



T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ENDEMİK *Salvia pseudoeuphratica* Rech. f.
BİTKİSİNİN HÜCRE SÜSPANSİYON
KÜLTÜRLERİNİN OPTİMİZASYONU VE BAZI
AgNP UYGULAMALARININ TOTAL FENOLİK,
FLAVONOİD, ANTİOKSİDAN AKTİVİTE İLE
BAZI TERPENOİD BİLEŞİKLERİN MİKTARLARI
ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayşe HOŞER MÜJDECİ

Haziran-2024 BATMAN

T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

ENDEMİK *Salvia pseudoeuphratica* Rech. f.
BİTKİSİNİN HÜCRE SÜSPANSİYON
KÜLTÜRLERİNİN OPTİMİZASYONU VE BAZI
AgNP UYGULAMALARININ TOTAL FENOLİK,
FLAVONOİD, ANTİOKSİDAN AKTİVİTE İLE
BAZI TERPENOİD BİLEŞİKLERİN MİKTARLARI
ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayşe HOŞER MÜJDECİ

Danışman
Prof. Dr. Engin TİLKAT

Haziran-2024
BATMAN

TEZ KABUL VE ONAYI

Ayşe HOŞER tarafından hazırlanan “Endemik *Salvia pseudoeuphratica* Rech.f. bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu ve bazı AgNP uygulamalarının total fenolik, flavonoid, antioksidan aktivite ile bazı terpenoid bileşiklerin miktarları üzerine etkileri” adlı tez çalışması 07/06/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Batman Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Ahmet ONAY

Danışman (Üye)

Prof. Dr. Engin TİLKAT

Üye

Prof. Dr. Tarık ARAL

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Oğuzhan ÖZDEMİR

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Ömer Murat ÖTER
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 122Z474 no’lu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Ayşe HOŞER MÜJDECİ

Tarih: 07.06.2024

ÖZET

DOKTORA TEZİ

ENDEMİK *Salvia pseudoeuphratica* Rech.f. BİTKİSİNİN HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN OPTİMİZASYONU VE BAZI AgNP UYGULAMALARININ TOTAL FENOLİK, FLAVONOİD, ANTİOKSİDAN AKTİVİTE İLE BAZI TERPENOİD BİLEŞİKLERİN MİKTARLARI ÜZERİNE ETKİLERİ

Ayşe HOŞER MÜJDECİ

Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Engin TİLKAT

2024, 124 Sayfa

Jüri

Prof. Dr. Ahmet ONAY

Prof. Dr. Engin TİLKAT

Prof. Dr. Tarık ARAL

Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER

Dr. Öğr. Üyesi Oğuzhan ÖZDEMİR

Salvia cinsine ait türler, geleneksel tıpta drog olarak kullanılan yapılarında birçok terapötik özellik barındıran önemli bir tıbbi kaynaktır. Bu tez çalışması, özellikle endemik ve tehlike altındaki *Salvia pseudoeuphratica* Rech.f.'in türünün biyoteknolojik yöntemlerle optimize edilmiş bir hücre süspansiyon kültür protokolünün oluşturulmasına odaklanmaktadır. Bu bağlamda, hücre süspansiyon kültürleri yoluyla elde edilen bitkisel materyallerin antioksidan aktivite, enzim inhibisyonu etkileri ve terpenoid bileşiklerindeki etkileri değerlendirilerek, terapötik bileşiklerin biyoteknolojik yöntemlerle sürdürülebilir bir şekilde üretilmesine de katkı sağlamak amaçlanmıştır. Ayrıca, *Salvia pseudoeuphratica* Rech.f.'in AgNP uygulamaları ile terpenoid içeriği, toplam fenolik ve flavonoid miktarları ile antioksidan kapasite değerleri üzerindeki farklı etkileri değerlendirilmiştir. Bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarla, kritik tehlike altında olan ve lokal endemik bir tür olan *Salvia pseudoeuphratica* Rech.f. bitkisinin biyoteknolojik teknikler kullanılarak ilk defa kallus ve hücre süspansiyon kültürleri oluşturulmuş, ayrıca hücre süspansiyon kültürlerinde bazı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) total fenolik, flavonoid, antioksidan aktivite, enzim inhibisyonu ile bazı terpenoid bileşiklerin miktarları üzerine etkileri de ilk kez araştırılmıştır.

Bulgular, *Salvia pseudoeuphratica* Rech.f.'in hücre süspansiyon kültürlerine uygulanan gümüş nanopartiküllerin (AgNP'lerin) antioksidan aktiviteleri üzerinde belirgin etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Özellikle, 24 ve 48 saatlik sürelerde 400 ve 800 µg/ml konsantrasyonlarda uygulanan AgNP'lerin antioksidan aktivitelerinde önemli bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca, DPPH, ABTS ve CUPRAC yöntemleriyle yapılan antioksidan aktivite çalışmaları, DPPH yönteminde 12 Saat 400 µg/ml AgNP uygulaması ($IC_{50}:100,00\pm1,98$ µg/mL), ABTS yönteminde 24 Saat 100 µg/ml AgNP uygulaması ($IC_{50}:56,82\pm0,59$ µg/mL) ve CUPRAC yönteminde ise 24 Saat 400 µg/ml AgNP ($A_{0.5}:79,591\pm0,59$) uygulamasının en yüksek antioksidan aktiviteyi sergilediğini ortaya koymuştur.

Antioksidan etkilerinin yanı sıra, AgNP'lerin bitki hücrelerinde enzim aktiviteleri üzerinde de belirgin etkileri olduğu görülmüştür. Özellikle, BChE enzim aktivitesi üzerinde 24 saatlik süre içinde 400 µg/ml AgNP uygulamasının belirgin bir artışa neden olduğu tespit edilmiştir. Bu, *Salvia pseudoeuphratica*

Rech.f.'in biyolojik aktivitelerini düzenleyen AgNP uygulamalarının, özellikle BChE üzerindeki etkisinin zaman ve konsantrasyona bağı olarak değişebileceğini göstermektedir. Bunun yanı sıra sonuçlar hem toplam fenolik ($22,43 \pm 0,50$ µg PEs/mg ekstre) hem de total flavonoid ($11,02 \pm 0,26$ µg QEs/mg ekstre) içerikleri bakımından 24 saat 400 µg/ml AgNP uygulamasının diğer parametrelere oranla iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Terpenoid analizi sonuçları, AgNP uygulamalarının, bitki kültürlerindeki terpenoid profiline önemli etkiler sağladığını ve özellikle oleanolik asit miktarında belirgin artışlara neden olduğunu göstermektedir. Oleanolik asit'in AgNP uygulaması yapılmayan kontrol grubu örneklerinde bulunmadığı halde bütün AgNP uygulamalarının Oleanolik asit'in sentezinin uyardığı tespit edilmiştir. Süspansiyon kültürlerinde üretilen en yüksek Oleanolik asit miktarı 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasında 3995,80 µg analit/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Bu durum, AgNP'lerin bitki metabolizmasını etkileyerek belirli terpenoidleri artırma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur. Sonuç olarak, bu çalışma ile, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.'in hücre süspansiyon kültürlerinde AgNP uygulamalarının antioksidan aktiviteler, enzim aktiviteleri ve terpenoid profil üzerindeki etkileri detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Salvia pseudeuphratica*, hücre süspansiyon kültürleri, AgNP uygulamaları, biyolojik aktivite, terpenoid üretimi.

ABSTRACT
Ph.D. THESIS

**OPTIMIZATION OF CELL SUSPENSION CULTURES OF ENDEMIC PLANT
Salvia pseudeuphratica Rech.f. AND EFFECTS OF SOME AGNP APPLICATIONS
ON TOTAL PHENOLIC, FLAVONOID, ANTIOXIDANT ACTIVITY, AND
SOME TERPENOID COMPOUND LEVELS**

Ayşe HOŞER MÜJDECİ

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
BATMAN UNIVERSITY THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY IN
BIOLOGY**

Advisor: Prof. Dr. Engin TİLKAT

**2024, 124
Pages**

Jury

Prof. Dr. Ahmet ONAY

Prof. Dr. Engin TİLKAT

Prof. Dr. Tarık ARAL

Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER

Dr. Öğr. Üyesi Oğuzhan ÖZDEMİR

The species belonging to the *Salvia* genus are important medicinal sources containing many therapeutic properties used in traditional medicine. This thesis focuses on the establishment of cell suspension cultures of *Salvia pseudeuphratica* Rech.f., especially an endemic and endangered species, using biotechnological methods. In this context, the aim is to contribute to the sustainable production of *Salvia pseudeuphratica* Rech.f. through the evaluation of antioxidant activity, enzyme inhibition effects, and the effects on terpenoid compounds of plant materials obtained via cell suspension cultures. Additionally, the effects of AgNP (silver nanoparticle) applications on the terpenoid content, total phenolic and flavonoid amounts, and antioxidant capacity values of *Salvia pseudeuphratica* Rech.f. are evaluated. Through the conducted studies within the scope of this thesis, callus and cell suspension cultures of *Salvia pseudeuphratica* Rech.f., a critically endangered and locally endemic species, have been established for the first time using biotechnological techniques. Furthermore, the effects of some AgNP applications (100, 200, 400, and 800 µg/ml) on the amounts of total phenolics, flavonoids, antioxidant activity, enzyme inhibition, and some terpenoid compounds in cell suspension cultures have been investigated for the first time.

The findings indicate significant effects of silver nanoparticles (AgNPs) applied to cell suspension cultures of *Salvia pseudeuphratica* Rech.f. on antioxidant activities. Particularly, a significant increase in antioxidant activities has been observed with AgNPs applied at concentrations of 400 and 800 µg/ml for 24 and 48 hours. Additionally, antioxidant activity studies conducted with DPPH, ABTS, and CUPRAC methods revealed that the application of 400 µg/ml AgNP for 12 hours in the DPPH method (IC₅₀: 100.00±1.98 µg/mL), 100 µg/ml AgNP for 24 hours in the ABTS method (IC₅₀: 56.82±0.59 µg/mL), and 400 µg/ml AgNP for 24 hours in the CUPRAC method (A_{0.5}: 79.591±0.59) exhibited the highest antioxidant activity. In addition to antioxidant effects, significant effects of AgNPs on enzyme activities in

plant cells have been observed. Particularly, a significant increase in BChE enzyme activity has been detected within 24 hours of applying 400 µg/ml AgNP. This demonstrates that AgNP applications regulating the biological activities of *Salvia pseudeuphratica* Rech.f., especially their effects on BChE, may vary depending on time and concentration. Moreover, the results have determined that the application of 400 µg/ml AgNP for 24 hours yielded good results compared to other parameters in terms of both total phenolic (22.43 ± 0.50 µg PEs/mg extract) and total flavonoid (11.02 ± 0.26 µg QEs/mg extract) contents. Terpenoid analysis results indicate that AgNP applications significantly affect the terpenoid profile in plant cultures and particularly lead to significant increases in oleanolic acid levels. While oleanolic acid was not found in the control group samples without AgNP application, it was observed that all AgNP applications stimulated its synthesis. The highest amount of oleanolic acid produced in suspension cultures was determined to be 3995.80 µg analyte/g extract in the 24-hour 400 µg/ml AgNP application. This demonstrates the potential of AgNPs to influence plant metabolism and increase certain terpenoids.

In conclusion, this study comprehensively examines the effects of AgNP applications on antioxidant activities, enzyme activities, and terpenoid profiles in cell suspension cultures of *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.

Keywords: AgNP applications, biological activity, cell suspension cultures, terpenoid production, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.

ÖNSÖZ

Lisans öğrenimimin ilk yıllarında tanıştığım, bana akademiye sevdiren ve lisans eğitimimden doktora sürecine kadar bana rehberlik eden, fikirleriyle ufkumu genişleten Prof. Dr. Engin TİLKAT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımın biyolojik aktivitelerin belirlenmesi aşamalarında değerli yardım ve rehberliklerini gördüğüm, aynı zamanda eş danışmanım olan Dr. Mehmet AKDENİZ ile her zaman pozitif yaklaşımı ile bana yön veren Prof. Dr. Abdulselam ERTAŞ hocalarıma da içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Aynı şekilde, lisans öğrenimimin ilk yıllarından beri tanıdığım, samimiyeti ve güler yüzüyle benden desteğini esirgemeyen, doktora tezimi başarılı bir şekilde tamamlamamda büyük emeği olan Prof. Dr. Emine AYAZ TİLKAT'a teşekkür ederim.

Bütün bu süreçlere tanıklık eden sevgili Enes Berke'ye, bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, laboratuvar çalışmalarımda bana büyük katkı ve kolaylık sağlayan Dr. Öğr. Üyesi Veysel SÜZERER'e minnettarlığımı ifade ederim.

Araştırma sürecinde 122Z474 No'lu proje ile mali destek sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) ve YÖK 100/2000 Doktora Bursu Projesi ile destek veren Yüksek Öğretim Kurumu'na (YÖK) teşekkür ederim.

Batman Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı ekibine (Züleyha TOPTAMUR, Elif DEMİR TUNÇ, Hayri BATIBAY, Nesrin BOZHAN, Merve DADANLAR, Orhan YEL, Merve BALAMUR) katkılarından dolayı minnettarım.

Hayatımın her alanında olduğu gibi öğrenim hayatımda da en büyük destekçim olan eşim Muhammet MÜJDECİ'ye ve beni bu seviyeye getiren, her türlü ihtiyaç ve yardıma koşan, her şeyimi borçlu olduğum sevgili annem Muhbet HOŞER ve babam Sadık HOŞER'e, abim Mehmetcan, ablam Nazan ile kardeşlerim Mesut, Leyla ve Feyzi HOŞER'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım. İyi ki varsınız, hiçbir zaman elinizi üzerimden çekmeyin...

Sizlere sonsuz teşekkürlerimi ve minnettarlığımı sunarım...

Ayşe HOŞER MÜJDECİ
BATMAN-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	x
ŞEKİLLER TABLOSU.....	xii
ÇİZELGELER TABLOSU.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
Simgeler	xiv
Kısaltmalar	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	8
2.1. <i>Salvia pseudeuphratica</i> Rech. f. Türü Hakkında Genel Bilgiler	8
2.1.1. Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası	8
2.1.2. <i>Salvia</i> L. cinsi.....	9
2.1.3. <i>Salvia pseudeuphratica</i> Rech. f. türü	10
2.1.4. İklim ve toprak istekleri	12
2.1.5. Ekonomik önemi	12
2.1.6. <i>Salvia</i> cinsi ve tıbbi önemi	13
2.1.6.1. Kolinerjik etkisi	13
2.1.6.2. Antioksidan etkisi	14
2.1.6.3. Antienflamatuar etkisi.....	15
2.1.6.4. Antidepresan ve anksiyolitik etkisi	15
2.1.6.5. Antikanser etkisi	18
2.1.7. Endemik <i>Salvia</i> türleri ve IUCN tehlike kategorileri.....	18
2.2. Doku Kültürü Uygulamaları	20
2.2.1. Kallus ve hücre süspansiyon kültürleri	21
2.2.2. Sekonder metabolit üretimi için doku kültürleri	23
2.2.3. İkincil metabolit üretiminde hücre süspansiyon kültürlerinin önemi	23
2.2.4. Elisitör olarak nanopartiküller	30
2.2.4.1. Nanoteknoloji ve nanomalzemeler	30
2.2.5. <i>Salvia</i> 'da elisitasyon yoluyla biyoaktif metabolitlerin artırılması.....	33
2.2.6. Hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini teşvik edici stratejiler	36
3. MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1. Materyal	38
3.1.1. Çalışma materyali	38
3.2. Yöntem.....	39
3.2.1. Olgun tohumların yüzey sterilizasyonu	39
3.2.2. Kallus kültürlerinin başlatılması	39
3.2.3. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması	39
3.2.4. Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu.....	40
3.2.4.1. Farklı karbon kaynaklarının süspansiyon gelişimine etkisi.....	40

3.2.4.2. Süspansiyon gelişimine farklı ışık yoğunluklarının etkisi.....	40
3.2.4.3. Süspansiyon gelişimine farklı çalkalama hızlarının etkisi.....	40
3.2.4.4. Süspansiyon gelişimine farklı pH'ın etkisi.....	41
3.2.5. Süspansiyon kültüründe büyüme eğrisinin belirlenmesi	41
3.2.6. İkincil metabolit üretimine AgNP elisitasyonun etkisi	41
3.2.7. Süspansiyon kültürlerinde ölçüm parametreleri	41
3.2.7.1. Paketlenmiş hücre hacminin (PHH) hesaplanması.....	42
3.2.7.2. Taze ağırlığın hesaplanması.....	42
3.2.7.3. Kuru ağırlığın hesaplanması.....	42
3.2.8. Kültür koşulları ve süresi	43
3.2.8.1. Çalışmaları	43
3.2.9.1. Ekstraksiyon işlemi.....	43
3.2.9.2. Toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini	43
3.2.9.3. Antioksidan aktivite çalışmaları	46
3.2.9.4. Enzim inhibisyon tayini.....	47
3.2.10. GC-MS/MS ile terpenoidlerin kantitatif analizi.....	50
3.2.11. İstatistiksel analiz	51
4. BULGULAR	52
4.1.Kallus Kültürlerinin Başlatılması	52
4.2. Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması.....	54
4.3. Süspansiyon Kültürlerinin Optimizasyonu	54
4.3.1.Farklı karbon kaynaklarının süspansiyon gelişimine etkisi	54
4.3.2. Süspansiyon gelişimine farklı ışık yoğunluklarının etkisi	56
4.3.3.Süspansiyon gelişimine farklı çalkalama hızlarının etkisi	57
4.3.4. Süspansiyon gelişimine farklı pH etkisi	59
4.4. Süspansiyon kültüründe büyüme eğrisinin belirlenmesi	59
4.5. İkincil metabolit üretimine AgNP elisitasyonun etkisi	62
4.6. Toplam Fenolik ve Flavonoid Miktarı ve Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi (DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi, ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi ve Yöntemi, CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)	65
4.6.1. Toplam fenolik ve flavonoid miktarı.....	65
4.6.2. Antioksidan aktivite çalışmaları (DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, ABTS katyon radikali giderim aktivitesi ve yöntemi, CUPRAC yöntemi (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi).....	66
4.7. Enzim inhibisyon tayini.....	67
4.8. GC-MS/MS ile Terpenoidlerin Kantitatif Analizi.....	70
5. TARTIŞMA.....	72
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	79
KAYNAKLAR.....	80
EKLER.....	94
ÖZGEÇMİŞ.....	107

ŞEKİLLER TABLOSU

Şekil 2.1. <i>S. pseudeuphratica</i> 'nın genel görünüşü.....	11
Şekil 2.2. <i>S. pseudeuphratica</i> yayılışı haritası.....	11
Şekil 2.3. <i>Salvia</i> bitkilerindeki ana bileşenler ve potansiyel aktiviteleri.....	17
Şekil 3.1. <i>S. pseudoeuphratica</i> Rech.f. tohumları	38
Şekil 3.2 <i>S.pseudoeuphratica</i> Rech. f. bitkisinin tohumlarından elde edilen kallus ve hücre süspansiyon kültürlerine AgNP uygulamaları ve ekstraksiyon süreci.....	58
Şekil 4.1. 1 mg/l farklı oksin ve sitokinin kombinasyonlarını içeren MS besisi ortamında kültüre alınan kallus gelişimi	52
Şekil 4.2. Kallus kültürlerinden süspansiyon kültürlerinin oluşturulması	54
Şekil 4.3. <i>S. pseudoeuphratica</i> Rech.f. ait süspansiyon kültürlerinin genel görüntüsü	56
Şekil 4.4a. Süspansiyon kültürlerinde PHH bakımından büyüme eğrisi grafiği.	61
Şekil 4.4b. Süspansiyon kültürlerinde yaş ağırlık bakımından büyüme eğrisi grafiği.	61
Şekil 4.4c. Süspansiyon kültürlerinde kuru ağırlık bakımından büyüme eğrisi grafiği.....	61
Şekil 4.5. 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasına ait kromatogram	71

ÇİZELGELER TABLOSU

Çizelge 2.1. Türkiye’de yetişen endemik <i>Salvia</i> türleri ve IUCN tehlike kategorileri	19
Çizelge 2.2. Çeşitli doku kültürü yöntemleriyle üretilen <i>Salvia</i> türleri ve metabolitleri).	26
Çizelge 4.1. 1mg/l konsantrasyonlarda hazırlanan farklı oksin (IAA, IBA ve 2,4-D) ve sitokinin (BAP, Kin ve TDZ) kombinasyonu destekli MS besi ortamında kallus oluşum	53
Çizelge 4.2. Farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonlarının süspansiyon gelişimine etkisi	55
Çizelge 4.3. Farklı ışık yoğunluğunun süspansiyon gelişimine olan etkisi.....	57
Çizelge 4.4. Farklı çalkalama hızlarının süspansiyon gelişimine etkisi.....	58
Çizelge 4.5. Besi ortamında farklı pH’nın süspansiyon gelişimine olan etkisi.....	59
Çizelge 4.6. Süspansiyon kültürlerinde büyümenin hesaplanması	60
Çizelge 4.7a. Süspansiyon kültürlerinde Farklı AgNP konsantrasyonu ve uygulama zamanının PHH üzerine etkisi	62
Çizelge 4.7b. Süspansiyon kültürlerinde farklı AgNP konsantrasyonu ve uygulama zamanının yaş ağırlık üzerine etkisi.....	63
Çizelge 4.7c. Süspansiyon kültürlerinde farklı AgNP konsantrasyonu ve uygulama zamanının kuru ağırlık üzerine etkisi.....	64
Çizelge 4.8. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin toplam fenolik ve flavonoid miktarı	65
Çizelge 4.9. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin antioksidan aktiviteleri üzerine etkileri.	66
Çizelge 4.10. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin AChE Aktivite Testi, BChE Aktivite Testi ve Üreaz Enzimi aktiviteleri üzerine etkileri	68
Çizelge 4.11. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin Tirozinaz Enzim Aktivitesi, Elastaz Enzim Aktivitesi ve Kollajenaz Enzim aktiviteleri üzerine etkileri	69
Çizelge 4.12. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin bazı terpenoid miktarları üzerine etkileri	70

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

AcI	:Asetiltiyokolin iyodür
Ag	:Gümüş
AgNP	:Gümüş Nanopartikülü
Au	:Gümüş
B5	:Gamborg (1968)
BuI	:Bütirilkolinyodür
°C	:Santigrat derece
Ca ²⁺	:Kalsiyum İyonları
CuO	:Bakır oksit nanopartiküllerin
CuONP	:Bakır oksit nanopartiküller
Fe ₃ O ₄ NP	:Demir Oksit Nanopartiküller
Na ₂ CO ₃	:Sodyum Karbonat
NaOCl	:Sodyum hipoklorit
NaOH	:Sodyum hidroksit
SiO ₂	:Silikon Dioksit
TiO ₂	:Titanyum dioksit
TiO ₂ NP	:Titanyum oksit nanopartiküller
ZnO	:Çinko oksit
ZnONP	:Çinko oksit nanopartiküller

Kısaltmalar

AA	: Askorbik Asit
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
ACh	: Asetilkolinin
AChE	: Asetilkolinesteraz
BA	: Betulinik Asit
BABA	: Beta-Aminobütirik Asit
BAP	: Benzil amino pürin
BBD	: Bitki büyüme düzenleyicileri
BBO	: Bitki Büyütme Odası
BChE	: Kolinesteraz enzim aktivitesi
cm	: Santimetre
CR	: Kritik tehlike altında
CT	: Kriptotanshinon
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DEHB	: Dikkat Eksikliği Hiperaktivite Bozukluğunu
Dk	: Dakika
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit
dH ₂ O	: Distile Su

DW	: Kuru ağırlık
EN	: Tehlikede
EtOH	: Etilalkol
FCR	: Folin-Ciocalteu Reaktifi
g/l	: Gram/litre
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi
gr	: Gram
HCl	: Hidroklorik Asit
IAA	: Indol asetik asit
IBA	: İndol bütirik asit
IUCN	: Uluslararası Doğa Koruma Birliği
Kg	: Kilogram
Kin	: Kinetin
M	: Metre
M	: Molar
m ² s ⁻¹	: Metre ² /saniye
MeJA	: Metil Jasmonat
mg	: Miligram
mg/g	: Miligram/Gram
mg/l	: Miligram/litre
ml	: Mililitre
Mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
MS	: Murashige ve Skoog
NAA	: Naftalen asetik asit
Nm	: Nanometre
NP	: Nanopartikül
NP	: Nanopartiküller
Np	: Nanopartükül
OA	: Oleanolik Asit
pH	: Hidrojen iyon konsantrasyonu
PHH	: Paketlenmiş Hücre Hacmi
Ppm	: Milyonda Bir Birim
RA	: Rosmarinik asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türlerini
RPM(rpm)	: Dakikada Dönme Hızı (Rotation Per Munite)
s	: Saat
Sn	: Saniye
TE	: Tespit Edilmedi
TDZ	: Thidiazuron
TFİ	: Toplam flavonoid içeriği
UA	: Ursolik Asit
UV	: Ultraviyole
VU	: Savunmasız

w/w	: Ağırlıkça Yüzde
YE	: Maya Ekstresi
Mg	: Mikrogram
ml	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
μ g/ml	: Mikrogram/mililitre
2,4-D	: 2,4 Diklorofenoksi asetik asit



1. GİRİŞ

Bitkiler, tıbbi, kozmetik ve endüstriyel alanlarda kullanılan birçok değerli bileşik içermeleri nedeniyle, biyoteknolojik çalışmalarda büyük önem taşımaktadır. Doğal ürünler, yıllardır insan sağlığına katkı sağlayan etkili biyoaktif bileşiklerin asıl kaynağını oluşturmuşlardır. Bitki özlerinin antioksidan aktiviteleri, polifenolik içeriklerinin niteliği, zenginliği oran ve nispetinde büyük bir öneme sahiptir. Yüksek polifenollerin düzeylerine sahip bitkiler, doğal antioksidan kaynakları olarak sağlık açısından kritik bir rol oynar. Antioksidanlar, okside bileşikler baskılamaya yönelik önemli bileşenlerdir. Canlı organizmalar, çevresel etkiler ve metabolik faaliyetler sonucunda reaktif oksijen türleri (ROT) üretirler. Yüksek düzeyde üretilen ROT, canlı organizmalarda zararlı hale gelebilir. Antioksidan bileşikler, ROT'un olumsuz etkilerini bastırarak bu zararı önler. Antioksidan bileşiklerin yetersiz olduğu durumlarda oksidatif stres meydana gelir. Serbest radikaller, kanserler, nörolojik bozukluklar ve kardiyovasküler hastalıklar dâhil olmak üzere çeşitli kronik hastalıkların başlangıcıdır.

Tıbbi bitkiler, insanlığın ilk günlerinden beritedavi edici drog olarak kullanılmaktadırlar. Günümüzde ilaçların %80'inden fazlası, güçlü farmakolojik özellikleri, düşük toksisitesi ve düşük maliyeti nedeniyle doğrudan veya dolaylı olarak tıbbi bitkilerle bağlantılıdır. Birçok durumda, tıbbi bitkilerden izole edilen doğal enzim inhibitörleri, sayısız insan patolojisinin tedavisi için yararlı terapötik araçlar olarak kabul edilmektedir (Uysal ve ark. 2021). Özellikle antioksidan kapasiteleri yüksek olan bitkiler, oksidatif stresle ilişkilendirilen çeşitli kronik hastalıklara karşı koruyucu etki gösterirler. Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerini baskılayarak oksidatif stresi önlerler. Parkinson, Alzheimer, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıkların başlangıcını engelleyebilir. Bu bağlamda tıbbi bitkiler, insanlık tarihinde tedavi amaçlı kullanılmış ve günümüzde hala bu tedavi edici rollerini sürdürmektedirler.

Genelde hoş kokulu bitkilerin bulunduğu Lamiaceae familyası, dünyada yaklaşık 250 cins ve 7000 tür ile temsil edilmektedir. Ballıbabagiller olarak da bilinen Lamiaceae familyası, tıpta ve parfümeride yaygın kullanım alanı bulan ve uçucu yağlar bakımından zengin olan *Salvia*, *Rosmarinus*, *Mentha*, *Origanum*, *Thymus*, *Lavandula* ve *Melissa* gibi cinsleri kapsar. *Salvia* cinsi takson sayısı ve

kullanım alanı bakımından familyanın en önemli cinslerinden biri olup büyüme formları, içerdiği ikincil bileşikler, çiçek morfolojisi ve tozlaşma biyolojisinde dikkate değer bir çeşitlilik gösterir (Kahraman ve ark., 2010; Kriebel ve ark., 2019). Ayrıca, 126 tür ve tür altı taksonu bulunan *Stachys* cinsinden sonra, 58'i endemik olmak üzere 107 takson (98 türe bağlı 8 alttür ve 6 varyete) ile de sıralama bakımından Türkiye'nin ikinci en büyük cinsidir (Uyanık 2017, Kuşaksız 2019). Bu türlerin 58 tanesi (% 59,7) İran-Turan, 27 tanesi (%27,8) Akdeniz, 5 tanesi (% 5) Avrupa-Sibirya elementi olup, kalan 7 tanesi ise (%7) birden fazla fitocoğrafik bölgede bulunmaktadır (Doğan ve ark., 2008). Ülkemizde adaçayı, puhur, elma çayı, şalba ve ayıkulağı gibi yöresel isimlerle anılır. Ülkemizde doğal yayılışı dışında çeşitli bölgelerimizde kültürü yapılmaktadır. Çiçekleri bahçelerde ve parklarda dekoratif süs bitkileri olarak yetiştirilmektedir. Bu cinsin bitkileri, özellikle Akdeniz bölgesi çevresindeki Avrupa'nın tropikal ve ılıman bölgelerinde, Güneydoğu Asya'da ve Orta ve Güney Amerika'da yaygın olmasına rağmen, dünya çapında dağılmıştır (Drew ve ark., 2017; Afonso ve ark., 2021). Türkiye'nin Akdeniz ve Ege sahillerinde yaygın dağılışı gösteren bu bitkiler, her yıl Almanya ve diğer Avrupa ülkelerine ihraç edilmek üzere doğadan toplanmaktadır.

Tezimizin konusu ve odak noktasını oluşturan *Salvia pseudeuphratica* Rech. f.'in de dahil olduğu *Salvia* cinsi, terpen, fenolik ve flavonoid gibi değerli ikincil metabolitleri içeren bitkileri içerdiği için önemlidir. Bu metabolitler, antienflamatuar, hepatoprotektif, sitotoksik/antitümör, antikanser ve antioksidan aktiviteler gibi çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. *Salvia* bitkileri, aynı zamanda antioksidan aktiviteye sahip olan polifenoller bakımından zengin bir kaynaktır (Bonesi ve ark., 2017).

Salvia pseudeuphratica Rech.f. ise, Türkiye'ye özgü endemik bir tür olup, bu çalışma kapsamında incelenmiştir. Bu tür, 750-900 m yükseklikte, kumul alanlar, kayalık-taşlık bölgeler ve orman altı gibi çeşitli habitatlarda doğal olarak yetişir. Ancak, popülasyonunun %80'inin yok olma riski taşıdığı kritik bir tehlike altında bulunan türler arasında yer alır. *Salvia pseudeuphratica* IUCN tarafından "kritik tehlike altında" kategorisinde bir tür olarak belirlenmiştir. Bu endemik tür, ülkemizde B7 (Elâzığ: Keban-Maden) karesinde ve riskli türler grubunda lokal endemik bir taksondur. Popülasyonunun neslinin devamı ve doğal habitatlarda korunması büyük önem taşımaktadır (Kahraman ve ark., 2012).

Salvia kelimesi etimolojik olarak, eski çağlardan beri iyileştirici özelliğinden dolayı “şifacı” anlamına gelen Latince “salvare” kelimesinden gelmektedir. *Salvia* cinsine ait türler, terpen, fenolik ve flavonoid gibi değerli ikincil metabolitlerin çoğunu içerdiğinden, antienflamatuvar, hepatoprotektif, sitotoksik/antitümör, antikanser ve antioksidan gibi pek çok aktiviteye sahiptir (Martínez-Cruz ve Paredes-López, 2014; Bayan ve Genç 2016; Poyraz ve ark., 2019, Privitera ve ark., 2019; Mohammed ve ark, 2021; Emre ve ark., 2021).

Salvia cinsinin tıbbi önemi, yaprakları ve uçucu yağlarındaki bileşenlerden kaynaklanmaktadır. Adaçayı esansiyel yağında yaklaşık 120 farklı bileşik tanımlanarak, ana bileşiklerin mono-, seski- ve diterpenler bakımından zengin olduğu bildirilmiştir (Đurović ve ark., 2022). *Salvia* bitkileri, antioksidan aktivite gösteren yüksek miktarda polifenol bileşikler içerir, bu nedenle doğal antioksidan kaynakları olarak büyük önem taşır. *Salvia* bitkileri, bir dizi fenolik asit ve flavonoid içeren 160'tan fazla tanımlanmış polifenol ile zengin bir polifenol bileşikler kaynağıdır. Bu fenolik bileşiklere kafeik asit ve türevleri, rosmarinik asit, salvianolik asitler, sagekumarin, litospermik asitler, sagernik asit ve yunnaneik asitler dâhildir. En yaygın flavonoidler luteolin, apigenin, hispidulin, kaempferol ve kersetindir. *Salvia* cinsinin bitkileri α ve β -thujone, kafur, 1,8sineole, α -humulen, β -karyofillen ve viridiflorol gibi geniş bir terpenoid dizisi ile uçucu yağlar açısından da zengindir. Ayrıca karnosik asit, ursolik asit, karnosol ve tansinonlar gibi zengin diterpen ve triterpen kaynaklarıdır (Lopresti, 2017).

Bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesi, temel olarak içerdikleri polifenolik bileşiklerin kalitesinden kaynaklanır. Antioksidanlar, reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerini bastırarak oksidatif stresin önlenmesine yardımcı olur. Oksidatif stres, birçok kronik hastalığın başlangıcına neden olabilir, bu nedenle bitki kaynaklı antioksidanlar insan sağlığı açısından büyük önem taşır. Bir başka deyişle, antioksidanlar, okside bileşikleri baskılamaya yarayan bileşiklerdir. Canlı organizmalar, çevresel etkiler ve metabolik faaliyetler sonucunda ROT üretirler. Yüksek düzeyde üretilen ROT, canlı organizmalarda zararlı hale gelebilir. Antioksidan bileşikler ROT 'un olumsuz etkilerini bastırır. Antioksidan bileşiklerin yetersiz olduğu durumlarda oksidatif stres oluşur. Oksidatif stresin bir sonucu olarak ortaya çıkan çeşitli hastalıklar arasında Parkinson, Alzheimer, kanser veya kardiyolojik bozukluklar bulunmaktadır.

Salvia türlerinden elde edilen doğal polifenoller, özellikle kolinesteraz enzimlerini inhibe edici aktivite gösterir ve bu nedenle Alzheimer tedavisinde potansiyel terapötik araçlar olarak kabul edilir (Leporini ve ark., 2020; Akgül ve ark., 2020). Alzheimer, beyindeki kolinerjik nöron kaybı, nörofibriler yumak oluşumu ve β amiloid birikimi ile karakterize nörodejeneratif bir hastalıktır. Kolinesteraz enzim inhibitörleri, bu tür nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılır. *Salvia* türlerinden elde edilen doğal polifenoller, kolinesteraz enzimlerini inhibe edici aktivite gösterir ve bu nedenle Alzheimer tedavisinde potansiyel terapötik araçlar olarak kabul edilir (Leporini ve ark., 2020; Akgül ve ark., 2020).

İçerdikleri fenolik bileşiklerin zengin çeşitliliği sayesinde sadece antioksidan kapasiteleriyle değil, aynı zamanda etkili bir antimikrobiyal aktiviteyle de dikkat çekerler. Bazı bitki özleri, kalp ve zihinsel hastalıklar ile kanser gibi çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde kullanılır (Martínez-Cruz ve Paredes-López, 2014). Eski çağlardan günümüze kadar boğaz ağrıları, soğuk algınlığı, grip, gece terlemeleri ve tüberküloz gibi rahatsızlıkların yanı sıra menopoz şikayetleri için, sakinleştirici ve yatıştırıcı olarak, bazı kanser türlerinin tedavisinde ve hatta Çin’de “angina pectoris” ve “miyokardiyal enfarktüs” gibi kalp hastalıklarının tedavisinde halk arasında kullanıldığı bilinmektedir (Tünay ve ark., 2015). Ayrıca, içerdği uçucu yağlar ve uçucu olmayan fenolik bileşikler sayesinde antibakteriyel ve antioksidan özellikleri nedeniyle Avrupa ve birçok başka ülkede gıda koruyucu olarak da kullanılmaktadır.

Bitki kaynaklı doğal ürünler, 40 yılı aşkın süredir umut verici ve güçlü kemoterapötik ajanlar olarak kabul edilmektedir (Demain ve Vaishnav, 2011). Kanser, genellikle küresel olarak önde gelen ve ölüme yol açan bir grup tehlikeli hastalığı temsil eder (Ferlay ve ark. 2021). 2020’de yaklaşık on milyon ölüme neden olup, tahminen 19 milyon yeni kanser vakası teşhis edilmiştir (Sung ve ark. 2021). Yaşlanan nüfustaki artış, hareketsiz yaşam tarzının benimsenmesi, kötü beslenme ve diğerleri gibi faktörler nedeniyle dünyanın hem gelişmiş hem de gelişmekte olan bölgelerinde kanser insidansı küresel olarak artmaktadır. Kanserlerin tedavileri şu anda radyasyon, kimyasal tedaviler, ameliyatlar veya bunların bir kombinasyonunu içermektedir. Bu yöntemlerin bazıları, özellikle radyoterapi ve ameliyatlar, klinik olarak halen faydalı olsa da ciddi rahatsızlıklara

neden olabilir. Benzer şekilde birçok antikanser ilacı ciddi yan etkilere sahipken, bazı kanser hücreleri bazı antikanser ilaçlara karşı direnç geliştirmiştir. Bu nedenle, normal hücreleri korurken kanser hücrelerine seçici olarak toksik olan klinik olarak etkili ilaçlara ihtiyaç vardır. Bu bağlamda bitkilerden elde edilen doğal ürünler ile ilgili biriken literatür bitkileri yeni antikanser ajanların potansiyel kaynakları olarak konumlandığı için, bitkiler son yıllarda bilimsel açıdan ilgi görmektedir. *Salvia*, *Zanthoxylum*, *Allium* ve *Zingiber* türlerinin alternatif tıpta birçok tümör ve kanser türünün tedavisinde uygulandığı bildirilmiştir (Ezema ve ark., 2022).

