T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN *SALVIA SCLAREA*'DA SÜRGÜN REJENERASYONU VE SEKONDER METABOLİT İÇERİKLERİNE ETKİSİ

Elif ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı

Danışman: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin SERVİ

Şubat, 2022

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLLERİN *SALVIA SCLAREA*'DA SÜRGÜN REJENERASYONU VE SEKONDER METABOLİT İÇERİKLERİNE ETKİSİ

Elif ARSLAN tarafından hazırlanan tez çalışması 25/02/22 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik programı **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN	Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin SERVİ
Yıldız Teknik Üniversitesi	İstanbul Yeni Yüzyıl Üniversitesi
Danışman	Eş-Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Prof. Dr. Satı UZUN

Dr. Öğr. Üyesi Esra YÜCA YILMAZ

Danışmanım Prof. Dr. Semiha ERİŞEN ve eş danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin SERVİ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan ‘gümüş nanopartiküllerin *Salvia sclarea*’da sürgün rejenerasyonu ve sekonder metabolit içeriklerine etkisi’ başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Elif ARSLAN

İmza

İTHAF

Gelecek güzel
günlere…

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca engin bilgi ve tecrübeleriyle her aşamada yanımda olan, anlayışını ve desteğini hiç esirgemeden bana yol gösteren danışmanım sayın Prof. Dr. Semiha ERİŞEN hocama; bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen, deneysel kısımlarda ve sonuçların değerlendirilmesinde yardımlarını benden esirgemeyen eş-danışmanım sayın hocam Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin SERVİ'ye ve katkılarından dolayı sayın Dr. Öğr. Üyesi Esra YÜCA YILMAZ hocaya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Birlikte başladığımız yüksek lisans eğitiminde tanıdığım ve ilk günlerden eğitimimin sonuna kadar hep yanımda olup beni destekleyen, motivasyonumu arttıran ve her konuda yardımıma koşan, çok güzel anılar biriktirdiğimiz ve bundan sonra da her zaman yanımda görmek isteyeceğim arkadaşlarım İrem METEOĞLU ve Pınar ÖZTEKİN'e; arkadaşlığımızın güçlenerek devam edeceğine inandığım Gülşah AKBAŞ'a; lisans hayatım boyunca yanımda olduğu gibi yüksek lisans hayatımda da cevapsız kalan her sorumda tecrübesini benimle paylaşan canım arkadaşım Serap SAKARYA'ya ve ayrıca iş arkadaşlarım İmmünoloji ve DTL. ekibine çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni destekleyip her kararımda arkamda duran, eğitim hayatımda hep bir üst seviyeye çıkmam için beni teşvik eden, maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen, gösterdikleri fedakarlıklar için hep minnet duyacağım canım annem Emel ARSLAN, canım babam Kani ARSLAN, kardeşim Hakan ARSLAN ve babannem Mebruke ARSLAN' a, son yedi senem boyunca her zaman benimle olup sevinçlerimi kendi sevinci, üzüntülerimi kendi üzüntüsü olarak benimseyen, beni hiç yalnız bırakmayan, her konuda destekleyip yanımda olan ve bundan sonraki hayatımda hep yanımda görmek istediğim Burak Can AKGÜNAY'a sonsuz teşekkür ederim.

Elif ARSLAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa no:

SİMGE LİSTESİ **vii**
KISALTMA LİSTESİ **viii**
ŞEKİL LİSTESİ **ix**
TABLO LİSTESİ **x**
ÖZET **xi**
ABSTRACT **xiii**
1. GİRİŞ **1**
1.1 Literatür Özeti **1**
1.2 Tezin Amacı **2**
1.3 Hipotez **2**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1 *Salvia sclarea* 4
2.2 Sekonder Metabolitler 5
2.2.1 Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması ve Kullanım Alanları 6
2.3 Doku Kültürü 8
2.3.1 Bitki Hücre ve Doku Kültürleri ile Sekonder Metabolit Üretimi 8
2.3.2 Elisatör Uygulamaları ve Sekonder Metabolit Üretiminin Arttırılması 10
2.4 Nanoteknoloji 11
2.4.1 Nanoteknolojinin Tanımı, Tarihçesi ve Kullanım Alanları 11
2.4.2 Nanopartiküller ve Sentez Yöntemleri 12
2.4.3 Gümüş Nanopartiküller 16
2.4.4 Nanopartiküllerin Sekonder Metabolit İçeriklerine Etkisi 16
3. MATERYAL VE YÖNTEM **18**
3.1 Materyal 18
3.1.1 *Salvia sclarea* Tohumları 18
3.1.2 Kimyasallar 18
3.1.3 Cihazlar 19
3.2 Yöntem 19
3.2.1 Gümüş Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu 19
3.2.2 Doku Kültürü Çalışmaları 21
3.2.3 Sekonder Metabolit İçerik Analizi 24

4. SONUÇ VE ÖNERİLER **27**
4.1 Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 27
4.2 Gümüş Nanopartikül ve Gümüş Nitrat'ın Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi 28
4.3 Gümüş Nanopartikül ve Gümüş Nitrat'ın Sekonder Metabolit İçeriğine Etkisi 34
KAYNAKÇA **39**
TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR **47**

SİMGE LİSTESİ

^{0}C	: santigrat derece
cm	: santimetre
gr	: gram
L	: litre
M	: molar
mg	: milligram
mm	: milimetre
nm	: nanometre
rpm	: dakikada dönme hızı
rcf	: göreceli santrifüj kuvveti
µM	: mikromolar
%	: yüzde

KISALTMA LİSTESİ

Ag^+ : gümüş iyonu
AgNP : gümüş nanopartikül
$AgNO_3$: gümüş nitrat
Au : altın
CuO : bakır oksit
dH_2O : distile su
DNA : deoksiribo nükleik asit
EtOH : etanol
GC-MS : gaz kromatografisi- kütle spektrometresi
HCl : hidroklorik asit
IAA : indol asetik asit
Meja : metil jasmonat
MT : meta topolin
MS : Murashige and Skoog
NAA : naftalin asetik asit
NaOH : sodyum hidroksit
NP : nanopartikül
ROS : reaktif oksijen türleri
RRI : bağıl alıkonma zamanı
RRI Lit. : bağıl alıkonma zamanı literatür
RT : alıkonma zamanı
uv : ultraviyole
yy : yüzyıl
ZnO : çinko oksit

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa no:

2.1 Nanoteknolojinin Kullanım Alanları……....12
2.2 NP Sentez Yöntemleri……..13
2.3 Aşağıdan Yukarıya ve Yukarıdan AşağıyaYaklaşımı……....14
3.1 AgNP Sentezinde Kullanılan *S. sclarea* Bitkisi……...…….....20
3.2 Maserasyon Sonrası Ekstratın Filtre Kağıdından Süzülmesi……...…25
3.3 Evaporatör Cihazı……...…..25
3.4 GC-MS Cihazı…….....26
4.1 Sentezlenen AgNP'lerin Absorbans İntensisitesi…….27
4.2 Sentezlenen AgNP'lere Ait SEM Görüntüsü……...…….28
4.3 Farklı Konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$ Uygulamalarının *in vitro* Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi…….....……...34

TABLO LİSTESİ

Sayfa no:

2.1 Sekonder Metabolit Grupları ve Bazı Örnekler…….….7
3.1 Çalışmada Kullanılan Kimyasallar……....18
3.2 Çalışmada Kullanılan Cihazlar……..19
3.3 *İn vitro* Sürgün Çoğaltımında Kullanılan Besin Ortamı Konsantrasyonları……..23
4.1 AgNP ve $AgNO_3$ Uygulamalarının *S. sclarea*'da Sürgün Rejenerasyonuna Etkisine Ait Varyans Analiz Sonuçları……..…….……29
4.2 AgNP ve $AgNO_3$ Uygulamalarının *S. sclarea*'da Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi…….....29
4.3 Farklı Konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$ Uygulamalarının *S. sclarea*'da Sürgün Rejenerasyonuna Ait Varyans Analiz Sonuçları……....31
4.4 Farklı Konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$ Uygulamalarının *S. sclarea*'da Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi……...…..32
4.5 Farklı Konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$ Uygulamalarının *S. sclarea* Bitkisinin Sekonder Metabolit İçeriklerine Etkisi….……..…….....35

ÖZET

Gümüş Nanopartiküllerin *Salvia sclarea*'da Sürgün Rejenerasyonu ve Sekonder Metabolit İçeriklerine Etkisi

Elif ARSLAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Prof. Dr. Semiha Erişen

Eş-Danışman: Dr. Öğr.Üyesi Hüseyin Servi

S. sclarea içerdiği monoterpen, diterpen, seskiterpen ve flavonoidler gibi değerli sekonder metabolitler nedeniyle ekonomik değeri yüksek tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Bitkiye ait değerli metabolitlerin üretiminde bitki hücre ve doku kültürü çalışmaları alternatif bir yol olarak görülmektedir. *İn vitro* kültürlerde elisatör olarak NP uygulamalarının bitki büyüme, gelişme ve fizyolojisi üzerindeki etkileri değişkendir. Son yıllarda bu uygulamalar sekonder metabolitlerin biyosentez ve birikiminin arttırılması için kullanılmaktadır. Bu tez çalışmasında yeşil sentez yöntemi kullanılarak üretilen AgNP'lerin, *S. sclarea* bitkisinde sürgün rejenerasyonu ve sekonder metabolit içeriklerine olan etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla bitkiye ait nodal segmentler farklı konsantrasyonlarda (0,25,50,100 mg/l) AgNP veya $AgNO_3$ ilave edilmiş, 1 mg/l MT ve 0.2 mg/l IAA içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültürden 8 hafta sonra nodal segmentlerden gelişen rejenere sürgünlerin sayısı, uzunluğu, yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Elde edilen veriler değerlendirildiğinde; AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının eksplant başına sürgün sayısına etkisinin istatistiksel olarak bir farklılık göstermediği fakat sürgün uzunluğu, sürgün yaş ve kuru ağırlığı bakımından farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Uygulanan konsantrasyonların etkisi değerlendirildiğinde ise tüm parametrelerde 0.01 düzeyinde anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Eksplant başına sürgün

sayısı bakımından 25 mg/l AgNP ve $AgNO_3$ ile 100 mg/l AgNP içeren ortamlarla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak bir farklılık olmadığı belirlenmiştir. Sürgün uzunluğu bakımından ise en iyi sonuç kontrol grubundan elde edilmiş olup (18.29 mm), 25mg/l AgNP içeren ortamdan elde edilen sonuç (14. 08 mm) kontrolle aynı grupta yer almıştır. Sürgün yaş ağırlığı bakımından ise 50 ve 100 mg/l $AgNO_3$ içeren ortamlar hariç diğer konsantrasyonlardan elde edilen değerler (5.33-7.53 mg) arasında istatistiksel farklılık gözlemlenmemiştir. Sürgün kuru ağırlığı bakımından ise en yüksek sonuç 50 mg/l AgNP (0.74 mg) içeren ortamdan elde edilmiştir. Rejenere sürgünlere ait yaprakların sekonder içerikleri GC-MS yöntemi ile saptanmıştır. Kültür ortamına AgNP ve $AgNO_3$ ilavesinin yapraklardaki sekonder metabolit içeriklerini ve miktarlarını değiştirdiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Gümüş nanopartikül, misk adaçayı, sekonder metabolitler, sürgün rejenerasyonu, yeşil sentez

ABSTRACT

The Effect of Silver Nanoparticles on Shoot Regeneration and Secondary Metabolite Contents of *Salvia sclarea*

Elif ARSLAN

Department of Molecular Biology and Genetics

Master Thesis

Advisor: Prof. Dr. Semiha ERİŞEN

Co-advisor: Assist. Prof. Dr. Hüseyin SERVİ

S. sclarea is a medicinal and aromatic plant with high economic value due to the valuable secondary metabolites such as monoterpene, diterpene, sesquiterpene and flavonoids contained in it. Plant cell and tissue cultures are seen as an alternative way to produce valuable metabolites belonging to the plant. The influence of nanoparticle applications, which are used as an elisator in *in vitro* cultures, on plant growth, development and physiology is varied. These applications recently are used to increase the biosynthesis and accumulation of secondary metabolites. In this thesis, the effect of AgNPs, which were produced by green synthesis, on shoot regeneration and secondary metabolite contents of *S. sclarea* was investigated. For this purpose, the nodal segments were cultured on MS medium supplemented AgNP or $AgNO_3$ at different concentrations (0.25, 50, 100 mg/l) with 1 mg/l MT and 0.2 mg/l IAA. The number, lenght, wet and dry weight of regenerated shoots derived from nodal segment were determined 8 weeks after culture. The results were evaluated; It was determined that the effect of AgNP and $AgNO_3$ applications on shoot number per explant did not show a statistical difference but statistically differed in shoot length, wet and dry weight. When the effect of different concentrations was

evaluated, a significant difference at the level of 0.01 was found in all parameters. In terms of the number of shoots per explant, it was determined that there was no statistical difference between the media containing 25 mg/l AgNP or $AgNO_3$, 100 mg/l AgNP and the control group. In terms of shoot length, the best result was obtained from the control group (18.29 mm), however, the result obtained from the medium containing 25mg/l AgNP (14.08 mm) was in the same group as the control statistically. In terms of wet weight of regenerated shoot (5.33-7.53 mg) no statistical difference was observed between applications except for media containing 50 and 100 mg/l AgNO3. The highest shoot dry weight (0.74 mg) was obtained from 50 mg/l AgNP . Secondary metabolites contents in the leaves of regenerated shoots were evaluated by GC-MS and it was determined that AgNP and $AgNO_3$ added to the culture medium altered the secondary metabolite contents in leaves qualitatively and quantitatively.

Keywords: Silver nanoparticle, clary sage, secondary metabolites, shoot regeneration, green synthes

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Aromatik ve tıbbi bir bitki olan *Salvia sclarea*, geleneksel tıp ve eczacılıkta uzun yıllardan beri kullanılmaktadır (Tulukcu, 2006). Süre gelen yıllar içerisinde bitkinin iyileştirici etkileri bilimsel olarak da kanıtlanmıştır. Bu bitkiyi değerli kılan içerdiği sekonder metabolitlerdir. *S. sclarea* monoterpen, diterpen, seskiterpen ve flovanoidler gibi çeşitli sekonder metabolitler barındırır (Ulubelen vd., 1994). Bu değerli metabolitler tıp, eczacılık, kozmetik, parfümeri ve gıda başta olmak üzere birçok sektör için ekonomik açıdan önemli ve yeri doldurulamaz maddelerdir. *S. sclarea* yetiştiriciliği özellikle sclareol için yapılmaktadır. Sclareol, diterpenler grubuna dahil olan bir sekonder metabolit olup, ambroksit öncül maddesi olarak parfümeri sanayinde kullanılması bakımından önem taşımaktadır (Caniard vd., 2012). Ayrıca sclareolün çeşitli tümörlere karşı sitotoksik aktivite ve büyüme inhibisyonu sergilediği de bilinmektedir (Günnewich vd., 2013). Doğal yollarla bitkilerden bu değerli metabolitlerin eldesinde birçok zorlukla karşılaşılabilmektedir. Örneğin; etkili maddelerin bitkilerin belirli gelişim evrelerinde ve az miktarda üretilmeleri, istenilen miktarlarda etkili madde üretimi için geniş tarım alanlarına ihtiyaç duyulması bu zorluklardan bazıları olarak söylenebilir. Bu ve benzer sebeplerle sınırlanan üretim, artan talebi karşılayamamaktadır. Karşılaşılan sorunların önüne geçmek için bitki hücre ve doku kültürleri alternatif bir yol olarak görülmekte ve farklı *in vitro* uygulamalar, sekonder metabolitlerin biyosentez ve birikiminin arttırılması için kullanılmaktadır (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015). Yapılan sınırlı sayıdaki çalışmada doku kültüründe besin ortamlarına elisatör olarak dahil edilen nanopartiküllerin (NP) bitki büyüme, gelişme ve fizyolojisinde önemli farklar oluşturduğu, ayrıca sekonder içeriklerin biyosentez ve birikimini değiştirdiği gösterilmiştir (Marslin vd., 2017). Fakat bitki-NP etkileşimleri yeni bir alan olup bu konudaki araştırmalar sınırlı sayıdadır (Fazal vd., 2016). NP'lerin bitkiler üzerindeki etkisi büyük ölçüde bitki türü, bitkinin büyüme aşaması, nanoparçacıkların boyut, şekil ve konsantrasyonu ile uygulama şartları (sıcaklık, süre, ortam) gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Vanini vd., 2013). Örneğin yapılan bir çalışmada gümüş nanopartiküllerin

(AgNP) 15.4 mg/l'den sonraki konsantrasyonlarındaki artışa paralel olarak bitki gelişiminde zararlara neden olduğu bildirilmiştir. (Oliveira Timoteo vd., 2019) NP uygulamalarının bitkilerdeki sonuçlarının farklılıkları dikkate alındığında, tıbbi ve ekonomik değeri yüksek sekonder metabolitlerin üretimi için bitki-NP etkileşimleri ile ilgili yeni araştırmaların yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Bu tez çalışmasında yeşil sentez yöntemiyle üretilmiş AgNP'lerin *S. sclarea* bitkisinde sürgün rejenerasyonuna ve sekonder içeriklerine olan etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca ortaya çıkan etkilerin AgNP kaynaklı gümüş (Ag^{+}) iyonları ya da NP yapısından mı kaynaklandığını belirlemek amacıyla aynı konsantrasyonlarda gümüş nitrat ($AgNO_3$) ile de uygulama yapılmış ve sonuçlar kontrol ile karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla bitkiye ait nodal segmentler 3 farklı konsantrasyonda (0,25,50,100 mg/l) AgNP veya $AgNO_3$ ilave edilmiş, 1 mg/l meta-topolin (MT) ve 0.2 mg/l indol asetik asit (IAA) içeren Murashige and Skoog (MS) besin ortamlarında kültüre alınmıştır. Kültürden 8 hafta sonra nodal segmentlerden gelişen sürgünlerin sayısı, boyu, yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. *İn vitro* sürgünlere ait yaprakların sekonder içerikleri gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) yöntemi ile belirlenmiştir.

