

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI



**ARONIA MELANOCARPA (MICHX) ELLIOT'DA KALLUS
OLUŞUMU, METABOLİTLERİ VE BAZI PATOJENİK
ORGANİZMALAR ÜZERİNE ENDOFİTİK BAKTERİ,
FUNGUS VE NANOPARTİKÜLLERİN KARŞILIKLI
ETKİLERİ**

Doktora Tezi

Luay Burhan Mustafa

Danışman

Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Bu tez, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.FEN. 1904.22.023 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN
2024

TEZ KABUL VE ONAYI

Luay Burhan Mustafa tarafından, Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ danışmanlığında hazırlanan “**ARONIA MELANOCARPA (MICHX) ELLIOT’DA KALLUS OLUŞUMU, METABOLİTLERİ VE BAZI PATOJENİK ORGANİZMALAR ÜZERİNE ENDOFİTİK BAKTERİ, FUNGUS VE NANOPARTİKÜLLERİN KARŞILIKLI ETKİLERİ**” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 12.6.2024 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Yasemin ÖZDENER KÖMPE Ondokuz Mayıs Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Dr. Öğr.Ü. Melike Çebi Kılıçoğlu Ondokuz Mayıs Üniversitesi Samsun Meslek Yüksekokulu	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. ARDA ACEMİ Kocaeli Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Cem Tolga GÜRKANLI Ordu Üniversitesi Biyoloji Ana Bilim Dalı	☒ Kabul ☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Ahmet TABAK
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Doktora tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

14/05/2024

Luay Burhan Mustafa

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: *ARONIA MELANOCARPA* (MICHX) ELLIOT'DA KALLUS OLUŞUMU, METABOLİTLERİ VE BAZI PATOJENİK ORGANİZMALAR ÜZERİNE ENDOFİTİK BAKTERİ, FUNGUS VE NANOPARTİKÜLLERİN KARŞILIKLI ETKİLERİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 14.05.2024 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 12

Tek kaynak oranı : % 5 çıkmıştır.

14/05/2024

Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

ÖZET

ARONIA MELANOCARPA (MICHX) ELLIOT'DA KALLUS OLUŞUMU, METABOLİTLERİ VE BAZI PATOJENİK ORGANİZMALAR ÜZERİNE ENDOFİTİK BAKTERİ, FUNGUS VE NANOPARTİKÜLLERİN KARŞILIKLI ETKİLERİ

Luay Burhan Mustsaf
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı
Doktora, Haziran/2024
Danışman: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

Bu çalışma, antioksidanlar, fenolik maddeler ve antimikrobiyal fitokimyasallar bakımından zengin önemli bir tıbbi bitki olan *Aronia melanocarpa* yaprağının kallus kültürlerinde sekonder metabolit üretiminin artırılmasına odaklanmaktadır. Buna bağlı olarak, bu tez biyotik ve abiyotik elisitör teknikleri kullanarak endofitik bakteri, fungusların hücre dışı kültür filtratları ve Fe₃O₄ nanopartikülleri ile, biyoaktif bileşiklerin büyük ölçekte üretimi için uygun biyoteknolojik stratejileri belirlemeyi amaçlamaktadır.

A. melanocarpa köklerinden dört endofitik bakteri ve dört fungal suşun izolasyonu ve karakterizasyonu, sırasıyla 16S rDNA ve ITS rDNA genlerinin PCR amplifikasyonu ve dizileme yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. Elisitasyon süreci, hücre dışı kültür filtratlarının (5, 10 ve 15 mL/100 mL) ve Fe₃O₄ nanoparçacıklarının (10, 15 ve 20 mg/L) değişen konsantrasyonlarını içermiştir. Kallus kültürlerinin uyarılması, toplam fenolik maddeler birikiminde ve DPPH serbest radikal temizleme aktivitesinde önemli bir artışa neden olmuş ve biyotik elisitörler için en iyi uygulamalar olarak gözlemlenmiştir.

Ayrıca, *Diatrype stigma* fungusunun hücre dışı kültür filtratının (15 mL/100 mL) kullanıldığı *A. melanocarpa* yaprağı kallus biyomasının metanol ekstresi, fenolik maddeler ve antioksidanlar açısından en yüksek değerleri göstermiştir. Bu ekstrakt, klinik olarak önemli patojenlere karşı dikkate değer inhibe edici etkiler sergilemiştir; *Staphylococcus aureus*, 100 mg/mL/disk için kallus biomass ekstresi için en yüksek inhibisyon zonu (26,01±0,37 mm) göstermiştir. Fungal suşlar değerlendirildiğinde, aynı ekstrakt ve aynı konsantrasyon ile 23,00±0,69 mm değeri ile *Aspergillus flavus* için en yüksek inhibisyon zonu elde edilmiştir.

Özetle, bu çalışma bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak için elisitör stratejilere dair anlayışımızı geliştirmekte ve elisitör ekstrelerin antimikrobiyal ajanlar geliştirmedeki pratik uygulamasına vurgu yapmaktadır. Araştırma, bitki biyoteknolojisi alanına önemli katkılar sunarak, potansiyel farmasötik uygulamaları olan biyoaktif bileşiklerin sürdürülebilir üretimi için değerli bilgiler sunmaktadır. *A. melanocarpa* kallus kültürlerinde sekonder metabolit üretiminin başarılı bir şekilde artırılması, büyük ölçekte tıbbi bileşik üretimi için biyoteknolojik ilerlemelerin umut vadeden perspektiflerini ortaya koymaktadır.

Anahtar Sözcükler: Endofit Bakteri ve Funguslar, *Aronia melanocarpa*, Kallus, Elisitörler, Toplam fenolik maddeler, Antimikrobiyal, Antioksidanlar

ABSTRACT

THE INTERACTIVE EFFECTS OF ENDOPHYTIC BACTERIA, FUNGI, AND NANOPARTICLES ON CALLUS FORMATION, METABOLITES, AND SOME PATHOGENIC ORGANISMS IN *ARONIA MELANOCARPA* (MICHX) ELLIOT

Luay Burhan Mustafa
Ondokuz Mayıs University
Institute of Graduate Studies
Department of Biology
Ph.D., June/2024
Supervisor: Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ

The present study delves into the augmentation of secondary metabolite production in callus cultures of *Aronia melanocarpa* leaf, a significant medicinal plant whose leaves are rich in antioxidants, phenols, and antimicrobial phytochemicals. Accordingly, this thesis aims to determine appropriate biotechnological strategies for the large-scale production of bioactive compounds with extracellular culture filtrates of endophytic bacteria, fungi, and Fe₃O₄ nanoparticles using biotic and abiotic elicitor techniques.

Isolation and characterization of four endophytic bacteria and four fungal strains from *A. melanocarpa* roots were conducted via PCR amplification, sequencing, and phylogenetic analysis of 16S rDNA ve ITS rDNA gene, respectively. The elicitation process involved varying concentrations of extracellular culture filtrates (5, 10, and 15 mL/100 mL) and Fe₃O₄ nanoparticles (10, 15, and 20 mg/L). Stimulation of callus cultures resulted in a significant increase in total phenolic substance accumulation and DPPH free radical scavenging activity and was observed as best practice for biotic elicitors.

Moreover, methanol extract of *A. melanocarpa* leaf callus biomass using extracellular culture filtrate of *Diatrype stigma* fungus (15 mL/100 mL) showed the highest values regarding phenolic substances and antioxidants. This extract demonstrated notable inhibitory effects against clinically important pathogens; *Staphylococcus aureus* showed the highest zone of inhibition, 26.01±0.37 mm for callus biomass extract at 100 mg/mL/disk. When fungal strains were evaluated, the highest inhibition zone for *Aspergillus flavus* was obtained with the same extract and the same concentration, with a value of 23.00±0.69 mm.

In summary, this study improves our understanding of elicitor strategies to increase secondary metabolite production in plant cell cultures and highlights the practical application of elicitor extracts in developing antimicrobial agents. The research contributes significantly to the field of plant biotechnology, offering valuable insights into the sustainable production of bioactive compounds with potential pharmaceutical applications. The successful enhancement of secondary metabolite production in *A. melanocarpa* callus cultures highlights the promising prospects for biotechnological advancements in large-scale medicinal compound production.

Keywords: Endophyte Bacteria and Fungi, *Aronia melanocarpa*, Callus, Elicitors, Total phenol, Antimicrobial, Antioxidant

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmamı gerçekleştirmemde bana önemli bir çalışma ortamı sağlayan, her aşamada yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Prof. Dr. İbrahim ÖZKOÇ'a,

Tez izleme komitesinde yer alan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Yasemin Özdener Kömpe ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Melike Çebi Kılıçoğlu'na tez sürecimdeki değerli katkılarından dolayı şükranlarımı sunuyorum,

Çalışmalarım sırasında büyük bir sabır ve anlayışla yanımda olan, manevi desteklerini eksik etmeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi ifade etmek istiyorum.

Öğrenim hayatım boyunca sürekli destek sağlayan Tikrit Üniversitesi'ne şükranlarımı sunuyorum,

Doktora çalışmamı tamamlamam için burs desteği sağlayan ve sürekli desteklerini esirgemeyen Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na teşekkür ederim,

Son olarak, tezime PYO.FEN 1904.22.023 numaralı projeyle destek veren Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi'ne teşekkürlerimi sunarım.

Luay Burhan Mustafa

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. <i>Aronia melanocarpa</i> Bitkisi	4
2.2. Bitki Metabolizması	5
2.2.1. Primer Metabolitler	5
2.2.2. Sekonder Metabolitlerin Tanımı, Grupları ve Kullanım Alanları	5
2.3. Toplam Fenolik Maddeleri Ölçme Yöntemleri	18
2.3.1. Toplam Fenolik Maddelerin (TFM) Folin-Ciocalteu Spektrofotometrik Yöntemiyle Tayini	18
2.3.2. Gaz Kromatografisi	20
2.3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	20
2.3.4. Fenolik Maddelerin Ayırma ve Miktarının Belirlenmesine Yönelik Diğer Tahliller	20
2.4. Oxidative Stress	21
2.5. Bitki Fenolik Maddelerinin Antioksidan Özellikleri	22
2.6. Antioksidan Aktivitenin Ölçülmesi	23
2.7. Bitki Fenolik Maddelerinin Antibakteriyel ve Antifungal Aktiviteleri	26
2.8. Bitki Doku Kültürü Tarihçesi	29
2.8.1. Bitki Doku Kültürünün Tanımı ve Uygulama Alanları	30
2.8.2. Kallus Kültürleri	31
2.8.3. İkincil Metabolit Bileşik Üretim Aracı Olarak Kallus Kültürü	33
2.9. Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak için Geliştirilen Stratejiler	34
2.9.1. Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak için Elisitör Olarak Endofitik Mikroorganizmaların Kullanımı	38
2.9.2. Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak için Elisitör Olarak Demir Oksit Nanopartiküllerin Kullanımı	40
2.10. Endofitler	42
2.10.1. Bakteriyel Endofitik Mikrobiyota	44
2.10.2. Fungal Endofitik Mikrobiyota	45
2.10.3. Endofitlerin Bitki Dokusuna Girişi ve İletimi	47
3. MATERYAL VE YÖNTEM	51
3.1. Test Bitkisi	51
3.2. <i>Aronia melanocarpa</i> Bitki Örneklerinin Yüzeysel Sterilizasyonu ve İzolasyon Aşamaları	51
3.2.1. Bitki Köklerinin Yüzeysel Sterilizasyonu ve Endofit Bakterilerin İzolasyonu	51
3.2.2. Bitki Köklerinin Yüzeysel Sterilizasyonu ve Endofit Fungus İzolasyonu	52
3.3. İzolatların Saflaştırılması	53
3.4. Stok Kültürlerin Hazırlanması	53
3.5. Bakterilerin Morfolojik Karakterizasyonu	53
3.6. Fungusların Morfolojik Karakterizasyonu	54
3.7. Bakteri ve Fungusların Moleküler Tanımlaması	54
3.7.1. Bakteri İzolatlarından DNA İzolasyonu	55

3.7.2. Funguslardan DNA İzolasyonu.....	56
3.7.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	57
3.7.4. 16S rDNA Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	58
3.7.5. ITS1-5.8S-ITS2 Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	59
3.8. Dizi Analizi ve Değerlendirme	60
3.9. <i>Aronia melanocarpa</i> (Michx) Elliott Sürgünlerinden In Vitro Elde Edilen Yapraklar Kullanılarak Kallus Üretimi.....	60
3.9.1. Sürgün Çoğaltımı	60
3.9.2. Besiyerinin Hazırlanması	61
3.9.3. Yüzeysel Sterilizasyonu	62
3.9.4. Kallus Üretimi	62
3.9.5. Gözlem Ortamı ve Kallus Gelişimi	62
3.10. Elisitör Hazırlanması.....	63
3.10.1. Bakteri Elisitörleri	63
3.10.2. Fungus Elisitörleri	63
3.11. Biyotik Elisitör Uygulamaları	63
3.12. Abiyotik Elisitör Uygulamaları.....	64
3.13. Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Testleri için Kallus Ekstraktının Hazırlanması	65
3.14. Toplam Fenolik Madde Tayini	65
3.15. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi	67
3.16. Antimikrobiyal Aktivite	66
3.16.1. Antimikrobiyal Yeteneğini Ölçmek İçin Kallus Ekstraktının Hazırlanması.....	66
3.16.2. Test Mikroorganizmaları.....	67
3.16.3. Antibakteriyel Aktivite Testi.....	67
3.16.4. Antifungal Aktivite Testi	67
3.17. İstatistiksel Analiz.....	68
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	69
4.1. Endofitik Mikroorganizmaların Gelişmesi ve Kontaminasyonu Üzerine Yüzey Sterilizasyon Yöntemlerinin Etkinliği	69
4.2. Endofitik Mikroorganizmaların İzolasyonu	69
4.2.1. <i>Aronia melanocarpa</i> Köklerinden Endofitik Bakteri İzolasyonu	69
4.2.2. <i>Aronia melanocarpa</i> Köklerinden Endofitik Fungusların İzolasyonu	70
4.3. İzolatların Morfolojik ve Mikroskopik Özelliklerinin Belirlenmesi.....	71
4.3.1. Bakterilerin Morfolojik ve Mikroskopik Özelliklerinin Belirlenmesi	71
4.3.2. Fungusların Morfolojik ve Mikroskopik Özelliklerinin Belirlenmesi	74
4.4. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu	77
4.5. Filogenetik Analizler	80
4.6. İzolatların Saklanması.....	89
4.7. Kallus Üretiminin Aşamaları	89
4.7.1. Sürgün Çoğaltımı ve Eksplantların Seçimi	89
4.7.2. Yaprakların Yüzeysel Sterilizasyonu	89
4.7.3. Kallus Üretimi	91
4.8. Elisitör Hazırlanması	92
4.8.1. Biyotik Elisitör Hazırlanması.....	92
4.8.2. Abiyotik Elisitör Hazırlanması.....	93
4.9. Biyotik ve Abiyotik Elisitörlerin Uygulanması	93
4.9.1. Bakteriyel Elisitörlerin Toplam Fenolik Madde ve Radikal Temizleme Aktivitesi Üzerindeki Etkisi.....	94
4.9.2. Fungus Elisitörlerin TPB ve Radikal Temizleme Aktivitesi Yüzdesi Üzerindeki Etkisi	100
4.9.3. Demir Oksit Nanopartiküllerinin (Fe ₃ O ₄) Toplam Fenolik Madde ve Radikal Temizleme Aktivitesi Yüzdesi Üzerindeki Etkisi	107
4.10. Antimikrobiyal Aktivitenin Tespiti.....	112
5. SONUÇLAR	120

KAYNAKLAR	122
ÖZ GEÇMİŞ.....	158



SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	: Santigrat
l	: Litre
mL	: Mililitre
µl	: Mikrolitre
MS	: Murashige ve Skoog besiyeri
PDA	: Patates dekstroza agar
TSA	: Tryptic soya agar
NA	: Nutrient Agar
CTAB	: Setil Trimetil Amonyum Bromür
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
ITS	: Dahili kopyalanmış aralayıcı
TE	: Tris-EDTA
RNase	: Ribonükleaz A
rpm	: Dakikada devir
ACC	: 1-aminosiklopropan-1-karboksilik asit
IAA	: İndol-3-asetik asit
mg	: Miligram
GAE	: Gallik Asit Eşdeğeri
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
RSC	: Radikal Temizleme Kapasitesi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
HCl	: Hidroklorik asit
Na ₂ CO ₃	: Sodyum karbonat
Fe ₃ O ₄ NP	: Demir Oksit Nanopartikül
NaClO ₂	: Sodyum Klorit
H ₂ O	: Hidrojen dioksit
ddH ₂ O	: Double-distilled water
GEN	: Gentamisin
KLT	: Klotrimazol
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>A. melanocarpa</i> bitkisinin yaprak ve meyveleri (Bushmeleva vd, 2023).....	4
Şekil 2.2. Sekonder metabolitlerin sentezlendiği yaygın biyosentetik yollar (Ramawat vd, 2009).....	6
Şekil 2.3. Fenolun yapısı.....	9
Şekil 2.4. Basit ikame edilmiş fenollerin genel yapısı	10
Şekil 2.5. Hidroksil ikameli fenollerin yapısı	11
Şekil 2.6. Dihidroksil ile ikame edilmiş fenollerin yapısı.....	11
Şekil 2.7. Hidroksil ikameli benzoik asitlerin genel yapıları	12
Şekil 2.8. Hidroksibenzoik asitlerin yapıları.....	12
Şekil 2.9. Trihidroksibenzoik asit örnekleri.....	12
Şekil 2.10. Hidroksil ikameli sinamik asitlerin genel yapıları	13
Şekil 2.11. Ana polifenollerin şeması ve kimyasal yapıları. Polifenoller dört ana sınıfa ayrılır: stilbenler, lignanlar, fenolik asitler ve flavonoidler. Sonuncusu altı alt sınıfa ayrılmıştır: antosiyaninler, flavonoller, flavanoller, flavanonlar, kalkonlar ve diğerleri. (de Laureto vd, 2019)	14
Şekil 2.12. Diğer polifenol türleri (Prabhu vd, 2021)	18
Şekil 2.13. Folin-Ciocalteu yöntemi	19
Şekil 2.14. Oksidatif stres ve 3 resimdeki oksidatif strese maruz kalmış hücre	21
Şekil 2.15. Oksidatif stres	23
Şekil 2.16. Fenolik-bakteriyel hücre etkileşimlerinin potansiyel mekanizmaları (fenol yapısı, çeşitli fenolik maddeleri temsil eden bir yer tutucudur).....	28
Şekil 2.17. Farklı antifungal fenolik maddeler ve bunların funguslardaki etki şekilleri.....	29
Şekil 2.18. Çeşitli bitki kallus türlerinin şematik gösterimi (Ikeuchi vd, 2013)	33
Şekil 2.19. Elisitörlerin genel mekanizma etkisinin şematik gösterimi. PL- Fosfolipaz; ROS- Reaktif oksijen türleri; RNS-Reaktif nitrojen türleri MAPK-Mitojenle aktive edilen protein kinaz	35
Şekil 2.20. Elisitörlerin niteliklerine göre sınıflandırılması.....	39
Şekil 2.21. Nanopartiküllerin hücre kültürlerinde sekonder metabolit sentezi üzerindeki etkisi.....	42
Şekil 2.22. Bitkilerde endofitlerin rolleri. Endofitik mikroorganizmalar çevreden besin olarak bitki büyümesini teşvik eder.	45
Şekil 2.23. Endofitik fungus ve bakterilerin giriş yolları.....	50
Şekil 3.1. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş bitki kökleri ve endofitik bakteri izolasyonu	51
Şekil 3.2. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş bitki kökleri ve endofitik fungus izolasyonu	52
Şekil 3.3. MS ortamına konsantrasyonlarda (5, 10 ve 15 mL/ 100 mL) elisitörleri eklenmesi. F-2: Eklenen Elisitör ve konsantrasyonunun sembolüdür. E.O: Elisitörü eklemekten ağırlık. E.B: Elisitörle birlikte ağırlık	63

Şekil 3.4. <i>A. melanocarpa</i> kallusunda fenolik madde üretimini teşvik etmek ve antioksidanları arttırmak için biyotik ve abiyotik elisitörlerin uygulanması	64
Şekil 3.5. Kallusun toz haline getirilmesi	65
Şekil 4.1. <i>P. umsongensis</i> 'nin saf kolonileri ve gram boyama reaksiyonu sonrası 100X immersion objektifinde görüntüsü	72
Şekil 4.2. <i>P. brassicacearum</i> 'nin saf kolonileri ve gram boyama reaksiyonu sonrası 100X immersion objektifinde görüntüsü	72
Şekil 4.3. <i>B. subtilis</i> 'nin saf kolonileri ve gram boyama reaksiyonu sonrası 100X immersion objektifinde görüntüsü	73
Şekil 4.4. <i>P. litorisediminis</i> 'nin saf kolonileri ve gram boyama reaksiyonu sonrası 100X immersion objektifinde görüntüsü	74
Şekil 4.5. <i>R. vagum</i> fungal izolatların morfolojik ve mikroskopik özellikleri.....	74
Şekil 4.6. <i>D. novozelandica</i> nolu fungal izolatların morfolojik ve mikroskopik özellikleri..	75
Şekil 4.7. <i>G. butleri</i> fungal izolatların morfolojik ve mikroskopik özellikleri	76
Şekil 4.8. <i>D. stigma</i> fungal izolatların morfolojik ve mikroskopik özellikleri	76
Şekil 4.9. PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri A) 27F-1525R Primerleri ile elde edilen PCR ürünleri, B) ITS1F-ITS4R Primerleri ile elde edilen PCR ürünleri.....	78
Şekil 4.10. <i>P. umsongensis</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.....	81
Şekil 4.11. <i>P. brassicacearum</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.....	82
Şekil 4.12. <i>B. subtilis</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç	83
Şekil 4.13. <i>P. litorisediminis</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç	84
Şekil 4.14. <i>R. vagum</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç	85
Şekil 4.15. <i>D. novozelandica</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.....	86
Şekil 4.16. <i>G. butleri</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç	87
Şekil 4.17. <i>D. stigma</i> türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç	88
Şekil 4.18. <i>A. melanocarpa</i> sürgün çoğaltımı	90
Şekil 4.19. <i>A. melanocarpa</i> türünde doku kültürü çalışmasında kallus oluşumu	91
Şekil 4.20. a- Kallus 1 ay sonra, b- Kallus 6 hafta sonra	92
Şekil 4.21a. Bakteri elisitörlerin hazırlanması	93
Şekil 4.21b. Fungus elisitörlerin hazırlanması.....	94
Şekil 4.22a. <i>A. melanocarpa</i> callus ekstraktlarında bakteriyel elisitörlerin toplam fenolik içerik üzerindeki etkisi	98
Şekil 4.22b. <i>A. melanocarpa</i> kallus ekstraktlarında bakteriyel elisitörlerin DPPH radikali giderme üzerindeki etkisi.....	99
Şekil 4.23a. <i>A. melanocarpa</i> callus ekstraktlarında fungal elisitörlerin toplam fenolik içerik üzerindeki etkisi	103
Şekil 4.23b. <i>A. melanocarpa</i> kallus ekstraktlarında fungal elisitörlerin DPPH radikali giderme üzerindeki etkisi.....	106
Şekil 4.24a. <i>A. melanocarpa</i> kallus ekstraktlarında Fe ₃ O ₄ NP elisitörlerin toplam fenolik içerik üzerindeki etkisi	109

Şekil 4.24b. <i>A. melanocarpa</i> callus ekstraktlarında Fe ₃ O ₄ NPs elisitörlerin DPPH radikali giderme üzerindeki etkisi.....	110
Şekil 4.25. <i>A. melanocarpa</i> kallus ekstraktlarında Fe ₃ O ₄ NP elisitörlerin DPPH radikali giderme üzerindeki etkisi.....	110
Şekil 4.26a. Farklı kallus konsantrasyonunun patojen bakterilere karşı oluşturduğu inhibisyon bölgesini gösteren grafikler.....	115
Şekil 4.27a. Farklı kallus konsantrasyonunun patojen fungus karşı oluşturduğu inhibisyon bölgesini gösteren grafikler.....	116
Şekil 4.26b. <i>A. melanocarpa</i> kallus metanol ekstraktlarının A- <i>S. aureus</i> , B- <i>E. faecalis</i> , C- <i>B. cereus</i> , D- <i>E. coli</i> ve E- <i>P. aeruginosa</i> 'ya karşı inhibisyon bölgesi (mm). Disklerdeki sayılar (1-10, 2-30, 3-50, 4-80 ve 5-100 mg/mL) <i>A. melanocarpa</i> kallus ekstraktının konsantrasyonlarını temsil eder. 6- pozitif kontrolü temsil eder.....	117
Şekil 4.27b. <i>A. melanocarpa</i> callus metanol ekstraktlarının A- <i>A. niger</i> , B- <i>T. rubrum</i> , C- <i>R. microsporus</i> , D- <i>A. flavus</i> ve E- <i>M. canis</i> 'e karşı inhibisyon bölgesi (mm). Disklerdeki sayılar (1-10, 2-30, 3-50, 4-80 ve 5-100 mg/mL) <i>A. melanocarpa</i> kallus ekstraktının konsantrasyonlarını temsil eder. 6- pozitif kontrolü temsil eder	118

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1. Bazı değerli sekonder metabolitlerin kullanım alanları, kullanıldığı sektörler ve elde edildiği bitkiler (Sökmen ve Gürel, 2001; Rao ve Ravishankar, 2002)	8
Tablo 2.2. Antioksidan aktiviteyi ölçmek için kullanılan farklı teknikler	24
Tablo 2.3. Fenolik maddelerin temel iskeleti, kaynakları ve özellikleri	27
Tablo 2.4. Bitki hücresi/doku kültürü ile sekonder metabolitlerin in vitro üretimini artırmak için kullanılan biyotik elisitörler	36
Tablo 2.5. Bitki hücresi/doku kültürü ile sekonder metabolitlerin in vitro üretimini artırmak için kullanılan abiyotik elisitörler	37
Tablo 3.1. Lizis tamponu hazırlama.....	54
Tablo 3.2. Tris tamponu hazırlama	55
Tablo 3.3. TE tamponu hazırlama.....	55
Tablo 3.4. 10X TBE tamponu hazırlama	55
Tablo 3.5. 1x TBE tamponu hazırlama	55
Tablo 4.1. Endofitik bakteri suşlarının izolasyon bilgileri.....	70
Tablo 4.2. Endofitik fungus suşlarının izolasyon bilgileri	71
Tablo 4.3. 16S rDNA ve ITS Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları	77
Tablo 4.4. <i>A. melanocarpa</i> kallus ekstraktlarında bakteriyel elisitörlerin toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite üzerindeki etkisi.....	96
Tablo 4.5. <i>A. melanocarpa</i> callus ekstraktlarında fungal elisitörlerin toplam fenolik maddelerin içeriği ve antioksidan aktivite üzerindeki etkisi	102
Tablo 4.6. <i>A. melanocarpa</i> callus ekstraktlarında Fe ₃ O ₄ NP elisitörlerin toplam Fenolik maddelerin içeriği ve antioksidan aktivite üzerindeki etkisi	108
Tablo 4.7. <i>A. melanocarpa</i> kallus ekstraktının disk difüzyon deneyinde farklı insan patojen bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivitesi	113
Tablo 4.8. <i>A. melanocarpa</i> kallus ekstraktının disk difüzyon deneyinde farklı insan patojen fungus türlerine karşı antifungal aktivitesi	114

1. GİRİŞ

Aronia melanocarpa, genellikle siyah Chokeberry, yabani bektaşı üzümü veya Aronya olarak da adlandırılır, Rosaceae familyasına aittir ve Kuzey Amerika'ya özgü bir çalıdır. *Aronia* yaklaşık bir asır önce Avrupa'da tanınmış ve popüler olmuştur (Kulling ve Rawel, 2008; Kim vd, 2013). Bitkinin bileşenleri bir çok yararlı biyoaktif bileşik içerdiğinden *Aronia* yetiştiriciliği popüler hale gelmiştir. *Aronia* bitkisinin hidroksisinnamik asit, flavanoller ve antosiyanin gibi en zengin doğal polifenol kaynaklarından biri olduğu bilinmektedir (Malinowska vd, 2012; Sharif vd, 2013; Denev vd, 2019; Kong vd, 2021). Bir çok meyvenin başta fenolik maddeler olmak üzere biyolojik olarak aktif bileşiklerin iyi bir kaynağı olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, *Aronia* bitkilerinin yaprakları da değerli bir fenolik madde kaynağı olabilir ve bunların bazıları halihazırda bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır (Pavlović vd, 2016; Tian vd, 2017; Nogueira vd, 2024). *Aronia* yapraklarının potansiyel sağlığa yararlı etkileri hakkındaki veriler hala sınırlıdır. Bununla birlikte, farmakolojik aktiviteleri hakkında birkaç çalışma bulunmakla birlikte, bazı çalışmalar *Aronia* yaprak ekstraktlarının, farklı kanser hücrelerine karşı antitümör ve inhibitör aktivitesini ortaya çıkarmıştır (Skupień vd, 2008 ve Thi ve Hwang, 2018; Kuzmanović vd, 2023).

Endofitler, sağlam bitki dokularıyla simbiyotik bir ilişki kurarak yaşayan mikroorganizmalardır (bakteri veya fungus veya aktinomisetler) (Kumar vd, 2023; Dutta vd, 2024). Bugüne kadar incelenen hemen hemen tüm bitkilerle söz konusu ilişkiler tesbit edilmiştir. Bitki endofitlerinin, bitki konukçularındaki sekonder metabolitlerin profilini değiştirdiği bilinmektedir. İkincil metabolizmaya ait kimyasal bileşiklerin oluşumu, dış stres sinyalleri (örneğin, patojen elisitör, oksidatif stres, yaralanma, vb.) tarafından indüklenebilmektedir (Nascimento ve Fett-Neto, 2010; Sahu vd, 2022; Pandey vd, 2022).

Bitkilerden sekonder metabolit üretiminde son zamanlarda doku kültüründen de yararlanılmaktadır. Kallus ve doku kültürleri, tüm bitkilerin tüm genetik bilgisini barındırdığından, sekonder metabolitlerin biyosentezi için potansiyele sahiptirler. Ayrıca, doku kültürü teknolojileri, ticari olarak geliştirilmiş özelliklere sahip sekonder metabolitlerin türevlerini üretmek için bitki hücrelerinin biyosentez yollarını manipüle etme olasılığını gündeme getirmektedir (Hussain vd, 2012;

Abdulhafiz vd, 2022; Ozyigit vd, 2023).