Salvia türlerinden şekerleme, pastacılık, antioksidan takviye, kozmetik, et ve konserve sanayi gibi birçok alanda da faydalanılmaktadır. Özellikle yemeklerde baharat ve çay şeklindeki kullanımı oldukça yaygındır (Baydar, 2013). Geleneksel olarak, *Salvia* çayı astım, depresyon, bronşit, faranjit, aşırı terleme, öksürük, ağız ve boğaz iltihapları, sindirim ve dolaşım problemleri, cilt sorunları ve birçok diğer hastalığın tedavisinde kullanılmıştır. Adaçayı yağı ise güçlü antiseptik ve antibiyotik özellikler barındırır. Dolayısıyla, üst solunum yolları hastalıklarının tedavisinde kullanılan ilaçlara ham madde olarak eklenmektedir (Coşge Şenkal ve ark., 2016).

Türkiye'de bulunan *Salvia* türleri, genellikle çalimsı ya da otsu yapıdadır. Çalimsı olanlar, yaklaşık olarak 1.5 metre yüksekliğe erişebilir. Çoğunlukla aromatik kokulu, genellikle çok yıllık, nadiren iki ve tek yıllık bitkilerdir (Doğan ve ark., 2008). Çok yıllık yarı çalimsı bitkiler grubuna giren *S. pseudoeuphratica* 20-35 cm uzunluğunda gövdeleri yatık veya dik, tüylü, yaprakları basit, taç yapraklar menekşe mavisi, meyveleri kahverengiden siyaha doğrudur (Şekil 1.1). Çiçeklenme dönemi Mayıs, nadiren Haziran'a kadar olup, kayalık-taşlık, kalkerli yamaçlar, kumul alanlar, step, yol kenarındaki yamaçlar, serpantinli alanlar, maki arası, orman altı ve tuzcul alanlar olmak üzere çeşitli birçok habitat türünde ve 750-900 m yükseltilerde doğal olarak yetişir (Kahraman ve ark., 2012) *S. pseudoeuphratica* üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlı olup, uçucu yağlarında başlıca Kâfur ve 1,8-sineol bulunduğu (Karakuş ve ark., 2017; Temel ve ark., 2016) ve antialzheimer aktiviteye sahip olduğu (Temel ve ark., 2016), ayrıca HT-29 ve MCF-7 hücre serilerine karşı da sitotoksik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Ertaş, 2018; Fidan, 2019).

Son yıllarda uluslararası alanda nadir endemik türlerin konzervasyonu için çok ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Endemik *Salvia* türlerinin yok olabileceği

ihtimali nedeniyle bu türlerin korunma altına alınmaları elzemdir (Uyanık, 2017). *Salvia* cinsi önemli tıbbi özelliklere sahip olduğundan, bu bitkiler doğal ortamlarından sökülerek pazarlarda yerini almakta bu durum özellikle endemik türler için neslin devamlılığı açısından tehlike arz etmektedir. Türlerin küresel koruma statüsüne ilişkin en önemli bilgi kaynağı, IUCN (Uluslararası Doğa Koruma Birliği)'nin tehdit altındaki türlerin kırmızı listesidir ve son verilere göre, 15.774 tehdit altındaki bitki türü vardır (Coelho ve ark., 2020). Ülkemizde *Salvia* cinsinin tehlike kategorisine bakıldığında, 42 taksonun değişik tehlike kategorilerinde olduğu tespit edilmiştir. *Salvia* türleri içerisinde IUCN kriterlerine göre tehlike kategorisi 'CR' (kritik tehlike altında) olan 11 tür bulunmaktadır (*S. pseudeuphratica*, *S. anatolica*, *S. ballsiana*, *S. freyniana*, *S. hedgeana*, *S. marashica*, *S. odontochlamys*, *S. quezelii*, *S. sericeotomentosa*, *S. tigrina* ve *S. vermifolia*) (İpek ve Gürbüz 2010). Nitekim bu türlerden biri olan *Salvia pseudeuphratica* da ülkemizde B7 (Elâzığ: Keban-Maden) karesinde ve riskli türler grubunda yer alan lokal endemik bir taksondur. Son zamanlarda popülasyonunun % 80'inin yok olma riski taşıdığına dair kanıtlar mevcuttur. *Salvia* türleri önemli tıbbi özelliklere sahip olduğundan, bu bitkiler doğal ortamlarından sökülerek pazarlarda yerini almakta dolayısıyla bu durum özellikle endemik türler için neslin devamlılığı açısından tehlike arz etmektedir (Uyanık, 2017).

Modern biyoteknolojik yöntemler, bitkilerin doğal çoğaltımına yönelik karşılaşılan sorunların üstesinden gelinmesinin yanı sıra, bazı değerli ikincil metabolitlerin daha fazla üretilmesine de imkân sağlayabilmektedir. Bu bağlamda en fazla kullanılan biyoteknolojik yöntemlerin başında kallus, süspansiyon, gövde teratomaları, saçak kök kültürleri gelmektedir. Hücre süspansiyon kültürleri homojen, hızlı büyüyen bir materyal sağladığı ve ölçeklendirilmesi kolay olduğu için tercih edilen ve güvenilir bir yaklaşımdır. Koşulların tekrarlanabilirliği, süspansiyon kültürlü hücreleri hücresel ve moleküler seviyelerde karmaşık fizyolojik süreçlerin analizi için uygun hale getirir. Ayrıca bitki hücre süspansiyon kültürleri, yüksek değerli ikincil metabolitlerin ve ticari açıdan ilgi çekici diğer maddelerin üretimi için de değerli bir platform sağlar (Moscatiello ve ark., 2013). Bu tür kültürlerde alkaloidler, flavonoidler, polifenoller, terpenler, triterpenler ve kardiyak glikozitler dahil olmak üzere çeşitli metabolit grupları başarıyla üretilmiştir (Mendoza ve ark., 2020). Seçkin hücre hatlarının seçimi ve gelişimi,

uygun eksplantların yanı sıra kültür koşullarına (besinler, büyüme düzenleyicileri, pH, sıcaklık vb.) da bağlı olup bu durum ikincil metabolitlerin sentezini ve birikimini de etkiler (Linh ve ark., 2021). Bu teknikler ile aynı zamanda, ticari öneme sahip endemik veya tehlike altındaki türlerin içerdiği ikincil metabolitlerin analizi için sınırsız çoğaltım olanakları sağlanmaktadır. Keza elisitör veya öncül bileşikler kullanılarak bu metabolitlerin miktarları arttırılabilmektedir. Günümüzde, nanopartiküllerin elisitör olarak ortama eklenmesi, mikrobiyal dekontaminasyondaki başarısı ve ikincil metabolitlerin arttırılmasındaki başarısı nedeniyle dünya çapında ilgi kazanmıştır. Nanopartiküller, nanometrik boyut aralığındaki varlıklardır: benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahiptirler. Tüm nanopartiküller arasında, gümüşnanopartiküller (AgNP'ler), uygun dozlarda, İkincil metabolit birikimine yol açmalarının yanı sıra bitki biyokütlesinin iyileşmesine de olumlu yönde katkı sağlamaktadır (Rahmawati ve ark. 2022). Bazı araştırmalar, nanopartiküllerin ROT ve bitkilerde bulunan ikincil metabolitlerin sentezine yol açan ikincil habercileri uyardığı öne sürmüştür. Şu ana kadar, bitki sekonder metabolizmasının anlaşılması için çeşitli stres faktörleri kullanılmıştır. NP'ler, benzersiz özelliklerinden dolayı bitkilerde flavonoidlerin potansiyel yeni uyarıcıları olabilir. Metalik, metal oksit ve karbon bazlı NP'ler gibi farklı NP tipleri, flavonoid sentezinde son teknolojik yöntemler olarak geniş çapta rapor edilmiştir. Bu nanomateriyaller arasında gümüş nanopartiküller (AgNP), bakır nanopartiküller (CuNP), demir oksit nanopartiküller (Fe₃O₄NP), çinko oksit nanopartiküller (ZnONP), bakır oksit nanopartiküller (CuONP), karbon nanotüpler ve kitosan bazlı nanopartiküller yer almaktadır. Nanopartiküllerin tıbbi bitkilerde kullanılmasının ve biyoaktif bileşiklerin artırılmasının temel amacı, flavonoidler, uçucu yağlar, karotenoidler, terpenoidler, kumarinler ve alkaloidler gibi terapötik bileşiklerin aktivitelerini arttırmaktır. Çeşitli nanopartiküller arasında, özellikle AgNP'lerin *in vitro* kültürlerde flavonoidlerin artırılmasında sıklıkla kullanıldığı belirtilmektedir (Yel, 2021). Bu bağlamda, çalışmamız *Salvia pseudeuphratica*'nın biyokimyasal bileşenlerini inceleyerek terpenoid içeriği, toplam fenolik ve flavonoid miktarları ile antioksidan kapasite değerlerine AgNP (gümüş nanopartikül) uygulamalarının etkisini değerlendirmeyi amaçlamaktadır.

Tez çalışmamızın ana odak noktası, bitkinin biyoteknolojik yöntemlerle kallus ve süspansiyon kültürlerinin başlatılması ve optimizasyonu ve bu kültürlerden elde edilen ekstraktların antioksidan aktivite, enzim inhibitörü etkileri

ve terpenoid bileşikleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesidir. Sonuç olarak, bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarla, kritik tehlike altında olan ve lokal endemik bir tür olan *Salvia pseudeuphratica* bitkisinin biyoteknolojik teknikler kullanılarak ilk defa kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmuş, ayrıca hücre süspansiyon kültürlerinde bazı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) total fenolik, flavonoid, antioksidan aktivite, enzim inhibisyonu ile bazı terpenoid bileşiklerin miktarları üzerine etkileri de ilk kez araştırılmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Bu bölümde, *Salvia* cinsine ait *Salvia pseudeuphratica* Rech. f. türünün tarihsel, sistematik ve botanik bilgileri ile bu türler üzerine daha önce yapılan doku kültürü ve biyolojik aktivite çalışmalarına yer verilmiştir.

2.1. *Salvia pseudeuphratica* Rech. f. Türü Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası

Lamiaceae familyası, uçucu yağlar içeren tek veya çok yıllık otsu bitkiler ya da nadiren odunsu olan çalılardan oluşan büyük bir bitki ailesidir. Familyanın belirgin özelliklerinden biri, dört köşeli gövde yapısıdır ve bu gövdelerde iyi gelişmiş bir kollenkima dokusu bulunur. Yapraklar basit veya parçalı olup, her zaman karşılıklı ve çapraz (*opposite-decussate*) diziliş gösterir. Stipul (yaprak tabanında küçük yaprakçıklar) bulunmaz. Çiçekler, yaprakların koltuğunda sık kümeler halinde vertisillastrum olarak yer alır ve her nodusta bulunur. Çiçekler erdişi, zigomorf ve iki dudaklıdır. Çiçek durumu bazen panikula, kapitulum, korimbus veya simöz olabilir. Genellikle hermafrodit olan çiçekler, bazı türlerde erkek organlarının indirgenmiş ve steril olmasından dolayı dişi özellik gösterebilir. Kaliks, beş sepalden oluşur, kalıcıdır ve bazen iki lobludur. Korolla, beş petalden oluşur ve bilabiata yapıya sahiptir; bazen üst dudak eksik olabilir.

Lamiaceae familyasının ismi, çiçeklerinin iki dudaklı yapısından gelmektedir. Korolla şekli ve stamen pozisyonu değişiklik gösterebilir. Genellikle üst dudak ve alt dudak arasında belirgin bir ayrım vardır. Ilıman bölgelerde bulunan

cinslerin çoğunda üst dudak iki lobdan oluşur ve kancalıdır; alt dudak ise böceklerin nektar emmesine uygun bir platform oluşturan üç lobludur. Stamenler genellikle dört adettir ve didinam, bazen iki adettir ve petallere birleşiktir. Ovaryum üst durumlu, iki karpelli ve dört gözlüdür; her gözde bir ovül bulunur ve stilus ginobaziktir. Meyve, dört nukta ayrılan bir şizokarptır. Ginobazik stilus ve dört nutletli meyve, Lamiaceae familyasının tipik özelliklerindendir. Bu familya, medikal ve kozmetik alanlarında kullanılan birçok uçucu yağı içerdiği için önemlidir. Uçucu yağlar, epiderma üzerindeki salgı tüylerinde bulunur. Bu familyaya özgü başı sekiz hücreli pul şeklindeki salgı tüyleri karakteristiktir. Lamiaceae familyasına ait bitkiler genellikle yüzeylerinde hem örtü hem de salgı tüyleri bulundurur. Bu bitkilerin başlıca salgı organı olan salgı tüyleri, generatif organlarda da bulunabilir (Erdem, 2013).

2.1.2. *Salvia L. cinsi*

Salvia L. cinsi genellikle aromatik özellik gösteren, otsu, çalı veya ağaçsı yapıya sahip çok yıllık bitkilerdir, nadiren iki yıllık ya da tek yıllık olabilirler. Gövdeleri dik veya toprak üzerinde yatık şekilde olup, bezli, bezsiz, tüylü veya tüysüz olabilirler. Yaprakları bölünmemiş, lirat veya pinnat parçalanmış olabilir. Çiçek durumu çeşitli şekillerde bir araya gelmiş simöz olarak görülür. Vertisillasterler (1-)2-10(-40) çiçekli olup, sık veya birbirinden uzak aralıklıdır. Kaliks çan, huni veya boru şeklinde olabilir; üst dudak üç dişli veya az çok düz, alt dudak ise iki dişli olup, meyve kaliksleri hafifçe uzamış veya belirgin bir şekilde uzamış olduğunda zarsı bir yapıya sahiptirler. Korollalar beyaz, sarı, pembe, mavi veya mor renkte olabilir; üst dudak düz veya orak şeklinde, alt dudak ise 3 loblu olup, ortadaki lob geniş ve içbükey, yanlardaki 2 lob ise küçüktür. Stamenler 2 adettir; biri kısa filamentli diğeri ise az çok uzamış üst ucunda verimli bir teka, alt ucunda ise verimli ya da yarı verimli küçük bir teka bulunduran az çok uzamış bir konnektife sahiptir (Stamen tipi A), veya çeşitli şekillerde kısır doku bulundurur (Stamen tipi B); stamenler normal olarak filament ve konnektifin birleşim noktasında eklemlidir (Stamen tipi B); staminodlar daima mevcut ve küçüktür (stamen tip C); Stilus iki loblu olup, fındıkçıklar tüysüz, oval veya üç köşeli, hatta yarı dairemsi şekillerde olabilir ve genellikle müsilaç içerirler (İpek, 2018).

2.1.3. *Salvia pseudeuphratica* Rech. f. türü

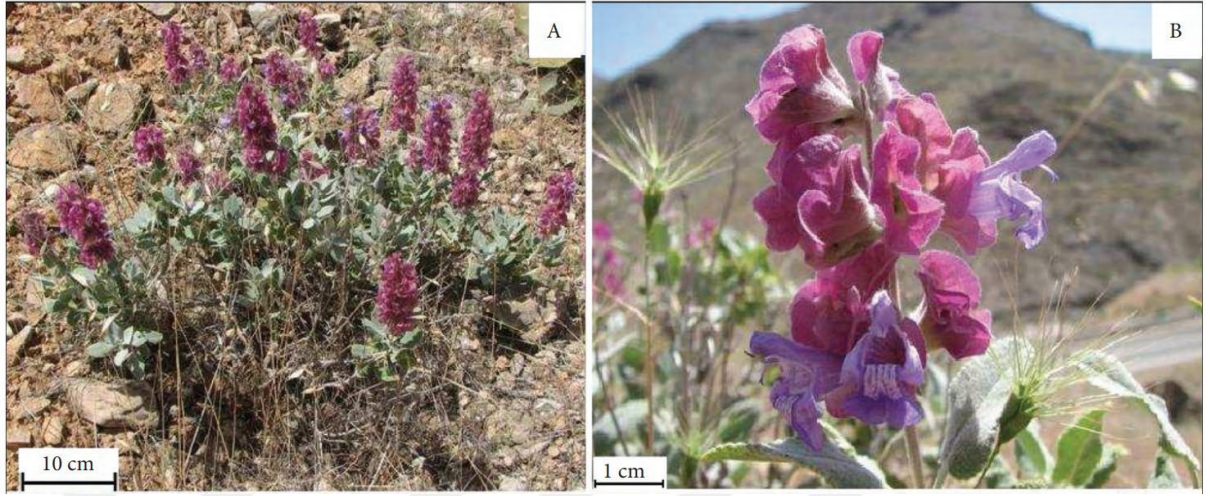
Alem	: Plantae
Alt Alem	: Tracheobionta
Bölüm	: Magnoliophyta
Sınıf	: Magnoliopsida
Alt Sınıf	: Asteridae
Takım	: Lamiales
Aile	: Lamiaceae
Cins	: Salvia
Tür	: <i>Salvia pseudeuphratica</i> Rech. f.

Salvia pseudeuphratica, aromatik ve çok yıllık odunsu bitkilerden oluşur. Bu bitkinin gövdesi yükselici ve dik bir yapıya sahiptir, glandsız yünüksü tüylüdür ve 2030 (-35) cm uzunluğa ulaşır. Gövde, tabanda dallanmış ve verimsiz sürgünlere sahiptir. Yaprakları tam kenarlı, oval ya da yumurtamsı şeklinde olup 1.5-4 x (0.8-1)3.5 cm boyutlarındadır. Yaprakların tabanında küçük yan loblar bulunmaz ve beyaz yünüksü, sapsız salgı tüyleri ile kaplıdır. Yaprak kenarları testere dişli şeklindedir ve sapları (7)10-20 cm uzunluğundadır.

Çiçek durumu genellikle dallanmamış, nadiren dallanmış olup salgısız yünüksü tüylerle kaplıdır. Çiçek kümeleri (vertisillastrum) 4-16 çiçek içerir. Üst çiçek kümelerindeki brakteler geniş oval formda olup, kaliksten daha kısadır ve 5-15 (-25) x 4-10 (-16) mm boyutlarında, yünüksü tüylü ve grimsi renktedir. Alt kısımdaki brakteler ise yaprağa benzer ve brakteol taşımaz. Pediseller 2-4(-5) mm uzunluğunda olup, salgısız yünüksü tüylüdür. Kaliks koyu morumsu renkte, salgısız yıldızsı kılsı tüylüdür ve geniş çan şeklinde olup, meyvede zarımsı bir yapı kazanır. Çiçek döneminde kaliksin boyutları 10-15 x 10-16 mm iken, meyvede (12-)15-20 x (12-)15-25 mm'ye genişler ve uzar.

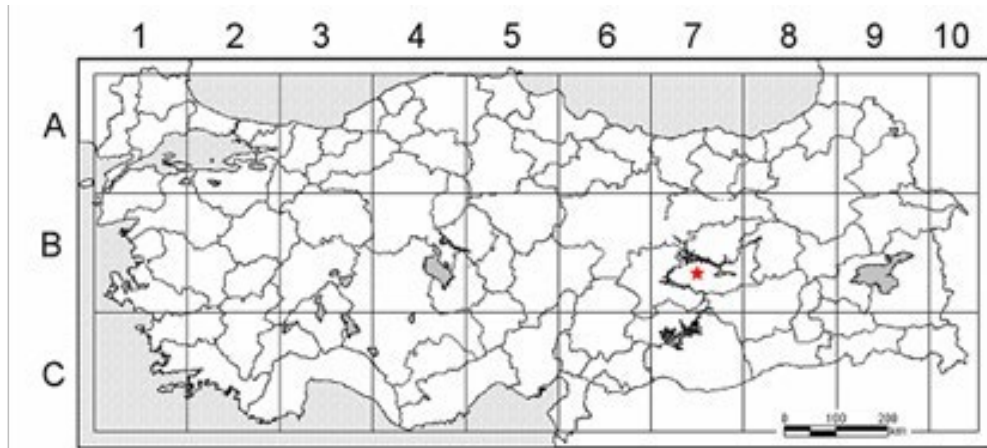
Korolla morumsu-mavi renkte olup, 15-20 mm uzunluğundadır. Alt dudakın dış kısmı tüylüdür; tüpler 10-15 mm uzunluğunda olup, boğaz kısmında hafif geriye kıvrık ve genişlemiştir. Üst dudak düzgündür. Stamenler 2 adet olup, filamentler 2.8-4.7 (-5.2) mm uzunluğundadır. Verimli anterler çıplak ve 1.8-2.9 mm boyutlarındadır, verimsiz anterler ise 0.9-1.3 mm boyutlarındadır. Üst tekalar

1.6-3 mm, alt tekalar (0.8-)1-2(-2.3) mm uzunluğundadır. Stilus ise (15-)17-23 mm uzunluğundadır (Aygün Tuncay, 2019) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *S. pseudeuphratica*'nın genel görünüşü (A.Kahraman 1384A) (Kahraman ve ark., 2010).

Yetiştirme ortamı: *Salvia pseudeuphratica*, kalkerli kayalıklar, taşlı yamaçlar, kuru bölgeler ve yol kenarları gibi çeşitli habitatlarda yetişir. 70 ila 900 metre arasındaki yükseltilerde bulunur. Bitkinin çiçeklenme dönemi Mayıs ayı olup, meyve verme dönemi ise Haziran ayına denk gelmektedir (Aygün Tuncay, 2019). Türkiye’de B7 (Elâzığ: Keban-Maden) karesinde yayılış gösterir.



Şekil 2.2. *S. pseudeuphratica* (★) yayılış haritası

2.1.4. İklim ve toprak istekleri

Akdeniz ikliminde yetişen adaçayı, yaz mevsimi sıcak ve kurak, kış mevsimi ise ılık ve yağışlı olan yerlerden çok hoşlanır. *Salvia* türleri, yaklaşık 3500 m yüksekliğe kadar olan birçok farklı habitat tiplerinde yetişmektedir. Yükseklik arttıkça, sıcaklık ve ışık miktarının azalmasıyla birlikte, toprak ve hava neminin artması, bitkilerin uçucu yağ oranının azalmasına neden olur. Genellikle taban suyu yüksek olmayan, kireç taşı (kalker) kayalık alanlar ve kayalık alanların çevrelerindeki yamaçlar da yetişen *Salvia* türleri, kumul alanlar, step, yol kenarındaki yamaçlar, jipsli alanlar, serpantin’li alanlar, maki arası, orman altı, alpin bölgeler ve tuzcul alanlar olmak üzere çeşitli birçok habitat türünde yayılış göstermektedir.

2.1.5. Ekonomik önemi

Tıbbi ve aromatik bitkiler, gıda, ilaç, kozmetik ve baharat gibi birçok alanda geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir ve insanlık tarihi boyunca bu amaçlar için kullanılmıştır. Türkiye, benzersiz coğrafi konumu, çeşitli iklim koşulları ve zengin bitki çeşitliliği ile tıbbi ve aromatik bitki pazarı için büyük bir potansiyel sunmaktadır (Pakdemirli, 2020). Ayrıca, Türkiye tıbbi bitkiler ticaretinde dünyadaki en önemli ülkeler arasında yer almaktadır. Ülkede, doğadan toplanarak iç ve dış ticareti yapılan 347 bitki türü bulunmakta olup, bu türlerin %30’u uluslararası ticarete yer almaktadır (Bayraktar ve ark., 2017).

Özellikle 2019 yılı sonrasında, dünya çapında sağlık için tehdit oluşturan pandeminin etkisiyle, sadece Türkiye’de e-ticaret üzerinden yapılan bitkisel ürünlerin satışlarında %45 oranında bir artış gözlemlenmiştir. Türkiye’de doğadan en fazla toplanan ve ticarete sunulan bitkiler arasında Anadolu adaçayı (*Salvia fruticosa* Mill.) öne çıkmaktadır. Ege ve Akdeniz Bölgeleri başta olmak üzere, Anadolu’da “Çalba” olarak bilinen bazı *Salvia* türleri (*S. fruticosa*, *S. tomentosa*, *S. cryptantha*, *S. multicaulis*, *S. aramisis* ve *S. sclarea* gibi) yabani olarak toplanarak iç ve dış pazarlara sunulmaktadır. Aynı familyadan gelen “Dağ çayı” ve “Yayla çayı” olarak bilinen *Sideritis* cinsinin Türkiye florasında 30’u endemik olmak üzere 45 türü yayılış göstermektedir.

Adaçayı üretimi ve ticareti, özellikle son yıllarda Türkiye'de artış göstermiştir. Antalya, ülkedeki adaçayı üretiminde öncü konumdadır. 2019'da Antalya'nın üretimi, ülke genelindeki üretimin %71,6'sını oluştururken, Denizli ve Kütahya da önemli üretim merkezleridir. Adaçayı ekiliş alanlarında da önemli bir artış yaşanmıştır. 2012'de 54 dekar olan ekiliş alanları, 2019'da 5.602 dekara ulaşmıştır. Adaçayı yağı ihracatı da dikkate değer şekilde artmıştır; 2016'da 0,47 ton iken, 2019'da 25,4 tona yükselmiştir. Türkiye'nin en çok adaçayı ihracatı yaptığı ülkeler arasında Almanya, Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti ve Malezya yer almaktadır. Ancak, doğadan toplanan adaçaylarının sürdürülebilirliği ve kalitesi, bilinçsiz toplama nedeniyle risk altındadır. Ayrıca bu durum, adaçayı popülasyonlarının aşırı azalarak tükenmesine ve genetik çeşitliliğin azalmasına da neden olmaktadır (Elmas, 2021; Anonim, 2020).

2.1.6. Salvia cinsi ve tıbbi önemi

2.1.6.1. Kolinerjik etkisi

Merkezi kolinerjik sinyal, uzun zamandır hafıza, motivasyon ve ruh hali özellikleriyle ilişkilendirilmiştir. Kolinerjik sinyalleşmede yer alan bir nörotransmitter olan asetilkolinin (ACh), dikkat, öğrenme, hafıza ve motivasyon dahil olmak üzere bilişsel işlev ve davranışın çeşitli yönlerinde önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. ACh sinyalleşmesindeki değişiklikler, Alzheimer hastalığı da dâhil olmak üzere çoklu nörodejeneratif bozuklukların patofizyolojisinde rol oynamaktadır (Luchicchi ve ark., 2014). Son çalışmalar ayrıca kortikal ACh'nin dikkat çabası, yönelimi ve davranışsal olarak önemli uyaranların saptanmasındaki rolü için destek sağlamıştır. Asetilkolinesteraz (AChE), asetilkolinin parçalanmasını katalize eden bir enzimdir ve genel ACh konsantrasyonunu artırmak için çeşitli AChE inhibitör ilaçları mevcuttur. Bu ilaçlar, beyindeki asetilkolin reseptörlerinde ACh'nin mevcudiyetinin artırılmasının nörondan nörona taşınmasını arttırdığı ve nihayetinde bilişsel işlevi iyileştirdiği öncülüne dayanmaktadır (Colovic ve ark., 2013). *S. fruticosa* (Senol ve ark., 2011) ve *S. lavandulaefolia* uçucu yağının AChE'ye karşı inhibisyon gösterdiği bildirilmiştir (Kennedy ve ark., 2011). *S. officinalis*'ten izole edilen

fenolik diterpenler, 7a-methoxyrosmanol ve isorosmanol bileşiklerinin AChE inhibisyonu sergilediği belirtilmiştir (Sallam ve ark., 2016). Birkaç *Salvia* türünde bulunan rosmarinik asit, karnosik asit ve kersetin gibi aktif bileşenler, AChE aktivitesini inhibe edebilir (Marcelo ve ark., 2013). Keza *S. miltiorrhiza* 'dan elde edilen tanşinonların ise, hem AChE hem de Bütirilkolinesteraz (BChE) aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Zhou ve ark., 2011a ; Xu ve ark., 2016).

2.1.6.2. Antioksidan etkisi

Serbest radikallerin aşırılığı ile yetersiz bir antioksidan savunma oksidatif stres durumu yaratır. Bu durum zamanla, tüm vücut dokularına zarar verebilir ki burada en hassas bölge ise beyindir. Oksidatif stres, Alzheimer hastalığı (Perry ve ark., 1999) ve Parkinson hastalığı dahil olmak üzere birçok nörolojik bozuklukla ilişkilendirilmiştir. Oksidatif stres, majör depresif (Sita ve ark., 2016) ve dikkat eksikliği hiperaktivite bozukluğunu (DEHB) (Liu ve ark., 2015) gibi birçok mental hastalığın seviyesini de yükseltir.

Salvia bitkileri ve her bir türüne ait kimyasal bileşikleri güçlü antioksidan aktiviteye sahiptir. 10 farklı *Salvia* türüne ait analizler tüm türlerin önemli derecede antioksidan aktivite sergilediği göstermiştir (Sulniute ve ark., 2016). *S. miltiorrhiza*'nın oksidazları inhibe ettiği, süperoksit üretimini azalttığı, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidatif modifikasyonunu inhibe ettiği ve mitokondriyal oksidatif stresi iyileştirerek ROT üretimini azaltabileceği belirlenmiştir. *S. miltiorrhiza* ayrıca katalaz, manganez süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve eşleşmiş endotelial nitrik oksit sentazın aktivitelerini arttırmıştır (Chang ve ark., 2016). Antioksidan etkilerin çoğu, güçlü radikal süpürücü aktivite sergiledikleri için rosmarinik asit, salvianolik asit, sagekumarin ve sagerinik asit gibi *Salvia* türlerinde bulunan fenolik bileşiklere atfedilmektedir. *S. lavandulaefolia* esansiyel yağında tanımlanan monoterpenlerden 1,8-sineol ve α -pinenin ROT üretimini inhibe ettiği ve endojen antioksidan bileşikler (örn. glutatyon, katalaz, süperoksit dismutaz, hem oksijenaz-1 aktivitesi ve protein ekspresyonu) arttırdığı tespit edilmiştir (Porres-Martinez ve ark., 2015). Ayrıca yine *salvia* türlerinde bulunan karnosik ve ursolik asitin de güçlü antioksidanlar olduğu belirtilmiştir (Kashyap ve ark., 2016; Birtic ve ark., 2015).

2.1.6.3. Antienflamatuar etkisi

Enflamasyonun bilişsel işlev üzerindeki etkisine dair kanıtlar mevcuttur. *In vitro* ve *deneysel* hayvan çalışmalarından elde edilen bulgular, *Salvia* türlerinin ve bileşenlerinin antienflamatuar etkilere sahip olduğunu göstermiştir. *S. officinalis*'teki (esas olarak 1,8cineole ve kafur içeren) uçucu yağların incelenmesi, fare makrofajlarında LPS tarafından uyarılan nitrik oksit üretimini önemli ölçüde inhibe etmiştir (Abu-Darwish ve ark., 2013). *S. officinalis* tentürünün, farelerde akut enflamasyonu önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (Oniga ve ark., 2007). *S. officinalis*'te bulunan fenolik diterpenler (karnosol ve karnosik asit), makrofajlarda nitrik oksit ve prostaglandin E2 (PGE2) üretimini azaltmıştır (Schwager ve ark., 2016). *S. plebeian*'ın metanol ekstraktları ve aktif bileşenlerinden birkaçı, makrofaj enflamatuar sürecini önemli ölçüde kısaltmış bunun yanı sıra nitrik oksit, siklooksijenaz-2 (COX-2), PGE2 salınımını ve iNOS ekspresyonunu da azaltmıştır (Akram ve ark., 2015).

Tanşinonlar ve salvianolik asitler gibi *S. miltiorrhiza*'da bulunan biyoaktif bileşenlerin de sitokin üretimini ve iNOS aktivitesini etkileyerek antienflamatuar mekanizmalara sahip olduğu gösterilmiştir (Bonaccini ve ark., 2015). Ayrıca, bir çalışmada, *S. miltiorrhiza*'dan izole edilen tanşinonlar, LPS ile uyarılan makrofajlarda TNF- α , IL-1 β ve IL-8'in mRNA ve protein ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe etmiştir (Ma ve ark., 2016). *Salvia* bitkilerinin kimyasal bileşiklerine yönelik araştırmalar, kafeik asit, rosmarinik asit (Nabavi ve ark., 2015) ve ursolik asidin (Kashyap ve ark., 2016) güçlü anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğunu da doğrulamıştır.

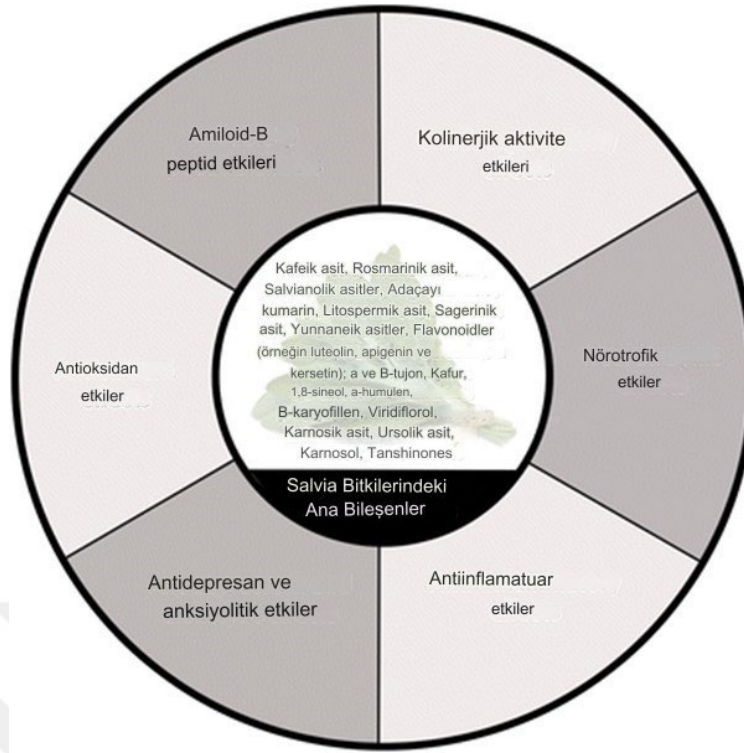
2.1.6.4. Antidepresan ve anksiyolitik etkisi

Depresyon ve kronik stres, bilişsel performans üzerinde zararlı etkilere sahip olabilir. Aslında, hafıza, dikkat ve öğrenmedeki bozuklukları içeren bilişsel eksiklikler, majör depresif bozukluğun ve çoğu kaygı bozukluğunun ortak belirtileridir (Scult, 2016). Kronik ve akut strese maruz kalmak bilişsel yetenekleri olumsuz etkileyebilir. Alzheimer hastalığı da majör depresyon ile yüksek bir

komorbiditeye sahiptir ve depresif semptomların bu durumun bir sonucu olabileceği gösterilmiştir (Bennett ve Thomas, 2014). Bu bağlamda, depresyon ve anksiyete üzerinde yararlı etkileri olan bitki kaynaklı bileşenlerin bu nedenle bilişsel performans üzerinde olumlu etkileri olması muhtemeldir.

S. elegans (Herrera-Ruiz, 2006) ve *S. verticillata*'nın (Naderi, 2011) hidroalkolik ekstraktlarının uygulanmasının, hayvan depresyon ve anksiyete modelleri yoluyla antidepresan ve anksiyolitik benzeri etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Yine benzer bir durum, *S. sclarea* (Gross, 2013; Seol, 2010) ve *S. miltiorrhiza* (Liu ve ark., 2015b) esansiyel yağlarının uygulanmasından sonra da gözlenmiştir. Hatta *S. sclarea*'nın etkilerinin, *Anthemis nobilis* (papatya), *Rosmarinus officinalis* (biberiye) ve *Lavandula angustifolia* (lavanta) esansiyel yağları uygulamalarına oranla daha belirgin olduğu da rapor edilmiştir. *S. sclarea*'nın anti-stresör etkisi, dopamin reseptör antagonistlerini önemli ölçüde bloke etmiştir (Seol ve ark., 2010).

Fenolik asitler, rosmarinik asit ve kafeik asit ayrıca antidepresan ve anksiyolitik benzeri aktiviteye sahiptir (Takeda ve ark., 2002). Ayrıca, *S. miltiorrhiza*'dan (Feng ve ark., 2012) bir bileşik olan salvianolik asit B ve *S. divinorum*'dan (Braida ve ark., 2009) salvinorin A, hayvan modellerinde antidepresan ve anksiyolitik etkiler sergilemiştir.



Şekil 2.3. *Salvia* bitkilerindeki ana bileşenler ve potansiyel aktiviteleri (Lopresti, 2017).

2.1.6.5. Antikanser etkisi

Günümüzde, doğal kaynaklardan elde edilen bileşenlerin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini anlamak ve kullanmak büyük bir önem kazanmıştır. Bu bağlamda, *Salvia* cinsi bitkiler, tarihsel olarak geleneksel tıpta kullanılan ve modern bilim dünyasının dikkatini çeken önemli bir bitki grubunu oluşturur. Yapılan araştırmalar, *Salvia* cinsine ait bitkilerin de özellikle antikanser potansiyeli taşıdığını ortaya koymaktadır.

Salvia cinsinin içerdiği triterpenik asitler, özellikle betulinik asit (BA), oleanolik asit (OA) ve ursolik asit (UA) gibi bileşenler, antioksidan, anti-enflamatuar ve antikanser gibi çeşitli biyolojik etkilere sahip oldukları bilinen triterpenlerdir. Bu triterpenik asitler, özellikle son yıllarda yapılan araştırmalarda kanserle mücadelede potansiyel ajanlar olarak öne çıkmıştır (Petronelli ve ark., 2009, Baer-Dubowska ve ark., 2021).

İran'da gerçekleştirilen bir çalışmada, *Salvia* cinsine ait 22 farklı türün triterpenik asit içeriği ve bu asitlerin sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir. *Salvia multicaulis* ve *Salvia officinalis* L. gibi türler, yüksek triterpenik asit içerikleri ile dikkat çekmiş ve aynı zamanda farklı insan kanser hücre hatları (SH-SY5Y ve MCF-7) üzerinde sitotoksik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Abdollahi-Ghehi ve ark., 2019).

