



T.C.
BATMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TUZ STRESİNE MARUZ BIRAKILAN *Salvia*
***virgata* Jacq. BİTKİSİNDE ELİSİTÖR**
UYGULAMASININ FİZYOLOJİK VE
ANTİOKSİDAN KAPASİTEYE ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Türkan OKTAY BOZABA

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Selçuk KURU

Temmuz-2023
BATMAN
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Türkan OKTAY BOZABA tarafından hazırlanan “Tuz stresine maruz bırakılan *Salvia virgata* Jacq. bitkisinde elisitör uygulamasının fizyolojik ve antioksidan kapasiteye etkileri” adlı tez çalışması 31/07/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Prof. Dr. Filiz AKBAŞ

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Selçuk KURU

.....

Üye

Doç. Dr. Mehmet Emre EREZ

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Osman PAKMA
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü V.

*Bu tez çalışması Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından BTÜBAP-2022-YL-02 numaralı proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

Türkan OKTAY BOZABA

31/07/2023

ÖZET
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**TUZ STRESİNE MARUZ BIRAKILAN *Salvia virgata* Jacq. BİTKİSİNDE
ELİSİTÖR UYGULAMASININ FİZYOLOJİK VE ANTİOKSİDAN
KAPASİTEYE ETKİLERİ**

Türkan OKTAY BOZABA

**Batman Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı**

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Selçuk KURU

2023, 82 Sayfa

Jüri
Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Selçuk KURU
Prof. Dr. Filiz AKBAS
Doç. Dr. Mehmet Emre EREZ

Bu çalışmada, *Salvia virgata* bitkisi tuz (NaCl) stresine maruz bırakılmış ve çeşitli gruplara ayrılan bitkilere çinko oksit nanopartikül (ZnONP), salisilik asit (SA) ve ZnONP+SA kombinasyonu uygulanmıştır. Bitkilerin fotosentetik pigment (klorofil a, klorofil b ve karotenoidler), prolin (stresle ilişkili bir amino asit), malondialdehit (MDA, lipid peroksidasyon göstergesi), toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği belirlenmiştir. Ayrıca, antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için DPPH, ABTS ve CUPRAC gibi serbest radikal giderme aktiviteleri ölçülmüş ve elde edilen tüm veriler karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu doğrultuda *Salvia virgata* bitkisi tohumdan itibaren yetiştirilerek 4 hafta boyunca ¼ hoagland besin çözeltisiyle ve bu sürenin sonunda kontrol grubu hariç diğer bitkiler 2 hafta boyunca 100 mM NaCl stresine maruz bırakılmıştır. Toplam 6 haftalık gelişimden sonra 10 gün boyunca SA ve ZnONP uygulamaları yapılarak, saksılar; “Kontrol, 100 mM NaCl, 100 mM NaCl + 500 µM SA, 100 mM NaCl + 20 mg/L ZnONP ve 100 mM NaCl + 500 µM SA + 20 mg/L ZnONP” olacak şekilde beş gruba ayrılmış ve 10. günü takiben bitkiler hasat edilmiştir.

Tuz stresi uygulaması klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriğinde azalmaya neden olurken, tuz stresi ile birlikte uygulanan SA, ZnONP, SA+ZnONP elisitörleri, her üç pigment içeriğini artırmıştır. Prolin ve MDA içeriği, tuz stresi uygulaması sonucunda artış gösterirken, prolin içeriği elisitör uygulamalarıyla daha fazla artış göstermiş ancak, MDA içeriği elisitör uygulamalarıyla sadece tuz uygulanan bitkilere göre azalmıştır. En düşük prolin miktarı 2.293 ± 0.13 mM g⁻¹ kontrol grubunda, en yüksek prolin miktarı 4.128 ± 0.18 mM g⁻¹ NaCl+SA+ZnONP uygulamasında; en düşük MDA içeriği 1.674 ± 0.09 µM g⁻¹ kontrol grubunda, en yüksek MDA içeriği 3.666 ± 0.11 µM g⁻¹ NaCl uygulamasında görülmüştür. Tuz stresi ve tuzla birlikte uygulanan SA, ZnONP, SA+ZnONP uygulamaları toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği kontrol grubuna göre artırmakla birlikte, elisitör uygulamalarının toplam fenolik ve flavonoid içeriği daha fazla artırdığı tespit edilmiştir. En düşük toplam fenolik içerik (166.82 ± 1.72 µg) ve toplam flavonoid içerik (62.25 ± 0.78 µg) kontrol grubunda; en yüksek toplam fenolik içerik (314.96 ± 3.47 µg) ve toplam flavonoid içerik (114.50 ± 1.96 µg) NaCl+ZnONP uygulamasında görülmüştür. Toplam antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla kullanılan DPPH, ABTS ve CUPRAC yöntemlerinden elde edilen sonuçlar benzerlik göstermiştir. Tuz stresi ve tuzla birlikte tüm elisitör uygulamaları, antioksidan aktiviteyi kontrol grubuna göre artırmıştır. Üç yöntemin antioksidan aktivite sıralamasının benzerlik gösterdiği ve NaCl+ZnONP > NaCl+SA > NaCl+SA+ZnONP > NaCl > Kontrol şeklinde olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte DPPH yönteminde SA, ZnONP, SA+ZnONP uygulamaları sonucunda elde edilen aktivite değerlerinin pozitif kontrol olarak kullanılan BHT'den, ABTS ve CUPRAC yöntemlerinde NaCl+ZnONP uygulamasının pozitif olarak kullanılan BHA'dan daha yüksek antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir.

Elde edilen bu sonuçlara göre, NaCl+SA+ZnONP elisitör uygulamasının fotosentetik pigment, prolin ve MDA içeriği üzerine daha etkili olduğu, toplam fenolik ve toplam flavonoid içerik ile toplam antioksidan aktivitede NaCl+ZnONP elisitör uygulamasının daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca, SA ve ZnONP'nin hem stres hasarını azaltmadaki etkileri hem de sekonder metabolit (fenolik, flavonoid, karotenoid) üretimine olan etkileri birlikte değerlendirilerek özellikle stres hasarını azaltmada SA ve ZnONP'nin sinerjik etki gösterdiği görülmüştür. SA ve ZnONP uygulamaları, tuz stresi altındaki bitkilerde stres etkilerini azaltma potansiyeline sahip olabilir. Ancak, bu etkilerin bitki türüne, stres koşullarına, uygulama yöntemine ve kullanılan elisitörlerin konsantrasyonlarına bağlı olarak değişebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, SA ve ZnONP gibi elisitörlerin stres yönetimi stratejilerinde kullanılmasıyla ilgili daha fazla araştırma yapılması önerilmektedir. Bu araştırmalar, bu elisitörlerin etkinliğini ve uygulama protokollerini daha iyi anlamamıza ve bitkilerin tuz stresi gibi çevresel streslere karşı daha iyi bir uyum sağlamasını destekleyen stratejiler geliştirmemize yardımcı olabilir.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, Çinko oksit nanopartikül, Salisilik asit, *Salvia virgata*, Tuz stresi

ABSTRACT

MS THESIS

EXPOSED TO SALT STRESS, *Salvia virgata* Jacq. EFFECTS OF ELISITOR APPLICATION ON PHYSIOLOGICAL AND ANTIOXIDANT CAPACITY Türkan OKTAY BOZABA

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES OF BATMAN UNIVERSITY THE DEGREE OF MASTER SCIENCE IN BIOLOGY

Advisor: Asst. Prof. Dr. İbrahim Selçuk KURU

2023, 82 Pages

Jury

Asst. Prof. Dr. İbrahim Selçuk KURU

Prof. Dr. Filiz AKBAŞ

Assoc. Prof. Dr. Mehmet Emre EREZ

In this study, *Salvia virgata* plant was exposed to salt (NaCl) stress and zinc oxide nanoparticle (ZnONP), salicylic acid (SA) and ZnONP+SA combination was applied to plants divided into various groups. The photosynthetic pigment (chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoids), proline (a stress-related amino acid), malondialdehyde (MDA, lipid peroxidation indicator), total phenolic and total flavonoid content of the plants were determined. Additionally, free radical scavenging activities such as DPPH, ABTS, and CUPRAC were measured to evaluate antioxidant capacity, and all the obtained data were evaluated comparatively. For this purpose, *Salvia virgata* plant was grown from seed and exposed to ¼ hoagland nutrient solution for 4 weeks and at the end of this period, other plants except the control group were exposed to 100 mM NaCl stress for 2 weeks. After a total of six weeks of growth, SA and ZnONP applications were made for 10 days on the potted plants. The pots were divided into five groups as follows: "Control, 100 mM NaCl, 100 mM NaCl + 500 µM SA, 100 mM NaCl + 20 mg/L ZnONP, and 100 mM NaCl + 500 µM SA + 20 mg/L ZnONP" and after the 10th day has been harvested.

While salt stress application caused a decrease in chlorophyll a, chlorophyll b and carotenoid contents, SA, ZnONP, SA+ZnONP elicitors applied together with salt stress increased the content of all three pigments. Proline and MDA content increased as a result of salt stress application. Proline content increased more with elicitor applications, but MDA content decreased with elicitor applications compared to plants treated with only salt. The lowest amount of proline in the control group ($2.293 \pm 0.13 \text{ mM g}^{-1}$), the highest amount of proline in NaCl+SA+ZnONP ($4.128 \pm 0.18 \text{ mM g}^{-1}$) application; the lowest MDA content was found in the control group ($1.674 \pm 0.09 \text{ µM g}^{-1}$), and the highest MDA content was determined in NaCl ($3.666 \pm 0.11 \text{ µM g}^{-1}$) application. The application of salt stress and the combined application of SA, ZnONP, and SA+ZnONP increased the total phenolic and total flavonoid content compared to the control group. Moreover, it was observed that elicitor applications resulted in a greater increase in total phenolic and flavonoid content than salt stress alone. The lowest total phenolic content ($166.82 \pm 1.72 \text{ µg}$) and total flavonoid content ($62.25 \pm 0.78 \text{ µg}$) in the control group; the highest total phenolic content ($314.96 \pm 3.47 \text{ µg}$) and total flavonoid content ($114.50 \pm 1.96 \text{ µg}$) in the NaCl+ZnONP treatment group were observed. The results obtained from the DPPH, ABTS, and CUPRAC methods, used to determine total antioxidant activity, showed similarities. Salt stress and all elicitor applications with salt increased antioxidant activity compared to the control group. The antioxidant activity of the three methods were similar and the activity sorting from largest to smallest was determined as NaCl+ZnONP > NaCl+SA > NaCl+SA+ZnONP > NaCl > Control. In addition, it was observed that the activity values obtained from the SA, ZnONP, and SA+ZnONP applications in the DPPH method exhibited higher antioxidant activity than the positive control BHT, while in the ABTS and CUPRAC methods, the NaCl+ZnONP application showed higher antioxidant activity than the positive control BHA.

According to the obtained results, it can be concluded that the NaCl+SA+ZnONP elicitor application is more effective in terms of photosynthetic pigment, proline, and MDA content, while the

NaCl+ZnONP elicitor application is more effective in terms of total phenolic and total flavonoid content, as well as total antioxidant activity. Additionally, when evaluating the effects of SA and ZnONP on reducing stress damage and secondary metabolite (phenolic, flavonoid, carotenoid) production together, it was observed that SA and ZnONP exhibit a synergistic effect, especially in reducing stress damage. SA and ZnONP applications may have the potential to reduce the effects of stress in plants under salt stress. However, it should be noted that these effects may vary depending on the plant species, stress conditions, application methods and concentrations of elicitors used. Therefore, further research on the use of elicitors such as SA and ZnONP in stress management strategies is recommended. Such research can help us better understand the effectiveness and application protocols of these elicitors and develop strategies that support better adaptation of plants to environmental stresses like salt stress.

Keywords: Antioxidant activity, Zinc oxide nanoparticle, Salicylic acid,, *Salvia virgata*, Salt stress

ÖNSÖZ

Topraktaki tuz miktarının normalden daha yüksek olması veya sulama suyundaki tuzluluğun yüksek olması durumunda ortaya çıkan tuz stresi, bitkilerin büyümesini, gelişimini ve verimini olumsuz etkileyebilen önemli bir faktördür. Bitkilerin tuz stresine karşı toleranslı hale getirilmesi için, tuz toleranslı bitki türlerinin kullanılması, tuz toleranslı çeşitlerin seçilmesi, tuz stresine dayanıklı genlerin transferi, toprak iyileştirmesi ve sulama yönetimi gibi çeşitli stratejiler kullanılabilir. Ayrıca, nanopartikül ve salisilik asit gibi çeşitli elisitörlerin kullanımı, bitkilerin tuz stresine karşı toleransını artırmada potansiyel stratejiler arasında yer almaktadır. Bununla birlikte, nanopartikül ve salisilik asit elisitörleri, bitkilerin savunma tepkilerini uyarabilir ve bazı sekonder metabolitlerin sentezini artırabilir. Bu kapsamda, tuz (NaCl) stresine maruz bırakılan *Salvia virgata* bitkisine salisilik asit ve çinko oksit nanopartikül elisitörleri ayrı ayrı ve birlikte uygulanarak hem stres hasarını azaltmadaki etkileri hem de sekonder metabolit (fenolik, flavonoid, karotenoid) üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Salisilik asit ve çinko oksit nanopartikülün, stresin etkisini azaltma ve sekonder metabolit üretimini artırmada nasıl etkileşim gösterdiğini anlamak, bitki stres toleransını artırmak ve bitki sağlığını iyileştirmek için potansiyel stratejiler geliştirmek açısından önemlidir. Bu elisitörlerin kullanımı, bitkisel üretimde tuz stresine karşı toleransı artırma potansiyeline sahip olmasına rağmen, optimize edilmiş uygulama protokollerine ihtiyaç duyulması araştırmamızı önemli kılmaktadır.

Yüksek lisans tez danışmanlığımı üstlenerek tüm çalışmalarım süresince karşıma çıkan her türlü sorunun çözülmesinde yardımcı olan, her konuda desteğini aldığım, tecrübe ve bilgilerini esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Dr. Öğr. Üyesi İbrahim Selçuk KURU'ya ve laboratuvar analiz süreçleri boyunca desteğini esirgemeyen değerli Dr. Öğr. Üyesi Pınar ORCAN'a çok teşekkür ederim. *Salvia virgata* bitkisini toplayıp teşhis eden Doç. Dr. Hüseyin EROĞLU ve bitkiye ait görselleri bizimle paylaşan Dr. Mehmet FIRAT'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca Yüksek lisans tezimi, BTÜBAP-2022-YL-02 no'lu proje ile destekleyen Batman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne (BTÜBAP) teşekkür ederim.

Türkan OKTAY BOZABA
BATMAN-2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
ÖNSÖZ	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	6
2.1. Botanik Özellikler	6
2.2. Salvia Türlerinin Kullanımı	8
2.3. Bitkilerde Stres Faktörleri	9
2.3.1. Bitkilerde tuz stresi.....	10
2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar	13
2.5. Elisitörler	17
2.5.1. Nanopartiküller	19
2.5.2. Salisilik asit	20
2.6. Literatür Özetleri	22
3. MATERYAL VE YÖNTEM	27
3.1. Materyal	27
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Çözeltilerin hazırlanması	27
3.2.2. Bitkisel materyalin yetiştirilmesi	28
3.2.3. Stres faktörü ve elisitör uygulamaları	29
3.2.4. Fotosentetik pigment içeriklerinin belirlenmesi	30
3.2.5. Prolin içeriğinin belirlenmesi	30
3.2.6. Malondialdehit içeriğinin belirlenmesi	31
3.2.7. Antioksidan aktivite tayini	32
3.2.7.1. Bitki ekstrelerinin hazırlanması	32
3.2.7.2. Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi	33
3.2.7.3. Toplam flavonoid içeriğin belirlenmesi	34
3.2.7.4. DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi	35
3.2.7.5. ABTS ^{•+} katyon radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi	36
3.2.7.6. CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme) aktivitesinin belirlenmesi	37
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	39

4.1. Fotosentetik Pigment İçerikleri	39
4.2. Prolin İçeriği	40
4.3. Malondialdehit İçeriği	41
4.4. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriği	42
4.5. Toplam Antioksidan Aktivite Bulguları	44
4.5.1. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi	44
4.5.2. ABTS ^{•+} katyon radikali giderim aktivitesi	46
4.5.3. CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme) aktivitesi	48
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	56
5.1. Sonuç	56
5.2. Öneriler	57
KAYNAKLAR	59
ÖZGEÇMİŞ	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

L	: Litre
M	: Molar
g	: Gram
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
μM	: Mikromolar
nm	: Nanometre
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre

Kısaltmalar

NaCl	: Sodyum klorür
NP	: Nanopartikül
ZnONP	: Çinko oksit nanopartikül
SA	: Salisilik asit
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
O₂•-	: Süperoksit radikali
OH•	: Hidroksil radikali
¹O₂	: Tekli oksijen
MDA	: Malondialdehit
AA	: Askorbik asit
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)
BHA	: Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	: Bütil hidroksitoluen
CUPRAC	: Bakır (II) İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
ROT	: Reaktif oksijen türleri
SM	: Sekonder metabolit
QE	: Kersetin eşdeğeri
%I	: Yüzde inhibisyon
IC₅₀	: Inhibitory concentration 50

1. GİRİŞ

Bitkiler genellikle büyümelerini ve üretkenliklerini sınırlayan ve aynı zamanda dünya çapındaki tarımsal üretimde önemli kayıplara neden olan kuraklık, sıcak, soğuk, besin eksiklikleri, topraktaki aşırı tuz veya toksik metal seviyeleri gibi olumsuz abiyotik çevre koşullarıyla karşı karşıyadır. Bu abiyotik stresler, dünya çapında ekilebilir arazilerin kullanımını sınırlar ve ürün verimliliğini olumsuz etkiler (Zhang ve ark., 2022). Çevresel stres faktörleri arasında sıklıkla rastlanan tuzluluk, dünya çapında bitkisel üretimin önündeki en önemli stres engellerinden biri olup özellikle kurak ve yarı kurak bölgelerde bitki üretimini ciddi şekilde sınırlamaktadır. Yetersiz sulama, yüksek düzeyde buharlaşma, sık sulama ve deniz suyuyla temas gibi birçok faktör toprak tuzluluğuna neden olmaktadır. Dünya genelinde 9 milyar hektarın üzerinde olan tuzluluk oranı yüksek araziler, bitkisel üretim ve hatta doğal bitki popülasyonu için ciddi bir tehlike oluşturmaktadır (Mahajan ve ark., 2008).

Tuz stresi; “ozmotik stres”, “iyon toksisitesi” ve “oksidatif stres” yoluyla bitki metabolizmasını olumsuz etkiler. Bitki kök hücreleri, toprak çözeltisinin hiperozmotik basıncı nedeniyle suyu emmek yerine kaybedebilir. Bu nedenle ozmotik strese yanıt öncelikle ozmotik ayarlamaları içerir. Bitkiler, hücresel düzeyde ozmotik dengeyi desteklemek için prolin, çözünür şekerler, glisin, betain ve diğer ozmolitleri sentezler (Taji ve ark., 2002). Tuzlu topraklarda sodyum klorür (NaCl), toplam çözünür tuzların %50-80'ini oluşturur (Rengasamy, 2006). Bu topraklarda bulunan bitkilerde sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) iyonlarının yüksek oranda birikmesi sonucu iyon toksisitesi ve hücre içi iyon dengesizliği meydana gelir. Bu iyonlar, birçok enzimi ve fotosentez sinyal sistemleri gibi hücresel fonksiyonları etkiler (Cheeseman, 2013). Ayrıca, sitoplazmadaki fazla Na^+ , nitrojen (N), fosfor (P), potasyum (K^+), kalsiyum (Ca^{2+}) ve çinko (Zn^{2+}) dahil olmak üzere birçok makro ve mikro besinlerin taşınımını engeller (Liu ve ark., 2022). Ozmotik stres ve iyon toksisitesi tuzluluğun birincil etkilerinin bir sonucu olup, oksidatif stres gibi ikincil stresler sıklıkla reaktif oksijen türlerinin (ROT) aşırı üretimi nedeniyle oluşur. Oksidatif stres sonucu yüksek miktarda oluşarak zararlı hale gelen ROT'lar, lipid peroksidasyonuna yol açarak membran akışkanlığının ve geçirgenliğinin artmasına (Sharma ve ark., 2012), fonksiyonel ve yapısal proteinlerin denatürasyonuna, fotosentetik pigmentlerin bozulmasına (Nkomo ve ark., 2019) ve baz modifikasyonları yoluyla nükleik asitlerin olumsuz yönde etkilenmesine neden olur (Jena, 2012).

Tuza toleranslı bitkilerin ıslah edilmesi, tuza dayanıklı ürün çeşitlerinin geliştirilmesi, bitkisel üretimde dayanıklılık, sürdürülebilirlik ve verimlilik sağlamak amacıyla tuz stresine karşı koyacak yeni teknolojilerin kullanılması büyük önem taşımaktadır (Hofmann ve ark., 2020). Bu kapsamda hızla gelişen bir alan olan nanoteknoloji, ilaç, gıda, kozmetik, tekstil, elektronik, su arıtma dahil olmak üzere çok çeşitli sektörlerde kullanılmaya başlanmış oldukça popüler bir teknolojidir. Bununla birlikte, nanoteknolojinin tarımsal ve bitki bazlı ürünlerin üretim süreçlerinde benimsenmesi, sürdürülebilirlik için hayati önem taşıyan potansiyel ve hızlı çözümler sunabilmesi nedeniyle önemli bir zemin kazanmıştır (Zulfiqar ve ark., 2019). Bu nedenle tuzluluk stresi altında büyümeyi ve bitki performansını iyileştirmek için en umut verici yöntemlerden biri olarak kullanılan nanopartiküllerin kullanımına büyük ilgi gösterilmiştir. Nanopartiküller (NP), 1 ila 100 nm arasında çapa sahip çok küçük boyutlu bileşenlerden oluşur ve bu bileşenlerin önemli düzeyde birçok etkileri vardır (Etesami ve ark., 2021). NP'lerin tuzluluk stresi altındaki farklı bitkiler üzerinde çeşitli çalışmalarda kullanılmasının olumlu etkileri kanıtlanmıştır. NP'ler, hormonal konsantrasyonları, antioksidan enzim aktivitelerini, iyon homeostazını, gen ekspresyonunu ve savunma sistemlerini değiştirerek çeşitli bitkilerde tuzluluk toleransını düzenler (Wahid ve ark., 2020). Bazı NP'lerin tuzluluk stresi altındaki farklı bitkiler üzerinde enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan aktiviteleri artırdığı, prolin ve fenolik içeriği artırdığı, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve MDA içeriklerini azalttığı rapor edilmiştir (Moradbeygi ve ark., 2020; Gohari ve ark., 2020; Sen ve ark., 2020).

Bitkiler karbonhidratlar, proteinler, lipitler gibi birincil metabolit olarak adlandırılan büyüme ve gelişim olaylarında rol oynayan maddelere sahip olmalarının yanı sıra çevreye ve stres koşullarına karşı uyum sağlamada rol oynayan sekonder metabolitler olarak adlandırılan maddelere de sahiptir (Leicach ve Chludil, 2014). Bitki büyümesini ve sekonder metabolitlerin üretimini etkileyen en önemli faktörlerden biri tuz stresidir. Bitkiler, kendilerini bu streslerden korumak için güçlü ve entegre bağışıklık sistemleriyle evrimleşmişlerdir. Hücrel reseptörler, stres faktörlerini tanımlayarak hem lokal enfeksiyon bölgelerinde hem de uzak bölgelerde bağışıklık tepkileri üretirler. Küçük molekül yapısına sahip bir hormon olan salisilik asit, hem lokal hem de sistemik bağışıklık tepkilerine katılımı nedeniyle stres tepkilerini uyarmada önemli rol oynamaktadır. Salisilik asit (SA), önemli bir sinyal molekülü olarak işlev gören, çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik işlevleri etkileyen, hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı tolerans üzerinde çeşitli etkileri olan, doğal olarak

bulunan ve dünya çapında bilim adamlarının ilgisini çeken en önemli basit fenolik bileşiklerden biridir (Kaltdorf ve Naseem, 2013; Wani ve ark., 2017). Çeşitli araştırmacılar bitkilerin olumsuz çevresel faktörlere karşı endojen kaynaklı salisilik asit miktarındaki aşırı artışı bildirmiştir (He ve ark., 2007; Zhao ve ark., 2021). Bu bulgular, bitkilere çeşitli streslere karşı tolerans sağlamada salisilik asidin eksojen uygulamasının rolü için yeni bir alan açmıştır. Kadmiyum stresine maruz kalan fasulye tohumlarının salisilik asit ön işlemi, klorofil ve karotenoid içeriğini artırırken, H_2O_2 ve MDA içeriğini azaltarak oksidatif hasarı azaltmıştır (Saidi ve ark., 2013). Tuz stresine maruz bırakılan çeşitli bitkilerde eksojen SA uygulamasının, pigment içeriğini artırdığı (Manaa ve ark., 2014), oksidatif stresi iyileştirdiği (Fayez ve Bazaid, 2014), prolin miktarını artırdığı (Hussain ve ark., 2021), MDA miktarını azalttığı (Mahdavian, 2023) bildirilmiştir. Bitkilere eksojen SA uygulamasının, sadece stres koşullarına maruz kalan bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal cevaplarının iyileştirilmesinde değil, aynı zamanda bitkilerde sekonder metabolit seviyesini artırmadaki rolü de dikkat çekicidir. Eksojen SA uygulamasının *Salvia miltiorrhiza* (Li ve ark., 2016), *Carthamus tinctorius* (Golkar ve ark., 2019) ve *Salvia officinalis* (Es-sbihi ve ark., 2021) bitkilerinde sekonder metabolit seviyesini artırdığı bildirilmiştir.

Bitkiler, hem geleneksel hem de modern ilaçların yapımında kullanılmakta ve tedavi amacıyla önemli rol oynamaktadır. Bitki kaynaklı ilaçlar, binlerce yıldır insan sağlığının evriminin bir parçası olmuştur. Sentetik ilaç kimyası ve antibiyotik alanındaki birçok ilerlemeye rağmen bitkiler, çeşitli insan hastalıklarını tedavi eden ilaçlar için ana hammaddelerden biri olmaya devam etmektedir. Klinik ve farmasötik araştırmalar, tıbbi bitkilerde bulunan biyoaktif maddelerin rolünü tanımlamaya ve metabolizmadaki etki tarzlarını anlamaya çalışmaktadır (Jain ve ark., 2019). Tıbbi bitkilerden elde edilen sekonder metabolitlerin diyabet, kanser, kardiyovasküler, karaciğer, beyin ve bağırsak gibi çeşitli hastalıklara karşı yararlı etkileri vardır. Tıbbi bitkilerin en önemli ve ilgi çekici özelliklerinden biride antioksidan aktivite gösteren sekonder metabolitler açısından zengin olmasıdır. Tıbbi bitkilerde bulunan antioksidan bileşiklerin tanımlanması ve oksidasyonu önleyen mekanizmanın aydınlatılmasına olan ilgi son yıllarda araştırmacıların odak noktası olmuştur (Orozco ve ark., 2019). Tıbbi bitkiler, ilaç ve farmasötik endüstrisinde yaygın olarak kullanılan alkaloidler, glikozitler, aminler, steroidler, fenolikler, flavonoidler ve ilgili metabolitler açısından zengindir. Geleneksel olarak sekonder metabolitler olarak anılan bu maddeler, genellikle bitkiler aleminde sınırlı taksonomik gruplar arasında farklı şekilde dağılır (Sharanabasappa ve

ark., 2007; Jain ve ark., 2019). Bu tür metabolitlerin birikmesi, genellikle çeşitli elisitorler veya sinyal molekülleri dahil olmak üzere strese maruz kalan bitkilerde artış gösterir (Akula ve Ravishankar, 2011). Sekonder metabolitlerin miktarındaki artış, bitki açısından önemli olmakla birlikte biyoaktif özellik göstermeleri nedeniyle bu metabolitlerin üretiminin değiştirilmesi olasılığına olan ilginin artmasına neden olmuştur.

Bitki hücrelerinde fenolik asitlerin sentezinde rol alan enzimlerden fenilalanin amonyak-liyaz (PAL), tirozin aminotransferaz (TAT) ve rosmarinik asit sentaz (RAS) ekspresyonunu kodlayan genler *Salvia miltiorrhiza* bitkisine SA uygulanarak araştırılmıştır. Araştırma sonuçları SA'nın PAL, TAT ve RAS'ı kodlayan genlerin ekspresyonunu uyardığı ve aynı zamanda kafeik asit (CA), rosmarinik asit (RA) ve salvianolik asit B (Sal B) gibi fenolik asitlerin birikimini artırdığı rapor edilmiştir (Li ve ark., 2016).

Silva ve ark. (2023), farklı tuz konsantrasyonlarında (0.5, 1.3, 3.25, 5.2 ve 6 dS m⁻¹ NaCl) fesleğen (*Ocimum basilicum*) bitkisine çeşitli SA (0, 0.29, 1.0, 1.71 ve 2 mM) uygulamaları yaparak, büyüme parametreleri ve uçucu yağ bileşenlerini araştırmışlardır. SA uygulaması, gaz değişimi, klorofil indeksleri ve klorofil a floresansı üzerindeki tuz stresi hasarını azaltmıştır. Ayrıca, tuz stresinin esansiyel yağ içeriği üzerindeki zararlı etkilerini hafifleterek uçucu yağ içeriğini artırmış ve en yüksek değer 1.77 dS m⁻¹ + 0.98 mM SA uygulamasında gözlenmiştir. Tuz stresi ile birlikte SA kullanımının, özellikle yarı kurak bölgelerde *O. basilicum* uçucu yağ içeriğini artırma stratejisi olabileceği ifade edilmiştir.

Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında önemli bir yere sahip olan Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyası Türkiye'de takson sayısına göre üçüncü, tür sayısına göre dördüncü en büyük familyadır. Ekonomik ve tıbbi açıdan önemli birçok türü içeren Lamiaceae üyeleri arasında, ailenin en büyük cinsi olan *Salvia* (ada çayı) önemli bir yer tutmaktadır. Türkiye'de 107 taksonla temsil edilen *Salvia* cinsinin 58 taksonu endemik olup %54 endemizm oranına sahiptir (Celep ve Dirmenci, 2017). *Salvia* cinsi birçok biyolojik aktivitesinin yanı sıra besleyici özellikleri ile dünya çapında yaygın olarak bilinen ve kullanılan bir bitki türüdür. *Salvia* cinsine ait taksonlar, farklı kısımlarında içerdiği çeşitli sekonder metabolitler sayesinde farklı biyolojik özellikler gösterir. *Salvia* türleri antioksidan, antimikrobiyal, antikanser gibi dikkat çekici aktivitelere sahip olup, yüksek besin içeriğiyle önemli bir doğal kaynaktır (Uysal ve ark., 2023). Araştırmamıza konu olan *Salvia virgata* Jack. türü Türkiye'de yerel olarak "yılancık" veya

“fatmaanaotu” olarak bilinmekte olup eski zamanlardan beri halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Türk halk hekimliğinde *S. virgata*'nın yaprakları, yaraların ve cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmakta olup, ek olarak toprak üstü parçaları Türkiye'nin batısında lösemi tedavisinde kullanılmaktadır (Şenkal ve ark., 2019).

