminde avantaj sağlamak için kullanılabileceğini düşündürmektedir (Baffi et al., 2012). Ayrıca yeni endofitik fungal türlerin ve endofitik fungal sekonder metabolitlerin araştırılması, yeni doğal ürünler bulma şansını artırabileceği anlamına gelmektedir (Yu et al., 2010). Endofitik fungal türler, zeytinin önemli patojenlerinin antagonistleri olarak keşfedilebilir ve etkili

biyokontrol ajanları olarak geliştirilebilir (Abdelfattah et al., 2015). Tanımlanan türler ve enzimleri, sadece zeytin endüstrisinde değil, biyolojik dönüşüm ve tarımsal yan ürünlerin kullanımı için biyoteknolojik süreçleri kullanabilen diğer endüstrilerde de kullanılabilir (Baffi et al., 2012).

Bu çalışma Hurma zeytin türü ile endofit olarak yaşayan fungusların çeşitliliğini tespit etmek için yapılmış yeni bir çalışma olduğundan literatürdeki ilk çalışmadır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Zeytin (*Olea europaea*)

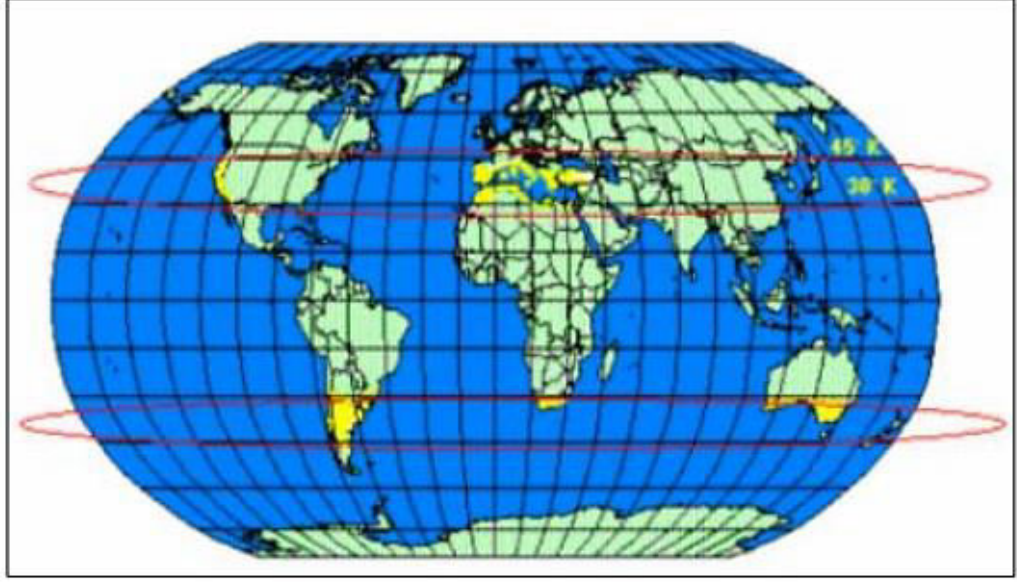
2.1.1. Zeytinin tanımı

Türkiye iklim özelliklerinden dolayı zengin tarım potansiyeline sahip bir ülkedir. Bu nedenle Anadolu, tarih boyunca önemli uygarlıklara ev sahipliği yapmıştır. Bölgenin olumlu iklim koşulları nedeniyle de çok çeşitli alanlarda tarımsal çalışmalar yapılmıştır (Erden vd. 2016).

Zeytin bitkisi “Oleaceae” familyasında bulunmaktadır. Zeytinin adının kökeni Yunanca Elaia ve Latince Olea’dan gelmektedir. Boyu 2- 10 metre arasında değişmektedir. Ancak 15-20 metreye kadar da çıkabilen bir bitki türlerine rastlanmaktadır. Meyveleri başta yeşilken ekim-kasım aylarında morlaşıp siyahlaşarak olgunlaşmaktadır. Zeytin ağacı narin bir ağaçtır. Ağır ve zahmetli büyümesine karşın oldukça uzun ömürlüdür. Genellikle 300-400 yıl gibi uzun ömürlü bir ağaç olan zeytinin 2000 yıl yaşayanları da vardır. Bu onun olasılıkla kuraklıktan etkilenmeyen bir bitki türü olmasından dolayı kaynaklanmaktadır. Bu yüzden de zeytin ağacının adı mitoloji ve botanikte “ölümsüz ağaç” olarak geçmektedir (Çelik vd., 2016).

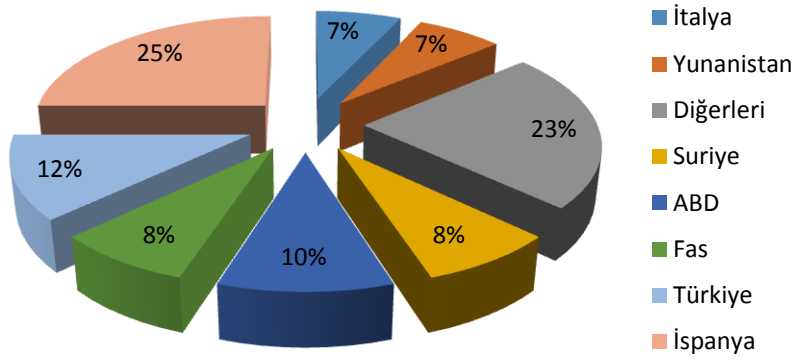
2.1.2. Zeytinin coğrafi yeri

Zeytin, ekonomik olarak dünyanın her yerinde yetişmesi mümkün olmayan bir meyve türüdür. 300–400 enlemler arasında ve %98’i Kuzey yarımkürede bulunmaktadır, genellikle de Akdeniz bölgesinde yetişmektedir. Üretilen zeytin ve zeytinyağının çoğu kısmını üretici ülkeler kendileri tüketmektedir, dünya ticaretine sunulan miktar ise toplam üretimin %20’si kadarını geçmemektedir. Zeytin dünyanın çok az yerinde üretilebildiği için güzel işlendiği zaman küresel olarak rekabet şansı artmaktadır ve sağlıklı beslenme açısından da değerli bir besin ürünüdür (Tüzün, 2003; Özata ve Cömert, 2016).



Şekil 2.1. Dünyadaki zeytin üretim alanları (Tüzün, 2003)

Günümüzde 34'ü kuzey yarımkürede, 6'sı ise güney kürede olan 40 ülkede 2012 yılı verilerine göre yaklaşık 10 milyon hektarlık alanda 1 milyar kadar zeytin ağacı bulunmaktadır. Dünya zeytin yetiştiriciliğinin % 95'i Akdeniz ülkelerinde yer almaktadır (Gündoğdu vd., 2016). Bu ülkeler de zeytin yetiştiriciliğindeki sıralamalarına göre İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Suriye ve Tunus'tur. Zeytin Türkiye'de çok geniş bir alanda yayılım göstermektedir. *Olea europaea* olarak bilinen ağacın meyvesi olan zeytinin yetiştiriciliği Ege, Marmara, Akdeniz ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde bulunan toplam 42 ilimizde yapılmaktadır. Türkiye'de 2013/2014 verilerine göre, 826.000 hektarda 168.997.000 ağaç varlığıyla 1.768.000 ton zeytin üretimi yapılmaktadır ve zeytinden de 190.000 ton zeytinyağı elde edilmektedir. Çoğunlukla zeytin üretiminin yapıldığı illerimiz Aydın, İzmir, Muğla, Balıkesir, Bursa, Manisa ve Çanakkale'dir (TÜİK, 2015; Gündoğdu vd., 2016; Ergün ve Tunalıoğlu, 2016; Özata ve Cömert, 2016; Çelik vd., 2016).



Şekil 2.2. Ülkelerin sofralık zeytin üretim oranları (1993-1994, 2002-2003) (Tunalıoğlu, 2003).

Zeytin meyvesinin olgunlaşması aylarca süren yavaş ve uzun bir süreci içermektedir. Bu olgunlaşma süreci zeytinin yetiştirildiği yerin coğrafi konumuna, tarımsal faaliyetlere ve zeytin meyvesinin çeşidine bağlıdır (Lavee and Wodner, 1991; Gündoğdu vd., 2016). Ülkemizde bölgelere göre çok farklı zeytin çeşitleri yetiştirilmektedir. Her bir çeşidin de kendine özgü özellikleri olmaktadır. Bu da elde edilen yağların tat, koku ve aromalarında farklılık göstermektedir (Efe vd., 2011; Gündoğdu vd., 2016).

2.1.3. Zeytinin kullanıldığı alanlar ve önemi

Zeytin, meyvesi yağlık ve sofralık olarak işlenebilen ve bu işleme sonucu oluşan yan ürünleri değerlendirilebilen tarımsal bir üründür. Zeytin sağlıklı beslenmede, sanayiye hammadde kazandırmada ve pazar oluşturmada tarım ekonomisi ve Türkiye ekonomisi açısından önemli bir yere sahiptir (Erden vd., 2016). Zeytin bitkisinin özel iklim gereksinimleri nedeniyle zeytincilik tarımı, dünyada daha çok Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde (İspanya, İtalya, Yunanistan, Türkiye, Tunus, Suriye, Fas, Fransa ve Portekiz) yapılmaktadır. Toplam 47 ülkede, ortalama olarak 20 milyon ton zeytin üretimi yapılmaktadır (FAO, 2015). Dünya'da zeytin ve zeytinyağına olan talebin artışıyla, ülkeler bu üretimi daha da artırma çalışmalarına gitmişlerdir (Ergün ve Tunalıoğlu, 2016).

Zeytin, tarih boyunca barışın sembolü olarak görülmüştür. Zeytin ağacı ise kutsal olarak kabul edilmiştir ve varlık, bilgelik ve sağlığın sembolü olmuştur. Zeytin ve zeytinyağı sektörü de, ülkemizde tarım ekonomisi açısından önemli bir

yere sahiptir. Bu sektör istihdam sağladığı nüfus açısından, yarattığı katma değer yönünden ve yüksek ihracat potansiyeline sahip olması ile rekabette avantajlara sahiptir. Türk tarımının gelişmesinde de önemli bir yere sahip olan zeytincilik sektörü, zeytinyağı ve sofralık zeytin alt sektörleri ile tarıma dayalı bir sanayi kolu olmaktadır ve bu şekilde önemli bir katma değer yaratmaktadır (Özata ve Cömert, 2016).

Zeytin meyvesi; belli aşamalardan geçerek sofralık zeytin veya zeytinyağı gibi gıda maddeleri olarak kullanılabildiği gibi bunun dışında ilaç sanayi, kozmetik ve hayvan beslenmesi gibi birçok alanda da kullanılabilmektedir. Zeytin yaprağı ilk olarak Eski Mısır'da ilaç olarak kullanılmıştır. Yüzyıllardır yetiştirilen zeytin ağacının sağlığa yararlı etkileri son zamanlarda yapılan çalışmalarla daha da aydınlatılmakta ve doğrulanmaktadır (Durlu-Özkaya ve Özkaya, 2011; Ünlüel ve Aydın, 2016). Önemli antioksidan fonksiyonuna sahip bileşenlerin zeytinyağı ile sebze ve meyvelerde bulunması dikkat çekmektedir. Bu bileşenler zeytinyağının faydalı maddeleri olarak onun çok daha küçük bileşimlerinde bulunan alfa-tokoferol, karoten ve polifenoller olarak belirtilmektedir. Bu bileşimler oksidasyonu önleyerek serbest radikallerin oluşumunu engellediği için kalp-damar hastalıkları riskini de önemli ölçüde azaltmaktadır (Özata ve Cömert, 2016).

2.1.4. Zeytinin fenolik bileşikler

2.1.4.1. Fenolik madde

Fenolikler, bir veya daha fazla sayıda hidroksil (-OH) grubunun bağlandığı benzen halkasına sahip maddeler olarak bilinmektedir (Harborne and Dey, 1989; Yorulmaz ve Tekin, 2008). Fenolik bileşiklerin, bitkilerde aromatik aminoasit metabolizması sırasında sentezlenen yan bileşiklerden oluşan sekonder metabolitler olduğu belirtilmektedir. Gıda bileşeni olarak fenolik bileşikler; insan sağlığı açısından fonksiyonları, tat ve koku oluşumundaki etkileri, renk oluşumu ve değişimine katkıları, antimikrobiyal ve antioksidatif etki göstermeleri, enzim inhibisyonuna neden olmaları, gıdalarda saflık kontrol kriteri olarak kullanılmaları gibi birçok açıdan öneme sahiptirler. Fenolik bileşiklerin antioksidatif etkisi fenol

grubundaki hidroksil grubu sayısının artması ile artmaktadır (Yorulmaz ve Tekin, 2008).

Son yıllarda, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, sağlık ve duyuşal özellikleri nedeniyle zeytin fenoliklerine ilgi artmaktadır. Fenolik bileşikler, beslenme özelliklerini, duyuşal özelliklerini ve zeytinyağının raf ömrünü düzenler. Bu bileşikler, anti-enflamatuvar, anti-alerjik, antimikrobiyal, kanserojen ve antiviral aktivitelerinden dolayı insan sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Aktaş, 2013).

Zeytinyağı fenolikleri genellikle zeytindeki fenolik maddelerin mekanik ekstraksiyon sırasında yağa sızmaları ile ortaya çıkmaktadır. Zeytin fenolikleri zeytinyağı fenoliklerinden farklılıklar göstermektedir. Zeytin, meyve etinin % 1-3'ünü oluşturacak şekilde, yüksek konsantrasyonlarda fenolik madde içermektedir (Diez and Adamos, 1997; Yorulmaz ve Tekin, 2008).

Zeytinin temel fenolikleri; fenolik asitler, fenolik alkoller, flavonoidler ve sekoiridoitler olarak sınıflandırılmaktadır. Tablo 2.1'de zeytin fenoliklerinin gruplarını ve bu gruplarda yer alan fenolikler görölmektedir (Yorulmaz ve Tekin, 2008; Ünlüel ve Aydın, 2016). Tablo 2.1'de de göröldüğü gibi (3,4-dihidroksifenil) etanol (3,4-DHPEA) ve (phidroksifenil) etanol (p-HPEA) zeytinin temel fenolik alkolleridir (Diez and Adamos, 1997; Yorulmaz ve Tekin, 2008). Tirozol, zeytinde hidroksitirozolden sonra düşük miktarda bulunan bileşenlerden biridir (Romani et al., 1999; Yorulmaz ve Tekin, 2008). Vinha et al. (2005), tarafından yapılan çalışmada, Portekiz zeytin çeşitlerinde tirozolün iz miktarda olduğı veya hiç bulunmadığı belirtilmiştir. Zeytinde önemli bir diğfer fenolik alkol olan hidroksitirozolün, bazı araştırmacılar tarafından oleuropeinin parçalanma ürünü olduğı bildirilmiştir. Olgunlaşmanın ilerleyen aşamalarında oleuropein konsantrasyonu azaldıkça hidroksitirozol konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (Vinha et al., 2005; Yorulmaz ve Tekin, 2008).

Tablo 2.1. Zeytin fenolikleri (Servili and Montedora, 2002)

Antosiyaninler Siyanidin-3-glikozit Siyanidin-3-rutinosit Siyanidin-3-kaffeglikozit Siyanidin-3-kafferutinosit Delfinidin-3-ramnoglikozit-7-ksilosit	Sekoiridoitler Oleuropein Demetiloleuropein Ligstrosit Nüzhenit
Flavonoller Kuersetin-3-rutinosit	Fenolik asitler Klorojenik asit Kaffeik asit p-hidroksibenzoik asit Prokateşik asit Vanilik asit Syringic asit p-kumarik asit o-kumarik asit Ferulik asit Sinapik asit Benzoik asit Sinnamik asit Gallik asit
Flavonlar Luteolin-7-glikozit Luteolin-5-glikozit Apigenin-7-glikozit	
Fenolik alkoller (3,4-dihidroksifenil) etanol (3,4-DHPEA) (p-hidroksifenil) etanol (p-HPEA)	
Hidroksisinnamik asit türevleri Verbaskosit	

Zeytin yaprakları da çeşitli fenolik bileşikleri içermektedirler. Bu bileşenler ve konsantrasyonları Tablo 2.2’de görülmektedir (Han et al., 2009; Ünlüel ve Aydın, 2016).

Tablo 2.2. Zeytin yaprağındaki önemli fenolik bileşenlerin konsantrasyonları

Fenolik Bileşen	Konsantrasyon (mg/kg)
Hydroxytyrosol	219 ± 3
Oleuropein	2,231 ± 52
Demethyloleuropein	984 ± 47
Verbascoside	27.45 ± 4.05
Rutin	15.80 ± 4.51
Lutcolin 7-o-glucoside	15.80 ± 4.51

Zeytin fenoliklerinin zengin olmasından dolayı zeytinyağı da fenolik bileşiklerce zengin olmuştur. Zeytin, hiçbir kimyasal işleme maruz bırakılmaksızın doğal sızma olarak yağa işlendiğinde de fenolik bileşikler içermektedir. Bu fenolik bileşikler ve konsantrasyonları (Han et al., 2009) Tablo 2.3’te gösterilmektedir (Ünlüel ve Aydın, 2016). Zeytinyağı; *Olea europaea* L. meyvesinden mekanik yollarla elde edilen ve Akdeniz diyeti olarak adlandırılan beslenme şekline ait önemli bir gıda ürünüdür (Tripoli et al., 2005). Zeytinyağı bileşiminde ise % 98 trigliserit ve %2 fenolik maddeler dışında serbest yağ asitleri, steroller, hidrokarbonlar, uçucu bileşenler ve antioksidanlar bulunmaktadır (Kayahan ve Tekin, 2006; Yorulmaz ve Tekin, 2008).

Tablo 2.3. Natürel sızma zeytinyağındaki önemli fenolik bileşiklerin konsantrasyonları

Fenolik Bileşen	Konsantrasyon (mg/kg)
Hydroxytyrosol	14.42 ± 3.01
Oleuropein	2.04 ± 0.78
Oleuropein agycone	14.42 ± 3.01
Tyrosol	27.45 ± 4.05
Apigenin	15.80 ± 4.51

Fenolik asitler, fenolik alkoller ve flavonoidler farklı pek çok meyve ve sebze de bulunabilirken, sekoiridoitler sadece *Olea europaea* L. türünün sınıflandırıldığı Oleaceae familyasında bulunmaktadır. Sekoiridoit sınıfındaki fenolik maddeler yapılarında elenoik asit ya da elenoik asit türevi içermeleriyle diğer bileşiklerden ayrılmaktadırlar (Diez and Adamos, 1997; Yorulmaz ve Tekin, 2008). Zeytinde en fazla bulunan sekoiridoit glikozit grupları oleuropein, demetiloleuropein, ligstrosit ve nüzhenittir (Diez and Adamos, 1997; Yorulmaz ve Tekin, 2008).

Oleuropein zeytinlerin acı tadından sorumlu olmaktadır ve oleuropein miktarı olgunlaşma aşaması ilerledikçe azalmaktadır. Küçük meyveler yüksek miktarlarda oleuropein ve düşük miktarlarda verbaskosit içerir; büyük danelerde ise bu durum tam tersi olmaktadır (Boskou, 2006; Yorulmaz ve Tekin, 2008). Kimyasal olarak oleuropein, elenoik asit ile (3,4-dihidroksifenil) etanolün esterleşmesi sonucu oluşan bir bileşiktir. Oleuropein suda çözündüğü için zeytinin yağa işlenmesi ve sofralık zeytin üretimi sırasında sulu faza geçerek miktarı önemli ölçüde azalmaktadır. Ayrıca sofralık zeytin üretimi sırasında %1-2 oranında sodyum hidroksit çözeltisinden yararlanılarak, ya da bazı uygulamalarda asitler veya glukozidaz enzimi yardımı ile hidrolize edilerek acı tat giderilmektedir (Kayahan ve Tekin, 2006; Yorulmaz ve Tekin, 2008).

Demetiloleuropein de yapısal olarak oleuropeine çok benzemektedir, tek fark bu bileşikte hidroksitirozolün yerini tirozol almaktadır. Ligstrosit, genç zeytinlerde fazla bulunmasına karşın olgunlaşma ilerledikçe miktarında azalma olmaktadır. Zeytinlerin gelişme ve olgunlaşması süresince oleosit 11-metilester, tirozol, hidroksitirozol ve bu bileşiklerin glikozitlerinde değişimler meydana gelmektedir. Oleuropein ve ligstrositin hidrolizi ile bu bileşiklerin bazılarının miktarları arasında bir korelasyon gözlenmiştir. Flavonoidler luteolin-7-glikozit ve rutin gibi flavonol glikozitlerin yanında siyanidin ve delfinidin glikozit gibi antosiyaninleri de içermektedir (Yorulmaz ve Tekin, 2008). Bir hidroksi sinamik asit türevi olan verbaskosit bileşiği de zeytinde bulunmaktadır. Verbaskosit bir disakkarit olup, glikoz ve ramnoz, hidroksitirozol ve hidroksi sinamik asit molekülüne bağlanması sonucu oluşmaktadır (Bianchi, 2003; Yorulmaz ve Tekin, 2008). Vinha et al. (2005), tarafından yapılan çalışmada, kullanılan zeytin

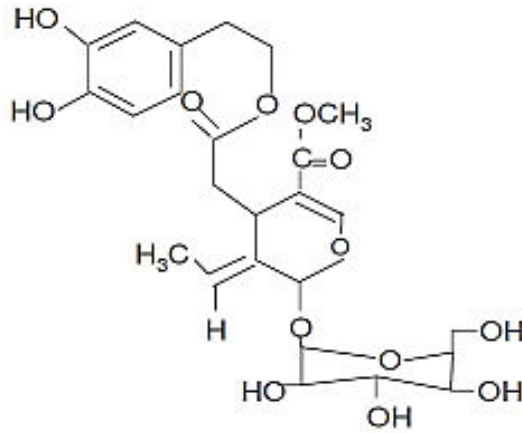
türlerinde verbaskosit miktarının % 0.02'den daha az olduğu belirtilmiştir. Ayrıca oleuropein miktarının en yüksek olduğu zeytin türlerinde verbaskosit miktarının ise en düşük olduğu görülmektedir (Vinha et al., 2005; Yorulmaz ve Tekin, 2008).

Oleuropein, demetiloleuropein, verbaskosit zeytin meyvesinin et, kabuk, çekirdek gibi tüm kısımlarında bulunsa da yaygın olarak et kısmında yer almaktadır. Nüzhenit ise sadece zeytin çekirdeğinde bulunmaktadır. Vinha et al. (2005), Portekiz'de yetiştirilen zeytinlerin bir kısmının hidrokstitirozol, luteolin 7-O-glikozit, oleuropein, rutin, apigenin 7-O-glikozit ve luteolin gibi fenolik bileşikler içerdiğini, bir kısmının ise bu bileşikler dışında 5-O-kaffeoylquinik asit, verbaskosit, kuersetin 3-O-ramnosit, siyanidin 3-O-glikozit ve siyanidin 3-O-rutinosit bileşiklerini içerdiğini saptamışlardır (Vinha et al., 2005). İspanyol zeytinlerinde en önemli fenolik bileşik hidrokstitirozol-4- β -d-glikozittir. Ancak tirozol, verbaskosit, luteolin-7-glikozit, rutin, demetiloleuropein ve oleuropeinin de fazla miktarlarda bulunduğu bildirilmiştir. İz miktarda bulunan diğer fenolik bileşikler ise kateşol, vanillik asit, apigenin-7-rutinosit ve ligstrosit'dir. Vinha et al. (2005), Portekiz'de yetiştirilen zeytin çeşitlerinde bulunan fenolik madde miktarlarının 4364 ile 75215 mg/kg arasında değişim gösterdiğini belirtmişlerdir (Vinha et al., 2005). Boskou et al. (2006), farklı kahvaltılık zeytin çeşitlerinden elde edilen çekirdeklerde kafeik asit cinsinden 51 ile 256 mg/100 g arasında değişen oranlarda fenolik madde miktarının bulunduğunu göstermişlerdir (Boskou et al., 2006). Boskou (2006), zeytinlerin olgunlaşması sırasında fenolik bileşiklerde meydana gelen en önemli değişimlerin oleuropein miktarının azalması, tirozol ve hidrokstitirozol miktarının ise artması olduğunu belirtmektedir (Boskou, 2006). Mousa et al. (1996), zeytinlerin yetiştiği yükseklik ile fenol içeriği arasında bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmalarında daha yüksekte yetişen zeytinlerin fenol içeriğinin daha az olduğunu bildirmişlerdir (Mousa et al., 1996; Yorulmaz ve Tekin, 2008).

2.1.4.2. Oleuropeinin kimyası

Oleuropein; hidroksitirozol, elenoik asit ve glikoz alt birimlerinden oluşan bir fenolik glikozittir (Yıldız ve Uylaşer, 2011). Meyve olgunlaştıkça miktarı azalan oleuropein acı tat veren bileşik olarak bilinmektedir ve suda çözünbilme özelliğindedir. Suda çözünbilmesi nedeniyle zeytinyağı üretiminde ve sofralık zeytin üretiminde sulu faza geçerek miktarında azalma olduğu bilinmektedir. Ayrıca sodyum hidroksit çözeltisi, glukosidaz enzimi ya da asit uygulaması gibi işlemlerle de oleuropeinin neden olduğu acı tat giderilebilmektedir (Yorulmaz ve Tekin, 2008; Yıldız ve Uylaşer, 2011; Ünlüel ve Aydın, 2016).

Oleuropein bileşiği, 1800’li yıllarda malarya hastalığı sonucu ile ortaya çıkan ateşin giderilmesi için kullanılmıştır. İlk olarak 1908 yılında keşfedilmiştir (Yıldız ve Uylaşer, 2011), 1960 yılında izole edilmiştir (Köçkar vd., 2010) ve 1970 yılında da kimyasal olarak yapısı tanımlanmıştır (Türköz vd., 2008; Ünlüel ve Aydın, 2016).



Şekil 2.3. Oleuropeinin kimyasal yapısı (Yıldız ve Uylaşer, 2011)

Tablo 2.4. Oleuropeinin biyolojik aktiviteleri ve etkileri (Barbaro et al., 2014; Ünlüel ve Aydın, 2016)

Aktivite	Etkileri
Antioksidant	Reaktif oksijen türlerini (ROS) atma etkisi
	LDL'nin oksidasyonunu engelleme
	Radikal stabilitenin gelişimi
Anti-enflamatuar	Lipoksigenaz inhibisyonu
Anti-tümör	ROS atma etkisi
	Antimigrasyon etkisi
	Apoptosis indüksiyon
	Anjiyogenez inhibisyonu
Antimikrobiyel	Bakteri hücre membranı zararı
Antiviral	Viral Kılıf Etkileşimi
	Viral integrase inhibisyonu
Nöroprotektif	Oksidatif stres azaltma
	Tau fibrilizasyon inhibisyonu
Hepatoprotektif	Oksidatif stres azaltma
	Karaciğer yağlanmasını azaltma

2.1.5. Zeytinin gelişimi ve olgunlaşması

Zeytin ağacının çiçeklenmeye başlaması meyve gelişiminin başladığını göstermektedir. İlerleyen gelişimin altı ile sekizinci aylarında zeytin maksimum meyve ağırlığına ulaşmaktadır. Bununla birlikte meyvede renk değişimi başlar ve beraberinde morumsu siyah renklenme ile fizyolojik modifikasyonlar da gerçekleşir. Yeşil ve siyah olgunlaşma olmak üzere iki çeşit olgunlaşma süreci vardır. Yeşil olgunlaşma, meyvedeki klorofil içeriğinin düşmesi, meyvenin yumuşaması ve yağ içeriğinin artması şeklinde tanımlanırken, siyah olgunlaşma evresi klorofilin daha da azalarak, CO₂ birikiminin artışı, etilen salgılanması ve antosiyanin içeriğinin artması ile zeytin meyvesinin renginin siyaha dönmesi şeklinde tanımlanmaktadır (Kadalkal, 2009).

Zeytinde tanımlanan bir diğer gelişme aşaması da büyüme fazı olarak bilinmektedir ve yeşil olgunlaşma öncesinde oleuropein birikiminin olduğu

dönem olarak açıklanmaktadır (Ryan and Robards, 1998; Ryan et al., 1999; Kadakal, 2009). Fenolik bileşiklerin konsantrasyonu meyvenin olgunluğu ile bağlantılıdır. Zeytinin erken gelişme döneminde oleuropein baskın fenolik bileşiktir ve meyvenin kuru madde miktarının %14' üne kadar ulaşmaktadır. Yeşil hasat edilen zeytinler için hasat zamanında da yüksek olan oleuropein, siyah olarak hasat edilen zeytinlerde ise hasat döneminde hiç bulunmayabilir (Bianchi, 2003; Othman et al., 2009). Oleuropein konsantrasyonu meyve olgunlaştıkça azalmaktadır ve oleuropeinin hidrolizinin ardından dimetiloleuropein ve elenoik asit türevleri açığa çıkmaktadır. Bu bileşenlerin hiçbirisi yeşil olgunlaşma aşamasından önce görülmemektedir. Siyah olgunlaşma aşaması ise antosiyanin varlığı ile karakterize edilmektedir (Ryan and Robards, 1998; Kadakal, 2009).

2.1.5.1. Olgunlaşma döneminde zeytindeki değişimler

Olgunlaşma döneminde zeytin meyvesinde çeşitli biyokimyasal, fiziksel ve fizyolojik değişiklikler meydana gelir. Bu değişikliklerin birçoğu hem sofralık zeytin hem de zeytinyağı üretiminde önemli rol oynamaktadır. Bu değişiklikler, çeşit, meyve olgunluğu, kültürel işlemler (sulama rejimleri, gübreleme, budama vb.) ve çevresel faktörler (coğrafi alan, iklim koşulları, toprak kalitesi, ekim türü, yağış vb.) gibi çeşitli faktörlerden etkilenebilir. Kompozisyondaki değişiklikler ise meyvelerin ve yağın kalitesini, duysal ve besleyici özelliklerini etkiler (Nergiz ve Engez, 2000; Yorulmaz vd., 2013; Aktaş, 2013; Gündoğdu vd., 2016).

Sofralık zeytin, içerdiği doğal fenolik bileşikler dolayısıyla yüksek antioksidan etkiye sahiptir ve fonksiyonel gıda olarak nitelendirilmektedir (Marsilio et al., 2000; Bianchi, 2003). Bu bileşikler, yüksek antioksidan etkileri ile birlikte, zeytine önemli yapısal ve duysal özellikler de katmaktadır (Ryan et al., 1999; Marsilio et al., 2001; Bianchi, 2003). Zeytinin sofralık zeytine işlenmesi fenolik bileşik profilini önemli oranda değiştirmektedir. Fenolik bileşiklerden oleuropein; işlenmemiş yeşil zeytinin yüksek oranda acılığından sorumlu baskın bir fenolik bileşik iken, işlenmiş sofralık zeytinlerdeki baskın fenolik bileşiklerin tirozol, hidroksitirozol, elenoik asit olduğu tespit edilmiştir. Zeytinlerdeki fenolik bileşiklerin konsantrasyonlarının işleme teknikleri ile birlikte olgunlaşma

derecelerine göre de deðiřtiđi vurgulanmaktadır (Bianchi, 2003; Sousa et al., 2006).

Fenolik profil, çeşidinin cinsi, olgunluk aşaması, iklim koşulları ve sulama yönetiminden önemli ölçüde etkilenir (Amiot et al., 1986; Tovar et al., 2001). Çeşitlilik, zeytin meyvesinin fenolik profilini etkileyen en önemli faktördür (Amiot et al., 1986). Olgunlaşma derecesi, zeytin meyvesinin ve zeytinyağının fenolik içeriğini de etkiler. Oleuropein konsantrasyonu, hidrofilik fenol yağ miktarları ve zeytinin olgunlaşma evresi arasında negatif bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Garcia et al., 1996). İklim koşulları (özellikle sıcaklık ve yağış) zeytinin fizyolojisini etkiler. Özellikle olgunlaşma sırasındaki yağış ve sıcaklık değişimleri, zeytin ve zeytinyağının fenolik dağılımları ile ilişkili olabilir (Romero et al., 2003).