1.3 Hipotez

Nanobiyoteknolojideki gelişmeler NP'lerin tıp, eczacılık, gıda, kozmetik gibi birçok alanda kullanımının yolunu açmıştır. Bu alanlardan birisi de tarımsal uygulamalardır. NP'lerin tarımda pestisit, gübre, sensör, gen aktarım araçları ve elisatör olarak kullanımına yönelik çalışmalar literatürde yer almaktadır. AgNP'ler, antimikrobiyel özellikleri ile en çok tercih edilen NP'lerdir. Bitkilerde, AgNP'ler oksidatif strese neden olurlar ve bitki büyüme, gelişimi ve sekonder içerikleri etkilerler. Literatürde, *in vitro* kültürlerde besin ortamına ilave edilen AgNP'lerin doza bağlı olarak sürgün rejenerasyonunu azaltıcı veya arttırıcı etkileri olduğu ve sekonder içeriklerde değişimlere neden olduğu rapor edilmiştir. *İn vitro* kültürlerde AgNP uygulamalarının etkisi bitkinin türü, yaşı ve NP'lerin şekil, boyut, konsantrasyon, uygulama biçimi gibi parametrelere göre değişmektedir. Bu çalışmada *S. sclarea* bitkisinin *in vitro* kültürlerinde AgNP 'lerin sürgün rejenerasyonu ve sekonder metabolit içeriklerine etkisi ilk kez ortaya konulacaktır. Böylece AgNP'nin *in vitro* sürgün kültürlerinde elisatör olarak etkisi belirlenerek, *S.*

sclarea bitkisine ait değerli sekonder metabolitlerin üretimi için alternatif bir yöntem geliştirilecektir.

2
GENEL BİLGİLER

2.1 *Salvia sclarea*

Ülkemiz, çok sayıda tıbbi bitkinin doğal yetişme alanıdır, geniş kullanım alanı ve yüksek ekonomik değere sahip pek çok tıbbi bitki türünün yetişmesi için de uygun bir ekolojiye sahiptir (Tulukcu 2005a). *Salvia* cinsi, genellikle aromatik bitkileri içerisinde barındıran ve 45 farklı cinsi bulunan Lamiaceae/Labiatae (Ballıbabagiller) familyasının en büyük ve önemli cinslerinden birisidir (Şenkal, 2012; Yilmaz ve Gokduman 2015). Bu cinsin, tropik ve subtropik bölgelerde dağılım gösteren toplam 1000'e yakın türü olduğu bilinmekle birlikte ülkemizde yaklaşık 90 türü bulunmaktadır. Bu türlerden birisi olan *S. sclarea* ise, Kuzey Afrika ve Orta Asya'daki bazı bölgelerle birlikte genellikle Akdeniz havzasına özgü bir bitkidir (Russo vd., 2013).

Misk adaçayı olarak da bilinen *S.sclarea* yıl boyu hüküm süren kısa ömürlü veya iki yıllık bir otsudur. Genellikle geçirgen ve nemli ya da kuru toprağı ve güneşli bölgeleri tercih eder. Kumlu, killi, tınlı topraklarla uyumludur. Kıvrımlı yamaçlar, kayalık bölgeler, ormanlar, çayır ve tarlalarda görülmekle birlikte yol kenarlarında da doğal olarak bulunabilir. Bitkinin gövdesi diktir, yükselerek tepeye doğru dallanır. 50-100 cm boylarında açık dikdörtgen şeklindedir, gövdenin üzerinde çok sayıda tüy bulunmaktadır. Yapraklarının üstü buruşuk ve yine tüylerle kaplı olup çiçekleri 15-80 cm uzunlukta dairesel dizilişlidir, her bir daire ise 2 ila 6 arasında çiçek içermektedir. Bitkinin tohumları küçük, oval ya da yassı şekillidir, renkleri ise koyu kahve ya da siyahtır. Yüksek miktarda antioksidan ve antiradikal özelliğe sahip oldukları için uzun yıllar bozulmadan kalabilirler (Grigoriadou vd., 2020; Kutlu, 2015). Tohumlar bahar aylarında doğrudan dışarıya ekilebilmekte haziran ve temmuz aylarında ise çiçek açmaktadır.

İnsanlar yüzyıllardan beri hastalıklara karşı mücadelede bitkileri kullanmışlar ve büyük oranda başarılı sonuçlar almışlardır. Birçoğu tesadüfen, birçoğu da merak sonucu denenerek etkileri anlaşılan tıbbi bitkilerin tedavide kullanımı, kulaktan kulağa yayılarak günümüze kadar ulaşmıştır (Tulukcu 2005b). Geleneksel tıp ve eczacılıkta *S.sclarea* mide rahatsızlıklarında, kabızlığı gidermede, terlemeyi azaltmada, ülser yaraları ve göz

iltihaplarının iyileştirilmesinde, sinir sistemini rahatlatmada, baş ağrısı ve uykusuzluğu gidermede, akrep sokmalarında ve ödem attırıcı olarak kullanılmaktadır. Kuvvetli bir diş temizleyicisi olarak da bilinen *S. sclarea* sık içildiğinde tüm bedeni güçlendirip kalp krizi tehlikesini azaltmaktadır (Tulukcu, 2006).

S. sclarea çeşitli monoterpen, diterpen (sclareol, manool, salvipison) seskiterpen ve flavonoidler gibi biyoaktif bileşikler içerir (Ulubelen vd., 1994). Yapılan çalışmalar sonucu *S. sclarea*'nın iyi bir anti-bakteriyal (Cui vd., 2015; Kalemba vd., 2009), anti-fungal (Hristova vd., 2013), anti- inflamatuar (Moretti vd., 1997), anti-malarial (Özek vd., 2010) ve anti-viral (Dikova, 2009) etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca nöro-koruyucu etkisinin olduğu da düşünülmektedir (Asadi vd., 2010). Bunların yanı sıra bu bitkinin esansiyel yağ buharının (aromaterapi) kullanılması kan basıncının önemli derecede düşürülmesinde etkili olmuş ve diğer yağlarla kombinasyonunun menstrüel ağrıyı gidermede etkili olduğu teyit edilmiştir (Seol vd., 2013). Ayrıca bitki içeriğindeki biyoaktif bir bileşik olan sclareol'ün çeşitli tümörlere karşı büyüme inhibisyonu ve sitotoksik aktivite sergilediği de bilinmektedir (Günnewich vd., 2013).

Bitkiye ait esansiyel yağlar özellikle parfümeri olmak üzere kozmetik ve gıda sanayilerinde de kullanılmaktadır. *S.sclarea* üretimi özellikle içeriğinde bulunan değerli bir sekonder metabolit olan sclareol için yapılmaktadır. Sclareol metaboliti, ambroksit öncül maddesi olarak kullanılmasından dolayı parfümeri sanayii için önem arz etmektedir (Caniard vd., 2012). Cildi temizleme ve ciltteki gözenekleri küçültme özelliğinden dolayı kozmetik ürünlerde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, çeşitli gıda ürünlerinde koku ve tat verici olarak kullanılıyor olup, çok değerli bir baharat bitkisi olduğu bilinmektedir (Tulukcu, 2006). Yine yapılan çalışmalarda böcek uzaklaştırıcı özelliği olduğu da ortaya çıkarılmıştır (Conti vd., 2012). Bahsi geçen aromatik ve tıbbi özellikleri sebebiyle bu bitkinin yetiştiriciliği birçok ülkede yaygın olarak yapılmaktadır. *S. sclarea*'nın ticari üretiminin ana alanları Eski Sovyetler Birliği (Rusya, Ukrayna, Gürcistan, Özbekistan), ABD, Bulgaristan, Fransa, Çin, Macaristan ve Hindistan'dır (Kuzma vd., 2006; Tulukcu vd., 2009).

2.2 Sekonder Metabolitler

Bitkiler, primer metabolitlerin temel kaynağını oluşturmaktadır. Bunların yanı sıra önemli fonksiyonları olan ve primer metabolitlerin son ürünleri olarak bilinen sekonder

metabolit adında karmaşık kimyasal bileşenler de sentezlerler. Sekonder metabolitler; ilaç, kimya, gıda, tekstil, kozmetik ve tarım gibi birçok sektörde ekonomik açıdan önemli ve yeri doldurulamaz maddelerlerdir (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015)

Sekonder metabolit kavramı ilk defa Kossel (1891) tarafından tanımlanmış, daha sonra Theis ve Lerdau (2003) sekonder metabolitleri 'bitkiler tarafından üretilen, fotosentez ürünü olmayıp, birtakım fizyolojik mekanizmaların fonksiyonlarıyla oluşan ve fotosentez ya da solunum gibi hayati fizyolojik olaylar için mutlak gerekli olmayan maddeler' şeklinde tarif etmiştir (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015). Bu karmaşık kimyasalların primer metabolitler gibi bitkilerin temel faaliyetlerinde (büyüme, gelişme, üreme, fotosentez, ürün dönüşümü gibi) doğrudan etkileri bulunmamakla birlikte en az primer metabolitler kadar önem taşıyan biyoaktif bileşiklerdir. Bu bileşikler bitkide doku, organ ve gelişme kısımlarında spesifik biyosentetik enzimler tarafından spesifik yollarla sentezlenirler, fakat organizmada sürekli olarak üretimleri yoktur, hatta bazı metabolitler sadece belirli türlerde üretilmektedir (Alaca ve Arslan, 2012).

Önceleri, bu kimyasal maddelerin metabolizmanın işlevsiz son ürünleri yani metabolik atıklar olduğu düşünülüyordu. Fakat sonradan canlı organizmada savunma, ortama uyum, abiyotik stres faktörlerine karşı koruma, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirme gibi oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleri olduğu anlaşıldı. Ayrıca günümüzde insan sağlığına olumlu etkilerinden dolayı ilaç ham maddeleri olarak kullanılmalarının dışında çeşitli bilimsel, teknolojik ve ticari uygulamalar için de ham madde kaynağı oluştururlar. Bu sebeple 19 ve 20. yy araştırmacıları bu bileşiklere yönelmişler ve böylelikle sekonder metabolitlerin araştırılması ve büyük miktarlarda üretimleri için yapılan çalışmaların önü açılmıştır (Cragg ve Newman, 2013).

2.2.1 Sekonder Metabolitlerin Sınıflandırılması ve Kullanım Alanları

Sekonder metabolitler genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılırlar ve tablo 2.1 de belirtildiği üzere terpenler, fenoller ve azot ve/veya kükürt içeren bileşikler olmak üzere 3 ana gruba ayrılırlar (Bourgaud vd., 2001).

Tablo 2.1 Sekonder metabolit grupları ve bazı örnekler (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015'den modifiye edilmiştir.)

TERPENOİDLER	**Sekonder Metabolit**	**Kaynak Bitki**	**Kullanım Alanı**
Monoterpenler	Limonen Linalool	*Citrus* türleri Lavanta	Gıda ve kozmetik
Seskiterpenler	Artemisin	*Artemisia annua*	Sağlık
Diterpenler	Taksol **Sclareol**	Çin porsuğu ***S.sclarea***	Sağlık **Sağlık, gıda, kozmetik**
Triterpenler	Ginsenosit Dammarenediol	Asya ginsengi Tütün	Sağlık, gıda
Tetraterpenler	Karoten Likopen	Havuç Tatlı patates	Gıda, kozmetik, sağlık
Politerpenler	Kauçuk	Kara hindiba	Otomotiv, tekstil
Steroller	Spinasterol	Ispanak	Sağlık
FENOLİK BİLEŞİKLER			
Fenolik asitler	Salisilik asit Kafeik asit	Söğüt Kahve, tarçın	Kozmetik, sağlık
Kumarinler	Kumarin	Kumaru	Gıda, kozmetik, sağlık
Taninler	Tannik asit	Mazı meşesi	Gıda, sağlık
Flavanoidler	Kersetin	Soğan	Sağlık, gıda
Lignin	Alkali lignin	Akasya	Sağlık
Lignanlar	Sesamin	Susam	Gıda, sağlık
AZOT İÇEREN BİLEŞİKLER			
Alkaloidler	Nikotin Kokain	Tütün Koka bitkisi	Sağlık
Glikozinatlar	Sinigrin	Karnabahar, lahana, brokoli	Gıda, sağlık

Doğal koşullarla bitkilerden sekonder metabolit eldesinde birçok zorlukla karşılaşılabilmektedir. Sekonder metabolit içeriklerinin miktar ve kalitesinin iklimsel koşullardan etkilenmesi, etkili maddelerin bitkilerin belirli gelişim evrelerinde ve az miktarda üretilmeleri, doğal floradaki bitkilerin toplanmasındaki zorluklar, bitkilerin sürekli doğal ortamdan toplanması sonucunda nesillerinin zamanla yok olma ihtimali, istenilen miktarlarda etkili madde üretimi için geniş tarım alanlarına ihtiyaç duyulması bu zorluklardan başlıcaları olarak söylenebilir. Bu gibi benzer nedenlerle sınırlanan üretim, talep artışını karşılayamamaktadır. Bu sorunların önüne geçmek için

biyoteknolojik yöntemler, özellikle bitki hücre ve doku kültürleri alternatif bir yol olarak görülmektedir. Farklı *in vitro* uygulamalar, sekonder içeriklerin biyosentez ve birikiminin arttırılması için kullanılmaktadır (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015).

2.3 Doku Kültürü

Bitki doku kültürleri, aseptik şartlarda, optimize edilmiş yapay bir besin ortamında, tam bitkiden veya bitki kısımlarından (hücre, doku, organ) elde edilen kültürlerdir. Bitkilerin bitkiye ait herhangi bir parçadan eşeysiz çoğalabilme özelliklerine "totipotensi" denir. Totipotensi, gelişimleri sırasında bitkileri hayvanlardan ayıran en önemli özelliktir. Bu özellik sayesinde tek hücreden organizma üretilebilir. Bu nedenle bitki doku kültürleri hayvansal dokulardan daha çok ve daha hızlı üretilebilirler (Güven ve Gürsul, 2014).