Endofitik bakteri ve fungus kullanımının *Aronia* yapraklarından kallus kültürlerinde fenolik madde üretimini artırmada olumlu sonuçlar doğuracağı ileri sürülmektedir. Aynı bağlamda sekonder metabolit üretiminin uyarılmasında düşünülen unsurlardan biri de nanomalzemelerdir. Nanomalzemelerin büyüme, organogenez ve transformasyon gibi çeşitli amaçlarla bitki doku kültürüne uygulanması ve bitkilerde sekonder metabolitlerin farklı şekilde uyarılması üzerine çalışmalar bulunmaktadır (Kim vd, 2017; Ali vd, 2019; Mishra vd, 2022; Singh vd, 2023).

Yapraklardan kallus üretimi ve elisitörlerin uygulanması yoluyla fenolik madde içeriğin artırılması, bitki biyoteknolojisi ve farmakolojisinde önemli araştırma alanlarıdır (Efferth, 2019). Fenolik maddeler, insan sağlığı ve ilaç endüstrisi üzerinde önemli etkileri olan antioksidan özellikleriyle bilinmektedir. Fenolik maddeler, bitkilerin çevresel stresten korunmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bitkisel materyalin fenolik madde içeriğinin artırılması, antioksidan kapasitesinin artmasına neden olabilir ve bu da onu farmasötikler ve fonksiyonel gıdalar dahil olmak üzere çeşitli alanların ilgi odağı haline getirebilir. (Sun ve Shahrajabian, 2023).

Araştırmacılar, kallusu elisitörlerle (uyarıcı) muamele ederek fenolik madde içeriği arttırmayı ve böylece bitki materyalinin antioksidan kapasitesini arttırmayı hedeflemektedirler. Bu araştırmanın doğal antioksidanların ve farmasötik bileşiklerin geliştirilmesinde potansiyel uygulamaları vardır. Aynı zamanda bitki hücre kültürü ve sekonder metabolit üretimine ilişkin anlayışımıza da katkıda bulunmaktadır (Gajić vd, 2022; Li vd, 2023).

Elisitörlerin kallus kültürlerine uygulanması, fenolik maddeler de dahil olmak üzere spesifik metabolitlerin üretimini arttırmayı ve antioksidan kapasiteyi arttırmayı amaçlayan bir stratejidir.

Antimikrobiyal ajanlar, özellikle de antibiyotikler, bulaşıcı hastalıkların oluşturduğu tehditleri önemli ölçüde azaltmış ve yaşam beklentisinde önemli kazanımlara katkıda bulunmuştur. 20. yüzyıldan önce bulaşıcı hastalıklar dünya çapında yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmuş, bu ve diğer nedenlerle o dönemde ortalama yaşam süresi bugünkünden çok düşük (yaklaşık 47 yıl) kalmıştır (Adedeji, 2016).

Edinilmiş enfeksiyonlar gibi insan hastalıklarına çoğunlukla katkıda bulunan bakteriyel enfeksiyonlar, onları tedavi etmek için kullanılan ilaçlara karşı da direnç geliştiriyor. Tıbbi bitkilerden elde edilen kallus kültürleri, in vitro anti-mikrobiyal maddelerin üretimini mümkün kılmak için uygun koşullar altında oluşturulmuştur (Chintalwar vd 2013; Guru vd, 2022). Birçok çalışma, farklı bitkilerden elde edilen kallus ekstraktlarının anti-bakteriyel ve anti-fungal özelliklere sahip olduğunu göstermiştir (Landa vd, 2006; Parsaeimehr vd, 2010; Singh, 2011; Kala vd, 2014; Singh vd, 2016; Mahmoud, 2019).

Çalışmamızın amaçlarından biri, üzerinde çalışılan kallus ekstraktlarının yukarıda belirtilen elisitörlerle metabolit üretimini uyardıktan sonra, sürekli insan sağlığını tehdit eden bazı mikrobiyal türlere (Gram-negatif ve Gram-pozitif bakteriler, bazı maya ve funguslar) karşı inhibitör yeteneklerini test etmektir. Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma, *Aronia* kallusun sekonder metabolitlerini ve üretilen metabolitlerin patojenik mikroorganizmaları engellemedeki etkinliğini test eden ilk olma özelliğini taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Aronia melanocarpa* Bitkisi

Aronia bitkisinin hidroksisinnamik asit, flavanoller ve antosiyanin gibi en zengin doğal polifenol kaynaklarından biri olduğu bilinmektedir (Kulling ve Rawel, 2008; Malinowska vd, 2012; Sharif vd, 2013). Son birkaç yılda, sağlıkla ilgili özellikleri nedeniyle *Aronia* üzerinde birçok çalışma yapılmıştır (Şekil 2.1). *Aronia* antioksidan, antiaterosklerotik ilaç, antidiyabetik, antiinflamatuvar, antiviral ve antimutajenik ajan olarak kullanılmıştır (Chrubasik ve Chrubasik, 2010; Nikolova vd, 2012). Ayrıca çeşitli katı tümör modelleri üzerinde antiproliferatif etkileri ve kanser kök hücrelerinin görünümü ve büyümesi üzerinde antikanser, kimyasal önleyici etkileri vardır (Kim vd, 2013; Sharif vd, 2013).



Şekil 2.1. *A. melanocarpa* bitkisinin yaprak ve meyveleri (Bushmeleva vd, 2023).

Aronia meyvesinin biyoaktivitesi iyi tanımlanmış olmasına rağmen, *Aronia* yapraklarının biyoaktivitesini araştıran az sayıda çalışma yapılmıştır. Çeşitli meyvelerin, baskın olarak fenolik maddeler olmak üzere biyolojik olarak aktif bileşiklerin iyi bir kaynağı olarak kabul edildiği iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, *Aronia* bitkilerinin yaprakları da değerli bir fenolik madde kaynağı olabilir ve bunların bazıları halihazırda bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır (Pavlović vd, 2016; Tian vd, 2017; Zdunić vd, 2020). Cvetković vd (2018), *Aronia* yapraklarında yüksek düzeyde klorojenik asit ve kuersetin türevlerinin bulunduğunu bildirmiştir. *Aronia* yapraklarında kafeoilkinik asit ve kuersetin türevlerinin varlığı Dawidowicz vd (2016), Lee vd (2014) ve Ito vd (2005) tarafından da doğrulanmıştır. *Aronia*

yapraklarında fenolik maddelerin yanı sıra karotenoidler, α -tokoferol ve yağ asitleri de bulunmuştur (Sivanesan vd, 2016). *Aronia* yapraklarının çay olarak geleneksel kullanımına dair bazı belgeler olsa da (Lee vd, 2014; Park ve Jung, 2017), *Aronia* yapraklarının potansiyel sağlık yararlı etkileri hakkındaki veriler hala sınırlıdır.

2.2. Bitki Metabolizması

2.2.1. Primer Metabolitler

Bitkilerdeki primer metabolitler, büyüme, gelişme, strese uyum ve savunmada doğrudan rol oynayan temel bileşiklerdir. Doğada yaygın olarak bulunurlar ve insanlar tarafından gıda olarak kullanılırlar.

Primer metabolitler temel olarak nükleik asitler, proteinler, karbonhidratlar, yağlar ve lipitlerin bileşiklerinden oluşur. Bitkinin büyümesi, gelişmesi ve enerji gereksinimleri için hayati önem taşırlar ve aynı zamanda gıdanın besin kalitesini, tadını, kokusunu ve sağlığı geliştirici özelliklerini de belirlerler (Pott ve Vallarino, 2019).

Öte yandan sekonder metabolitler, primer metabolitlerden sentezlenmekte ve çeşitli çevresel koşullar altında bitki adaptasyonunda, ayrıca insan beslenmesinde ve tıpta kritik roller oynamaktadır (Maeda, 2019). Diğer işlevlerin yanı sıra bitkiyi koruyan, zararlıları uzaklaştıran, iyileştiren ve iletişim kuran bileşikler içerirler. Bu nedenle primer metabolitler bitki büyümesi ve metabolizmasında doğrudan rol alırken, sekonder metabolitler primer metabolizmanın son ürünleri olarak kabul edilir ve bitki-çevre etkileşimlerine aracılık eder (Erb ve Kliebenstein, 2020).

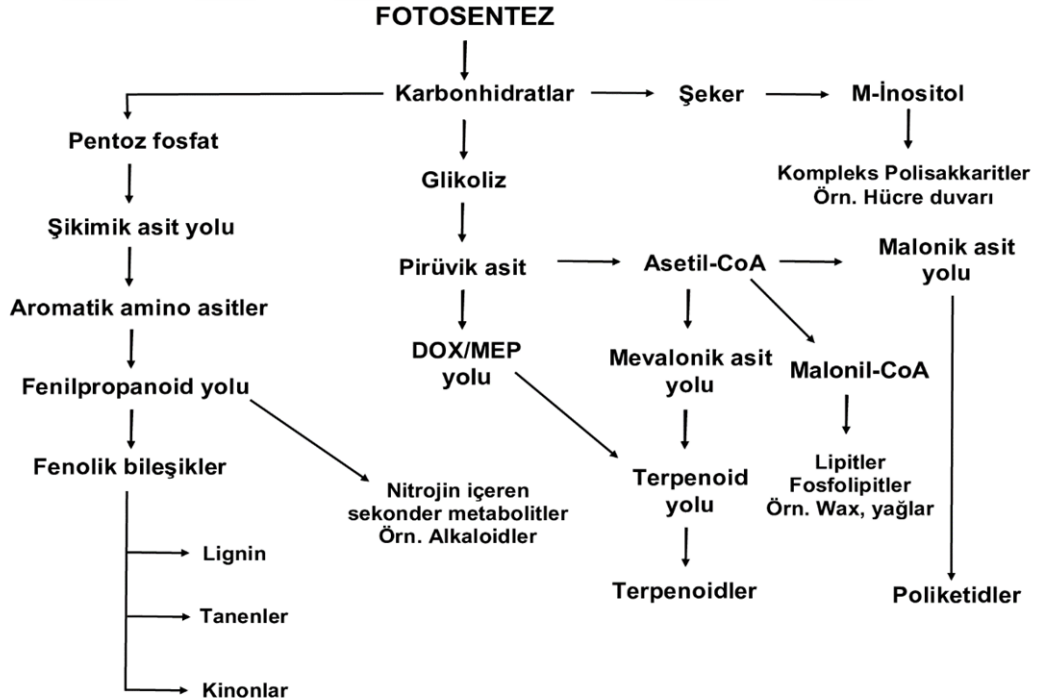
2.2.2. Sekonder Metabolitlerin Tanımı, Grupları ve Kullanım Alanları

İnsanlığın ilk günlerinden beri sekonder metabolitlere sahip bitkiler insanlar tarafından enfeksiyonları, sağlık bozukluklarını ve hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır (Van Wyk ve Wink, 2018). Sadece son 100 yılda, doğal ürünler kısmen, birçok durumda bitki yapılarının öncü olduğu sentetik ilaçlarla değiştirilmiştir. Daha yüksek bitkiler, her zaman mükemmel bir farmasötik, böcek ilacı, tatlandırıcı, koku ve gıda renklendirici kaynağı olan bir dizi madde üretebilir (Kieran vd, 1997; Kandar, 2021; Najmi vd, 2022). Bu maddeler geleneksel olarak doğal olarak yetiştirilen bütün bitkilerden elde edilmekte örn. ginsenoside, *Panax quinquefolium*'dan, genellikle 4-6 yıl süren büyük ölçekli mahsul yetiştirme yoluyla farmasötik kullanım için elde edilmektedir (Zhong vd, 1996). Doğal bileşiklerin

ticari üretimini de sınırlayabilen bölgesel ve çevresel kısıtlamalar vardır. Aspirin gibi basit kimyasal yapılara sahip birkaç önemli doğal ürün kemosentez yoluyla üretilirken, diğer karmaşık yapıların sentezlenmesi zordur veya sentez maliyeti ticari mevcudiyetlerinden daha fazladır (Yue vd, 2016; Stevenson ve Szczechlik, 2006).

Karbonhidratlar, lipitler ve proteinler primer metabolitlerin bir parçasıdır. fenolik maddeler, alkaloidler, ligninler ve uçucu yağlar gibi sekonder metabolitler, bitkiler tarafından biyotik ve abiyotik streslere yanıt olarak savunma ile ilgili ürünler olarak üretilir ve böylece bitkiler ve çevre arasındaki ilişkiye aracılık eder (Pagare vd, 2015). Bitkilerin sekonder metabolitleri (BSM), bitki hücresi tarafından primer metabolik yollardan türetilen sekonder metabolik yollar yoluyla üretilen çeşitli biyokimyasal maddeler grubudur (Şekil 2.2).

Hayatta kalmak için çok önemli olan ana metabolik yollarda yer alan primer metabolitlerin aksine, BSM'ler büyüme ve yaşam için gerekli değildir, ancak bitkileri otçullara ve mikroplara karşı korumak da dahil olmak üzere türler arası rekabet ve savunmada önemli roller oynarlar (Kabera vd, 2014; Hussein ve El-Anssary, 2019).



Şekil 2.2. Sekonder metabolitlerin sentezlendiği yaygın biyosentetik yollar (Ramawat vd, 2009).

Şu anda, yaklaşık iki yüz bin farklı BSM izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Kessler ve Kalske, 2018). Kimyasal yapıları ve/veya biyosentez yollarına göre sınıflandırılabilirler (Kabera vd, 2014; De Filippis, 2016; Delgoda ve Murray, 2017; Ashraf vd, 2018; Hussein ve El-Anssary, 2019). Basit bir sınıflandırma üç ana grubu içermektedir: terpenoidler (polimerik izopren türevleri ve asetattan mevalonik asit yoluyla biyosentezlenir), fenolik maddeler (şikimat yollarından biyosentezlenir, bir veya daha fazla hidroksillenmiş aromatik halka içerir) ve alkaloidler (protein olmayan nitrojen içeren bileşikler) (Li vd, 2020). Bazı değerli sekonder metabolitlerin kullanım alanları, kullanıldıkları sektörler ve elde edildikleri bitkiler Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

Görüldüğü gibi, sekonder metabolitler bitkiler için oldukça kullanışlıdır, bu nedenle biyoteknoloji, manipüle etmek ve bizim yararımıza bazı yeni ürünler üretmek için kullanılabilir. Bitki doku kültürü, geleneksel kimyasal yöntemlerin veya bu metabolitlerin büyük ölçekte üretilmesinin mümkün olmadığı durumlarda ikincil metabolitlerin üretilmesi için sıklıkla tercih edilen yöntemdir. Alamgir ve Alamgir'in 2018'de vurguladığı gibi, bu yaklaşım özellikle diğer üretim tekniklerinin mevcut olmadığı veya pratik olmadığı durumlarda tercih edilmektedir.

In vitro bitki doku kültürü teknikleri bu nedenle önemli metabolitlerin üretimi için avantajlıdır, kallus kültürü veya süspansiyon kültürü, mikro çoğaltma, uyarma (elisitör uygulama) işlemi, tüylü kök kültürü, mikro çoğaltma ve biyo-dönüşüm uygulanmakta olan bitki doku kültürü yöntemlerinden bazılarıdır (Wilson ve Roberts, 2012).

2.2.2.1. Fenolik Maddeler

Fenolik maddeler bitkilerde öncelikle şikimik asit ve malonik asit yolları aracılığıyla sentezlenen sekonder metabolitlerdir. Şikimik asit yolu, bitki fenolik maddelerinin çoğunun biyosentezinde rol oynar (Kumar, 2020). Bir veya daha fazla hidroksil ekame edicisine sahip benzen halkaları içerirler ve basit fenolik moleküllerden (Şekil 2.3) yüksek polimerize bileşiklere kadar değişirler (Velderrain-Rodríguez vd, 2014).

Fenolik maddelerin malonik asit yoluyla biyosentezi fungus ve bakteri gibi mikroorganizmalarda yaygındır (Cheynier vd, 2013), ancak bu yol bitkilerde yaygın değildir.

Tablo 2.1. Bazı değerli sekonder metabolitlerin kullanım alanları, kullanıldığı sektörler ve elde edildiği bitkiler (Sökmen ve Gürel, 2001; Rao ve Ravishankar, 2002)

Sektör	Sekonder Metabolit	Kullanım Alanı	Elde Edildiği Bitki
İlaç	Ajmasilin	Antihipertansif	<i>Catharanthus roseus</i>
	Atropin	Antikolinerjik	<i>Atropa belladonna</i>
	Efedrin	Bronş açıcı	<i>Ephedra sinica</i>
	Kamptotesin	Antitümoral	<i>Camptotheca acuminata</i>
	Kapsaisin	Tahriş önleyici	<i>Capsicum frutescens</i>
	Kodein	Analjezik	<i>Papaver somniferum</i>
	Kolşisin	Antitümoral	<i>Colchicum autumnale</i>
	Digoksin	Kardiyonik	<i>Digitalis lanata</i>
	Elliptisin	Antitümoral	<i>Ochrosia elliptica</i>
	Emetin	Ampli dizanteri	<i>Cephaelis spp.</i>
	Morfin	Yatıştırıcı	<i>Papaver somniferum</i>
	Taksol	Antikanser	<i>Taxus brevifolia</i>
	Vinkristin	Antilösemik	<i>Catharanthus roseus</i>
	Kinin	Sıtma tedavisi	<i>Cinchona ledgerana</i>
Gıda	Antosiyanin	Renklendirici	<i>Vitis vinifera</i>
	Betalain	Renklendirici	<i>Beta vulgaris</i>
	Likopen	Renklendirici	<i>Lycopersicum esculentum</i>
	Kinin	Acılaştırıcı	<i>Cinchona ledgeriana</i>
	Vanilin	Koku verici	<i>Vanilla planifolia</i>
	Taumatoksin	Tatlandırıcı	<i>Thaumatococcus daniellii</i>
	Krosetin	Renklendirici	<i>Crocus sativa</i>
	Glisirizin	Tatlandırıcı	<i>Glycyrrhiza glabra</i>
	Humulon	Acı ve koku verici	<i>Humulus lupulus</i>
Parfüm Kozmetik	Yasemin yağı	Parfüm	<i>Jasminum spp.</i>
	Gül yağı	Parfüm	<i>Rosa damascena</i>
	Lavanta yağı	Parfüm ve kozmetik	<i>Lavandula officinalis</i>
Ziraat	Piretrin	İnsektisit	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>
	Yasmodin	İnsektisit	<i>Chrysanthemum cinerariifolium</i>
	Nikotin	İnsektisit	<i>Nicotiana glauca</i>
	Anakardik asit	Molluskusit	<i>Anacardium occidentale</i>

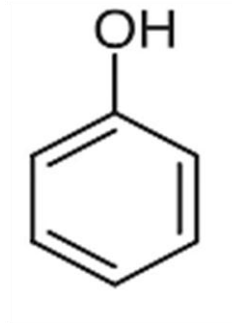
Buna karşılık, fenolik maddelerin şikimik asit yolundan biyosentezi bitkilerde, funguslarda ve bakterilerde daha yaygındır ve hayvanlarda mevcut değildir (Ayoub vd, 2016; Butkhup vd, 2010; Puthur, 2016). Şikimik asit yolu, pentoz fosfat yolundan ve glikolizden türetilen öncüleri kullanarak sık görülen bir ara ürün olan fenilalanin ile çeşitli aromatik amino asitler üretir (Taiz ve Zeiger, 2006; Bartwal vd, 2013; Wu vd, 2022).

Fenolik maddeler bitkilerde bulunan en belirgin sekonder metabolitlerdir ve

dağılımları tüm metabolik süreç boyunca gösterilir. Bu fenolik maddeler veya polifenoller çok sayıda bileşik çeşidi içerir: basit flavonoidler, fenolik asitler, kompleks flavonoidler ve renkli antosiyaninler (Babbar vd, 2014). Bu fenolik maddeler genellikle bitkideki savunma tepkileriyle ilişkilidir. Bununla birlikte, fenolik metabolitler, örneğin tozlaşmayı hızlandırmak için çekici maddelerin dahil edilmesi, kamuflaj için renklendirme ve otçullara karşı savunmanın yanı sıra antibakteriyel ve antifungal aktiviteler gibi diğer işlemlerde de önemli bir rol oynar (Alasalvar vd, 2001; Edreva vd, 2008). Strese bağlı fitokimyasallar da dahil olmak üzere fenolik maddeler, özellikle antioksidan aktivitelerinden dolayı meyve ve sebze tüketiminin neden olduğu olumlu etkilerle ilişkilendirilmiştir (Forni vd, 2019).

Balasundram vd (2006), bitkilerde ve tarımsal-endüstriyel yan ürünlerde fenolik maddelerin antioksidan aktivitesini, oluşumunu ve gizli kullanımlarını gözden geçirmiştir. Bu raporlara göre meyveler, sebzeler ve içecekler insan beslenmesindeki fenolik maddelerin başlıca kaynaklarıdır. İnsan sağlığı ve hastalıklarında diyet antioksidanları olarak bitki polifenollerini oksidatif hasara karşı bir miktar koruma sağlayabilir.

Doğal antioksidanlar olarak fenolik maddeler, gıda ve sağlık hizmetlerinde hayati rol oynayan bitkisel yiyecek ve içeceklerde bol miktarda bulunur. Bazı araştırmalar, fenolik maddelerin sıradan insan beslenmesindeki antioksidanlar arasında en zengin olanı olduğunu göstermiştir. Son zamanlarda fenolik maddeler, çeşitli insan hastalıklarını önlemedeki varsayımsal rollerine ilişkin aktif raporlara dayanarak önemli bir ilgi kazanmıştır (Fiorentino vd, 2008; Sun ve Shahrajabian, 2023).



Şekil 2.3. Fenolün yapısı.

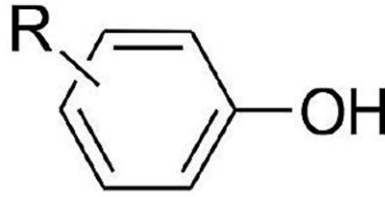
Ahududu, kıvılcık, elma, üzüm, armut ve reçel gibi normal olarak tüketilen taze ve işlenmiş meyvelerin fenolik maddelerin ana kaynakları olduğu ve meyve suları gibi çileklerin ve bunlardan türetilmiş ürünlerin olduğu iyi bilinmektedir (Vattem vd, 2005; Da Silva Pinto vd, 2007).

2.2.2.1.1. Fenollerin Sınıflandırılması

Fenolik maddeler genel olarak basit ve polifenolik bileşikler olarak sınıflandırılabilir (Harborne, 1964; Vermerris ve Nicholson, 2007).

2.2.2.1.1.1. Basit Fenolik Maddeler

Bir fenol birimi (veya bunun bir türevini) içeren fenolik maddeler “basit” olarak kabul edilir. Temel olarak ikame edilmiş fenolik maddeleridir. Basit fenolik bileşikler C₆ genel iskelet temsiline sahiptir. Genel yapı aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.4).

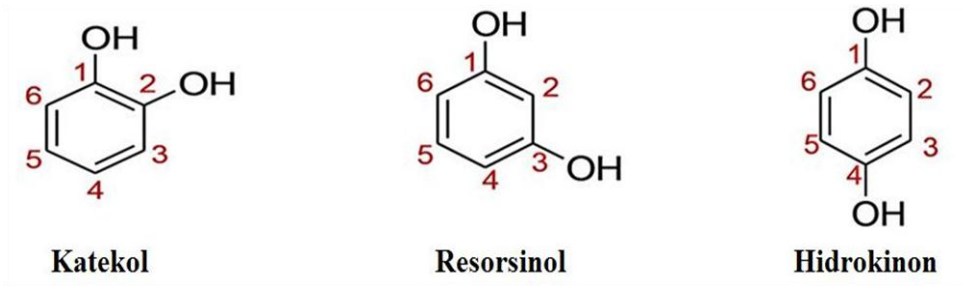


Şekil 2.4. Basit ikame edilmiş fenollerin genel yapısı.

Bu gruptakiler, aromatik halkanın orto (o), meta (m) veya para (p) pozisyonlarında olabilen, “R” (alkil, alkenil, aril...vb. veya hidroksi, alkoksi, amino vb. olabilen organik bir grup) ile ifade edilmektedir. Bu tanımlayıcılar, fenolü oluşturan 1. konum verilen hidroksil grubunun konumuna göre sırasıyla 1,2-, 1,3 ve 1,4-karbon ilişkisine atıfta bulunur. Aşağıda bazı basit fenolik maddelerler verilmiştir (Wloch vd, 2023).

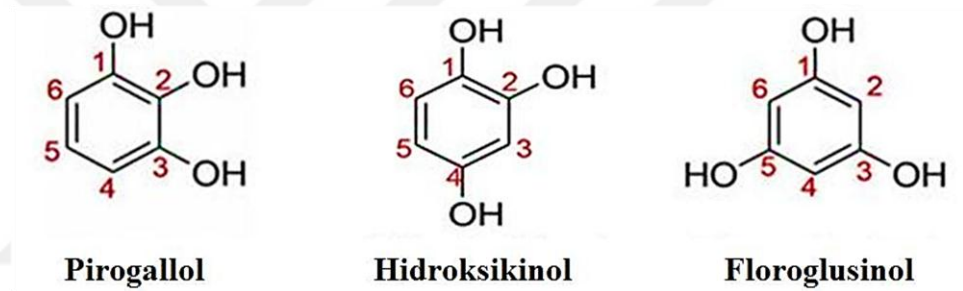
2.2.2.1.1.1.1. Basit Fenolikler

Basit ikame edilmiş fenolik maddeleri, hidroksifenoller veya dihidroksibenzenler olabilir. Örnekler katekol (1,2-dihidroksibenzen), resorsinol (1,3-dihidroksibenzen) ve hidrokinondur (1,4-dihidroksibenzen) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Hidroksil ikameli fenollerin yapısı.

Diğer basit ikameli fenolik maddeleri aynı zamanda dihidroksifenoller veya trihidroksibenzenler de olabilir. Örnekler pirogallol (1,2,3-trihidroksibenzen), hidroksikinol (1,2,4-trihidroksibenzen) ve floroglüsinol (1,3,5-trihidroksibenzen)'dir (Şekil 2.6).



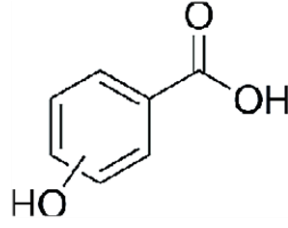
Şekil 2.6. Dihidroksil ile ikame edilmiş fenollerin yapısı.

2.2.2.1.1.1.2. Hidroksibenzoik Asitler

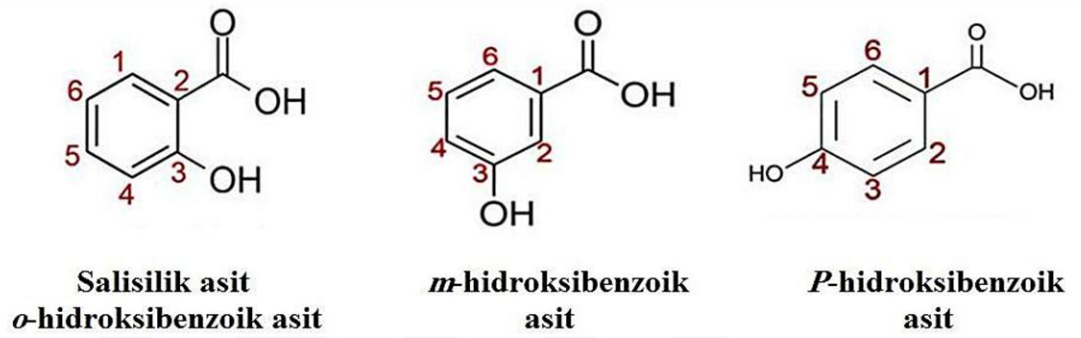
Hidroksibenzoik asitler, bir hidroksil grubu ile ikame edilmiş benzoik asitlerdir. Alternatif olarak, doğrudan fenol halkasına bağlı bir karboksilik asit fonksiyonel grubu ile ikame edilmiş fenoller olarak da görülebilirler (Şekil 2.7). Hidroksibenzoik asitlerdeki hidroksil grubu *orto* (o) (salisilik asit), *meta* (m) veya *para* (p) olabilir. Yapıları aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.8).

Dihidroksibenzoik asitler, iki hidroksil grubu ile ikame edilmiş benzoik asitlerdir. İki hidroksil grubu esas olarak 2,3-, 2,4-, 2,5-, 2,6-, 3,4- ve 3,5- göreceli pozisyonlarında olabilir (Vermerris ve Nicholson, 2007).

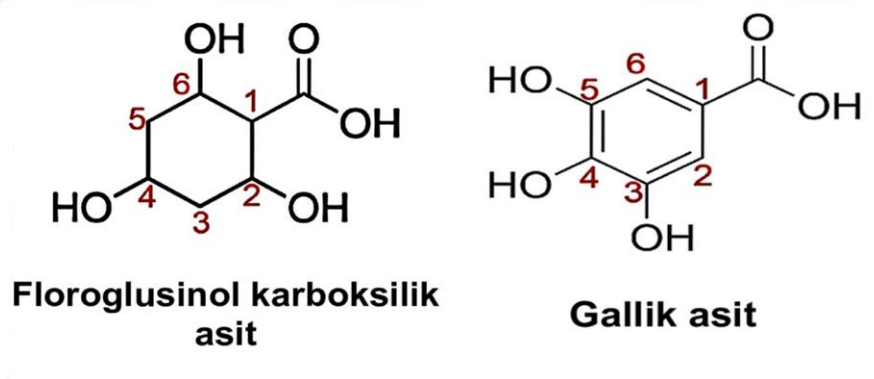
Trihidroksibenzoik asitler, üç hidroksil grubu ile ikame edilmiş benzoik asitlerdir. Örnekler arasında 2,4,6-trihidroksibenzoik asit ve 3,4,5-trihidroksibenzoik asit (gallik asit) yer alır (Şekil 2.9).



Şekil 2.7. Hidroksil ikameli benzoik asitlerin genel yapıları.



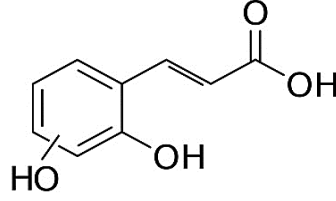
Şekil 2.8. Hidroksibenzoik asitlerin yapıları.



Şekil 2.9. Trihidroksibenzoik asit örnekleri.

2.2.2.1.1.1.3. Hidroksisinnamik Asitler

Karboksilik asit fonksiyonel grubu fenol halkasından a C=C bağıyla ayrıldığında fenolik asitler hidroksisinnamik asitler olarak tanımlanır (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Hidroksil ikameli sinamik asitlerin genel yapıları.

2.2.2.1.1.4. Kumarinler

Doğada kumarin ve türevleri serbest formda bulunabilir veya glikozitler halinde diğer moleküllerle konjuge edilebilir. Bu bileşiklerin çoğunun yenilebilir bitkilerde mevcut konsantrasyonlarda insan sağlığı açısından risk oluşturmadığı düşünülmektedir (Wang vd, 2013).

