



Hasat Öncesi İncir Meyvelerinde Ethephon Kullanımının Oluşturduğu Kalıntı Riskinin Belirlenmesi^A

Gülden HAZARHUN¹, Nabi Alper KUMRAL^{2*}

Öz: Bursa siyahı incirinin yüksek besin değerlerine sahip olması ve yetiştiriciliği yapılmayan Orta ve Kuzey Avrupa ülkelerinde egzotik bir meyve olarak tercih edilmesi nedeniyle önemi Türkiye tarımı ve ihracatı açısından çok yüksektir. Bu bitkisel ürünün sentetik kimyasallar kullanılmadan üretilmesi tüketicinin diğer bir tercih nedenidir. Ancak, incir meyvelerinin hasat öncesinde hızlı olgunlaşmasını sağlamak amacıyla ethephon gibi bitki gelişme düzenleyicilerinin kullanılması sorunlu bir konudur. Bu nedenle, bu simülasyon çalışmasında, ethephon'un bahçe koşullarında uygulanması sonucu ortaya çıkan ethephon ve onun parçalanma ürünü olan fosfonik asidin kalıntı risklerini belirlemek amaçlanmıştır. Bu amaçla, ethephon'un ticari bir formülasyonu arazi koşullarında bitkilere iki farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. Uygulamanın hemen sonrasında, hasat sırasında ve hasat sonrasında farklı depolama süreçlerinde örnekler alınarak, bu iki kimyasalın kalıntı düzeyleri yeni bir analiz metodu kullanılarak LC-MS-MS cihazı ile belirlenmiştir. Analiz sonuçlarına göre, ethephon'un üç günde hasat olgunluğuna neden olan yüksek konsantrasyonu uygulandığında 3. ve 6. günlerdeki hasat edilmiş ürünlerdeki ortalama ethephon konsantrasyonu sırasıyla 10.92 ve 8.45 mgkg⁻¹ bulunmuştur. Hasat sonrasında 16 günlük soğuk havada saklama sürecinde ise ethephon konsantrasyonu sırasıyla 5.30 ve 6.34 mgkg⁻¹'a kadar düşmüştür. Diğer taraftan, 6 günde meyveleri olgunluğa ulaştıran düşük konsantrasyon kullanılırsa, hasat edilmiş ürünlerdeki ortalama ethephon konsantrasyonu 0.63 mgkg⁻¹; hasat sonrası soğuk koşullarda 16 gün bekleme sonucu 0.20 mgkg⁻¹ bulunmuştur. Fosfonik asit ise ethephonun uygulanmasından hemen sonra tüm aşamalarda 0.19-0.31 mgkg⁻¹ konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Sonuç olarak, her koşulda ve aşamada ethephon ve

^A Bu çalışma finansal olarak Perla Fruit A.Ş. tarafından desteklenmiştir. Yapılan bu çalışma etik kurul izni gerektirmemektedir.

* **Sorumlu yazar/Corresponding Author:** ²Nabi Alper KUMRAL, Bursa Uludağ Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Bursa, Türkiye, akumral@uludag.edu.tr, [OrcID 0000-0001-9442-483X](https://orcid.org/0000-0001-9442-483X)

¹ Gülden HAZARHUN, Perla Fruit, Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı, Bursa Uludağ Üniversitesi, ULUTEK Teknoloji Geliştirme Bölgesi, Görükle Kampüsü, Bursa, Türkiye, gulden.hazarhun@perlafruit.com, [OrcID 0000-0003-2036-2722](https://orcid.org/0000-0003-2036-2722)

parçalanma ürünü fosfonik asit incir meyveleri üzerinde tespit edilmiştir. Bu nedenle bu ürün incir yetiştiriciliğinde kesinlikle kullanılmaması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: Ethephon, fosfonik asit, incir, kalıntı, risk.

Assessment of Residue Risks Caused by Ethephon Use during Pre-harvest Period of Fig Fruits

Abstract: Bursa black fig holds great significance in terms of agricultural production and exportation of Turkey, because of its high nutritional value and the demand from Central and Northern European countries as an exotic fruit. Another reason for the consumer preference is that this agricultural product is grown without using synthetic chemicals. However, the use of plant growth regulators like ethephon, during pre-harvest period to ensure rapid ripening of fig fruits becomes questionable. The aim of this simulation study was to determine the residual risks of ethephon and its degradation product, phosphonic acid, resulting from its application in orchards during pre-harvest period. For this purpose, a commercial formulation of ethephon was applied to plants at two different concentrations under field conditions. The residue levels of these two chemicals were detected by LC-MS-MS using a new analysis method, by taking samples in different processes: immediately after the application, during pre- and postharvest. Results showed that the fruits reach maturity within three days when the high concentration of ethephon was applied. The average ethephon residues in the harvested products on the 3rd and 6th days were found to be 10.92 and 8.45 mg kg⁻¹, respectively. During the 16-day cold storage process after harvest, ethephon concentration slowly decreased to 5.30 and 6.34 mg kg⁻¹, respectively. If the low concentration is applied to fruits, maturity completed within 6 days. The average ethephon residues at harvest time and at the end of 16 days cold storage were 0.63 mg kg⁻¹ and 0.20 mg kg⁻¹, respectively. Phosphonic acid has been determined between 0.19 and 0.31 mg kg⁻¹, since the time of ethephon application in all treatments. As a result, the residues of ethephon and its breakdown metabolite phosphonic acid left over the detection limits of the device and the method during all processes. Therefore, this chemical should not be used during the growing period of figs.

Keywords: Ethephon, phosphonic acid, fig, residue, risk assessment.

Giriş

Dünya'nın farklı bölgelerinde yetiştiriciliği yapılan incir (*Ficus carica* L.), Dutgiller (Moracea) familyasına ait bir meyve türüdür (Köseoğlu, 2008). Dünya incir üretiminin %70'i Akdeniz'in kıyı bölgelerinde bulunan ülkeler tarafından gerçekleştirilmektedir (Çalışkan ve Polat, 2011). Ülkemiz Erbeyli İncir Araştırma Enstitüsü koleksiyon bahçesinde de muhafaza edilen yüzlerce incir çeşidine ev sahipliği yapmaktadır (Aksoy ve ark.,

1992; Kutlu ve Aksoy, 1997; Nalbant ve ark., 1998; Aksoy ve ark., 2001). Bu nedenle Türkiye hem kurutmalık hem de sofralık incir üretim ve ihracatında dünyada en önemli ülkedir (Çalışkan ve Polat, 2012). Dünya genelinde sofralık incire karşı olan talep taze tüketilen diğer birçok meyve türüne oranla daha fazladır ve her geçen gün de artmaktadır. İncir meyvelerinde bulunan yüksek orandaki antioksidan bileşikler (fenoller, organik asitler, E vitamini ve karotenoidler) insan hücrelerinde meydana gelen oksidatif zararlanmanın engellenmesinde rol oynamaktadır (Silva ve ark., 2004). Mineral maddelerin özellikle de kalsiyum ve demir içeriğinin fazla olması sebebiyle insanlardaki kemik erimesine, vitamin eksikliğine ve kansızlığa iyi gelmektedir. Ayrıca barındırdığı ham ve indirgen lifler mükemmel bir besin kaynağıdır (Yıldırım, 2016). İncirin tüm bu olumlu yönlerinin yanında kendine özgü aroması, görünümü ve zengin besin içeriği nedeniyle Bursa Siyahı incir çeşidi ihracatın gözdesi durumundadır. Türkiye 2019 yılında 300 905 bin tonluk incir ihracatı ile dünyada birinci sırada yer almaktadır. İncir ihracatının 7 748 ton'luk bölümü ise Bursa siyahı incir ihracatı olarak gerçekleştirilmiş olup her yıl bu miktar %6 civarında artış göstermektedir (Anonim, 2019; FAO, 2019).

