



T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

***Melissa officinalis* (OĞUL OTU) ADVENTİF KÖK SÜSPANSİYON
KÜLTÜRÜNDE SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİNE BESİN
ORTAM BİLEŞENLERİ VE ELİSİTÖR ETKİLERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Rabia GÜNDÜZ

Birinci Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İlhami KARATAŞ

İkinci Danışman: Dr. Rahime KARATAŞ

TOKAT-2025

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre, Dr. Öğr. Üyesi İlhami KARATAŞ danışmanlığında hazırlamış olduğum “*Melissa officinalis* (Oğul otu) Adventif Kök Süspansiyon Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimine Besin Ortam Bileşenleri ve Elisitör Etkilerinin Belirlenmesi” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

01/08/2025

Rabia GÜNDÜZ

JÜRİ KABUL VE ONAY

Rabia GÜNDÜZ tarafından hazırlanan “*Melissa officinalis* (Oğul otu) Adventif Kök Süspansiyon Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimine Besin Ortam Bileşenleri ve Elisitör Etkilerinin Belirlenmesi ” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 17/07/2025 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Başkan) : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

.....

Üye Dr. Öğr. Üyesi İlhami KARATAŞ

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Fatma GEDİKLİ .

.....

ONAY

...../...../.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın ortaya çıkmasında, akademik bilgi ve deneyiminin yanı sıra, maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, karşılaştığım her zorlukta sabırla yanımda olan, kendime örnek aldığım değerli danışmanım, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Almus Meslek Yüksekokulu Müdürü Dr. Öğr. Üyesi İlhami KARATAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Gösterdiği fedakârlık ve sağladığı destekle bu süreci yürütmemde büyük katkı sağlamış; her aşamada bana yol gösterici olmuştur.

Ayrıca, çalışmam süresince her zaman bana destek olan, bilimsel rehberliğinin yanında gösterdiği sabır ve anlayışla süreci kolaylaştıran, teşvik edici tutumlarıyla beni motive eden ikinci danışmanım Dr. Rahime KARATAŞ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Rosmarinik asit analizlerinde sağladığı değerli katkılar için Dr. Öğr. Üyesi Duygu MISIRLI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte kıymetli bilgi ve tecrübeleriyle yalnızca akademik değil her zaman destek olan sayın Prof. Dr. Hüseyin KOÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez sürecim boyunca değerli tavsiye ve önerilerinin yanı sıra verdikleri moral ve motivasyonla her zaman yanımda olan Prof. Dr. Duran KATAR, Dr. Öğr. Üyesi Emine BİLGİNOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Fatma GEDİKLİ hocalarıma, destekleri ve katkıları için içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi yürütme sürecinde laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirmeme imkân tanıyarak kapılarını bana açan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Almus Meslek Yüksekokulu'na, ayrıca güler yüzlü destekleriyle her daim yanımda olan başta Osman TALİ olmak üzere tüm Almus Meslek Yüksekokulu personeline teşekkür ederim.

Hayatım boyunca yanımda olan, bana güç veren kıymetli aileme; her daim maddi ve manevi desteğini hissettiren canım babam Bahattin GÜNDÜZ'e, fedakârlığı ve sevgisiyle yolumu aydınlatan sevgili annem Hatice GÜNDÜZ'e ve her zaman yanımda olduğunu hissettiren kardeşim Muhammet Enes GÜNDÜZ'e gönülden teşekkür ederim.

Bu süreçte manevi desteği, anlayışı ve samimiyetiyle yanımda olan, aynı evi paylaşmanın ötesinde moral kaynağım haline gelen sevgili ev arkadaşım, İmtisal YERLİ'ye teşekkür ederim.

Rabia GÜNDÜZ

TEMMUZ-2025

ÖZET

Melissa officinalis (OĞUL OTU) ADVENTİF KÖK SÜSPANSİYON KÜLTÜRÜNDE SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİNE BESİN ORTAM BİLEŞENLERİ VE ELİSİTÖR ETKİLERİNİN BELİRLENMESİ

Gündüz, Rabia

Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi İlhami Karataş

İkinci Danışman: Dr. Rahime Karataş

Temmuz, 2025, xi+63 sayfa

Bitki adventif kök kültürleri tıp, eczacılık, kozmetik ve gıda başta olmak üzere çok çeşitli sektörlerde kullanılan biyoaktif bileşiklerin üretimi için alternatif biyoteknolojik yöntemlerdir. Bu çalışmada, oğul otu (*Melissa officinalis*) adventif kök süspansiyon kültüründe indol-3-bütirik asit (IBA, 0.50, 1.0, 2.0 ve 4.0 mg L⁻¹), MS (Murashige ve Skoog) besin ortamı (0.50, 0.75, 1.0, 1.25 ve 1.5 MS) ve sükroz konsantrasyonunun (%1, %2, %3, %4 ve %5) biyokütle, sekonder metabolit (rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid) içeriği ve antioksidan aktiviteye etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca besin ortam optimizasyon çalışmalarından elde edilen bulgular doğrultusunda elisitör olarak farklı konsantrasyonlarda kullanan maya ekstratının (50, 100 ve 200 µg mL⁻¹) bu parametrelere etkisi de incelenmiştir. Antioksidan aktivite testleri Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH[•]), Katyon Radikali Giderme Aktivitesi (ABTS^{•+}) ve İndirgeme Gücü Aktivitesi (FRAP) metotları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Adventif köklerin indikasyonu *in vitro* koşullarda yetiştirilen 50 günlük bitkilerin hipokotil kısımlarının 1 mg L⁻¹ IBA, 30 g L⁻¹ sükroz ve 2 g L⁻¹ phytagel içeren 1 MS besin ortamında karanlık koşullarda kültüre alınmasıyla sağlanmıştır. Besin ortamı bileşenlerinin (sükroz, MS ve IBA) süspansiyon kültür koşullarında optimizasyonu için adventif kökler (4 g) 125 mL besin ortamı içeren 250 mL hacimli erlenmayerlerde 120 devir/dakika'daki çalkayıcı üzerinde 30 gün süreyle kültüre alınmıştır. Yapılan çalışma neticesinde yaş ağırlık, rosmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve antioksidan aktivite (DPPH, FRAP ve ABTS) bakımından optimum sükroz, MS ve IBA konsantrasyonunun sırasıyla 30 g L⁻¹ (%3), 0.5 MS (2.2 g L⁻¹) ve 2 mg L⁻¹ olduğu belirlenmiştir. Optimum besin ortamı koşullarında adventif köklere uygulanan farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarında en yüksek rosmarinik asit içeriği kontrol grubuna göre 2,59 kat artışla (30,25 ± 0,49 mg g⁻¹ KA) 200 µg mL⁻¹ maya ekstati uygulamasında belirlenmiştir. Sonuç olarak oğul otu adventif kök kültürleri rosmarinik asitin biyoteknolojik yöntemlerle üretimi için önemli bir alternatif olduğu ve yüksek verimde metabolit üretiminin sağlanmasında besin ortam bileşenlerinin optimizasyonu ve elisitör uygulamaları büyük önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: Adventif Kök, Elisitör, Maya Ekstraktı, *Melissa officinalis*, Rosmarinik Asit, Antioksidan Aktivite

ABSTRACT

THE DETERMINATION OF THE EFFECTS OF MEDIUM COMPONENTS AND ELICITOR ON SECONDARY METABOLITE PRODUCTION IN ADVENTITIOUS ROOT SUSPENSION CULTURE OF *Melissa officinalis* (LEMON BALM)

Gündüz, Rabia

Master's Thesis, Department of Bioengineering

Advisor: Asst. Prof. Dr. İlhami Karataş

Second Advisor: Dr. Rahime Karataş

July, 2025, xi+63 pages

Adventitious root cultures of plants represent alternative biotechnological methods for the production of bioactive compounds widely used in various sectors, particularly in medicine, pharmacy, cosmetics, and food industries. This study aimed to determine the effects of indole-3-butyric acid (IBA; 0.50, 1.0, 2.0, and 4.0 mg L⁻¹), Murashige and Skoog (MS) medium (0.50, 0.75, 1.0, 1.25, and 1.5 MS), and sucrose concentrations (1%, 2%, 3%, 4%, and 5%) on biomass accumulation, secondary metabolite content (rosmarinic acid, total phenolics, and flavonoids), and antioxidant activity in adventitious root suspension cultures of *Melissa officinalis* (lemon balm). In addition, based on the findings obtained from the nutrient medium optimization studies, the effects of yeast extract used as an elicitor at different concentrations (50, 100, and 200 µg mL⁻¹) on these parameters were also investigated. Antioxidant activity assays were performed using the DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity, ABTS•⁺ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) cation radical scavenging activity, and FRAP (ferric reducing antioxidant power) methods. The induction of adventitious roots was achieved by culturing the hypocotyl segments of 50-day-old *in vitro*-grown plants on 1 MS medium supplemented with 1 mg L⁻¹ IBA, 30 g L⁻¹ sucrose, and 2 g L⁻¹ phytagel under dark conditions. For the optimization of medium components (sucrose, MS, and IBA) under suspension culture conditions, 4 g of adventitious roots were cultured in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 125 mL of nutrient medium on a shaker at 120 rpm for 30 days. As a result of the study, the optimal concentrations of sucrose, MS, and IBA for fresh weight, rosmarinic acid content, total phenolic compounds, and antioxidant activity (DPPH, FRAP, and ABTS) were determined to be 30 g L⁻¹ (3%), 0.5 MS (2.2 g L⁻¹), and 2 mg L⁻¹, respectively. Under optimized medium conditions, the highest rosmarinic acid content (30.25 ± 0.49 mg g⁻¹ KA), representing a 2.59-fold increase compared to the control group, was observed with the application of 200 µg mL⁻¹ yeast extract. In conclusion, adventitious root cultures of *Melissa officinalis* represent a promising alternative for the biotechnological production of rosmarinic acid, and the optimization of nutrient medium components along with the application of elicitors plays a crucial role in achieving high-yield metabolite production.

Keywords: Adventitious Root, Antioxidant Activity, Elicitor, *Melissa officinalis*, Rosmarinic Acid, Yeast Extract

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ETİK SÖZLEŞME.....	i
JÜRİ KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETLERİ	5
2.1. Bitki Sekonder Metabolitleri ve Kullanım Alanları.....	5
2.2. Bitki Fenolik Bileşiklerinin Temel Özellikleri	8
2.2.1. Bitki Fenolik Bileşiklerinden Rosmarinik Asitin Yapısı ve Biyolojik Önemi	9
2.3. <i>Melissa officinalis</i> (oğul otu) Bitkisinin Sekonder Metabolit İçeriği ve Biyolojik Aktiviteleri	10
2.4 Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ile Sekonder Metabolit Üretimi	12
2.4.1. Adventif Kök Kültürleri ile Sekonder Metabolit Üretimi	13
2.5. Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Uygulamalar	14
2.5.1. Elisitör Uygulamaları	16
2.6. Rosmarinik Asitin Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ile Üretimi	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Bitki Materyali.....	21
3.1.2. Cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri	21
3.1.3. Kimyasallar.....	21

3.2. YÖNTEM.....	22
3.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi ve Steril Fidelerin Elde Edilmesi.....	22
3.2.2. Katı Kültür Koşullarında Adventif Köklerin İndüksiyonu.....	24
3.2.3. Sıvı Kültür Koşullarında Adventif Köklerin Çoğaltılması.....	24
3.2.4. Süspansiyon Kültür Koşullarında Besin Ortamı Bileşenlerinin Optimizasyonu.....	25
3.2.5. Adventif Kök Süspansiyon Kültürlerine Maya Ekstraktı Uygulamaları.....	27
3.2.6. Analizlerde Kullanılacak Adventif Kök Ekstraktlarının Hazırlanması.....	27
3.2.7. Rosmarinik Asit İçeriğinin Belirlenmesi.....	27
3.2.8. Toplam Flavonoid Miktarının Belirlenmesi.....	29
3.2.9. Toplam Fenolik Bileşik Miktarının Belirlenmesi.....	29
3.2.10. ABTS Radikal Katyon Giderme Aktivitesi.....	29
3.2.11. DPPH Radikalı Temizleme Kapasitesi.....	30
3.2.12. Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP)	30
3.2.13. İstatistiksel Analizler	31
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	32
4.1. <i>M. officinalis</i> Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı Sükroz Konsantrasyonlarının Biyokütle ve Sekonder Metabolit İçeriğine Etkileri	32
4.2. <i>M. officinalis</i> Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı Sükroz Konsantrasyonlarının Antioksidan Aktiviteye Etkileri	35
4.3. <i>M. officinalis</i> Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı MS (Murashige Skoog) Gücünün Biyokütle ve Sekonder Metabolit İçeriğine Etkileri....	38
4.4. <i>M. officinalis</i> Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı MS (Murashige Skoog) Gücünün Antioksidan Aktiviteye Etkileri.....	40
4.5. <i>M. officinalis</i> Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı IBA (indol-3-bütirik asit) Konsantrasyonunun Biyokütle ve Sekonder Metabolit İçeriğine Etkileri.....	42
4.6. <i>M. officinalis</i> Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı IBA (indol-3-bütirik asit) Konsantrasyonlarının Antioksidan Aktiviteye Etkileri	44
4.7. <i>M. officinalis</i> Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Maya Ekstraktının Biyokütle ve Sekonder Metabolit İçeriğine Etkileri.....	46

4.8. <i>M. officinalis</i> Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Maya Ekstraktının Antioksidan Aktiviteye Etkileri.....	48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
KAYNAKLAR	53



ÇİZELGELER LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	Bazı bitkisel kökenli sekonder metabolitlerin sınıfları, elde edildikleri bitki türleri, kullanıldıkları sektörler ve kullanım amaçları.....	7
Çizelge 2.2.	Çeşitli bitki doku kültürü yöntemleri ile farklı bitki türlerinden elde edilen sekonder metabolitler.....	13
Çizelge 2.3.	Elisitörlerin sınıflandırılması, tanımı ve örnekleri.....	17
Çizelge 2.4.	Farklı doku kültürü yöntemleri kullanarak çeşitli bitki türlerinden üretilen rosmarinik asit içeriği.....	20
Çizelge 3.1.	MS temel besi ortamı içeriği (Murashige ve Skoog, 1962).....	23
Çizelge 3.2.	<i>M. officinalis</i> adventif kök süspansiyon kültüründe yürütülen optimizasyon çalışmaları kapsamında kullanılan besin ortam kombinasyonları.....	26
Çizelge 3.3.	Rosmarinik asit analizinde kullanılan HPLC koşulları.....	28
Çizelge 4.1.	Farklı sükroz konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin yaş ağırlık, rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid miktarları.....	33
Çizelge 4.2.	Farklı MS gücünde kültüre alınan adventif köklerin yaş ağırlık, rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid miktarları.....	38
Çizelge 4.3.	Farklı IBA (Indol-3-Bütirik Asit) Konsantrasyonunda kültüre alınan adventif köklerin yaş ağırlık, rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid miktarları.....	43
Çizelge 4.4.	Farklı Maya Ekstraktı konsantrasyonunda kültüre alınan adventif köklerin yaş ağırlık, rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid miktarları.....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Fenolik bileşiklerin grupları.....	9
Şekil 2.2. Rosmarinik asidin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 3.1. Eksplant kaynağı olarak kullanılan oğul otu bitkilerinin <i>in vitro</i> koşullarda yetiştirilmesi.....	23
Şekil 3.2. Hipokotil eksplantlarından adventif köklerin gelişimi.....	24
Şekil 3.3. Süspansiyon kültürlerdeki adventif köklerin genel görünümü.....	26
Şekil 3.4. Rosmarinik asit bileşiği standardına (A) ve adventif kök (B) ait HPCL kromotogramı	28
Şekil 4.1. Farklı sükroz konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin FRAP (A), ABTS (B) ve DPPH (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri.....	36
Şekil 4.2. Farklı MS (Murashige Skoog) güçlerinde kültüre alınan adventif köklerin FRAP (A), ABTS (B) ve DPPH (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri.....	41
Şekil 4.3. Farklı IBA (indol-3-bütirik asit) konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin FRAP (A), ABTS (B) ve DPPH (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri.....	45
Şekil 4.4. Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin FRAP (A), ABTS (B) ve DPPH (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri.....	49

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
Atm	Atmosfer basıncı
cm	Santimetre
dk	Dakika
µg	Mikrogram
µM	Mikromolar
µm	Mikrometre
µmol	mikromol
ε	Molar absorptivite katsayısı
g	Gram
L	Litre
M	Molar
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
rpm	Dakikadaki devir sayısı
%	Yüzde
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar	Açıklama
ABTS ⁺	2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiyozolin-6-sülfonik asit) radikali
Abs	Absorbans
DPPH [·]	1,1-Difenil 2-pikril hidrazil radikali
FRAP	Ferrik indirgeyici antioksidan potansiyeli
TE	Troloks eşdeğer
TEAC	Troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi
Troloks	6-Hidroksi-2,5,7,8-tetramethilkroman-2-karboksilik asit
YA	Yaş ağırlık
KA	Kuru ağırlık
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
MJ	Metil jasmonat
YE	Yeast ekstrakt
RA	Rosmarinik asit
SA	Salisilik asit
IBA	İndol butirik asit
MS	Murashige and Skoog (1962)
GA ₃	Giberellik asit
UV	Ultraviyole

1. GİRİŞ

Melissa officinalis L. (oğul otu), tıbbi ve aromatik özellikleriyle dikkat çeken çok yıllık bir bitkidir. Türkiye’de halk arasında oğul otu, melisa otu veya karakteristik limon benzeri aroması nedeniyle limon nanesi olarak bilinmektedir. Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait bu çok yıllık bitki, özellikle rosmarinik asit, fenolik bileşikler, flavonoidler ve uçucu yağlar bakımından zengin fitokimyasal profili sayesinde antiviral, antioksidan, spazmolitik ve sedatif etkilere sahiptir. Geleneksel tıpta uzun süredir kullanılan *Melissa officinalis*, bu biyolojik etkileri nedeniyle ilaç, gıda, kozmetik ve aromaterapi gibi çeşitli endüstrilerde potansiyel bir doğal metabolit kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Baytop, 1984; Carnat ve ark., 1998; Dastmalchi ve ark., 2008; Moradkhani ve ark., 2010).

Oğul otu bitkisinde bulunan rosmarinik asit, L-fenilalanin (fenilpropanoid yolak) ve L-tirozin (tirozin türevli yolak) üzerinden sentezlenen fenolik asit türevi bir bileşiktir. Bu bileşik güçlü antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve antialerjik etkileri nedeniyle geniş farmakolojik uygulama alanlarına sahiptir (Petersen ve Simmonds, 2003; Babaei ve ark., 2020). Son yıllarda rosmarinik asit başta olmak üzere fenolik bileşiklere olan endüstriyel talep artmış (Anonim, 2024); bu durum, bitkisel kaynaklı sekonder metabolitlerin sürdürülebilir ve verimli üretimini zorunlu hale getirmiştir. Artan talep karşısında bu bileşiği içeren bitki türlerinin belirlenmesine yönelik çeşitli çalışmalar yürütülmüştür. Ancak bitkilerde bulunan değerli metabolitlerin miktarları kullanılan genotip, bitkilerin yetiştirildiği bölgenin ekolojik koşulları, yetiştirme teknikleri, hasat zamanı/şekli ve hasat sonrası işlemler gibi birçok faktörden etkilenmektedir. (Li ve ark., 2020a)

Rosmarinik asidin doğal kaynaklardan elde edilmesi, çeşitli çevresel ve biyotik/abiyotik faktörlere bağlı olarak ciddi kısıtlamalarla karşı karşıyadır. Mevsimsel değişkenlik, çevresel stres faktörleri, tarımsal üretim sınırlamaları ve doğal popülasyonların kontrolsüz şekilde toplanması, bu bileşiğin geleneksel yöntemlerle standardize üretimini kısıtlamaktadır. Özellikle rastgele ve yoğun bitki toplama faaliyetleri, doğaya zarar vermekte; genetik çeşitliliğin azalmasına ve nadir türlerin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalmasına yol açmaktadır. Bu tür sınırlamaların üstesinden gelebilmek için, kontrollü koşullarda üretim sağlayan alternatif biyoteknolojik yaklaşımların

geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu çerçevede, bitki doku kültürleri, bitki biyoteknolojisinin en önemli araçlarından biri olarak öne çıkmaktadır (Li ve ark., 2020a; Kieran ve ark., 1997; Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Karataş 2022a).

Değerli bitki sekonder metabolitlerin üretiminde bitki doku kültürleri birçok açıdan avantaja sahiptir. Özellikle bitkide doğal olarak düşük miktarlarda bulunan ve çevresel etmenlere duyarlı olan sekonder metabolitlerin, yıl boyunca sürekli, standardize ve izlenebilir bir şekilde üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Ayrıca *in vitro* üretim sistemleri, tarımsal üretim alanı gereksinimini azaltmakta, doğadan bağımsız bir üretim stratejisi sunarak ekosistem üzerindeki baskıyı hafifletmekte ve nesli tehdit altındaki bitki türlerinin korunmasına katkı sağlamaktadır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Karuppusamy, 2009; Karataş, 2013; Karataş ve ark., 2016). Bunun yanı sıra, sekonder metabolitlerin biyosentezinde rol oynayan metabolik yolların anlaşılması ve bu yolların hedef metabolit üretimi yönünde düzenlenebilmesi de önemli avantajları arasında yer almaktadır (Bhatia ve Dahiya, 2015; Neumann ve ark., 2020; Kumar ve Loh, 2012; Thorpe, 1990).

Bitki hücre ve doku kültürü teknikleri, sekonder metabolit üretimi için yararlanılan önemli biyoteknolojik araçlar arasında yer almakta olup, bu yöntem kapsamında üretim verimliliğini iyileştirmek amacıyla çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejiler; besi ortamı bileşenlerinin optimizasyonu, biyotik ve abiyotik elisitör uygulamaları, uygun doku kültürü yönteminin seçilmesi (saçak, adventif kök, hücre süspansiyon vs), kültür ortamına öncül bileşiklerin ilavesi ve mutajenik varyasyon tekniklerin kullanımı gibi çok yönlü uygulamaları kapsamaktadır (Sasson, 1991; Sökmen ve Gürel, 2001; Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Adventif kök kültürleri, yüksek biyokütle ve metabolit üretim kapasitesiyle öne çıkan *in vitro* doku kültürü tekniklerden biridir. Adventif kökler, bitkilerin kök dışı organ ve dokularından (gövde, yaprak ve hipokotil vb.) gelişen ve hem normal fizyolojik gelişim sürecinde hem de çeşitli stres koşullarına (besin yetersizliği, mekanik yaralanma vb.) yanıt olarak oluşabilen kök türleridir. Bitki doku kültürü yöntemleriyle adventif köklerin indüklenmesi ise genellikle kök dışı eksplant kaynaklarının yüksek düzeyde oksin ve düşük düzeyde sitokinin içeren besin ortamlarında kültüre alınmasıyla sağlanmaktadır. Oksin baskınlığındaki bu denge, hücre farklılaşmasını köklenme yönünde yönlendirerek

adventif kök gelişimini etkin şekilde teşvik etmektedir (Steffens ve Rasmussen, 2016). Bu kök kültürleri, genetik stabilitenin korunması, genetik müdahaleye gerek kalmadan üretim yapılabilmesi ve sürekli üretim döngülerine olanak tanınması gibi avantajlarıyla ön plana çıkmaktadır. Adventif köklerin bu özellikleri onları ticari ölçekli sekonder metabolit üretimi açısından uygun ve tercih edilebilir bir yöntem olmasını sağlamaktadır (Gaosheng ve Jingming, 2012; Murthy ve ark., 2016; Karataş, 2021). Özellikle sıvı besin ortamlarında kurulan süspansiyon kültürleri, büyük ölçekli biyoreaktör uygulamalarına geçişte yüksek verimlilik ve ölçeklenebilirlik açısından avantajlı bir model sunmaktadır (Murthy ve ark., 2014).