2.3.1 Bitki Hücre ve Doku Kültürleri İle Sekonder Metabolit Üretimi

Sekonder metabolitlerin bitki hücre ve doku kültürleri ile üretimi geleneksel yöntemlere kıyasla belirgin avantajlara sahiptir. Bu avantajlar; ilgili metabolitin çevresel faktörlerden bağımsız olarak üretilebilmesi, hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyalin elde edilebilmesi, kökeni ne olursa olsun herhangi bir bitkinin *in vitro* kültüre alınabilmesi, kültür şartlarının sekonder metabolit üretimini arttıracak şekilde optimize edilebilmesi şeklinde sıralanabilir (Sathuluri ve Gokare, 2002). Ayrıca bitki hücre ve doku kültürlerinden, sekonder metabolit üretiminin dışında, bu ürünlerin biyosentez mekanizmalarının anlaşılmasında da model olarak yararlanılmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001).

Bitki hücre ve doku kültürleri tekniğiyle sekonder metabolit üretiminde 3 ana sistem bulunmaktadır.

2.3.1.1 Farklılaşmış ve Organize Olmamış Kültürler İle Metabolit Üretimi

- **Kallus Kültürleri**

Kallus kültürleri, ana bitkiden kesilerek çıkarılan doku ve organların laboratuvar koşullarında kültüre alınmasıyla oluşan morfolojik düzensizlik gösteren hücre yığınlarıdır. Kallus kültürünün başlatıldığı doku parçasının orijini sekonder metabolitlerin üretiminde önemlidir (Sökmen ve Gürel, 2001). *Crataegus sinaica* bitkisiyle yapılan bir çalışmada hem kök hem de yapraklardan kallus uyarımı yapılarak antosiyanin içeriğine bakılmış, yapraktan uyarılan kalluslara oranla köklerden uyarılan kalluslarda daha iyi

sonuçlar alındığı bildirilmiştir (Maharik vd., 2009).

- **Hücre Süspansiyon Kültürleri**

Hücre süspansiyon kültürleri, tek hücrelerinin sıvı bir büyüme ortamında gelişim gösterdiği bitki hücre kültürü tekniğidir. Bu kültürler direkt ana bitkiden alınan doku parçası veya kalluslar ile başlatılabilir. Bitkide sekonder metabolitin yüksek oranda bulunduğu doku parçası ile başlatılan kültürlerde başarı oranı daha fazla olacaktır (Sökmen ve Gürel, 2001).

2.3.1.2 Farklılaşmış ve Organize Olmuş Kültürler İle Metabolit Üretimi

- **Kök Kültürleri**

Bitki tarafından üretilen ilgili metabolitin sentez yerinin kökler olduğu durumlarda, bu kısımdan alınan parçaların kültüre alınmasıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca bitkinin farklı dokularının (nod, gövde, yaprak) kök gelişimi için uyarılmasıyla elde edilen adventif kök kültürleri de sekonder metabolit üretiminde kullanılmaktadır. Kök kültürleri diğer kültür çeşitlerine kıyasla daha hızlı, kararlı ve üretim kapasitesi yüksektir (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015).

- **Sürgün Kültürleri**

Sürgün kültürleri nod (boğum) içeren sap parçaları, koltuk altı veya meristem dokusundan alınan parçaların uygun besin ortamında kültüre alınmasıyla gerçekleşmektedir. Sürgün kültürleri de kök kültürlerinde olduğu gibi genetik kararlılık, sekonder metabolit üretiminde yüksek kapasite gibi benzer özellikleri gösterirler. Hatta sürgün kültürlerinde, metabolit birikiminin ana bitkiden daha yüksek oranda olduğu tespit edilen çalışmalar da mevcuttur (Bourgaud.,vd 2001; Patil vd., 2013).

- **Embriyo Kültürleri**

Bitkilerin tohumlarından ya da tohum taslaklarından embriyoların aseptik koşullarda izole edilerek yapay besin ortamlarında kültüre alındığı *in vitro* tekniktir.

2.3.1.3 Mikroçoğaltım

Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip kısımlardan (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) *in vitro* koşullar altında yeni bitkiler elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Gürel

ve Mansuroğlu, 2001).

Mikroçoğaltım, özellikle ekonomik değeri yüksek ancak bitki bünyesinde çok düşük oranlarda bulunan sekonder metabolitlerin kısa sürede ve her dönem üretilmesine olanak sağlar. Örneğin *Catharantus roseus* bitkisinin 2 ton yaprağından sadece 1 gram alkaloid elde edilebilmektedir ve bu miktar ise lösemi hastalarının sadece 6 hafta boyunca tedavilerini karşılayabilmektedir. Chang ve ark. (2001) bu tür üzerinde yaptığı mikroçoğaltım çalışmaları başarılı sonuçlar vermiştir.

Salvia cinslerinde sekonder metabolitlerin bitki hücre ve doku kültürüyle elde edilmesi konusunda yapılan çeşitli çalışmalar mevcuttur. *S. officinalis* L.'in sürgün (Santos-Gomes vd., 2002), *S. miltiorrhiza*'nın kök (Wu vd., 2007), *S. sclarea*'nın sürgün (Kalemba vd., 2009) ve kök (Kuzma vd.,2006), *S. fruticosa*'nın kallus, hücre ve kök (Karam vd., 2003) kültürlerinde ve *S. officinalis, S. virgata ve S. fruticosa* hücre kültürlerinde (Haas vd., 2014) gerçekleştirilen sekonder metabolit çalışmaları bunlara örnek teşkil etmektedir.

2.3.2 Elisatör Uygulamaları ve Sekonder Metabolit Üretiminin Arttırılması

Bitki biyoteknolojisi yöntem ve uygulamaları sadece sekonder metabolitleri üretmekle kalmayıp aynı zamanda miktarlarını arttırmak için de yeni fırsatlar sunar. Biyoteknolojik yöntemlerle sekonder metabolitlerin istenilen miktar ve kalitede üretimi mümkün olup bu durum kültür şartlarının optimize edilmesine bağlıdır. *İn vitro* kültürlerde besin ortamına ilave edilen kimyasallar ve stress uygulamaları sekonder metabolit içeriklerinde değişimlere neden olabilmektedir (Ghorbanpour, 2015). Doku kültürü çalışmalarında metil jasmonat kullanılmasının *S. sclarea* (Kuzma vd., 2009; Vaccaro vd., 2017), *S. miltiorrhiza* (Xiao vd., 2009), *S. virgata* (Dowom vd., 2017) cinslerinde, coronatine kullanılmasının *S. sclarea*'da (Vaccaro vd., 2017), triacontanol kullanılmasının *S. officinalis* L.'de (Grzegorczyk ve Wysokinska, 2007), *Bacillus cereus* bakterisi ile inokülasyonunun *S. miltiorrhiza bunge* cinsinde (Wu vd., 2007) sekonder metabolit içeriklerini arttırdığı gözlemlenmiştir.

Bunlara ek olarak son zamanlardaki çalışmalar besin ortamına eklenen NP'lerin bitki büyüme, gelişme ve fizyolojisini önemli ölçüde etkilediğini göstermiştir. Örneğin; Ag^{+} iyonlarının *S. miltiorrhiza*'nın saçak kök kültürlerinde tanshinone, tanshinone ı, tanshinone ııa ve kriptotanshinone nin verimlerinde 2 kattan fazla artışa neden olduğu (Zhang vd., 2004), *S. virgata*'nın *in vitro* çoğaltılmış sürgünlerinde ise rosmarinik asit

gibi değerli fenolik bileşiklerinin miktarını arttırdığı bildirilmiştir (Dowom vd., 2017).

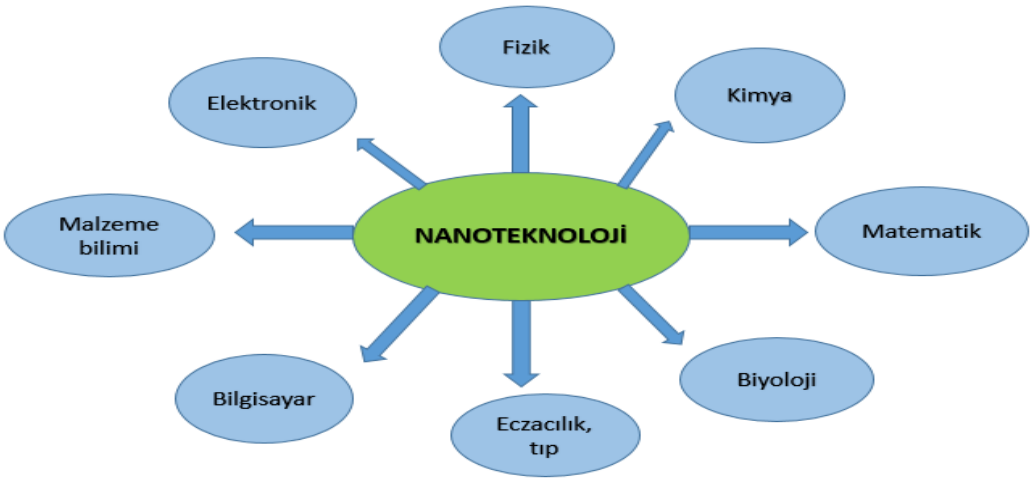
2.4 Nanoteknoloji

2.4.1 Nanoteknolojinin Tanımı, Tarihçesi ve Kullanım Alanları

Nano, Yunanca "cüce" demektir. Nano ile tanımlanan ifadeler, fiziksel bir büyüklüğün milyarda birini gösterir (Özdoğan vd., 2006). Nano ile teknoloji kelimelerinin birleşimiyle oluşan nanoteknoloji kavramı ise temel olarak "çok küçük maddelerin teknolojisi" olarak bilinmektedir ve bu terim ilk kez 1974 yılında Norio Taniguchi tarafından tanımlanmıştır. Nanoteknoloji, 100 nm den daha küçük yapıların karakterizasyonu, yapımı ve işlenmesi üzerine yoğunlaşmış bir teknolojidir.

Maddeye atom ve molekül seviyesinde yeni özellikler kazandırmayı hedefleyen bu teknoloji sayesinde maddeler üzerinde büyük değişimler sağlanabilmektedir. Örneğin normalde sarı renkte olan altın, nano boyutlara indirildiğinde mavi renkte görülebilmekte, normal boyutta asal iken nano boyutta katalitik özellikler göstermekte, normal şartlarda erime sıcaklığı 1064°C iken 2.5 nm boyutunda 600°C civarında erimektedir (Beykaya ve Çağlar, 2016).

Richard Feynman'ın 1959 yılında Kaliforniya Teknoloji Enstitüsünde gerçekleştirdiği "There is plenty of room at the bottom" (Aşağıda daha çok yer var) adlı konuşmasında nanoteknolojiye değinmiş ve doğal yaşamdan örnekler vererek çok küçük bir hacme ne kadar çok fonksiyon ve bilginin sığdırılabileceğini göstermiştir. Nanoteknoloji, maddenin temel bilgisindeki eksikliklerin tamamlaması, yeni uygulamalar vaat etmesi ve yüksek kar marjı gibi nedenlerle biyoteknoloji, farmakoloji, gıda, fizik, elektronik, enerji üretimi, tekstil, gibi birçok bilim dalında en popüler çalışma konularından bir tanesi olmaya aday haline gelmiştir (Rai vd., 2009; Roco, 2007). 1985 yılında nanometre düzeyinde atom ve moleküllerin incelemesinde kullanılan "Taramalı Tünelleme Mikroskobu" ve Atomik Kuvvet Mikroskobunun geliştirilmesiyle de nanoteknolojik çalışmalar hızla gelişmeye başlamıştır (Drexler, 1986).



Şekil 2.1 Nanoteknolojinin kullanım alanları (Özdoğan vd., 2006'dan modifiye edilmiştir.)

Nanoteknoloji, şekil 2.1'de görüldüğü üzere birçok sektör açısından önemlidir. Günümüzde kullanılan nanoteknoloji ürünlerine birkaç örnek verecek olursak; çizilmeyen araba boyaları, kir tutmayan kaplamalar, kendi kendini temizleyen camlar, antibakteriyel ve koku tutmayan tekstil ürünleri, şeffaf koruyucu güneş kremleri bu ürünlerden sadece bir kaçıdır. (Miller ve Senjen, 2008). Tüm bu gelişmelerden anlaşılacağı üzere bundan sonra nanoteknolojik ürünler yaşamımızda daha fazla yer alacaktır.

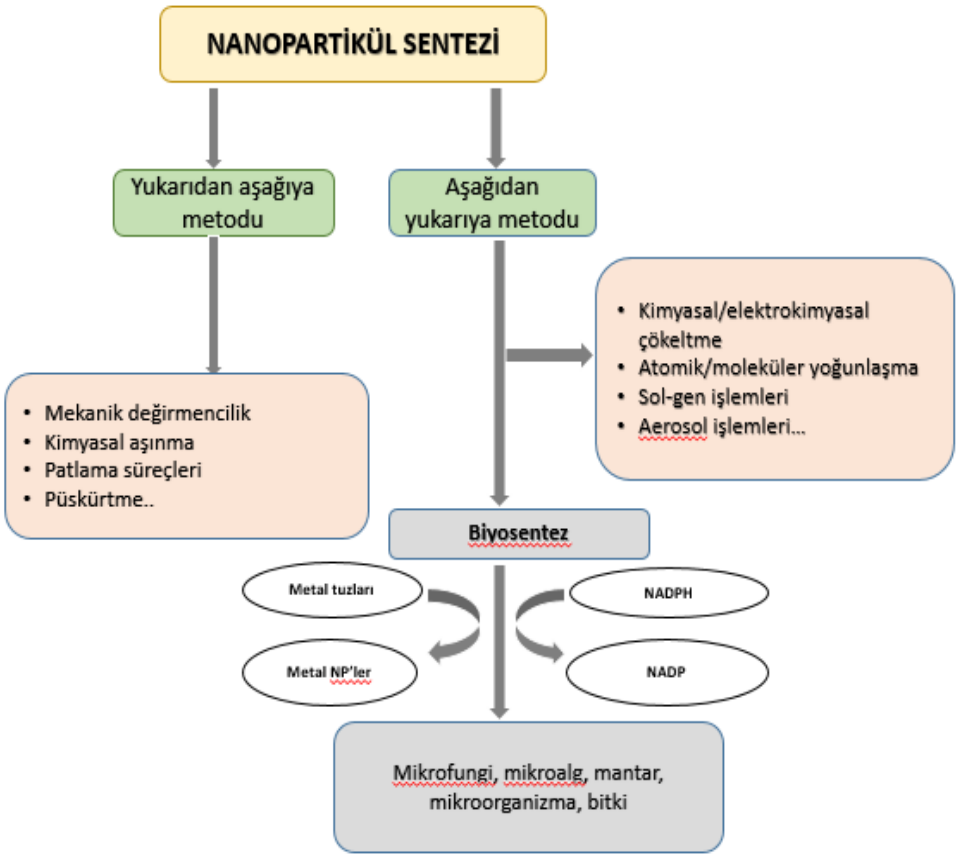
2.4.2 Nanopartiküller ve Sentez Yöntemleri

Boyutları 100 nanometrenin altında kalan NP'ler nanoteknolojinin temelini oluşturmakta olup biyoloji, fizik ve kimyanın mühendislik ile bütünleştirildiği son yılların en ilgi çeken alanlarından birisidir. NP'ler; metal, yarı iletken, seramik, organik moleküler topluluk, polimerik ya da kompozit malzemeler olabilirler. NP'ler, mikropartiküler sistemlere kıyasla hücre içine daha fazla alınmaktadırlar. Bir çalışmada 100 nm boyutundaki NP'lerin Caco-2 hücrelerinden; 1 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla iki buçuk kat daha fazla, 10 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla ise altı kat daha fazla hücre içerisine alındığını göstermişlerdir (Desai vd., 1997). Nanoteknoloji ile yapılmak istenen materyalin küçültülerek özelliklerini değiştirmektir. Herhangi bir materyalin boyutları küçüldükçe özellikleri de gerçek hallerinden daha farklı olarak değişmektedir.