Bursa siyahı incir çeşidinin tüm bu olumlu özelliklerine ek olarak herhangi bir kimyasala ihtiyaç duyulmadan yetiştirilebiliyor olması bu ürünün nadir organik olarak yetiştirilen gıdalardan biri olmasını da sağlamaktadır. Bu nedenle T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı çok zorunlu kalmadıkça herhangi bir kimyasalın ruhsatına izin vermemektedir. İncirde kullanılmasına izin verilmeyen kimyasallardan biri de meyvelerinin çabuk olgunlaşmasına neden olan ethephon etken maddeli Bitki Gelişme Düzenleyicisi (BGD)'dir. Sistemik etkili bir BGD olan ethephon (chloroethephon; 2-CEPA; 2-chloroethylphosphonic acid, $C_2H_6ClO_3P$) cilde, solunum yollarına ve göze tahriş edici özelliğe sahiptir. Suda çözünürlüğü çok yüksek olan bu kimyasalın yarılanma ömrü 13 gün kadardır. Asidik koşullarda bu süre 99 güne kadar çıkabilirken bazı şartlarda 2 günün altına inebilmektedir. Memelilere akut toksisitesi orta düzeyde bulunurken, kronik toksik etkisi daha yüksek olarak belirlenmiştir (Mursalat ve ark., 2013; Bhadoria ve ark., 2015; 2018; PPDB, 2020). Herhangi bir genotoksik veya nörotoksik hasara neden olmamakla birlikte bazı parçalanma ürünleri HEPA (2-hydroxyethyl phosphonic acid, $C_2H_3O_4P$) ve fosfonik asitin (phosphonic acid, H_3O_3P) kendisinden daha toksik olduğu yönünde bazı bulgular bulunmaktadır (EFSA Scientific Report, 2008; Azar ve ark., 2016). Bu nedenle, bu tip kimyasalların kalıntılarının taze tüketilen meyvelerde belirlenen sınır değerlerinin üstünde olmaması istenmektedir (Kumral ve ark., 2020). Ethephon ülkemizde sadece domates ve pamukta ruhsatlı olup, bu ürünlerde izin verilen hasat öncesi süre (PHI) 14 gündür. Ayrıca, Avrupa Birliği (AB) ülkelerinde ve ülkemizde domates üzerinde bulunması izin verilen maksimum kalıntı sınırı (MRL) sırasıyla ve 2 ve 1 $mgkg^{-1}$ 'dir (BKUtarım, 2020). Ülkemizde yasak olmasına rağmen yine AB ülkelerinde incir için belirlenen MRL değeri 3.0 $mgkg^{-1}$ 'dir. Ancak İyi Tarım Uygulamaları yönetmeliğine göre üretildiği ülkede ruhsatı olmayan bir ürün kesinlikle kullanılmaz ve dolayısıyla ülkemizde incir meyvelerinde ethephon için belirlenen MRL değeri sıfır'dır (Anonim, 2010). Ayrıca, ethephonun bir parçalanma ürünü olan fosfonik asit türevlerinin de incir üzerinde olması istenmemektedir. AB ülkeleri tarafından bir pestisit olan fosetyl-al etken maddesiyle aynı statüde değerlendirilen fosfonik asidin incir meyvelerindeki MRL değeri 2.0 $mgkg^{-1}$ 'dir (EU Pesticide Database, 2020). Benzer olarak, fosetyl-al'in Türkiye'de incir üzerinde ruhsatlı olmaması bu kimyasalın MRL değerinin sıfır kabul edilmesine neden olmaktadır.

Tüm bu nedenlerle, ülkemizde yetiştiriciliği yapılan incir meyvelerinde ethephon kullanılmamalı, riskleri ortaya konmalı ve üretici bu konuda bilinçlendirilmelidir. Bu çalışmada 2020 yılı arazi koşullarında ethephon uygulaması iki farklı konsantrasyonda simüle edilmiş olup, ethephon ve onun bir parçalanma ürünü olan fosfonik asit kalıntı düzeyleri farklı süreçlerde (uygulama sırasında, hasat esnasında, depolama ve nakliye) gösterilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, bu araştırmada ethephon ve fosfonik asit kalıntı düzeyleri LC-MS-MS cihazında Perla Fruit Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı tarafından geliştirilmiş yeni bir metot kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmamıza benzer bir araştırma Azar ve ark. (2016) tarafından yine Bursa siyahı inciri üzerinde gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, kullanılan analiz yöntemi, ethephon konsantrasyonları, örnekleme süreçleri açısından farklılıklar bulunmaktadır. Ayrıca bu araştırmada fosfonik asit kalıntılarının ilk defa bakılacak olması çalışmamızın diğer orijinal yönüdür.

Materyal ve Yöntem

Bitkisel Materyal

Bu çalışmada Bursa ili Dürdane köyünde doğal olarak yetişen Bursa siyahı incir çeşidi (*Ficus carica* L. Moraceae) meyveleri kullanılmıştır. Denemede kullanılan incir meyveleri herhangi bir kimyasal kullanılmadan yetiştirilmiştir.