Adventif köklerin metabolit verimliliği besin ortamı bileşenleri ve uygulanan elisitörler tarafından etkilenebilmektedir. Bu doğrultuda, elisitör uygulamaları, metabolit üretimini artırmaya yönelik başlıca yaklaşımlardan biri olarak değerlendirilmektedir. Elisitörler; mikrobiyal kökenli moleküller, kimyasal ajanlar veya fiziksel stres faktörleri gibi farklı uyarıcıları kapsamaktadır. Bu bileşikler, bitki hücre zarlarındaki özgül reseptörlerle etkileşerek savunma mekanizmalarını aktive eden genlerin ekspresyonunu başlatmaktadır. Böylece, hedeflenen sekonder metabolitlerin biyosentezi uyarılmakta ve hedef bileşiklerin üretim düzeylerinde anlamlı artışlar sağlanmaktadır. Bu amaçla en sık başvuru kimyasal elisitörler arasında metil jasmonat (MJ), maya ekstraktı (YE) ve salisilik asit (SA) yer almaktadır. Özellikle maya ekstraktı (yeast extract), düşük konsantrasyonlarda dahi etkili olabilen ve endojen sinyal iletim yollarını tetikleyerek metabolit biyosentezini kayda değer oranda artırabilen güçlü bir elisitör olarak öne çıkmaktadır (Mulabagal ve Tsay, 2004; Shilpa ve ark., 2010, Karataş, 2013; Lee ve ark., 2017).

Melissa officinalis bitkisinde bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak sekonder metabolit üretimi üzerine gerçekleştirilen çalışmaların oldukça sınırlı olduğu, özellikle bu bitkinin adventif kök kültürlerinin metabolit üretim kapasitesi üzerine çalışmalara rastlanmamıştır. Bu durum, türün biyoteknolojik potansiyelinin yeterince değerlendirilmediğini ve araştırma alanında önemli bir boşluk bulunduğunu ortaya koymaktadır. Bu doğrultuda yürütülen tez çalışmasında, *M. officinalis*'e ait adventif kök süspansiyon kültürlerinin kurulması ve bu sistemde başta rosmarinik asit olmak üzere toplam fenolik ve flavonoid bileşikler, biyokütle artışı ile antioksidan aktivite düzeylerinin (DPPH, ABTS, FRAP) değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışma

kapsamında, farklı besin ortamı formülasyonları ile maya ekstraktı (YE) uygulamalarının söz konusu parametreler üzerindeki etkilerinin incelenmesi ve elde edilen veriler doğrultusunda bu türün adventif kök kültürlerinin rosmarinik asit üretiminde alternatif biyoteknolojik bir yöntem olarak kullanım potansiyeli değerlendirilmiştir. Bu yönüyle çalışma sektörün ihtiyaç duyduğu değerli bir bileşiğin biyoteknolojik bir yöntemle üretilmesine önemli bir katkı sağlayacaktır.



2. LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1. Bitki Sekonder Metabolitleri ve Kullanım Alanları

Bitkilerde bulunan kimyasal bileşikler metabolik yolları ve işlevleri doğrultusunda primer ve sekonder metabolitler olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Primer metabolitler; hücre bölünmesi, büyüme ve üreme gibi temel biyolojik süreçlerde doğrudan rol oynayan, hayati öneme sahip bileşiklerdir. Buna karşılık, sekonder metabolitler bitkinin temel yaşamsal faaliyetleri için zorunlu olmamakla birlikte, çevresel stres faktörlerine karşı direnç geliştirme, patojenlere karşı savunma, adaptasyon gibi çevre ile etkileşim süreçlerinde kritik işlevler üstlenmektedir. Bu bileşiklerin yokluğu, bitkide abiyotik ve biyotik stres faktörlerine karşı direnç mekanizmalarının zayıflamasına, fizyolojik fonksiyonlarının bozulmasına ve uzun vadede bitkinin ölümüyle sonuçlanabilecek olumsuzluklara yol açabilmektedir (Mammadov, 2014; Topcu ve Çölgeçen, 2015; Baydar, 2019; Vuran ve Türker, 2021; Öztıp, 2022).

Sekonder metabolitler, primer metabolitlere kıyasla daha karmaşık yapısal özellikler sergilemekte olup, biyosentezleri özgün enzimatik yollarla düzenlenmektedir. Bu bileşikler çoğunlukla belirli bitki türlerine özgü olarak sentezlenmekte ve bu özellikleri sayesinde kimyasal taksonomi çalışmalarında ayırt edici belirteçler olarak değerlendirilmektedir. Bitki bünyesinde genellikle spesifik doku veya organlarda ya da farklılaşmış hücre tiplerinde biriken bu bileşiklerin bir kısmı yalnızca bitki gelişiminin belirli fizyolojik evrelerinde sentezlenmektedir (Çetin, 2006). Bunun yanı sıra, tohum yayılımı ve tozlaşma gibi süreçlere katkı sağlayarak, bitkinin ekolojik adaptasyon başarısını artırmaktadırlar (Karaçocuk, 2019).

Yapısal çeşitlilikleri ve biyosentez mekanizmaları temelinde, bu bileşikler başlıca alkaloidler, terpenoidler ve fenolik bileşikler olmak üzere üç temel grupta sınıflandırılmaktadır. Alkaloidler, yapılarında bir veya daha fazla azot atomu bulunduran, çoğunlukla bazik özellikteki bileşiklerdir ve morfin, kafein, nikotin gibi farmakolojik olarak aktif örneklerle temsil edilmektedir. Kapalı tohumlu bitkilerin yaklaşık %20'sinde bulunan alkaloidler, güçlü fizyolojik etkileri nedeniyle özellikle tıbbi bitki araştırmalarında ön planda yer almaktadır. Terpenoidler ise izopren birimlerinden türeyen, monoterpenlerden diterpenlere kadar uzanan geniş bir alt sınıflandırmaya sahip, kimyasal çeşitliliği yüksek bir grup olup, uçucu yağların ve reçinelerin temel bileşenlerini

oluşturmaktadır. Fenolik bileşikler, hidroksil grubu taşıyan aromatik halkaya sahip bileşikler olup, bitkilerin herbivorlar ile fitopatojen organizmalara karşı geliştirdiği savunma yanıtlarında kritik roller üstlenmektedir. (Harborne, 1999).

Sekonder metabolitler, sahip oldukları biyolojik aktiviteler nedeniyle ilaç, kozmetik ve gıda endüstrileri başta olmak üzere birçok alanda geniş bir uygulama potansiyeline sahiptir. Antienflamatuvar, antimikrobiyal, antioksidan ve antikanserojenik gibi geniş biyolojik etki spektrumu bunları farmasötik alanda potansiyel terapötik ajanlar haline getirmektedir. (Seca ve Pinto, 2019) Kozmetik endüstrisinde cilt yenilenmesini destekleyici, yaşlanma karşıtı etki ve doğal ürün talebini karşılamaya yönelik olarak formülasyonlarda kullanılmaktadır (Tundis ve ark., 2015). Gıda endüstrisinde katkı maddesi veya fonksiyonel bileşen olarak değerlendirilen bu bileşikler; antioksidan özellikleri ve vücut sağlığını destekleyici etkileri sayesinde besin takviyesi olarak ön plana çıkmaktadır. Tarım sektöründe, doğal insektisit ve pestisit alternatifleri sunarak çevre dostu biyolojik mücadele yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlamaktadır (Tlak Gajger ve Dar, 2021; Hadacek, 2002; Rattan, 2010). Sekonder metabolitlerin sahip olduğu bu geniş biyolojik spektrum ve uygulama potansiyeli, onları biyoteknolojik üretim stratejilerinde öncelikli araştırma konusu hâline getirmiştir (Guerriero ve ark., 2018). Bazı bitkisel kaynaklı bileşikler, sekonder metabolit sınıfı, elde edildikleri bitki türleri (Latince adları ile), kullanım alanları ve endüstriyel sektörlerdeki işlevleri Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Bazı bitkisel kökenli sekonder metabolitlerin sınıfları, elde edildikleri bitki türleri, kullanıldıkları sektörler ve kullanım amaçları
(Elshafie ve ark., 2023; Kaushik ve ark., 2021; Bhatti ve ark., 2022; Kabera ve ark., (2014)

Bileşik	Sekonder Metabolit	Bitki	Bitkinin Latince adı	Kullanıldığı Sektör	Kullanım Amacı
Gallik Asit	Fenolikler	Çay, Meşe Ağacı	<i>Camellia sinensis</i> , <i>Quercus spp.</i>	Sağlık, Kozmetik	Antioksidan, anti-inflamatuar, cilt sağlığı için
Kateşin	Fenolikler	Yeşil Çay, Kakao	<i>Camellia sinensis</i> , <i>Theobroma cacao</i>	Sağlık, Gıda	Antioksidan, kalp sağlığını destekleyici
Genistein	Fenolikler	Soya Fasulyesi	<i>Glycine max</i>	Sağlık	Antioksidan, menopoz semptomlarını hafifletici, anti-kanserojen
Apigenin	Fenolikler	Papatya, Maydanoz	<i>Matricaria chamomilla</i> , <i>Petroselinum crispum</i>	Sağlık	Anti-inflamatuar, anti-kanserojen özellikli
Silibin	Fenolikler	Devedikeni	<i>Silybum marianum</i>	Sağlık	Karaciğer koruyucu ve antioksidan olarak
Morfin	Alkaloidler	Haşhaş	<i>Papaver somniferum</i>	Eczacılık	Güçlü ağrı kesici olarak
Kafein	Alkaloidler	Kahve, Çay	<i>Coffea arabica</i> , <i>Camellia sinensis</i>	Gıda, Eczacılık	Uyarıcı etkisi nedeniyle enerji içeceklerinde ve ilaçlarda
Rosmarinik Asit	Fenolikler	Biberiye, Fesleğen	<i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Ocimum basilicum</i>	Sağlık, Kozmetik	Antioksidan, antimikrobiyal, cilt bakım ürünlerinde
Ferulik Asit	Fenolikler	Mısır, Pirinç, Buğday	<i>Zea mays</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Triticum aestivum</i>	Sağlık, Kozmetik	Cilt sağlığını destekleyici, antioksidan
Klorojenik Asit	Fenolikler	Kahve, Patlıcan	<i>Coffea arabica</i> , <i>Solanum melongena</i>	Sağlık, Gıda	Antioksidan, kan şekeri düzenleyici
Nikotin	Alkaloidler	Tütün	<i>Nicotiana tabacum</i>	Tarım, Eczacılık	Böcek kovucu, düşük dozlarda uyarıcı
Atropin	Alkaloidler	Güzellavrat Otu	<i>Atropa belladonna</i>	Eczacılık	Göz bebeklerini büyütücü, kalp atışını düzenleyici
Kolşisin	Alkaloidler	Çiğdem	<i>Colchicum autumnale</i>	Eczacılık	Gut hastalığı tedavisinde anti-inflamatuar olarak
Krosin	Terpenoidler	Safran	<i>Crocus sativus</i>	Gıda	Altın sarısı renk verici olarak çeşitli yiyecek ve içeceklerde
Betanin	Fenolik bileşik	Pancar	<i>Beta vulgaris</i>	Gıda	Kırmızı/pembe renklendirici olarak
Ricinin	Alkaloidler	Hint Yağı Bitkisi	<i>Ricinus communis</i>	Tarım	Böcek öldürücü; düşük dozlarda doğal pestisit
Limonen	Terpenler	Limon	<i>Citrus limon</i>	Parfüm, Gıda, Sağlık	Koku verici; kanser önleyici potansiyel etki
Resveratrol	Fenolikler	Üzüm	<i>Vitis vinifera</i>	Sağlık, Gıda	Antioksidan, kardiyovasküler sağlığı destekleyici
Taxol (Paclitaxel)	Terpenoid	Porsuk Ağacı	<i>Taxus brevifolia</i>	Sağlık, Eczacılık	Kanser tedavisi; over, meme ve akciğer kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde

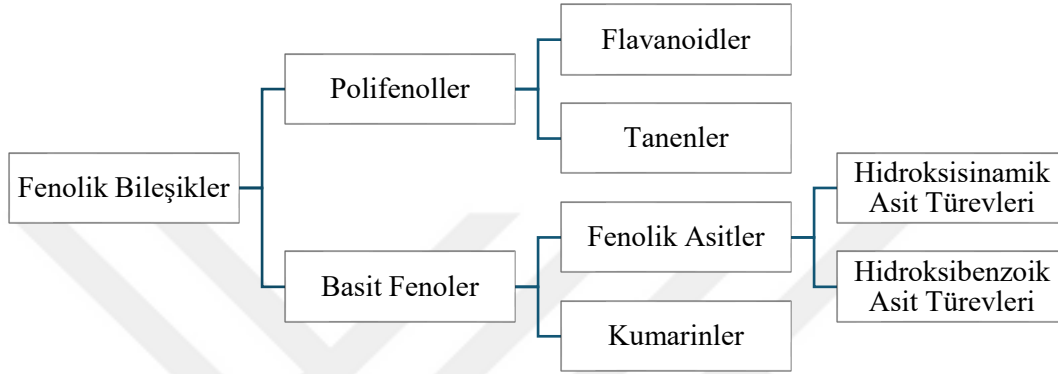
2.2. Bitki Fenolik Bileşiklerinin Temel Özellikleri

Fenolik bileşikler, bitkilerde yaygın olarak bulunan ve yapılarında bir veya daha fazla aromatik halka ile en az bir hidroksil grubu içeren, 8 000'den fazla bileşik türünü kapsayan önemli bir sekonder metabolit grubudur. Bu bileşikler bitkilerin UV radyasyonu, patojen ve herbivor baskılarına karşı geliştirdiği savunma mekanizmalarında temel rol oynamaktadır. Ayrıca fenolik bileşikler, bitki dokularında acı ve buruk tatların oluşumunda ve pigmentasyon yoluyla renk farklılıklarının belirlenmesinde etkili olmaktadır (Dai ve Mumper, 2010; Mammadov, 2014).

Bitkilerde fenolik bileşiklerin biyosentezi, başlıca şikimat yolu ve malonat yolu olmak üzere iki temel metabolik yol üzerinden gerçekleşir. Bu biyosentez süreçleri; flavonoidler, tanenler ve ligninler gibi yapısal ve savunma işlevleri olan çeşitli fenoloik bileşiklerin sentezini mümkün kılmaktadır. Biyosentez, basit karbonhidratların şikimat yolu aracılığıyla aromatik amino asit fenilalanine dönüştürülmesiyle başlar. Ardından fenilalanin, fenilpropanoid yolak üzerinden hidroksilasyon, metilasyon, açılasyon ve glikozilasyon gibi enzimatik modifikasyonlara uğrayarak farklı fenolik yapıların oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Bu modifikasyonlar fenolik bileşiklerin kimyasal çeşitliliğini artırmakla kalmayıp, aynı zamanda bu bileşiklerin çözünürlük, stabilite ve biyolojik aktiviteleri gibi fizyokimyasal özelliklerini de önemli ölçüde etkilemektedir. Bu süreçte görev alan başlıca enzimler arasında glikoziltransferazlar ve açıltransferazlar yer almakta olup, bu enzimler fenolik bileşiklerin polaritesini, hücresel taşınabilirliğini ve diğer biyomoleküllerle olan etkileşimlerini düzenlemede kritik roller üstlenmektedir (Cheynier ve ark., 2013; Corso ve ark., 2020).

Fenolik bileşikler, içeriklerindeki yapısal birim sayısına göre basit fenoller ve polifenoller olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. En basit yapı fenoller, tek bir aromatik halka üzerinde yer alan bir hidroksil (-OH) grubundan oluşmaktadır. Basit fenoller fenolik asitler ve kumarinler olmak üzere başlıca iki alt sınıfa ayrılmaktadır. Fenolik asitler, yapısal özelliklerine göre hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler olarak sınıflandırılmaktadır. Hidroksibenzoik asitler, fenol halkasına doğrudan bağlı karboksilik asit grubuna sahip benzoik asit türevleridir ve genellikle bir hidroksil grubu içermektedir. Hidroksisinnamik asitler, sinamik asit türevleri olup, yan zincirlerinde çift bağ ve hidroksil grupları bulundurmaktadır. Daha karmaşık fenolik bileşikler arasında, iki

aromatik halka (A ve B halkaları) ile bunları bağlayan heterosiklik bir C halkasına sahip flavonoidler yer alır. Tanenler ve kumarinler de yapısal ve biyolojik özellikleri nedeniyle fenolik bileşikler sınıfına dahildir (Robbins ve Bean, 2004; Vuolo ve ark., 2019). Fenolik bileşiklerin genel sınıflandırması Şekil 2.1’de verilmiştir.



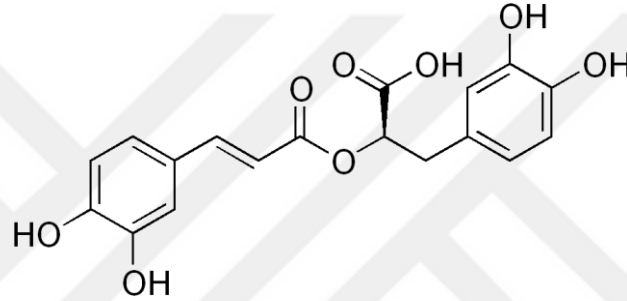
Şekil 2.1. Fenolik bileşiklerin grupları
(Robbins ve Bean, 2004)

Fenolik bileşikler, insan sağlığı açısından çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. En belirgin özellikleri, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunda rol alan enzimleri inhibe ederek oksidatif stresi azaltmalarıdır. Oksidatif stres, kronik hastalıkların gelişiminde rolü dikkate alındığında, fenolik bileşiklerin yüksek antioksidan potansiyeli terapötik açıdan büyük önem taşımaktadır (Zhang ve Tsao, 2016). Ayrıca, anti-inflamatuar etkileri sayesinde inflammatuar süreçlerin düzenlenmesinde ve bağışıklık sisteminin dengeli çalışmasında etkili olmaktadır. Antimikrobiyal aktiviteleriyle patojenlerin çoğalmasını engelleyerek hem gıda güvenliğinin artırılması hem de insan sağlığının korunmasına katkı sağlamaktadır. Bunun yanında, kardiyovasküler sistemi olumlu etkilemekte ve bağırsak mikrobiyotasını düzenleyerek bağırsak sağlığının korunmasına destek olmaktadır (Cheynier, 2012).

2.2.1. Bitki Fenolik Bileşiklerinden Rosmarinik Asitin Yapısı ve Biyolojik Önemi

Rosmarinik asit, kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asidin esterifikasyonu sonucu oluşan bir bileşiktir. Biosentezi bitkilerde L-fenilalanin ve L-tirozin amino asitlerinden başlamaktadır. (Petersen ve Simmonds, 2003) Kimyasal yapısında bulunan aromatik

halkalara bağı çoklu hidroksil (-OH) grupları ve ester fonksiyonel grupları, rosmarinik aside yüksek antioksidan kapasite kazandırmaktadır. Bu yapısal özellikler, bileşiğin biyolojik aktivitesini güçlendirmekte ve farmakolojik açıdan değerli bir molekül olmasını sağlamaktadır. Rosmarinik asidin kimyasal yapısı Şekil 2.2’de gösterilmiştir. Antioksidan, antiinflamatuvar, antibakteriyel, antialerjik ve antiviral gibi geniş bir biyolojik etki spektrumuna sahip olan bu bileşik, çok sayıda endüstride yüksek katma değerli ürünlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır (Jordán ve ark., 2012; Babaei ve ark., 2020).



Şekil 2.2. Rosmarinik asidin kimyasal yapısı
(Petersen ve Simmonds, 2003)

Rosmarinik asit içeren bitkisel ekstraktlar; bağışıklık sisteminin desteklenmesi, inflamatuvar süreçlerin hafifletilmesi, karaciğer fonksiyonlarının korunması ve alerjik reaksiyonların azaltılması gibi etkileri nedeniyle fonksiyonel gıda ve takviye edici ürün formülasyonlarında yaygın olarak tercih edilmektedir. Ticari ürünler arasında, her kapsülünde 280 mg rosmarinik asit içeren ve toplamda 75 kapsülden takviyelerin perakende fiyatı yaklaşık 100 Amerikan doları (USD) seviyesindedir (Anonim, 2025a). Ayrıca, analitik ve farmasotik kalite kontrol uygulamalarında kullanılan, $\geq 98\%$ HPLC saflığındaki rosmarinik asit referans standartları da yüksek maliyetlidir. Uluslararası kimyasal tedarik firmaları tarafından toz formda sunulan bu standartların 10 mg’lık ambalajları, yaklaşık 63 Euro (EUR) fiyatla piyasaya arz edilmektedir (Anonim, 2025b).

2.3. *Melissa officinalis* (oğul otu) Bitkisinin Sekonder Metabolit İçeriği ve Biyolojik Aktiviteleri

Melissa officinalis L., Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait, çok yıllık otsu bir tıbbi ve aromatik bitkidir. Kökeni Akdeniz bölgesi, Batı Asya ve Kuzey Afrika olan bu tür,

farmasotik, medikal, gıda ve aromaterapi uygulamalarında yaygın şekilde değerlendirilmektedir (Aharizad ve ark., 2012). Nektar içeriği bakımından zengin çiçeklere sahip olması nedeniyle bal arıları tarafından yoğun ilgi gören bu bitki, bu özelliği dolayısıyla halk arasında "oğul otu" olarak adlandırılmaktadır. Türkiye’de ayrıca "kovan otu", "limon nanesi" ve "melisa otu" gibi farklı yöresel isimlerle de tanınmaktadır (Baytop, 1984).

Oğul otu sahip olduğu farmakolojik özellikleri ve çok yönlü kullanım potansiyeli ile gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde hem ekonomik hem de terapötik açıdan önemli bir bitki türü olarak öne çıkmaktadır. İlaç endüstrisinde, özellikle anksiyolitik, nootropik ve antioksidan etkileri nedeniyle, zihinsel sağlık ve bilişsel fonksiyonların desteklenmesine yönelik bitkisel takviye formülasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda ve içecek sektöründe ise ferahlatıcı tadı ve aromatik profili sayesinde çay, yemek ve çeşitli içeceklerin formülasyonlarında tercih edilmektedir. Kozmetik uygulamalarda ise yatıştırıcı, antioksidan ve antimikrobiyal özellikleri sayesinde cilt bariyerini güçlendirmeye, yaşlanma karşıtı etki sağlamaya ve dermal irritasyonları azaltmaya yönelik ürünlerde değerlendirilmektedir. Ayrıca, rahatlatıcı ve anksiyete giderici etkilerinden dolayı *M. officinalis* esansiyel yağı, aromaterapide stres yönetimi için doğal bir ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Shakeri ve ark., 2016).