Son yıllarda çevresel strese maruz bırakılan bitkilere eksojen nanopartikül ve salisilik asit gibi elisitörler uygulanarak, bitkinin strese karşı toleransının artırılmasını hedefleyen ve sekonder metabolit sentezinin nasıl etkilendiği yönünde yanıtlar arayan birçok araştırma bulunmaktadır. Söz konusu araştırmalarda farklı nanopartikül çeşitleri uygulanmasına karşın, araştırmamızda çinko oksit nanopartikül (ZnONP) uygulaması tercih edilmiştir. Çinko, dünyadaki en bol elementlerden biri olmasına rağmen, çinko içeren minerallerin çözünürlüğünün düşük olması nedeniyle, özellikle alkali ve tuzlu topraklara sahip kuru alanlarda, bitkiler ve mikroorganizmalar için düşük konsantrasyonda veya erişilebilir değildir (Marslin ve ark., 2017). Bu bağlamda, çinko eksikliğini gidermek için ZnONP uygulanması etkili bir strateji olabilir. ZnONP ve SA'nın strese maruz bırakılan çeşitli bitkilerdeki fizyolojik tepkileri üzerindeki etkilerine ilişkin birçok literatür mevcut olmasına rağmen ikisinin birlikte kullanıldığı ve potansiyel sinerjik etkilerinin olup olmadığıyla ilgili sınırlı sayıda araştırma vardır. Ayrıca *Salvia* türlerinde tuz stresine karşı ZnONP ve SA'nın potansiyel sinerjik etkisinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Literatürde tespit edilen bu eksikliklerden yola çıkılarak araştırmamızda, tuz (NaCl) stresine maruz bırakılan *Salvi virgata* bitkisine ZnONP/SA'nın ayrı ayrı ve birlikte uygulanmasıyla bitkinin fizyolojik, biyokimyasal ve antioksidan kapasitesi üzerindeki potansiyel etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Tıbbi bitkilerin tüketimi, endüstriyel talebi ve sürdürülebilir üretimini sağlamak için daha iyi alternatiflere yönelimin olması; hangi çevresel koşullar altında daha yüksek verim ve kalite verdiğinin belirlenmesi; doğal yaşam alanlarının hızla yok olması ve çevresel istikrarsızlıklarla birlikte bitki kaynaklı bileşikler elde etmenin giderek zorlaşması gibi tespitler araştırmamızın önemini artırmaktadır.

Bu doğrultuda araştırmamızda;

- Tuz stresine maruz bırakılan *S. virgata* bitkisine ayrı ayrı ve birlikte ZnONP/SA elisitörleri uygulanarak bitkinin vereceği fizyolojik, biyokimyasal ve antioksidan tepkilerin belirlenmesiyle gelecekte bu bitki türünde yapılacak olan benzer çalışmalara temel oluşturması,

- Fotosentetik pigment (klorofil a, b ve karotenoid) içeriğinin belirlenmesi,

- Ozmoprotektan olarak işlev gören prolin ve membran hasarının göstergesi olan MDA içeriğinin belirlenmesi,
- Toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi,
- Üç farklı yöntem kullanılarak (DPPH, CUPRAC, ABTS) bitkinin antioksidan aktivite kapasitesinin belirlenmesi,
- Kontrol ve uygulama gruplarında elde edilen tüm analiz verilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Elde edilen sonuçların literatüre kazandırılmasıyla hem *S. virgata* bitkisiyle hem de ZnONP ve SA'nın tuzluluk stresine karşı sinerjik etkisi ile ilgili yapılacak çalışmalara temel bilgi sağlanmış ve çeşitli öneriler ortaya konmuştur.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Botanik Özellikler

Araştırmamızda bitkisel materyal olarak kullanılan *Salvia virgata* Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir. Lamiaceae familyası; çiçeklerinin alt dudak ve üst dudak şeklinde birleşmesinden dolayı De Jussieu tarafından ‘Labiatae’ olarak adlandırılmış ve 1836 yılında Lindley tarafından ‘Lamiaceae’ olarak değiştirilmiştir (Greuter, 1982; Dirmenci, 2003). Angiospermiler içerisinde altıncı büyük familya olan Lamiaceae üyeleri dünya genelinde 245'ten fazla cins ve 7886 tür içermektedir. Türkiye’de 48 cins ve 782 takson (603 tür, 179 alttür ve varyete) içeren familyanın 346 taksonu (271 tür, 75 alttür ve varyete) endemik olup endemizm oranı yaklaşık %44’tür. Takson sayısına göre ülkemizdeki en büyük beş cins *Stachys* (118 takson), *Salvia* (107 takson), *Sideritis* (53 takson), *Phlomis* (53 takson) ve *Teucrium* (48 takson)’dur (Celep ve Dirmenci, 2017). En önemli bitki familyalarından biri olan Lamiaceae familyası, biyolojik ve tıbbi uygulamalara sahip çok çeşitli bitkileri bünyesinde barındırmaktadır. Familya üyeleri içerdikleri sekonder metabolitlerden dolayı önemli bir değere sahip olup türlerin çoğunda yoğun bir şekilde bulunan uçucu yağlar, en önemli sekonder metabolittir. Bu ailenin en bilinen üyeleri kekik, nane, fesleğen, adaçayı, biberiye, mercanköşk otu, melisa ve daha sınırlı kullanıma sahip çeşitli aromatik baharatlardır (Bekut ve ark., 2018).

Dünya genelinde yaklaşık 1000 tür içeren Lamiaceae familyasının en önemli cinslerinden biri olan *Salvia*, Uzak Doğu'dan Avrupa'ya kadar geniş bir dağılıma ve büyük bir çeşitliliğe sahiptir (Kintzios, 2000). Türkiye’de 100 tür 7 varyete olmak üzere toplamda 107 taksonla temsil edilen *Salvia* cinsinin 58 taksonu endemik olup %54 endemizm oranına sahiptir (Celep ve Dirmenci, 2017). *Salvia* türleri, odunsu çalılar ile tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık otsu bitkileri içerir. Kümeler halinde bulunan çiçekleri genellikle maviden kırmızıya değişen renkleri ile gösterişli bir görüntü sergilemekle birlikte daha az yaygın olarak beyaz ve sarı çiçeklere rastlanmaktadır (Askari ve ark., 2021). *Salvia* cinsi içerisinde kozmetik, gıda, ilaç endüstrilerinde değerli olan birçok tür bulunmaktadır. Üyelerinin çoğu sekonder metabolitler, antioksidanlar, antimikrobiyal, antialzheimer, antikanser ve hatta böcek öldürücü olarak etkili olan uçucu yağlar içerir (Pavlidou ve ark., 2004; Senel ve ark., 2010; Exarchou ve ark., 2015; Sarrou ve ark., 2016).

Lamiaceae familyasına ait çok yıllık bir bitki olan *S. virgata*, Asya (İran'ın kuzeydoğusu) ve güneydoğu Avrupa'ya özgüdür. Türkiye'de yerel olarak “fatmaanaotu” veya “yılancık” olarak bilinen *S. virgata* (Şekil 2.1) yaklaşık 30-100 cm yüksekliğinde, aşırı dallı bir yapıya sahip, otsu ve çok yıllık bir bitkidir (Akkol ve ark., 2008). *S. virgata* eski zamanlardan beri halk hekimliğinde kullanılmaktadır. Bitki geleneksel olarak cilt hastalıklarını, yaralanmaları ve kan kanserini tedavi etmek için kullanılmıştır (Baytop, 1999). Bu türün önemli biyolojik özelliklerinden bazıları, antioksidan (Latani ve ark., 2019), antimikrobiyal (Alizadeh, 2013), antifungal (Bayar ve Yılar, 2019), antiinflamatuvar ve antinosiseptif aktiviteler (Akkol ve ark., 2008) literatürde bildirilmiştir.

***Salvia virgata* türünün sistematikteki yeri;**

- Alem : Plantae
- Bölüm : Magnoliophyta
- Sınıf : Magnoliopsida
- Takım : Lamiales
- Familya : Lamiaceae
- Cins : *Salvia*
- Tür : *Salvia virgata*



Şekil 2.1. *Salvia virgata* bitkisinin genel görünümü

2.2. Salvia Türlerinin Kullanımı

Salvia türleri geçmişten günümüze kadar birçok alanda kullanılmıştır. Örneğin, 6000 yıl önce Mezopotamya'da yaşayan insanlar tarafından şifa amaçlı kullanılmış ve aynı zamanda yöre halkı arasında şans getirdiğine inanılmıştır. Bölgede yapılan kazılarda bulunan yazılı tabletlerde Salvia'nın nasıl kullanılacağı hakkında faydalı bilgiler bulunmuştur. Ayrıca rahatlatıcı etkisi olduğu keşfedilen ada çayı kurutularak pipo ile içilmekte, yapraklarının taze hali ise diş temizliğinde kullanılmaktadır. Günümüzde ada çayının bazı türleri kurutularak çay şeklinde tüketilmektedir (Uysal ve ark., 2023). Geçmişten günümüze çayı, merhemi ya da özüt haline getirilen ve ağrı kesici, balgam söktürücü gibi işlevlerinden yararlanan ada çayının etken maddelerinin ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi, kullanıldığı alanlarda daha doğru ve etkili sonuçlar alınmasına yardımcı olacaktır. Yapılan birçok çalışmada Salvia türlerinin ağırlıklı olarak fenolik asitler, flavonoidler, terpenler ve terpenoidler içerdiği görülmüştür. İzolasyon çalışmalarında sekonder metabolitlerin antimikrobiyal, antifungal, antiseptik, analjezik, antikanser ve insektisit gibi farmasötik ve biyolojik faydalar sağladığı anlaşılmıştır (Lu ve Foo, 2002). Salvia türlerinin temel uygulama alanları soğuk algınlığı, bronşit, tüberküloz, kanama ve adet bozukluklarının tedavisi olmasına rağmen, ağrılardan epilepsiye kadar değişen altmıştan fazla farklı rahatsızlığın tedavisinde kullanılmıştır (Topçu, 2006). *Salvia spp.* gıdaların mikrobiyolojik kalitesini ve güvenliğini artırmak için doğal koruyucular olarak özellikle yararlıdır (Tenore ve ark., 2011). Ayrıca, et ve balık sektöründe doğal antibakteriyel olarak, kozmetik sektöründe parfüm ve sabun katkı maddesi olarak, tekstil ve peyzaj mimarisinde bitkisel boya olarak kullanılmaktadır. Salvia cinsinin bileşenleri biyolojik mücadelede yaygın olarak kullanılmaktadır. Uçucu yağların bileşiklerinde bulunan alkaloidler, flavonoidler ve terpenoidler gibi maddeler zararlı böceklere karşı insektisit olarak kullanılır. Özellikle depolanan ürünlere zarar veren böceklere karşı fumigant etkisi vardır (Celep ve Dirmenci, 2017)

Ekonomik açıdan en önemli Salvia türleri *S. officinalis*, *S. fruticosa*, *S. lavandulifolia*, *S. verbenaca*, *S. sclarea* ve *S. tomentosa* 'dır. Pek çok Salvia türü, sekonder metabolitleri için yetiştirilmekle birlikte uçucu yağlar, farmasötikler, renklendiriciler, boyalar, kozmetikler ve biyositler gibi özel malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır (Lubbe ve Verpoorte, 2011). Etnobotanik öneminin yanı sıra *Salvia hispanica* (chia) gibi bazı türler, esansiyel yağlarına olan ilgi ve geleneksel tıptaki

popülaritesi nedeniyle piyasada gıda olarak satılmaktadır. *Salvia miltiorrhiza*'nın kurutulmuş kökü, koroner kalp hastalığı, serebrovasküler hastalık, hepatit, hepatosiroz, kronik böbrek yetmezliği, dismenore ve nöroastenik uykusuzluk tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır (Li, 1998). İn vitro ve in vivo çalışmalara dayanarak, *S. virgata*'nın tüm bitki ve sürgün kültürlerinde kafeik asit (CA), rosmarinik asit (RA), salvianolik asit A (Sal-A) ve salvianolik asit B (Sal-B) gibi bazı fenolik asitlerin varlığı rapor edilmiştir (Ejtahed ve ark., 2015; Dowom ve ark., 2017; Fotovvat ve ark., 2018). Son çalışmalar, bu fenolik asitlerin hipoglisemik (Huang ve ark., 2016), antioksidan, antibakteriyel, antifungal (Grzegorzcyk-Karolak ve ark., 2019), antikanser (Katary ve ark., 2019), antiviral (So-He ve ark., 2020) ve ayrıca RA ve Sal-B'nin Alzheimer hastalığına bağlı hafıza ve bilişsel bozukluğu iyileştirebileceği gösterilmiştir (Gok ve ark., 2018).

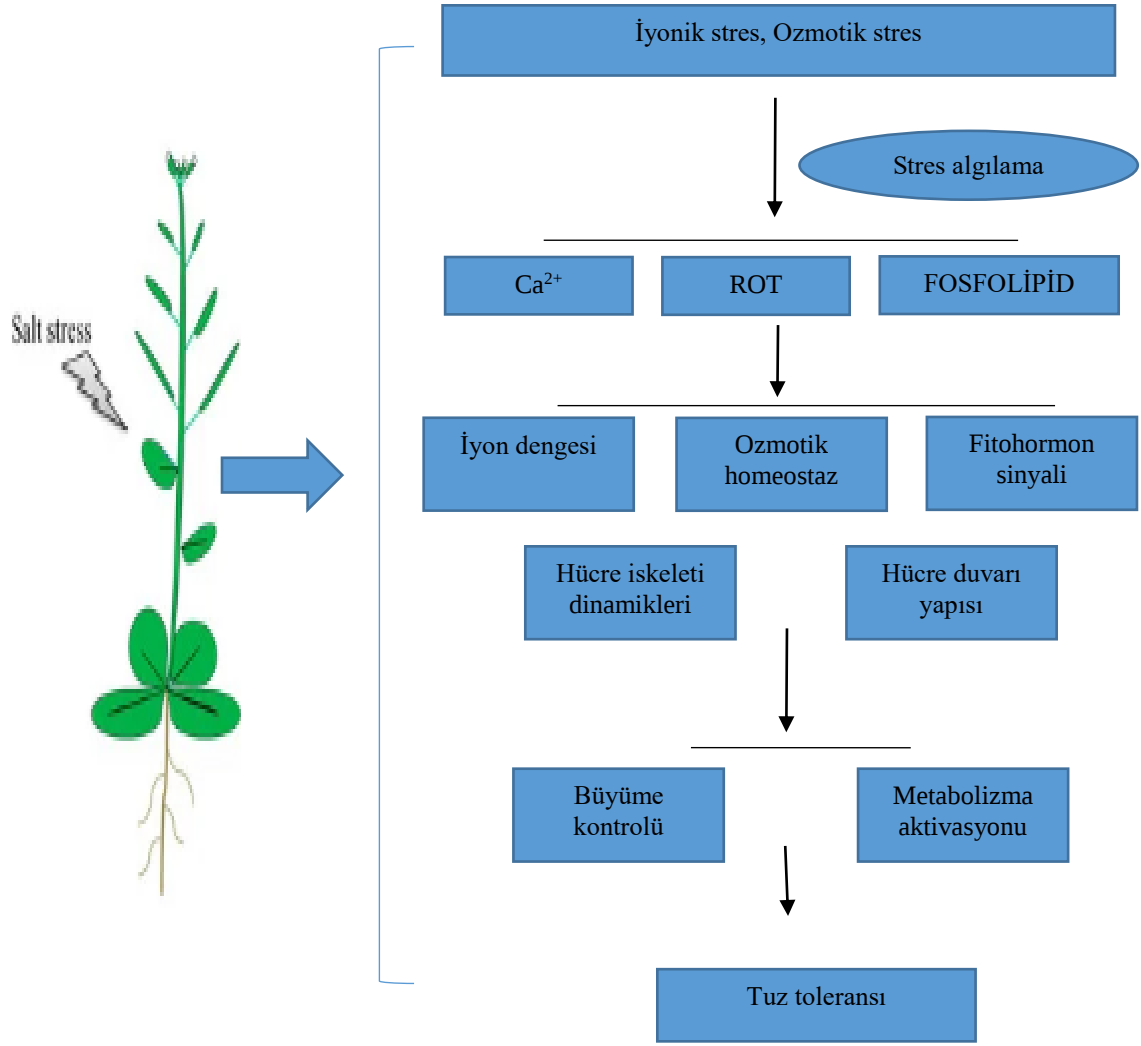
2.3. Bitkilerde Stres Faktörleri

Bitkiler, büyüme ve gelişim için genellikle elverişsiz veya sürekli değişen stresli ortamlarda yaşarlar. Bu olumsuz çevresel koşullar, patojen enfeksiyonu, otçul saldırısı gibi canlı çevreden kaynaklı biyotik stres veya kuraklık, sıcak, soğuk, besin eksikliği, aşırı tuz ve toksik metaller gibi abiyotik stres faktörlerini içerir (Zhu, 2016). Bu abiyotik stresler, dünya çapında ekilebilir arazilerin kullanımını sınırlar ve ürün verimliliğini olumsuz etkiler. Bu nedenle, bitkilerin stres sinyallerini nasıl algıladıklarını ve olumsuz çevre koşullarına nasıl uyum sağladıklarını anlamak, küresel gıda güvenliği için kritik öneme sahiptir. Kuraklık, tuz ve sıcaklık stresleri, bitkilerin doğadaki coğrafi dağılımını etkileyen, tarımda bitki verimliliğini sınırlayan ve gıda güvenliğini tehdit eden başlıca çevresel faktörlerdir. Bu abiyotik streslerin olumsuz etkileri, aşırı hava olaylarının sıklığında artışa yol açacağı tahmin edilen iklim değişikliği ile daha da şiddetlenmektedir (Fedoroff ve ark., 2010). Abiyotik streslere yanıt olarak ortaya çıkan mekanizmalar, stresin türüne ve şiddetine, bitkinin maruz kaldığı gelişim evresine ve süresine bağlı olarak değişse de stresin etkisi genellikle çimlenme, büyüme, gelişim ve nihai ürün verimi üzerinde azalmaya neden olmaktadır. Bunun yanı sıra şekerler, polioller, betainler ve prolin gibi çeşitli organik çözünen maddelerin birikmesine, hücresel mekanizmanın korunmasına, iyonik homeostazın sürdürülmesine, serbest radikallerin temizlenmesine, belirli proteinlerin ekspresyonuna, genlerin düzenlenmesine ve fitohormonların uyarılmasına yol açan metabolik ayarlamalar da bu sürecin bir parçasıdır (Munns ve Tester, 2008).

2.3.1. Bitkilerde tuz stresi

Abiyotik stres faktörlerinden biri olan toprak tuzluluğu gibi sorunlar, doğal çevrenin bozulması, iklim değişiklikleri ve kötü sulama uygulamaları ile birlikte gittikçe şiddetlenen bir sorun haline gelmiştir (Park ve ark., 2016). Bu nedenle ürün verimini iyileştirmek ve gün geçtikçe artan toprak tehdidi unsurunu ele almak oldukça kritik bir öneme sahiptir. Tuz stresi, bitkisel gelişimi ciddi bir şekilde sınırlamakta ve bu nedenle bitkiler doğal ortamında ya da tarımsal faaliyetlerle kültüre alınması risk altında olup, tuza dayanıklı bitki çeşitlerinin geliştirilmesi, ürün verimi ve üretkenliğinin artırılması, küresel gıda güvenliğinin sağlanması önemli stratejilerdir. Bitkiler tuz stresine maruz kaldıklarında, tuz stresinin olumsuz etkileri ile başa çıkabilmek için bazı fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal cevap oluştururlar. Tuz stresi ilk olarak kök sistemi tarafından algılanır ve kısa vadede azalan su mevcudiyetinin neden olduğu ozmotik stresi indüklerken, uzun vadede sitozoldeki besin dengesizliği nedeniyle tuzun neden olduğu iyon toksisitesi ile bitki büyümesini bozar (Munns, 2005). Bu nedenle, tuzluluğun yarattığı iki ana tehdit, aşırı sodyum (Na^+) ve klor (Cl^-) alımıyla ilişkili “ozmotik stres” ve “iyon toksisitesi” olup bu durum başta kalsiyum (Ca^{2+}) ve potasyum (K^+) olmak üzere diğer besin dengesizliklerine yol açar. Tuzluluk, ozmotik ve toksik etkiler yoluyla bitki büyümesini, kök gelişimini ve hidrolik iletkenliği azaltarak kökten su hareketini azaltan ve toprak direncini artıran etkilere neden olur. Tuz stresine maruz kalan bitkilerde yaprak sayısı, yaprak alanı, taze ve kuru ağırlık, bitki boyu, kök-sürgün oranı gibi morfolojik özelliklerde azalma gözlemlendiği çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Alvarez ve Sánchez-Blanco, 2015; Cirillo ve ark., 2016; Acosta-Motos ve ark., 2016).

Şekil 2.2’de bitkide tuz stresi tepkisinin basitleştirilmiş bir modeli verilmiştir. Tuz stresi bitki tarafından algılandıktan sonra ilk olarak iyonik ve ozmotik strese neden olur ve daha sonra Ca^{2+} birikimi, ROT sinyalinin etkinleştirilmesi ve fosfolipid bileşimlerinin değişimi gibi süreçlerle devam eder. Bu sinyaller, iyon dengesi, ozmotik homeostazın sürdürülmesi, fitohormonların indüklenmesi, hücre iskeleti ve hücre duvarı yapısının düzenlenmesi dahil olmak üzere tuz stresini hafifletmek için adaptif süreçleri aktive eder. Daha sonra bir dizi sinyal iletim yolu aracılığıyla bitki büyümesi yavaşlar ve tuz toleransını artırmak için metabolizma etkinleştirilir (Zhao ve ark., 2021).



Şekil 2.2. Tuz stresi tepkisinin basitleştirilmiş modeli (Zhao ve ark., 2021)

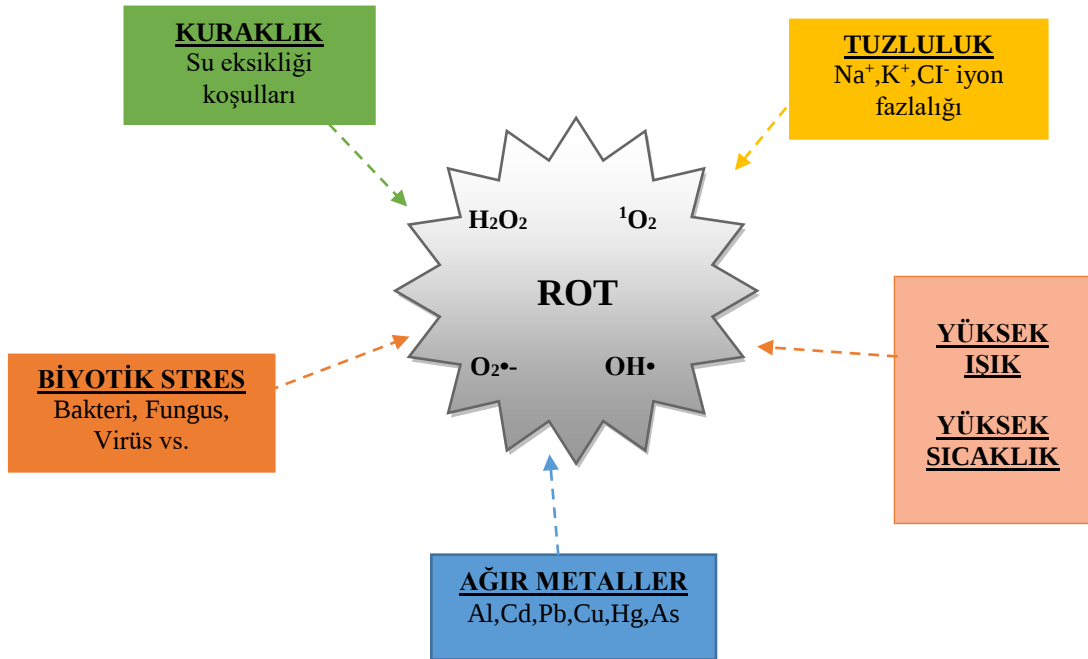
Tuzlu topraklarda yüksek sodyum konsantrasyonu bitkide besinlerin emilimini ve su alımını sınırlamaktadır. Fizikokimyasal benzerlikleri ve ortak bir taşıma sistemi nedeniyle toprak çözeltisindeki Na^+ ve K^+ taşınım için rekabet eder ve bu durum K^+ eksikliğine neden olabilir. K^+ eksikliği, hücre turgorunun, membran potansiyellerinin ve enzim aktivitelerinin sürdürülmesinde kritik bir rol oynadığı için büyümeyi engeller (Zeeshan ve ark., 2020). Tuz stresi sonucu meydana gelen ozmotik stres, hücre turgor basıncında azalmaya, hücre duvarının fiziksel değişimine ve plazma zarının büzülmesi gibi birçok geçici biyofiziksel değişime neden olur. Bu durumda bitkiler ozmotik stresi hafifletmek için, gen ekspresyonu ve ozmolit biyosentez enzimlerinin aktivasyonundan su taşıma sistemlerine kadar oluşan süreçleri düzenleyen ozmotik sinyal yollarına başvururlar (Yang ve Guo, 2018). Bitkisel hücrelerde ozmotik potansiyeli azaltan süktroz, sorbitol, manitol, gliserol, arabinitol, pinitol gibi karbohidratlar; betain, glutamat, aspartat, glisin, prolin, kolin, putresin gibi nitrojen bileşikler; malat ve oksalat

gibi organik asitler biriktirilir (Acosta-Motos ve ark., 2017). Bu ozmolitler, sitozolik bölmedeki ozmotik potansiyeli düşürerek ozmotik basıncın düzenlenmesine katılırlar ve ayrıca absisik asit birikimini indüklemek, ilgili gen ekspresyonunu etkilemek ve tuz stresi altındaki bitki büyümesini düzenlemek için işlev görürler (Marusig ve Tombesi, 2020). Organik ozmolitler arasında, prolin ve glisin-betain en önemli ve uyumlu çözünenlerdir. Bir ozmoprotektan olarak hareket etmesine ek olarak, prolinin antioksidan özelliklere sahip olduğu ve dehidrasyon sırasında biyolojik makromoleküllerin yapısını korumak için moleküler bir şaperon görevi görebildiği, böylece çevresel streslere karşı bitki toleransı sağladığı bildirilmiştir (Tang ve ark., 2015). Önemli bir ozmotik düzenleme maddesi olarak bitki hücrelerinde serbest halde bulunan prolin, düşük moleküler ağırlığa ve suda yüksek çözünürlüğe sahip olup fizyolojik pH aralığında net yük içermeyen önemli bir ozmolit olarak değerlendirilir (Liang ve ark., 2018). Rontein ve ark. (2002), prolinin hücre osmoregülasyonunda ve dehidrasyon sırasında proteinlerin korunmasında rol oynadığını ve stres koşullarında enzimatik bir düzenleyici olarak hareket edebildiğini bildirmiştir. Ayrıca, tuzluluk stresi altında, stresle ilgili bir sinyal olarak kabul edilebilecek hücre içi yapıları stabilize etmekten sorumlu bir organik molekül olduğu belirtilmiştir. Farklı araştırmacılar tarafından tuzlu koşullar altında yetiştirilen *Salvia nemorosa* (Sharifi ve Bidabadi, 2020), *Salvia leriifolia* (Dashti ve ark., 2022), *Salvia virgata* (Khosrojerdi ve ark., 2023) bitkilerinde prolin miktarının artış gösterdiği bildirilmiştir.

Tuz stresinden en çok etkilenen metabolik süreçlerden biride fotosentez mekanizmasıdır. Tuzluluk kısa vadede, stoma sınırlamaları yoluyla fotosentezi etkileyerek karbon asimilasyonunda bir azalmaya yol açarken uzun vadede, genç yapraklarda tuz birikmesi ve halofit bitkilerde bile klorofil ve karotenoid konsantrasyonlarında azalma nedeniyle fotosentetik süreci etkileyebilir (Duarte ve ark., 2013). Tuza dayanıklı türlerin tuzluluk koşulları altında artan veya değişmeyen klorofil içeriği gösterdiği, oysa tuza duyarlı türlerde klorofil seviyelerinin düştüğü ve bu durumun klorofil parametresi için bitkilerde tuz toleransının biyokimyasal bir belirteci olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir (Ashraf ve Harris, 2013). Bazı araştırmacılar tuzluluk stresi altında *Salvia officinalis* (Es-sbihi ve ark., 2021), *Nigella sativa* (Aghajanzadeh-Gheshlaghi ve ark., 2021), *Salvia miltiorrhiza* (Li ve ark., 2022) bitkilerinde fotosentetik pigment içeriklerinde azalma olduğunu bildirmiştir.

2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Çeşitli çevresel stres faktörlerine maruz kalma, bitkilerde reaktif oksijen türleri (ROT) üretimine neden olarak oksidatif stresi tetikler ve bu da çeşitli biyolojik süreçleri etkiler (Şekil 2.3). Oksidatif stres terimi ilk defa 1985 yılında Sies ve Cadenas tarafından tanıtılmış olup, hücrenin kendi içerisinde artan ROT seviyesinin bir sonucu olarak redoks dengesinin kesintiye uğraması anlamına gelmektedir. Sonuç olarak, ROT oluşumu ve ROT temizliği arasındaki hassas denge çevresel stres faktörleri tarafından bozulursa bitki hücreleri “oksidatif stres” durumunda olacaktır. Oksidatif stres durumunda bitkinin hayatta kalabilmesi, stres koşullarının şiddeti, süresi ve bitkilerin değişen enerji denkleminde hızla uyum sağlama kapasitesi gibi birçok önemli faktöre bağlıdır (Miller ve ark., 2010).