Kimyasallar

Bu denemede arazi koşullarında meyvelere uygulanmak üzere 480 g/l ethephon aktif maddesi içeren Aproz 48 SL marka (BİO Agro & Tarım firması) ticari bir formülasyon kullanılmıştır. LC-MS-MS analizlerinde ise ethephon (2-chloroethylphosphonic acid)'un ve fosfonik asidin %99'luk saflıktaki analitik standardı Ehrenstorfer kimyasal firmasından sağlanmıştır. Diğer tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

İncir Meyvelerine Ethephon Uygulaması

Ethephonun iki farklı konsantrasyonu incir meyvelerine 22 Eylül 2020 tarihinde bir el spreyi ile homojen bir şekilde püskürtülmüştür. Bu amaçla 60 adet meyveye 5 ml/1 lt su konsantrasyonunda (2400 mgL⁻¹ a.i.), bir diğer 60 meyveye ise 1 ml/1 lt su konsantrasyonunda (480 mgL⁻¹ a.i.) ticari ethephon formülasyonu eşit miktarda hacimde uygulanmıştır. Ağaçtaki ışıklandırma sürelerindeki farklılıklar düşünülerek uygulama yapılacak meyveler ağaçların üç farklı yönünden seçilmiştir. Ağaçtan kaynaklanacak farklılıkları eşitlemek için her iki konsantrasyonda aynı ağaçta farklı meyvelere uygulanmış, farklı konsantrasyonlar renkli kurdelelerle işaretlenmiştir. Püskürtme sırasında oluşabilecek sürüklenme etkisine karşı uygulama yapılan meyvelerin arasında belirli bir mesafe sağlanmıştır. Aynı sayıda meyveye ise kontrol amaçlı olarak hiçbir uygulama yapılmamıştır. Denemeler 3 tekerrürlü olacak şekilde üç farklı ağaçta yürütülmüştür.

Örnekleme Prosedürü

Ethephon ve onun parçalanma ürünü olan fosfonik asidin kalıntı düzeylerini belirlemek amacıyla farklı tarihlerde örnekleme yapılmıştır. İlk örnekleme arazide uygulama yapılır yapılmaz (0G) gerçekleştirilmiştir. İkinci örnekleme uygulamadan sonra meyvede olgunlaşma görüldüğü hasat gününde yapılmıştır. Yüksek doz için 3. (3G) ve 6. gün (6G)'ler; düşük doz için ise 6. gün (6G) hasat günü örnekleme olarak belirlenmiştir. Pratik anlamda hasat edilen incir meyveleri tüketime sunulana kadar değişken zamanlarda soğuk zincir koşullarında (+4°C) muhafaza veya nakliye edildiğinden, farklı zamanlarda hasat sonrası depo örnekleme yapılmıştır. Bu nedenle soğuk zincir koşullarında ürünün en yakın ve en uzak sevkiyat noktalarına ulaşma zamanı dikkate alınarak farklı zamanlarda örnekleme yapılmıştır: her iki konsantrasyon içinde uygulamadan 15 gün sonra (15G), 19 gün sonra (19G) ve 22 gün sonra (22G).

Ethephon ve Fosfonik asit Ekstrasyonu

Ethephon ve fosfonik asit ekstrasyonu için Perla Fruit uzmanları tarafından geliştirilen ve uluslararası patent başvurusu yapılan (Patent Başvuru No: 2020/22810) yeni bir metot kullanılmıştır. Bu amaçla, öncelikle 500 gr incir meyvesi örnekleri Retsch marka GM300 model blenderde homojenize edilmiştir. Homojenize edilen bu örneklerin 10 g'lık kısmı 50 mL'lik polypropylene santrifüj tüpüne konmuş ve üzerine 2 ml ultra saf su ilavesi yapılmıştır. Örnekler 30 sn vortex ile çalkalandıktan sonra içine 100 µL Internal standart (Ethrenstorfer) ilave edilmiştir. Daha sonra 10 ml %1 formik asit içeren metanol eklenerek 1 dk daha vortex yapılmıştır. Örnekler 5000 rpm'de santrifüj edildikten sonra üst faz 15 ml lik tüplere 0.45 µm çaplı membran filtre (Millipore) ile süzülerek aktarılmıştır. Örnekler saf su kullanılarak 5 kat seyreltilmiş ve amber renkli 1.5ml lik cam viallere aktarılmıştır.

Ethephon ve Fosfonik asit Düzeylerinin Belirlenmesi

Ethephon ve fosfonik asit konsantrasyonları Agilent 6470 Triple Quad Liquid-Mass Spectrometry (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Kromatografik ayırma için Shodex kolon kullanılmıştır. Mobil A faz amonium bikarbonat ve saf su içeren sulu bir çözeltiden oluşmaktadır. Mobil faz akış hızı, 0,45mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Gradyan elüsyon sırasıyla 0-1 dk %40 A, 1-4 dk %30 A, 4-4.95 dk %0 A ve 4.95-6.50 dk %40 A olacak şekilde programlanmıştır. Kütle spektrofotometresi (MS) ile tespit, çoklu reaksiyon izleme (MRM) ve elektrosprey iyonizasyon (ESI) modunda gerçekleştirilmiştir. Gaz akışı 10 psi, gaz kılcal voltajı 3600V ve kaynak sıcaklığı 100°C olacak şekilde ayarlanmıştır. Numune enjeksiyon hacmi 20 µL'dir.

Validasyon Çalışmaları

Validasyon çalışmaları Avrupa Komisyonu DG Sağlık ve Gıda Güvenliği Kılavuzuna (SANTE, 2019) uygun olarak herhangi bir kimyasal içermeyen incir meyve örnekleri ile gerçekleştirilmiştir. Her iki aktifin kalibrasyon

eğrileri altı konsantrasyonda (0.005 ile 5 mgL⁻¹) üç tekerrürlü olarak belirlenmiştir. Tüm bileşikler için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin korelasyon katsayısı (R^2) ≥ 0.99 olacak şekilde kullanılmıştır. Tekrarlanabilirlik 0.01 ve 0.05 mgL⁻¹ konsantrasyonlarda 5 tekerrürlü olarak iki farklı analistle gerçekleştirilmiştir. Tekrar üretilebilirlik ve geri kazanım çalışmaları 0.01 ve 0.05 mgL⁻¹ konsantrasyonlarda farklı zamanda iki farklı analistle gerçekleştirilmiştir. Cihazın (LODs) ve metodun tespit sınırlarını (LOQs) belirlemek amacıyla her iki kimyasalın 5 µgL⁻¹lik konsantrasyonları 10 tekerrürlü olarak analiz edilmiştir.

İstatistiksel Analiz

Farklı zamanlarda örneklenen incir meyvelerindeki ethephon ve fosfonik asit düzeylerinin ortalamaları tekrarlı ölçülmüş varyans analiz (*MANOVA*) testine tabi tutulmuştur. Daha sonra Tukey'in post hoc testi ($p < 0.05$) gerçekleştirilerek ortalamalar arasındaki farklıklar gruplandırılmıştır (SAS 2007).