Bitkinin biyolojik aktivite spektrumu oldukça geniştir. Antibakteriyel, antifungal (Abdel-Naime ve ark., 2019), antioksidan (Abdellatif ve ark., 2023), antikanser (De Sousa ve ark., 2004), antiviral (Allahverdiyev ve ark., 2004), antidepresan, anksiyolitik (Zam ve ark., 2022) ve nöroprotektif (López ve ark., 2009) etkiler gösterdiği çeşitli çalışmalarda raporlanmıştır. Bu geniş farmakolojik aktivite bitkinin zengin sekonder metabolit içeriğine dayanmaktadır. *Melissa officinalis*, uçucu yağlar (Behzadi ve ark., 2023), triterpenler (Janicsák ve ark., 2006), fenolik asitler ve flavonoidler (Dastmalchi ve ark., 2008) gibi çeşitli biyoaktif bileşenler açısından zengindir. En önemli fenolik bileşeni rosmarinik asit olup; kafeik asit, kaftarik asit, gentisik asit, klorojenik asit, p-kumarik asit ve ferulik asit gibi bileşenler de fitokimyasal profilin temelini oluşturmaktadır (Barros ve ark., 2013; Guran ve ark., 2021)

2.4 Bitki Doku Kùltürü Yöntemleri ile Sekonder Metabolit Üretimi

Bitki doku kùltürü, bitki hücrelerinin, dokularının veya organ parçalarının aseptik koşullar altında; sıcaklık, ışık ve nem gibi çevresel parametrelerin kontrollü olarak sağlandığı özel besin ortamlarında *in vitro* olarak kùltüre alınması yoluyla yeni bitkilerin üretilmesi ve çoğaltılmasını amacını taşıyan bir teknik olarak tanımlanmaktadır (Thorpe, 1990). Başlıca doku kùltürü yöntemleri arasında kallus, anter-ovul, organ, protoplast, embriyo, meristem, sürgün, kök, saçak kök, süspansiyon kùltürleri önemli yer tutmaktadır. Bu yöntemler, hızlı ve etkin çoğaltım, hastalık ve virüslere karşı temiz materyal üretimi, genetik kaynakların (germplazm) korunması, gen transferi, somatik hibridizasyon, *in vitro* seleksiyon, somaklonal varyasyon oluşturma, haploid bitki üretimi, sentetik tohum geliştirme ve özellikle sekonder metabolitlerin biyoteknolojik üretimi gibi çok çeşitli uygulama alanlarında kullanılmaktadır (Babaoğlu ve ark., 2001; Onay ve ark., 2019).

Geleneksel olarak bitkisel sekonder metabolitler, doğal ortamlarından toplanan ya da tarımsal alanlarda yetiştirilen bitkilerden elde edilmektedir. Ancak, bu yaklaşımlar birçok kısıtlamaya sahiptir. Bitkilerde metabolit sentezi; toprak yapısı, abiyotik stresler, iklimsel ve mevsimsel farklılıklar gibi çevresel etkenlerden yoğun şekilde etkilenmektedir (Toivonen, 1993). Ayrıca, değerli metabolitler bitkilerde genellikle düşük konsantrasyonlarda bulunmakta ticari anlamda yeterli verim alınabilmesi için geniş çaplı tarımsal üretim gerekmektedir; bu durum ise yüksek üretim maliyetlerine neden olmaktadır. Öte yandan, özellikle tıbbi amaçlarla yabani bitkilerin aşırı toplanması, doğal popölasyonların azalmasına, biyolojik çeşitliliğin tehdit altına girmesine ve türlerin yok olma tehlikesiyle karşılaşmasına yol açmaktadır (Muranaka ve Saito, 2010).

Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve metabolit üretiminde sürdürülebilirlik sağlamak için, bitki doku kùltürü teknikleri yenilikçi biyoteknolojik çözümler olarak öne çıkmaktadır. Kontrollü laboratuvar koşullarında bitkinin optimal gelişim ortamı sağlanarak, hedef metabolitlerin kesintisiz, yüksek verimle ve standart kaliteyle üretimi mümkün hale gelmektedir (Selwal ve ark., 2023). Çeşitli bitki doku kùltürü yöntemleri kullanılarak farklı bitki türlerinden elde edilen sekonder metabolitlerin kaynakları ve özellikleri Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Çeşitli bitki doku kültürü yöntemleri ile farklı bitki türlerinden elde edilen sekonder metabolitler
(Vanisree ve ark. 2004; Karuppusamy, 2009)

Kullanılan Bitki Doku Kültürü Yöntemi	Kullanılan Bitki	Üretilen Metabolit
Kallus	<i>Stevia rebaudiana</i>	Steviosit
	<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Sterol ve Fenolik Bileşikler
	<i>Frangula alnus</i>	Antrakinin
	<i>Coffea arabica</i>	Kafein
	<i>Capsicum annum</i>	Kapsaisin
	<i>Silybum marianum</i>	Silimarın
	<i>Cassia acutifolia</i>	Antrakinin
	<i>Vitis vinifera</i>	Resveratrol
Süspansiyon	<i>Ephedra sp.</i>	L-Efedrin
	<i>Papaver somniferum</i>	Morfin ve Kodein
	<i>Ailanthus altissima</i>	Alkaloidler
	<i>Podophyllum hexandrum</i>	Podofilotoksin
	<i>Anchusa officinalis</i>	Rosmarinik asit
	<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkosid-A
	<i>Camptotheca acuminata</i>	Kamptoteşin
	<i>Catharanthus roseus</i>	Indol alkaloid
Saçak Kök	<i>Papaver somniferum</i>	Kodein
	<i>Sesamum indicum</i>	Naftakinon
	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Flavonoidler
	<i>Solanum aculeatissi</i>	Steroid al saponin
	<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Kamptoteşin
	<i>Rheum ribes</i>	Kateşin
	<i>Coscinium fenestratum</i>	Berberin

2.4.1. Adventif Kök Kültürleri ile Sekonder Metabolit Üretimi

Adventif köklerin hızlı büyüme yetenekleri ve sekonder metabolit üretiminde sağladıkları genetik ve biyokimyasal stabilite, tıbbi ve ekonomik açıdan değerli bitki türlerinde metabolit verimliliğini artırmaya yönelik biyoteknolojik araştırmalara ivme kazandırmıştır. Bitki doku kültürü uygulamaları içinde öne çıkan bu sistemler, değerli biyoaktif bileşiklerin sürdürülebilir, kontrollü ve standardize koşullarda üretimini mümkün kılarak tarım, sağlık, farmasötik, pigment ve boya gibi çeşitli endüstriyel alanlar

için yüksek verimli bir üretim platformu sunmaktadır (Nasiri-Bezenjani ve ark., 2011; Murthy ve ark., 2014).

Adventif kökler, bitkilerin primer kök sisteminden bağımsız olarak yaprak, gövde, hipokotil veya nod (boğum) gibi vejetatif organlardan gelişen ve çevresel stres koşullarına karşı bitkinin fizyolojik adaptasyonu sonucu oluşan yapılardır (Rahmat ve Kang, 2019). Opin benzeri bileşikler üretmemeleri, bakteriyel DNA taşınamaları, genetik transformasyona ihtiyaç duymamaları ve hızlı büyüme kapasiteleri sayesinde saçak köklerden ayrılmaktadır. Bu yapısal ve biyokimyasal üstünlükleri, özellikle saflık ve üretim stabilitesinin kritik olduğu farmasötik uygulamalarda, adventif kök kültürlerini saçak kök kültürlerine kıyasla daha güvenilir, etkili ve çevresel olarak sürdürülebilir bir üretim platformu haline getirmektedir (Gaosheng ve Jingming, 2012; Murthy ve ark., 2016; Lee ve ark., 2017). Adventif kök kültürlerinin üretim potansiyeli, pek çok tıbbi bitki türü üzerinde yapılan çalışmalarda incelenmiştir. Örneğin *Panax ginseng* türüne ait adventif kök kültürleri kullanılarak anti-inflamatuar ve antioksidan özelliklere sahip ginsenosidlerin etkin şekilde üretildiği rapor edilmiştir (Murthy ve ark., 2018; Kim ve ark., 2009).

Adventif köklerin endüstriyel ölçekte uygulanabilirliğini artırmak amacıyla, üretim süreçleri kontrollü biyoreaktör sistemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir (Murthy ve ark., 2008; Wu ve ark., 2018b; Khanam ve ark., 2022). Bu sistemler, optimize edilmiş havalandırma, karıştırma ve besin desteği ile kök biyokütlesinin verimli şekilde artmasını sağlarken, aynı zamanda sekonder metabolit birikimini de belirgin biçimde teşvik etmektedir (Baque ve ark., 2012a). Bu doğrultuda gerçekleştirilen bir çalışmada *Ocimum basilicum* L. türüne ait adventif kök kültürleri hava kaldırma (airlift) biyoreaktör sisteminde değerlendirilmiş ve Murashige ve Skoog (MS) besiyeri ile indol-3-bütirik asit (IBA) konsantrasyonları optimize edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, %0.75 MS ve 2 mg L⁻¹ IBA içeren kombinasyonun, biyokütle artışı ve rosmarinik asit üretimi açısından en uygun koşulları sağladığını ortaya koymuştur (Karataş, 2022b).

2.5. Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Uygulamalar

Sekonder metabolitlerin bitki doku kültürü yöntemleriyle üretiminin artırılması, son yıllarda çeşitli biyoteknolojik ve çevresel stratejiler aracılığıyla araştırmacıların ilgi odağı

olmuştur. Bu stratejiler arasında özellikle metabolik mühendislik yaklaşımları, genetik düzeyde yapılan düzenlemelerle ön plana çıkmaktadır. Bu yöntemler, hedef metabolitin biyosentezinde rol oynayan enzimlere ait genlerin aşırı eksprese edilmesi veya susturulması yoluyla, metabolit akışının optimize edilmesini sağlamaktadır (Isah ve ark., 2018). Farmakolojik olarak tümörögenezi inhibe edici etkileriyle bilinen apigenin bileşiği *Saussurea involucrata* bitkisinde doğal olarak düşük seviyelerde bulunmaktadır. Bu sınırlılığı aşmak amacıyla, bitkiden türetilen saçak kök kültürüne kalkon izomeraz (CHI) geninin aktarılmasıyla, genin aşırı ekspresyonu sağlanmış ve kontrol grubuna kıyasla 12 kat daha yüksek apigenin üretimi elde edilmiştir (Li ve ark., 2006). Benzer şekilde, *Catharanthus roseus* bitkisinde antikanser özellik gösteren vinblastin ve vinkristin alkaloidlerinin biyosentez yolları genetik olarak düzenlenmiş ve böylece üretim miktarlarında anlamlı artışlar sağlandığı rapor edilmiştir (Verpoorte ve ark., 2002). Ayrıca CRISPR/Cas9 gibi gelişmiş genom düzenleme teknikleri, genetik mekanizmaların hassas modifikasyonu ile hedef metabolitlerin veriminde önemli iyileştirmeler sağlamaktadır. Örneğin, *Catharanthus roseus* bitkisinde vinblastin üretiminden sorumlu genlere uygulanan CRISPR tabanlı müdahaleler metabolit seviyelerinde kayda değer artışlar elde edilmiştir (Li ve ark., 2020b).

Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik bir diğer etkili yaklaşım öncül bileşiklerin kültür ortamına eklenmesidir. Hedef metabolitin biyosentez yolunun bilindiği durumlarda, bu yolda yer alan başlangıç ya da ara ürünlerin ortama ilave edilmesi, enzimatik reaksiyonları uyararak metabolit düzeylerinde anlamlı artışlara yol açmaktadır (Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Özellikle şikimik asit gibi öncül maddelerin varlığının fenolik bileşiklerin sentezini hızlandırdığı yönünde bulgular mevcuttur (Santos-Sánchez ve ark., 2019). Bunun yanında nanoteknolojik yaklaşımlar da metabolit üretimini artırmaya yönelik önemli stratejiler arasında yer almaktadır. Özellikle gümüş ve titanyum dioksit nanopartiküllerinin, bitki hücrelerinde biyosentez yollarını aktive ederek metabolit sentezini artırdığı bildirilmiştir (Agrahari ve Dubey, 2020).

Biyoreaktör sistemlerinin tasarımı ve ortam koşullarının (pH, sıcaklık, oksijen transferi, çalkalama hızı vb.) optimizasyonu, üretim süreçlerinin verimliliğini doğrudan etkileyen kritik teknik unsurlardır (Li ve Wang, 2021). Ayrıca, elisitör uygulamaları, bitki hücre kültürlerinde sıklıkla tercih edilen bir diğer etkili yaklaşımdır. Elisitörler; mikrobiyal kaynaklı ekstraktlar, fungal polisakkaritler gibi biyotik veya UV ışınımı, ozon, ağır

metaller gibi abiyotik stres faktörleri olabilir ve bitki hücrelerinde savunma mekanizmalarını tetikleyerek sekonder metabolit üretimini artırabilmektedir (Namdeo, 2007).

2.5.1. Elisitör Uygulamaları

Elisitörler, bitki hücrelerinde savunma mekanizmalarını aktive ederek sekonder metabolit üretimini artıran biyotik veya abiyotik kökenli uyarıcılardır. Bitki hücre zarında bulunan özgül reseptörler tarafından algılanan bu uyarıcılar hücre içi sinyal iletim mekanizmalarını tetiklemektedir. Sinyal iletimi sonucunda hücre içi kalsiyum iyonu (Ca^{2+}) düzeylerinde ani bir artış meydana gelmekte ve reaktif oksijen türleri (ROS) üretilmektedir. ROS'lar, hem oksidatif stres yanıtını tetiklemekte hem de metabolit biyosentezinde görevli enzimlerin aktivitesini artırmaktadır (Namdeo, 2007; Agrahari ve Dubey, 2020). Reaktif oksijen türlerinin üretimi ile eş zamanlı olarak Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) yollarının aktive olmasıyla savunma genlerinin ekspresyonu artmakta; jasmonik asit (JA) ve salisilik asit (SA) gibi fitohormonların etkisiyle fenilpropanoid metabolizması başta olmak üzere çeşitli biyosentetik yollar uyarılmaktadır (Haghpanah ve ark., 2025; Kim ve ark., 2011). Ayrıca, elisitörler hücre duvarında yapısal modifikasyonlara neden olarak, sentezlenen metabolitlerin hücre dışına taşınmasını kolaylaştırmakta ve böylece üretim sürecinin verimliliğini önemli ölçüde artırmaktadır. (Kim ve ark., 2011).

Elisitör uygulamalarının başarısı; başta elisitörün tipi ve kaynağı (biyotik/abiyotik) olmak üzere, uygulama dozu, hücrelerin elisitöre maruz kalma süresi, kültür tipi, besiyeri kompozisyonu kullanılan hücre hattının genetik yapısı ve gelişim evresi gibi pek çok faktöre bağlı olarak farklılık göstermektedir (Karataş, 2013; Halder ve ark., 2019). Ayrıca ortam pH'ı, sıcaklık, ışık koşulları ve elisitörlerin tekli veya kombinasyon halinde uygulanması da yanıt üzerinde belirleyicidir. Bitki türü ve genotipe özgü farklılıklar göz önüne alındığında, elisitör temelli uygulamalar karmaşık bir optimizasyon süreci gerektirmektedir (Naik ve Al-Khayri, 2016) Elisitörler, kimyasal yapıları ve kökenlerine bağlı olarak farklı kategorilere ayrılmaktadır. Yapısal özelliklerine göre biyotik (canlı organizmalardan türeyen) ve abiyotik (canlı kökenli olmayan fiziksel veya kimyasal ajanlar) elisitörler olarak sınıflandırılırken; kaynaklarına göre ise bitki tarafından doğal

olarak üretilen endojen elisitörler ile dış ortamdan uygulanan egzojen elisitörler şeklinde gruplandırılmaktadır. Elisitörlerin detaylı sınıflandırmaları Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Elisitörlerin sınıflandırılması, tanımı ve örnekleri (Namdeo, 2007)

Sınıflandırma	Elisitör türü	Tanım/ Açıklama	Örnekler
Yapılarına Göre Elisitörler	Biyotik Elisitörler	Canlı organizmalardan veya onların bileşenlerinden türetilen elisitörler.	Maya ekstraktı (yeast extract), Kitin, kitosan, Glukanlar, Bakteriyel ekstraktlar
	Abiyotik Elisitörler	Canlı olmayan kimyasal ya da fiziksel faktörlerden oluşan elisitörler.	Ag ⁺ (gümüş iyonları), UV ışınları, Jasmonik asit, Salisilik asit, Etilen, Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂), Ozon
Kökenlerine Göre Elisitörler	Eksojen Elisitörler	Hücreye dış ortamdan verilen elisitörler.	Maya ekstraktı (yeast extract), Jasmonik asit, Salisilik asit, Gümüş iyonları, Fungal ekstraktlar
	Endojen Elisitörler	Hücre tarafından kendi içinde üretilen veya metabolik süreçler sonucu oluşan elisitörler.	Oligosakkaritler, Reaktif oksijen türleri (ROS), İç kaynaklı sinyal molekülleri

Biyotik kökenli elisitörlerden biri olan maya ekstraktı (yeast extract), fenilpropanoid metabolizmasını aktive ederek fenolik bileşiklerin sentezini artırmaktadır. Bu etki, başta fenilalanin amonyak liyaz (PAL) ve tirozin aminotransferaz (TAT) olmak üzere, ilgili anahtar enzimlerin aktivitesindeki artış ile ilişkilidir (Namdeo, 2007; Park ve ark., 2016). *Salvia miltiorrhiza* saçak kök kültürlerinde gerçekleştirilen bir çalışmada maya ekstraktı uygulamasının rosmarinik asit birikimini önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır. Bu çalışmada, maya ekstraktının, özellikle tirozin aminotransferaz (TAT) aktivitesini yükselterek rosmarinik asit biyosentezini teşvik ettiği, buna karşın fenilalanin amonyak liyaz (PAL) aktivitesini baskıladığı gözlemlenmiştir. Bu bulgular, maya ekstraktının sekonder metabolit üretiminde özellikle tirozin kaynaklı fenilpropanoid yolunu aktive ederek etkili olduğunu göstermektedir (Yan ve ark., 2006). *Ocimum basilicum* adventif kök süspansiyon kültürlerinde uygulanan farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarının, rosmarinik asit, toplam fenolik bileşikler ve flavonoid içeriği üzerinde anlamlı düzeyde

artışlara neden olduğu; bu artışların uygulanan ekstrakt konsantrasyonu ile doğrusal bir ilişki sergilediği bildirilmiştir (İrten, 2022). Benzer şekilde *Ocimum basilicum* L. var. *purpurascens* (mor reyhan) kallus kültürlerinde yürütülen bir başka çalışmada, 100 mg L⁻¹ düzeyindeki maya ekstraktı uygulamasının rosmarinik asit, kafeik asit ve antosiyanin gibi değerli metabolitlerin birikimini teşvik ettiği ve bununla birlikte kallusların toplam antioksidan kapasitesini de anlamlı biçimde yükselttiği rapor edilmiştir (Zaman ve ark., 2022).

2.6. Rosmarinik Asitin Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ile Üretimi

Rosmarinik asit, güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal etki gösteren fenolik grubu değerli bir sekonder metabolittir. İlk olarak 1958 yılında *Rosmarinus officinalis* (biberiye) bitkisinden izole edilerek tanımlanan bu bileşik (Scarpati ve Oriente, 1958; Ribeiro-Santos ve ark., 2015), Lamiaceae ve Boraginaceae familyalarına ait türlerde bulunduğu bildirilmiştir. Özellikle *Ocimum basilicum* (fesleğen), *Lavandula angustifolia* (lavanta), *Melissa officinalis* (oğulotu) ve *Salvia officinalis* (adaçayı) gibi türlerde önemli düzeylerde tespit edilmiştir (Nazir ve ark., 2019; Khadem ve ark., 2022). Rosmarinik asidin biyosentezi, birçok enzimin ve metabolik yolun etkileşimini içeren kompleks bir süreçtir. Kimyasal sentez yöntemleri ise ara bileşiklerin kararsızlığı ve yüksek hassasiyet gerektiren reaksiyon koşulları nedeniyle sınırlamalar içermektedir (Pu ve ark., 2024). Bu bağlamda, bitki doku kültürü teknikleri, rosmarinik asidin sürdürülebilir ve kontrollü koşullarda üretimi için güçlü bir alternatif sunmaktadır.

Farklı tıbbi bitkilerde yapılan *in vitro* kültür çalışmalarında, ortam bileşimi, büyüme düzenleyicileri ve elisitör uygulamalarının rosmarinik asit sentezinde belirleyici rol oynadığını göstermektedir. Bu bağlamda, *Rosmarinus officinalis* (biberiye), *Coleus blumei* (kolyoz), *Ocimum basilicum* (fesleğen), *Salvia officinalis* (adaçayı), *Melissa officinalis* (oğulotu) ve *Lavandula vera* (lavanta) gibi tıbbi bitkilerde çeşitli uygulamaların rosmarinik asit birikimi üzerinde anlamlı şekilde artırdığı ortaya konmuştur. (Khojasteh ve ark., 2014; Trócsányi ve ark., 2020). Bu alandaki öncü çalışmalardan biri olan Razzaque ve Ellis (1977) araştırmasında; *Coleus blumei* hücre süspansiyon kültürlerinde rosmarinik asidin başlıca sekonder metabolit olarak sentezlendiğini bildirmiştir. Takip eden çalışmalarda, jasmonik asit, salisilik asit ve mantar kökenli elisitörlerin kültür ortamına eklenmesinin rosmarinik asit düzeylerinde

kayda değer artış sağladığı gösterilmiştir (Sahu ve ark., 2013; De-Eknamkul ve Ellis, 2014).

O. basilicum kallus kültürlerinde naftalenasetik asit (NAA) ve tidiazuron (TDZ) gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin uygulanması, fenilpropanoid metabolik yolaklarını aktive ederek rosmarinik asit biyosentezini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Nazir ve ark., 2019). Benzer şekilde, *Agastache rugosa* hücre kültürlerinde maya ekstraktı ve gümüş nitrat gibi elisitörlerin kullanımı, ilgili gen ekspresyonlarının indüklenmesi yoluyla sekonder metabolit üretimini anlamlı düzeyde teşvik etmiştir (Park ve ark., 2016).

Farklı bitki doku kültürü tekniklerinin rosmarinik asit üretimine etkisini inceleyen çalışmalar, bu bileşiğin birikiminin kullanılan yönteme bağlı olarak değiştiğini gstermekedir. Rosmarinik asit içerikleri, kullanılan doku kültürü yöntemleri ve ilgili kaynaklar izelge 2.4'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Farklı doku kültürü yöntemleri kullanarak çeşitli bitki türlerinden üretilen rosmarinik asit içeriği

Bitki	Kültür Tipi	Max. RA İçeriği	Referans
<i>Mentha × piperita</i>	Süspansiyon	117.95 mg g ⁻¹ (12% KA)	(Krzyzanowska ve ark., 2012)
<i>Ocimum basilicum</i>	Kallus	23.02 mg g ⁻¹	(Guirgis ve ark. 2007)
<i>Ocimum basilicum</i>	Adventif kök kültürü	20.98 ± 1.38 mg ⁻¹ KA	(Karataş, 2022b)
<i>Ocimum basilicum</i>	Süspansiyon	10 mg g ⁻¹ KA	(Kintzios ve ark., 2003)
<i>Ocimum basilicum</i>	Saçak kök kültürü	14.1% KA	(Tada ve ark., 1996)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Kallus	34.4 mg g ⁻¹	(Yesil-Celiktas ve ark., 2007)
<i>Salvia officinalis</i>	Süspansiyon	6.4 g L ⁻¹ (36%) ve 18.6 mg g ⁻¹ KA	(Grzegorzcyk ve ark., 2007)
<i>Salvia officinalis</i>	Kallus	22.6 g L ⁻¹ ve 5.8 mg g ⁻¹ KA	(Grzegorzcyk ve ark., 2007; Kintzios ve ark., 1999)
<i>Agastache rugosa</i>	Süspansiyon	11.5 mg g ⁻¹	(Lee ve ark., 2008)
<i>Agastache rugosa</i>	Saçak kök kültürü	116.3 mg g ⁻¹ KA	(Lee ve ark., 2008)
<i>Anthoceros agrestis</i>	Süspansiyon	5.1 % KA	(Vogelsang ve ark., 2005)
<i>Coleus blumei</i>	Süspansiyon	210.0 mg g ⁻¹ KA	(Ulbrich ve ark., 1985)
<i>Eryngium planum</i>	Sürgün Kültürü	2.59 mg g ⁻¹ KA	(Kikowska ve ark., 2012)
<i>Eryngium planum</i>	Kallus	16.24 mg g ⁻¹ KA	(Kikowska ve ark., 2012)
<i>Eryngium planum</i>	Süspansiyon	3.91 mg g ⁻¹ KA	(Kikowska ve ark., 2012)
<i>Origanum dictamnus</i>	Adventif kök kültürü	6.6 % (w/w)	(Sarropoulou ve ark., 2023).
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Süspansiyon	1.74 mg g ⁻¹ YA	(Yamamoto ve ark., 2000)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Çalışmada bitkisel materyal olarak kullanılan *Melissa officinalis* (oğul otu) tohumları, Tokat ilinde bulunan Orta Karadeniz Geçit Kuşağı Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü'nden temin edilmiştir.