Kumarinler (1,2-benzopironlar veya 2H-1-benzopiran-2-on), tamamı piron halkasına bağlı bir benzen halkasından oluşan, doğal olarak oluşan benzopiron bileşiklerinin önemli bir ailesini temsil eder (Robledo-O’Ryan vd, 2017). Doğal kumarinler altı temel gruba ayrılabilir: basit kumarinler, furanokumarinler (doğrusal tip ve açısall tip), pironokumarinler (doğrusal tip ve açısall tip), bisoumarinler, benzokumarinler ve kumestanlar (Önder, 2020).

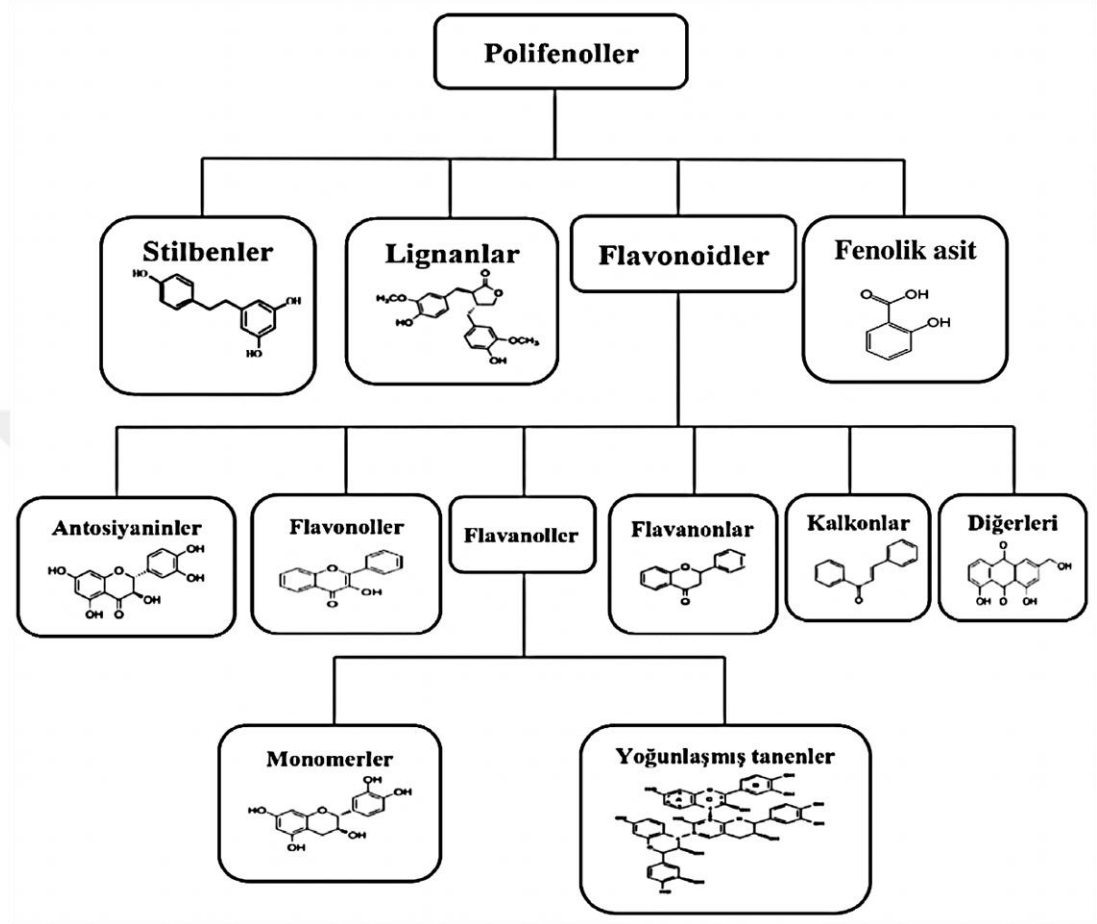
2.2.2.1.1.2. Polifenoller

Polifenoller, şikimat ve/veya poliketit yolundan türetilen sekonder bitki metabolitleridir. Farklı bitkilerde büyük farklılıklar gösterirler ve pigment oluşumunda, patojenlere veya ultraviyole radyasyona karşı savunma mekanizmaları da dahil olmak üzere çevresel streslere direnmede ve kimyasal haberciler olarak hareket etmede önemli roller oynarlar (Fantini vd, 2015).

Polifenoller, fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar gibi birkaç alt sınıfa ayrılan, içerdikleri fenol halkalarının sayısına ve bu halkaları bağlayan yapı elemanlarına göre farklı gruplara ayrılabilirler. Şekil 2.11, farklı polifenol gruplarını ve bunların kimyasal yapılarını göstermektedir (Kuhnau, 1976; Spencer ve, 2008; Pandey ve Rizvi, 2009).

Doğal polifenoller meyveler, sebzeler, çay, tahıllar, tıbbi bitkiler, mikroalgler ve yenilebilir ve yabani çiçekler gibi birçok bitki ve gıdada bulunmuştur (Deng vd,

2013; Li vd, 2012). Bazı yenilebilir ve yabani meyveler değerlendirilmiş ve üzüm, zeytin, yaban mersini, şekerleme, mango ve narenciye meyvelerinin yüksek oranda polifenol içerdiği bulunmuştur (Fu vd, 2010; Deng vd, 2012).



Şekil 2.11. Ana polifenollerin şeması ve kimyasal yapıları. Polifenoller dört ana sınıfa ayrılır: stilbenler, lignanlar, fenolik asitler ve flavonoidler. Sonuncusu altı alt sınıfa ayrılmıştır: antosiyaninler, flavonoller, flavanoller, flavanonlar, kalkonlar ve diğerleri. (de Laureto vd, 2019).

Sebzeler günlük diyetin önemli kaynaklarıdır ve polifenoller açısından zengindir. En yüksek fenolik içerikler Çin toon tomurcuğu (*Toona sinensis*), börülce, kimyon, lotus kökü, tatlı patates yaprağı, soya fasulyesi (yeşil), biber yaprağı, ginseng yaprağı, frenk soğanı ve brokolide bulunmuştur (Guo vd, 2012; Deng vd, 2013). Ek olarak, Akdeniz diyetleri, yüksek oranda polifenol içeren zeytinyağı, meyve ve sebze yeterli miktarda alınması nedeniyle kardiyovasküler hastalık riskinin azalmasıyla ilişkilidir (Xia vd, 2010; Carluccio vd, 2003; Ditano-Vázquez vd, 2019).

Çevresel koşullar, depolama ve gıda işleme gibi günlük gıdalardaki polifenollerin içeriğini etkileyebilecek bir dizi faktör vardır. Örneğin, güneşe maruz kalma, yağış, farklı kültür türleri ve olgunluk derecesi, polifenollerin konsantrasyonlarını ve oranlarını farklı şekillerde etkileyebilir (Gómez-Rico vd, 2006; Bouaziz vd, 2004).

Doğal polifenoller, yaşa bağlı hastalıkların, kanserlerin, kalp hastalıklarının vb. önlenmesi ve tedavisi için çok sayıda biyolojik aktivite ve sağlık yararı göstermiştir, polifenollere olan bu geç ilgi, büyük ölçüde kimyasal yapılarının karmaşıklığı ile açıklanmaktadır (Vaher vd, 2005; Yang vd, 1997; Rysz vd, 2021).

2.2.2.1.1.2.1. Fenolik Asit

Fenolik asitler, bir karboksilik asit grubuna (-COOH) sahip aromatik halkalardan oluşur. Bu fenolik maddeler, bitki bazlı fenolik bileşiklerin ana sınıfını temsil eder. Fenolik asit antioksidan özelliklere sahip olduğu için kardiyovasküler hastalıklara karşı koruma sağlar (Rasouli vd, 2017; Shahidi ve Yeo, 2018; Behl vd, 2020; Baniwal vd, 2021).

2.2.2.1.1.2.2. Flavonoidler

Bir flavonoid, polifenolik bileşiklerin bitki bazlı metabolitlerinin ana grubudur. 15-karbon atomlarından oluşan bu flavonoidlerin bu yapısal bileşimi, 3-karbon atomlu bir zincirle birbirine bağlanan 2 aromatik halkadan oluşur. Flavonoidler, B halkasının bağlı olduğu C halkasına, konfigürasyonuna ve C halkasının oksidasyonuna bağlı olarak birkaç kategoriye ayrılabilir (Harborne, 2013). Flavonoidler esas olarak meyveler, soğan, çay, üzüm, elma, çilek, koka içinde bulunurlar ve hücre sinyali, anti-trombojenik, nöroprotektif özellikler dahil olmak üzere çok sayıda sağlık özelliği sergilerler (Ballard ve Junior, 2019).

2.2.2.1.1.2.3. Flavonoller

Flavonoller, C2-C3 ve karbonil C4 arasındaki çift bağdan oluşan bir flavonoid ailesi kategorisidir. Flavonoller kuersetin, kaempferol içerir, mirisetin her yerde bulunan bitki flavonoidleridir ve lahana, soğan, marul ve domates gibi çok sayıda meyve ve sebzede bulunur (Sandu vd, 2017). Klinik çalışmalardan ortaya çıkan kanıtlar, bu flavonollerin kardiyovasküler hastalıkların ön tedavisinde ve önlenmesinde, hücre yenilenmesinde, kan pıhtılaşmasını önlemede, insan diş etlerinde ve diğer kalple ilgili hastalıklarda potansiyele sahip olduğunu göstermiştir

(Singla vd, 2019; Behl vd, 2020).

2.2.2.1.1.2.4. İzoflavonlar

İzoflavonlar, bitkilerden elde edilen steroidal olmayan bileşikler olan bir tür fitoöstrojendir (Nikolić vd, 2017). İzoflavonlar, fenil grubu yerine yapı olarak 4H-1-benzopiran-4-on'a sahiptir (Singla vd, 2019). İzoflavonlar, yüksek bitkilerde flavon gruplarının üretilmesine yardımcı olan fenilpropanoid yolu ile elde edilir. İzoflavonlar soya fasulyesi ve soya fasulyesi ürünlerinden elde edilir. Daidzein ve genistein olmak üzere 2 temel bileşene sahip olduğu için soya fasulyesinde izoflavon içeriği yüksektir (Zaheer ve Humayoun Akhtar, 2017).

Araştırmalar, izoflavonların menopoza bağlı semptomları iyileştirmek için potansiyel kullanımını ve ayrıca kimyasal-koruyucu özelliklere sahip olduklarını düşündürmektedir (Rasouli vd, 2017). Çalışmalar ayrıca çeşitli hormonal bozuklukların, kalp ile ilgili bozuklukların, osteoporozun, kanserin (meme ve prostat) tedavisinde yardımcı olduğunu göstermektedir. Çalışmalar ayrıca aşırı izoflavon tüketiminin hipotalamik-hipofiz-yumurtalık ekseninin uygunsuz gelişimine yol açabileceğini ve ayrıca üreme sisteminin eksik gelişimine yol açabileceğini düşündürmektedir (Nikolić vd, 2017).

2.2.2.1.1.2.5. Flavanonlar

Turunçgiller, bazı aromatik bitkiler ve domates, flavonoidlerde küçük bir kısım oluşturan flavanonların bazı kısımlarıdır. Tatlandırıcı özelliklerinden ayrı olarak insan sağlığının büyük bir bileşeni olarak kabul edilirler. Limondan elde edilen eriodyctiol, portakaldan elde edilen hesperidin ve greyfurttan elde edilen naringenin flavanonları oluşturur (Calderón-Oliver ve Ponce-Alquicira, 2018). Bunun yanı sıra flavanonlar ayrıca o-metilasyon, glikosilasyon ve hidroksilasyon gibi çeşitli kimyasal işlemlere tabi tutulur (Singla vd, 2019).

Bergamot suyu, yani *Citrus bergamia*'nın içinde büyük miktarlarda flavonoidler olduğu bulunmuştur (Mandalari vd, 2006). Bu, ateroskleroz, lipid profili ve lipoproteinler gibi kardiyovasküler metabolizmalar üzerinde ekstraktının çeşitli avantajlarına yol açan Bergamot'ta serum lipidlerinin varlığının azaldığını göstermiştir. Ayrıca, bu ekstraktın altı aydan fazla tüketilmesinin lipid düzeylerinin düşmesine yol açtığı ve Düşük Yoğunluklu Lipoprotein (LDL) düzeylerinin tespit edilmesiyle kardiyovasküler olayların tanımlanabileceği de bulunmuştur (Behl vd,

2020).

2.2.2.1.1.2.6. Antosiyanidinler

Antosiyanidinler, meyve ve sebzelerde renkten (kırmızı, pembe, mor) birincil olarak sorumlu olan pigmentlerdir (Wrolstad, 2004). Meyveler, sebzeler ve çiçeklerdeki çeşitli renkler, epidermislerindeki antosiyanidin varlığından kaynaklanmaktadır. Turp, pancar, böğürtlen, çilek ve kiraz gibi farklı meyve ve sebzeler yeterli bir antosiyanidin kaynağıdır (Welch vd, 2008). *Aronia* meyveleri, artan antioksidan özellikleri nedeniyle oldukça ünlüdür, bunun bir nedeni yüksek antosiyanin içeriği olabilir (Krga ve Milenkovic, 2019).

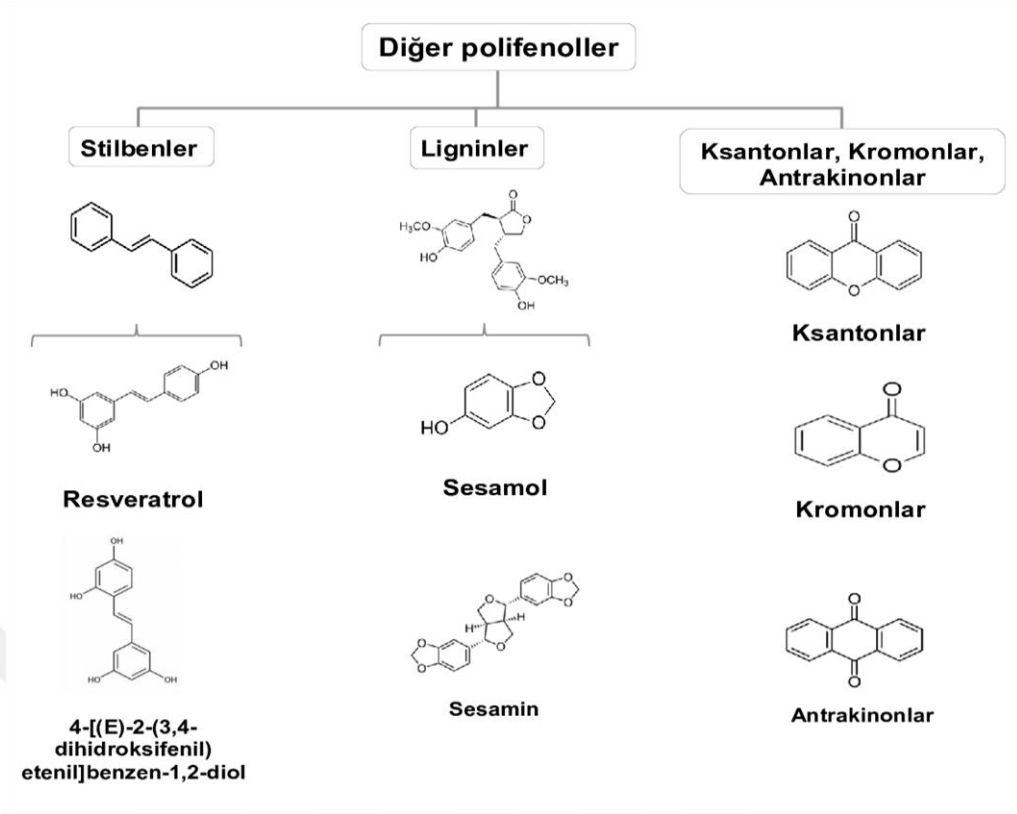
Yaban mersini kullanılarak üretilen antosiyanin kapsülleri, yapılan araştırmalar sonucunda antosiyanin tedavilerinin plazma Kolesterol Ester Transfer Proteini (CETP) kütlelerinde değişikliklere neden olduğunu kanıtlamıştır. Yapılan çalışmalar, yaban mersini tüketiminin sistolik kan basıncını azaltabileceğini göstermiştir (Gaspar vd, 2021).

2.2.2.1.1.2.7. Flavonlar

Flavonlar genellikle tahıllarda, kerevizde, maydanozda ve brokolide bulunur. Ayrıca turuncgillerin dış tabakasında da bol miktarda bulunurlar. Flavonların Koroner arter hastalığı (CAD) üzerinde ters etkiye sahip olduğu tescillenmiştir (Cutrim ve Cortez, 2018). Flavonların bir bileşeni olan mandalina, vücutta bulunan düz kasların çoğalmasını teşvik eden trombosit oluşumunu etkisiz hale getirerek ateroskleroz ve restenoza yol açar. Nobiletin içeren narıncıya tüketerek kanser ve iltihaplanma önlenir. Nobiletinin trombosit aktivasyonuna yardımcı olduğu çeşitli deneylerle bilinmektedir (Jiang vd, 2016).

2.2.2.1.1.2.8. Diğer Polifenoller

Stilbenler (resveratrol, piceatannol), Lignanlar (sesamol, pinoselinol, sinol, enterodiol) dahil olmak üzere diğer polifenoller ve tanenler (hidrolize edilebilir, hidrolize edilemeyen ve yoğunlaştırılmış tanenler), ligninler de dahil olmak üzere diğerleri de geniş bir terapötik ve endüstriyel uygulama yelpazesine sahiptir (Rasouli vd, 2017; Singla vd, 2019; Kumar vd, 2021). Doğada bulunan diğer bazı polifenollere genel bir bakış Şekil 2.12'te sunulmaktadır.



Şekil 2.12. Diğer polifenol türleri (Prabhu vd, 2021).

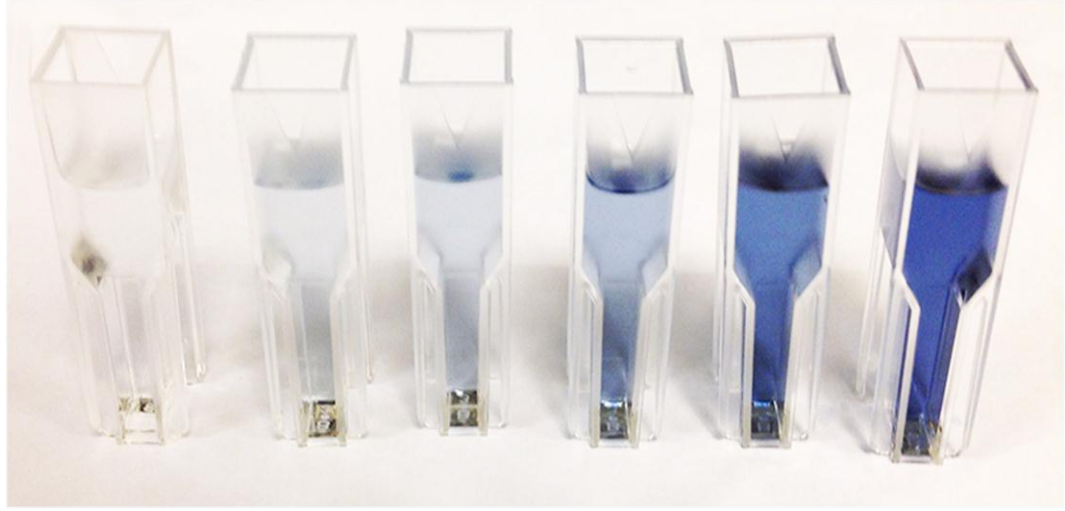
2.3. Toplam Fenolik Maddeleri Ölçme Yöntemleri

Fenolik maddelerin analizi için en önemli adımlar numune hazırlama ve ekstraksiyon, ardından çeşitli yöntemler kullanılarak sınıflandırma ve miktar belirlemedir. Fenolik maddeler, kolorimetrik, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler dahil olmak üzere çeşitli teknikler kullanılarak ölçülebilir (Alara vd, 2021).

2.3.1. Toplam Fenolik Maddelerin (TFM) Folin-Ciocalteu Spektrofotometrik Yöntemiyle Tayini

Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi, biyolojik materyallerdeki toplam fenollerin belirlenmesi için iyi tekrarlanabilirliğe sahip, kullanışlı bir analitik tekniktir. FC yöntemine dayalı birçok niceliksel veri rapor edilmiştir (Huang ve Prior, 2005; Everette vd, 2010). Bu yöntem kullanılarak elde edilen sonuçların doğruluğu, kullanılan eşdeğer standartlara, reaktiflerin eklenme sırasına ve molibden VI içeren Folin-Ciocalteu reaktifine (FCR) göre belirlenir. Fenolik bileşikler, Mo^{6+} 'nın mavi olan (Şekil 2.13) ve 730 nm'de optik olarak ölçülebilen Mo^{5+} 'ya indirgenmesine

dayanarak belirlenir (Huang ve Prior, 2005).



Şekil 2.13. Folin-Ciocalteu yöntemi.

FCR ve fenolik bileşiklerin karışımı asitte stabildir ancak alkalik solüsyonda kararsızdır. Bu nedenle alkalik bir ortam sağlamak için kullanılan sodyum karbonat reaksiyon için kritik öneme sahiptir.

FC yöntemi kullanışlı ve basit bir yöntemdir. FC yöntemi özel bir ekipman gerektirmez ve botanik örneklerin karakterizasyonu ve standartlaştırılmasında faydalı olabilir (Prior ve Schaich, 2005). FC yönteminin önemli bir avantajı, şaraplardaki farklı fenolik maddelere eşdeğer tepki vermesi ve bu yöntemin toplam fenolik bileşiklerin doğru bir şekilde ölçülmesi için uygun olmasıdır (Waterhouse, 2002). Buna göre, FC yöntemine dayanan toplam fenolik içeriklerin belirlenmesi, şarapları ve alkollü içecekleri, meyve sularını, bitki dokularını, sorgum tanesini ve diğer benzer ürünleri karakterize etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Singleton ve Lamuela-Raventós, 1999). FC yöntemi, görünen toplam fenol içeriğine katkıda bulunan, kolayca oksitlenebilen benzer maddelerin seçici oksidasyonuna dayanır.

2.3.2. Gaz Kromatografisi

Gaz kromatografisi (GC), fenolik asitler, yoğunlaştırılmış tanenler ve flavonoidler gibi fenolik bileşiklerin ayrılması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesi için uygulanan başka bir tekniktir (Shi vd, 2022). Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) tekniklerine uygulanamayan GC analizinin ana endişeleri, fenolik bileşiklerin türetilmesi ve uçuculuğudur. GC ile, gıda matrislerinden fenoliklerin miktarının belirlenmesi, ekstraktan lipitlerin çıkarılması,

fenoliklerin glikozitten salınması ve enzimatik, alkalın ve asidik ester bağları gibi temizleme adımlarını içerebilir. (Nasr ve Zhu, 2019).

2.3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HPLC, fenolik bileşiklerin hem ayrılması hem de miktarının belirlenmesi için kullanılan bir tekniktir (Thuy vd, 2021). Numune saflaştırması, mobil faz, kolon tipleri ve dedektörler dahil olmak üzere fenolik bileşiklerin HPLC analizini etkileyen çeşitli faktörler vardır. Genel olarak saflaştırılmış fenolikler, ters fazlı C18 kolonu (RP-C18), foto diyot dizisi dedektörü (PDA) ve polar asitlendirilmiş organik çözücüler kullanılarak bir HPLC cihazına uygulanır (Tagliani vd, 2019).

2.3.4. Fenolik Maddelerin Ayırma ve Miktarının Belirlenmesine Yönelik Diğer Tahliller

Kağıt Kromatografisi (PC) ve İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), gıdalardaki fenolik maddelerin ayrılması için kullanılan iki ayırma tekniğidir (Naczki ve Shahidi, 2006). PC basit bir yöntemdir ve HPLC ve GC'ye kıyasla daha az kullanılır.

TLC, özellikle ham bitki ekstraktlarındaki fenolik maddelerin analizinde PC'den daha güçlü bir tekniktir. Ham bitki ekstraktlarındaki fenolik maddeler, ucuz olan ve aynı TLC plakası üzerinde kısa analiz süresinde çoklu tespit sağlayan bir dizi TLC tekniğiyle ayrılabilir (Ignat vd, 2011).

Yüksek Hızlı Karşı Akım Kromatografisi (HSCCC), karışım bileşenlerini izole etmek ve ayırmak için kullanılan iki fazlı bir sıvı-sıvı bölümlendirme yöntemidir (Naczki ve Shahidi, 2004). Bu benzersiz teknik, çeşitli doğal bileşikleri saflaştırmak ve ayırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır.

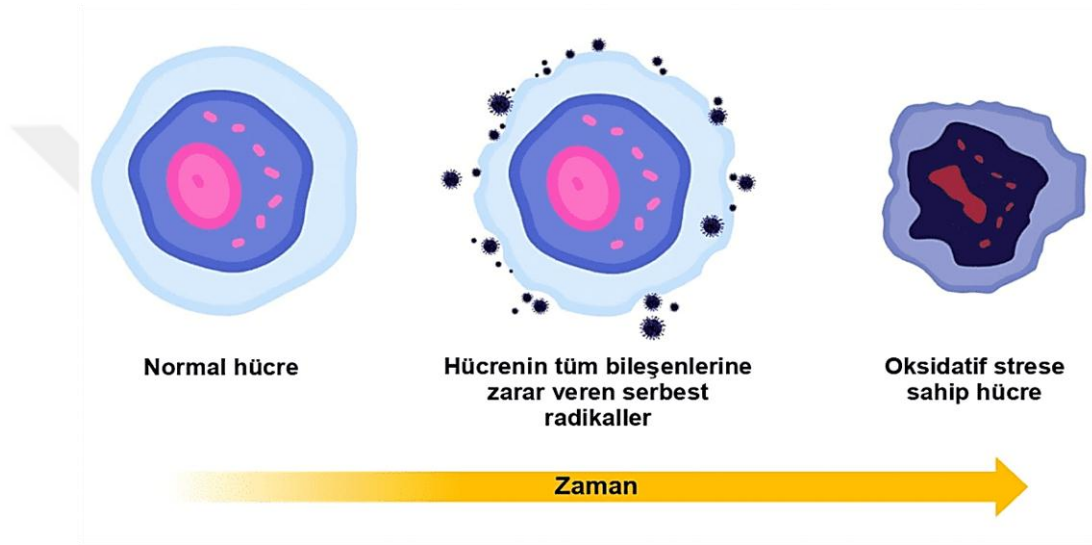
Kılcal Elektforez (CE), dar bir kılcal kolondaki iyon çözeltisiyle gerçekleştirilen yüksek çözünürlüklü bir tekniktir. Yüklü düşük ve orta moleküler ağırlıklı bileşikler yüksek çözünürlükle hızlı ve verimli bir şekilde tanımlamaya uygundur ve düşük numune ve reaktif hacmi gereksinimlerine sahiptir (Prabhu vd, 2023).

Fenolik maddeleri analiz etmek ve tanımlamak için kullanılan diğer çok yönlü kromatografik teknik, Süperkritik Akışkan Kromatografisidir (SFC). Diğer iyi bilinen kromatografik tekniklerle (HPLC ve GC) karşılaştırıldığında SFC, yüksek ayırma verimliliğine, yüksek çözünürlük gücüne, kısa analiz süresine sahiptir, çevre

dostudur ve farklı dedektör türleriyle uyumludur (He vd, 2019).

2.4. Oksidatif Stres

Oksidatif stres (OS), “reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açan biyokimyasal süreçler ile ROS'un uzaklaştırılmasından sorumlu olanlar arasındaki dengesizlik” olarak tanımlanır (Daenen vd, 2019). Lipidler, proteinler ve DNA dahil olmak üzere önemli biyolojik öneme sahip moleküller için ciddi bir tehlikeyi temsil eder (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Oksidatif stres ve 3 resimdeki oksidatif strese maruz kalmış hücre.

OS, kanser gibi çok sayıda hastalığa katkıda bulunan bir faktör olarak kabul edilir (Tekiner-Gulbas vd, 2013; Wang vd, 2014); romatoid artrit (Veselinovic vd, 2014; Hosseinzadeh vd, 2016); pulmoner ve böbrek (Yang vd, 2014; Leibowitz vd, 2016) başarısızlıkları; Kalp yetmezliği, hipertansiyon, iskemi, ateroskleroz, kardiyak hipertrofi ve kardiyomiyopati (Zampetaki vd, 2013; Matsuda ve Shimomura, 2014); ve nörokenerasyon dahil olmak üzere çeşitli kardiyovasküler hastalıklar. Daha sonra Alzheimer, Parkinson'un, Hafıza Kaybı, Multipl Skleroz, Depresyon, vb. Bu nedenle, insan sağlığını korumak için OS kaynaklı moleküler hasarı hafifletmek esastır. Enzimatik savunma sistemlerine ek olarak, kimyasal antioksidanlar bu amaca ulaşmak için uygun bir araçtır. Fenolik maddeler doğada her yerde bulunur, beslenmemizde bol miktarda bulunur ve tartışmasız antioksidanların en paradigmatic ve bilinen örneğidir (Adebo ve Gabriela Medina-Meza, 2020).

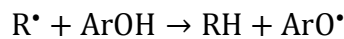
2.5. Bitki Fenolik Maddelerinin Antioksidan Özellikleri

Gıda fenoliklerine olan ilgi, antioksidan ve serbest radikal temizleme yetenekleri ve potansiyel sağlık yararları nedeniyle büyük ölçüde artmıştır. Gıdalarda veya tıbbi malzemelerde, bazı durumlarda kanserojen olduğu bildirilen sentetik antioksidanların yerini alacak, doğal olarak oluşan antioksidanların bulunmasına yönelik ilgide büyük ölçüde artış olmuştur (Uzombah, 2022).