Bulgular

Validasyon Sonuçları

Analiz sonuçlarına göre ethephonun yakalama zamanı 4.3 dk; ana iyonu 143 m/z; Ürün iyonu 107 m/z ve collision (çarpışma) enerjisi 10'dur. Fosfonik asidin ise yakalanma zamanı 4.1 dk., ana iyonu 81 m/z; ürün iyonu 79 m/z ve çarpışma enerjisi 5'tir. Tekrarlanabilirlik için RSD ethephonda %1.11-%3.64, fosfonik asitte %0.70-%2.40 arasında bulunmuştur. Ethephon ve fosfonik asidin 0.01 ve 0.05 mgL⁻¹ konsantrasyonları için tekrar üretilebilirlik için RSD %0.94-3.50, fosfonik asitte %5.13-1.21 olarak belirlenmiştir. Ortalama geri kazanım ethephon ve fosfonik asidin 0.01 ve 0.05 mgL⁻¹ konsantrasyonları için sırasıyla %103.62-102.66 ve %101.76-101.93 olmuştur. Ethephon ve fosfonik asit için cihaz tespit sınırları (LODs) 5.85 ve 5.49 µgL⁻¹ ve metod tespit sınırları (LOQs) sırasıyla 7.82 ve 6.64 µgL⁻¹ olarak belirlenmiştir.

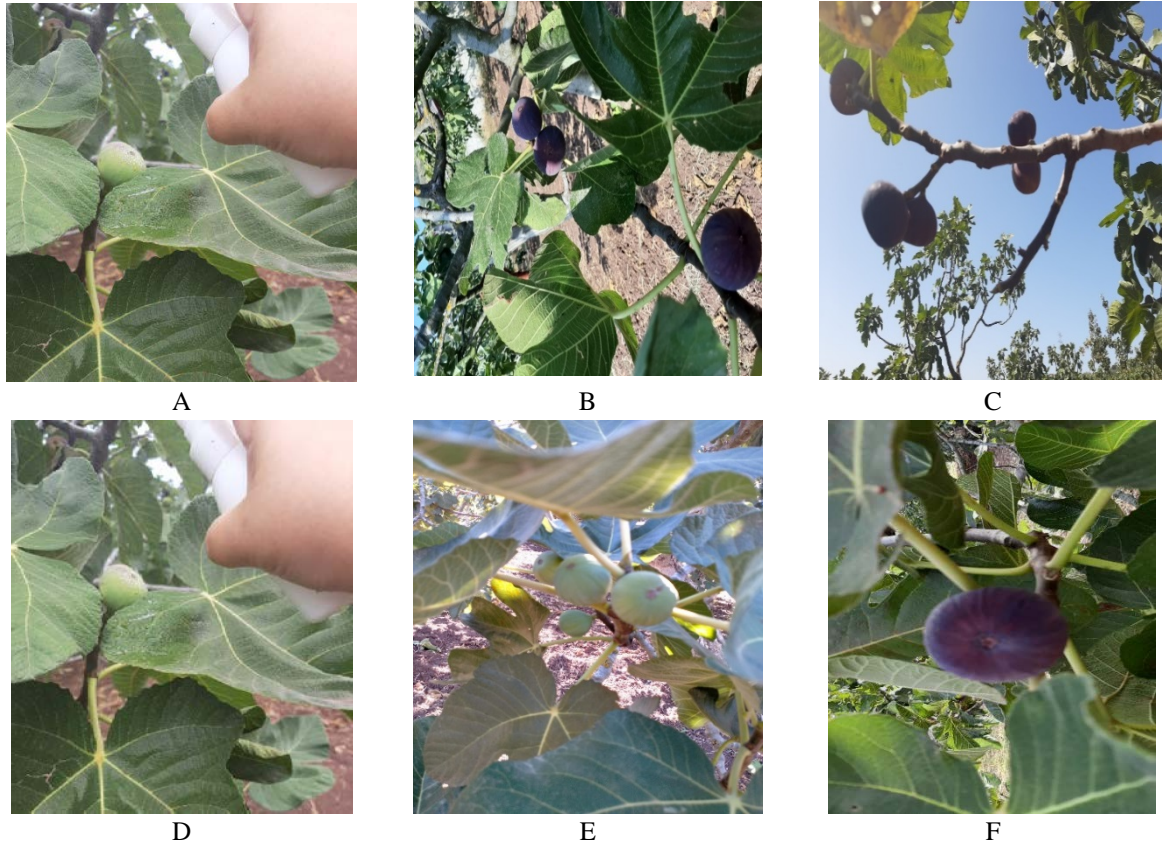
Ethephon Kalıntıları

Arazi koşullarında 2400 ve 480 mgL⁻¹ konsantrasyonlarda ethephon uygulandıktan sonra 3 ve 6 gün sonra meyvelerde görülen renk değişimi Şekil 1'de gösterilmiştir. Gözlemlerimize göre yüksek konsantrasyon uygulandığında meyvelerde 3 gün sonra olgun meyve rengi oluşmuştur (Şekil 1b). Aynı konsantrasyonda 6 gün beklenildiğinde ise meyvelerin tamamen olgunlaştığı ve hatta dalından düşecek duruma geldiği gözlemlenmiştir. Ayrıca, yüksek konsantrasyon uygulaması yapılan meyvelerin etrafındaki yaprakların döküldüğü görülmüştür (Şekil 1c). Diğer taraftan düşük konsantrasyon uygulanan meyvelerde 3 gün sonra kısmen bir renklenme görülürken ancak 6 gün sonra olgunlaşma saptanmıştır (Şekil 1d,e,f). Bu meyvelerin bulunduğu dallarda herhangi bir yaprak dökümü saptanmamıştır.

Arazi koşullarında 2400 mgL⁻¹ konsantrasyonda ethephon uygulanmasından sonra meyvelerde yapılan analizlerde ethephon kalıntı miktarı ortalama 36.48 mgkg⁻¹ olarak saptanmıştır (Şekil 2a). Uygulamadan 3 gün

sonra hasat olgunluğuna ulaşan meyvelerde yapılan analizlerde ise ortalama ethephon miktarı 10.91 mgkg^{-1} bulunmuştur. Bu örnekler $+4\text{C}$ 'deki soğuk havada 12 gün boyunca tutulduğunda 5.73 mgkg^{-1} , 16 gün boyunca muhafaza edildiğinde 5.30 mgkg^{-1} ethephon kalıntısı belirlenmiştir. Uygulama yapılan günde alınan örnekler göre ethephon kalıntı miktarı hem arazi koşullarında hem de depolama sırasında önemli düzeyde düşüş göstermiştir. Ancak, soğuk hava deposunda farklı sürelerde bekletilen örneklerde ethephon miktarı açısından önemli bir farklılık bulunmamıştır ($F_{3,8}=308.72$; $P<0.01$). Aynı konsantrasyonla uygulama yapıldıktan 6 gün sonra hasat edilen örneklerde ise ortalama ethephon konsantrasyonu 8.45 mgkg^{-1} bulunmuştur (Şekil 2b). Örnekler $+4\text{C}$ 'deki soğuk havada 12 gün boyunca tutulduğunda 7.73 mgkg^{-1} , 16 gün boyunca muhafaza edildiğinde 6.34 mgkg^{-1} ethephon kalıntısı saptanmıştır. Uygulama günü kalıntı miktarları ile karşılaştırıldığında ethephon kalıntı miktarı hasat zamanında önemli bir şekilde düşüş gösterse de soğuk hava deposunda geçen sürelerde istatistiki anlamda önemli bir düşüş belirlenmemiştir ($F_{3,8}=368.69$; $P<0.01$).