3.1.2. Cihaz ve Laboratuvar Malzemeleri

Araştırmada kullanılan alet ve cihazlar (marka ve modelleriyle birlikte); Laminar kabin (Bilser), hassas terazi (Precisa), otomatik pipet (Gilson), pH metre (Hanna), santrifüj (Hettich), spektrofotometre (Shimadzu), otoklav (Nüve), manyetik karıştırıcı (Heidolph-MR), çalkalayıcı (Memmert), 0.22 µm gözenek çapına sahip mebran filtre (Sartorius), HPCL (Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus)'den oluşmaktadır.

3.1.3. Kimyasallar

Araştırmada kullanılan kimyasal maddeler, işlevsel gruplarına göre sınıflandırılarak ve temin edildikleri ticari firmalar belirtilerek detaylı şekilde tanımlanmıştır. Çözücü ve Asit-Baz Reaktifleri grubunda; Etanol (Merck), Metanol (Sigma-Aldrich), Diklorometan (Sigma-Aldrich), formik asit (Sigma-Aldrich), hidroklorik asit (HCl; Merck), sodyum hidroksit (NaOH; Merck), trikloroasetik asit (Sigma-Aldrich) yer almaktadır. Bitki gelişim düzenleyicileri ve besi ortamı bileşenleri kapsamında ise Murashige and Skoog (MS) temel besi ortamı (Duchefa) , Giberellik asit (GA₃; Merck), Indol-3-bütirik asit (IBA; Merck), Sükroz (Duchefa), Phytigel (Sigma), Maya ekstraktı (Duchefa), Tween-20 (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Antioksidan aktivite ve fenolik içerik analizinde kullanılan reaktifler arasında Folin-Ciocalteu reaktifi (Merck), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil; Sigma), ABTS [2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit); Sigma], Alüminyum klorür (AlCl₃; Merck), Sodyum karbonat (Na₂CO₃; Merck), Potasyum persülfat (K₂S₂O₈; Sigma-Aldrich), Ferrik klorür (FeCl₃; Sigma-Aldrich), potasyum ferrisiyanür (K₃[Fe(CN)₆]; Merck), sodyum asetat (CH₃COONa; Sigma-Aldrich) bulunmaktadır. Ayrıca spektrofotometrik analizlerde kullanılmak üzere Kuersetin (Sigma) ve Gallik asit (Sigma); HPLC analizlerinde ise Rosmarinik asit (≥%98 saflıkta; Sigma) referans standartlar olarak kullanılmıştır.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Tohumların Çimlendirilmesi ve Steril Fidelerin Elde Edilmesi

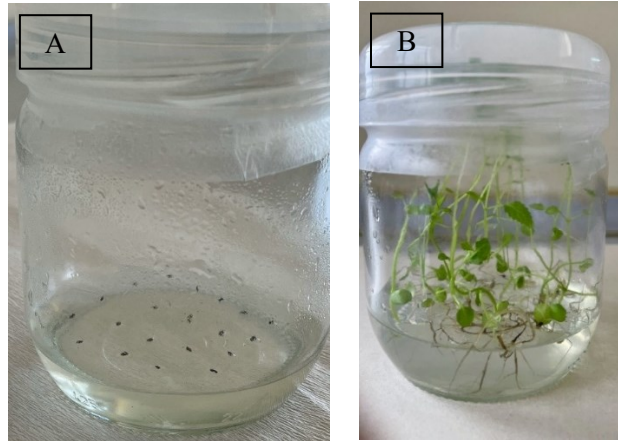
Eksplant kaynağı olarak kullanılan oğul otu bitkilerinin tohumları, çimlendirme öncesinde yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. Bu amaçla, tohumlar öncelikle %75 (v/v) etanol çözeltisinde 30 saniye süreyle hafifçe çalkalanmış ardından etanol çözeltisi süzülerek tohumlardan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra %2.5 (v/v) sodyum hipoklorit çözeltisi içerisine iki damla Tween-20 ilave edilerek 15 dakika süreyle düşük hızda manyetik karıştırıcıyla karıştırılmıştır. Sterilizasyon işleminin ardından, tohumlar kalıntı kimyasallarından arındırılmak amacıyla steril saf su ile dört kez, her biri beşer dakika sürecek şekilde durulanmıştır.

Bitki tohumlarının çimlenmesi ve fide gelişiminde kullanılan cam kültür kavanozları 121°C'de, 1.2 atm basınç altında, 15 dakika süreyle otoklavlanarak sterilize edilmiştir. Steril kavanozlara dökülecek olan besi ortamı, 4.4 g L⁻¹ Murashige ve Skoog, 1962 (MS) bazal ortamı, 30 g L⁻¹ sükroz ve 2 g L⁻¹ phytigel içerecek şekilde hazırlanmıştır. Ortamın pH'sı (1 M NaOH veya 1 M HCl kullanılarak) 5.8'e ayarlandıktan sonra, 121°C'de, 1.2 atm basınç altında, 20 dakika süreyle otoklavlanarak sterilizasyon sağlanmıştır. Daha sonra laminar kabin içerisinde, besin ortamının pH'sı 5.8'e ayarlanmış ve 0.22 µm membran filtreden geçirilerek 2 mg L⁻¹ giberellik asit (GA₃) ilave edilmiştir. Hazırlanan besi ortamı, her bir kavanoza yaklaşık 50 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. MS besin ortamının içeriği Çizelge 3.1'deki gibi verilmiştir.

Çizelge 3.1. MS temel besi ortamı içeriği
(Murashige ve Skoog, 1962)

İçerik	mg/L
KNO ₃	1900
NH ₄ NO ₃	1650
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6
H ₃ BO ₃	6,2
KI	0,83
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
CoCl ₂ ·6 H ₂ O	0,025
myo-inositol	100
Thiamin- HCl	0,1
Nikotinik asit	0,5
Pridoksin HCl	0,5
Na ₂ EDTA	37,30
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,80
Glisin	2

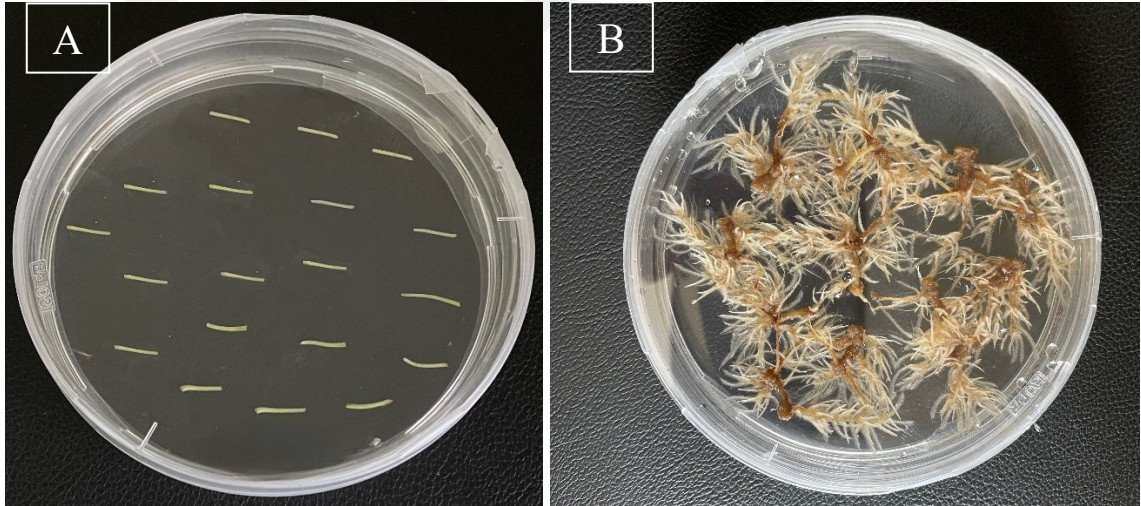
Sterilizasyon ve besin ortamı hazırlığı tamamlandıktan sonra her kavanoza 20 tohum yerleştirilerek ekim işlemi gerçekleştirilmiştir. Tohumların çimlenme süreci (10 gün) karanlık koşulda gerçekleştirilmiş olup ardından bu ortamda gelişen fideler 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyot koşullarında 50 gün boyunca yetiştirilmiştir. Şekil 3.1’de tohumların ekimi ve gelişen bitkilere ait görsel verilmiştir.



Şekil 3.1. Eksplant kaynağı olarak kullanılan oğul otu bitkilerinin *in vitro* koşullarda yetiştirilmesi (A) Tohumların cam kavanozlara ekimi (B) Bitki gelişimi

3.2.2. Katı Kültür Koşullarında Adventif Köklerin İndüksiyonu

Adventif kök kültürünün başlatılmasında kullanılan kültür ortamı 4.4 g L⁻¹ Murashige ve Skoog (MS) bazal tuzları, 30 g L⁻¹ süktroz, 1 mg L⁻¹ indol-3-bütirik asit (IBA) ve 2 g L⁻¹ phytigel içerecek şekilde hazırlanmıştır. Ortamın pH değeri 5.8'e ayarlandıktan sonra, 121°C ve 1.2 atm basınçta, 20 dakika boyunca otoklavlanarak sterilizasyon sağlanmıştır. Sterilize edilen besin ortamı laminar kabin içerisinde 9 mm çapındaki petri kaplarına dağıtılmıştır. Adventif kök oluşumunun teşvik edilmesi amacıyla eksplant kaynağı olarak *in vitro* koşullarda yetiştirilen *Melissa officinalis* L. bitkilerine ait 50 günlük fidelerinin hipokotil kısımları kullanılmıştır. Yaklaşık 1 cm uzunluğunda kesilen bu parçalar, daha önce hazırlanmış besin ortamlarına transfer edilmiştir. Bu ortam koşullarında gelişen adventif kökler 21. günde aynı içeriğe sahip taze besin ortamına aktarılarak alt kültüre alınmıştır. Tüm kültürler, 25±2°C sıcaklıkta ve karanlık koşullar altında inkübe edilmiştir. Hipokotil parçalarının başlangıçta besin ortamına yerleştirilmesi ve bu hipokotillerden gelişen adventif köklerin görünümüne ait resimler Şekil 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.2. Hipokotil eksplantlarından adventif köklerin gelişimi ((A) hipokotil eksplantları, (B) gelişen adventif kökler)

3.2.3. Sıvı Kültür Koşullarında Adventif Köklerin Çoğaltılması

Adventif kök kültürde optimizasyon çalışmalarının başlatılması için katı besin ortamında gelişen adventif kökler sıvı kültür ortamında çoğaltılmıştır. Süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan besin ortamı, katı ortamınkinden farklı olarak içerisinde

katılaştırıcı madde (phytagel) içermemektedir. Bu amaç doğrultusunda hazırlanan sıvı besin ortamı 4.4 g L^{-1} MS, 30 g L^{-1} süktroz ve 1 mg L^{-1} IBA içermektedir. Besin ortamının pH değeri 5.8'e getirilerek, 121°C 'de, 1.2 atm basınç altında, 20 dakika süreyle otoklavlanarak sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Steril edilen besin ortamı 250 mL'lik erlenmayerlere her birinde 125 mL olacak şekilde dağıtılmıştır. Daha sonra adventif kökler bu erlenmayerlere her birinde 2 g olacak şekilde aktarılmıştır. Ardından adventif kökler karanlık koşullar altında $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta çalkalayıcı (120 rpm dk^{-1}) üzerinde 10 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

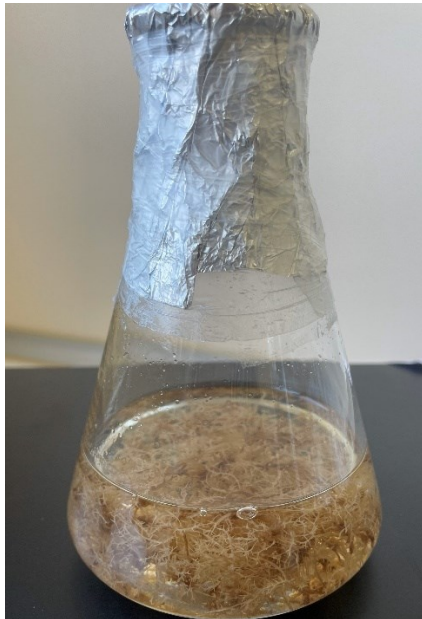
3.2.4. Süspansiyon Kültür Koşullarında Besin Ortamı Bileşenlerinin Optimizasyonu

Adventif kök süspansiyon kültürlerinde besin ortamı bileşenlerinin sekonder metabolit üretimi ve biyokütle gelişimi üzerine etkilerini değerlendirmek amacıyla optimizasyon çalışmaları yürütülmüştür. Bu kapsamda, süktroz, indol-3-bütirik asit (IBA) ve Murashige ve Skoog (MS) konsantrasyonlarının söz konusu parametrelere etkisini değerlendirmek üzere üç ayrı deney grubu oluşturulmuştur. Birinci deney grubunda IBA (2 mg L^{-1}) ve MS (4.4 g L^{-1} ; $1 \times$ MS gücü) sabit tutulurken, süktroz konsantrasyonları 10, 20, 30, 40 ve 50 g L^{-1} olacak şekilde beş farklı düzeyde uygulanmıştır. İkinci deney grubunda ise, süktroz (30 g L^{-1}) ve IBA (2 mg L^{-1}) sabit tutulmuş, MS konsantrasyonları ise (0.5 MS gücü için 2.2 g L^{-1} ; 0.75 MS gücü için 3.3 g L^{-1} ; 1 MS gücü için 4.4 g L^{-1} ; 1.25 MS gücü için 5.5 g L^{-1} ; 1.5 MS gücü için 6.6 g L^{-1}) test edilmiştir. Üçüncü deney grubunda, MS gücü $1 \times$ (4.4 g L^{-1}) ve süktroz 30 g L^{-1} sabit tutulurken, IBA konsantrasyonları 0.5, 1, 2 ve 4 mg L^{-1} seviyelerinde uygulanmıştır. Süspansiyon kültürlerinde gerçekleştirilen besin ortamı bileşenlerinin optimizasyon çalışmalarına ait bileşen miktarları ve uygulama konsantrasyonlarına ilişkin bilgiler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. *M. officinalis* adventif kök süspansiyon kültüründe yürütülen optimizasyonun çalışmaları kapsamında kullanılan besin ortam kombinasyonları

Çalışma grupları	Sükroz Konsantrasyonu (g L ⁻¹)	IBA Konsantrasyonu (mg L ⁻¹)	MS Konsantrasyonu (g L ⁻¹)
Sükroz optimizasyonu	10 (%1)	2	1
	20 (%2)	2	1
	30 (%3)	2	1
	40 (%4)	2	1
	50 (%5)	2	1
MS optimizasyonu	30	2	0.5 MS (2.2 g L ⁻¹)
	30	2	0.75 MS (3.3 g L ⁻¹)
	30	2	1 MS (4.4 g L ⁻¹)
	30	2	1.25 MS (5.5 g L ⁻¹)
	30	2	1.5 MS (6.6 g L ⁻¹)
IBA optimizasyonu	30	0.5	1
	30	1	1
	30	2	1
	30	4	1

Her deney grubunda, 125 mL besin ortamı içeren erlenmayerlere 4 g adventif kök eklenmiş ve kültürler 25 ± 2 °C sıcaklık, 120 rpm/dakika çalkalama hızında karanlık ortam koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda (30 gün) adventif kökler hasat edilip yaş ağırlıkları ölçülmüş ve analiz için kurutulmuştur. Süspansiyon kültürlerdeki adventif köklerin genel görünümüne ait resimler Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3.3. Süspansiyon kültürlerdeki adventif köklerin genel görünümü

3.2.5. Adventif Kök Süspansiyon Kültürlerine Maya Ekstraktı Uygulamaları

Adventif kök süspansiyon kültürü optimizasyon çalışmalarında belirlenen ortam koşulları (0.5 MS, 30 g L⁻¹ sükroz ve 2 mg L⁻¹ IBA) altında elde edilen adventif köklere elisitör olarak maya ekstraktı uygulanmıştır. Hazırlanan besin ortamında kültüre alınan adventif kökler, kültür sürecinin 10. gününde aynı bileşenleri içeren besin ortamına alt kültüre alınmıştır. Kültür sürecinin 20. gününde besin ortamına farklı konsantrasyonlarda maya ekstraktı (50, 100, 200 µg mL⁻¹) ilave edilmiştir. Elisitör uygulamasının ardından 72 saatlik inkübasyon süreci sonunda adventif kökler hasat edilerek yaş ağırlıkları belirlenmiş; ardından kurutularak diğer kimyasal analizler için uygun hale getirilmiştir.

3.2.6. Analizlerde Kullanılacak Adventif Kök Ekstraktlarının Hazırlanması

Sekonder metabolit içeriği ve antioksidan aktivite düzeylerinin belirlenmesinde kullanılan ekstraktların hazırlanmasında 0.2 g kurutulmuş adventif kök örneği kullanılmıştır (Karataş, 2022a). Her bir örnek 10 mL hacmindeki metanol-diklorometan (4:1) çözeltisi ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyon işleminin ardından, süspansiyon 0.22 µm gözenek çapına sahip membran filtreden geçirilerek filtre edilmiştir. Hazırlanan ekstraktlar, sekonder metabolit düzeyleri ve antioksidan kapasitelerinin analizinde kullanılmak üzere amber şişelerde +4 °C’de, karanlık koşullarda muhafaza edilmiştir.

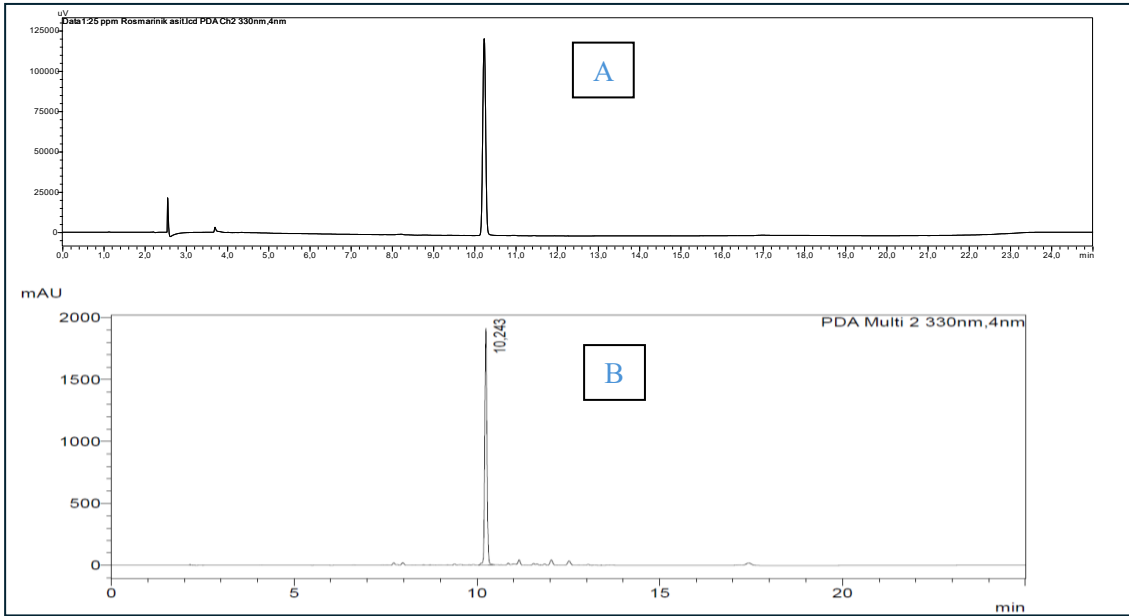
3.2.7. Rosmarinik Asit İçeriğinin Belirlenmesi

Adventif kök örneklerindeki rosmarinik asit miktarının belirlenmesinde yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) cihazı kullanılmıştır. Analiz protokolü, Karataş (2022a) ve İrten (2022) tarafından bildirilen yöntem temel alınarak uygulanmıştır. Kullanılan HPLC cihazına ait gradiyent programı ve cihazın çalışma koşulları Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Rosmarinik asit analizinde kullanılan HPLC koşulları

Parametre	Koşullar
Kolon	GL Sciences InterSustain (Japonya) menşeli Phenylhexyl (4.6 x 150 mm) kolonu
Dedektör	Photodiode Array Detector (PDA)
Kolon Akış Hızı	1 mL /dakika
Kolon Sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
Dalga Boyu	330 nm
Mobil Faz	Çözücü A:%0.1formik asit içeren deiyonize su; Çözücü B: Asetonitril
Gradient Programı	0 dak., %100 A ve %0 B 5 dak., %80 A ve %20 B 10 dak., %50 A ve %50 B 15 dak., %30 A ve %70 B 20 dak., %100 A ve %0 B 25 dak., %100 A ve %0 B

Rosmarinik asit miktarları, standart çözeltiler kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrisi temel alınarak hesaplanmıştır. Standart rosmarinik asit bileşiği ve adventif köklere ait kromatogramlar Şekil 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.4. Rosmarinik asit bileşiği standardına (A) ve adventif kök (B) ait HPCL kromatogramı

3.2.8. Toplam Flavonoid Miktarının Belirlenmesi

Toplam flavonoid miktarı Pekal ve Pyrzynska (2014) metoduna göre belirlenmiştir. Her bir analiz tüpüne 100 µL numune ekstraktı alınmıştır. Ardından, tüplere sırasıyla 1.5 mL etanol, 100 µL %10'luk alüminyum klorür ($AlCl_3$) çözeltisi ve 100 µL 1 M sodyum asetat ($NaCH_3COO$) eklenmiş; son hacim saf su ile 5 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan reaksiyon karışımları, flavonoid-alüminyum kompleksi oluşumunun gerçekleşmesi amacıyla 30 dakika süreyle oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda, karışımların absorbans değerleri spektrofotometrik olarak 427 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Adventif köklerin flavonoid içeriği standart olarak kullanılan kuersetine eşdeğer ($mg\ QE\ g^{-1}$ kuru ağırlık) olarak hesaplanmıştır.

3.2.9. Toplam Fenolik Bileşik Miktarının Belirlenmesi

Adventif kök ekstraktlarının toplam fenolik bileşik miktarının belirlenmesinde, Slinkard ve Singleton (1977) tarafından bildirilen yöntem kullanılmıştır. Bu amaçla her bir analiz tüpüne 100 µL adventif kök ekstraktı ile birlikte 4.5 mL saf su ve 100 µL Folin-Ciocalteu reaktifi eklenmiştir. Karışım oda sıcaklığında 3 dakika süreyle bekletilmiş ve ardından 300 µL %2 sodyum karbonat (Na_2CO_3) çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanan karışımlar, oda sıcaklığında 2 saat boyunca karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda, oluşan renk değişiminin absorbansı spektrofotometrik olarak 760 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Toplam fenolik madde miktarı gallik asite eşdeğer ($mg\ GAE\ g^{-1}$ kuru ağırlık) olarak ifade edilmiştir.