Türkiye zeytinleri ile yapılan bir başka araştırmaya göre, olgunlaşma sırasında oleuropein konsantrasyonu azalırken, olgunlaşma boyunca hidrokstitirozol ve demetiloleuropein artmaktadır. Buna ek olarak, zeytin meyvelerinin trans sinamik asit içeriği azalırken, siyanidin 3-O-glukozit ve siyanidin 3-O-rutinosid konsantrasyonları artar (Yorulmaz vd, 2013; Aktaş, 2013).

Zeytin ve zeytinyağındaki fenolik bileşiklerin konsantrasyonu, β -glukozidaz, polifenoloksidazlar (PPO), peroksidazlar (POD) ve lipoksijenaz (LPO) gibi zeytinlerde bulunan çeşitli endojen enzimlerin aktivitesi ile ilgilidir (Yorulmaz vd., 2013; Aktaş, 2013).

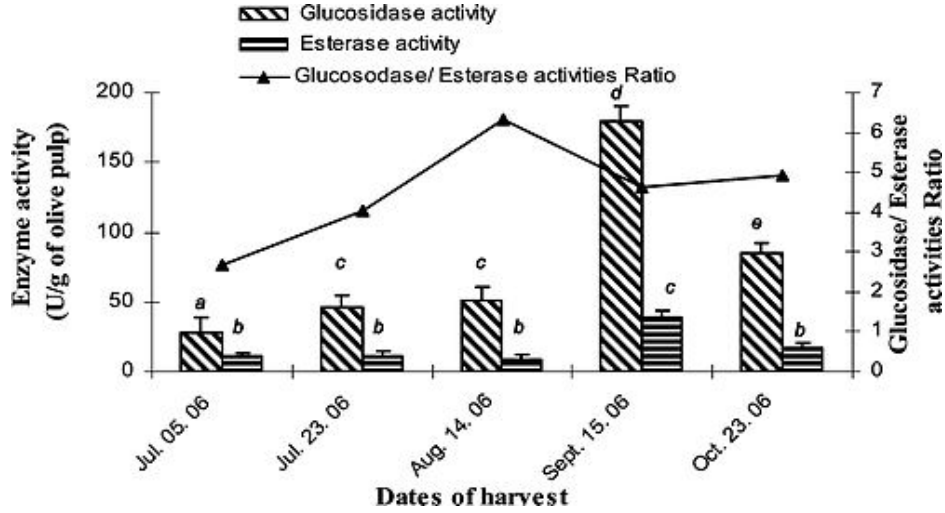
Olgunlaşma süreci üç aşamaya ayrılır. Birincisi, oleuropein birikiminin meydana geldiği büyüme aşamasıdır. İkinci aşama, klorofil ve oleuropein seviyelerinde azalma ile çıkaşan yeşil bir olgunlaşma aşamasıdır (Charoenprasert and Mitchell, 2012). Bu aşamada yoğun lipit sentezi gözlenir. Oleuropeinin hızlı bir şekilde azalması ve verbaskosit birikmesi ikinci aşama ile ilgilidir. Son aşama, antosiyaninlerin ve flavonoidlerin ortaya çıkaşıyla karakterize edilen ve oleuropein seviyelerinin düşmeye devam ettiği siyah bir olgunlaşma aşamasıdır (Amiot et al., 1986; Charoenprasert and Mitchell, 2012).

Olgunlaşma dönemindeki Gordal Sevilana zeytinleri ile ilgili bir çalışmada zeytin büyüklüğü, et/çekirdek oranı ve yağ içeriği artmış, nem ve toplam şeker içerikleri düşmüştür. Ek olarak, toplam fenolikler başlangıçta azalmış ve olgunlaşma sırasında kademeli olarak artmıştır. Ayrıca, optimum olgunluk seviyesinde maksimum şeker içeriği tespit edilmiştir. Dönen renk fazının başlangıcındaki zeytinler, meyvede bulunan şekerlerin azalmasına yol açarak yeşil sofralık zeytinlerin sonraki fermentasyonu için mevcut substratı en aza indirmiştir (Menz and Vriesekoop, 2010).

Zeytin meyvesinde yağ sentezi ve birikimi yaklaşık 10. haftada başlar ve sezonun 34. haftasına kadar devam eder (Vossen, 1998). Yağ içeriği taze ağırlık bazında %3 ile 38 arasında değişmektedir, bu da çeşit ve olgunlaşma derecesi ile ilişkilidir (Charoenprasert and Mitchell, 2012). Meyveler maksimum olgunluğa ulaşana kadar (renk değişimi ve yumuşama) yağ sentezi artmaktadır. Meyve çok olgunlaştığında, yağ sentezi tamamen durur (Vossen, 1998).

2.1.5.2. Olgunlaşma sırasında enzimatik aktiviteler

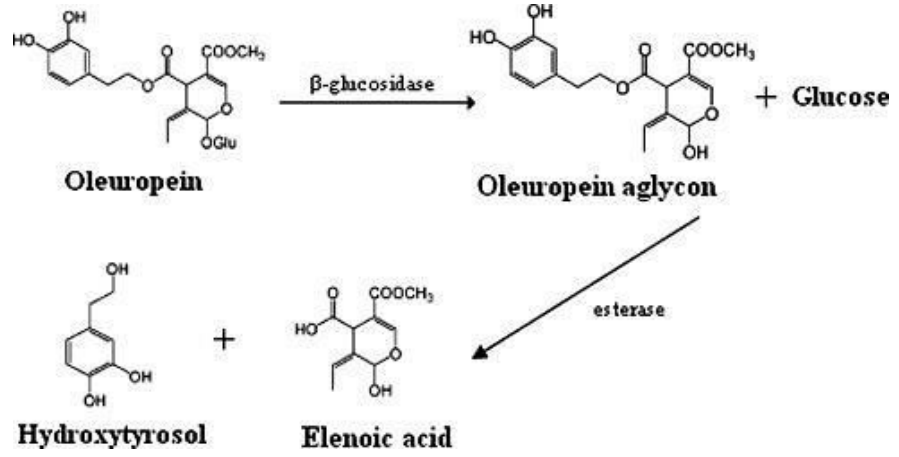
Jemai et al. (2009) yaptıkları çalışmada zeytin pulpasında β -glukozidaz ve esteraz aktiviteleri belirlenmiştir. İki enzim aynı eğilimi göstermektedir; Eylül ayında maksimuma ulaşırlar, ardından son hasatta hafif bir düşüş olur (Şekil 2.4). Pulpa ekstraktlarının β -glukozidaz aktivitesi, oleuropein konsantrasyonundaki ilgili bir değişiklik ile ilişkili olabilecek bir varyasyon göstermiştir. β -glukozidaz aktivitesi, Temmuz ayında 28,31 U/g zeytin pulpası ile başlamış, daha sonra kayda değer bir şekilde artmış ve Eylül ayında en yüksek seviyeye ulaşmıştır (179.75 U/g zeytin pulpası). Ekim ayında ise 84.24 U/g'ye gerilemiştir (Şekil 2.4) (Jemai et al., 2009).



Şekil 2.4. Dhokar meyvesi ekstraktlarında β -glukozidaz ve esteraz aktivitelerinin olgunlaşma aşamalarındaki oranları (Jemai et al., 2009).

Meyve ekstraktlarında ölçülen esteraz aktivitesi, zeytin meyvesinin siyah olduğu Eylül ayında (30.03 U/g) maksimum aktiviteyi göstermiştir ve son olgunlaşma aşamasında 17.05 U/g değerine sahip bir aktiviteye ulaşarak azalmıştır (Şekil 2.4). Amiot et al. (1989), zeytin meyve ekstraktlarında ölçülen esteraz aktivitesinin olgunlaşma aşamasında önemli ölçüde arttığını, siyah olgunlaşma sırasında maksimum seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir (Amiot et al., 1989; Jemai et al., 2009).

Oleuropein iki ardışık hidroliz reaksiyonuna girmiştir. İlk adımda β -glukozidaz enzimi hidroliziyle oleuropeinden aglikon ve glikoz elde edilmiştir ve ikinci adımda ise aglikondan esteraz aktivitesi ile elenoik asit ve hidroksitirozol oluşumu gerçekleşmektedir. Ayrıca bu çalışmada Dhokar zeytin çeşidinde, oleuropein seviyesinde önemli bir azalma olduğu da bildirilmiştir. Bu sonuçta, olgunlaşma sırasındaki artan hidrolitik enzim aktivitesi raporları ile tutarlıdır (Briante et al., 2002; Jemai et al., 2009).



Şekil 2.5. Oleuropein ve türevleri, β -glukozidaz ve esteraz ile enzimatik hidrolizden sonrası
(Abdel-Shafy et al., 2015)

2.1.6. Hurma zeytin

Zeytin, dalından koparıldığında başta oleuropein olmak üzere içerdiği yoğun fenolik bileşikler nedeniyle, doğrudan tüketilemeyecek kadar acı bir tatta olmaktadır. Bu nedenle zeytin, meyveye uygulanan kırma, ezme ve çizme gibi belirli işlemler sonrasında salamura edilerek, acı tadı veren maddelerin meyve dokusundan uzaklaştırılması gerekmektedir (Aktaş vd., 2014).

Karaburun Yarımadası'nda Erkence zeytin çeşidinin meyvelerinin ağaç üzerindeyken acılıklarının kaybolarak yenebilir hale gelmeleri sonucu oluşan zeytin meyvesine "Hurma" zeytin denmektedir. Hurma zeytinin bu olgunlaşma süreci ise "Hurmalaşma" olarak ifade edilmektedir. Bu işlemin sonunda, zeytin hala ağaçta iken acı tadını kaybeder ve içeride koyu kahverengimsi bir renge ve buruşuk bir dış tabakaya sahip olup, bu işleme girmeyen diğer zeytinlerden farklı fiziksel özellikleri göstermektedir. Hurma zeytini ağaçta olgunlaştığı için de, diğer sofralık zeytinlerin ihtiyaç duyduğu sofralık zeytin işleme adımlarından geçmek zorunda değildir. Bu nedenle, hipertansiyon gibi sağlık sorunları olan tüketiciler, bu zeytin türünü daha yüksek tuz içeriğine sahip olan sofralık zeytin yerine tercih etmektedirler (Aktaş vd., 2014).

Hurmalaşmanın iklim (çiğ oluşturacak nem koşullarının olması, denizden poyraz rüzgarının esmesi, sıcaklığın mevsim normallerinde olması gibi) ve toprak özellikleri dışında genotipine de bağlı olduğu, bazı tiplerin daha fazla hurmalaştığı ve hurma oluşumunun yıllara göre değişiklik gösterdiği de bilinmektedir. Hurmalaşmanın sadece bu yörelerde ‘’Erkence’’ zeytin çeşitlerinde gerçekleşmesinin sebebi ise diğer çeşitlerin kabuk kısımlarının Erkence zeytine göre daha kalın olması nedeniyle bu oluşumunun gerçekleşmemesidir (Sevim vd., 2013).

Daha önce yapılan bir çalışmaya göre, acı tadın giderimi, etli kısımda yetişen ve oleuropeini hidrolize eden fungus *Phoma oleae* adlı fungusun varlığından kaynaklanmaktadır. Oleuropeinin, özellikle β -glukosidaz ile enzimatik hidirolizi, hem bakteri hem de funguslar için iyi bilinmektedir (Panagou, 2006).

Çeşitli araştırmalara göre, Yunanistan ve Tunus gibi ülkelerde de benzer zeytin türleri bildirilmiştir. Yunanistan'ın Thasos adasında yetişen tatlı Thasos zeytiniyle yapılan çalışmalar oleuropeinin acı lezzetlerden sorumlu olduğunu göstermektedir. Olgunlaşma sırasında funguslar ve bakteriler tarafından üretilen bir enzim olan β -glukosidaz ile hidroksitirozole ve türevlerine hidrolize edilir (Zoidou et al., 2010). Tunus'un güney bölgesinde yetişen Dhokar zeytinleri ile ilgili bir çalışmada da aynı durum görülmektedir. Bundan dolayı, olgunlaşma sırasında hidroksitirozol konsantrasyonu artarken, oleuropein konsantrasyonu azalır. Ek olarak, toplam fenol içeriği ve azalan şeker konsantrasyonu nispeten artmaktadır (Jemai et al., 2009).

Hurma zeytinin mikrobiyolojik karakterizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada Hurma zeytini üzerindeki mikrobiyal popülasyonun Erkence ve Gemlik zeytini ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Olgunlaşma döneminde, Hurma üzerindeki mikrobiyal büyüme, fenolik bileşikleri parçalayan ve Hurma zeytinin hurmalaşma aşamalarına neden olan enzim aktivitelerinde artışlara yol açabilir (Aktaş, 2013).

2.2. Endofitler

Endofitler, bitki dokularında yer alan mikrobiyal topluluğun bir parçasıdır. Bitki patolojisinin önemli ismi Alman botanikçi Anton de Bary 1886 yılında sürgün ve yaprakların iç dokularında kolonize olan mikroorganizmaları endofit olarak tanımlamıştır. Bu tanım daha sonra asemptomatik endofitlerin spesifikliğini açıklayabilmek için gözden geçirilmiş ve birçok farklı tanımlama yapılmıştır. Bacon and White (2000), endofitleri bitkilerin canlı iç dokularında kolonize olan ve herhangi bir olumsuz etki göstermeyen organizmalar olarak daha kapsamlı şekilde tanımlamışlardır. Bu organizmalar ksilem ve floem dahil olmak üzere bitkinin tüm kısımlarında bulunabilmektedir (Tejesvi et al., 2007; Beram et al., 2016). Tüm bu tanımlamaların yanı sıra, endofitler halen tam olarak açıklanamamaktadır. Bu karışıklığın sebebi ise bazı endofitlerin yaşam döngüsü boyunca sadece endofit olarak kalmamasıdır. Bu da mutualistik ve kommensalistik yaşama ek olarak endofitlerin; latent patojenleri, latent saprotrofları, mikorizal fungusları ve rhizobiumların kolonizasyonlarının erken aşamalarını içerebileceği anlamına gelmektedir. Bu nedenle, endofitler yaşam döngülerinin bir kısmında bir ya da birden fazla işleve sahip olabilmektedir (Porras-Alfaro and Bayman, 2011; Beram et al., 2016).

Genel olarak bakterileri ve fungusları içeren endofitler, bitki dokusuna kök, gövde, çiçek, yaprak veya kotiledondan giriş yapabilmekte ve bitkinin diğer dokularına bu kısımlardan yayılış gösterebilmektedir (Kobayashi and Palumbo, 2000; Beram et al., 2016). Yaşam şekillerine bağlı olarak obligat ya da fakültatif olabilirler. Obligat olanlar gelişimleri ve hayatta kalabilmeleri için konukçularına bağımlıdır. Fakültatif olanların ise konukçu bitkilerinin dışında mevcut bir yaşam döngüleri vardır (Su et al., 2010; Beram et al., 2016). Bitki endofit birlikteliğinde endofitler bitkiden karbonhidrat alırken, bitkinin biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı direnç kazanmasına yardımcı olurlar (Hamilton and Bauerle, 2012; Hamilton et al., 2012; Beram et al., 2016). Endofitler, konukçusunun herbivorlar ve patojenler gibi rakipleri ile etkileşimine aracılık etmekle birlikte bitki çeşitliliği ve topluluk yapılarını da etkilemektedir (Clay and Holah 1999; Beram et al., 2016). Ayrıca, endofitlerin metal direncinin yüksek olduğu, bitki

gelişimini arttırabildiği ve organik bileşenleri ayrıştırabildiği için bitkisel arıtımda kullanılabileceği bildirilmiştir (Chen et al., 2010; Beram et al., 2016).

2.2.1. Fungal endofitler

Endofitik funguslar, konakçıya herhangi bir zarar vermeden tüm yüksek bitkilerin canlı iç dokularında yaşam döngülerinin tamamını ya da bir kısmını tamamlamaktadırlar (Malhadas et al., 2017).

Funguslar, çoğu ekosistemde bulunan önemli bileşenlerdir; farklı ortamlarda besinlerin ayrıştırılması, geri dönüşümü ve taşınması gibi çok önemli süreçlerle yakından ilişkilidirler. Dünyada bir milyondan fazla farklı fungal türün olabileceği tahmin edilmektedir, bunların sadece küçük bir kısmı (yaklaşık %5) tespit edilmiştir (Hawksworth, 1991; Padhi et al., 2013). Ayrıca bitki endofiti olarak var olan birçok bakteri de vardır ve çoğu durumda endofitik funguslarla birlikte bulunurlar. Endofitlerin varlığı yüz yıldan uzun bir süredir bilinmektedir. Çoğu zaman aseksüel funguslar olarak yaşarlar ve faydalı parazitler veya gerçek simbiyotikler olarak tanımlanırlar. Konukçu bitkilerin dağılımını, ekolojisini, fizyolojisini ve biyokimyasını etkileyebilirler (Sridhar and Raviraja, 1995; Padhi et al., 2013).

2.2.2. Fungal endofitlerin önemi

İnsan hastalıklarının tedavisi ve/veya önlenmesinde ve ayrıca nutrasötikler ve fonksiyonel gıda ürünlerinin tasarımında kullanılan doğal biyoaktif bileşiklerin araştırılması, son birkaç yılda belirgin şekilde artmıştır (Malhadas et al., 2017). Hızla artan dünya nüfusunu karşılamak için gıda üretiminin arttırılması gerekmektedir. Ne yazık ki, özellikle de fitopatojen kaynaklı bitki hastalıkları nedeniyle ciddi tahıl kaybı hala kaçınılmazdır. İnsan genellikle dünya popülasyonunda fungal veya bakteriyel enfeksiyonların görülme sıklığındaki büyük artış sorunları ile karşı karşıyadır. Bu enfeksiyonlarla başa çıkmak için birçok yan etkisi olan kimyasal sentetik ilaçlar kullanılmaktadır (Strobel and Dasiy, 2003; Yu et al., 2010). Hem insan patojenleri hem de fitopatojenler, antibiyotiklerin etkinliğini büyük ölçüde azaltmak için “ilaç” dirençleri

geliştirmeye eğilimlidir. Buna göre, yenilenebilir, petrokimyasal olmayan, doğal olarak çevre dostu ve kolay elde edilebilir olması beklenen daha güvenli antimikrobiyal ajanların icadı için çalışmaya acil ihtiyaç vardır (Yu et al., 2010).

Birçok araştırma, endofitin modern tıp, tarım ve endüstride potansiyel yeni doğal ürünler kaynağı olduğunu kanıtlamıştır. Şimdiye kadar, antimikrobiyal aktiviteye sahip çok sayıda yeni doğal ürün endofitlerden izole edilmiştir. Endofitlerden antimikrobiyal bileşiklerin taranmasının, insan ve bitki patojeninin ilaca dirençli suşlarının artan tehdidinin üstesinden gelmek için umut verici bir yol olduğuna inanılmaktadır. Bu kazanımlar, endofitleri antibiyotik üretimi için yeni bir kaynak olarak kullanma fırsatı sağlayacaktır (Yu et al., 2010).

Endofitik funguslar en yeni doğal ürün üreticilerinden biridir. Konakçı fizyolojisi, savunma ve biyotik ve abiyotik baskılara karşı toleransı etkileyebilecek çok çeşitli biyoaktif sekonder metabolitler üretmektedir. Antimikrobiyal, antiparaziter, sitotoksik, antienflamatuar, antitümör, antioksidan ve nöroprotektif aktiviteleri olan bu sekonder endofitik metabolitlerin bazıları, benzersiz kimyasal yapılaraya sahip olan bileşiklerdir (Malhadas et al., 2017). Bu nedenle endofitik fungusların incelenmesi, bu fungusların sekonder metabolitlerin üretimi için de kullanılabileceği ve zararlı böcek direnci sağlayabilen ve diğer önemli özellikleri eksprese edebilecek genlerin klonlanması için vektörler olarak kullanılma potansiyellerinden dolayı önemlidir (Sia, 2013).

Bakterilerin antibiyotiklere direnci küresel bir endişe haline gelmiştir ve yeni antibakteriyel ajanların aranması hızlı bir şekilde devam etmektedir. Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (Infectious Diseases Society of America - IDSA), 2020 yılına kadar 10 yeni antibiyotik sınıfının geliştirilmesini destekleyen bir girişim başlatmıştır (IDSA, 2010). Endofitik funguslar, sekonder metabolitlerinin kimyasal çeşitliliği nedeniyle, yeni antimikrobiyal bileşiklerin potansiyel kaynaklarından biridir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda, alkaloidler, peptidler, steroidler, terpenoidler, fenoller, fenilpropanoidler, alifatik bileşikler, polyketidler, kinonlar ve flavonoidler, ve aynı zamanda esterler, lipidler, alkoller, asitler, ketonlar gibi uçucu organik bileşikler (VOC'ler) dahil olmak üzere çeşitli

yapısal sınıflara ait endofitik funguslar tarafından üretilen çok çeşitli yeni antimikrobiyal bileşikler rapor edilmiştir (Malhadas et al., 2017).

2.2.3. Bitki-endofit etkileşimleri

2.2.3.1. Konak bitki faktörleri ve endofitik yaşam tarzı

Konukçu bitkilerinin kök eksüdatları, endofitler dahil olmak üzere yararlı mikroorganizmaları çeken veya tanıyan biyomoleküller bakımından zengindir. Eksüdatlar ayrıca mikroorganizmayı çeken besin ve su bakımından da zengindir. Flavonoidler, birkaç bitki tarafından salgılanan ve kökler ile endofitik etkileşimlerinde önemli rol oynayan bir metabolittir (Khare et al., 2018).

Son zamanlarda, *Arabidopsis thaliana*'nın kökleri tarafından salgılanan strigolaktonun (SL), endofitik *Mucor* sp.'nin kolonizasyonu için bir sinyal molekülü görevi gördüğü bulunmuştur (Rozpadek et al., 2018). López-Ráez et al. (2017) göre, SL ayrıca bitkide simbiyotik sinyal yolunu uyaran kısa zincirli kitin oligomerlerinin sentezini ve salımını da etkinleştirmektedir (López-Ráez et al., 2017).

Bitki hücre çeperi proteinlerinin yüksek oranda glikosile edilmiş üyeleri olan arabinogalaktan proteinleri (AGP'ler), bitkinin mikroorganizma ile birkaç aşamada etkileşime girmesinde rol oynar, hidroksiprolin bakımından zengin glikoprotein (HRGP) üst ailesinin üyeleridirler. Bu proteinler kök kolonizasyonunda, mikroorganizma kovucu veya cezbedici olarak çalışır ve enfeksiyon yapılarının gelişiminde önemli bir role sahiptirler (Nguema-Ona et al., 2013). Şekerler, amino asitler, organik asitler, fenolik bileşikler ve diğer sekonder metabolitler, endofitleri seçici olarak davet eden bitki kökleri tarafından salgılanan ürünlerdir (Chagas et al., 2017; Khare et al., 2018).

Bunun dışında, bitkilerin endofitler gibi faydalı mikroorganizmaları patojenlerden ayırmak için kullandıkları stratejileri bulmak hala bir araştırma konusudur. Bitki bağışıklık sisteminin faydalı mikroorganizmaların bitki dokularına girmesine izin vermedeki rolünü gösteren çalışmalar bulunmaktadır

(Fesel and Zuccaro, 2016). Bitki gen ekspresyonu ve mikro RNA'lar (miRNA'lar) hakkındaki son bulgular, bitkilerde genlerin ve yolakların tepkisinin endofitik mikroorganizmaya bağılı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, etilen (ET) / jasmonik asit (JA) / salisilik asit (SA) sinyal yolları, mikroorganizmadan bağımsız olarak çalışmaktadır. Kusajima et al. (2018) bakteriyel endofit *Azospirillum* sp. B510'un pirinçte sistemik hastalık direncini indüklediğini ve ayrıca gen ekspresyon analizinin, pirinçte endofit aracılı indüklenen sistemik direnç (ISR) için ET sinyalinin gerekli olduğunu belirtmiştir (Kusajima et al., 2018).

Endofitlerin etkileşimi ile konukçuda indüklenen miRNA'ların çoğunun aynı zamanda hormon-cevap yollarını da hedeflediği bildirilmektedir (Formey et al., 2014). Arbüsküler mikorizal fungus (AMF) enfeksiyonu sırasında, miRNA'lar düzenlenerek, karşılıklı ilişkilere karşı baskılayıcı etki için bilinen gibberellik asit (GA) sinyal yolunu bozarlar (Formey et al., 2014; Martín-Rodríguez et al., 2015; Wu et al., 2016). Bitki ayrıca, farklı mikroorganizma kümeleri ile kolonizasyon sırasında farklı gen gruplarının ekspresyonunu indükleyebilir. Örneğin, simbiyozun oluşumu sırasında, miRNA'ların bitki savunma sistemi için hedeflediği yolların çoğunluğu, aksi takdirde endofitlerin çoğalmasını engelleyebilecek şekilde kapatılır (Plett and Martin, 2018; Khare et al., 2018).

Lateral gen transferi genetik çeşitliliği teşvik etmede ve bitkilerin endosferini kolonize etmek ve her iki ortağa da avantaj sağlayan sekonder metabolitlerin üretilmesi için önemli özelliklerin kazanılmasında önemli bir rol oynar (Tisserant et al., 2013; Arora et al., 2018). Lateral gen transferinin faydalı bir rolünü gösteren bir örnek, fitotojenik funguslara karşı savunmaya katılan bir enzim olan mannitol dehidrojenazı üreten bakteriyel endofit için genin varlığıdır. Bu gen endofitlere endosferde rekabetçi bir avantaj sağlar (Wu et al., 2011). Endofitik *Enterobacter* sp.'in, büyük konjugatif bir plazmit üzerinde, konak-bakteri etkileşimleri için önemli olan amino asit / demir taşınması, hemolisin ve hemaglutinin için genlere sahip olduğu bildirilmiştir (Taghavi et al., 2010). Güçlü genlerin yeri böylece endofitik yaşam tarzı hakkında ipuçları verebilir (Khare et al., 2018).

Konukçu bitkilerin türleri ve genotipi ayrıca bitki endosfer mikrobiyomunu da önemli ölçüde etkiler (Rodriguez-Blanco et al., 2015; Ding and Melcher, 2016). Bazı endofitlerde, yaşam tarzlarının patojenik duruma değişmesinin, lokal olarak meydana gelen abiyotik stres faktörlerine ek olarak konukçu genotipine de bağlı olduğu bulunmuştur (Bacon et al., 2008). Örneğin, mısırda, *Fusarium verticillioides* bir patojen veya bir endofit olarak yaşayabilir. Benzer şekilde, *Ramularia collo-cygni*, mahsulün gelişimi sırasında, asemptomatik bir endofit olarak yaşar, ancak daha sonra büyüme mevsiminde nekrotrofik patojen olmaya geçebilir. Bununla birlikte, endofitten patojene fungal geçişten sorumlu olan ekzojen veya endojen faktörler tam olarak anlaşılmamıştır. Endofitizmin dinamiklerini daha iyi anlamak için, aynı mikroorganizmanın mutualist veya patojen olarak davrandığı koşullar ve gen ifadeleri (hem bitkilerde hem de endofitlerde) etkisi altında olan karşılaştırmalı çalışmalar yapılması gerekmektedir (Khare et al., 2018).

2.2.3.2. Bitkisel bağışıklık sisteminin endofitlerle modülasyonu

Endofitler, konukçu bitkiye girmek için, bitki bağışıklık sisteminin ilk savunma hattını geçmesi gerekir. Bu, mikroorganizma veya patojene bağlı moleküler modeller (MAMP (microbe-associated molecular pattern)'ler veya PAMP (pathogen-associated molecular pattern)'ler) olarak da bilinen, birçok mikroorganizmanın karakteristik özelliği olan korunmuş moleküllerin, bitkiler tarafından tanınmasını içerir. Flagellin (Flg; flg22), uzama faktörü TU (EF-Tu; elf18/26), peptidoglikan (PGN), lipopolisakkaritler (LPS), bakteriyel soğuk şok proteinleri (RNP1motif), bakteriyel süperoksit dismutaz (Sod), β -Glikan (GE) ve kitin MAMP'larda en çok olarak kullanılanlardır. Bu MAMP'ler bitki hücrelerinin yüzeyinde pattern tanıma reseptörleri (PRR'ler) ile tanınırlar. Fungal endofitlerin etkileşiminde, bitkiler üzerindeki kitin spesifik reseptörler (PR-3), fungal hücre duvarı üzerinde oluşan kitin oligomerlerini tanımakta, bu da daha ileri savunma reaksiyonlarını tetiklemektedir. Bununla birlikte, endofitler kendilerini bitki savunma mekanizmalarından korumak için mekanizmalar da kullanırlar. Örneğin, Cord-Landwehr et al. (2016), fungal endofitlerin, bitkilerin reseptörleri tarafından algılanmayan kitosan oligomerlerini deasetile eden kitin deasetilaz ürettiklerini bildirmiştir; bu nedenle, kendilerini tanımlarını engellerler. Ayrıca endofitik

bakterilerin, bitkilerin PRR'leri tarafından tanınmayan kendi MAMP'lerini ürettiği bilinmektedir, patojenik etkileşimlere kıyasla nispeten zayıf ve geçici bir savunma reaksiyonu tetiklerler (Khare et al., 2018).

2.2.3.3. Biyotik ve abiyotik streslere karşı direnç artışı

Endofitik funguslar bitkiyi hastalık ve zararlılardan korurken bunun yanında abiyotik streslerin yatıştırılması, içsel fizyolojik streslerin iyileştirilmesi gibi çeşitli birçok yararlı etkiye de sahiptirler. Bazı araştırmacılar bitkilerin maruz kaldığı çeşitli stres faktörlerinin zararlarının azaltılması için bitkinin kendisinin değil daha çok endofitik fungusların rolünün olduğunu bildirmişlerdir (Tanaka et al., 2005; Vega et al., 2008; Lugtenberg et al., 2016; Lata et al., 2018).

Yapılan birçok çalışmada ekstrem sıcaklıklar, yüksek ışık, sel, kuraklık, toksik metaller, radyasyon, yaralanmalar, predatör böcekler, çeşitli patojenlerin varlığı, yüksek tuz miktarı, çevresel organik kirleticiler gibi çok sayıda abiyotik ve biyotik stres koşullarının bitki gelişimini inhibe ettiği vurgulanmıştır. Ortamda bulunan stres faktörleri giderilinceye ya da bitki metabolizması bu stresin üstesinden gelinceye kadar bitki yaşamı süresince streslere maruz kalmaktadır. Öldürücü olmayan stres dönemlerinde ise bitki gelişimi yavaşlar veya durur. Bu yüzden gelişme aşamasındaki bitkinin asıl verimi stres faktörlerinin yoğunluğuna ve miktarına bağlı olarak değişmektedir (Glick et al., 1999).

Biyotik streslere direnç artışı

Endofitlerin, antagonistik aktivite ile fitopatojenleri baskıladığı bilinmektedir. Endofitlerin, bitkilerde fitopatojenlere karşı ISR (indüklenen sistemik direnç)'nin uyarılmasında rol oynadığı bilinmektedir. Endofitlerin ayrıca bitki fizyolojik tepkilerini ve savunma yollarını etkileyen konak genetik ifadesini düzenlediği de bildirilmektedir. Özellikle salisilik asit ve jasmonik asidin fitopatojenlere karşı bitki stres tepkilerinde önemli rol oynadığı bilinmektedir. Gibberellin üreten endofitlerin, fitopatojen ve böcek saldırılarına karşı SA ve JA yolları ile direnç arttırdığı bilinmektedir. Kavroulakis et al. (2007), *Fusarium solani* nin, kök dokularında patogeneze ile ilgili gen ekspresyonunun indüklenmesi

yoluyla, *Septoria lycopersici*'ye (domates yaprak patojeni) karşı ISR verdiğini bildirmiştir. Yaprak endofitik fungusu, *Colletotrichum tropicale*, ile aşıl原因 *Theobroma kakao* bitkisi, *Phytophthora* enfeksiyonunda azalma göstermiştir. *Colletotrichum tropicale* nin aşıl原因ması, ET (etilen) savunma yolunun birçok bileşenin ve *Theobroma cacao*, *Arabidopsis thaliana* ve diğer konukçu bitkilerde hastalık direncinden sorumlu olan birkaç diğer sinyal geninin eksprese edilmesine neden olmuştur (Mejía et al., 2014).