Bu bulgular, *Salvia* cinsinin antikanser potansiyelini anlamak ve gelecekteki araştırmalarda kullanılmak üzere yüksek verimli türleri belirlemek adına önemli bir adım oluşturmaktadır. *Salvia* cinsinin sağlık üzerindeki olumlu etkilerini keşfetmek, doğal kaynaklardan elde edilen bileşenlerin terapötik kullanımına yeni kapılar aralamaktadır. Bu bağlamda, bitki kökenli triterpenik asitlerin antikanser özellikleri, modern tıpta umut verici bir alan olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.1.7. Endemik *Salvia* türleri ve IUCN tehlike kategorileri

Salvia cinsine ait 107 takson içinde 100 tür bulunmakta olup, bu türlerin 58'i (%54) endemik özellik göstermekte ve toplamda 53 endemik tür bulunmaktadır (%53). Türkiye'deki *Salvia* cinsine ait bu 107 takson arasında IUCN

Tehlike Kategorileri altında adı geçen 43 taksonun değerlendirilmesi sonucunda, bunların 13'ü kritik tehlikedeki (CR), 15'i tehlikede (EN) ve 15'i savunmasız (VU) olarak sınıflandırılmıştır (Kuşaksız, 2019). Türkiye'de yetişen endemik *Salvia* türleri ve IUCN Tehlike Kategorileri **Çizelge 2.1**'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Türkiye'de yetişen endemik *Salvia* türleri ve IUCN tehlike kategorileri (Kuşaksız, 2019)

Tür	Endemizm	Tehlike Kategorisi
<i>Salvia adenocaulon</i> P.H. Davis	Endemik	VU
<i>Salvia adenophylla</i> Hedge & Hub.-Mor.	Endemik	EN
<i>Salvia albimaculata</i> Hedge & Hub.-Mor.	Endemik	EN
<i>Salvia anatolica</i> Hamzaoglu & A. Duran	Endemik	CR
<i>Salvia aramiensis</i> Rech. f.	-	VU
<i>Salvia aucheri</i> Benth. var. <i>Aucheri</i>	Endemik	VU
<i>Salvia aucheri</i> Benth. var. <i>canescens</i> Boiss. & Heldr.	Endemik	VU
<i>Salvia aytachii</i> M. Vural & N. Adıgüzel	Endemik	EN
<i>Salvia ballsiana</i> (Rech. f.) Hedge	-	CR
<i>Salvia brachyanth</i> (Bordz.) Pobed subsp. <i>tankutiana</i> Bagherpour, Celep, Kahraman & Doğa	Endemik	EN
<i>Salvia cassia</i> G. Samuelsson ex Rech. f.	-	VU
<i>Salvia cedronella</i> Boiss.	Endemik	EN
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> Rech. var. <i>elazigensis</i> A. Karaman, F. Celep & Dogan	Endemik	EN
<i>Salvia chionantha</i> Boiss	-	VU
<i>Salvia chrysophylla</i> Stapf	-	VU
<i>Salvia cilicica</i> Boiss. & Kotschy	Endemik	EN
<i>Salvia ekimiana</i> F. Celep & Doğan	Endemik	EN
<i>Salvia eriophora</i> Boiss. & Kotschy ex Boiss.	Endemik	EN
<i>Salvia freyniana</i> Bornm.	-	CR
<i>Salvia fruticosa</i> Mill	-	VU
<i>Salvia halophila</i> Hedge	Endemik	EN
<i>Salvia hasankeyfense</i> Dirmenci, Celep & Ö. Güner	Endemik	CR
<i>Salvia hedgeana</i> Dönmez	Endemik	CR
<i>Salvia heldreichiana</i> Boiss. ex DC.	Endemik	VU
<i>Salvia kronenburgii</i> Rech. fil.	Endemik	EN
<i>Salvia kurdica</i> Boiss. & Hohen. Ex Benth.	-	VU
<i>Salvia marashica</i> A. İlçim, F. Celep & Doğan	Endemik	CR
<i>Salvia modesta</i> Boiss.	Endemik	EN
<i>Salvia nutans</i> L.	-	VU
<i>Salvia nydeggeri</i> Hub.-Mor.	Endemik	EN
<i>Salvia odontochlamys</i> Hedge	Endemik	CR
<i>Salvia pilifera</i> Montbr. & Auch.	Endemik	VU

<i>Salvia pisidica</i> Boiss. & Hohen. Ex Benth.	Endemik	VU
<i>Salvia pomifera</i> L.	-	VU
<i>Salvia potentillifolia</i> Boiss. & Hohen. Ex Benth.	Endemik	VU
<i>Salvia pseudeuphratica</i> Rech. f.	Endemik	CR
<i>Salvia quezelii</i> Hedge & Afzal-Rafii	Endemik	CR
<i>Salvia sericeo-tomentosa</i> Rech. fil. var. <i>sericeotomentosa</i>	Endemik	CR
<i>Salvia sericeo-tomentosa</i> Rech. fil. var. <i>hatayica</i> F.Celep & Doğan	Endemik	CR
<i>Salvia smyrnaea</i> Boiss.	Endemik	EN
<i>Salvia tigrina</i> Hedge & Hub.-Mor.	Endemik	CR
<i>Salvia tobeyi</i> Hedge	Endemik	EN
<i>Salvia vermifolia</i> Hedge & Hub.-Mor.	Endemik	CR

Çizelge 2.1.'de görüldüğü üzere, tez çalışmamızda kullandığımız bitki *Salvia pseudeuphratica* Rech. f. “**kritik tehlike altında**” ve “**endemik**” bir türdür.

2.2. Doku Kültürü Uygulamaları

Doku kültürü yaklaşımları genellikle aseptik koşullarda bitki hücrelerini veya organlarını elde etmek ve yetiştirmek için kullanılan yöntemleri içerir ve kullanım alanları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- (1) Bitkiden türetilen ikincil metabolitler ve biyofarmasötik olarak kullanılan rekombinant proteinler gibi yüksek ekonomik değere sahip bileşiklerin elde edilmesi,
- (2) mikroçoğaltım yöntemleriyle bitki üretimi,
- (3) nadir veya tehlikede olan bitki türlerinin korunması,
- (4) avantajlı karakterlere sahip hücrelerin, bitkilerin yerine ele alınması (örneğin, herbisit direnci/toleransı),
- (5) patojenlerden arınmış bitkilerin elde edilmesi,
- (6) türler arası hibridleşme yoluyla hibrit türlerin elde edilmesi,
- (7) somaklonal varyasyonlar yoluyla yeni özelliklere sahip bitkilerin elde edilmesi,
- (8) steril hibrid türlerin üretilmesi,
- (9) anter ve mikrospor kültürü ile haploit bitkilerin üretilmesi,

- (10) uzak akraba türlerin çapraz tozlaşması ve ardından embriyo oluşturmak için doku kültürünün uygulanması (embriyo kurtarma),
- (11) kromozom kopyalama ve poliploidinin indüksiyonu
- (12) protoplast füzyonu ve yeni hibridlerin rejenerasyonu
- türler arası uzak akraba türler arasında yeni türlerin oluşturulması,
- (13) bitkilerdeki fizyolojik, biyokimyasal ve üreme mekanizmalarının moleküler temelini hızlı bir şekilde araştırmak için hızlı bir yol olması (örneğin, stres toleranslı bitkiler için *in vitro* seçim),
- (14) germplazm korunması,
- (15) hücre kültürleri yoluyla *in vitro* seçilime imkân vermesi,
- (16) somatik embriyogenez ile yapay tohumların büyük ölçekli üretimi,
- (17) germplazm koleksiyonları ve sentetik tohumların korunması,
- (18) hücre büyümesinin otomatik kontrolünü ve metabolit işlemlerinin rasyonel düzenlenmesini sağlamak için uygulanması, işgücü maliyetlerini azaltmaya ve üretkenlikte iyileşmelere katkıda bulunması,
- (19) transgenik bitki üretimi için temel bir araç olarak doku kültürünün kullanılması (Özyiğit 2023).

Totipotensi, bitki parçalarının (hücre, herhangi bir doku ya da organ vb.) ait olduğu bitkiyi yeniden oluşturma potansiyeline sahip olmasıdır. (Bhatia ve Dahiya, 2015). Genç bitkiler, fideler, kalluslar ve somatik embriyolar, doku kültürü sistemlerinde kullanılmak için tercih edilir (Isah ve ark. 2019; Secgin ve Okumuş 2022). Doku kültürü tekniklerini kullanarak bitkilerin *in vitro* üretilmesi, iki ardışık adımdan oluşur: ilk adım, *in vitro* hücre/kallus/hücre süspansiyonu ve protoplast kültürünün oluşumudur ve diğer adım ise, *in vitro* rejenerasyon yoluyla doğrudan veya dolaylı organogenez veya somatik embriyogenezdir (Aasim ve ark. 2019, Pasternak ve Steinmacher 2024).

2.2.1. Kallus ve hücre süspansiyon kültürleri

Bitki doku kültürü, aseptik koşullar altında ve özel bir besin ortamında bitkilerin kök, sürgün, embriyo gibi farklı kısımlarından elde edilen hücrelerden veya kallus, hücre süspansiyonu gibi yöntemlerle üretilen hücrelerden yeni bitki

dokusu, bitki veya bitkisel ürünlerin elde edildiği sofistike bir tekniktir (Babaoğlu ve ark., 2001). Kök, sürgün, embriyo, kallus ve hücre süspansiyonu kültürleri, temel bitki doku kültürü yöntemleri arasında yer alır ve bitki biyoteknolojisi ile tarım araştırmalarında çeşitli uygulamalar sunar.

Çok hücreli organizmalarda hücreler, zigot oluşumundan kısa bir süre sonra belirli bir işlev kazanmak üzere özelleşmeye başlar. Döllenmenin ardından farklılaşmanın başlangıcına kadar geçen sürede her bir hücre bütün bir organizmayı oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Bu özellik totipotensi olarak tanımlanmaktadır. Totipotensi aynı zamanda, tek bir hücrenin bölünüp spor ve zigot gibi ekstra embriyonik dokuları da içerecek şekilde organizmanın tüm hücrelerini üretebilme yeteneğini ve hücrenin embriyogenez yoluyla bağımsız olarak tam bir bitki oluşturma kapasitesini ifade eder. Bazı organizmalarda meydana gelen bu farklılaşmanın geri dönüşümü mümkündür. Yeniden büyümeyi sağladıkları için gelişmenin ilk evrelerinde dönüşüm olarak adlandırılan dediferansiyasyon durumunda hücreler yeniden totipotensi özelliklerini kazanabilirler. Bitki doku kültüründe çevresel faktörlerin manipülasyonu ile dediferansiyasyon ve rediferansiyasyon için temel bir varlık olan bu potansiyel, hemen hemen tüm bitki hücrelerinde bulunur (Mitalipov ve Wolf, 2009; Su ve ark. 2021).

Bitkilerde kalluslar dediferansiyasyon ile bütün bir organizmayı oluşturabilme yeteneği kazanmış farklılaşmamış hücreler grubundadırlar. Kallus, ana bitkiden ayrılmış ancak aktif bölünme yeteneğini kaybetmemiş bitkisel doku parçalarının uygun besiyeri ortamında üretilmesi ile meydana gelen farklılaşmamış, düzensiz hücre kitleleridir.

Kalluslar, yapılarında bulundurdıkları farklılaşmamış hücreler nedeniyle birçok kültür için başlangıç materyali olarak kullanılabilir. Hücre süspansiyon kültürleri için de kalluslar oldukça uygun bir kaynaktır (Göktepe 2020).

Tek veya küçük bir hücrenin sıvı kültür ortamında çalkalanması sonucu oluşan hücre ya da hücre kümelerine hücre süspansiyon kültürü adı verilir. Hücre süspansiyon kültürleri, özellikle bazı ikincil metabolitlerin üretimi açısından büyük öneme sahiptirler. Ayrıca, homojen yapıda olmaları, hızlı çoğalmaları, biyoreaktör kullanımına uygun olmaları ve alt kültürlerdeki değişimin az olması gibi avantajlar nedeniyle tercih edilmektedirler (Kayın ve Turan, 2023).

2.2.2. Sekonder metabolit üretimi için doku kültürleri

Daha önce de belirtildiği gibi, *Salvia* bitkileri önemli bir gıda katkı maddesi kaynağı olduğu gibi farmakolojik açıdan ilgi çekici metabolitlerin de önemli bir kaynağıdır ve bu ürünlere olan talep son zamanlarda güçlü bir şekilde artmaktadır. Biyokütle tedariki, beklenmedik biyotik ve abiyotik kısıtlamalar tarafından güçlü bir şekilde sınırlanabilir ve bu bağlamda bitki hücre ve doku kültürleri, bu moleküllerin kontrol edilebilir ve sürekli bir şekilde ekstraksiyonu ve üretimi için değerli bir alternatif kaynaktır. Bitki hücre ve doku kültürlerinden değerli ikincil metabolitlerin çıkarılmasının, doğada yetiştirilen bitkilerden çıkarılmalarından daha avantajlı olduğu birçok farklı yönü bulunmaktadır. Bunlar şunları içerir: (a) üretim daha güvenilir, basit ve tahmin edilebilir olabilir; (b) fitokimyasalın izolasyonu, karmaşık bitki matrislerinden çıkarmaya göre hızlı ve etkili olabilir; (c) çoğu zaman bitki hücrelerinin metabolik profili, bütün bitkininkiyle uyumludur; (d) doğal koşullarda yetişen bitkilerde meydana gelen müdahale edici bileşenler, hücre ve doku kültürlerinde önlenmiş olabilir; (e) doku ve hücre kültürleri, belirli standart fitokimyasalların büyük miktarlarda üretilmesini sağlayabilir; (f) hücre ve doku kültürü, mevsimsel kısıtlamalar nedeniyle ilgi çeken metabolitlerin kalitesinde ve miktarında değişiklik olmaksızın sürekli bir şekilde yıl boyunca üretilen bir sistem sağlayabilir; (g) doku ve hücre kültürleri, metabolit biyosentezini kontrol eden faktörleri incelemek ve açıklamak için uygun sistemlerdir (Hussain ve ark., 2012)

2.2.3. İkincil metabolit üretiminde hücre süspansiyon kültürlerinin önemi

Hücre süspansiyon kültürleri, ikincil metabolitlerin üretiminde önemli bir role sahiptir. İkincil metabolitlerin üretiminde hücre süspansiyon kültürlerinin kullanımının ana nedenleri aşağıda sıralanmıştır:

- Hücre süspansiyon kültürleri, ikincil metabolitlerin kontrollü bir ortamda büyük ölçekte üretimine olanak tanır (Murthy ve ark., 2014). Geleneksel bitki yetiştiriciliğinin aksine, ikincil metabolitlerin doğadaki ana bitkilerden eldesinden farklı olarak, hücre süspansiyon kültürleri

biyoreaktörlerde büyük miktarlarda ikincil metabolit üretmek için ölçeklenebilir (Bapat ve ark., 2023).

- Hücre süspansiyon kültürleri, genetik yapısı ve büyüme koşulları açısından stabilite sunar (Solis-Ramos ve ark. 2013). Bu tutarlılık, farklı tekrarlar da ikincil metabolit profillerinin tutarlı kalmasını sağlar ve bu da farmasötikler ve kozmetikler gibi endüstrilerde standartlaştırma ve kalite kontrolü için önemlidir.
- Hücreleri biyoreaktörlerde süspansiyonda kültürlemek, araştırmacılara sıcaklık, pH, besin maddesi ve oksijen konsantrasyonu gibi çevresel faktörler üzerinde daha fazla kontrol sağlar. Bu uygun koşullar, belirli ikincil metabolitlerin üretimini maksimize etmek için ayarlanabilir (Verdú-Navarro ve ark. 2023).
- Hücre süspansiyon kültürleri, genetik ve metabolik mühendislik tekniklerine uygundur (García-Granados ve ark., 2019). Hücrelerin genetik yapısını veya metabolik yollarını manipüle ederek, araştırmacılar istenen ikincil metabolitlerin üretimini artırabilir veya hatta yeni bileşiklerin biyosentez yolları aydınlatılabilir.
- Süspansiyondaki hücreler genellikle tam bir bitkiye göre daha hızlı büyüme ve daha yüksek çoğalma oranları gösterir. Bu hızlı büyüme ikincil metabolit üretiminde daha yüksek verimlilik sağlar (Murthy ve ark. 2014; Topcu ve Çölgeçen 2015)
- Hücre süspansiyon kültürleri, bitkilerden ekstraksiyon yoluyla gerçekleştirilen geleneksel ikincil metabolit üretim yöntemlerine sürdürülebilir bir alternatif sunar. Hücre kültürlerini kullanarak, doğal kaynakları tüketmeden veya çevresel zarara neden olmadan ikincil metabolitlerin üretimi mümkündür.

Genel olarak, hücre süspansiyon kültürleri, ölçeklenebilirlik, tutarlılık, kontrol edilebilirlik ve sürdürülebilirlik açısından ikincil metabolitlerin üretimi için çok yönlü ve verimli bir platform sağlar. Bu kültürler, farmasötikler, tarım ve biyoteknoloji gibi çeşitli endüstriler için önemli sonuçlar doğurur.

İnsanlar binlerce yıldır bitkileri çeşitli amaçlar için kullanmışlardır. Temel metabolit ihtiyaçları olan karbonhidrat, protein ve yağ gibi bileşenleri bitkilerden elde etmişlerdir. Bununla birlikte, bitkinin iletişimini sağlayan ve doğrudan

büyüme veya enerji üretimi gibi temel fonksiyonlarda rol oynamayan bazı maddeler de bulunmaktadır. Bu tür maddelere ikincil metabolitler denir.

İkincil metabolitler, bitkinin çevresine uyum sağlamasına ve çevresel faktörlere tepki vermesine yardımcı olan kimyasal bileşiklerdir. Kuraklık, tuzluluk, UV ışınları gibi çevresel streslere karşı savunma sağlamak, bitkiyi herbivorlara ve mikroorganizmalara karşı korumak, polinasyonu teşvik etmek ve tohum dağılımını kolaylaştırmak gibi önemli ekolojik rolleri vardır (Eray Vuran ve Türker, 2021).

Günümüzde, bilinen 50.000'den fazla ikincil metabolit ürünü mevcuttur. Bu ürünler genellikle flavonoidler, fenoller, alkaloidler, glikozitler, saponinler, renk maddeleri, uçucu yağlar, steroidler, reçineler ve tanenler gibi çeşitli kimyasal gruplara ayrılmaktadır. Alkaloidler, terpenoidler ve fenoller gibi temel gruplarda sınıflandırılırlar (Baydar, 2013). İkincil metabolitler, bitki-organizma etkileşimlerinin önemli birer göstergesi ve fizyolojik belirleyicisi olarak kabul edilirler (Çalışkan ve ark., 2019).

Hücre süspansiyon kültürü, kontrol edilebilir bir sistemde hızlı büyüme ve yüksek metabolizma hızları nedeniyle ikincil metabolitlerin büyük ölçekli üretimi için tercih edilen bir yöntemdir (Bong ve ark. 2021). Pek çok terapötik bitkide, kallus ve hücre süspansiyon kültürleri yoluyla ikincil metabolitlerin üretimi başarılı bir şekilde rapor edilmiştir. Örnek olarak, *Taxus baccata* bitkisinden taksol (Khosroushahi ve ark. 2006) *Artemisia annua* bitkisinden artemisinin (Chan ve ark. 2010) ve *Panax ginseng* bitkisinden ise ginsenosid (Kim ve ark. 2018) üretimi verilebilir.

Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması, ilaç olarak kullanılabilecek biyolojik açıdan önemli moleküllerin ve ekonomik açıdan önemli maddelerin elde edilmesine de yardımcı olabilir (Özyiğit et al., 2023). Birçok bitkide, hücre süspansiyon kültür protokolleri ikincil metabolitlerin üretimi için başarılı bir şekilde başlatılmıştır. Günümüze değin yapılan *Salvia* cinsine ait biyoaktif metabolitlerine olan yüksek talep nedeniyle, hücre süspansiyon kültürleri, bu metabolitlerin ekstraksiyonu ve üretiminin bir kaynağı olarak geniş ölçüde kullanılmıştır. Ancak, birçok çalışma, *Salvia* hücre süspansiyonlarının genellikle yüksek miktarda ikincil metabolit üretmekte başarısız olduğunu, yavaş büyüme, düşük biyokütle yoğunluğu, agregat oluşturma eğilimi ve alt kültürleme döngüleri sırasında genetik ve metabolik istikrarsızlık derecesinin yüksek olduğunu bildirmiştir (Marchev ve ark., 2014). Düşük metabolit üretimi, çoğu durumda,

hücre diferansiyasyonu ve dolayısıyla biyosentez veya sekresyon için gerekli olan belirli dokuların eksikliği ile ilişkilendirilmiştir (Facchini, 2001, Ziegler ve Facchini, 2008). Bu sorun, genellikle dış uyarıcıları taklit eden ve belirli bir yolun biyosentezi için transkripsiyonel aktivasyonu indükleyen elisitörler olarak bilinen moleküllerin kullanılmasıyla aşılabilmektedir. Bu nedenle, elisitörlerin kullanımı, bitki hücrelerinde ve doku kültürlerinde biyoaktif ikincil metabolitin birikimini indüklemek için en yaygın yöntemlerden biri haline gelmiştir. *Salvia* türlerinin hücre süspansiyon ve saçak kök kültürlerinde İkincil metabolitlerin üretimi için günümüze kadar yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar derlenerek **Çizelge 2.2.**'de sunulmuştur.

Çizelge 2.2. Çeşitli doku kültürü yöntemleriyle üretilen *Salvia* türleri ve metabolitleri (D'Amelia, ve ark., 2017).

<i>Salvia</i> Türü	Doku Kültürü Tipi	Metabolitler	Referanslar
<i>S. officinalis</i>	Hücre süspansiyon kültürü Saçak Kök Kültürü	Rosmarinik asit	(Hippolyte ve ark., 1992; Grzegorzcyk ve ark., 2006)
<i>S. fruticosa</i>	Kallus, Hücre süspansiyon ve Kök Kültürleri	Rosmarinik asit	(Karam ve ark., 2003)
<i>S. officinalis</i>	Sürgün kültürleri	Karnosik asit	(Grzegorzcyk ve ark., 2006)
<i>S. miltiorrhiza</i>	Hücre süspansiyon kültürü	Criptotanshinone Ferruginol	(Miyasaka ve ark., 1986, 1987)
	Kök Kültürleri	Tanshinone	(Shimomura ve ark., 1991)
	Ti/Transforme Hücre Hatları	Tanshinone	(Song ve ark., 2000)
<i>S. miltiorrhiza</i>	Saçak Kök Kültürleri	Tanshinone Cryptotanshinone Rosmarinik asit	(Zhi ve Alfermann, 1993)
	Saçak Kök Kültürleri	Tanshinone Ferruginol	(Wang ve ark., 2010)
<i>S. sclerea</i>	Saçak Kök Kültürleri	Salvipisone, Ferruginol Aethiopinone 1-oxoaethiopinone	(Kuzma ve ark., 2008)
<i>S. fruticosa</i>	Saçak Kök Kültürleri	Rosmarinik asit	(Chen ve ark., 2001)
<i>S. leriifolia</i>	Hücre süspansiyon kültürleri	Fenolik asitler	(Moderres ve ark., 2018)
<i>Salvia officinalis</i> , <i>S. virgata</i> , <i>S. fruticosa</i>	Hücre süspansiyon kültürleri	Oleanolik asit, Ursolik asit	(Haas ve ark. 2014)
<i>S. fruticosa</i>	Hücre süspansiyon kültürleri	Oleanolik asit, Ursolik asit	(Kümmritz ve ark., 2016)

Salvia hücre süspansiyon kültürlerinde Rosmarinik asit (RA) üretimi için başarılı sonuçlar bildirilmiştir. RA biyosentezi tüm bitki dokularında meydana geldiği için hücre diferansiyasyonunu gerektirmez ve *Salvia* hücre süspansiyon kültürlerinde birikim, bazen tüm bitkidekinden daha yüksek olabilir. (Hippolyte ve ark., 1992), *S. officinalis* hücre süspansiyon kültüründe RA üretiminin son derece yüksek bir seviyesi (6.4 mg/l'e kadar) bildirilmiştir, ancak bu miktarın diğer benzer çalışmalarda elde edilmediği belirtilmiştir. Karam ve ark., (2003) ise, *S. fruticosa* türüne ait kallus, hücre süspansiyonu ve kök kültürlerinde RA birikimi üzerine bir çalışma yapmıştır. En yüksek miktarda kallus (0.79 g), 6.9 mM thidiazuron (TDZ) ve 3 mM indol-3-asetik asit (IAA) destekli MS besisi ortamında kültüre alınan yapraklardan elde edilmiştir. 5 hafta süren kallus kültürü, maksimum kallus büyümesi ve RA verimi (100 mg kuru ağırlık başına 2-12 mg) ile sonuçlanmıştır. 4% (w/v) sakkaroz ile kültüre alınan kökler, en yüksek taze (3-06 g) ve kuru (0-28 g) ağırlığı sergilemiş ve RA üretiminde en yüksek miktarı (100 mg kuru ağırlık başına 2-62 mg) üretmiştir. Farklı diferansiyasyon düzeylerine sahip farklı *in vitro* sistemlerinin kullanıldığı karşılaştırmalı bir çalışmada, *S. officinalis* saçak kökleri ve hücre süspansiyonlarının en yüksek RA üretimini sağladığı bulunmuş, bu da bu özelleşmiş metabolitin biyosentezi için diferansiyasyonun gerekli olmadığını vurgulamıştır (Grzegorzczuk ve ark., 2006).

Bano ve ark. (2022), *S. moorcroftiana*'nın *in vitro* çoğaltımını ve ikincil metabolitlerinin üretimini arttırmayı amaçladıkları çalışmalarında farklı oksin, sitokinin ve melatonin kombinasyonları kullanarak en yüksek kallus oluşumunu (%100) her biri 1 mg/l konsantrasyonunda 2,4-D+BAP ile kombine edilen MS besisi ortamından elde etmişlerdir. Ayrıca, aynı ortamda maksimum taze ağırlık elde edilirken, MS besisi ortamına 1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l BAP'ın yanısıra 1,5 mg/l oranında melatonin ilave edildiğinde ise maksimum kuru ağırlık elde edilmiştir. Ayrıca, maksimum DPPH aktivitesi ve toplam fenolik ve flavonoid içeriği de yine 1,5 mg/l oranında melatonin varlığında kaydedilmiştir. Sonuç olarak, çeşitli bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonları arasında 2,4-D + BAP (her biri 1mg/l) ile 1,5 mg/l melatonin uygulamasının, kallus gelişimi ve ikincil metabolitlerin üretimi için en iyisi olduğu rapor edilmiştir.

Bir diğer çalışmada, polifenolik bileşikler bakımından zengin bir kaynak olan *S. viridis* bitkisinin anti-enflamatuar, antioksidan ve antikanser etkileri nedeniyle büyük ölçekli platformlarda yetiştirilmesinin (Platform biyoreaktörü)

optimizasyonu amaçlanmıştır. Araştırma, sürgünlerin büyüme süresi, yarı-kesintili sistem kullanımı ve sıvı ortamdaki daldırma sıklığı gibi faktörlerin büyüme ve ikincil metabolitlerin birikimi üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. En etkili büyüme parametreleri, her 80 dakikada bir daldırılan bir besi ortamı sisteminde yetiştirilen sürgünlerde gözlemlenmiş olup, bu yöntemle dört haftada biyokütle 33 kat artmıştır. Ancak, en etkili biyoaktif bileşik üretimi, üç hafta boyunca her 80 dakikada bir daldırılan parametrede yetiştirilen sürgünlerde gerçekleşmiş; bu koşullarda toplam fenolik asit, toplam feniletanoid ve toplam fenol içeriği sırasıyla 18-3, 11-4 ve 29-7 mg/g kuru ağırlık olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak, Plantform biyoreaktöründe yetiştirilen *S. viridis* sürgün kültürlerinin, değerli bileşikler açısından zengin bir bitki materyali kaynağı olarak öne çıktığı rapor edilmiştir (Grzegorzcyk-Karolak ve ark., 2022).

Salvia türlerindeki biyoaktif metabolitlerin üretimine yönelik hücre süspansiyon ve saçak kök kültürlerinin kullanımına bakacak olursak, RA için, Laminaceae türlerine ait bitkilerin çeşitli doku kültürlerinde uçucu maddelerin indüksiyonu için organogenez kaçınılmazdır. Yine diterpen sentezi için doku diferansiyasyonun da kritik olduğu rapor edilmiştir (Mulder-Krieger, 1988). *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* ve *S. officinalis*'in farklılaşmamış kallus kültürlerinde uçucu maddelerin birikmediği görülmüştür (Becker, 1970). Benzer şekilde, *Lavandula angustifolia* ve *R. officinalis*'in farklılaşmamış doku kültürlerinde ise herhangi bir monoterpen tespit edilememiştir (Webb ve ark., 1984). *S. officinalis*'te karnosik asit üretimi ile ilgili olarak, (Grzegorzcyk ve ark., 2006), bu diterpenin yalnızca sürgün kültürleri yoluyla üretilebileceği ve sadece sürgünlerin bu yeteneğe sahip olduğu rapor edilmiştir. Bu bulgu, farklılaşma düzeyinin RA üretimini etkilemediği daha önceki sonuçlarla uyumludur, ancak karnosik asit ve karnosolün biyosentezinin morfolojik farklılaşma eksikliği tarafından olumsuz yönde etkilendiği de bildirilmiştir (Kuhlmann, 2006).

Günümüze değin, **Danshen** (*S. miltiorrhiza* Bunge) kallus ve hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak diterpenler üretmek için bir dizi çalışma yapılmıştır. (Marchev ve ark., 2014). *S. miltiorrhiza* fidelerinin mikroçoğaltımı, *in vitro* organogenez aracılığıyla başarılmıştır (Wang ve Liu, 1987). Kalluslar, fitohormonların uygun konsantrasyonlarıyla MS ortamında genç yaprak ve petiole eksplantlarından indüklenmiştir. Özellikle 4 mg/l 6-benzilaminopurin (BA) ve 3

mg/l naftalen-3-asetik asit (NAA)'ın, kallus indüksiyonu için en iyi konsantrasyonlar olduğu bildirilmiştir (Lemraski ve ark., 2014).

Bir diğer çalışmada *S. miltiorrhiza* fideleri, önemli miktarda kriptotanshinon (CT) ve ferruginol üretebilen bir hücre hattı indüklemek için kullanılmıştır (Miyasaka ve ark., 1986). Ayrıca, ortam kompozisyonunun CT ve ferruginol üretimi üzerinde derin bir etkisi olduğu kanıtlanmıştır, çünkü ortam optimizasyonu CT'nin (110'e karşı 87.4 mg/L) çok daha yüksek bir birikimine ve biraz daha düşük ferruginolün (53.2'ye karşı 69.3 mg/L) birikimine yol açmıştır. Ayrıca, ışık altında kültüre alınan hücrelerde ferruginol içeriği, karanlıkta kültüre alınanlara göre sadece %56 olmuştur (Miyasaka ve ark., 1987).

S. miltiorrhiza kök kültürlerinde daha yüksek terpen üretimi için ortam kompozisyonunun kritik olduğu da bulunmuştur: sekiz hafta boyunca 0.5 mg/l indol-3bütirik asit (IBA) ile sıvı Gamborg B5 ortamında alt kültüre alınan köklerin, en yüksek tansinon içeriğine sahip olduğu, ana bitki köklerinde üretilen miktarın yaklaşık olarak altı katına karşılık gelen 80 mg/g kuru ağırlık (DW)'a sahip oldukları bildirilmiştir (Shimomura ve ark., 1991). Bir diğer yöntem ise, *S. miltiorrhiza* fidelerini *A. tumefaciens* suşu C58 ile enfekte ederek ve Ti-transforme hücre hatlarını kültüre alarak daha yüksek miktarda total tansinon biriktiren hücre süspansiyon hatları oluşturmak temellidir (Song ve ark., 2000).

Birçok biyoaktif metabolitin birçok *Salvia* bitkisinin köklerinde sentezlendiği ve/veya biriktiği göz önüne alındığında, saçak kök kültürünün bu bileşiklerin ekstraksiyonu için bir alternatif kaynak olarak geniş ölçüde kullanıldığını belirtmek önemlidir. Saçak kökler, yaralı bitki dokularının *Agrobacterium rhizogenes* toprak bakterisi ile enfekte edilmesiyle indüklenir (Saito, 1993). İstenen bileşikler sentezleme yeteneğinin yanı sıra, saçak kök kültürlerinin genetik ve biyokimyasal olarak stabil olma ve hızlı ve bitki büyüme düzenleyicisinden bağımsız büyüme oranları gösterme avantajları vardır. Bu nedenle, metabolit üretimi, saçak kök kültürlerinde genellikle tarla bitkilerinin köklerinde veya hücre süspansiyonlarında bulunan içeriğin önemli derecede ölçüde üzerine çıkabilir (Kuzma ve ark., 2008).

In vitro yetiştirilen genç *Salvia* bitkilerinin, *A. rhizogenes* ile transformasyonu için en iyi eksplant kaynakları olduğu görünmektedir (Hao ve ark., 2012), muhtemelen *in vivo* yetiştirilen bitkilerin yapraklarından (Gupta ve ark., 2011) daha etkilidir, çünkü *in vivo* *Salvia* yapraklarının transformasyonu,

dönüşümü olumsuz etkileyen fenolik bileşiklerin yoğun bir şekilde salınımı ile birlikte meydana gelmektedir (Marchev ve ark., 2011). Ayrıca, saçak kök indüksiyonunun verimliliği, *A. rhizogenes* suşuna bağlıdır (Gupta ve ark., 2011). *S. miltiorrhiza*'nın ilk rapor edilen saçak kök kültürü, bitki eksplantlarını farklı *A. rhizogenes* suşları ile enfekte ederek elde edilmiştir (Zhi ve Alfermann, 1993). Saçak kökleri çoğunlukla *A. rhizogenes* ATCC 15834 ile enfekte edildi, bu suşun diğer suşlara göre yüksek dönüşüm verimine sahip olduğu gösterildi, ancak daha yüksek metabolit üretimine neden olmadı. Örneğin, *A. rhizogenes* ATCC 15834 tarafından dönüştürülen *S. miltiorrhiza* saçak kökleri, az miktarda tanshinon ve 0.04 mg/L CT üretirken, daha yüksek RA düzeyine (1.24% w/w) sahiptir. Kültür ortamının saçak kökleri sıvı MS besisi ortamında amonyum nitrat olmaksızın kültüre alındığında, Saçak köklerinde ve kültür ortamında yedi ana tansinon ve ferruginol bileşiği tespit edilmiştir. Saçak köklerin kuru ağırlığı 20 günde 22 kat artarken, köklerin toplam tansinon içeriği 43 mg/g dw'ye (CT olarak 20 mg/g dw) ulaşmıştır (Wang ve Wu. 2010). Benzer şekilde, *S. sclarea*'nın saçak köklerindeki toplam diterpenoid içeriği, tarla bitkilerinin köklerindeki dokuz kat daha fazla bulunmuştur (Kuzma ve ark., 2008), ve *S. officinalis* saçak kök kültürlerinin olgun bitki köklerinden daha yüksek miktarda rozmarinik asit biriktirdiği bulunmuştur (31 mg/g dw) (Chen ve ark. 2001) Metabolit üretiminde daha fazla artış, aşağıda belirtildiği gibi, elisitörler ile muamele edilen *Salvia* saçak kökleri için rapor edilmiştir.

2.2.4. Elisitör olarak nanopartiküller

2.2.4.1. Nanoteknoloji ve nanomalzemeler

Nanoteknoloji, nanomalzemelerin sentezini ve gelişimini yönlendiren bir yükselen bilim alanıdır. Nanopartiküller (NP'ler), 1 ila 100 nanometre boyutları arasındaki materyaller olarak tanımlanır ve bunlar yapay veya doğal olabilir (Hasan, 2015). NP'ler, son yıllarda morfoloji, kimyasal reaktivite, rekabetçi bağlama siteleri ve optik aktivite gibi dikkat çekici benzersiz özelliklere sahip oldukları için büyük ilgi görmektedir. Yüzeyleri, şekilleri ve yapıları bakımından büyük malzemelerden farklılık gösterebilirler ve bu ölçekte geliştirilmiş özelliklere

sahip olabilirler (Joshi ve ark., 2019). NP'lerin tıp, biyoteknoloji, elektronik, gıda ve tarım gibi çeşitli alanlarda potansiyel uygulamaları vardır (Lira Saldivar ve ark., 2018; Vargas-Hernandez, ve ark., 2020).

2.2.4.1.1. Tarımsal uygulamalarda nanomalzemeler

Tarımsal uygulamalarda nanomalzemeler, nanoteknolojinin tarım sektörüne entegrasyonu ile ortaya çıkan materyalleri ifade eder. Bu nanomalzemeler, genellikle nanoölçel boyutlara sahip olan ve tarımın çeşitli alanlarında kullanılan özel malzemelerdir. Tarımsal uygulamalarda sıkça kullanılan nanomalzemeler arasında nano-gübreler, nano-pestisitler, nano-enzimler, nanomalzemelerle kaplanmış tohumlar ve nano-sensörler sayılabilir. Nanomalzemelerin tarımda kullanımı, verimliliği artırma, kaynak kullanımını optimize etme ve çevresel sürdürülebilirliği destekleme potansiyeline sahiptir. Ancak, bu teknolojilerin uzun vadeli etkileri ve güvenliği konularında daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Nanomalzemelerin tarımsal üretimindeki temel uygulamaları, agrokimyasal kullanımının azaltılması ve zararlılar ile besin yönetimi aracılığıyla verimin artırılmasıdır (Prasad ve ark., 2017). Son çalışmalar, nanoteknolojinin tarım üretiminde verim, besin değeri ve nutrasötik değeri artırma potansiyelini vurgulamaktadır (Fraceto ve ark., 2016). Nanopartiküllerin tarımsal uygulamadaki fayda ve özellikleri de dikkat çekmektedir (Duhan ve ark., 2017).

2.2.4.1.2. Bitki hücre ve doku kültürlerinde elisitör olarak nanopartiküller

Nanoparçacıklar, bitki hücre ve doku kültürlerinde biyoaktif bileşiklerin indüksiyonu için yenilikçi bir abiyotik elisitör olarak potansiyele sahiptir (Hatami ve ark., 2019). Son yıllarda, birçok araştırmacı, nanoparçacıkların ikincil metabolit biyosentezine dahil genlerin ekspresyonunu tetikleme rolünü incelemiştir (Yarizade ve ark., 2015). Mekanizmayı tam anlamak için hâlâ birçok çaba gerekmektedir. Birlikte, bazı araştırmacılar, NP'lerin (nanoparçacıkların) reaktif oksijen türlerini (ROT) ve ikincil sinyal iletenleri indüklediğini ve bu durumun bitki ikincil metabolizmasında transkripsiyonel düzenlemeye yol açtığını öne sürmüşlerdir (Marslin ve ark., 2017). ROT ve kalsiyum iyonları (Ca^{2+}), ikincil

metabolitlerin transkripsiyonel düzenleyicilerinin yukarı regülasyonuna yol açan önemli ikinci habercilerdir (Anjum ve ark., 2019). Oksidatif stresin aktivasyonu veya inaktivasyonu, bitki türleri (Hasanuzzaman ve ark., 2020), doku yaş ve türü (Vannini ve ark., 2013), bitkilerdeki tolerans veya hassasiyet ve stres uygulama türü (Tassi ve ark., 2017) gibi çeşitli faktörlere bağlıdır.

Birçok çalışma, NP uygulamasının bitki hücrelerinde ROT birikimine neden olduğunu ve bu nedenle birincil ve ikincil metabolitlerde ardışık doğrudan ve dolaylı değişikliklere yol açtığını bildirmiştir (Marslin ve ark., 2017).