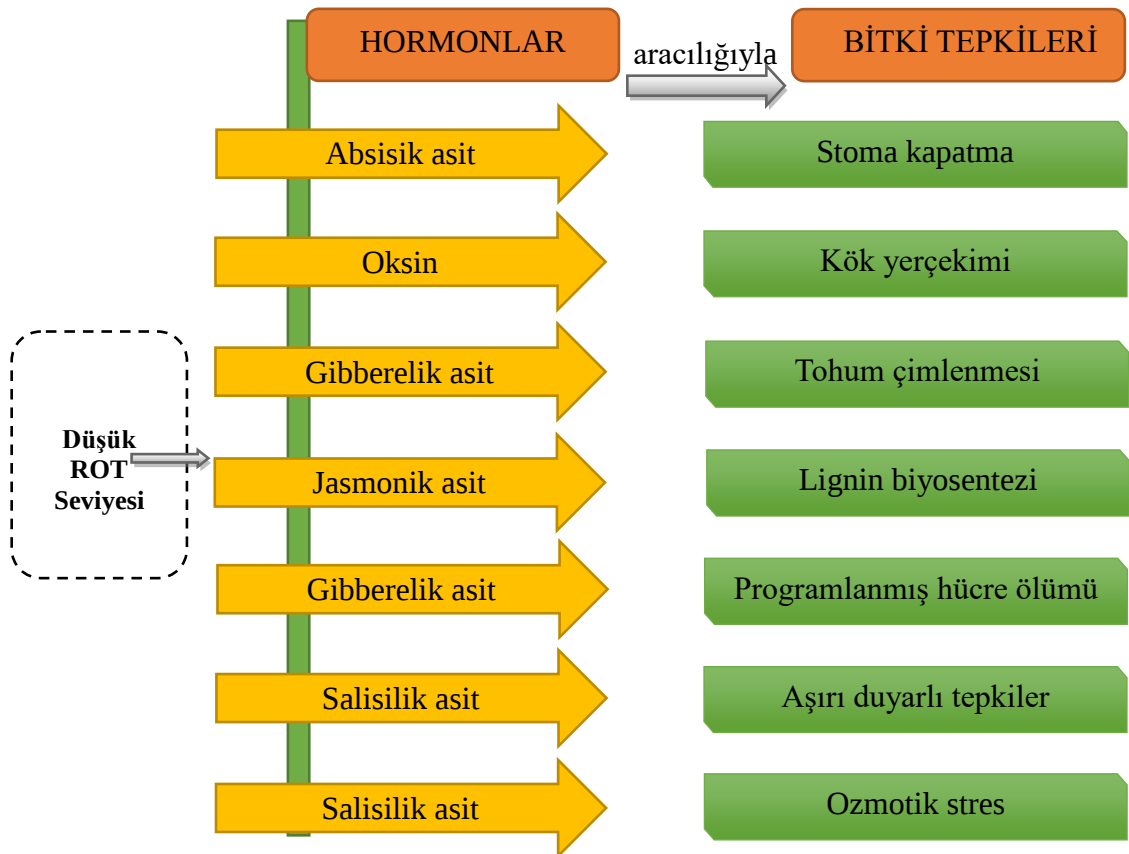


Şekil 2.3. ROT oluşumundan sorumlu çeşitli stres faktörleri (Das ve Roychoudhury, 2014)

Bitkilerde ROT üretimi esas olarak kloroplastlar, peroksisomlar ve mitokondri gibi hücresel organellerde gerçekleşir. Bununla birlikte çevresel stres durumunda peroksidazlar ve amin oksidazlar içeren hücre duvarları ve plazma zarları da ROT üretimine katılır. ROT'un bitki hücrelerinin hücresel metabolizmasında yer almasına rağmen, stres koşulları altında aşırı üretimleri çeşitli hücresel yapılarda fotooksidatif hasara neden olur. Temel olarak tekli oksijen (1O_2), hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit

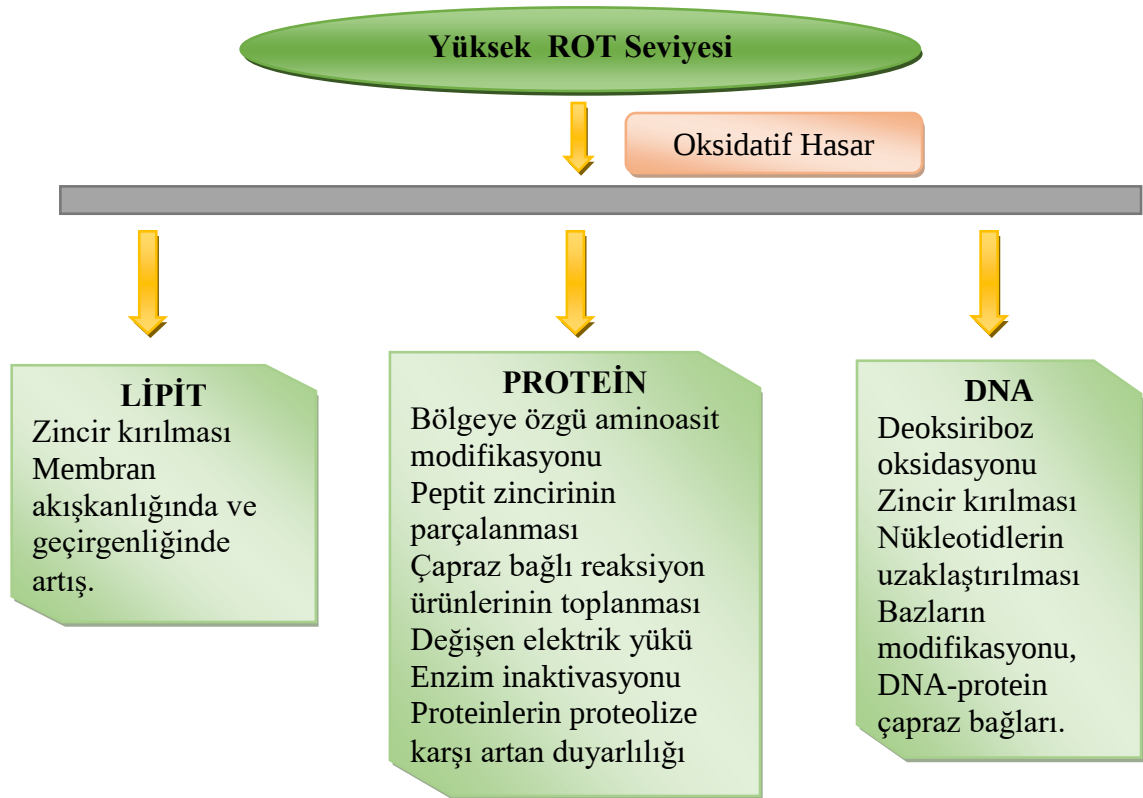
($O_2^{\bullet-}$) ve hidroksil radikalini ($OH^{\bullet}$) içeren ROT'lar, oldukça reaktif olup karbonhidrat deoksidasyonu, lipid peroksidasyonu, protein denatürasyonu, DNA, RNA, enzimler ve pigmentlerin yıkımı yoluyla plazma zarının bozulması gibi çok çeşitli hücresel, fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları etkiler (Raja ve ark., 2017; Huang ve ark., 2019).

ROT'lar düşük/orta konsantrasyonda, stoma kapanması (Yan ve ark., 2007) programlanmış hücre ölümü (Mittler, 2002), gravitropizm (Joo ve ark., 2001) dahil olmak üzere bitki hücrelerinde çeşitli yanıtlara aracılık eden hücre içi sinyal iletiminde ikinci haberciler olarak rol aldığı ve bu nedenle hem biyotik hem de abiyotik streslere karşı toleransın kazanılmasında önemli olduğu gösterilmiştir. Şekil 2.4 bitkilerde hormon aracılı hücresel tepkilerde ikinci haberci olarak ROT'un rolünü göstermektedir. Bitkiler, bazı redoks duyarlı proteinler, kalsiyum mobilizasyonu, protein fosforilasyonu ve gen ekspresyonu yardımıyla ROT sinyalini algılayabilir, iletebilir ve uygun hücresel tepkiler verebilir (Sharma ve ark., 2012).



Şekil 2.4. ROT'un hormon aracılı hücresel yanıtlarda ikinci haberci olarak rolü (Sharma ve ark., 2012)

Bununla birlikte, ROT'un üretimi ve temizlenmesi arasındaki denge, tuzluluk, kuraklık, yüksek ışık, metallere bağlı toksisite, patojenler ve benzeri gibi bir dizi stresli koşul altında bozulur. Artan ROT seviyesi, lipitler, proteinler ve DNA gibi biyomoleküllerde hasara neden olabilir (Şekil 2.5). Bu reaksiyonlar, akışkanlık, iyon taşınması, enzim aktivitesi kaybı, protein çapraz bağlanması, protein sentezinin inhibisyonu, DNA hasarı ve benzeri gibi içsel zar özelliklerini değiştirebilir ve sonuçta hücre ölümüyle sonuçlanabilir (Sharma ve ark., 2012).

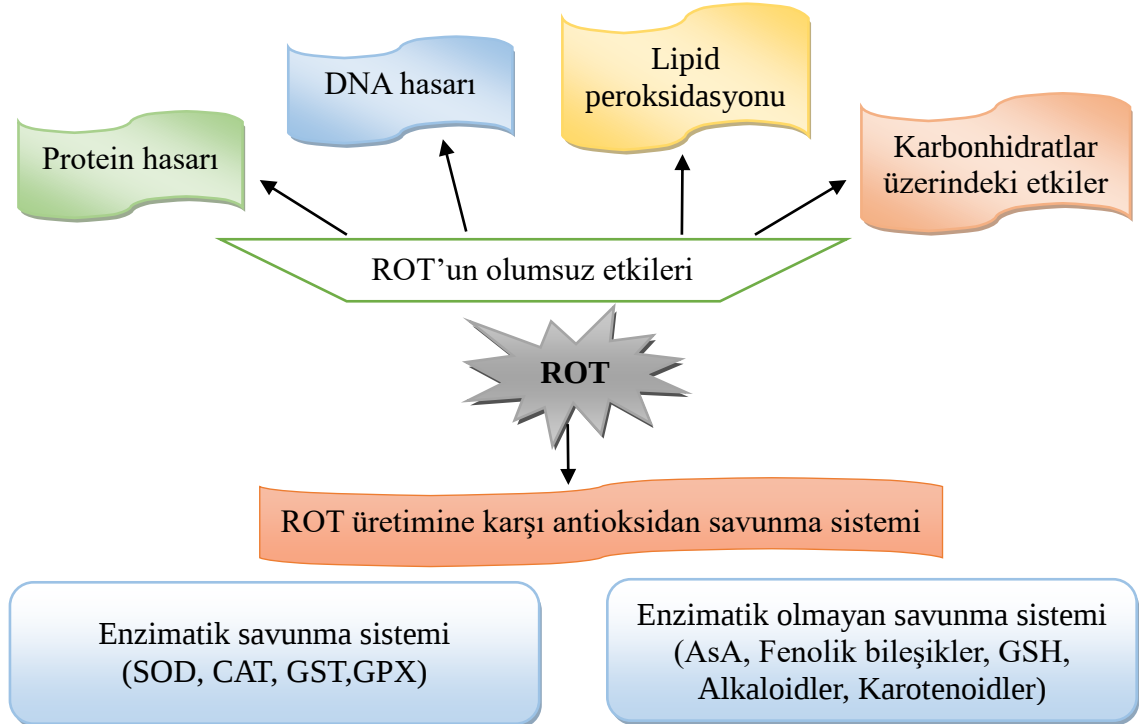


Şekil 2.5. ROT'ların lipit, protein ve DNA'da neden olduğu oksidatif hasarlar (Sharma ve ark., 2012)

ROT seviyesi aşırı yükseldiğinde, hücresel ve organel zarlarda lipid peroksidasyonu gerçekleşir ve bu da normal hücresel işleyişi etkiler. Çoklu doymamış yağ asitleri, genellikle ROT tarafından oksitlenen lipit bileşenleridir. ROT'lar çoklu doymamış yağ asitlerinden hidrojen atomunun ayrılmasıyla başlayan ve bir lipid radikalinin oluşumuyla sonuçlanan sıralı lipid peroksidasyon reaksiyonlarını tetikler. Bu lipid radikali, moleküler oksijen ile reaksiyona girerek lipid peroksil ve lipid alkoksil radikallerini oluşturur. Daha sonra bu radikallerin her ikisi de komşu lipid molekülleri ile reaksiyona girerek radikal zincir oksidasyonunun lipid peroksidasyonuna neden olur. Tarif edilen zincir modifikasyonları sonucunda, lipitlerin yapısı bozulur ve zarların

akışkanlığı ile bütünlüğü tehlikeye girebilir. Zar yapısında meydana gelen bozulmalar, hücre hasarına ve fonksiyon kaybına neden olarak ölümle sonuçlanabilir (Vistoli ve ark., 2013; Alché, 2019). Lipid peroksidasyon seviyesi, stresli koşullar altında hücre zarlarında ROT aracılı hasarın bir göstergesi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Lipid peroksidasyonu son ürünlerden biri olan malondialdehit (MDA), fosfolipidlerdeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon seviyesini gösteren önemli bir gösterge olup aynı zamanda hücre zarı hasarından sorumludur (Alché, 2019). Tuzluluk stresi altında büyüyen bitkilerde lipitlerin peroksidasyonu sonucu nihai ürün olan MDA miktarındaki artış çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Younis ve ark., 2021; Abdalla ve ark., 2022; Khosrojerdi ve ark., 2023).

Stres altındaki bitki hücreleri, biriken ROT'ların bitkiye vereceği zararlı etkileri ortadan kaldırabilmek için enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma mekanizmalarını kullanarak hayatta kalmaya çalışırlar. Enzimatik savunma sistemleri, glutatyon redüktaz (GR), dehidroaskorbat redüktaz (DHAR), süperoksit dismutaz (SOD), monodehidroaskorbat redüktaz (MDHAR), glutatyon peroksidaz (GPX), katalaz (CAT) ve askorbat peroksidaz (APX) gibi çeşitli enzimleri içerirken; enzimatik olmayan savunma sistemi karotenoidler, α -tokoferol, indirgenmiş glutatyon (GSH), askorbik asit (AA) fenolikler, flavanoidler ve prolin gibi düşük moleküllü bileşiklerden oluşur (Mansoor ve ark., 2022) (Şekil 2.6).



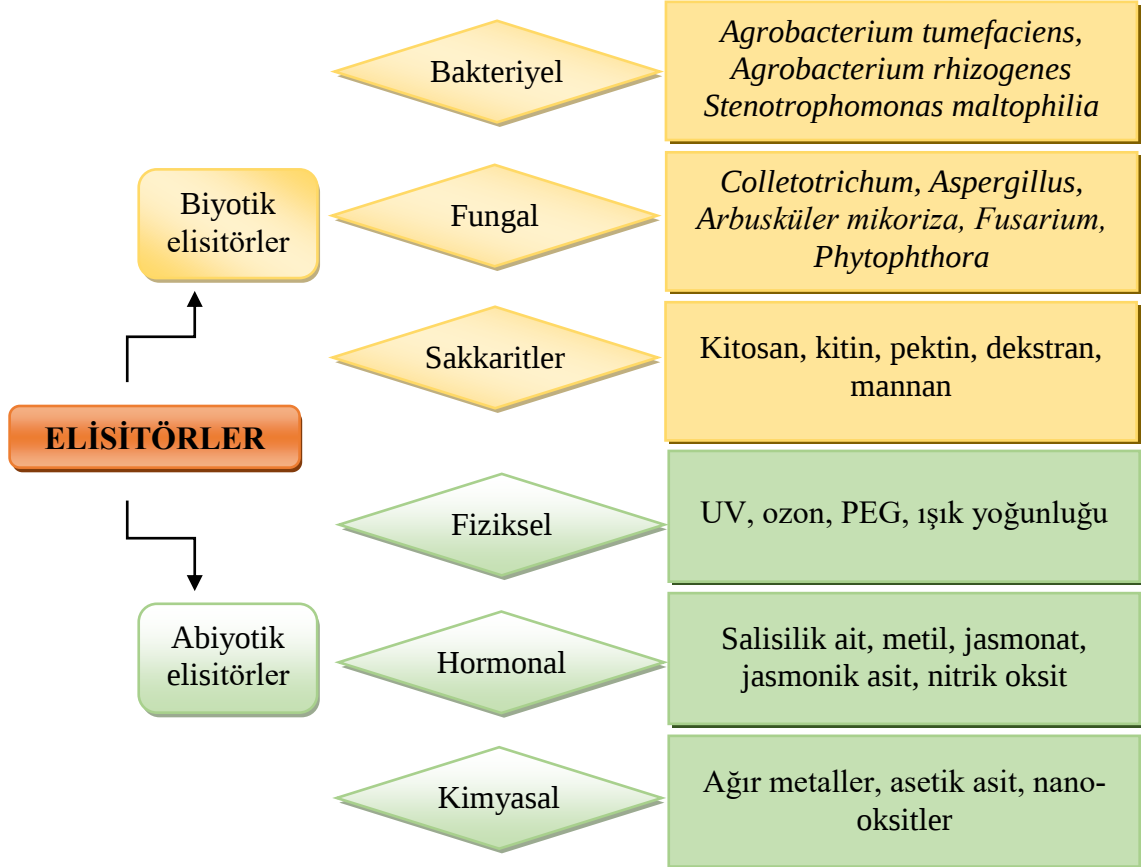
Şekil 2.6. Oksidatif stresin olumsuz etkileri ve savunma mekanizmaları (Mansoor ve ark., 2022)

Bitkilerde bulunan doğal antioksidan bileşiklere gösterilen ilgi giderek artmaktadır. Bunlar arasında en popüler olanı yapısında bir veya daha fazla hidroksil grubu içeren polifenolik bileşiklerdir (Cheynier ve ark., 2013). Bu bileşikler yapısal olarak, fenolik asitler (esas olarak hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitler) ve flavonoidler olmak üzere iki ana sınıfa ayrılabilir. Fenolik bileşiklerin antioksidan özelliği, halka yapısındaki hidroksil gruplarının sayısına ve bunların dizilişine bağlıdır. Hidroksil gruplarının sayısı ne kadar yüksekse, antioksidan özellikleri o kadar iyidir (Villaño ve ark., 2005). Flavonoidler, bitkilerde sekonder metabolitler olarak üretilen bir grup polifenolik bileşik olup, bitkilerde birçok biyolojik süreçte ve çevresel faktörlere verilen tepkilerde önemli roller oynar. Kapsamlı olarak çalışılan flavonoidlerin en temel biyoaktif özelliği, antioksidan aktiviteleridir. Flavonoidler, oksidazlar, lipoksijenaz, fosfoinositid 3-kinaz inhibisyonu, a-tokoferol radikallerinin indirgenmesi ve antioksidan enzimlerin aktivasyonu yoluyla serbest radikallerin neden olduğu hasarı önleyebilir. Ayrıca, oksidatif stresi hafifletmek için ürik asit seviyelerini, metal şelatlama aktivitesini ve düşük moleküler ağırlıklı antioksidan aktiviteyi artırabilir (Williamson ve ark., 2018). Enzimatik olmayan antioksidan savunma sisteminde rol alan önemli metabolitlerden biride karotenoidlerdir. Karotenoidler, antioksidan olarak aktivitesini artırmak için proteinler ve lipidler gibi diğer biyomoleküllerle işbirliği yapar. Karotenoidler, bitki hücreleri üzerinde strese neden olan ve fotosentez için yararlı olmayan ekstra UV ışığına karşı bitkileri koruyarak antioksidan özelliklerini gösterirler. Ayrıca, aroma, renk ve fitohormon üretiminden sorumlu olan apokarotenoidlere parçalanır ve bitki hücreleri arasında sinyal üretimine yardımcı olur (Dhar ve ark., 2020). Tuz stresi altında yetiştirilen; *Salvia mirzayanii*'de fenolik içeriğin ve antioksidan aktivitenin arttığı (Valifard ve ark., 2014), *Rosmarinus officinalis*'de toplam fenolik içeriğin arttığı (El-Esawi ve ark., 2017), *Thymus vulgaris* ve *Thymus daenensis*'de toplam fenolik/flavonoid içerik ve toplam antioksidan aktivitenin arttığı (Bistgani ve ark., 2019), *Amaranthus tricolor*'da toplam karotenoid ve toplam fenolik içerik ile antioksidan aktivitenin arttığı (Sarker ve Oba, 2020) bildirilmiştir.

2.5. Elisitörler

Biyotik ve abiyotik streslerin etkisiyle bitkiler hem doğal popülasyon alanlarında hem de kültür alanlarında risk altında olup bu nedenle bitki veriminde düşmektedir. Bu riskleri ortadan kaldırmak veya en aza indirmek için dirençli çeşitlerin geliştirilmesi,

ürün rotasyonu, biyolojik kontrol, zirai kimyasallar ve toprak işleme gibi çeşitli yöntemler mevcut olsa da bilim adamları yeni stratejiler geliştirmeye odaklanmıştır. Son yıllarda stres koşullarıyla başa çıkmak için geliştirilen stratejilerden biride elisitör uygulamalarıdır. Elisitörler, hedef canlı organizmalarda fizyolojik ve morfolojik tepkiler ile fitoaleksinin birikimini uyaran çeşitli kaynaklardan gelen kimyasal veya biyo-faktörlerdir. Elisitör terimi önceleri fitoaleksinin üretimini indükleyebilen moleküller için kullanılıyordu ancak, şimdi yaygın olarak her türlü bitki savunmasını uyaran bileşikler için kullanılmaktadır (Thakur ve Sohal, 2013). Elisitörler kökenlerine göre biyotik ve abiyotik olmak üzere iki gruba ayrılırlar (Şekil 2.7). Abiyotik uyarıcılar arasında fiziksel, kimyasal ve hormonal faktörler, yani UV radyasyonları, ozmotik stres, kuraklık, tuzluluk, sıcaklık stresi (düşük ve yüksek), ağır metaller ve hücre içi sinyal molekülleri (jasmonik asit, metil jasmonat, salisilik asit, brasinosteroidler, poliaminler, absisik asit ve giberellik asit ve etilen ve nitrik oksit gibi gaz molekülleri) yer alır (Cai ve ark., 2013; Hashemi ve Naghavi, 2016). Buna karşılık biyotik elisitörler, polisakkaritler ve patojenler (maya, bakteri ve mantar özleri) içeren biyolojik kökenli maddelerdir (Ahmed ve Baig, 2014; Guru ve ark., 2022).



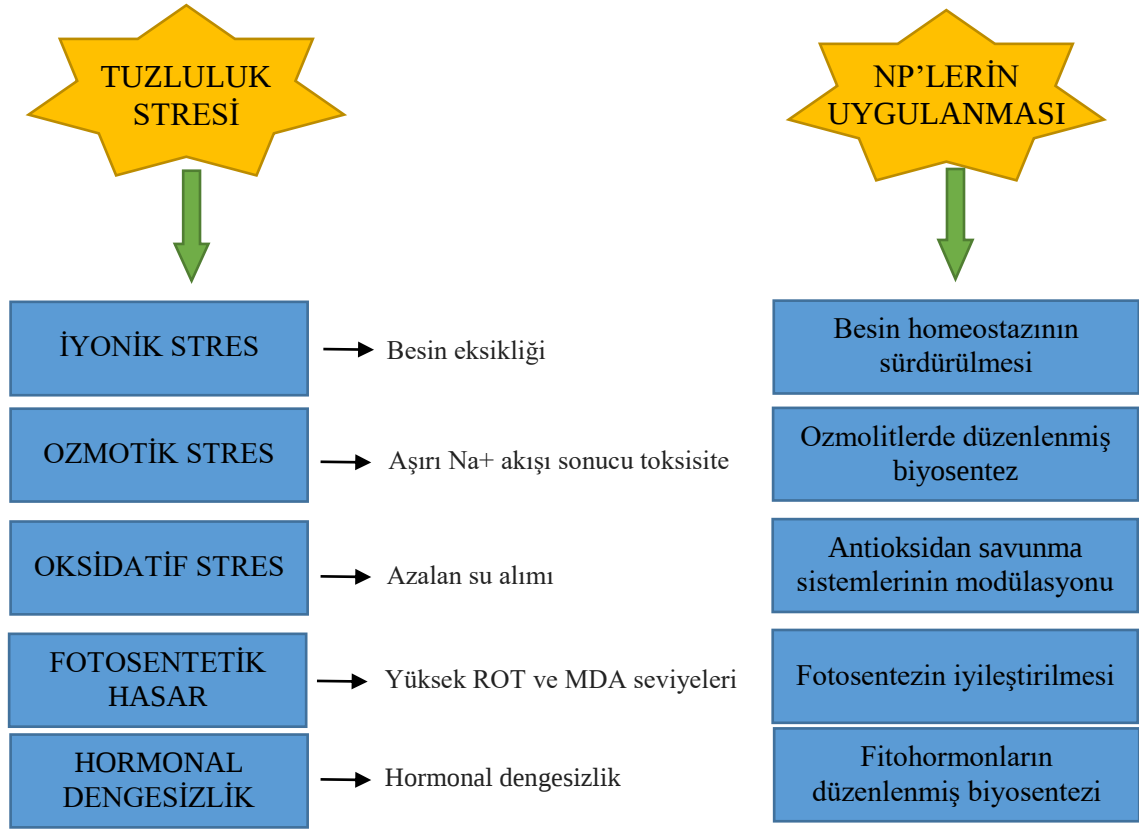
Şekil 2.7. Biyotik ve abiyotik elisitörler (Guru ve ark., 2022)

2.5.1. Nanopartiküller

Son yıllarda araştırmacılar tarafından çok sayıda stres yönetimi stratejisi geliştirilmiştir. Bunlar arasında nanoteknoloji, ürün verimini artırması beklenen ve yeni ortaya çıkan stratejilerden biridir (Ashraf ve ark., 2021). Bununla birlikte, şu anda nanopartiküller (NP) üzerine yapılan araştırmaların çoğu, bunların toksisitesine odaklanmaktadır (Pelegrino ve ark., 2020; Ranjan ve ark., 2021). Özellikle çeşitli abiyotik stres koşulları altında, bitki korumada NP'lerin rolüne ilişkin nispeten daha az yayın mevcuttur (Rajput ve ark., 2021; Kolesnikov ve ark., 2021). NP'ler, en az bir boyutta 1 ila 100 nm arasında çaplara sahip malzemeler olarak tanımlanabilir. NP'ler, farklı şekiller (küre, çubuk, tüp, lif, disk, kare, elipsoid), hacim oranına göre geniş yüzey alanı, kristal yapı, ayarlanabilir gözenek boyutu ve canlı organizmalarda hücresel ve moleküler düzeyde güçlü aktiviteye sahip olma gibi özelliklere sahiptir (Abobatta, 2018; Sarkar ve ark., 2021). NP'lerin uygulanması, kimya, optik, biyomedikal, ilaç, gıda ve tekstil endüstrileri gibi çeşitli diğer alanlar dahil olmak üzere tarım ve ilgili sektörlerde yaygın bir popülerlik kazanmıştır (Staron ve ark., 2020; Rajput ve ark., 2021).

Son yıllarda, tuzluluk stresi altında büyümeyi ve bitki performansını iyileştirmek için en umut verici yöntemlerden biri olarak nanopartiküllerin kullanımına büyük ilgi gösterilmiştir. NP'lerin tuzluluk stresi altındaki farklı bitkiler üzerinde çeşitli çalışmalarda kullanılmasının olumlu etkileri kanıtlanmıştır (Alabdallah ve Alzahrani, 2020; Noohpisheh ve ark., 2021; Zulfıqar ve Ashraf, 2021). NP'ler çeşitli bitkilerde hormonal konsantrasyonları, antioksidan enzim aktivitelerini, iyon dengesini ve savunma sistemlerini değiştirerek tuzluluk toleransını düzenler (Şekil 2.8). Bu etkiler, farklı çevre koşullarında veya çeşitli bitki türlerinde NP'lerin boyutuna, şekline ve uygulanan konsantrasyonlarına bağlı olarak değişebilir (Mohamed ve ark., 2017; Wahid ve ark., 2020). Tuz stresi altında yetiştirilen ve nanopartikül uygulanan *Ocimum basilicum*'da klorofil ve prolin içeriğinin arttığı (Kaltah ve ark., 2018), *Mentha piperita*'da lipid peroksidasyon seviyesinde azalma olduğu (Askary ve ark., 2017), *Ocimum basilicum*'da klorofil içeriği ve fenolik içerik gibi enzimatik olmayan antioksidanların arttığı (Gohari ve ark., 2020), *Camelina sativa*'da toplam fenolik, antosiyanin, karotenoid ve DPPH radikalini temizleme yeteneğinin önemli ölçüde arttığı (Hezaveh ve ark., 2020b), *Capsicum annuum*'da artan klorofil, fenoller, flavonoidler, β -

karoten (González-García ve ark., 2021), *Salvia officinalis*'de toplam klorofil içeriğinde artış ve prolin içeriğinde azalma olduğu (Alenezi ve ark., 2022) bildirilmiştir.