Endofitik bakterilerin, fitopatogenik bakterilere, funguslara ve nematodlara karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip çeşitli uçucu organik bileşikler (VOC'ler) ürettiği bilinmektedir. Arora et al. (2001), siderefor üreten *Rhizobium* un, bazı ürünlerde kömür çürümesine neden olan fitopatogen *Makrofomina phaseolina*'nin biyolojik kontrolünde rol oynadığını bildirmiştir (Arora et al., 2001). Mercado-Blanco et al. (2004), *Verticillium*'a karşı antagonistik zeytin ağaçlarının köklerinden endofitik *Pseudomonas fluorescence* izole etmişlerdir (Mercado-Blanco et al., 2004). Etminani and Harighi (2018) ilk kez *Pseudomonas syringae* ve *Pseudomonas tolaasii*'nin kontrolünü gösteren yabani fıstıktan elde edilen endofitik *Pantoea*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia* ve *Stenotrophomonas*'ın antagonistik suşlarını bildirmişlerdir (Etminani and Harighi, 2018; Khare et al., 2018).

Bitkilerin, terpenoidler gibi çeşitli metabolit gruplarını içeren fitoaleksinler adı verilen düşük moleküler ağırlıklı antimikrobiyal molekülleri ürettiği bilinmektedir. Yong et al. (2009) yaptıkları bir çalışmada, endofitik fungus *Fusarium* spp. tarafından, terpenoidlerin içeriğinde ve *Euphorbia pekinensis* bitkisinin büyümesinde bir gelişme olduğu gösterilmiştir (Yong et al., 2009). Konak dokularda endofitlerin varlığı, konukçu tepkisini ortaya çıkararak veya antagonistik metabolitleri kendileri üreterek patojenlere karşı dirençlerini arttırabilir. Böylece, endofitlerin ve konukçu bitkinin gen havuzları, bitkinin parazitlerden korunması için birlikte çalışırlar (Khare et al., 2018).

Abiyotik streslere direnç artışı

Kuraklık, tuzluluk, aşırı sıcaklıklar, ağır metal toksisitesi ve oksidatif stres gibi abiyotik stresler tarım ekosistemi için ciddi tehditlerdir. Bitkilerde stres toleransının arttırılması için endofitler tarafından uygulanan moleküler mekanizmalar, strese cevap veren genlerin indüklenmesi ve ekspresyonu ve antistres metabolitlerinin sentezlenmesini içermektedir (Lata et al., 2018).

Bitki hücreleri ve organelleri için reaktif oksijen türlerin (ROT) zarar verici etkilerinden korumak açısından antioksidan savunma sistemlerinin rolü çok önemlidir. Bitkilerde bulunan bu antioksidan sistem enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan olarak ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik savunma sisteminde süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), askorbat peroksidaz (APX), peroksidaz (POD), glutatyon redüktaz (GR) ve monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR) enzimleri bulunmaktadır. Enzimatik olmayan savunma sistemi ise askorbat (AsA), glutatyon (GSH), tokoferol, lipoik asit, karotenoid, antosiyanin ve flavonoidlerden oluşmaktadır. CAT, APX, MDHA ve GR gibi antioksidant enzim aktivitelerinin artışı abiyotik stres faktörlerine karşı önemli rol oynamaktadır (Kızılkaya, 2015).

Baltruschat et al. (2008) *Piriformospora indica*'yı yapay olarak bitkiye enfekte ederek antioksidant enzim aktivitelerini arttırmayı başarmışlardır. ROT süpürücü antioksidant enzimlerin veya prolin sentezi bitkiler tarafından aktive edilebildiği gibi aynı zamanda endofitik funguslar tarafından da aktive edilebilmektedirler (Baltruschat et al., 2008). Bunun için en iyi örnek *Piriformospora indica* ile inoküle edilmiş bitkilerin kök ve yapraklarında antioksidant bileşiklerin, antioksidatif enzimlerin seviyelerinin artması ve H_2O_2 seviyesinin azaldığının gösterilmesidir. Fungal ekolojideki araştırmalar strese karşı direncin bitkinin kendisinden değil daha çok dokularında yaşayan endofitik funguslar tarafından gerçekleştirildiğini ortaya koymuştur (Kuldau and Bacon, 2008).

Stres koşullarında köklerde ROT üretimi kapasitenin üzerine çıkarak lipid peroksidasyonu yoluyla hücre bileşenlerine zarar verebilecek seviyelere kadar

yükselebilir. Bu tür durumlarda endofitik funguslar ROT seviyesini düzenleyerek biyotik ve abiyotik streslerin neden olduğu zararı engelleyebilirler. Endofitlerle enfekteli bitkilerde büyümenin artışı, kuraklık stresine dirençlilik, sıcaklık stresi, tuz stresi ve uygun olmayan toprak koşullarına tolerans ve fungal patojenlerin sebep olduğu streslere karşı direncin arttığı gösterilmiştir (Kızılkaya, 2015).

Khan et al. (2011) yaptıkları bir çalışmada *Penicillium minioluteum*'un soya fasülyesi ile birlikteliği sonucu tuz stresi şartlarında gövde uzunluğu, taze ve kuru ağırlık, klorofil içeriği ve yaprak alanı gibi büyüme parametrelerinin bu birliktelik sayesinde önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir. Araştırmacılar bu iyileşmenin fungusun bitki hormonları ve flavonoidlerin biyosentezini etkilemesi sonucu gerçekleşmiş olabileceğini bildirmişlerdir (Khan et al., 2011).

Trichoderma endo-kitinazı, bitki savunmasındaki proteinleri indükleyerek bitki savunmasını güçlendirmektedir. *Trichoderma* inokülasyonu etkisi ile oksidatif strese karşı koruma sağlayan glutatyon redüktaz gibi enzimlerin regülasyonu sağlanmaktadır. Yapılan proteomik çalışmalar da bitkinin dirençle ilgili proteinleri indüklediğini göstermektedir (Harman and Shores, 2007).

Fitohormonlar, bitkilerde abiyotik stresin toleransında kritik rol oynarlar. Bitki hormonu absisik asit (ABA) kaynaklı stoma kapanması ve bitki büyümesinin düzenlenmesi, bitkideki ozmotik ve diğer abiyotik streslerle mücadeleye katkıda bulunur. ABA biyosentezi ve ABA kaynaklı sinyal yolları, tuz stresi koşulları altında bitki büyümesinin artmasına katkıda bulunabilecek bitki endosferinde faydalı mikroorganizmaların varlığı ile modüle edilmektedir. Peskan-Berghofer et al. (2015), faydalı fungus *Piriformospora indica* ve *Arabidopsis thaliana* kökleri arasında ortak bir simbiyoz kurulmasında ABA'nın gerekliliğini göstermiştir. Aquaporin, dehidrin ve malonaldehit genlerinin yükselmesi, endofitik *Trichoderma harzianum*'un aşılansıyla pirinçte abiyotik streslerin azaltılmasında bildirilmiştir (Khare et al., 2018).

Patates endofiti olan *Burkholderia phytofirmans* PsJN üzerine yapılan bir çalışmada, bakterilerin değişen çevresel koşulları algılamasına ve metabolizmalarını buna göre iyileştirmelerine olanak tanıyan bir hücre yüzeyi

sinyal elemanı (ekstretoplazmatik fonksiyon grubu IV sigma faktörleri) için modüle edilmiş gen ekspresyonu gösterilmiştir (Sheibani-Tezerji et al., 2015).

Çok çeşitli endofitik Proteobakterilerin, bitkilerin metabolizmalarına katkıda bulunarak herbisitlerin şiddetli etkilerinden koruduğu gösterilmiştir. Bir çalışmada Germaine et al. (2006), 2,4-diklorofenoksiasetik aside maruz kaldıklarında, *Pseudomonas* endofiti olan bitkilerin dokularında herbisit birikimi göstermediğini bildirmiştir (Germaine et al., 2006). *Pseudomonas punonensis* D1-6 genomu, bu endofitik bakterilerin konakçıdaki herbisit direncindeki rolünü gösteren birçok herbisite dayanıklılığı sağlayan ve herbisiti metabolize edici gen içerdiğini ortaya koymaktadır (Lafi et al., 2017).

2.2.3.4. Bitkisel sekonder metabolitlerin üretiminde endofitlerin metabolomiği ve rolü

Uzun bir süre, endofitlerin konukçu bitkileri ile birlikte bir arada bulunmaları ve evrimleşmesi bitkilerde biyoaktif metabolitlerin üretimini önemli ölçüde etkileyen bir faktör olarak değerlendirilmiştir. Endofitik toplulukların konukçu bitki ile etkileşimi, yeni sekonder metabolitlerin sentezine yol açan sessiz gen kümelerinin aktivasyonu gibi bitkinin fizyolojik süreçlerini önemli ölçüde etkilemektedir (Khare et al., 2018).

Hem bitkinin hem de endofitlerinin birçok ortak sekonder metabolit üretebileceği iyi bilinen bir gerçektir. Bu tür biyoaktif bileşikler arasında, antibiyotikler, antitümör bisindol alkaloitleri (vinblastin ve vincristine), antikanser ilaç kamptotesini, podofilotoksin ve böcek ilacı azadirachtin bulunmaktadır. Antikanser aktivitesine sahip en çok çalışılan biyoaktif bileşiklerden biri, porsuk bitkisinden ve fungal endofiti *Taxomyces andreanae*'den taksolün sentezidir. Howitz and Sinclair (2008) tarafından yapılan hipotez, bitkilerde ve mikroorganizmalarda mevcut olan homolog gen kümelerinin, belirli koşullar altında bitki konukçularından veya endofitlerden stres kaynaklı moleküller ile çapraz olarak aktive edilebileceğini belirtmektedir (Howit and Sinclair, 2008; Khare et al., 2018).

Endofitlerin konukçu sekonder metabolitlerin üretimi üzerindeki kesin etkisi hakkında birçok rapor vardır, ancak ilgili mekanizmalar tam olarak bilinmemektedir. Bir endofitik actinobacterium *Pseudonocardia*, *Artemisia* bitkisinde artemisinin üretimini sitokrom P450 monooksijenaz ve sitokrom P450 oksidoredüktaz genlerinin ekspresyonunu indükleyerek gerçekleştirmiştir. Pandey et al. (2016) yaptıkları çalışmada, *Papaver somniferum* L.'nin endofitlerinin (*Acinetobacter* sp. ve *Marmoricola* sp.) benzilizokinolin alkaloit biyosentezi için anahtar genlerin ekspresyonunu arttırdığını bulmuşlardır (Pandey et al., 2016). Çalışmalar aynı zamanda, *Catharanthus roseus* bitkisinde bulunan fungal endofitler *Curvularia* sp. ve *Choanephora infundibulifera* nın, terpenoid indol alkaloid yolu genlerinin ekspresyonunu uyardığını göstermektedir. *Crotalaria* bitkisinin herbivorlara karşı kimyasal savunmasında esas olan pirolizidin alkaloitlerin (PA) biyosentezi, *Bradyrhizobium* tarafından yapılan nodülasyona bağlıdır. Yalnızca nodüllerde PA yolunun ilk enzimi olan hooperermidin sentaz (HSS) transkriptlerinin varlığı, PA biyosentezinin nodüllerle sınırlı olduğunu gösterir. Bu nedenle nodüller, alkaloitlerin bitkinin toprak üstü kısımlarına taşındığı kaynaktır. Bununla birlikte, PA'lar gibi, yeni uygulamalara sahip daha birçok biyoaktif sekonder metabolitin, konukçu bitkide endofitlerin mevcudiyeti ile sentezlenmesi olasılıkları olabilir (Khare et al., 2018).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışma materyalleri

Çalışmamızda İzmir Karaburun Yarımadasında dalında olgunlaşan Hurma zeytin örnekleri kullanılmıştır. Karaburun bölgesinin Eğlenhoca, Kösedere, İncelik, Amberseki ve Saip köylerinden alınan Hurma zeytinlerden endofitik fungus izolasyonu yapılmıştır. Bunun dışında karşılaştırma amaçlı İzmir, Manisa ve Bursa'dan zeytin örnekleri de alınarak endofitik fungus izolasyonu yapılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.1.2. Kullanılan besiyerleri

Besiyeri 1: Potato Dextrose Agar (PDA) (Merck, 110130)

Potato infusion	4,0 gr/lt
D-Glukoz	20,0 gr/lt
Agar	15,0 gr/lt
Distile su	1000 ml

Bu besiyeri ticari olarak hazır haldedir. Litresinde 39 gr olacak şekilde distile su içerisinde çözündürülerek, 121°C'de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. Sonrasında endofitik fungusların ilk izolasyonu, saflaştırılması ve tanılanması aşamalarında kullanılmak üzere 25'er ml şeklinde steril petrilere paylaştırılmıştır. Saf kültürlerin stoklanmasında ise; distile su ile çözülerek hazırlanan besiyeri kaynatılarak cam tüplere 5'er ml gelecek şekilde paylaştırılmıştır. 121°C'de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlandıktan sonra yatık halde dondurularak saf kültürlerin stoklanmasında kullanılmıştır.

Besiyeri 2: Czapek Yeast Agar (CYA 5, CYA 25, CYA 37)

K ₂ HPO ₄	1.0 gr/lt	(Merck, 105101)
Czapek Konsatresi	10.0 ml	
Yeast Extract	5.0 gr/lt	(Merck, 103753)
Sukroz	30.0 gr/lt	(Merck, 107651)
Agar	15.0 gr/lt	(Merck, 101613)
Distile su	1000 ml	

İzole edilen *Penicillium* türlerinin 5 °C, 25°C ve 37°C'deki morfolojik gelişimlerini inceleyerek fenotipik tanımlanmasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. İstenen miktarlarda uygun olarak tartılan bileşenler distile su ile karıştırılarak, 121°C'de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sonrasında steril petrilere 25'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 3: Malt Extract Agar (MEA)

Malt Extract	20,0 gr/lt	(Merck, 105391)
Peptone	1,0 gr/lt	(Merck, 107214)
D-Glukoz	20,0 gr/lt	(Sigma, SZBA3420V)
Agar	20,0 gr/lt	(Merck, 101613)
Distile su	1000 ml	

Malt Ekstrakt Agar izole edilen endofitik fungus türlerinin kültüve edilmesinde ve fenotipik olarak tanımlanmasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. İstenen miktarlarda uygun olarak tartılan bileşenler distile su ile karıştırılarak, 121°C'de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sonrasında steril petrilere 25'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 4: Malt Extract Broth

Malt Extract	20.0 gr/lt	(Merck, 105391)
Peptone	1.0 gr/lt	(Merck, 107214)
D-Glukoz	20.0 gr/lt	(Sigma, 16301)
Distile su	1000 ml	

Malt Ekstrakt Broth besiyeri, DNA izolasyonu için çalkalamalı kültürde pellet elde edilmesinde kullanılmıştır. Hazırlanan besiyeri erlenlere 100'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır. Sonrasında 121°C'de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Besiyeri 5: %25 Glycerol Nitruate Agar (G25N)

Czapek Konsantresi	10 ml	
K ₂ HPO ₄	1 gr/lt	(Merck, 105101)
Yeast extract	4.94 gr/lt	(Merck, 103753)
Gliserol	333.32 gr/lt	(Merck, 104092)
Agar	16 gr/lt	(Merck, 101613)
Distile su	1000 ml	

İzole edilen *Penicillium* türlerinin fenotipik olarak tanılanmasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. İstenen miktarlarda uygun olarak tartılan bileşenler distile su ile karıştırılarak, 121°C'de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sonrasında steril petrilere 15'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 6: Nötral Kreatin Sukroz Agar (CSN)

Kreatin Sukroz Konsantresi	10 ml	
Sukroz	10 gr/lt	(Merck, 107651)
Kreatin	5 gr/lt	(Sigma, C0780)
KH ₂ PO ₄	1 gr/lt	(Merck, 104873)
Bromocresol purple	0.05 gr/lt	(Merck, 103025)
Agar	15 gr/lt	(Merck, 101613)
Distile su	1000 ml	

İzole edilen *Penicillium* türlerinin fenotipik olarak tanımlanmasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. İstenen miktarlarda uygun olarak tartılan bileşenler distile su ile karıştırılarak, 121°C'de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sonrasında steril petrilere 15'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

Besiyeri 7: Oatmeal Agar (OA)

Yulaf unu	30 gr/lt	(OTS, Organik Yulaf Unu)
Agar	15 gr/lt	(Merck, 101613)
Distile su	1000 ml	

İzole edilen endofitik fungus türlerinin fenotipik olarak tanımlanmasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. İstenen miktarlarda uygun olarak tartılan bileşenler distile su ile karıştırılarak, 121°C'de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Sonrasında steril petrilere 25'er ml olacak şekilde paylaştırılmıştır.

3.1.3. Tamponlar ve çözeltiler

3.1.3.1. Yüzey sterilizasyonunda kullanılan tamponlar ve çözeltiler

Etanol [% 70'lik]

Etanol	70 ml	(Sigma, SZBG1890V)
Distile su	30 ml	

Zeytin örneklerinin yüzey sterilizasyonu işleminde kullanılmıştır.

Sodyum Hipoklorit (NaClO) Solüsyonu [% 2.5]

NaClO	2.5 ml
Distile su	97.5 ml

Zeytin örneklerinin yüzey sterilizasyonu işleminde kullanılmıştır.

3.1.3.2. Fenotipik tanılamada kullanılan çözeltiler

Czapek Konsantresi

NaNO ₃	30.0 gr/lt	(Merck, 106535)
KCl	5.0 gr/lt	(Merck, 104936)
MgSO ₄ .7H ₂ O	5.0 gr/lt	(Merck, 105886)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 gr/lt	(Merck, 103965)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1 gr/lt	(Merck, 108883)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05 gr/lt	(Merck, 102790)
Distile su	100 ml	

Czapek konsantresi *Penicillium* türlerinin tanımlanmasında kullanılan CYA ve G25N besiyerlerinin içerisine eklenmek üzere hazırlanmıştır. Bu çözelti otoklavda steril edilmeden +4 °C’de saklanmaktadır. Çözelti, tanılama ortamlarının hazırlanmasında kullanılmadan önce çökelme olabileceği için çalkalanmaktadır.

Kreatin Sukroz Konsantresi

KCL	5 gr/lt	(Merck, 104936)
MgSO ₄ .7H ₂ O	5 gr/lt	(Merck, 105886)
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.1 gr/lt	(Merck, 103965)
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.1 gr/lt	(Merck, 108883)
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.05 gr/lt	(Merck, 102790)
Distile su	100 ml	

Kreatin Sukroz konsantresi *Penicillium* türlerinin tanımlanmasında kullanılan CSN besiyerinin içerisine eklenmek üzere hazırlanmıştır. Bu çözelti otoklavda steril edilmeden +4 °C’de saklanmaktadır. Çözelti, tanılama ortamlarının hazırlanmasında kullanılmadan önce çökelme olabileceği için çalkalanmaktadır.

3.1.3.3.DNA izolasyonunda kullanılan tamponlar ve çözeltiler

Lizis Tamponu [pH: 8]

EDTA	2.35 gr/lt	(Glenthams, GE3023)
Tris HCl	6.3 gr/lt	(Glenthams, GP7166)
NaCl	0.9 gr/lt	(Merck, 106404)
SDS	1 gr/lt	(Glenthams, GD2962)
Distile su	100 ml	

Endofitik fungus türlerinin manuel DNA izolasyonu işleminde kullanılmıştır. İstenen miktarlarda uygun olarak tartılan bileşenler distile su ile çözündürülerek, 121°C’de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir.

Potasyum Asetat Tamponu [pH: 4,8]

Potasyum asetat	14.7 gr/lt	(Sigma, SLBR2628V)
Glasiyel asetik asit	5.75 ml	(Riedel De Haen, 27225)
Distile su	29.55 ml	

Endofitik fungus türlerinin manuel DNA izolasyonu işleminde kullanılmıştır. 14,7 gr potasyum asetat, 29,55 ml distile su ile çözündürülerek, 121°C’de, 1.1 atm basınçta, 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Otoklav sonrasında 5,75 ml glasiyel asetik asit ilave edilmiştir.

İzopropil Alkol (C_3H_8O) (Tekkim, 211016132001)

Endofitik fungus türlerinin manuel DNA izolasyonu işleminde kullanılmıştır.

Etanol [% 70’lik]

Etanol	70 ml	(Sigma, SZBG1890V)
Distile su	30 ml	

Endofitik fungus türlerinin manuel DNA izolasyonu işleminde kullanılmıştır.

Ultrasaf su (Eau-Bi-Distillee)

Manuel DNA izolasyonunun son aşamasındaki etanolün uçurulması işleminden sonra DNA süspansiyonunu hazırlamak için kullanılmıştır.

3.1.3.4. PCR işleminde kullanılan tamponlar ve çözeltiler

- Ultrasaf su (Eau-Bi-Distillee)
- Taq DNA Buffer (Thermo Fisher Scientific, 500 U, 10X)
- MgCl₂ Solüsyonu (Thermo Fisher Scientific, 500 U, 25nM)
- dNTP Karışımı (Thermo Fisher Scientific, 10nM)
- Primerler (Invitrogen)
- Taq DNA Polimeraz (Thermo Fisher Scientific, 500 U)

PCR hedef bölge	Primer Adı	Dizi (5' → 3')	
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(Samson et al., 2014)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(Samson et al., 2014)
28S	LR0R	GTACCCGCTGAACTTAAGC	(Lin et al., 2015)
	LR7	TACTACCACCAAGATCT	(Lin et al., 2015)

3.1.3.5. Agaroz jel elektroforezinde kullanılan tamponlar ve çözeltiler

Tris Borik Asit Edta (TBE) Tamponu

- 5X Stok TBE Solüsyonu:

Tris Base	10.8 gr/lt	(Glenthams, 103QGF)
Borik Asit	5.5 gr/lt	(J.T.Baker, 00300020030)
EDTA	0.75 gr/lt	(Glenthams, 226JXM)
Distile su	182.95 ml	

- 1X Kullanıma Hazır TBE Solüsyonu:

5X TBE	200 ml
Distile su	800 ml

TBE solüsyonu, agaroz jel elektroforezinde kullanılan agaroz (Prona, Biomax) jelin hazırlanmasında ve yürütme tankının doldurulmasında kullanılmak üzere hazırlanmıştır.

Yükleme Boyası (Thermo Fisher Scientific, 6X Orange DNA Loading Dye)

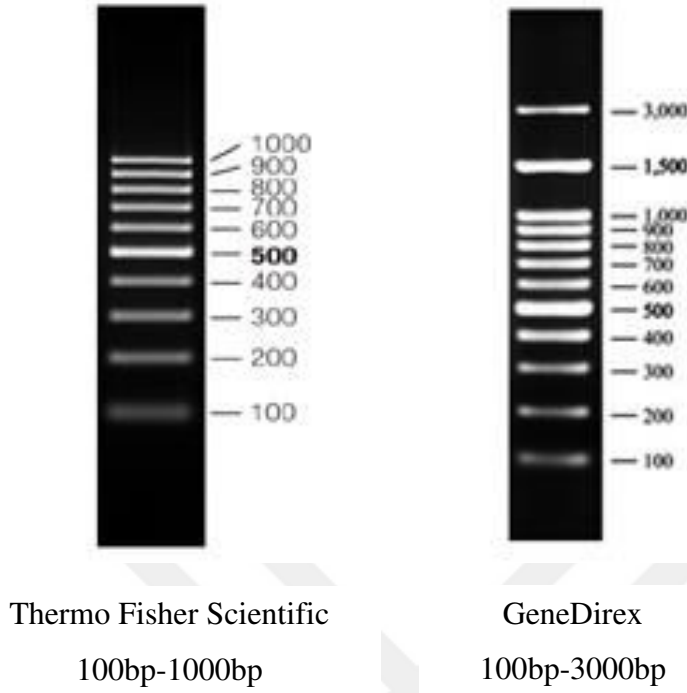
Agaroz jel elektroforezinde yükleme boyası olarak 6x Orange DNA Loading Dye kullanılmıştır. DNA örnekleri ve PCR ürünleri yükleme boyası ile karıştırılarak birlikte jel kuyucuklarına yüklenmiştir.

GelRed (Biotium)

Agaroz jel elektroforezinde UV altında DNA örneklerinin ve PCR ürünlerinin görüntülenmesinde kullanılmıştır.

Marker DNA'lar (Thermo Fisher Scientific, GeneDirex)

Ticari olarak alınan marker DNA'lar, PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra uygun boyutta olup olmadığını belirlemek amacıyla kullanılmıştır.



3.1.4. Kullanılan başlıca cihazlar

- Terazi (Sartorius BP 610)
- Hassas Terazi (GEC-AVERY)
- Mikrodalga (Arçelik MD574)
- Otoklav (HIRAYAMA- HICLAVE HVE-50)
- Vortex (Heidolph)
- Zoom Stereo Mikroskop (Nikon SMZ800)
- Çalkalamalı İnkübatör (ZHICHENG®-ZHWHY-2112B)
- İnkübatör (BINDER)
- Steril Kabin (Labcaire BH18)
- Işık mikroskobu (Olympus CX22)
- Santrifüj (Hettich®- ROTINA35/35R)
- Isı Bloğu (Stuart- SBH130D)
- Gradient Termal Döngü Cihazı / Palm cycler
- Yatay Elektforez Tankı (Consort HU13)
- Güç Kaynağı (1500V Sigma)

- Spektrofotometre (Varian 50)
- Jel Görüntüleme Cihazı (UVP Dual-Insentiy Transilluminator)
- PCR Cihazı (Palm Cyclers, Corbett Research)
- UV Lambası (Philips, 370nm, Near Visible Ultraviolet)

3.1.5. DNA izolasyon kiti (ZymoResearch Mini Prep-D6005)

Manuel DNA izolasyonunda düzgün sonuç alınamayan fungal DNA örneklerinin moleküler tanılması amacıyla DNA izolasyonunda kullanılmıştır.

ZR Fungal/Bakteriyel DNA Kit içeriği;

Lysis Solution	40 ml
Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer	100 ml
DNA Pre-Wash Buffer	15 ml
Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer	50 ml
DNA Elution Buffer	10 ml
ZR BashingBead Lysis Tube	50
Zymo-Spin IV Spin Filters(Orange Tops)	50
Zymo Spin II Columns	50
Collection tubes	150

3.2. Metod

3.2.1. Örneklerin alımı ve laboratuvara getirilmesi

Hurma zeytin örnekleri Karaburun bölgesinin Eğlenhoca, Kösedere, İnecek, Amberseki ve Saip köylerinden alınmıştır. Diğer zeytin örnekleri ise İzmir, Manisa ve Bursa'dan alınmıştır. Steril poşetler ile alınan örnekler soğuk ortamda muhafaza edilerek laboratuvara getirilmiştir.

3.2.2. Zeytin örneklerinin yüzey sterilizasyon işlemi

Laboratuvara getirilen zeytin örneklerinin öncelikle yüzey sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada steril kaplarda hazırlanan %70'lik etanol, %2.5'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ve steril distile su kullanılmıştır. İlk olarak zeytin örnekleri aseptik koşullarda, 5 dk boyunca %70'lik etanol içerisinde bekletilmiştir. Ardından da 5 dk boyunca %2.5'lik sodyum hipoklorit solüsyonu içerisinde bekletilmiştir. Bu işlemler tamamlandıktan sonra örnekler steril distile su ile 3 kez yıkanmıştır (Stephane et al., 2011).

3.2.3. Endofitik fungusların izolasyon işlemi

Yüzey sterilizasyonu tamamlanan zeytin örneklerinin, steril edilmiş pens ve bistüri yardımı ile steril petriler içerisinde aseptik koşullarda izolasyon işlemine başlanmıştır. Zeytinlerin kabuklarının iç kısmından ve etli kısmından alınan kazıntı ve parçalar Potato Dextrose Agar (PDA) ortamlı petrilere belli aralıklarla aktararak inoküle edilmiştir. Daha sonra petriler 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.4. Endofitik fungusların saflaştırılması

Kazıntı ve parçaların alındığı PDA ortamlarının inkübasyonu sonrası üreyen fungus örnekleri ayrı ayrı PDA besiyeri bulunan petrilere iğne öze ile 3 nokta şeklinde inoküle edilerek saflaştırılma işlemleri yapılmıştır. 25°C’de, 5-7 gün boyunca inkübasyona bırakılmıştır. 7 günlük inkübasyon sonunda saf üremesi gerçekleşen tüm örneklerin daha uzun süreli saklanması için Potato Dextrose Agar (PDA) ile hazırlanmış yatık tüplere ekimleri gerçekleştirilmiştir. -80°C’de stoklanması içinse; yatık tüplerin 5-7 günlük inkübasyonu sonrası Malt Ekstrakt Broth ile fungusların süspansiyonları hazırlanmıştır. Fungal süspansiyon, %60’lık Gliserol solüsyonu ile cryo tüplere aktararak -80°C’de saklanmıştır.

3.2.5. Endofitik fungusların fenotipik tanılaması

Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen izolatların morfolojik ve mikroskopik özellikleri, Pitt, 1985; Hasenekoğlu, 1991; Barnett and Hunter, 1998; Samson and Pitt 2000; Boerema et al., 2004; Zheng et al., 2007, Samson et al., 2010, Bensch et al., 2012; Woudenberg et al., 2013 ve Aveskamp, 2014’te belirtildiği şekilde incelenerek genus düzeyinde fenotipik tanıları yapılmıştır.

Sonrasında bu izolatlar genuslarına göre belirlenip, herbiri için kendi tanılama ortamları hazırlanmıştır. İzolatlar bu besiyerlerine üç nokta ekimleri yapılarak inkübasyona bırakılmıştır.

- *Phoma* genusu tanılaması için; Malt Extract Agar (MEA) ve Oatmeal Agar (OA) besiyerleri kullanılmıştır. İlk olarak MEA ve OA besiyerleri 25°C’de 7 gün inkübe edilmiştir. Inkübasyonun ikinci haftası sırasında petrilere 13 saat NUV (Near visible ultraviolet) ışığında ardından 11 saat koloni pigmentasyonu ve piknidyum oluşumu için karanlıkta 7 gün inkübe edilmiştir (Boerema et al., 2004; Aveskamp, 2014).
- *Penicillium* genusu tanılaması için; Czapek Yeast Agar (CYA 5 °C, 25°C, 37°C), Malt Extract Agar (MEA 25°C), %25 Glycerol Nitrate Agar (G25N 25°C) ve Neutral Creatine Sucrose Agar (CSN 25°C) besiyerleri kullanılmıştır (Pitt, 1985; Samson and Pitt 2000; Samson et al., 2010).

- *Rhizopus* genusu tanılaması için; Potato Dextrose Agar (PDA) besiyeri 25°C ve 37°C’de inkübe edilerek kullanılmıştır (Zheng et al., 2007).
- *Alternaria* genusu tanılaması için; Potato Dextrose Agar (PDA) ve Malt Extract Agar (MEA) besiyerleri 25°C’de inkübe edilerek kullanılmıştır (Samson et al., 2010; Woudenberg et al., 2013).
- *Cladosporium* genusu tanılaması için; Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA) ve Oatmeal Agar (OA) besiyerleri 25°C’de inkübe edilerek kullanılmıştır (Bensch et al., 2012).

İnkübasyon sonrasında izolatların fenotipik tanısında kültürden bir öze yardımıyla alınan misel, laktofenol çözeltisi ile birlikte lam-lamel arasına koyularak preparat hazırlanmıştır ve Olympus CX22 mikroskobunda incelenmesi yapılmıştır.

3.2.6. Endofitik fungusların genotipik tanılaması

3.2.6.1. DNA izolasyon işlemi

Endofitik fungus izolatları, içerisinde 100 ml Malt Extract Broth sıvı besiyeri bulunan erlenlere ekimleri yapılmış ve 27°C’de çalkalamalı inkübatörde 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası her erlen için ayrı olarak steril filtre kağıdı kullanılarak huni ile süzme işlemleri yapılmıştır. Filtre kağıdında kalan fungus pelletleri steril eppendorflara alınmıştır.