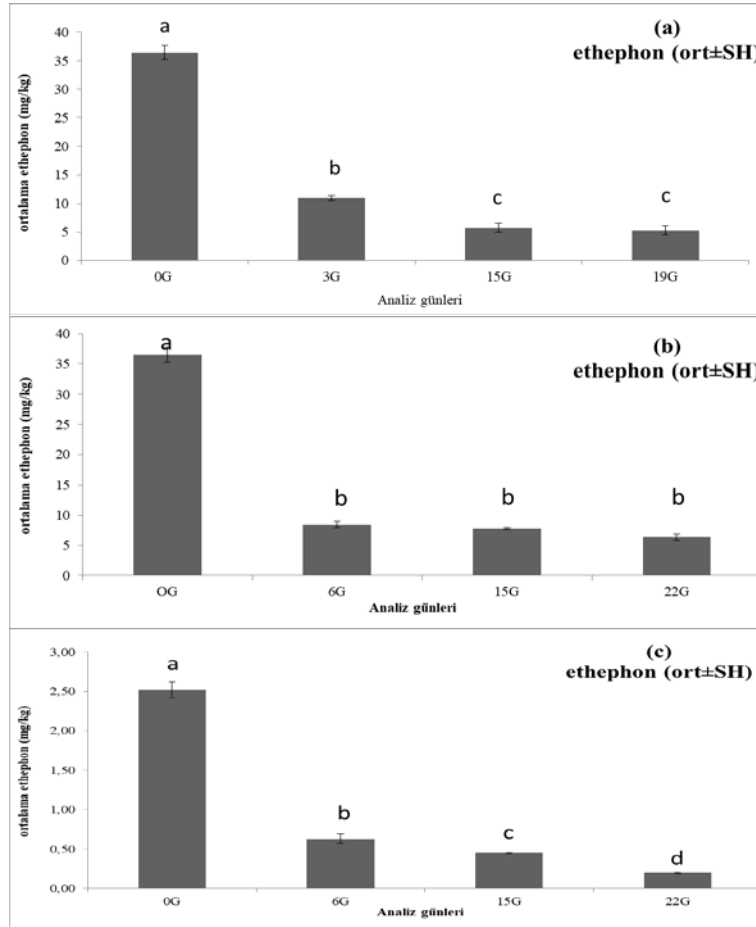
Arazi koşullarında 480 mgL^{-1} konsantrasyonda ethephon uygulanması yapıldıktan hemen sonra meyvelerde yapılan analizlerde ortalama ethephon konsantrasyonu 2.52 mgkg^{-1} bulunmuştur (Şekil 2c). Uygulamadan 6 gün sonra olgunlaşan incir meyvelerinde yapılan analizlerde ortalama ethephon miktarı 0.63 mgkg^{-1} 'ye düşmüştür. Bu örnekler $+4\text{C}$ 'deki soğuk havada 9 gün boyunca tutulduğunda 0.45 mgkg^{-1} , 16 gün boyunca muhafaza edildiğinde 0.20 mgkg^{-1} ethephon kalıntısı belirlenmiştir. Uygulama yapılan günden sonraki her örneklemede ethephon kalıntı miktarı önemli düzeyde düşüş göstermiştir ($F_{3,8}=348.09$; $P<0.01$). Soğuk havada tutulan örneklerde önemli bir farklılık bulunmamıştır. İstatistiki analizlere göre; yüksek konsantrasyona göre düşük konsantrasyonda ethephon uygulanan tüm incirlerde her örnekleme gününde de önemli düzeyde daha az kalıntı bulunmuştur ($F_{7,16}=541.97$; $P<0.01$). Yüksek konsantrasyon uygulanan örneklerde en düşük ethephon kalıntısı 22. günde depodan alınan örneklerde bulunsa dahi; bu miktar düşük dozun uygulandığı tarihteki örneklerde düşük bulunmamıştır.



Şekil 1. Arazi koşullarında 2400 mgL⁻¹ konsantrasyonda ethephon uygulanan meyvelerdeki (a) uygulama günü görüntüsü (b) 3 gün sonra hasat edilecek örneklerdeki görüntü (c) 6 gün sonra hasat edilecek örneklerdeki görüntü 480 mgL⁻¹ konsantrasyonda ethephon uygulanan meyvelerdeki (d) uygulama günü görüntüsü (e) 3 gün sonra hasat edilecek örneklerdeki görüntü (f) 6 gün sonra hasat edilecek örneklerdeki görüntü

Fosfonik Asit Kalıntıları

Arazi koşullarında 2400 mgL⁻¹ konsantrasyonda ethephon uygulanmasından sonra meyvelerde yapılan analizlerde fosfonik asit kalıntısı ortalama 0.31 mgkg⁻¹ olarak saptanmıştır (Şekil 3a). Hiç uygulama yapılmayan örneklerde ise herhangi bir fosfonik asit kalıntısına rastlanılmamıştır (Analiz sonuçları sıfır çıktığı için herhangi bir grafikte gösterilmemiştir). Uygulamadan 3 gün sonra hasat olgunluğuna ulaşan meyvelerde yapılan analizlerde ise ortalama fosfonik asit 0.22 mgkg⁻¹ bulunmuştur. Bu örnekler +4°C'deki soğuk havada 12 gün boyunca tutulduğunda 0.19 mgkg⁻¹, 16 gün boyunca muhafaza edildiğinde 0.19 mgkg⁻¹ fosfonik asit kalıntısı belirlenmiştir. Fosfonik asit kalıntı miktarları sadece arazi koşullarında düşüş göstermiş olup, soğuk hava deposunda istatistiki ve göreceli anlamda bir düşüş saptanmamıştır (F_{3,8}=10.18; P<0.01). Aynı konsantrasyonla uygulama yapıldıktan 6 gün sonra hasat edilen örneklerde ise ortalama fosfonik asit konsantrasyonu 0.36 mgL⁻¹ bulunmuştur (Şekil 3b). Örnekler +4°C'deki soğuk havada 12 gün boyunca tutulduğunda 0.29 mgkg⁻¹, 16 gün boyunca muhafaza edildiğinde 0.41 mgkg⁻¹ fosfonik asit kalıntısı saptanmıştır. Uygulama gününe göre diğer örnekleme günlerinde önemli düzeyde bir yükseliş belirlenmiştir (F_{3,8}=24.64; P<0.01).