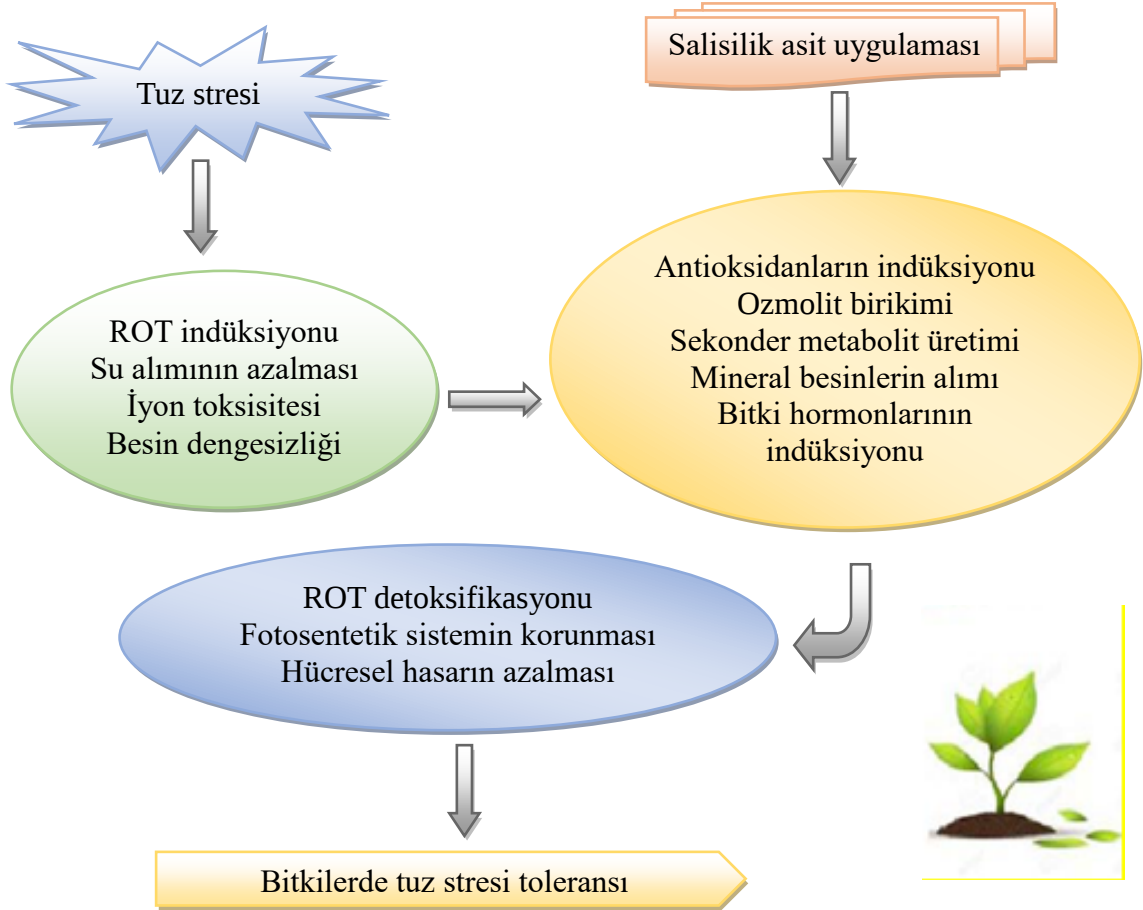


Şekil 2.8. NP uygulamasının tuzluluk toleransını artırma mekanizması (Etesami ve ark., 2021)

2.5.2. Salisilik Asit

Salisilik asit (SA, 2-hidroksi benzoik asit), bitkiler tarafından sentezlenen, bir hidroksil grubu veya bunun fonksiyonel türevini taşıyan aromatik bir halkaya sahip bitki fenolik bileşik gruplarından biridir (Dempsey ve ark., 2011). Latince *Salix* (söğüt) sözcüğünden gelen salisilik asit terimi, ilk olarak 1838 yılında Raffaele Piria isimli araştırmacı tarafından kullanılmıştır. Bitkilerde SA ile ilgili yapılan araştırmalar, tohum çimlenmesi, stoma hareketleri, pigment birikimi, fotosentez, etilen biyosentezi, enzim aktiviteleri, absisyonun tersine çevrilmesi, besin alınımı, çiçek indüksiyonu, membran fonksiyonları, baklagil nodülasyonu, bitki büyümesi ve gelişimi gibi çeşitli fizyolojik tepkilere dahil olduğunu ortaya çıkarmıştır (Sahu, 2013). Bu nedenle SA ve ilgili analogları fitohormonlar olarak adlandırılır. Bununla birlikte, temel olarak sistemik kazanılmış direnç (Tripathi ve ark., 2019) ve abiyotik stres toleransındaki (Ali, 2017) rolleriyle tanınırlar. Rajeshwari ve Bhuvaneshwari (2017), tuz stresi altındaki bitkilere

eksojen SA uygulamasının, antioksidanların indüksiyonu, ozmolit birikimi, sekonder metabolit üretimi, mineral besinlerin alımı ve bitki hormonlarının indüksiyonu gibi süreçleri indükleyerek tuz stresi altındaki bitkilerin strese toleransını artırdığını bildirmiştir (Şekil 2.9). Salisilik asidin, bitkilerde hem lokal dirençlerde hem de sistemik kazanılmış dirençte rolü olduğu bilinmektedir. SA'nın veya fonksiyonel analoglarının eksojen uygulaması, bitkilerde sistemik kazanılmış direnci (SAR) indükler ve patojenlere direnç gibi çeşitli biyotik streslere karşı önemli bir koruma sağlar (Wang ve ark., 2005; Hayat ve ark., 2010). Salisilik asidin bitki büyümesinde ve gelişmesinde rol oynamasının yanı sıra, lokal bağışıklık, sistemik kazanılmış direnç ve hem biyotik hem de abiyotik bitki stres tepkilerindeki katılımına bağlı olarak, bitkilerde çeşitli hastalıklara ve toksisitelere karşı birçok terapötik etkiye sahip olduğu bildirilmektedir (Wani ve ark., 2017).



Şekil 2.9. Salisilik asitin tuzluluk toleransını artırma mekanizması (Rajeshwari ve Bhuvaneshwari 2017)

Stres altında bitkilerde endojen SA seviyesinde gözlenen artış (Guo ve ark., 2016; Su ve ark., 2018; Fan ve ark., 2022) strese tepkide önemli bir rol oynadığını

göstermektedir. Bu durum strese maruz kalan bitkilere eksojen SA uygulanmasının önünü açmış ve stres toleransının artırılmasına yönelik eksojen SA uygulanması, araştırmacıların odak noktası haline gelmiştir. Tuz stresi altında yetiştirilen *Mentha pulegium*'da artan MDA içeriği, eksojen SA uygulaması sonucu azalırken, artan prolin içeriği SA ile daha fazla artış göstermiştir (Farhadi ve Ghassemi-Golezani, 2020). *Ocimum bacilicum* 'da tuz stresi sonucu azalan klorofil a ve b içeriği eksojen SA uygulaması ile artarken, artan prolin içeriği 0.5-1 mM SA uygulaması ile azalmış, 1.5-2 mM SA ile artmıştır (Mohammadi ve ark., 2022). *Salvia officinalis*'de tuz ile azalan pigment içeriği SA ile artış göstermiş (Es-sbihi ve ark., 2021), kuraklık stresine maruz bırakılan *Mentha piperita*'da toplam fenolik, toplam flavonoid içeriği ve DPPH süpürme aktivitesinde kontrole göre artış görülmüş, ayrıca eksojen SA uygulaması her üç parametrede daha fazla artışa neden olmuştur (Jahani ve ark., 2021).

2.6. Literatür Özetleri

İran'da endemik olan *Salvia mirzayanii*, Lamiaceae familyasına ait tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Farklı tuz konsantrasyonlarının, toprak üstü kısımlarının toplam fenolik içeriği, antioksidan aktiviteleri ve uçucu bileşenleri üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada, tuz uygulamalarının toplam fenolik içeriği, DPPH radikali süpürme aktivitesini ve uçucu bileşenlerin genelini artırdığı bildirilmiştir (Valifard ve ark., 2014).

Bitki hücrelerinde fenolik asitlerin sentezinde rol alan enzimlerden fenilalanin amonyak-liyaz (PAL), tirozin aminotransferaz (TAT) ve rosmarinik asit sentaz (RAS) ekspresyonunu kodlayan genler *Salvia miltiorrhiza* bitkisine SA uygulanarak araştırılmıştır. Araştırma sonuçları SA'nın PAL, TAT ve RAS'ı kodlayan genlerin ekspresyonunu uyardığı ve aynı zamanda kafeik asit (CA), rosmarinik asit (RA) ve salvianolik asit B (Sal B) gibi fenolik asitlerin birikimini artırdığı rapor edilmiştir (Li ve ark., 2016).

Tuz stresi (0, 50, 100, 150 mM NaCl) altında demir oksit nanopartiküllerinin (0, 10, 20, 30 μ M Fe₂O₃NP) nanenin (*Mentha piperita*) fizyolojik parametreleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, tuzlulukla artan lipid peroksidasyonu ve prolin içeriği Fe₂O₃NP uygulanarak önemli ölçüde azalmıştır. Toplam antioksidan aktivite (DPPH) ve antioksidan enzimlerin (CAT, SOD, GPOX) maksimum aktiviteleri, 150 mM NaCl ile muamele edilen bitkilerde gözlenmiş, ancak Fe₂O₃NP uygulaması antioksidan

aktiviteleri azaltmıştır. Sonuç olarak uygun konsantrasyondaki demir nanopartiküllerin, nanenin stres direncini artırmak için kullanılabileceği ifade edilmiştir (Askary ve ark., 2017).

Tuz stresi altında yetiştirilen *Ocimum basilicum* bitkisinin bazı vejetatif özellikleri üzerine silisyum nanopartiküllerinin etkisini değerlendirmek için yapılan çalışmada, tuzluluk stresi altında azalan klorofil içeriğinin silikon nanopartikül uygulaması ile arttığını, tuzluluk stresine yanıt olarak artan prolin içeriğinin bitkide tolerans indüksiyonuna bağlı olarak silisyum nanopartikülleri tarafından daha fazla arttığı rapor edilmiştir (Kaltah ve ark., 2018).

NaCl stresine maruz bırakılan *Salvia coccinea* bitkisinde, tuzlulukla birlikte klorofil a-b, toplam karotenoid içeriği, toplam polifenoller ve antioksidan aktivitede [ferrik indirgeme (FRAP) ve 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS)] azalma meydana getirmiştir. NaCl ve SA ile muamele edilmiş *S. coccinea* yapraklarında klorofil a-b ve karotenoid içerikte en fazla artış 100 mM NaCl + 1 mM SA konsantrasyonda görülmüş, toplam polifenol içerik, FRAP ve ABTS antioksidan potansiyelinde en yüksek değerler 200 mM NaCl ve 0.5 mM SA ile muamele edilen bitkilerde görülmüştür. Araştırma sonuçlarına göre SA'nın yapraklardan uygulanmasının NaCl'nin olumsuz etkilerini hafiflettiği bildirilmiştir (Grzeszczuk ve ark., 2018).

Golkar ve ark. (2019), in vitro tuzluluk stresi altında yetiştirilen aspir (*Carthamus tinctorius*) bitkisi üzerine elisitör olarak kitosan ve salisilik asit uygulaması yaptıkları çalışmada, toplam fenolik (%34), toplam flavonoid (%13), toplam flavonol içerik (%12) ve DPPH aktivitesi (%21), tuzluluk stresi sonucu önemli ölçüde artmıştır. Her iki elisitör, tuz stresi uygulanan gruba göre toplam fenolik, toplam flavonoid, toplam flavonol içeriğinde önemli bir artışa neden olurken, en yüksek DPPH (%) aktivitesi NaCl + 50 mg L⁻¹ SA uygulamasında gözlenmiştir.

Hezaveh ve ark. (2020a), kolza (*Brassica napus*)'da 0, 50, 100 mM NaCl içeren ve 20, 40, 80 mg/L konsantrasyonda ZnONP uygulaması yaptıkları çalışmada, NaCl (100 mM) toplam fenolik, flavonoid antosiyanin ve DPPH radikal süpürme yeteneğini önemli ölçüde artırmıştır. ZnONP (80 mg L⁻¹) uygulaması, toplam fenoliği önemli ölçüde arttırırken, aynı zamanda kontrollere kıyasla tohumun DPPH radikal süpürme aktivitesinde önemli bir artışa (%12.91) neden olmuştur. ZnONP'lerin 20 mg L⁻¹ konsantrasyonunda, kontrollere kıyasla yaprak flavonoid içeriği (%16.66) önemli ölçüde artarken, tohumun flavonoid içeriği, NaCl (100 mM) ve ZnONP'lerin (20 mg L⁻¹

¹⁾ kombine uygulanmasıyla önemli ölçüde azalmıştır (%13.09). En düşük flavonoid içerik, NaCl (100 mM) ve ZnONP'lerin (20 mg L⁻¹) kombine uygulamasında gözlenmiştir. Araştırmacılar sonuç olarak, tuzluluk stresinin olumsuz etkilerini hafifletmek için ZnONP'lerin 20 mg L⁻¹ konsantrasyonda yapraktan uygulanmasını, tavsiye etmişlerdir.

Hezaveh ve ark. (2020b), ketencik (*Camelina sativa*) bitkisinde ZnONP (0, 20, 40, 80 mg L⁻¹) ve tuzluluk (0, 50, 100 mM NaCl) stresinin biyokimyasal etkisini araştırmıştır. Tuzluluk stresi, toplam fenolik, toplam flavonoid, antosiyanin ve karotenoid içerikleri ile DPPH radikalini temizleme yeteneğini önemli ölçüde arttırmıştır. Sürgün ve kökün maksimum toplam fenol içeriği, kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında sürgünde %36.19, kökte %96.83 artış ile 100 mM NaCl + 80 mg L⁻¹ ZnONP uygulamasında görülürken, ZnONP'lerin sürgün ve kök flavonoid içeriklerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlenmiştir. Tuz stresi ile artan karotenoid içeriği ZnONP uygulamalarında genel olarak azalma göstermiş, ancak en yüksek karotenoid içeriği, %38.05 artışla 100 mM NaCl + 40 mg L⁻¹ ZnONP'nin kombine uygulamasında gözlenmiştir. Tuz stresi ve ZnONP'lerin ayrı ayrı uygulamaları bitkilerde sürgün ve kökün toplam antioksidatif (DPPH) kapasitelerini artırmıştır. Bununla birlikte, NaCl + ZnONP uygulamaları sonucunda aktivite değerleri genel olarak azalırken, 50 mM NaCl konsantrasyonunda uygulanan tüm ZnONP'ler sürgünde antioksidan aktiviteyi artırmıştır. Araştırmacılar elde edilen sonuçlara göre, uygun ZnONP konsantrasyonunun (20 mg L⁻¹) *Camelina sativa*'da tuz stresinin olumsuz etkilerinin üstesinden gelebileceğini ifade etmişlerdir.

Abdoli ve ark. (2020), çeşitli tuzluluk seviyelerinde (0, 4, 8, 12 dS m⁻¹ NaCl) ajovan kimyonu (*Trachyspermum ammi*) bitkisine yapraktan salisilik asit (1 mM) ve nano-Fe₂O₃ (3 mM) uygulayarak bitkinin fizyolojik tepkilerini araştırmışlardır. Tuz stresi sonucunda çözünür şekerler, glisin betain, prolin, antioksidan enzim aktiviteleri, ROT oluşumu ve lipid peroksidasyon seviyesi artarken, yaprak su içeriği ve pigment içeriği azalmıştır. Özellikle SA ve SA + nano-Fe₂O₃ uygulamaları, antioksidan enzimlerin aktiviteleri (süperoksit dismutaz, katalaz, peroksidaz ve polifenol oksidaz), klorofil a-b içeriği ve ozmolitleri (çözünür şekerler, glisin betain) artırırken, prolin ve MDA miktarını azaltmıştır. Bu uygulamaların, artan antioksidan kapasite, ozmolitler ve fotosentetik pigmentler yoluyla ajovanın tuz toleransını artırabileceği bildirilmiştir.

Es-sbihi ve ark. (2021), 150 mM NaCl stresi altında yetiştirilen ada çayı (*Salvia officinalis*) bitkisine 0.5 ve 1 mM konsantrasyonda SA uygulayarak klorofil içeriği ve

uçucu yağ bileşenlerini araştırmışlardır. Tuz stresi, uçucu yağ verimini kontrole kıyasla %33 oranında azaltırken, stres altındaki bitkilere SA uygulaması uçucu yağ verimini artırmıştır. Bu artışlar, 0.5 mM SA'da %112'ye, 1 mM'da yaklaşık %62'ye ulaşmıştır. Ayrıca tuza bağlı olarak azalan pigment içeriğinin SA uygulamalarıyla birlikte arttığı görülmüştür.

Salvia lavandulifolia bitkisine uygulanan tuz stresinin büyüme parametreleri, klorofil içeriği ve antioksidan aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmak için yapılan çalışmada, tuz uygulamalarının bitki büyüme özelliklerini önemli ölçüde etkilediği gözlenmiştir. Kontrole kıyasla en düşük bitki boyu, yaprak sayısı, yaprak uzunluğu ve sürgün kuru ağırlığı sırasıyla %62, %41, %44 ve %82 azalma ile en yüksek tuz konsantrasyonu olan 13.3 dS m⁻¹'de kaydedilmiştir. En yüksek tuzluluk düzeyi, kontrole kıyasla klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriğini sırasıyla %57, %53 ve %54 oranında azaltmıştır. Tuz stresi tüm konsantrasyonlarda toplam fenolik içeriği ve serbest radikal yakalama kapasitesini artırırken, toplam flavonoid içeriği düşük tuz konsantrasyonlarında azalmış, ancak yüksek tuz konsantrasyonlarında artış göstermiştir (Bayat ve ark., 2022).

ZnONP (0, 2, 4 mg/l) ve tuzluluk (0, 50, 100, 150, 200 mM NaCl) stresinin *Salvia leriifolia*'nın morfo-fizyolojik özellikleri üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, yüksek tuzluluk stresinde ZnONP'lerin çözünür protein ile prolin üzerinde anlamlı etkisi görülmezken, hafif tuzluluk stresinde (50 ve 100 mM) özellikle 4 mg/L ZnONP konsantrasyonda yaprak ve kökte çözünür protein ile prolin içeriğini artırdığı görülmüştür. Araştırmacılar, tuzluluğun zararlı etkilerine karşı ZnONP uygulamasının, *Salvia leriifolia*'da tolerans yeteneğini geliştirdiğini bildirmişlerdir (Dashti ve ark., 2022).

Salvia officinalis bitkisinin 0, 75, 100, 150 mM NaCl ve 10 ile 30 mg/L konsantrasyonda ZnONP içeren Murashige ve Skoog kültür ortamında sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, tuz konsantrasyonu arttıkça klorofil içeriği azalmış, ancak 10 mg/L ve 30 mg/L ZnONP uygulaması 75 ve 100 mM tuza maruz kalan bitkilerde klorofil miktarını tekrar artırmıştır. Ek olarak ZnONP'ler, tuzluluk altındaki bitkilerde prolin birikimi, CAT, SOD ve GR antioksidan enzim aktivitelerini önemli ölçüde artırmıştır. Sonuçlar ZnONP'lerin, özellikle 10 mg/L'lik dozda tuz stresinin azaltılmasında çok önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Alenezi ve ark., 2022).

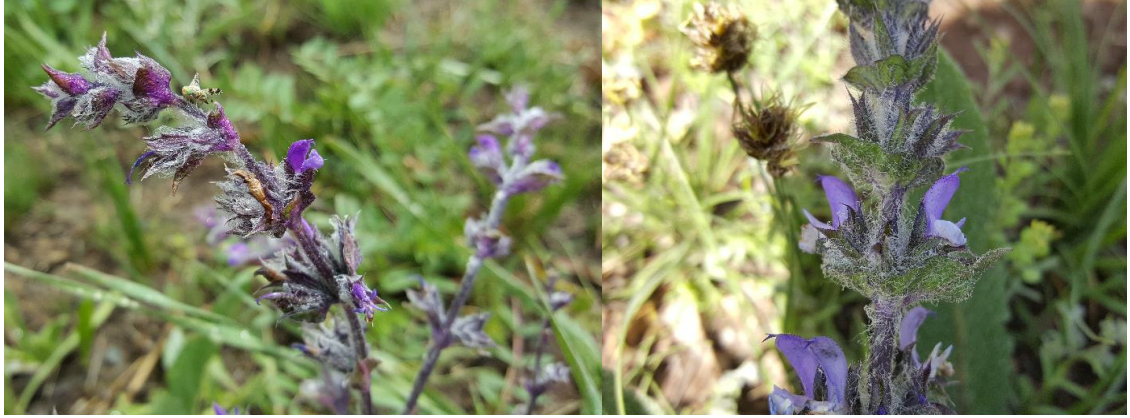
Silva ve ark. (2023), farklı tuz konsantrasyonlarında (0.5, 1.3, 3.25, 5.2 ve 6 dS m⁻¹ NaCl) fesleğen (*Ocimum basilicum*) bitkisine çeşitli SA (0, 0.29, 1.0, 1.71 ve 2 mM) uygulamaları yaparak, büyüme parametreleri ve uçucu yağ bileşenlerini araştırmışlardır. SA uygulaması, gaz değişimi, klorofil indeksleri ve klorofil a floresansı üzerindeki tuz stresi hasarını azaltmıştır. Ayrıca, tuz stresinin esansiyel yağ içeriği üzerindeki zararlı etkilerini hafifleterek uçucu yağ içeriğini artırmış ve en yüksek değer 1.77 dS m⁻¹ + 0.98 mM SA uygulamasında gözlenmiştir. Tuz stresi ile birlikte SA kullanımının, özellikle yarı kurak bölgelerde *O. basilicum* uçucu yağ içeriğini artırma stratejisi olabileceği ifade edilmiştir.

Mahdavian (2023), tuz stresi altında yetiştirilen turp bitkisine SA uygulanmasının büyüme ve biyokimyasal değişimler üzerindeki etkisinin araştırıldığı çalışmada, tuzluluğun (0, 25, 50 ve 100 mM) kök-sürgün büyümesini, kök-sürgün kuru ağırlığını, klorofil a-b ile karotenoid içeriğini azalttığı, prolin ve MDA içeriğini artırdığı görülmüştür. Tuz uygulaması sonucu azalan klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriği SA uygulamalarıyla artış gösterirken, prolin ve MDA içeriğinde azalma gözlenmiştir. Araştırma sonuçlarına göre, turp için tuzluluk stresinin yıkıcı etkilerini azaltmada SA kullanımının önerilebileceği bildirilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Araştırmamızda materyal olarak *Salvia virgata* (Şekil 3.1.) bitkisinin olgun tohumları kullanıldı. *S. virgata* bitkisi, 14 Temmuz 2021 tarihinde Van ili İpekyolu ilçesi, 38°30'36"K, 43°28'17"D, 1845 m rakımda Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin EROĞLU tarafından toplanıp teşhis edildi. Bitkilerden elde edilen olgun tohumlar, araştırmamızda kullanılmak üzere serin ve kuru ortamda muhafaza edildi. Bu çalışmanın bitki büyütme aşamaları, Batman Üniversitesi Merkezi Laboratuvar Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde bulunan kontrollü bitki büyütme odasında gerçekleştirilirken, analiz süreçleri Batman Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.



Şekil 3.1. *Salvia virgata*

3.2. Yöntem

3.2.1. Çözeltilerin hazırlanması

Hoagland besin çözeltisi: Ticari olarak toz halinde satılan Hoagland (Sigma) besin çözeltisinden 0.4 g tartılıp 1 L distile saf suda çözülerek $\frac{1}{4}$ Hoagland besin çözeltisi hazırlandı.

100 mM NaCl çözeltisi: 5.844 g NaCl tartılarak 1 L $\frac{1}{4}$ Hoagland besin çözeltisine ilave edildi.

Salisilik asit çözeltisi: 6.906 mg SA %96 etanolde çözülerek son hacmi distile su ile 100 mL'ye tamamlandı ve 500 μ M SA çözeltisi elde edildi.

ZnONP çözeltisi: Ticari olarak satın alınan ZnONP'den 2 mg tartılıp 100 mL distile suda süspanse edilerek 20 mg/L konsantrasyonda ZnONP çözeltisi hazırlandı. Nanopartiküllerin topaklaşmaması için ultrasonik su banyosunda 30 dk süresince tutularak sonikasyon gerçekleştirildi. Her uygulama öncesi taze olarak hazırlanan ZnONP çözeltisi ultrasonik su banyosunda 30 dk süresince tutularak ve vorteksenerek bekletilmeden kullanıldı.

3.2.2. Bitkisel materyalin yetiştirilmesi

S.virgata tohumları %1'lik sodyum hipoklorit (NaOCl) içerisinde 2 dakika bekletildi ve bu sürenin sonunda distile su ile 5 defa yıkanan tohumlar NaOCl'den arındırılarak yüzey sterilizasyonları tamamlanmış oldu. Bu işlemten sonra tohumlar, önceden hazırlanmış toprak:torf:perlite (1:1:1) karışımı içeren saksılara eşit sayıda ekildi ve her saksı tarla kapasitesine gelinceye kadar sulanarak, kontrollü şartlara sahip bitki büyütme odasında gelişmeye bırakıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Salvia virgata* bitkisinin büyütme odasında gelişimi

3.2.3. Stres faktörü ve elisitör uygulamaları

Tohum ekimi işlemini takiben her saksı, 4 hafta boyunca tarla kapasitesi göz önünde bulundurularak $\frac{1}{4}$ Hoagland besin çözeltisiyle sulandı. Dört haftalık gelişim sürecinin sonunda, 100 mM tuz (NaCl) içeren $\frac{1}{4}$ Hoagland besin çözeltisiyle 2 hafta daha sulanan fideler, NaCl stresine maruz bırakıldı. NaCl stresi altındaki bitkiler, 2 haftalık sürenin sonunda 4 gruba (NaCl, NaCl+SA, NaCl+ZnONP, NaCl+SA+ZnONP) ayrılarak 500 μ M SA ve 20 mg/L ZnONP ayrı ayrı ve birlikte eksojen olarak yapraktan püskürtme yoluyla 1 hafta boyunca uygulanarak uygulama grupları oluşturuldu. NaCl içermeyen $\frac{1}{4}$ Hoagland besin çözeltisiyle aynı zaman ve ölçüde sulanan bitkiler ise kontrol grubu olarak belirlendi. Böylece bitkiler “Kontrol, 100 mM NaCl, 100 mM NaCl + 500 μ M SA, 100 mM NaCl + 20 mg/L ZnONP ve 100 mM NaCl + 500 μ M SA + 20 mg/L ZnONP” olmak üzere beş gruba ayrıldı (Şekil 3.3). SA ve ZnONP’nin 1 haftalık uygulamasının ardından tüm bitkiler hasat edilip, bitkilerin yaprak kısımları sıvı nitrojenle ezilerek toz haline getirildi ve taze örnekler üzerinden yapılacak analizlerde kullanılmak üzere -80 °C’de muhafaza edildi. Kontrol ve uygulama gruplarına ait bir miktar taze materyal, toplam fenolik ve toplam flavonoid içerik ile antioksidan aktivite tayininde kullanılmak üzere gölgede ve oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.



Şekil 3.3. *Salvia virgata* bitkisine yapılan uygulamalar

Taze yaprak örneği kullanılarak yapılan analizler:

- Fotosentetik pigment içeriği
- Prolin İçeriği
- Malondialdehit İçeriği

Kuru yaprak örneği kullanılarak yapılan analizler:

- Toplam fenolik içeriği
- Toplam flavonoid içeriği
- Toplam antioksidan kapasite (DPPH, CUPRAC, ABTS)

3.2.4. Fotosentetik pigment içeriklerinin belirlenmesi

Fotosentetik pigmentlerin (klorofil a, klorofil b, toplam karotenoid) belirlenmesi için, 0.25 g taze yaprak örnekleri alınarak 2 mL % 80'lik asetonla homojenize edildi. Homojenatlar, kaba filtre kağıdından süzülerek kaba partiküllerden arındırıldı ve daha sonra oda sıcaklığı koşullarında, 5000 rpm'de 5 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatantlar elde edildi. Yaprak ekstratlarının absorbansı, UV-Vis spektrofotometrede klorofil-a için 663 nm, klorofil-b için 645 nm ve toplam karotenoid için 480 nm dalga boyunda ölçüldü (Arnon, 1949).

Fotosentetik pigmentlerin miktarları aşağıdaki eşitliklere (3.1, 3.2 ve 3.3) göre hesaplandı:

$$\text{Klorofil-a} = [\Delta A_{663} \times 12.70 - \Delta A_{645} \times 2.69] [(V/1000) * W] \quad (3.1)$$

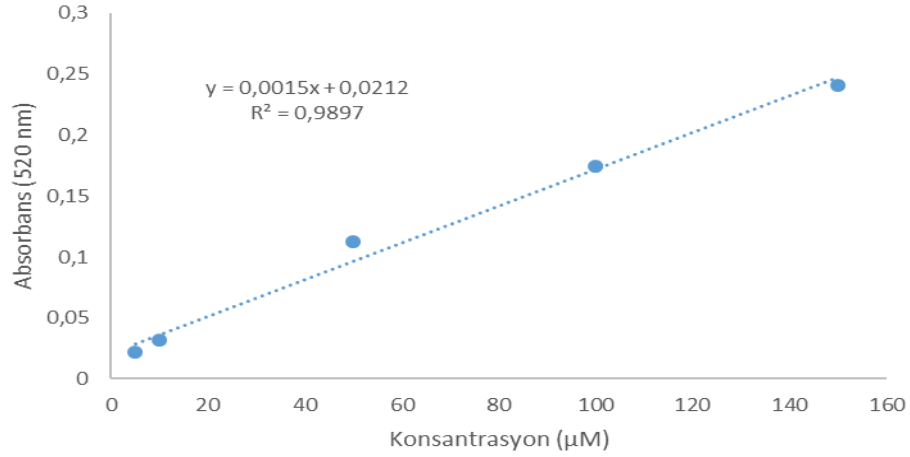
$$\text{Klorofil-b} = [\Delta A_{645} \times 22.90 - \Delta A_{663} \times 4.68] [(V/1000) * W] \quad (3.2)$$

$$\text{Toplam Karotenoid} = [\Delta A_{480} + \Delta A_{663} \times 0.114 - \Delta A_{645} \times 0.638/112.50] [(V/1000) * W] \quad (3.3)$$

{ ΔA : Belirtilen dalga boylarındaki absorbans değerini, V: mL cinsinden son ekstraksiyon hacmini, W: g cinsinden analiz için alınan bitki miktarını ifade etmektedir}

3.2.5. Prolin içeriğinin belirlenmesi

Prolin içeriğinin belirlenmesi için Bates ve ark. (1973) tarafından geliştirilen asidik ninhidrin bazlı kolorimetrik test küçük değişiklikler yapılarak kullanıldı (Ghoulam ve ark., 2002). Sıvı nitrojenle hasat edildikten sonra -80 °C'de muhafaza edilen taze bitki örneklerinden 100 mg alınarak üzerine 2 mL %40'lık metanol eklendi ve homojenizasyon sağlandı. Homojenat whatman No. 1 filtre kağıdından süzüldü ve elde edilen süzüntüden 1 mL alınarak, üzerine 1 mL glasiyal asetik asit ve 6 M ortofosforik asit karışımı (3:2 v/v) ilave edildi. Hazırlanan reaksiyon ortamına 25 mg ninhidrin eklenerek karışım 1 saat 95 °C'de inkübe edildi. Reaksiyon karışımı soğutulurken üzerine 5 mL tolüen eklendikten sonra organik ve su fazlarının ayrılmasını sağlamak için 5 dakika bekletildi. Prolin miktarının belirlenmesi için üstteki fazın absorbansı 520 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Prolin konsantrasyonu, L-prolin standart eğri grafiği (Şekil 3.4) kullanılarak belirlendi ve $\mu\text{mol g}^{-1}$ taze ağırlık olarak ifade edildi.