Manuel DNA izolasyonu

DNA izolasyonunda Liu et al. (2000) tarafından geliştirilen yöntem esas alınmıştır ve işlem modifiye edilerek uygulanmıştır.

Bir miktar fungal pellet 1,5 ml’lik eppendorf tüplerine alınıp üzerlerine 500 µl lizis solüsyonu ilave edilmiştir. Mekanik parçalama yapıldıktan sonra eppendorflar 1 dakika kadar vortekslenmiştir. Sonrasında 20 dakika 65°C’de ısı bloğunda bekletilmiştir. Isı işleminden sonra üzerlerine 150 µl potasyum asetat

eklenerek 15 dakika -20°C 'de bekletilmiştir. Bekleme işleminden sonra 5 saniyelik vortekslenmiş ve 12.000 rpm'de 5 dakika santifüj edilmiştir. Elde edilen supernatant yeni steril eppendorflara aktarılmıştır. Bu potasyum asetat basamağı proteinlerin yeterince çökmemesi durumunda bir kere daha tekrar edilmiştir. Steril eppendorflara alınan süpernatant üzerine eşit hacimde izopropanol ilave edilerek tekrar 12.000 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılıp çökelti üzerine 300 μl %70'lik etanol ilave edilerek etanol presipitasyonu yapılmış ve -20°C 'de 1 saat kadar bekletilmiştir. Bekleme işleminden sonra eppendorflar 12.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek süpernatant dökülmüştür. Ardından 1 gece boyunca eppendorflarda kalan etanolün uçması için oda sıcaklığında bekletilmiştir. Etanol uçurulduktan sonra eppendorflara 50 μl ultra saf su ilave edilerek DNA süspansiyonu yapılmıştır ve genomik DNA -20°C 'de muhafaza edilmiştir. Böylece moleküler tanılamada kullanılacak olan genomik DNA'lar elde edilmiştir.

Kit ile DNA izolasyonu

Kit prosedürü: Manuel DNA izolasyonunda düzgün sonuç alınamayan fungal DNA örneklerinin moleküler tanılaması amacıyla DNA izolasyon kiti kullanılmıştır.

1. Bir miktar fungal pellet ZR BashingBeas Lysis Tube içine alınarak, üzerine 750 μl Lysis Solution ekleyip 5 dakika vortex yardımıyla karıştırılmıştır.
2. 10.000 xg'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
3. Santrifüj işleminden sonra ZR BashingBeas Lysis Tube içindeki supernatanttan 400 μl alınıp Zymo-Spin IV Spin Filter içine koyulmuştur. Bu filtrenin alt kısmı koparılarak Collection Tube içine yerleştirilmiştir.
4. 7000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.

5. 3. Adımdaki Collection Tube içine 1200 µl Fungal DNA Binding Buffer eklenmiştir.
6. 5. Adımdaki Collection Tube içindeki karışımın 800 µl'si Zymo Spin IIc Column içine koyulmuştur.
7. 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
8. 6. Adım tekrarlanmıştır.
9. Yeni Collection Tube içine koyulan Zymo Spin IIc Column 'a 200 µl DNA Pre-Wash Buffer eklenmiştir.
10. 10000 rpm'de 1 dk santrifüjlenmiştir.
11. Zymo Spin IIc Column üzerine 500 µl Fungal DNA Wash Buffer eklenmiştir. 10000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
12. Zymo Spin IIc Column yeni mikrosantrifüj tüpüne geçirilmiştir ve üzerine 50 µl DNA Elution Buffer eklenmiştir.
13. 11000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.
14. DNA'lar kullanılana kadar -20°C'de saklanır.

3.2.6.2.Total DNA'ların agaroz jel elektroforezi

İzole edilen total DNA'nın varlığını kontrol edebilmek için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Elektroforezde tampon olarak TBE kullanılmıştır. Steril bir erlende 100 ml TBE tamponuna 1 gr agaroz ilave edilip kaynatılarak %1'lik agaroz jel hazırlanmıştır. Tamponun sıcaklığı yaklaşık 45 °C sıcaklığa düştüğünde ise içerisine 1 µl 10000X GelRed (BIOTIUM) nükleik asit boyası eklenmiştir. Elektroforez tepsisine dökülüp kuyucukların oluşturulması için taraklar yerleştirilmiştir. DNA'ların kuyucuklara yüklenmesinde ise 5 µl DNA solüsyonu

ve 1 µl yükleme boyası karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Total DNA'lar 90V-300mA- 50W elektrik akımında 1 saat yürütülmüştür. Elde edilen genomik DNA'ların saflık kontrolleri ve miktar tayinleri ise Thermo NanoDrop cihazı ile yapılmıştır.

3.2.6.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Moleküler identifikasyonunda ise ITS PCR ve 28S PCR yapılmıştır. Nükleer DNA'nın ITS1-5.8-ITS2 (ITS) bölgesi, ITS1 ve ITS4 primerleri ile amplifiye edilmiştir (Samson et al., 2014). LR0R ve LR7 primerleri ise 28S DNA bölgesi amplifikasyonu için kullanılmıştır (Rehner and Samuels, 1994).

- **ITS PCR analizi**

ITS PCR, ITS1: 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' ve ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' primerleri kullanılarak yapılmıştır (Samson et al., 2014). DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 50µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 50µl olacak şekilde bileşenler Tablo 3.1'deki sıra ile eklenmiştir. Sonrasında reaksiyon koşulları optimize edilmiş, Tablo 3.2'deki gibi ayarlanarak amplifikasyon Thermal Cycler'da gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1. ITS PCR mix tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Ultrasaf su	34,6 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	4 µl (4mM)
dNTP mix	1µl
Primer ITS1	2µl (10 pmol/µl)
Primer ITS4	2µl (10 pmol/µl)
Taq DNA polimeraz	0,40 µl (2 U)
Kalıp DNA	1µl (40-50 µg/ml)

Tablo 3.2. Amplifikasyonun sağlandığı ITS- PCR koşulları

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
Başlangıç	1	3 dk	94°C
Denatürasyon	35	1 dk	94°C
Annealing		1 dk	60°C
Elongasyon		1 dk	72°C
Son uzama	1	5dk	72°C
Soğutma	-	∞	4°C

- **28S PCR analizi**

28S PCR, LR0R: 5'-GTACCCGCTGAACTTAAGC-3' ve LR7: 5'-TACTACCACCAAGATCT-3' primerleri kullanılarak yapılmıştır (Lin et al., 2015). DNA amplifikasyonu optimize edilmiş 50µl'lik reaksiyon karışımında gerçekleştirilmiştir. Toplam reaksiyon hacmi 50µl olacak şekilde bileşenler Tablo 3.3'deki sıra ile eklenmiştir. Sonrasında reaksiyon koşulları optimize edilmiş, Tablo 3.4'deki gibi ayarlanarak amplifikasyon Thermal Cycler'da gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.3. 28S PCR mix tüpüne sırasıyla konulan bileşikler ve miktarları

Bileşik	Miktar
Ultrasaf su	29,2 µl
PCR reaksiyon tamponu	5 µl (10x)
MgCl ₂	4 µl (4mM)
dNTP mix	2µl
Primer LR0R	2µl (10 pmol/µl)
Primer LR7	2µl (10 pmol/µl)
Taq DNA polimeraz	0,8 µl (2 U)
Kalıp DNA	5µl (40-50 µg/ml)

Tablo 3.4. Amplifikasyonun sağlandığı 28S PCR koşulları

İşlem	Döngü	Süre	Sıcaklık
Başlangıç	1	5 dk	94°C
Denatürasyon	35	1 dk	94°C
Annealing		1 dk	50°C
Elongasyon		2 dk	72°C
Son uzama	1	7dk	72°C
Soğutma	-	∞	4°C

3.2.6.4.PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde tampon olarak TBE kullanılmıştır. Steril bir erleninde 100 ml TBE tamponuna 1,6 gr agaroz ilave edilip kaynatılarak %1,6'lık agaroz jel hazırlanmıştır. Tamponun sıcaklığı yaklaşık 45 °C sıcaklığa düştüğünde ise içerisine 1,2 µl 10000X GelRed (BIOTIUM) nükleik asit boyası eklenmiştir. Elektroforez tepsisine dökülüp kuyucukların oluşturulması için taraklar yerleştirilmiştir. PCR ürünlerinin kuyucuklara yüklenmesinde ise 5 µl PCR ürünü ve 1 µl yükleme boyası karıştırılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca elektroforez işleminde PCR ürünleri dışında 1 kuyucukta 100 bp'lik DNA marker da (Thermo Fisher Scientific) 90V- 300mA- 50W elektrik akımında 1 saat jelde yürütülmüştür.

3.2.6.5.DNA dizi analizi ve sonuçların değerlendirilmesi

Çalışmamızda endofitik fungusların genotipik tür tanısı için ITS gen bölgesi ve 28S gen bölgesi amplifikasyonu sonucunda elde edilen PCR ürünlerinin baz sırası tayini, Medsantek Laboratuvar Malzemeleri Sanayi ve Ticaret Ltd. Şti'de yapılmıştır. Analiz sonucu elde edilen veriler Finch TV (Blast) ve Ap E programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, tür tayini araştırmacıların kullanımına açık olan Gen Bankası'nın <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> web sayfasında, nükleotid dizilerinin kıyaslanarak benzerliklerin incelenmesi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR

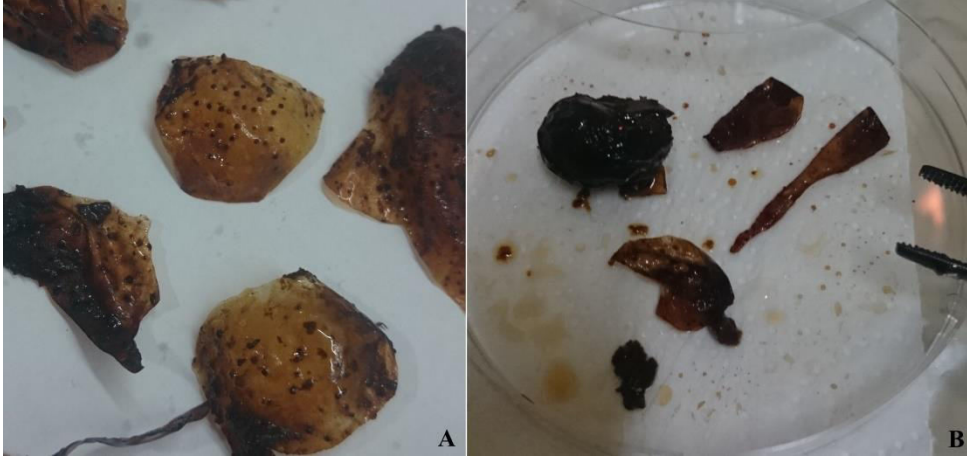
4.1. Genel Bulgular

Çalışmamızda İzmir Karaburun Yarımadasında dalında olgunlaşan Hurma zeytin örnekleri Karaburun bölgesinin Eğlenhoca köyünden 4, Kösedere köyünden 6, İncelik köyünden 4, Amberseki köyünden 3 ve Saip köyünden 3 örnek olmak üzere toplam 20 örnek alınarak Hurma zeytinlerden endofitik fungus izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonucunda toplam 26 adet endofitik fungus izolatu izole edilmiştir. 26 adet izolatu 6'sı Eğlenhoca, 8'i Kösedere, 6'sı İncelik, 3'ü Amberseki ve 3'ü Saip köylerinden alınan hurma zeytin örneklerinden izole edilmiştir (Tablo 4.1).

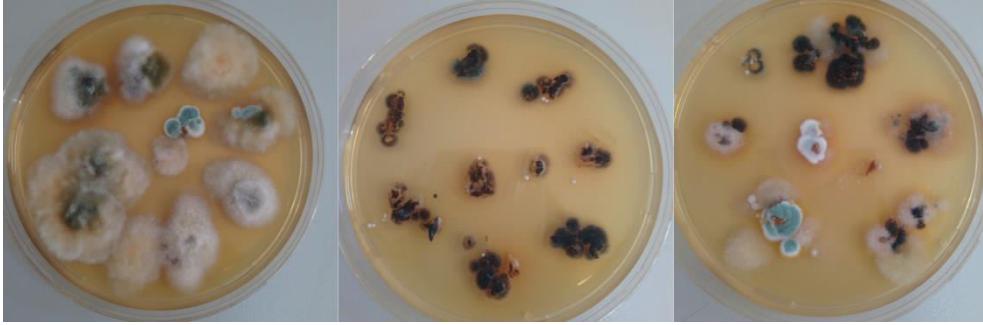
Bunun dışında karşılaştırma amaçlı İzmir'den 5 örnek Hurma olmayan Erkence zeytin çeşidi, Manisa'dan 3 örnek Gemlik zeytin çeşidi ve Bursa'dan 4 örnek Çelebi zeytin çeşidi olmak üzere 12 zeytin örneği de alınarak endofitik fungus izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonucunda 3 adet endofitik fungus türü izole edilmiştir. Bu izolatlar da Manisa'dan alınan Gemlik zeytin çeşidi örneklerinden izole edilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus sayıları

Bölge	Zeytin çeşidi	Alınan örnek sayısı	İzole edilen endofitik fungus sayısı
Eğlenhoca	Hurma	4	6
Kösedere	Hurma	6	8
İncelik	Hurma	4	6
Amberseki	Hurma	3	3
Saip	Hurma	3	3



Şekil 4.2. Hurma zeytinlerin kabuk içi ve etli kısım görüntüsü (A): Hurma zeytinlerin kabuk içi görüntüsü, (B): Hurma zeytinlerin kabuklarının iç kısmından ve etli kısmından kazıntı ve parçaların alınması.



Şekil 4.3. Hurma zeytinlerden alınan kazıntı ve parçaların inkübasyonu sonucu PDA ortamındaki görüntüleri.

4.2. Zeytinlerden İzole Edilen Endofitik Fungus Türleri

Fenotipik ve genotipik tanılama sonucunda Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türleri; *Stemphylium vesicarium*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Dothiora oleae*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium chrysogenum* ve *Bartalinia* sp. şeklindedir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türleri

Bölge	Örnek No	İzole edilen endofitik fungus türleri
Eğlenhoca	1	<i>Stemphylium vesicarium</i> (Wallr.) E.G. Simmons, 1969 <i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010
	2	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010 <i>Dothiora oleae</i> (DC.) Crous, 2016
	3	<i>Dothiora oleae</i> (DC.) Crous, 2016
	4	<i>Penicillium chrysogenum</i> Thom. 1910
Kösedere	1	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010
	2	<i>Stemphylium vesicarium</i> (Wallr.) E.G. Simmons, 1969
	3	<i>Stemphylium vesicarium</i> (Wallr.) E.G. Simmons, 1969 <i>Dothiora oleae</i> (DC.) Crous, 2016
	4	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010 <i>Dothiora oleae</i> (DC.) Crous, 2016
	5	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010
	6	<i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill, 1902
İnecik	1	<i>Stemphylium vesicarium</i> (Wallr.) E.G. Simmons, 1969 <i>Dothiora oleae</i> (DC.) Crous, 2016
	2	<i>Stemphylium vesicarium</i> (Wallr.) E.G. Simmons, 1969 <i>Rhizopus stolonifer</i> (Ehrenb.) Vuill, 1902

	3	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010
	4	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010
Amberseki	1	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010
	2	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i> (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010
	3	<i>Bartalinia</i> sp. Tassi, 1900
Saip	1	<i>Stemphylium vesicarium</i> (Wallr.) E.G. Simmons, 1969
	2	<i>Dothiora oleae</i> (DC.) Crous, 2016
	3	<i>Bartalinia</i> sp. Tassi, 1900

Fenotipik ve genotipik tanılama sonucunda Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türleri de; *Alternaria alternata* ve *Cladosporium ramotenellum* şeklindedir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türleri

Bölge	Zeytin çeşidi	Örnek No	İzole edilen endofitik fungus türleri
Manisa	Gemlik	1	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. 1912
	Gemlik	2	<i>Alternaria alternata</i> (Fr.) Keissl. 1912
	Gemlik	3	<i>Cladosporium ramotenellum</i> K. Schub., Zalar, Crous & U. Braun. 2007
İzmir	Erkence	1	-
	Erkence	2	-
	Erkence	3	-
	Erkence	4	-
	Erkence	5	-

Bursa	Çelebi	1	-
	Çelebi	2	-
	Çelebi	3	-
	Çelebi	4	-

4.2.1. Endofitik fungus türlerin istatistiksel verileri

Hurma zeytin ile hurma olmayan zeytin çeşitlerindeki **tür sayılarının** istatistiği yapıldığında;

Independent Samples Test:

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means		
	F	Sig.	t	df	Sig.(2-tailed)
Equal variances assumed	,515	,500	2,829	6	,030
Equal variances not assumed			3,015	5,221	,028

Bu karşılaştırma için means testinde independent test yapılmıştır. Buna göre Sig. (Significance; anlamlılık) değeri **P** (probability;olasılık) olarak kabul edilerek yapılan testte; **0.01<0,030=p<0.05** ve **0.01<0,028=p<0.05** istatistiksel anlamlılık değerleri hesaplanmıştır. Bu da iki grup arasında anlamlı fark olduğunu göstermektedir.

Hurma zeytin çeşitlerindeki tanımlanan **funga türlerin** istatistiğı yapıldığında ise;

	Frequency	Percent	Valid Percent
<i>Bartalinia</i> sp.	2	7,7	7,7
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	9	34,6	34,6
<i>Dothiora oleae</i>	6	23,1	23,1
<i>Penicillium chrysogenum</i>	1	3,8	3,8
<i>Rhizopus stolonifer</i>	2	7,7	7,7
<i>Stemphylium vesicarium</i>	6	23,1	23,1
Total	26	100,0	100,0

Burada frekans analizi yapılarak, hurma zeytinler içerisinde karşılaşılan en yoğun türün *Stagonosporopsis cucurbitacearum* olduğu görülmektedir. Toplam izole edilen 26 tür arasında bu tür 9 (%34,6) adet olmak üzere en çok izole edilen tür olmuştur.

4.3. Endofitik Fungus Türlerinin Fenotipik Tanısı

Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen izolatların morfolojik ve mikroskopik özellikleri, Pitt, 1985; Hasenekoğlu, 1991; Barnett and Hunter, 1998; Samson and Pitt 2000; Boerema et al., 2004; Zheng et al., 2007; Samson et al., 2010; Bensch et al., 2012; Woudenberg et al., 2013 ve Aveskamp, 2014'te belirtildiğı şekilde incelenerek tür düzeyinde fenotipik tanıları yapılmıştır.

4.3.1. *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (Fr.) Aveskamp, Gruyter & Verkley, 2010

Sistematik: Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, *Stagonosporopsis* Died., 1912

Synonymy: *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm, 1881

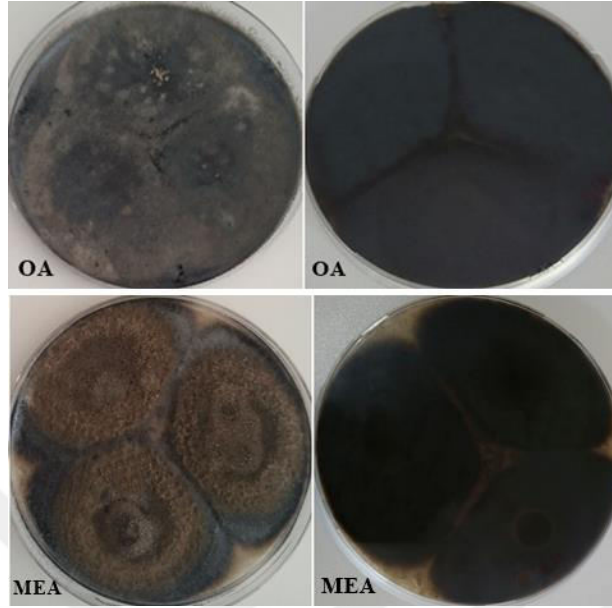
Anamorf: “*Phoma cucurbitacearum*” (Fr.) Sacc., 1884

Sistematik: Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, Didymellaceae, *Phoma* Sacc., 1880

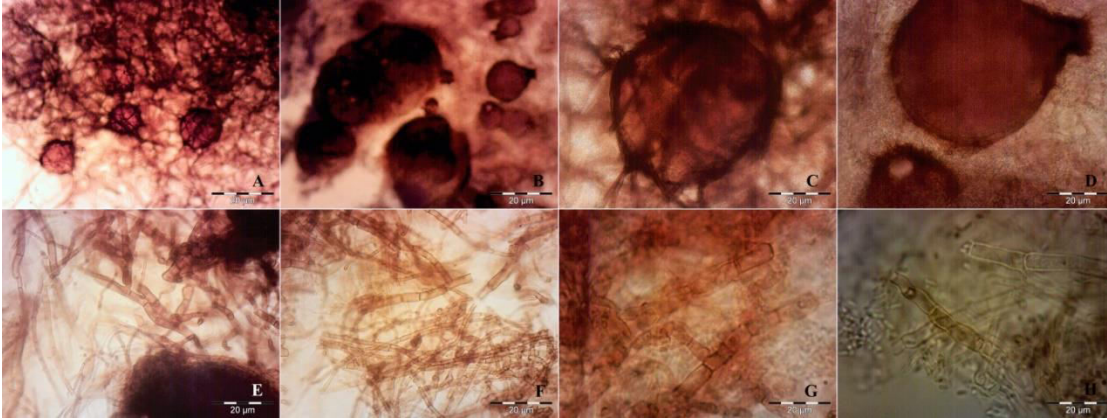
Makromorfoloji: OA ve MEA üzerindeki koloniler hızlı büyür, 7 gün sonra petride neredeyse tamamen büyüyebilir; OA üzerinde büyüme 5 - 7 cm çapında. 5 gün sonra, normal, renksiz / donuk yeşil ile olivaceous / olivaceous gri; yünlüden flokoza, beyazdan olivaceous gri havai miselyum; tersi donuk yeşili / olivaceous, kurşuni gri / kurşuni siyah renk. Agar üzerinde gelişen Pycnidia [ve pseudothecia], birleşme için yalnız; ayrıca havai miselyumda küçük pycnidia bulunabilir.

Mikromorfoloji: Pycnidia globoz düzensizdir, 1 (-2), bazen papiller ostiole, daha sonra gelişen uzun boylu, 80-380 µm çapında, tüysüz veya misel büyümesiyle birlikte gelişir. Ten rengi beyaz renkli matris [Pseudothecia da gelişebilir, pycnidiadan ayırt edilemez]. Conidia değişken şekilli, elipsoidal veya allantoide subglobose, birkaç küçük guttule ile, genellikle aseptat, 4-8x2-3 µm, ancak 10x 4.5 µm'ye kadar olan bazı büyük 1-septat conidialar mevcut olabilir.

Makroskobik ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.' te verilmiştir.



Şekil 4.4. *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (Anamorf: *Phoma cucurbitacearum*), OA ve MEA besiyerleri görüntüleri

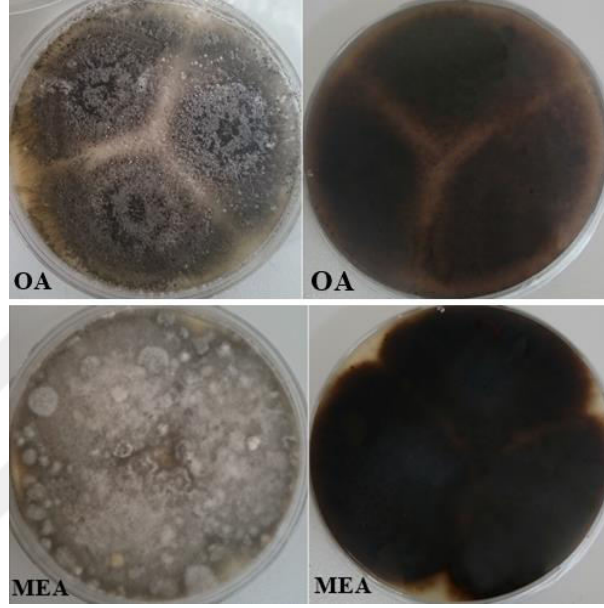


Şekil 4.5. *Stagonosporopsis cucurbitacearum* (Anamorf: *Phoma cucurbitacearum*), mikroskop görüntüleri. (A,B,C,D): Piknidyum; (E,F,G): Konidiofor; (H): Konidiofor ve Konidia.

4.3.2. *Stemphylium vesicarium* (Wallr.) E.G. Simmons, 1969

Sistematik: Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, Pleosporaceae, *Stemphylium* Wallr., 1833

Makroskobik ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.' de verilmiştir.



Şekil 4.6. *Stemphylium vesicarium*, OA ve MEA besiyerleri görüntüleri



Şekil 4.7. *Stemphylium vesicarium*, mikroskop görüntüleri.

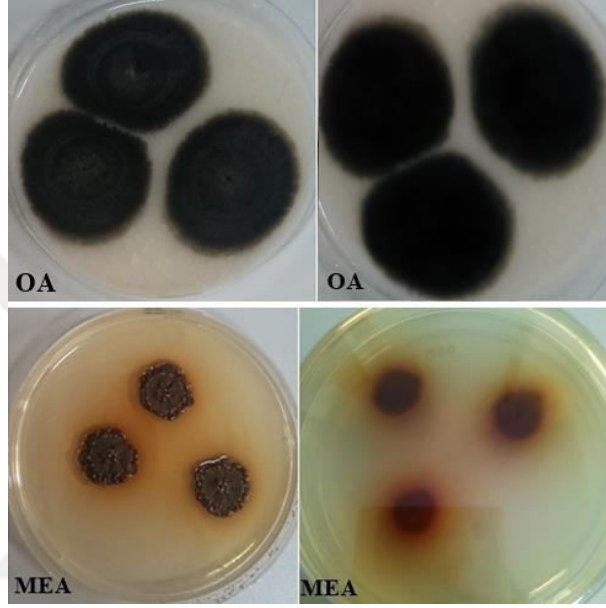
(A,B,C,D): Askoma; (E,F,G,H): Konidiofor ve konidia.

4.3.3. *Dothiora oleae* (DC.) Crous. 2016

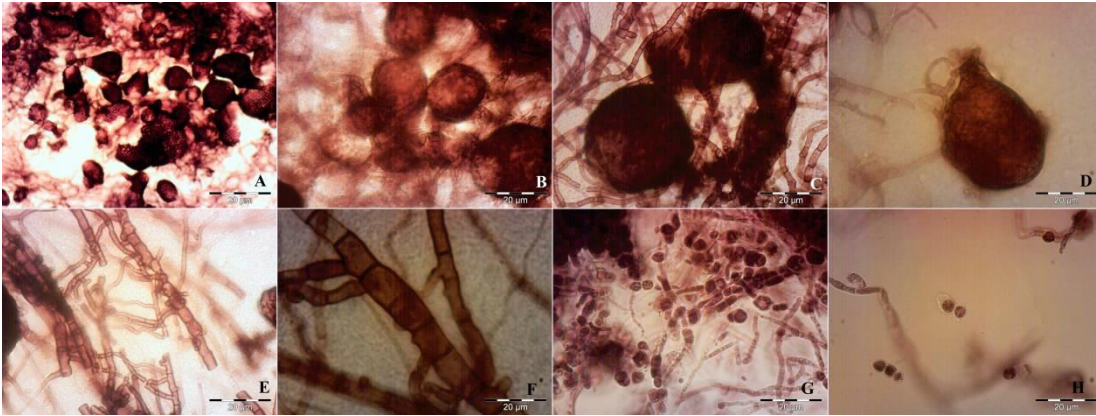
Sistematik: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Dothideomycetidae, Dothideales, Dothioraceae, *Dothiora* Fr. 1849

Synonym: *Phoma oleae* (Cavara) Sacc., 1982.

Makroskobik ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.8. ve Şekil 4.9.' da verilmiştir.



Şekil 4.8. *Dothiora oleae*, OA ve MEA besiyerleri görüntüleri



Şekil 4.9. *Dothiora oleae*, mikroskop görüntüleri.

(A,B,C,D): Piknidyum; (E,F): Konidiofor; (G,H): Konidiofor ve konidia.

4.3.4. *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill. 1902

Sistematik: Fungi, Mucoromyceta, Mucoromycota, Mucoromycotina, Mucoromycetes, Mucorales, Mucoraceae, *Rhizopus* Ehrenb. 1820

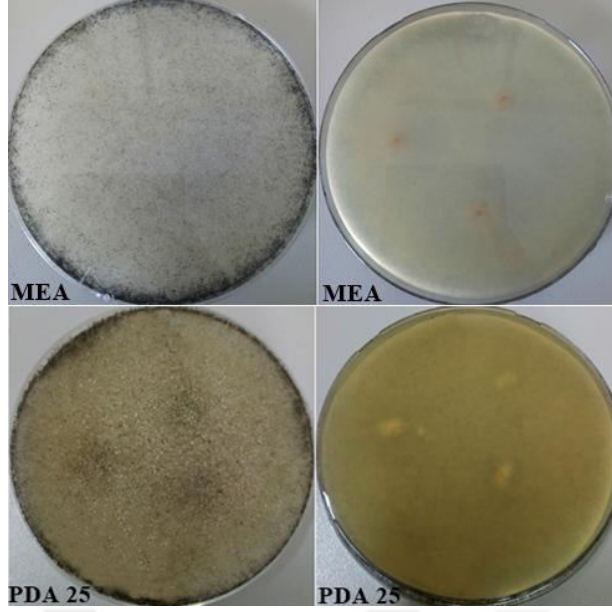
Makromorfoloji: Koloni beyazımsı kahverengimsi sporangiofora ve kahverengi-siyah sporangia'ya bağlı olarak grimsi-kahverengidir, genellikle 20 mm yüksekliğindedir. Mycelium, sporangiophores ve sporlar Petri kabının dışında büyüyebilir ve bu nedenle laboratuvarın kontaminasyonu kolaylıkla gerçekleşebilir.

Mikromorfoloji: Sporangioforlar 1.5-3 (4) mm boyunda, tek veya 2-7 (genellikle 3-4) grup halindedir. Renksizden koyu kahverengiye doğru, pürüzsüz veya hafif pürüzlü stolonlar, dallanmış rizoidler şeklinde görülür. Sporangia globose subglobose, (50) 150-360 µm çapta, olgunlukta siyahımsı-kahverengi renktedir. Collumella globose, subglobose, oval (40) 70-160 (250) µm çaptadır. Sıklıkla poligonal veya oval düzensiz şekilde sporangiosporlar, globose, eliptik, striate, (4)7-15x6-8(12) µm çaplıdır. Stolonlarda klamidospor bulunmaz, bazen gizli (submerged) hiflerde bulunabilir. Heterothalictir. Zygosporlar kahverengimsi-siyah, eşit olmayan suspensors, (75) 150-200 µm çaptadır.

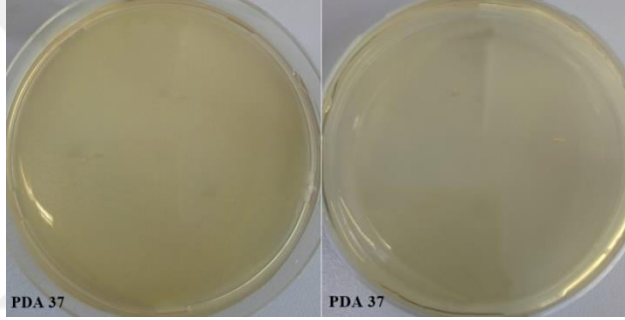
Benzer Türler: *Rhizopus stolonifer*, *Rhizopus oryzae* Went & Prins. Geerl.1895 ve *Rhizopus oligosporus* Saito,1905'dan 37 ° C'de büyümemesi ile ayırt edilebilir.

Habitat: Yiyecek ve iç mekan (genellikle hava kaynaklı) fungusudur. Dünya çapında dağılımı vardır ama daha sıcak bölgelerde daha sık oluşmaktadır. Toprak, tahıl, sebze, meyve ve fındıktan izole edilir.