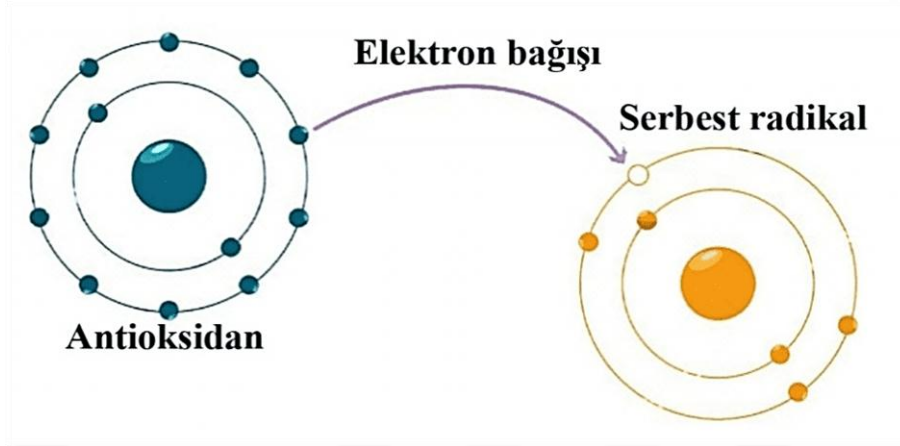
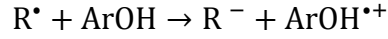
Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda biyomoleküllerin (proteinler, nükleik asitler, çoklu doymamış lipitler, şekerler) serbest radikal aracılı reaksiyonlar yoluyla oksidatif hasara uğramasını önleyebilen bileşiklerdir (Sindhi vd, 2013). Oksitleyici zincir reaksiyonlarını, reaktif oksijen türlerinin doğrudan baskılanması, enzimlerin inhibisyonu ve metal iyonlarının (Fe^{3+} , Cu^{+}) şelasyonu dahil olmak üzere çeşitli yollarla inhibe edebilirler. Yararlı etkileri, oksidatif süreçlerin belirgin olduğu hastalıklarla (ateroskleroz, koroner kalp hastalığı, bazı tümörler ve yaşlanma) ilişkilidir (Pisoschi ve Pop, 2015; Soberanes vd, 2019).

Aslında meyve, sebze, tahıl ve zeytinyağı açısından zengin bir beslenme, kalp-damar hastalıklarını ve bazı kanser türlerini önleyebilir (Badimon vd, 2019). Bu yaygın gıdaların başlıca antioksidan bileşenleri fenolik maddelerdir. Antioksidan aktivitelerinin moleküler yapılarıyla, daha kesin olarak hidroksil gruplarının varlığı ve sayısı ve konjugasyon ve rezonans etkileriyle ilişkili olduğu görülmektedir (Al-Mamary ve Moussa, 2021).

Son zamanlarda kuantum mekaniksel bir araştırma, flavonollerin antioksidan etkisinin, bitişik halkalar arasında genişletilmiş elektronik delokalizasyona izin veren düzlemsel bir konformasyon gösteren radikallerle ilişkili olduğunu göstermiştir (Brovarets ve Hovorun, 2020). Antioksidanların koruyucu rol oynayabileceği iki ana mekanizma öne sürülmüştür (Wright vd, 2001). İlkinde serbest radikal, antioksidandan ($ArOH$) bir hidrojen atomunu uzaklaştırır ve kendisi de radikal haline gelir:



İkinci mekanizmada (tek elektron transferi), aşağıdaki şekilde (Şekil 2.15) belirtildiği gibi antioksidan serbest radikale bir elektron vererek kendisi de radikal katyon haline gelebilir:



Şekil 2.15. Oksidatif stres.

2.6. Antioksidan Aktivitenin Ölçülmesi

Antioksidanların aktivitesini ölçmek için kullanılan yöntem ve araçlar son birkaç on yılda dikkate değer ilerlemeler kaydetmiştir. Şimdiye kadar, antioksidan aktiviteyi, örneğin farklı serbest radikal türlerine veya ROS'a karşı temizleme aktivitesi, gücü azaltma ve metal şelasyonu gibi özel yöntemlerle değerlendirmek için oldukça hassas ve otomatik tespit teknolojileriyle birleştirilmiş çeşitli kimyasal testler kullanılmaktadır (Shahidi ve Zhong, 2015).

Hidrojen atomunun transferinin veya elektronların antioksidanlardan serbest radikallere transferinin doğrudan ölçümü için çok sayıda test mevcuttur. Bu yöntem grubunda rapor edilen antioksidan aktiviteler genellikle bazılarının yapay ve biyolojik olarak alakasız olabileceği belirli tipteki radikal türlerini nötralize etme kapasiteleriyle ilişkilidir (Li vd, 2024).

Tablo 2.2. Antioksidan aktiviteyi ölçmek için kullanılan farklı teknikler

Teknikler	Antioksidan Kapasite Testi	Yöntemin Prensibi	Son Ürün Belirleme
Spektrometri	ORAC	2,2'-azobis-2-amidino-propan (AAPH) tarafından indüklenen peroksil radikalleriyle antioksidan reaksiyon	Floreseinin floresans kaybı
	HORAC	Co(II) bazlı Fenton benzeri bir sistem tarafından üretilen OH radikallerini söndürmeye yönelik antioksidan kapasitesi	Floreseinin floresans kaybı
	TRAP	AAPH ayrışmasından kaynaklanan luminol türevi radikalleri temizlemeye yönelik antioksidan kapasitesi	Kemilüminesans söndürme
	CUPRAC	Antioksidanlar yoluyla Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi	Kolorimetri
	FRAP	Fe(III) kompleksi ile antioksidan reaksiyon	Kolorimetri
	PFRAP	Antioksidanlar yoluyla potasyum ferrisiyanürün indirgenmesi ve ardından potasyum ferrosiyanürün Fe^{3+} ile reaksiyonu	Kolorimetri
	ABTS	Organik katyon radikaliyle antioksidan reaksiyonu	Kolorimetri
	DPPH	Organik bir radikalle antioksidan reaksiyonu	Kolorimetri
	Florimetrik Analiz	Işığ ı veya farklı dalga boyundaki diğ er elektromanyetik radyasyonu emen bir bileş ik tarafından ış ık emisyonu	Floresan uyarma/emisyon spektrumlarının kaydedilmesi

Tablo 2.2. Devamı

Teknikler	Antioksidan Kapasite Testi	Yöntemin Prensibi	Son Ürün Belirleme
Elektrokimyasal Teknikler	Voltametri	Uygulanan potansiyelde, çalışma elektrotunun yüzeyindeki bir bileşiğin indirgenmesi veya oksidasyonu, yeni malzemenin elektrot yüzeyine kütleli taşınmasıyla ve bir akımın üretilmesiyle sonuçlanır	Katodik/anodik tepe akımının ölçümü
	Amperometri	Çalışma elektrodunun potansiyeli referans elektroda göre sabit bir değere ayarlanmıştır	Elektroaktif bir analitin oksidasyonu/redüksiyonu ile üretilen akımın ölçümü
	Biamperometri	Analitin (antioksidan) tersinir gösterge redoks çiftinin oksitlenmiş formuyla reaksiyonu	Küçük bir potansiyel farkında ve analiz edilen numuneyi ve tersinir bir redoks çiftini içeren bir çözeltiye daldırılmış iki özdeş çalışma elektrotu arasında akan akımın ölçümü
Kromatografi	Gaz kromatografisi	Bir karışımdaki bileşiklerin ayrılması, sıvı sabit faz ile gaz hareketli faz arasındaki yeniden bölümlenmeye dayanır.	Alev iyonizasyonu veya termal iletkenlik tespiti
	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi	Bir karışımdaki bileşiklerin ayrılması, mobil fazın yüksek akış hızı ve basıncında, farklı polaritelere sahip bir katı sabit faz ile sıvı bir mobil faz arasında yeniden bölümlendirmeye dayanır.	UV-Vis (örn. diyet dizisi) tespiti, florimetrik tespit, kütle spektrometresi veya elektrokimyasal tespit

Bununla birlikte, hidrojen atomu transferine ilişkin veriler veya bu yöntemlerle elde edilen elektronların aktarım kapasitesine ilişkin veriler, bunların minimum çevresel müdahaleyle içsel antioksidan potansiyelleri hakkında önemli bilgiler sağlar. Bu testler bir lipid substratı gerektirmez ve normalde bir oksidan (serbest radikaller veya diğer ROS), oksitleyici bir substrat (bazı testlerde buna gerek yoktur) ve araştırılmakta olan antioksidanlar içeren bir kimyasal sistem kullanır.

Antioksidan kapasitenin değerlendirilmesine yönelik çeşitli yöntemler, Tablo

2.2.'de sunulduğu gibi spektrometri, elektrokimyasal analizler ve kromatografi olmak üzere üç ayrı kategoriye ayrılır (Moharram ve Youssef, 2014).

2.7. Bitki Fenolik Maddelerinin Antibakteriyel ve Antifungal Aktiviteleri

Bitkiler, mikrobiyal enfeksiyonlar gibi savunma/stres koşullarının üstesinden gelmek için muazzam bir fitokimyasal koleksiyonu sağlar. Tarih boyunca çeşitli şifalı bitkiler veya bunların özleri insan veya hayvanlardaki bulaşıcı hastalıkların tedavisinde uygulanmıştır. Modern tıpta bilim adamları, bazı spesifik fitokimyasalların mikropları etkisiz hale getirme potansiyeline sahip olduğunu bulmuşlardır. Ancak yirminci yüzyılın ortalarında antibiyotiklerin keşfinden sonra antimikrobiyal fitokimyasallar genellikle unutulmuştur. Günümüzde ilaca dirençli bakterilerin ortaya çıkmasıyla birlikte antibakteriyel bitkilere ve bunların aktif fitokimyasallarına olan ilgi her geçen gün artmaktadır (Barbosa vd, 2021).

Fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve tanenler gibi bitki kaynaklı fenolikler, gıdayla ilişkili patojenlerin yanı sıra klinik açıdan önemli bakteriler, funguslar ve protozoalar da dahil olmak üzere birçok mikroorganizmanın büyümesini ve aktivitesini inhibe edebilir (Domínguez vd, 2018; Barouh vd, 2022).

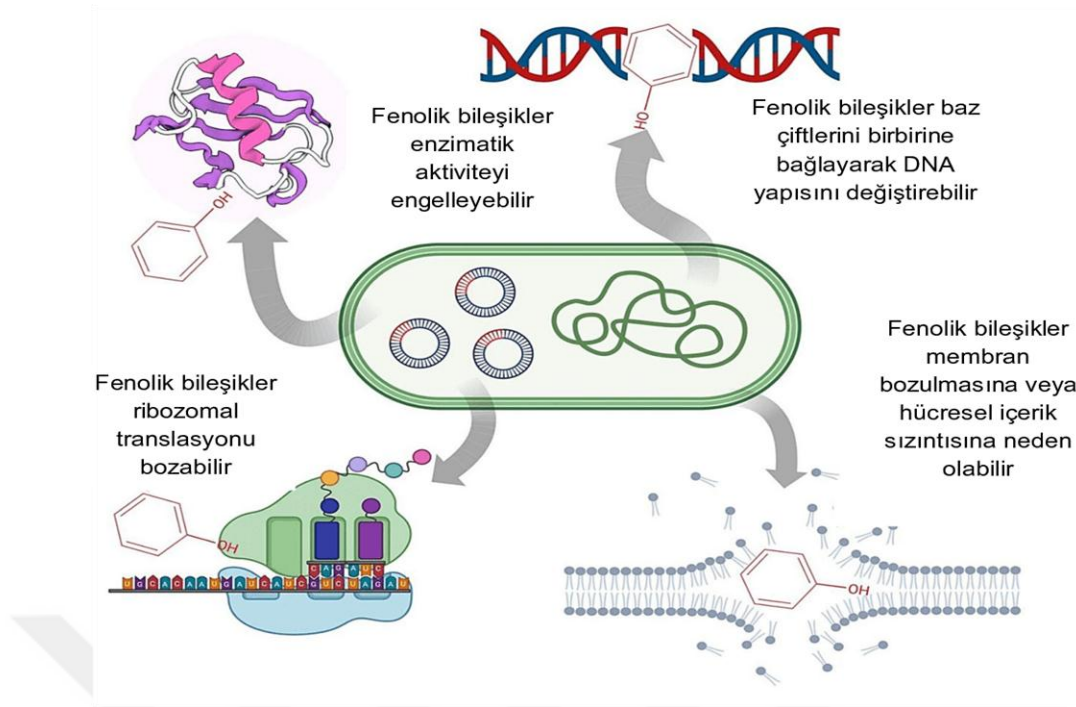
Farklı moleküller yapıları ve kimyasal bileşimleri bakımından farklılık gösterdiğinden, plazma zarının geçirgenliği ve dengesizleşmesi veya hücre dışı enzimlerin inhibisyonu gibi çeşitli antimikrobiyal etkiler gösterebilirler (Hu vd, 2022). Üstelik bu etki mekanizmaları, bitki fenoliklerini ilaca dirençli patojenlere karşı etkili hale getirebilen geleneksel antibiyotiklerinkinden farklıdır.

Üstelik bu etki mekanizmaları, bitki fenoliklerini ilaca dirençli patojenlere karşı etkili hale getirebilen geleneksel antibiyotiklerinkinden farklıdır (Górniak vd, 2019). Tablo 1. fenolik maddelerin temel iskeletini, ana kaynaklarını ve özelliklerini özetlemektedir.

Fenolik maddeler biyolojik yapılarda sentezlenen çok çeşitli bileşiklerle etkileşime girer; bu bileşikler fenoliklerin biyolojik aktivitesi için moleküler hedefler olarak hareket edebilir. Mevcut veritabanları, fenolik maddelerin, çoğu mikrobiyal/bakteriyel metabolizmada yer alan çok sayıda bileşiklerle etkileşime girebileceğini göstermektedir (Wishart vd, 2018). Fenolik maddeler bakterilere karşı farklı düzeylerde ve metabolik yollarda etki gösterir. Nükleik asitlerin yapısı ve oluşumu, hücre zarının ve çeşitli enzimlerin yapıları gibi etkilenebilir (Şekil 2.16).

Tablo 2.3. Fenolik maddelerin temel iskeleti, kaynakları ve özellikleri

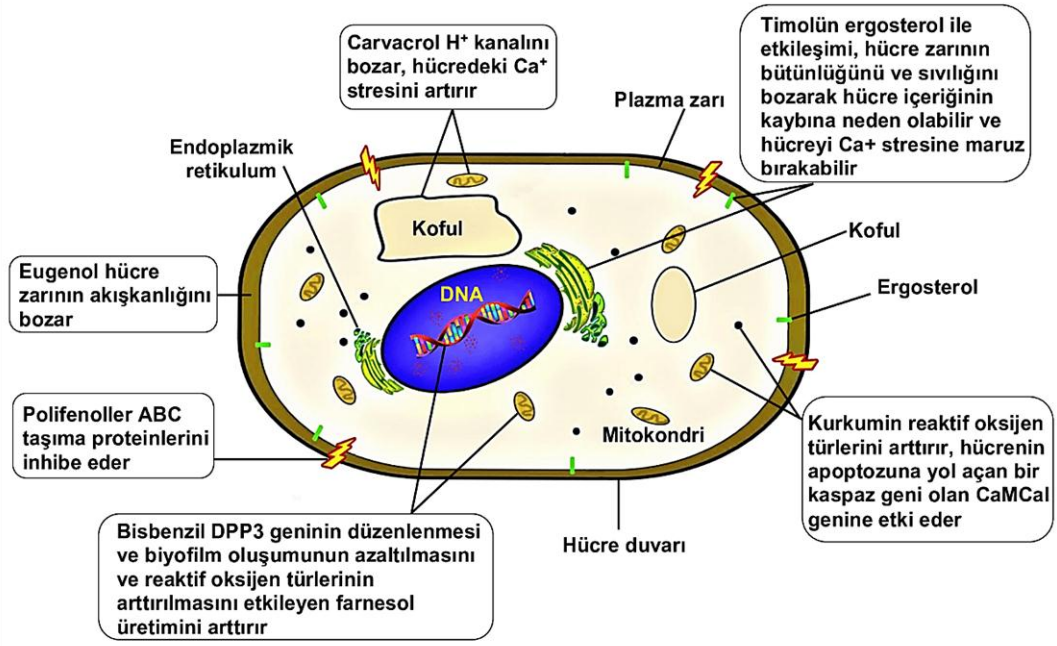
Fenolik maddekler	Temel İskelet	Ana kaynaklar	Özellikler	Kaynaklar
Flavonoidler (flavanonlar, flavonoller, flavanon, izoflavonlar, flavanoller, kuersetin, antosiyanin)	C6–C3–C6	Çok çeşitli kaynaklar (meyveler, otlar, kakao, üzüm, yeşil ve siyah çay, turunçgiller, ıspanak, soya fasulyesi, zeytin, kiraz ve kırmızı şarap)	Antioksidan, antimikrobiyal, anti-enfektif ve antifungal aktiviteler	(Deshmukh ve Gaikwad, 2022; Durazzo vd, 2019)
Tanenler (hidrolize edilebilir tanenler, yoğunlaşabilir tanenler)	C6–C1	Çay, kahve, çikolata, meyveler, elmalar ve şarap	UV emilimine ek olarak antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan özellikler	(Albuquerque vd, 2021)
Fenolik asitler (hidroksibenzoik asit (gallik asit, sinapik asit, ellagik asit) ve hidroksisinnamik asit (kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit))	C6–C1 ve C6–C3	Meyveler, hurma, elma suyu, üzüm, hardal, portakal, çavdar, kahve, fungus, propolis, çay ve şarap	Antioksidan, antimikrobiyal ve anti-enfeksiyon faaliyetleri	(Manassis vd, 2020)
Lignanlar matairesinol, pinoresinol, sekoizolarisiresinol	C6–C3	Keten tohumu, susam, baklagiller, tam tahıllar ve meyveler gibi yağlı tohumlar	Antioksidanlar ve antimikrobiyal özellikler	(Mark vd, 2019)
Stillbenler (resveratrol, pinosilvin, piceid)	C6–C2–C6	Üzüm, çam, badem, yer fıstığı, sorgum, meyveler ve şarap	Antioksidan ve anti-enfektif aktiviteler	(Durazzo vd, 2019; Manassis vd, 2020)
Ligninler	C3–C6	Ladin, jüt, pamuk, kenevir, çam ve huş ağacı	Antioksidanlar ve antimikrobiyal özellikler	(Faustino vd, 2010; Pouteau vd, 2003)
Kumarinler	C6–C3	Tarçın, karanfil, tonka fasulyesi, kereviz ve kayısı	Antioksidanlar ve antimikrobiyal özellikler	(Manassis vd, 2020)



Şekil 2.16. Fenolik-bakteriyel hücre etkileşimlerinin potansiyel mekanizmaları (fenol yapısı, çeşitli fenolik maddeleri temsil eden bir yer tutucudur).

Seçici bir toksisiteyi tesbit etmenin zorluğu nedeniyle, ökaryotik mikroorganizmalarla mücadele mücadele genelde zordur. Bu nedenele fungus enfeksiyonları hala günlük yaşamla ilgili en yaygın ve önemli sorunlardan biri olmaya devam ediyor. Fungusların çoğunun yaygın olarak kullanılan antifungal ilaçlara karşı direnç geliştirmesi ve bazılarının insanlarda da toksik etki göstermesi nedeniyle bunlara karşı etkili, daha az toksik ve daha etkili bir ilaç henüz gündeme gelmemektedir.

Böyle bir senaryoda, doğal fenolik maddelerin, daha az toksik etkisi olan veya hiç toksik etkisi olmayan, çok güçlü antifungal ajanlar oldukları kanıtlandığı için fark edilmeye başlanmıştır. Sadece kendileri antifungal ajan olarak değil, aynı zamanda halihazırda kullanılan antifungal ajanlarla sinerji içinde de kullanılabilirler. Ayrıca farklı funguslardaki farklı hedefler üzerinde çeşitli etki modları yoluyla etki gösterebilirler (Şekil 2.17) (Ansari vd, 2013; Letsiou vd, 2024).



Şekil 2.17. Farklı antifungal fenolik maddeler ve bunların funguslardaki etki şekilleri.

2.8. Bitki Doku Kültürü Tarihçesi

Bitki doku kültürünün teorik temeli, Gottlieb Haberlandt tarafından 1902'de Alman Bilimler Akademisi'nde yaptığı konuşmada, tek hücre kültürü üzerine yaptığı deneylere dayanarak önerilmiştir (Shahzad ve Ahmad, 2016). Bununla birlikte, ilk bitki hücre kültürü ancak 1922'de Kolte ve Robbins kültür ortamı sterilizasyon sorununun üstesinden gelmek amacıyla kök ve gövde uçlarını yetiştirdiklerinde başarılı bir şekilde geliştirilmiştir (Kotte, 1922; Robbins, 1922).

1934–1935'te Gautheret, White ve Nobercourt ile birlikte, knop solüsyonu, glikoz, sistein, IAA ve vitaminlere yol açan katılaştırılmış bir ortamda *Acer pseudoplatanus* L.'den kambiyal doku oluşturulmasını içerdiğinden, ilk "gerçek" bitki doku kültürü uygulamasını geliştirmiştir. O andan itibaren, farklı bitkiler, organlar ve dokular, aynı zamanda farklı besin solüsyonları kombinasyonları sayısız denemede test edilmiştir (Gautheret, 1939).

1940 ile 1960 yılları arasındaki dönem, günümüzde halen kullanılan bitki doku kültürü tekniklerinin büyük çoğunluğunun gelişimi için en önemli dönemlerden biri olarak gösterilmektedir. Bu süre zarfında, esas olarak bitki büyüme düzenleyicileri alanında birçok keşif yapılmıştır: 1955'te hücre bölünmesi hormonu olarak kinetin

bulunmuş ve 1957'de Skoog ve Miller, ortamdaki oksinlerin ve sitokinlerin konsantrasyonunu ayarlayarak organ oluşumu için hormonal kontrol kavramını ortaya çıkarmıştır (Skoog ve Miller, 1957). Bununla birlikte, bu on yıllar boyunca meydana gelen en önemli devrim niteliğindeki başarı, Murashige ve Skoog tarafından 1962'de tütün hücre kültürleri için karbon kaynağı (örn. sükroz), B kompleksi vitaminleri ve büyüme düzenleyicileri yüksek konsantrasyonda tuz ancak düşük nitrojen, makro ve mikronütrient içeren iyi bilinen MS (Murashige ve Skoog) ortamını geliştirerek elde edilmiştir. (Murashige ve Skoog, 1962).

Bitki doku kültürünün yüksek değerli metabolitlerin üretimi için kullanılması açısından ilk girişim 1950 yılında Charles Pfizer Şirketi tarafından, in vitro yetiştirilen karpuz bitkilerden elde edilen fungus ekstraktları kullanarak farmasötik endüstri için fitokimyasal bileşikler üretmek amacıyla gerçekleşti (Lombardino, 2000). Bununla birlikte, sekonder metabolitlerin üretimi için bitki doku kültürünün endüstriyel uygulanabilirliği ancak 1978'de Almanya ve Japonya'da mümkün olmuştur (Loyola-Vargas ve Vázquez-Flota, 2006). 1987'de, 30'dan fazla farklı hücre kültür sisteminin sonuçlarına dayalı olarak, bitki doku kültürü teknikleriyle sekonder metabolitlerin üretimi ekonomik olarak uygulanabilir bir süreç olarak kabul edilmiştir (Savangikar, 2004; Loyola-Vargas ve Vázquez-Flota, 2006).

2.8.1. Bitki Doku Kültürünün Tanımı ve Uygulama Alanları

In vitro hücre, aksenik veya steril kültür olarak da adlandırılan bitki doku kültürü, ticari uygulamanın yanı sıra hem temel hem de uygulamalı çalışmalarda önemli bir araçtır (Patel vd, 2022; Sharma vd, 2023). Bitki doku kültürü, hücrelerin, dokuların, organların ve bunların bileşenlerinin in vitro tanımlanmış fiziksel ve kimyasal koşullar altında aseptik kültürüdür.

Bitkiler hem geleneksel hem de modern ilaçlarda her zaman önemli roller oynamıştır. Dünya nüfusunun neredeyse %80'i, hayati önem taşıyan sağlık için gerekli bitki kaynaklı bileşenlere güvenmektedir (Winter vd, 2012; Yuan vd, 2016). Tedavisi zor hastalıkları iyileştirme kabiliyetine sahip fitokimyasallar açısından zengindirler ve ilaç, kozmetik, nutrasötikler vb. birçok sektörde kullanılabilirler (Nasri vd, 2014).

Bu bitkilerin tıbbi özellikleri, yapılarında ve metabolik yollarında farklı olan sekonder metabolitler olarak adlandırılan heterojen doğal metabolik ürün grubunun

varlığından kaynaklanmaktadır.

Bitki metabolitleri doğal olarak yetiştirilen bitkilerden izole edilebilir, ancak ticari üretimleri çevresel ve bölgesel kısıtlamalar nedeniyle sınırlıdır (Yue vd, 2016). Geleneksel yöntemler zaman alıcıdır, çünkü bitkinin büyümesi ve istenen metabolit üretimi noktasına ulaşması birkaç yıl alır. Bu tür ürünlere yönelik artan talep, doğal populasyonlarını bozmadan üretimlerini artırmak için stratejiler bulma ihtiyacını teşvik etmiştir (Atanasov vd, 2015). Bu durumu aşmanın alternatif bir yöntemi, ticari uygulama için kısa bir süre içinde verimli bir şekilde sekonder metabolitlerin üretimi amacıyla bitki doku kültürü tekniklerini kullanmaktır (Verpoorte vd, 2002; Kolewe vd, 2008). Bitkilerin herhangi bir mevsimsel kısıtlama olmaksızın kontrollü çevre koşullarında toplu olarak çoğaltılmasını sağlamaktadır (Murthy vd, 2014; Ochoa-Villarreal vd, 2016).

2.8.2. Kallus Kültürleri

Bitki ürünlerini insanın yararına kullanmak için biyoteknoloji uygulamalarında kallus kültürü çok önemlidir. Bitki dokularının, daha sonra farmasötik, gıda, tarım ve kozmetik endüstrileri için faydalı ürünler verecek şekilde tasarlanabilen farklılaşmamış bir kütleye ulaşmasını içerir (Eibl vd, 2018). Bitkiler, yaralama veya patojen enfeksiyonu gibi streslere yanıt olarak kallus veya tümörler gibi organize olmayan hücre kütleleri üretir.

"Kallus" terimi, Latince sert anlamına gelen callum kelimesinden gelir ve tıpta cilt dokusunun kalınlaşması anlamına gelir. Bitki biyolojisinin ilk günlerinde "Kallus", hücrelerin yoğun büyümesine ve yaranamayla ilişkili kallus birikimine atıfta bulunuyordu. Bugün aynı kelime daha geniş bir şekilde kullanılmakta ve düzensiz hücre kütlelerine topluca kallus adı verilmektedir. Kallus tek bir farklılaşmış hücreden üretilebilir ve birçok kallus hücresi totipotenttir ve tüm bitki gövdesini yeniden üretebilir (Steward vd, 1958; Nagata ve Takebe, 1971).

İlaç mühendisliği olarak adlandırılan terapötik bileşikler için bir biyolojik mühendislik süreci olarak kallus kültürünün geliştirilmesi, son yıllarda belirli bitki hücreleri tarafından yararlı bileşiklerin üretimini en üst düzeye çıkarmak için çeşitli teknikler kullanarak büyük önem kazanmıştır (Ogita, 2015). Bitki hücrelerinden elde edilen ürünler genel olarak primer ve sekonder metabolitler olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Primer metabolitler, bitki hücrelerinin hayatta kalması için gerekliyken,

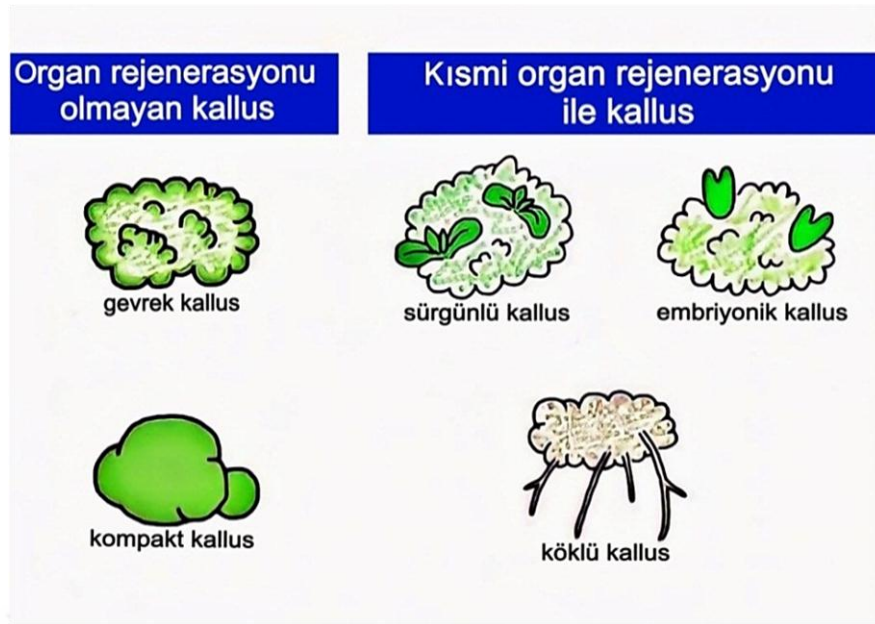
sekonder metabolitlere bitki tarafından ihtiyaç duyulmaz, ancak yaralanmaya yanıt olarak veya çeşitli biyotik ve abiyotik stres türlerine karşı korunmak için üretilir (Yang vd, 2018).

Bu nedenle, alkaloidler, tanenler, glikozitler, terpenoidler ve flavonoidleri içeren bu sekonder metabolitlerin çoğunun insanlarda hastalık yönetimi için terapötik kullanımlara sahip olması uygun bir değerlendirmedir (Wisdom vd, 2016). Terapötik bileşiklerin üretimi için kallus kültüründe genellikle en az iki adım gereklidir; birincisi maksimum kallus büyümesi için, ikincisi ise sekonder metabolitlerin üretimi içindir (Efferth, 2019). Kallus oluşumu için optimum ışık, sıcaklık, nem ve besin koşulları gereklidir. Kallus, farklı biyotik ve abiyotik uyaranlar nedeniyle oluşur.

Önde gelen bitki fizyoloğu FW Skoog, deneysel olarak orta düzey oksin ve sitokinin oranlarının genellikle in vitro kallus oluşumundan sorumlu olduğunu göstermiştir (Skoog, 1957). İkinci aşama, hedef sekonder metabolitlerin üretimini artırmak için ampirik olarak belirlenmiş miktarlarda elisitörlerin veya öncülerin uygulanmasını içerir (Sharma vd, 2019). Bununla birlikte, kallusların çok çeşitli olduğu ve makroskobik özelliklerine göre alt gruplara ayrılabilmesi de kabul edilmiştir. Örneğin, belirgin bir organ rejenerasyonu olmayan kalluslara tipik olarak gevrek veya kompakt kallus denir. Bazı derecelerde organ rejenerasyonu gösteren diğer kalluslara, ürettikleri organlara bağlı olarak köklü, sürgünlü veya embriyonik kallus denir (Şekil 2.18) (Zimmerman, 1993; Frank vd, 2000).