Şekil 2. (a) Arazi koşullarında 2400 mgL^{-1} konsantrasyonda ethephon uygulanan ve 3 gün sonra hasat edilen örneklerdeki; (b) 2400 mgL^{-1} konsantrasyonda ethephon uygulanan ve 6 gün sonra hasat edilen örneklerdeki; (c) 480 mgL^{-1} konsantrasyonda ethephon uygulanan ve 6 gün sonra hasat edilen incir örneklerindeki ethephon kalıntı miktarları (0G, uygulama günü; 3G, 3. günde hasat edilen; 6G, 6. günde hasat edilen; 15G, soğuk saklama koşullarında bekletilen 15. gün; 19G, soğuk saklama koşullarında bekletilen 19. Gün; soğuk saklama koşullarında bekletilen 22. gün örnekleri), Sütunların üzerindeki çubuklar standart hatayı; farklı küçük harfler ise Tukey analizine göre istatistiki anlamda ($p < 0.01$) farklılıkları göstermektedir.

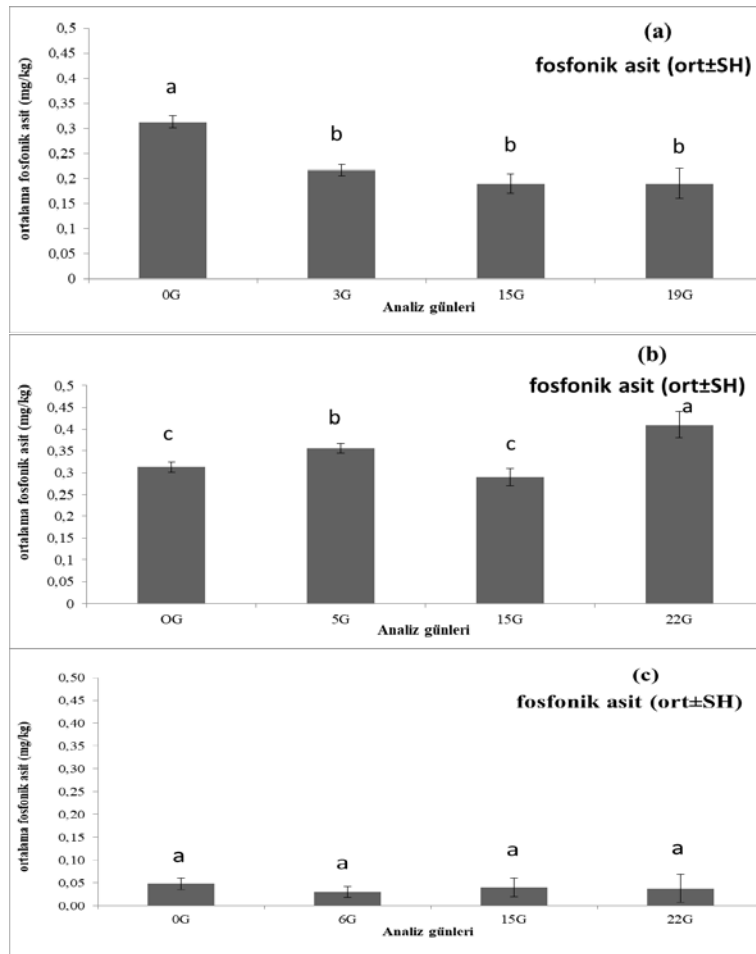
Arazi koşullarında 480 mgL^{-1} konsantrasyonda ethephon uygulanmasının arkasından alınan meyve örneklerinde ortalama fosfonik asit kalıntısı 0.048 mgkg^{-1} bulunmuştur (Şekil 3c). Uygulamadan 6 gün sonra olgunlaşan incir meyvelerinde yapılan analizlerde ortalama fosfonik asit miktarı 0.03 mgkg^{-1} 'ye düşmüştür. Bu örnekler $+4\text{C}$ 'deki soğuk havada 9 gün boyunca tutulduğunda 0.06 mgkg^{-1} , 16 gün boyunca muhafaza edildiğinde 0.038 mgkg^{-1} fosfonik asit kalıntısı belirlenmiştir. Uygulama yapılan gündeki örneklerle karşılaştırıldığında hasat zamanında önemli bir düşüş görülmesine rağmen, depolama esnasında önemli bir azalma görülmemiştir ($F_{3,8}=14.79$; $P < 0.01$). İki yollu ANOVA varyans analizine göre düşük konsantrasyonda ethephon uygulanan örneklerde önemli düzeyde daha az fosfonik asit kalıntısı belirlenmiştir ($F_{7,16}=421.06$; $P < 0.01$). Diğer taraftan, fosfonik asit miktarında uygulama gününe nazaran önemli bir düşüş saptanmamıştır.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada ethephon ve fosfonik asit kalıntıları yeni bir ekstrasyon ve cihaz koşulları kullanılarak LC-MS-MS cihazında belirlenmiştir. SANTE (2019) dökümanında belirtilen standartlara uygun olarak matrisli kalibrasyon eğrilerinin R^2 değeri >0.99 olmuştur. Doğrusallık için en önemli kriterin bu korelasyon katsayısı olduğu araştırmacılar tarafından not edilmektedir (Tiryaki, 2017; Yolci Omeroglu ve ark., 2018). Ethephon ve fosfonik asit için metodun en alt sınır değeri (LOQ) sırasıyla 7.82 ve 6.64 μgkg^{-1} olarak tespit edilmiş olup, her iki kimyasalın AB MRL değerlerinin (3 ve 2 mgkg^{-1}) çok altında olduğu görülmektedir. Aynı zamanda Türkiye’de bu iki kimyasalın ruhsatlı olmayışı tespit limitlerinin çok düşük olması gerekliliğini getirdiği için metodun hassasiyeti oldukça iyi bulunmuştur. Nitekim, Azar ve ark. (2016), kullandıkları yönteme göre ethephon için bu değeri 20.38 μgkg^{-1} olarak daha yüksek bulmuşlardır. SANTE (2019) normlarına göre geri kazanım limitleri $\%60 \leq Q \leq \%140$ arasında olmalı ve tekrarlanabilirlik $\leq 20\%$ olmalıdır. Bu normlara uygun olarak bu çalışmada ortalama geri kazanım ethephon ve fosfonik asit için $\%103.62-102.66$ ve $\%101.76-101.93$ olarak tespit edilmiş ve tekrarlanabilirlik $<20\%$ (sırasıyla $\%1.11-\%3.64$, $\%0.70-\%2.40$) olmuştur. Tüm bu veriler geliştirilen yeni metodun kazanım testlerinin sonuçlarının kabul edilebilir olduğu ve kalıntı analizi için yöntem performans kriterlerine uygun olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada, arazi koşullarında incir meyveleri üzerinde farklı konsantrasyonlarda uygulama yapılmasının akabinde ethephon ve fosfonik asit kalıntıları farklı örnekleme günlerinde tespit edilmiştir. Araştırma sonuçlarına göre yüksek konsantrasyonda ham incir meyveleri 3 gün içinde olgunlaşmış olup, uygulamadan 6 gün sonra meyveler ve hatta yapraklar dökülmeye başlamıştır. Bu uygulama sonucunda gerek hasat sırasında (8.45 - 10.91 mgkg^{-1}) gerekse hasattan sonra depolama (5.73 - 7.73 mgkg^{-1}) ve pazara sunma (5.30 - 6.34 mgkg^{-1}) aşamalarında AB MRL değerlerinin (3 mgL^{-1}) üzerinde kalıntılara rastlanmıştır (EU Pesticide Database, 2020). Düşük konsantrasyonda yapılan uygulamalardan sonra ham meyvelerin olgunlaşması 6 gün sürmüştür ve ethephon kalıntıları hasat sırasında 0.63 mgkg^{-1} , hasattan sonra depolama aşamasında 0.45 mgkg^{-1} ve pazara sunma sırasında 0.20 mgkg^{-1} olmuştur. Bu sonuçlar her ne kadar AB MRL değerlerini altında kalsa da ülkemizde ethephon’un incir üzerinde kullanılmasına izin verilmediği için ihracatta ve iç piyasada herhangi bir ethephon kalıntısı istenmemektedir. Bu anlamda, bu süreçlerde ethephon’un tamamen parçalanmadığı ve kalıntı riski oluşturduğu ortaya çıkmaktadır. Benzer olarak, Kanada’da incirler üzerinde yapılan bir çalışmada ethephon kalıntıları 20-40 gün sonra dahi 0.2 ila 2.3 mgkg^{-1} düzeyinde saptanmıştır (FAO, 1995). Bursa ilinde incirler üzerinde farklı bir analiz yöntemi ile yapılan başka bir çalışmada ise 1500 mgL^{-1} konsantrasyonunda ethephon uygulanan incirlerde hasat sırasında 0.8-1.2 mgkg^{-1} , depolama sürecinde 0.3 mgkg^{-1} ve hasat sırasında 0.2 mgkg^{-1} ortalama ethephon kalıntılarında rastlanılmıştır (Azar ve ark., 2016). Araştırmacılar da benzer olarak, incirde ethephon uygulamasının üründe uzun bir süre kalıntıya neden olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaya göre, bizim araştırmamızda düşük konsantrasyon (480 mgL^{-1}) kullanmamıza rağmen ethephon kalıntı düzeylerinin daha yüksek çıkmasının iki sebebi olabilir. Birincisi bizim çalışmamızda kullanılan yeni metodun geri kazanım oranının ortalama $\%103$ oranlarında olmasına karşılık, Azar ve ark. (2016)’ın metodunun $\%83$ ila $\%110$ arasında çok değişken olmasıdır. Ayrıca, bu çalışmadaki metotta tekrarlanabilirlik ve tekrar üretkenlik değerleri de