Nanopartiküllerin *in vitro* kültürlerdeki uyarıcı etkileri gün geçtikçe daha fazla ilgi çekmektedir; ancak bu konudaki etkiler hakkında sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bitkilerin birincil ve ikincil metabolitleriyle etkileşiminden kaynaklanan yeni uyarıcı etkinlikler, *in vitro* sistemlerde rapor edilmiştir. Hücre kültürlerinde ticari olarak önemli biyoaktif bileşiklerin üretimi, özellikle tıbbi bitkilerde ikincil metabolizma üretimi odaklı olarak, doku kültürü teknolojisi ile artırılmaktadır (Zhang ve ark., 2013). Son yıllarda hücre/doku kültürü yöntemleri, özellikle tıbbi bitkilerde ikincil metabolizma üretimi üzerinde odaklanmıştır (Hatami ve ark., 2019).

Son çalışmalar, bitki doku kültürlerinde nanopartiküllerin uygulanma yöntemi, kullanılan nanopartikülün çeşidi ve süresi gibi faktörlere bağlı olarak sekonder metabolizma yollarında çeşitli etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, nanopartiküllerin etkili bir şekilde uygulanması, kritik dozajların belirlenmesi, nanopartiküllerin sinerjik etkilerinin araştırılması konuları bitkilerin biyoaktif bileşen üretimi üzerindeki etkilerini anlamak için önemlidir (Rivero-Montejo ve ark., 2021). Bu noktada nanopartiküllerin kullanımıyla biyoaktif bileşiklerin indüklenmesinin temel amacı, terapötik aktiviteye katkıda bulunan bir dizi bileşiği içeren flavonoidler, uçucu yağlar, karotenoidler, terpenoidler, kumarinler ve alkaloidleri artırmaktır (Muley ve ark., 2009).

Örneğin, Bakır oksit nanopartiküllerin (CuO) kültür sistemine uygulanması, sürgünlerde toplam fenol, köklerde flavonoid içeriği ve sürgünlerde antioksidan aktivitesinde artışa neden olmuştur (Singh ve ark., 2018). Ag nanopartiküllerin uyarımı, kültüre alınan bitkiciklerde indigo ve triptantren üretimini artırmıştır (Karakas, 2020).

Çinko oksit nanopartiküllerin kültür sistemine uygulanması, farklı *Thymus* türleri ve *Z. multiflora*'nın timol ve karvakrol içeriğini artırmıştır (Mosavat ve ark., 2019). Titanyum dioksit (TiO₂) ve Silikon Dioksit (SiO₂) nanopartiküllerinin kullanımı, Arğan bitkisinin *in vitro* üretiminde kontrolle karşılaştırıldığında belirgin bir artışa neden olmuştur (Hegazi ve ark., 2020).

Çinko oksit (ZnO) ve CuO nanopartikül uyarımının candy leaf bitkisinde rebaudioside A, stevioside, toplam fenol ve flavonoid içeriğini artırdığı görülmüştür (Ahmad ve ark., 2020). Farklı türlerdeki nanopartiküller arasında aynı sinerjistik etkinin *in vitro* olarak gözlemlendiği vurgulanmalıdır. Altın ve gümüş (AgAu) nanopartiküllerin kombinasyonu, toplam fenol ve flavonoid içeriğinde artış sağlamıştır (Fazal ve ark., 2019). Ag nanopartiküllerle uyarılan bitkilerde biyokütle azalması gözlemlense de, çeşitli biyoaktif bileşiklerde artış gözlenmiştir (Chung ve ark., 2018a). Ag nanopartiküllerin bitki biyoteknolojisinde yeni ve etkili bir uyarıcı olarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Rivero-Montejo ve ark., 2021).

Bu araştırmalar, nanopartiküllerin ikincil metabolizmanın biyosentezi üzerindeki sinerjistik etkilerini, kullanılan nanomateryal, bitki türleri ve dozlara bağlı olarak değişeceğini göstermektedir. Bu bağlamda, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f. süspansiyon kültürlerinde AgNP'lerin kullanımının, terpenoid içeriği, toplam fenolik ve flavonoid miktarı ile antioksidan kapasite değeri üzerindeki etkilerinin ilk kez belirlenecek olması, elisitör olarak nanopartiküllerin kullanımının ikincil metabolizma üzerindeki potansiyelini anlamak açısından önemlidir.

2.2.5. *Salvia*'da elisitasyon yoluyla biyoaktif metabolitlerin arttırılması

İkincil metabolitler, bitkilerin mikrobiyal patojenlere ve çevresel streslere karşı kısmi bir savunma katkısı yapar. Bu nedenle biyotik ve abiyotik elisitörler, bitki doku kültürlerinde üretimlerini uyarabilir. Elisitörler, bitki savunma tepkilerini tetikleyen ajanlara işaret eder, örneğin bitki hücrelerinde fitoaleksinlerin (antimikrobiyal ikincil metabolitler) birikimini (Zhao ve ark., 2005) içerir. *S. miltiorrhiza* saçak kök kültürlerinde tansinonlar genellikle düşük verimlerde üretilir ve bu ilginç bileşik sınıfının sentezini artırmak için çeşitli iyi belgelenmiş

elisitasyon stratejileri uygulanmıştır. Bunlar arasında biyotik ve abiyotik elisitör uygulamaları bulunmaktadır.

Örneğin, *S. miltiorrhiza* saçak kökleri, Maya ekstresi (YE) ile elde edilen, RA'nın azalmış bir konstitütif seviyesini biriktirirken, CT seviyesi büyük ölçüde artmıştır, ancak bu artışla birlikte biyokütle birikiminin azaldığını göstermiştir, bu da elisitasyonun hücreleri birincil metabolizmadan ikincil metabolizmaya kısmen geçirdiğini göstermiştir (Chen ve Chen, 2000). YE, *S. miltiorrhiza* saçak kök kültürlerinde tansinon üretimini doza bağlı olarak uyarıcı bir etki göstermiştir, en belirgin olarak 100 mg/L'de eklenildiğinde, tansinon verimi, elicited saçak köklerinde bulunan miktarın 3.8 katı kadar olduğu bildirilmiştir. (Yan ve ark., 2005). Bitki savunma tepkisi indükleyicisi olan beta-aminobütirik asit (BABA), *S. miltiorrhiza* saçak kök kültürlerinde YE ile indüklenen tansinon üretimini güçlü bir şekilde artırabilir (Ge ve Wu, 2005a). Saçak kökleri, YE eklenmeden önce 3 gün boyunca BABA ile ön işleme tabi tutulduğunda, sadece YE uygulamasına göre çok daha yüksek bir tansinon verimi elde edilir, muhtemelen BABA ön işleme, kök hücrelerini elisitasyona daha duyarlı ve tepki verebilen hale getirir. İnorganik iyonlar veya ağır metaller ve hiperosmotik stres de *S. miltiorrhiza* saçak kök kültürlerinde tansinon üretimini uyarıcı bir şekilde etkili olmuştur. (Zhang ve ark., 2004), *S. miltiorrhiza* saçak kök kültürlerine gümüş iyonu Ag^+ (30 μM) sağlayarak, köklerin toplam tansinon içeriğini kontrole göre iki katı artırırken , kök büyümesini bastırmıştır. Saçak kökleri, Ag^+ ile 24-48 saat ön işlem görmüşse, YE ile indüklenen diterpen üretimini (özellikle CT) de potansiyalize etmiştir. (Ge ve Wu, 2005b). Başka bir ağır metal iyonu olan La^{3+} , *S. miltiorrhiza* saçak kök kültürlerine uygulandığında, tansinon üretimini yaklaşık %50 artırmıştır (27 mg tansinon/g'ye kadar) (Zhou ve ark., 2010). Hiperosmotik stres, saçak kök kültürlerinde ikincil metabolizmayı tetikleme konusunda etkili başka bir yoldur. *S. miltiorrhiza* saçak köklerinin kültür ortamına eklenen sorbitol (kontrol MS ortamının 1.5-2 kat osmolaritesi) köklerin toplam tansinon içeriğini kontrol edilmemiş köklere göre 4-5 kat artırmıştır (Shi ve ark., 2007). Osmotik stresi indüklemek için özellikle ilginç bir bileşik, çünkü kültüre alınan bitki hücreleri için osmotik stresi indükleyebilir ve aynı zamanda kültüre alınan bitki hücreleri için ana karbon kaynağı olarak hizmet edebilir (Wu ve Shi, 2008).

Biyotik ya da mikrobiyal elisitörler, ölü hücre parçacıkları şeklinde çok öncelerden beri kullanılmış olmasına rağmen, son yirmi yılda biyolojik ajan uygulamalarının optimizasyonu *S. miltiorrhiza*'da tanshinon üretimini büyük ölçüde artırmıştır (Wu ve ark., 2007, Zhao ve ark., 2010b). *S. miltiorrhiza* saçak köklerinin kültivasyon sürecinin başında *B. cereus* canlı bakterilerin çeşitli konsantrasyonları ile inokülasyonu, tansinon birikimini çok güçlü bir şekilde artırmış (12-18 kat artış), ancak kök büyümesini önemli ölçüde inhibe etmiştir (toplam biyokütlede %50'ye kadar azalma), bu nedenle genel verim düşük kalmıştır (Wu ve ark., 2007). İnokülasyon zamanının optimize edilmesinden sonra, 18 günlük bir *S. miltiorrhiza* saçak kök kültürüne %2.5 hacim/v hacminde *B. cereus* canlı bakteri süspansiyonu eklenerek tansinon veriminde 12 kat artış elde edilmiştir (0.20'den 2.67 mg/g dw'ye) (Zhao ve ark., 2010a). Song ve arkadaşlarını 2000 yılında rapor ettiği çalışmada, bitki patojenik fungus *Armillaria mellea*'nın otoklavlanmış miselyal sıvısını *S. miltiorrhiza* 'nın crown gall hücre kültürlerine uyarıcı olarak kullandı, kontrolün üzerine göre maksimum tanshinon verimini (147 mg/L), 9 kat arttırdı. Elisitasyonun büyümeyi olumsuz etkileyebileceği göz önüne alındığında (Zhao ve ark., 2010b), elisitor konsantrasyonu ile elisitörün eklenme zamanının optimizasyonu, Kuzma ve ark. (2008) tarafından belirtildiği gibi, *Salvia sclarea* saçak köklerinin diterpenoid üretimini güçlü bir şekilde etkileyen faktörlerdir. En yüksek diterpenoid birikimi, biyoreaktör kültüründe 23 günlük saçak köklerine yedi gün boyunca uygulanan 125 µM metil jasmonat (MeJA) ile elde edilmiştir (Kuzma ve ark., 2008). İlginç bir şekilde, bu çalışmalar MeJA'ın, sıvı biyoreaktör kültürlerinde olduğu gibi sallanan şişe kültürlerinde de biyoaktif diterpenoid birikimini etkili bir şekilde uyarabildiğini ortaya koymuştur. Neyse ki, MeJA'nın biyoreaktörde uygulanması, muhtemelen daha yüksek kök biyokütlesinden dolayı ve dolayısıyla elisitöre daha fazla reseptörü maruz bıraktığı için, *S. sclarea* saçak kökleri üzerindeki MeJA elisitasyonundan daha avantajlı olmuştur.

Kai ve ark., (2012) tarafından yapılan bir diğer çalışmada; MeJA, *S. miltiorrhiza* saçak köklerinde elisitör olarak kullanarak tanshinon biosentezi yolunun düzenlenmesini incelemek için kullanılmıştır. Bu gen transkripsiyon aktivasyonu ve tanshinon biosentezinin erken adımlarında yer alan ilgili enzimleri kodlayan genlerin tümü MeJA tarafından dramatik bir şekilde uyarılmıştır ve tanshinon birikimi MeJA tarafından büyük ölçüde uyarılmıştır. Bununla birlikte,

aynı çalışmada YE veya Ag⁺ 'nin etkisi de değerlendirilmiştir. Bunlar muhtemelen geç tanımlanmış belirli tanhinon biyosentetik genlerin indüksiyonu nedeniyle yalnız başlarına veya bir arada tanhinon biosentezinin indüksiyonunu teşvik etmiştir. Bu nedenle, tanhinon biosentezi yolunun tamamının daha iyi anlaşılması, biyotik ve abiyotik elisitörlerin sinerjistik bir kombinasyonu ile *S. miltiorrhiza* saçak kök kültüründe üretimini teşvik etmek için kullanışlı bilgiler sağlayabilir. Farklı *Salvia* türlerindeki elisitasyon çalışmaları, transkriptom analizi ile birleştirildiğinde, farklı elisitör aktivitesinin artırıcı etkilerinin, biyosentetik genlerin veya düzenleyici genlerin ekspresyonunu yukarı regüle etme yeteneklerine dayandığını ortaya koymuştur. Bu nedenle, ikincil metabolit oluşturma sorumlu olan hız sınırlayıcı enzimleri veya ikincil metabolit oluşumu için sorumlu anahtar transkripsiyon faktörlerini kodlayan yeni genleri aşırı ifade etme, yukarı regüle etme, susturma veya tanıtmaya çabalarına büyük çaba harcanmıştır (Zhou ve ark., 2011b).

2.2.6. Hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini teşvik edici stratejiler

Bitki hücre süspansiyon kültürleri, ikincil metabolit üretimi için önemli bir araç olarak kullanılmaktadır. Bu kültürler genellikle çalkalama düzeneklerinde sıvı besiyerinde geliştirilir. Gelişen hücre süspansiyonları, bireysel ve kümeleşmiş hücrelerden oluşur. Bitki hücreleri, kallus veya sıvı besiyerinde süspansiyon kültürü şeklinde aseptik koşullarda saklanabilir.

Kallus, düzensiz bitki hücrelerinin kümelenerek, kısmen farklılaşmış, hızlı üreyebilen bir formudur. Bu form, bitki dokularının kallus indüksiyonu ile uyandırıldığı bir iyileştirme mekanizması olarak ortaya çıkar. Kallus kültürü, farklılaşmış ve farklılaşmamış iki sınıf dokudan oluşur ve dağınık özelliği ile karakterizedir. Dağınık özellik, hücre süspansiyon kültürleri için istenen bir özelliktir (Güven ve Gürsul, 2014).

Bitki hücre kültürlerinde büyüme, hücre sayısında artış ve hücre hacminde artış olmak üzere iki ana aşamada gerçekleşir. Büyüme-süre grafiği, mikroorganizmalarda olduğu gibi sigmoidal bir eğri gösterir. Büyüme süreci, lag

fazı, log veya üstel faz, lineer faz, yavaşlama fazı ve duraklama fazı olmak üzere beş karakteristik büyüme fazından oluşur (Ramulifho ve ark., 2019)

Bitki hücre kültürlerinde ikincil metabolit birikimi ile büyüme arasındaki ilişki, antosiyanin tipi ve betasianin tipi olmak üzere iki ana model aracılığıyla değerlendirilir. Antosiyanin tipinde, ikincil metabolit birikimi ile büyüme arasında ters bir ilişki vardır. Betasianin tipinde ise metabolit seviyesi hücre bölünmesi ile doğru orantılıdır (Tepe ve Sökmen, 2007).

İkincil metabolitler, bitkilerde savunma mekanizması olarak sentezlenir ve bitkinin stres faktörleri ile karşılaştığında ortaya çıkar. Ayrıca, ikincil metabolitler, bitkinin büyüme koşullarındaki değişikliklerden korunmasına yardımcı olarak metabolik aktiviteleri etkilerler (Isah, 2019).

Bitki doku kültürlerinin kullanımı, spesifik biyoaktif bileşenlerin ticari üretimi için *in vitro* geliştirilen kültürleri içerebilir. Hücre kültürleri, büyüklüklerine bağlı olarak ve sıkça bir araya toplanarak geliştikleri için homojen hücre gruplarının önemli olduğu vurgulanmalıdır. Bu gruplar, kültürün üretim potansiyelini önemli ölçüde etkileyebilir.

Sonuç olarak, bitki hücre kültürleri, sekonder metabolit üretimi için önemli ve kontrol edilebilir sistemler sağlar. Bu kültürlerin geliştirilmesi ve yönetilmesi, bitki biyoteknolojisi alanında geniş uygulama alanlarına sahip potansiyel bir araştırma ve endüstri alanını temsil etmektedir. Hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak için kullanılan stratejiler arasında özellikle elisitasyon, prekürsör kullanımı, bitki büyüme düzenleyicileri, besin ortamının optimize edilmesi ve hücre süspansiyonlarının uygun biyoreaktörlerde kültüre alınması gibi çeşitli yöntemleri içermektedir. Ayrıca, son yıllarda, sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla nanoparçacıkların da elisitör olarak başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

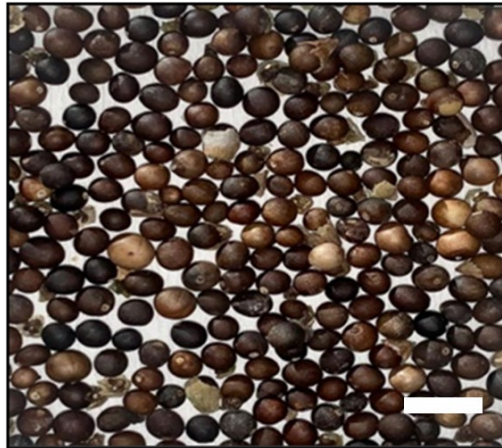
3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

2.1.1. Çalışma materyali

Çalışmamızın materyali, 2019 yılında Türkiye Florası kareleme sistemine göre B7 karesinde, Elâzığ ili, Keban ilçesinde gerçekleştirilen arazi çalışması sonucunda elde edilmiştir. İlk arazi çalışması Mayıs ayında bitkinin habitat ve tür tespiti, çiçekli halinin belirlenip herbaryum örneği haline getirilmesi amacıyla yapılmış, ikinci arazi çalışması ise bitkinin tohumlarının olgunlaştığı Temmuz ayında gerçekleştirilmiştir. Toplanan örnekler herbaryum örnekleri haline getirilip, herbaryum tekniklerine uygun bir şekilde kurutulmuştur. Bitkinin tür teşhisi, "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı eserin yedinci cildine göre yapılmıştır (Hedge, 1982). Toplanan örnekler, Dr. Mehmet Fırat'ın (MF. 34970) toplayıcı numarası ile VANF (Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Herbaryumu) koleksiyonuna eklenmiştir.

Tez çalışması kapsamında kullanılan *Salvia pseudoeuphratica* Rech.f. tohumları (Şekil 3.1.), Batman Üniversitesi Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'na getirilmiş ve doku kültürü çalışmalarında kullanılabilecek kadar +4 °C'de buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.1. *Salvia pseudoeuphratica* Rech.f. tohumları (Bar: 1 cm)

3.2. Yöntem

3.2.1. Olgun tohumların yüzey sterilizasyonu

Huii ve ark. (2012) tarafından rapor edilen yöntem, olgun tohumların yüzey sterilizasyonu modifiye edilmiştir. Tohumlar, başlangıçta musluk suyu altında 20 dakika süresince yıkanarak, yüzeylerindeki mukus tabakasından arındırıldı. Daha sonra, 5 saniye süreyle %70 etil alkol (EtOH) çözeltisinde tutulduktan sonra, 5 dakika süreyle steril dH₂O ile yıkandı. Etil alkol uygulamasının ardından, %5 sodyum hipoklorit (NaOCl) çözeltisinde 10 dakika süreyle işlem gördü. Son olarak, NaOCl'den arındırmak için tohumlar 5'er kez 5'er dakika süreyle steril dH₂O ile yıkandı.

3.2.2. Kallus kültürlerinin başlatılması

Kallus kültürlerinin başlatılması çalışmalarında yüzey sterilizasyonu tamamlanan olgun tohumlardan, her biri 1mg/l konsantrasyonlarında hazırlanan farklı oksin (IAA, IBA ve 2,4-D) ve sitokinin (BAP, Kin ve TDZ) kombinasyonları destekli (Her biri 1'er mg/l; IAA-BAP, IAA-Kin, IAA-TDZ, IBA-BAP, IBA-Kin, IBA-TDZ, 2,4-D-BAP, 2,4-D-Kin, 2,4-D-TDZ) MS (Murashige ve Skoog, 1962) besi ortamına ekilerek, BBO'ya transfer edildi. Çalışmanın sonunda en iyi kallus oluşumu (miktar ve kallus tipi) tespit edilen kalluslar belirlenen besi ortamına ekilerek, çoğaltım işleminin gerçekleşmesi için BBO'ya transfer edildi.

3.2.3. Süspansiyon kültürlerinin başlatılması

En iyi kallus oluşumunun elde edildiği 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D kombinasyonunu içeren agarsız MS besi ortamı kullanılarak, süspansiyon kültürleri başlatıldı. Bu kapsamda daha önce sürekli alt kültür yoluyla elde edilen kallus stok kültürlerinden süspansiyon kültürlerinin başlatılması aşamasında, kolay dağılabilen, yeşilimsi-sarı renk özelliklerine sahip tohum orjinli ve yaş ağırlıkları

yaklaşık 0.5 g olan kallus parçaları, 1 mg/l KIN ve 1 mg/l 2,4 D ile destekli agar içermeyen 50 ml MS besi ortamının olduğu 250 ml lik erlenlere aktarıldı. Erlenler içindeki süspansiyon kültürleri BBO'ya transfer edilerek 100 rpm hıza ayarlı çalkalayıcı üstünde kültüre edildi.

Süspansiyon kültürünün başlatılmasının ardından, yaklaşık 4 haftalık kültür süresinin sonunda, süspanse olan kalluslar sırasıyla 500 µm, 250 µm ve 100 µm'lik porlara sahip metal süzgeçlerden geçirilerek başarılı bir şekilde hücre süspansiyon kültürleri oluşturuldu. Daha sonra, kültürlerin çoğaltımı her 4 haftalık kültür süreci sonunda tekrar alt kültürleri yapıldı.

3.2.4. Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu

Hücre süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu sürecinde, aşağıda sıralanan konu başlıkları altında çeşitli yöntemler test edildi.

3.2.4.1. Farklı karbon kaynaklarının süspansiyon gelişimine etkisi

Süspansiyonların gelişimleri ve büyümeleri üzerine çeşitli karbon kaynaklarının (Glukoz ve Sukroz) ve bunların farklı konsantrasyonlarının (15, 30 ve 45 g/l) etkileri denendi.

3.2.4.2. Süspansiyon gelişimine farklı ışık yoğunluklarının etkisi

Süspansiyonların gelişimlerine karanlık ve aydınlık (kontrol) ortamların etkisi test edildi.

3.2.4.3. Süspansiyon gelişimine farklı çalkalama hızlarının etkisi

Süspansiyonların gelişimlerine farklı çalkalama hızlarının (90 rpm, 100 rpm (kontrol) ve 110 rpm) etkisi test edildi.

3.2.4.4. Süspansiyon gelişimine farklı pH'ın etkisi

Süspansiyon gelişimlerine besi ortamının farklı pH'larının (sırasıyla pH 4.5, 5.8 (Kontrol) ve 7.0) etkisi test edildi.

3.2.5. Süspansiyon kültüründe büyüme eğrisinin belirlenmesi

Süspansiyon kültürlerine yönelik gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarının akabinde süspansiyon kültürünün büyüme eğrisi oluşturma çalışması gerçekleştirildi. Optimizasyon çalışmasıyla birlikte belirlenen en iyi besi ortamı kullanılarak süspansiyon kültürleri oluşturuldu. Büyüme eğrisinin oluşturulması kapsamında her zaman periyodu için hazırlanan süspansiyon kültürlerinden 0., 7., 14., 21. ve 28. günler için örnekler alınarak eğriler hesaplandı.

3.2.6. İkincil metabolit üretimine AgNP elisitasyonunun etkisi

Elisitasyon çalışmaları kapsamında 40nm boyutunda gümüş nanopartükülleri (AgNP) kullanıldı. AgNP'lerin besi ortamına katılmadan önce 1 mg/l lik konsantrasyonda hazırlandı ve filtre ile steril edildi. Büyüme eğrisinin oluşturulmasıyla birlikte süspansiyon kültürünün büyüme fazı sonu tespit edildi. Süspansiyon kültürlerine büyüme fazının sonunda 0, 12, 24 ve 48 saat boyunca 100-200-400-800 µg/ml konsantrasyonlarında hazırlanan AgNP (40 nm) uygulaması gerçekleştirildi.

3.2.7. Süspansiyon kültürlerinde ölçüm parametreleri

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen süspansiyon kültürlerinin taze ve kuru ağırlıkları, ayrıca Paketlenmiş Hücre Hacmi (PHH) değerleri belirlenerek morfolojik gözlemlerle birlikte raporlandı.

3.2.7.1. Paketlenmiş hücre hacminin (PHH) hesaplanması

Hücre süspansiyonlarının bulunduğu sıvı ortamdan 10 mL alınıp 15 mL'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 3000 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj işlemi uygulandı. Santrifüj sonrasında tüpte oluşan peletin hacmi Paketlenmiş Hücre Hacmi (PHH) olarak hesaplandı.

$$\text{Paketlenmiş Hücre Hacmi (mL)} \times \text{PHH (mL/L)} = \text{Paketlenmiş Hücre Hacmi (mL)} \times 1000$$

Örnek Hacmi (mL) (Asan, 2013)

3.2.7.2. Taze ağırlığın hesaplanması

Süspansiyon kültürü hücrelerinin içinde bulunduğu sıvı ortamdan 10 mL alınıp, 22 µm por çapına sahip filtrelerden geçirilerek hücreler ve sıvı ortam birbirinden ayrıldı. Sıvının uzaklaştırılmasının ardından elde edilen hücreler, hassas terazide tartılarak taze ağırlıkları belirlendi. Taze ağırlık hesaplaması için şu formül (Asan, 2013) kullanıldı:

$$\text{Taze Ağırlık (g/L)} = \text{Taze Hücre Ağırlığı (g)} \times 1000 \text{ Örnek Hacmi (mL)}$$

3.2.7.3. Kuru ağırlığın hesaplanması

Taze ağırlığı ölçülen hücrelerin, oda sıcaklığında kurutulmasından sonra sabit bir ağırlık elde edilinceye kadar tartıldı ölçüm sonuçları kaydedildi. Kuru ağırlık hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı (Asan, 2013):

$$\text{Kuru Ağırlık (g/L)} = \text{Kuru Hücre Ağırlığı (g)} \times 1000 \text{ Örnek Hacmi (mL)}$$

3.2.8. Kültür koşulları ve süresi

Kültürlerin bulunduğu Bitki Büyütme Odası koşulları $50 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık şiddetinde 25 ± 2 °C sıcaklık ve 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık fotoperiyoduna sahiptir. Normal kültür süreci yaklaşık 4 haftadır.

3.2.9. Ekstraksiyon, toplam fenolik ve flavonoid ve biyolojik aktivite belirlenmesi çalışmaları

3.2.9.1. Ekstraksiyon işlemi

Süspansiyon çalışmasında elde edilen örnekler oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda kurutuldu. Ardından etanol ile ekstrakte edildi. Çözücü evaporatör sisteminde uçurulduktan sonra elde edilen ekstrelerin 4000 ppm stok çözeltileri hazırlandı. *In vitro* çalışmalara ait materyaller, özellikleri bozulmayacak şekilde (oda sıcaklığında) kurutulup blender yardımıyla toz haline getirildikten sonra yapılacak bileşenlerin analizi için, 250 ml lik erlene konuldu, üzerini kaplayacak şekilde etanol eklendi. Öncesinde kabın darası alındı. Ultrasonik banyoda çözüldürüldü. İyice çözünen örnek filtre kağıdından süzüldü. Süzme kağıdında kalan maddeyi spatül yardımıyla alındı ve tekrar erlene koyulup etanol eklenerek ultrasonik banyoda örnek çözünmeye tabi tutuldu. Bu işlem her örnek için 5 defa tekrarlandı. Sonunda kalan posanın ağırlığı ölçüldü. Etanol ile çözünen örnekler evaporatör ile uçucu maddesi uçurulduktan sonra erlende kalan ekstrakt 4 gün boyunca çeker uçakta bekletilip etanolden iyice arındırma sağlandı. Ekstraksiyon sonunda kalan maddeden 4000 ppm 'lik çözelti hazırlandı.

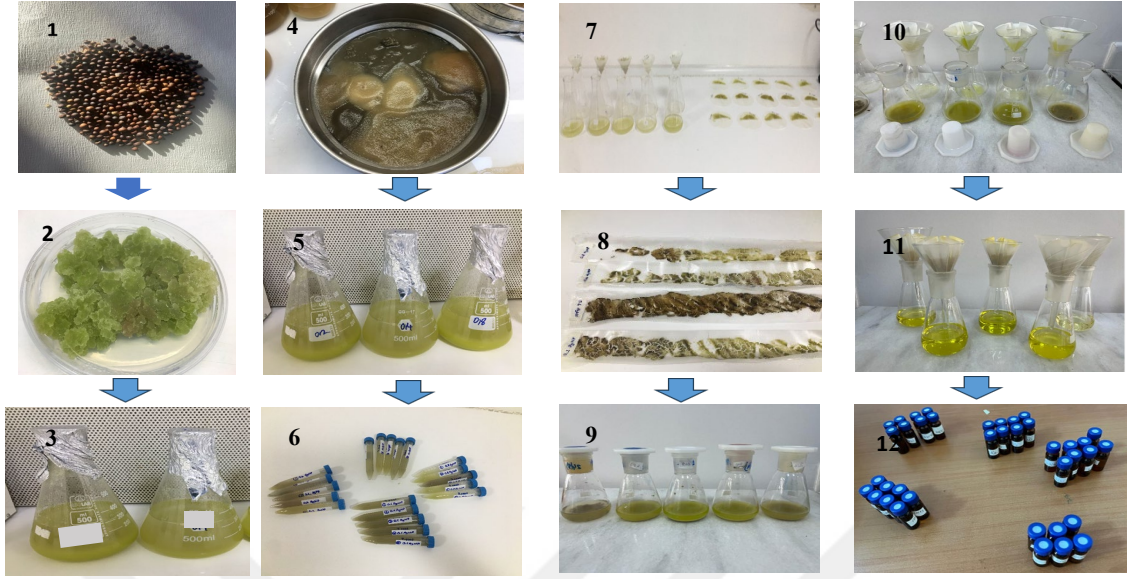
3.2.9.2. Toplam fenolik ve flavonoid miktar tayini

Ekstrelerin toplam fenolik miktarları, Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer biçimde belirlenmiştir (Slinkard ve Singleton, 1977). İlk aşamada, 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0-8 mL

alınarak hacimleri distile su ile 184 μL 'ye tamamlandı. Bitkilerin etanol ekstrelerinin 1000 ppm konsantrasyonunda çözeltileri hazırlandı ve 1 mg ekstre içeren örnek çözeltilerinden 4 μL alınarak distile su ile 184 μL 'ye tamamlandı. Pirokatekol çözeltileri ve örneklere 4 μL Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ve 3 dakika sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 12 μL eklendi. Karışım oda sıcaklığında 2 saat bekletildi ve absorbansları 760 nm'de ölçüldü. Toplam fenolik içerikler, standart pirokatekol grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak hesaplandı.

Ekstrelerin toplam flavonoid içerikleri, kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile tespit edildi (Moreno ve ark., 2000). 1000 ppm'lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0-8 mL alınarak hacimleri %80'lik etanol ile 192 μL 'ye tamamlandı. 4 μL 1 M potasyum asetat eklenip bir dakika sonra 4 μL %10'luk alüminyum nitrat eklenmişti. 40 dakika inkübasyonun ardından absorbansları 415 nm'de ölçüldü. Bitkilerin etanol ekstrelerinin absorbans değerleri de aynı şekilde ölçüldü. Toplam flavonoid içerikleri, standart kersetin grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak hesaplandı.

Şekil 3.2. *Salvia pseudoeuphratica* Rech. f. bitkisinin tohumlarından elde edilen kallus ve hücre süspansiyon kültürlerine AgNP uygulamaları ve ekstraksiyon süreci.



Salvia pseudoeuphratica Rech. f. bitkisinin tohumlarından başlayarak elde edilen biyolojik materyallerin ekstraksiyon süreçlerinin şematik gösterimi:

- (1) **Materyal:** *Salvia pseudoeuphratica* Rech. f. bitkisine ait tohumlar,
- (2) **Kallus Oluşumu:** Tohumlardan elde edilen dağınık özellikteki yeşil kalluslar,
- (3) **Süspansiyon Kültürleri:** Kalluslardan elde edilen hücre süspansiyon kültürleri,
- (4) **Süspansiyon Kültürlerinin Filtrasyonu:** Hücre süspansiyonlarının süzülmesi,
- (5) **AgNP Elisitör Uygulaması:** Süspansiyon kültürlerine AgNP elisitörlerinin uygulanması,
- (6) **Santrifüjleme:** pH hesaplaması için santrifüjleme işlemi,
- (7) **Ağırlık Hesaplaması:** Santrifüj işlemi sonrasında hücrelerin yaş ve kuru ağırlıklarının hesaplanması,
- (8) **Kurutma:** Örneklerin kurutulması,
- (9-10) **Ekstraksiyon Hazırlığı:** Ekstraksiyon işlemi için kurutulmuş ve öğütülmüş örneklerin EtOH ile muamelesi,
- (11) **Ultrasonik Banyo ve Filtrasyon:** Ultrasonik banyo uygulaması sonrası örneklerin süzülmesi,
- (12) **GC/MS Analizi:** Süzülen ekstraktların GC/MS cihazı ile içerik tespiti için viallere alınması.

3.2.9.3. Antioksidan aktivite çalışmaları

3.2.9.3.1. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi

Ekstrelerin, fraksiyonların ve elde edilen miktarca yeterli olan saf maddelerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (Blois, 1958). Örneklerin etanol çözücüsünde 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 µL alınarak etanol ile hacimleri 40 µL'ye tamamlandı ve üzerlerine 0,1 mM DPPH çözeltisinden 160 µL ilave edildi. Hazırlanan çözeltilerin oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{Inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Burada A, absorbans değerini temsil etmektedir.

3.2.9.3.2. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi

Ekstrelerin, fraksiyonların ve elde edilen miktarca yeterli olan saf maddelerin ABTS katyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi (Re ve ark., 1999). Örneklerin etanol çözücüsünde 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 µL alınarak etanol ile hacimleri 40 µL'ye tamamlandı ve üzerlerine 7 mM ABTS katyon radikali çözeltisinden 160 µL ilave edildi. Reaksiyon karanlıkta 6 dakika bekletildikten sonra 734 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\% \text{Inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

3.2.9.3.3. CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi)

CUPRAC yönteminde, örneklerdeki antioksidan bileşiklerin varlığında Cu(II)Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc şelatına indirgenir ve bu şelatın absorptansı 450 nm’de ölçülür. Örneklerin son konsantrasyonları 10, 25, 50 ve 100 µg/mL olacak şekilde ayarlanır. Hazırlanan stok çözeltilerine ve standartlara sırasıyla 61 µL CuCl₂, 61 µL neokuproin ve 61 µL NH₄OAc tampon çözeltisi eklenir. Karışım, oda sıcaklığında 1 saat bekletildikten sonra 450 nm’de absorptans değeri ölçülür (Apak ve ark., 2004). Ölçülen absorptans değeri standartlarla karşılaştırılarak değerlendirilir.

Tüm antioksidan analizlerde, örneklerin konsantrasyonları 10, 25, 50 ve 100 µg/mL olarak belirlenmiştir. Çok aktif örnekler için 1, 2.5, 5 ve 10 µg/mL, düşük aktivite gösteren örnekler için ise 100, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları kullanılmış ve her yöntem için IC₅₀ değeri hesaplanmıştır.

3.2.9.4. Enzim inhibisyon tayini

3.2.9.4.1. Antikolinesteraz aktivite tayini

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri, Ellman metodu olarak bilinen (Ellman ve ark., 1961) spektrofotometrik yöntem kullanılarak ölçüldü (Kivrak ve ark., 2009). Bu yöntemde, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzimleri, asetilkolin iyodür ve bütirilkol iniyodür substratlarıyla reaksiyona sokuldu. Aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanıldı. 96 kuyucuklu mikropalakaların her birine 0,1 M pH=8 fosfat tamponundan 130 µL, 10 µL numune, AChE veya BChE çözeltisinden ise 20 µL eklenerek hazırlandı. Daha sonra, 25 °C’de 10 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı ve ardından 20 µL DTNB çözeltisi ve 20 µL asetilkoliniyodür veya bütirilkolin iyodür ilave edildi. Sonuç olarak, enzimatik hidrolizle açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kontrol için etanol, standart olarak ise galantamin kullanıldı.

3.2.9.4.1.1. AChE aktivite testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Sarı renkli 5-tiyo-2nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmektedir. Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan 10 µL çözeltilerden ve asetil kolinesteraz (AChE) enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edilir. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve asetilkolin iyodür (AcI) (20 µL) her bir kuyucuğa ilave edildi. Standart olarak Galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanıldı. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorban okunur ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanlardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler belirlendi. Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM'dan 0.125 mM'a kadar seyreltilmiş solüsyonları hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

3.2.9.4.1.2. BChE aktivite testi

Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi, substrat olarak butiriltiyokolin iyodür ve enzim olarak butirilkolinesteraz kullanılarak belirlendi. Mikroplakadaki kuyucuklara, pH=8 fosfat tamponundan 130 µL, numunelerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve butirilkolinesteraz (BChE) enzim çözeltisinden 20 µL eklendi. Bu solüsyon, 25°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. Inkübasyon süresinin ardından, herbir kuyucuğa 20 µL DTNB reaktifi ve 20 µL substrat olarak butirilkolinyodür (BuI) eklendi. Standart olarak Galantamin kullanıldı. Mikroplakadaki absorbanlar, 412 nm dalga boyunda ELISA okuyucuyla ölçüldü ve absorbanlardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi. Aktivite gösteren bileşiklerin IC₅₀ değerleri, aynı işlemler tekrarlanarak 0,5 mM'den 0,125 mM'a kadar seyreltilmiş solüsyonlarla belirlendi.