Bu nedenle, kallus terimi, çeşitli farklılaşma derecelerine sahip hücreleri içerir. Kallusun yapay olarak in vitro üretilebileceği (Gautheret, 1939; Nobecourt, 1990; White, 1939) ve iki bitki hormonu olan oksin ve sitokinin arasındaki dengenin farklılaşma ve farklılaşma durumunu belirlediği çığır açan keşiften sonra (Skoog ve Miller, 1957), kallus hem temel araştırmalarda hem de endüstriyel uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Bourgaud vd, 2001; Stepanova vd, 2022).

Genel olarak değerlendirecek olursak, orta düzeyde bir oksin ve sitokinin oranı kallus indüksiyonunu desteklerken, yüksek bir oksin-sitokinin veya sitokinin-oksine oranı sırasıyla kök ve sürgün rejenerasyonunu indükler (Skoog ve Miller, 1957). Bu rejenerasyon sisteminin keşfinden bu yana, örneğin ekonomik açıdan önemli özelliklerin çoğaltılmasında ve transgenlerin tanıtılmasında yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.18. Çeşitli bitki kallus türlerinin şematik gösterimi (Ikeuchi vd, 2013).

2.8.3. İkincil Metabolit Bileşik Üretim Aracı Olarak Kallus Kültürü

Bitkiler, genellikle sekonder metabolitler olarak bilinen çeşitli düşük moleküler ağırlıklı, yapısal olarak karmaşık kimyasal bileşikler sentezler. İkincil metabolitler kavramı ilk olarak 1910'da fizyoloji veya tıp dalında asil ödül kazanan Albrecht Kossel tarafından tanımlanmıştır.

İkincil metabolitler, bitkilerin varlıkları ve devamlılıkları için çevreleriyle etkileşimlerinde çok önemli bir role sahiptir (Moore vd 2014; Pichersky ve Gang 2000). Yüksek bitkiler, hayatta kalmak için kendi savunma stratejilerini (yapısal/kimyasal) oluşturur. Böylece, kimyasal savunma stratejisinin bir parçası olarak bitkiler, acil ihtiyaçlarını karşılamak için muazzam sayıda kimyasal bileşik (sekonder metabolitler) sentezlerler. Tahminler, bitkilerin 100.000'den fazla sekonder metabolit ürettiklerini, yapısal olarak karakterize edildikten sonra ise toplam sayının 500.000'i geçebileceğini ortaya koymuştur (Hadacek, 2002).

Bitkilerin sekonder metabolitleri, yapılarına göre genel olarak fenolik maddeler, alkaloidler, saponinler ve terpenler olarak sınıflandırılır (Hussein ve El-Anssary, 2019). Bitki kaynaklı çok sayıda kimyasal bileşik, ilaç preparatları için hali hazırda kullanılmaktadır ve bitkilerin birçok önemli biyoaktif molekül/farmakofor için ana kaynak olmaya devam ettiği gerçeği devam etmektedir (Dias vd, 2012; Pan

vd, 2014; Raomai vd, 2015).

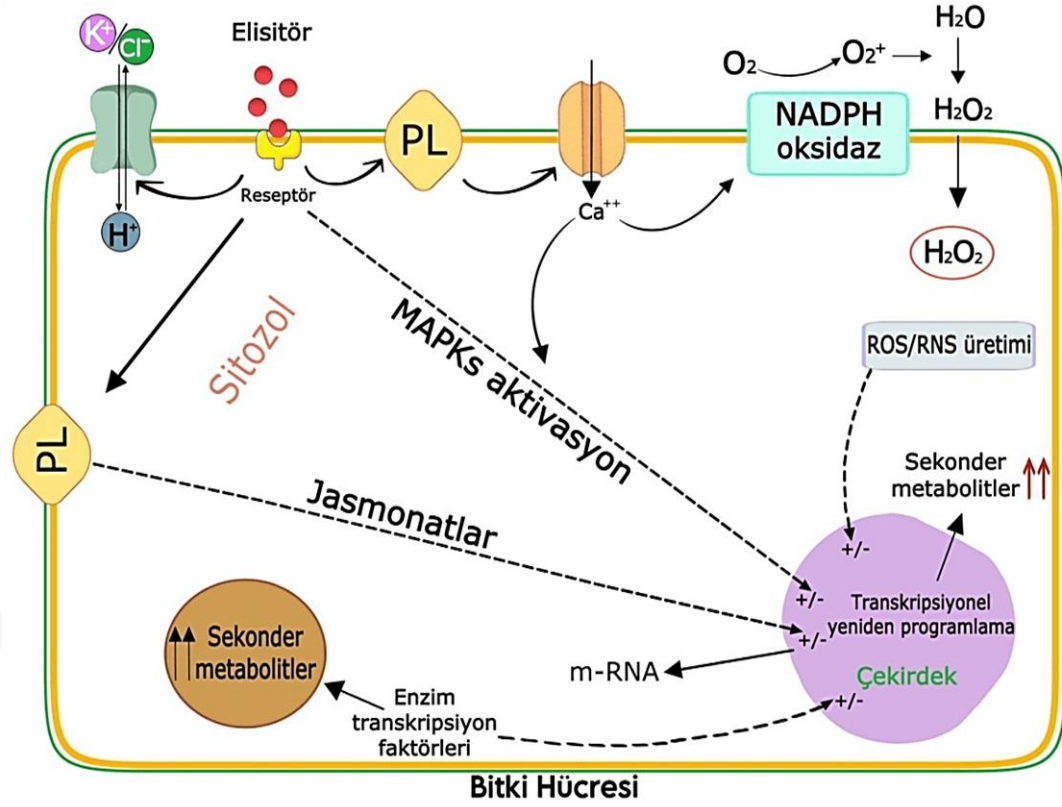
Doğal olarak, bitkiler kuru ağırlık olarak %1'den daha az sekonder metabolit üretirler ve üretim çevre koşullarının yanı sıra bitkinin gelişimsel ve fizyolojik aşamasına bağlıdır (Dixon 2001; Oksman-Caldentey ve Inzé 2004). Bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitler insanlığın ihtiyacını karşılayamaz ve bitkinin tamamı fitokimyasal ekstraksiyon için kullanılır, bu nedenle değerlendirecek bitkilerin yetersizliği ve aşırı kullanımı önemli bir sınırlamadır. Mevcut talebi karşılamak için bitkiler, iklimsel, coğrafi ve edafik engelleri ortadan kaldırdığı ve ayrıca her mevsim bitki büyümesini teşvik ettiği ve fitokimyasalların sürekli tedariki için uygun bir ortam sağladığı için biyoteknolojik teknikler kullanılarak in vitro yetiştirilmektedir (Yukimune vd, 1996; Karuppusamy, 2009).

Biyoaktif bileşiklerin miktarındaki sınırlamanın üstesinden gelmek için ortamın optimizasyonu, uygun kültür ortamlarının sağlanması, permeabilizasyon, immobilizasyon, elisitörlerin uygulaması, öncü besleme, metabolik mühendislik, biyotransformasyon yöntemleri, biyoreaktörlerin kullanımı ve mikro çoğaltma gibi çeşitli biyoteknolojik stratejiler kullanılır (Naik ve Al-Khayri, 2016).

Bir elisitör, muhtemelen bir faktör, madde, molekül veya bir ajan olarak tanımlanır ve mevcut bir hücresel arka plana küçük bir miktar dahil edildiğinde, yoldaki spesifik bileşiklerin, özellikle sekonder metabolitlerin biyosentetik yeterliliğini geliştirir (Gorelick ve Bernstein, 2014).

2.9. Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak için Geliştirilen Stratejiler

Büyüme ve gelişme sırasında bitkiler, diğerleri arasında ışık, sıcaklık, su, tuz, bakteri, virüsler ve fungus dahil olmak üzere abiyotik ve biyotik streslerin değişkenliğine maruz kalır (Ncube vd, 2012; Ahmad vd, 2021). Çeşitli sinyal moleküllerine yanıt olarak, bitki çok çeşitli sekonder metabolitler SM'ler üretir. Çeşitli abiyotik ve biyotik elisitörler, sekonder metabolizmanın üretimi için bu tek molekülleri aktive eder. Bitkiler, primer metabolitler PM'leri yeniden yönlendirerek ve fenolik, flavonoid, tanen ve diğer SM'ler gibi SM'lerin üretimini ortaya çıkararak ve ayrıca antioksidan enzim aktivitelerini uyarak strese yanıt verir (Jan vd, 2021). Şekil 2.19, elisitör tarafından indüklenen savunma tepkileri sırasında meydana gelen ardışık olayları göstermektedir.



Şekil 2.19. Elisitörlerin genel mekanizma etkisinin şematik gösterimi. PL- Fosfolipaz; ROS- Reaktif oksijen türleri; RNS-Reaktif nitrogen türleri MAPK-Mitojenle aktive edilen protein kinaz.

Hücre zarındaki reseptör, elisitörü algılar ve hücre içinde bir dizi olayı tetikler. Bu olaylar arasında plazma membranı ve sitoplazmik proteinlerin tersinir fosforilasyonu ve defosforilasyonu, sitoplazmik kalsiyum konsantrasyonunda artış, klor ve potasyum iyonlarının dışarıya akışı, proton girişi ve bunun sonucunda ekstraselüler alkalinizasyon ve sitoplazmik asitlenme bulunmaktadır. Bu değişiklikler, mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) yolu gibi çeşitli sinyal yollarını aktive eder ve reaktif oksijen ve nitrogen türleri (ROS ve RNS) üreten nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) oksidazın aktivasyonuna yol açar. Bu süreç aynı zamanda erken savunma genlerinin ifadesini, jasmonatların üretimini ve daha sonra savunma tepkisi genlerinin ifadesini tetikler. Son olarak, sekonder metabolitlerin birikmesi, elisitöre karşı kalıcı bir savunma sağlar (Ramirez-Estrada vd, 2016).

Bu metabolitler gıda, kozmetik, tarım ilaçları ve ilaç sektörlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bitki doku kültürü uygulamalarıyla, sekonder metabolit üretimi için ana bölge olan herhangi bir organ hedeflenebilir ve kültürlenebilir. Son

zamanlarda, elisitörlerin kullanımı ile bitkilerde metabolit üretimini artırmak için yeni bir strateji uygulanmaktadır. Elisitörlerin bitki doku kültüründe sekonder metabolit miktarını arttırdığını gösteren birçok rapor mevcuttur (Tablo 2.4, 2.5).

Tablo 2.4. Bitki hücresi/doku kültürü ile sekonder metabolitlerin in vitro üretimini artırmak için kullanılan biyotik elisitörler

Elisitör	Bitki türleri	Hedeflenen sekonder metabolit	Kontrolle kıyasla kat artışı	Kaynaklar
Maya ekstrakt	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Tanshinone	10	(Zhao vd, 2010a)
Phoma sp.'nin kurutulmuş hücre tozu.	<i>Calophyllum inophyllum</i>	Inophyllum	751	(Pawar vd, 2011)
Siklodekstrin	<i>Catharanthus roseus</i>	Ajmalisin	3	(Almagro vd, 2011)
Fungus kaynaklı serebrozid	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	2.6	(Wang vd, 2009)
Maya ekstrakt	<i>Pueraria candollei</i>	İzoflavonoidler	4.5	(Udomsuk vd, 2011)
Kitosan	<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	6	(Putalun vd, 2007)
Pektin	<i>Vitis vinifera</i>	Antosiyaninler	2.5	(Cai vd, 2012a)
<i>Trichoderma viride</i> homojenat	<i>Calendula officinalis</i>	Oleanolik asit	1.8	(Wiktorowska vd, 2010)
Maya	<i>Andrographis paniculata</i>	Andrographolide	8.82	(Gandi vd, 2012)
Aljinik asit	<i>Vitis vinifera</i>	Antosiyaninler	2.6	(Cai vd, 2012a)
<i>Aspergillum niger</i> hücre duvarı	<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperisin	4.2	(Xu vd, 2005)
<i>Piriformospora indica</i> kültür filtratı	<i>Lantana camara</i>	Betulinik asit	7.8	(Kumar vd, 2016)
Kurutulmuş <i>Xylaria</i> sp. miseller	<i>Gymnema sylvestre</i>	Gymnemik asit	10.7	(Netala vd, 2016)

Tablo 2.5. Bitki hücresi/doku kültürü ile sekonder metabolitlerin in vitro üretimini artırmak için kullanılan abiyotik elisitörler

Elisitör	Bitki türleri	Hedeflenen sekonder metabolit	Kontrolle kıyasla kat artışı	Kaynaklar
Isı şoku	<i>Taxus yunnanensis</i>	Taksol	6	(Zhang ve Fevereiro, 2007)
CuSO ₄	<i>Bacopa monnieri</i>	Bacoside	1.42	(Sharma vd, 2015)
Vanadate	<i>Panax ginseng</i>	Ginsenoside	3.6	Huang vd (2013)
CdCl ₂	<i>Gymnema sp</i>	Gimnemik asit	6.8	(Ch vd, 2012)
Alüminyum klorür	<i>Withania somnifera</i>	Withanolide A	14	(Sivanandhan vd, 2012)
Sodyum Asetat	<i>Arachis hypogaea</i>	Trans-resveratrol	60	(Medina-Bolivar vd, 2007)
Hidrostatik basınç	<i>Glycine max</i>	izoflavonoidler	1.3	(Gueven ve Knorr, 2011)
Ağır metal: Ag ⁺	<i>Taxus chinensis</i>	Paklitaksel	4.6	Zhang vd (2007)
KCl	<i>Digitalis purpurea</i>	Digoksin	7.75	(Patil vd, 2013)
Darbeli elektrik alanları	<i>Vitis vinifera</i>	Resveratrol	3.6	(Cai vd, 2011b)
Hiperozmotik stres	<i>Vitis vinifera</i>	Antosiyaninler	2.6	(Ferri vd, 2011)
Ultrason	<i>Morinda citrifolia</i>	Antrakinonlar	2.5	(Komaraiah vd, 2005)
Jasmonik asit	<i>Vitis vinifera</i>	Resveratrol	4	(Santamaria vd, 2012)
Salisilik asit	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Fenolik asit	6 – 10	Dong vd (2010)
Jasmonik asit	<i>Calendula officinalis</i>	Oleanolik asit	9.4	(Wiktorowska vd, 2010)
Kobalt nitrat	<i>Panax quinquefolius</i>	Ginsenositler	2	(Biswas vd, 2016)
AgNO ₃	<i>Plumbago indica</i>	plumbagin	4	(Jaisi ve Panichayupak-aranant, 2016)

Bitki hücre kültürü sistemleri, gıda ve ilaç endüstrilerinde ticari öneme sahip sekonder metabolitlerin üretimi için uygun alternatiflerdir. Bununla birlikte, nispeten çok az kültür, bu bileşikleri, tüm bitkilerde bulunanlarla karşılaştırılabilir miktarlarda

uzun süreler boyunca sentezler. Kallustan sekonder metabolit üretme probleminin üstesinden gelmek için elisitör kullanımı kullanılan en önemli çözümlerden biridir.

Elisitörler, in vitro kültürlerde belirli BSM'(ler)inin biyosentezini ve bütün oluşumunu uyaran, farklı kökenlere sahip biyotik veya abiyotik maddelerdir (Akula ve Ravishankar, 2011; Angelova vd, 2006). Uyarma (Elisitasyon), bitki dokularının elisitörlere tepkilerinin bir sonucu olarak hem in vitro hem de in vivo koşullar altında BSM'lerinin kapsamlı üretimi için en etkili biyoteknolojik strateji olarak kabul edilir (Poulev vd, 2003; Namdeo, 2007; Kandoudi ve Németh-Zámboiné, 2022). Uygulama programı, hücre hattı, besiyeri bileşimi, elisitör tipi, konsantrasyonlar, maruz kalma süresi, kültür tipi ve elisitör tedavisi sırasındaki kültürün yaşı dahil olmak üzere birçok faktör, elisitasyon tedavisi altındaki bitki dokularında sekonder metabolit birikimini düzenlemektedir (Naik ve Al-Khayri, 2016).

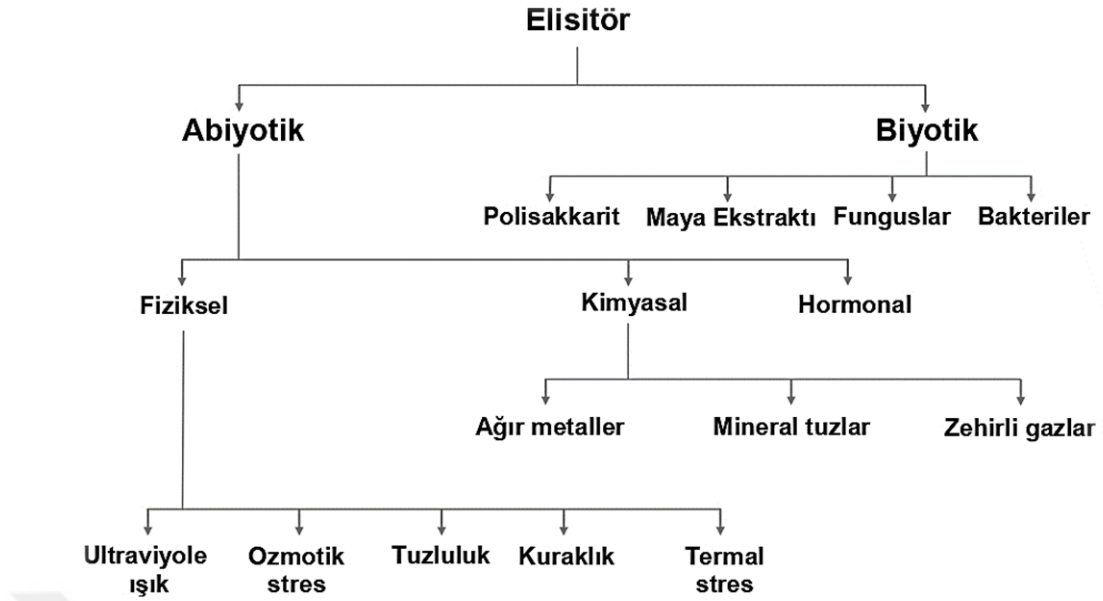
Elisitasyon, çok küçük miktarlarda elisitörlerin eklenmesi nedeniyle BSM'lerinin biyosentezinin uyarılması veya arttırılması olarak kabul edilir (Radman vd, 2003). Vasconsuelo ve Boland (2007), bitkilerin sekonder metabolitlerinin üretimini ölçeklendirmek için kullanılan biyotik elisitörlerin çoğunun ya eksojen ya da endojen mikrobiyal kökenli olduğunu, abiyotik elisitörlerin ise kimyasal olabilen (inorganik tuzlar, ağır metaller) canlı olmayan kaynaklar olduğunu vurgulamıştır (Şekil 2.20).

2.9.1. Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak İçin Elisitör Olarak Endofitik Mikroorganizmaların Kullanımı

1809'da Alman botanikçi Fredrich Link, endofitleri açıklayan ilk kişiydi ve Endophytæ terimini, bitki dokularında ikamet eden kısmen paraziter fungus kümesi anlamına gelecek şekilde tanıtmıştır.

Endofitler artık genellikle herhangi bir hastalık semptomu göstermeden sağlıklı bitkilerin iç dokularını kolonize edebilen mikroplar (genellikle funguslar ve bakteriler) olarak kabul edilmektedir (Adeleke vd, 2021), ancak konukçu bitki yaşlandığında patojenik hale gelebilirler (Rodriguez ve Redman, 2008).

Endofitler, Archaea (Moissl-Eichinger vd, 2018), bakteriler (Aguiar-Pulido vd, 2016) ve funguslarda (Gupta vd, 2020) oluşabilir, ve yaşam döngülerinin önemli bir bölümünü veya tamamını bitkilerin canlı dokularında geçirirler (Meshram vd, 2016).



Şekil 2.20. Elisitörlerin niteliklerine göre sınıflandırılması.

Endofitik mikroorganizmalar, konukçu bitkiye girmesi için muhtemelen bitki patojenlerinininkine benzer bir yaklaşımı benimsemektedir (Sieber, 2007), ancak bunlar, konukçu bitkilerde hastalıklara neden olan patojenlerden farklıdır. Endofitler ayrıca bitki organlarını (hava ve yer altı) enfekte etse de, bu enfeksiyon zararsız ve asemptomatiktir (Zimmerman ve Vitousek, 2012). Bildirilen bitki-endofit ilişkilerinin çoğu karşılıklıdır; bu nedenle, ilişki her iki ortağa da fayda sağlamaktadır (Deshmukh vd, 2006). Konukçu tıbbi bitkilerin sekonder metabolitlerinin biyosentezinin yanı sıra büyümeyi, gelişmeyi, in vitro çoğaltmayı ve büyük ölçekli çoğaltmayı etkilerler (Pandey vd, 2016; Gupta vd, 2018; Gupta ve Chaturvedi, 2019, 2020). Pek çok rapor, şimdiye kadar incelenen türlerdeki endofit topluluğunun birden fazla mikroorganizma türünden oluştuğunu (Strobel ve Daisy, 2003) ve bunların bitkinin kökler, gövdeler, yaprak sapları, yaprak bölümleri, çiçekler gibi çeşitli kısımlarında yaşadıklarını göstermiştir (Specian vd, 2012). Endofitleri tanıyan bitkiler, dokularındaki endofitlerin büyümesini kısıtlama eğilimindedir ve endofitler, konukçu dokular içinde istikrarlı bir şekilde uyum sağlamalarını sağlayan belirli mekanizmaları aktive etmektedir (Dudeja vd, 2012).

Son yıllarda, doğrudan terapötik bileşikler olarak veya yeni ilaç ve ürünlerin üretimi için öncüler olarak büyük etkilerinin bir sonucu olarak, BSM'lerine olan toplumsal ilgi önemli ölçüde artmıştır (Yadav ve Dixit, 2008). Değerli BSM'lerine

olan yüksek talep ve tıbbi bitkilerin doğadan aşırı kullanımının zorlukları nedeniyle, son otuz yılda organ kültürü, kallus kültürü, hücre kültürü ve tüm bitkilerin mikro çoğaltımı dahil olmak üzere farklı yaklaşımlar kullanılmıştır.

Kallus, steril koşullar altında hızlı büyüyebilir ve bitki-mikrobiyal etkileşimlerin anlaşılmasında basit ve verimli bir sistem sağlamaktadır (Nowak vd, 1995). Zheng vd (2016), endofitik *Penicillium oxalicum*'un artemisinin üretimini teşvik etmek için konukçu bitki *Artemisia annua* L ile etkileşime girdiğini göstermiştir. Zhou vd (2018), endofitik *Pseudomonas*'ın, *Atractylodes lancea* (Thunb.) DC'de tıbbi seskiterpenoid birikimini artıran metabolik akış değişikliklerini indükleyebileceğini bulmuştur. Endofit tarafından indüklenen yeniden programlanmış sekonder metabolizma, konukçu bitkinin savunma tepkisini de güçlendirebilir (Lopez-Fernandez vd, 2016; Munir vd, 2020). İkincil metabolitler, bitkilerin çeşitli çevresel streslerle başa çıkmaları için çok önemli bileşenlerdir. Metabolomik yaklaşım, endofit kolonize olduğunda *Vitis vinifera* L.'de fenolik maddelerin, flavonoid ve terpenoid glikozitlerin metabolik değişimini karakterize etmek için de kullanılmıştır (Stranska vd, 2021). Sonuç olarak, metabolomik, bitkilerde sekonder metabolik değişiklikleri araştırmak için güçlü bir yaklaşım olacaktır. Bu nedenle, kallus ve endofitlerin ikili kültürü, konukçu bitkiler ve endofitler arasındaki etkileşimi araştırmak için yaygın olarak kullanılan bir sistem olmuştur (Miyazaki vd, 2011; Hemmati vd, 2020).

2.9.2. Bitki Hücre Kültüründe Sekonder Metabolit Üretimini Artırmak İçin Elisitör Olarak Demir Oksit Nanopartiküllerin Kullanımı

Elisitasyon, in vitro bitki kültürlerinin üretkenliğini artırmak için kullanılan çekici bir yaklaşım olabileceği bildirilmiştir (Giri ve Zaheer, 2016). Son zamanlarda, nanoparçacıkların (NP'ler), çeşitli sekonder metabolitlerin aşırı üretimine yol açan bir besin kaynağı ve bir elisitör olduğu öne sürülmüştür (Kim vd, 2017). Örneğin, Poborilova vd (2013), 96 saatlik muameleden sonra 100 µg/ml konsantrasyonunda maksimum seviyeye (211.7 µg/g FW) ulaşan tütün hücresi süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonlarda alüminyum oksit nanopartikülleri (Al₂O₃NP) eklenmesi üzerine fenolik madde birikimini bildirmiştir. Benzer şekilde, kontrolden 3.9 kat daha yüksek olan gümüş-silika çekirdek-kabuk nanopartikülleri Ag-SiO₂NP'leri ile muamele edilmiş 20 günlük *Artemisia annua* tüylü kök kültürlerinde artemisinin içeriği artırmıştır (Zhang vd, 2013, Jamkhande vd, 2019, Ayoobi vd, 2023).

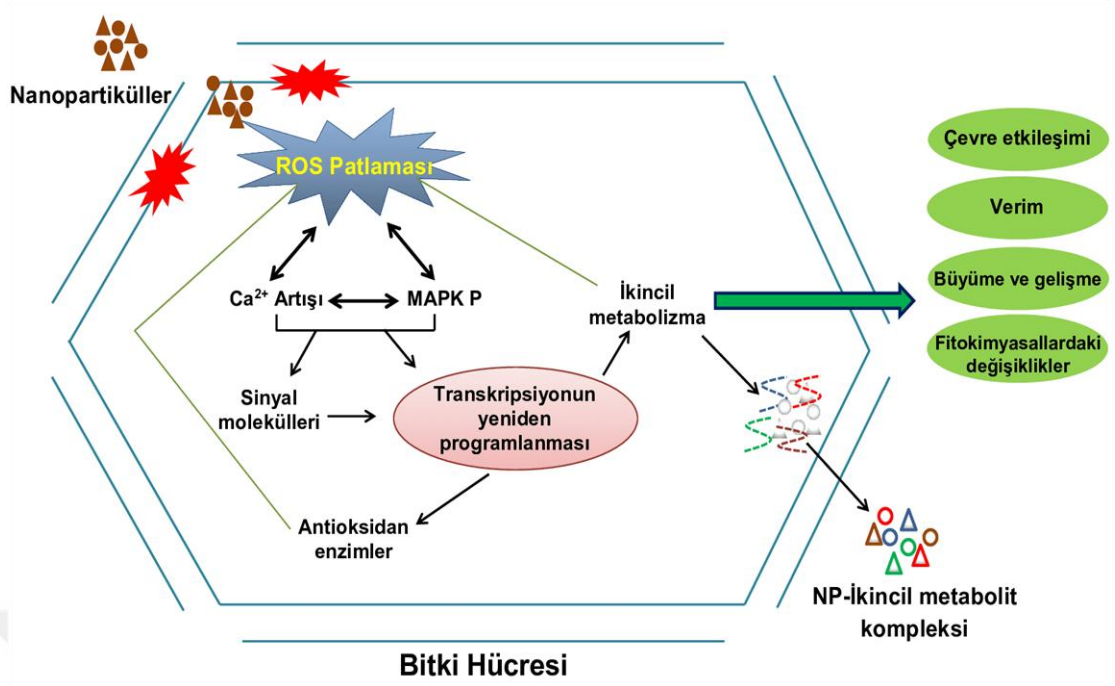
Çok duvarlı karbon nanotüpler (MWCNT'ler), *Satureja khuzestanica* kallus kültürlerinde sekonder metabolitlerin üretimini indüklenmiştir. Toplam fenolikler ve flavonoidlerin maksimum miktarları, kontrole kıyasla sırasıyla 1.9 ve 2.6 kat daha yüksek olan 100 µg/ml MWCNT'lere maruz bırakılan kültürlerde belirlenmiştir. NP'lerin sekonder metabolizmayı modüle ettiği mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Genomik analizler, bitkilerin biyotik veya abiyotik stres faktörleri gibi nano boyutlu materyallerin içselleştirilmesine yanıt verebildiğini ortaya koymuştur.

Diğer stresörler gibi, NP'lerin de farklı hücrel sinyal iletim yollarını indükleyerek bitki sekonder metabolizmasını modüle edebildiği öne sürülmüştür. Kalsiyum akışı, reaktif oksijen türleri (ROS) patlaması ve mitojenle aktive protein kinaz (MAPK) fosforilasyonu, NP'ler tarafından aktive edilen birincil eylemler olabilir (Şekil 2.21). NP'lerin bitkiler üzerindeki etkilerini araştıran çalışmaların çoğunda ROS üretimi rapor edilmiştir. NP ile indüklenen ROS'un bitki sekonder metabolizmasını indüklemek için bir sinyal görevi görebileceği öne sürülmüştür (Marslin vd, 2017; Madhankumar vd, 2020). Sitosolik Ca^{2+} ve ROS'un aracılık ettiği tipik stres sinyalleme reaksiyonlarının indüksiyonu, nanogümüş maruz bırakılan model bitki *Arabidopsis thaliana*'da rapor edilmiştir (Sosan vd, 2016; Khan vd, 2019).

Reaktif oksijen türleri, farklı fiziko-kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlarla üretilir. Çeşitli maddelerle uyarım, oksidatif stresin indüklenmesine yol açabilir.

Genel olarak bitkiler, peroksidaz (POD), süperoksit dismutaz (SOD), askorbat peroksidaz (APX) ve katalaz (CAT) gibi antioksidatif enzimler gibi çok çeşitli radikal süpürücü sistemler aracılığıyla oksidatif streslere karşı korunur (Hatami ve Ghorbanpour 2014). Oksidatif gerilim, sekonder metabolit üretimi gibi çeşitli sekonder tepkilere yol açan tüm streslerle ilgili genel bir tepkidir (Zou vd, 2018).

Demir oksit nanoparçacıklarının çapları yaklaşık 1 ile 100 nm arasındadır. Demir oksit nanoparçacıkları manyetittir, Fe_3O_4 veya $\gamma-Fe_2O_3$ 'tür. Paramanyetik özellikleri ve birçok alanda olası kullanımları nedeniyle araştırma ilgisini çekmişlerdir (Sharafi vd, 2013a, b). Nanomalzemeler bazı metabolizmaları teşvik edebilir ve fizyolojik yanıtları ortaya çıkarabilir ancak altta yatan mekanizmalar bilinmemektedir (Hatami ve Ghorbanpour 2014).