oldukça iyi bulunmasına rağmen, atıf yapılan çalışmada bu değerler paylaşılmamıştır. Diğer ikinci sebep, örnekleme takvimi ile ilişkili olabilir. Çünkü bizim çalışmamızda meyvenin olgunlaşma sürecine bakılarak örneklemler yapılmış ve iç ve dış pazarlara sunulma durumuna göre hem araziden hem depodan değişken zamanlarda örnekleme yapılmıştır. Atıfta bulunan çalışmada en az 10 gün örnekler arazi koşullarında bekletildikten sonra +4°C sıcaklığa alınmıştır. Bu nedenle, doğal koşullarda ethephonun parçalanması daha kolay olacağından depoya giren örneklerde daha düşük konsantrasyonların bulunması doğal bir sonuçtur. Ancak, özellikle yüksek konsantrasyon ethephon kullanıldığında meyveler çok hızlı olgunlaştığı ve hatta yere dökülmeye başladığı için erken hasat edilmesi (3. gün) gerekmektedir. Bu durumda da soğuk koşullarda üründeki ethephonun parçalanması çok yavaşlamakta ve daha fazla risk ortaya çıkmaktadır.



Şekil 3. (a) Arazi koşullarında 2400 mgL^{-1} konsantrasyonda ethephon uygulanan ve 3 gün sonra hasat edilen örneklerdeki; (b) 2400 mgL^{-1} konsantrasyonda ethephon uygulanan ve 6 gün sonra hasat edilen örneklerdeki; (c) 480 mgL^{-1} konsantrasyonda ethephon uygulanan ve 6 gün sonra hasat edilen incir örneklerindeki fosfonik asit kalıntı miktarları (0G, uygulama günü; 3G, 3. günde hasat edilen; 6G, 6. günde hasat edilen; 15G, soğuk saklama koşullarında bekletilen 15. gün; 19G, soğuk saklama koşullarında bekletilen 19. gün; soğuk saklama koşullarında bekletilen 22. gün örnekleri). Sütunların üzerindeki çubuklar standart hatayı; farklı küçük harfler ise Tukey analizine göre istatistiki anlamda ($p < 0.01$) farklılıkları göstermektedir.

Bu çalışmada ayrıca uygulama yapılmayan temiz örnekler göre ethephon uygulanan tüm örneklerde fosfonik asit kalıntısı bulunmuştur. Daha önce Azar ve ark. (2016) ethephonun bir parçalanma ürünü olan HEPA'yı uygulamadan 17 gün sonra belirlemelerine rağmen, bizim çalışmamızda fosfonik asit uygulamanın yapıldığı ilk günden itibaren düşük konsantrasyonlarda ($0.19-0.31 \text{ mgkg}^{-1}$) belirlenmiştir. Bu çalışmada, ethephon uygulanan her örnekte fosfonik asit kirliliğinin bulunması bu çalışmada ilk defa gösterilmiştir. Bulgularımızla uyumlu olarak, bazı araştırmacılar ethephonun yapraklara püskürtülmesinden hemen sonra stoma açıklıkları ve kütikuladan hızlıca penetre olduğunu, 5 pH ve üzerinde etilen, klorit ve fosfat türevlerine parçalandığını kaydetmektedirler (Archambault ve ark., 2006; Bhadoria ve ark., 2018).

Sonuç olarak, domates ve pamuk örnekleri düşünüldüğünde ethephonun PHI değerleri 14 gün olduğu görülmektedir. Ancak, incirde bu çalışmada kullanılan her iki konsantrasyon da dikkate alındığında en fazla 6 gün sonra incirler hasat edilmelidir. Aksi takdirde meyveler dalında bozulmaya başlanmaktadır. Diğer bir değişle incirde hasat sonrasındaki bekleme süresi yetersizdir. Bu çalışmada gösterildiği gibi soğuk hava koşullarında depolamalarda da bu kimyasalın parçalanması çok yavaşlamaktadır. Üstüne üstlük HEPA'dan farklı olarak fosfonik asit ethephon uygulanır uygulanmaz saptanabilmektedir. Her iki kimyasal için de tüm süreçlerde kalıntı miktarları saptandığından, meyvelerin ticaretini engellemektedir. Bizim bu çalışmamız ve Azar ve ark. (2016)'nın önceki saptamaları ışığında ethephonun incirde kullanımı incir ticareti açısından çok yüksek riskli görülmektedir.