3.2.9.4.2. Tirozinaz enzim aktivitesi

Tirozinaz inhibisyon aktivitesi için tirozinaz enzimi kullanıldı. Mikroplakadaki kuyucuklara, pH=6,8 fosfat tamponundan 150 µL, ekstrelerin etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL eklenerek 3 dakika boyunca karıştırıldı ve ilk absorbans 475 nm dalga boyunda ölçüldü. Daha sonra bu çözelti, 37°C'de 10 dakika boyunca inkübe edildi ve 10 dakika sonra 20 µL L-DOPA ilave edilerek tekrar 37°C'de 10 dakika inkübe edildi. Inkübasyonun ardından mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirildi ve 475 nm dalga boyunda son absorbans ölçüldü. Tirozinaz aktivitesi (% inhibisyon), belirtilen eşitlik kullanılarak hesaplandı. Standart olarak Kojik asit kullanıldı.

$$\% \text{Inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

3.2.9.4.3. Üreaz enzim aktivitesi

Üreaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak Üreaz kullanıldı. Mikroplakadaki kuyucuklara etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL enzim çözeltisinden 25 µL ve substrat olarak 50 µL üre konulur ve 630 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Daha sonra bu çözelti 15 dakika süre ile 30°C de inkübe edildi ve 15 dakika sonra 45 µL fenol reaktifi ve 70 µL alkali reaktif ilave edildi ve yine 30°C de inkübe edilerek ve 20 dakika sonra Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 630 nm dalga boyunda son absorbans okundu. Üreaz aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Standart olarak Tiyoüre kullanıldı.

$$\% \text{Inhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

3.2.9.4.4. Elastaz enzim aktivitesi

Elastaz inhibitörü etkisi spektrofotometrik olarak tayin edildi (Kraunsoe ve ark., 1999; Melzig ark., 2001). Örneklerin farklı konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak, bu farklı konsantrasyondaki çözeltilerden 0,05'er mL alınarak üzerine elastaz enziminden 0,05 mL ilave edildi. Daha sonra 0,9 mL Tris-HCl tamponundan (pH: 7,8; 0,2 M) eklenerek, sonrasında kontrol çözeltisi olarak 0,1 mL enzim çözeltisi ve üzerine 0,9 mL Tris-HCl karışımı ilave edildi. Hazırlanan bu karışım 15 dakika 37°C'de inkübe edilerek örnek tüpleri ve kontrol çözeltilerinin üzerine inkübasyondan sonra 0,05 mL, 5 mM N-süksinil-(Ala)3-nitroanilide çözeltisi ilave edilerek 30 dakika 37°C inkübe edildi. 410 nm'de köre karşı absorbans değerleri okundu.

3.2.9.4.5. Kollajenaz enzim aktivitesi

İlk olarak, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerden 50 µL alınarak üzerine 0.8 U/mL kollajenaz içeren çözelti ilave edildi (Thring ve ark., 2009). Daha sonra, karışıma pH değeri 7.5 olan 0.9 mL Tris tampon çözeltisi eklendi. Kontrol çözeltisine herhangi bir bitki özütü veya uçucu yağ eklenmeyerek, kör test için ise enzim yerine eşit miktarda dimetil sülfoksit çözeltisi kullanıldı. Kör, kontrol ve örnek çözeltileri daha sonra 25°C'de 30 dakika boyunca inkübasyona alındı. Bu ilk inkübasyonun ardından, tüm çözeltilere 1 mM N-(3-[2-Furyl]acryloyl)-Leu-Gly-ProAla (kollajenaz enzim substratı) çözeltisinden 0.05 mL eklendi ve ikinci bir 15 dakikalık inkübasyon süresi uygulandı. Son olarak, hem örnek hem de kontrol çözeltileri için 340 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede, körle karşılaştırılarak absorpsiyon değerleri ölçüldü.

3.2.10. GC-MS/MS ile terpenoidlerin kantitatif analizi

Hazırlanan ekstrelerin GC-MS analizleri için; Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde bulunan Agilent marka 7890A Model Gaz Kromatografisi ve Agilent

marka 5977B model kütle spektrometresi cihazı kullanıldı. GC-MS analizleri apolar HP-5MS UI kolonunda ($30\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 0.25\text{ }\mu\text{m}$ film kalınlığı) helyum gazı (1mL/dak ve 20 psi) ile yapıldı. Enjeksiyon bloğu sıcaklığı $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de tutuldu. GC fırın sıcaklığı $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 2 dakika tutulup, $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'ye $5\text{ }^{\circ}\text{C/dakika}$ hızla çıkarıldı ve bu sıcaklıkta (300°C) 14 dakika sabit tutuldu. Split oranı 1:10 olarak ayarlanıp, enjeksiyon hacmi $1\text{ }\mu\text{L}$ olarak gerçekleştirildi. Kütle spektrometresi (EI/MS) 70 eV iyonizasyon enerjisine ayarlandı. Kütle spektrometresi tarama aralığı m/z 50-800 atomik kütle birimi (amu) aralığına ayarlandı. NIST ve Wiley GC-MS kütüphaneleri bileşenlerin belirlenmesinde kullanıldı. Cihaza verilecek ekstre önce 1000 mg/L 'ye seyreltildi ve daha sonrasında $0.2\text{ }\mu\text{m}$ şırınga ucu filtreden geçirilip cihaza verildi. Uçucu olmayan bileşenler BSTFA+TMCS 99:1 (Sylon BFT) ile türevlendirilip çalışıldı (Bakır ve ark., 2020).

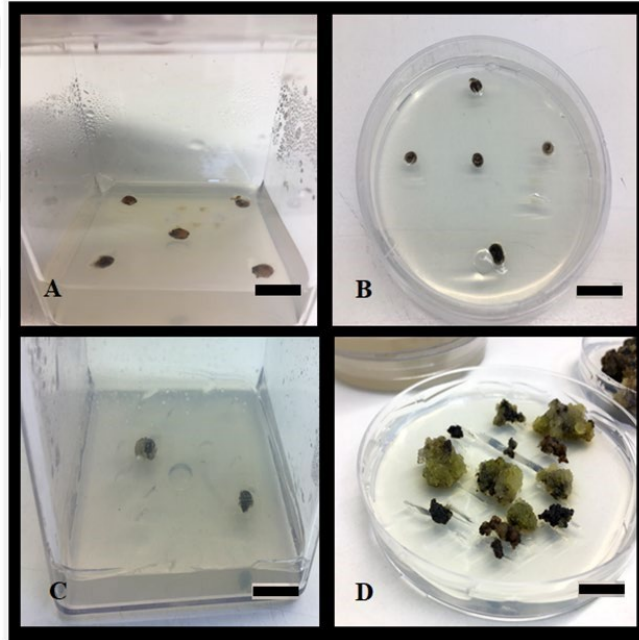
3.2.11. İstatistiksel analiz

Denemeler en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Çalışmalarda test edilen parametreler arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla elde edilen veriler, SPSS 22.0 paket programına işlendi ve sonuçlara ANOVA $P \leq 0.05$ 'e göre Duncan çoklu karşılaştırma testleri uygulandı.

4. BULGULAR

4.1.Kallus Kültürlerinin Başlatılması

Yüzey sterillizasyonu tamamlanan tohumlar herbiri 1 mg/l konsantrasyonlarda hazırlanan farklı oksin (IAA, IBA ve 2,4-D) ve sitokinin (BAP, Kin ve TDZ) kombinasyonlarını içeren MS besi ortamına aktarıldı alındı. Yaklaşık 4 hafta sonunda tohumlardan elde edilen kallusların morfolojik görüntüleri (**Şekil 4.1**)’de kallus verileri ise **Çizelge 4.1**’de sunulmuştur.



Şekil 4.1. 1 mg/l farklı oksin ve sitokinin kombinasyonlarını içeren MS besi ortamında kültüre alınan kallus gelişimi .

- A) 1 mg/l Kin+ 1 mg/l 2,4-D içeren MS besi ortamında kültüre alınan tohumlar (Bar: 0,8 cm),
 B) Kültürün 28. Gününde tohumların periferinde gelişen kallus oluşumları (Bar: 0,8 cm)
 C) Aynı kültür ortamında alt kültüre alınan ve üzerinde kallus dokuları bulunan tohumların görüntüleri (Bar: 0,8 cm), D) 1 mg/l Kin ve 1mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında 3 kez alt kültür edilen stok kallus kültürlerinin genel görüntüleri (Bar: 0.8 cm)

Kallus oluşumuna yönelik yapılan başlatma çalışmalarında, test edilen parametreler arasında maksimum kallus yüzdesinin 1 mg/l Kin ve 1mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamından elde edildiği tespit edilmiştir (**Şekil 4.1.A**). İlk kez kallus oluşumu

kültürün 14. gününde gözlenmiştir (**Şekil 4.1.B**). Kültürün 28. gününe ait tohumların etrafında gelişen kallus dokuları ise **Şekil 4.1. C'**de sunulmuştur. Elde edilen kalluslar tekstür ve renk bakımından incelendiğinde ise, hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılması için en uygun morfolojik özelliklere sahip (yeşilimsi-sarı renkli, yumuşak ve dağılgan) kalluslar 1 mg/l Kin ve 1mg/l 2,4D destekli MS besi ortamında 3 kez alt kültür edilerek stok kallus kültürleri elde edilmiştir (**Şekil 4.1.**).

Çizelge 4.1. 1mg/l konsantrasyonlarda hazırlanan farklı oksin (IAA, IBA ve 2,4-D) ve sitokinin (BAP, Kin ve TDZ) kombinasyonu destekli MS besi ortamında kallus oluşum

BBD Kombinasyonu (1 mg/l)		Kallus (%)	Kallus Morfolojisi
BAP		0	Kallus Oluşumu Gözlenmedi
Kin	IAA	4	Yumuşak-Kahverengi Kallus
TDZ		8	Yumuşak-Koyu Kahverengi Kallus
BAP		12	Yumuşak-Açık Yeşil Kallus
Kin	IBA	28	Yumuşak-Yeşil Kallus
TDZ		8	Yumuşak-Koyu Kahverengi Kallus
BAP		8	Kompakt-Krem Kallus
Kin	2,4-D	32	Dağılgan- Sarımsı Yeşil Kallus
TDZ		8	Kompakt-Koyu Kahverengi Kallus

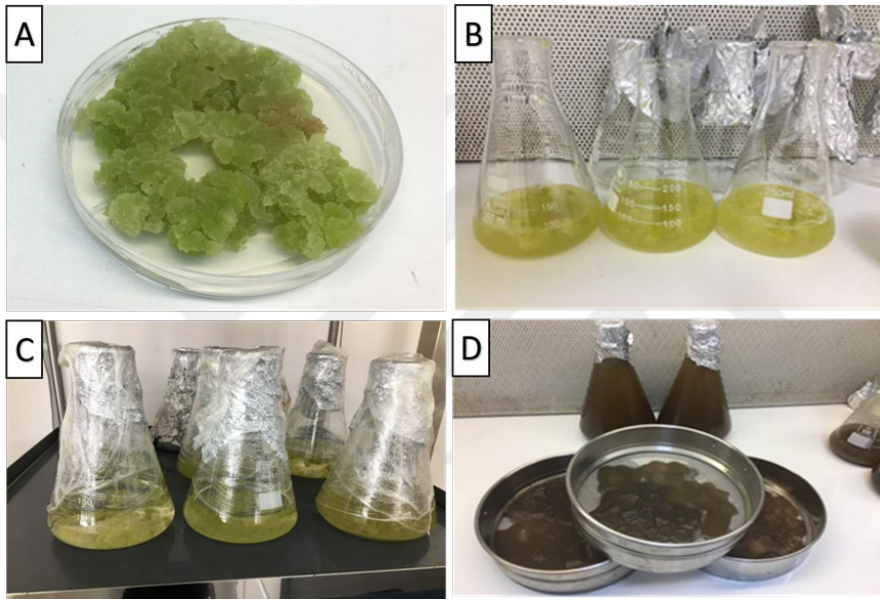
*Çalışmada her bir denemede 20 tohum kullanıldı ve 3 defa tekrar edildi.

Çizelge 4.1. irdelendiğinde, denenen BBD kombinasyonları arasında Kin-2,4-D ve KinIBA kombinasyonlarının denenen diğer kombinasyonlara oranla kallus oluşum oranı bakımından daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. En yüksek kallus oluşum yüzdesi %32 ile 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D ile destekli MS besi ortamında elde edilmiştir. Söz konusu ortamda kültüre bırakılan tohumlardan süspansiyon kültürlerinin başlatılabilmesi için en uygun tekstürde (dağılgan ve sarımsı yeşil) kallusların oluştuğu gözlemlendi. IAA ve IBA'nın diğer BBD kombinasyonları sonucunda genel anlamda yumuşak tekstürde kalluslar meydana gelmiş olup, kallus renklerinin genellikle yeşil ve kahverengi olduğu belirlendi. TDZ'nin IAA, IBA ve 2,4-D ile kombinasyonlarında yer yer kızarmalara varan koyu kahverengileşme olduğu dikkati çekti. 2,4-D'nin Kin ile olan kombinasyonu sonucu dağılgan tekstürde ve sarımsı yeşil renkte kalluslar meydana geldiği görüldü. Bu sonuçlar ışığında hücre süspansiyon kültürlerinin başlatılması için en uygun kallus

tekstürünün, 1 mg/l Kin ve 1 mg/l 2,4-D kombinasyonundan elde edilen kalluslar olduğuna karar verildi.

4.2. Süspansiyon Kültürlerinin Başlatılması

Daha önceki başlıkta ifade edildiği üzere süspansiyon kültürü için ideal kallusun oluştuğu 1 mg/l Kin ve 1mg/l 2,4-D destekli MS besi ortamında üretilen kalluslardan süspansiyon kültürlerinin elde edilmesine ilişkin görseller **Şekil 4.2**'de sunulmuştur.



Şekil 4.2. Kallus kültürlerinden süspansiyon kültürlerinin oluşturulması (A-5. Alt kültür sonucu gelişen kalluslar, B-C; Kalluslardan süspansiyon kültürlerinin oluşturulması. D-Süspansiyon kültürlerinin süzülmesi ve hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması

4.3. Süspansiyon Kültürlerinin Optimizasyonu

Çalışmamızda hücre süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu aşamasında gerçekleştirilen çalışmalara ait sonuçlar aşağıda alt başlıklar halinde sunulmuştur.

4.3.1. Farklı karbon kaynaklarının süspansiyon gelişimine etkisi

Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, Glukoz ve Sukroz'un 15, 30 ve

45 gr/l konsantrasyonlarının etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada, yaklaşık 4 hafta kültür periyodu sonrasında gelişen süspansiyonlara ait verilerin istatistiksel hesaplamaları **Çizelge 4.2**'de, görüntüler ise **Şekil 4.3**'te sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Farklı karbon kaynağı ve konsantrasyonlarının süspansiyon gelişimine etkisi

Karbon Kaynağı	PHH (ml) Ort±SH	Yaş Ağırlık (g) Ort±SH	Kuru Ağırlık (g) Ort±SH
Glukoz (15 gr/l)	0.40±0.07 b	0.334±0.081 b	0.018±0.001 b
Glukoz (30 gr/l)	0.44±0.06 b	0.385±0.023 b	0.020±0.001 b
Glukoz (45 gr/l)	0.30±0.05 b	0.419±0.022 ab	0.021±0.002 b
Sukroz (15 gr/l)	0.36±0.02 b	0.439±0.031 ab	0.019±0.001 b
Sukroz (30 gr/l)	0.62±0.04 a	0.513±0.024 a	0.028±0.002 a
Sukroz (45 gr/l)	0.36±0.05 b	0.519±0.021 a	0.031±0.001 a

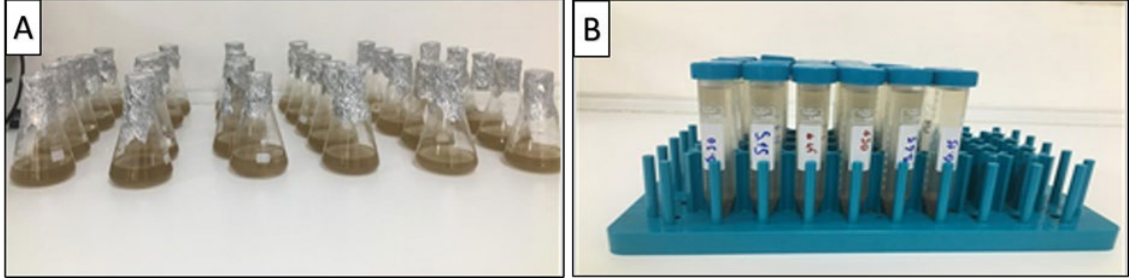
*Çalışmada her bir denemede 20 eksplant ve 3 defa tekrar edildi.

*Bir kolondaki farklı harfler bu iki işlemin Duncan'ın çoklu oran testine göre $p \leq 0.05$ 'te istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.2, Glukoz ve Sukroz'un farklı konsantrasyonlarının *Salvia pseud euphratica* Rech.f. süspansiyon kültürlerinin büyümesine olan etkilerini değerlendirmektedir. İstatistiksel anlamda farklılık gösteren parametreler aracılığıyla, karbon kaynağı ve konsantrasyonlarının hücrel gelişim üzerindeki spesifik etkileri ortaya konmuştur. Buna göre, süspansiyon gelişimlerine farklı karbon kaynakları ve konsantrasyonlarının etkileri değerlendirildiğinde PHH olarak en yüksek 0.62 ± 0.04 ml ile 30 g/l Sukroz, yaş ağırlık bakımından en yüksek 0.519 ± 0.021 g ve 0.513 ± 0.024 g ile sırasıyla 30 g/l ve 45 g/l Sukroz, kuru ağırlık bakımından ise en yüksek değerler yine sırasıyla 0.028 ± 0.002 g ve 0.031 ± 0.001 g 30 g/l ve 45 g/l Sukroz'da hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde PHH'da 30 g/l Sukroz diğer denemelere göre istatistiksel olarak farklı olduğu hesaplanmıştır. Yaş ağırlıkta ise 45 g/l, 30 g/l, 15 g/l Sukroz ve 45 g/l Glukoz ile 30 g/ Glukoz ve 15 g/l Glukoz arasında istatistiksel fark belirlenirken, kuru ağırlıkta 45 g/l, 30 g/l, Sukroz ise 15 g/l Sukroz, 45 g/l, 30 g/l ve 15 g/ Glukoz arasında istatistiksel olarak fark hesaplanmıştır. PHH bakımından, 30 gr/l Sukroz'un diğer karbon kaynaklarına göre belirgin bir şekilde daha yüksek olduğunu göstermektedir. Yaş ağırlık bakımından 30 gr/l ve 45 gr/l Sukroz, diğer denemelere göre anlamlı bir şekilde üstündür. Kuru ağırlık değerleri, 30 gr/l ve 45 gr/l Sukroz gruplarının belirgin bir avantaja sahip olduğunu göstermektedir.

İstatistiksel olarak anlamlı farklar, özellikle 30 gr/l Sukroz konsantrasyonunda, diğer denemelere göre daha etkili bir hücrel büyümeyi işaret etmektedir. 30 gr/l Sukroz konsantrasyonunun, süspansiyon kültürlerinin PHH, yaş ağırlık ve kuru ağırlık

parametrelerinde en üstün performansı gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, özellikle belirli Sukroz konsantrasyonlarının hücresel büyüme üzerinde spesifik ve olumlu etkileri olduğunu göstererek, *Salvia pseudoeuphratica* Rech. f. Bitkisinin süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu bakımından önemli bilgiler sağlamaktadır.



Şekil 4.3. A. *Salvia pseudoeuphratica* Rech.f. ait süspansiyon kültürlerinin genel görüntüsü, **B.** Süspansiyon kültürlerinin yaklaşık 4 haftalık kültür sonunda PHH hesaplanmasına ilişkin örnekler

4.3.2. Süspansiyon gelişimine farklı ışık yoğunluklarının etkisi

Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, bitki büyüme odasındaki gelişimlerinde aydınlık (kontrol) ve karanlık ortamın etkilerinin araştırıldığı çalışmada, yaklaşık 4 hafta kültür periyodu sonrasında gelişen süspansiyonlara ait verilerin istatistiksel hesaplamaları **Çizelge 4.3'**te sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Farklı ışık yoğunluğunun süspansiyon gelişimine olan etkisi

Işık Yoğunluğu	PHH (ml) Ort±SH	Yaş Ağırlık (gr) Ort±SH	Kuru Ağırlık (gr) Ort±SH
Aydınlık (Kontrol)	0.22 ± 0.01 a	0.043 ± 0.004 a	0.024 ± 0.003a
Karanlık	0.21 ± 0.01 a	0.016 ± 0.002 b	0.005 ± 0.001b

*Çalışmada her bir denemede 20 eksplant ve 3 defa tekrar edildi.

*Bir kolondaki farklı harfler bu iki işlemin Duncan'ın çoklu oran testine göre $p \leq 0.05$ 'te istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.3, süspansiyon kültürlerinin farklı ışık yoğunlukları altında gelişimini değerlendirmektedir.

Sonuçlar aydınlık ortamın PHH olarak en yüksek 0.22 ± 0.01 ml, yaş ağırlık bakımından en yüksek 0.043 ± 0.004 g, kuru ağırlık bakımından ise yine en yüksek 0.024 ± 0.003 g değerler ürettiğini göstermiştir. PHH'da aydınlık ve karanlık arasında istatistiksel olarak fark görülmezken, yaş ve kuru ağırlık da aydınlık ortamda istatistiksel olarak farklılıklar belirlenmiştir. Farklı bir söylemle, aydınlık ve karanlık grupları arasında PHH değerlerinde anlamlı bir farklılık gözlememekle birlikte, aydınlık ortamda yetiştirilen süspansiyon kültürlerinin yaş ağırlık bakımından karanlık ortama oranla anlamlı bir şekilde farkla olduğu görülmektedir. Bu durum, ışık yoğunluğunun hücre hacmi üzerinde belirgin bir etkisinin olmadığını düşündürebilir ancak bitkilerin ışığa maruz kalmalarının biyokütle birikimini artırdığını ortaya koymaktadır. Yine aydınlık ortamda yetiştirilen süspansiyon kültürlerinin kuru ağırlık değerlerinin, karanlık ortama göre belirgin bir üstünlük sergilediği gözlenmektedir. Bu durum, ışık varlığı ve yoğunluğunun bitki hücrelerinin besin biriktirme kapasitesini artırabileceğini göstermektedir.

Genel olarak aydınlık ortamda süspansiyon kültürlerinin genel büyüme performansının, yaş ve kuru ağırlık parametrelerinde karanlık ortama göre daha etkili olduğu görülmekte ve ışık yoğunluğunun süspansiyon kültürlerinin biyokütle birikimi üzerinde belirgin bir etkisi olduğu ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, bitki büyüme odasındaki ışık koşullarının, süspansiyon kültürlerinin hücresel gelişimi üzerinde önemli bir faktör olduğunu göstermektedir.

4.3.3.Süspansiyon gelişimine farklı çalkalama hızlarının etkisi

Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, bitki büyüme odasındaki gelişimlerinde farklı çalkalama hızlarının etkilerinin araştırıldığı çalışmada, yaklaşık 4

hafta kültür periyodu sonrasında gelişen kültürlerle ait verilerin istatistiksel sonuçları **Çizelge 4.4**'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Farklı çalkalama hızlarının süspansiyon gelişimine etkisi

Çalkalama Hızı (rpm)	PHH (ml) Ort±SH	Yaş Ağırlık (gr) Ort±SH	Kuru Ağırlık (gr) Ort±SH
90	0.48 ± 0.04 a	0.688 ± 0.030 b	0.046 ± 0.002 b
100 (Kontrol)	0.52 ± 0.04 a	0.926 ± 0.014 a	0.065 ± 0.005 a
110	0.20 ± 0.03 b	0.241 ± 0.026 c	0.015 ± 0.003 c

*Çalışmada her bir denemede 20 eksplant kullanıldı ve 3 defa tekrar edildi.

*Bir kolondaki farklı harfler bu iki işlemin Duncan'ın çoklu oran testine göre $p \leq 0.05$ 'te istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.4, süspansiyon kültürlerinin farklı çalkalama hızları altında gelişimini değerlendirmektedir. Buna göre, PHH değerleri açısından en yüksek değer 0.52 ± 0.04 ml ile 100 rpm çalkalama hızında elde edilmiştir. Yaş ağırlık bakımından en yüksek değer 0.926 ± 0.014 g, kuru ağırlık bakımından ise en yüksek değer 0.065 ± 0.005 g olarak, yine 100 rpm çalkalama hızında belirlenmiştir.

İstatistiksel açıdan değerlendirildiğinde, çalkalama hızları arasında PHH değerlerinde belirgin farklılıklar gözlenmektedir. 100 rpm'de çalkalama hızının, diğer hızlara kıyasla en yüksek PHH değerleri ile ilişkilendirildiği görülmektedir. Bu durum, hücre hacminin, belirli bir çalkalama hızında optimal bir seviyeye ulaştığını göstermektedir. Ayrıca, yaş ve kuru ağırlık bakımından her çalkalama hızı arasında anlamlı farklar gözlemlenmiştir. Özellikle 100 rpm'de çalkalama hızının, yaş ve yaş ağırlık bakımından en yüksek değerlere sahip olduğu ve diğer çalkalama hızlarına göre anlamlı bir üstünlük sergilediği belirlenmiştir. Bu durum, 100 rpm'lik bir çalkalama hızının süspansiyon kültürlerinin besin biriktirme kapasitesi ile biyokütle birikimini daha fazla artırdığını göstermektedir.

Genel olarak çalkalama hızları arasında 100 rpm'nin, süspansiyon kültürlerinin genel büyüme performansında en etkili hız olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, çalkalama hızlarının süspansiyon kültürlerinin hücresel gelişimi ve biyokütle birikimi üzerinde kritik bir rol oynadığını ortaya koymaktadır.

4.3.4. Süspansiyon gelişimine farklı pH etkisi

Süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu çalışmalarında, besi ortamının farklı pH'sının etkilerinin araştırıldığı çalışmada, yaklaşık 4 hafta kültür periyodu sonrasında gelişen süspansiyonlara ait verilerin istatistiksel sonuçlar **Çizelge 4.5**'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Besi ortamında farklı pH'nın süspansiyon gelişimine olan etkisi

pH	PHH (ml) Ort±SH	Yaş Ağırlık (gr) Ort±SH	Kuru Ağırlık (gr) Ort±SH
4	0.73 ± 0.06 a	0.073 ± 0.005 b	0.041 ± 0.003 b
5.8 (Kontrol)	0.47 ± 0.04 b	0.242 ± 0.035 a	0.115 ± 0.023 a
7	0.25 ± 0.03 c	0.107 ± 0.039 b	0.037 ± 0.002 b

*Çalışmada her bir denemede 20 eksplant ve 3 defa tekrar edildi.

*Bir kolondaki farklı harfler bu iki işlemin Duncan'ın çoklu oran testine göre $p \leq 0.05$ 'te istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.5, süspansiyon kültürlerinin gelişimine farklı besi ortamı pH düzeylerinin etkilerini değerlendirmektedir. En yüksek PHH değeri, pH 4 düzeyinde elde edilmiştir (0.73 ± 0.06 ml). pH 5.8 (Kontrol) ve pH 7 düzeylerindeki PHH değerleri sırasıyla 0.47 ± 0.04 ml ve 0.25 ± 0.03 ml olarak belirlenmiştir. En yüksek yaş ağırlık değeri, pH 5.8 düzeyinde elde edilmiştir (0.242 ± 0.035 g). pH 4 ve pH 7 düzeylerindeki yaş ağırlık değerleri sırasıyla 0.073 ± 0.005 g ve 0.107 ± 0.039 g olarak belirlenmiştir. En yüksek kuru ağırlık değeri, pH 5.8 düzeyinde elde edilmiştir (0.115 ± 0.023 g). İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde PHH, yaş ve kuru ağırlık bakımından tüm pH'lar arasında istatistiksel olarak fark hesaplanmıştır. Bu sonuçlar, besi ortamındaki pH'nın süspansiyon kültürlerinin gelişimi üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu göstermektedir. pH 4'ün PHH üzerinde, pH 5.8'in ise yaş ve kuru ağırlık üzerinde olumlu bir etkisi olduğu görülmektedir. Elde edilen veriler, farklı pH düzeylerinin optimal süspansiyon gelişimini etkileyen önemli bir unsur olduğunu göstermektedir.

4.4. Süspansiyon kültüründe büyüme eğrisinin belirlenmesi

Süspansiyon kültüründe büyüme eğrisinin belirlenmesinde, optimize edilen besi ortamı ve kültür koşulları uygulanarak 0. Gün, 7. Gün, 14. Gün, 21. Gün, 28. Gün'ler için süspansiyon kültürleri hazırlanarak belirlenen günlerdeki süspansiyon kültürlerine ait

veriler istatistiksel hesaplamaları yapılarak **Çizelge 4.6**'da, büyüme eğrileriye **Şekil 4.4a**, **4.4b** ve **4.4c** ve **B**'de sunulmuştur.

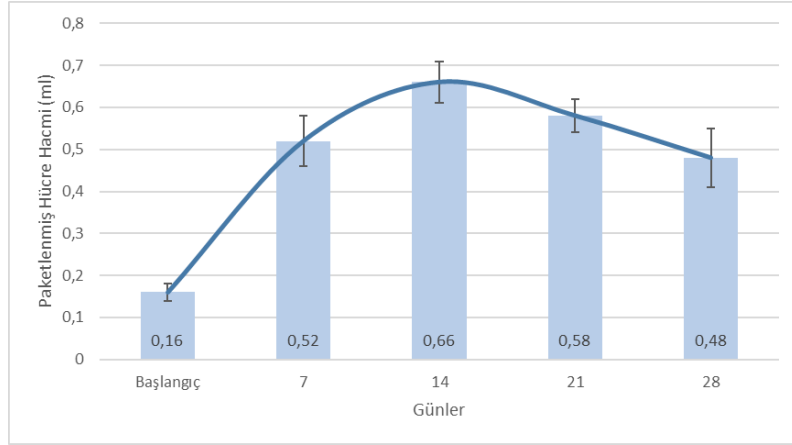
Çizelge 4.6. Süspansiyon kültürlerinde büyümenin hesaplanması

Günler	PHH (ml) Ort±SH	Yaş Ağırlık (gr) Ort±SH	Kuru Ağırlık (gr) Ort±SH
Başlangıç	0.16 ± 0.02 c	0.242 ± 0.041 b	0.119 ± 0.040 b
7	0.52 ± 0.06 ab	0.465 ± 0.021 a	0.246 ± 0.029 a
14	0.66 ± 0.05 a	0.491 ± 0.021 a	0.290 ± 0.013 a
21	0.58 ± 0.04 ab	0.453 ± 0.027 a	0.276 ± 0.033 a
28	0.48 ± 0.07 b	0.39 ± 0.084 a	0.224 ± 0.051 a

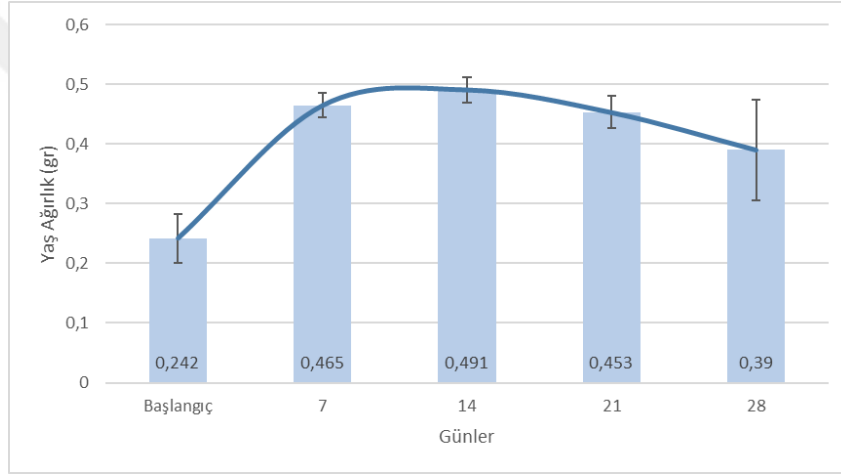
*Çalışmada her bir denemede 5 kültür ve 3 defa tekrar edildi.

*Bir kolondaki farklı harfler bu iki işlemin Duncan'ın çoklu oran testine göre $p \leq 0.05$ 'te istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

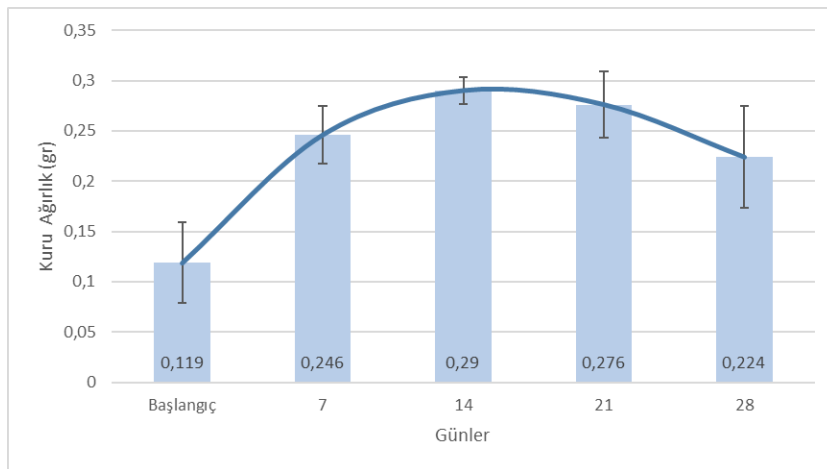
Çizelge 4.6 incelediğinde, büyüme 14. güne kadar devam ederken, PHH olarak 0.66 ± 0.05 ml, yaş ağırlık bakımından 0.491 ± 0.021 g, kuru ağırlık bakımından ise 0.290 ± 0.013 hesaplanmıştır. 14. günden sonra büyüme fazının tamamlandığı ve büyümenin azaldığı tespit edilmiştir. Elisitasyon çalışması kapsamında ise 14. Gün AgNP'lerin uygulama zamanı olarak belirlenmiştir. İstatistiksel olarak değerlendirildiğinde PHH, yaş ve kuru ağırlıklar bakımından başlangıç ile 7, 14, 21, 28 günler arasında istatistiksel fark hesaplanmıştır. Bu veriler, süspansiyon kültürlerinin zaman içinde nasıl değiştiği ve optimize edilen koşullar altında nasıl büyüdüğü konusunda önemli bilgiler sağlamaktadır.



Şekil 4.4a. Süspansiyon kültürlerinde PHH bakımından büyüme eğrisi grafiği.



Şekil 4.4b. Süspansiyon kültürlerinde yaş ağırlık bakımından büyüme eğrisi grafiği.



Şekil 4.4c. Süspansiyon kültürlerinde kuru ağırlık bakımından büyüme eğrisi grafiği.

4.5. İkincil metabolit üretimine AgNP elisitasyonunun etkisi

Süspansiyon kültürlerinde büyüme eğrisinin hesaplanması sonrasında büyüme fazının tespit edilmesiyle birlikte, optimal kültür koşulları altında büyüme fazı sonundaki süspansiyon kültürlerine AgNP'lerin 100-200-400-800 µg/ml konsantrasyonlarda ve 0, 12, 24 ve 48 saat uygulamasının süspansiyon gelişimine etkileri **Çizelge 4.7a** (PHH), **4.7b** (yaş ağırlık) ve **4.7c** (kuru ağırlık)'de sunulmuştur. Uygulamalar sonrası elde edilen kültürler karanlık ortamda ve serin bir yerde kurutularak ikincil metabolit üretiminin analizi ile aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C' de saklandı.

Çizelge 4.7a. Süspansiyon kültürlerinde Farklı AgNP konsantrasyonu ve uygulama zamanının PHH üzerine etkisi

Elisitör Konsantrasyon µg/ml	PHH (ml) Ort±SH		
	Uygulama Süresi		
	12s	24s	48s
Kontrol	0.42 ± 0.04 b	0.44 ± 0.05 b	0.48 ± 0.04 b
100	0.59 ± 0.04 a	0.52 ± 0.04 ab	0.52 ± 0.05 ab
200	0.59 ± 0.04 a	0.58 ± 0.06 ab	0.60 ± 0.03 ab
400	0.58 ± 0.04 a	0.62 ± 0.04 a	0.62 ± 0.04 a
800	0.60 ± 0.04 a	0.60 ± 0.06 ab	0.62 ± 0.04 a

*Çalışmada her bir denemede 5 kültür ve 3 defa tekrar edildi.

*Bir kolondaki farklı harfler bu iki işlemin Duncan'ın çoklu oran testine göre $p \leq 0.05$ 'te istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7a, süspansiyon kültürlerinde AgNP elisitasyonunun, farklı konsantrasyon ve uygulama sürelerindeki etkilerini göstermektedir. Buna göre, her uygulama süresi içerisinde (12s, 24s ve 48s) kontrole göre AgNP konsantrasyonu arttıkça genel olarak PHH artarken, uygulanan AgNP konsantrasyonlarının farklı uygulama zamanları PHH' da bir artışa neden olmamıştır. En yüksek PHH değerleri, sırasıyla 24 saatlik (24s) ve 48 saatlik (48s) sürelerde 400 µg/ml (0.62 ± 0.04 ml) ve 800 µg/ml (0.62 ± 0.04 ml) AgNP uygulamalarında elde edilmiştir. En düşük PHH değeri ise 12 saatlik (12s) kontrol grubunda 0.42 ± 0.04 ml olarak belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmeye göre, 12s uygulamalarında kontrol ile diğer uygulamalar arasında anlamlı farklar gözlemlenmiştir. 24s uygulamalarında, kontrol ile 400 µg/ml AgNP uygulamaları arasında anlamlı bir fark saptanırken, kontrol ile 100 µg/ml AgNP, 200 µg/ml AgNP ve 800 µg/ml AgNP uygulamaları arasında ve aynı şekilde 100 µg/ml AgNP, 200 µg/ml AgNP, 400 µg/ml AgNP ve 800 µg/ml AgNP uygulamaları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır.

48s uygulamalarında ise kontrol ile 400 µg/ml AgNP ve 800 µg/ml AgNP uygulamaları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir. Ancak, kontrol ile 100 µg/ml AgNP, 200 µg/ml AgNP uygulamaları arasında ve yine 100 µg/ml AgNP, 200 µg/ml AgNP, 400 µg/ml AgNP ve 800 µg/ml AgNP uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Genel olarak değerlendirildiğinde, farklı AgNP uygulamalarının kontrol grubuna kıyasla PHH değerlerini artırdığı gözlemlenmiştir. Özellikle, 100 µg/ml AgNP uygulaması, 12 saatlik süre içinde en yüksek PHH değerini sağlamıştır. Diğer yandan, 200 µg/ml, 400 µg/ml ve 800 µg/ml AgNP uygulamalarının genel olarak yüksek PHH değerleri ürettiği gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.7b. Süspansiyon kültürlerinde farklı AgNP konsantrasyonu ve uygulama zamanının yaş ağırlık üzerine etkisi

Elisitör Konsantrasyon µg/ml	Yaş Ağırlık Ort±SH (gr)		
	Uygulama Süresi		
	12s	24s	48s
Kontrol	0.35 ± 0.04 b	0.39 ± 0.04 b	0.44 ± 0.05 a
100	0.51 ± 0.04 a	0.33 ± 0.03 b	0.31 ± 0.04 b
200	0.60 ± 0.03 a	0.51 ± 0.04 a	0.40 ± 0.05 ab
400	0.39 ± 0.05 b	0.35 ± 0.05 b	0.48 ± 0.04 a
800	0.35 ± 0.05 b	0.56 ± 0.06 a	0.49 ± 0.02 a

*Çalışmada her bir denemede 5 kültür ve 3 defa tekrar edildi.