3.2.10. ABTS Radikal Katyon Giderme Aktivitesi

Adventif kök ekstraktlarının ABTS (2,2'-Azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) radikal süpürme kapasiteleri Re ve ark., (1999) tarafından geliştirilen yöntemle dayalı olarak belirlenmiştir. Bu amaçla, 2 mM ABTS ve 2.45 mM potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$) çözeltileri hazırlanarak 1:2 oranında karıştırılmış ve reaksiyon karışımı karanlık ortamda 6 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, analizlerde kullanılmak üzere elde edilen $ABTS^+$ radikal çözeltisi 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) ile seyreltilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir. Örnek ekstraktlarından 20 µL alınarak üzerine 2980 µL 0.1 M fosfat tamponu (pH 7.4) ile toplam hacmi 3 mL olacak şekilde hazırlanmış ve her bir tüpe 1 mL $ABTS^+$ çözeltisi ilave edilmiştir. Karışımlar

vortex ile homojen hale getirildikten sonra, oda sıcaklığında 30 dakika süreyle karanlık koşullarda inkübasyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda, her bir örneğin absorbansı spektrofotometrik olarak 734 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Numunelerin ABTS⁺ radikal giderme aktiviteleri aşağıdaki formül ile % olarak hesaplanmıştır:

$$\text{Radikal süpürme aktivitesi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} : Numunesiz ABTS radikal çözeltisi absorbans değeri

$A_{\text{örnek}}$: Reaksiyon karışımının absorbans değeri

3.2.11. DPPH Radikali Temizleme Kapasitesi

Adventif kök ekstraktlarının DPPH radikali temizleme kapasitesi, Blois (1958) metodu kullanılarak değerlendirilmiştir. Adventif kök ekstraktlarından 50 µL alındıktan sonra her birinin üzerine 2950 µL etanol eklenerek 3 mL'ye tamamlanmıştır. Daha sonra, her bir deney tüpüne 0.26 mM DPPH çözeltisinden 1 mL eklenmiştir. Reaksiyon karışımları vortekslelendikten sonra 30 dakika boyunca oda sıcaklığında karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, absorbansları spektrofotometre ile 517 nm'de ölçülmüştür. DPPH radikali temizleme aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak inhibisyon yüzdesi olarak hesaplanmıştır.

$$\text{DPPH radikali temizleme kapasitesi (\%)} = [(A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}] \times 100$$

A_{kontrol} : Numunesiz DPPH radikal çözeltisi absorbans değeri

$A_{\text{örnek}}$: Reaksiyon karışımının absorbans değeri

3.2.12. Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP)

Adventif kök örneklerinin FRAP aktiviteleri Oyaizu (1986) tarafından belirtilen yöntemle göre analiz edilmiştir. Farklı miktarlarda örnek ekstraktları içeren test tüplerine 1.25 mL fosfat tamponu (0.2 M, pH 6.6) eklenerek toplam hacim 1.25 mL'ye tamamlanmıştır. Ardından, her bir deney tüpüne 1.25 mL %1 (w/v) potasyum ferrisiyanür [$K_3Fe(CN)_6$] çözeltisi eklenmiştir. Tüpler daha sonra 20 dakika boyunca 50 °C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her tüpe 1.25 mL %10 (w/v) trikloroasetik asit (TCA) eklenmiş, ardından 0.25 mL %0.1 (w/v) demir (III) klorür ($FeCl_3$) ilave edilmiştir. Test tüpleri vortekslenmiş ve absorbansları spektrofotometre kullanılarak 700 nm'de ölçülmüştür. Örneklerin indirgeme gücü Trolox eşdeğerleri olarak ifade edilmiştir.

3.2.13. İstatistiksel Analizler

Tüm deneyler üç tekrarlı olarak yürütölmüş ve elde edilen veriler istatistiksel analizler ile değerdendirilmiştir. Bu araştırmada istatistiksel analizler SPSS 20 (Armonk, NY: IBM Corp.) paket programı aracılığıyla gerçekleştirilmiştir. Deney grupları arasındaki farklar, Duncan'ın çoklu aralık testi (Duncan, 1955) kullanılarak tek yönlü ANOVA ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, ortalama $\pm$ standart hata (SE) biçiminde sunulmuştur.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, *Melissa officinalis* (oğul otu) adventif kök süspansiyon kültürlerinde besin ortamı bileşenlerinin ve maya ekstraktı uygulamalarının biyomas, rosmarinik asit, total fenolik bileşik ve flavonoid içeriği ile antioksidan aktivite üzerine etkileri araştırılmıştır.

In vitro koşullarda yetiştirilen bitkilerin hipokotil kısımları adventif köklerin indüksiyonu için eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır. Süspansiyon kültürü koşullarında besin ortamı bileşenlerini optimum miktarlarını belirlemek için MS temel besin ortamı (0.5 MS, 0.75 MS, 1 MS, 1.25 MS ve 1.5 MS), sükroz (%1, %2, %3, %4 ve %5) ve indol-3-bütirik asit (0.5, 1, 2, 4 mg L⁻¹)'in farklı konsantrasyonları araştırılmıştır. Temel besin ortamı bileşinleri açısından optimum koşullar belirlendikten sonra adventif kök süspansiyon kültürlerinde elisitör olarak uygulanan maya ekstraktının metabolit ve antioksidan aktiviteye etkileri incelenmiştir.

4.1. *M. officinalis* Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı Sükroz Konsantrasyonlarının Biyokütle ve Sekonder Metabolit İçeriğine Etkileri

Sükroz, adventif kök kültürleri için önemli bir karbon ve enerji kaynağı olup konsantrasyonu sekonder metabolit verimini ve büyümeyi önemli ölçüde etkileyebilmektedir (Cui ve ark. 2010). Ayrıca, sükroz konsantrasyonunun büyüme ve metabolit içeriği üzerindeki etkileri bileşik çeşidi, bitki türleri, kültür yöntemi ve hücre hatları gibi birçok faktöre göre değişmektedir (Li ve ark. 2016).

M. officinalis adventif kök süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit ve biyokütle birikimine sükroz konsantrasyonun etkisini belirlemek amacıyla adventif kökler %1, %2, %3, %4 ve %5 olmak üzere beş farklı konsantrasyonda sükroz içeren besin ortamlarında 30 gün süreyle kültüre alınmıştır. Çizelge 4.1'de, farklı sükroz konsantrasyonlarının adventif köklerin sekonder metabolit içeriği ve biyokütle üzerindeki etkileri verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı süktroz konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin yaş ağırlık, rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid miktarları

Süktroz Konsantrasyonu %	Rosmarinik Asit (mg g ⁻¹ KA)	Toplam Fenolik (mg g ⁻¹ KA)	Flavonoid (mg g ⁻¹ KA)	Yaş Ağırlık (g L ⁻¹)
1	10.27 ± 0.43 d*	16.43 ± 0.27 d	5.14 ± 0.16 a	7.34 ± 0.19 c
2	14.33 ± 0.27 b	19.4 ± 0.27 b	4.26 ± 0.01 b	9.56 ± 0.05 b
3	18.04 ± 0.58 a	20.85 ± 0.28 a	4.09 ± 0.01 b	11.2 ± 0.65 a
4	12.94 ± 0.12 c	17.83 ± 0.01 c	3.28 ± 0.01 c	10.06 ± 0.35 ab
5	7.38 ± 0.19 e	13.54 ± 0.06 e	3.11 ± 0.02 c	9.87 ± 0.32 b

*Aynı sütun içindeki farklı harfler, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testine göre ($p < 0.05$) anlamlı farkları göstermektedir. Veriler, ortalama ± standart hata ($n = 3$) olarak ifade edilmiştir.

M. Officinalis adventif köklerinin yaş ağırlığı besin ortamına ilave edilen süktroz konsantrasyonundan istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenmiştir. Çizelge 4.1. incelendiğinde en yüksek yaş ağırlığın %3 süktroz uygulanan adventif köklerde 11.2 ± 0.65 g L⁻¹ olarak elde edildiği ve bu değerin diğer gruplardan istatistiksel olarak önemli ölçüde farklı olduğu belirlenmiştir ($p < 0.05$). Yaş ağırlık, süktroz konsantrasyonunun %3'e kadar artmasıyla artış göstermiş; ancak bu konsantrasyonun üzerine çıkıldığında süktroz oranındaki yükselme, yaş ağırlıkta azalmaya neden olmuştur. En düşük yaş ağırlık %1 süktroz konsantrasyonunda kültüre alınan adventif köklerde 7.34 ± 0.19 g L⁻¹ olarak tespit edilmiştir. Bu bulgular adventif kök süspansiyon kültüründe süktroz konsantrasyonunun biyokütle üretimi açısından önemli bir faktör olduğu ve ilave edilen süktroz konsantrasyonun yaş ağırlıkta istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar meydana getirdiği belirlenmiştir. Literatür taramalarına göre, *in vitro* bitki kültürlerinde genellikle %3 (30.0 g L⁻¹) süktroz konsantrasyonu standart uygulama olarak tercih edilmektedir. Ancak, biyokütle birikimi için en uygun süktroz konsantrasyonu, kullanılan kültür yöntemi ve bitki türüne bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu bağlamda, farklı araştırmalar adventif kök kültürlerinde biyokütle artışını desteklemek üzere %3 (Cui ve ark., 2010), %4 (Yin ve ark., 2013) ve %5 (Baque ve ark., 2012b) süktroz konsantrasyonlarının etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

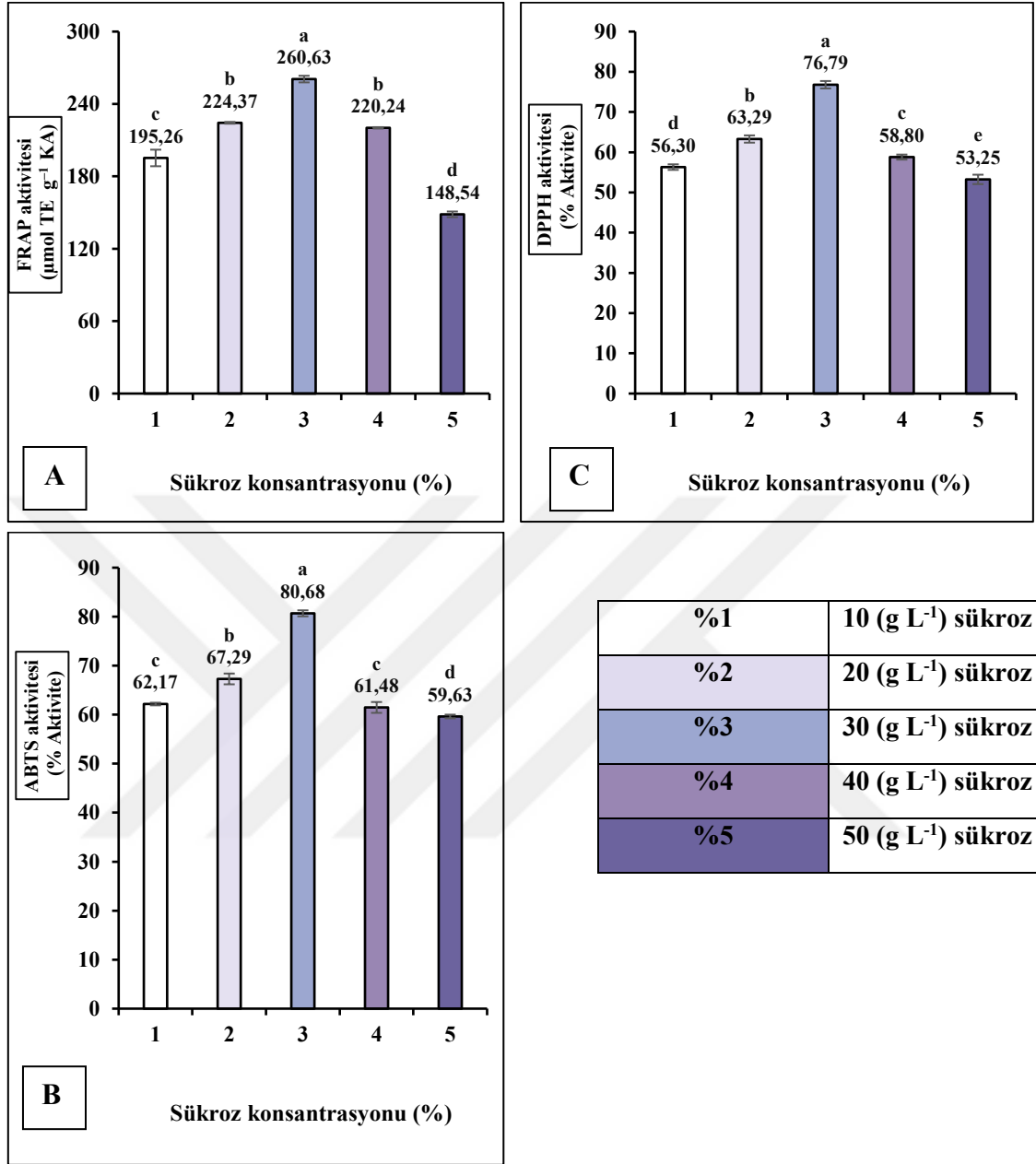
Sükroz konsantrasyonu, rosmarinik asit, toplam fenolikler ve flavonoidlerin üretimini istatstiki olarak önemli ölçüde etkilemiş olup sekonder metabolit birikimine ilişkin bulgular biyokütle sonuçlarıyla benzer bir eğilim göstermiştir. Rosmarinik asit ve toplam fenolik bileşik miktarlarının, sükroz oranının %3'e kadar artışıyla birlikte yükseldiği; ancak bu konsantrasyonun üzerine çıkıldığında, artan sükroz oranına bağlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda en yüksek rosmarinik asit ve toplam fenolik bileşik miktarları %3 sükroz konsantrasyonunda kültüre alınan advenkif köklerde sırasıyla $18.04 \pm 0.58 \text{ mg g}^{-1} \text{ KA}$ ve $20.85 \pm 0.28 \text{ mg g}^{-1} \text{ KA}$ olarak belirlenmiştir. Buna karşın, en düşük değerler %5 sükroz konsantrasyonunda yetiştirilen köklerde; rosmarinik asit için $7.38 \pm 0.19 \text{ mg g}^{-1} \text{ KA}$, toplam fenolik bileşik için ise $13.54 \pm 0.06 \text{ mg g}^{-1} \text{ KA}$ olarak ölçülmüştür. Adventif köklerin flavonoid miktarındaki değişim toplam fenolik ve rosmarinik asit miktarından farklılık göstermiştir. *M. officinalis* adventif köklerinde toplam flavonoid miktarı sükroz konsantrasyonundaki artışa paralel olarak anlamlı şekilde azalmıştır. En yüksek flavonoid birikimi % 1 sükroz konsantrasyonunda kültüre alınan adventif köklerde $5.14 \pm 0.16 \text{ mg g}^{-1} \text{ KA}$ iken en düşük değer %5 sükroz uygulanan köklerde $3.11 \pm 0.02 \text{ mg g}^{-1} \text{ KA}$ olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, sükroz konsantrasyonunun sekonder metabolit sentezi üzerinde konsantrasyona bağımlı bir etki oluşturduğunu ve yüksek sükroz düzeylerinin *M. officinalis* adventif köklerinde metabolit üretimi üzerine olumsuz yönde etkileyebileceğini ortaya koymaktadır. Karataş (2023) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, *Ocimum basilicum* adventif kök kültürleri biyoreaktör sistemlerinde yetiştirilerek farklı sükroz konsantrasyonlarının (%2, %3, %4 ve %5) rosmarinik asit, toplam flavonoid, toplam fenolik bileşik birikimi ve biyokütle üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada en yüksek sekonder metabolit içeriği %2 sükroz konsantrasyonunda elde edilmiş olup, besin ortamında bulunan sükroz seviyesinin artmasıyla birlikte hem biyokütle hem de metabolit üretiminde düşüş gözlenmiştir. Bu bulgular, mevcut çalışmanın sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

Adventif kök kültürleri kullanılarak rosmarinik asit üretiminde sükroz konsantrasyonunun etkilerinin incelendiği çalışmalar oldukça sınırlıdır. Mevcut literatürdeki araştırmaların büyük çoğunluğu kallus ve süspansiyon kültürleri üzerine yoğunlaşmıştır. Bu doğrultuda *Coleus blumei* bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerinde yapılan bir çalışmada ise, farklı karbon kaynaklarının (sükroz, glikoz, fruktoz, mannitol) ve bunların çeşitli konsantrasyonlarının büyüme ve rosmarinik asit (RA) üretimi

üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada, en yüksek RA birikimi %5 süktroz içeren ortamda gözlenmiştir (Gertlowski ve Petersen, 1993). Her iki çalışmanın bulguları, süktroz konsantrasyonunun RA birikimi üzerinde anlamlı bir etki oluşturduğunu; ancak maksimum üretimin sağlandığı konsantrasyonun türler arasında farklılık gösterebildiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca önceki araştırmalarda %4 (Karam ve ark., 2003), %5 (Hakkim ve ark., 2011) ve %7 (Ilieva ve Pavlov, 1997) gibi yüksek süktroz konsantrasyonlarının kallus ve süspansiyon kültürlerinde rosmarinik asit birikimi için uygun konsantrasyonlar olduğu bildirilmiştir. Bitki doku kültürü çalışmalarında genellikle %3 süktroz konsantrasyonu uygulansa da optimum süktroz düzeyi; kültür koşulları (katı, süspansiyon), kültür çeşidi (saçak kök, adventif kök, kallus) ve çalışılan bitki türüne göre değişkenlik gösterebilmektedir.

4.2. *M. officinalis* Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı Süktroz Konsantrasyonlarının Antioksidan Aktiviteye Etkileri

M. officinalis adventif köklerinin farklı süktroz konsantrasyonlarındaki antioksidan aktiviteleri DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleriyle değerlendirilmiş ve bu parametrelerin süktroz konsantrasyonundan istatistiki olarak önemli ölçüde etkilendiği belirlenmiştir. Farklı süktroz konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktiviteleri Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1. Farklı sükroz konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin FRAP (A), ABTS (B) ve DPPH (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri

Adventif köklerin FRAP aktivite sonuçları, standart antioksidan olan Trolox eşdeğeri (μmol TE g⁻¹) cinsinden ifade edilmiş olup en yüksek değer %3 sükroz uygulamasında (260.63 μmol TE g⁻¹ KA) kaydedilmiştir. Bu değer, %1 ve %5 sükroz konsantrasyonlarında sırasıyla 195.26 ve 148.54 μmol TE g⁻¹ KA olup aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Buna karşın, %2 (224.37 μmol TE g⁻¹ KA) ve %4 (220.24 μmol TE g⁻¹ KA) konsantrasyonları arasında anlamlı bir farklılık tespit

edilmemiştir. ABTS ve DPPH yöntemleriyle yapılan antioksidan analizlerinde, en yüksek antioksidan aktivite her iki yöntemde içinde %3 süktroz konsantrasyonunda kültüre alınan adventif köklerde belirlenmiş olup, ABTS; %80.68 ve DPPH; %76.79 olarak ölçülmüştür. Her iki yöntemde de en düşük antioksidan aktivite %5 süktroz uygulanan örneklerde gözlenmiş sırasıyla %59.63 (ABTS) ve %53.2 (DPPH) olarak kaydedilmiştir.

Adventif köklerin antioksidan kapasitesi kullanılan üç yöntemde göre de süktroz konsantrasyonundan istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilendiği belirlenmiştir. Süktroz konsantrasyonu %1'den %3'e artırıldığında, tüm analiz yöntemlerinde antioksidan aktivite kademeli bir artış göstermiş ve her üç yöntemde de en yüksek antioksidan aktivite %3 süktroz uygulamasında elde edilmiştir. Öte yandan, süktroz konsantrasyonu %3'ten %5'e yükseldiğinde antioksidan aktivite kademeli olarak azalmıştır. Söz konusu sonuçlar adventif köklerdeki en yüksek rosmarinik asit ve toplam fenolik bileşiğin elde edildiği %3 süktroz konsantrasyonu ile paralellik arz etmektedir. Benzer bir çalışmada *Ocimum basilicum* adventif kök kültürlerinde süktroz konsantrasyonunun DPPH, ABTS ve FRAP aktivitelerine etkileri incelenmiş olup en yüksek antioksidan aktivitenin %2 süktroz konsantrasyonunda gözleendiği ve daha yüksek konsantrasyonlarda bu aktivitelerin azaldığı bildirilmiştir. Antioksidan kapasitenin, rosmarinik asit ve toplam fenolik bileşik birikimiyle pozitif korelasyon gösterdiği ayrıca ifade edilmiştir (Karataş, 2023). *Hypericum perforatum*'un adventif kök kültüründe yapılan önceki bir çalışmada ise süktroz konsantrasyonunun (0, 1, 3, 5, 7 ve 9% w/v) antioksidan aktivitede değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir (Cui ve ark., 2010). Fazal ve ark. (2016) *Prunella vulgaris*'in hücre süspansiyon kültürlerinde yaptığı bir araştırmada, 5-50 g L⁻¹ aralığındaki on farklı süktroz konsantrasyonunun metabolit üretimine etkileri incelenmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, 20 g L⁻¹ süktroz konsantrasyonunun en yüksek DPPH aktivitesi ve en yüksek toplam fenolik içeriği sağladığı belirlenmiştir. Yapılan bu çalışma ve önceki çalışmaların ışığında antioksidan aktivite süktroz konsantrasyonuna göre önemli ölçüde değişmektedir. Bunun temel nedenleri arasında adventif köklerden üretilen yüksek antioksidan aktiviteye sahip sekonder metabolitlerin miktarlarının süktroz konsantrasyonuna göre değişmesidir. Diğer taraftan antioksidan aktivite aynı süktroz konsantrasyonunda kültür tipine ve bitki türüne göre de farklılıklar gösterebilmektedir.

4.3. *M. officinalis* Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı MS (Murashige Skoog) Gücünün Biyokütle ve Sekonder Metabolit İçeriğine Etkileri

MS temel besin (Murashige Skoog) ortamı bitki *in vitro* kültürlerinde kök gelişimi, biyokütle ve sekonder metabolitlerin birikimi üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada, MS ortamının *M. officinalis* adventif kök süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit içeriği ve biyokütle üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla farklı MS güçlerinde (0.5, 0.75, 1, 1.25 ve 1.5) 30 gün boyunca kültüre alınmıştır. MS gücü *M. officinalis* adventif köklerinde rosmarinik asit, toplam fenolik bileşik ve flavonoid içerikleri ile biyokütle miktarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilemiştir. Farklı MS gücünün adventif köklerin sekonder metabolit içerikleri ve biyokütle üzerindeki etkileri Çizelge 4.2’de, verilmiştir.

Çizelge 4.2. Farklı MS gücünde kültüre alınan adventif köklerin yaş ağırlık, rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid miktarları

MS Gücü	Rosmarinik Asit (mg g ⁻¹ KA)	Toplam Fenolik (mg g ⁻¹ KA)	Flavonoid (mg g ⁻¹ KA)	Yaş Ağırlık (g L ⁻¹)
0.5	17.15 ± 0.32 a	23.36 ± 0.33 a	4.37 ± 0.09 a	15.16 ± 1.55 a
0.75	10.70 ± 0.73 b	17.14 ± 0.50 c	4.05 ± 0.07 b	11.37 ± 0.48 b
1	18.04 ± 0.58 a	20.85 ± 0.28 b	4.09 ± 0.01 b	11.20 ± 0.65 b
1.25	7.08 ± 0.14 c	13.83 ± 0.54 d	3.29 ± 0.03 c	6.39 ± 0.1 c
1.5	9.31 ± 0.06 b	16.86 ± 0.44 c	4.02 ± 0.06 b	5.80 ± 0.07 c

*Aynı sütun içindeki farklı harfler, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testine göre ($p < 0.05$) anlamlı farkları göstermektedir. Veriler, ortalama ± standart hata ($n = 3$) olarak ifade edilmiştir.