Dolayısıyla NP'leri büyük materyallerden ayıran sadece boyutları değildir. Bu yapılar kimyasal reaktiviteleri, enerji emilimleri ve biyolojik mobiliteleri açısından da büyük materyallerden farklı bir yapı ortaya koyarlar (Binti Ida Umaya, 2017; Ko vd., 2014).

Eski Hinduların romatoid artrit tedavisinde kullandıkları ilacın içeriğinde altın nanoparçacıkların varlığı rapor edilmiş olup, NP sentez ve kullanımının 17. yy'den öncelere dayandığı düşünülmektedir. Hinduların AuNP'leri yukarıdan aşağıya adı verilen biyolojik yöntemle ürettiği, Micheal Faraday'ın ise 1857 yılında ilk kez kimyasal yöntem olan aşağıdan yukarıya yöntemini deneyen kişi olduğu bilinmektedir (Beykaya ve Çağlar, 2016).

Dolayısıyla şekil 2.2'de gösterildiği üzere NP üretiminde kullanılan iki ana yaklaşım bulunmaktadır. Bunlar aşağıdan yukarı "bottom up" ve yukarıdan aşağı "top down" olarak adlandırılır. Bunların haricinde kullanılan üretim teknikleri bu iki yaklaşımın alt sınıflara ayrılmasıyla çeşitlenmektedir (Ravichandran, 2010).



Şekil 2.2 NP sentez yöntemleri (Mittal vd., 2013'den modifiye edilmiştir.)

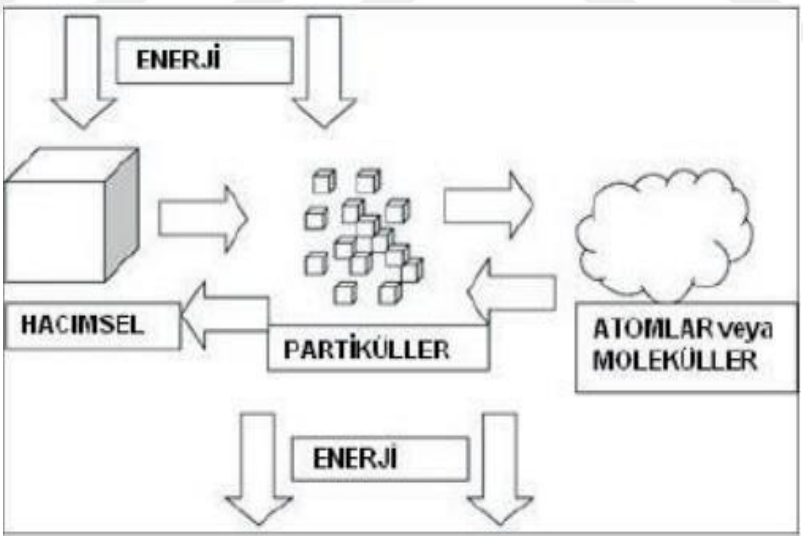
2.4.2.1 Fiziksel ve Kimyasal Sentez

- **Yukarıdan aşağıya (top down) yaklaşımı:**

Yukarıdan aşağıya yaklaşımda, nanoüretim büyük yapı ile başlar ve farklı indirgenme prosesleri ile devam eder. Bu yöntemde, kullanılan yöntem esas olarak maddeye dışarıdan mekanik ve/veya kimyasal işlemlerle yüksek enerji verilmesine dayanmaktadır. Bu işlem sonrasında malzemenin nano boyutlara inebilecek kadar küçük parçacıklara ayrılması hedeflenmektedir (Şekil 2.3). Bu yaklaşıma verilebilecek en genel örnekler mekanik öğütme ve aşındırmadır (Beykaya ve Çağlar, 2016).

- **Aşağıdan yukarıya (bottom-up) yaklaşımı:**

Aşağıdan yukarıya yaklaşımda ise proses tek atomlar ile başlar ve devamında nanoyapılar oluşturulur. Nanoyapılı yapıtaşları oluşturulduktan sonra atomik veya moleküler boyuttaki yapılar kimyasal reaksiyonlar ile büyütülerek son partikül oluşumunun gerçekleştirilmesi hedeflenir (Şekil 2.3) (Ko vd., 2014; Thakkar vd., 2010). Nano yapıların üretiminde kullanılan ilk yöntemlerden biri olan gaz yoğunlaştırma yöntemi bottom-up yaklaşımıyla çalışmaktadır.



Şekil 2.3 Aşağıdan yukarıya ve yukarıdan aşağıya yaklaşımı (Sebahattin ve Burçak, 2008.)

2.4.2.2 Biyolojik Sentez ve Yeşil Nanoteknoloji

NP üretiminde yıllarca kullanılan fiziksel- kimyasal yaklaşımlar ile kısa sürede yüksek çözünürlüklü ve istenilen küçüklükte partiküller üretilebilmesine karşın bu sistemlerin

toksik içeriklerinin yüksek, partikül verimliliklerinin düşük ve kullanılan tekniklerin pahalı olması gibi olumsuzluklar bilim insanlarını yeni yöntemler aramaya itmiştir (Narayanan ve Sakthivel, 2010). Bu konuyla ilgili araştırmaların başlamasıyla doğada zaten kendiliğinden varolan nanoboyutlardaki madde ve canlılar incelenmiş ve araştırmalar sonucunda canlı hücrelerden nanotanecik üretimi esasına dayanan Yeşil Nanoteknoloji terimi ortaya çıkmıştır.

Biyosentez, biyolojide çok aşamalı, enzim katalizli bir işlem olup canlı organizmalarda basit bileşiklerin modifiye edilerek büyük moleküllerin oluşturulmasıdır. Bu terimin nanoteknolojideki tanımı ise, virüs, mikrop, alg, maya, mantar, bitki gibi canlı organizmaları kullanarak NP sentezlemektir.

Yeşil sentez de olarak bilinen bu yöntem, fiziksel ve kimyasal senteze alternatif olarak metal NP eldesinde kullanılan yaklaşımdır (Ahmad ve Sharma, 2012). Yeşil sentez yöntemiyle metal nanotanecik üretiminde indirgen olarak bakteri, alg, yosun, mantar ya da bitki özütleri gibi maddeler kullanılabilmektedir.

Metal nanotaneciklerin yeşil sentez ile üretiminin basit ve ekonomik oluşu, toksik madde kullanımı gerektirmemesi, farmakolojik ve biyomedikal uygulamalara uygun, geniş yelpazede ticari üretime elverişli olması gibi avantajlarından dolayı günümüzde sıkça kullanılan bir yöntem haline gelmiştir.

Bir tepkimenin yeşil olabilmesi için;

1. Yenilenebilir hammaddelerden elde edilmiş olması
2. Çevresel olması
3. Güvenli olması
4. Tek bir tepkime basamağından oluşması
5. Atık üretimi gerçekleştirmemesi
6. Ürün ayrıştırılmasının basit olması
7. % 100 verim vermesi gibi koşulları sağlaması gerekmektedir (Dubey vd., 2010; Philip,2010).

NP üretiminde diğer biyolojik kaynaklara oranla bitkisel özütler daha fazla tercih edilir. Bitkiler; ucuz, kolay ulaşılabilir ve yenilenebilir kaynaklar olduğundan kitlesel sentez ve dolayısıyla büyük oranda ticari ürün üretimine olanak sağlarlar. Bitkilerin indirgeyici özellikleri içerdikleri terpenoidler, flavonlar, ketonlar, aldehidler, amidler ve karboksilik

asit gibi fitokimyasallardan kaynaklanmaktadır. İndirgeme özelliklerinin yanısıra bu fitokimyasallar partikül yüzeyi ile etkileşime girerek NP'lerin stabilize olmasına yardımcı olurlar. Bu sayede bitkisel NP üretiminde dışarıdan herhangi bir stabilizasyon ajanı eklenmesine gerek kalmaz. Aynı zamanda bitkisel nanoüretim, tek basamakta gerçekleşir, çok hızlı ve ekonomiktir, toksik etkisi bulunmaz. Bu şekilde üretilen nanomateryallerin biyomedikal alanlarda kullanım potansiyeli yüksektir, medikal ve tıbbi uygulamalarla da uyumludur (Keshari vd., 2021).

2.4.3 Gümüş Nanopartiküller

Metalik NP'ler, nanoteknolojide çok önemli bir yere sahiptir. Bu grupta yer alan AgNP'ler, gıda raf ömrü uzatma, gıda paketleme, tıbbi, biyomedikal ve kozmetik endüstrilerinde kullanılmaktadır (Bilgili, 2014).

Ag^{+} metali aslında çok eski çağlardan beri insanlığın kullanımındadır. Antibakteriyel özelliği sayesinde antik çağlarda süt içerisine atılan gümüş paralarla sütün raf ömrü uzatılmış; gıdalar, gümüş kaplarda saklanarak muhafaza edilmiştir. Ayrıca yanık ve ülser tedavisinde de gümüş kullanılmıştır. Antibakteriyel özelliğinin yanında antifungal ve antiviral özellikler taşıması onu geniş spektrumlu bir antimikrobiyal madde haline getirmiştir (Duncan, 2011).

Malzemenin boyutlarının nanometreye indirgenmesiyle benzersiz elektrik, optik ve mekanik özelliklere sahip yeni malzemeler oluşur. Mesela AgNP'lerin bu kadar küçük boyutlara indirgenmesi onun, bakteri, virüs ve mantarlar üzerindeki yok etme ve uzun süre koruma aktivasyonunu inanılmaz derecede arttırmaktadır.

2.4.4 Nanopartikülerin Sekonder Metabolit İçeriklerine Etkisi

Son zamanlardaki çalışmalar bitki büyümesi, gelişimi ve fizyolojisinin NP'lerden önemli ölçüde etkilendiğini göstermiştir (Marslin vd., 2017). Ancak çevresel veya laboratuvar koşullarında biyolojik olarak aktif bileşiklerin içeriklerinin arttırılmasına NP'lerin etkisi yeni bir alan olup bu konudaki araştırmalar sınırlı sayıdadır (Fazal vd., 2016). Az sayıdaki çalışmalarda bakır oksit (CuO) NP'leri (Javed vd., 2017) ve AgNP'lerin (Golkar vd.,2019) *Stevia rebaudiana*'nın *in vitro* kültürlerinde stevioside içeriğini arttırdığı, *P.vulgaris*'in kallus kültürlerinde Au ve AgNP'lerin naftalin asetik asit (NAA) ile birlikte muamelesinin fenolik birikimi ve flavonoid içeriğini maksimum seviyede indüklediği (Fazal vd., 2016), *Artemisia annua* saç kök kültürlerinde de, 20 gün süreyle 900 mg /l

AgNP muamelesinden sonra artemisin içeriğinin 3.9 kat arttığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2013). *A. thaliana*'da ise AgNP'lere cevap olarak, antosiyanin ve flavonoid biyosentetik genlerinin ekspresyon artmıştır (Garcia-Sanchez vd., 2015).

Literatürdeki sınırlı sayıdaki bu çalışmalar NP'lerin sekonder metabolitlerin üretimini arttırmak için moleküler elisatörler olarak kullanılabileceği yönünde umut verici sonuçlar ortaya koymuşlardır. *S. officinalis* bitkilerinde nano-titanyum dioksidin doğal antioksidanların biyosentezi ve sekonder metabolizmayı geliştirmek için elisatör olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Ghorbanpour, 2015). Bununla birlikte, NP'lerin bitkiler üzerindeki etkisi büyük ölçüde bitki türü, bitkinin büyüme aşaması, NP'lerin boyut, şekil ve konsantrasyonu ile uygulama şartları (sıcaklık, süre, ortam) gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (Vanini vd., 2013). Ayrıca, *Campomanesia rufa* bitkisinde AgNP uygulamalarının düşük konsantrasyonlarda (0.385, 0.77 ve1.54 mg/l) herhangi bir etki göstermemesine rağmen 15.4 mg/l 'den sonraki konsantrasyonlarda artışa paralel bitki gelişiminde zararlara neden olduğu bildirilmiştir (Oliveira Timoteo vd., 2019). NP uygulamalarının bitkilerdeki sonuçlarının farklılıkları dikkate alındığında, tıbbi ve ekonomik değeri yüksek sekonder metabolitlerin üretimi için bitki-NP-etkileşimleri ile ilgili yeni araştırmaların yapılması gereklidir.

3
MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 *Salvia sclarea* Tohumları

S. sclarea tohumları Zeytinburnu Tıbbi Bitkiler Bahçesinden sağlanmıştır.

3.1.2 Kimyasallar

Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar tablo 3.1 de belirtilmiştir.

Tablo 3.1 Çalışmada kullanılan kimyasallar

▪ MS
▪ Sükroz
▪ Agar
▪ $AgNO_3$
▪ NaOH
▪ EtOH
▪ MT
▪ IAA
▪ HCl
▪ Hekzan çözücüsü

3.1.3 Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar tablo 3.2 de listelenmiştir.

Tablo 3.2 Çalışmada kullanılan cihazlar

▪ Ph metre
▪ Biyogüvenlik kabini
▪ Hassas Terazi
▪ Santrifüj
▪ Manyetik karıştırıcı
▪ Sonikatör
▪ Ultrasonik su banyosu
▪ İklimlendirme dolabı
▪ Shaker
▪ Evaporatör
▪ Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi cihazı
▪ Uv-Vis spektrometresi
▪ Otoklav

3.2 Yöntem

3.2.1 Gümüş Nanopartikül Sentezi ve Karakterizasyonu

AgNP sentezi Erişen ve Yüca (2019) tarafından yapılan yeşil sentez yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentez için yapılan çalışmalar aşağıda belirtilmiştir.

3.2.1.1 1M 100 ml $AgNO_3$ Çözeltisinin Stok Olarak Hazırlanması

100 ml 1 molarlık $AgNO_3$ çözeltisi hazırlamak için 16.99 gr $AgNO_3$ (169.9gr/l) hassas terazide tartıldı ve 100 ml dH_2O'da çözüldü. Hazırlanan çözelti, oto-oksidasyonu engellemek amacıyla koyu renkli cam şişede saklandı. Sentezde kullanılan 10 mM $AgNO_3$ çözeltisi stok çözeltiden 1/100 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

3.2.1.2 *S. sclarea* Yapraklarından Özüt Hazırlanması

Yeşil sentez yöntemiyle AgNP sentezinde *S. sclarea* yapraklarına ait özüt kullanılmıştır. Yapraklar YTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Doku Kültürü Laboratuvarındaki bitki büyütme odasında bulunan *S. sclarea* bitkilerinden sağlanmıştır.



Şekil 3.1 AgNP sentezinde kullanılan *S. sclarea* bitkisi

Bitkinin yaprakları toplanmış ve tartılmıştır. Yapraklar çeşme suyuyla yıkandıktan sonra fazla suyun uzaklaştırılması amacıyla bir süre kurutma kağıdı üzerinde bekletilmiştir. Suyu uzaklaştırılan ve erlen içerisine küçük parçalara ayrılan yapraklara 1 gr:10 ml (bitki:distile su) oranında distile su eklenerek manyetik karıştırıcıda yaklaşık 30-40 dakika boyunca kaynatılmıştır. Bu şekilde hazırlanan karışım Whattmann no:1 filtre kağıdından süzülerek falkon tüplere aktarılmış ve 6000 rcf ‘de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Böylece diğer partiküller uzaklaştırılmıştır. Santrifüj sonrası süpernatant kısım toplanarak fiziksel bir sterilizasyon yöntemi olan filtre sterilizasyonu yöntemiyle steril hale getirilmiştir. Bu işlem esnasında kabin içerisinde çalışılmış ve tek kullanımlık selüloz nitrat membran filtresi kullanılmıştır.