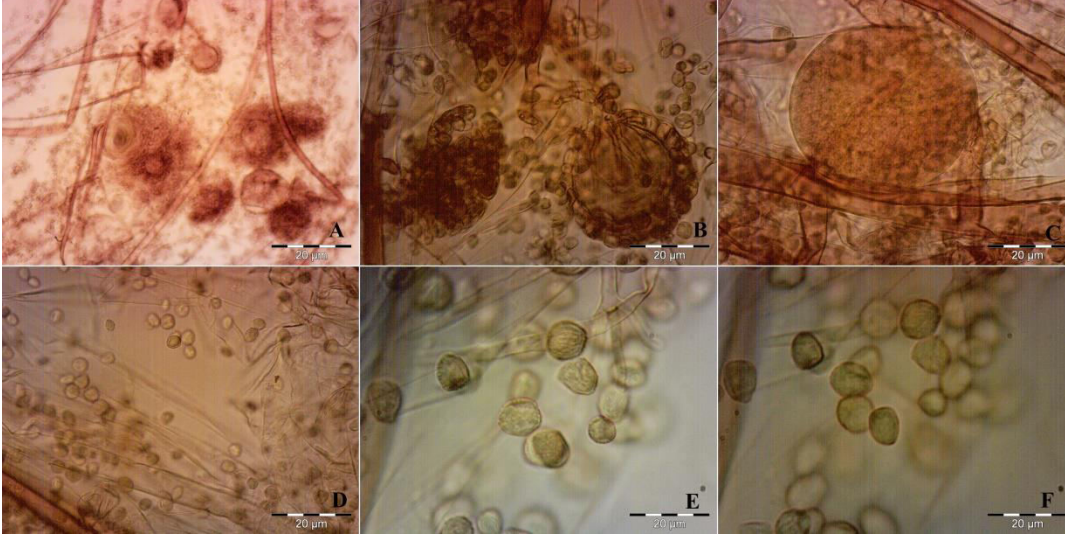
Bu türün tanınması Zheng et al., (2007) ve Samson et al., (2010)'a göre yapılmıştır. Makroskobik ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.10., Şekil 4.11 ve Şekil 4.12.' de verilmiştir.



Şekil 4.10. *Rhizopus stolonifer*, MEA ve PDA25 besiyerleri görüntüleri



Şekil 4.11. *Rhizopus stolonifer*, PDA37 besiyerleri görüntüler



Şekil 4.12. *Rhizopus stolonifer*, mikroskop görüntüleri.

(A,B,C): Sporangium, sporangiofor ve sporangiospor; (D): Sporangiofor ve sporangiospor;
(E,F): Sporangiospor.

4.3.5. *Penicillium chrysogenum* Thom. 1910

Sistematik: Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Eurotiomycetes, Eurotiomycetidae, Eurotiales, Aspergillaceae, *Penicillium* Link. 1809

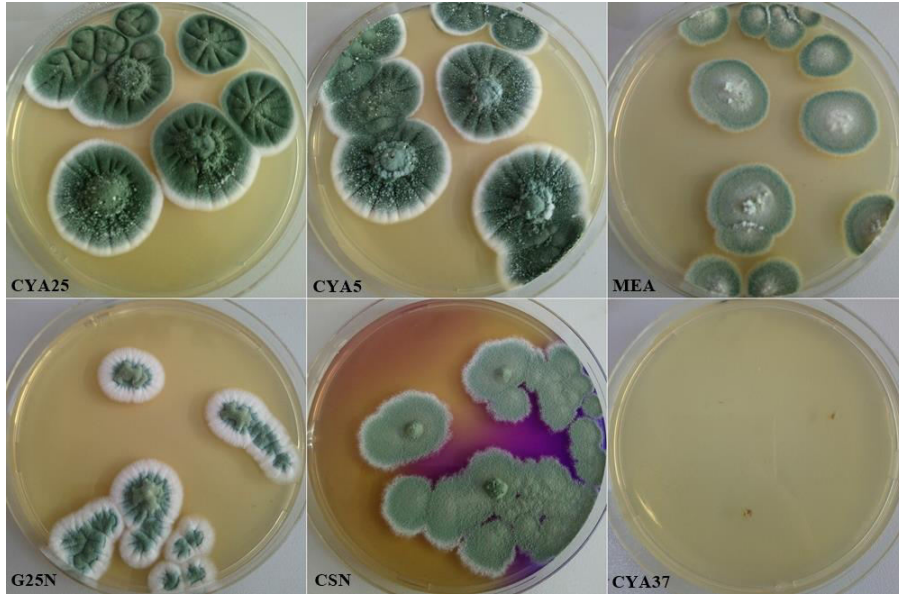
Makromorfoloji: 7 günlük inkübasyon sonrasında Koloni Çapları (mm): **CYA25**'de 35-45 mm; **MEA**'da 25-40 mm; **G25N**'de 18-32 mm; **CYA5**'te 4 mm çapa kadar gözle görünür koloniler oluşmaktadır; **CYA37**'de koloni gelişimi yoktur; **CSN**'de 12-18 mm. **CYA25**'de koloniler donuk yeşil, grimsi turkuaza yakın donuk mavi renkte, miselyum sarımsı beyaz renktedir. Eksuda genellikle bol miktarda oluşmakta, parlak sarımsı damlalar halindedir. Parlak sarı çözünür pigment üretebilir. Ters yüzey genellikle parlak sarı veya sarı kahverengi renkte fakat çözünebilir pigmentin yokluğunda soluk veya kırmızı kahverengidir. Koloni tekstürü radyat şekilde oluklu, genellikle az veya çok sıkı yapılı ve velvet şeklindedir. **MEA**'da koloniler donuk yeşil grimsi turkuaz renktedir. Ters yüzey soluk, sarımsı, sarı kahverengi veya kırmızımsı kahverengidir. Miselyum çok göze çarpmamaktadır. Koloni tekstürü velvet ve bazen merkezde az veya çok flukkoz veya biraz granül şeklindedir. **G25N**'de koloniler genellikle radyat şekilde oluklu ve yoğundur. Ters yüzey soluk sarı kahverengi veya kırmızımsı kahverengidir. **CYA5**'te koloniler 4 mm çapa kadar görünür koloniler üremektedir. **CYA37**'de koloni gelişimi yoktur. **CSN**'de gelişim orta güçlüdür, orta nötral veya zayıf asittir, ters yüzeyi de benzer özelliktedir.

Mikromorfoloji: Konidioforlar düz çeperli, değişik uzunlukta, genellikle 150-400 µm veya daha uzun da olabilirler. Genellikle tervertisillattır. Rami 1-2 tane ve 15-20 µm, metula 8-12 µm, phialide ampulliform 7-8(-10) µm'dir. Konidia elipsoidal, subspheroidal, 2.5-4.0 µm, düz çeperli ve düzensizdir.

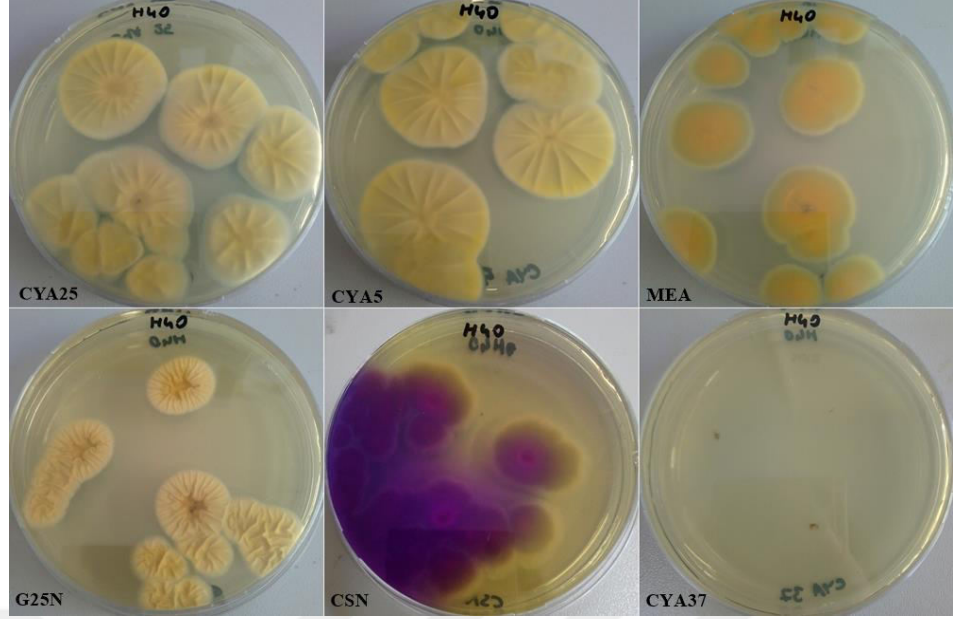
Ayrt Edici Özellikleri: Koloniler standart **CYA25** ortamında hızla büyürler. **CYA** üzerinde mavi-yeşil renkte konidia ile bol üreme gözlenir. Eksuda oluşturur. Mikroskopik *penicillium* tervertisillattır. Düz çeperli konidiofor yapısı vardır. Bazı izolatları sarı pigmentasyona sahip değildir.

Habitat: Çoğu yerde bulunan bir fungus türü, yeryüzünde en yaygın ökaryotik yaşam formları arasındadır. Toprak, bitki örtüsü ve gıda gibi çok çeşitli yaşam alanlarına sahiptir.

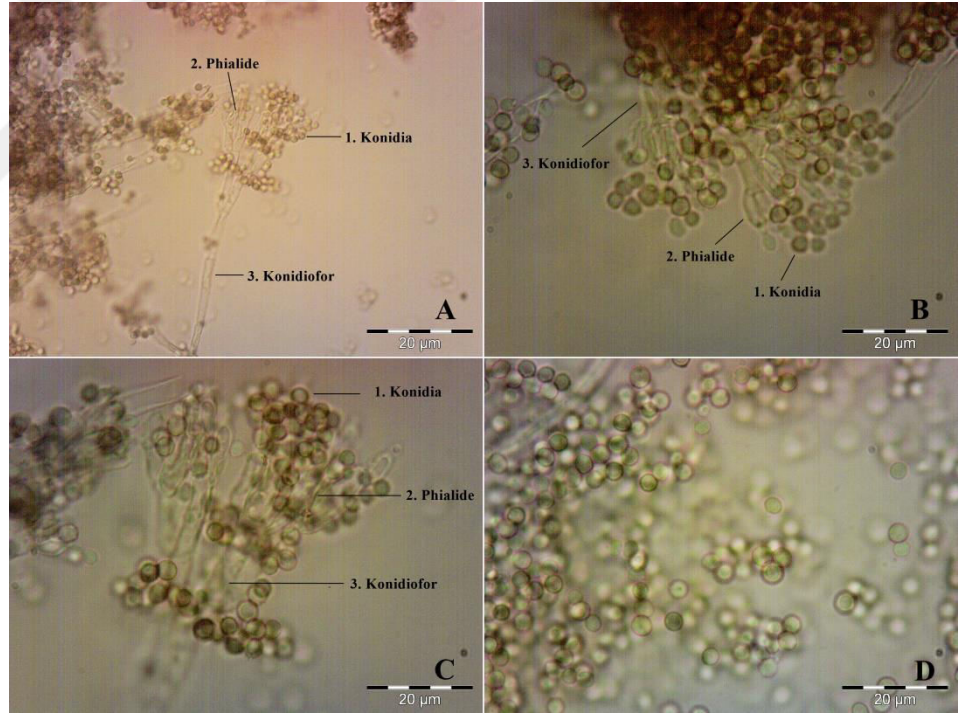
Bu türün tanınması Pitt (1985), Samson and Pitt (2000) ve Samson et al., (2010)'a göre yapılmıştır. Makroskobik ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.13., Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.' te verilmiştir.



Şekil 4.13. *Penicillium chrysogenum*, CYA25, CYA5, MEA, G25N, CSN ve CYA 37 besiyerleri görüntüleri



Şekil 4.14. *Penicillium chrysogenum*, CYA25, CYA5, MEA, G25N, CSN ve CYA 37 besiyerleri görüntüleri (tersi)



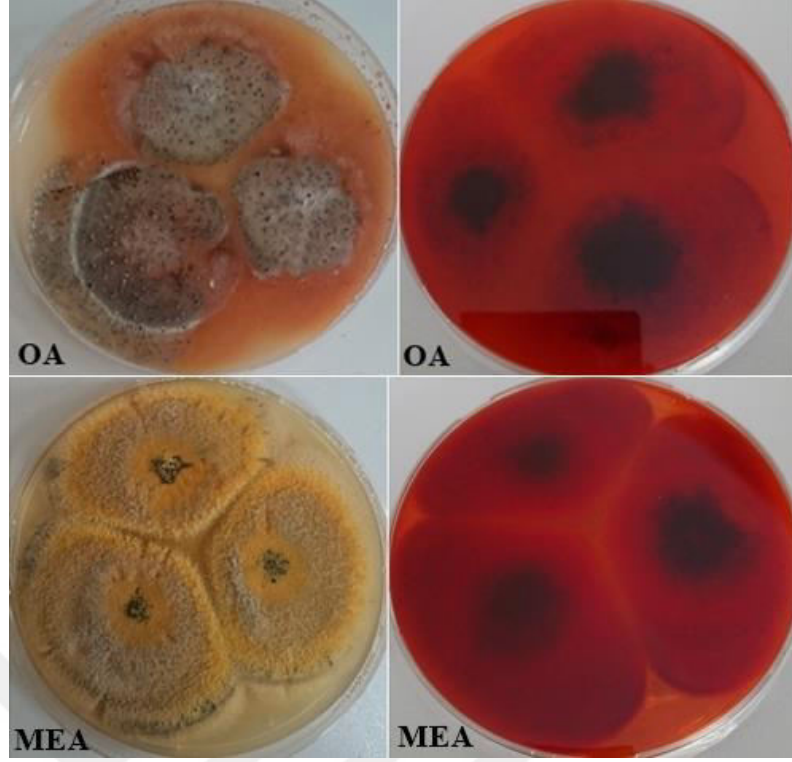
Şekil 4.15. *Penicillium chrysogenum*, mikroskop görüntüleri.
(A,B,C): 1.Konidia, 2.Phialide, 3.Konidiofor; (D): Konidia.

4.3.6. *Bartalinia* sp. Tassi. 1900

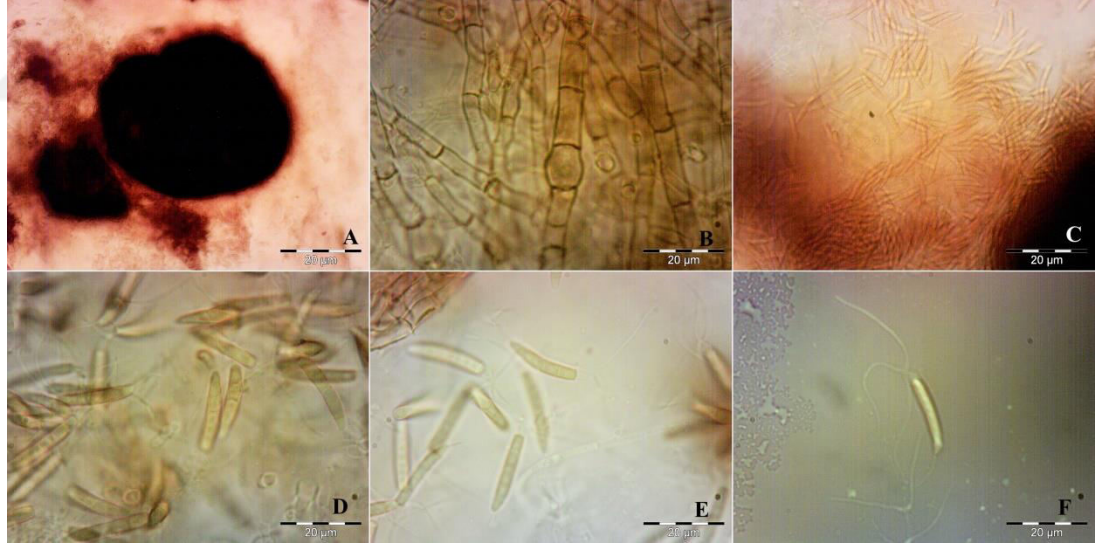
Sistematik: Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Sordariomycetes, Xylariomycetidae, Amphisphaeriales, Bartaliniaceae.

Mikromorfoloji: Konidyomata stromatik, subperidermal, intrakortikal veya subepidermal kökenli, dallanmış, lokulleri bazen kıvrık, koyu kahverengi - kahverengi, tüysüz, globose, dış katmanlarda kalın duvarlı ve koyu kahverengi-kahverengidir. Pycnidia, kahverengiden koyu kahverengiye, globose subglobose, dağınık veya toplu halde, belirgin bir ostiole tarafından açılmaktadır. İç duvarı kaplayan konidioforlar, septalı ve düzensiz dallanmış, ince duvarlı, pürüzsüz, percurrent proliferasyonlar ve apikal periklinal yoğunlaşmalar görülür. Conidia akut veya körelmiş apeks ve kesik tabanlı fusiform silindirik şeklinde, düz veya hafif kavisli, 3-4-euseptat, apikal hücre hyaline ve içerikten yoksun, diğer hücreler soluk kahverengi hyaline, duvar pürüzsüz, septa daralması olsun veya olmasın, suprabazal hücreler diğerlerinden daha uzundur.

Bu türün tanılması Morgan-Jones et al., (2011) ve Crous et al., (2014) 'e göre yapılmıştır. Makroskobik ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.16. ve Şekil 4.17.' de verilmiştir.



Şekil 4.16. *Bartalinia* sp., OA ve MEA besiyerleri görüntüleri



Şekil 4.17. *Bartalinia* sp., mikroskop görüntüleri.

(A): Piknidyum; (B): Konidiofor; (C,D,E,F): Konidia.

4.3.7. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl. 1912

Sistematik: Fungi, Dikarya, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Pleosporomycetidae, Pleosporales, Pleosporaceae, *Alternaria* Nees. 1817

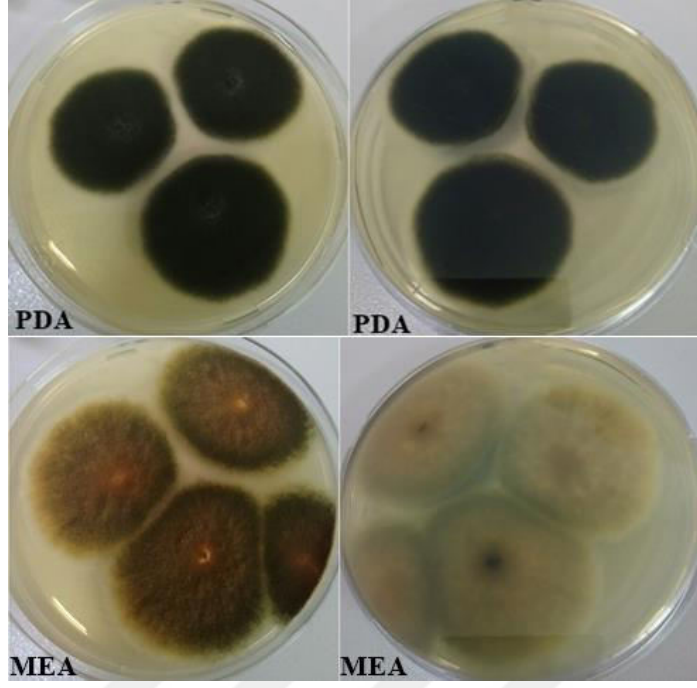
Makromorfoloji: Koloni genellikle siyah veya zeytinimsi siyah, bazen de gri renktedir.

Mikromorfoloji: Konidioforlar tek veya küçük gruplar halinde, dallanmış veya basit, düz veya kıvrımlı, bazen genikulat, soluk veya orta derecede altın sarısı, düz çeperli 50 µm kadar uzunlukta, 3-6 µm kalınlığında, bir veya birkaç tane apikal poru olan, 1-3 bölmeli şekildedir. Konidiler genellikle uzun sık dallanan zincirler halinde, obklavat, obpriform, ovoid veya elipsoidal, genellikle kısa konik veya silindirik bir gagaya sahip, bazen bu gaga konidinin üçte biri kadar uzun olmakta, konidiler soluk veya orta derecede altın sarısı renginde, düz veya verrukuloz çeperli, sekize kadar enine ve birkaç tane de boyuna veya oblik bölmeli, bütün uzunluk 18-63 µm, eni ise 7-18(13) µm, gaga soluk renkli 2-5 µm kalınlığındadır.

Habitat: Son derece yaygın bir saprofit olup birçok bitki artığı, gıda, toprak, tekstil maddeleri üzerinde bulunmaktadır.

Bu türün tanınması Samson et al., (2010) ve Woudenberg et al., (2013) 'e göre yapılmıştır.

Makroskobik ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.' da verilmiştir.



Şekil 4.18. *Alternaria alternata*, PDA ve MEA besiyerleri görüntüleri



Şekil 4.19. *Alternaria alternata*, mikroskop görüntüleri.

(A,B,C,D,E,F): Konidiofor ve konidia.

4.3.8. *Cladosporium ramotenellum* K. Schub., Zalar, Crous & U. Braun. 2007

Sistematik: Fungi, Ascomycota, Pezizomycotina, Dothideomycetes, Dothideomycetidae, Capnodiales, Cladosporiaceae, *Cladosporium* Link. 1816

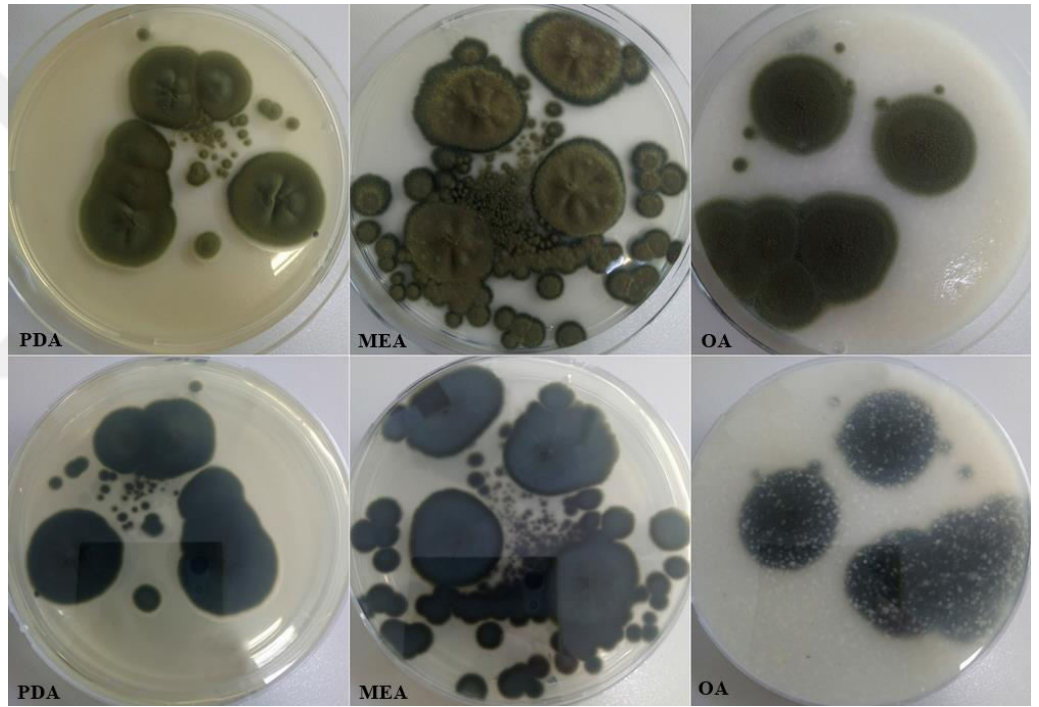
Makromorfoloji: PDA üzerindeki koloniler, 25 °C'de 14 gün sonunda 46-49 mm çapa ulaşır, bol sporülasyona bağlı olarak olivaceous ve gri-olivaceous renktedir. Kenarlar hafifçe dalgalı, beyaz, tüysüz, havai miselyumu yok veya seyrek olarak bulunur. Belirgin eksudaları yoktur. Biraz katlanmış ve buruşuk koloni merkezili düz büyüme, sporulasyon fazladır. MEA üzerindeki koloniler, 25 °C'de 14 gün sonunda 48-49 mm çapa ulaşır, velvet, gri-olivaceousden olivaceous-gri ve olivaceous-griden demir-gri rengindedir. Ters yüzey, kenar dalgalı, radyal olarak kabarık, havai miselyum seyrek, dağınık, hafif yükselmiş koloni merkezi ile yassı büyüme, belirgin eksudalar oluşmamış, bolca sporlanır. OA üzerindeki koloniler, 25 °C'de 14 gün sonunda 40 mm çapa ulaşır. Gri-olivaceous rengindedir. Kenarın tamamı renksiz veya beyaz, tüysüzdür. Havai miselyumu yok ya da seyrek. Eksüda oluşumu yok, yassı büyüme gözlenir ve sporulasyon fazladır.

Mikromorfoloji: Mycelium dallanmamış veya sadece 1.5-4 µm genişliğinde dallı, septalı, şişme ve daralma yok, hiyalin veya subhiyalin, pürüzsüz, bazen düzensiz pürüzlü duvarlı, duvarları kalınlaşmamış şekildedir. Conidiophores soliter, makronematoz ve mikronematoz, hiflerin lateral kolları olarak veya yükselen hiflerden terminal olarak ortaya çıkar, dik, düz veya hafifçe bükümlü, silindirik, dalsız, bazen dallanmış, dalsız genellikle sadece bir septum, 14-110 × 2-4 µm, septalı, soluk olivaceous veya kahverengidir. Konidiogenöz hücreler, birleşik, terminal, aynı zamanda interkalar, silindirik, noduloz olmayan, 10-28 (-50) µm uzunluğundadır. Ramoconidia, silindirik dikdörtgen, 47 µm uzunluğunda, 2-4 µm genişliğinde, 0-1-septalı, nadiren 4-septat, subhiyalin çok soluk olivaceous, pürüzsüzdür. Conidia, dallı zincirlerde çok sayıda, polimorf, düz, bazen hafif kavisli, küçük terminal konidia çok sayıda, globose, subglobose veya oval, obovoid veya limoniform şekilli, 2,5-7 × 2-4 (-4,5) µm, aseptat, interkalar konidia ellipsoid subsilindirik, 8-15 × 3-4 (-4,5) µm, 0-1-septat;

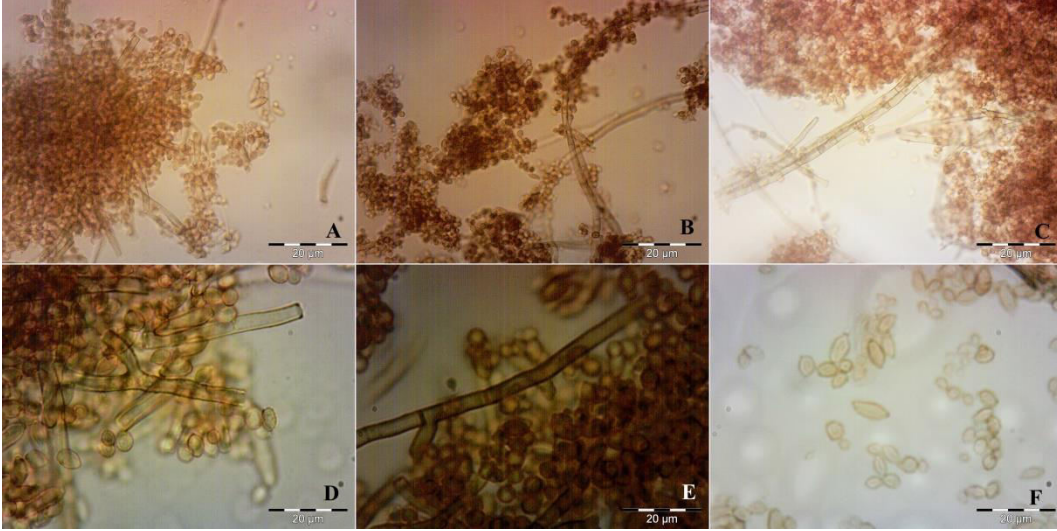
sekonder ramoconidia subsilindirik, $17-35 \times 3-4 (-5) \mu\text{m}$, 0-3-septat, septa daralmamış, subhiyalin çok soluk olivaceous, verruculose (SEM altında granülat) şeklindedir.

Habitat: Geniş bir coğrafi dağılımı olan çeşitli substratlarda ortaya çıkan oldukça yaygın bir saprobik türdür. Hipersalin water, air; Europe (Slovenia).

Bu türün tanınması Bensch et al., (2012) 'e göre yapılmıştır. Makroskobik ve mikroskobik görüntüleri Şekil 4.20 ve Şekil 4.21' de verilmiştir.



Şekil 4.20. *Cladosporium ramotenellum*, PDA, MEA ve OA besiyerleri görüntüleri



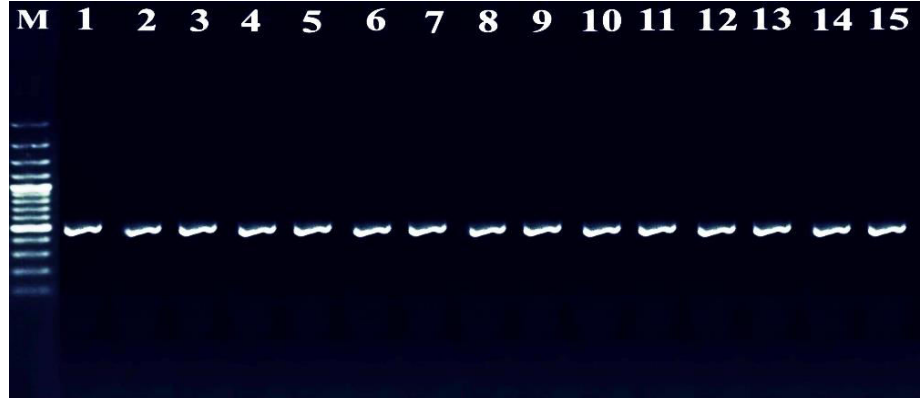
Şekil 4.21. *Cladosporium ramotenellum*, mikroskop görüntüleri.

(A,B,C,D,E): Konidiofor ve konidia; (F): Konidia.

4.4.Endofitik Fungus Türlerinin Genotipik Tanısı

4.4.1. ITS PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Zeytinlerden izole edilen ve fenotipik tanısı yapılan endofitik fungus izolatlarının genotipik tanısı için ITS1 ve ITS4 primerleri ile ITS (Internal Transcribed Spacer) PCR yapılmıştır. Nukleer ribozomal DNA'nın ITS1-5.8-ITS2 bölgesi, ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') ve ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3') primerleri ile amplifiye edilmiştir (Samson et al., 2014). ITS PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel sonuçları Şekil 4.22., Şekil 4.23. ve Şekil 4.24'te gösterilmiştir.