Şekil 2.21. Nanopartiküllerin hücre kültürlerinde sekonder metabolit sentezi üzerindeki etkisi. Nanopartiküllerin kültür ortamına ilavesinin ardından NP'ler doğrudan süzülen hücrelerle etkileşime girer, hücre membranında gözenekler oluşturur ve reaktif oksijen türlerini salgılayarak antioksidan sistemini tetikler. NP'ler tarafından indüklenen ROS, mitojen-aktif protein kinaz kaskadını ve kalsiyum dalgalarını yönlendirebilir ve bu da sekonder metabolizmanın transkripsiyonunu muhtemelen düzenler. ROS'a yanıt olarak, bitki hücresi ROS hasarını önlemek için savunma mekanizmasını etkinleştirir. Bu şekilde, nanopartiküller içermeyen kontrol kültürleri ile karşılaştırıldığında sekonder metabolitlerin miktarı artar. Nanopartikül- sekonder metabolit kompleksleri bitki hücresinden çıkabilir veya bazen hücre içinde intrasellüler metabolit formunda kalabilir.

Önceki çalışmalar, uygun maliyetli bir ajan olarak endofitlerin veya abiyotik elisitörlerin, bitki ve doku kültürü geliştirme ve biyokimyasal yolların yanı sıra sekonder metabolit asimilasyonunda çoklu biyokimyasal fonksiyonlara sahip olduğunu ayrı ayrı kabul etmiştir. Tersine, *Aronia* tesislerinde fitofarmasötik üretimi tetiklemedeki bütüncü uygulamaları, bilginiz dahilinde belgelenmemiştir. Bu nedenle, mevcut çalışma, *Aronia* bitkisinin yaprakları için kallus kültürlerine biyotik ve abiyotik elisitörlerin uygulanmasının, bu bitkinin doku kültürlerinde fenolik maddelerin birikimini artırmak için değerli bir strateji olup olmadığını incelemeyi amaçlamaktadır.

2.10. Endofitler

Endofit kelimesi "bitkide" anlamına gelir ve çalışmalar endofitlerin filosferden ve rizosferden çıktığını ortaya koymuştur (Yadav vd, 2017; Mishra vd, 2021).

Endofitler, bitki büyümesinde ve fizyolojisinde çok önemli bir rol oynar ve yine de bitki ekosisteminin en çok gözden kaçan bileşeni olmaya devam etmektedir (Nicoletti ve Fiorentino, 2015). Bu mikroplar, yaşam alanları olarak bitkinin spesifik kimyasal ortamına başarılı bir şekilde uyum sağlamıştır. Bitkilerde endofitler çeşitli roller oynar: nitrojen fiksasyonu ve fosfatın çözündürülmesi dahil olmak üzere besin alımı, fitohormon ve siderofor üretimi, tuzluluk, kuraklık veya kirlilik gibi abiyotik streslere karşı koruma veya fitopatojen kontrolü (Şekil 2.22).

Endofitler, konakçı bitkideki rollerine göre üç gruba ayrılabilir: karşılıklı yarara dayalı endofitler, fırsatçı patojenler ve bilinmeyen işlevlere sahip, sayısal olarak en büyük grup olan kommensal endofitler olarak adlandırılanlar (Hardoim vd, 2015; Rana vd, 2019). Kommensal endofitler, konakçı bitkinin performansını etkilemeden konakçı metabolitleri üzerinde yaşarken, karşılıklı olarak ortak yaşarlar, konakçıya yarar sağlar ve sıklıkla bitki büyümesini desteklemektedir. Eşzamanlı olarak, büyümelerine ve stres direncine yardımcı olan primer ve sekonder metabolit üretimine katkıda bulunarak konakçıya avantajlar sağlamaktadır (Ludwig-Müller, 2015; Srivastava vd, 2024). Buna karşılık, fırsatçı patojenler bitkinin uyumunu azaltabilir ve konukçu bitkinin biyotik veya abiyotik strese maruz bırakılması gibi belirli koşullar altında hastalığa neden olabilir (Kogel vd, 2006).

Endofitler bitkilerin ana olarak kökler ve bitkinin diğer doğal açıklıkları aracılığıyla bitki dokusuna girmektedir. Bitkiye girdikten sonra, bakteriyel endofitler konukçu bitkinin dokuları boyunca yayılabilmektedir (Salim vd, 2024), endofitler genellikle yüzey sterilizasyonundan sonra bitkilerin iç dokularından izole edilir. Mikroorganizmalarla bitki birlikteliği, kolonizasyon tipine ve rollerine göre sınıflandırılabilir (Brader vd, 2017). Mikroorganizmaların ekosistemde oynadıkları çeşitli rollerin daha iyi anlaşılması, en önemlisi bitki büyümesi ve mahsul verimi için tarım alanında uygulanabilme yollarını geliştirecektir (Nair ve Padmavathy, 2014). Endofitler dünyası, büyümeyi teşvik etme ve aşırı koşullar altında bitkilerin hayatta kalmasını sağlamadaki önemli rolleri nedeniyle birçok araştırmacının ilgisini çekmiştir (Shen vd, 2019).

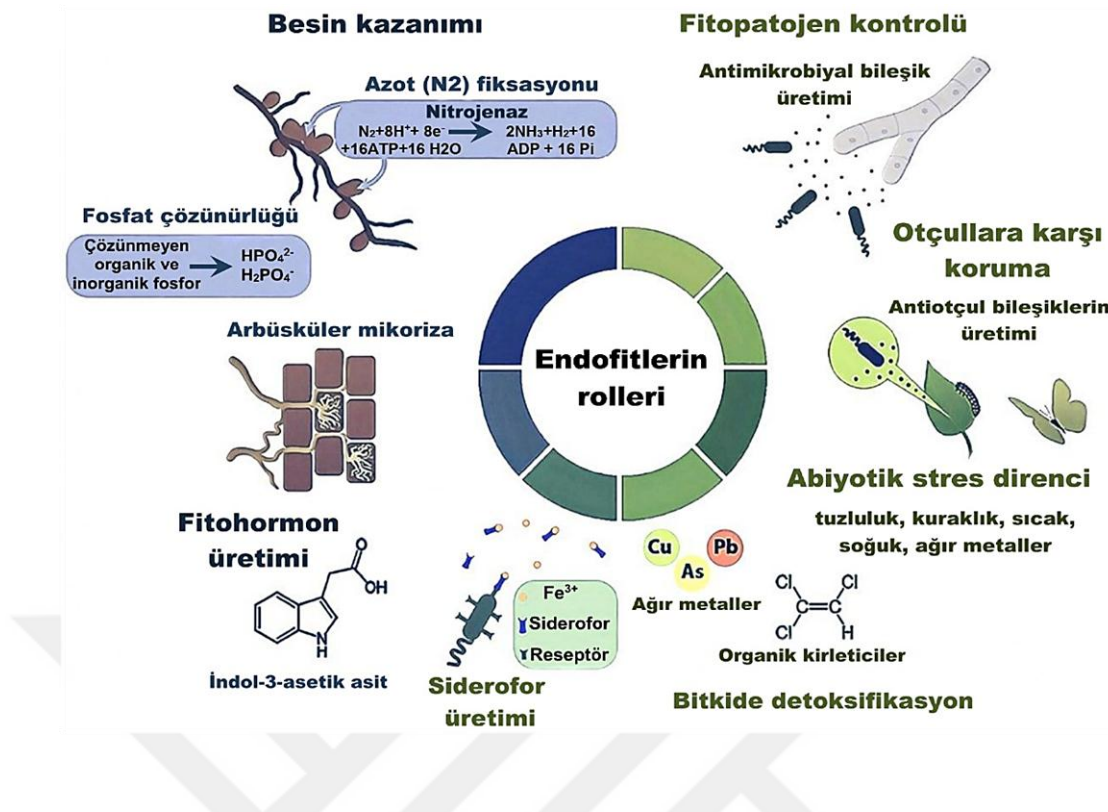
Endofitler, fitohormonlar salgılayarak bitki büyümesini iyileştirir ve sonuç olarak çift yönlü besin aktarımı kullanarak beslenmenin iyileştirilmesine ve bitkileri fitopatojenlere karşı koruyarak sağlığının iyileştirilmesine yardımcı olur (Andreozzi vd, 2019; Shen vd, 2019). Bitki endofit etkileşimi, bitkilerin ağır metal varlığı ve

kuraklık gibi çevrenin zararlı koşullarına karşı korunmasını tetiklemektedir. Endofitler yaygındır ve araştırmalara göre birçok bitkide bulunurlar; birçok biyoaktif metabolit ve biyoteknolojik olarak ilgili enzim üretme kapasiteleri nedeniyle önemli hale gelmiştir (Khan vd, 2019; Kushwaha vd., 2020). Bazı endofitler bitki patojenleri ile yakından ilişkili olduğu, ancak avirü lent oldukları için, bitkiler onların varlığını algılar ve çeşitli proteinlerin, sekonder metabolitlerin ve patojenlere, otçullara ve tuzluluk ve abiyotik stresler gibi abiyotik streslere tolerans kazandıran hormonların üretimi yoluyla savunma tepkilerini aktive etmektedir.

2.10.1. Bakteriyel Endofitik Mikrobiyota

Bakteriyel endofitik mikrobiyota, endosferde yaşayan tüm bakterileri ifade eder. Bakteriyel endofitler bitkilerin çiçeklerinde, yapraklarında, köklerinde, tohumlarında ve gövdelerinde bulunur (Qin vd, 2009; Compant vd, 2011; Elmagzob vd, 2019). Tohumla ilişkili bakteriler baskındır ve bitki gelişiminin erken aşamalarında önemli bir rol oynayarak tohumun canlılığını, çimlenmesini ve fidenin hayatta kalmasını etkilemektedir (Verma vd, 2019; Rodríguez vd, 2020). Öte yandan bitki gelişiminin ilerleyen aşamalarındaki endofitlerin ana kaynağı topraktır. Daha sonra kolonize olan bu bakterilerin, tohum aşamasından gelen halihazırda yerleşik mikrobiyota ile etkileşime girmesi gerekir. Bu kolonizasyon sürecinde bitkiler, bakteri alımında, kendilerinin tamamlayıcı işlevleri olan bu bakterilerin seçilmesinde ve enfekte edilmesine izin verilmesinde aktif bir role sahiptir (Lemanceau vd, 2017).

Bitki genotipi, bitki gelişim aşaması, toprak özellikleri, iklim koşulları ve tarım uygulamaları gibi çeşitli faktörler ve diğer abiyotik ve biyotik faktörler endofitik mikrobiyotanın kompozisyonunu etkiler ve modüle eder (Compant vd, 2019). Endofitik bakterilerin bitki sağlığı ve gelişimi üzerindeki rolü geniş çapta incelenmiştir (Compant vd, 2019). Bakteriyel endofitik bileşen bitkilerin genetik potansiyelini genişletir. Bu, endofitik bakterilerin, fitohormon dengesi (yani indol asetik asit, gibberellin, sitokininler, ACC-deaminaz üretimi), besin alımının iyileştirilmesi (biyolojik N₂ fiksasyonu yoluyla) ve çözünebilirliği de içeren bitkinin sekonder metabolizması üzerindeki etkisi yoluyla gözlemlenmiştir. Mineraller (örn. P, K, Fe), fitopatojenlere karşı bitki savunmasını ve abiyotik streslere karşı bitkilerin toleransını artırır (Turner vd, 2013; Van der Wolf ve De Boer, 2015; Etalo vd, 2018; Varga vd, 2020).



Şekil 2.22. Bitkilerde endofitlerin rolleri. Endofitik mikroorganizmalar çevreden besin olarak bitki büyümesini teşvik eder. Bazı endofitik taksonlar atmosferik nitrojeni fikse eder, organik ve inorganik fosforu çözündürür veya arbusküler mikoriza gibi simbiyotik etkileşimler kurarak besin alımını artırır. Fitohormonların mikrobiyal üretimi aynı zamanda bitki büyümesini ve gelişimini de etkilemektedir. Bazı endofitlerin aynı zamanda sideroforlar ürettiği, kirletici maddeleri zehirden arındırdığı, abiyotik ve biyotik streslere karşı direnci artırdığı ve fitopatojenleri savuşturduğu da göstermiştir (Papik vd, 2020).

Tıbbi bitkilerden izole edilmiş bakteriyel endofitler, biyoaktif metabolitler üretebilir ve konukçu bitkiler tarafından sekonder metabolit üretimini önemli ölçüde indükleyebilir. Konukçu-endofit ilişkisi, endofitik bakterilerin gen ekspresyonlarını değiştirdiği veya konukçu bitki büyümesindeki küçük değişikliklere dayalı olarak farklı metabolitler ürettiği veya bunun tersinin de geçerli olduğu esnek, dinamik bir etkileşim olarak kabul edilebilir (Ek-Ramos vd, 2019).

Endofitik mikrobiyomun faydalı etkisi, daha yüksek verim elde etmek amacıyla bakterilerin mahsullere uygulanması yoluyla insan yararına uzun süredir kullanılmaktadır (Compant vd, 2019).

2.10.2. Fungal Endofitik Mikrobiyota

“Endofitik funguslar” terimi, herhangi bir olumsuz etki veya hastalığa neden

olmadan, konukçu bitki ile karşılıklı yarar sağlayan simbiyotik bir ilişki kurarak, yaşam döngüsünün tamamı veya bir kısmı boyunca bitki dokularında yaşayan fungusları ifade etmektedir (Hyde vd, 2019; Patchett ve Newman, 2021). Bunlar, indoleasetik asit gibi hormonların üretilmesi, bitki büyümesi ve gelişimi için besin maddelerinin biyosentezlenmesi ve elde edilmesi, bitkiyi korumak için stres adaptör metabolitlerinin salgılanması dahil olmak üzere konukçu bitkinin fizyolojik aktivitelerini çeşitli şekillerde olumlu yönde etkileyen bitki mikro ekosisteminin doğal bileşenleridir. Konukçu bitkinin otçullar ve patojenlerin istilasından korunmasını ve konukçunun abiyotik stres faktörlerine karşı uyum sağlama yeteneğinin iyileştirilmesini sağlamaktadır. Buna karşılık bitkiler endofitik funguslar için yaşam alanı ve besin sağlamaktadır (Odelade ve Babalola, 2019; Igiehon vd, 2021).

Endofitik funguslar zengin çeşitlilikte biyoaktif maddeler üretme kapasitesine sahiptir ve bitkilerden tanımlanan farmakolojik aktivitelerle aynı veya benzer bileşikler üretebilmektedirler. Alkaloidler, flavonoidler, steroidler, terpenoidler ve fenolik maddeler dahil olmak üzere farklı kimyasal sınıflardan bir dizi metabolit üretirler. Bazı bileşikler, antimikrobiyal, antioksidan, anti-diyabetik, anti-sıtma ve antitümör özellikleri dahil olmak üzere pleiotropik ve ilginç farmakolojik aktiviteler gösterir. Bu yapısal olarak yeni ve çeşitli aktif bileşiklerin keşfi, mikrobiyomdan doğal tıbbi ürünlerin incelenmesi için değerli bir kaynak sağlamaktadır (Deshmukh vd, 2018; Popli vd, 2018).

Ön ilaç bileşikleri olarak biyoaktif moleküllerin araştırılmasında veya ilaçların geliştirilmesinde endofitik funguslar, değerli aktif bitki bileşikleri için alternatif bir kaynak olarak hizmet edebilir. Biyoaktif sekonder metabolitler ticari olarak mevcut olmadığında, yavaş büyüyen veya nadir ve nesli tükenmekte olan bitkilerden türetildiğinde ve ağır moleküler ağırlık veya yapısal karmaşıklık nedeniyle sentezlenmesi zor olduğunda, endofitik funguslar, insan farmasötik kullanımına yönelik biyoaktif bileşikler üretmek için kullanılabilir. Endofitik fungus sekonder metabolitleri tıbbi bitkiler, mangrovlar ve deniz mikroorganizmaları arasında büyük ilgi görmüştür (Zheng vd, 2021; Rustamova vd, 2020).

Endofitik funguslar, doğada her yerde mevcut gibi görünen, oldukça biyolojik çeşitliliğe sahip ve çok yönlü bir mikrobiyal topluluktur. Çalışmalar, Arktik bölgelerde, çöllerde, okyanuslarda ve tropikal yağmur ormanlarında kolonileştirilmiş

bitkiler de dahil olmak üzere hemen hemen tüm bitkilerin endofitik funguslar içerdiğini göstermiştir (Ding vd, 2015; Jin vd, 2021). Algler, yosunlar, eğrelti otları, açık tohumlular ve kapalı tohumlular dahil olmak üzere çeşitli bitkilerin köklerinden ve toprak üstü kısımlarından izole edilmiş ve kültürü yapılmıştır. Fosil bitki dokusundaki mikroorganizma kayıtlarından elde edilen kanıtlar, bitki-endofitik fungus etkileşimlerinin yaklaşık 400 milyon yıldır mevcut olduğunu ve bu süre zarfında endofitik fungusların, karmaşık sekonder metabolitleri sentezlemek için benzersiz biyosentetik yolları ve metabolik mekanizmaları birlikte geliştirdiklerini göstermiştir (Wang vd, 2022).

Bugüne kadar Dünya üzerindeki 1,5 milyon fungus türünün yalnızca %5'i ayrıntılı olarak tanımlanmış ve bu yüzden (69.000 fungus türü) yalnızca %16'sının (11.500 tür) kültürü yapılmış ve incelenmiştir. Yeni nesil dizileme teknolojileri sonuçlarına göre, Dünya'da yaklaşık 0.035-5.1 milyon fungus türü bulunmuştur (Kharwar vd, 2011). Dünya üzerinde bilinen yaklaşık 300.000 yüksek bitki türü bulunmaktadır ve bunların her biri bir veya daha fazla zorunlu endofitik fungusun konukçusudur. Endofitik funguslarda bulunan biyoaktif sekonder metabolitlerin sayısının yüksek olması, bunların zengin tür çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır (Hawksworth, 1991; Wu vd, 2019). Endofitik funguslar, Vogl vd 1898'de ryegrass (*Lolium temulentum* L.) tohumlarından izole ettiği ilk endofitik suşunun çalışılmasından bu yana 100 yıldan fazla bir süredir incelenmektedir. Stierle vd (1993), sırasıyla Pasifik Porsuk ağacından ve daha sonra diğer bitki türlerinden paklitaksel üreten endofitik fungus *Taxomyces andreanae*'i keşfettiler. Bu keşif, mikologların ve farmasötik kimyagerlerin yeni bir biyoaktif madde kaynağı olarak endofitik funguslara olan ilgisini uyandırmış ve sürdürülebilir bir bitki metabolit kaynağı olarak endofitik funguslara olan ilgiyi canlandırmıştır.

2.10.3. Endofitlerin Bitki Dokusuna Girişi ve İletimi

Endofitik mikrobiyal suşun konakçı dokuya kolonizasyonu, çeşitli salgı ürünleri ve sinyal moleküllerinin aracılık ettiği bir dizi ardışık olaydır. Bununla birlikte, konukçu dokuya mikrobiyal suşların eklenmesi, endofit kolonizasyonu için birincil adımdır. Lipopolisakkaritler ve ekzopolisakkaritler gibi salgı ürünleri, doğrudan veya dolaylı olarak adezyona yardımcı olur. Buna karşılık, flagella, fimbriae ve pilli gibi yapısal bileşenler, kolonizasyon sırasında bakteri suşlarının konukçu dokuya doğru hareketine yardımcı olur (Şekil. 2.23). Bununla birlikte,

bitkiler, özellikle gen ekspresyon modellerinde, mikrobiyal suşların yüzeylerine bağlanmasından sonra farklı tepkiler verir. Bir çalışmada Bodilis ve Barry (Bodilis ve Barry, 2006), *Pseudomonas*'ın yüzeyinde bulunan dış zar porin F (OprF) proteinlerini ve bunların konukçu yüzeylerle bağlanmadaki rollerini tartışmışlardır. Benzer şekilde, bitki hücre duvarında bulunan arabinogalaktan proteinleri, endofitik mikroorganizmaların ilk kolonizasyonuna yardımcı olur (Nguema-Ona vd, 2014).

Bağlandıktan sonra, mikrobiyal suşlar, aktif veya pasif süreçler aracılığıyla aracılık edilebilen konukçu dokuya girmek için nüfuz etmeye başlar. Pasif penetrasyon, zararlı organizmanın neden olduğu kök yüzeyindeki çatlaklarda yer alırken, aktif penetrasyon, konukçu doku içinde giriş veya çoğalmada yapısal bileşenler ve salgı ürünlerini içerir (Böhm vd, 2007). Stomalar, yaralar ve kotiledonlar gibi toprak üstü kısımlar endofitlerin tipik giriş bölgeleridir (Suárez-Moreno vd, 2010). Bununla birlikte, giriş ve penetrasyon sürecinde karşılıklı ve patojenik suşlar arasında önemli farklılıklar gözlenmiştir. Örneğin, patojenler, yararlı mikroorganizmalara kıyasla daha yüksek miktarda hücre duvarı parçalayıcı enzimler salgırlar (Reinhold-Hurek vd, 2006).

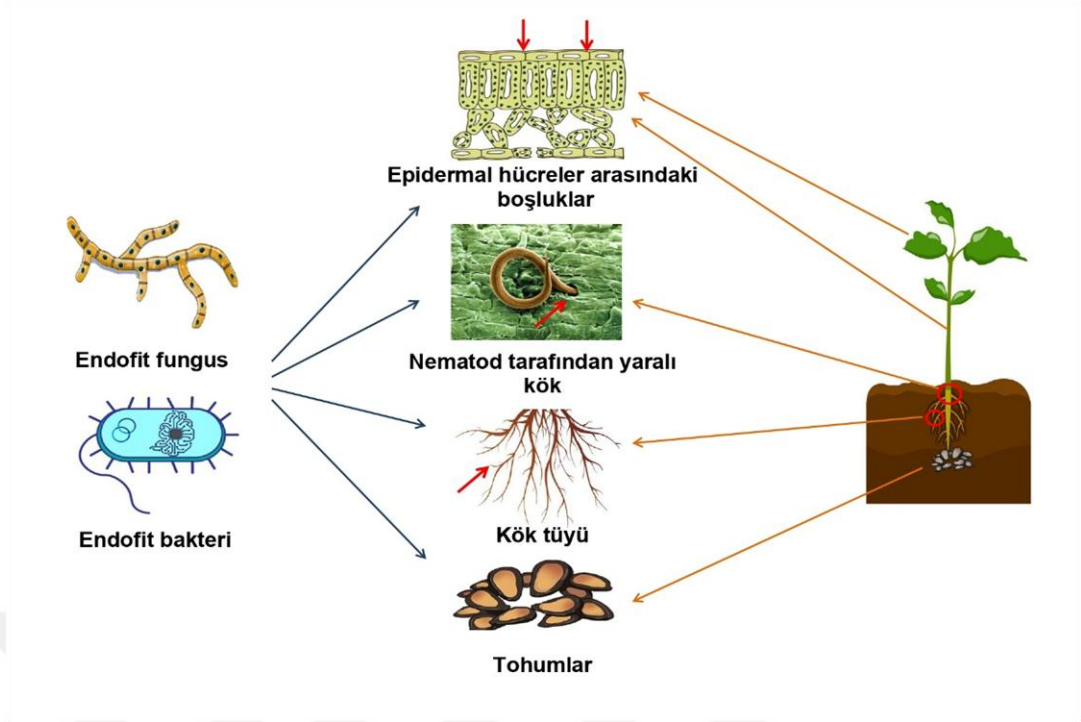
Ek olarak, bazı çalışmalar endofitlerin bitkilerde hastalık önleyici rol oynadığını göstermiştir. Endofitler, patojenlerin bitki dokusuna yerleşmesini ve yayılmasını engelleyebilirler. Örneğin, endofitik bakteri suşu *Bacillus amyloliquefaciens*, patojenik bakterilere karşı biyokontrol potansiyeli gösterir (Chowdhury vd, 2015). Aynı şekilde, endofitik funguslar da bitki patojenlerine karşı antagonistik etki gösterir ve bitki savunma mekanizmalarını aktive eder (Rodriguez vd, 2009).

Bu nedenle, karşılıklı yarara dayalı endofitler ve konukçular, bitki dokularının kolonizasyonu sırasında patojenlere kıyasla daha derin ve daha kesin bir moleküler sinyal modülasyonu sağlarlar. Konukçu içindeki endofitlerin bulaşması farklı modlar aracılığıyla olabilir (örneğin, ortamların aracılık ettiği yatay; tohumlar/polen taneleri yoluyla ebeveynler aracılığıyla yavrulara bulaşma olarak adlandırılan dikey; veya yatay ve dikey veya her iki iletim modu) (Frank vd, 2017). Önceki bir çalışmada, steril koşullar altında büyüyen otsu bitkiler türlerinin tohumlarından, kotiledonlarından ve yapraklarından endofitlerin izolasyonu yoluyla fungus suşlarında dikey bulaşma modları iyi belgelenmiştir (Hodgson vd, 2014). Bununla birlikte, fungus türlerinde yatay geçiş modu da çeşitli yazarlar tarafından

bildirilmiştir. Bu gözlem, genellikle ölü yaprak ve toprakta sporlanan, ancak sıklıkla endofit olarak rapor edilen *Alternaria* ve *Cladosporium* gibi her yerde bulunan bazı fungus sporofitlerine dayanmaktadır (Hayes, 1979; Marchisio ve Airaudi, 2001).

Benzer şekilde bakteri türleri de genellikle yatay, dikey ve karışık bulaşma şekillerini tercih eder. Başka bir çalışmada yazar, aseptik koşullar altında büyüyen bir tohumun, normal çevre koşullarında yetişen bir tohumdan daha düşük bakteri çeşitliliğine sahip olduğunu bildirmiştir. Bu gözlem, yatay iletim modunun yaygınlığını göstermektedir (Faeth, 2002; Bright ve Bulgheresi, 2010; Singh ve Kalita, 2024). Endofitlerin başarılı bir şekilde kolonizasyonu, konukçu genotipleri, mikrobiyal suşların doğası ve besin kaynaklarının mevcudiyeti gibi çeşitli faktörlere bağlıdır (singh vd, 2017; Kumar vd, 2020). Endofitler, kolonizasyon ve bulaşma sırasında benzersiz bir yol izlemektedirler. Örneğin, *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN suşu, ekzodermis veya kortikal hücreler yoluyla konakçı dokuya giriş yaparak köklerin merkez bölgesine ulaşır ve ksilem damarlarıyla üst bölge veya yer üstü dokuya doğru hareket eder (Compant vd, 2008). Bununla birlikte, endofitik mikroorganizmalar genellikle apikal köke girmek için süperleşmemiş hücreleri tercih etmektedir (James vd, 2002).

Her bitki türünün yaşam döngüsünde en azından bazı endofitler olmasına rağmen, bunların yoğunluğu bitki türleri arasında ve hatta aynı bitkinin farklı organları arasında farklılık gösterir. Genel olarak endofitik mikroorganizmaların çeşitliliği yukarı doğru veya kökten meyvelere doğru hareket ettikten sonra azalır. Bu nedenle, çiçeklerde veya tohumlarda endofitlerin yoğunluğu, kökler, gövdeler ve yapraklar gibi diğer bitki organlarına göre daha düşüktür. Ancak bitkilerin diğer üreme organları söz konusu olduğunda çiçeklerde meyve ve tohumlara göre daha yüksek yoğunluk ve çeşitlilik kaydedilmiştir (Kumar vd, 2020). Bu nedenle, endofit çeşitliliği köklerden üst kısma doğru artar ve bitkilerin üreme organları boyunca azalmaktadır (Pathak vd, 2022). Endofitlerin bu çift yönlü rolü, hem bitki sağlığını artırmada hem de tarımsal üretimde önemli avantajlar sunmaktadır (Berg vd, 2016).



Şekil 2.23. Endofitik fungus ve bakterilerin giriş yolları.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

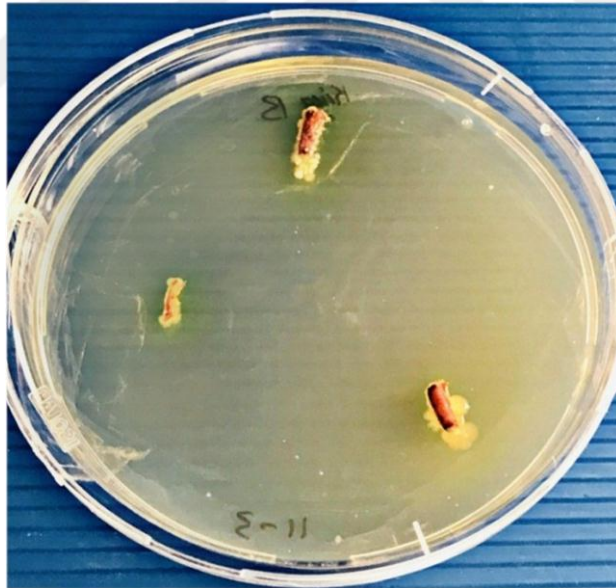
3.1. Test Bitkisi

Çalışmada kullanılan *Aronia melanocarpa* fidanları, bir çevrimiçi alışveriş sitesinden temin edilmiştir (<https://www.fidanmarketim.com>).

3.2. *Aronia melanocarpa* Bitki Örneklerinin Yüzeysel Sterilizasyonu ve İzolasyon Aşamaları

3.2.1. Bitki Köklerinin Yüzeysel Sterilizasyonu ve Endofit Bakterilerin İzolasyonu

Bitki kökleri akan musluk suyu ile yıkandı. Sırasıyla %70'lik etanolde 1 dakika, sodyum hipoklorit solüsyonunda (%2,5 Cl olan) 5 dakika ve steril distile su ile 3 kez yıkama yapıldı. Temizlendikten sonra bitki köklerini 1 cm olacak şekilde bistüri ile kesilip steril Petri kabı içerisindeki kurutma kağıdına yerleştirildi (Çalışmalar başlamadan önce Petrilere kurutma kağıdı yerleştirilerek otoklavlandı) ve besiyerlerine (King B, Nutrient agar, M9 minimal, TSA) aşılandı.



Şekil 3.1. Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilmiş bitki kökleri ve endofitik bakteri izolasyonu.

Sterilizasyon yönteminin başarılı olduğunu doğrulamak için yıkama yapılan son distile sudan da besiyerine aşılama yapıldı. Petriler 28 °C'de 3 gün inkübe edilerek gelişme takip edildi ve morfolojik olarak farklı olan koloniler seçildi. Aynı

besiyerine tekrarlı ekilerek saf kültür elde edildi. Saflaştırılan bakteri örnekleri % 20'lik gliserollü stoğa alınarak -20 °C'de saklandı (Bashan vd, 1993; Araújo vd, 2002; Compant vd, 2011; Bafana, 2013; Tran vd, 2022). Şekil 3.1'de bitki köklerinin yüzey sterilizasyon aşamaları ile birlikte besi ortamına yerleştirme aşamaları gösterilmiştir.