3.2.1.3 Gümüş Nanopartikül Sentezi

AgNP sentezi için yaprak özütü ve 10 mM'lık $AgNO_3$ çözeltisi, 1 ml:9 ml oranında ($AgNO_3$ çözeltisi: bitki özütü) karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlık ortamda bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası karışım steril santrifüj tüplerine paylaştırılarak 10.000 rcf'de 1 saat boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası ise süpernatant kısım uzaklaştırılmış ve tüplerin dibinde kalan NP kısımları karanlık ortamda kurumaya bırakılmıştır.

3.2.1.4 Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

AgNP sentezinin başlaması çözeltinin açık sarı renkten kahverengiye olan renk değişimiyle gözlemlenmiştir. AgNP'lerin sentezinin doğrulanması ise UV-Vis spektrometresi kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenen AgNP'lerin morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. SEM analizi Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı 'ndan hizmet alımı yoluyla yapılmıştır.

3.2.2 Doku Kültürü Çalışmaları

3.2.2.1 Çalışma Ortamı, Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

Çalışmalar biyogüvenlik kabininde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalardan 10 dakika önce kabin havalandırılması açılmış ve %70'lik alkol ile temizlenmiştir.

Çalışmalar esnasında kullanılacak alet ve ekipmanlar (pens, magenta, cam tüpler) 121 ^{0}C'de 20 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Uygulamalar sırasında kullanılan pens ve bistüriler aralıklı olarak alkol ve alevden geçirilerek steril kalmaları sağlanmıştır.

3.2.2.2 Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Olarak Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmada kullanılan MT ve IAA bitki büyüme düzenleyicilerinden stok solüsyonlar (1mg/ml) hazırlanmıştır. Stok çözelti için bitki büyüme düzenleyicilerinden 10 mg tartıldı ve çözünmeleri için MT üzerine 1-2 damla sodyum hidroksit (NaOH), IAA üzerine ise yine 1-2 damla etanol (EtOH) damlatılmıştır. Çözünme gerçekleşince üzerleri 10 ml ye distile su ile tamamlanmıştır. Biyogüvenlik kabininde tek kullanımlık selülaz filtre kullanılarak sterilizasyonları gerçekleştirilmiş ve daha sonra kullanılmak üzere +4 derecede saklanmıştır.

3.2.2.3 Besin Ortamlarının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Çalışmalarda temel besin ortamı olarak % 3 sükroz içeren ve % 0.7 agar ile katılaştırılarak hazırlanan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı kullanılmıştır. AgNP ve $AgNO_3$ içeren besin ortamlarında gözlenen katılaşma sorunu sebebiyle % 0.7 olan agar miktarı % 0.9'a çıkarılmıştır. Sürgün rejenerasyonu için eksplantlar 1 mg/l MT ve 0.2 mg/l IAA içeren MS ortamında kültüre alınmış olup, AgNP ilavesinin bitki büyüme ve gelişimi ile sekonder metabolit içeriklerine etkilerinin belirlemesi amacıyla tablo 5'de belirtilen konsantrasyonlarda $AgNO_3$ veya AgNP besin ortamlarına eklenmiştir. Tablo 3.3'de belirtilen her bir deneme konsantrasyonu için 4 magenta (4x7) besin ortamı hazırlanmıştır.

Sürgün rejenerasyonları besin ortamı hazırlık aşamasında; eklenen AgNP ve $AgNO_3$ ' ün tamamen çözünmediği gözlemlenmiş ve eklenen madde konsantrasyonu arttıkça çözünme hızının azaldığı görülmüştür. Bu sorunun önüne geçmek için çözeltiler ultrasonik su banyosunda 10-30 dakika arasında sonikasyon işlemine tabi tutulmuştur. Tam çözünmenin gerçekleşmesi için ise sonikatör cihazı (5-10 dakika) kullanılmıştır. Çözünme gerçekleşince Ph'ı 5.6-5.8'e ayarlanan çözeltiler sterilizasyon için 121 ^{0}C de 20 dakika otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası ise besin ortamları kabine alınmış, bitki büyüme düzenleyicileri eklnmiş ve magentalara dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır.

3.2.2.4 Tohumlarının Yüzey Sterilizasyonu ve Çimlendirilmesi

S. sclarea tohumlarının yüzey sterilizasyonu, ilk aşamada %20 'lik ticari çamaşır suyu içerisine alınan tohumlarının manyetik karıştırıcı vasıtasıyla 5 dakika boyunca karıştırılmasıyla sağlanmıştır. Ardından steril distile su içerisine aktarılan tohumlar yine karıştırıcı aracılığıyla 5 dakika boyunca karıştırılarak durulanmış ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

Çimlenme aşamasında bazı tohumlarda kontaminasyon oluştuğu gözlemlendiği için yüzey sterilizasyonu prosedüründe değişikliğe gidilerek çamaşır suyu çözeltisi %25'e, sterilizasyon süresi ise 10 dakikaya çıkartılmıştır.

Sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar çimlenme için bitki büyüme düzenleyici içermeyen MS ortamına (MS0) aktarılmıştır. Fakat düşük çimlenme yüzdesi nedeniyle yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumlar MS0 besin ortamına aktarım öncesinde 1/2

sıvı MS ile ıslatılmış steril kağıtlar arasında çimlendirilmiştir. Bu uygulama sonucunda tohumların tamamına yakınının çimlendiği belirlenmiştir.

3.2.2.5 Aseptik Fidelerin Eldesi ve Eksplant İzolasyonu

MS0 ortamına aktarılarak çimlendirilen tohumlar 24^0C'de 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiotta 4000 lux floresans ışık altında, iklimlendirme dolabında çimlendirilmiştir. Çimlenen tohumlardan aseptik fideler elde edilmiştir. 8-9 haftalık kültür sonunda aseptik fidelerin nod bölgeleri çıkarılarak eksplant olarak kullanılmıştır.

3.2.2.6 *İn Vitro* Sürgünlerin Çoğaltımı ve Kültürü

Tablo 3.3'de belirtilen her bir deneme konsantrasyonu için 4 magenta besin ortamı (4x7 adet) hazırlanmış ve her bir magentaya aseptik fidelerden elde edilen 5 adet eksplant yerleştirilmiştir.

Nodal segmentler besin ortamlarına aktarıldıktan sonra tüm kültürler 24^0C'de 16 saat aydınlık / 8 saat karanlık fotoperiotta 4000 lux floresans ışık altında, iklimlendirme dolabında tutulmuştur.

Tablo 3.3 *İn vitro* sürgün çoğaltımında kullanılan besin ortamı konsantrasyonları

	Konsantrasyon (mg/L):	
	AgNP	**$AgNO_3$**
DENEMELER	-	-
	25	-
	50	-
	100	-
	-	25
	-	50
	-	100

3.2.2.7 Gümüş Nanopartikül ve Gümüş Nitrat'ın Sürgün Büyüme ve Gelişimine Etkisinin Belirlenmesi

AgNP ve $AgNO_3$'ün bitki büyüme ve gelişimine olan etkilerinin belirlenmesi amacıyla kültürden yaklaşık 8 hafta sonra aşağıdaki parametreler değerlendirilmiştir.

- Eksplant başına sürgün sayısı (adet)
- Sürgün boyu (cm)
- Sürgün yaş ve kuru ağırlığı (mg)

Besin ortamından alınan sürgünlerin yaş ağırlıkları hassas terazide tartılarak belirlenmiştir. Sürgünler oda sıcaklığında 2 hafta kurutma kağıdı üzerinde kurutulduktan sonra kuru ağırlıkları belirlenmiştir.

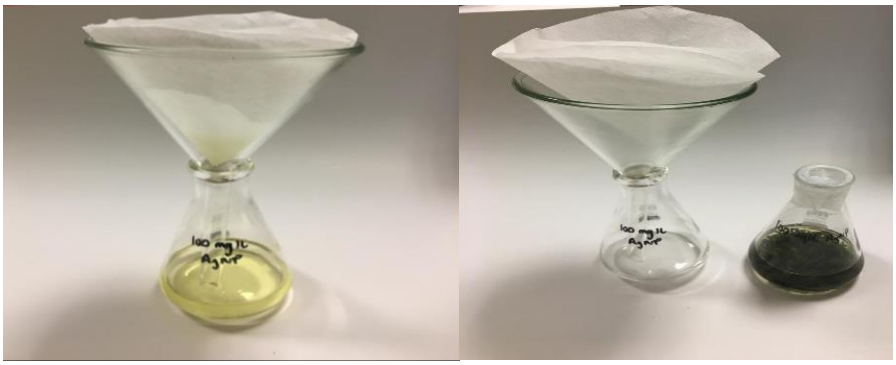
3.2.2.8 Verilerin Analizi

Doku kültürü çalışmalarında denemeler 4 tekerrürlü olarak kurulmuş olup her tekerrürde 5 eksplant kültüre alınmıştır. Elde edilen verilerin Varyans Analizleri SPSS for Windows (versiyon 23.0) programı kullanılarak yapılmış, uygulamalar arasındaki farklılıklar ($p \leq 0.05$) Duncan Çoklu Karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

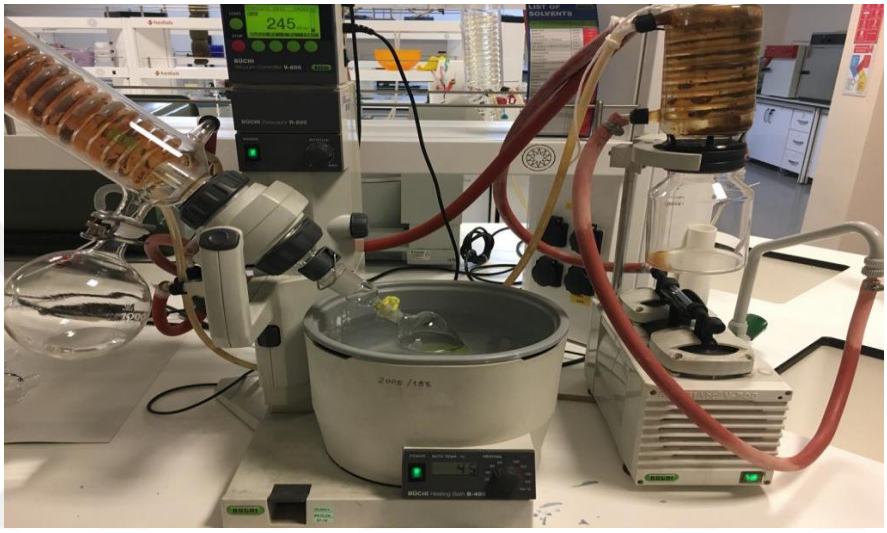
3.2.3 Sekonder Metabolit İçerik Analizi

3.2.3.1 Maserasyon Yöntemi ile Bitki Eksratı Eldesi

S. sclarea yaprakları laboratuvarda oda sıcaklığında kurutulmuş ve küçük parçalar haline getirilerek erlen kaplarına aktarılmıştır. Ardından 1:10 (yaprak materyali: hekzan çözücüsü) oranında hekzan çözücüsü eklenmiş ve yaklaşık 1 saat boyunca ultrasonik su banyosu kullanılarak masere edilmiştir. Maserasyon sonrası ekstrat, filtre kağıdından (whatman no:2) süzülmüştür (şekil 3.2). Filtrasyon sonrası ise hekzan çözüsü, evaporatör cihazı kullanılarak 40 ^{0}C düşük vakum basıncı altında uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.3). Böylece ham ekstre elde edilmiştir. Hekzan ekstratlarının bileşenleri, GC-MS kromotografik yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.2 Maserasyon sonrası ekstratın filtre kağıdında süzülmesi



Şekil 3.3 Evaporatör cihazı

3.2.3.2 GC-MS Analizi

GC- MS analizi Erişen vd., (2020) belirttiği şekilde gerçekleştirildi. Hekzan özleri, *n*-hekzan ile (GC-grade, Merck) ile 1:100 oranında seyreltildi. Taşıyıcı gaz olarak helyum (1.0 ml/dk), kolon olarak ise Innowax FSC kapiler kolonu (60mx0.25 mm, 0.25m film kalınlığı) kullanıldı. Hekzan ekstre bileşenlerinin belirlenmesi ise *n*-alkan serilerinin literatür ile karşılaştırılması ve kütle spektrum karşılaştırılmalarıyla yapıldı. Analizler iki tekrarlı gerçekleştirildi.



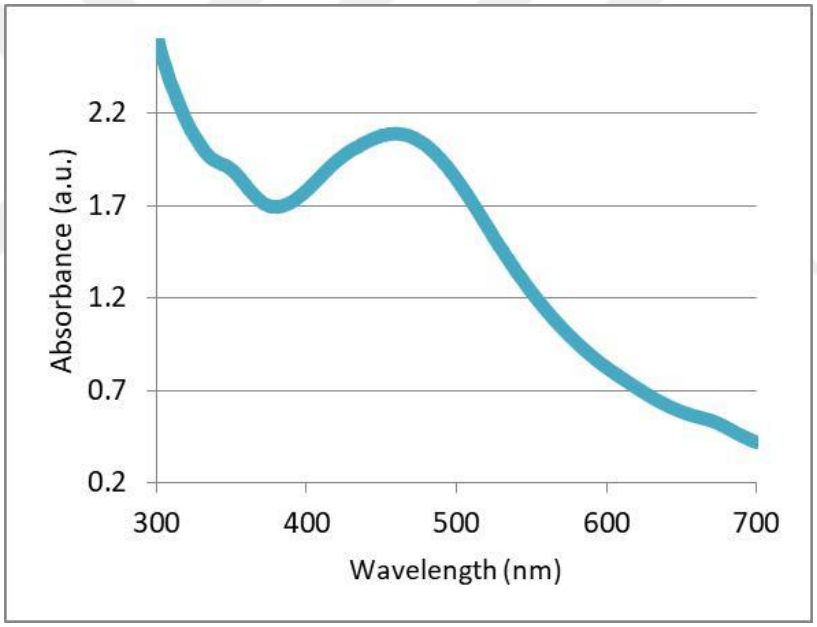
Şekil 3.4 GC-MS cihazı

4

SONUÇ VE ÖNERİLER

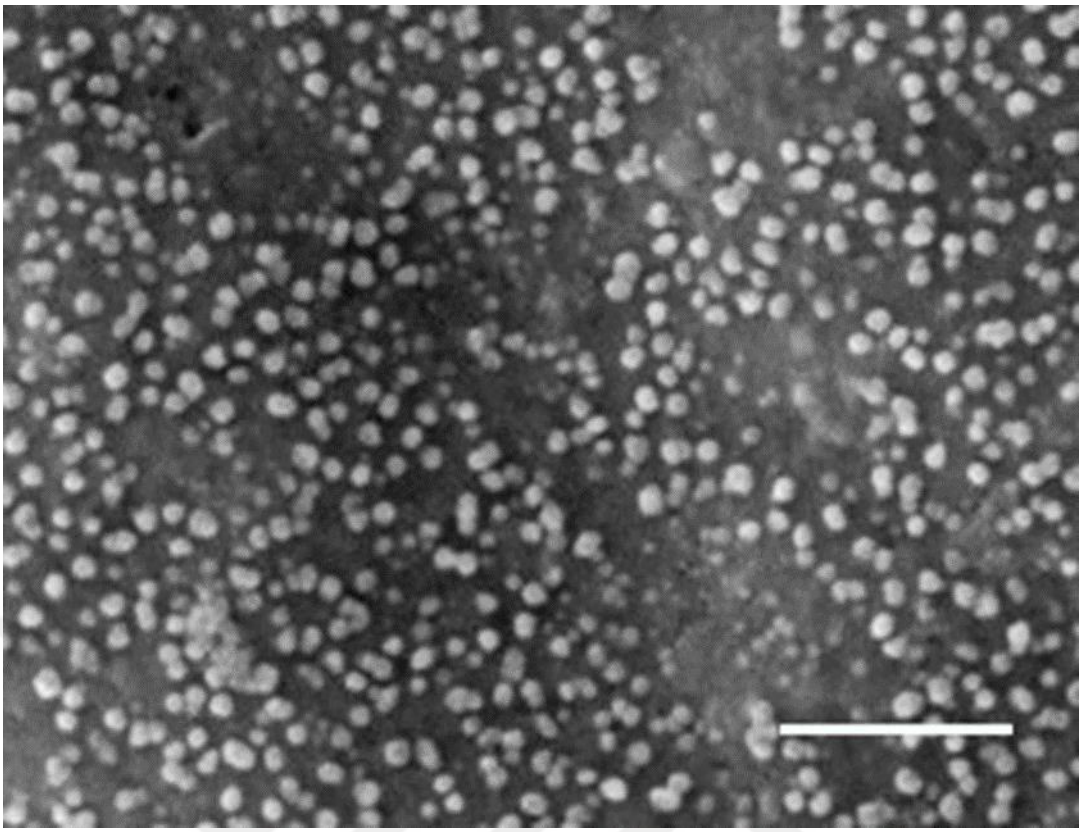
4.1 Gümüş Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