Şekil 4.22. Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin ITS PCR jel görüntüsü. M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bç),

1: H-ST1, 2: H-ST2, 3: H-ST3, 4: H-ST4, 5: H-ST5, 6: H-ST6, 7: H-ST7, 8: H-ST8, 9: H-ST9, 10: H-ST10, 11: H-ST11, 12: H-ST12, 13: H-ST13, 14: H-ST14, 15: H-ST15



Şekil 4.23. Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin ITS PCR jel görüntüsü (devam). M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bç) K: Negatif Kontrol,

1: H-ST16, 2: H-ST17, 3: H-ST18, 4: H-ST19, 5: H-ST20, 6: H-ST21, 7: H-ST22, 8: H-ST23, 9: H-ST24, 10: H-ST25, 11: H-ST26

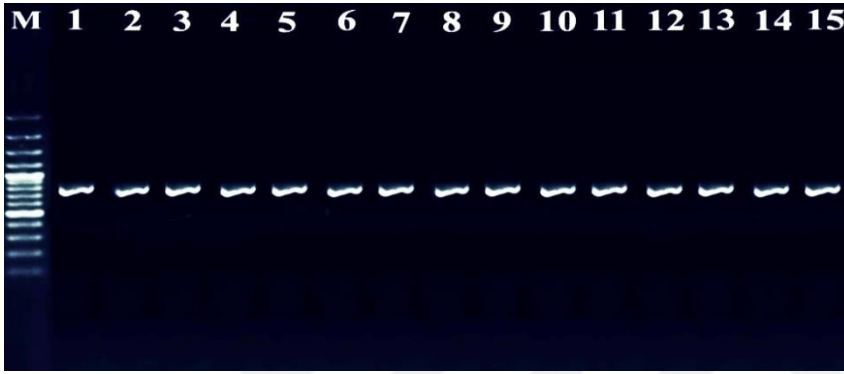


Şekil 4.24. Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin ITS PCR jel görüntüsü. M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bç) K: Negatif Kontrol,

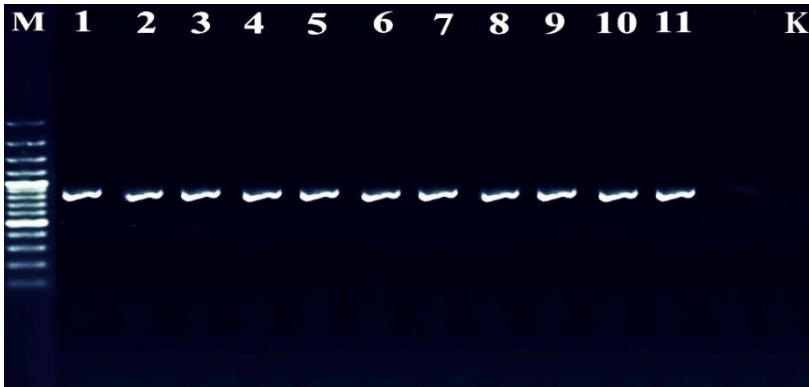
1: Z-ST1, 2: Z-ST2, 3: Z-ST3

4.4.2. 28S PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

Zeytinlerden izole edilen ve fenotipik tanısı yapılan endofitik fungus izolatlarının genotipik tanısı için LR0R ve LR7 primerleri ile 28S (LSU - Large Subunit) PCR yapılmıştır. LR0R (5'-GTACCCGCTGAACTTAAGC-3') ve LR7 (5'-TACTACCACCAAGATCT-3') primerleri ile 28S ribozomal DNA bölgesi amplifiye edilmiştir (Lin et al., 2015). 28S PCR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel sonuçları Şekil 4.25., Şekil 4.26. ve Şekil 4.27'de gösterilmiştir.



Şekil 4.25. Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin 28S PCR jel görüntüsü. M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bp),
1: H-ST1, 2: H-ST2, 3: H-ST3, 4: H-ST4, 5: H-ST5, 6: H-ST6, 7: H-ST7, 8: H-ST8, 9: H-ST9, 10: H-ST10, 11: H-ST11, 12: H-ST12, 13: H-ST13, 14: H-ST14, 15: H-ST15



Şekil 4.26. Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin 28S PCR jel görüntüsü (devam). M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bp) K: Negatif Kontrol,
1: H-ST16, 2: H-ST17, 3: H-ST18, 4: H-ST19, 5: H-ST20, 6: H-ST21, 7: H-ST22, 8: H-ST23, 9: H-ST24, 10: H-ST25, 11: H-ST26



Şekil 4.27. Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin 28S PCR jel görüntüsü. M: Moleküler ağırlık standardı (100-1500 bp) K: Negatif Kontrol, 1: Z-ST1, 2: Z-ST2, 3: Z-ST3

4.5. Endofitik Fungus Türlerinin DNA Dizi Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Endofitik fungus türlerinin DNA dizi analizi sonucu elde edilen veriler Finch TV (Blast) ve Ap E programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, tür tayini araştırmacıların kullanımına açık olan Gen Bankası'nın <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> web sayfasında, nükleotid dizilerinin kıyaslanarak benzerliklerin incelenmesi ile yapılmıştır. İzole edilen endofitik fungus türlerinin ITS gen bölgesi amplifikasyon ürünlerinin dizi analizi sonuçları ile 28S gen bölgesi amplifikasyon ürünlerinin dizi analizi sonuçları Tablo 4.5 ve Tablo 4.6'da verilmiştir.

Tablo 4.5. Hurma zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin DNA dizi analizi sonuçları

İzolat Kodu	GenBank Accession Numarası		Sekans Sonucu
	ITS bölgesi	28S bölgesi	
H – ST 1	MK681350	MK685360	<i>Stemphylium vesicarium</i>
H – ST 2	MK713566	MK685680	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
H – ST 3	MK681349	MK685897	<i>Stemphylium vesicarium</i>
H – ST 4	MK713546	MK685900	<i>Stemphylium vesicarium</i>
H – ST 5	MK713568	MK685984	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>

H – ST 6	MK713570	MK687410	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
H – ST 7	MK681351	MK687409	<i>Stemphylium vesicarium</i>
H – ST 8	MK713496	MK687411	<i>Stemphylium vesicarium</i>
H – ST 9	MK713572	MK687459	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
H – ST 10	MK713573	MK696205	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
H – ST 11	MK713574	MK687460	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
H – ST 12	MK713576	MK687461	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
H – ST 13	MK713567	MK687462	<i>Dothiora oleae</i>
H – ST 14	MK713580	MK687555	<i>Dothiora oleae</i>
H – ST 15	MK713581	MK688373	<i>Dothiora oleae</i>
H – ST 16	MK713578	MK687570	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
H – ST 17	MK713582	MK688378	<i>Dothiora oleae</i>
H – ST 18	MK713583	MK688393	<i>Dothiora oleae</i>
H – ST 19	MK713584	MK688554	<i>Dothiora oleae</i>
H – ST 20	MK724069	MK693698	<i>Bartalinia</i> sp.
H – ST 21	MK713547	MK689360	<i>Stemphylium vesicarium</i>
H – ST 22	MK713579	MK689059	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
H – ST 23	MK724070	MK689243	<i>Bartalinia</i> sp.
H – ST 24	MK722192	MK704515	<i>Rhizopus stolonifer</i>
H – ST 25	MK713550	MK713338	<i>Penicillium chrysogenum</i>
H – ST 26	MK722197	MK705761	<i>Rhizopus stolonifer</i>

Tablo 4.6. Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinden izole edilen endofitik fungus türlerinin DNA dizi analizi sonuçları

İzolat Kodu	GenBank		Sekans Sonucu
	Accession Numarası		
	ITS bölgesi	28S bölgesi	
Z – ST 1	MK713548	MK713340	<i>Alternaria alternata</i>
Z – ST 2	MK674250	MK713341	<i>Alternaria alternata</i>
Z – ST 3	MK722198	MK713374	<i>Cladosporium ramotenellum</i>

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Ege Bölgesi'nde yaygın olarak yetişen Ayvalık, Memecik, Domat, Erkence, Uslu, Çakır ve Çilli zeytin (*Olea europaea* L.) çeşitleri bulunmaktadır. İzmir'in Karaburun Yarımadası'nda kalan Seferihisar, Urla, Çeşme ve Karaburun'daki zeytin ağaçlarının önemli bir kısmı da Erkence zeytin çeşidinden oluşmaktadır. Zeytin, dalından koparıldığında başta oleuropein olmak üzere içerdiği yoğun fenolik bileşikler nedeniyle, doğrudan tüketilemeyecek kadar acı bir tatla olmaktadır. Bu nedenle zeytin, meyveye uygulanan kırma, ezme ve çizme gibi belirli işlemler sonrasında salamura edilerek, acı tadı veren maddelerin meyve dokusundan uzaklaştırılması gerekmektedir (Panagou, 2006). Karaburun Yarımadası'nda Erkence zeytin çeşidinin meyvelerinin ağaç üzerindeyken acılıklarının kaybolarak yenebilir hale gelmeleri sonucu oluşan zeytin meyvesine ise "Hurma" zeytin denmektedir. Hurma zeytinin bu olgunlaşma süreci ise "Hurmalaşma" olarak ifade edilmektedir. Bu işlemin sonunda, zeytin hala ağaçta iken acı tadını kaybeder ve içeride koyu kahverengimsi bir renge ve buruşuk bir dış tabakaya sahip olup, bu işleme girmeyen diğer zeytinlerden farklı fiziksel özellikleri göstermektedir. Hurma zeytinini ağaçta olgunlaştığı için de, diğer sofralık zeytinlerin ihtiyaç duyduğu sofralık zeytin işleme adımlarından geçmek zorunda değildir. Bu nedenle, hipertansiyon gibi sağlık sorunları olan tüketiciler, bu zeytin türünü daha yüksek tuz içeriğine sahip olan sofralık zeytin yerine tercih etmektedirler (Aktaş vd., 2014).

Hurmalaşmanın iklim (çiğ oluşturacak nem koşullarının olması, denizden poyraz rüzgarının esmesi, sıcaklığın mevsim normallerinde olması gibi) ve toprak özellikleri dışında genotipine de bağlı olduğu, bazı tiplerin daha fazla hurmalaştığı ve hurma oluşumunun yıllara göre değişiklik gösterdiği de bilinmektedir. Hurmalaşmanın sadece bu yörelerde "Erkence" zeytin çeşitlerinde gerçekleşmesinin sebebi ise diğer çeşitlerin kabuk kısımlarının Erkence zeytine göre daha kalın olması nedeniyle bu oluşumunun gerçekleşmemesidir (Sevim vd., 2013).

Doğanlar vd. önderliğinde yapılan çalışmalar sonucu hurma zeytininin gen haritasının diğer zeytin türlerinden farklı olduğu tespit edilmiştir. Urla ve Karaburun yarımadasında 20 farklı yerde yetişen erkenci zeytinlerini incelemişlerdir. Zeytinin 5 tane genini barkod olarak kullanmışlardır. Bu genleri Türkiye'de yetişen diğer 20 çeşit zeytinle dizileme yapmışlardır. Bu dizileme sonucunda çeşitleri birbirinden ayırt edecek DNA noktalarını belirlemişlerdir. Erkenci zeytinin diğerlerine ne kadar benzediğine veya benzemediğine bakmışlardır. Araştırmalar sonucunda da bölgeden toplanan 20 farklı erkence zeytinin diğer zeytin türlerine göre farklı çeşitte olduğunu tespit etmişlerdir (Şahbaz, 2017).

Benzer bir zeytine Yunanistan'da rastlanır ve “Thrubolea” veya “Throuba Thassos” adıyla bilinmektedir. Başka bir çeşidi olan “Dhokar”, Tunuslu araştırmacılar tarafından bildirilmektedir (Jemai et al., 2009; Rigane et al., 2011; Zoidou et al., 2010; Aktaş vd., 2014). Yunanistan'da bulunan benzer tatlanmanın meydana geldiği, meyvelerinin ağaç üzerinden işlem görmeksizin tüketilebildiği bir zeytin çeşidi ile yapılan çalışmada, olgunlaşma işlemi sonucu tatlanmanın, oleuropeini hidrolize eden bir *Phoma olea* isimli fungusun varlığından kaynaklandığı belirtilmektedir. Bu yörelerde Hurmalaşmış zeytinlerin daha yüksek ekonomik değer taşımasından dolayı da genelde zeytinyağı üretimi ikinci planda kalmaktadır. Ağaç üzerindeki olgunlaşma sürecine iklim ve/veya toprağın etkisi de yerel halk tarafından parametre olarak belirtilmiştir, çünkü bu fenomen sadece belirli coğrafi konumlarla sınırlıdır (Aktaş vd., 2014; Sevim vd., 2013).

Olgunlaşma süreci üç aşamaya ayrılır. Birincisi, oleuropein birikiminin meydana geldiği büyüme aşamasıdır. İkinci aşama, klorofil ve oleuropein seviyelerinde bir azalma ile çakışan yeşil bir olgunlaşma aşamasıdır. Bu aşamada yoğun lipit sentezi gözlenir. Oleuropeinin hızla azalması ve verbaskosit birikmesi ikinci aşama ile ilgilidir. Son aşama, antosiyaninlerin ve flavonoidlerin ortaya çıkmasıyla karakterize edilen ve oleuropein seviyelerinin düşmeye devam ettiği siyah bir olgunlaşma aşamasıdır (Charoenprasert and Mitchell, 2012; Aktaş, 2013).

Susamcı vd. (2017) Karaburun Yarımadası'ndan toplanan Erkence ve Hurma zeytinlerinin kimyasal özelliklerinin gelişimini incelemek için yaptıkları bir araştırmada Hurma zeytinlerinde oleuropein içeriğinin (<2000 mg/kg taze ağırlık), mevsimin başlangıcında Erkence zeytinlerden (35.000 mg/kg taze ağırlık) çok daha düşük olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlar, oleuropeinin enzimatik oksidasyonunun, ağaçtaki olgunlaşma sırasında Hurma zeytinlerinin doğal acılığından sorumlu olabileceğini düşündürmüştür (Susamcı vd., 2017).

Jemai et al. (2009) yaptıkları çalışmada Tunus'un güneyinde yetişen Dhokar zeytini ile Chemlali zeytin çeşidini kıyaslamışlardır. Başlıca zeytin meyvesi biyofenolik bileşiği olan oleuropein, tüm olgunluk aşamalarında önemli ölçüde azalmıştır ve seviyesi, Dhokar zeytin çeşidinde 3.29 g / kg (Temmuz)'dan, 0.16 g/kg (Ekim)'a kadar düşmüştür. Chemlali zeytin çeşidinde ise 5.7 g / kg'dan (Temmuz), 3.75 g / kg (Ekim)' e kadar düşmüştür (Jemai et al. 2009).

Oleuropein, β -glikosile edilmiş elenik asit ve hidroksitirozolün heterosidik bir esteridir. Zeytin meyvesinin başlıca sekoiridoitleridir ve zeytinlerin acı tadından sorumludur. Demetiloleuropein, ligstrosit ve oleuropein aglikonu gibi zeytinlerde farklı oleuropein türleri mevcuttur (Aktaş, 2013). Zeytinlerin doğal olarak acılığını yitirmesi ve olgunlaşması sırasındaki değişimlerin β -glukozidaz ve esteraz enzimlerinin aktiviteleri ile ilişkili olabileceği ve fenolik bileşiklerde bir azalmaya neden olabileceği varsayılmıştır (Jemai et al., 2009; Aktas et al., 2014).

Jemai et al. (2009) Tunus'un güneyinde yetişen Dhokar zeytin çeşidi ile yaptıkları bir çalışmada β -Glukozidaz ve esteraz aktiviteleri belirlemişlerdir. İki enzim de aynı eğilimi göstermiştir; Eylül ayında maksimuma ulaşmışlardır, ardından son hasatta hafif bir düşüş görülmüştür. Bu aktiviteler, oleuropein konsantrasyonunda ilgili olabilecek değişiklikler göstermiştir. β -glukozidaz aktivitesi, Temmuz ayında zeytin meyvesinde 28,31 U / g ile başlamış, daha sonra kayda değer bir şekilde artmış ve Eylül ayında maksimum seviyeye ulaşmıştır (179.75 U / g zeytin meyvesi). Ekim ayında ise 84.24 U / g'ye gerilemiştir. Esteraz aktivitesi ise, zeytin meyvesinin siyah olduğu Eylül ayındaki (30.03 U / g) maksimum aktiviteyi göstermiştir ve son olgunlaşma aşamasında 17.05 U / g değerinde bir aktiviteye ulaşarak azalmıştır. Benzer bir çalışma ile Amiot et al.

(1989) da, zeytin meyvesi ekstraktları içerisinde ölçülen esteraz aktivitesinin, olgunlaşma aşamasında önemli ölçüde arttığını, siyah olgunlaşma sırasında maksimum seviyeye ulaştığını bildirmişlerdir (Amiot et al., 1989, Jemai et al., 2009). Bu verilere göre oleuropein iki ardışık hidroliz reaksiyonuna girmiş gibi görünmektedir. İlk aşamada β -glukozidaz enzimi hidroliziyle oleuropein aglikon ve glikoz elde edilmiştir ve ikinci aşama da ise aglikondan esteraz aktivitesi ile elenoik asit ve hidroksitirozol oluşumu gerçekleşmektedir. Ayrıca bu çalışmada Dhokar zeytin çeşidinde, oleuropein seviyesinde önemli bir azalma olduğu da bildirilmiştir. Bu sonuçta, olgunlaşma sırasındaki artan hidrolitik enzim aktivitesi raporları ile tutarlıdır (Briante et al., 2002, Jemai et al., 2009).

Hidroksitirozol, ifade edildiği gibi oleuropeinin başlıca bozunma ürünlerinden biridir (Bouaziz et al., 2004; Jemai et al., 2009). Oleuropeine göre çok daha az miktarlarda bulunmuştur ve olgunlaşma sırasında ters bir eğilim göstermiştir. Konsantrasyon değeri, olgunluğun başlangıcında 204 mg / kg'dır ve 320 mg / kg'a yükselmiştir; daha sonra tamamen olgun siyah meyvelerde, hasat sonunda seviyesi düşmüştür. Hidroksitirozol konsantrasyonlarının artması, oleuropein hidrolizini katalizleyen hidrolitik enzimlerin, özellikle glikosidaz ve esterazların, oleuropein aglikon, elenoik asit ve 3,4-dihidroksifenil üretimi ile sonuçlanan aktivitesine dayandığı belirtilmektedir (Jemai et al., 2009).

Jemai et al. (2009) çalışmasında Chemlali zeytin meyvelerine kıyasla, Dhokar zeytin meyvesindeki hidroksitirozol içeriğinin daha düşük olduğu sonucuna varmışlardır. Chemlali zeytin meyvesinde olgunlaşmanın başlangıcında (Temmuz) hidroksitirozol konsantrasyonu 300 mg / kg değerine ve Ocak ayında (760 mg / kg) maksimum seviyesine ulaşmaktadır. Bu sonuçlar, olgunlaşma sırasında, oleuropein türevlerinde ve hidroksitirozoldeki artışa paralel olarak, oleuropeinde bir azalma bildiren önceki literatür verilerini doğrulamaktadır. Malik et al. (2006), tam gelişmiş meyvelerde verbaskosit artışının, olgun meyvelerde oleuropein azalmasına eşlik ettiğini, ancak aynı ölçüde olmamakla birlikte olgunlaşma sırasındaki oleuropein bozulmasının bir kısmının verbaskosit artışına katkıda bulunabileceğini bildirmiştir (Malik et al., 2006). Diğer verilerde Ryan et al. (2003) ise, oleuropeinin bozulmasının hidroksitirozol üretebileceği ve daha

sonra verbaskoside dönüştürülebileceğini bildirmiştir (Ryan et al., 2003; Jemai et al., 2009).

β -glukosidaz (bG; EC 3.2.1.21) enziminin hidrolitik aktivitesi, çeşitli endüstriyel uygulamalarda kullanılmaktadır. β -glukosidazlar doğal mayalanmış sofralık zeytin ve zeytinyağı üretiminde de kullanılır. Zeytinler, acı tadı oluşturan fenolik glikozid oleuropein içerir. Günümüzde, tipik endüstriyel acılık giderme yöntemleri meyvelerde, oleuropeinin hidrolizini gerçekleştirmektedir. Ancak bu teknolojiler, üretilen yüksek derecede kirli deşarjlar ve durulama için kullanılan çok miktarda su gibi büyük dezavantajlara sahiptir. Alternatif bir strateji, sofralık zeytinlerin doğal fermantasyonu sırasında ve mikrobiyal β -glukosidazlar ve esterazlar ile oleuropeinin hidrolizine dayanmaktadır. Sofralık zeytinlere özgü olan bu prosedür atık su problemini ortadan kaldırır ve fenolik antioksidanların zeytinden atılmasını önler (Restuccia et al., 2011; Ramirez et al., 2014; Piscopo et al., 2014).

Susamcı et al. (2017) yılında yaptıkları çalışmada, Hurma zeytinlerinde fenolik bileşiklerin konsantrasyonunun, özellikle de oleuropeinin, Erkence zeytin meyvesine kıyasla daha düşük olduğunu doğrulamıştır. Oleuropein aglikon, hidroksitozol glukozitler ve geri kalan fenolik bileşiklerin içerikleri de Hurma zeytinlerde Erkence zeytinlerine göre çok daha düşüktür. Dahası, koyu kahverengi Hurma zeytinleri, serbest siyanidin-3-rutinosid ve siyanür-3-glukozit içeren siyah Erkence zeytininin aksine serbest veya polimerleşmiş antosiyaninleri içermediği bildirilmiştir. Antosiyaninler çiğ zeytinlerde bulunur ve işleme sırasında oksitlenebilir ve polimerize edilebilir. Bu maddelerin Hurma zeytinlerinde serbest veya polimerize edilmediğini, böylece koyu kahverengi renklerinin, o-difenollerin, özellikle oleuropeinin oksidasyonundan oluşabileceğini göstermektedir. Bu nedenle bu pigmentler Hurma zeytinlerinin koyu renginde yer almazlar, ancak oleuropeinin enzimatik oksidasyonu sırasında oluşan polimerler bu koyu kahverengi renkten sorumlu olmalıdır. Bu nedenle Hurma zeytinleri, oleuropeinin enzimatik oksidasyonu nedeniyle ağaçta olgunlaşma sırasında acılarını yitirdiği belirtilmektedir (Susamcı et al., 2017).

Erkence ve Hurma zeytinleri arasında bulunan diğer bir fark da şeker içeriğidir. Hurma'da glikoz içeriği Erkence zeytinlerinden çok daha düşüktür. Dolayısıyla, Hurma zeytinlerinin ağaç üzerindeki olgunlaşmaları sırasında acılığı azalmaktadır ve bu dönemde yüksek miktarda glikoz tüketmektedirler, ancak manitol veya fruktoz içermemektedirler. Hurma zeytinlerinin doğal acılığının gitmesi için net bir açıklama yoktur, ancak olayın *Phoma olea* ile enfeksiyonundan dolayı olabileceği öne sürülmektedir. Erkence'in Hurma zeytinlerine dönüşümü sırasında ortaya çıkan olaylardan biri de meyvede nemin azalmasıdır. Hurma zeytinlerinde bu parametre %30-40 arasında değişmektedir, Erkence zeytinlerinde ise %50 civarındadır. *Phoma* fungusu meyvelerde düzensiz nekrotik lekeler, fenolik bileşiklerde bir düşüşe ve peroksidaz ve polifenoloksidaz aktivitesinde bir artışa neden olmaktadır (Susamcı et al., 2017).

Daha önce yapılan bir çalışmaya göre, acı tadın giderimi, etli kısımda yetişen ve oleuropeini hidrolize eden fungus *Phoma oleae*'nin varlığından kaynaklanmaktadır. Oleuropeinin, özellikle β -glukosidaz ile enzimatik hidrolizi, hem bakteri hem de funguslar için iyi bilinmektedir (Panagou, 2006).

Zeytin ve zeytinyağındaki fenolik bileşiklerin konsantrasyonu, β -glukosidaz, polifenoloksidazlar (PPO), peroksidazlar (POD) ve lipoksijenaz (LPO) gibi zeytinlerde bulunan çeşitli endojen enzimlerin aktivitesi ile ilgilidir (Yorulmaz vd., 2013). Polifenol oksidaz (PPO) aktivitesi birçok bitkide meyve olgunlaşması sırasında değişmektedir. Meyve olgunlaşması sırasında hem PPO aktivitesi hem de PPO proteini miktarı önemli ölçüde artmıştır (Ortega-Garcia et al., 2008).

Ramirez et al. (2014) yaptıkları bir çalışmada farklı zeytin kooperatifleri tarafından tedarik edilen başlıca İspanyol sofralık zeytin çeşitlerini polifenol bileşimleri ve endojen enzimler açısından incelemiştir. PPO (polifenol oksidaz) aktivitesi ve kahverengileşme oranı arasındaki korelasyon beş İtalyan zeytin çeşidinde bildirilmiştir. Sonuç olarak, aynı olgunlaşma derecesinden hasat edilen çiğ zeytinlerde oksidaz ve β -glukosidaz aktivitelerinin maksimum olduğu, olgunlaşmada zeytinde endojen olarak bulunan bu enzimlerin rol oynadığı vurgulanmıştır (Ramirez et al., 2014).

De Leonardis et al. (2015) zeytin yapraklarında endojen oleuropeinin bozulmasında en az iki tip enzimin rol oynadığını saptamışlardır. Aktif polifenoloksidaz ve β -glukosidazın varlığı HPLC ve UV-Görünür spektroskopisi ile belirlenmiştir. Spesifik olarak, taze yapraklardan elde edilen protein ekstraktları, her iki enzimatik aktivitenin varlığını göstermiştir, çünkü oleuropein tükenmesi, oleuropein aglikon, 3,4-DHPEA-EA oluşumu ile aynı anda meydana gelmiştir. Kurutma işlemine tabi tutulan yapraklar, sadece reaksiyon çözeltisinin tipik kahverengi renklenmesinden sorumlu olan oksidasyon ürünlerinin oluşumuna yol açan polifenoloksidaz aktivitesi göstermiştir (De Leonardis et al., 2015).

Ortega-García et al. (2008) yaptıkları bir çalışmada ise, oleuropein konsantrasyonu ile polifenol oksidaz (polyphenol oxidase - PPO) aktivitesi arasındaki zaman dilimlerini *Olea europaea* “Picual” meyvesiyle karşılaştırarak, meyve olgunlaşması sırasında oleuropein konsantrasyonundaki en keskin düşüşün PPO aktivitesindeki artışla çakışmadığını tespit etmişlerdir. Oleuropein konsantrasyonu olgunlaşmanın ilk aşamalarında düşerken, PPO olgunlaşmanın son aşamalarında yükselmiştir. Dolayısıyla PPO aktivitesindeki artış meyve olgunlaşması sırasında oleuropein konsantrasyonundaki değişikliklerden sorumlu değildir. Her ne kadar meyve olgunlaşması sırasında oleuropein metabolizması tam olarak açıklanmamasına rağmen, diğer zeytin çeşitlerinde meyve olgunlaşması sırasında, oleuropein konsantrasyonunun azaldığı, muhtemelen demetiloleuropein ve elenoik asidin bir glikozidi gibi esteraz aktivitesinin sonucu diğer bileşiklere dönüştürüldüğü gösterilmiştir (Ortega-García et al., 2008).

Esterazlar, oleuropeinin ester bağlarını hidrolize ederek, hidroksitirozol ve elenoik asit türevlerini üretir (Capozzi et al., 2000); β -glikosidaz'lar, glikoz ve aglikon arasındaki bağı koparırlar (Briante et al., 2004; Mazzei et al., 2006; Restuccia et al., 2011). Restuccia et al. (2011) yaptıkları bir çalışmada doğal fermente zeytin tuzlu suyundan β -glikosidaz (bG) üreticisi *Wickerhamomyces anomalus* BS81 suşunu izole etmişlerdir. Maya suşunun, oleuropein acılığını β -glikosidaz ile sinerjistik olarak hareket eden esteraz aktivitesine sahip olduğunu göstermişlerdir (Restuccia et al., 2011).

Jemai et al. (2009) yaptıkları çalışmada, zeytin ekstraktının antioksidan potansiyelinin, olgunlaşma sırasında toplam fenol içeriği, flavonoidler ve yüksek oranda şeker içeren antioksidan aktiviteleri ile bilinen mannitol içeriği ile bağlantılı olarak arttığı bulunmuştur. Bu veri, elde edilebilir yağların kalitesinin test edilmesinde önemli parametreler olarak farklı *Olea europaea* L. çeşitlerinin bir biyokimyasal karakterizasyonu için faydalı olacağı bildirilmiştir (Jemai et al., 2009).

Sofralık zeytinler çok iyi fenolik bileşik kaynakları olarak bilinmektedir. Fenolik bileşikler sadece antimikrobiyal ve antioksidan özelliklere sahip değildir, aynı zamanda zeytin meyve sineği olan *Dacus olea* istilasının önlenmesine de katkıda bulunmaktadır. Ek olarak, zeytinlerin fenolik bileşikleri, özellikle oleuropein ve hidroksitirozol, kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi, dejeneratif hastalıkların korunması, antienflamatuar ve antioksidan özelliklerinden ötürü kardiyovasküler hastalıkların önlenmesi gibi olumlu sağlık etkileriyle de ilişkilidir (Aktaş et al., 2013). Son yıllarda, antioksidan ve antimikrobiyal aktiviteleri, sağlık ve duyuşal özellikleri nedeniyle, zeytin fenoliklerine ilgi artmaktadır. Fenolik bileşikler, beslenme özelliklerini, temel özellikleri ve raf ömrünü düzenler. Bu bileşikler, anti-enflamatuar, anti alerjik, antimikrobiyal, anti kanserojen ve antiviral aktivitelerinden dolayı insan sağlığı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Aktaş, 2013).

Karşlı'nın 2013 yılında yaptığı Hurma zeytinin mikrobiyolojik karakterizasyonu üzerine olan çalışmada Hurma zeytinini üzerindeki mikrobiyal popülasyonun Erkence ve Gemlik zeytinini ile karşılaştırıldığında daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Karşlı bu çalışmasını zeytindeki bakteriyel mikroorganizmaların araştırılması üzerinde yapmıştır. Olgunlaşma döneminde Hurma zeytindeki mikrobiyal büyüme, fenolik bileşikleri parçalayan ve Hurma zeytinin hurmalaşma aşamalarına neden olan enzim aktivitelerinde artışlara yol açabilir (Karşlı, 2013; Aktaş, 2013).

Çalışmamızda İzmir Karaburun Yarımadasında dalında olgunlaşan Hurma zeytin örnekleri Karaburun bölgesinin Eğlenhoca, Kösedere, İneçik, Amberseki ve Saip köylerinden toplam olarak 20 bahçeden Hurma zeytin örneği alınmıştır.

Bu örneklerin dışında çalışmamızda Manisa (Gemlik zeytin çeşidi), İzmir (Erkence zeytin çeşidi) ve Bursa'dan (Çelebi zeytin çeşidi) karşılaştırma amaçlı Hurma olmayan diğer zeytinlerden toplam olarak 12 zeytin örneği daha alınarak, tüm bu zeytin örneklerinden izole ettiğimiz endofitik fungus türlerinin araştırılması hedeflenmiştir. Bu amaçla yüzey sterilizasyonu yaptığımız zeytin örneklerinden zeytinlerin kabuklarının iç kısmından ve etli kısmından alınan kazıntı ve parçalar ile Potato Dextrose Agar (PDA) ortamlı petrilere belli aralıklarla aktararak inoküle edilmiştir ve 25°C'de inkübasyona bırakılmıştır. Bu aşamada Malt Ekstrakt Agar (MEA) ortamı da kullanılmıştır ve en iyi PDA ortamından sonuç alındığı için çalışmaya PDA ortamı ile devam edilmiştir. Kazıntı ve parçaların alındığı PDA ortamlarının inkübasyonu sonrası üreyen fungus örnekleri ayrı ayrı PDA besiyeri bulunan petrilere iğne öze ile 3 nokta şeklinde inoküle edilerek saflaştırılma işlemleri yapılmıştır.

İzolasyon aşamasında PDA besiyeri kullanılmıştır. Çünkü, son on yılda, patatesler özellikle mitosporik fungusların üremesini teşvik edici kompleks karbonhidratları içermesi nedeniyle daha yaygın bir nişasta kaynağı olmuştur. Sia et al. 2013 yılında zeytin bitkisi *Olea europaea*'nın endofitik fungal çeşitliliği üzerine yaptıkları çalışmada izolasyonda PDA ve MDA (Manihot Dextrose Agar) kullanmışlar ve PDA ortamının MDA ile aynı performansa sahip olduğunu belirtmişlerdir (Sia et al., 2013). Ayrıca Ferraro et al., (2008) yaptıkları bir çalışmada Sicilya'daki iki farklı bölgede yetişen zeytin bitkisinde malt ekstrakt agar ortamı (MEA) kullanarak endofitik fungusların tanısını yapmışlardır. Hakim fungal genusların *Alternaria*, *Cladosporium*, *Diplodia*, *Phoma*, *Septoria* ve *Stemphylium* olduğunu gözlemlemiştir. İki bölgede yetişen zeytin meyvesinden izole edilen endofitik fungal türlerin her ikisinde de benzer bir kompozisyona sahip olduğunu gözlemlemiştir. Her ne kadar yapılan endofitik fungus çalışmaları ılıman iklim bitki türleri üzerinde gerçekleştirilmiş olsa da, bazı çalışmalar tropikal bitki türlerinin daha büyük bir fungal biyolojik çeşitliliğine ev sahipliği yaptığını göstermiştir. Şimdiye kadar elde edilen sonuçların çoğu, tropikal endofitlerin çeşitlilik gösterebileceğini; bu nedenle, tropik konukçu endofit fungal türlerin zengin olduğu ekolojik bir topluluğunu oluşturduğunu göstermektedir (Ferraro et al., 2008; Sia et al., 2013).