3.2.2. Bitki Köklerinin Yüzeysel Sterilizasyonu ve Endofit Fungus İzolasyonu

Kısaca, kök akan musluk suyunda iyice yıkandı ve 1 dakika boyunca %70 etanol, 5 dakika boyunca sodyum hipoklorit solüsyonunda (%2,5 Cl olan), ve steril damıtılmış suda üç kez yıkandı.

Steril Petri kabı içerisindeki kurutma kağıdına yerleştirildi (Çalışmalar başlamadan önce Petrilere kurutma kağıdı yerleştirilerek otoklavlandı). Kökler 1 cm'lik dilimler halinde kesildi. Parçalar, patates dekstroz agar (PDA) ve malt ekstrakt agar (MEA) ortamı içeren bir Petri kabına yerleştirildi. Örnekler karanlıkta 25 °C'de inkübe edildi.



Şekil 3.2. Yüzeysel sterilizasyonu gerçekleştirilmiş bitki kökleri ve endofitik fungus izolasyonu.

En az 2 hafta boyunca her 2 günde bir segmentlerden gelişen funguslar gözlemlendi. Segmentlerden çıkan hifler, saflık ve tanımlama için taze PDA'ya aktarıldı. Şekil 1a'de bitki köklerinin yüzey sterilizasyon aşamaları ile birlikte besi ortamına yerleştirme aşamaları gösterilmiştir.

3.3. İzolatların Saflaştırılması

İzolasyon Petrilerinde (ortamlarında) gözlenen fungus ve bakteri kolonileri, öze yardımıyla alınıp izole edildikleri besiyerlerinde aktarıldı ve bu işleme saf koloniler elde edilene kadar devam edildi (Ensign, 1992).

3.4. Stok Kültürlerin Hazırlanması

Funguslar için PDA, bakteriler için NA besiyerleri kullanılarak tüplerde hazırlanan yatık besiyerlerine inoküle edilen funguslar ve bakteriler inkübasyona (fungus için 28 °C'ta 5-7 gün, bakteri için 27 °C'ta 24 saat) bırakıldı. Yeterli büyüme gözlemlendikten sonra tüpler +4 °C buzdolabında muhafaza edildi.

3.5. Bakterilerin Morfolojik Karakterizasyonu

İzole edilen bakteri kolonilerinin makroskopik özellikleri şu kriterlere göre değerlendirildi: Koloninin rengi, yüksekliği, kenarı, koloninin opaklığı, kıvamı ve koloninin yüzeyi. Mikroskopik özellikler Gram boyama ile belirlendi. Gram testi için, izole edilmiş bir bakteri kolonisinin bir cam slayt üzerinde bir damla damıtılmış su ile karıştırılmasıyla bakteriyel bir yayma yapıldı. Bu daha sonra havayla kurutuldu ve bakteriyel yaymanın ısıyla sabitlenmesi için üç kez hızlı bir şekilde açık alevden geçirildi. Yaymayı tamamen kaplayacak kadar az miktarda amonyum oksalat kristal viyole eklendi ve 60 saniye boyunca çökmeye bırakıldı. Altmış saniye sonra boya distile su ile nazikçe yıkandı ve mordan olarak yeterli miktarda Gram's iyot eklendi. Altmış saniye sonra, mordan tekrar nazikçe suyla yıkandı ve slaytın 15 saniye boyunca %95 etanol ile doldurulmasıyla rengi giderildi. Daha sonra EtOH distile su ile uzaklaştırıldı ve yeterli miktarda safranin ilave edilerek 30 saniye boyanması sağlandı. Daha sonra preparat, mikroskopik incelemeden önce damıtılmış su ile yıkandı.

Endospor oluşumu, ısıyla sabitlenen bakteriyel yayma preparatları ile değerlendirildi. Bakteriyel yaymayı içeren her slayt, kağıt mendil katmanlarıyla kaplandı ve kaynar su içeren bir tavanın üzerine yerleştirilen boyama rafına yerleştirildi. Kapalı slayt malahit yeşili ile dolduruldu ve 7 dakika boyunca buharla muamele edildi. Daha sonra kağıt kapak çıkarıldı ve slayt durulandı ve %0,5 safranin ile boyandı. Yeşil sporların ve kırmızı bitkisel hücrelerin ortaya çıkması mikroskopik incelemede pozitif sonucu göstermektedir.

Hareketlilik testi: Her bir izolat, yarı katı besleyici agar tüplerinin (%0,2 agar)

ortasına nokta aşılandı ve 30 °C'de inkübe edildi. Koloninin difüzyonu 24 saatte gözlemlendi ve kaydedildi (Elbeltagy vd, 2000).

Morfolojik tanımlama: Her bir izolatın 24 saatlik bir kolonisi toplandı (öze dolusu), bir kültür tüpünde 10 ml steril su ile karıştırıldı ve vortekslendi. 10⁷ cfu/ml'ye kadar seri seyreltmeler yapıldı ve son seyreltmeden 0,1 ml, NA ortamı içeren Petri plakalarına pipetlendi. Her bir izolat, koloni rengi, koloni yüksekliği, koloni kenarları, koloni kıvamı ve bakteri şekli açısından koloni karakterleri açısından kaydedildi (Holt vd, 1994).

3.6. Fungusların Morfolojik Karakterizasyonu

Plakalar 5-7 gün boyunca karanlıkta 28°C'de inkübe edildi. Daha sonra saf fungus kolonileri gözlemlendi ve inceleme için muhafaza edildi (Jasuja vd, 2013; Reddy vd, 2014). Fungus morfolojisi, koloni özelliklerini (renk, şekil, boyut ve hifler) gözlemleyerek mikroskopik olarak ve miselyumun küçük bir kısmı ile sabitlenmiş laktofenol mavisi ve safran boyalı bir slayt kullanılarak bileşik mikroskopla mikroskopik olarak incelenmiştir. Koloni rengi, The Royal Horticultural Society 'nin renk kataloğuna (RHS Colour Chart) göre belirlenmiştir (Royal Horticultural Society, 1995). Bu çalışmada izole edilen ve tanımlanan dört fungus türü kültürel, mikroskopik, morfolojik ve moleküler özelliklere göre kontrol edildi (Cappuccino ve Sherman, 1996).

3.7. Bakteri ve Fungusların Moleküler Tanımlaması

Elisitör olarak kullanılan endofitik bakteri ve fungusları tanımlamak için moleküler teknikler kullandı. DNA izolasyonunda gerekli tüm stok çözeltiler hazırlandı ve belirli koşullar altında saklandı (Maniatis vd, 1982).

Tablo 3.1. Lizis tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
Saf su	70 mL
100 mM Tris-HCl pH 8.0	14 mL
20 mM EDTA	2 mL
1.4 M NaCl	15 mL
CTAB	2 g
Saf su (ayar)	-
Son Hacim	100 mL

Tablo 3.2. Tris tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
Saf su	70 mL
1 M Tris-HCl pH 8.0	1 mL
Saf su (ayar)	-
Son Hacim	100 mL

Tablo 3.3. TE tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
Saf su	70 mL
0.5 M EDTA pH 8.0	2 mL
0.5 M Tris-HCl pH 8.0	0.2 mL
Saf su (ayar)	-
Son Hacim	100 mL

Tablo 3.5. 10X TBE tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
Tris	108 g
Borik Asit	55 g
Saf su	900 mL
0.5 M EDTA pH 8.0	40 mL
Saf su (ayar)	-
Son Hacim	1000 ml

Tablo 3.4. 1x TBE tamponu hazırlama

Bileşen	Hacim/Ağırlık
10x TBE Tamponu	100 mL
Saf su (ayar)	900 mL
Son Hacim	1000 mL

3.7.1. Bakteri İzolatlarından DNA İzolasyonu

DNA ekstraksiyonu, Setil Trimetil Amonyum Bromür (CTAB) yöntemi (Sambrook vd, 1989) izlenerek gerçekleştirildi. Bakteri kolonileri 10 ml besleyici nutrient broth'a aşılandı ve gece boyunca 28 ± 2 °C'de inkübe edildi. Bir ml gecelik kültür, 1,5 ml'lik bir eppendorf tüpüne aktarıldı ve 13000 rpm'de 30 saniye santrifüjlendi. Bakteri hücreleri, süpernatant atılarak toplandı ve 1 ml CTAB (100 ml

CTAB/NaCl çözeltisi hazırlamak için 4,1g NaCl tartılarak 90 ml ddH₂O) içerisinde çözöldü vorteksleyerek iyice karıştırıldı. Dikkatlice homojenize ettikten sonra ve 65 °C'de 45 dakika boyunca üç veya dört kez sallayarak inkübe edildi.

Örnekler su banyosundan alındıktan sonra 5000 rpm'de, 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda tüplerde iki tabaka göröldü. Bunlardan biri alt kısma çökelmiş organik kısım, üst tabakada ise su, DNA ve diğer polisakkaritleri içeren kısımdır. Süpernatant (DNA'nın bulunduğu kısım) 1,5 ml'lik yeni tüplere dikkatli bir şekilde transfer edildi. 1ml kloroform/isoamilalkol ve 2µl RNase ilave edildi. 2 dakika boyunca vortekslenerek iyice karıştırıldı. Tüpler daha sonra 13.000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant 1,5 ml'lik tüplere transfer edildi.

Tekrar 1 ml kloroform/isoamilalkol eklenerek 2 dakika boyunca vortekslendi ve iyice karıştırıldı. Tüpler daha sonra 13000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant (DNA'nın bulunduğu kısım) 1,5 ml'lik yeni tüplere transfer edildi. 3/2 hacminde soğuk isopropanol eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika boyunca -20 °C'de buzdolabında çökelmeye bırakıldı. On dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj edilerek DNA tüpün altına çökeldikten sonra üst kısım hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı. Tüplerdeki tüm etanol uzaklaştırıldıktan sonra DNA'lar desikatörde kurumaya bırakıldı. İyice kuruduktan sonra DNA'yı korumamak amacıyla üzerine 50 µl TE eklendi ve buzdolabında saklandı.

3.7.2. Funguslardan DNA İzolasyonu

Toz haline getirilmiş örneklerden 20-30 mg kuru fungus miseli 1.5 ml eppendorf tüplerine transfer edildi. Reaksiyon tüplerine 2-3 adet küçük homojenizasyon boncuğu (0,4 mm) ve 1 ml CTAB (100 ml CTAB/NaCl çözeltisi hazırlamak için 4.1 g NaCl tartılarak 90 ml ddH₂O içerisinde çözöldü.

İyice karıştırıldıktan sonra 65 °C'de 30 dakika boyunca su banyosunda inkübe edildi. Örnekler su banyosundan aldıktan sonra 5000 rpm'de, 10 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda tüplerde iki tabaka göröldü. Bunlardan biri alt kısma çökelmiş organik kısım, üst tabakada ise su, DNA ve diğer polisakkaritleri içeren kısımdır. Süpernatant (DNA'nın bulunduğu kısım) 1,5 ml'lik yeni tüplere dikkatli bir şekilde transfer edildi.

1ml kloroform/isoamilalkol ve 2 µl RNase ilave edildi. İki dakika boyunca

vortekslenerek iyice karıştırıldı. Tüpler daha sonra 13000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant 1,5 ml'lik tüplere transfer edildi.

Tekrar 1 ml kloroform/isoamilalkol eklenerek 2 dakika boyunca vortekslendi ve iyice karıştırıldı. Tüpler daha sonra 13000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Süpernatant 1,5 ml'lik yeni tüplere transfer edildi, 3/2 hacminde soğuk isopropanol eklenip, iyice karıştırıldıktan sonra 30 dakika boyunca -20 °C'de buzdolabında çökelmeye bırakıldı.

On dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj edilerek DNA tüpün altına çökeldikten sonra üst kısım hızlı bir şekilde uzaklaştırıldı. Tüplerdeki tüm etanol uzaklaştırıldıktan sonra DNA'lar desikatörde kurumaya bırakıldı. İyice kuruduktan sonra DNA'yı TE pH 8 içinde çözüldü ve buzdolabında saklandı.

3.7.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi tekniği, DNA fragmanlarının görüntülenmesinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu çalışmada bakteri ve funguslardan izole edilen DNA'nın varlığı bu teknik kullanılarak doğrulandı. Agaroz jel moleküler bir elek görevi görerek daha küçük DNA parçalarının jelden daha büyük olanlara göre daha hızlı ve daha uzağa geçmesine olanak tanır.

Agaroz jeli hazırlamak için 0,3 g agaroz, 30 ml 1 X TBE tamponu ile karıştırıldı ve berrak bir çözelti elde edilene kadar karıştırılarak mikrodalgada ısıtıldı. Çözelti daha sonra 50°C'ye soğutulduktan sonra elektroforez tepsisine döküldü. Jelin oda sıcaklığında soğumasına izin verildi ve katılaşmanın ardından taraklar çıkarıldı. Daha sonra jel, jel seviyesinin hemen üzerine 1X TBE tampon çözeltisi dolduruldu.

Bakteri ve fungusların örneklerinden izole edilen DNA'yı görselleştirmek için agaroz jelin kuyucuklarına yüklenen karışımın konsantrasyonları dikkatlice hazırlandı. Toplamda 3 µl DNA, 1,7 µl saf su, 0,3 µl Gel Red (10 mg/ml stok), 100bp DNA marker ve 1 µl yükleme tamponu karıştırılıp jel üzerine yüklendikten sonra jel yaklaşık 30-45 dk sabit voltajda elektroforeze tabi tutuldu.

Elektroforezden sonra agaroz jel, bir Transilluminatör kullanılarak UV ışığı altında görüntülendi. DNA fragmanları, jelde farklı bantlar olarak gözlemlendi; daha küçük fragmanlar, büyük fragmanlara göre jelin tabanına daha yakın görünüyordu. İzole edilmiş DNA'nın boyutunu tahmin etmek için DNA fragmanlarının varlığı ve boyutu, bilinen fragman boyutlarına sahip standart bir DNA işaretleyiciyle (DNA

marker) karşılaştırıldı (Maniatis vd, 1982).

3.7.4. 16S rDNA Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kültüre edilen bakteri ve suşlarının filogenetik analizleri için korunmuş 16S ribozomal DNA bölgesi tercih edildi. Bu amaçla, PCR amplifikasyonu için 27F ve 1525R primer çiftleri kullanıldı (Weisburg vd, 1991). Toplam reaksiyon hacmi 50µl olacak şekilde, aşağıdaki bileşenler sırasıyla PCR tüpüne konuldu;

Kalıp DNA	1 µl
10X PCR buffer	5 µl
MgCL ₂	3 µl
dNTP karışımı	1 µl
27F primeri (10 pmol)	2 µl
1525R primeri (10 pmol)	2 µl
Distile Su	37,75 µl
Taq polimeraz	0.25 µl
Toplam hacim	50 µl

Çalışmada 16S rDNA gen bölgesinin çoğaltılması için kullanılan primer dizileri (Heuer vd, 1997) aşağıda gösterilmektedir.

primer 27F	5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'
primer 1525R	5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3'

16S rDNA gen bölgesinin amplifikasyonu için kullanılan zaman ve sıcaklık döngüleri aşağıdaki gibidir:

Basamak	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk Denatürasyon	1	2 dk	95 °C
Denatürasyon		20 sn	95 °C
Anneling	35	40 sn	56 °C
Uzama		90 sn	72 °C
Son Uzama	1	5 dk	72 °C

Tüpler daha sonra +4 °C'de saklanmıştır.

3.7.5. ITS1-5.8S-ITS2 Bölgesinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Benzer olan endofitik fungus izolatlarından PCR işlemi için seçim yapıldı. DNA örneklerinin ITS1-5.8S-ITS2'i kodlayan DNA bölgesinin amplifikasyonu için iki primer (ITS-5 ve ITS-4) kullanıldı (White vd, 1990). PCR işlemleri 0,2 ml'lik PCR tüplerinde Thermal Cycler (Primus 25)'da yapıldı.

Stok solüsyonlar kontaminasyon riskini azaltmak amacıyla küçük miktarlarda (25-100 µl) steril eppendorflara bölünerek kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. dNTP karışımı (her biri 25 mM dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) (promega), Primer ITS5 (GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) ve Primer ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Qiagen) (White vd, 1990), 5X Taq tampon (Promega) ve MgCl₂ (Promega) buz üzerinde çözülme ve vortekslendi.

Reaksiyon hazırlama süreci buz üzerinde gerçekleştirildi. Protokolde belirlendiği gibi malzemeler buz üzerinde reaksiyon tüpünde çözülme ve vortekslendi. Taq DNA polimeraz (Promega) ise enzim ekleme aşamasına kadar -20 °C'de tutulmaya devam edilmiştir.

PCR karışımı aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

Kalıp DNA	1 µl
10XPCR buffer	5 µl
MgCL ₂	3 µl
dNTP karışımı	1 µl
Primer 1 (ITS4)	2 µl
Primer 2 (ITS5)	2 µl
Distile Su	37,75 µl
Taq polimeraz	0.25 µl
Toplam hacim	50 µl

Her örnek için toplam hacim 50 µl olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Master mix hazırlamak için reaksiyonda kullanılacak malzemeler Taq DNA polimeraz ve kalıp DNA hariç örnek sayısınca artırılarak 1,5 ml'lik soğutulmuş steril eppendorf tüpü içerisine buz üzerinde transfer edildi.

Hazırlanan master mix vortekslendi ve buz üzerinde bekletilen her bir PCR tüpüne bu karışımdan 49 µl ilave edildi. Bu işlemi takiben her bir PCR tüpüne ilgili kalıp DNA ve en son olarak da Taq polimeraz ilave edilerek vortekslendi.

Negatif kontrol diğer tüplerden farklı olarak kalıp DNA içermeyecek şekilde

hazırlandı. Bu işlemleri takiben hazırlanan PCR tüpleri fazla bekletilmeden aşağıdaki programın uygulanması için (BNRHI. CYC programı kullanılmıştır) Thermal cycler'a yerleştirildi.

PCR için uygulanacak zaman ve sıcaklık profili aşağıdaki gibidir:

Basamak	Döngü	Süre	Sıcaklık
İlk Denatürasyon	1	5 dk	94 °C
Denatürasyon		30 sn	94 °C
Anneling	35	60 sn	49 °C
Uzama		90 sn	72 °C
Son Uzama	1	7 dk	72 °C

Tüpler daha sonra +4 °C'de saklanmıştır.

3.8. Dizi Analizi ve Değerlendirme

Bakteri ve fungus kültürleri 16S ribozomal DNA bölgesi ve ITS bölgesi dizi analizleri hizmet alımıyla gerçekleştirildi. 16S rDNA bölgesi için 27F ve 1525R primer çiftleri ve ITS bölgesi için ITS5F ve ITS4R primer çiftleri kullanıldı.

ITS1-5.8S-ITS2 rDNA ürünlerini ve 16S rDNA içeren PCR örnekleri MacroGen firmasına gönderildi dizilemeleri yapıldıktan sonra farklı formatlarda tarafımıza gönderildi.

NCBI veritabanından endofitik fungusların yakından ilişkili 16S rDNA ve ITS gen dizilerini elde edildikten sonra filogenetik analiz yürütmek için veri seti oluşturuldu. Dizileri BioEdit programını kullanarak hizalandı ve hataları manuel olarak da düzeltildi. Daha sonra MEGA 6,06 programında Neighbour-Joining algoritması ve program tarafından önerilen baz değişim modeli kullanarak filogenetik ağaçlar oluşturuldu.

3.9. *Aronia melanocarpa* (Michx) Elliott Sürgünlerinden In Vitro Elde Edilen Yapraklar Kullanılarak Kallus Üretimi

3.9.1. Sürgün Çoğaltımı

Olgun *A. melanocarpa* bitki örneği ticari olarak temin edildikten sonra bitkiden kesilen sürgün parçaları musluk suyu altında yaklaşık 5 dakika boyunca yıkandı. Bu işlemin ardından uygun boyuttaki sürgünler birkaç damla Tween-20 içeren %1'lik NaOCl çözeltisi içerisinde 15 dakika tutuldu ve yüzeysel sterilizasyonları sağlanmış

oldu. Bu işlemin ardından sürgünler steril distile su ile üç defa yıkandı ve NaOCl kalıntılarından arındırılmaları sağlanmış oldu.

Ardından sürgünler her biri en az 1 nod içeren 1-1,5 cm boyutlarında parçalara ayrılmış, bu parçalar daha sonra 40 ml vitaminli Murashige ve Skoog (MS) besiyeri (1962) içeren Magenta kaplarında kültüre alındı. MS besiyeri %3 süktroz ve %0,7 agar ile desteklendi. Kùltürler 1 ay süresince 16/8 saatlik fotoperiyodda uygulanan 23 °C sıcaklıkta inkübe edildi. Yeterli sayıda yaprak eksplantına ulaşmak için sürgünler aynı şartlarda fakat 0,5 mg/L benzilaminopürin ile desteklenmiş MS besiyerinde alt kùltürlere alınarak çoğaltıldı. Elde edilen lateral sürgünlerin üzerinde bulunan yapraklar kallus üretimi için eksplant kaynağı olarak kullanıldı.

3.9.2. Besiyerinin Hazırlanması

Çalışmada bitki doku kùltürü için neredeyse bütün çalışmalarda görülmesi mümkün olan ve temel besi ortamı ihtiyaçlarını karşılayan MS besi yeri kullanıldı (Murashige ve Skoog, 1962). MS besi ortamı bitkilerin temel olarak ihtiyacı olan makro-mikro besin elementleri yanında su ve vitaminleri de içermektedir. Yapılan çalışmada, MS besi ortamında 2,4-D diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve Kinetin (KIN) bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları kullanıldı.

Besi ortamı hazırlanırken içerik için 4,4 g/L MS - 30 g/L süktroz oranında tartılıp, karıştırıldıktan sonra çalkalayıcı ile çözünmesi sağlandı. Besi ortamı çözündükten sonra pH değeri 5,7-5,8 aralığına getirildi ve katılaştırması için 7 g/L katılaştırıcı jel (Agar) ilave edildi.

3.9.3. Yüzeysel Sterilizasyonu

A. melanocarpa yaprakları 2-3 kez akan su ile 30 dakika yıkandıktan sonra 30-40 dakika sıvı deterjan ile ön işlem den geçirildi. Yıkanan yapraklar, 1 dakika boyunca %70 etanol içine daldırıldı, ardından steril damıtılmış su ile yıkandı ve ardından birkaç damla Tween 20 içeren %2 sodyum hipoklorit (NaOCl) ile ıslatıldı, ardından steril çift damıtılmış suyla 10 dakika durulandı.

3.9.4. Kallus Üretimi

Kallus üretimi için elde edilen yapraklar yaklaşık 0,5 cm² uzunluğunda parçalar halinde kesilerek 1,5 mg/L 2,4-D veya 0,5 mg/L KIN değeri ise 1,5 mg/L 2,4-D içeren Murashige ve Skoog ortamında büyütüldü, aynı fiziksel koşullar altında

alt yüzeyleri birbirine bakacak şekilde kültüre alındı. İnkübasyon süresi olarak 1 aylık periyod kullanıldı. Bu süre sonunda elde edilen kallus dokuları sonraki deneylerde kullanılacaklardır. Belirtilen tüm bu işlemler laminar hava akışlı steril kabin içerisinde gerçekleştirildi, kültür kabı başına 6 eksplant kullanıldı.

3.9.5. Gözlem Ortamı ve Kallus Gelişimi

A.melanocarpa eksplantları 24 ± 1 °C'de 2500 lux floresan ışık altında özel iklim odalarında 16 saat aydınlık 8 saat karanlık olacak şekildeki periyotlarda bekletilerek kallus gelişimleri gözlemlendi. Kontamine olan kültür kapları olabilecek en kısa sürede ortamdan uzaklaştırıldı, kallus gelişimi gözlenmeyen kültür kaplarının ise beklenmesine devam edildi. Takip edilen kültür kaplarında 1 ay süre içerisinde ekimi yapılan *A. melanocarpa* eksplantlarında kallus oluşumu başlangıcı gözlemlendi.

3.10. Elisitör Hazırlanması

3.10.1. Bakteri Elisitörleri

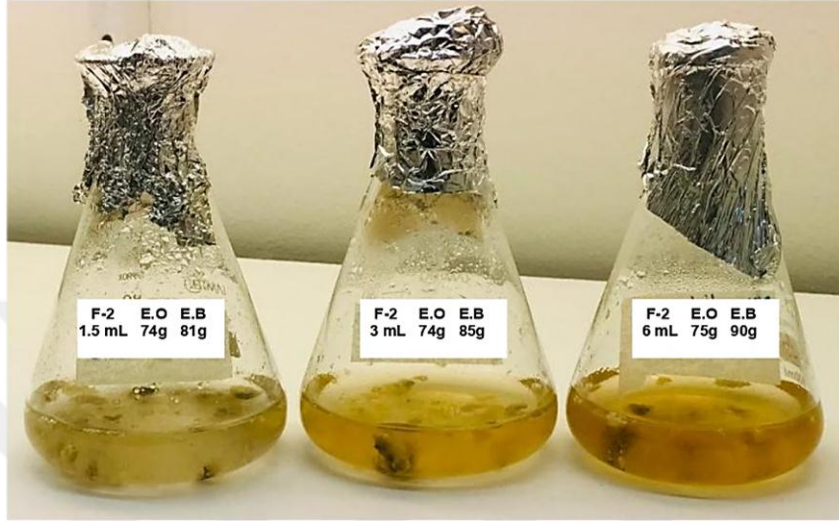
Kültürlerden elde edilen bakteriyel elisitörler, taze yetiştirilmiş bakteriyel biyokütle kullanılarak hazırlandı. Bakterilerin yeni gelişmiş bir kolonisi, 100 ml steril nutrient broth besin içeren konik şişeye (250 mL) aseptik olarak aşılandı. Kültürler, 27 °C'de bir döner çalkalayıcıda (90 rpm) 48 saat süreyle inkübe edildi. Bakteriyel biyokütle, 24 saatlik 10000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek peletlerin dibe çökmesi sağlandı. Süpernatant daha sonra filtre ile sterilize edildi (0,22 µm, PVDF filtreleri, Millipore), pH değeri 5,7-5,8 aralığına getirildi ve daha fazla kullanım için 4 °C'de cam şişelerde saklandı (Shaikh vd, 2020).

3.10.2. Fungus Elisitörleri

Funguslar 7 gün boyunca patates dekstroz agar plaklarında üretildi. Bir santimetre kare fungus içeren agar parçası, 250 mL patates dekstroz sıvı ortamı içeren 500 mL'lik bir erlenmayere aşılandı. Kültür, 150 rpm'de çalıştırılan bir çalkalayıcı rotary üzerinde 25 ± 2 °C'de tutuldu. Yirmi gün sonra funguslar tamamen büyümüş sporlu miseller havan ve tokmakla homojenize edildi ve 10000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatantlar toplandı. Toplanan süpernatant filtre ile sterilize edildi (0,22 µm, PVDF filtreleri, Millipore), sterilize edilmiş fungus özleri, in vitro kültür sistemi için elisitörler olarak kullanıldı. Fungal ekstraktlar pH değeri 5,7-5,8 aralığına getirildi 4 °C'de saklandı (Boonsongcheep vd, 2019).

3.11. Biyotik Elisitör Uygulamaları

Kırılğan kallus 0,5 g altı eşit parçaya bölündü, elisitörlerin eklenmesinden önce kallusların, katılaştırıcı madde içermeyen 30 MS mL içeren, 1,5 mg/L 2,4-D, 0.5 mg/L kinetin içeren ve %3 (w/v) süktroz ile desteklenen MS ortamı konulan 125 mL'lik erlenmeyer şişelerinde alt kültürü yapıldı.



Şekil 3.3. MS ortamına konsantrasyonlarda (5, 10 ve 15 mL/ 100 mL) elisitörleri eklenmesi. F-2: Eklenen Elisitör ve konsantrasyonunun sembolüdür. E.O: Elisitörü eklemeyen ağırlık. E.B: Elisitörle birlikte ağırlık.

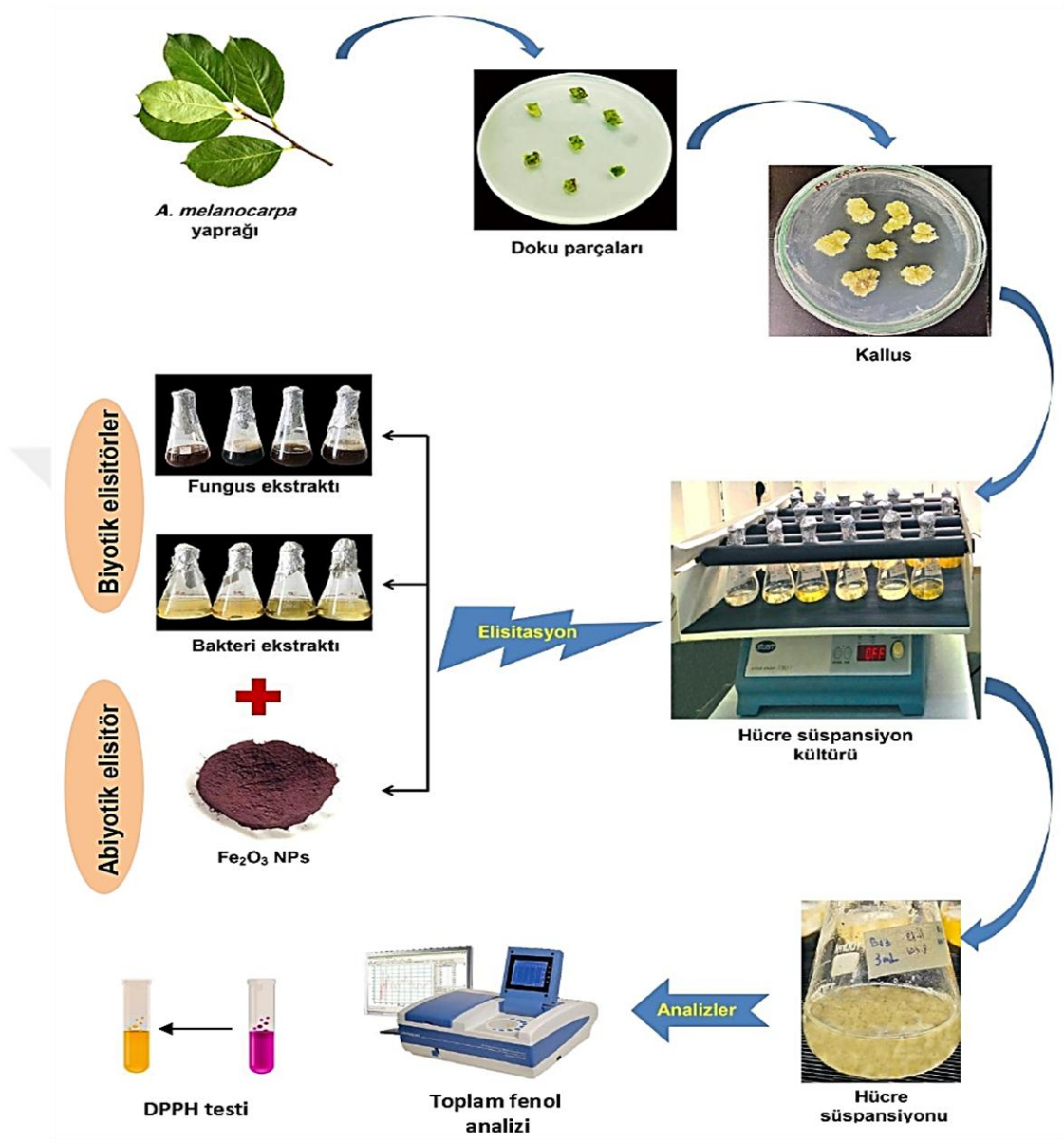
Elisitörleri kültüre 4 endofit bakteri *P. umsongensis*, *P. brassicacearum*, *B. subtilis*, *P. litorisediminis* ve 4 endofiti fungus *R. vagum*, *D. novozelandica*, *G. butleri* ve *D. stigma* (0, 5, 10 ve 15 mL/100 mL) nihai konsantrasyonlarıyla eklendi, kontrol erlenmeyer şişelerine hiç bir elisitör ilave edilmedi (Şekil 3.3).