*Bir kolondaki farklı harfler bu iki işlemin Duncan'ın çoklu oran testine göre $p \leq 0.05$ ' te istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7b, süspansiyon kültürlerinde farklı AgNP konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin yaş ağırlığı üzerindeki etkilerini göstermektedir. Deneyin sonuçlarına göre, her uygulama süresi için (12s, 24s ve 48s), kontrol grubuna kıyasla AgNP konsantrasyonu arttıkça genel olarak yaş ağırlığında bir artış gözlemlenmiştir. En yüksek yaş ağırlık değerleri, 12s süresinde 200 µg/ml AgNP uygulamasında 0.60 ± 0.03 gr olarak belirlenmiştir. En düşük yaş ağırlığı değeri ise 12s kontrol grubunda 0.35 ± 0.04 gr olarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel değerlendirmeye göre, 12s uygulamalarında kontrol ile 100 µg/ml ve 200 µg/ml diğer uygulamalar arasında yaş ağırlık bakımından anlamlı farklar gözlemlenmiştir. 24s uygulamalarında ise kontrol ile 200 µg/ml ve 800 µg/ml AgNP uygulamaları arasında anlamlı fark saptanırken, kontrol ile diğer AgNP konsantrasyonları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır. 48s uygulamalarında ise kontrol ile 100 µg/ml

AgNP uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilirken, kontrol ile 200 µg/ml AgNP, 400 µg/ml AgNP ve 800 µg/ml AgNP uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, farklı AgNP uygulamalarının yaş ağırlığı değerlerini kontrol grubuna kıyasla artırdığı gözlenmiştir. Özellikle, 12s ve 48s süresinde 200 µg/ml ve 24s süresinde 800 µg/ml AgNP uygulamalarının yaş ağırlığı üzerinde belirgin bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Ancak, uygulama süreleri ve AgNP konsantrasyonları arasındaki etkileşimler, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde belirli kombinasyonlarda anlamlı farklar ortaya çıkmıştır.

Çizelge 4.7c. Süspansiyon kültürlerinde farklı AgNP konsantrasyonu ve uygulama zamanının kuru ağırlık üzerine etkisi

Elisitör Konsantrasyon µg/ml	Kuru Ağırlık Ort±SH (gr) Uygulama Süresi		
	12s	24s	48s
Kontrol	0.16 ± 0.01 c	0.19 ± 0.02 bc	0.22 ± 0.02 a
100	0.28 ± 0.03 b	0.16 ± 0.02 c	0.17 ± 0.02 a
200	0.40 ± 0.02 a	0.30 ± 0.04 a	0.23 ± 0.04 a
400	0.21 ± 0.04 bc	0.18 ± 0.04 bc	0.23 ± 0.02 a
800	0.20 ± 0.04 bc	0.29 ± 0.05 ab	0.24 ± 0.03 a

*Çalışmada her bir denemede 5 kültür ve 3 defa tekrar edildi.

*Bir kolondaki farklı harfler bu iki işlemin Duncan'ın çoklu oran testine göre $p \leq 0.05$ 'te istatistiksel olarak farklı olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.7c, süspansiyon kültürlerinde farklı AgNP konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin kuru ağırlık üzerindeki etkilerini göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre, her uygulama süresi için (12 s, 24 s ve 48 s), AgNP konsantrasyonu arttıkça genel olarak kuru ağırlıkta bir artış gözlemlenmiştir. Kuru ağırlık bakımından 12 s uygulama süresi dışında diğer zaman uygulamalarında AgNP konsantrasyonu arttıkça yaş ağırlık miktarı artarken, 12 s uygulamalarında 200 µg/ml AgNP uygulaması sonrası uygulama miktarı arttıkça kuru ağırlık azalmaktadır. En yüksek kuru ağırlık değerleri, 12s süresinde 200 µg/ml, AgNP uygulamalarında 0.40 ± 0.02 gr olarak belirlenmiştir. En düşük kuru ağırlık değeri ise ve 24s süresinde 100 µg/ml, AgNP uygulamaları grubunda sırasıyla 12 s kontrol grubunda 0.16 ± 0.01 ve 0.16 ± 0.02 gr olarak hesaplanmıştır.

İstatistiksel değerlendirmeye göre, 12 s uygulamalarında kontrol ile 100 µg/ml ve 200 µg/ml AgNP uygulamaları arasında kuru ağırlık bakımından anlamlı farklar

gözlenmiştir. 24 s uygulamalarında ise kontrol ile 200 µg/ml AgNP uygulamaları arasında anlamlı fark saptanırken, kontrol ile diğer AgNP konsantrasyonları arasında fark bulunmamıştır. 48 s uygulamalarında tüm AgNP konsantrasyon uygulamaları arasında ise uygulamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, farklı AgNP uygulamalarının kuru ağırlık değerlerini kontrol grubuna kıyasla artırdığı gözlenmiştir. Özellikle, 12s ve 24s süresinde µg/ml AgNP uygulamalarının kuru ağırlık üzerinde belirgin bir etkisi olduğu gözlenmiştir. Ancak, uygulama süreleri ve AgNP konsantrasyonları arasındaki etkileşimler, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde belirli kombinasyonlarda anlamlı farklar ortaya çıkmıştır.

4.6. Toplam Fenolik ve Flavonoid Miktarı ve Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi (DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi, ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi ve Yöntemi, CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)

4.6.1. Toplam fenolik ve flavonoid miktarı

AgNP elisitasyon uygulamaları sonrası elde edilen örnek ekstraktlarına yönelik toplam fenolik ve flavonoid miktarları **Çizelge 4. 8'** de sunulmuştur.

Çizelge 4.8. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin toplam fenolik ve flavonoid miktarı üzerine etkileri

Uygulama Süresi	Örnek Tipi µg/ml AgNP	Toplam Fenolik (µg PEs/mg ekstre)	Toplam Flavonoid (µg QEs/mg ekstre)
12 Saat	Kontrol	9,15 ± 0,31	3,40 ± 0,08
	100	12,32 ± 0,12	5,75 ± 0,02
	200	11,21 ± 0,13	4,62 ± 0,14
	400	15,40 ± 1,12	6,93 ± 0,08
	800	16,37 ± 0,42	5,94 ± 0,12
24 Saat	100	19,59 ± 0,16	6,69 ± 0,19
	200	20,81 ± 0,29	9,47 ± 0,33
	400	22,43 ± 0,50	11,02 ± 0,26
	800	18,51 ± 0,41	8,60 ± 0,06
48 Saat	100	13,57 ± 0,48	6,48 ± 0,73
	200	17,59 ± 0,06	8,85 ± 0,57
	400	15,92 ± 0,35	7,22 ± 0,17
	800	14,20 ± 0,31	6,60 ± 0,12

Çizelge 4.8'de, farklı zaman aralıklarında (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) süspansiyon kültürlerinin toplam fenolik ve flavonoid miktarları üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu parametreler, bitkinin biyokimyasal içeriği ve antioksidan kapasitesi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır.

Çizelge 4.8 incelediğinde, kontrole göre tüm elisitasyon uygulama toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin arttığı tespit edilmiştir. Toplam fenolik miktarları açısından değerlendirildiğinde, özellikle, 24 saatlik uygulamalarda 400 µg/ml AgNP uygulamasının en yüksek toplam fenolik miktarını (22.43 ± 0.50 µg PEs/mg ekstre) ürettiği görülmüştür. Ancak genel eğilimde 24 saatlik uygulamaların daha yüksek toplam fenolik miktarlarına sahip olduğu görülmüştür. Toplam flavonoid miktarlarına baktığımızda ise, 24 saatlik uygulamalarda genellikle en yüksek miktarların elde edildiği gözlemlenmiştir. Özellikle 24 saatlik uygulamalarda 400 µg/ml AgNP uygulamasının en yüksek toplam flavonoid miktarını (11.02 ± 0.26 µg QEs/mg ekstre) ürettiği görülmüştür. Ancak zaman aralıkları ve uygulama konsantrasyonları arasında farklılıklar gözlemlenmiş, bu da belirli kombinasyonlarda diğerlerine göre daha yüksek flavonoid miktarlarına işaret etmiştir. Sonuç olarak, özellikle hem toplam fenolik ($22,43 \pm 0,50$ µg PEs/mg ekstre) hem de total flavonoid ($11,02 \pm 0,26$ µg QEs/mg ekstre) içerikleri bakımından 24 saat 400 µg/ml AgNP örneğinin gerçekleştirilen diğer uygulamalara göre daha fazla olduğu hesaplanmıştır.

4.6.2. Antioksidan aktivite çalışmaları (DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, ABTS katyon radikali giderim aktivitesi ve yöntemi, CUPRAC yöntemi (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi)

AgNP elisitasyon uygulamaları sonrası elde edilen örnek ekstraktlarına yönelik DPPH, CUPRAC ve ABTS sonuçları **Çizelge 4.7'**de sunulmuştur.

Çizelge 4.9. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin antioksidan aktiviteleri üzerine etkileri.

Uygulama Süresi	Örnek Tipi	Antioksidan Aktivite (µg/mL)		
	µg/ml AgNP	DPPH (IC ₅₀)	ABTS (IC ₅₀)	CUPRAC (A _{0.5})
12 Saat	Kontrol	828,17 ±3,12	542,44 ±1,43	666,67 ±3,67
	100	211,87 ±2,19	78,30 ±0,74	125,81 ±1,05
	200	210,13 ±2,48	77,35 ±0,59	137,50 ±0,98
	400	100,00 ±1,98	85,98 ±1,47	108,57 ±0,87
	800	111,09 ±1,78	87,37 ±1,36	185,00 ±1,34

24 Saat	100	243,05 ±2,08	56,82 ±0,59	85,00 ±0,67
	200	214,58 ±1,88	74,95 ±0,99	81,25 ±0,78
	400	250,00 ±2,09	76,51 ±1,18	79,591 ±0,59
	800	268,89 ±3,42	81,80 ±1,21	111,42 ±1,04
48 Saat	100	451,00 ±4,67	106,13 ±1,31	178,26 ±1,88
	200	105,68 ±0,98	148,06 ±1,23	191,30 ±2,08
	400	112,44 ±1,67	83,45 ±1,10	111,767 ±1,34
	800	300,00 ±2,13	89,20 ±1,33	115,62 ±1,21
BHT		18,69 ±0,65	15,09 ±0,29	9,08 ±0,14
α-TOC		7,03 ±0,12	8,32 ±0,18	15,65 ±0,78

a: Sonuçlar IC₅₀ değerleri olarak verilmiştir ve değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

Çizelge 4. 9' daki sonuçlara göre, farklı zaman aralıklarında (12s, 24s ve 48s) denenilen farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) süspansiyon kültürlerinin antioksidan aktiviteleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Buna göre, tüm zaman parametreleri arasında 12 saatlik uygulamalarda DPPH yöntemiyle ölçülen antioksidan aktivitelerde genel bir artış gözlenirken, 24 saatlik uygulamalarda ise ABTS ve CUPRAC yöntemiyle ölçülen antioksidan aktivitelerde genel bir artış gözlemlenmiştir. DPPH yönteminde en aktif örnek 12 Saat 400 µg/ml AgNP uygulaması örneği IC₅₀: 100,00 ± 1,98 µg/mL, ABTS yönteminde 24 Saat 100 µg/ml AgNP uygulaması örneği IC₅₀: 56,82 ± 0,59 µg/mL ve CUPRAC yönteminde ise 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulaması örneğinin A_{0.5}: 79,591 ± 0,59 µg/mL olduğu hesaplanmıştır. Kontrole göre tüm örneklerde aktivitenin arttığı hesaplanmıştır. Ancak standartlara göre örneklerin aktivitesi çok yüksek olmadığı gözlenmiştir.

4.7. Enzim inhibisyon tayini

AgNP elisitasyon uygulamaları sonrası elde edilen örnek ekstraktlarına yönelik enzim inhibisyon; AChE Aktivite Testi, BChE Aktivite Testi ve Üreaz Enzim Aktivitesi sonuçları **Çizelge 4. 8'** de sunulmuştur. Tirozinaz Enzim Aktivitesi, Elastaz Enzim Aktivitesi ve Kollajenaz Enzim Aktivitesi sonuçları ise **Çizelge 4. 9'** da sunulmuştur.

Çizelge 4.10. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin AChE Aktivite Testi, BChE Aktivite Testi ve Üreaz Enzimi aktiviteleri üzerine etkileri

Uygulama Süresi	Örnek Tipi µg/ml AgNP	İnhibisyon (%)		
		AChE	BChE	Üreaz
12 Saat	Kontrol	AD	35,37 ± 0,61	AD
	100	AD	47,31 ± 0,71	AD
	200	AD	48,92 ± 1,79	AD
	400	AD	44,26 ± 0,56	AD
	800	AD	45,33 ± 1,14	AD
24 Saat	100	AD	46,56 ± 0,23	AD
	200	AD	47,52 ± 1,21	AD
	400	AD	69,41 ± 1,63	AD
	800	AD	56,41 ± 2,30	AD
48 Saat	100	AD	51,81 ± 1,64	AD
	200	AD	53,36 ± 0,76	AD
	400	AD	56,79 ± 1,55	AD
	800	AD	48,22 ± 1,34	AD
^b Galantamin		85.13±0.98	77.95 ± 1.56	-
^b Tiyoüre		-	-	96.56 ± 0.52

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (50 µg/mL).

b: Standart madde, A.D.: Aktif değil

Çizelge 4.10' da, farklı zaman dilimlerinde (12s, 24s ve 48s saat) ve çeşitli AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) süspansiyon kültürlerindeki örneklerin AChE, BChE ve Üreaz enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, hiçbir örneğin AChE ve Üreaz aktivitesi yönünden aktif olmadığı gözlemlenirken, BChE enzim aktivitesinde özellikle 24 saatlik uygulamalarda artışlar kaydedilmiştir. Bu artışlar, özellikle 24s 400 µg/ml AgNP uygulamalarında daha belirgindir. Örnekler içindeki en yüksek BChE aktivitesine sahip örnek 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulaması örneği %69,41 ± 1,63, en düşük aktiviteye sahip örnek ise Kontrol örneği %35,37 ± 0,61 olarak hesaplanmıştır. Bulgular, özellikle belirli AgNP konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin 12 saatte 200 µg/ml AgNP uygulamasına kadar, 24 ve 48 saatte ise 400 µg/ml AgNP uygulamalarına kadar BChE enzim aktivitelerini artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.11. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin Tirozinaz Enzim Aktivitesi, Elastaz Enzim Aktivitesi ve Kollajenaz Enzim aktiviteleri üzerine etkileri

Uygulama Süresi	Örnek Tipi µg/ml AgNP	İnhibisyon (%)		
	Kontrol	Tirozinaz	Elastaz	Kollejenaz
12 Saat	Kontrol	AD	AD	21,30 ± 0,33
	100	AD	AD	24,34 ± 0,33
	200	AD	AD	22,41 ± 0,49
	400	AD	AD	36,13 ± 0,97
	800	AD	AD	22,59 ± 0,25
24 Saat	100	AD	AD	34,38 ± 0,35
	200	13,05 ± 0,03	AD	19,73 ± 0,08
	400	AD	AD	36,07 ± 0,37
	800	AD	AD	23,00 ± 0,13
48 Saat	100	12,20 ± 0,01	AD	22,57 ± 0,34
	200	14,57 ± 0,06	AD	22,59 ± 0,88
	400	21,32 ± 0,12	AD	28,96 ± 0,44
	800	AD	AD	16,27 ± 0,78
^b Kojik Asit		87.49 ± 0.19	-	-
^b Oleanolik Asit		-	54.78 ± 0.52	-
^b Epikateşin Gallat		-	-	86.31 ± 1.45

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (50 µg/mL).

b: Standart madde, A.D.: Aktif değil

Çizelge 4.11' de, farklı zaman dilimlerinde (12s, 24s ve 48s saat) çeşitli AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) süspansiyon kültürlerindeki örneklerin Tirozinaz, Elastaz ve Kollajenaz enzim aktiviteleri üzerindeki etkileri sunulmuştur.

Çizelge 4.11. irdelendiğinde örnekler Elastaz aktivitesi yönünden aktif değilken, Tirozinaz aktivitesi yönünden sadece 24 Saat 200 µg/ml AgNP, 48 Saat 100 µg/ml AgNP, 48 Saat 200 µg/ml AgNP, 48 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamalarına sahip örnekler aktivite göstermiş olup en yüksek Tirozinaz aktivitesi 48 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamalarına ait örnekte % 21,32 ± 0,12 olarak hesaplanmıştır. Kollejenaz aktivitesi yönünden kontrol ve AgNP uygulamalarına yönelik örnekler aktivite göstermiştir. Kollegenaz aktivitesi yönünden en yüksek aktivite gösteren örnekler 12 Saat 400 µg/ml AgNP ve 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamalarına ait örnekler olup sırasıyla % 36,13 ± 0,97 ve % 36,07 ± 0,37 değerleri ile Epikateşin'e an yakın değerler bu iki parametreden elde edilmiştir. En düşük aktivite gösteren örnek ise 48 Saat 800 µg/ml AgNP uygulaması örneği olup %16,27±0,78 olarak belirlenmiştir. Bulgular, belirli AgNP konsantrasyonlarının ve uygulama sürelerinin Tirozinaz enzim aktivitesini azaltma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuştur.

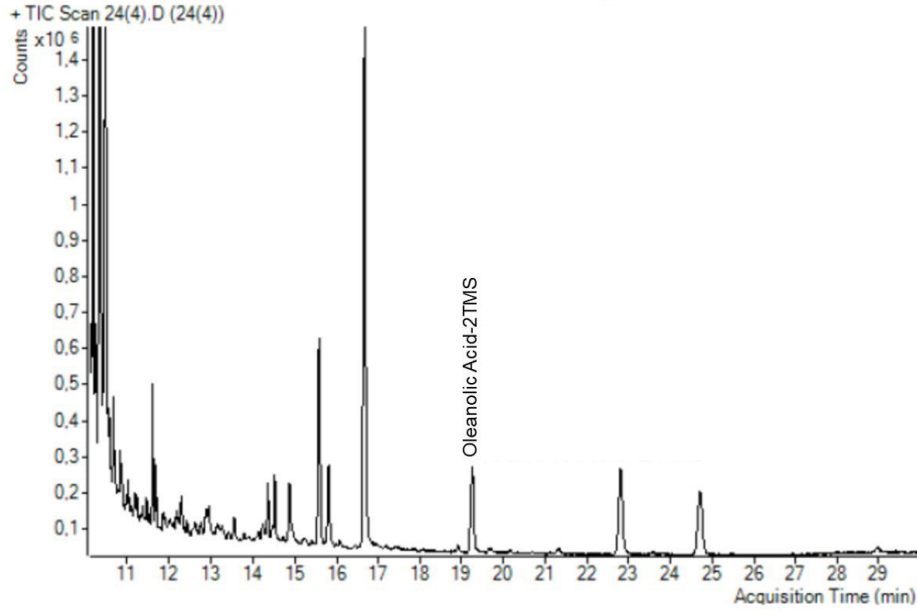
4.8. GC-MS/MS ile Terpenoidlerin Kantitatif Analizi

AgNP elisitasyon uygulamaları sonrası elde edilen örnek ekstraktlarının bazı terpenoidler açısından miktarları **Çizelge 4. 10'** da, örnek kromatogram ise **Şekil 4. 5'** te sunulmuştur.

Çizelge 4.12. Süspansiyon kültürlerinde farklı zaman (12s, 24s ve 48s) ve farklı AgNP uygulamalarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) örneklerin bazı terpenoid miktarları üzerine etkileri

Uygulama Süresi	Örnek Tipi µg/ml AgNP	Analit Tipi (µg Analit/g Ekstrakt)						
		α-Amirin	Moronik Asit	Oleanonik Asit	Oleanolik Asit	Betulinik Asit	Ursolik Asit	Ursonik Asit
	Kontrol	TE	TE	TE	TE	TE	TE	TE
12 Saat	100	TE	TE	TE	1402,64	TE	TE	TE
	200	TE	TE	TE	1465,01	TE	TE	TE
	400	TE	TE	TE	1581,21	TE	TE	TE
	800	TE	TE	TE	1479,88	TE	TE	TE
24 Saat	100	TE	TE	TE	1109,03	TE	TE	TE
	200	TE	TE	TE	1125,59	TE	TE	TE
	400	TE	TE	TE	3995,80	TE	TE	TE
	800	TE	TE	TE	2754,78	TE	TE	TE
48 Saat	100	TE	TE	TE	1889,35	TE	TE	TE
	200	TE	TE	TE	2787,79	TE	TE	TE
	400	TE	TE	TE	1910,78	TE	TE	TE
	800	TE	TE	TE	1500,37	TE	TE	TE

Çizelge 4.12 irdelendiğinde, Oleanolik asit dâhil olmak üzere tüm terpenoidler kontrol grubunda tespit edilememiştir. Oleanolik asit bakımından değerlendirildiğinde ise, AgNP uygulaması yapılmayan kontrol grubu örneklerinde Oleanolik asitin bulunmadığı, ancak bütün diğer AgNP uygulamalarında Oleanolik asitin sentezinin uyarıldığı tespit edilmiştir. Süspansiyon kültürlerinde üretilen en yüksek Oleanolik asit miktarı 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasında 3995,80 µg analit/g ekstrakt olarak tespit edilmiştir. Genel olarak bütün uygulama saatlerinde elde edilen Oleanolik asit miktarının yüksek (800 µg/ml) AgNP uygulamalarında diğer uygulamalara oranla azaldığı tespit edilmiştir. 12 ve 24 Saat uygulamalarında 400 µg/ml'ye kadar olan AgNP uygulamalarının genel olarak Oleanolik asit içeriğini periyodik olarak arttırdığı, 48 saat uygulamasında ise Oleanolik asidin periyodik olarak arttığı sınır değer 200 µg/ml AgNP olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.5. 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasına ait kromatogram

GC-MS sonuçlarına bakıldığında; çalışılan bitki örneklerinin Oleanolik asit ve özellikle sterol içeriklerinde kayda değer değişiklikler tespit edilmiştir. Süspansiyon kültürlerinde; 24(4) (24 saat 400µg/mL AgNP) örneğinin, diğer örneklerle göre daha fazla Oleanolik asit (3995,80 µg Analit/g Ekstrakt) içerdiği, ayrıca genel olarak neredeyse tüm örneklerin sterol (özellikle Campesterol, Stigmasterol, ve β-sitosterol) içerikleri bakımından zengin olduğu ve genel olarak bu üç sterol içeriğinin özellikle 48(4) AgNP (48 saat 400µg/mL AgNP) elisitasyonu sonucu arttığı tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Nanopartiküllerin bitki kültürlerine eklenmesi, ikincil metabolitlerin homojen üretiminde önemli bir teknoloji olarak öne çıkmaktadır. Bu nanopartiküller, sadece ikincil metabolitlerin uyarıcısı olmakla kalmaz, aynı zamanda mikrobesein kaynağı olarak işlev görür ve zaman zaman antimikrobiyal ajanlar olarak etki ederler. Bunların yanısıra NP'ler kallus indüksiyonunu, organogenezin, sürgün büyümesini ve kök başlangıcını da teşvik eder (Kim ve ark., 2017), Malik ve ark., 2021)

Calendula officinalis L. (kadife çiçeği) kallus kültürlerinde, özellikle 2,4-D (2 mg/l) ve kinetin (0,2 mg/l) içeren MS ortamı ile zenginleştirilmiş ortamlarda gümüş nanoparçacıklarının (1,2 mg/l) uçucu yağ içeriğini ve bileşenlerini artırdığı gözlemlenmiştir (Al-Oubaidi ve ark., 2014). Bu, terpenoid üretimindeki AgNP'lerin uyarıcı etkisiyle uyumludur.

Aloe vera L. süspansiyon kültürleri üzerinde yapılan çalışmalarda, AgNP'ler (0,625 mg/ml) ile 48 saat boyunca yapılan uygulamanın aloin içeriğini artırdığı ve bu artışın zamanla azaldığı gözlemlenmiştir (Raei ve ark. 2014). Bulgular, AgNP uygulamalarının aloin üretimi üzerindeki etkileriyle tutarlıdır.

Capsicum frutescens kallus kültürleri, 2,4-D ve kinetin içeren ortamlarda AgNP'lerin, *Capsicum annum* ve *C. frutescens* meyveleri ile karşılaştırıldığında, capsaicin içeriğinde belirgin bir artışa neden olduğunu göstermiştir (Bhat ve Bhat, 2016). Belirli bileşenlerin üretimindeki bu artış, bulgularınızla uyumludur.

Corylus avellana L. (findık) hücre süspansiyon kültürlerinde, 5 ppm AgNP'ler ile uyarılmanın anti-kanser bileşenler taxanes, taxol ve baccatin III'ün üretimini artırdığı, ancak 10 ppm konsantrasyonunda azalttığı gözlemlenmiştir (Jamshidi ve ark., 2017). Bu, biyoaktif bileşen üretimi üzerinde AgNP'lerin etkileriyle uyumludur.

Vanilla planifolia Jacks. ex Andrews (vanilya) sürgünleri, 25 ve 50 mg/l AgNP'lerin (35±15 nm) ile zenginleştirilmiş MS besi ortamında, Toplam Fenolik İçerik (TFİ) ve antioksidan kapasitesinin arttırdığını, ancak 100 mg/l'de azalttığını göstermiştir (Spinoso-Castillo ve ark., 2017). Bulgular, hormesis etkisi olarak adlandırılan bu durumu destekler.

Momordica charantia L. (acı kavun) hücre süspansiyon kültürleri, AgNP'ler (1–20 nm; 5 mg/l) ile muamele edildiğinde, kontrol kültürüne göre toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinde artış göstermiş, ayrıca flavonol hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asit içeriklerinde de bir artış gözlemlenmiştir (Chung ve ark., 2018b).

Stevia rebaudiana L. kallus kültürlerinde, AgNP'ler (45 mg/l) ile uyarılmanın stevioside üretimini artırdığı rapor edilmiştir (Golkar ve ark., 2018).

Prunella vulgaris L. (yara otu) kallus kültürleri, AgNP'ler ve AuNP'lerin tek başına veya farklı oranlarda bir arada (30 µg/l) NAA (2 mg/l) ile birlikte uygulanması, ikincil metabolit üretimini artırmıştır (Fazal ve ark., 2016). Bulgular çalışmamızla uyumluluk göstermektedir.

Caralluma tuberculata bitkisinin *in vitro* kallus kültürlerinde AgNP'lerin (özellikle 60 µg/l AgNP) MS ortamında en yüksek kallus oluşumuna neden olarak biyoaktif antioksidanların (TFİ: 3.0 mg, , Toplam Flavonoid İçerik (TFİ): 1.8 mg, PAL aktivitesi: 5.8 U/mg) artışına neden olduğu rapor edilmiştir. Bulgularımıza paralel olarak, bu çalışma da AgNP'lerin kullanımının *C. tuberculata* bitkisinin kallus kültürlerinde biyoaktif antioksidan üretimini artırma potansiyeline işaret etmektedir (Ali ve ark., 2019).

Lavandula angustifolia (lavanta) kültürlerine Ag (27.5 ± 4.8 nm) ve Au (24.2 ± 2.4 nm) nanokolloidlerin eklenmesi, uçucu yağ kompozisyonunda değişikliklere neden olmuştur (Wesołowska ve ark., 2019).

Sonuçlar, AgNP'lerin süspansiyon kültürlerinin antioksidan aktiviteleri üzerinde önemli etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, bitki büyümesi ve ikincil metabolit üretimi üzerinde AgNP'lerin olumlu etkilerini vurgulamaktadır.

Antioksidan aktivite çalışmalarında elde ettiğimiz sonuçlar, DPPH, ABTS ve CUPRAC yöntemleriyle belirlenen antioksidan aktivitelerdeki önemli değişiklikleri ortaya koymaktadır. Özellikle, 24 ve 48 saatlik sürelerde yüksek konsantrasyonlarda (400 ve 800 µg/ml) uygulanan AgNP'lerin antioksidan aktiviteleri üzerinde belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu durum, AgNP'lerin bitki hücrelerinde antioksidan enzimlerin aktivasyonunu artırabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, DPPH yönteminde en yüksek aktivitenin 12 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasında elde edildiği, ABTS yönteminde ise 24 Saat 100 µg/ml AgNP uygulamasının en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlenmiştir. CUPRAC yönteminde ise 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasının en yüksek aktiviteyi sergilediği görülmüştür. Elde ettiğimiz bulgular *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.'in süspansiyon kültürlerinde yapılan farklı AgNP uygulamalarının antioksidan aktiviteler üzerinde belirgin etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Özellikle 24 saatlik süre içinde 400 µg/ml AgNP uygulamasının DPPH yöntemiyle (IC_{50} : $100,00 \pm 1,98$ µg/mL) ve CUPRAC yöntemiyle (24 Saat 400 µg/ml AgNP, $A_{0.5}$: $79,591 \pm 0,59$ µg/mL) en yüksek antioksidan aktiviteyi sergilediği tespit edilmiştir. ABTS yöntemine göre ise 24 Saat 100 µg/ml AgNP uygulamasının (24 Saat 100

$\mu\text{g/ml}$ AgNP, IC_{50} : $56,82 \pm 0,59 \mu\text{g/mL}$) kontrole örnekleri olan BHT ve α -TOC'e göre en yakın aktiviteyi sergilediği tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.'in antioksidan aktivite potansiyeli hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Ayrıca, literatürdeki diğer çalışmalar da, *Salvia* cinsine ait birçok türün güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir. Örneğin, Sulniute ve ark. (2016) tarafından yapılan analizler, *Salvia* cinsine dahil olan 10 farklı türün önemli derecede antioksidan aktivite sergilediğini göstermektedir. Yine *S. miltiorrhiza* 'nın antioksidan etkileri de dikkate değerdir. Bu bitki, oksidazları inhibe etme, süperoksit üretimini azaltma, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidatif modifikasyonunu engelleme ve mitokondriyal oksidatif stresi iyileştirme yoluyla ROT üretimini azaltma yeteneğine sahiptir (Chang ve ark., 2016). Ayrıca, *S. miltiorrhiza* 'nın çeşitli antioksidan enzimlerinin aktivitelerini arttırdığı da belirtilmiştir.

Salvia türlerinde bulunan fenolik bileşikler, özellikle rosmarinik asit, salvianolik asit, sagekumarin ve sagerinik asit gibi, güçlü radikal süpürücü aktiviteleri nedeniyle antioksidan etkilerle ilişkilendirilmiştir. Örneğin, *S. lavandulaefolia* esansiyel yağında bulunan monoterpenlerin, ROT üretimini inhibe ettiği ve endojen antioksidan bileşiklerini arttırdığı gözlemlenmiştir (Porres-Martinez ve ark., 2015). Ayrıca, *Salvia* türlerinde bulunan karnosik ve ursolik asidin de güçlü antioksidanlar olduğu belirtilmiştir (Birtic ve ark., 2015; Kashyap ve ark., 2016).

Bu bağlamda, elde edilen sonuçlar, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.'in antioksidan aktivitesinin diğer *Salvia* türleriyle uyumlu bir şekilde potansiyel olarak antioksidan özelliklere sahip olduğunu düşündürmektedir. Ancak süspansiyon kültürlerinden elde edilen ve AgNP uygulanan bu ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin doğadan toplanan diğer *Salvia* türleri kadar güçlü derecede bir aktiviteye sahip olmadıkları belirlenmiştir.

Hussain ve diğerleri (2017) tarafından yürütülen çalışma, 40 nm boyutundaki altın nanopartiküllerin (AuNP'ler) 3 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda *Artemisia absinthum* bitkisinde (TFİ) ve toplam TFİ ile antioksidan aktivitesinde artışa neden olduğunu rapor etmiştir. Aynı çalışmada *Artemisia absinthum*'un *in vitro* olarak çimlendirilmiş fideleri üzerinde yapılan denemelerde, 34 nm boyutundaki gümüş nanopartikül (AgNP) uygulanan bitkilerin TFİ, TFİ ve antioksidan aktiviteyi arttırdığı belirlenmiştir. Benzer şekilde, çalışmamızda da 40 nm boyutundaki gümüş nanopartiküllerin (AgNP'ler) 400 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda süspansiyon kültürlerine uygulanması, ekstrelerin TFİ ve TFİ içeriği ile antioksidan aktivitesinde artışa sebep olmuştur.

Yine *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.'in de dahil olduğu Lamiaceae familyasına ait bir başka bitki olan *Thymus lotocephalus* üzerinde yapılan çalışmada, farklı elisitörlerin

(maya ekstraktı, salisilik asit ve AgNO_3) TFI ve TFI' de artışa neden olduğu belirlenmiştir (Gonçalves ve ark., 2019). Bu bulgular, AgNP uygulamalarının TFI ve TFI benzer şekilde arttırmasının yanı sıra, *Thymus lotocephalus*'ta RA miktarındaki artışa benzer bir şekilde, sonuçlarımızda Oleanolik asit miktarında belirli seviyelere kadar bir artış gözlemlenmiştir. Bu paralellik, bitki ekstraktlarında biyoaktif bileşen içeriğini artırmak için farklı uyarıcı ajanların geniş bir potansiyele sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Elde edilen sonuçlar, AgNP uygulamalarının özellikle BChE enzim aktiviteleri üzerinde belirgin etkiler yarattığını göstermektedir. BChE Aktivite Testi yönüyle örnekler içinde en yüksek aktivitenin 24 Saat 400 $\mu\text{g/ml}$ AgNP uygulamasında elde edildiği belirlenmiştir. Ancak, Tirozinaz Enzim Aktivitesi, Elastaz Enzim Aktivitesi ve Kollajenaz Enzim Aktivitesi üzerindeki etkiler incelendiğinde, örneklerin elastaz aktivitelerinin bulunmadığı, AgNP uygulamalarının çoğunun belirgin bir inhibisyon gösterdiği görülmektedir. Özellikle, 400 $\mu\text{g/ml}$ AgNP uygulamasının 12, 24 ve 48 saatte kollajenaz enzim aktivitesini belirgin şekilde artırdığı gözlemlenmiştir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.'in süspansiyon kültürlerinde uygulanan AgNP'lerin özellikle 24 saatlik bir süre içinde BChE Aktivite Testi üzerinde belirgin bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. Özellikle 24 saatlik süre içinde 400 $\mu\text{g/ml}$ AgNP uygulamasının, örnekler arasında BChE aktivitesinde en yüksek artışa neden olduğu ve diğer uygulama zamanları ve konsantrasyonlarına kıyasla önemli bir fark gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.'in biyolojik aktivitelerini düzenleyen AgNP uygulamalarının, özellikle BChE üzerindeki etkisinin zaman ve konsantrasyona bağlı olarak değişebileceğini ortaya koymaktadır.

Elde ettiğimiz bulgular, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.'in kolinerjik aktivite üzerindeki olası etkilerini değerlendirmek adına önemli bir katkı sağlamaktadır. Diğer çalışmalar, *S. fruticosa* ve *S. lavandulaefolia* gibi türlerin uçucu yağlarının AChE üzerinde inhibe edici etkiler gösterdiğini ortaya koymaktadır (Senol ve ark., 2011; Kennedy ve ark., 2011). Aynı zamanda, *S. officinalis*'ten elde edilen fenolik diterpenlerin (7a-methoxyrosmanol ve isorosmanol) AChE inhibisyonu sergilediği ve diğer *Salvia* türlerinde bulunan bileşenlerin (rozmarinik asit, karnosik asit, kersetin) de AChE aktivitesini inhibe edebileceği bildirilmiştir (Sallam ve ark., 2016; Marcelo ve ark., 2013).

Özellikle, *S. miltiorrhiza* 'dan elde edilen tanşinonların hem AChE hem de BChE aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Zhou ve ark., 2011a; Xu ve ark., 2016). Bu durum, *Salvia* türlerinin potansiyel olarak nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde kullanılabilecek bileşenlere sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f.'de AgNP uygulamalarının BChE aktivitesi üzerindeki etkisini ortaya koymasıyla bu değerli bitkinin potansiyel terapötik kullanım

alanlarına işaret etmektedir. Bu bağlamda elde ettiğimiz sonuçlar yukarıda değindiğimiz diğer *Salvia* türleri üzerinde yapılan çalışmalarla uyumlu görünmektedir.

Çalışma sonuçlarımız, süspansiyon kültürlerine uygulanan farklı AgNP konsantrasyonlarının (100, 200, 400 ve 800 µg/ml) tirozinaz ve kollajenaz enzim aktiviteleri üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur. AgNP uygulamalarının çoğunun özellikle kollejenaz enzim aktiviteleri üzerinde belirgin bir inhibisyon gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle, 400 µg/ml AgNP uygulamasının 12, 24 ve 48 saatte kollajenaz enzim aktivitesini belirgin şekilde artırdığı görülmüştür. Diğer yandan, hiçbir AgNP uygulamasının elastaz enzim aktivitesini arttırmadığı daha doğrusu ekstrelerin elastaz enzim aktivitesine sahip olmadığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, AgNP'lerin zaman ve konsantrasyon bağımlı olarak enzim aktivitelerini etkileyebileceğini düşündürmektedir. Elde ettiğimiz bu bulgular, Figueiredo ve ark. (2023) tarafından *Tribulus terrestris*'ten sentezlenerek elde edilen 31 nm çaplı AgNP'lerin antioksidan ve kollajenaz enzim inhibisyon aktivitelerini desteklemekte ve bu çalışma sonuçlarıyla benzer bir eğilim göstermektedir. Bu bağlamda, bitkisel kaynaklı AgNP'lerin biyosentezi, antioksidan ve enzim inhibitör potansiyeli açısından önemli bir alternatif olabilir.

Şinko ve ark. (2014), tarafından yapılan çalışma, AgNP'lerin asetilkolinesteraz (AChE) ve BChE üzerindeki etkilerini incelemiş ve üç farklı AgNP türünün ChE'leri reversibl olarak inhibe ettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, AgNP'lerin esterase aktivitelerini inhibe etme yeteneklerini desteklemekte olup, yapısal bozulmanın AgNP'ler tarafından AChE inhibisyonunda ortak bir mekanizma olabileceğine işaret etmektedir (Şinko ve ark., 2014).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, bitki kültürlerindeki AgNP uygulamalarının belirgin BChE enzim aktivitesi modülasyonu ile paralellik göstermektedir. Bu bağlamda, Li ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan çalışma, BChE inhibitörlerinin tanımlanması için kullanılan kapsamlı bir tarama yaklaşımıyla uyumluluk göstermektedir. Bulgularımız, *Salvia pseudophratica* Rech.f. hücre süspansiyon kültürlerinde AgNP uygulamalarının, özellikle BChE aktivitesini düzenleme potansiyeline sahip çeşitli bileşenleri içerebileceğini düşündürmektedir.