AgNP'lerin sentezi metod da belirtildiği gibi Erişen ve Yüca (2019)'a göre yapılmıştır. AgNP oluşumunun tespiti, $AgNO_3$ çözeltisi ile *S. sclarea* bitki özütünün reaksiyonundan 24 saat sonra UV-Vis spektral analizle doğrulanmıştır. Oluşan tepe noktası (peak) $AgNO_3$ ün AgNP halinde indirgendiğini göstermektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 Sentezlenen AgNP'lerin absorbans intensisitesi

Sentezlenen AgNP'lerin morfolojilerini belirlemek için SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda AgNP'lerin küresel morfolojide oldukları ve boyutlarının ise 10 ile 100 nm arasında değiştiği gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Sentezlenen AgNP'lere ait SEM görüntüsü (bar=1µm)

4.2 Gümüş Nanopartikül ve Gümüş Nitrat'ın Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

S. sclarea bitkisinde AgNP uygulamalarının sürgün rejenerasyonuna olan etkilerini belirlemek amacıyla 25, 50, 100 mg/l AgNP ile 1 mg/l MT ve 0.2 mg/l IAA içeren MS besin ortamlarında nodal segmentler kültüre alındı. Buna ek olarak AgNP uygulamasında ortaya çıkacak etkinin nanopartiküllerden salınan Ag^+ iyonlarından mı kaynaklandığını yoksa NP yapısının mı etkili olduğunu belirlemek amacıyla aynı konsantrasyonlarda $AgNO_3$ içeren MS besin ortamlarıyla da denemeler kuruldu. Kültürden yaklaşık 8 hafta sonra eksplant başına sürgün sayıları, sürgün boyu ve sürgün yaş ağırlıkları belirlendi. Sürgünlerin kuru ağırlıkları ise oda sıcaklığında 2 hafta kurutulduktan sonra belirlendi.

AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının eksplant başına sürgün sayısı bakımından herhangi bir istatistiksel farklılık meydana getirmediği tespit edildi (Tablo 4.1). Bununla birlikte uygulamaların sürgün boyuna etkisinin 0.01, yaş ve kuru ağırlığa etkisinin ise 0.05 düzeyinde istatistiksel farklılık gösterdiği belirlendi.

Tablo 4.1 AgNP ve $AgNO_3$ uygulamaların *S. sclarea*'da sürgün rejenerasyonuna etkisine ait varyans analizi sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D.	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Boyu (mm)		Yaş Ağırlık (mg)		Kuru Ağırlık (mg)	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
Genel	21								
Uygulama	2	2.45	1.70	170.18	11.19**	25.92	8.01*	0.20	5.46*
Hata	18	1.44		1.19		3.23		0.03	

*p≤0.05 **p≤0.01

Çalışmada istatistiksel farklılık belirlenen sürgün boyu, yaş ve kuru ağırlık değerleri arasındaki farklılıkların önem düzeyini belirlemek için ise Duncan testi yapılmıştır. Bu sonuçlar tablo 4.2 de verilmiştir.

Tablo 4.2 AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının *S. sclarea*'da sürgün rejenerasyonuna etkisi

Uygulamalar	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Boyu (mm)	Yaş Ağırlık (mg)	Kuru Ağırlık (mg)
Kontrol	3.66	18.29 a*	5.33 ab	0.36 b
AgNP	3.88	11.61 b	6.80 a	0.64 a
$AgNO_3$	2.86	6.45 c	3.41 b	0.35 b

Aynı sütunda faklı harflerle gösterilen gruplar arasında $p < 0.01^*$ veya 0.05 düzeyinde anlamlı faklılık vardır.

Uygulamaların eksplant başına sürgün sayısına olan etkisi incelendiğinde istatistiksel bir farklılık olmamasına karşın, eksplant başına sürgün sayısı bakımından en yüksek sonuç (3.88 adet) tablo 4.2 'de görüldüğü gibi AgNP uygulamalarından elde edilmiştir.

Sürgün boyu bakımından ise en iyi sonuç 18.29 mm ile kontrol grubundan elde edilmiştir. Bu değeri 11.61 mm ile AgNP uygulamaları takip etmektedir. En düşük sonuçlar ise (6.45 mm) $AgNO_3$ uygulamalarından elde edilmiştir (tablo 4.2).

Yaş ve kuru ağırlık parametrelerin her ikisi içinde en iyi sonuçlar sırasıyla 6.80 mg ve 0.64 mg olmak üzere AgNP uygulamalarından elde edilmiştir.

Son dönemlerde NP'ler, bitki büyüme ve gelişimini arttırmadaki potansiyel kullanımları sebebiyle dikkat çekmektedir. Fakat bitki-NP etkileşimleri hala tam olarak anlaşılamamış olup bildirilen çalışmalarda NP'lerin bitki büyüme ve gelişimine farklı etkilerin (arttırıcı-azaltıcı- nötr) olduğu rapor edilmiştir (Marslin vd., 2017). NP'lerin bitkiler üzerindeki etkisi NP boyutuna, şekline, türüne, konsantrasyonuna, bitkinin NP'ye maruz kalma süresine göre farklılık gösterirken aynı zamanda bitkilerin yaşı ve türüne göre de değişebilmektedir (Vannini vd.,2013). Antimikrobiyal etkileri ile dikkat çeken AgNP'lerin hayvanlar üzerindeki etkileri ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen, bitkiler üzerindeki etkisine ilişkin çalışmalar azdır. AgNP 'lerin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini arttırarak bitkiyi oksidatif strese soktuğu bilinmektedir (Cheng vd., 2010; Tripathi vd., 2012). Bu konuyla ilgili yapılan bir çalışmada; *in vitro* şartlarda yetiştirilen patates bitkisinde farklı konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$'ün etkileri, ROS üretimi ve oksidatif stres tepkileri açısından incelenmiştir. Bunun sonucunda her iki uygulamada da toplam ROS ve süperoksit anyonlarının 2 mg/l'den daha yüksek konsantrasyonlarda arttığı ve yine her iki uygulamanın da patates fideleri üzerinde oksidatif stres oluşturduğunu görülmüştür (Homaee vd. 2016).

Başka bir çalışmada ise *Aloe vera* özütü kullanılarak yeşil sentez yöntemiyle sentezlenen AgNP ile $AgNO_3$'ün farklı konsantrasyonlarının (1 ve 3 mM) hardal bitkisine etkisi araştırılmıştır. Sürgün uzunluğu bakımından elde edilen sonuçlar kontrol ile karşılaştırıldığında hem AgNP'lerin hem de $AgNO_3$'ün hardal fidelerinin büyümesini azalttığı fakat AgNP'nin hardal fideleri üzerindeki zararlı etkisinin $AgNO_3$'ten daha az olduğu bildirilmiştir (Vishwakarma vd., 2017). Çalışmalarla paralel olarak bu çalışmada da sürgün sayısı, sürgün boyu, yaş ve kuru ağırlık bakımından AgNP uygulamalarından elde edilen sonuçlar $AgNO_3$ uygulamalarına göre daha iyidir. AgNP'lere oranla $AgNO_3$'ün büyüme üzerindeki olumsuz etkisinin daha fazla olmasının sebebi bitkiler tarafından alınan Ag^+ iyonlarındaki artış olabilir (Harris ve Bali, 2008).

AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının farklı konsantrasyonların etkisi de istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Yapılan bu değerlendirmeler sonucunda, uygulama x konsantrasyonların eksplant başına sürgün sayısı, sürgün boyu, yaş ağırlık ve kuru ağırlığına etkisinin her dört parametre bakımından da 0.01 düzeyinde anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar tablo 4.3'de gösterilmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı farklılıklar arasındaki önem düzeylerini belirlemek amacıyla Duncan testi yapılmıştır. Sonuçlar tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.3 Farklı konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının *S. sclarea*'da sürgün rejenerasyonuna ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	**S.D.**	**Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)**		**Sürgün Boyu (mm)**		**Yaş Ağırlık (mg)**		**Kuru Ağırlık (mg)**	
		K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.	K.O.	F.
Genel	21								
Uygulama X Konsantrasyon	6	3.97	7.84**	85.60	11.95**	15,07	10.76**	0.12	4.90**
Hata	14	0.50		7.16		1.40		0.02	

**$p \leq 0.01$

Eksplant başına sürgün sayısı bakımından en iyi sonuçlar eksplant başına 4.73 adet sürgün oluşumuyla 25 mg/l $AgNO_3$ uygulamalarında kültüre alınan nodal segmentlerden elde edilmiştir. Fakat kontrol (3.66 adet), 25 mg/l AgNP (4.40 adet) ve 100 mg/l AgNP (4.06 adet) içeren ortamlarda elde edilen sonuçlar da 25 mg/l $AgNO_3$ uygulamasıyla aynı grupta yer almışlardır.

18.29 mm ile sürgün boyu bakımından ise en iyi sonuç kontrol grubundan elde edilmiştir. Bununla birlikte 25 mg/l AgNP (14.08 mm) içeren ortamdan elde edilen sonuçlar kontrol ile aynı grupta yer almaktadır. En düşük sonuç ise 50 mg/l $AgNO_3$ (2.78 mm) uygulamasından elde edilmiştir.

Yaş ağırlığa bakıldığında ise 50 ve 100 mg/l $AgNO_3$ uygulamaları dışındaki tüm uygulamalar kontrol ile aynı grupta yer alıp istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık

oluşturmamışlardır. Bununla birlikte en yüksek sonuç 50 mg/l AgNP (7.53 mg) uygulamasından elde edilmiştir.

Kuru ağırlık bakımından da en iyi sonuç yaş ağırlıkta olduğu gibi 50 mg/l AgNP (0.74 mg) uygulamasında tespit edilmiştir. En düşük sonuç ise 50 mg/l $AgNO_3$ (0.14 mg) uygulamasından elde edilmiştir.

Tablo 4.4 Farklı konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının *S. sclarea*'da sürgün rejenerasyonuna etkisi

Uygulamalar	Konsantrasyon (mg/l)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)	Sürgün Boyu (mm)	Yaş Ağırlık (mg)	Kuru Ağırlık (mg)
Kontrol	-	3.66 ab	18.29 a	5.33 a	0.35 bc
AgNP	**25**	4.40 ab	14.08 ab	6.50 a	0.61 ab
	50	3.20 bc	9.28 bc	7.53 a	0.74 a
	100	4.06 ab	11.45 b	6.38 a	0.56 ab
$AgNO_3$	**25**	4.73 a	11.89 b	6.12 a	0.57 ab
	50	1.53 c	2.78 d	2.80 b	0.14 c
	100	2.33 bc	4.67 cd	1.32 b	0.34 bc

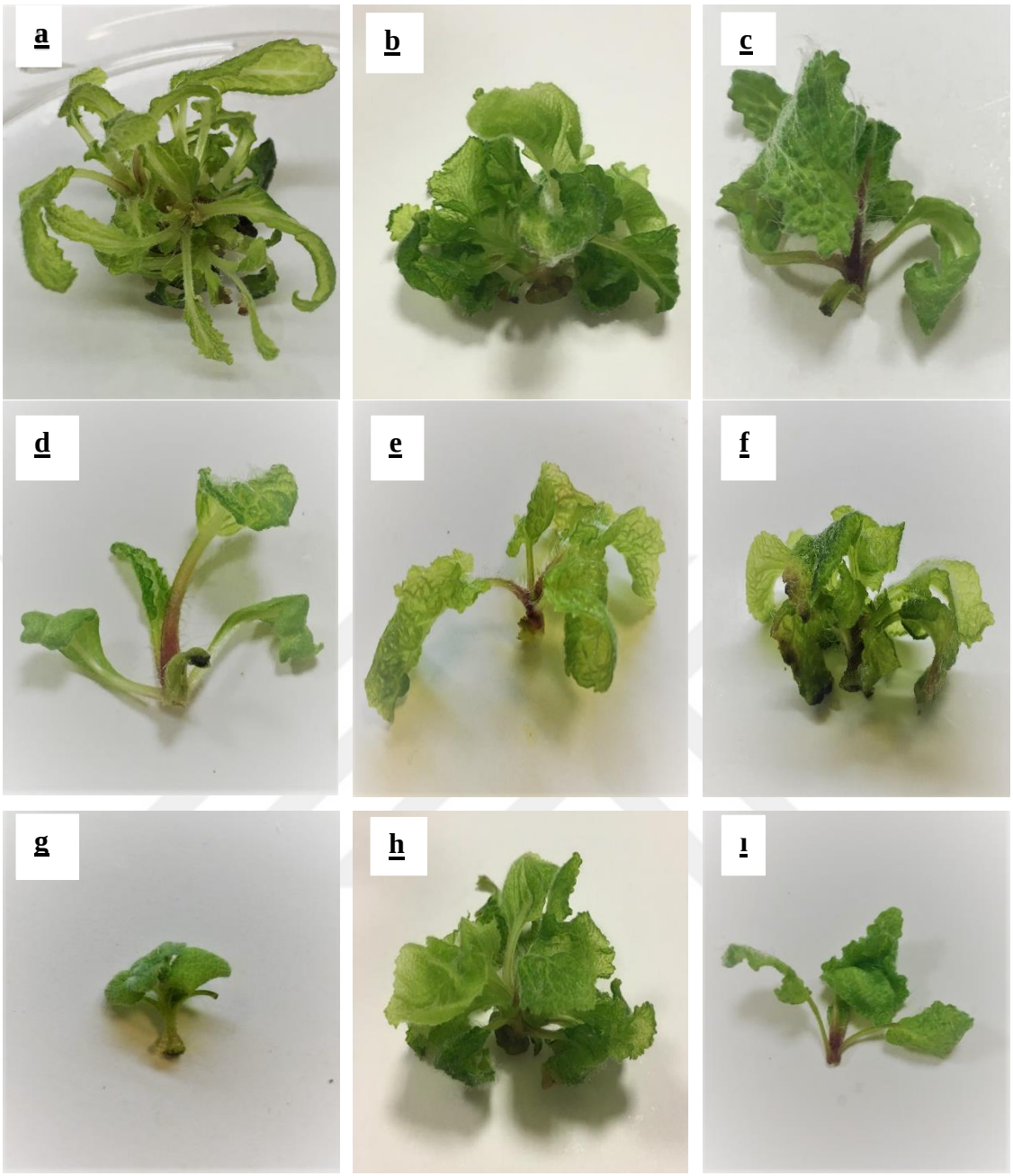
Aynı sütunda faklı harflerle gösterilen gruplar arasında $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı faklılık vardır.

2019 yılında yayınlanan bir çalışmada *in vitro* şartlarda muz bitkisine ait eksplantlar farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 5,10, 50, 100 ve 200 mg/l) AgNP veya $AgNO_3$ ile muamele edilmiş ve sonuçları karşılaştırılmıştır. Sonuçlarda düşük konsantrasyonlarda (1 ve 5 mg/l) hem AgNP'nin hem de $AgNO_3$'ün muz fidelerinin büyümesi ve gelişmesi (taze ve kuru ağırlık, kök sayısı ve kök uzunluğu) açısından olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür. Fakat her ikisi de yüksek konsantrasyonlarda inhibe edici bir etki yaratmıştır (Marva vd., 2019).