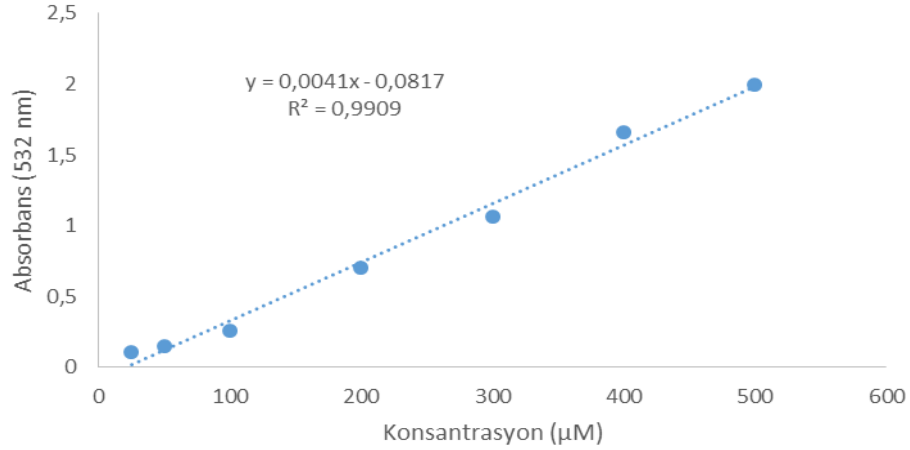
Şekil 3.4. L-Prolin standart eğrisi

3.2.6. Malondialdehit içeriğinin belirlenmesi

Lipit peroksidasyonunun ölçüsü olan MDA içeriği Ohkawa ve ark. (1979)'na göre belirlendi. MDA içeriğinin belirlenmesi için daha önce sıvı nitrojenle toz haline getirilip -80 °C'de bekletilen yaprak örneklerinden 100 mg tartılarak, üzerine 2 mL %5'lik trikloroasetik asit (TCA) eklendi ve homojenizasyon sağlandı. Elde edilen homojenat 25 °C 12000 rpm'de 20 dk süre ile santrifüj edildi. Daha sonra süpernatanttan 0.4 µL alınarak, üzerine %0.5 oranında tiyobarbitürik asit (TBA) içeren 0.4 µL %20'lik TCA çözeltisi eklendi ve reaksiyon karışımı 95 °C'lik sıcak su banyosunda 1 saat tutulduktan sonra (Şekil 3.5) reaksiyonu durdurmak amacıyla buz banyosuna konuldu. Bir sonraki aşamada, reaksiyon karışımı 10000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek, karışımın absorbans değerleri UV-Vis spektrofotometre yardımıyla 532 nm dalga boyunda ölçüldü. MDA miktarı, standart 1,1,3,3-Tetraethoxypropane (MDA) eğri grafiğinden elde edilen eşitlik (Şekil 3.6) kullanılarak $\mu\text{mol g}^{-1}$ taze ağırlık olarak hesaplandı.



Şekil 3.5. Lipid peroksidasyon aktivitesi ölçümü



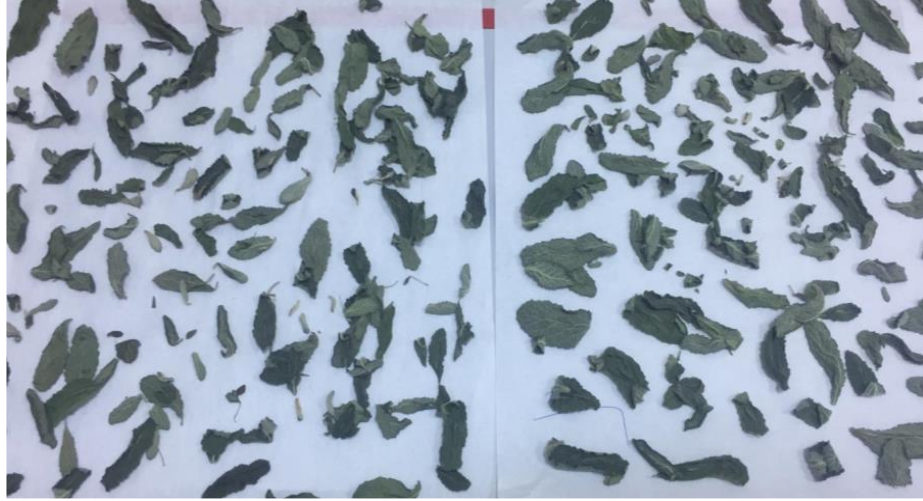
Şekil 3.6. MDA standart eğrisi

3.2.7. Antioksidan aktivite tayini

Bitki örneklerinin antioksidan aktivitelerini belirlemek için DPPH serbest radikali giderim aktivitesi, ABTS (katyon radikali giderim aktivitesi) ve CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi olmak üzere üç farklı yöntem kullanıldı. Antioksidan aktivitelerin belirlenmesi için hazırlanan bitki ekstralarında, toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri de uygun yöntemlerle belirlendi.

3.2.7.1. Bitki ekstralarının hazırlanması

Antioksidan aktivitelerde kullanılmak üzere hasat sırasında kurumaya bırakılan bitki örnekleri (Şekil 3.7) toz haline getirildikten sonra etanol ile 24 saat boyunca masere edildi. Maserasyon sürecinden sonra whatman No:1 filtre kağıtlarından süzülen ekstraların çözücü kısmı, evaporatör yardımıyla uzaklaştırıldı ve geriye kalan özüt aktivite tayinlerinde kullanılmak üzere hazır hale getirildi. Elde edilen katı özütlerden, toplam fenolik, toplam flavonoid ve antioksidan aktivite (DPPH, ABTS, CUPRAC) tayininde kullanılmak üzere 1000 µg/ml konsantrasyonda stok çözeltiler hazırlandı.



Şekil 3.7. *Salvia virgata* bitki örneklerinin kurutulması

3.2.7.2. Toplam fenolik içeriğin belirlenmesi

Ekstrelerdeki toplam fenolik içeriği Folin-Ciocalteu prosedürüne göre belirlendi. (Slinkard ve Singleton, 1977). Ekstrelerin stok çözeltilerinden 100 μL alınarak test tüplerine konuldu ve üzerine 4.5 mL distile su ilave edilerek hacim 4.6 mL'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına, 100 μL Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ve 3 dk sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 300 μL ilave edilerek oda sıcaklığında iki saat inkübasyona bırakıldı. Bu süre sonunda reaksiyon karışımının absorbansı, 760 nm'de UV-Vis spektrofotometrede ölçüldü. Farklı konsantrasyonlarda (0, 1, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanan standart gallik asit çözeltileri için de aynı prosedür uygulandı.

Yöntem:

Farklı hacimlerde alınan gallik asit çözeltisi/ekstre



Distile su ile hacim 4.6 mL'ye tamamlanır



100 μL FCR



(3 dk sonra)

300 μL Na_2CO_3 çözeltisi

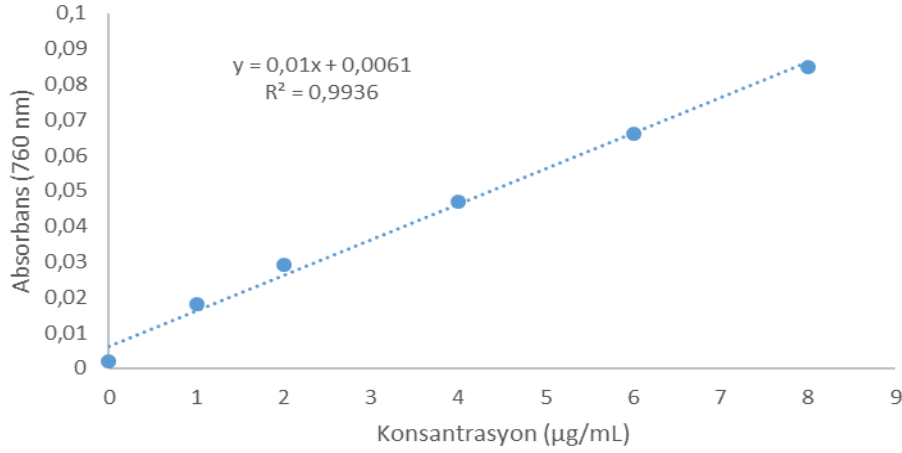


(2 saat sonra)

760 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma

Toplam fenolik içerik, standart gallik asit eğri grafiğinden (Şekil 3.8) elde edilen eşitlik kullanılarak hesaplandı ve gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak ifade edildi.

Gallik asite eşdeğer fenolik içerik ($y=0.01x+0.0061$; $R^2=0.9936$).



Şekil 3.8. Gallik asit standart eğrisi

3.2.7.3. Toplam flavonoid içeriğinin belirlenmesi

Salvia virgata yapraklarının etanol ekstraktının toplam flavonoid içeriği, alüminyum nitrat yöntemine göre belirlendi (Moreno, 2000). 100 µL stok bitki ekstresi üzerine 4.7 mL %80'lik etanol ilave edilerek karışımın hacmi 4.8 mL'ye tamamlandı. Daha sonra reaksiyon ortamına 100 µL 1 M potasyum asetat ve 1 dk sonra 100 µL %10'luk alüminyum nitrat eklenerek reaksiyon karışımının son hacmi 5 mL'ye tamamlanmış oldu. Nihai çözelti vorteksenerek iyice karıştırıldıktan sonra 40 dk inkübasyona bırakıldı ve bu süre sonunda karışımın absorbansı, 415 nm dalga boyunda UV-Vis spektrofotometre ile ölçüldü. Farklı konsantrasyonlarda (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 µg/mL) hazırlanan standart kersetin çözeltileri için de aynı prosedür uygulandı.

Yöntem:

Farklı hacimlerde alınan kersetin çözeltisi/ekstre

↓

%80'lik etanol ile hacim 4.8 mL'ye tamamlanır

↓

100 µl 1 M potasyum asetat çözeltisi

↓ (1 dk sonra)

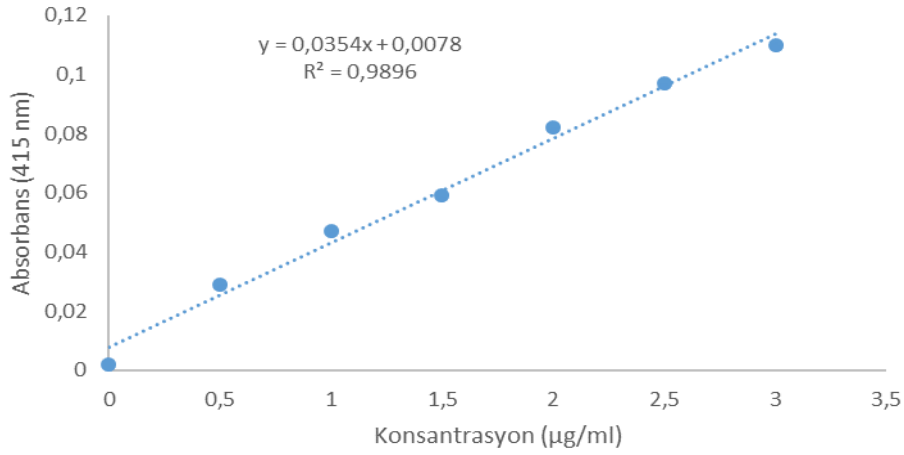
100 µl %10'luk Alüminyum nitrat çözeltisi

↓ (40 dk sonra)

415 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma

Toplam flavonoid içerik, standart kersetin eğri grafiğinden (Şekil 3.9) elde edilen eşitlik kullanılarak hesaplandı ve kersetin eşdeğeri (QE) olarak ifade edildi

Kersetine eşdeğer flavonoid içerik ($y=0.0354x+0.0078$; $R^2=0.9896$).



Şekil 3.9. Kersetin standart eğrisi

3.2.7.4. DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi

Bu yöntemin prensibi, antioksidan bileşiklerin kararlı serbest radikal olan DPPH'ı yakalamasıyla, çözeltinin renginin koyu mor renkten sarı renge dönmesi sonucu absorbans değerindeki düşüşün spektrofotometrik ölçümüne dayanır. Ekstrelerin serbest radikal yakalama aktivitesi Blois (1958) yöntemine göre kararlı bir radikal olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) kullanılarak değerlendirildi. Farklı konsantrasyonlarda (25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL) hazırlanan her bitki ekstresinden 1 mL alınarak üzerine 4 mL 100 µM DPPH çözeltisi ilave edildi. Reaksiyon karışımı vortekslenerek, karanlık ve oda sıcaklığı koşullarında 30 dk inkübe edildi (Şekil 3.10). Bu süre sonunda karışımların absorbansı, UV-Vis spektrofotometre ile 517 nm'de ölçüldü. Pozitif kontrol olarak, askorbik asit (1, 2, 3, 4, 5, 6 µg/mL), BHT (25, 50, 100, 150, 200, 250 µg/mL) ve BHA (5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL) kullanıldı. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde (3.4) yerine yerleştirilerek inhibisyon yüzdesi (%I) hesaplandı.

$$\% \text{ İnhibisyon (I)} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (A=\text{Absorbans}) \quad (3.4)$$

% İnhibisyon (I): DPPH radikali yakalama aktivitesi yüzdesi

A_{kontrol} : ekstre içermeyen (1mL metanol+4 mL DPPH) karışımın absorbansı

A_{örnek} : farklı konsantrasyonlarda ekstre veya pozitif kontrol içeren karışımın absorbansı

Ayrıca, DPPH radikali yakalama aktivitesinin yüzdesi ve bitki ekstresi konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$) kullanılarak IC_{50} değerleri hesaplandı. IC_{50} , DPPH radikal konsantrasyonunu %50 azaltmak için gerekli ekstre miktarını ifade etmektedir.

Yöntem:

1 mL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan ekstre/pozitif kontrol



4 mL DPPH çözeltisi



(30 dk karanlıkta inkübasyon)

517 nm dalga boyunda spektrofotometrik okuma



Şekil 3.10. DPPH yöntemine ait örneklerin inkübasyon sonrası görünüşü

3.2.7.5. ABTS^{++} katyon radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi

Bu yöntemin prensibi, ABTS^{++} katyon radikali absorpsiyonunun antioksidanlar tarafından inhibisyonu temeline dayanır. Bitki ekstraktlarının ABTS^{++} katyon radikal giderim aktiviteleri, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi (Ree ve ark., 1999). ABTS^{++} katyon radikali, uygun konsantrasyonda hazırlanan ABTS ve potasyum peroksidisülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) karışımının oda sıcaklığında ve karanlıkta 12-16 saat bekletilerek reaksiyona girmesiyle elde edildi. Elde edilen ABTS^{++} solüsyonunun absorpsiyon değeri 734 nm dalga boyunda ~ 0.700 olacak şekilde seyreltilti. Bu aşamadan sonra deney tüpüne farklı konsantrasyonlarda (5, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanan her bitki ekstresinden 1 mL konularak, üzerine 4 mL ABTS^{++} ilave edilip karışım 30 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.11) Daha sonra, reaksiyon karışımları 734 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında

okunarak, örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak, askorbik asit (0.5, 1, 2, 3, 4, 5 µg/mL), BHT (0.5, 1, 2, 3, 4, 5 µg/mL) ve BHA (5, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL) kullanıldı. Elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formülde (3.5) yerine yerleştirilerek inhibisyon yüzdesi (%I) hesaplandı.

$$\% \text{İnhibisyon (I)} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (A=\text{Absorbans}) \quad (3.5)$$

% İnhibisyon (I): ABTS^{•+} katyon radikali giderim aktivitesi yüzdesi

A_{kontrol}: ekstre içermeyen (1mL metanol+4 mL ABTS^{•+}) karışımın absorbansı

A_{örnek}: farklı konsantrasyonlarda ekstre veya pozitif kontrol içeren karışımın absorbansı

Yöntem:

1 mL farklı konsantrasyonlardaki ekstre/pozitif kontrol

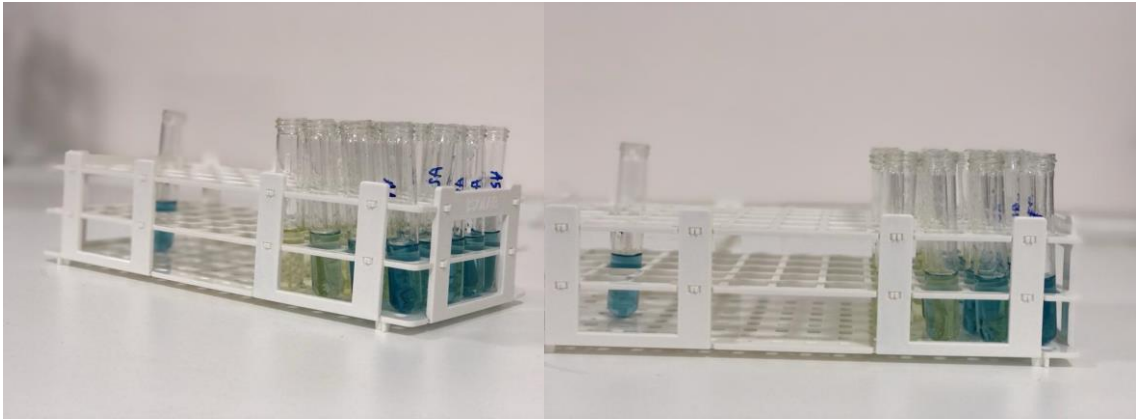
↓

4 mL ABTS^{•+}

↓ (30 dk karanlıkta inkübasyon)

734 nm dalga boyunda spektrofotometrede okuma

Ayrıca, ABTS^{•+} katyon radikali giderim aktivitesinin yüzdesi ve bitki ekstresi konsantrasyonları (µg/mL) kullanılarak IC₅₀ değerleri hesaplandı. IC₅₀, ABTS^{•+} katyon radikal konsantrasyonunu % 50 azaltmak için gerekli ekstre miktarını ifade etmektedir.



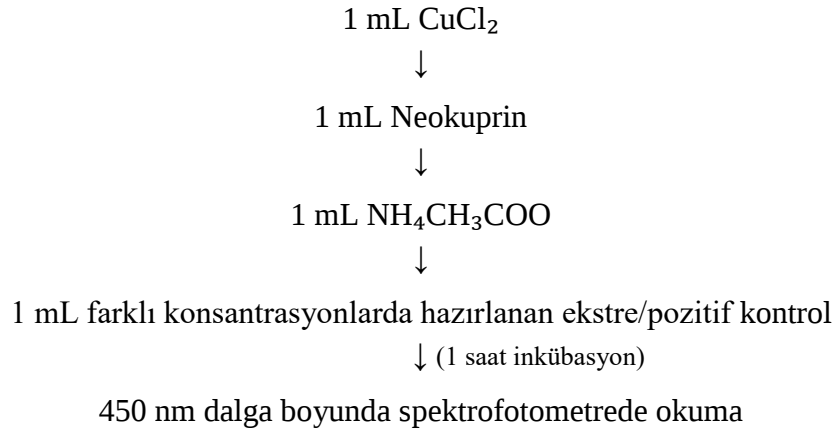
Şekil 3.11. ABTS^{•+} yöntemine ait örneklerin inkübasyon sonrası görünüşü

3.2.7.6. CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme) aktivitesinin belirlenmesi

Bu yöntemin prensibi, antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksinin, renkli Cu(I)-Nc'ye indirgenmesi esasına dayanır. CUPRAC yönteminde spektrofotometrik ölçümden elde edilen absorbans değerleri doğrudan

aktivite sonucunu ifade etmektedir (Apak ve ark., 2004). Aktivitenin belirlenmesi için deney tüpüne 1 mL 10 mM bakır klorür (CuCl_2), 1 mL 7.5 mM neokuproin, 1 mL 1M amonyum asetat ($\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$) ve farklı konsantrasyonlarda (10, 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$) hazırlanan bitki ekstrelerinden 1 mL konuldu. Reaksiyon karışımı vortekslenerek, karanlık ve oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildikten sonra, 450 nm’de UV-Vis spektrofotometre ile absorbans ölçümleri yapıldı (Şekil 3.12) ve kontrole karşı değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak, askorbik asit (2, 5, 10, 20, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$), BHT (1, 3, 6, 9, 12, 15 $\mu\text{g/mL}$) ve BHA (10, 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$) kullanıldı.

Yöntem:



Ayrıca, elde edilen absorbans değerleri ve bitki ekstresi konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$) kullanılarak $A_{0.5}$ değerleri hesaplandı. $A_{0.5}$, Cu(II)-Nc kompleksinin % 50’sinin renkli Cu(I)-Nc’ye indirgenmesi için gerekli ekstre miktarını ifade etmektedir.



Şekil 3.12. UV-Vis spektrofotometrede absorbans ölçümleri

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Fotosentetik Pigment İçerikleri

Tuz stresine maruz bırakılan ve bununla beraber elisitör uygulanan *Salvia virgata* bitkisinde klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriklerindeki değişimler Çizelge 4.1’de verilmiştir. Elde edilen verilere göre tuz stresi uygulamasının klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Tuz stresi ile birlikte uygulanan SA, ZnONP, SA+ZnONP elisitörleri her üç pigment miktarını artırırken NaCl+SA+ZnONP uygulamasında karotenoid miktarının kontrol grubundan daha fazla olduğu görülmüştür. Her üç pigment miktarının en düşük değerinin NaCl uygulamasında, en yüksek değerinin NaCl+SA+ZnONP uygulamasında olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 4.1. Elisitör uygulaması yapılan *Salvia virgata* bitkisinin fotosentetik pigment içerikleri*

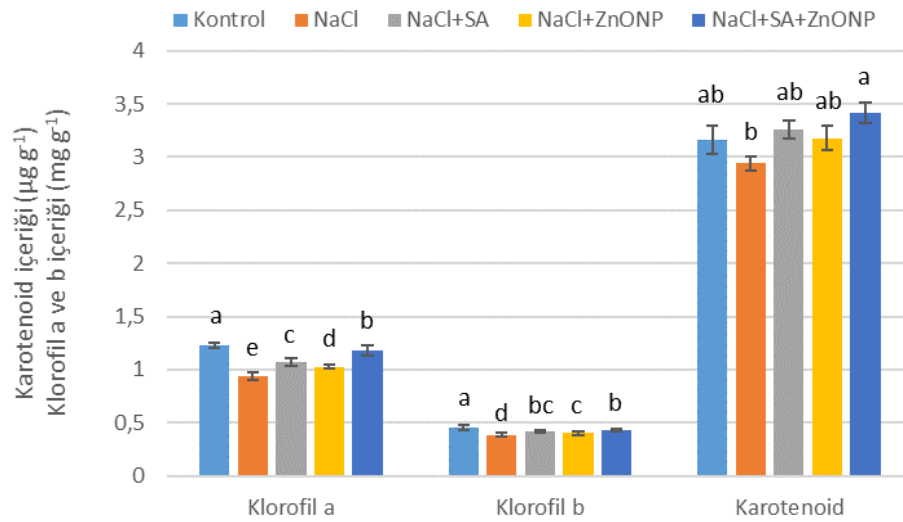
Ekstreler	Klorofil a (mg g⁻¹)	Klorofil b (mg g⁻¹)	Karotenoid (µg g⁻¹)
Kontrol	1.228±0.029 ^a	0.459±0.023 ^a	3.163±0.131 ^{ab}
NaCl	0.935±0.036 ^e	0.387±0.014 ^d	2.938±0.063 ^b
NaCl+SA	1.071±0.032 ^c	0.417±0.009 ^{bc}	3.258±0.083 ^{ab}
NaCl+ZnONP	1.027±0.020 ^d	0.405±0.019 ^c	3.174±0.115 ^{ab}
NaCl+SA+ZnONP	1.176±0.047 ^b	0.430±0.012 ^b	3.414±0.097 ^a

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama ± standart sapması olarak verilmiştir.

*Aynı sütundaki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir (p≤0.05)

Tuz stresi klorofil a miktarında azalmaya neden olmuş ancak, elisitör uygulamaları sonucunda bitkinin klorofil a miktarı her üç elisitör uygulamasında da NaCl uygulamasına göre artış göstermiş ve istatistiksel olarak tüm gruplar arasında farklılık olduğu belirlenmiştir. Tüm gruplar klorofil a miktarı bakımından sıralandığında Kontrol>NaCl+SA+ZnONP> NaCl+SA> NaCl+ZnONP>NaCl şeklinde olduğu görülmüştür. Klorofil b miktarı da tuz stresi uygulamasıyla azalmış ve klorofil a’ya benzer olarak elisitör uygulamalarıyla artış göstermiştir. En yüksek klorofil b miktarı 0.459 mg g⁻¹ ile kontrol grubunda, en düşük klorofil b miktarı 0.387 mg g⁻¹ ile NaCl grubunda görülmekle birlikte elisitör uygulamaları arasında en yüksek değer 0.430 mg g⁻¹ ile NaCl+SA+ZnONP uygulamasında görülmüştür. Karotenoid miktarı bakımından istatistiksel olarak kontrol, NaCl+SA ve NaCl+ZnONP grupları benzerlik göstermiştir.

En düşük karotenoid miktarı $2.938 \mu\text{g g}^{-1}$ ile NaCl grubunda, en yüksek karotenoid miktarı $3.414 \mu\text{g g}^{-1}$ NaCl+SA+ZnONP uygulamasında görülmüştür. Karotenoid miktarı bakımından istatistiksel olarak tüm gruplar sıralandığında $\text{NaCl+SA+ZnONP} > \text{NaCl+SA} = \text{Kontrol} = \text{NaCl+ZnONP} > \text{NaCl}$ şeklinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Fotosentetik pigment içeriğindeki değişimler

4.2. Prolin İçeriği

Tuz stresine maruz kalan bitkideki prolin artışı bitkinin bu strese karşı tolerans gösterebilmesi bakımından önemli bir parametredir. Çizelge 4.2’de kontrol ve tüm uygulama gruplarına ait prolin miktarı istatistiksel olarak ve standart sapma değerleriyle birlikte detaylı şekilde sunulmuştur. Prolin miktarı genel olarak değerlendirildiğinde tüm uygulama gruplarının kontrol grubuna göre prolin miktarını artırdığı gözlenmiştir.

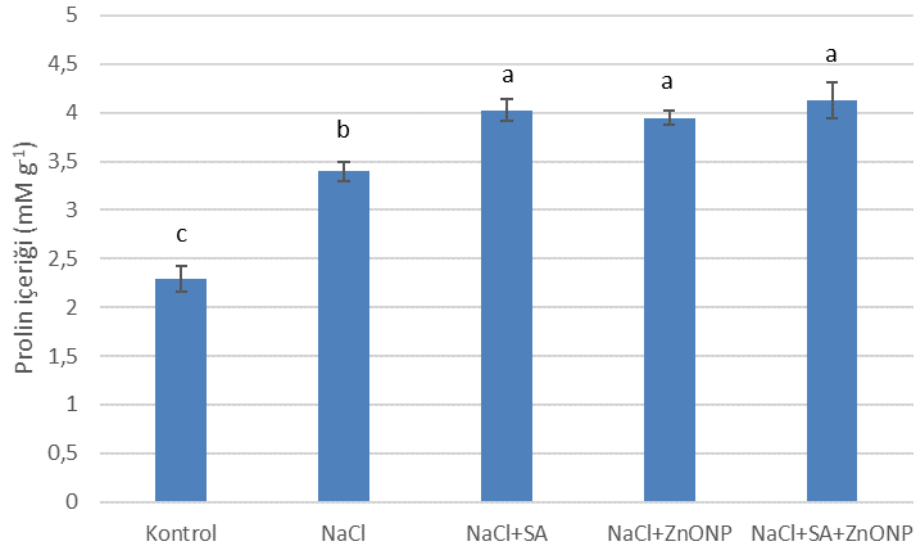
Çizelge 4.2. Elisitör uygulaması yapılan *Salvia virgata* bitkisinin prolin içerikleri*

Ekstreler	Prolin (mM g^{-1})
Kontrol	2.293 ± 0.13^c
NaCl	3.396 ± 0.10^b
NaCl+SA	4.026 ± 0.11^a
NaCl+ZnONP	3.948 ± 0.07^a
NaCl+SA+ZnONP	4.128 ± 0.18^a

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir.

*Aynı sütundaki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p \leq 0.05$)

Tuz uygulaması ve tuzla birlikte uygulanan tüm elisitörler prolin miktarını kontrol grubuna göre artırmıştır. En düşük prolin miktarı 2.293 mM g^{-1} ile kontrol grubunda, en yüksek prolin miktarı 4.128 mM g^{-1} ile NaCl+SA+ZnONP uygulamasında görülmüştür. Kontrol grubuna göre prolin miktarındaki artış oranları incelendiğinde NaCl %48.10, NaCl+SA %75.57, NaCl+ZnONP %72.17, NaCl+SA+ZnONP %80.02 artışa neden olmuştur. Elisitör uygulamalarının tamamı tuz uygulama grubuna göre prolin miktarında artışa neden olmakla birlikte en fazla artış NaCl+SA+ZnONP uygulamasında görülmüş ancak, elisitörler kendi içerisinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir. Prolin miktarı bakımından istatistiksel olarak tüm gruplar sıralandığında $\text{NaCl+SA+ZnONP}=\text{NaCl+ZnONP}=\text{NaCl+SA}>\text{NaCl}>\text{Kontrol}$ şeklinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Prolin içeriğindeki değişimler

4.3. Malondialdehit İçeriği

MDA miktarı, strese maruz kalan bitkinin hücre membranındaki lipid peroksidasyon derecesinin bir göstergesi olup membran hasar derecesi hakkında fikir vermektedir. Kontrol ve tüm uygulama gruplarına ait MDA miktarı, istatistiksel olarak ve standart sapma değerleriyle birlikte Çizelge 4.3'te verilmiştir. Tuz stresi ve tuzla birlikte tüm elisitör uygulamalarında MDA miktarı kontrol bitkisine göre artış göstermiş ve en çok artış oranının 2.18 kat ile NaCl uygulamasında olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte elisitör uygulamalarının tuza bağlı olarak artış gösteren MDA miktarında azalmaya neden olduğu ve en fazla azalmanın $2.116 \mu\text{mol g}^{-1}$ ile NaCl+SA+ZnONP

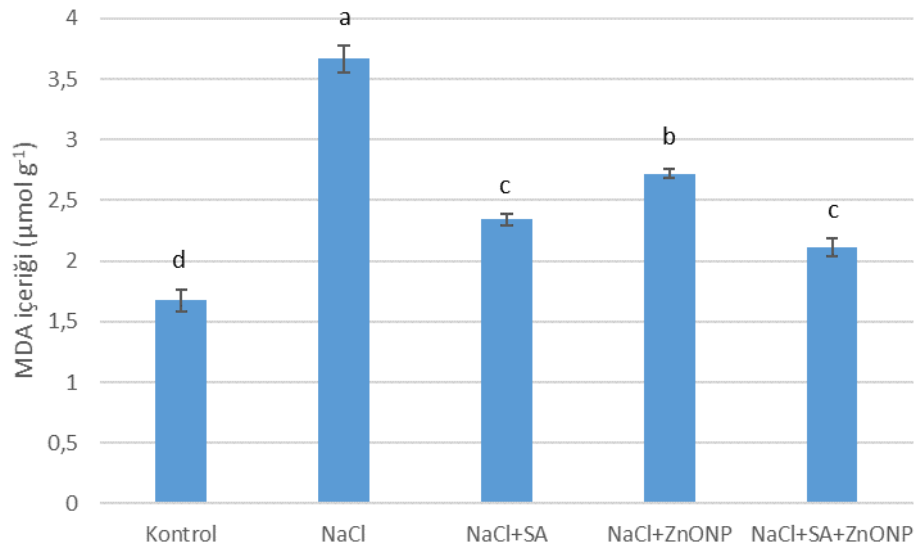
uygulamasında olduğu görülmüştür. En düşük MDA miktarı NaCl+SA+ZnONP uygulamasında görülse dahi NaCl+SA uygulamasıyla istatistiksel olarak benzerlik göstermiştir. Elisitörlerin NaCl uygulamasına göre MDA miktarındaki azalma oranları hesaplandığında, NaCl+ZnONP %25.80, NaCl+SA %36.14, NaCl+SA+ZnONP %42.28 oranında azalmaya neden olmuştur. Tüm gruplar birlikte değerlendirildiğinde istatistiksel olarak NaCl > NaCl+ZnONP > NaCl+SA+ZnONP = NaCl+SA > Kontrol şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.3.).