Saflaştırma işlemi sonucunda Hurma zeytin örneklerinden 26 ve hurma olmayan diğer zeytin çeşitlerinden ise 3 izolat olmak üzere toplamda 29 izolat elde edilmiştir. Sonrasında bu izolatlara morfolojik ve mikroskopik özellikleri, Pitt, 1985; Hasenekoğlu, 1991; Barnett and Hunter, 1998; Samson and Pitt, 2000; Boerema et al., 2004; Zheng et al., 2007; Samson et al., 2010; Bensch et al., 2012; Woudenberg et al., 2013 ve Aveskamp, 2014'te belirtildiği şekilde herbiri için kendi tanılama ortamlarında incelenerek tür düzeyinde fenotipik tanıları yapılmıştır. Tüm bu türler Tablo 4.3. ve Tablo 4.4.'de belirtilmiştir.

Fenotipik tanısı yapılan 29 izolata genotipik tanısı için ITS PCR ve 28S PCR yapılmıştır. Birçok çalışma geleneksel olarak fungal türleri tanımlamak için ITS bölgesinden elde edilen sekans verilerini kullanmaktadır. ITS verilerinin, ITS'in hızlı evrimi ve yüksek varyasyonu nedeniyle bu amaçlar için faydalı olduğu düşünülmektedir. D1 ve D2 yüksek oranda değişken domainlerini içeren LSU bölgesi ise, kendi başlarına veya ITS bölgesi ile birlikte kullanıldığında, funguslarda türlerin tanımlanması için değerli olmaktadır. Tür düzeyinde tanımlama için, ITS, rRNA sistronunun en hızlı gelişen kısmı olduğundan en faydalı olanıdır. Amplifikasyondaki kolaylık, yaygın kullanım ve uygun şekilde büyük barkod açığı nedeniyle (yani, özel ve özel olmayan değişkenlik arasındaki fark), ITS, bir mikolog konsorsiyumu tarafından funguslar için resmi barkod olarak seçilmiştir. Bu nedenle, doğal ürünler araştırması için, LSU geninin ve ITS bölgesinin, fungal taksonomisi ve sistematikteki yüksek prevalansları nedeniyle önemlidir. LSU, tür ilişkilerini belirlemek için filogenetik analizlerde kullanılabilirken, ITS tek başına veya türlerin tanımlanması için diğer protein kodlama genleriyle birlikte kullanılabilir. Bu genler, Fungal Yaşam Ağacı'nın Birleştirilmesi (Assembling the Fungal Tree of Life - AFToL) gibi fungal sistematikteki ana dönüm noktası çalışmalarında yaygın olarak kullanılmıştır. Bu nedenle, fungal rRNA'nın çok sayıda nukleer rDNA sekansı, barkodlama ve filogenetik analiz yoluyla türlerin tanımlanması için GenBank'ta mevcuttur. (Yoo and Eom, 2012; Raja et al., 2017).

ITS PCR için ITS1-ITS4 primerleriyle Samson, 2014'de belirtilen miktar ve koşullar optimize edilerek ITS PCR gerçekleştirilmiştir ve sekans analizine gönderilmiştir. 28S PCR için de LR0R-LR7 primerleriyle Lin et al., 2015'te

belirtildiği şekilde 28S PCR işlemi gerçekleştirilmiştir ve sekans analizine gönderilmiştir. Analizden gelen sekans sonuçları Finch TV (Blast) ve ApE programı kullanılarak değerlendirilmiştir ve <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov> (NCBI) sayfasında Standard Nucleotide Blast kısmında program ayarlarından megablast (yüksek sekans benzerliği) özelliği seçilerek incelenmiştir. ITS ve 28S gen bölgesi PCR ürünlerinin sekans analizi sonuçları fenotipik tayin sonuçlarıyla beraber değerlendirilerek 29 izolatın genotipik tanısı tamamlanmıştır.

Yapılan fenotipik ve genotipik tanılama sonucunda Hurma zeytin örneklerinin izolatlarından belirlediğimiz türler; *Stemphylium vesicarium*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Dothiora oleae*, *Rhizopus stolonifer*, *Penicillium chrysogenum* ve *Bartalinia* sp. olmuştur. Hurma olmayan diğer zeytin örneklerinin izolatlarından belirlediğimiz türler ise *Alternaria alternata* ve *Cladosporium ramotenellum* olmuştur. Yapılan çalışmalarda da olduğu gibi çalışmamızda Hurma olan zeytin türlerinden izole edilen fungal popülasyon Hurma olmayan diğer zeytin türlerinden izole edilen fungal popülasyona göre daha yüksek çıkmıştır. Bu da bize Hurma zeytinlerdeki endofitik fungal türlerin çeşitliliğinin fazla ve önemli olduğunu göstermektedir.

Baffi et al. (2012), zeytin (*Olea europaea* L.) meyvelerinin fungal çeşitliliğini ve biyoteknolojik uygulamalarla belirlenmiş enzimatik aktivitelerini araştırmıştır. Yedi farklı cinse (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Lichtheimia* ve *Galactomyces*) ait on dört farklı tür tanımlamıştır. *Aspergillus fumigatus*, ardından *Galactomyces geotrichum*, *Penicillium commune* ve *Rhizomucor variabilis* var. *regularior* en sık görülen türler olmuştur. Spesifik enzim taraması, sırasıyla β -glukosidaz, karboksimetilselülaz (CMCase), poligalakturonaz ve lipaz için substratlar olarak sellobiyoz, karboksimetilselüloz (CMC), poligalakturonik asit ve CaCl_2 / Tween 80 kullanılarak agar plakaları üzerinde test edilmiştir. En iyi aktiviteleri sergileyen türler: *Aspergillus fumigatus* (β -glukozidaz, CMCase ve lipaz için); *Rhizopus oryzae* (β -glukozidaz ve lipaz için); *Rhizomucor variabilis* (β -glukozidaz, CMCase ve polygalakturonase için); *Mucor fragilis* (β -glukozidaz, CMCase ve lipaz); *Galactomyces geotrichum* (glu-glukozidaz, poligalakturonaz ve lipaz için) ve *Penicillium commune* ve *Penicillium crustosum* (lipaz için) (Baffi et al., 2012).

En yüksek β -glukozidaz aktivitesi, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Rhizomucor variabilis*, *Rhizopus oryzae* ve *Mucor fragilis* tarafından sergilenmiştir. Bu enzim, oleuropeinin (zeytinlerde ana fenol bileşiği), elenoik asit ve 3,4-dihidroksifeniletanolün heterosidik bir esterine parçalanmasında rol oynar; kahverengileşme kapasiteleri ve yoğun acı tadı nedeniyle, teknik öneme sahiptir (Ciafardini, 2002; Baffi et al., 2012).

Wase ve arkadaşları tarafından öğütülmüş samandan izole edilen *Aspergillus fumigatus* suşunun β -glukosidaz aktivitesi biyoetanol üretiminde kullanılmıştır. Ayrıca biyoetanol üretiminde pirinç samanını hidrolize etmek için *Aspergillus niger* β -glukosidaz kullanılması uygulanabilirliği, Sukumaran ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. Baffi ve arkadaşlarının çalışmasında *Rhizomucor variabilis* için, tüm isolatlar güçlü β -glukosidaz aktivitesi sergilemiştir. Bu genus, özellikle *Rhizomucor miehei*, yüksek hücre dışı β -glukozidaz üretiminin bir sonucu olarak biyoteknolojik açıdan ilginçtir (Tako et al., 2010; Baffi et al., 2012). CMCase ve polygalacturonase enzimleri için en iyi aktiviteler, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* ve *Rhizomucor variabilis* isolatlarında da gözlenmiştir. Bu enzimler zeytinyağı kalitesini etkiler ve bazı ülkelerde kullanımlarına izin verilir, çünkü bunlar antioksidan fenol bileşiği seviyelerini önemli ölçüde artırır, koruyucu bir etki sağlar ve böylece raf ömrünü uzatır. Teknolojik açıdan da önemlidir, çünkü zeytin hücresi duvarı polisakkaritlerini hidrolize ederek verimi artırırlar. Biyoteknolojik uygulamaları olan *Aspergillus* kaynaklı selülozlar ve poligalakturonazlar diğer araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. *Rhizomucor variabilis* için, diğer *Rhizomucor* türleri, endüstriyel işlemlerde çok çeşitli uygulamalara sahip güçlü pektinolitik ve selüloolitik enzim üreticileri olarak rapor edilmiştir (Baffi et al., 2012).

Bazı durumlarda, tespit edilen enzimatik aktivite teknolojik proseslerin iyileştirilmesi için kullanılabilir. Örneğin Baffi et al. (2012) yaptıkları çalışmada, neredeyse tüm suşlar β -glukosidaz aktivitesi göstermiştir. Bu enzim, zeytinyağında kahverengileştirme ve acıdan sorumlu olan oleuropeinin degradasyonuna katılır ve lignoselülozik artıklardan biyoetanol üretimi için kullanılabilir (Baffi et al., 2012).

Bu çalışmalar aynı zamanda zeytinden izole edilmiş zengin bir mikobiotanın potansiyelini göstermektedir, bu da zeytinlerin farklı sektörlerde biyoteknoloji ve enzim üretiminde avantaj sağlamak için kullanılabileceğini düşündürmektedir. Tanımlanan türler ve enzimleri, sadece zeytinyağı endüstrisinde değil, biyolojik dönüşüm ve tarımsal yan ürünlerin kullanımı için biyoteknolojik süreçleri kullanabilen diğer endüstrilerde de kullanılabilir (Baffi ve ark., 2012).

Sia et al. (2013), zeytin bitkisi *Olea europaea*'nın endofitik fungal çeşitliliği üzerine yaptıkları çalışmada, *Collectotrichum* ve *Diaporthe* / *Phomopsis* genusunu saptamışlardır. *Diaporthe* / *Phomopsis* genusu potansiyel olarak birçok biyolojik antifungal ve antibakteriyal metabolit ürettiği, zengin bir sekonder metabolit kaynağı olduğu ve özellikle de fitopatojenik funguslar olan *Cladosporium sphaerospermum* ve *C. cladosporioides*'e karşı etkili olduğu yapılan çalışmalarda vurgulanmıştır. *Collectotrichum*, birçok bitki türünden izole edilmiş semptomatik patojenlerdir. Bununla birlikte, asemptomatik endofitler de olabilirler. *Collectotrichum* spp. ağaçlarda antraknoza neden olabilir, bu da ciddi üretim kaybına neden olur. Bu genus aynı zamanda avokado, muz, narenciye, mango, papaya, tutku meyvesi, guava ve kaju yetiştiriciliğinde yaygın bir tropikal meyve bitki patojenidir. Ancak, bu yaptıkları çalışmada örneklenen yapraklar sağlıklı durumdadır ve antraknoz semptomları göstermemiştir. Ayrıca *Collectotrichum*'un, antikanser ilacı taksolü ürettiği bilinir. Tıbbi ve endüstriyel açıdan önemli ekstrasellüler lipaz, antimikrobiyal bir metabolit (colletotrik asit) ve colletotrik asit (11 β -hidroksisteroid dehidrojenaz tip 1 (11 β -HSD1) inhibitörü) de bu genusun türlerinden izole edilmiştir (Sia et al., 2013).

Krohn et al. (1999), *Medicago lupulina* bitkisi endofitik fungusu olan *Pleospora herbarum*'dan anti-bakteriyel bileşik Ketodivinillaktonik steroid, herbarulid olduğunu bildirmişlerdir (Krohn et al., 1999). Bu da bizim izole ettiğimiz *Stemphylium vesicarium* gibi *Pleospora herbarum* anamorfı olan bazı fungal türlerimizin önemli anti-mikrobiyal özelliklere sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Abdelfattah et al. (2015), yaptıkları bir çalışmada, asemptomatik zeytin meyvesinden *Colletotrichum*, *Pseudocercospora*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Hypocreales*, *Devriesia*, *Toxicocladosporium*, *Alternaria*, *Dissoconium*, *Eudarluc* ve *Phomopsis* funguslarını izole etmişlerdir. *Cladosporium* spp. ve *Devriesia* spp.'lerin fungal bitki patojenlerine karşı olası bir rekabet etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, düşük oranda tespit edilen diğer cinsler (*Hormonema* spp., *Dissoconium* spp., *Hansfordia* spp., *Bullera* spp. ve *Dioszegia* spp.) ispatlanmış antagonistik fonksiyonlara sahip türler içermektedir. Bazı *C. cladosporioides* suşları da etkili biyo-kontrol ajanları olarak bildirilmiştir (Abdelfattah et al., 2015). Bu bilgilerden yola çıkarak bizim izole ettiğimiz *Alternaria* ve *Cladosporium* endofitik fungal türlerinin de potansiyel anatagonistik ajanlar olarak etkinliklerinin değerlendirilmesi gerektiği görülmektedir.

Endofitik fungus izolasyonu çalışmaları bundan dolayı önem taşımaktadır. İnsan hastalıklarının tedavisi ve/veya önlenmesinde ve ayrıca nutrasötikler ve fonksiyonel gıda ürünlerinin tasarımında kullanılan doğal biyoaktif bileşiklerin araştırılması, son birkaç yılda belirgin şekilde artmıştır (Malhadas et al., 2017). Hızla büyüyen dünya nüfusunu karşılamak için gıda üretiminin artırılması gerekmektedir. Ne yazık ki, özellikle de fitopatojen kaynaklı bitki hastalıkları nedeniyle ciddi tahıl kaybı hala kaçınılmazdır. İnsan genellikle dünya popülasyonunda fungal veya bakteriyel enfeksiyonların görülme sıklığındaki büyük artış sorunları ile karşı karşıyadır. Bu enfeksiyonlarla başa çıkmak için birçok yan etkisi olan kimyasal sentetik ilaçlar kullanılmaktadır (Strobel and Dasiy, 2003; Yu et al., 2010). Hem insan patojenleri hem de fitopatojenler, antibiyotiklerin etkinliğini büyük ölçüde azaltmak için “ilaç” dirençleri geliştirmeye eğilimlidir. Buna göre, yenilenebilir, petrokimyasal olmayan, doğal olarak çevre dostu ve kolay elde edilebilir olması beklenen daha güvenli antimikrobiyal ajanların buluşu için çalışmaya acil ihtiyaç vardır (Yu et al., 2010).

Birçok araştırma, endofitlerin modern tıp, tarım ve endüstride potansiyel yeni doğal ürünler kaynağı olduğunu kanıtlamıştır. Şimdiye kadar, antimikrobiyal aktiviteye sahip çok sayıda yeni doğal ürün endofitlerden izole edilmiştir. Endofitlerden antimikrobiyal bileşiklerin taranmasının, insan ve bitki patojeninin

ilaca dirençli suşlarının artan tehdidinin üstesinden gelmek için umut verici bir yol olduğuna inanılmaktadır. Bu kazanımlar, endofitleri antibiyotik üretimi için yeni bir kaynak olarak kullanma fırsatı sağlayacaktır (Yu et al., 2010).

Endofitik funguslar en yeni doğal ürün üreticilerinden biridir. Bu funguslar, konakçıya herhangi bir zarar vermeden tüm yüksek bitkilerin canlı iç dokularında yaşam döngülerinin tamamını ya da bir kısmını tamamlamaktadırlar. Bu ilişkide endofitler, konakçı fizyolojisi, savunma ve biyotik ve abiyotik baskılara karşı toleransı etkileyebilecek çok çeşitli biyoaktif sekonder metabolitler üretmektedir (Malhadas et al., 2017).

Antimikrobiyal, antiparaziter, sitotoksik, antienflamatuar, antitümör, antioksidan ve nöroprotektif aktiviteleri olan bu sekonder endofitik metabolitlerin bazıları, benzersiz kimyasal yapılara sahip olan bileşiklerdir ve yeni ilaçların keşfi için çalışılmaktadırlar (Malhadas et al., 2017). Bu nedenle endofitik fungusların incelenmesi, bu fungusların sekonder metabolitlerin üretimi için de kullanılabileceği ve zararlı böcek direnci sağlayabilen ve diğer önemli özellikleri eksprese edebilecek genlerin klonlanması için vektörler olarak kullanılma potansiyellerinden dolayı önemlidir (Sia, 2013).

Bakterilerin antibiyotiklere direnci küresel bir endişe haline gelmiştir ve yeni antibakteriyel ajanların aranması hızlı bir şekilde devam etmektedir. Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (Infectious Diseases Society of America - IDSA), 2020 yılına kadar 10 yeni antibiyotik sınıfının geliştirilmesini destekleyen bir girişim başlatmıştır (IDSA, 2010). Endofitik funguslar, sekonder metabolitlerinin kimyasal çeşitliliği nedeniyle, yeni antimikrobiyal bileşiklerin potansiyel kaynaklarından biridir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar sonucunda, alkaloidler, peptitler, steroidler, terpenoidler, fenoller, fenilpropanoidler, alifatik bileşikler, polyketidler, kinonlar ve flavonoidler, ve aynı zamanda esterler, lipitler, alkoller, asitler, ketonlar gibi uçucu organik bileşikler (VOC'ler) dahil olmak üzere çeşitli yapısal sınıflara ait endofitik funguslar tarafından üretilen çok çeşitli yeni antimikrobiyal bileşikler rapor edilmiştir (Malhadas et al., 2017).

Mikroorganizmalar arasındaki ilaç direnci, insan sağığı için büyük bir tehdit olarak kabul edilmektedir ve yeni antimikrobiyal ajanların gelişmesi, bu soruna yönelik etkili çözümlerden biri olarak belirtilmektedir. Malhadas et al. (2017)'nın yaptıkları çalışmada test edilen endofitler (yani, *Alternaria alternata*, *Penicillium canescens* ve *Penicillium commune*), bir dizi insan patojenik mikroorganizmasına karşı yeni ilaçların geliştirilmesinde büyük ilgi çekmiştir. Bu çalışmada hem *P. canescens* hem de *P. commune*'nin bakterilere karşı en etkili olduğu bulunmuştur, *A. alternata* ise mayalara karşı daha yüksek aktivite göstermiştir. *Penicillium* cinsine ait çeşitli türlerin, antimikrobiyal bileşikler de dahil olmak üzere, biyoaktif sekonder metabolitlerin üreticileri olduğu bildirilmiştir (Malhadas et al., 2017). Elde edilen bu bilgilere göre de çalışmamızda izole ettiğimiz *Alternaria* ve *Penicillium* türlerinin antimikrobiyal potansiyele sahip olabilme ihtimali ve biyoaktif sekonder metabolitlerin üreticileri olarak rolleri araştırılmalıdır.

Ayrıca Malhadas et al. (2017) çalışmalarında, endofit *A. alternata*, *C. albicans* dahil olmak üzere test edilen tüm *Candida*'ya karşı güçlü aktivite göstermiştir. Bu endofit ayrıca, *B. cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* bakterilerini önemli ölçüde inhibe etme kapasitesinden dolayı antibakteriyel ajan olarak potansiyel faydaya sahip olabileceği vurgulanmıştır. *Alternaria* cinsine ait funguslar tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiklerin bazıları tanımlanmıştır. Örneğin, *Alternaria* spp. miselyumundan ekstrakte edilen altenusin, çok sayıda ilaca dirençli bakteri ve fungal suşa karşı antimikrobiyal aktivite sergiler. Benzer şekilde, *Alternaria* spp. kültüründen izole edilen altersetin, Gram-pozitif bakterilere karşı güçlü bir aktivite göstermiştir. *A. alternata* tarafından üretilen bazı VOC'ler ile bu türün *C. albicans* ve *C. parapsilosis* mayalarına karşı gösterdiği inhibisyon etkisi bulunmuştur. Benzer şekilde endofit *P. canescens* için, 1-okten-3-ol ile; *E. coli*, *B. subtilis* ve *P. aeruginosa* inhibisyonu etkisi bulunmuştur. Biyolojik testler için örnekler vererek bu hipotezi teyit etmeye hala ihtiyaç duyulmasına rağmen, bu VOC'lerin ortak etkisinin bakteri ve mayaların neden olduğu bulaşıcı hastalıkların tedavisinde potansiyel bir faydası var gibi görünmektedir. Aslında, endofitik funguslardan çıkarılan VOC'lerin, çeşitli insan ve bitki patojenlerine karşı antimikrobiyal etkileri olduğu rapor edilmiştir (Malhadas et al., 2017).

Landum et al. (2016) yaptıkları bir çalışmada, agar-difüzyon testler ile *Colletotrichum acutatum* büyümesinin inhibisyonuna neden olan beş fungus izolatu tespit etmişlerdir. Bunlar; *Alternaria* sp. izolat 2, *Xylariaceae* familyasından bir fungus, *Alternaria* sp. izolat 1; *Diaporthe* sp., *Nigrospora oryzae*. Bu isolatlar tarafından üretilen uçucu maddeler, feniletil alkol, 4-metilkinazolin, benzotiazol, benzil alkol, lilial, galaksolit gibi metabolitler gaz-kromatografi teknikleriyle tespit edilmiştir. Bu inhibitör uçucular, zeytinde *C. acutatum* inhibisyonunda önemli bir rol oynayabilirler ve potansiyel biyo-kontrol ajanları olarak kullanılabilirler (Landum et al., 2016). *Colletotrichum acutatum*'un neden olduğu bir zeytin meyvesi hastalığı olan zeytin antraknozu, dünya çapında zeytin üretiminin en ciddi kısıtlamalarından biridir. İtalya, İspanya ve Portekiz gibi birçok Akdeniz ülkesinde, zeytin antraknozu % 80-100 verim kaybına neden olduğu bildirilmiştir. Antraknoz ayrıca serbest asitliği ve peroksit değerlerini artırarak ve oksidatif stabiliteyi ve fenolik bileşiklerin içeriklerini azaltarak zeytinyağının kalitesinin düşmesinden sorumludur. Fungisitlerin kullanımı bu hastalığa karşı uygulanan temel kontrol stratejisi olmuştur. Zeytin antraknozunun önlenmesinde tamamen etkili olmasının yanı sıra, zeytin meyvelerinde ve sonuçta da yağda olası kalıntıları nedeniyle bununla ilgili sayısız çevresel riskler ve toksisite sorunları ortaya çıkmaktadır. Kimyasal kontrol önlemleri, Avrupa Tarım Modelinin temelleri olan sürdürülebilir üretim sistemleri (organik ve entegre üretim) ile de uyumlu değildir. Zeytin meyveleri ile ilişkili mikroorganizmalar, zeytin antraknozunun önlenmesi için yeni ve çevre dostu kontrol stratejileri tasarlamak için bütüncü bir bakış açısıyla incelenebilir (Preto et al., 2017).

Preto et al. (2017) yaptıkları bir çalışmada, zeytin meyvelerinden *Quambalaria cyanescens*, *Epicoccum nigrum*, *Aspergillus brasiliensis*, *Chondrostereum purpureum*, *Chaetomium globosum*, *Aspergillus westerdijikiae* ve *Aspergillus* sp. fungus türlerini izole etmişlerdir. Bu yedi fungal türün hepsi, çimlenme inhibisyonu, fungal miselin parçalanması veya fungusit / fungistatik etkiler uygulayarak *C. acutatum*'a karşı antagonistik aktivite sergilemiştir. Bu fungusların doğal koşullar altındaki rolünü daha iyi tespit etmek ve *C. acutatum*'un biyolojik kontrolündeki potansiyellerini değerlendirmek için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir. Burada ayrıntılı yapılan çalışmalar,

Quambalaria cyanescens, *Epicoccum nigrum* ve *Chaetomium globosum*'un bu amaç için büyük umut vaat ettiğini göstermektedir (Preto et al., 2017).

Gao et al. (2011) yaptığı bir çalışmada, endofitik fungus *Penicillium chrysogenum*'un sekonder metaboliti olan penisimonoterpen, patojenik fungus *Alternaria brassicae*'nin doğal inhibitörü olarak etki göstermiştir. Ayrıca Penisit A da, *A. brassicae*'ye karşı ılımlı aktivite göstermiştir. Ek olarak, Penisit A, HepG2 tümör hücre hattına karşı orta derecede seçici sitotoksik aktivite sergilemiştir (Gao et al., 2011). Bizimde çalışmamızda izole ettiğimiz endofitik *Penicillium chrysogenum* fungusunun da bu potansiyeli araştırmaya değer olduğunu düşünmekteyiz.

Da Silva et al. (2017) yaptıkları çalışmada, insanlarda patojenik bakterilere karşı *Schinus terebinthifolius* şifalı bitkisinden izole edilen endofitik fungus, *Phoma* sp. URM 7221'in antibakteriyel kapasitesini araştırmışlardır. *Phoma herbarum* URM7221, morfolojik olarak ve ITS rDNA sekansı hedef alınarak tanımlanmıştır. Bu endofitin (URM7221), önemli biyoteknoloji potansiyeli olan patojenik mikroorganizmalara karşı biyoaktif metabolitlerin üretimi için verimli bir şekilde kullanılabileceği çalışmada vurgulanmıştır (Da Silva et al., 2017).

Abacı vd. (2014) yaptıkları yeni bir çalışma sonucu İzmir Karaburun Yarımadasında dalında olgunlaşan hurma zeytinlerden *Phoma multirostrata*'nın izolasyonu ve tanımlanması ile *Olea europaea* (*Oleaceae*)'dan ilk kayıt yayınlanmıştır. Moleküler identifikasyon için ITS ve LSU bölgesi analiz edilmiş ve sonuç olarak izolatları *Phoma multirostrata* olarak saptanmıştır. Bu çalışmalarında izole ettikleri ve moleküler yöntemler ile tanıladıkları *Phoma multirostrata* türü *Didymellaceae* familyasında Group O içerisinde yer almaktadır. Bu grup içerisinde *Phoma multirostrata*, *Phoma pereupyrena* ve *Phoma insulana* türleri yer almaktadır (Abacı vd., 2014). Ülkemizde bugüne kadar yapılan çalışmalarda, hurmalaşmaya *Phoma oleae*'nin neden olduğu bildirilmektedir. Uluslararası yayınlarda *Phoma fallens* ve *Phoma insulana*'nın zeytinlerde olgunlaşmaya neden olduğu belirtilmektedir. Bizim yaptığımız bu çalışmamızda da *Phoma oleae*'nin synonymy olan *Dothiora oleae* türü tespit edilmiştir.

Yunanistan'ın Thassos Adası'nda yetişen tatlı Thassos zeytiniyle ilgili bir araştırma, acı tattan sorumlu olan oleuropeinin, olgunlaşma sırasında funguslar tarafından üretilen β -glukosidaz enzimi ile hidroksitirozol ve türevlerine hidrolize edildiğini göstermiştir. Yine, Tunus'un güney bölgesinde yetiştirilen Dhokar zeytinleri ile ilgili bir çalışmada da bu durum gözlenmiştir. Bu çalışmalara rağmen, doğal olgunlaşma olgusu hakkında bilgi çoğunlukla fenolik değişikliklerle sınırlıdır ve olgunlaşma sırasında zeytin bileşiminde meydana gelen diğer kimyasal değişiklikleri tanımlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Aktaş vd., 2014).

Tüm bu çalışmalar zeytinde fungal biyoçeşitliliğin araştırılmasının ve bu alanda daha ayrıntılı analizlere ihtiyaç duyulduğunun önemini vurgulamaktadır. Aynı zamanda yapılan çalışmalar zeytinden izole edilmiş zengin bir mikrobiyotanın potansiyelini göstermektedir, bu da zeytinlerin farklı sektörlerde biyoteknoloji ve enzim üretiminde avantaj sağlamak için kullanılabileceğini düşündürmektedir (Baffi et al., 2012). Ayrıca yeni endofitik fungal türlerin ve endofitik fungal sekonder metabolitlerin araştırılması, yeni doğal ürünler bulma şansını artırabileceği anlamına gelmektedir (Yu et al., 2010). Endofitik fungal türler, zeytinin önemli patojenlerinin antagonistleri olarak keşfedilebilir ve etkili biyokontrol ajanları olarak geliştirilebilir (Abdelfattah et al., 2015). Tanımlanan türler ve enzimleri, sadece zeytin endüstrisinde değil, biyolojik dönüşüm ve tarımsal yan ürünlerin kullanımı için biyoteknolojik süreçleri kullanabilen diğer endüstrilerde de kullanılabilir (Baffi et al., 2012).

Görüldüğü gibi, Hurma zeytinler ile ilgili mikrobiyolojik çalışmalarda şimdiye kadar çok az sayıda endofitik fungus türü tespit edilmiştir. Bu amaçla yaptığımız çalışmada yeni endofitik fungal türlerin tespitini gerçekleştirmiş olduk. Çalışmamız sonucunda da Hurma zeytinlerden Hurma olmayan zeytinlere göre çok daha fazla endofitik fungus izole ettik. Böylece Hurma zeytinlerden ilk defa farklı yeni endofitik fungal türlerinin izolasyonunu gerçekleştirmiş olduk. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ve yapılan diğer çalışmalar sonucunda izole edilen bu yeni endofitik fungal türlerin, zeytinin fiziksel ve kimyasal özelliklerine etki edebileceğine, antimikrobiyal, antiparaziter, sitotoksik, antienflamatuar, antitümör, antioksidan ve nöroprotektif aktiviteleri olan yeni sekonder metabolit

Üretim potansiyeline sahip olabileceklerini düşünebiliriz. Çalışmamızın yeni endofitik fungusların ve fungal tanılamamanın önemine ilgiyi arttıracadı ve ilgili birçok araştırmaya ışık tutacağını düşünmekteyiz. Sonuçta alışmamızda sekonder metabolit üretme potansiyeli olan fungal türler keşfettik.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Abacı-Günyar Ö., Haliki-Uztan A., Ölmez H.A. and Ozkarakaş İ., 2014, İzmir Karaburun Yarımadasında dalında olgunlaşan hurma zeytinlerden *Phoma multirostrata*'nın izolasyonu ve tanılanması: *Olea europaea* (Oleaceae) 'dan ilk kayıt, Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi TR (Eski adı: OrLab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi) Yıl:2014 Cilt:12 Sayı:2 Sayfa:20-27.

Abdelfattah. A., Li Destri Nicosia, M.G., Cacciola, S.O., Droby, S. and Schena, L., 2015, Metabarcoding Analysis of Fungal Diversity in the Phyllosphere and Carposphere of Olive (*Olea europaea*). *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0131069.

Abdel-Shafy, H., Schories, G., Mohamed-Mansour, M.S. and Bordei, V., 2015, Integrated membranes for the recovery and concentration of antioxidant from olive mill wastewater. *Desalination and water treatment* 56(2):305-314.

Aktaş, A.B., 2013, Chemical Characterization Of 'Hurma' Olive Grown In Karaburun Peninsula, Food Engineering, İzmir Institute of Technology, July, 2013.

Aktaş, A.B., Ozen, B., Tokatli, F. and Sen, I., 2013, Phenolics profile of a naturally debittering olive in comparison to regular olive varieties. *J Sci Food Agric* 94: 691–698.

Aktaş, A.B., Ozen, B., Tokatli, F. and Sen, I., 2014, Comparison of some chemical parameters of a naturally debittered olive (*Olea europaea* L.) type with regular olive varieties. *Food Chemistry* 161, 104–111.

Amiot, M. J., Fleuriet, A. and Macheix, J.J., 1986, Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 34(5): 823-826.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Amiot, M. J.; Fleuriet, A. and Macheix, J. J., 1989, Accumulation of oleuropein derivative during olive maturation, *Phytochemistry*, 28, 67– 69.

Andrikopoulos, N.K., 2006, Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Grek market, *Food Chemistry*, 94, 558-564.

Arnold, A.E., Mejía, L.C., Kylo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A., 2003. Fungal Endophytes Limit Pathogen Damage in a Tropical Tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, pp. 15649e15654.

Arora, N. K., Kang, S. C. and Maheshwari, D. K., 2001, Isolation of siderophore-producing strains of *Rhizobium meliloti* and their biocontrol potential against *Macrophomina phaseolina* that causes charcoal rot of groundnut. *Curr. Sci.* 81 673–677.