Başka bir çalışmada yeşil sentez yöntemiyle üretilen çinko oksit (ZnO) NP'lerinin tıbbi bir bitki olan *S. officinalis* L. bitki tohumlarının çimlenmesi ve fide büyümesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Farklı dozlarda ZnONP uygulaması sonucunda *S. officinalis L.* tohumlarının çimlenmesi %90-94, gövde uzunluğu 1.86-2.92 cm ve sürgün uzunluğu 1.01-1.98 cm arasında olmuştur. En yüksek kök ve sürgün uzunluğu 2.5 mg ZnONP uygulamasından elde edilmiştir (Zubeyır vd., 2021).

Bu tez çalışmasında sürgün boyu bakımından benzer sonuçlar elde edilmekle birlikte eksplant başına sürgün sayısı ile yaş ve kuru ağırlık bakımından AgNP dozlarının (eksplant başına sürgün sayısında 50 mg/l uygulaması hariç) arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. $AgNO_3$ uygulamasında ise doz artışı azaltıcı bir etki yaratmıştır.

AgNP ve $AgNO_3$ içeren ortamlarda gelişen sürgünler morfolojik özellikleri bakımından da incelenmiştir. Kontrol grubuna göre 25 mg/l AgNP içeren ortamlarda az sayıda da olsa vitrifike sürgünlerin geliştiği görülmüştür. 25 mg/l $AgNO_3$ içeren ortamlarda gelişen sürgünlerde ise 25 mg/l AgNP' ye göre daha fazla sayıda vitrifikasyon gözlemlenmiştir. 50 AgNP ve $AgNO_3$ içeren ortamların her ikisinde de sürgünlerde vitrifikasyon yanında nekroz oluşumları görülmüştür. 100 mg/l AgNP ve $AgNO_3$ içeren ortamlardaki sürgünler ise 50 mg/l AgNP ve $AgNO_3$ içeren ortamlardaki sürgünlere göre daha sağlıklı olduğu, fakat 25 mg/l konsantrasyonlarına göre vitrifikasyon oranının daha fazla sürgünde olduğu belirlenmiştir. Ayrıca 100 $AgNO_3$ içeren ortamlarda 1-2 sürgünde kök oluşumu da görülmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Farklı konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının *in vitro* sürgün rejenerasyonuna etkisi. Kontrol (a), 25 mg/l AgNP (b,c,d), 25 mg/l $AgNO_3$ (e), 50 mg/l AgNP (f), 50 mg/l $AgNO_3$ (g), 100 mg/l AgNP (h), 100 mg/l $AgNO_3$ (ı) içeren besin ortamlarında gelişen sürgünler.

4.3 Gümüş Nanopartikül ve Gümüş Nitrat'ın Sekonder Metabolit İçeriğine Etkisi

S. sclarea bitkisinin *in vitro* sürgünlerine ait yaprak eksplantlarında sekonder metabolit içerikleri GC-MS analizi ile belirlenmiştir. Analiz sonuçları tablo 4.5'de gösterilmiştir

Tablo 4.5 Farklı konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının *S. sclarea* bitkisinin sekonder metabolit içeriklerine etkisi

No	RT	RRI	RRI Lit.	İçerik	Kontrol (%)	25 mg/l AgNP (%)	50 mg/l AgNP (%)	100 mg/l AGNP (%)	25 mg/l $AgNO_3$ (%)	50 mg/l $AgNO_3$ (%)	100 mg/l $AgNO_3$ (%)
1	38.821	1834	1830	Tridecanal	-	-	-	0.5	-	-	-
2	43.719	2023	2025	2-Pentadecanone	-	-	-	0.4	-	-	-
3	45.945	2115	2107	(*E*)-2-Tetradecanal	2.3	-	1.1	0.5	0.6	0.9	0.5
4	48.141	2209	2200	Docosane	-	-	-	-	-	-	0.8
5	49.898	2287	2287	Sandaracopimaradiene	-	-	-	0.3	-	-	-
6	50.405	2309	2300	Tricosane	1.8	-	-	-	-	2.8	2.2
7	52.922	2412	2400	Tetracosane	4.3	-	-	-	-	6.6	3.4
8	55.904	2515	2500	Pentacosane	6.7	-	-	-	3.5	8.7	5.8
9	58.183	2582	2583	Methyl linolenate	-	2.5	-	0.4	-	-	-
10	58.519	2591	2594	9-Hexacosene	-	1.0	-	0.8	2.1	-	-
11	59.617	2619	2622	Phytol	tr	tr	3.2	2.2	tr	tr	tr
12	59.628	2619	2600	Hexacosane	8.2	-	-	-	3.6	-	2.1
13	64.039	2722	2744	Heptacosane	11.1	10.6	10	7.6	10.5	13.7	11.6

Tablo 4.5 Farklı konsantrasyonlarda AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının *S. sclarea* bitkisinin sekonder metabolit içeriklerine etkisi (devamı)

14	59.962	2627	2640	Hexacosene	-	2.6	-	1.9	1.5	12.0	7.0
15	67.041	2787		Squalene	2.4	10.6	6.4	5.7	4.9	1.6	-
16	68.834	2823	2822	Octacosene	10.7	-	-	1.1	2.0	13.1	9.3
17	69.338	2833	2822	Pentadecanoic acid	4.0	7.2	7.0	6.3	5.5	1.4	4.2
18	73.359	2912	2931	Hexadecanoic acid	1.5	12.1	14.1	7.0	6.1	2.0	3.7
19	74.063	2925	2942	Nonacosene	11.0	9.9	10.8	1.3	10.4	12.4	10.8
20	74.789	2939	2950	9-Nonacosene	-	-	-	8.2	-	-	-
21	79.482	3025	3000	Triacontane	6.6	-	-	-	-	9.3	5.2
22	81.038	3053	3063	Octadecanoic acid	18.1	24.7	28.8	32.1	28.3	3.2	22.1
23	82.679	3081	3100	Hentriacontane	-		-	4.9	5.6	-	-
24	85.512	3217	3200	Dotriacontane	10.7	14.5	12.7	4.1	4.5	4.0	3.4

Bu sonuçlar değerlendirildiğinde; yağ asitlerinin baskın olduğu belirlendi. Oktadekanoik asit ve pentadekanoik asit 50 mg/l $AgNO_3$ ile muamele edilmiş bitkiler hariç, analiz edilen tüm ekstrelerin ana bileşiğiydi. Hekzadekanoik asit içeriği ise kontrol bitkileri (% 1.5) ile karşılaştırıldığında; özellikle 25 (% 12.1) ve 50 mg/l (% 14.1) AgNP olmak üzere AgNP ve $AgNO_3$'ün tüm konsantrasyonları bazında önemli artış gösterdi. Oktadekanoik asit, pentadekanoik asit ve hekzadekanoik asit doymuş fosfolipid yağ asitleridir ve kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında AgNP'lerle muamele edilmiş bitkilerde önemli ölçüde artmışlardır. Bu doymuş yağ asitleri, fosfolipid çift tabakasının bileşenleridir. Bu bileşenlerdeki artış, stres koşullarına uyum sağlamak için membran sentezinin işareti olabilir (Zhang vd., 2018).

AgNP ve $AgNO_3$ uygulamaları sekonder içeriği hem kalitatif hem de kantitatif olarak etkilemiştir. Örneğin; Tridekanal (% 0.5), 2-Pentadekanon (% 0.4), sandarakopimaradin (% 0.3) ve 9-Nonakosen (% 8.2) metabolitleri sadece 100 mg/l AgNP uygulamasından elde edilen sürgünlerde belirlenmiştir. Dokosan içeriğinin ise kontrol grubu dahil hiçbir deneme grubunda gözlemlenmediği sadece 100 mg/l $AgNO_3$ konsantrasyonunda % 0.8 oranında tespit edildi. Bu durumun tam tersi olarak skualen metabolitinin ise, 100 mg/l $AgNO_3$ uygulaması hariç tüm bitki ekstraktlarında farklı seviyelerde varlığı belirlendi. En düşük skualen seviyesi, 50 mg/l $AgNO_3$ (% 1.6) uygulamasında tespit edildi. Kontrol bitkileri (% 2.4) ile karşılaştırıldığında, 25 mg/l $AgNO_3$ (% 4.9) ve AgNP (% 5.7-10.6) uygulamalrında önemli skualen seviyeleri tespit edildi. Triterpen grubuna dahil olan skualen lipid özelliklere sahiptir. Antioksidan, antibakteriyel, antikanser, antifungal, detoksifiye edici ve kardiyoprotektör gibi birçok özelliği sebebiyle de ilaç ve kozmetik endüstrilerinde kullanılmaktadır (Lozane-Grande vd., 2018).

S. sclarea'nın diğer bir değerli metaboliti olan fitol, diterpen grubuna ait olup klorofilin parçalanmasında rol oynar. Kozmetik, ev temizlik maddeleri ve koku üretiminde kullanılır (Erisen vd., 2020). Mevcut çalışmada, kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında fitol, $AgNO_3$ (25, 50 ve 100 mg/l) ve 25 mg/l AgNP uygulamalarında iz miktarda olmakla birlikte 50 mg/l AgNP (% 3.2) ve 100 mg/l AgNP (% 2.2) konsantrasyonlarında artmıştır. Fitol seviyesinin artması, klorofil bozulmasının bir işaretidir. Klorofil bozulmasından kaynaklanan fitol, lipidleri oksidatif hasardan koruyan tokoferol sentezinde bir öncü olarak kullanılır. Ayrıca fitol, oksidatif stres için koruyucu bir mekanizma olabilir. Ek olarak, strese karşı bitki savunmasının biyolojik belirteci olarak kullanılır (Zhang

vd.,2018).

Bazı bileşik seviyeleri kontrole göre $AgNO_3$'lere kıyasla AgNP'lere yanıt olarak daha fazla artmış ve azalmıştır. AgNP uygulaması ile artan bileşikler fitol, skualen, pentadekanoik asit, heksadekanoik asit, oktadekanoik asit, tridekanal, 2-pentadekanon, sandaracopimaradiene ve 9- nonakosen'dir. Trikosan, tetrakosan, pentakosan, heksakosan ve triakontan dahil olmak üzere bazı bileşik seviyeleri ise AgNP muamelesi ile önemli ölçüde azalmıştır. Benzer başka bir sonuç salatalık bitkisiyle yapılan bir çalışmada belirlenmiştir. Salatalık bitkisi farklı konsantrasyonlarda AgNP veya $AgNO_3$ 'e maruz bırakılmış ve sekonder içeriklerindeki değişimin belirlenmesi amacıyla GC-MS yöntemi kullanılmışır. Analiz sonuçlarına göre Ag+ iyonları bazı değişikliklere sebep olsa da karbazol, laktuloz, rafinoz, sitrakonik asit, laktamit, asetanilid ve *p*-benzokinon 'un AgNP'ye özgü olarak değiştiği belirlenmiştir (Zhang vd., 2018). Sonuç olarak AgNP ve $AgNO_3$ uygulamalarının sekonder içerikteki farklı etkileri nano boyutlara özgü bir tepkinin varlığını göstermektedir.

Genel olarak *S. sclarea* bitkisinin *in vitro* kültürlerinde sürgün rejenerasyonunda eksplant başına sürgün sayısı bakımından 25 mg/l $AgNO_3$ uygulaması en yüksek sonuçları verirken, sürgün boyunda en yüksek sonuçlar kontrolden alınmıştır. Fakat 25 mg/l AgNP uygulaması ikinci en iyi sonuçları vererek kontrol ile aynı grupta yer almıştır. Yaş ve kuru ağırlık bakımından ise AgNP uygulamaları pozitif etki yapmıştır. $AgNO_3$ (25 mg/l hariç) uygulamaları tüm parametrelerde inhibe edici etki göstermiştir. Uygulamalar sekonder metabolit içeriklerini hem kalitatif hem de kantitatif olarak etkilemiştir. Skualen ve fitol gibi değerli metabolitlerin miktarları doza bağlı olarak AgNP uygulamalarında artış göstermiştir. *S. sclarea* bitkisinde değerli metabolitlerin *in vitro* sürgün kültürleri ile üretiminde AgNP'ler elisatör olarak önerilebilir. Gelecek çalışmalarda *S. sclarea*'da farklı konsatrasyonların, farklı NP'lerin ve farklı uygulama şekillerinin etkisinin ortaya konulması *in vitro* kültürlerle sekonder metabolit üretiminin arttırılmasına katkı sağlayabilir.

5

KAYNAKÇA

Ahmad, N., & Sharma, S. (2012). 'Green Synthesis of Silver Nanoparticles Using Extract of Ananas comosus'. Green and Sustainable Chemistry, *02*(04),141– 147. https://doi.org/10.4236/gsc.2012.24020.

Alaca, F., & Arslan, N. (2012). 'Sekonder Metabolitlerin Bitkiler Açısından Önemi'. *Ziraat Mühendisliği*, *358*, 48–55.

Asadi, S., Ahmadiani, A., Esmaeili, M.A., Sonboli, A., Ansari, N., Khodagholi, F. 2010. 'In vitro antioxidant activities and an investigation of neuroprotection by six *Salvia* species from Iran: a comparative study', Food Chem Toxicol, 48(5),1341-9.

Beykaya, M., Çağlar, A. 2016. 'Bitkisel Özütler Kullanılarak Gümüş-Nanopartikül (AgNP) Sentezlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinlikleri Üzerine Bir Araştırma'. AKÜ FEMÜBİD 16 (2016) 035403 (631-641). https://doi.org/10.5578/fmbd.34220.

Bilgili, B., 2014. 'Gümüş Nanopartiküllerin (AgNP) Sentezi ve Karakterizasyonu. 'Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Muğla.

Binti Ida Umaya. 2017. 'Gümüş Nanopartiküllerin Atkestanesi (*Aesculus Hippocastanum*) Yaprak Özütü İle Biyosentezi, Biyolojik Aktivite Ve İlaç Salınım Özelliklerinin Belirlenmesi.' Universitas Nusantara PGRI Kediri, *01*, 1–7. http://www.albayan.ae.

Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. 'Pro-duction of plant secondary metabolites: a historical perspective.' Plant Science, 5:839-85.

Caniard, A., Zerbe, P., Legrand, S., Cohade, A., Valot, N., Magnard J. L., Bohlmann, J., & Legendre, L. 2012. 'Discovery and functional characterization of two diterpene synthases for sclareol biosynthesis in *Salvia sclarea* (L.) and their relevance for perfume manufacture.' *BMC Plant Biology*, *12*(1), 119. https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-119

Chang, SH., Ho, CK., Chen, Z.Z., Tsay, J.Y., 2001. 'Micro-propagation of *Taxus mairei* from mature trees.' Plant Cell Reports, 20:496–502.

Conti, B., Benelli, G., Leonardi, M., Afifi, F. U., Cervelli, C., Profeti,R., Pistelli, L.,

Canale, A. 2012. 'Repellent effect of *Salvia dorisiana, S. longifolia,* and *S. sclarea* (Lamiaceae) essential oils against the mosquito Aedes albopictus Skuse (Diptera: Culicidae)', Parasitol Res. 111(1),291-9.

Cheng, L., Shao, M., Zhang, M., and Ma, D. D. 2010. 'An ultrasensitive method to detect dopamine from single mouse brain cell: surface-enhanced Raman scattering on Ag nanoparticles from beta-silver vanadate and copper'. Sci. Adv. Mater. 2, 386–389. doi: 10.1039/b802405.

Cragg, G. M., & Newman, D. J. 2013. 'Natural products: A continuing source of novel drug leads.' In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1830, Issue 6, pp. 3670–3695). https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008

Cui, H., Zhang, X., Zhou, H., Zhao, C., Lin, L. 2015. 'Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil', Bot Studies, 56, 16.

Desai, M. P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R. J., & Amidon, G. L. 1997. 'The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent.' *Pharmaceutical Research, 14*(11), 1568–1573. https://doi.org/10.1023/A:1012126301290

Dikova, B. 2009.' Establishment of Some Viruses—Polyphagues on Economically Important Essential Oil—Bearing and Medicinal Plants in Bulgaria', Biotechnology, 23, 80-85.