Çizelge 4.3. Elisitör uygulaması yapılan *Salvia virgata* bitkisinin MDA içerikleri*

Ekstreler	MDA ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
Kontrol	1.674 $\pm$ 0.09 ^d
NaCl	3.666 $\pm$ 0.11 ^a
NaCl+SA	2.341 $\pm$ 0.05 ^c
NaCl+ZnONP	2.720 $\pm$ 0.04 ^b
NaCl+SA+ZnONP	2.116 $\pm$ 0.07 ^c

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir.

*Aynı sütundaki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p \leq 0.05$)



Şekil 4.3. MDA içeriğindeki değişimler

4.4. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriği

Kontrol ve uygulama gruplarına ait toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri Çizelge 4.4’de verilmiştir. Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoid içerikleri

sırasıyla gallik asit ve kersetine eşdeğer olarak belirlenmiştir. Kontrol bitkisi ile karşılaştırıldığında, tuz stresi uygulaması ile tüm elisitör uygulamalarında hem fenolik hem de flavonoid içerikte artış gözlenmiş ve istatistiksel olarak birbirlerinden anlamlı farklılıklar göstermiştir. Bununla birlikte elisitör uygulamalarının fenolik ve flavonoid içeriğini sadece tuz stresi uygulanan gruba göre daha fazla artırdığı tespit edilmiştir. Tüm gruplar arasında en düşük ve en yüksek fenolik/flavonoid içeriği incelendiğinde en düşük toplam fenolik içeriği kontrol grubuna ait bitki ekstresinde 166.82 µg olarak gözlenirken, yine kontrol grubuna ait ekstrede toplam flavonoid içeriğinin 62.25 µg olduğu belirlenmiştir. En yüksek toplam fenolik içeriği NaCl+ZnONP grubuna ait bitki ekstresinde 314.96 µg olarak gözlenirken, aynı ekstrede toplam flavonoid içeriğinin 114.50 µg olduğu belirlenmiştir.

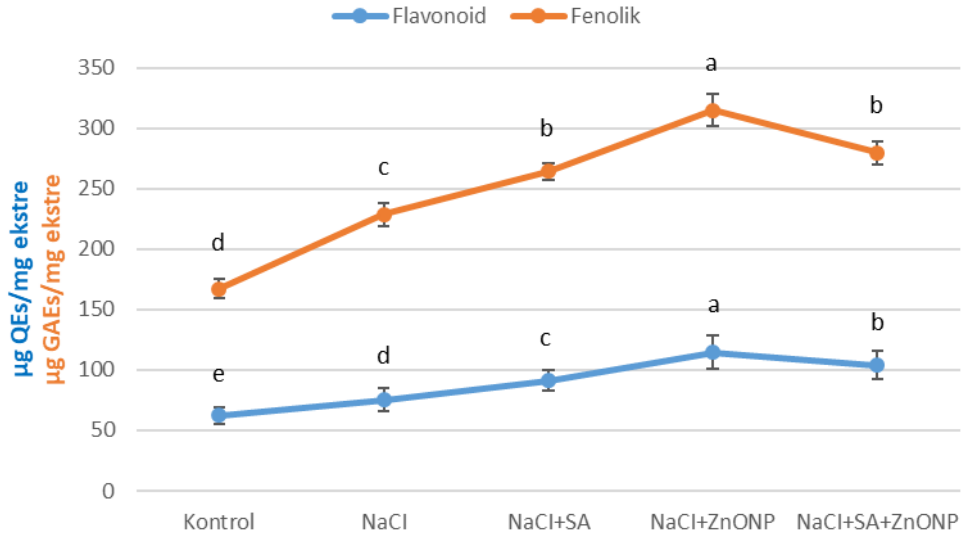
Çizelge 4.4. Elisitör uygulaması yapılan *Salvia virgata* bitkisinin toplam fenolik ve flavonoid içerikleri*

Ekstreler	Fenolik içerik (µg GAEs/mg ekstre)	Flavonoid içerik (µg QEs/mg ekstre)
Kontrol	166.82±1.72 ^d	62.25±0.78 ^e
NaCl	228.54±2.45 ^c	75.31±1.63 ^d
NaCl+SA	264.04±1.56 ^b	91.08±1.41 ^c
NaCl+ZnONP	314.96±3.47 ^a	114.50±1.96 ^a
NaCl+SA+ZnONP	279.47±4.51 ^b	103.69±2.28 ^b

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama ± standart sapması olarak verilmiştir.

*Aynı sütundaki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir (p≤0.05)

Elisitör uygulamaları kendi aralarında karşılaştırıldığında fenolik ve flavonoid içeriğindeki en yüksek artış NaCl+ZnONP uygulamasında gözlenirken, en az artış NaCl+SA elisitör uygulaması sonucunda gözlenmiştir. Tüm gruplar toplam fenolik içeriği bakımından birlikte değerlendirildiğinde istatistiksel olarak NaCl+ZnONP > NaCl+SA+ZnONP = NaCl+SA > NaCl > Kontrol, toplam flavonoid içeriği bakımından ise NaCl+ZnONP > NaCl+SA+ZnONP > NaCl+SA > NaCl > Kontrol şeklinde sıralandığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğindeki değişimler

4.5. Toplam Antioksidan Aktivite Bulguları

Toplam antioksidan aktivite tayini, DPPH serbest radikali giderim aktivitesi, katyon radikali giderim aktivitesi (ABTS) ve bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan (CUPRAC) kapasitesi olmak üzere üç farklı yöntemle belirlenmiştir.

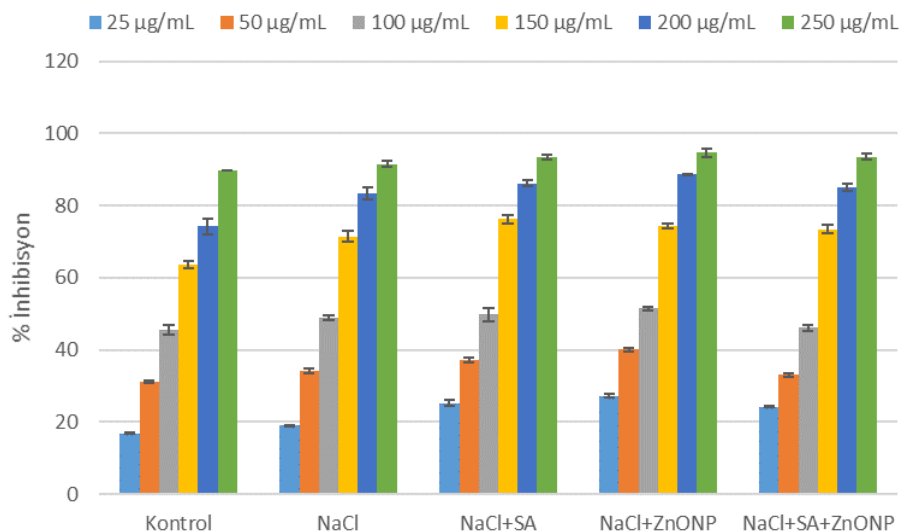
4.5.1. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi

Bitki ekstralarının ve pozitif kontrollerin DPPH yöntemiyle belirlenen antioksidan aktiviteleri % inhibisyon ve IC_{50} değeri olarak verilmiştir. % inhibisyon değerinin yüksek olması antioksidan aktivitenin yüksek olduğu anlamına gelirken, IC_{50} değerinde küçük olan değer yüksek aktivite anlamına gelmektedir. Bitki ekstraları ve pozitif kontrollerin DPPH yöntemiyle antioksidan aktivite ölçümleri farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Bunlar;

- Bitki ekstraları için 6 farklı konsantrasyon (25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$)
- AA için 6 farklı konsantrasyon (1, 2, 3, 4, 5, 6 $\mu\text{g/mL}$)
- BHT için 6 farklı konsantrasyon (25, 50, 100, 150, 200, 250 $\mu\text{g/mL}$)
- BHA için 6 farklı konsantrasyon (5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$)

DPPH yönteminde uygulama grupları bütün konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiş ve en yüksek aktivite değerleri tüm örnekler için en yüksek konsantrasyon olan 250 $\mu\text{g/mL}$ 'de ölçülmüştür. Tüm ekstralar arasında en yüksek aktivite NaCl+ZnONP uygulamasında görülürken, en düşük

antioksidan aktivite kontrol grubunda gözlenmiştir. Ekstreler ve pozitif kontroller karşılaştırıldığında BHT hariç pozitif kontrollerin ekstrelerden daha yüksek aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Pozitif kontrollerde AA için en yüksek aktivite değeri 6 $\mu\text{g/mL}$ 'de %96.05, BHA için 50 $\mu\text{g/mL}$ 'de %94.22 ve BHT için 250 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda %92.25 olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Bitki ekstrelerinin DPPH yöntemiyle belirlenen inhibisyon değerleri

Çizelge 4.5. Elisitör uygulaması yapılan *Salvia virgata* bitki ekstrelerinin DPPH aktivitesi (%I)*

		25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
Uygulamalar	Kontrol	16.94 $\pm$ 0.26	31.15 $\pm$ 0.33	45.57 $\pm$ 1.25	63.57 $\pm$ 0.91	74.31 $\pm$ 2.15	89.78 $\pm$ 0.11
	NaCl	19.05 $\pm$ 0.18	34.21 $\pm$ 0.54	48.94 $\pm$ 0.62	71.47 $\pm$ 1.44	83.36 $\pm$ 1.52	91.49 $\pm$ 0.79
	NaCl+SA	25.26 $\pm$ 0.74	37.15 $\pm$ 0.69	49.78 $\pm$ 1.78	76.21 $\pm$ 1.06	86.21 $\pm$ 0.98	93.47 $\pm$ 0.65
	NaCl+ZnONP	27.24 $\pm$ 0.48	40.10 $\pm$ 0.42	51.47 $\pm$ 0.60	74.31 $\pm$ 0.76	88.63 $\pm$ 0.23	94.73 $\pm$ 1.17
	NaCl+SA+ZnONP	24.31 $\pm$ 0.19	33.05 $\pm$ 0.55	46.10 $\pm$ 0.85	73.47 $\pm$ 1.18	84.94 $\pm$ 1.02	93.57 $\pm$ 0.82
Pozitif Kontroller		1 $\mu\text{g/ml}$	2 $\mu\text{g/ml}$	3 $\mu\text{g/ml}$	4 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	6 $\mu\text{g/ml}$
	AA	22.47 $\pm$ 0.15	36.10 $\pm$ 0.52	49.57 $\pm$ 0.23	75.56 $\pm$ 0.27	91.78 $\pm$ 0.18	96.05 $\pm$ 0.41
		25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$	250 $\mu\text{g/ml}$
	BHT	17.68 $\pm$ 0.47	33.94 $\pm$ 0.36	52.15 $\pm$ 0.55	73.33 $\pm$ 0.16	80.21 $\pm$ 0.89	92.25 $\pm$ 0.73
		5 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$
	BHA	25.47 $\pm$ 0.14	40.84 $\pm$ 0.75	57.42 $\pm$ 0.27	69.94 $\pm$ 0.63	83.97 $\pm$ 0.67	94.22 $\pm$ 0.43

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir.

Bitki ekstrelerinin IC_{50} değerleri incelendiğinde, en yüksek aktivite değeri NaCl+ZnONP (IC_{50} =87.81 $\pm$ 0.32 $\mu\text{g/mL}$) uygulamasında, en düşük aktivite değeri kontrol (IC_{50} =117.92 $\pm$ 0.57 $\mu\text{g/mL}$) grubunda gözlenmiştir. Pozitif kontroller içerisinde

en yüksek aktivite AA'da ($IC_{50}=2.76\pm0.03 \mu\text{g/mL}$) görülmüştür. Tüm örneklerin IC_{50} sonuçları birlikte değerlendirildiğinde aktivite sıralamasının $AA > BHA > NaCl+ZnONP > NaCl+SA > NaCl+SA+ZnONP > BHT=NaCl > Kontrol$ şeklinde olduğu görülmüştür (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Bitki ekstrelerinin DPPH aktivitesine ait IC_{50} değerleri

Uygulamalar	$IC_{50} (\mu\text{g/mL})$
Kontrol	117.92 ± 0.57^a
NaCl	103.64 ± 0.50^b
NaCl+SA	92.62 ± 0.55^d
NaCl+ZnONP	87.81 ± 0.32^e
NaCl+SA+ZnONP	100.67 ± 0.61^c
Pozitif Kontroller	
AA	2.76 ± 0.03^g
BHT	103.11 ± 0.13^b
BHA	17.65 ± 0.07^f

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir.

*Aynı sütundaki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p\leq0.05$)

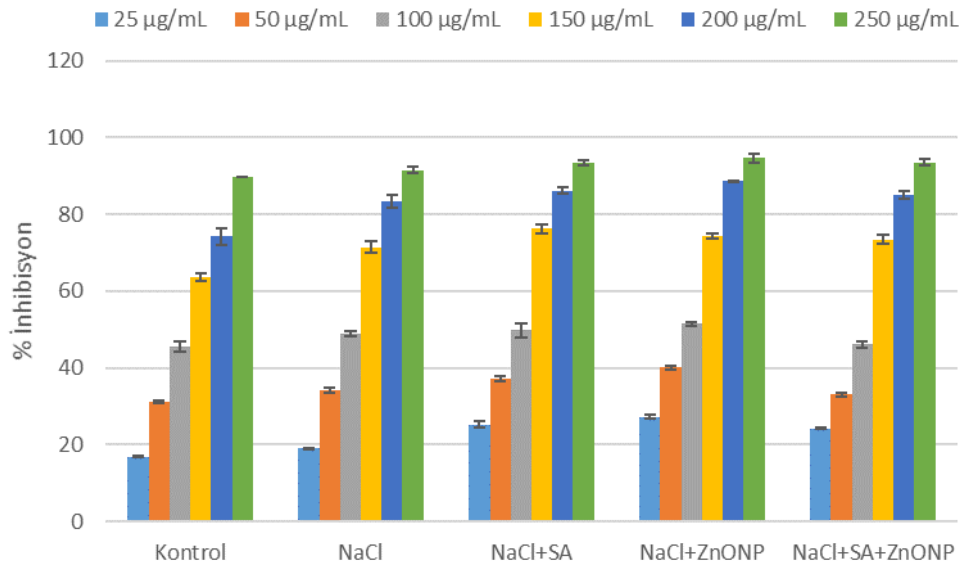
4.5.2. ABTS⁺ katyon radikali giderim aktivitesi

Bitki ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin ABTS yöntemiyle belirlenen antioksidan aktiviteleri % inhibisyon ve IC_{50} değeri olarak verilmiştir. % inhibisyon değerinin yüksek olması antioksidan aktivitenin yüksek olduğu anlamına gelirken, IC_{50} değerinde küçük olan değer yüksek aktivite anlamına gelmektedir. Bitki ekstreleri ve pozitif kontroller farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Bunlar;

- Bitki ekstreleri için 6 farklı konsantrasyon (5, 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g/mL}$)
- AA ve BHT için 6 farklı konsantrasyon (0.5, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu\text{g/mL}$)
- BHA için 6 farklı konsantrasyon (5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{g/mL}$)

Uygulama grupları bütün konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiş ve en yüksek aktivite değerleri tüm örnekler için en yüksek konsantrasyon olan 80 $\mu\text{g/mL}$ 'de ölçülmüştür (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.6). Tüm ekstreler arasında en yüksek aktivite NaCl+ZnONP uygulamasında, en düşük aktivite kontrol grubunda gözlenmiştir. Pozitif kontrollerde AA için en yüksek aktivite değeri 5 $\mu\text{g/mL}$ 'de %98.98, BHT için 5 $\mu\text{g/mL}$ 'de %91.48 ve BHA için 50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda %96.48 olarak elde edilmiştir. Ekstreler ile pozitif kontroller karşılaştırıldığında pozitif kontrollerin genel olarak ekstrelerden daha yüksek aktivite

gösterdiği ve kendi aralarında istatistiksel olarak AA=BHT>BHA sıralaması olduğu görülmüştür.



Şekil 4.6. Bitki ekstralarının ABTS yöntemiyle belirlenen inhibisyon değerleri

Çizelge 4.7. Elisitör uygulaması yapılan *Salvia virgata* bitki ekstralarının ABTS aktivitesi (%I)*

		5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL	60 µg/mL	80 µg/mL
Uygulamalar	Kontrol	12.96±1.11	17.77±0.74	33.70±0.08	58.14±1.25	83.70±1.78	95.74±0.58
	NaCl	16.11±0.78	18.88±0.14	43.14±0.41	60.92±1.33	86.11±1.56	96.66±0.44
	NaCl+SA	16.85±0.58	27.96±0.22	48.14±0.66	78.14±0.06	91.11±0.85	99.07±0.96
	NaCl+ZnONP	22.62±0.32	32.92±0.89	54.07±1.47	83.03±0.19	95.85±1.17	99.44±0.84
	NaCl+SA+ZnONP	17.96±0.15	25.18±1.12	48.33±0.43	72.22±1.44	83.70±0.23	97.59±0.42
Pozitif Kontroller		0.5 µg/mL	1 µg/mL	2 µg/mL	3 µg/mL	4 µg/mL	5 µg/mL
	AA	12.40±0.52	25.74±0.65	48.14±0.23	72.12±1.83	90.74±1.57	98.98±0.71
	BHT	10.18±0.39	22.31±0.65	39.35±1.17	67.87±0.41	84.72±1.96	91.48±0.12
		5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL	50 µg/mL
	BHA	11.48±0.78	26.85±0.14	41.85±0.26	70.18±0.52	89.35±1.71	96.48±0.94

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama ± standart sapması olarak verilmiştir.

Bitki ekstralarının IC₅₀ değerleri incelendiğinde, en yüksek aktivite değeri NaCl+ZnONP (IC₅₀=21.86±0.47 µg/mL) uygulamasında, en düşük aktivite değeri kontrol (IC₅₀=35.81±0.25 µg/mL) grubunda gözlenmiştir. Pozitif kontroller arasında en yüksek aktivite değeri AA'da (IC₅₀=2.17±0.04 µg/mL) ölçülmüştür. Ekstreler ile pozitif kontrollerin IC₅₀ değerleri karşılaştırıldığında pozitif kontrollerin genel olarak

ekstrelerden daha yüksek aktivite gösterdiği ancak, NaCl+ZnONP ekstresinin aktivite değerinin BHA pozitif kontrolünden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca istatistiksel olarak AA ve BHT arasında anlamlı fark görülmezken, diğer tüm örnekler arasında anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Tüm örneklerin IC₅₀ sonuçları birlikte değerlendirildiğinde aktivite sıralamasının AA=BHT> NaCl+ZnONP> BHA> NaCl+SA > NaCl+SA+ZnONP>NaCl>Kontrol şeklinde olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.8. Bitki ekstrelerinin ABTS aktivitesine ait IC₅₀ değerleri

Uygulamalar	IC ₅₀ (µg/mL)
Kontrol	35.81±0.25 ^a
NaCl	32.58±0.47 ^b
NaCl+SA	26.58±0.55 ^d
NaCl+ZnONP	21.86±0.47 ^f
NaCl+SA+ZnONP	28.76±0.66 ^c
Pozitif Kontroller	
AA	2.17±0.04 ^g
BHT	2.44±0.02 ^g
BHA	22.78±0.12 ^e

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama ± standart sapması olarak verilmiştir.

*Aynı sütundaki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir (p≤0.05)

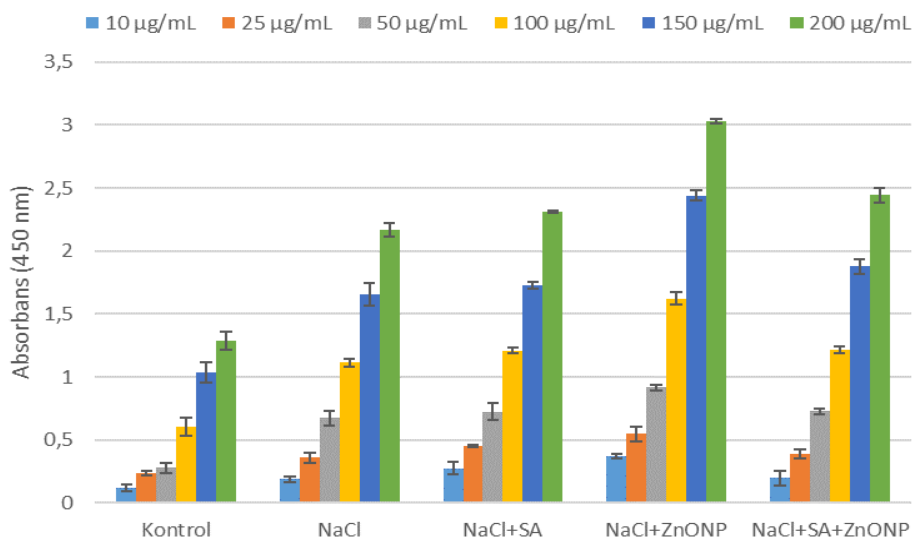
4.5.3. CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme) aktivitesi

Bitki ekstrelerinin ve pozitif kontrollerin CUPRAC yöntemiyle belirlenen antioksidan aktiviteleri absorbans ve A_{0.5} değeri olarak verilmiştir. Bu yöntemde, artan absorbans değeri artan antioksidan aktiviteyi ifade ederken, A_{0.5} değerinde küçük olan değer yüksek aktivite anlamına gelmektedir. Bitki ekstreleri ve pozitif kontrollerin CUPRAC yöntemiyle antioksidan aktivite ölçümleri farklı konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Bunlar;

- Bitki ekstreleri için 6 farklı konsantrasyon (10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL)
- AA için 6 farklı konsantrasyon (2, 5, 10, 20, 40, 50 µg/mL)
- BHT için 6 farklı konsantrasyon (1, 3, 6, 9, 12, 15 µg/mL)
- BHA için 6 farklı konsantrasyon (10, 25, 50, 100, 150, 200 µg/mL)

Uygulama grupları tüm konsantrasyonlarda kontrol grubuna göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Bitki ekstreleri için en yüksek aktivite değerleri 200 µg/mL konsantrasyonda ölçülmüştür (Çizelge 4.9 ve Şekil 4.7). Tüm ekstrelerde en düşük aktivite kontrol grubunda görülürken en yüksek aktivite NaCl+ZnONP

uygulamasında gözlenmiştir. Pozitif kontrollerde AA için en yüksek aktivite değeri 50 µg/mL’de 3.382, BHT için 15 µg/mL’de 3.174 ve BHA için 200 µg/mL konsantrasyonda 2.839 olarak elde edilmiştir. Ekstreler ile pozitif kontroller karşılaştırıldığında pozitif kontrollerin ekstrelerden daha yüksek aktivite gösterdiği ve kendi aralarında istatistiksel olarak BHT>AA>BHA sıralaması olduğu görülmüştür.



Şekil 4.7. Bitki ekstrelerinin CUPRAC yöntemiyle belirlenen absorbans değerleri

Çizelge 4.9. Elisitör uygulaması yapılan *Salvia virgata* bitki ekstrelerinin CUPRAC aktivitesi*

		10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL
Uygulamalar	Kontrol	0.121±0.03	0.236±0.02	0.279±0.04	0.605±0.07	1.035±0.08	1.285±0.07
	NaCl	0.189±0.02	0.359±0.04	0.673±0.06	1.114±0.03	1.655±0.09	2.167±0.05
	NaCl+SA	0.275±0.05	0.456±0.01	0.726±0.07	1.211±0.02	1.727±0.03	2.311±0.01
	NaCl+ZnONP	0.374±0.02	0.548±0.06	0.916±0.02	1.622±0.05	2.438±0.04	3.030±0.02
	NaCl+SA+ZnONP	0.197±0.06	0.390±0.04	0.727±0.02	1.215±0.03	1.877±0.06	2.442±0.06
Pozitif Kontroller		2 µg/mL	5 µg/mL	10 µg/mL	20 µg/mL	40 µg/mL	50 µg/mL
	AA	0.256±0.02	0.517±0.01	0.915±0.01	1.742±0.03	2.743±0.02	3.382±0.03
		1 µg/mL	3 µg/mL	6 µg/mL	9 µg/mL	12 µg/mL	15 µg/mL
	BHT	0.405±0.03	0.824±0.03	1.452±0.02	1.975±0.01	2.559±0.03	3.174±0.01
		10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL	200 µg/mL
	BHA	0.314±0.01	0.571±0.02	0.959±0.05	1.458±0.03	2.120±0.06	2.839±0.02

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama ± standart sapması olarak verilmiştir.

Bitki ekstrelerinin $A_{0.5}$ değerleri incelendiğinde en yüksek aktivite değeri NaCl+ZnONP ($A_{0.5}=20.46\pm0.37$ µg/mL) uygulamasında, en düşük aktivite değeri

kontrol ($A_{0.5}=74.20\pm0.35$ $\mu\text{g/mL}$ grubunda gözlenmiştir. Pozitif kontroller arasında en yüksek aktivite değeri BHT’de ($A_{0.5}=1.36\pm0.04$ $\mu\text{g/mL}$) ölçülmüştür. Ekstreler ile pozitif kontrollerin $A_{0.5}$ değerleri karşılaştırıldığında pozitif kontrollerin genel olarak ekstrelerden daha yüksek aktivite gösterdiği ancak, NaCl+ZnONP ekstresinin aktivite değerinin istatistiksel olarak BHA’ya benzerlik gösterdiği gözlenmiştir. Pozitif kontroller ve bitki ekstrelerinin $A_{0.5}$ sonuçları birlikte değerlendirildiğinde aktivite sıralamasının BHT>AA> NaCl+ZnONP =BHA>NaCl+SA>NaCl+SA+ZnONP>NaCl> Kontrol şeklinde olduğu görülmüştür (Çizelge 4.10).

Çizelge 4.10. Bitki ekstrelerinin CUPRAC aktivitesine ait $A_{0.5}$ değerleri

Uygulamalar	$A_{0.5}$ ($\mu\text{g/mL}$)
Kontrol	74.20 ± 0.35^a
NaCl	38.33 ± 0.53^b
NaCl+SA	30.70 ± 0.24^d
NaCl+ZnONP	20.46 ± 0.37^e
NaCl+SA+ZnONP	34.70 ± 0.28^c
Pozitif Kontroller	
AA	4.06 ± 0.05^f
BHT	1.36 ± 0.04^g
BHA	20.89 ± 0.09^e

*Değerler üç paralel ölçümün ortalama $\pm$ standart sapması olarak verilmiştir.

*Aynı sütundaki farklı harfler ortalamalar arasındaki farkın önemli olduğunu göstermektedir ($p\leq0.05$)

Bitkiler, maruz kaldıkları stres etkileriyle başa çıkmalarına yardımcı olan çeşitli potansiyel mekanizmalara sahip olsa da bazen bu mekanizmalar yetersiz kalabilir ve stresle başa çıkamayarak bitki hücrelerinin ölümüne neden olabilir. Bu nedenle araştırmacılar, bitkilerin stres koşullarıyla başa çıkabilmeleri ve strese karşı tolerans seviyelerini geliştirmek için sürekli olarak farklı stratejiler geliştirmektedirler. Bu stratejilerden biri olan elisitör uygulamaları, fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler yanıtları uyarabilen çeşitli kaynaklardan gelen kimyasal veya biyo-faktörler olarak tanımlanmaktadır (Thakur ve Sohal, 2013). Elisitörler, çok sayıda kimyasal sınıfa ait olan, sekonder metabolitlerin biyosentezini uyarabilen veya geliştirebilen, sinyal iletiminin yanı sıra çevresel stresin hafifletilmesi, bitkilerin hayatta kalması ve üretkenliği üzerinde önemli etkilere sahip olan bileşiklerdir (Jan ve ark., 2021; Jeyasri ve ark., 2023). Literatürdeki tespitlerden yola çıkılarak yapılan bu çalışmada, tuz stresine maruz kalan *Salvia virgata* bitkisine eksojen SA ve ZnONP uygulamalarının,

bitkinin fizyolojik, biyokimyasal ve antioksidan cevapları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir.