Arora, N.K., Khare, E., Singh, S. and Tewari, S., 2018, Phenetic, genetic diversity and symbiotic compatibility of rhizobial strains nodulating pigeon pea in Northern India. *3 Biotech* 8:52.

Aveskamp, M., 2014, 'Phylogeny and DNA-based identification in *Phoma* and related genera', PhD thesis Wageningen University, Wageningen, NL.

Bacon C. W., Glenn A. E. and Yates I. E., 2008, *Fusarium verticillioides*: managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. *Toxin Rev.* 27 411–446.

Bacon, C.W. and White, J.F., 2000, Microbial Endophytes. New York: Marcel Dekker.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Baffi, M.A., Romo-Sa´nchez, S., U´beda-Iranzo, J. and Briones-Pe´rez, A.I., 2012, Fungi isolated from olive ecosystems and screening of their potential biotechnological use. *New Biotechnology*, Volume 29, Number 3, February 2012.

Balsano,C., 2014, Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health, *International Journal of Molecular Sciences* 15: 18508-18524.

Baltruschat, H., Fodor, J., Harrach, B.D., Niemczyk, E. and Barna, B., 2008. Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytol.* 180, 501–10.

Barbaro, B., Toietta, G., Maggio, R., Arciello M., Tarocchi, M., Galli, A. and Beltrán, G., C. del Río, S. Sánchez and L. Martínez, 2004, Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process, *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(13): 1783-1790.

Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W., 2012, The Genus *Cladosporium*. *Studies in Mycology* 72: 1–401.

Beram, R.C., Beram, A. ve Doğmuş Lehtijarvi, H.T., 2016, Fungal Endofitler ve Etkileşimleri. *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 7(2): 161-166.

Berg, G., Grube, M., Schlöter, M. and Smalla, K., 2014. Unraveling the plant microbiome: looking back and future perspectives. *Front. Microbiol.* 5, 148.

Bianchi, G., 2003, Lipids and phenols in table olives, *European Journal of Lipid Science and Technology* .Vol. 105, pp. 229-242.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Boerema, G.H., de Gruyter, J., Noordeloos, M.E. and Hamers, M.E.C., 2004, Phoma Identification Manual. Differentiation of Specific and Infra-specific Taxa in Culture. CABI Publishing.

Boskou, G., Salta, F.N., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A. and Boskou, D., 2006, Olive oil chemistry and technology. *AOCS Press*, Champaign, IL, 268 p, USA.

Bouaziz, M., Chamkha, M. and Sayadi, S., 2004, Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 5476– 5481.

Briante, R., Patumi, M., Febbraio, F. and Nucci, R., 2004, Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic b-glycosidase. *J Biotechnol* 111: 67–77.

Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Ferdinando, F., Vaccaro, C., Di Salla, A., La Cara, F. and Nucci, R., 2002, Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian Cultivars of *Olea europaea* L *Plant Sci.* 2002, 162, 791– 798.

Capozzi, F., Piperno, A. and Uccella, N., 2000, Oleuropein site selective hydrolysis by technomimetic nuclear magnetic resonance experiments. *J Agr Food Chem* 48: 1623–1629.

Çelik, M., Aksoy, M. ve Durlu-Özkaya, F., 2016, Üniversite Öğrencilerinin Zeytinyağı Bilgi Düzeylerini Belirlemeye Yönelik Bir Araştırma, *Zeytin Bilimi*, 6 (2) 2016, 69-75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Chagas, M. B. O., Prazeres Dos Santos, I., Nascimento da Silva, L. C., Correia, M. T. D. S. and Magali de Araújo J., 2017, Antimicrobial activity of cultivable endophytic fungi associated with *Hancornia speciosa* gomes bark. *Open Microbiol. J.* 11 179–188.

Charoenprasert, S. and Mitchell, A., 2012, Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*), *Journal of agricultural and food chemistry* 60(29): 7081-7095.

Chen, L., Luo, S., Xiao, X., Guo, H., Chen, J., WanY Li, B., Xu, T., Xi, Q., Rao, C., Liu, C. and Zeng, G., 2010, Application of plant growth-promoting endophytes (PGPE) isolated from *Solanum nigrum* L. for phytoextraction of Cd polluted soils. *Applied Soil Ecology*, 46, 383–389.

Ciafardini, G. and Zullo, B.A., 2002, Microbiological activity in stored olive oil. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 111–118.

Clay, K. and Holah, J., 1999, Fungal endophyte symbiosis and plant diversity in successional fields. *Science*, 285, 1742–1744.

Cord-Landwehr S., Melcher R. L. J., Kolkenbrock S. and Moerschbacher B. M., 2016, A chitin deacetylase from the endophytic fungus *Pestalotiopsis* sp. efficiently inactivates the elicitor activity of chitin oligomers in rice cells. *Sci. Rep.* 6:38018.

Crous P.W., Giraldo A., Hawkswort D.L., Robert V., Kirk P.M., Guarro J., Robbertse B., Schoch C.L., Damm U., Trakunyingcharoen T. and Groenewald J.Z., 2014. The Genera of Fungi: fixing the application of type species of generic names. *IMA FUNGUS*, Volume 5, No1: 141–160.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Da Silva, G.B.P.G., Silvino, K.F., Bezerra, J.D.P., de Farias, T.G.S., de Araújo, J.M. and Stamford, T.L.M., 2017, African Journal of Microbiology Research. Academic Journals. Vol. 11(1), pp. 1-7, 7.

De Leonardis, A., Macciola, V., Cuomo, F. and Lopez, F., 2015, Evidence of oleuropein degradation by olive leaf protein extract. *Food Chemistry* 175, 568–574.

Díez, G.F.M.J. and Adamos, M. R., 1997, Table olives, *Chapman & Hall*, pp. 67-109, London, UK.

Ding T. and Melcher U., 2016, Influences of plant species, season and location on leaf endophytic bacterial communities of non-cultivated plants. *PLoS One* 11:e0150895.

Durlu-Özkaya, F. ve Özkaya, M., 2011, Oleuropein using as an Additive for Feed and Products used for Humans, *Journal of Food Processing & Technology* 2:113.

Efe, R., Soykan, A., Cürebal, İ. ve Sönmez, S., 2011, Dünyada, Türkiye’de, Edremit Körfezi Çevresinde Zeytin ve Zeytinyağı. *Edremit Belediyesi Kültür Yayınları*, No:6, 2011.

Erden D., Bağlan G. ve Tunahoğlu R., 2016, Türkiye’de Değişen Tarım Politikaları ve Aydın Zeytinciliği’ndeki Farklılıkların İncelenmesi, *Zeytin Bilimi* 6 (2), 33-40.

Ergün, N. ve Tunahoğlu, R., 2016, Edremit İlçesinde Zeytincilik ve Desteklemeler, *Zeytin Bilimi*, 6 (2) 2016, 83-92.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Etminani, F. and Harighi, B. 2018, Isolation and identification of endophytic bacteria with plant growth promoting activity and biocontrol potential from wild pistachio trees. *Plant Pathol. J.* 34 208–217.

FAO, 2015, www.fao.org. (Erişim Tarihi: Aralık 2018).

Ferraro, V., Conigliaro, G., Torta, L., Burruano, S. and Moschetti, G., 2008, Preliminary investigation on the endophytic communities in *Olea europaea* in Sicily. In: Cross J, Brown M, Fitzgerald J, Fountain M, Yohalem J (eds) IOBC Working Groups“Integrated fruit protection in fruit crops”. Proceedings of the 7th International Conference on Integrated Fruit Production, Avignon., pp 459–463.

Fesel, P. H. and Zuccaro, A., 2016, Dissecting endophytic lifestyle along the parasitism/mutualism continuum in Arabidopsis. *Curr. Opin. Microbiol.* 32 103–112.

Formey, D., Sallet, E., Lelandais-Briere, C., Ben, C., Bustos-Sanmamed, P. and Niebel A., 2014, The small RNA diversity from Medicago truncatula roots under biotic interactions evidences the environmental plasticity of the miRNAome. *Genome Biol.* 15:457.

Gao, S.S., Li, X.M., Du, F.Y., Li, C.S., Proksch, P. and Wang, B.G., 2011, Secondary Metabolites from a Marine-Derived Endophytic Fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Marine Drugs* 2011, 9, 59-70; doi:10.3390/md9010059.

Garcia, J. M., Seller, S. and Perez-Camino, M. C., 1996, Influence of fruit ripening on olive oil quality, *Journal of agricultural and food chemistry* 44(11): 3516-3520.

Germaine, K., Liu X., Cabellos, G., Hogan, J., Ryan, D. and Dowling, D. N., 2006, Bacterial endophyte-enhanced phyto-remediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* 57 302–310.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. and Penrose, D.M., 1999, Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. *Imperial College Press*, London, 134-179.

Gündoğdu, M.A., Kaleci, N., Nergis, O. ve Doğan, E., 2016, Farklı Zaman Periyotlarında Hasat Edilen Bazı Yabancı Kökenli Zeytin Çeşitlerinin Pomolojik ve Bazı Biyokimyasal Karakterlerindeki Değişimlerin Saptanması, *Zeytin Bilimi*, 6 (2) 2016, 61-67

Hamilton, C. E. and Bauerle, T. L., 2012, A new currency for mutualism? fungal endophytes alter antioxidant activity in hosts responding to drought. *Fungal Diversity*, doi:10.1007/s13225-012-0156-y.

Hamilton, C. E., Gundel, P. E., Helander, M. and Saikkonen, K., 2012, Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review. *Fungal Diversity*. doi:10.1007/s13225-012-0158-9.

Han, J., Talorete, T., Yamada, P. and Isoda, H., 2009, Anti-proliferative and apoptotic effects of oleuropein and hydroxytyrosol on human breast cancer MCF-7 cells. *Cytotechnology* 59:45-53.

Harborne, J.B. and Dey, P.M., 1989, Methods in Plant Biochemistry, *Academic Press*, London.

Harman, G. and Shores, M., 2007. The mechanisms and applications of opportunistic plant symbionts. See Ref. 125, 131–155.

Haseneoğlu, İ., 1991, Toprak Mikrofungusları, Atatürk Üniversitesi Yayınları No.689.

Hawksworth, D.L., 1991, The fungal dimension of biodiversity, magnitude, significance and conservation. *Mycological. Res.*1991; 95: 641-655.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Howitz, K. T. and Sinclair, D. A., 2008, Xenohormesis sensing the chemical cues of other species. *Cell* 133 387–391. 10.1016/j.cell.2008.04.019

IDSA-Infectious Diseases Society of America, 2010, The 10 × ‘20 initiative: pursuing a global commitment to develop 10 new antibacterial drugs by 2020. *Clin Infect Dis* 50:1081–1083.

Jemai, H., Bouaziz, M. and Sayadi, S., 2009, Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of Tunisian sweet olive cultivar with regard to fruit ripening, *Journal of agricultural and food chemistry* 57(7): 2961-2968.

Kadalkal, E., 2009, Gemlik Yöntemi İle İşlenmişgemlik Tipisofralık Zeytinlerin Antioksidan Özelliklerive Fenolik Profilleri, İstanbul Teknik Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, Haziran 2009.

Karşlı, G.S., 2013, Microbiological Characterization Of ‘Hurma’ Olives Grown In Karaburun Peninsula. İzmir Institute of Technology. Food Engineering. Master Thesis. İzmir.

Kavroulakis, N. S., Zervakis, G. I., Ehaliotis, C., Haralampidis, K. and Papadopoulou, K. K., 2007, Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. *J. Exp. Bot.* 58 3853–3864.

Kayahan, M. ve Tekin, A., 2006, Zeytinyağı Üretim Teknolojisi. *TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Kitaplar Serisi:15*, Filiz Matbaacılık San. Tic. Ltd, 198 s, Ankara.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Khan, A.L., Hamayun, M., Ahmad, N., Hussain, J., Kang, S., Kim, Y., Adnan, M., Tang, D., Waqas, M., Radhakrishnan, R. and Hwang, Y., Lee, I., 2011. Salinity Stress Resistance Offered by Endophytic Fungal Interaction Between *Penicillium minioluteum* LHL09 and Glycine max. L. J. *Microbiol. Biotechnol.*, 21(9), 893-902.

Khare, E., Mishra, J. and Arora, N.K., 2018, Multifaceted Interactions Between Endophytes and Plant: Developments and Prospects. *Front Microbiol.* 2018; 9: 2732.

Kızılkaya, M., 2015, *Beauveria Bassiana* Endofitik Kolonizasyonunun Fasülye Bitkisinin Büyüme Ve Gelişmesi Üzerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoloji, Botanik, Erzurum.

Kobayashi, D. Y. and Palumbo, J. D., 2000, Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon, C. W., White, J. F., (eds) *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, New York, 199–236.

Köçkar, F., Aydoğan Türkoğlu, S. ve Aydın, M., 2010, Oleuropein'in Prostat (PC-3), Meme (MCF-7) ve Hepatoma (HEP3B) Kanseri Hücrelerinde Anti-tümör Etkisinin Belirlenmesi. *Biyoloji Bilimleri Araştırma Dergisi* 3 (2): 185-190.

Krohn, K., Biele, C., Aust, H.J., Draeger, S. and Schulz, B., 1999, Herbarulide, a ketodivinyllactone steroid with an unprecedented Homo-6-oxaergostane skeleton from the endophytic fungus *Pleospora herbarum* 1. *J Nat Prod* 62(4):629–630.

Kuldau, G. and Bacon, C., 2008. Clavicipitaceous endophytes: their ability to enhance resistance of grasses to multiple stresses. *Biol Control.*, 46, 57–71.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kusajima, M., Shima, S., Fujita, M., Minamisawa, K., Che, F.-S. and Yamakawa, H., 2018, Involvement of ethylene signaling in *Azospirillum* sp. B510-induced disease resistance in rice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 82 1522–1526.

Lafi, F. F., AlBladi, M. L., Salem, N. M., AlBanna, L., Alam, I. and Bajic V. B., 2017, Draft genome sequence of the plant growth– promoting *Pseudomonas punonensis* strain D1- 6 isolated from the desert plant *Erodium hirtum* in Jordan. *Genome Announc.* 5 e1437–e1416.

Landum, M.C., do Rosário Félix, M., Alho, J., Garciaa, R., Cabrita, M.J., Rei, F. and Varanda, C.M.R., 2016, Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*. *Microbiological Research* 183 (2016) 100–108.

Lata, R., Chowdhury, S., Gond, S. K. and White, J. F., 2018, Induction of abiotic stress tolerance in plants by endophytic microbes. *Lett. Appl. Microbiol.* 66 268–276.

Lavee, S. and Wodner. M., 1991, Factors Affecting the Nature of Oil Accumulation in Fruit of Olive (*Olea europaea* L.) Cultivars, *Journal of Horticultural Science*, 66, 583-91.

López-Ráez, J. A., Shirasu, K. and Foo, E., 2017, Strigolactones in plant interactions with beneficial and detrimental organisms: the yin and yang. *Trends Plant Sci.* 22 527–537.

Lugtenberg, B.J.J., Caradus, J.R. and Johnson, L.J., 2016, Fungal endophytes for sustainable crop production. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92:fiw194.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Malhadas, C., Malheiro, R., Pereira, J.A., de Pinho, P.G. and Baptista, P., 2017, Antimicrobial activity of endophytic fungi from olive tree leaves. *World J Microbiol Biotechnol*, 33:46.

Malik, N. S. A. and Bradford, J. M., 2006, Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in ‘Arbequina’ olives., *Sci. Hortic.* 2006, 110, 274– 278.

Marsilio, V., Campestre, C. and Lanza, B., 2001, Phenolic Compounds Change during California Style Ripe Olive Processing, *Food Chemistry*, 74, 55-60pp.

Marsilio, V., Lanza, B., Campestre, C. and De Angelis, M., 2000, Oven dried table olives: textural properties as related to pectic composition, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1271e1276.

Martín-Rodríguez, J. A., Ocampo, J. A., Molinero-Rosales, N., Tarkowska, D., Ruiz-Rivero, O. and Garcia-Garrido, J. M., 2015, Role of gibberellins during arbuscular mycorrhizal formation in tomato: new insights revealed by endogenous quantification and genetic analysis of their metabolism in mycorrhizal roots. *Physiol. Plant* 154 66–81.

Materatski, P., Varanda, C., Carvalho, T., Dias, A.B., Camposa, M.D., Rei, F. and Felix, M.R., 2019, Spatial and temporal variation of fungal endophytic richness and diversity associated to the phyllosphere of olive cultivars. *Fungal Biology* 123 (2019) 66e76.

Mazzei, R., Giorno, L., Mazzuza, S., Spadafora, A. and Drioli, E., 2006, b-Glucosidase separation from *Olea europaea* fruit and its use in membrane bioreactors for hydrolysis of oleuropein. *Desalination* 200: 483–484.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Mejía, L. C., Herrel, E. A., Sparks, J. P., Winter, K., García, M. N. and Van Bael S. A.,** 2014. Pervasive effects of a dominant foliar endophytic fungus on host genetic and phenotypic expression in a tropical tree. *Front. Microbiol.* 5:479.
- Menz, G. and Vriesekoop F.,** 2010, Physical and chemical changes during the maturation of Gordal Sevillana olives (*Olea europaea* L., cv. Gordal Sevillana), *Journal of agricultural and food chemistry* 58(8): 4934-4938.
- Mercado-Blanco, J., Rodríguez-Jurado, D., Hervás, A. and Jiménez-Díaz, R. M.,** 2004, Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol. Control* 30 474–486.
- Mora, F., Francisco Tapia, F., Scapim, C.A. and Elias Nunes Martins, E.N.,** 2007, Vegetative growth and early production of six olive cultivars, in Southern Atacama Desert, Chile. *Journal of Central European Agriculture* 8(3):269-276.
- Morgan-Jones, G., Nag Raj, T.R. and Kendrick, B.,** 2011, Genera coelomycetorum. V. Alpakesa and Bartalinia. Canadian Journal of Botany. ResearchGate. January 2011. DOI: 10.1139/b72-105.
- Mousa, M. Y., Gerosopoulos, D., Metzidakis, I. and Kiritsakis, A.,** 1996, Effect of altitude on fruit and quality characteristics of “Mastoides” olives. *J. Sci. Food Agric.*, 71, 345-350.
- Nergiz, C. and Engez, Y.,** 2000, Compositional variation of olive fruit during ripening, *Food Chem.* 60, 55-59.
- Nguema-Ona, E., Vire-Gibouin, M., Cannesan, M. A. and Driouich, A.,** 2013, Arabinogalactan proteins in root-microbe interactions. *Trends Plant Sci.* 18 440–449.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ortega-Garcia, F., Peinado, M.A. and Peragon, J., 2008, Polyphenol oxidase and its relationship with oleuropein concentration in fruits and leaves of olive (*Olea europaea*) cv. ‘Picual’ trees during fruit ripening. *Tree Physiology* 28, 45–54 © 2008 Heron Publishing—Victoria, Canada.

Othman, N.B., Roblain, D., Chammen, N., Thonart, P. and Hamdi, M., 2009, Antioxidant phenolic compounds loss during the fermentation of chetoui olives, *Food Chemistry*. Article In Press.

Özata, E. ve Cömert, M., 2016, Zeytinyağı ve Sağlıklı Yaşam, *Zeytin Bilimi*, 6 (2) 2016, 105-110.

Padhi, L., Mohanta, Y.K. and Panda, S.K., 2013, Endophytic fungi with great promises: A Review. Review Article. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*, Jul-Sept 2013 Vol 3 Issue 3.

Panagou, E.Z., 2006, Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20°C. *LWT-Food Science and Technology*, 39, 322-329.

Pandey, S. S., Singh, S., Babu, C. S., Shanker, K., Srivastava, N. K. and Kalra, A. , 2016, Endophytes of opium poppy differentially modulate host plant productivity and genes for the biosynthetic pathway of benzyloquinoline alkaloids. *Planta* 237 1097–1114.

Peskan-Berghofer, T., Vilches-Barro, A., Muller, T. M., Glawischnig, E., Reichelt, M. and Gershenzon, J., 2015, Sustained exposure to abscisic acid enhances the colonization potential of the mutualist fungus *Piriformospora indica* on *Arabidopsis thaliana* roots. *New Phytol.* 208 873–886.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Plett, J. M. and Martin, F. M.**, 2018, Know your enemy, embrace your friend: using omics to understand how plants respond differently to pathogenic and mutualistic microorganisms. *Plant J.* 93 729–746.
- Porras-Alfaro, A. and Bayman, P.**, 2011, Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Phytopathology*, 49 (1), 291.
- Preto, G., Martins, F., Pereira, J.A. and Baptista, P.**, 2017, Fungal community in olive fruits of cultivars with different susceptibilities to anthracnose and selection of isolates to be used as biocontrol agents. *Biological Control* 110, 1–9.
- Raja, H.A., Miller, A.N., Pearce, C.J. and Oberlies, N.H.**, 2017, Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*. 80, 756–770.
- Ramírez, E., Medina, E., Brenes, M. and Romero, C.**, 2014, Endogenous Enzymes Involved in the Transformation of Oleuropein in Spanish Table Olive Varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, 62, 9569–9575.
- Restuccia, C., Muccilli, S., Palmeri, R., Randazzo, C.L., Caggia C. and Spagna G.**, 2011, An alkaline β -glucosidase isolated from an olive brine strain of *Wickerhamomyces anomalus*. *FEMS Yeast Res.* 2011 Sep;11(6):487-93.
- Rigane, G., Salem, R.R., Sayadi, S. and Bouaziz, M.**, 2011, Phenolic composition, isolation, and structure of a new deoxyloganic acid derivative from Dhokar and Gemri-Dhokar olive cultivars. *J Food Sci*76:C965–C973 (2011).
- Rodriguez-Blanco, A., Sicardi, M. and Frioni, L.**, 2015, Plant genotype and nitrogen fertilization effects on abundance and diversity of diazotrophic bacteria associated with maize (*Zea mays* L.). *Biol. Fertil. Soils* 51 391–402.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F.F. and Cimato, A., 1999, Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 964–967.

Romero, M. P., Tovar, M. J., Ramo T. and Motilva, M. J., 2003, Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of origin “Les Garrigues”, *Journal of the American Oil Chemists' Society* 80(5): 423-430.

Rozpadek, P., Domka, A. M., Nosek, M., Ważny, R., Jędrzejczyk, R. J. and Wiciarz M., 2018, The role of strigolactone in the cross-talk between *Arabidopsis thaliana* and the endophytic fungus *Mucor* sp. *Front. Microbiol.* 9:441.

Ryan, D. and Robards, K., 1998, Critical Review. Phenolic compounds in olives. *The Analyst*, 123(5), May 1998.

Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K., 2003, Quantitative changes in phenolic content during physiological development of olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy’s Mammoth J. *Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2532– 2538.

Ryan, D., Robards, K. and Lavee, S., 1999, Changes in Phenolic Content of Olive during Maturation, *Journal of Food Science and Technology* , 34, 265-274pp.

Samson, R.A. and Pitt, J.I, 2000, Integation of Modern Taxonomic Methods for *Penicillium* and *Aspergillus* Classification, CRC Press, London, p.524.

Samson, R.A., Houbraken, J. and Thrane, U., 2010, Food and Indoor Fungi, CBS KNAW Biodiversity Center; Utrecht.

Servili, M. and Montedoro, GF., 2002, Contribution of phenolic compounds to virginolive oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 104, 602-613.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sevim, D., Köseoğlu, O., Altunoğlu, Y., Ataol Ölmez, H., Büyükgök, E.B., 2013, Erkence zeytin çeşidinden elde edilen yağların (Hurmalaşmış ve Hurmalaşmamış) karşılaştırılması. *GIDA* (2013) 38 (3): 159-166.

Sheibani-Tezerji, R., Rattei, T., Sessitsch, A., Trognitz, F. and Mitter, B. 2015, Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *mBio* 6:e00621-15. 10.1128/mBio.00621-15.

Sia, E., Marcon, J., Luvizotto, D.M., Quecine, M.C., Tsui, S., Pereira, J.O., Pizzirani-Kleiner, A.A. and Azevedo, J.L., 2013, Endophytic fungi from the Amazonian plant *Paullinia cupana* and from *Olea europaea* isolated using cassava as an alternative starch media source. Sia et al. *Springer Plus* 2013, 2:579.

Sousa, A., Ferreira I.C.F.R., Calhelha, R., Andrade, P.B., Valentao, P., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A. and Pereira J.A., 2006, Phenolics and Antimicrobial Activity of Traditional Stoned Table Olives”Alcaparra”, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 14, 8533-8538pp.

Sridhar, K.R. and Raviraja, N.S., 1995, Endophytes- a crucial issue. *Current. Sc.* 1995; 69(7): 570-574.

Strobel, G. and Daisy, B., 2003, Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2003;67(4):491–502.

Su, Y. Y., Guo, L. D. and Hyde, K. D., 2010, Response of endophytic fungi of *Stipa grandis* to experimental plant function group removal in Inner Mongolia steppe, China. *Fungal Diversity*, 43, 93–101.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Susamci, E., Romero, C., Tuncay, O. and Brenes, M., 2017, An explanation for the natural de-bittering of Hurma olives during ripening on the tree. *Grasas Y Aceites* 68 (1). January–March 2017, e182.

Şahbaz, Y., 2017, ‘‘Hurma zeytininin gen haritası çıkarıldı’’, <https://www.aa.com.tr/tr/bilim-teknoloji/hurma-zeytininin-gen-haritasi-cikarildi/1000131> (Erişim tarihi: 10.12.2018).

Taghavi, S., van der Lelie D., Hoffman A., Zhang Y. B., Walla M. D., and Vangronsveld J., 2010, Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp 638. *PLoS Genet.* 6:e1000943.

Tako', M., Toth, A., Nagy, L.G., Krisch, J., Vágvölgyi, C. and Papp, T., 2010, A new beta-glucosidase gene from the zygomycete fungus *Rhizomucor miehei*. *Van Leeuw. J.* 97, 1–10.

Tanaka, A., Tapper, B. A., Popay, A., Parker, E. J., and Scott, B., 2005, A symbiosis expressed non-ribosomal peptide synthetase from a mutualistic fungal endophyte of perennial ryegrass confers protection to the symbiotum from insect herbivory. *Mol. Microbiol.* 57 1036–1050.

Tejesvi, M. V., Kini, K. R., Prakash, H. S., Subbiah, V. and Shetty, H. S., 2007, Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. *Fungal Diversity*, 24, 37-54.

Tisserant, E., Malbreil, M., Kuo, A., Kohler, A., Symeonidi, A. and Balestrini, R., 2013, Genome of an arbuscular mycorrhizal fungus provides insight into the oldest plant symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110 20117–20122.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Tovar, M. J., Motilva, M. J. and Romero, M.P., 2001, Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(11): 5502-5508.

Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S. and La Guardia, M., 2005, The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health, *Nutrition Research Reviews*, 18:98–112.

TÜİK, 2015, Tarımsal araştırma istatistikleri (Erişim Tarihi: Aralık 2018).

Türköz, G., Baydar, T., Sözbilen, M. ve Hışıl, Y., 2008, Oleuropein ve Ekstraksiyon Yöntemleri. I. Ulusal Öğrenci Kongresi. 17-18 Mayıs, Balıkesir, s. 151-157.

Tüzün, T.Y., (2/3 Ekim 2003), Zeytin Üretimindeki Periyodisitenin Zeytinyağı Ekonomisine Etkileri, *Türkiye 1. Zeytinyağı ve Sofralık Zeytin Sempozyumu Bildirileri*, Çiğli-İzmir.

Ünlüel, İ. ve Aydın, Ö., 2016, Bir Zeytin Fenoliği Olan Oleuropeinin Sağlığımız Üzerine Etkileri, *Zeytin Bilimi*, 6 (2) 2016, 77-14.

Vega, F. E., Posada, F., Aime, M. C., Pava-Ripoll, M., Infante, F. and Rehner, S. A., 2008, Entomopathogenic fungal endophytes. *Biol. Control* 46 72–82.

Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J.A., Oliveira, B., Seabra, R.M. and Andrade, P.B., 2005, Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89, 561-568.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Vossen, P., 1998, Variety and maturity the two largest influences on olive oil quality, *Project Report. Univ. California. Davis.*

Wase, D.A.J., 1985, Production of b-D-glucosidase, endo-1,4-b-D-glucanase and D-xylanase from straw by *Aspergillus fumigatus* IMI 255091. *Enzyme Microb. Technol.* 7, 225–229.

Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M. and Crous, P.W., 2013, *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology* 75: 171–212.

Wu, P., Wu, Y., Liu, C.C., Liu, L.W., Ma, F.F. and Wu, X.Y., 2016, Identification of arbuscular mycorrhiza (AM)-responsive microRNAs in tomato. *Front. Plant Sci.* 7:429. 10.3389/fpls.2016.00429.

Wu, X., Monchy, S., Taghavi, S., Zhu, W., Ramos, J. and Van der Lelie D., 2011, Comparative genomics and functional analysis of niche specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35 299–323.

Yıldız, G. ve Uylaşer, V., 2011, Doğal Bir Antimikrobiyel: Oleuropein. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 25(1): 131-142.

Yong, Y. H., Dai, C. C., Gao, F. K., Yang, Q. Y. and Zhao, M., 2009, Effects of endophytic fungi on growth and two kinds of terpenoids for *Euphorbia pekinensis*. *Chin. Trad. Herb. Drugs* 40 18–22.

Yoo, J.J. and Eom, A.H., 2012, Molecular Identification of Endophytic Fungi Isolated from Needle Leaves of Conifers in Bohyeon Mountain, Korea. *Research Article. © The Korean Society of Mycology. Mycobiology* 40(4) : 231-235.

Yorulmaz, A. ve Tekin, A., 2008, Zeytin Ve Zeytinyağı Fenolikleri, *I.Ulusal Zeytin Öğrenci Kongresi*, 17-18 Mayıs 2008 / Edremit-Balıkesir.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Yorulmaz, A., Erinc, H. and A. Tekin, A., 2013, Changes in Olive and Olive Oil Characteristics During Maturation, *Journal of the American Oil Chemists' Society*: 90(5), pp 647–658.

Yu, H., Zhang, L., Li L., Zheng, C., Guo, L., Li, W., Sun, P. and Qin, L., 2010, Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. *Microbiological Research* 165(2010) 437—449.

Zheng, R.Y., Chen, G.Q., Huang, H. and Liu, X.Y., 2007. A monograph of *Rhizopus*. *Sydowia*. 59(2):273-372.

Zoidou, E., Melliou, E., Gikas, E., Tsarbopoulos, A., Magiatis, P. and Skaltsounis, AL., 2010, Identification of Throuba Thassos, a traditional Greek table olive variety, as a nutritional source of oleuropein. *J Agric Food Chem* 58:46–50.

TEŞEKKÜR

Tüm yüksek lisans sürecimde bana destek olan, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren, yardımını esirgemeyen, her türlü araştırma olanağını sağlayan, değerli danışmanım Doç. Dr. Özlem ABACI GUNYAR'a çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince her zaman yardımlarını esirgemeyen ve bana her konuda destek olan değerli laboratuvar arkadaşlarım Derya BİROL, Bahar MİDİLLİ ve Bengi ALDI'ya çok teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan, her konuda benden desteklerini esirgemeyen canım annem, babam ve kardeşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Ege Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir (2017 Fen 043). Bu nedenle, Araştırma Fonu Yönetim Kuruluna teşekkür ederim.

15 / 03 / 2019

Şenay ŞENTÜRK

ÖZGEÇMİŞ

Şenay Şentürk 15 Aralık 1989 tarihinde Bursa’da doğdu. İlkokul, ortaokul ve lise öğrenimini Bursa’da tamamladı. 2009 Yılında Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde lisans öğrenimine başladı. Lisans öğrenim döneminde Ege Üniversitesi Biyomühendislik Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda zorunlu stajını yaptı. 2015 yılında Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’ndan mezun oldu. 2015 yılında mezun olduğu anabilim dalında yüksek lisansa başladı. Aynı bölümdeki yüksek lisans eğitimini 2019 yılında “İzmir Karaburun Yarımadasına Özgü Hurma Zeytinlerden İzole Edilen Endofit Fungal Türlerin Saptanması” konulu tez ile tamamladı.