Çizelge 4.2’deki verilere göre, oğul otu adventif köklerinde MS gücüne bağlı olarak biyokütle üretiminde anlamlı değişiklikler gözlenmiştir. En yüksek biyokütle, 0.5 MS (15.16 g L⁻¹) ortamından elde edilmiştir. MS gücünün 0.5’ten ve 1.5 kadar artışına bağlı olarak adventif köklerin yaş ağırlığı da kademeli olarak azalmıştır. Bu bağlamda en düşük yaş ağırlık 1.5 MS gücünde 5.80 ± 0.07 g L⁻¹ olarak belirlenmiş olup bu değer 0.5 MS gücünden elde edilene kıyasla 2.6 kat daha düşük bulunmuştur. Bu bulgular yüksek MS konsantrasyonunun adventif kök gelişimini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir.

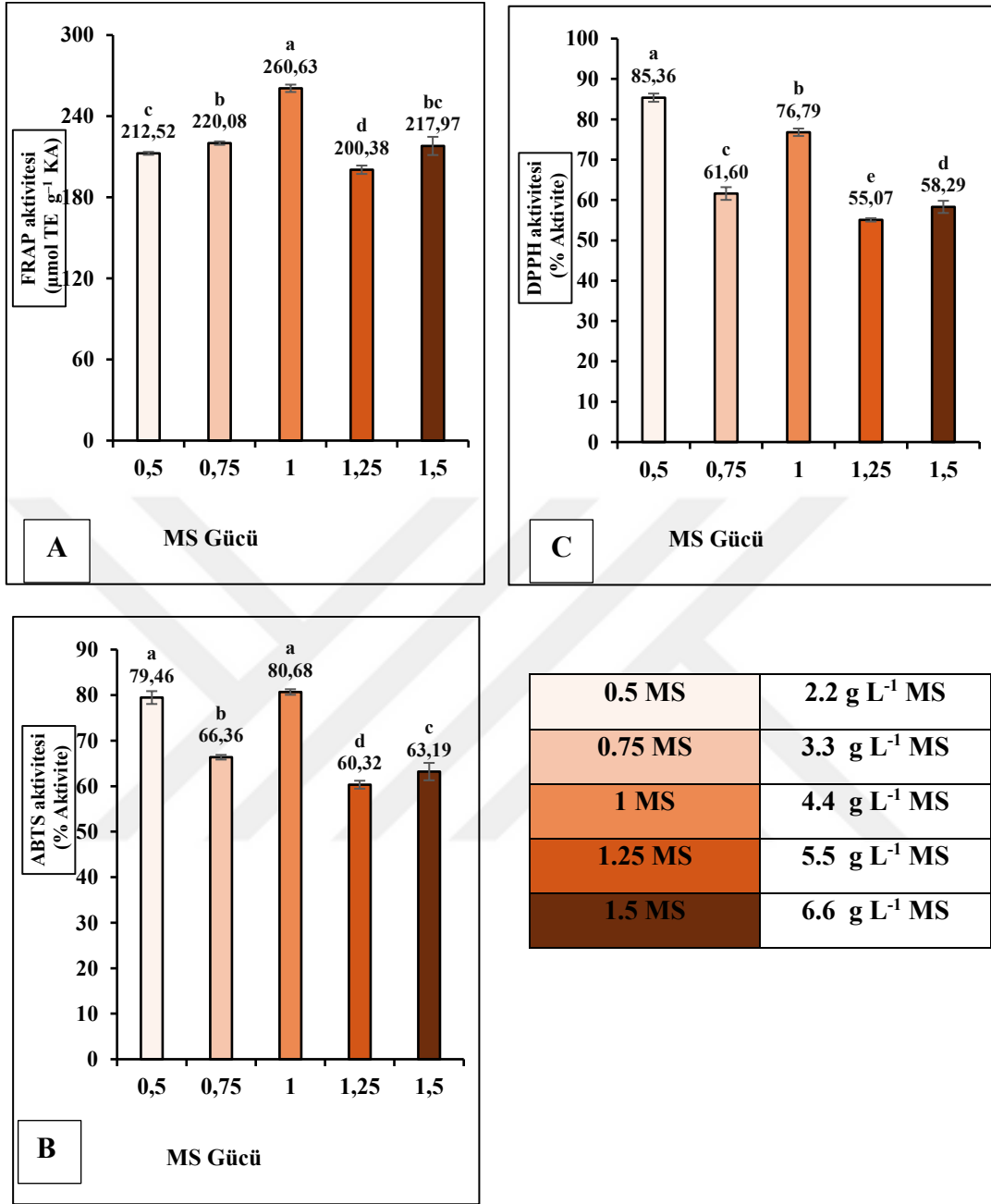
Oğul otu adventif köklerinde rosmarinik asit birikimi, kullanılan MS besin ortamı gücüne bağlı olarak önemli ölçüde değişkenlik göstermektedir. En yüksek rosmarinik asit değerleri, 1 MS (18.04 mg g⁻¹ KA) ve 0.5 MS (17.15 mg g⁻¹ KA) besin ortamlarında kaydedilmiştir. Bu iki konsantrasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. En düşük rosmarinik asit içeriği 1.25 MS gücündeki besin ortamında 7.08 mg g⁻¹ KA olarak elde edilmiştir.

Farklı MS güçleri, adventif kök kültürlerinde toplam fenolik ve flavonoid birikiminde anlamlı değişimlere yol açmıştır. En yüksek toplam fenolik (23.36 ± 0.33 mg g⁻¹ KA) ve flavonoid (4.37 ± 0.09 mg g⁻¹ KA) içerikleri 0.5 MS ortamında elde edilmiştir (p < 0.05). MS gücü arttıkça her iki bileşiğin düzeyinde genel bir azalma gözlemlenmiştir. En düşük toplam fenolik ve flavonoid içeriği 1.25 MS gücündeki besin ortamında sırasıyla 13.83 ± 0.54 ve 3.29 ± 0.03 mg g⁻¹ KA olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, oğul otu adventif kök kültürlerinde düşük MS gücünün sekonder metabolit birikimi açısından daha uygun olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, *Echinacea pallida* ve *Echinacea purpurea* türlerine ait adventif köklerin biyoreaktör koşullarında en yüksek yaş ve kuru biyokütle ile en yüksek büyüme oranının 0.75 MS ortamından elde edildiğini bildiren Wu ve arkadaşlarının (2018b) sonuçlarıyla örtüşmektedir. Benzer şekilde, *Morinda citrifolia* adventif kök kültürlerinde farklı MS ortam tuz güçlerinde (0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 ve 2.0) yapılan bir araştırmada, 0.25 MS ortamında en yüksek biyokütle ve sekonder metabolit (antrakınon, fenolik ve flavonoid) üretimi gözlemlenmiştir. MS ortam gücünün artmasıyla birlikte biyokütle ve metabolit üretiminde azalma meydana gelmiştir. Yüksek MS tuz konsantrasyonları (1.5 ve 2 MS) osmotik stres oluşturma yanında fenilalanin amonyak liyaz (PAL) aktivitesini tetiklemiştir. Bu enzim aktivitesi, fenolik bileşiklerin sentezini artırmıştır (Baque ve ark., 2010). *Eleutherococcus koreanum* Nakai adventif kök kültürlerinde yapılan araştırma, kullanılan MS tuz konsantrasyonunun hem kök gelişimi hem de sekonder metabolit üretimi üzerinde belirleyici bir rol oynadığını göstermiştir. Özellikle 1/2 MS gücü, en yüksek adventif kök biyokütlesinin yanı sıra farmakolojik açıdan değerli biyoaktif bileşiklerin üretimini teşvik etmiştir. Buna karşılık daha yüksek MS konsantrasyonları (1 MS üzeri), kök dokularında fizyolojik bozukluklara neden olarak büyümeyi olumsuz etkilediğini; daha düşük konsantrasyonların, yetersiz besin içeriği nedeniyle biyokütle birikimini sınırladığı bildirilmiştir (Lee ve Paek, 2012). Önceki çalışmalarda, 0.25 MS (Cui ve ark., 2013), 0.5 MS (Baque ve ark., 2012a) ve 1

MS (Yin ve ark., 2013) gibi farklı MS güçlerinin, adventif köklerin büyümesi için en uygun konsantrasyonlar olduğu belirlenmiştir. Öte yandan, kök büyümesi 1 MS'den daha güçlü ortamlarda engellenmiştir ve bunun, yüksek ozmotik stresten kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Cui ve ark., 2013; Yin ve ark., 2013). Reyhan adventif köklerinin rosmarinik asit içeriği bu çalışmaya paralel olarak düşük MS konsantrasyonlarında daha yüksek bulunmuştur (Karataş, 2022b). Farklı MS gücünün adventif köklerin rosmarinik asit içerikleri ve yaş ağırlıkları birlikte değerlendirildiğinde uygun MS konsantrasyonunun 0.5 MS olduğu belirlenmiştir.

4.4. *M. officinalis* Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı MS (Murashige Skoog) Gücünün Antioksidan Aktiviteye Etkileri

Murashige ve Skoog (MS) ortamının farklı konsantrasyonlarının oğul otu adventif köklerinin antioksidan kapasiteleri üzerindeki etkisi FRAP, ABTS ve DPPH yöntemleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. Farklı MS (Murashige Skoog) güçlerinde kültüre alınan adventif köklerin FRAP (A), ABTS (B) ve DPPH (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri

Adventif köklerin FRAP yöntemi ile belirlenen antioksidan kapasitesinde, besin ortamındaki MS konsantrasyonuna bağlı olarak anlamlı farklılık belirlenmiştir. Antioksidan aktivite, MS gücünün artmasıyla birlikte 1 MS seviyesine kadar artış göstermiş ve en yüksek değer 1 MS gücünde 260.63 μmol TE g⁻¹ KA olarak elde edilmiştir. Ancak MS konsantrasyonunun 1 MS gücü üzerine çıkarılması durumunda,

antioksidan kapasitede belirgin bir azalma gözlemlenmiştir. En düşük aktivite 1.25 MS gücünde 200.38 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ KA olarak belirlenmiştir. ABTS aktivitesi ölçümlerinde, en yüksek antioksidan aktivite değerleri 1 MS (%80.68) ve 0.5 MS (%79.46) konsantrasyonlarından elde edilmiştir. Her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. En düşük ABTS aktivitesi ise 1.25 MS güçte %60.32 olarak saptanmıştır. DPPH aktivite sonuçlarına göre, en yüksek antioksidan aktivite (%85.36) 0.5 MS gücünde tespit edilmiştir. Bu değer, diğer tüm konsantrasyon seviyelerinden anlamlı şekilde yüksek çıkmıştır. En düşük aktivite ise 1.25 MS düzeyinde (%55.07) ölçülmüştür.

Melissa officinalis köklerinin gösterdiği antioksidan özellikler, aynı familyadan *Ocimum basilicum* köklerinde bildirilen yüksek rosmarinik asit içeriği ve buna bağlı antioksidan aktiviteyle örtüşmektedir. Srivastava ve ark. (2016), bu bitkinin köklerinde saptanan yüksek antioksidan kapasitenin rosmarinik asit varlığıyla ilişkili olduğunu belirtmiştir. Karataş (2022b) da, söz konusu fenolik bileşik ile antioksidan aktivite arasında güçlü bir korelasyon olduğunu belirlemiş ve en yüksek DPPH, ABTS ve FRAP aktivitesinin bu çalışmada olduğu gibi düşük MS güçlerinde olduğunu ifade etmiştir. Bu çalışmada *Melissa officinalis* kök ekstraktlarında gözlemlenen yüksek antioksidan etkinin de benzer şekilde rosmarinik asit gibi fenolik bileşiklerin MS konsantrasyonuna göre birikimlerinin değişmesinden ileri gelmektedir.

4.5. *M. officinalis* Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Farklı IBA (indol-3-bütirik asit) Konsantrasyonunun Biyokütle ve Sekonder Metabolit İçeriğine Etkileri

Bu çalışmada, *Melissa officinalis* bitkisinde farklı indol-3-bütirik asit (IBA) konsantrasyonlarının (0.5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹ ve 4 mg L⁻¹) sekonder metabolit üretimi ile biyokütle üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çizelge 4.3.'te farklı IBA konsantrasyonlarının adventif köklerin sekonder metabolit içerikleri ve biyokütle üzerindeki etkileri verilmiştir

Çizelge 4.3. Farklı IBA (Indol-3-Bütirik Asit) Konsantrasyonunda kültüre alınan adventif köklerin yaş ağırlık, rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid miktarları

IBA Konsantrasyonu	Rosmarinik Asit (mg g ⁻¹ KA)	Toplam Fenolik (mg g ⁻¹ KA)	Flavonoid (mg g ⁻¹ KA)	Yaş Ağırlık (g L ⁻¹)
0.5	13.79 ± 0.39 b*	19.9 ± 0.65 a	3.83 ± 0.05 b	9.1 ± 0.38 b
1	12.82 ± 0.47 b	17.75 ± 0.43 b	3.69 ± 0.06 c	8.92 ± 0.09 b
2	18.04 ± 0.58 a	20.85 ± 0.28 a	4.09 ± 0.01 a	11.2 ± 0.65 a
4	5.59 ± 0.03 c	11.66 ± 0.17 c	3.49 ± 0.01 d	6.07 ± 0.03 c

*Aynı sütun içindeki farklı harfler, Duncan'ın çoklu karşılaştırma testine göre ($p < 0.05$) anlamlı farkları göstermektedir. Veriler, ortalama ± standart hata ($n = 3$) olarak ifade edilmiştir.

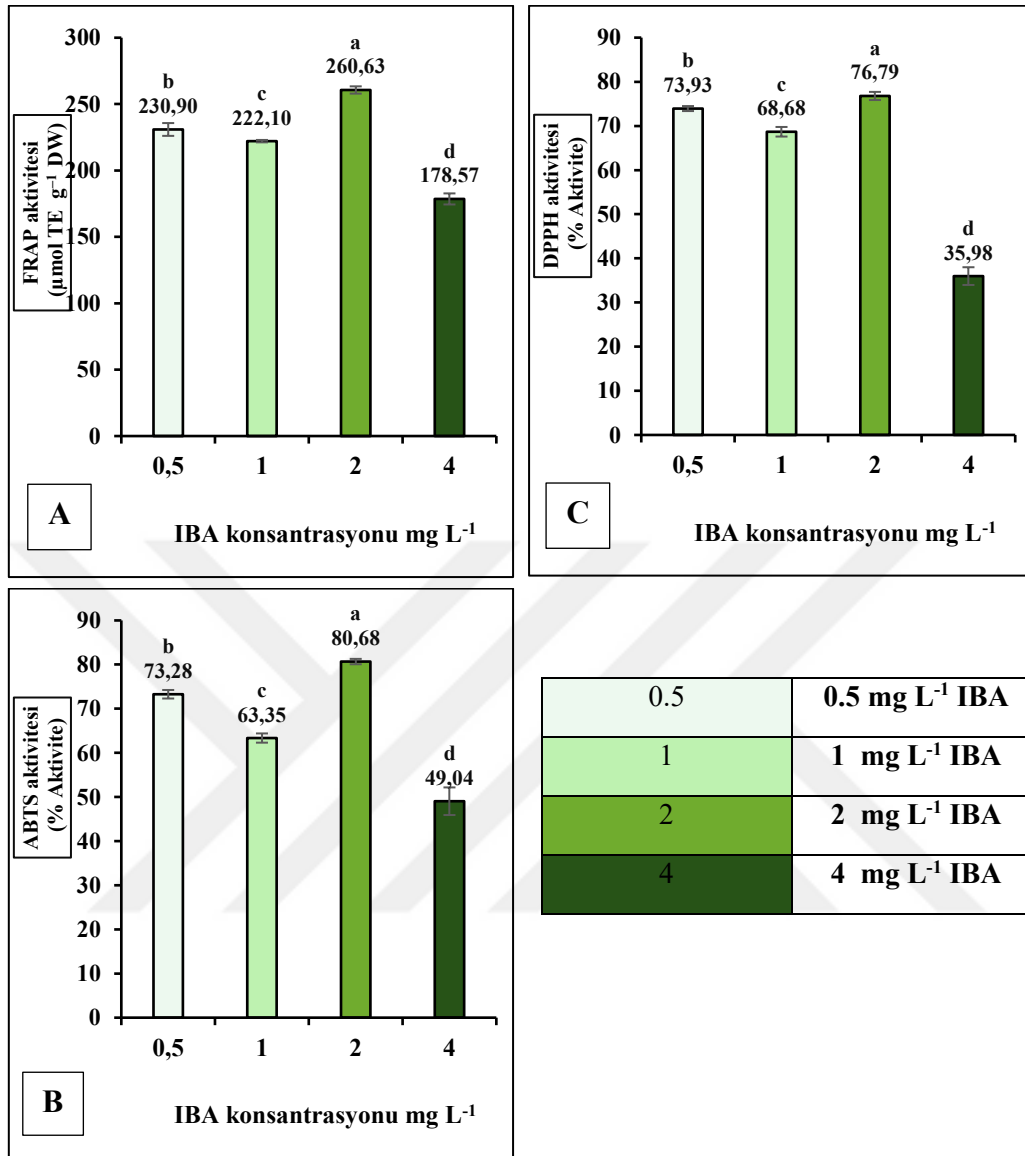
Adventif köklerin yaş ağırlığının besin ortamına ilave edilen IBA konsantrasyonuna bağlı olarak istatistiksel açıdan önemli ölçüde değiştiği belirlenmiştir. En yüksek yaş biyokütle, 11.2 ± 0.65 g L⁻¹ ile 2 mg L⁻¹ IBA uygulanan kültürlerde elde edilirken, en düşük değer 6.07 ± 0.03 g L⁻¹ ile 4 mg L⁻¹ IBA uygulamasında gözlenmiştir. Öte yandan, 0.5 mg L⁻¹ ve 1 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonları arasında yaş ağırlık bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Farklı IBA konsantrasyonunda kültüre alınan adventif köklerde en yüksek rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid birikimi 2 mg L⁻¹ IBA uygulanan köklerde sırasıyla 18.04 ± 0.58 mg g⁻¹ KA, 20.85 ± 0.28 mg g⁻¹ KA ve 4.09 ± 0.01 mg g⁻¹ KA olarak belirlenmiştir. Her üç parametre içinde en düşük değerler 4 mg/L IBA uygulanan adventif köklerde belirlenmiştir. Bu bağlamda yüksek IBA konsantrasyonu (4 mg L⁻¹) yaş ağırlık sonuçlarına benzer şekilde metabolit üretiminde de anlamlı düşüşlere neden olmuştur. Bu bulgular, Karataş (2022b) tarafından yürütülen çalışmanın sonuçlarıyla büyük ölçüde örtüşmektedir. Söz konusu çalışmada, reyhan adventif köklerinde en yüksek rosmarinik asit birikimi 2 mg L⁻¹ IBA uygulamasında 20.98 mg/g KA düzeyinde belirlenmiştir. Söz konusu çalışmada da 4 mg/L gibi yüksek IBA konsantrasyonlarının, bitkilerde stres yanıtlarını tetikleyerek hem rosmarinik asit üretimini hem de biyokütle oluşumunu olumsuz etkilediği ortaya konmuştur. Bu çalışmadan elde edilen veriler, Ho ve ark. (2021) tarafından *Polygonum multiflorum* türünde yürütülen biyoreaktör çalışmalarıyla da

uyumludur. Söz konusu araştırmada, 2 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonunun hem fenolik bileşik üretimini hem de adventif kök gelişimini maksimize ettiği, ancak daha yüksek oksin seviyelerinin metabolik dengenin bozulmasına yol açtığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, Nazir ve ark. (2019), *O. basilicum* kallus költürlerinde orta düzeyde oksin uygulamasının fenilpropanoid yolak enzimlerini (PAL) indükleyerek rosmarinik asit birikimiyle pozitif yönde etkilemiştir. Bu eğilim, mevcut çalışmada gözlemlenen metabolit birikim eğilimiyle de uyumludur. Ancak tüm bitkilerin oksine verdiği yanıtlar aynı olmayıp tür ve genotiplere göre farklılıklar meydana gelebilmektedir. Bu bağlamda, Baque ve ark. (2010), *Morinda citrifolia* adventif kök költürlerinde 5 mg L⁻¹ IBA uygulamasının herhangi bir büyüme baskılanmasına yol açmadığını bildirmiştir. Bu durum, bazı türlerin yüksek oksin konsantrasyonlarına karşı daha toleranslı olduğunu ve bitkinin genetik yapısına, metabolik yanıtlarına bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde *M. Officinalis* adventif kök süspansiyon költürlerindeki 2 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonun metabolit ve biyokütle üretimi açısından en uygun konsantrasyon olduğu belirlenmiştir.

4.6. *M. officinalis* Adventif Kök Süspansiyon Költürüne Uygulanan Farklı IBA (indol-3-bütirik asit) Konsantrasyonlarının Antioksidan Aktiviteye Etkileri

M. officinalis adventif köklerinin farklı IBA (indol-3-bütirik asit) konsantrasyonlarındaki antioksidan aktiviteleri DPPH, ABTS ve FRAP yöntemleriyle incelenmiş olup, antioksidan aktivite IBA konsantrasyonundan istatistiki olarak önemli ölçüde etkilenmiştir. Adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktiviteleri şekil 4.3'de verilmiştir.



Şekil 4.3. Farklı IBA (indol-3-bütirik asit) konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin FRAP (A), ABTS (B) ve DPPH (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri

FRAP yöntemiyle belirlenen antioksidan kapasite, kültür ortamındaki IBA konsantrasyonlarına bağlı olarak anlamlı düzeyde değişiklik göstermiştir. Elde edilen verilere göre en yüksek FRAP aktivitesi 2 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonunda 260.63 μmol TE g⁻¹ KA olarak ölçülürken en düşük aktivite 4 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonunda 178.57 μmol TE g⁻¹ KA olarak kaydedilmiştir. Benzer şekilde en yüksek ABTS ve DPPH aktiviteleri de 2 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonunda sırasıyla %80.68 ve %76.79 olarak belirlenmiştir. Her iki parametre için en düşük aktivite 4 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonunda ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar, IBA konsantrasyonundaki artışın antioksidan kapasite

üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu göstermektedir. Ancak bu etkinin artan IBA miktarıyla orantılı olmadığı belirlenmiştir. Üç analiz yöntemine göre de, 2 mg L⁻¹ IBA uygulaması antioksidan aktivite açısından en yüksek değerlerin elde edildiği konsantrasyon olarak öne çıkmıştır. Bu bulgular, optimal IBA düzeyinin sekonder metabolit üretimi üzerinde teşvik edici bir etki oluşturduğunu ve bu etkinin özellikle rosmarinik asit, fenolik ve flavonoid bileşiklerin biyosenteziyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde Karataş (2022b) tarafından yapılmış bir çalışmada IBA konsantrasyonunun *O. basilicum* adventif kök süspansiyon kültürlerinde DPPH, ABTS ve FRAP antioksidan aktiviteleri üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Sonuçlara göre, bu antioksidan aktiviteleri 0.5-2 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonlarında artarken daha yüksek konsantrasyonlarda azalmıştır. Bu çalışmada olduğu gibi 2 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonunda en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir.