Klorofil, bitki fotosentezinde önemli bir pigment molekülü olup, bitki büyümesi ve gelişmesi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Tuz stresi altında klorofil içeriğindeki azalma yaygın olarak bildirilen bir olgudur ve çeşitli çalışmalarda klorofil konsantrasyonu, hücresel metabolik durumun hassas bir göstergesi olarak kullanılmıştır (Chutipaijit ve ark., 2011). Tuz stresi, bitkilerde fotosentetik pigmentleri bozarak kloroz, nekroz ve erken yaşlanmanın yanı sıra nihayetinde bitki büyümesini yavaşlatan diğer birçok önemli değişikliğe neden olur (Ahmad ve ark., 2019). Araştırmamızda tuz stresi uygulamasının klorofil a, klorofil b ve karotenoid miktarında azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Tuz stresi ile birlikte uygulanan SA, ZnONP, SA+ZnONP elisitörleri her üç pigment miktarını artırırken, en yüksek artışın SA+ZnONP uygulamasında olduğu tespit edilmiştir. Ajovan kimyonu bitkisinde tuz stresinde azalan klorofil a-b içeriğinin SA + nano-Fe₂O₃ uygulamaları sonucu arttığı (Abdoli ve ark., 2020), *Salvia officinalis*'de tuz ile azalan pigment içeriğinin eksojen SA uygulamasıyla artış gösterdiği (Es-sbihi ve ark., 2021) ve buğday bitkisinin tuz ile azalan klorofil a, klorofil b, karotenoid içeriklerinin SA uygulamasıyla arttığı bildirilmiştir (Talaat ve Hanafy, 2022). Tuz stresi altındaki yapraklarda klorofilin öncüsü olan aminolevulinik asit (ALA) içeriğinin azaldığı (Santos, 2004), klorofilaz ve feoforbil monooksijenaz gibi klorofil degradasyonunda rol oynayan enzimlerin arttığı (Zhu ve ark., 2019) bildirilmiştir. Ayrıca, tuz stresinin neden olduğu oksidatif hasarlar klorofil bozulmasını hızlandırırken, fotosentezde yer alan anahtar enzimlerin aktivitelerini azaltır (Al-Hinai ve ark., 2022). Araştırmamızda, tuz stresi altında klorofil içeriğindeki azalmanın, klorofil degradasyonundaki artışa veya klorofil sentezindeki azalmaya bağlı olabileceği düşünülmektedir. Karotenoidler, bitkilerin fotooksidatif süreçlere karşı korunmasında önemli rol oynayan pigmentler olup, ¹O₂ ve peroksil radikallerini temizleyen etkili antioksidanlardır. Karotenoidlerin, lipofilik olmaları ve peroksil radikallerini yakalamaya yönelik spesifik özelliklerinden dolayı, hücre zarlarının ve lipoproteinlerin oksidatif hasara karşı korunmasında önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Stahl ve Sies, 2003). Ayrıca, β-karoten, likopen veya lutein gibi karotenoidler, ¹O₂'nin fazla enerjisini tüketen ve onu ısı olarak dağıtarak, karotenoidin antioksidan olarak geri dönüşümünü sağlayan tekli oksijen söndürücüler olarak işlev görür. Böylece, karotenoidler oksidatif stresin etkilerini azaltarak hücresel hasarı önlemeye yardımcı olurlar (Amarowicz ve Pegg, 2019). Araştırmamızda, elisitör uygulamalarıyla birlikte

membran hasarının göstergesi olan MDA içeriği azalırken, karotenoid miktarının arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, artan karotenoid içeriğinin peroksil radikallerini temizleyerek membran hasarını azalttığını göstermektedir. Aynı zamanda, elisitör uygulamalarıyla birlikte klorofil a ve b ile karotenoid içeriğindeki benzer artış, karotenoidin fotosistemleri ışığın zararlı etkilerinden koruyarak klorofil a ve b içeriğinde artışa neden olduğunu düşündürmektedir.

Bitkiler, tuzluluğun neden olduğu ozmotik stresin üstesinden gelmek için prolin gibi metabolik olarak uyumlu çözünen maddeleri sentezler ve biriktirir. Bu ozmolitlerin birikimi, turgor basıncını korumak üzere doku su potansiyelinin ayarlanmasında önemli rol oynarken (Farooq ve ark., 2015), ayrıca antioksidan görevi görerek hücre altı yapıları stabilize etmeye yardımcı olur (Al-Hinai ve ark., 2022). Tuz stresi altında prolin içeriği değişimlerine ilişkin elde ettiğimiz bulgulara göre, tuz uygulaması sonucu artan prolin içeriği SA, ZnONP, SA+ZnONP uygulamalarıyla daha fazla artmıştır. En düşük prolin miktarı 2.293 ± 0.13 ile kontrol grubunda, en yüksek prolin miktarı 4.128 ± 0.18 ile NaCl+SA+ZnONP uygulamasında görülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlar, tuz stresine maruz bırakılmış *Salvia nemorosa* (Sharifi ve Bidabadi, 2020), *Salvia leriifolia* (Dashti ve ark., 2022), *Ocimum bacilicum* (Jadczak ve ark., 2022) bitkilerinde gözlenen prolin artış verileriyle uyumludur. Bununla birlikte tuz stresi ile birlikte uygulanan ZnONP'nin *Salvia leriifolia*'da prolin içeriğini artırdığı (Dashti ve ark., 2022), tuz stresi altında yetiştirilen *Mentha pulegium*'da artan prolin içeriğinin eksojen SA uygulamasıyla daha fazla artış gösterdiğini (Farhadi ve Ghassemi-Golezani, 2020) bildiren çalışmalar sonuçlarımızla paralellik göstermektedir. Prolin gibi ozmoprotektanlar, tuz stresi toleransı için önemli moleküller olup reaktif oksijen türlerini temizleyebilir, proteinleri ve zarları stabilize edebilir (Singh ve ark., 2019). Literatürdeki bu veriler dikkate alındığında, araştırmamızda toplam antioksidan kapasitenin artmasında ve MDA içeriğinin azalmasında prolin içeriğindeki artışın katkısının olduğu söylenebilir.

Bitkilerin çeşitli stres faktörlerine maruz kalması sonucunda artan ROT seviyesi, hücre zarlarında lipid peroksidasyonuna neden olur ve bunun sonucunda zar yapısında bozulmalar meydana gelir. Lipid peroksidasyonu son ürünlerden biri olan MDA, fosfolipidlerdeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyon seviyesini gösteren önemli bir bileşiktir (Alché, 2019). Araştırmamızda MDA içeriklerindeki değişimler incelendiğinde, tuz stresi ve tuzla birlikte tüm elisitör uygulamalarında MDA miktarı kontrol bitkisine göre artış göstermiştir. Bununla birlikte tuz stresi uygulamasıyla artan MDA miktarı, SA, ZnONP, SA+ZnONP uygulamaları sonucunda azalmış ve en fazla

azalma NaCl+SA+ZnONP uygulamasında görülmüştür. Tuz stresi uygulanan çeltik (Orcan ve ark., 2019), nohut (Mushtaq ve ark., 2022), çeltik (Alshiekheid ve ark., 2023), *Salvia virgata* (Khosrojerdi ve ark., 2023) bitkilerinde lipid peroksidasyonu sonucu MDA birikiminin gerçekleştiğini gösteren çalışmalar ile araştırma bulgularımız örtüşmektedir. Tuz stresine maruz bırakılan turp bitkisinde eksojen SA uygulamasının MDA miktarını azalttığı (Mahdavian, 2023), tuz stresi altında yetiştirilen ve Fe₂O₃ nanopartikül uygulanan *Mentha piperita*'da lipid peroksidasyon seviyesinde azalma olduğu (Askary ve ark., 2017), tuz stresi altındaki *Trachyspermum ammi* bitkisinde artan MDA miktarının, uygulanan nano-Fe₂O₃ ve SA ile azaldığı ve özellikle SA + nano-Fe₂O₃ uygulamasının daha etkili olduğunu bildiren (Abdoli ve ark., 2020) araştırmalar, sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. SA'nın eksojen uygulaması OsWRKY45 geninin ifadesini artırarak endojen SA içeriğini artırmış ve stres altında *Oryza sativa*'daki H₂O₂ içeriğini azaltarak membran hasarını önlemiştir (Chao ve ark., 2010). NP'ler, bitkilerde nitrik oksit (NO) sentezinden sorumlu olan nitrat redüktaz aktivitesini (Shahrokh ve ark., 2014) artırabilir ve NO daha sonra ROT'u temizleyen ve lipid peroksidasyonu önleyen antioksidan genlerin ekspresyonunu uyarabilir (Chen ve ark., 2015; Abdoli ve ark., 2020). Lipid peroksidasyon reaksiyonlarındaki artışın ROT ile ilişkili olduğu düşünüldüğünde, araştırmamızda SA ve NP uygulamalarının lipid peroksidasyon seviyesini azaltması, ROT'u temizleyen çeşitli antioksidan genlerin aktive edilmesiyle olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, araştırmamızda toplam fenolik ve toplam flavonoid gibi enzimatik olmayan antioksidanların içeriğindeki artışla MDA içeriğindeki azalma ters korelasyon göstermiştir. Fenolik ve flavonoid içeriğindeki artışın ROT seviyelerini azaltabileceği ve bunun lipid peroksidasyon hasarını azaltmada katkısı olabileceği düşünülmektedir.

Bitkiler, biyolojik aktiviteye sahip olan ve biyoaktif bileşikler olarak adlandırılan fitokimyasal içerirler. Biyoaktif bileşikler arasında önemli bir yere sahip olan fenolik ve flavonoidler, bitkilerde birçok biyolojik süreçte, antioksidan aktivitede ve çevresel faktörlere verilen tepkilerde önemli roller oynar (Williamson ve ark., 2018). Farklı stres faktörlerine ve ölümcül maddelere maruz kalan bitkilerde üretimleri yüksek olduğu için, fenoller aynı zamanda stres göstergeleri olarak da işlev görürler (Verma ve Shukla, 2015). Araştırmamızda, sadece tuz stresi ve tuzla birlikte SA, ZnONP, SA+ZnONP uygulamalarının toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğini kontrol grubuna göre artırdığı görülmüştür. Bununla birlikte elisitör uygulamalarının fenolik ve flavonoid içeriğini sadece tuz stresi uygulanan gruba göre daha fazla artırdığı tespit

edilmiştir. Tuz stresinin *Salvia mirzayanii*'de (Valifard ve ark., 2014) toplam fenolik içeriği, *Salvia lavandulifolia*'da toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği (Bayat ve ark., 2022). *Amaranthus lividus*'ta (Hossain ve ark., 2022) toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriği artırdığı bildirilmiştir. Tuzluluk stresi altında yetiştirilen bitkilerdeki toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriğindeki artış, araştırma sonuçlarımızla uyumludur. Tuzluluk stresi altında yetiştirilen *Dracocephalum moldavica* bitkisine demiroksit nanopartiküllerinin uygulandığı çalışmada, tuz stresıyla artan fenolik ve flavonoid içeriğinin NP uygulamasıyla daha fazla arttığını (Moradbeygi ve ark., 2020), NaCl stresine maruz bırakılan *Vicia faba* bitkisinde, tuzlulukla birlikte toplam fenolik içeriğin SA uygulamasıyla daha fazla arttığını (Anaya ve ark., 2017) bildiren literatür verileri araştırma sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir. Polifenollerin çoklu fenolik hidroksil grupları, aktif hidrojen sağlayabilir ve reaktif oksijen serbest radikallerini doğrudan temizleyebilir (Cazzola ve ark., 2016). Bazı bitki ekstrelerinin toplam fenolik içeriği ile antioksidan aktivitesi arasında pozitif korelasyon olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (Shao ve ark., 2018; Jahani ve ark., 2021; Bayat ve ark., 2022). Bu raporlar araştırmamızda elde ettiğimiz fenolik içeriklerle antioksidan aktiviteler arasındaki korelasyon ilişkisini destekler niteliktedir.

Bitkide normal şartlar altında sürekli oluşan ROT'lar, antioksidan savunma sistemi tarafından dengede tutulmaktadır. Farklı abiyotik stres faktörleri, ROT'ların aşırı üretimine neden olarak ROT ile antioksidan kapasite arasındaki dengeyi bozar ve bunun sonucunda oksidatif strese yol açar. ROT'un detoksifikasyonu ve üretimi arasındaki denge, çevresel stresler altında hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur (Hasanuzzaman ve ark., 2019). Araştırmamızda toplam antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla DPPH, ABTS ve CUPRAC olmak üzere 3 farklı yöntem kullanılmış olup, kullanılan yöntemlerin sonuçları birbiriyle benzerlik göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre tüm uygulama grupları kontrol grubuna göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir. Ayrıca, tüm ekstreler arasında en yüksek aktivite NaCl+ZnONP uygulamasında görülürken, en düşük antioksidan aktivite kontrol grubunda gözlenmiştir. Üç yöntemin antioksidan aktivite sıralamasının benzerlik gösterdiği ve NaCl+ZnONP > NaCl+SA > NaCl+SA+ZnONP > NaCl > Kontrol şeklinde olduğu belirlenmiştir. Tuz stresine maruz bırakılan *Salvia mirzayanii*'de toplam fenolik içerik ve DPPH radikali süpürme aktivitesinin arttığı (Valifard ve ark., 2014), tuzluluk stresi altında yetiştirilen *Carthamus tinctorius* bitkisinde toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve DPPH

aktivitesinin tuzluluk stresi sonucu önemli ölçüde arttığı; tuzla birlikte uygulanan eksojen SA'nın her üç parametrede daha fazla artışa neden olduğu (Golkar ve ark., 2019), tuz stresi altında yetiştirilen ve ZnONP uygulanan *Camelina sativa*'da toplam fenolik, karotenoid ve DPPH radikalini temizleme yeteneğinin önemli ölçüde arttığı (Hezaveh ve ark., 2020b), kuraklık stresine maruz bırakılan *Mentha piperita*'da toplam fenolik içerik, toplam flavonoid içerik ve DPPH süpürme aktivitesinde kontrole göre artış görüldüğü; tuzla birlikte eksojen SA uygulamasının her üç parametrede daha fazla artışa neden olduğunu (Jahani ve ark., 2021) bildiren literatür verileri araştırma sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir.

Oksidatif stres durumundaki bitkiler, enzimatik ve enzimatik olmayan (askorbik asit, indirgenmiş glutatyon, fenolik asitler; alkaloidler, flavonoidler, karotenoidler, a-tokoferol; protein olmayan amino asitler vb.) antioksidanlarla ROT'ları temizleyerek oksidan-antioksidan dengeyi korumaya çalışırlar (Kaur ve ark., 2019). Araştırma sonuçlarımızda enzimatik olmayan antioksidan bileşiklerden fenolik, flavonoid ve karotenoid içeriği, elisitör uygulamalarında genel olarak artış göstermiş olup bu bileşiklerde meydana gelen artışın toplam antioksidan aktiviteye yansıdığı görülmektedir. Eksojen olarak uygulanan elisitörlerin, antioksidan enzimatik tepkileri indükleyerek, kimyasalların bileşimini, gen ekspresyonunu ve bitki sekonder metabolitlerinin biyoaktivitesini değiştirerek stres etkilerini hafiflettiği belgelenmiştir (El-Esawi ve ark., 2017).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Araştırmamızdan elde edilen veriler genel olarak değerlendirildiğinde elde edilen sonuçlar şu şekilde sıralanabilir:

- Tuz stresi uygulamasının klorofil a, klorofil b ve karotenoid içeriğinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir. Tuz stresi ile birlikte uygulanan SA, ZnONP, SA+ZnONP elisitörleri, tuzluluğun neden olduğu azalmaya iyileştirici yönde etki yaparak, klorofil a ve b ile karotenoid içeriğinde artışa neden olmuştur. Her üç pigment içinde en yüksek değer **NaCl+SA+ZnONP** uygulamasında görülmüştür.
- Tüm uygulama gruplarının kontrol grubuna göre prolin içeriğini artırdığı gözlenmiştir. Tuz stresi uygulaması sonucunda artış gösteren prolin içeriği, elisitör uygulamalarıyla daha fazla artış göstermiştir. En düşük prolin içeriği kontrol grubunda, en yüksek prolin içeriği **NaCl+SA+ZnONP** uygulamasında görülmüştür.
- Tuz stresi ve tuzla birlikte tüm elisitör uygulamaları, MDA içeriğini kontrol grubuna göre artırmış ve en yüksek artışın NaCl uygulamasında olduğu gözlenmiştir. Elisitör uygulamaları sonucundaki MDA içeriğinin, kontrol grubuna göre yüksek olsa da sadece tuz uygulanan bitkilerden daha düşük olması, elisitörlerin iyileştirici etki yaparak membran hasarını azalttığını göstermektedir. Tuz stresine göre en fazla azalma oranı **NaCl+SA+ZnONP** uygulamasında tespit edilmiştir.
- Toplam fenolik ve toplam flavonoid içerik birlikte değerlendirildiğinde, tuz stresi ve tuzla birlikte uygulanan SA, ZnONP, SA+ZnONP'nin her iki bileşenin içeriğini kontrol grubuna göre artırdığı belirlenmiştir. Ayrıca, tüm elisitör uygulamalarının fenolik ve flavonoid içeriği sadece tuz stresi uygulanan gruba göre daha fazla artırdığı tespit edilmiştir. En yüksek toplam fenolik ve toplam flavonoid içerik **NaCl+ZnONP** uygulamasında gözlenmiştir.
- Toplam antioksidan aktiviteyi belirlemek amacıyla kullanılan DPPH, ABTS ve CUPRAC yöntemlerinden elde edilen sonuçlar benzerlik göstermiştir. Tuz stresi ve tuzla birlikte tüm elisitör uygulamaları, antioksidan aktiviteyi kontrol grubuna göre arttırmıştır. Üç yöntemin antioksidan aktivite sıralamasının

benzerlik gösterdiği ve **NaCl+ZnONP** > NaCl+SA > NaCl+SA+ZnONP > NaCl > Kontrol şeklinde olduğu belirlenmiştir.

- Prolin, MDA ve fotosentetik pigment içeriklerinde **NaCl+SA+ZnONP** elisitör uygulaması daha etkili olurken, toplam fenolik ve toplam flavonoid içerik ile toplam antioksidan aktivitede **NaCl+ZnONP** elisitör uygulamasının daha etkili olduğu tespit edilmiştir.
- Tüm parametreler birlikte değerlendirildiğinde, karotenoid içeriğindeki artışın klorofil pigmentlerini koruyucu etki yaparak, klorofil a ve b içeriğinde artışa neden olduğu; prolin içeriğindeki artışın bitkileri ozmotik strese karşı koruduğu; karotenoid artışının peroksil radikallerini temizleyerek MDA içeriğinde azalmaya neden olduğu; toplam fenolik, toplam flavonoid ve karotenoid içeriğindeki artışın toplam antioksidan aktiviteye yansıdığı ve DPPH, ABTS, CUPRAC yöntemlerinden elde edilen sonuçlarla örtüştüğü, antioksidan aktivitedeki artışın artan pigment, artan prolin ve azalan MDA içeriğiyle uyumlu olduğu sonuçlarına varılabilir.

5.2. Öneriler

Bitkilerin abiyotik stres toleransını iyileştirme arayışında, umut verici birçok teknik araştırılmaktadır. Strese maruz kalan bitkilerde elisitör (salisilik asit, jasmonik asit, etilen, kitin, nitrik oksit, nanopartiküller vs.) kullanımı, bitkilerin stres faktörlerine karşı savunma tepkilerini aktive ederek dirençlerini artırmayı amaçlayan bir stratejidir. Stres koşullarında bitki performansını olumlu yönde etkileyebilen yöntemlerden biri olan nanopartiküller, bitkilerin stresle başa çıkmasına yardımcı olabilecek çeşitli mekanizmalara sahiptir. Bunlar arasında bitki büyüme ve gelişimini teşvik etme, fotosentetik aktiviteyi artırma, antioksidan savunmayı güçlendirme gibi etkiler bulunur. Salisilatlar (toplu olarak salisilatlar olarak adlandırılan salisilik asit ve türevleri), bir stresle karşılaşıldıktan sonra bitki savunma genlerini aktive eden bitki tarafından üretilen sinyaller olarak adlandırılır. Stres altındaki bitkilerde elisitör olarak SA uygulaması, bitkilerin savunma mekanizmalarını, fitopatojen direncini, biyotik ve abiyotik streslere karşı toleransını, antioksidan aktivitelerini, fitoaleksin üretimini ve gen ifadesini etkileyebilir. SA ve NP uygulamaları, tuz stresi altındaki bitkilerde stres etkilerini azaltma potansiyeline sahip olabilir ancak, etkileri bitki türüne, stres koşullarına, uygulama yöntemine, konsantrasyon ve uygulama sıklığına bağlı olarak

değişebilir. Bu nedenle, SA ve NP tabanlı stres yönetimi stratejileri üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Araştırmamızda prolin, MDA ve fotosentetik pigment içeriklerinde NaCl+SA+ZnONP elisitör uygulamasının daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, SA ve ZnONP gibi elisitörlerin sinerjik etki gösterebildiğini ve farklı elisitör kombinasyonlarının sinerjik etkilerinin araştırılmasının potansiyel bir değerlendirme alanı olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, gelecekteki araştırmalar için önemli bir temel oluşturmaktadır. Farklı elisitörlerin bir araya getirilmesiyle oluşabilecek sinerjik etkilerin incelenmesi, bitkilerin stres toleransını artırmak ve sekonder metabolit üretimini optimize etmek için daha etkili stratejilerin geliştirilmesini sağlayabilir.

Elisitörlerin stresin etkisini azaltmadaki rolünün yanı sıra bitki sekonder metabolit sentezini artırmak için de kullanıldığı bilinmektedir. Elisitörler bitkilerde savunma tepkilerini uyarmak suretiyle bitkilerin sekonder metabolitler üretmesine ve bir dizi biyokimyasal reaksiyonu başlatmasına katkıda bulunurlar. Araştırmamızda kullanılan SA ve ZnONP ile ilgili literatürde çok sayıda araştırma bulunmasına karşın, bu elisitörlerin stres hasarını azaltma ve sekonder metabolit üretimine olan etkilerinin birlikte değerlendirilmesine yönelik araştırmaların oldukça sınırlı kaldığı görülmektedir. Aynı zamanda *Salvia virgata* bitkisinde SA ve ZnONP'nin tuz stresi ile birlikte ayrı ayrı ve birlikte potansiyel sinerjik etkisinin araştırıldığı çalışmalara rastlanmamıştır. Literatürde genellikle belirli bir stres çeşidi altında yetişen bitkilere, tek bir elisitörün uygulandığı araştırmaların daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte araştırmacılar, genellikle ya sekonder metabolit üretimini inceleyerek ya da stresin etkisini azaltmaya yönelik parametreleri değerlendirerek araştırmalar yapmaktadırlar. Bu nedenle, araştırmamızda SA ve ZnONP'nin hem stres hasarını azaltmadaki etkilerini hem de sekonder metabolit (fenolik, flavonoid, karotenoid) üretimine olan etkilerini birlikte değerlendiren bir yaklaşımı benimsemek, mevcut literatüre katkı sağlayacaktır. SA ve ZnONP'nin stresin etkisini azaltma ve sekonder metabolit üretimini artırmada nasıl etkileşim gösterdiğini anlamak, bitki stres toleransını artırmak ve bitki sağlığını iyileştirmek için potansiyel stratejiler geliştirmek açısından değerli olabilir.

KAYNAKLAR

- Abdalla, H., Adarosy, M.H., Hegazy, H.S., Abdelhameed, R.E. 2022, Potential of green synthesized titanium dioxide nanoparticles for enhancing seedling emergence, vigor and tolerance indices and DPPH free radical scavenging in two varieties of soybean under salinity stress, *BMC Plant Biology*, 22(1), 1-18.
- Abdoli, S., Ghassemi-Golezani, K., Alizadeh-Salteh, S. 2020, Responses of ajowan (*Trachyspermum ammi* L.) to exogenous salicylic acid and iron oxide nanoparticles under salt stress, *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 36939-36953.
- Abobatta, W.F. 2018, Nanotechnology application in agriculture, *Acta Scientific Agriculture*, 2(6), 99-102.
- Acosta-Motos, J.R., Ortuño, M.F., Álvarez, S., López-Climent, M.F., Gómez-Cadenas, A., Sánchez-Blanco, M.J. 2016, Changes in growth, physiological parameters and the hormonal status of *Myrtus communis* L. plants irrigated with water with different chemical compositions, *Journal of plant physiology*, 191, 12-21.
- Acosta-Motos, J.R., Ortuño, M.F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez-Blanco, M.J., Hernandez, J.A. 2017, Plant responses to salt stress: adaptive mechanisms, *Agronomy*, 7(1), 18.
- Aghajanzadeh-Gheshlaghi, S., Peyvandi, M., Ahmad, M.A.J.D., Abbaspour, H. 2021, Alterations in leaf anatomy, quality, and quantity of flavonols and photosynthetic pigments in *Nigella sativa* L. subjected to drought and salinity stresses, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 49(3), 12398-12398.
- Ahmad, R., Hussain, S., Anjum, M.A., Khalid, M.F., Saqib, M., Zakir, I., Ahmad, S. 2019, Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in plants under salt stress, Hasanuzzaman, M., Hakeem, K.R., Nahar, K., Alharby, H.F. (Edt.), *Plant Abiotic Stress Tolerance*, Springer, Cham, Switzerland, 191-205.
- Ahmed, S.A., Baig, M.M.V. 2014, Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), 499-504.
- Akkol, E.K., Göger, F., Koşar, M., Başer, K.H.C. 2008, Phenolic composition and biological activities of *Salvia halophila* and *Salvia virgata* from Turkey, *Food Chem.*, 108, 942-949.
- Akula, R., Ravishankar, G.A. 2011, Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants, *Plant Signaling & Behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Al-Hinai, M.S., Ullah, A., Al-Rajhi, R.S., Farooq, M. 2022, Proline accumulation, ion homeostasis and antioxidant defence system alleviate salt stress and protect carbon assimilation in bread wheat genotypes of Omani origin, *Environmental and Experimental Botany*, 193, 104687.
- Alabdallah, N.M., Alzahrani, H.S. 2020, The potential mitigation effect of ZnO nanoparticles on [*Abelmoschus esculentus* L. Moench] metabolism under salt stress conditions, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 3132-3137.
- Alché, J.D. 2019, A concise appraisal of lipid oxidation and lipoxidation in higher plants, *Redox biology*, 23, 101136.
- Alenezi, N.A., Al-Qurainy, F., Tarroum, M., Nadeem, M., Khan, S., Salih, A.M., Alansi, S. 2022, Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs), biosynthesis, characterization and evaluation of their impact to improve shoot growth and to reduce salt toxicity on *Salvia officinalis* in vitro cultivated, *Processes*, 10(7), 1273.

- Ali, B. 2017, Salicylic acid induced antioxidant system enhances the tolerance to aluminium in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) plants, *Indian Journal of Plant Physiology*, 22, 178-189.
- Alizadeh, A. 2013. Essential oil constituents, antioxidant and antimicrobial activities of *Salvia virgata* Jacq. from Iran, *J Essent Oil Bearing Plants*, 16, 172-182.
- Alshiekheid, M.A., Dwiningsih, Y., Alkahtani, J. 2023, Analysis of morphological, physiological, and biochemical traits of salt stress tolerance in asian rice cultivars at different stages, *Preprints.org*, 2023030251.
- Álvarez, S., Sánchez-Blanco, M.J. 2015, Comparison of individual and combined effects of salinity and deficit irrigation on physiological, nutritional and ornamental aspects of tolerance in *Callistemon laevis* plants. *Journal of Plant Physiology*, 185, 65-74.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B. 2019, Natural antioxidants of plant origin, *Adv Food Nutr Res.*, 90, 1-81,
- Anaya, F., Fghire, R., Wahbi, S., Loutfi, K. 2017, Antioxidant enzymes and physiological traits of *Vicia faba* L. as affected by salicylic acid under salt stress, *J Mater Environ Sci.*, 8(7), 2549-2563.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E. 2004, A novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols, vitamin C and E using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- Arnon, D.I. 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiology*, 24(1), 1-15.
- Ashraf, M., Harris, P.J.C. 2013, Photosynthesis under stressful environments: An overview, *Photosynthetica*, 51, 163-190.
- Ashraf, S.A., Siddiqui, A.J., Abd Elmoneim, O.E., Khan, M.I., Patel, M., Alreshidi, M., Moin, A., Singh, R., Snoussi, M., Adnan, M. 2021, Innovations in nanoscience for the sustainable development of food and agriculture with implications on health and environment, *Science of the Total Environment*, 768, 144990.
- Askary, M., Talebi, S.M., Amini, F., Bangan, A.D.B. 2017, Effects of iron nanoparticles on *Mentha piperita* L. under salinity stress, *Biologija*, 63(1).
- Askari, S.F., Avan, R., Tayarani-Najaran, Z., Sahebkar, A., Eghbali, S. 2021, Iranian *Salvia* species: a phytochemical and pharmacological update, *Phytochemistry*, 183, 112619.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973, Rapid determination of free proline for water stress studies, *Plant and Soil*, 39, 205-207.
- Bayar, Y., Yilar, M. 2019, The antifungal and phytotoxic effect of different plant extracts of *Salvia virgata* Jacq, *Fresenius Environ Bull.*, 28, 3492-3497.
- Bayat, H., Shafie, F., Shahraki, B. 2022, Salinity effects on growth, chlorophyll content, total phenols, and antioxidant activity in *Salvia lavandulifolia* Vahl, *Advances in Horticultural Science*, 36(2), 145-153.
- Baytop, T. 1999. Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present), *Publ Istanbul Univ.*, 312.
- Bekut, M., Brkić, S., Kladar, N., Dragović, G., Gavarić, N., Božin, B. 2018, Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy, *Pharmacological Research*, 133, 301-314.
- Bistgani, Z. E., Hashemi, M., DaCosta, M., Craker, L., Maggi, F., Morshedloo, M.R. 2019, Effect of salinity stress on the physiological characteristics, phenolic compounds and antioxidant activity of *Thymus vulgaris* L. and *Thymus daenensis* Celak, *Industrial Crops and Products*, 135, 311-320.

- Blois, M.S., 1958, Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181(4617), 1199-1200.
- Cai, Z., Kastell, A., Speiser, C., Smetanska, I. 2013, Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 330-340.
- Cazzola, M., Corazzari, I., Prenesti, E., Bertone, E., Vernè, E., Ferraris, S. 2016, Bioactive glass coupling with natural polyphenols: Surface modification, bioactivity and anti-oxidant ability, *Applied Surface Science*, 367, 237-248.
- Celep, F., Dirmenci, T. 2017, Systematic and biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey, *Natural Volatiles and Essential Oils*, 4(4), 14-27.
- Chao, Y.Y., Chen, C.Y., Huang, W.D., Kao, C.H. 2010, Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves, *Plant and Soil*, 329, 327-337.
- Chen, J., Liu, X., Wang, C., Yin, S.S., Li, X.L., Hu, W.J., Simon, M., Shen, Z.J., Xiao, Q., Chu, C.C., Peng, X., Zheng, H.L. 2015, Nitric oxide ameliorates zinc oxide nanoparticles-induced phytotoxicity in rice seedlings. *Journal of hazardous materials*, 297, 173-182.
- Cheeseman, J.M. 2013, The integration of activity in saline environments: Problems and perspectives, *Funct. Plant Biol.*, 40, 759-774.
- 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.
- Chutipaijit, S., Cha-um, S., Sompornpailin, K. 2011, High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp.indica, *Australian Journal of Crop Science*, 5(10), 1191-1198.
- Cirillo, C., Roupahel, Y., Caputo, R., Raimondi, G., Sifola, M. I., De Pascale, S. 2016, Effects of high salinity and the exogenous application of an osmolyte on growth, photosynthesis, and mineral composition in two ornamental shrubs, *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 91(1), 14-22.
- Das, K., Roychoudhury, A. 2014, Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants, *Frontiers in environmental science*, 2, 53.
- Dashti, M., Akhondi, M., Niakan, M., Akharat, H.M., 2022, Effects of foliar application of nano-ZnO on morpho-physiological characteristics and ionic content of *Salvia leriifolia* Benth. under salinity stress, *Journal of Medicinal plants and By-products*, 11(2), 159-169.
- Dempsey, D.M.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C., Klessig, D.F. 2011, Salicylic acid biosynthesis and metabolism, *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.
- Dhar, M.K., Mishra, S., Bhat, A., Chib, S., Kaul, S. 2020, Plant carotenoid cleavage oxygenases: structure–function relationships and role in development and metabolism, *Briefings in Functional Genomics*, 19(1), 1-9.
- Dirmenci T., 2003, “Türkiye’ de Yetişen Nepeta L. (Lamiaceae) Türleri Üzerinde Taksonomik Araştırmalar”, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Balıkesir.
- Dowom, S.A., Abrishamchi, P., Radjabian, T., Salami, S.A. 2017, Enhanced phenolic acids production in regenerated shoot cultures of *Salvia virgata* Jacq. after elicitation with Ag⁺ ions, methyl jasmonate and yeast extract, *Industrial Crops and Products*, 103, 81-88.