Dowom, S., Abrishamchi, P., Radjabian, T., Salami, S. 2017. 'Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag+ ions, methyl jasmonate and yeast extract', Industrial Cropsand Products, 103,81–88.

Drexler, K. E., 1986. Engines of Creation: The Coming EraOf Nanotechnology, Doubleday, New York.

Dubey, S. P., Lahtinen, M. ve Sillanpaa M. 2010. ' Tansy Fruit Mediated Greener Synthesis of Silver and Gold Nanoparticles'. P. Biochemistry 45: 1065-1071.

Duncan, T. V. 2011. 'Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors.' *Journal of Colloid and Interface Science, 363*(1), 1–24. https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.07.017

Erişen, S., Kurt-Gür, G., & Servi, H. 2020. '*In vitro* propagation of *Salvia sclarea* L. by meta-Topolin, and assessment of genetic stability and secondary metabolite profiling of micropropagated plants.' Industrial Crops and Products, 157, 112892.

Erişen, S., , Yüca, E., 2019. '*Salvia sclarea* Yaprak Özütlerini Kullanarak Gümüş

Nanopartikül Biyosentez.' Yükseköğretim Kurumları Destekli Proje, 2016 – 2019.

Erkoyuncu, T., Yorgancılar, M. 2015. 'Bitki Doku Kültürü Yöntemleri İle Sekonder Metabolitlerin Üretimi', Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi, 2(1),66-76.

Fazal, H., Abbasi, B., Ahmad, N., Ali, M. 2016. 'Elicitation of Medicinally Important Antioxidant Secondary Metabolites with Silver and Gold Nanoparticles in Callus Cultures of *Prunella vulgaris L*', Appl Biochem Biotechnol, 180(6),1076-1092.

Garcia-Sanchez, S., Bernales, I., Cristobal, S. 2015. 'Early response to nanoparticles in the *Arabidopsis* transcriptome compromises plant defence and root-hair development through salicylic acid signalling', BMC Genomics, 16(1),341.

Ghorbanpour, M. 2015. 'Major essential oil constituents, total phenolics and flavonoids content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* plant in response to nano-titanium dioxide', Indian Journal of Plant Physiology, 20(3), 249–256.

Golkar, P., Moradi, M., Garousi, G.A. 2019. 'Elicitation of Stevia Glycosides Using Salicylic Acid and Silver Nanoparticles Under Callus Culture', Sugar Tech, 21, 569–577.

Grigoriadou, K., Trikka, F. A., Tsoktouridis, G., Krigas, N., Sarropoulou, V., Papanastasi, K., Maloupa, E., & Makris, A. M. 2020. 'Micropropagation and cultivation of *Salvia sclarea* for essential oil and sclareol production in northern Greece.' *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *56*(1), 51–59. https://doi.org/10.1007/s11627-019-10040-4

Grzegorczyk, I., Wysokinska, H. 2007. 'Liquid shoot culture of *Salvia officinalis* L. for micropropagation and production of antioxidant compounds; Effect of triacontanol', Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 2,99-104.

Günnewich, N., Higashi, Y., Feng, X., Choi, K.B., Schmidt, J., Kutchan, T.M. 2013.' A diterpene synthase from the clary sage *Salvia sclarea* catalyzes the cyclization of geranylgeranyl diphosphate to (8R)-hydroxy-copalyl diphosphate', Phytochemistry, 91,93-9.

Güven, A., & Gürsul, I. 2014. 'Secondary Metabolite Synthesis in Plant Tissue Cultures. Gida / the Journal of Food' 39, 1–8. https://doi.org/10.15237/gida.gd13060.

Haas, C., Hengelhaupt, K.C., Kümmritz, S., Bley, T., Pavlov, A., Steingroewer, J. 2014. '*Salvia* suspension cultures as production systems for oleanolic and ursolic acid', Acta Physiologiae Plantarum, 36, 2137–2147.

Harris, A. T., and Bali, R. 2008. 'On the formation and extent of uptake of silver

nanoparticles by live plants'. J. Nanopart. Res. 10, 691–695. doi: 10.1007/s11051-007-9288-5.

Homaee, B., M., Ehsanpour, A.A. 2016. 'Silver nanoparticles and silver ions: Oxidative stress responses and toxicity in potato (*Solanum tuberosum L*) grown in vitro 'Hortic. Environ. Biotechnol. 57, 544–553 (2016). https://doi.org/10.1007/s13580

Hristova, Y., Gochev, G., Wanner, J., Jirovetz, L., Schmidt, E., Girova, T., Kuzmanov A. 2013. 'Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Salvia sclarea L*. from Bulgaria against clinical isolates of Candida species', J. BioSci. Biotech, 2(1), 39-44.

Javed, R., Mohamed, A., Yücesan, B., Gürel, E., Kausar, R., Zia, M. 2017. 'CuO nanoparticles significantly influence in vitro culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of *Stevia rebaudiana Bertoni*', Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 131, 611–620.

John Wiley & Sons, Hoboken, NJ. 2006. Wiley Registry 8th Edition/NIST 05 Mass Spectral Library, 8th ed., USA.

Kalemba, D., Kuzma, L., Rozalski, M., Rozalska, B., Wieckowska-Szakiel, M., Krajewska, U., Wysokinska, H. 2009. 'Chemical composition and biological activities of essential oil from *Salvia sclarea* plants regenerated in vitro', Molecules, 14(4),1438-47.

Karam, N., Fawzia, M., Jawad, Naser, A., Arikat & Rida A. Shibli. 2003. 'Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa'*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 73,117–121.

Keshari, A. K., Srivastava, A., Chowdhury, S., & Srivastava, R. 2021. 'Antioxidant and antibacterial property of biosynthesised silver nanoparticles.' *Nanomedicine Research Journal*, *6*(1), 17–27. https://doi.org/10.22034/nmrj.2021.01.003.

Kutlu, G., 2015 'Misk Adaçayı (*Salvia sclarea*) Tohumlarından Optimum Koşullarda Üretilen Gamın Fizikokimyasal, Kompozisyonel, Konformasyonel ve Reolojik Özelliklerinin Belirlenmesi.' Yüksek lisans tezi, Y.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı. Gıda Mühendisliği Programı.

Kuzma, L., Bruchajzerb, E., Wysokińskaa, H. 2009. 'Methyl jasmonate effect on diterpenoid accumulation in *Salvia sclarea* hairy root culture in shake flasks and sprinkle bioreactor', Enzyme and Microbial Technology, 406-410.

Kuzma, L., Zuzanna Skrzypek & Halina Wysokinska. 2006. 'Diterpenoids and

triterpenoids in hairy roots of *Salvia sclarea'*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84, 171–179.

Lozano-Grande, M. A., Gorinstein, S., Espitia-Rangel, E., Dávila-Ortiz, G., & Martínez-Ayala, A.L. 2018. 'Plant sources, extraction methods, and uses of squalene.' International journal of agronomy,1-13.

Maharik, N., Elgengaihi, S., Taha, H. 2009. 'Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* Bioss.' Internatıonal Journal of Academıc Research,1:30-3.

Mansuroğlu, S., Gürel, E. 2001. 'Mikroçoğaltım.' (Editör-ler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan),Bitki Biyotek-nolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s.262-281.

Marslin, G., Sheeba, C.J., Franklin, G. 2017. 'Nanoparticles Alter Secondary Metabolism in Plants via ROS Burst', Front Plant Sci., 19,8:832.

Marwa T.K. El-Mahd , Abeer A. Radi, Mokhtar M. Shaaban. 2019. ' Impacts of exposure of banana to silver nanoparticles and sliver ions in vitro'. Middle East Journal of Applied Sciences. ISSN 2077-4613. Pages: 727-740.

Miller G., Senjen R. 2008. Out Of The Laboratory And On To Our Plates-Nanotechnology In Food And Agriculture. Friends Of The Earth Australia, Europe & USA.p.68

Moretti, L., Satta, M., Peana, A. T. 1997. 'A Study on Anti-Inflammatory and Peripheral Analgesic Action of *Salvia sclarea* Oil and Its Main Components', Journal of Essential Oil Research, 9(2),199-204.

Murashige, T., Skoog, F. 1962. 'A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures', Physiologia Plantaum, 15.

Narayanan, K. B., & Sakthivel, N. 2010.' Biological synthesis of metal nanoparticles by microbes.' *Advances in Colloid and Interface Science*, *156*(1–2), 1–13. https://doi.org/10.1016/j.cis.2010.02.001.

Oliveira Timoteo, C., Paiva, R., Valquíria dos Reis M., Ivo Cunha Claro P., Diogo Pedrosa Corrêa da Silva, Jose Manoel Marconcini, Elvis de Oliveira, J. 2019. 'Silver nanoparticles in the micropropagation of *Campomanesia rufa* (O. Berg) Nied', Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 137(2), 359–368.

Özdoğan E., Demir A., Seventekin N. 2006. 'Nanotechnology And Its Applıcatıons In Textıle Industry'. Tekstil ve Konfeksiyon. 2006-Cilt: 16 - Sayı: 3 pp.159-168.

Özek, T., Tabanca, N., Demirci, F., Wedge E.D., Başer, H. C. 2010. 'Enantiomeric

Distribution of Some Linalool Containing Essential Oils and Their Biological Activities', Rec. Nat. Prod., 4(4),180-192.

Patil, J.G., Ahire, M.L., Nitnaware, K.M., Panda, S., Bhatt, V.P., Kishor, P.B.K., Nikam, T.D., 2013. '*In vitro* propagation and production of cardiotonic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea L*. by elicitation and precursor feeding.' Applied Microbiology and Biotechnology, 97: 2379–2393.

Philip, D., 2010. ' Green Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles Using Hibiscus rosa sinensis' Physica 42: 1417-1424.

Rai, M., Yadav, A., & Gade, A. 2009. 'Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials.' *Biotechnology Advances*, *27*(1), 76–83. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.002

Ravichandran, R. 2010. 'Nanotechnology Applications in Food and Food Processing: Innovative Green Approaches, Opportunities and Uncertainties for Global Market.' *International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry*, *1*(2), P72–P96. https://doi.org/10.1080/19430871003684440

Roco, M. C. 2007. *National Nanotechnology Initiative-Past, Present, Future* (Vol. 2). Taylor and Francis.

Russo, A., Formisano, C., Rigano, D., Senatore, F., Delfine, S., Cardile, V., Rosselli, S., & Bruno, M. 2013. 'Chemical composition and anticancer activity of essential oils of Mediterranean sage (*Salvia officinalis L.*) grown in different environmental conditions.' *Food and Chemical Toxicology*, *55*, 42–47. https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.036.

Santos-Gomes, P.C., Seabra, R. M., Andrade, P.B., Fernandes-Ferreira, M. 2002. 'Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis L.*)', Plant Sciene, 162, 981-987.

Sathuluri, R.R., Gokare, R. 2002.' Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites', Biotechnology Advances, 2,101-153.

Seol, G. H., Lee, Y. H., Kang, P., You, J. H., Park, M., Min, S.S. 2013. 'Randomized controlled trial for *Salvia sclarea* or *Lavandula angustifolia*: differential effects , on blood pressure in female patients with urinary incontinence undergoing urodynamic examination', J Alter Complement Med., 19(7),664-70.

Sökmen, A., Gürel, E. 2001. 'Sekonder Metabolit Üretimi.' (Editörler M.Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 211-261.

Şenkal, BC., İpek, A., Gürbüz, B., Türker, A., ve Bingöl, M.Ü., 2012. 'Bolu ekolojik koşullarında yetiştirilen *Salvia officinalis L.* ve *Salvia tomentosa L.* türlerinin bazı önemli tarımsal özelliklerinin belirlenmesi. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 5(2): 38-42.

Tulukcu, E., 2005a. 'Tıbbi Bitkilerin Kültüre Alınmasının Önemi'. 3. Ulusal Meslek Yüksek Okulları Sempozyumu. Burdur.

Tulukcu, E., 2005b. 'Tıbbi Bitkilerin Kullanımı ve Bazı Zehirli Bitkiler'. İpek Yolu Dergisi. Sayı:216 Konya.

Tulukcu, E., 2006. 'Misk Adaçayı'. Ekoloji Magazin Dergisi. Sayı: 9. İzmir.

Tulukcu, E., Sagdic, O., Albayrak, S., Ekici, L., Yetim, H. 2009. 'Effect of collection time on biological activity of Clary sage (*Salvia sclarea*)' Journal of Applied Botany and Food Quality, 83, 44 – 49.

Thakkar, K. N., S. S. Mhatre, and R. Y. Parikh. 2010. 'Biological synthesis of metallic nanoparticles.' Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine 6:257–62.

Tripathi, D. K., Singh, V. P., Kumar, D., and Chauhan, D. K. 2012. 'Rice seedlings under cadmium stress: effect of silicon on growth, cadmium uptake, oxidative stress, antioxidant capacity and root and leaf structures'. Chem. Ecol. 28, 281–291. doi:10.1080/02757540.2011.644789.

Ulubelen, A., Topcu, G., Eriş, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., Bozok-Johanssond C. 1994. 'Terpenoids from *Salvia sclarea'*, Phytochemistry, 36,971-974.

Vaccaro, M. C., Alfieri, M., Malafronte, N., De Tommasi, N., Leone, A. 2017, 'Increasing the synthesis of bioactive abietane diterpenes in *Salvia sclarea* hairy roots by elicited transcriptional reprogramming', Plant Cell Rep., 36(2),375-386.

Vannini, C,. Doming, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L., Bracale, M. 2013. 'Morphological and Proteomic Responses of Eruca sativa Exposed to Silver Nanoparticles or Silver Nitrate', PLoS One, 8(7).

Vishwakarma,K., Shweta, Upadhyay, N., Singh, J., Liu, S., Vijay P. Singh, Sheo M. Prasad, Devendra K. Chauhan, Durgesh K. Tripathi, Shivesh Sharma. 2017. 'Differential Phytotoxic Impact of Plant Mediated Silver Nanoparticles (AgNPs) and Silver Nitrate (AgNO3) on Brassica sp.' Front. Plant Sci. https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01501

Wu, J-Y., Ng, J., Shi, M., Wu, S.J. 2007. 'Enhanced secondary metabolite (tanshinone) production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots in a novel root-bacteria coculture process', Appl Microbiol Biotechnol, 77(3),543-50.

Xiao, Y., Gao, S., Di, P., Chen, J., Chen, W., Zhang, L. 2009. ‘Methyl jasmonate dramatically enhances the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures’, Physiol Plant, 137(1),1-9.

Yilmaz, D., & Gokduman, E. 2015. Adaçayı (*Salvia officinalis* L.) Bitkisinin Farklı Nem Düzeylerinde Fiziko-Mekanik Özelliklerinin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. Cilt: 10 - Sayı:1 pp.73-82.

Zubeyir, G., Toncer, O., Eren, Abdullah. 2021. 'Effects Of Zno Nanopartıcules Produced By Green Synthesıs On Germınatıon And Seedlıng Of *Salvıa Officınalıs* L. Seeds.' Journal of Elementology . Vol. 26 Issue 3, p625-637. 13p.

Zhang, C., Yan, Q., Cheuk, W.K., Wu, J. 2004. ‘Enhancement of Tanshinone Production in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Culture by Ag+ Elicitation and Nutrient Feeding’, Planta Media, 70(2),147-151.

Zhang, B., Zheng, L. P., Yi Li, W., Wen Wang, J. 2013. ‘Stimulation of Artemisinin Production in Artemisia annua Hairy Roots by Ag-SiO2 Core-shell Nanoparticles’, Current Nanoscience, 9(3), 363-370.

Zhang, H., Du, W., Peralta-Videa, J. R., Gardea-Torresdey, J. L., White, J. C., Keller, A., Hongyan,G., Ji, R., Zhao, L. 2018. ‘Metabolomics reveals how cucumber (Cucumis sativus) reprograms metabolites to cope with silver ions and silver nanoparticle-induced oxidative stress.’ Environmental science & technology, 52(14), 8016-8026.

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

Arslan E., Erişen S., Servi H., ‘ Gümüş Nanopartiküllerin *Salvia sclarea* Bitkisinde Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi’. 10.Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi. 18 Aralık 2021. s.34.