4.7. *M. officinalis* Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Maya Ekstraktının Biyokütle ve Sekonder Metabolit İçeriğine Etkileri

M. officinalis adventif kök süspansiyon kültürlerine uygulanan farklı maya ekstraktı (YE) konsantrasyonlarının (50 µg mL⁻¹, 100 µg mL⁻¹ ve 200 µg mL⁻¹) sekonder metabolit üretimi ve biyokütle üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Çizelge 4.4.'te, farklı YE konsantrasyonlarının rosmarinik asit, toplam fenolikler, flavonoid içerikleri ile yaş ağırlığı üzerindeki etkileri verilmiştir.

Çizelge 4.4. Farklı Maya Ekstraktı konsantrasyonunda kültüre alınan adventif köklerin yaş ağırlık, rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid miktarları

Maya Ekstraktı (YE) µg mL ⁻¹	Rosmarinik Asit (mg g ⁻¹ KA)	Toplam Fenolik (mg g ⁻¹ KA)	Flavonoid (mg g ⁻¹ KA)	Yaş Ağırlık (g L ⁻¹)
Kontrol	11.66 ± 0.85 d	17.51 ± 0.76 c	3.64 ± 0.07 c	6.46 ± 0.07 b
50 (YE50)	18.82 ± 0.09 c	25.24 ± 0.46 b	4.7 ± 0.04 a	8.61 ± 0.06 a
100 (YE100)	22.67 ± 0.14 b	26.19 ± 0.25 b	4.33 ± 0.01 b	9.19 ± 0.52 a
200 (YE200)	30.25 ± 0.49 a	29.77 ± 0.99 a	3.77 ± 0.03 c	5.98 ± 0.17 b

Biyotik bir elisitör olan maya özütü yaygın olarak *Saccharomyces cerevisiae*'den elde edilen proteinler, amino asitler, şekerler ve mineraller açısından zengin karmaşık bir doğal üründür. Ayrıca maya özütü glukanlar, mannan oligosakkaritler ve nükleotidler gibi

çeşitli biyoaktif moleküller içermektedir. Bu moleküllerin bitki hücresindeki belirli reseptörlerle etkileşime girerek uyarıcı olarak işlev gördüğü ve böylece sekonder metabolitlerin biyosentezini başlatan bir sinyal dizisini başlattığı düşünülmektedir (Tao ve ark., 2023; Sardar ve ark., 2023)

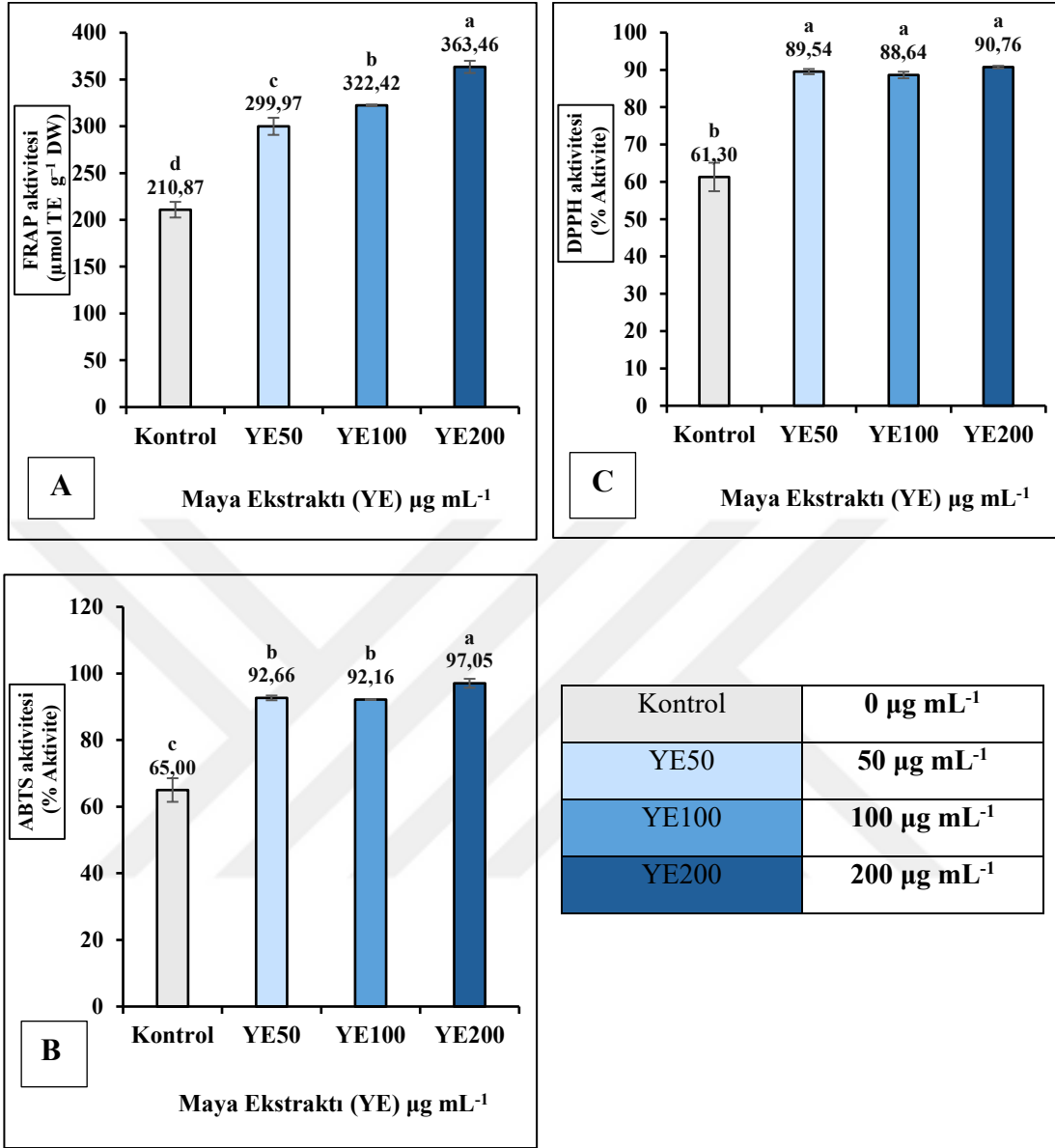
M. Officinalis adventif köklerinin yaş ağırlığı besin ortamına ilave edilen maya ekstraktı (YE) konsantrasyonundan istatistiksel olarak önemli ölçüde etkilenmiştir. Kontrol grubuyla kıyaslandığında yaş ağırlıktaki artış en fazla YE100 grubunda belirlenmiştir. YE100 grubunda yaş ağırlık 9.19 g L^{-1} olarak belirlenmiş ve bu değerin kontrol grubundan % 42 fazla olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek maya ekstraktı (YE200) uygulanması yaş ağırlıkta kontrol grubuna göre bir düşüşe neden olsa da sonuç istatistiki olarak önemli bulunmamıştır.

Maya Ekstraktı (YE) konsantrasyonlarının rosmarinik asit içeriğine etkisi incelendiğinde, uygulanan YE konsantrasyonlarının rosmarinik asit miktarını artırdığı görülmektedir. Kontrol grubunda rosmarinik asit miktarı 11.66 mg g^{-1} KA iken, uygulanan en yüksek konsantrasyon olan $200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ YE’de bu değer 30.25 mg g^{-1} KA’ye yükselmiştir. YE200 uygulaması rosmarinik asit içeriğinde kontrol grubuna göre 2.59 kat artış sağlamıştır. Aynı uygulama, toplam fenolik bileşik düzeyinde de kayda değer bir artışa yol açmış; bu değer, kontrol grubundaki 17.51 mg g^{-1} GAE’den 29.77 mg g^{-1} GAE seviyesine yükselmiştir. Maya ekstraktı uygulamasıyla flavonoid miktarında en yüksek artış YE50 dozunda gözlemlenmiştir. Kontrol grubundaki flavonoid miktarı 3.64 mg g^{-1} KA iken, en yüksek flavonoid seviyesi YE50 uygulamasında 4.70 mg g^{-1} KA’ya ulaşmıştır. Benzer sonuçlar *O. basilicum* adventif kök kültürlerinde de bildirilmiştir. Söz konusu çalışmada farklı konsantrasyonlarda uygulanan maya ekstraktlarının (125 , 250 ve $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$), toplam fenolik bileşik, flavonoid ve rosmarinik asit içeriklerinde anlamlı artışlar sağladığı bildirilmiştir. En yüksek metabolit konsantrasyonları, $125 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonda elde edilmiştir (İrten, 2022). Bir diğer çalışmada, maya ekstraktının (YE) *Melissa officinalis* fidelerinde rosmarinik asit (RA) birikimi ve tirozin aminotransferaz (TAT) gen ifadesi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda % 0.1 YE konsantrasyonunun rosmarinik asidin üretimini önemli ölçüde artırdığı ve rosmarinik asit biyosentezinde rol oynayan TAT gen ifadesini belirgin derecede yükselttiği ifade edilmiştir (Nasiri-Bezenjani ve ark., 2014). *Lithospermum erythrorhizon* bitkisinin hücre süspansiyon kültürlerine maya ekstraktı uygulanan başka

bir çalışmada maya ekstraktının PAL ve RA seviyelerini önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir (Mizukami ve ark., 1992). Bitki doku ve organ kültürü yöntemleriyle metabolit üretiminde uygulanan elisitörün optimum konsantrasyonunun belirlenmesi metaboit veriminin artırmasında büyük önem arz etmektedir. Ancak bu optimum değer, uygulanan bitki doku ve organ kültürü yöntemine ve bitkinin türüne göre farklılık gösterebilmektedir.

4.8. *M. officinalis* Adventif Kök Süspansiyon Kültürüne Uygulanan Maya Ekstraktının Antioksidan Aktiviteye Etkileri

Maya ekstraktı uygulamalarının adventif köklerin antioksidan aktivitesine etkisi FRAP, ABTS ve DPPH yöntemlerine göre değerlendirilmiştir. Bu bağlamda adventif kök süspansiyon kültürlerine 0, 50, 100 ve 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ konsantrasyonlarında maya ekstraktı uygulanmıştır. Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin DPPH, ABTS ve FRAP aktiviteleri Şekil 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Farklı maya ekstraktı konsantrasyonlarında kültüre alınan adventif köklerin FRAP (A), ABTS (B) ve DPPH (C) yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri

FRAP analizine göre, tüm maya ekstraktı uygulamalarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek antioksidan aktivite belirlenmiştir ($p < 0.05$). Kontrol grubunda $210.87 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{KA}$ olarak ölçülen FRAP değeri, YE50, YE100 ve YE200 uygulamalarında sırasıyla 299.97, 322.42 ve $363.46 \mu\text{mol TE g}^{-1} \text{KA}$ seviyelerine yükselmiştir. Bu sonuçlar, maya ekstraktı konsantrasyonu arttıkça FRAP kapasitesinin de anlamlı biçimde arttığını ortaya koymuştur. ABTS yöntemi ile değerlendirilen radikal süpürme aktiviteleri incelendiğinde, maya ekstraktı

uygulamalarının antioksidan aktiviteyi önemli ölçüde artırdığı gözlemlenmiştir. Kontrol grubunda %65 olan aktivite, YE50 ve YE100 uygulamalarında sırasıyla %92.66 ve %92.16 olarak bulunmuş, YE200 uygulamasında ise en yüksek değer olan %97.05'e ulaşmıştır. DPPH analizinde ise kontrol grubunun %61.30'luk aktiviteye sahip olduğu; YE50, YE100 ve YE200 uygulamalarının sırasıyla %89.54, %88.64 ve %90.76 değerleriyle daha yüksek aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu üç uygulama grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Benzer bir araştırmada *Ocimum basilicum* var. *purpurascens* kallus kültürlerinde maya ekstraktı uygulanması DPPH, ABTS ve FRAP yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri anlamlı biçimde yükselmiştir. Belirli bir dozun üzerindeki maya ekstraktı konsantrasyonlarının, stres yanıtlarını tetikleyerek antioksidan savunma aktivitelerini düşürdüğü belirtilmiştir (Zaman ve ark., 2022). Bir diğer araştırmada maya ekstraktı uygulamalarının adventif köklerde toplam fenolik, flavonoid ve rosmarinik asit düzeylerini artırdığı ve bu artışın antioksidan kapasite ile anlamlı bir korelasyon içerisinde olduğu ortaya konmuştur (İrten, 2022).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu araştırmada, *Melissa officinalis* (oğul otu) adventif kök süspansiyon kültürlerinde, besin ortamı bileşenleri ve maya ekstraktı uygulamalarının sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında, MS ortam gücü, sükroz ve IBA (Indol-3-bütirik Asit) konsantrasyonları ile elisitör olarak kullanılan maya ekstraktının farklı dozlarının hem metabolit üretimi hem de antioksidan aktivite üzerindeki etkileri detaylı biçimde analiz edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar, ortam bileşenlerinin ve maya ekstraktı uygulamalarının, özellikle rosmarinik asit, toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile antioksidan kapasitelerinde anlamlı artışlara neden olduğunu göstermektedir. Özellikle, 0.5 MS gücü, 30 g L⁻¹ sükroz ve 2 mg L⁻¹ IBA konsantrasyonların sekonder metabolit üretimi için optimum koşullar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, maya ekstraktı uygulamalarının doz bağımlı etkiler gösterdiği ve 200 µg mL⁻¹ konsantrasyonunun en verimli sonuçları sağladığı ortaya konmuştur.

Bu çalışma, *Melissa officinalis* adventif köklerinin kontrollü ve optimize edilmiş kültür koşulları altında yüksek verimli sekonder metabolit üretimi için uygun bir biyoteknolojik kaynak olabileceğini göstermektedir. Bu bulgular, özellikle doğal antioksidanların, farmasötik ve gıda endüstrilerine temini için alternatif biyoteknolojik üretim yöntemleri geliştirilmesine ışık tutmaktadır. Ayrıca, elde edilen veriler sonucunda, kültür koşullarının ve elisitör uygulamalarının, bitkisel metabolitlerin biyosentezinde önemli bir belirleyici olduğu açıkça ortaya konmaktadır.

Bitki doku kültürü teknolojileri ve biyoteknolojik yaklaşımlar, sekonder metabolitlerin sürdürülebilir ve kontrollü üretimi açısından büyük potansiyele sahiptir. Elisitörlerin kullanımı, metabolit üretiminde anlamlı artışlar sağlamış olup, bu uygulamaların etkinliği bitki türüne ve uygulama koşullarına bağlı olarak optimize edilmelidir (Kim ve ark., 2011; Namdeo, 2007). Ayrıca, genetik mühendisliğinde kaydedilen ilerlemeler, ilgili biyosentez yollarının yönlendirilmesi ve düzenlenmesi yoluyla metabolitlerin verimliliğini artırmakta bu da endüstriyel üretim süreçleri açısından önemli bir avantaj oluşturmaktadır (Li ve ark., 2020b). Biyoreaktörlerde ortam parametrelerinin hassas kontrolü ve otomasyon teknolojileriyle entegrasyonu sayesinde, yüksek verim ve kalite elde edilmekte; böylece sürdürülebilir ve ekonomik üretim hedeflenmektedir (Li ve

Wang, 2021). Tüm bu teknolojik gelişmeler, yalnızca üretim verimliliğini artırmakla kalmayıp aynı zamanda doğal kaynakların korunmasına ve çevresel etkilerin azaltılmasına da katkı sağlamaktadır (Guerriero ve ark., 2018).

Gelecekte yapılacak çalışmalarda, ortam koşullarının yanı sıra, pH, sıcaklık, oksijen seviyeleri gibi kültür parametrelerinin de optimize edilmesi büyük önem taşımaktadır. Bu çerçevede, biyoreaktör sistemlerinin kurulması ve bu sistemlerde farklı ortam bileşenleriyle gerçekleştirilecek optimizasyon çalışmaları üretim verimliliğinin artırılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca, çeşitli elisitör türleri ve bunların kombinasyonlarının uygulanması, metabolit üretimine etkilerin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına olanak tanıyacaktır. Bu çalışmaların yanı sıra, biyoteknolojik üretim süreçlerinin ekonomik analizleri ve sürdürülebilirlik değerlendirmelerinin de yapılması gereklidir. Bununla birlikte, elde edilen sekonder metabolitlerin farmakolojik etkileri ve biyoyararlanım özelliklerinin kapsamlı bir şekilde araştırılması, bu bileşiklerin potansiyel kullanım alanlarını genişletecek ve sağlık alanındaki uygulamalarını daha sağlam bilimsel temellere dayandıracaktır. Bu sayede, doğal antioksidanlar ve diğer biyoaktif bileşiklerin terapötik potansiyelleri daha etkin ve güvenilir bir şekilde değerlendirilebilecektir.

Sonuç olarak, bu çalışmayla *Melissa officinalis*'in adventif kök kültürlerinde sekonder metabolit üretim potansiyeli ortaya konmuştur. Bu temel bulgular farklı kültür sistemlerinde üretim süreçlerinin geliştirilmesine hem araştırmacılar hem de endüstri açısından büyük katkı sağlayacaktır. Bu alandaki çalışmalara devam edilerek, doğal ürünlerin endüstriyel üretimi ve ilaç sanayinde kullanılabilirliği daha da artırılabilirliği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdellatif, F., Begaa, S., Messaoudi, M., Benarfa, A., Ouakouak, H., Hassani, A., Sawicka, B. & Gandara, J.S., (2023). HPLC–DAD Analysis, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Aromatic Herb *Melissa officinalis* L., Aerial Parts Extracts. Food Analytical Methods, 16(1), 45-54.
- Abdel-Naime, W. A., Fahim, J. R., Fouad, M. A., & Kamel, M. S., (2019). Antibacterial, antifungal, and GC–MS studies of *Melissa officinalis*. South African Journal of Botany, 124, 228-234.
- Agrahari, S., & Dubey, A. (2020). Nanoparticles in plant growth and development. In Biogenic nano-particles and their use in agro-ecosystems (pp. 9-37). Singapore: Springer Singapore.
- Aharizad, S., Rahimi, M. H., Moghadam, M., & Mohebalipour, N. (2012). Study of genetic diversity in lemon balm (*Melissa officinalis* L.) populations based on morphological traits and essential oils content. Ann. Biol. Res, 3(12), 5748-5753.
- Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M., & Koltas, S., (2004). Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes simplex virus type-2. Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, 11(7-8), 657–661. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2003.07.014>
- Anonim 2024 Rosmarinic Acid Market Expands as Demand for Natural Antioxidants Surges <https://www.marketresearchintellect.com/blog/rosmarinic-acid-market-arising-star-in-natural-compounds-driving-innovation/> (30.07.2025)
- Anonim, 2025a Rosmarinic Acid Px - 75 Caps https://www.restorativeformulations.com/RosmarinicAcidPx_US (30.07.2025)
- Anonim, 2025b Sigma-Aldrich Rosmarinic acid, ≥98% (HPLC), Product No. R4033. <https://www.sigmaaldrich.com> (30.07.2025)
- Babaei, M., Borja Zamfir, G. M., Chen, X., Christensen, H. B., Kristensen, M., Nielsen, J., & Borodina, I. (2020). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for rosmarinic acid production. ACS synthetic biology, 9(8), 1978-1988.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M., Akbudak, M.A., (2001). Doku kültürü: Temel laboratuvar teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.1-35
- Baque, M. A., Elgirban, A., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2012a). Production of biomass and bioactive compounds by adventitious root cultures of *Echinacea purpurea* in bioreactors. Industrial Crops and Products, 36(1), 404-409.
- Baque MA, Elgirban A, Lee EJ, Paek KY (2012b) Sucrose regulated enhanced induction of anthraquinone, phenolics, favonoids biosynthesis and activities of antioxidant enzymes in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). Acta Physiol Plant 34:405–415. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0837-2>
- Baque, M. A., Lee, E.-J., & Paek, K.-Y. (2010). Medium salt strength induced changes in growth, physiology and secondary metabolite content in adventitious roots of *Morinda citrifolia*: The role of antioxidant enzymes and phenylalanine ammonia lyase. Plant Cell Reports, 29(6), 685–694. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0854-4>
- Barros, L., Dueñas, M., Dias, M. I., Sousa, M. J., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2013). Phenolic profiles of cultivated, in vitro cultured and commercial samples of *Melissa officinalis* L. infusions. Food chemistry, 136(1), 1-8.

- Baydar, H. (2019). Tıbbi ve aromatik bitkiler bilimi ve teknolojisi (7. Basım). Nobel Akademik Yayıncılık, Yayın, 2328, 21.
- Baytop, T., (1984). Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi (Geçmişte Ve Bugün) Vol. 40. İstanbul Üniversitesi.
- Behzadi, A., Imani, S., Deravi, N., Mohammad Taheri, Z., Mohammadian, F., Moraveji, Z., Shavysi, S., Mostafaloo, M., Soleimani Hadidi, F., Nanbakhsh, S., Olangian-Tehrani, S., Marabi, M. H., Behshood, P., Poudineh, M., Kheirandish, A., Keylani, K., & Behfarnia, P., (2023). Antiviral Potential Of *Melissa Officinalis* L.: A Literature Review. Nutrition And Metabolic Insights, 16, <https://doi.org/10.1177/11786388221146683>
- Bhatti, M. Z., Ismail, H., & Kayani, W. K. (2022). Plant secondary metabolites: therapeutic potential and pharmacological properties. In Secondary metabolites-trends and reviews. IntechOpen.
- Bhatia, S., & Dahiya, R. (2015). Concepts and techniques of plant tissue culture science. Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences, 32-60.
- Blois, M. S., (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature (181) 1199-1200
- Carnat, A. P., Carnat, A., Fraisse, D., & Lamaison, J. L. (1998). The aromatic and polyphenolic composition of lemon balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) tea. Pharmaceutica Acta Helvetiae, 72(5), 301-305.
- Cheynier, V. (2012). Phenolic compounds: from plants to foods. Phytochemistry reviews, 11(2), 153-177.
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V., & Martens, S. (2013). Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. Plant physiology and biochemistry, 72, 1-20.
- Corso, M., Perreau, F., Mouille, G., & Lepiniec, L. (2020). Specialized phenolic compounds in seeds: Structures, functions, and regulations. Plant Science, 296, 110471.
- Cui, X.-H., Murthy, H. N., Wu, C.-H., & Paek, K.-Y. (2010). Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 103(1), 7-14. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9747-z>
- Cui HY, Baque MA, Lee EJ, Paek KY (2013) Scale-up of adventitious root cultures of *Echinacea angustifolia* in a pilot-scale bioreactor for the production of biomass and caffeic acid derivatives. Plant Biotechnol Rep 7:297-308. <https://doi.org/10.1007/s11816-012-0263-y>
- Çetin, B., (2006). *Rubia tinctorum*. Bitkisinde *Agrobacterium rhizogenes* Aracılığıyla Transforme Saçaklı Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Sekonder Metabolit Üretimi. (Doktora Tezi), Celal Bayar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- Dai, J., and Mumper, R. J. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules, 15(10), 7313-7352.
- Dastmalchi, K., Dorman, H. D., Oinonen, P. P., Darwis, Y., Laakso, I., & Hiltunen, R., (2008). Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. LWT-Food Science and Technology, 41(3), 391-400.
- De-Eknamkul, W., & Ellis, B. E. (2014). Rosmarinic acid: Production in plant cell cultures. In Biotechnology in Agriculture and Forestry (pp. 310-329). Springer.