GC-MS/MS ile yapılan terpenoid analizi, AgNP uygulamalarının bazı terpenoidlerin miktarını etkilediğini göstermektedir. Oleanolik asit bakımından özellikle dikkat çekicidir ki, bu asidin kontrol grubunda bulunmadığı ancak AgNP uygulamalarının çoğunda arttığı gözlemlenmiştir. Bu durum, AgNP'lerin bitki metabolizmasını etkileyerek belirli terpenoidleri artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Tez kapsamında gerçekleştirilen terpenoid analizi, AgNP uygulamalarının bitki kültürlerindeki terpenoid

profiline önemli etkiler sağladığını göstermektedir. Bu sonuçlar, bitki metabolizmasının AgNP'ler tarafından modüle edilebileceğini ve özellikle oleanolik asit üretiminde belirgin değişikliklerin meydana geldiğini göstermektedir.

Analiz sonuçlarına göre, kontrol grubu dahil birçok örnekten farklı olarak, 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasında oleanolik asit miktarında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu durum, AgNPlerin bitki hücrelerinde oleanolik asit sentezini uyarabileceğini ve bu etkinin özellikle belirli konsantrasyon ve zamanlarda artış gösterdiğini düşündürmektedir.

Özellikle, 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasının oleanolik asit miktarını 3995,80 µg analit/g ekstrakt düzeyine çıkardığı gözlemlenmiştir. Ancak, yüksek AgNP konsantrasyonları (örneğin, 800 µg/ml) ile yapılan uygulamaların, oleanolik asit miktarında bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bu durum, AgNP konsantrasyonunun, bitki metabolizmasını belirli bir noktadan sonra olumsuz etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Çizelge 4.12'de oleanolik asit dışında araştırılan diğer tüm terpenoidlerin hiçbir örnekte tespit edilemediği görülmektedir. Bu durum, AgNP uygulamalarının bitki hücrelerinde spesifik terpenoidlerin üretimini tetikleyebileceğini veya inhibe edebileceğini düşündürmektedir. Zira, AgNP uygulamalarının bitki hücrelerinde ikincil metabolitlerin veya spesifik terpenoidlerin üretimi üzerindeki etkileri değişebilir ve AgNP konsantrasyonu, maruz kalma süresi ve ilgili spesifik bitki türleri dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olabilir ve bulgular bu bağlamda deneysel koşullara ve çalışılan biyolojik sistemlere göre farklılık gösterebilir.

Bazı çalışmalar AgNP'lerin bitkilerde terpenoidler de dahil olmak üzere ikincil metabolit üretimini etkileyebileceğini öne sürmektedir (Maqbool ve ark., 2023, Solanki ve ark., 2023). AgNP uygulamaları bazı durumlarda ikincil metabolitlerin sentezinde artışla ilişkilendirilirken bazı durumlarda ise azalmaya yol açabilmektedir (Mahajan ve ark., 2022; Laha ve ark., 2023). Bu durum doza bağlıdır, yani AgNP'lerin farklı konsantrasyonları farklı etkiler ortaya çıkarabilir.

Bu bağlamda NP uygulamalarının terpenoid üretimi üzerindeki etkisini anlamak için bitki türlerini, kullanılan NP konsantrasyonunu, maruz kalma süresini ve analiz için kullanılan yöntemleri dikkate almak önemlidir (Nourozi ve ark., 2019). AgNP'lerin bitkilerin biyokimyasal yollarındaki varlığı ve etkisi karmaşıktır ve çeşitli sinyal mekanizmalarını içerebilir (Rasheed ve ark., 2002). Çalışmamızda Oleanolik asit dışında araştırılan diğer tüm terpenoidlerin hiçbir örnekte tespit edilememesinin ardında bu etmenlerin yer aldığı düşünülebilir.

Şekil 4.5'te sunulan kromotogram, 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasına ait ve özellikle Oleanolik asit, 1-Campesterol-TMS, 2-Stigmasterol-TMS ve 3-β-sitosterol-TMS bileşenlerini içermektedir. Bu bileşenlerin bitki ekstrelerdeki değişen miktarları, AgNP uygulamasının oleanolik asit ve sterol profiline etki ettiğini göstermektedir.

Sonuç olarak, bu bulgular, AgNP'lerin bitki metabolizmasını özel bir şekilde modüle ederek terpenoid ve sterol üretimini etkileyebileceğini göstermektedir. Ancak, bu etkilerin AgNP konsantrasyonu ve uygulama süresine bağlı olarak değişebileceğini belirtmek önemlidir. Çalışmamızın genel sonuçları, AgNP'lerin *Salvia pseudeuphratica* Rech.f. süspansiyon kültürlerinde ikincil metabolitlerin üretimi üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu desteklemektedir, bu da literatürle uyumludur. Bu bağlamda ilk kez bu tez kapsamında tehlike altındaki lokal endemik bir tür olan *Salvia pseudeuphratica* bitkisinin tohumlarından itibaren biyoteknolojik yollarla (hücre süspansiyon kültürleri) üretilen aksenik eksplantlara ait ekstrelerin biyolojik aktiviteleri araştırılmış, farklı zaman ve konsantrasyonlarda süspansiyon kültürlerine uygulanan AgNP'lerinin biyolojik aktivite üzerinde önemli etkileri olduğu tespit edilmiştir. Bu aşamada, tez sonuçlarımız, AgNP miktarı ve uygulama zamanının özenle optimize edilmesinin, *Salvia pseudeuphratica* Rech.f. süspansiyon kültürlerinde terpenoid ve sterol içeriğini artırmak açısından önemli olduğunu vurgulamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma, bitki doku kültürlerinin tarıma dayalı endüstride katma değeri yüksek ürünlerin üretimine olanak tanıyan önemli bir ileri teknoloji uygulaması olduğunu bir kez daha ortaya koymaktadır. Bitki doku kültürleri, 30000'den fazla biyoaktif kimyasalın üretimini mümkün kılmasıyla tarım sektörü için büyük bir potansiyele sahiptir. Ancak, endüstriyel ölçekli üretimde hücrelerin mekanik dayanıklılığı önemli bir engel oluşturmaktadır. Bu zorluğun üstesinden gelmek için genetik uyarlamalarla mekanik dayanıklılığı artırılmış hücre kültürlerinin geliştirilmesi, üretim maliyetlerini düşürebilir.

Özellikle, bitki doku kültürlerinin mikroorganizma kültürlerinden daha hassas olması nedeniyle fermentör tasarımında önemli hassasiyetlerin göz önüne alınması gerekmektedir. Bu alandaki gelecekteki çalışmalar, oksijen transferi, mekanik karıştırma ve havalandırmada bitki doku kültürlerinin özel ihtiyaçlarını ele alan daha hassas fermentör tasarımlarını içermelidir. Laboratuvar ölçeğinde elde edilen başarıların endüstriyel ölçeğe taşınması, büyük çaplı üretim için uygun yöntemlerin geliştirilmesini gerektirmektedir. Bu bağlamda, bitki doku kültürlerinden elde edilen biyoaktif kimyasalların hücre içinde üretildiği ancak kültürün üretim potansiyelini etkilemeden salgılanmasını sağlayacak yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir.

Bu çalışma, özellikle *S. pseudeuphratica* türünden izole edilen biyoaktif bileşiklerin farmakolojik aktivitelerini değerlendirerek, bitki biyoteknolojisinin ve koruma biyolojisinin önemli bir bileşeni olarak potansiyelini vurgulamaktadır. Endemik bir tür olan *S. pseudeuphratica*, doğal habitatlarının korunması açısından kritik bir öneme sahiptir. Bu nedenle, biyoteknolojik uygulamalarla bu türün korunmasına ve sürdürülebilir kullanımına yönelik daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, bu tez, *Salvia pseudeuphratica*'nın hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve nanopartikül uygulamalarının bitkinin biyoaktif bileşikleri üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi açısından önemli bir adımı temsil etmektedir. Bu elde edilen veriler, endemik türlerin korunması, biyoaktif bileşiklerin üretimi ve bitki biyoteknolojisinin geliştirilmesi konularında bilimsel ve uygulamalı çalışmalara ilham verebilir. Bu çalışma, biyoçeşitliliğin korunması ve değerli bitki kaynaklarının sürdürülebilir şekilde kullanılması açısından da önemli bir katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

- Aasim, M., Sameeullah, M., Karataş, M., Bakirci, S., Bakhsh, A., & Akhtar, M. S. (2019). An insight into biotechnological approaches used for the improvement of secondary metabolites from the medicinal aquatic plant, water hyssop (*Bacopa monnieri* L.). In M. Akhtar & M. Swamy (Eds.), *Natural bio-active compounds* (pp. 123–152). Singapore: Springer.
- Abdollahi-Ghehi, H., Sonboli, A., Ebrahimi, S.N., Esmaeili, M.A., & Mirjalili, M.H. (2019). Triterpenic Acid Content and Cytotoxicity of Some *Salvia* Species From Iran. *Natural Product Communications*, 14(5).
- Abu-Darwish M.S., Cabral C., Ferreira I.V., Gonçalves M.J., Cavaleiro C., Cruz M.T., Al-bdour T.H., Salgueiro L. (2013). Essential Oil of Common Sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: Assessment of Safety in Mammalian Cells and Its Antifungal and Anti-Inflammatory Potential. *Biomed Res Int*, 2013, 538940.
- Afonso, A.F., Pereira, O.R., Cardoso, S.M. 2021. “*Salvia* Species as Nutraceuticals: Focus on Antioxidant, Antidiabetic and Anti-Obesity Properties”, *Appl. Sci.*, 11, 9365.
- Ahmad, M.A., Javed, R., Adeel, M., Rizwan, M., Ao, Q., & Yang, Y. (2020). Engineered ZnO and CuO Nanoparticles Ameliorate Morphological and Biochemical Response in Tissue Culture Regenerants of Candyleaf (*Stevia rebaudiana*). *Molecules*, 25(6), 1356.
- Akgül, H., Korkmaz, N., Dayangaç, A., & Sevindik, M. (2020). Antioxidant Potential of Endemic *Salvia absconditiflora*. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 8(10), 2222-2224.
- Akram, M., Syed, A.S., Kim, K.A., Lee, J.S., Chang, S.Y., Kim, C.Y., & Bae, O.N. (2015). Heme oxygenase 1-mediated novel anti-inflammatory activities of *Salvia plebeia* and its active components. *J Ethnopharmacol*, 174, 322–330.
- Ali, A., Sher Mohammad, S., Khan, M.A., Raja, N.I., Arif, M., Kamil, A., & Mashwani, Z.U.R. (2019). Silver nanoparticles elicited *in vitro* callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol*, 47(1), 715–724.
- Al-Oubaidi, H.K.M., & Muhammad-Ameen, A.S. (2014). The effect of (AgNO₃) NPs on increasing of secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. *in vitro*. *Int. J. Pharm. Ther.*, 5(4), 267–272.
- Anjum, S., Anjum, I., Hano, C., & Kousar, S. (2019). Advances in nanomaterials as novel elicitors of pharmacologically active plant specialized metabolites: Current status and future outlooks. *RSC Advances*, 9, 40404–40423.

- Anonim. (2020). Adaçayı fizibilite raporu ve yatırımcı rehberi. Retrieved from <https://www.tarimorman.gov.tr/SGB/TARYAT/Belgeler/Projeler/Ada%C3%A7ayı+Fizibilite+Raporu+ve+Yatirimci+Rehberi.pdf>
- Anwar, S., & Mohamed, H.I. (2022). Callus Induction, Proliferation, Enhanced Secondary Metabolites Production and Antioxidants Activity of *Salvia moorcroftiana* L. as Influenced by Combinations of Auxin, Cytokinin and Melatonin. Brazilian Archives of Biology and Technology, 65, e22210200.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S.E. (2004). Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamin C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine. J Agric Food Chem., 52, 7970-7981.
- Arıkat, N.A., Jawad, F.M., Karam, N.S., & Shibli, R.A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Scientia Horticulturae, 100, 193-202.
- Aygün Tuncay, E. (2019). *Salvia pseudeuphratica* bitkisinin sekonder metabolitlerinin saflaştırılması, antioksidan ve antialzheimer aktivitelerinin belirlenmesi ve LCMS/MS ve GC-MS ile kimyasal içeriklerinin incelenmesi (Yüksek lisans tezi). Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Diyarbakır.
- Babaoğlu, M., Gürel, E., & Özcan, S. (2001). Bitki biyoteknolojisi: Doku kültürü ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları. (Tak No: 975-6652-03-9, 374 s.).
- Baer-Dubowska, W., Narożna, M., & Krajka-Kuźniak, V. (2021). Anti-Cancer Potential of Synthetic Oleanolic Acid Derivatives and Their Conjugates with NSAIDs. Molecules, 26(16), 4957.
- Bano, A.S., Khattak, A.M., Basit, A., Alam, M., Shah, S.T., Ahmad, N., Gilani, S.A. Ullah, & Anwar, S. (2022). Callus Induction, Proliferation, Enhanced Secondary Metabolites Production and Antioxidants Activity of *Salvia moorcroftiana* L. as Influenced by Combinations of Auxin, Cytokinin and Melatonin. Brazilian Archives of Biology and Technology, 65, e22210200.
- Bapat, V. A., Kavi Kishor, P. B., Jalaja, N., Jain, S. M., & Penna, S. (2023). Plant Cell Cultures: Biofactories for the Production of Bioactive Compounds. Agronomy, 13(3), 858. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030858>
- Bayan, Y., Genç, N. 2016. “*Salvia verticillata* subsp. amasiaca’nın Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Kapasitesinin Belirlenmesi.” Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi, 5 (2), 158-166 . DOI: 10.17100/nevbiltek.284739.
- Baydar, H. (2013). Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi (Geniştirilmiş 4. Baskı). Süleyman Demirel Üniversitesi, Yayın No: 51.

- Baydar, N. G., & Baydar, H. (2013). Phenolic compounds, antiradical activity and antioxidant capacity of oil-bearing rose (*Rosa damascena* Mill.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 41, 375-380.
- Bayraktar, Ö., Öztürk, G., & Arslan, D. (2017). Türkiye'de Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Üretimi ve Pazarlamasındaki Gelişmelerin Değerlendirilmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 26, 216-229.
- Becker, H. (1970). Untersuchungen zur Frage der Bildung flüchtiger Stoffwechselprodukte in Callus kulturen. *Biochem Physiol Pflanz*, 161, 425-441.
- Bennett, S., & Thomas, A.J. (2014). Depression and dementia: cause, consequence or coincidence? *Maturitas*, 79(2), 184-190.
- Bhat, P., & Bhat, A. (2016). Silver nanoparticles for the enhancement of accumulation of capsaicin in suspension culture of *Capsicum* sp. *J. Exp. Sci.*, 7(2), 1-6.
- Bhatia, S., & Dahiya, R. (2015). Chapter 4 - Concepts and Techniques of Plant Tissue Culture Science. In S. Bhatia, K. Sharma, R. Dahiya, & T. Bera (Eds.), *Modern Applications of Plant Biotechnology in Pharmaceutical Sciences* (ss. 121-156). Academic Press. ISBN 9780128022214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12802221-4.00004-2>.
- Birtic, S., Dussort, P., Pierre, F.X., & Bily, A.C. Roller, M. (2015). Carnosic acid. *Phytochemistry*, 115, 9-19.
- Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181, 1199-1200.
- Bonaccini, L., Karioti, A., Bergonzi, M.C., & Bilia, A.R. (2015). Effects of *Salvia miltiorrhiza* on CNS neuronal injury and degeneration: a plausible complementary role of tanshinones and depsides. *Planta Med.*, 81(12-13), 1003-16.
- Bonesi, M., Loizzo, M.R., Acquaviva, R., Malfa, G.A., Aiello, F., Tundis, R. 2017. "Antiinflammatory and Antioxidant Agents from Salvia Genus (Lamiaceae): An Assessment of the Current State of Knowledge." *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem.* 16(2):70-86.
- Bong, F.J.; Chear, N.J.Y.; Ramanathan, S.; Mohana-Kumaran, N.; Subramaniam, S.; Chew, B.L. The development of callus and cell suspension cultures of Sabah Snake Grass (*Clinacanthus nutans*) for the production of flavonoids and phenolics. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 2021, 33, 101977.
- Braida, D., Capurro, V., Zani, A., Rubino, T., Vigano, D., Parolaro, D., & Sala, M. (2009). Potential anxiolytic- and antidepressant-like effects of salvinorin A,

- the main active ingredient of *Salvia divinorum*, in rodents. *Br J Pharmacol.*, 157(5), 844–853.
- Chang, C.C., Chang, Y.C., Hu, W.L., & Hung, Y.C. (2016). Oxidative stress and *Salvia miltiorrhiza* in aging-associated cardiovascular diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 4797102.
- Chen, H., & Chen, F. (2000). Effect of yeast elicitor on the secondary metabolism of Titransformed *Salvia miltiorrhiza* cell suspension cultures. *Plant Cell Rep*, 19, 710–717.
- Chen, H., Chen, F., Chiu, F.C.K., & Lo, C.M.Y. (2001). The effect of yeast elicitor on the growth and secondary metabolism of hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Enzym Microb Technol*, 28, 100-105.
- Chung, I.M., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2018a). Effect of silver nanoparticles on phenolic compounds production and biological activities in hairy root cultures of *Cucumis anguria*. *Acta Biologica Hungarica*, 69(1), 97-109.
- Chung, I.M., Rekha, K., Rajakumar, G., & Muthu Thiruvengadam, M. (2018b). Elicitation of silver nanoparticles enhanced the secondary metabolites and pharmacological activities in cell suspension cultures of bitter melon. *3 Biotech*, 8(10), 412.
- Coelho, N.; Gonçalves, S.; Romano, A. Endemic Plant Species Conservation: Biotechnological Approaches. *Plants* 2020, 9, 345. <https://doi.org/10.3390/plants9030345>
- Colovic, M.B., Krstic, D.Z., & Lazarevic-Pasti, T.D. (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr Neuropharmacol*, 11(3), 315–335.
- Coşge Şenkal, B., İpek, A., Cesur, C., Doğan, H., Yaman, C., Uskutoğlu, T., İpek, G. 2016. “Yozgat florasına kayıtlı ada çayı (*Salvia*) taksonlarının bitkisel özellikleri ve tıbbi önemi.” I. Uluslararası Bozok Sempozyumu 05 - 07 Mayıs 2016, Bozok Üniversitesi, Yozgat, IV. Cilt Sayfa 85-96.
- Çalışkan, T., Hatipoğlu, R., & Kırıcı, S. (2019). Sekonder bitki metabolitlerinin *in vitro* koşullarda üretimi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 7(7), 971-980.
- D’Amelia, V., Ruggiero, A., Tranchida-Lombardo, V., Leone, A., Tucci, M., & Docimo, T. (2017). Biosynthesis of *Salvia* Specialized Metabolites and Biotechnological Approaches to Increase Their Production. In: Georgiev, V., Pavlov, A. (eds) *Salvia Biotechnology*. Springer, Cham.
- Demain A. L. ve Vaishnav, P. 2011. Natural products for cancer chemotherapy, *Microb. Biotechnol.*, 4, 687–699.

- Doğan, M.S., Pehlivan, G., Akaydın, E., Bağcı, İ., & Uysal Doğan, H.M. Türkiye’de Yayılış Gösteren *Salvia* L. (Labiatae) Cinsinin Taksonomik Revizyonu. Tübitak Proje No: 104 T 450, (2008).
- Drew, B.T., González-Gallegos, J.G., Xiang, C.L., Kriebel, R., Drummond, C.P., Walked, J.B., Sytsma, K.J. 2017. *Salvia* united: “The greatest good for the greatest number.” *Taxon* 66: 133-145.
- Duhan, J.S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., & Nehra, K., Duhan, S. (2017). Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports*, 15, 11–23.
- Đurović, S., Micić, D., Pezo, L., Radić, D., Bazarnova, J.G., Smyatskaya, Y.A., Blagojević, S. 2022. “The effect of various extraction techniques on the quality of sage (*Salvia officinalis* L.) essential oil, expressed by chemical composition, thermal properties and biological activity”, *Food Chemistry: X*, 13, 100213.
- Elena, T.M., Camen, D., Moatăr, M., Petolescu, C., Boldea, M., & Iordanescu, O., Sala, F. (2019). Research regarding the influence of the preparing methods on seed germination on *Salvia officinalis*. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 23(2), 53-57.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V., & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95.
- Elmas, S. (2021). Türkiye’de Adaçayı Yetiştiriciliği ve Ticari Önemi. *Uluslararası Doğu Anadolu Fen Mühendislik ve Tasarım Dergisi*, 3(1), 298-332.
- Emre, I., Kürşat, M., Kirbag, S., Erecevit, P., Emre, M.Y., Yılmaz, O., Civelek, S. 2021. “The Antioxidant and Antimicrobial Capacities of Phenolic Profiles of Some *Salvia* L. Seeds Grown in Turkey”, *Int. J. Sec. Metabolite*, 8, 20-30.
- Eray Vuran, N., & Türker, M. (2021). Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Miktarını Arttırmaya Yönelik Uygulamalar. *International Journal of Advances in Engineering and Pure Sciences*, 33(3), 487-498.
<https://doi.org/10.7240/jeps.900129>
- Erdem, F. (2013). *Sideritis vulcanica* Hub. - Mor. (LAMIACEAE) Türünün (endemik) taksonomik yönden incelenmesi [Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü]. Sayfa 74.
- Ertaş, A., Topçu, G., Kandemir, S.İ., Kolak, U. ‘‘Temel, H., Yılmaz, M. A., Yener, İ.” 2018. “Bazı *Salvia* (Ada Çayı) Türlerinin HPLC-IT-TOF-MS ile Taranması, Sekonder Metabolitlerinin Saflaştırılması ve Antikanser Özelliklerinin Belirlenmesi” (KBAG- Project No: 114Z801-TUBITAK).

- Ezema CA, Ezeorba TPC, Aguchem RN, Okagu IU 2022. Therapeutic benefits of *Salvia* species: A focus on cancer and viral infection, *Heliyon* 8 e08763
- Facchini, P.J. (2001). Alkaloids biosynthesis in plants: Biochemistry, cell biology, molecular regulation, and metabolic engineering applications. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 59, 29–66.
- Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., & Ali, M. (2016). Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with silver and gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L. *J. Appl. Biochem. Biotechnol.*, 180(6), 1076–1092.
- Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, M., Shujait Ali, S., Khan, A., & Wei, D.Q. (2019). Sustainable production of biomass and industrially important secondary metabolites in cell cultures of selfheal (*Prunella vulgaris* L.) elicited by silver and gold nanoparticles. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 2553–2561.
- Feng, Y., You, Z., Yan, S., He, G., Chen, Y., Gou, X., & Peng, C. (2012). Antidepressant-like effects of Salvianolic acid B in the mouse forced swim and tail suspension tests. *Life Sci.*, 90(25–26), 1010–1014.
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D., Pineros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, 149, 778–789.
- Fidan, H.S., 2019. “Güneydoğu Anadolu Bölgesinde yetişen 6 endemik *Salvia* (ada çayı) türünün ve elde edilen bazı sekonder metabolitlerin sitotoksik etkilerinin ve gen düzeyinde antikanser aktivitelerinin incelenmesi.” Yayınlanmamış yüksek lisans tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Figueiredo, C.C.M., Gomes, A.d.C., Zibordi, L.C., Granero, F.O., Ximenes, V.F., Pavan, N.M., Silva, L.P., Sonvesso, C.d.S.M., Job, A.E., Nicolau-Junior, N., & da Silva, R.M.G. (2023). Biosynthesis of silver nanoparticles of *Tribulus terrestris* food supplement and evaluated antioxidant activity and collagenase, elastase and tyrosinase enzyme inhibition: *In vitro* and in silico approaches. *Food and Bioproducts Processing*, 138, 150–161. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.01.010>
- Fraceto, L.F., Grillo, R., Medeiros, G.A., Scognamiglio, V., Rea, G., & Bartolucci, C. (2016). Nanotechnology in agriculture: Which innovation potential does it have? *Frontiers in Environmental Science*, 4, 20.
- García-Granados R, Lerma-Escalera JA, Morones-Ramírez JR (2019) Metabolic engineering and synthetic biology: Synergies, future, and challenges. *Front Bioeng Biotechnol* 7:36. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00036>
- Ge, X., & Wu, J. (2005a). Induction and potentiation of diterpenoid tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots by β -aminobutyric acid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 68, 183–188.

- Ge, X., & Wu, J. (2005b). Tanshinone production and isoprenoid pathways in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots induced by Ag⁺ and yeast elicitor. *Plant Sci*, 168, 487–491.
- Ghanbar, T., Hosseini, B., & Jabbarzadeh, Z. (2012). Improving *Salvia sclarea* L. seed germination under *in vitro* condition. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2(S), 1051-1058.
- Ghanbar, T., Hosseini, B., Jabbarzadeh, Z., Farokhzad, A., & Sharafi, A. (2016). Highfrequency *in vitro* direct shoots regeneration from axillary nodal and shoot tip explants of clarysage (*Salvia sclarea* L.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(1), 73-78.
- Golkar, P., Moradi, M., & Garousi, G.A. (2018). Elicitation of Stevia glycosides using salicylic acid and silver nanoparticles under callus culture. *Sugar Tech.*, 1–9.
- Gonçalves, S., Mansinhos, I., Rodríguez-Solana, R., Pérez-Santín, E., Coelho, N., & Romano, A. (2019). Elicitation improves rosmarinic acid content and antioxidant activity in *Thymus lotocephalus* shoot cultures. *Industrial Crops and Products*, 137, 214-220.
- Gökdoğan, Y., Etik, E., & Bürün, B. (2022). *Salvia fruticosa* Mill.'da İn Vitro Tohum Kültürü ile Aseptik Fide Üretimi. *Ordu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 12(1), 11–19.
- Gross, M., Nesher, T., Tikhonov, T., Raz, O., & Pinhasov, A. (2013). Chronic food administration of *Salvia sclarea* oil reduces animals' anxious and dominant behavior. *Journal of Medicinal Food*, 16(3), 216–222.
- Grzegorzczak, I., Bilichowski, I., Mikiciuk-Olasik, E., & Wysokińska, H. (2005). *In vitro* cultures of *Salvia officinalis* as a source of antioxidant compounds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74(1), 17–21. doi:10.5586/asbp.2005.003.
- Grzegorzczak, I., Krolicka, A., & Wysokinska, H. (2006). Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. *Z Naturforsch C*, 61, 351–356.
- Gupta, S.K., Liu, R., Liaw, S., & Chan, H. (2011). Enhanced tanshinone production in hairy roots of '*Salvia miltiorrhiza* Bunge' under the influence of plant growth regulators in liquid culture. *Bot Stud*, 52, 435–443.
- Güven, A., & Gürsul, İ. (2014). Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Sentezi. *Gıda*, 39(5), 299–306.
- Haas, C., Hengelhaupt, K.C., Kümmritz, S., & Bley, T. (2014). Steingroewer J. *Salvia* suspension cultures as production systems for oleanolic and ursolic acid. *Acta Physiol Plant*, 36, 2137–2147.

- Hao, G., Ji, H., Li, Y., Renjiu, S., Wang, J., Feng, L., & Huang, L. (2012). Exogenous ABA and polyamines enhanced salvianolic acids contents in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba. *Plant Omics J*, 5, 446–452.
- Hasan, S.A. (2015). Review on nanoparticles: Their synthesis and types. *Res. J. Recent Sci.*, 2277, 2502.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.H.M., Zulficar, F., Raza, A., Mohsin, S.M., Mahmud, J.A., & Fotopoulos, V. (2020). Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, 9(8), 681.
- Hatami, M., Naghdi Badi, H., & Ghorbanpour, M. (2019). Nano-elicitation of secondary pharmaceutical metabolites in plant cells: A review. *Journal of Medicinal Plants*, 18, 6–36.
- Hedge, I. C. (1982). *Salvia forskahlei* L. In P. H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* (Vol. 7, pp. 451–452). Edinburgh University Press.
- Hegazi, G.A., Ibrahim, W.M., Hendawy, M.H., Salem, H.M., & Ghareb, H.E. (2020). Improving α -Tocopherol Accumulation in *Argania Spinosa* Suspension Cultures by Precursor and Nanoparticles Feeding. *Plant Archives*, 20(Suppl. 1), 2431–2437.
- Herrera-Ruiz, M., Garcia-Beltran, Y., Mora, S., Diaz-Veliz, G., Viana, G.S., & Tortoriello, J. (2006). Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(1), 53–58.
- Hippolyte, I., Marin, B., Baccou, J.C., & Jonard, R. (1992). Growth and rosmarinic acid production in cell suspension of *Salvia officinalis* L. *Plant Cell Rep*, 11, 109–112.
- Hui, L., Guoping, Z., Guozheng, S., Songlin, R., & Qiaojuan, F. (2012). Callus induction and plant regeneration from mature seeds of *Salvia splendens*. *Int. J. Agric. Biol.*, 14, 445–449.
- Hussain, M.S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M.A., Ahmad, I.Z., & Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.*, 4(1), 10–20. doi:10.4103/0975-7406.92725. PMID: 22368394; PMCID: PMC3283951.
- Ioja-Boldura, O.M., Radu, F., Popescu, S., & Boroza, A. (2010). Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.). *Bulletin UASVM Horticulture*, 67(1), 308–313.
- Isah, T. (2019). Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. *Biol Res*, 52, 39.

- İpek, A. ve Gürbüz, B. 2010. Türkiye Florasında Bulunan *Salvia* Türleri ve Tehlike Durumları, Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi, 19 (1- 2): 30-35.
- İpek, H.O. (2018). Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryum'undaki (Ank) *Salvia* (Lamiaceae) Cinsinin Revizyonu. Yüksek Lisans Tezi.
- J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram, D. Parkin, M. Pineros, A. Znaor, F. Bray, ~ Cancer statistics for the year 2020: an overview, Int. J. Cancer 149 (2021) 778– 789.
- Jamshidi, M., & Ghanati, F. (2017). Taxanes content and cytotoxicity of hazel cells extract after elicitation with silver nanoparticles. Plant Physiol. Biochem., 110, 178–184.
- Javaid, M.M., Florentine, S., Ali, H.H., & Weller, S. (2018). Effect of environmental factors on the germination and emergence of *Salvia verbenaca* L. abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. Int. J. Biosci., 5(1), 74–81.
- Rahmawati, M., Mahfud, C., Risuleo, G., & Jadid, N. (2022). Nanotechnology in Plant Metabolite Improvement and in Animal Welfare. Appl. Sci., 12, 838.
- Ramulifho, E., Goche, T., Van As, J., Tsilo, T.J., Chivasa, S., & Ngara, R. (2019). Establishment and Characterization of Callus and Cell Suspension Cultures of Selected *Sorghum bicolor* (L.) Moench Varieties: A Resource for Gene Discovery in Plant Stress Biology. Agronomy, 9(5), 218.
- Rasheed, A., Li, H., Tahir, M.M., Mahmood, A., Nawaz, M., Shah, A.N., Aslam, M.T., Negm, S., Moustafa, M., & Hassan, M.U., & Wu, Z. (2022). The role of nanoparticles in plant biochemical, physiological, and molecular responses under drought stress: A review. Front. Plant Sci., 13:976179. doi: 10.3389/fpls.2022.976179
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med., 26, 1231-1237.
- Rivero-Montejo, S.D.J., Vargas-Hernandez, M., & Torres-Pacheco, I. (2021). Nanoparticles as Novel Elicitors to Improve Bioactive Compounds in Plants. Agriculture, 11, 134.
- Saito, K. (1993). Genetic engineering in tissue culture of medicinal plants. Plant Tissue Cult Lett, 10:8.
- Sallam, A., Mira, A., Ashour, A., & Shimizu, K. (2016). Acetylcholine esterase inhibitors and melanin synthesis inhibitors from *Salvia officinalis*. Phytomedicine, 23(10), 1005–11.

- Santos-Gomes, P.C., Seabra, M.R., Andrade, P.B., & Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, 162, 981-987.
- Schwager, J., Richard, N., Fowler, A., Seifert, N., & Raederstorff, D. (2016). Carnosol and related substances modulate chemokine and cytokine production in macrophages and chondrocytes. *Molecules*, 21(4), 465.
- Sculth, M.A., Paulli, A.R., Mazure, E.S., Moffitt, T.E., Hariri, A.R., & Strauman, T.J. (2016). The association between cognitive function and subsequent depression: A systematic review and meta-analysis. *Psychol Med.*, 14, 1-17.
- Secgin, Z., & Okumuş, A. (2022). Domates (*Lycopersicon esculentum* L.)’te sentetik tohum üretiminde aljinat oranlarının depolama zamanına etkisi. *Frontiers in Life Sciences and Related Technologies*, 3(1), 30-35.
<https://doi.org/10.51753/flsrt.1041120>
- Senol, F.S., Orhan, I.E., Erdem, S.A., Kartal, M., Sener, B., Kan, Y., Celep., F., Kahraman, A., & Dogan, M. (2011). Evaluation of cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of wild and cultivated samples of sage (*Salvia fruticosa*) by activity-guided fractionation. *J Med Food*, 14(11), 1476–83.
- Seol, G.H., Shim, H.S., Kim, P.J., Moon, H.K., Lee, K.H., Shim, I., Suh, S.H., & Min, S.S. (2010). Antidepressant-like effect of *Salvia sclarea* is explained by modulation of dopamine activities in rats. *J Ethnopharmacol*, 130(1), 187–90.
- Shi, M., Kwok, K.W., & Wu, J.Y. (2007). Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* Bunge (red or Chinese sage) hairy-root culture by hyperosmotic stress and yeast elicitor. *Biotechnol Appl Biochem*, 196, 191–196.
- Shimomura, K., Kitazawa, T., Okamura, N., & Yagi, A. (1991). Tanshinone production in adventitious roots and regenerates of *Salvia miltiorrhiza*. *J Nat Prod*, 54, 1583– 1587.
- Singh, O.S., Pant, N.C., Laishram, L., Tewari, M., Dhoundiyal, R., Joshi, K., & Pandey, C. (2018). Effect of CuO nanoparticles on polyphenols content and antioxidant activity in Ashwagandha (*Withania somnifera* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 3433–3439.
- Šinko, G., Vinković Vrček, I., Goessler, W., Leitinger, G., Dijanošić, A., & Miljanić, S. (2014). Alteration of cholinesterase activity as possible mechanism of silver nanoparticle toxicity. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(2), 1391–1400.
- Sita, G., Hrelia, P., Tarozzi, A., & Morroni, F. (2016). Isothiocyanates are promising compounds against oxidative stress, neuroinflammation and cell death that may benefit neurodegeneration in Parkinson’s Disease. *Int J Mol Sci*, 17(9).

- Skala, E., & Wysokińska, H. (2004). *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 40, 596-602.
- Slinkard, K., & Singleton, V.L. (1977). Total Phenol Analyses: Automation and Comparison With Manual Methods. *ACEV*, 28, 49-55.
- Solanki, S., Lakshmi, G.B.V.S., Dhiman, T., Gupta, S., Solanki, P.R., Kapoor, R., & Varma, A. (2023). Co-Application of Silver Nanoparticles and Symbiotic Fungus *Piriformospora indica* Improves Secondary Metabolite Production in Black Rice. *J Fungi (Basel)*, 9(2), 260.
- Solis-Ramos, L. Y., Carballo, L. M., & Valdez-Melara, M. (2013). Establishment of cell suspension cultures of two Costa Rican *Jatropha* species (Euphorbiaceae). *Revista de Biología Tropical*, 61(3), 1095-1107.
- Song, J.Y., Qi, J.J., Ren, C.L., Fu, J., & Zhang, Y.L. (2000). Dynamics of growth and total tanshinones accumulation in crown gall cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Pharm Sin*, 35, 929–931.
- Soundararajan, P., Sivanesan, I., Jo, E.H., & Jeong, B.R. (2013). Silicon promotes shoot proliferation and shoot growth of *Salvia splendens* under salt stress *in vitro*. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 54(4), 311-318. <https://doi.org/10.1007/s13580-013-0118-7>
- Sönmez, Ç., Gökçöl, A., Şimşek Soysal, A.Ö., Bayram, E., & Çelen, A.E. (2019). Research on Germination and Emergence Performance Enhancing Treatments on Sage (*Salvia* spp.) Species. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology*, 7(3), 504- 510.
- Spinoso-Castillo, J.L., Chavez-Santoscoy, R.A., Bogdanchikova, N., Pérez-Sato, J.A., Morales-Ramos, V., & Bello-Bello, J.J. (2017). Antimicrobial and hormetic effects of silver nanoparticles on *in vitro* regeneration of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a temporary immersion system. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. <https://doi.org/>
- Sulniute, V., Ragazinskiene, O., & Venskutonis, P.R. (2016). Comprehensive evaluation of antioxidant potential of 10 *Salvia* species using high pressure methods for the isolation of lipophilic and hydrophilic plant fractions. *Plant Foods Hum Nutr*, 71(1), 64–71.
- Sung, F., Ferlay, J., Siegel, R., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. 2021. “Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.” *CA: Cancer J. Clin.* 71 209-249.
- Takeda, H., Tsuji, M., Inazu, M., Egashira, T., & Matsumiya, T. (2002). Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. *Eur J Pharmacol*, 449(3), 261–7.