Teşekkür Bilgi Notu

Bu çalışma STB065816 nolu ve “İhracat Ürünü Bursa Siyahı İncirinin azar Değerinin Artırılması için Kontrol ve Analiz Yöntemlerinin ve Üretici Portföyünün Geliştirilmesi” başlıklı ULUTEK Teknopark araştırma projesi kapsamında yürütülmüştür. Bu çalışmanın tüm kimyasal analizleri G. HAZARHUN tarafından gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bilimsel kurgusu, deneme deseni ve istatistiki analizleri N. A. KUMRAL tarafından yapılmıştır. Yazarlar tüm makaleyi birlikte hazırlamışlar ve okumuşlardır. Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması/çakışması bulunmamaktadır.

Kaynakça

- Aksoy, U., Seferoğlu, G., Mısırlı, A., Kara, S., Şahin, N., Bülbül, S. ve Düzbastılar, M. 1992. Ege Bölgesi koşullarına uygun sofralık incir çeşit seleksiyonu. Türkiye 1. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 13-16 Ekim 1992, İzmir 545-548.
- Aksoy, U., Can, H.Z., Hepaksoy, S. ve Şahin, N. 2001. İncir Yetiştiriciliği. Türkiye Tarımsal Araştırmalar Projesi Yayınları, İzmir, 45 s.
- Anonim, 2010. İyi Tarım Uygulamaları Hakkında Yönetmelik. Resmi Gazete, sayı 27778, s:1-14.

- Anonim, 2019. Uludağ Yaş Sebze Meyve İhracatçıları Birliği. Yıllık, <http://www.uib.org.tr/tr/ihracat-ihracat-rakamlari-uib-ihracat-rakamlari.html> (Erişim tarihi: 26.11.2020).
- Archambault, D.J., Li X., Foster K.R. and Jack T.R., 2006. A screening test for the determination of ethylene sensitivity. *Environ Monit Assessment*, 115: 509–530
- Azar, İ., Tosunoğlu, H. Akbaş, N. ve Deniz, A. 2016. Bursa siyah incirinde ethephonun metaboliti olan 2-hydroxyethyl phosphonic acide dönüşüm sürecinin ve kalıntı düzeylerinin araştırılması. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, 16(1): 24-32.
- Bhadoria, P., Nagar, M., Bahrioke, V. and Bhadoria A.S. 2015. Effect of ethephon on the liver in albino rats: A histomorphometric study. *Biomed Journal*. 38: 421–427.
- Bhadoria, P., Nagar, M., Bharihoke, V. and Bhadoria, A.S. 2018. Ethephon, an organophosphorous, a fruit and vegetable ripener: has potential hepatotoxic effects? *Journal of Family Medicine and Primary Care*, 7(1): 179-183.
- BKUtarm 2020. Bitki Koruma Ürünleri Veri Bankası. <https://bku.tarim.gov.tr> (Erişim tarihi: 26.11.2020).
- Çalışkan, O. and Polat, A.A. 2011. Phytochemical and antioxidant properties of selected fig (*Ficus carica* L.) accessions from the eastern Mediterranean region of Turkey. *Scientia Horticulturae*, 128(2011): 473-478.
- Çalışkan, O. ve Polat, A.A. 2012. Bazı incir çeşitlerinin fitokimyasal ve antioksidan özelliklerinin belirlenmesi. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 49(2): 201-207.
- EFSA Scientific Report, 2008. Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment active substance ethephon. Conclusion on the PeerReview of Ethephon, 174: 1-65.
- EU Pesticide Database, 2020. European Commission Pesticide Database. <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN> (Erişim tarihi: 26.11.2020).
- FAO, 1995. Pesticide residues in Food-1994. Evaluation Part-1 Residues Vol.1, Rome, Italy, 520pp.
- FAO 2019. Food and Agriculture Organisation, FAOSTAT, Crops. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. (Erişim tarihi: 26.11.2020).
- Köseoğlu, İ.V. 2008. Sarılop incir (*Ficus carica* L.) çeşidinin kurutulmuş meyvelerinde fumonisin varlığının araştırılması. Doktora Tezi, Ege Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, İzmir.
- Kumral, Y.A., Kumral N.A. and Gurbuz O. 2020. *Candida boidinii*'nin farklı suşlarının deltamethrini parçalama potansiyellerinin in-vitro koşullarda belirlenmesi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34(2): 337-349.
- Kutlu, E. and Aksoy, U. 1997. Further evaluation of selected Sarılop (*Calimyrna*) clones. *Acta Horticulturae*, 480: 265-269.
- Mursalat, M., Rony A.H., Rehman A.H., Khan, M.S. and Islam M.N. 2013. Critical Analysis of Artificial Fruit Ripening: Scientific, Legislative and Socio-Economic Aspects. *CHE Thoughts*, 1: 1–7.

- Nalbant, M., Şahin, N. and Aydın, Ş. 1998. Fig genetic resources at the Fig Research Institute (Aydın/Turkey), *Acta Horticulturae*, 480: 43.
- PPDB, 2020. The Pesticide Properties Database. www.sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/154.htm (Erişim tarihi: 26.11.2020).
- SANTE, 2019. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. SANTE/12682/2019. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_mrl_guidelines_wrkdoc_2019-12682.pdf (Erişim tarihi: 26.11.2020).
- SAS, 2007. SAS Institute. JMP version 7.0.2 Release Notes Cary, NC: SAS Institute Print Center, 1-20.
- Silva, R.H., Ağabeylio, V.C., Takatsu, A.L., Kameda, S.R., Grassl, C., Chehin, A.B., Medrano, W.A., Calzavara, M.B., Registro, S., Andersen, M.L., Machado, R.B., Carvalho, R.C., Ribeiro, A., Tufik, S. and Frussa-Filho, R. 2004. Role of hippocampal oxidative stress in memory deficits induced by sleep deprivation in mice. *Neuropharmacology*, 46: 895–903.
- Tiryaki O., 2017. Pestisit Kalıntı Analizlerinde Kalite Kontrol (QC) ve Kalite Güvencesi (QA), Geliştirilmiş ve Güncelleştirilmiş 2. Basım, Nobel Yayın No: 1697, Fen Bilimleri: 129, ISBN 978-605-320-604-0. Mart 2017, Ankara, 273s.
- Yıldırım, B. 2016. Bursa ilinde yetiştiriciliği yapılan ‘Bursa Siyahı’ incir çeşidinin SSR moleküler markırları kullanılarak tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Bursa uludağ Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Bursa.
- Yolci Omeroglu, P., Ambrus, A., and Boyacioglu, D. 2018. Uncertainty of pesticide residue concentration determined from ordinary and weighted linear regression curve. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(7): 1324-1339.