- De Sousa, A. C., Gattass, C. R., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Blank, A. F., & Alves, P. B., (2004). Melissa Officinalis L. Essential Oil: Antitumoral And Antioxidant Activities. *Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, 56(5), 677-681.
- Duncan DB (1955) Multiple range and multiple F-tests. *Biometrics* 11:1–42
- Elshafie, H. S., Camele, I., & Mohamed, A. A. (2023). A comprehensive review on the biological, agricultural and pharmaceutical properties of secondary metabolites based-plant origin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 3266.
- Fazal H, Abbasi BH, Ahmad N, Ali M, Ali S (2016) Sucrose induced osmotic stress and photoperiod regimes enhanced the bio mass and production of antioxidant secondary metabolites in shake-flask suspension cultures of *Prunella vulgaris* L. *Plant Cell Tiss Org Cult* 124:573–581. [https:// doi. org/ 10. 1007/ s11240-015-0915-z](https://doi.org/10.1007/s11240-015-0915-z)
- Gaosheng, H., Jingming, J., (2012). Production of useful secondary metabolites through regulation of biosynthetic pathway in cell and tissue suspension culture of medicinal plants, *Recent Advances In Plant In Vitro Culture*, Edited Leva, A., and Rinaldi, L. M. R. Chapter, 11. 197-209
- Gertlowski, C., & Petersen, M. (1993). Influence of the carbon source on growth and rosmarinic acid production in suspension cultures of *Coleus blumei*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 34, 183-190.
- Grzegorzczuk, I., Matkowski, A., & Wysokińska, H. (2007). Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 104(2), 536.
- Guerriero, G., Berni, R., Muñoz-Sanchez, J. A., Apone, F., Abdel-Salam, E. M., Qahtan, A. A., ... & Faisal, M. (2018). Production of plant secondary metabolites: Examples, tips and suggestions for biotechnologists. *Genes*, 9(6), 309.
- Guirgis, A. A., Abd El-Kawi, M. A., Abbas, H. N., Araffa, A. M. S., & Maksoud, A. I. (2007). High rosmarinic acid content in induced mutants and in in vitro elicited sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) callus. *Asian Journal of Plant Sciences*, 6(6), 1058–1064.
- Guran, K., Buzatu, R., Pinzaru, I., Boruga, M., Marcovici, I., Coricovac, D., Avram, S., Poenaru, M., Susan, M., Susan, R., Radu, D., & Dehelean, C., (2021). In Vitro Pharmac-Toxicological Characterization of *Melissa officinalis* Total Extract Using Oral, Pharynx and Colorectal Carcinoma Cell Lines. *Processes*, 9(5), 850. <https://doi.org/10.3390/pr9050850>
- Hadacek, F. (2002). Secondary Metabolites as Plant Traits: Current Assessment and Future Perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 273–322. <https://doi.org/10.1080/0735-260291044269>
- Haghpanah, M., Namdari, A., Kaleji, M. K., Nikbakht-dehkordi, A., Arzani, A., & Araniti, F. (2025). Interplay Between ROS and Hormones in Plant Defense Against Pathogens. *Plants*, 14(9), 1297. <https://doi.org/10.3390/plants14091297>
- Hakkim FL, Kalyani S, Essa M, Girija S, Song H (2011) Production of rosmarinic in *Ocimum sanctum* cell cultures by the influence of sucrose, phenylalanine, yeast extract, and methyl jasmonate. *Int J Biol Med Res* 2:1070–1074
- Halder, M., Sarkar, S., Jha, S., (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Eng Life Sci.*; 19: 880–895. <https://doi.org/10.1002/elsc.201900058>
- Harborne, J. B. (1999). Classes and functions of secondary products from plants. In *Chemicals from plants: perspectives on plant secondary products* (pp. 1-25).

- Ho TT, Le KC, Kim SW, Park SY (2021) Culture condition optimization and FT-IR analysis of *Polygonum multiflorum* Thunb. adventitious root cultures grown in an air-lift bioreactor system. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 144:371–381. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01961-9>
- Ilieva M, Pavlov A., (1997) Rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM cell-suspension culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 47:683–688. <https://doi.org/10.1007/s002530050995>
- Isah, T., Umar, S., Mujib, A., Sharma, M. P., Rajasekharan, P. E., Zafar, N., Frukh, A., (2018). Secondary metabolism of pharmaceuticals in the plant in vitro cultures: strategies, approaches, and limitations to achieving higher yield. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 132:239–265.
- İrten, A. (2022). Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinde adventif kök süspansiyon kültürlerinin oluşturulması ve bu kültürlerle uygulanan bazı elisitörlerin rosmarinik asit üretimine etkilerinin belirlenmesi (Yüksek lisans tezi). Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı.
- Janicsák, G., Veres, K., Kakasy, A. Z., & Máthé, I. (2006). Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae. *Biochemical systematics and ecology*, 34(5), 392-396.
- Jordán, M. J., Lax, V., Rota, M. C., Lorán, S., & Sotomayor, J. A. (2012). Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the in vitro antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(38), 9603-9608.
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol*, 2(7), 377-392.
- Karaçocuk, M., (2019). Melatonin ve Spermin Uygulamalarının Tuz Stresi Altındaki Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) Bitkisinin Fenolik Bileşiklere ve Antioksidan Aktivitesine Etkisi. (Yüksek Lisans Tezi), Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Kahramanmaraş.
- Karam NS, Jawad FM, Arikat NA, Shibli RA (2003) Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia frutescens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 73:117– 121. <https://doi.org/10.1023/A:1022806420209>
- Karataş, İ., (2013). Siyah havuç (*Daucus carota*) kallus ve hücre süspansiyon kültüründe antosiyanin üretimine UV-C stresinin ve riboflavinin etkilerinin belirlenmesi. (Doktra tezi), Gaziosmanpaşa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat.
- Karataş, İ., Karataş, R. ve Elmastaş, M. (2016). Antosiyaninlerin kallus ve hücre süspansiyon kültürüyle üretimi. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi* (12), 80-91. <https://dergipark.org.tr/en/pub/gbad/issue/29707/319637>
- Karataş, İ., (2021). Effects of hormone and explant sources on secondary metabolite production and antioxidant activities in in vitro root cultures of *Rubia tinctorum* L. (Madder). *KSU J. Agric Nat* 24 (5): 939-947.
- Karataş, İ. (2022a). Reyhan Bitkisinin (*Ocimum basilicum* L.) Adventif Kök Kültürlerinde Rosmarinik Asit Üretim Olanaklarının ve Antioksidan Kapasitenin Araştırılması. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 25(3), 459-466.

- Karataş, İ. (2022b). Production of rosmarinic acid and biomass from adventitious root cultures of *Ocimum basilicum* by optimization of medium components in airlift bioreactors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 151(2), 235-251.
- Karataş, İ. (2023). Optimization of sucrose concentration to promote root proliferation and secondary metabolite accumulation in adventitious root cultures of *Ocimum basilicum*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 59, 365–377. <https://doi.org/10.1007/s11627-023-10341-9>
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res*, 3(13), 1222-1239.
- Kaushik, B., Sharma, J., Kumar, P., & Shourie, A. (2021). Phytochemical properties and pharmacological role of plants: secondary metabolites. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18(1), 23.
- Khadem, A., Bagheri, A., Moshtaghi, N., Akhar, F., & Sharifi, A. (2022). Auxin sensitivity improves production of rosmarinic acid in transformed hairy roots of *lavandula angustifolia*: *Biological Communications*, 67(3).
- Khanam, M. N., Anis, M., Javed, S. B., Mottaghipisheh, J., & Csupor, D. (2022). Adventitious root culture—an alternative strategy for secondary metabolite production: a review. *Agronomy*, 12(5), 1178.
- Khojasteh, A., Mirjalili, M. H., Hidalgo, D., & Corchete, P. (2014). New trends in biotechnological production of rosmarinic acid. *Biotechnology Letters*, 36(11), 2393–2406. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1640-0>
- Kieran, P. M., MacLoughlin, P.F., Malone, D.M., (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, (59) 39-52.
- Kikowska, M., Budzianowski, J., Krawczyk, A., & Thiem, B. (2012). Accumulation of rosmarinic, chlorogenic, and caffeic acids in in vitro cultures of *Eryngium planum* L. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(6), 2425–2433.
- Kim, Y. J., Zhang, D., & Yang, D. C. (2011). Biosynthesis and production of ginsenosides. *Plant Cell Reports*, 30(7), 1209–1221.
- Kim, Y. K., Li, X., & Yang, D. C. (2009). Production and application of ginsenosides in adventitious root cultures of *Panax ginseng*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83(5), 747-755.
- Kintzios, S., Nikolaou, A., & Skoula, M. (1999). Somatic embryogenesis and in vitro rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. *Plant Cell Reports*, 18, 462-466.
- Kintzios, S., Makri, O., Panagiotopoulos, E., & Scapeti, M. (2003). In vitro rosmarinic acid accumulation in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *Biotechnology Letters*, 25, 405-408.
- Krzyzanowska JA, Czubacka AB, Pecio LA, Przybys MB, Doroszewska TB, Stochmal AA, Oleszek WA. (2012) The effects of jasmonic acid and methyl jasmonate on rosmarinic acid production in *Mentha × piperita* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss Org Cult*, 108: 73-81.
- Kumar, P. P., & Loh, C. S. (2012). Plant tissue culture for biotechnology. In *Plant biotechnology and agriculture* (pp. 131-138). Academic Press.
- Lee, E.-J., & Paek, K.-Y. (2012). Enhanced productivity of biomass and bioactive compounds through bioreactor cultures of *Eleutherococcus koreanum* Nakai

- adventitious roots affected by medium salt strength. *Industrial Crops and Products*, 36, 460–465. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.10.005>
- Lee, E. J., Paek, K. Y., & Murthy, H. N. (2017). Enhanced production of valuable compounds in plants through the bioreactor culture of adventitious roots. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(2), 2139-2150.
- Lee, SY, Xu H, Kim YK, Park SU, (2008). Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *World J Microb Biot* 24: 969-972.
- Li, C., & Wang, M. (2021). Application of hairy root culture for bioactive compounds production in medicinal plants. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22(5), 592-608.
- Li, F-X., Jin, Z-P., Zhao, D-X., Cheng, L-Q., Fu, C-X., Ma, F., (2006). Overexpression of the *Saussurea medusa* chalcone isomerase gene in *S. involucrata* hairy root cultures enhances their biosynthesis of apigenin. *Phytochemistry* (67) 553-560.
- Li H, Piao XC, Gao R, Jin MY, Jiang J, Lian ML (2016) Effect of several physicochemical factors on callus biomass and bioactive compound accumulation of *R. sachalinensis* bioreactor culture. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 52:241–250. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9758-5>
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020a). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant physiology and biochemistry*, 148, 80-89.
- Li, Y., Wang, X., & Wei, J. (2020b). CRISPR/Cas9 technology in secondary metabolite production from medicinal plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 40(1), 1–12.
- López, V., Martín, S., Gómez-Serranillos, M. P., Carretero, M. E., Jäger, A. K., & Calvo, M. I. (2009). Neuroprotective and neurological properties of *Melissa officinalis*. *Neurochemical Research*, 34(11), 1955–1961.
- Mammadov, R. (2014). Tohumlu bitkilerde sekonder metabolitler. Nobel Akademik Yayıncılık.
- Mizukami, H., Ogawa, T., Ohashi, H., & Ellis, B. E. (1992). Induction of rosmarinic acid biosynthesis in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by yeast extract. *Plant Cell Reports*, 11(8), 480–483.
- Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A., & Meftahizade, H. (2010). *Melissa officinalis* L., a valuable medicine plant: A review. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(25), 2753-2759.
- Muranaka, T., & Saito, K. (2010). Production of pharmaceuticals by plant tissue cultures. In H.-W. Liu & L. Mander (Eds.), *Comprehensive natural products II* (pp. 615–628). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00065-4>.
- Mulabagal, V., Tsay, H.S., 2004. Plant cell cultures-An alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International journal of Applied Science and Engineering*, 2 (1) 29-48.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3).
- Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY 2008. Adventitious Roots and Secondary Metabolism. *Chinese Journal of Biotechnology* 24,5:711-716
- Murthy, H. N., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118, 1-16.

- Murthy, H. N., Dandin, V.S., Paek, K.Y., (2016). Tools for biotechnological production of useful phytochemicals from adventitious root cultures. *Phytochem Rev.*15/129– 145.
- Murthy, H. N., Dandin, V. S., Park, S. Y., & Paek, K. Y. (2018). Quality, safety and efficacy profiling of ginseng adventitious roots produced in vitro. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 7309-7317.
- Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors–role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. *IntechOpen*.
- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1), 69-79.
- Nasiri-Bezenjani, M. Nagarajan, A., Arivalagan, U., & Rajagurua, P. (2011). In vitro root induction and studies on antibacterial activity of root extract of *Costus igneus* on clinically important human pathogens. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(4), 67-76.
- Nasiri-Bezenjani, M. A., Riahi-Madvar, A., Baghizadeh, A., & Ahmadi, A. R. (2014). Rosmarinic acid production and expression of tyrosine aminotransferase gene in *Melissa officinalis* seedlings in response to yeast extract. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16(5), 921–930. <https://doi.org/10.1007/s11738-014-1610-x>
- Nazir, M., Tungmunthum, D., Bose, S., Drouet, S., Garros, L., Giglioli-Guivarc'h, N., Abbasi, B. H., & Hano, C. (2019). Differential production of phenylpropanoid metabolites in callus cultures of *Ocimum basilicum* L. with distinct in vitro antioxidant activities and in vivo protective effects against UV stress. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(7), 1847–1859. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05647>
- Neumann, KH., Kumar, A., Imani, J. (2020). Secondary Metabolism. In: *Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-49098-0_10
- Öztop, H., (2022). *Centella asiatica* (L.) Ürban Hücre Kültüründe Elisitör Uygulamalarının Sekonder Metabolit Üretimi ve Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. (Yüksek Lisans Tezi). Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomühendislik Anabilim Dalı. İstanbul.
- Onay, A., Kılınç, F.M., Yıldırım, H. (2019). Bitki Doku Kültürü. Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Yaklaşımlar. Bölüm 5 Sayfa: 73-94 Editör Çiftçi, Y.Ö., Uncuoğlu, A. A., Palme Yayınevi.
- Oyaizu, M., (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44:307-315
- Park, W. T., Arasu, M. V., Al-Dhabi, N. A., Yeo, S. K., Jeon, J., Park, J. S., Lee, S. Y., & Park, S. U. (2016). Yeast Extract and Silver Nitrate Induce the Expression of Phenylpropanoid Biosynthetic Genes and Induce the Accumulation of Rosmarinic Acid in *Agastache rugosa* Cell Culture. *Molecules*, 21(4), 426. <https://doi.org/10.3390/molecules21040426>
- Pekal, A., Pyrzynska, K., (2014). Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. *Food Anal Methods* 7:1776–1782.
- Petersen, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125.
- Pu, X., Kitaoka, N., Rodríguez-López, C. E., & Chen, S. (2024). Plant secondary metabolite biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1477551.

- Rahmat, E., & Kang, Y. (2019). Adventitious root culture for secondary metabolite production in medicinal plants: a review. *Journal of Plant Biotechnology*, 46(3), 143-157.
- Ramachandra, R. S., Ravishankar, G.A., (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, (20) 101-153.
- Rattan, R. S. (2010). Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. *Crop protection*, 29(9), 913-920.
- Razzaque, A., & Ellis, B. E. (1977). Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta*, 137(1), 287-291.
- 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 (9- 10) 1231-1237.
- Ribeiro-Santos, R., Carvalho-Costa, D., Cavaleiro, C., Costa, H. S., Albuquerque, T. G., Castilho, M. C., Ramos, F., Melo, N. R., & Sanches-Silva, A. (2015). A novel insight on an ancient aromatic plant: The rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 355–368. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.015>
- Robbins, R and Bean, S. (2004). Development of a quantitative high-performance liquid chromatography-photodiode array detection measurement system for phenolic acids. *Journal of chromatography. A*. 1038. 97-105. [10.1016/j.chroma.2004.03.009](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.03.009).
- Sahu, R., Gangopadhyay, M., & Dewanjee, S. (2013). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Solenostemon scutellarioides*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(5), 1473-1481.
- Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Hernández-Carlos, B., & Villanueva-Cañongo, C. (2019). Shikimic acid pathway in biosynthesis of phenolic compounds. In *Plant physiological aspects of phenolic compounds*. IntechOpen.
- Sardar, T., Maqbol, M., Ishtiaq, M., Mazhar, M. W., El-Sheikh, M., Casini, R., Mahmoud, E. A., Elansary, H. O., (2023). Synergistic Influence of Yeast Extract and Calcium Oxide Nanoparticles on the Synthesis of Bioactive Antioxidants and Metabolites in *Swertia chirata* In Vitro Callus Cultures. *Molecules*, 28(12), 4607. <https://doi.org/10.3390/molecules28124607>
- Sarropoulou, V., Paloukopoulou, C., Karioti, A., Maloupa, E., & Grigoriadou, K. (2023). Rosmarinic acid production from *Origanum dictamnus* l. root liquid cultures in vitro. *Plants*, 12(2), 299..
- Sasson, A., (1991). Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures : biotechnological and economic aspects. *Options Méditerranéennes*, (14) 59-74.
- Scarpatti, M. L., & Oriente, G. (1958). Isolation of rosmarinic acid from *Rosmarinus officinalis* L. (Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal *rosmarinus* off.) *Ricerca Scientifica*, 28, 2329–2333.
- Seca, A. M. L., & Pinto, D. C. G. A. (2019). Biological Potential and Medical Use of Secondary Metabolites. *Medicines* (Basel, Switzerland), 6(2), 66. <https://doi.org/10.3390/medicines6020066>
- Selwal, N., Rahayu, F., Herwati, A., Latifah, E., Supriyono, S., Suhara, C., Suastika, I. B. K., Mahayu, W. M., & Wani, A. K. (2023). Enhancing secondary metabolite production in plants: Exploring traditional and modern strategies. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 100702. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2023.100702>

- Shakeri, A., Sahebkar, A., & Javadi, B. (2016). *Melissa officinalis* L.—A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of ethnopharmacology*, 188, 204-228.
- Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B.S., (2010). An alternate method of natural drug production: Elciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, 5(3) 222-247.
- Slinkard, K., Singleton, V. L., (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticulture* 28:49-55.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., (2001). Sekonder metabolit üretimi, Bitki Biyoteknolojisi, Doku Kültürü ve Uygulamaları. Editörler: Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S. Konya, s.211-261.
- SPSS 20. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp. Released 2011.
- Srivastava S, Conlan XA, Adholeya A, Cahill DM (2016) Elite hairy roots of *Ocimum basilicum* as a new source of rosmarinic acid and antioxidants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 126:19–32. [https:// doi.org/10.1007/s11240-016-0973-x](https://doi.org/10.1007/s11240-016-0973-x)
- Steffens, B., Rasmussen, A., (2016). The Physiology of Adventitious Roots, Topical Review on Adventitious Root Physiology, *Plant Physiology*, Vol. 170, pp. 603--617,.
- Tada, H., Murakami, Y., Omoto, T., Shimomura, K., & Ishimaru, K. (1996). Rosmarinic acid and related phenolics in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. *Phytochemistry*, 42(2), 431-434.
- Tao, Z., Yuan, H., Liu, M., Liu, Q., Zhang, S., Liu, H., Jiang, Y., Huang, D., and Wang, T., (2023). Yeast Extract: Characteristics, Production, Applications and Future Perspectives, *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 33(2):151-166. <https://doi.org/10.4014/jmb.2207.07057>
- Thorpe, T. A. (1990). The current status of plant tissue culture. In *Developments in crop science* (Vol. 19, pp. 1-33). Elsevier.
- Tlak Gajger, I., & Dar, S. A. (2021). Plant Allelochemicals as Sources of Insecticides. *Insects*, 12(3), 189. <https://doi.org/10.3390/insects12030189>
- Toivonen, L. (1993), Utilization of Hairy Root Cultures for Production of Secondary Metabolites. *Biotechnol Progress*, 9: 12-20. <https://doi.org/10.1021/bp00019a002>
- Topcu, Ş., ve Çölgeçen, H. (2015). Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi* (2), 9-29.
- Trócsányi, E., György, Z., & Zámoriné-Németh, É. (2020). New insights into rosmarinic acid biosynthesis based on molecular studies. *Current plant biology*, 23, 100162.
- Tundis, R., Loizzo, M. R., Bonesi, M., & Menichini, F. (2015). Potential role of natural compounds against skin aging. *Current medicinal chemistry*, 22(12), 1515–1538. <https://doi.org/10.2174/0929867322666150227151809>
- Ulbrich, B., Wiesner, W., & Arens, H. (1985). Large scale production of rosmarinic acid from plant cell cultures of *Coleus blumei* Benth. In K. H. Neumann, W. Barz, & E. Reinhard (Eds.), *Primary and secondary metabolism of plant cell cultures* (pp. 293–303). Springer.
- Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., & Tsay, H. S. (2004). Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 45(1), 1-22.
- Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1, 13-25.

- Vogelsang, K., Schneider, B., & Petersen, M. (2005). Production of rosmarinic acid and a new rosmarinic acid 3'-O- β -D-glucoside in suspension cultures of the hornwort *Anthoceros agrestis* Paton. *Planta*, 223(3), 369–373.
- Vuolo, M. M., Lima, V. S., & Maróstica Junior, M. R. (2019). Phenolic Compounds. *Bioactive Compounds*, 33–50. doi:10.1016/b978-0-12-814774-0.00002-5
- Vuran, N. E., Türker, M., (2021). Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Miktarını Arttırmaya Yönelik Uygulamalar. *Int. J. Adv. Eng. Pure Sci.* 2021, 33(3):487-498.
- Wu, C. H., Ge, Y. H., & Lin, C. Y. (2018a). Adventitious root culture: a potent biotechnological tool for secondary metabolite production. *Plant Growth Regulation*, 86(3), 207-215.
- Wu, CH, Tang J, Jin ZX, Wang M, Liu ZQ, Huang T, Lian ML (2018b) Optimizing co-culture conditions of adventitious roots of *Echinacea pallida* and *Echinacea purpurea* in air-lift bioreactor systems. *Biochem Eng J* 132:206–216. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.01.024>
- Yamamoto, H., Yazaki, K., & Inoue, K. (2000). Simultaneous analysis of shikimate-derived secondary metabolites in *Lithospermum erythrorhizon* cell suspension cultures by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 738(1–2), 3–15.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., & Wu, J. Y. (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*, 170(3), 853-858.
- Yin S, Gao W, Liang Y, Wang J, Liu H, Wei C, Zuo B (2013) Influence of sucrose concentration and phosphate source on biomass and metabolite accumulation in adventitious roots of *Pseudostellaria heterophylla*. *Acta Physiol Plant* 35:1579–1585. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1199-0>
- Yeşil-Çeliktaş, Ö., Nartop, P., Gurel, A., Bedir, E., & Vardar-Sukan, F. (2007). Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis* calli. *Journal of Plant Physiology*, 164(12), 1536–1542
- Zam, W., Quispe, C., Sharifi-Rad, J., López, M. D., Schoebitz, M., Martorell, M., Sharopov, F., Tsouh Fokou, P. V., Mishra, A. P., Chandran, D., Kumar, M., Chen, J.-T., & Pezzani, R. (2022). An updated review on the properties of *Melissa officinalis* L.: Not exclusively anti-anxiety. *Frontiers in Bioscience (Scholar Edition)*, 14(2), 16–30. <https://doi.org/10.31083/j.fbs1402016>
- Zaman, G., Farooq, U., Bajwa, M. N., Jan, H., Shah, M., Ahmad, R., Andleeb, A., Drouet, S., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2022). Effects of yeast extract on the production of phenylpropanoid metabolites in callus culture of purple basil (*Ocimum basilicum* L. var *purpurascens*) and their in-vitro evaluation for antioxidant potential. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(3), 543-553. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02303-7>
- Zhang, H., & Tsao, R. (2016). Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Current Opinion in Food Science*, 8, 33-42.

ÖZGEÇMİŞ