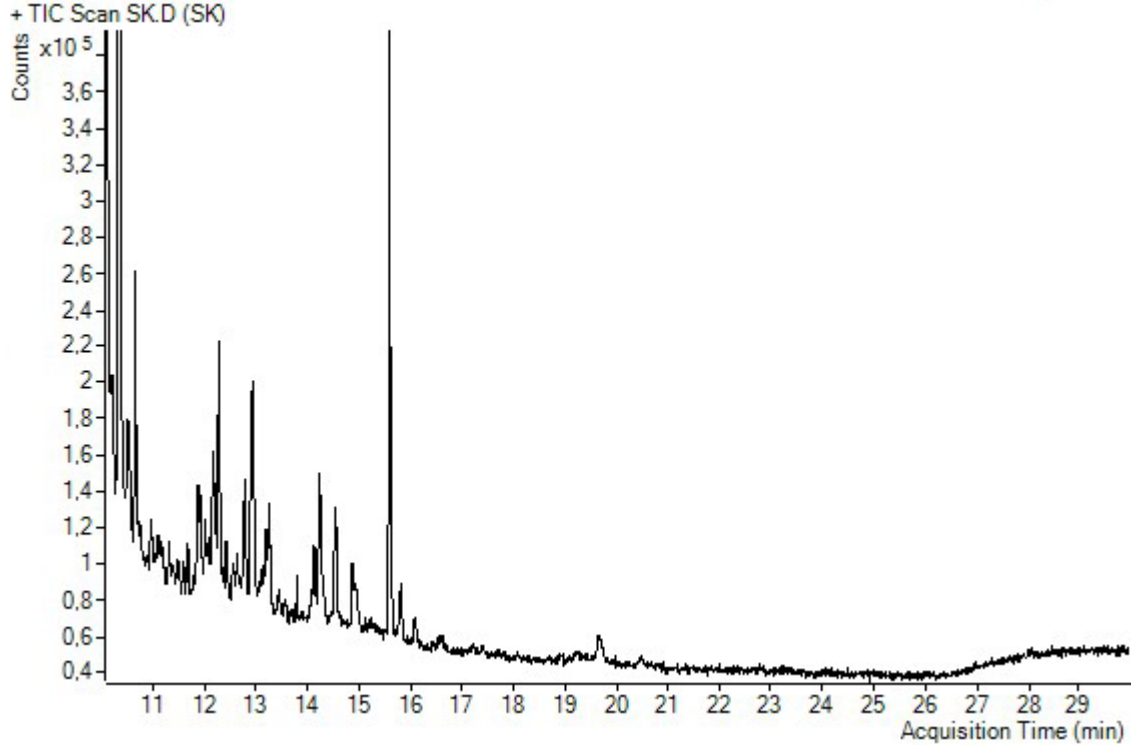
- Tassi, E., Giorgetti, L., Morelli, E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., & Barbafieri, M. (2017). Physiological and biochemical responses of sunflower (*Helianthus annuus* L.) exposed to nano-CeO₂ and excess boron: Modulation of boron phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 50–58.
- Temel, H.E., Demirci, B., Demirci, F., Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M., Başer, K.H.C. 2016. “Chemical characterization and anticholinesterase effects of essential oils derived from *Salvia* species.” *J Essent Oil Res* 2016, 28(4): 322-31.
- Tepe, B., & Sokmen A. (2007). Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* L. callus cultures. *Natural Product Research*, 21:13, 1133-1144.
- Thanos, C.A., & Doussi, M.A. (1995). Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of Crete. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43, 227-237.
- Thring, T.S.A., Hili, P., & Declan Naughton, D.P. (2009). Anti-collagenase, antielastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complement. Altern. Med.*, 9, 1-11.
- Tiambeng, D. (2015). A numerical taxonomic study on the genus *Salvia* L. (Lamiaceae) in Turkey (Master's thesis, Middle East Technical University).
- Topcu, Ş., & Çölgeçen, H. (2015). Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(2), 09-29. ISSN: 1308-0040, EISSN: 2146-0132.
- Tünay, Z., Varhan- Oral, E., Yener, İ., Fırat, M., Ertaş, E., & Temel, H. (2015). Van Gürpınar Bölgesindeki *Salvia kronenburgii* ve *Salvia xanthocheila* bitki türlerindeki arsenik, civa, kurşun, kadmiyum, selenyum miktarlarının ICP-MS ile tayini. XIV. Ulusal Spektroskopi Kongresi-Elazığ.
- Uyanık, M. (2017). Türkiye'de tehlike altındaki bazı endemik *Salvia* türlerinin *in vitro* çoğaltımı ve tarla şartlarına adaptasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı.
- Uysal, S., Zengin, G., Sinan, K.I., Ak, G., Ceylan, R., Mahomoodally, M.F., Uysal, A., Sadeer, N.B., Jekő, J., Cziáky, Z., Rodrigues, M.J., Yıldıztuğay, E., Elbasan, F., Custodio, L. 2021. “Chemical characterization, cytotoxic, antioxidant, antimicrobial, and enzyme inhibitory effects of different extracts from one sage (*Salvia ceratophylla* L.) from Turkey: open a new window on industrial purposes.” *RSC Adv.* 11(10):5295-5310.
- Vannini, C., Domingo, 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(6), e68752.
- Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R.G., Rico-Garcia, E., Ocampo-Velazquez, R.V., Avila-Juarez, L., & Torres-Pacheco, I.

- (2020). Nanoparticles as Potential Antivirals in Agriculture. *Agriculture*, 10(10), 444.
- Verdú-Navarro, F., Moreno-Cid, J. A., Weiss, J., & Egea-Cortines, M. (2023). The advent of plant cells in bioreactors. *Frontiers in plant science*, 14, 1310405. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1310405>
- Wang, J.W., & Wu, J.Y. (2010). Tanshinone biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* and production in plant tissue cultures. *Appl Microbiol Biotechnol*, 88, 437–449.
- Wang, J.Y., & Liu, D. (1987). Organogenesis of *Salvia miltiorrhiza*. *Plant Physiol Commun*, 6, 46.
- Webb, J.K., Banthorpe, D.V., & Watson, D.G. (1984). Monoterpene synthesis in shoots regenerated from callus cultures. *Phytochemistry*, 23, 903–904.
- Wesołowska, A., Jadczyk, P., Kulpa, D., & Przewodowski, W. (2019). Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analysis of essential oils from AgNPs and AuNPs elicited *Lavandula angustifolia* *in vitro* cultures. *Molecules*, E606.
- Wu, J.Y., Shi, M., Ng, J., & 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, 543–550.
- Wu, Q., Zhang, C., Yang, H., Sun, Y., Hu, J., & Zou, L. (2022). *In vitro* propagation via organogenesis and formation of globular bodies of *Salvia plebeia*: A valuable medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 58, 51–60.
- Xu, Q.Q., Xu, Y.J., Yang, C., Tang, Y., Li, L., Cai, H.B., Hou, B.N., Chen, H.F., Wang, Q., Shi, X.G., & Zhang, S.J. (2016). Sodium Tanshinone IIA sulfonate attenuates scopolamine-induced cognitive dysfunctions via improving cholinergic system. *Biomed Res Int*, 9852536.
- Yan, Q., Hu, Z., Xiang, R., & Wu, J. (2005). Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semi-continuous operation. *J Biotechnol*, 119, 416–424.
- Yari Khosroushahi, A., Valizadeh, M., Ghasempour, A., Khosrowshahli, M., Naghdibadi, H., Dadpour, M. R., et al. (2006). Improved Taxol production by combination of inducing factors in suspension cell culture of *Taxus baccata*. *Cell Biology International*, 30(3), 262-269.
- Yarizade, K., & Hosseini, R. (2015). Expression analysis of ADS, DBR2, ALDH1 and SQS genes in *Artemisia vulgaris* hairy root culture under nano cobalt and nano zinc elicitation. *Extension Journal of Applied Sciences*, 3(5), 69–76.

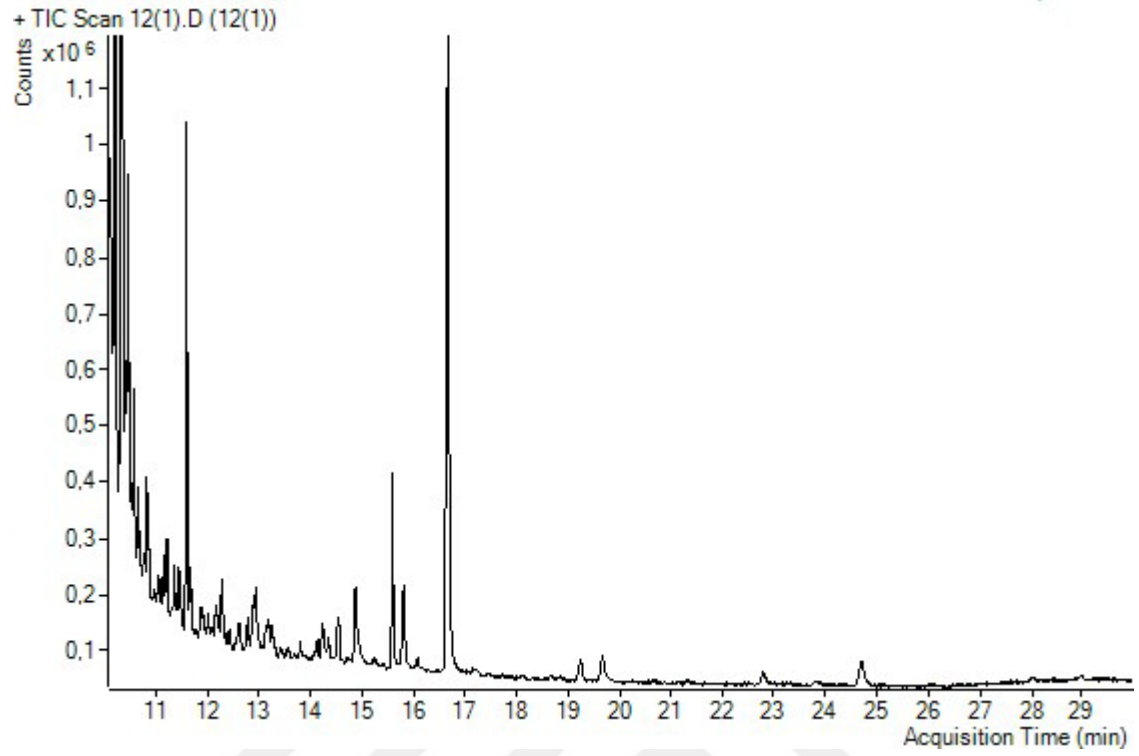
- Yel, O. (2021). Gümüş nanopartikül (AgNP) uygulamalarının *Pistacia lentiscus* L. sürgün kültürlerinde antioksidan ve antimikrobiyal aktivite üzerine etkileri. (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Batman.
- Zhang, B., Zheng, L.P., Yi, Li, W., & Wen Wang, J. (2013). Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO₂ core-shell nanoparticles. *Current Nanoscience*, 9(3), 363–370.
- Zhang, C., Yan, Q., Cheuk, W., & Wu, J. (2004). Enhancement of tanshinone production in *Salvia miltiorrhiza* hairy root culture by Ag⁺ elicitation and nutrient feeding. *Planta Med*, 70, 147–151.
- Zhao, J., Davis, L.C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv*, 23, 283–333.
- Zhao, J., Zhou, L., & Wu, J. (2010). Promotion of *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone production by polysaccharide—protein fractions of plant growthpromoting rhizobacterium *Bacillus cereus*. *Process Biochem*, 45, 1517–1522.
- Zhao, L. J., Zhou, G. L., & Wu, Y. J. (2010). Effects of biotic and abiotic elicitor on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Microbial Biotechnology*, 87, 137-144. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-24434>
- Zhi, B.H., & Alfermann, A.W. (1993). Diterpenoid production in hairy root cultures of *Salvia miltiorrhiza*. *Phytochemistry*, 32, 699–703.
- Zhou, J., Fang, L., Wang, X., Guo, L., & Huang, L. (2013). La Dramatically enhances the accumulation of tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Earth Sci Res J*, 2, 187–192.
- Zhou, M., Zhu, X., & Shao, J. (2011a). Production and metabolic engineering of bioactive substances in plant hairy root culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 90, 1229–1239.
- Zhou, Y., Li, W., Xu, L., & Chen, L. (2011b). In *Salvia miltiorrhiza*, phenolic acids possess protective properties against amyloid beta-induced cytotoxicity, and tanshinones act as acetylcholinesterase inhibitors. *Environ Toxicol Pharmacol*, 31(3), 443–452.
- Ziegler, J., & Facchini, P.J. (2008). Alkaloid biosynthesis: metabolism and trafficking. *Annu Rev Plant Biol*, 59, 735–769.

EKLER

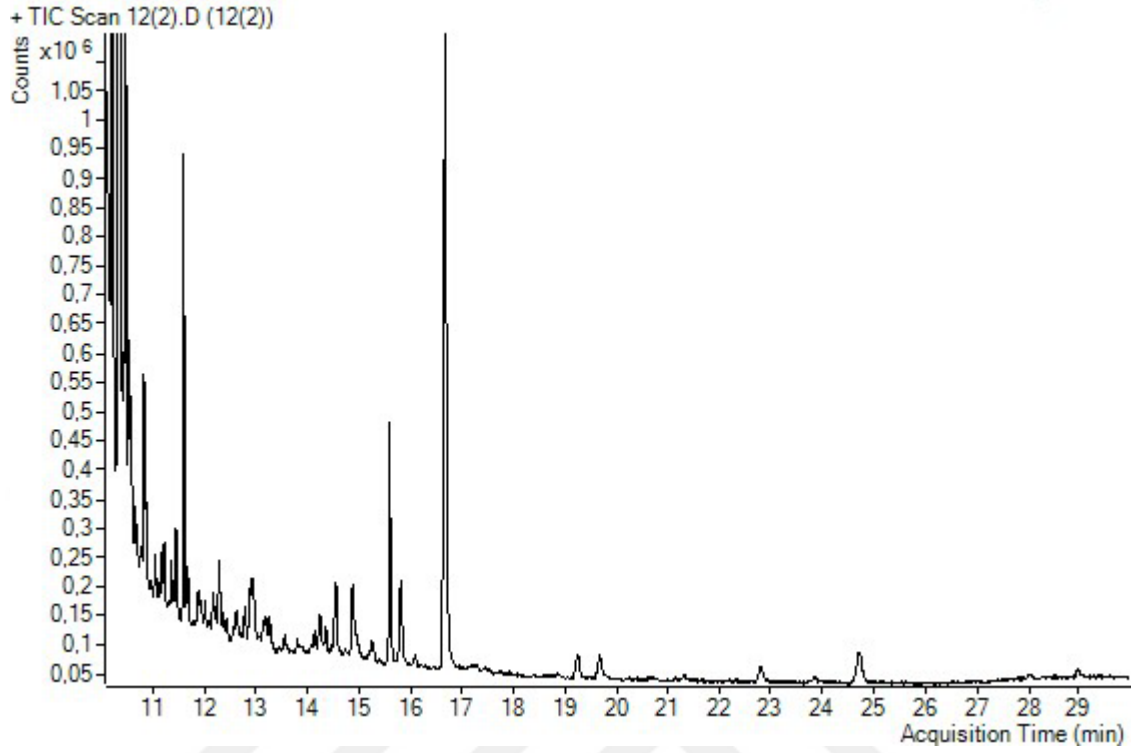
EK-1 Farklı AgNP uygulamalarına tabi tutulan süspansiyon kültürlerinde ait tüm kromatogramlar



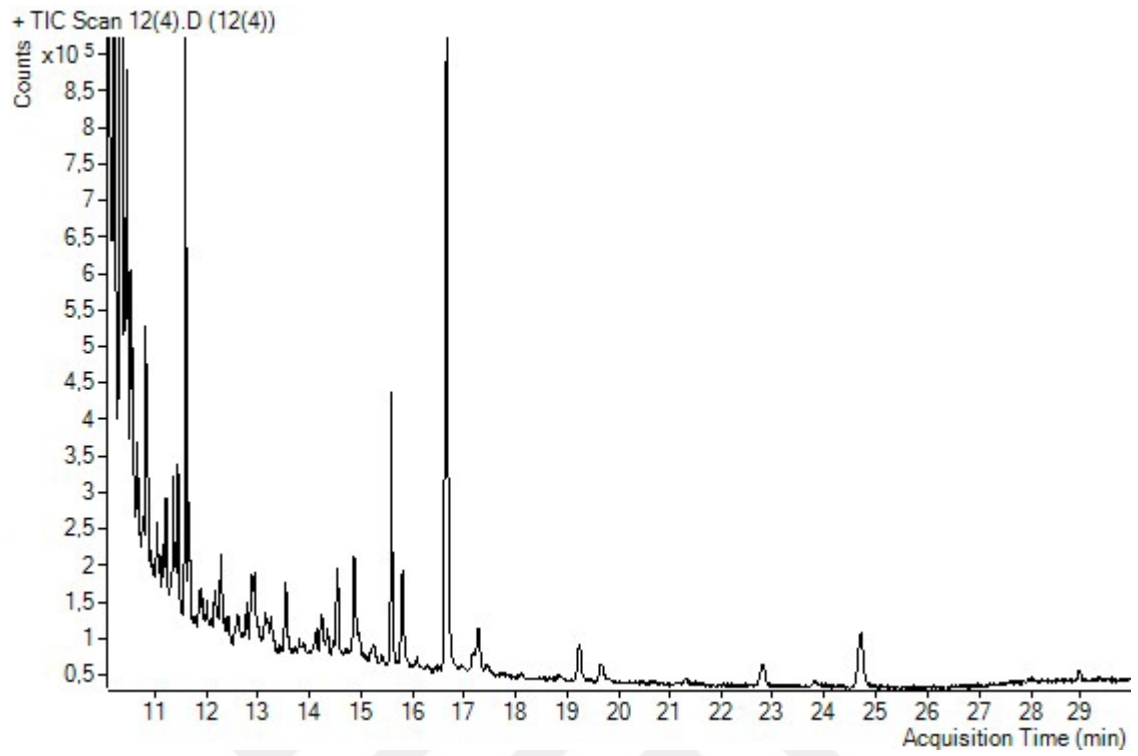
EK 2. 12 Saat 100 µg/ml AgNP uygulamasına ait kromatogram



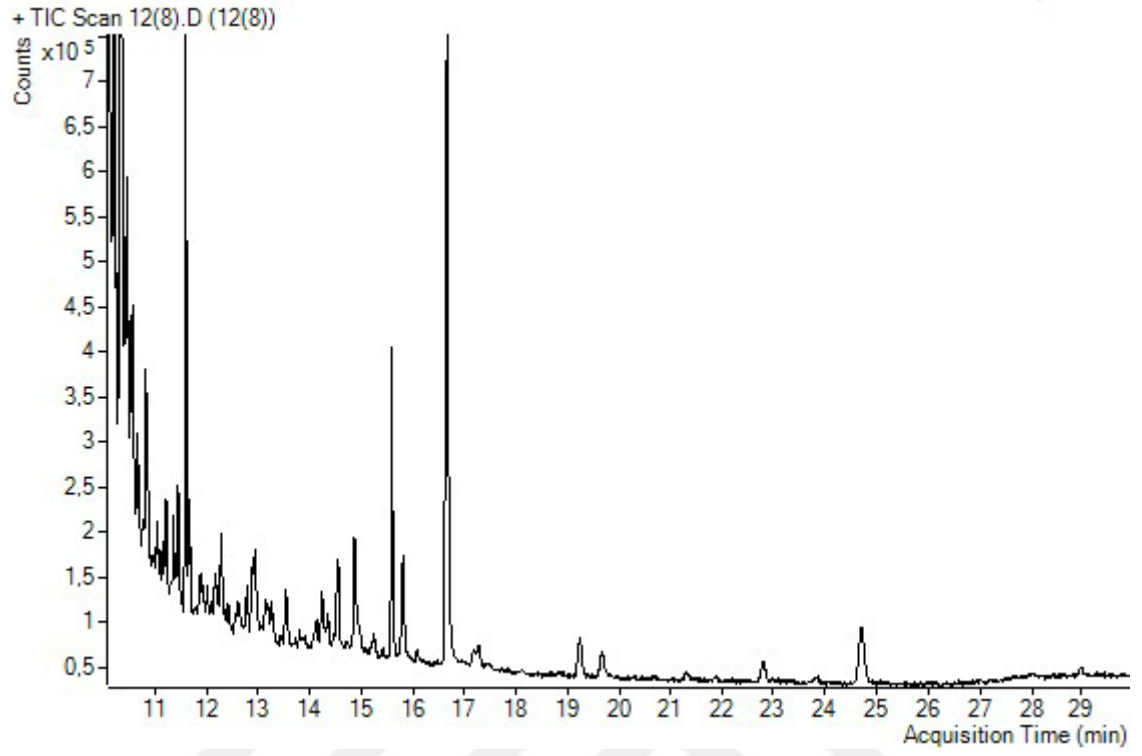
EK 3. 12 Saat 200 µg/ml AgNP uygulamasına ait kromatogram



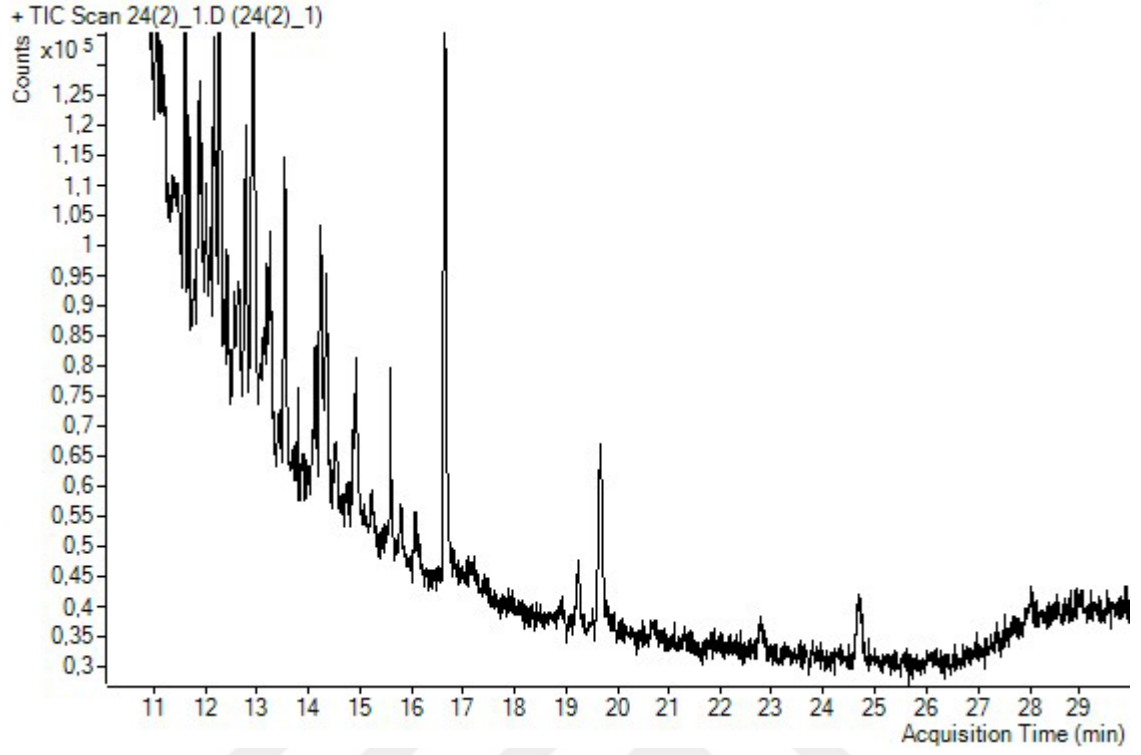
EK 4. 12 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamasına ait kromatogram



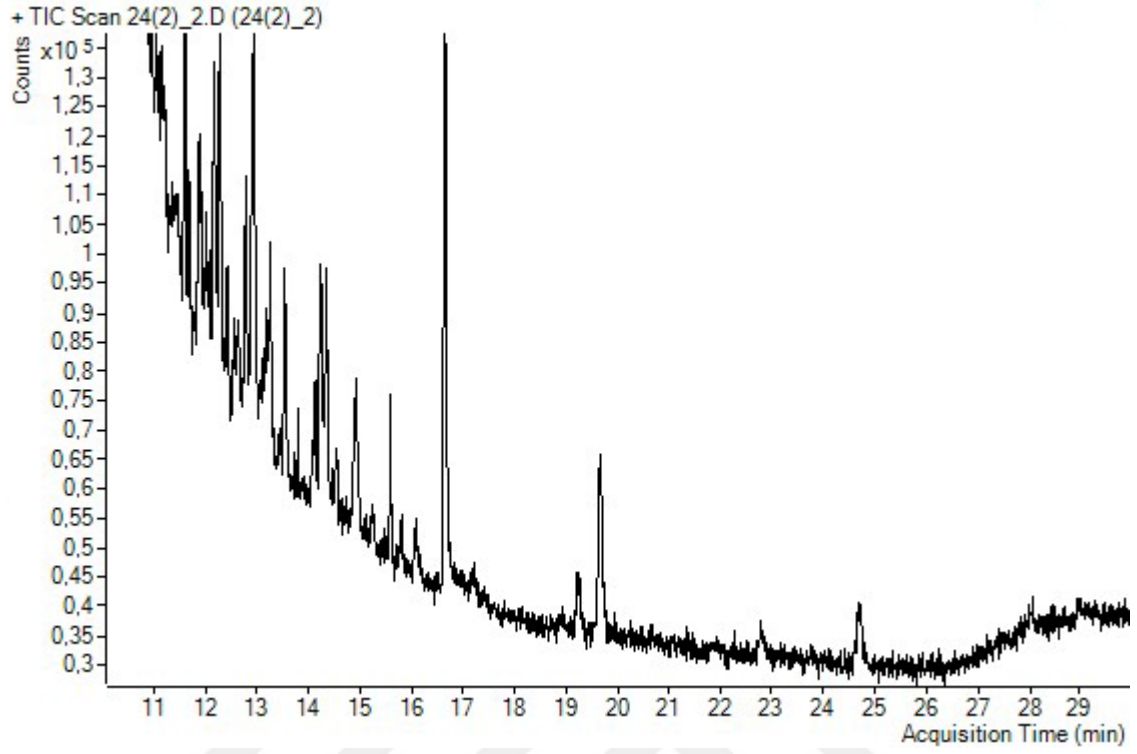
EK 5. 12 Saat 800 $\mu\text{g/ml}$ AgNP uygulamasına ait kromatogram



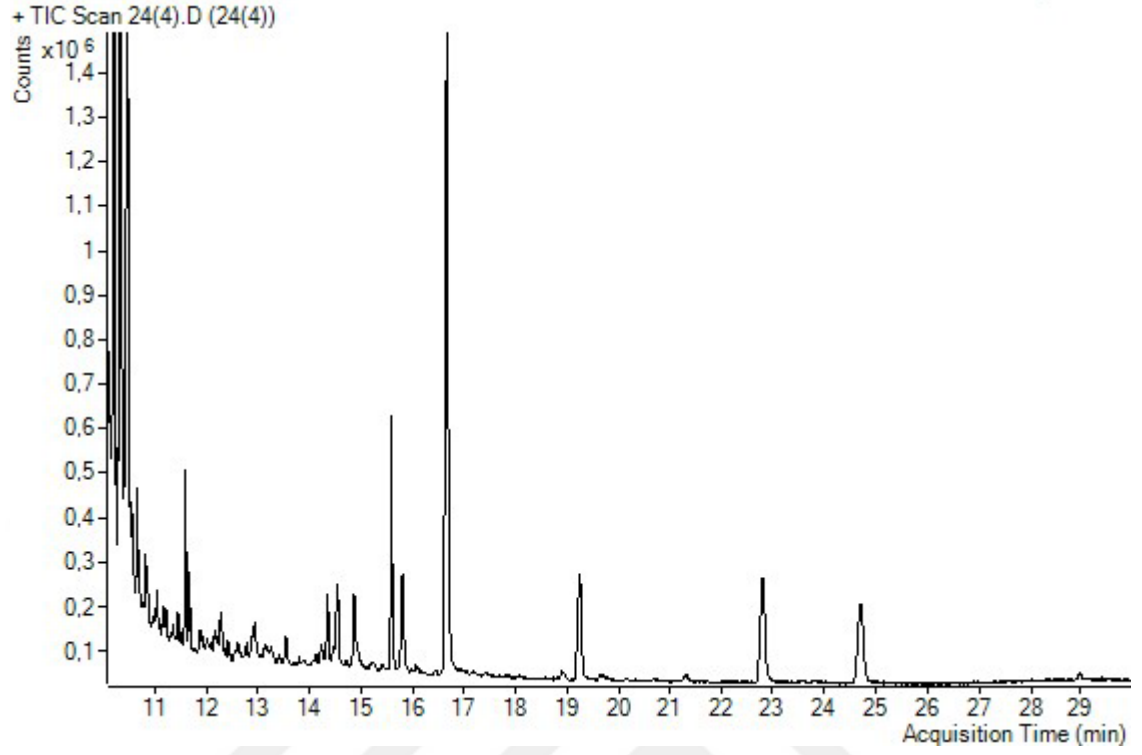
EK 6. 12 Saat 200 µg/ml AgNP uygulamalarına ait kromatogram



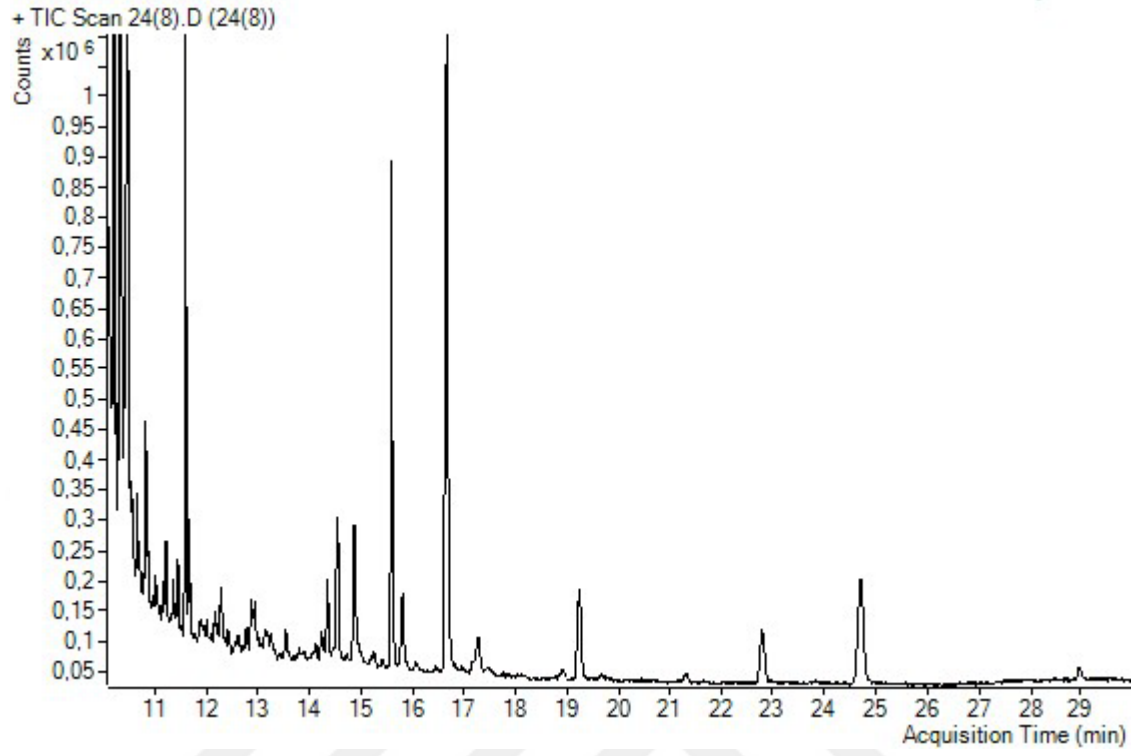
EK 7. 24 Saat 200 $\mu\text{g/ml}$ AgNP ve 24 saat 200 $\mu\text{g/ml}$ AgNP uygulamalarına ait kromatogram



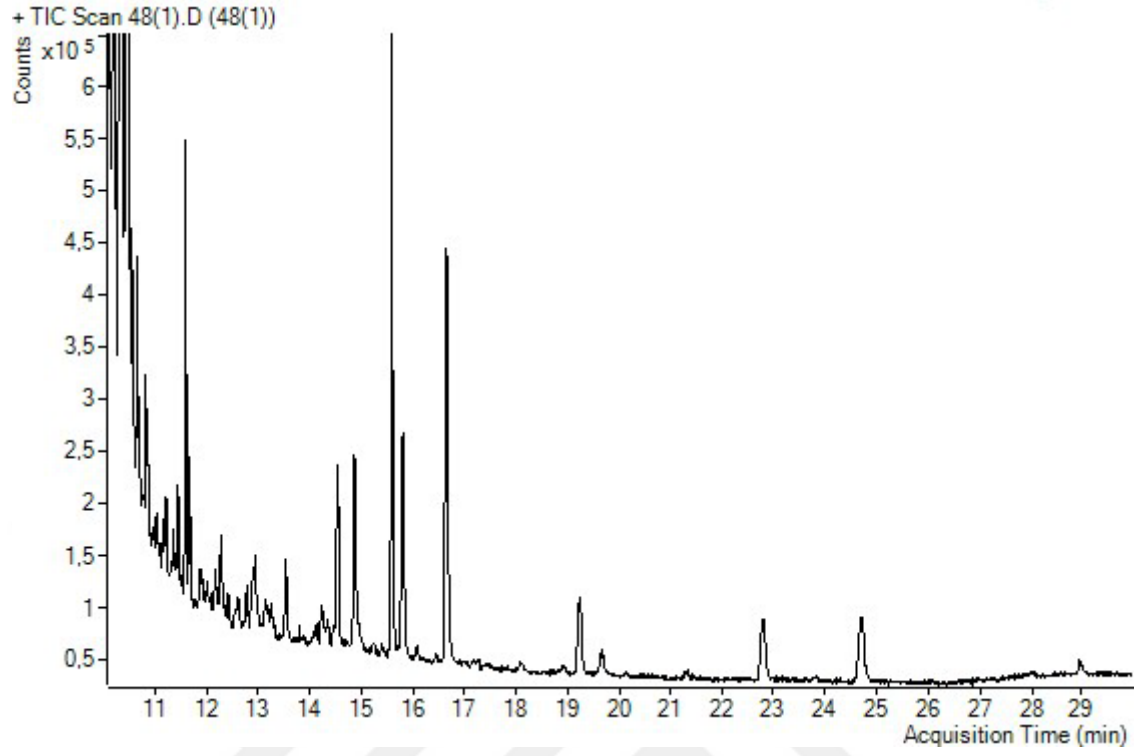
EK 8. 24 Saat 400 µg/ml AgNP uygulamalarına ait kromatogram



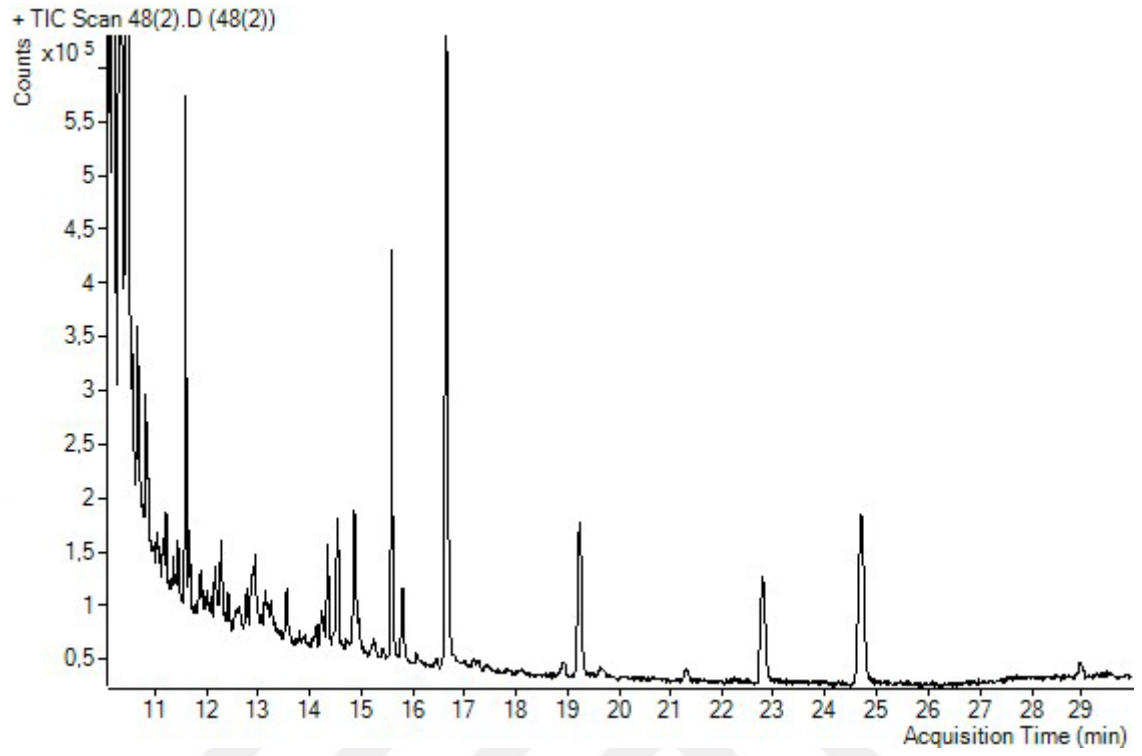
EK 9. 24 Saat 800 $\mu\text{g/ml}$ AgNP uygulamalarına ait kromatogram



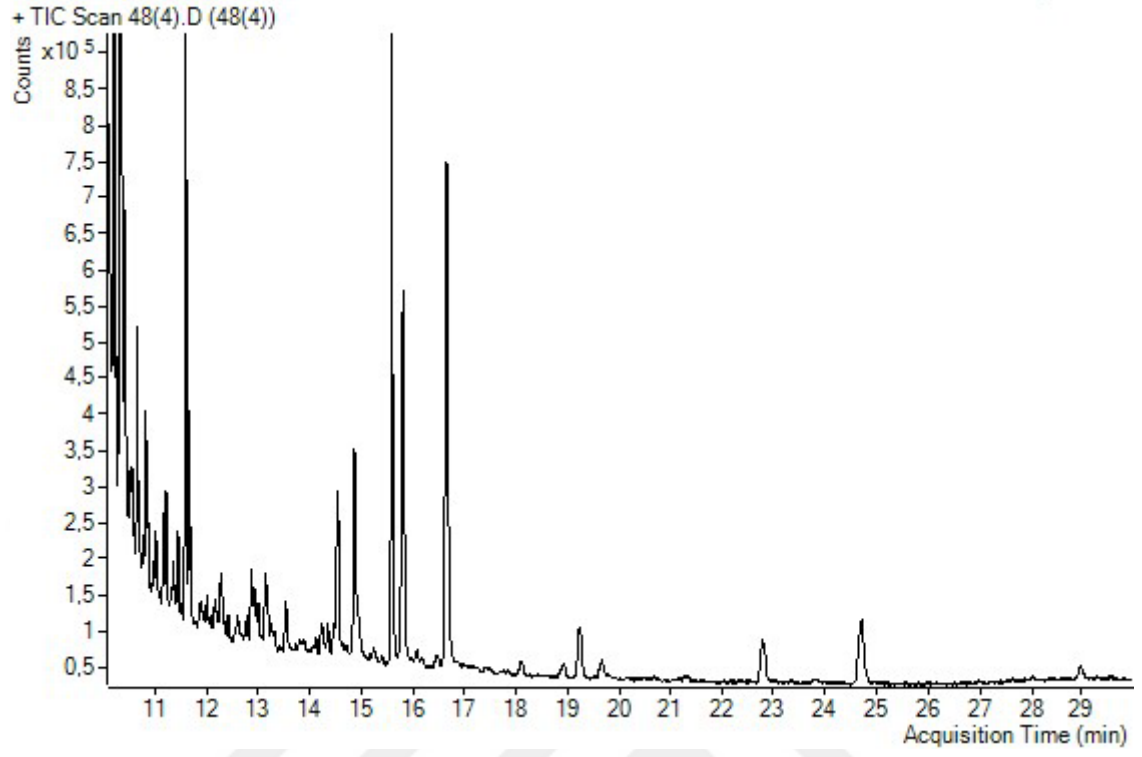
EK 10. 48 Saat 100 µg/ml AgNP AgNP uygulamalarına ait kromatogram



EK 11. 48 Saat 200 µg/ml AgNP AgNP uygulamalarına ait kromatogram



EK 12. 48 Saat 400 µg/ml AgNP AgNP uygulamalarına ait kromatogram



EK 13. 48 Saat 800 µg/ml AgNP AgNP uygulamalarına ait kromatogram