- Duarte, B., Santos, D., Marques, J.C., Cašador, I. 2013, Ecophysiological adaptations of two halophytes to salt stress: photosynthesis, PS II photochemistry and antioxidant feedback-implications for resilience in climate change, *Plant Physiology and Biochemistry*, 67, 178-188.
- Ejtahed, R.S., Radjabian, T., Tafreshi, S.A.H. 2015, Expression analysis of phenylalanine ammonia lyase gene and rosmarinic acid production in *Salvia officinalis* and *Salvia virgata* shoots under salicylic acid elicitation, *Applied biochemistry and biotechnology*, 176, 1846-1858.
- El-Esawi, M.A., Elansary, H.O., El-Shanhorey, N.A., Abdel-Hamid, A.M., Ali, H.M., Elshikh, M.S. 2017, Salicylic acid-regulated antioxidant mechanisms and gene expression enhance rosemary performance under saline conditions, *Frontiers in Physiology*, 8, 716.
- Es-sbihi, F.Z., Hazzoumi, Z., Aasfar, A. Joutei, K.A. 2021, Improving salinity tolerance in *Salvia officinalis* L. by foliar application of salicylic acid, *Chem. Biol. Technol. Agric.*, 8, 25.
- Etesami, H., Fatemi, H., Rizwan, M. 2021, Interactions of nanoparticles and salinity stress at physiological, biochemical and molecular levels in plants: A review, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 225, 112769.
- Exarchou, V., Kanetis, L., Charalambous, Z., Apers, S., Pieters, L., Gekas, V., Goulas, V., 2015, HPLC-SPE-NMR characterization of major metabolites in *Salvia fruticosa* Mill. extract with antifungal potential: relevance of carnosic acid, carnosol, and hispidulin, *J Agric Food Chem.*, 63(2), 457-463.
- Fan, S., Wu, H., Gong, H., Guo, J. 2022, The salicylic acid mediates selenium-induced tolerance to drought stress in tomato plants, *Scientia Horticulturae*, 300, 111092.
- Farooq, M. Hussain, M., Wakeel, A., Siddique K.H.M. 2015, Salt stress in maize effects resistance mechanisms and management: a review, *Agron. Sustain. Dev.*, 35, 461-481.
- Farhadi, N., Ghassemi-Golezani, K. 2020, Physiological changes of *Mentha pulegium* in response to exogenous salicylic acid under salinity, *Scientia Horticulturae*, 267, 109325.
- Fayez, K.A., Bazaid, S.A. 2014, Improving drought and salinity tolerance in barley by application of salicylic acid and potassium nitrate, *J Saudi Soc Agric Sci.*, 13, 45-55.
- Fedoroff, N.V., Battisti, D.S., Beachy, R.N., Cooper, P.J., Fischhoff, D.A., Hodges, C.N., Knauf V.C., Lobell, D., Mazur, B.J., Molden, D., Reynolds, M.P., Ronald, B., Rosegrant, M.W., Sanchez, P.A., Vonshak, A., Zhu, J.K. 2010, Radically rethinking agriculture for the 21st century, *Science*, 327(5967), 833-834.
- Fotovvat, M., Radjabian, T., Saboora, A. 2018, HPLC fingerprint of important phenolic compounds in some *Salvia* L. species from Iran, *Records of Natural Products*, 13(1), 37-49.
- Ghoulam, C., Foursy, A., Fares, K. 2002, Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars, *Environmental and Experimental Botany*, 47(1), 39-50.
- Gohari, G., Safai, F., Panahirad, S., Akbari, A., Rasouli, F., Dadpour, M.R., Fotopoulos, V. 2020, Modified multiwall carbon nanotubes display either phytotoxic or growth promoting and stress protecting activity in *Ocimum basilicum* L. in a concentration-dependent manner, *Chemosphere*, 249, 126171.
- Gok, D. K., Hidisoglu, E., Ocak, G.A., Er, H., Acun, A.D., Yargıoglu, P. 2018, Protective role of rosmarinic acid on amyloid beta 42-induced echoic memory

- decline: Implication of oxidative stress and cholinergic impairment, *Neurochemistry International*, 118, 1-13.
- Golkar, P., Taghizadeh, M. Yousefian, Z. 2019, The effects of chitosan and salicylic acid on elicitation of secondary metabolites and antioxidant activity of safflower under in vitro salinity stress, *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 137, 575-585.
- González-García, Y., Cárdenas-Álvarez, C., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., Cabrera-de-la-Fuente, M., Sandoval-Rangel, A., Valdés-Reyna, J., Juárez-Maldonado, A. 2021, Effect of three nanoparticles (Se, Si and Cu) on the bioactive compounds of bell pepper fruits under saline stress, *Plants*, 10(2), 217.
- Greuter, W. 1982, International Code of Botanical Nomenclature, Koetz Scientific Books, 2640, Konigstein, Germany.
- Grzegorzczuk-Karolak, I., Kuźma, Ł., Lisiecki, P., Kiss, A. 2019, Accumulation of phenolic compounds in different in vitro cultures of *Salvia viridis* L. and their antioxidant and antimicrobial potential, *Phytochemistry Letters*, 30, 324-332.
- Grzeszczuk, M., Salachna, P., Meller, E. 2018, Changes in photosynthetic pigments, total phenolic content, and antioxidant activity of *Salvia coccinea* Buc'hoz Ex EtL. induced by exogenous salicylic acid and soil salinity, *Molecules*, 23(6), 1296.
- Guo, B., Liu, C., Li, H., Yi, K., Ding, N., Li, N., Lin, Y., Fu, Q. 2016, Endogenous salicylic acid is required for promoting cadmium tolerance of Arabidopsis by modulating glutathione metabolisms, *Journal of hazardous materials*, 316, 77-86.
- Guru, A., Dwivedi, P., Kaur, P., Pandey, D.K. 2022, Exploring the role of elicitors in enhancing medicinal values of plants under in vitro condition, *South African Journal of Botany*, 149, 1029-1043.
- Hasanuzzaman, M., Bhuyan, M.B., Anee, T.I., Parvin, K., Nahar, K., Mahmud, J.A., Fujita, M. 2019, Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress, *Antioxidants*, 8(9), 384.
- Hashemi, S.M., Naghavi, M.R. 2016, Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125, 31-41.
- Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A. 2010, Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review, *Environmental and experimental botany*, 68(1), 14-25.
- He, W., Li, H., Li, X., Li, M., Chen, Y. 2007, *Tetranychus urticae* Koch induced accumulation of salicylic acid in frijole leaves, *Pesticide biochemistry and physiology*, 88(1), 78-81.
- Hezaveh, T.A., Pourakbar, L., Rahmani, F., Alipour, H. 2020a, Effects of ZnO NPs on phenolic compounds of rapeseed seeds under salinity stress, *Journal of Plant Process and Function*, 8(34), 11-18.
- Hezaveh, T.A., Rahmani, F., Alipour, H., Pourakbar, L. 2020b, Effects of foliar application of ZnO nanoparticles on secondary metabolite and micro-elements of camelina (*Camelina sativa* L.) under salinity stress, *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, 16(4), 54-69.
- Hofmann, T., Lowry, G.V., Ghoshal, S., Tufenkji, N., Brambilla, D., Dutcher, J. R., Gilbertson, L.M., Giraldo, J.P., Kinsella, J.M., Landry, M.P., Lovell, W., Naccache, R., Paret, M., Pedersen, J.A., Unrine, J.M., White, J.C., Wilkinson, K. J. 2020, Technology readiness and overcoming barriers to sustainably implement nanotechnology-enabled plant agriculture, *Nature Food*, 1(7), 416-425.
- Hossain, M.N., Sarker, U., Raihan, M.S., Al-Huqail, A.A., Siddiqui, M.H., Oba, S. 2022, Influence of salinity stress on color parameters, leaf pigmentation,

- polyphenol and flavonoid contents, and antioxidant activity of *Amaranthus lividus* leafy vegetables, *Molecules*, 27(6), 1821.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.X., Yi, M., Zhao, Y. 2019, Mechanisms of ROS regulation of plant development and stress responses, *Frontiers in plant science*, 10, 800.
- Huang, M.Q., Zhou, C.J., Zhang, Y.P., Zhang, X.Q., Xu, W., Lin, J., Wang, P.J. 2016, Salvianolic acid B ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in db/db mice through the AMPK pathway, *Cellular Physiology and Biochemistry*, 40(5), 933-943.
- Hussain, S.J., Khan, N.A., Anjum, N.A., Mesud, A., Khan, M.I.R. 2021, Mechanistic elucidation of salicylic acid and sulphur-induced defence systems, nitrogen metabolism, photosynthetic, and growth potential of mungbean (*Vigna radiata*) under salt stress, *J Plant Growth Regul.*, 40, 1000-1016.
- Jadczak, D., Bojko, K., Kaymakanova, M., Berova, M. 2022, Salinity-induced changes in the antioxidant status of common basil plants (*Ocimum basilicum* L.) grown under controlled conditions, *Horticulturae*, 8(9), 775.
- Jahani, F., Tohidi-Moghadam, H.R., Larijani, H.R., Ghooshchi, F., Oveysi, M. 2021, Influence of zinc and salicylic acid foliar application on total chlorophyll, phenolic components, yield and essential oil composition of peppermint (*Mentha piperita* L.) under drought stress condition, *Arabian Journal of Geosciences*, 14, 1-12.
- Jain, C., Khatana, S., Vijayvergia, R. 2019, Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review, *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 10(2), 494-504.
- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, Kim, K.M. 2021, Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions, *Agronomy*, 11(5), 968.
- Jena, N.R. 2012, DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair, *J. Biosci.*, 37, 503-517.
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S.H., Ramesh, M. 2023, Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 153(3), 447-458.
- Joo, J.H., Bae, Y.S., Lee, J.S. 2001, Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism, *Plant physiology*, 126(3), 1055-1060.
- Kaltdorf, M., Naseem, M. 2013, How many salicylic acid receptors does a plant cell need?, *Science Signaling*, 6(279 jc3), 1-3.
- Kalteh, M., Alipour, Z.T., Ashraf, S., Aliabadi, M.M., Nosratabadi, A.F. 2018, Effect of silica nanoparticles on basil (*Ocimum basilicum*) under salinity stress, *Journal of Chemical Health Risks*, 4(3), 49-55.
- Katary, M.A., Abdelsayed, R., Alhashim, A., Abdelhasib, M., Elmarakby, A.A. 2019, Salvianolic acid B slows the progression of breast cancer cell growth via enhancement of apoptosis and reduction of oxidative stress, inflammation, and angiogenesis, *International journal of molecular sciences*, 20(22), 5653.
- Kaur, N., Kaur, J., Grewal, S.K., Singh, I. 2019, Effect of heat stress on antioxidative defense system and its amelioration by heat acclimation and salicylic acid pre-treatments in three pigeonpea genotypes, *Indian Journal of Agricultural Biochemistry*, 32(1), 106-110.

- Khosrojerdi, M., Moghaddam, M., Farhadi, N. 2023, Magnetic water irrigation changes physiological traits and stress tolerance of *Salvia virgata* under saline conditions, *Scientia Horticulturae*, 314, 111935.
- Kintzios, S.E. 2000, Sage: The genus *Salvia*, Taylor and Francis, Harwood Academic, Netherlands.
- Kolesnikov, S., Tsepina, N., Minnikova, T., Kazeev, K., Mandzhieva, S., Sushkova, S., Minkina, T., Mazarji, M., Singh, R.K., Rajput, V.D. 2021, Influence of silver nanoparticles on the biological indicators of haplic chernozem, *Plants*, 10(5), 1022.
- Latani, M.D., Bidgoli, R.D., Akhbari, M. 2019, *Salvia virgata* L. leaves extract: qualitative and quantitative phenolic compounds and antioxidant activity, *Arabian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 5(3), 78-89.
- Leicach, S.R., Chludil, H.D. 2014, Plant secondary metabolites: Structure–activity relationships in human health prevention and treatment of common diseases, *Studies in natural products chemistry*, 42, 267-304.
- Li, L.N. 1998, Biologically active components from traditional Chinese medicines, *Pure and Applied Chemistry*, 70(3), 547-554.
- Li, X., Guo, H., Qi, Y., Liu, H., Zhang, X., Ma, P., Liang, Z., Dong, J. 2016, Salicylic acid-induced cytosolic acidification increases the accumulation of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* cells, *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 126, 333-341.
- Li, X., Li, J., Islam, F., Najeeb, U., Pan, J., Hou, Z., Shou, J., Qin, Y., Xu, L. 2022, 5-Aminolevulinic acid could enhance the salinity tolerance by alleviating oxidative damages in *Salvia miltiorrhiza*, *Food Science and Technology*, 42, e103121.
- Liang, W., Ma, X., Wan, P., Liu, L. 2018, Plant salt-tolerance mechanism: A review, *Biochemical and biophysical research communications*, 495(1), 286-291.
- Liu, C., Mao, B., Yuan, D., Chu, C., Duan, M. 2022, Salt tolerance in rice: Physiological responses and molecular mechanisms, *The Crop Journal*, 10(1), 13-25.
- Lu, Y., Foo, L.Y. 2002, Polyphenolics of *Salvia*-a review, *Phytochemistry*, 59, 117-140.
- Lubbe, A., Verpoorte, R. 2011, Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials, *Industrial crops and products*, 34(1), 785-801.
- Mahajan, S., Pandey, G.K., Tuteja, N. 2008, Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway, *Arch Biochem Biophys.*, 471, 146-158.
- Mahdavian, K. 2023, Application of salicylic acid on chlorophyll, carotenoids, and proline in radish under salinity stress, *Proc. Natl. Acad. Sci., India, Sect. B: Biol. Sci.*, 79.
- Manaa, A., Gharbi, E., Mimouni, H., Wasti, S., Aschi-Smiti, S., Lutts, S., Ahmed, H.B. 2014, Simultaneous application of salicylic acid and calcium improves salt tolerance in two contrasting tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivars, *S Afr J Bot.*, 95, 32-39.
- Mansoor, S., Wani, O.A., Lone, J.K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., Ahmad, P. 2022, Reactive oxygen species in plants: from source to sink, *Antioxidants*, 11(2), 225.
- Marusig, D., Tombesi, S. 2020, Absciscic acid mediates drought and salt stress responses in *Vitis vinifera*-A review, *International Journal of Molecular Sci.*, 21(22), 8648.
- Marslin, G., Sheeba, C.J., Franklin, G. 2017, Nanoparticles alter secondary metabolism in plant via ROS burst, *Frontiers in plant science*, 8, 832.
- Miller, G.A.D., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S., Mittler, R. 2010, Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses, *Plant, cell & environment*, 33(4), 453-467.

- Mittler, R. 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
- Mohamed, A.K.S., Qayyum, M.F., Abdel-Hadi, A.M., Rehman, R.A., Ali, S., Rizwan, M. 2017, Interactive effect of salinity and silver nanoparticles on photosynthetic and biochemical parameters of wheat, *Archives of Agronomy and Soil Science*, 63(12), 1736-1747.
- Mohammadi, H., Pirmoradi, M.R., Moghaddam, M., Shamshiri, M.H., Mirzaabolghasemi, M.A. 2022, Effects of salicylic acid on physiological, biochemical, nutrient uptake, and essential oil percentage of *Ocimum basilicum* cv. Keshkeni luvellou under salinity stress, *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 38(3), 464-475.
- Moradbeygi, H., Jamei, R., Heidari, R., Darvishzadeh, R. 2020, Investigating the enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense by applying iron oxide nanoparticles in *Dracocephalum moldavica* L. plant under salinity stress, *Scientia Horticulturae*, 272, 109537.
- Moreno, C.E., 2000, Métodos para medir la biodiversidad, M&T-Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza, 84.
- Munns, R. 2005, Genes and salt tolerance: bringing them together, *New phytologist*, 167(3), 645-663.
- Munns, R., Tester, M. 2008, Mechanisms of salinity tolerance, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Mushtaq, Z., Faizan, S., Gulzar, B., Mushtaq, H., Bushra, S., Hussain, A., Hakeem, K.R. 2022, Changes in growth, photosynthetic pigments, cell viability, lipid peroxidation and antioxidant defense system in two varieties of chickpea (*Cicer arietinum* L.) subjected to salinity stress, *Phyton*, 91(1), 149.
- Nkomo, M., Gokul, A., Keyster, M., Klein, A. 2019, Exogenous p-coumaric acid improves *Salvia hispanica* L. seedling shoot growth, *Plants*, 8(12), 546.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. 1979, Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Orcan, P., Işıkan, Ç., Akbaş, F. 2019, Evaluation of salinity tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) using water potential, biomass, membran damage and osmoprotective compound, *Fresenius Environmental Bulletin*, 8(4A), 3313-3323.
- Orozco, M.F., Vázquez-Hernández, A., Fenton-Navarro, B. 2019, Active compounds of medicinal plants, mechanism for antioxidant and beneficial effects, *Phyton*, 88(1), 1.
- Park, H.J., Kim, W.Y., Yun, D.J. 2016, A new insight of salt stress signaling in plant, *Molecules and cells*, 39(6), 447.
- Pavlidou, V., Karpouhtsis, I., Franzios, G., Zambetaki, A., Scouras, Z., Mavragani-Tsipidou, P. 2004, Insecticidal and genotoxic effects of essential oils of Greek sage, *Salvia fruticosa*, and Mint, *Mentha pulegium*, on *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), *J Agric Urban Entomol.*, 21(1), 39-49.
- Pelegriño, M.T., Kohatsu, M.Y., Seabra, A.B., Monteiro, L.R., Gomes, D.G., Oliveira, H.C., Rolim, W.R., Jesus, T.A., Batista, B.L., Lange, C.N. 2020, Effects of copper oxide nanoparticles on growth of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings and possible implications of nitric oxide in their antioxidative defense, *Environmental Monitoring and Assessment*, 192, 1-14.
- Raja, V., Majeed, U., Kang, H., Andrabi, K.I., John, R. 2017, Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs, *Environmental and Experimental Botany*, 137, 142-157.

- Rajeshwari, V., Bhuvaneshwari, V. 2017, Salicylic acid induced salt stress tolerance in plants, *International Journal of Plant Biology and Research*, 5(3), 1067-1073.
- Rajput, V.D., Minkina, T., Kumari, A., Harish, Singh, V.K., Verma, K.K., Mandzhieva, S., Sushkova, S., Srivastava, S., Keswani, C. 2021, Coping with the challenges of abiotic stress in plants: New dimensions in the field application of nanoparticles, *Plants*, 10(6), 1221.
- Ranjan, A., Rajput, V.D., Minkina, T., Bauer, T., Chauhan, A., Jindal, T. 2021, Nanoparticles induced stress and toxicity in plants, *Environmental nanotechnology, monitoring & management*, 15, 100457.
- Ree, M., Bae, J. Y., Jung, J.H., Shin, T.J., 1999, A new copolymerization process leading to poly (propylene carbonate) with a highly enhanced yield from carbon dioxide and propylene oxide, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 37(12), 1863-1876.
- Rengasamy, P. 2006, World salinization with emphasis on Australia, *J. Exp. Bot.*, 57, 1017-1023.
- Rontein, D., Basset, G., Hanson, A.D. 2002, Metabolic engineering of osmoprotectant accumulation in plants, *Metabolic engineering*, 4(1), 49-56.
- Sahu, G.K. 2013, Salicylic acid: role in plant physiology and stress tolerance, Rout, G.R., Das, A.B. (Edt.), *Molecular stress physiology of plants*, Springer, India, 217-239.
- Saidi, I., Ayouni, M., Dhieb, A., Chtourou, Y., Chaïbi, W., Djebali, W. 2013, Oxidative damages induced by short-term exposure to cadmium in bean plants: protective role of salicylic acid, *S Afr J Bot.*, 85, 32-38.
- Santos, C.V. 2004, Regulation of chlorophyll biosynthesis and degradation by salt stress in sunflower leaves, *Scientia horticulturae*, 103(1), 93-99.
- Sarkar, R.D., Singh, H.B., Kalita, M.C. 2021, Enhanced lipid accumulation in microalgae through nanoparticle-mediated approach, for biodiesel production: A mini-review, *Heliyon*, 7(9), e08057.
- Sarker, U., Oba, S. 2020, The response of salinity stress-induced *A. tricolor* to growth, anatomy, physiology, non-enzymatic and enzymatic antioxidants, *Frontiers in Plant Science*, 11, 559876.
- Sarrou, E., Martens, S., Chatzopoulou, P. 2016, Metabolite profiling and antioxidant activity of sage (*Salvia fruticosa* Mill.) under the influence of genotype and harvesting period, *Ind Crops Prod.*, 94, 240-250.
- Sen, S.K., Chouhan, D., Das, D., Ghosh, R., Mandal, P. 2020, Improvisation of salinity stress response in mung bean through solid matrix priming with normal and nano-sized chitosan, *International journal of biological macromolecules*, 145, 108-123.
- Senel, F.S., Orhan, I., Celep, F., Kahraman, A., Doğan, M., Yilmaz, G., Şener, B. 2010, Survey of 55 Turkish *Salvia* taxa for their acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant activities, *Food Chemistry* 12, 34-43.
- Shahrokh, S., Hosseinkhani, B., Emtiazi, G. 2014, The impact of silver nanoparticles on bacterial aerobic nitrate reduction process, *J. Bioprocess Biotech.*, 4, 152.
- Shao, Y., Hu, Z., Yu, Y., Mou, R., Zhu, Z., Beta, T. 2018, Phenolic acids, anthocyanins, proanthocyanidins, antioxidant activity, minerals and their correlations in non-pigmented, red, and black rice, *Food Chemistry*, 239, 733-741.
- Sharanabasappa, G.K., Santosh, M.K., Shaila, D., Seetharam, Y.N., Sanjeevarao, I. 2007, Phytochemical studies on *Bauhinia racemosa* lam. *Bauhinia purpurea* Linn. and *hardwickia binata* roxb, *E-journal of Chemistry*, 4(1), 21-31.

- Sharifi, P., Bidabadi, S.S. 2020, Strigolactone could enhances gas-exchange through augmented antioxidant defense system in *Salvia nemorosa* L. plants subjected to saline conditions stress, *Industrial crops and products*, 151, 112460.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M. 2012, Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions, *Journal of botany*, 217037.
- Silva, T.I., Ribeiro, J.E.S., Dias, M.G., Nóbrega, J.S., Gonçalves, A.C.M., Filho J.S.M., Alves, A.C.L., Júnior, J.T.C., Dias, T.J., Zanuncio, J.C. 2023, Ecophysiology and growth of basil (*Ocimum basilicum*) under saline stress and salicylic acid, *Acta Biol Colomb.*, 28, 1-26.
- Singh, M., Singh, V.P., Prasad, S.M. 2019, Nitrogen alleviates salinity toxicity in *Solanum lycopersicum* seedlings by regulating ROS homeostasis, *Plant Physiology and Biochemistry*, 141, 466-476.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *American journal of enology and viticulture*, 28(1), 49-55.
- So-Hee, K., Jihye, L., Lin, J.Y., Aerum, H., Sang-Jip, N., Byung-Kwan, L. 2020, Salvianolic acid B inhibits hand-foot-mouth disease enterovirus 71 replication through enhancement of AKT signaling pathway, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 30(1), 38-43.
- Stahl, W., Sies, H. 2003, Antioxidant activity of carotenoids, *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351.
- Staroń, A., Długosz, O., Pulit-Prociak, J., Banach, M. 2020, Analysis of the Exposure of Organisms to the Action of Nanomaterials, *Materials*, 13(2), 349.
- Su, H., Song, S., Yan, X., Fang, L., Zeng, B., Zhu, Y. 2018, Endogenous salicylic acid shows different correlation with baicalin and baicalein in the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* Georgi subjected to stress and exogenous salicylic acid, *PLoS One*, 13(2), e0192114.
- Şenkal, B.C., Uskutoğlu, T., Cesur, C., Özavcı, V., Doğan, H. 2019, Determination of essential oil components, mineral matter, and heavy metal content of *Salvia virgata* Jacq. grown in culture conditions, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43(4), 395-404.
- Talaat, N.B. Hanafy, A.M.A. 2022, Plant growth stimulators improve two wheat cultivars salt-tolerance: insights into their physiological and nutritional responses, *Plants*, 11, 3198.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2002, Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, 29, 417-426.
- Tang, X., Mu, X., Shao, H., Wang, H., Brestic, M. 2015, Global plant-responding mechanisms to salt stress: physiological and molecular levels and implications in biotechnology, *Critical reviews in biotechnology*, 35(4), 425-437.
- Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Arnold, N.A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., Senatore, F. 2011, Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus, *Food and Chemical Toxicology*, 49(1), 238-243.
- Thakur, M., & Sohal, B. S. (2013). Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Tripathi, D., Raikhy, G., Kumar, D. 2019, Chemical elicitors of systemic acquired resistance-Salicylic acid and its functional analogs, *Current Plant Biology*, 17, 48-59.

- Topçu, G. 2006, Bioactive triterpenoids from *Salvia* species, *J Nat Prod.*, 69, 482-487.
- Uysal, I., Koçer, O., Mohammed, F.S., Lekesiz, Ö., Doğan, M., Şabik, A.E., Sevindik, E., Gerçek, F.E., Sevindik, M. 2023, Pharmacological and nutritional properties: genus *salvia*, *Advances in Pharmacology and Pharmacy*, 11(2), 140-155.
- Valifard, M., Mohsenzadeh, S., Kholdebarin, B., Rowshan, V. 2014, Effects of salt stress on volatile compounds, total phenolic content and antioxidant activities of *Salvia mirzayanii*, *South African Journal of Botany*, 93, 92-97.
- Verma, N., Shukla, S. 2015, Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105-113.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M.S., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C. 2005, Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro, *Analytica Chimica Acta*, 538(1-2), 391-398.
- Vistoli, G., De Maddis, D., Cipak, A., Zarkovic, N., Carini, M., Aldini, G. 2013, Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation, *Free radical research*, 47(1), 3-27.
- Younis, M.E., Rizwan, M., Tourky, S.M.N. 2021, Assessment of early physiological and biochemical responses in chia (*Salvia hispanica* L.) sprouts under salt stress, *Acta Physiologiae Plantarum*, 43, 121.
- Wahid, I., Kumari, S., Ahmad, R., Hussain, S.J., Alamri, S., Siddiqui, M.H., Khan, M.I.R. 2020, Silver nanoparticle regulates salt tolerance in wheat through changes in ABA concentration, ion homeostasis, and defense systems, *Biomolecules*, 10(11), 1506.
- Wang, D., Weaver, N.D., Kesarwani, M., Dong, X. 2005, Induction of protein secretory pathway is required for systemic acquired resistance, *Science*, 308(5724), 1036-1040.
- Wani, A.B., Chadar, H., Wani, A.H., Singh, S., Upadhyay, N. 2017, Salicylic acid to decrease plant stress, *Environmental Chemistry Letters*, 15, 101-123.
- Williamson, G., Kay, C.D., Crozier, A. 2018, The bioavailability, transport, and bioactivity of dietary flavonoids: A review from a historical perspective, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(5), 1054-1112.
- Yan, J., Tsuichihara, N., Etoh, T., Iwai, S. 2007, Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening, *Plant, cell & environment*, 30(10), 1320-1325.
- Yang, Y., Guo, Y. 2018, Elucidating the molecular mechanisms mediating plant salt-stress responses, *New Phytologist*, 217(2), 523-539.
- Noohpisheh, Z., Amiri, H., Mohammadi, A., Farhadi, S. 2021, Effect of the foliar application of zinc oxide nanoparticles on some biochemical and physiological parameters of *Trigonella foenum-graecum* under salinity stress, *Plant Biosystems-Int. J. Deal. Asp. Plant Biol.*, 155(2), 267-280.
- Zeeshan, M., Lu, M., Sehar, S., Holford, P., Wu, F. 2020, Comparison of biochemical, anatomical, morphological, and physiological responses to salinity stress in wheat and barley genotypes differing in salinity tolerance, *Agronomy*, 10(1), 127.
- Zhang, H., Zhu, J., Gong, Z., Zhu, J.K. 2022, Abiotic stress responses in plants, *Nature Reviews Genetics*, 23, 104-119.
- Zhao, Q., Gu, C., Sun, Y., Li, G., Li, L.L., Hao, L. 2021, Root Defense in Salicylic Acid-Altering Arabidopsis Plants in Responses to Cadmium Stress, *J Plant Growth Regul.*, 40, 1764–1776.

- Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C., Wang, P. 2021, Regulation of plant responses to salt stress, *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4609.
- Zhu, J.K. 2016, Abiotic stress signaling and responses in plants, *Cell*, 167(2), 313-324.
- Zhu, Y.F., Wu, Y.X., Hu, Y., Jia, X.M., Zhao, T., Cheng, L., Wang, Y.X. 2019, Tolerance of two apple rootstocks to short-term salt stress: focus on chlorophyll degradation, photosynthesis, hormone and leaf ultrastructures, *Acta Physiologiae Plantarum*, 41, 1-14.
- Zulfiqar, F., Navarro, M., Ashraf, M., Akram, N. A., Munné-Bosch, S. 2019, Nanofertilizer use for sustainable agriculture: Advantages and limitations, *Plant Science*, 289, 110270.
- Zulfiqar, F., Ashraf, M. 2021, Nanoparticles potentially mediate salt stress tolerance in plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 160, 257-268.