Süspansiyon kültürleri, ortalama hızı 50-60 rpm olan döner çalkalayıcıda (Remi, Hindistan) muhafaza edildi. Kùltürler 16/8 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde ve 24 ± 1 °C sıcaklıkta inkübe edildi. On iki gün süreyle elisitörlerle maruz bırakıldıktan sonra, kalluslar süzölerek toplandı ve 48 saat boyunca 50 °C'de kurutuldu (Şekil 3.4).

3.12. Abiyotik Elisitör Uygulamaları

Biyo-fabrikasyon Demir Oksit Nanopartiküller'in kallus kültürü üzerindeki etkisini araştırmak için laboratuvarımızda daha önceden sentezlenmiş olan Fe₃O₄ nanopartikülleri abiyotik elisitör olarak kullanıldı, bu amaçla önce steril distile su içerisinde 1mg/mL Demir Oksit Nanopartiküller nano-biyofarmölasyon stok

solüsyonu hazırlandı ve ardından istenilen konsantrasyonlarda (10, 15 ve 20 mg/L) deney ortamlarında kullanıldı (Irum vd, 2020; Tapia-Guerrero vd, 2020).



Şekil 3.4. *A. melanocarpa* kallusunda fenolik madde üretimini teşvik etmek ve antioksidanları arttırmak için biyotik ve abiyotik elisitörlerin uygulanması.

Fe₃O₄, kallus uygulaması sırasında aseptik koşulları korumak için MS ortamına eklenmeden önce filtre ile sterilize edildi. Gerekli nanopartikül konsantrasyonları, otoklavlamadan sonra MS ortamına 30 mL eklendi, pH 5,8'e ayarlandı. Kontrol erlenmeyer şişelerine nanopartikül ilave edilmedi. Kırılgan kallus 0,5 g altı eşit parçaya bölündü ve farklı konsantrasyonlarda nano partiküller içeren MS ortamı

içeren erlenmayerlere aşılandı. Bu erlenmayerler 12 gün boyunca 24 ± 1 °C'de 16/8 saat aydınlık ve karanlık döngüsünde inkübe edildi. Kallus kültürü örnekleri, ilk kallus transfer tarihinden itibaren 12. günde toplandı. Kallus daha sonra kuru ağırlığın kaydedilmesi için iki gün 50 °C'de bir kuru ısı fırınında tutuldu. Kallus daha sonra daha fazla analiz için saklanan ince toz haline getirildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Kallusun toz haline getirilmesi.

3.13. Toplam Fenolik Madde ve Antioksidan Testleri için Kallus Ekstraktının Hazırlanması

Tüm örnekler metanol ekstraksiyon sonuçları olup 50 kat seyreltmeye ait sonuçlardır. Ekstraksiyon aşamasında 1 gram toz örnek tartılıp 10 mL metanol eklenmiştir 1 gece boyunca 25 derecede 100 rpm'de çalkalamalı inkübatörde çalkalanmıştır. Beş dakika ultrasonik banyo ve vorteks ardından santrifüjlenmiş ve süpernatant kullanılmıştır. Örnekler daha sonra Ege Üniversitesine bağlı Ege Matal adlı kuruluşa analiz için gönderilmiştir.

3.14. Toplam Fenolik Madde Tayini

Toplam fenolik madde miktarı, Slinkard ve Singleton (1997), yöntemine göre Folin–Ciocalteu mikro metodu kullanılarak belirlenmiştir. Yaklaşık 30 µl özüt çözeltisi, 2 ml damıtılmış su ve 100 µl Folin-Ciocalteu reaktifi ile birleştirildikten sonra, 200 g/l konsantrasyonundaki Na₂CO₃ içeren 300 µl eklenmiştir. Karışım, 40 °C'de 25 dakika boyunca su banyosunda bırakılmış ve ardından 760 nm'de

absorbansı ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisi olarak gallik asit standardı kullanılmıştır. Analiz için kontrol olarak hiçbir özüt içermeyen bir çözelti düşünülmüştür. Fenolik madde içeriği, Gallik Asit Eşdeğeri (GAE) olarak bu denklem kullanılarak hesaplanmıştır:

$$A = 0,98C + 9,925 \times 10^{-3} \text{ (R}^2 = 0,9996\text{)}$$

Burada A, gallik asidin absorpsiyonu, C ise konsantrasyondur (mg GAE g⁻¹ KA).

3.15. DPPH• Radikal Temizleme Aktivitesinin Belirlenmesi

Toplam antioksidan aktivitesi, Brand-Williams vd (1995) tarafından, tarif edilen yöntem kullanılarak değerlendirildi. Ekstraktların serbest radikal süpürme aktivitesini belirlemek için 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil (DPPH•) kullanıldı, 0.1 mM konsantrasyonda bir DPPH• çözeltisi metanol içinde hazırlandı ve ardından 3 ml ekstrakt çözeltisine eklenerek karışım oda sıcaklığında 30 dakika boyunca şiddetli bir şekilde çalkalandı. Kontrol aynı prosedürle hazırlandı ve örnek yerine metanol kullanıldı. Örneklerin absorbansları bir spektrofotometre ile 517 nm'de okundu. Antioksidan aktivitesi yüzdesi şu formül kullanılarak hesaplandı:

$$\text{RSC (\%)} = [A_{\text{DPPH}} - A_s / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Burada: A_s, ekstraktın karışım çözeltisinin absorbansı ve A_{DPPH}, DPPH çözeltisinin absorbansıdır. Tüm belirlemeler üç kez tekrarlandı.

3.16. Antimikrobiyal Aktivite

3.16.1. Antimikrobiyal Yeteneğini Ölçmek İçin Kallus Ekstraktının Hazırlanması

Kallus numuneleri 40 °C'de bir inkübatörde kurutuldu ve daha sonra Şekil 3.5'te gösterildiği gibi havan ve tokmak kullanılarak ince homojen toz üretmek üzere öğütüldü. İnce toz (3 g), Whatman® No. 1 filtre kağıdından (Whatman International, İngiltere) filtrelenmeden önce üç gün boyunca karanlıkta oda sıcaklığında 40 ml %95 Metanol içerisinde bekletildi. Filtrelenen çözeltiler daha sonra gece boyunca 40 °C'de bir su banyosuna konularak kuruyana kadar buharlaştırıldı. Beş farklı konsantrasyonda (10, 30, 50, 80 ve 100 (mg/ml) metanolik ekstrakt), katı ekstraktların %10 dimetil sülfoksit C₂H₆OS (DMSO) içinde çözülmesiyle hazırlandı.

Bu şekilde hazırlanan ekstraktlar daha sonra kullanılmak üzere 4 °C'de bir buzdolabında saklandı.

3.16.2. Test Mikroorganizmaları

Test Mikroorganizmaları *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) ve *Bacillus cereus* (ATCC 9634) olmak üzere üç Gram pozitif bakteri ve *Escherichia coli* (ATCC 25922) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) olmak üzere iki Gram negatif bakteri içeren beş patojenik bakteri suşu antibakteriyel deney için kullanıldı. Antifungal analiz için *Aspergillus niger*, *Trichophyton rubrum*, *Rhizopus microsporus*, *Aspergillus flavus* ve *Microsporum canis* olmak üzere beş patojenik fungus suşu kullanıldı.

Bakteriyel ve fungal suşların yanı sıra Gentamisin ve Klotrimazol tozu (Sigma Aldrich, Amerika), Ondokuz Mayıs Üniversitesi Mikrobiyoloji Bölümünden temin edildi. Bakteriyel ve fungal suşlar, her on beş günde bir Mueller Hinton Agar (Himedia) ve Sabouraud Dextrose Agar (Himedia) üzerinde sırasıyla alt kültürü yapılarak muhafaza edildi ve daha sonra 4 °C'de saklandı. Gentamisin ve Klotrimazol tozu, sırasıyla antibakteriyel ve antifungal analizler için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrol olarak %10 Dimetil sülfoksit (DMSO) (Himedia) kullanıldı.

3.16.3. Antibakteriyel Aktivite Testi

Aronia kallusunun metanolik ekstraktlarının antibakteriyel potansiyeli, Kil vd (2009) disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldı. McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ hücre/mL) bulanıklığa eşdeğer bulanıklıkta ayarlanarak standart bir bulanıklık oluşturuldu (McFarland, 1907; Lorian, 2005). Bu süspansiyondan 100 µl alınan örnek steril bir eküvyon yardımıyla Müller-Hinton agar yüzeyine yayıldı. Sterilize edilmiş filtre kağıdı diskleri (6 mm çapında), (10, 30, 50, 80 ve 100 mg/ml) konsantrasyonlarda 10 µl ekstrakt ile muamele edildi ve daha sonra test bakteri plakalarının yerleştirildi. Plakalar 37 °C'de 24 saat süreyle inkübe edildi ve inhibisyon bölgelerinin çapları ölçüldü. Gentamisin diski (GEN) (30 µg/disk) ve DMSO sırasıyla pozitif ve negatif kontroller olarak kullanıldı. Tüm ölçümler üç kopya halinde yapıldı ve ortalama değerler $\pm$ SD kaydedildi.

3.16.4. Antifungal Aktivite Testi

Antifungal aktivite disk difüzyon yöntemi kullanılarak ölçüldü (Ertürk, 2006).

Her 9 cm'lik Petri kabına yirmi mL Sabouraud Dextrose Agar (SDA) döküldü. Fungus suşları Sabouraud Dekstroz Broth'ta 27 °C'de 48 saat süreyle geliştirildi. Koloniler %0,85 steril normal tuz çözeltisi (5 ml hacim) içerisinde karıştırıldı ve 0,5 McFarland standartlarındaki bulanıklığa ayarlandı. Yaklaşık 10^8 spor/mL içeren 0,1 mL süspansiyon, Petri kaplarındaki agarın üzerine yerleştirildi ve steril pamuklu çubuk kullanılarak dağıtıldı.

Daha sonra sterilize edilmiş filtre kağıdı diskleri (6 mm çapında), her numunenin (10, 30, 50, 80 and 100 mg/ml) metanolik ekstraktlarına batırıldı ve ardından test fungus plakalarının merkezi yerleştirildi. Pozitif kontrol olarak Klotrimazol diski (KLT) (25 µg/disk) ve negatif kontrol olarak DMSO kullanıldı. İnhibisyon bölgeleri 27 °C'de 72 saat inkübasyonun ardından mm cinsinde belirlendi. Tüm deneyler üç kopya halinde yapıldı.

3.17. İstatistiksel Analiz

İstatistiki değerlendirmelerde kontrol grubuna oranla toplam fenolik madde içerik ve antioksidan aktivite ve antimikrobial testlerinde bir farkın olup olmadığını değerlendirmek üzere tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Tüm analizler 3 tekrarlı olarak yapılmış ve analiz sonuçları ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. ANOVA uygulaması ardından $p < 0,05$ önem dereceleri dikkate alınarak Tukey HSD testi uygulandı ve kontrole kıyasla istatistiki olarak farklı olan sonuçlar gösterildi. İstatistiki testler OriginPro 2024 programı kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Endofitik Mikroorganizmaların Gelişmesi ve Kontaminasyonu Üzerine Yüzey Sterilizasyon Yöntemlerinin Etkinliği

Kök sterilizasyonunun sonuçları, sodyum hipoklorit ve etil alkol kullanılarak endofit bakteri ve fungusların izole edilmesinde başarı gösterdi. Son yıkanmış distile suyu besiyerine inoküle ettiğimizde herhangi bir üreme fark edilmedi. Endofitik kökleri izole etmek için yüzey sterilizasyonu, herhangi bir dış kirleticiyi ortadan kaldırmak ve istenen endofitik mikroorganizmaların izolasyonunu sağlamak için çok önemli bir adımdır. Sodyum hipoklorit ve %70 etanol, bitki doku kültürü ve mikrobiyoloji araştırmaları da dahil olmak üzere çeşitli uygulamalarda yüzey sterilizasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (Bafana, 2013; Tran vd, 2022; Kilicoglu vd, 2024).

Sodyum hipoklorit ve %70 etanolün yüzey sterilizasyonundaki rolü, dış mikroorganizmaları öldürerek veya büyümesini engelleyerek bitki materyalini dekontamine etmektir. Güçlü bir oksitleyici madde olan sodyum hipoklorit, bakteriler, funguslar ve virüsler de dahil olmak üzere çok çeşitli mikroorganizmalara karşı etkilidir. Yaygın bir klinik izolat olan *Staphylococcus aureus*'un biyofilmlerinin kontrolünde %70 etanolden daha etkili olduğu gösterilmiştir (Tiwari vd, 2018).

Öte yandan %70 etanol, proteinleri denatüre edebilen ve hücre zarlarını bozabilen, mikroorganizmaların ölümüne yol açabilen geniş spektrumlu bir antimikrobiyal maddedir. Sodyum hipoklorit ve %70 etanolün spesifik konsantrasyonları ve maruz kalma süreleri, uygulamaya ve sterilize edilen bitki materyalinin türüne bağlı olarak değişebilir. Örneğin endofitik mikroorganizmaların köklerden izolasyonunda ortak bir protokol, bitki parçalarının %70 etanolde 1-3 dakika yıkanmasını, ardından sodyum hipokloritte (%0,5-5) 5-30 dakika yıkanmasını içerir (Compant vd, 2011; Bafana, 2013; Tran vd, 2022).

4.2. Endofitik Mikroorganizmaların İzolasyonu

4.2.1. *Aronia melanocarpa* Köklerinden Endofitik Bakteri İzolasyonu

Bitkiler karmaşık organizmalardır ve gerek yüzeylerinde gerekse sistemlerinin içinde çok çeşitli mikroorganizmaları barındırırlar. Bitkiler ve mikroorganizmalar doğada birlikte gelişir ve etkileşime girer (Müller vd, 2016; Lebeis, 2014). Bitkiler

için mikrobiyota, büyüme ve gelişme (Chaparro vd, 2014; Chaparro vd, 2012; del Carmen vd, 2018), strese dayanıklılık (Marasco vd, 2012; Bakker ve Mercado-Blanco, 2012; Mustafa vd, 2024a; Mustafa vd, 2024b), besin maddelerinin emilimi (Zhu vd, 2016) ve sürdürülebilir üretim (Igiehon ve Babalola, 2018; Quiza vd, 2015) açısından önemli olmaktadır. Örneğin, rizosfer toprağının mikrobiyal sistemi, topluluk yapısını, orta dereceli kuraklıkla baş etmek ve bitki toleransını arttırmak için büyüme mevsiminde yeterli dirence sahip olacak şekilde ayarlar (Mercado-Blanco vd, 2018). Bakteriye mikrobiyota besin taşınmasını iyileştirir ve bitki büyümesi ve verimi üzerinde önemli bir etki yapar (Mendes vd, 2011; Bulgarelli vd, 2013).

Bu çalışmada, *Aronia* köklerinin bitki yan ürünlerini uyarmada önemli bir role sahip olabilecek çeşitli endofitik bakteriler açısından zengin olduğu varsayılmıştır. Bu hipotezi kanıtlamak için bu çalışmada *A. melanocarpa* bitkisinin köklerinden 17 adet bakteri suşu saf olarak izole edildi ve kültürel ve mikroskopik özellikleri incelenerek dizileme için Makrogen firmasına gönderildi. Dizilemeye gönderilen izolatlardan 7 tanesi farklı tür olarak tesbit edildi. Bunlardan 4'ü (B-7, B-13, B-15, ve B-21) çalışmada kullanılmıştır. İzolatlar a ait bilgiler Tablo 4.1'de verilmiştir..

Tablo 4.1. Endofitik bakteri suşlarının izolasyon bilgileri

İzolat No	İzolat Kodu	Bitkiden İzole Edilen Kısım	İzolasyon Besiyeri
1	B-6	Kök	N.A
2	B-7	Kök	King B
3	B-10	Kök	N.A
4	B-12	Kök	N.A
5	B-13	Kök	N.A
6	B-15	Kök	M9 minimal
7	B-21	Kök	N.A

4.2.2. *A. melanocarpa* Köklerinden Endofitik Fungusların İzolasyonu

Endofitler, konakçı bitkilerde hastalık semptomlarına neden olmadan, canlı sağlıklı bitki dokularında bulunan organizmalardır (Wani vd, 2015). Endofitik funguslar kolonizasyon bölgeleri, patojenlerle beslenme rekabeti, antibiyotik sentezi ve direnç mekanizmalarının uyarılması yoluyla bitkileri hastalıklardan korur (Heydari ve Pessarakli, 2010). Endofitik funguslar, fitohormonlar üreterek veya bitkinin çeşitli streslere karşı direncini artırarak konakçı bitkinin büyümesini teşvik edebilir ve bitkileri otoburlardan korumak için pestisitler üretebilirler (Wearn vd,

2012; Asaf vd, 2018; Badawy vd, 2021; Abdelaziz vd, 2022).

Bitkiler, bitki mikrobiyomları olarak bilinen bakteri ve funguslar gibi birbirine bağlı mikroorganizmalardan oluşan geniş rezervuarlar üretebilir (Dhyani vd, 2019). Endofitik funguslar, tahmini bir milyon farklı fungus taksonu ile önemli ve aşırı çeşitliliğe sahip bir endofit türüdür (Nisa vd, 2015; Suryanarayanan vd, 2003). Son zamanlarda bilim adamları, endofitik fungusların izolasyonu ve bunların doğal ürünlerinin incelenmesi konusuna büyük ilgi göstermiştir. Endofitik funguslar, toprak funguslarına (Dhayanithy vd, 2019) veya siyanobakterilerle ilişkili funguslara (Nisa vd, 2015) kıyasla metabolik olarak daha fazla eğilim göstermektedir. Endofitik funguslar, yeni biyoaktif bileşiklerin güçlü bir kaynağı olarak kabul edilir (Ancheeva vd, 2020).

Bu çalışmada temin edilen *A. melanocarpa* kökünden toplam 15 fungus izole edilerek saflaştırıldı ve kültürel ve mikroskopik özellikleri incelenerek bunlardan 12 tanesi dizileme için Makrogen firmasına gönderildi. Dizilemeye gönderilen izolatlardan 4 tanesi farklı tür olarak tesbit edildi. İzolatlara ait bilgiler Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4.2. Endofitik fungus suşlarının izolasyon bilgileri

İzolat No	İzolat Kodu	Bitkiden İzole Edilen Kısım	İzolasyon Besiyeri
1	F-2	Kök	PDA
2	F-6	Kök	PDA
3	F-8	Kök	MEA
4	F-12	Kök	MEA

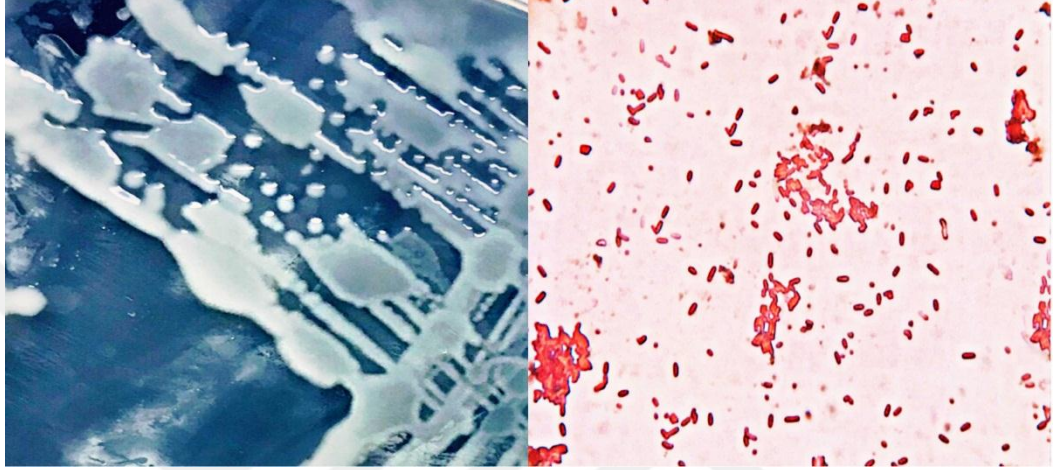
4.3. İzolatların Morfolojik ve Mikroskopik Özelliklerinin Belirlenmesi

4.3.1. Bakterilerin Morfolojik ve Mikroskopik Özelliklerinin Belirlenmesi

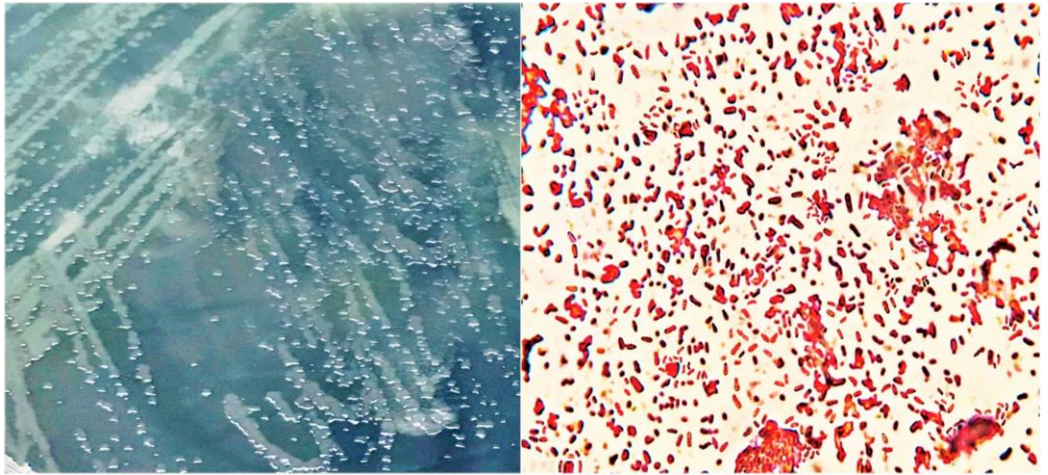
Dizileme sonuçlarına göre, seçilen farklı bulunan dört izolat (*Pseudomonas umsongensis*, (B-13) *Pseudomonas brassicacearum*, (B-15) *Bacillus subtilis* ve (B-21) *Paracoccus litorisediminis* (B-7)) daha ileri seviyede incelemeye tabi tutulmuştur. Moleküler sonucu doğrulamak için kültürlerin NA’da morfolojik özellikleri önceki çalışmalarla karşılaştırıldı. Söz konusu izolatların morfolojik ve mikroskopik özelliklerini aşağıdaki şekilde değerlendirildi.

Çalışmamızdaki *P. umsongensis*’nin morfolojik özelliklerinin, her ikisinin

Kwon vd (2003), çalışmasında belgelenen sonuçlarla oldukça tutarlı olduğu bulunmuştur. Hücreler Gram negatif, spor oluşturmeyan çubuklar ve hareketliydi. NA agarda koloniler dairesel ve beyaz-sarı renktedir. Hücreler King B üzerinde floresan bir pigment üretir. Suşlar 4 °C'de gelişmekte ancak 37 °C' de gelişmemektedir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *P. umsongensis*'nin saf kolonileri ve gram boyama reaksiyonu sonrası 100X immersion objektifinde görüntüsü.

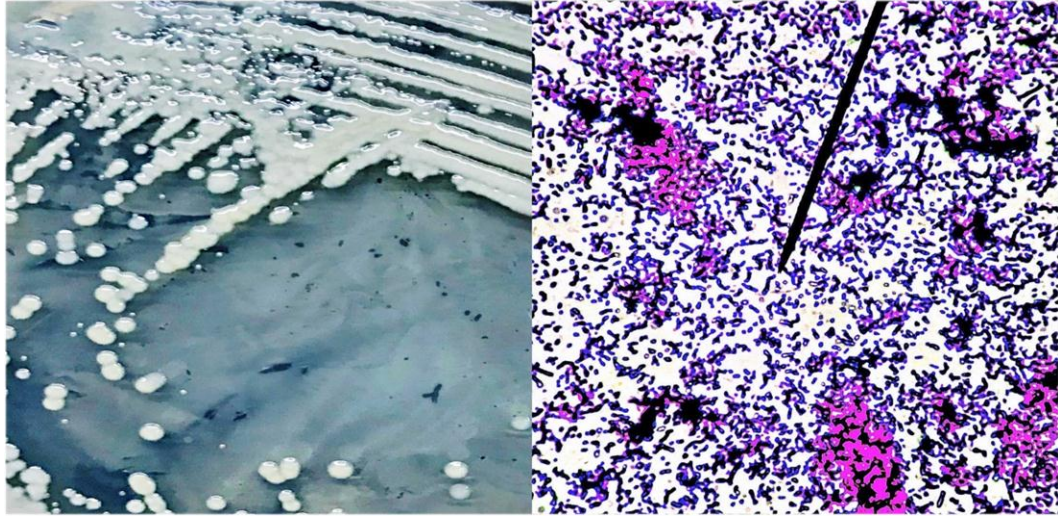


Şekil 4.2. *P. brassicacearum*'nin saf kolonileri ve gram boyama reaksiyonu sonrası 100X immersion objektifinde görüntüsü.

P. brassicacearum izolatlarının, Gamma-proteobacteria sınıfının Pseudomonadales takımına ait, hareketli, Gram negatif, spor yapmayan çubuk olduğu gösterilmiştir. Türün gelişme hızı orta derecededir ve 25 °C'de 1-2 gün içinde 1 mm'lik koloniler oluşturmaktadır.

NA agar plakaları üzerinde oluşan koloniler sarı parlaktır, kubbelidir ve orta derecede mukoiddir ve düzgün kenarlıdır (Şekil 4.2). NA'da iki haftadan uzun süre geliştirme, ortamın renginin koyu kahverengiye değişmesiyle sonuçlanır. Bu açıklamalar Zachow vd (2017) tarafından yapılan çalışmada gösterilen sonuçlarla tutarlıdır.

Mikroskopi sonuçları *B. subtilis*'in gram pozitif, endospor oluşturan ve hareketli olduğunu gösterdi; bu sonuçlar (Jamali vd, 2020; Akindahunsi vd, 2021) çalışmalarıyla tamamen benzerdir. Bu suşun besinli agar üzerindeki büyüme performansı (Şekil 4.3)'de gösterilmiştir, oluşan koloninin gri-beyaz, yuvarlak, opak, düz ve orta büyüklükte kuru olarak karakterize edildiği görülmektedir. Sonuçlarımız Lu vd (2018) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile tutarlılık göstermektedir.



Şekil 4.3. *B. subtilis*'nin saf kolonileri ve gram boyama reaksiyonu sonrası 100X immersion objektifinde görüntüsü.

Park vd (2017) tarafından yürütülen bir çalışma, *P. litorisediminis* bakterilerinin gram negatif, spor oluşturmayan, hareketsiz ve kokoid, oval veya kısa çubuk şeklinde olduğunu bulmuştur. NA üzerindeki koloniler dairesel, hafif konveks, düz, parlak, sarımsı beyaz renktedir (Şekil 4.4), sonuçlarımız bu sonuçlarla oldukça uyumludur.



Şekil 4.4. *P. litorisediminis*'nin saf kolonileri ve gram boyama reaksiyonu sonrası X100 immersion objektifinde görüntüsü.

4.3.2. Fungusların Morfolojik ve Mikroskopik Özelliklerinin Belirlenmesi

Moleküler çalışmaların sonucunu doğrulamak için kültürlerin morfolojik özellikleri önceki çalışmalarla karşılaştırıldı. PDA'da 28 °C'de fungus izolatlarının lama bir damla su alınarak aseptik koşullarda örneğin aktarılmasıyla mikroskopik olarak incelenmesi sonrasında edinilen bilgiler değerlendirilmiştir.

Moleküler karakterizasyonlar sonucunda bu 4 izolat (F-2) *Rhizopycnis vagum*, (F-6) *Dactylonectria novozelandica*, (F-8) *Gongronella butleri* ve (F-12) *Diatrype stigma* olarak ilişkilendirilmişlerdir. Söz konusu izolatların morfolojik ve mikroskopik özelliklerini aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir.



Şekil 4.5. *R. vagum* fungal izolatların solda morfolojik (makroskopik) ve solda mikroskopik (X40, X100) özellikleri.

R. vagum izolatları, koyu kahverengi ile kahverengi renkte hava miselyumu oluşturdu ve arka tarafı kırmızımsı renkte koyu kahverengi, daha açık renkte kenarlar, PDA ortamında 7 gün boyunca kültürlen koloninin boyutu yaklaşık 34-36 mm idi. Konidiler hiyalin ile kahverengi, silindirik ile iğsi, toroidal ve 1-3 parçalı idi. Bu izolasyonun açıklamaları çalışmalarda belgelenen sonuçlarla tutarlıdır (Şekil 4.5) (Farr vd, 1998; Armengol vd, 2019).

14 gün sonra *D. novozelandica* izolatları, fungus kolonilerinin turuncu ile koyu kahverengi ve pamuksu hava miselyumu olduğunu, orta derecede büyüdüğünü ve eşit marj genişlemesi olduğunu gösterdi (Şekil 4.6). Ayrıca *D. novozelandica* izolatlarının dikkate değer bir özelliğı, yuvarlak uçlu, pürüzsüz, çoğunlukla düz duvarlı oluşturma yetenekleridir, çoğunlukla 3 bölmeli konidiumlara sahip hiyalin konidiumlar bu türün tanımlanmasında ve sınıflandırılmasında önemlidir, sonuçlarımız Lawrence vd, (2019) ve Vigliecca (2022) tarafından yürütölen çalışmalarda büyük benzerlik göstermektedir.



Şekil 4.6. *D. novozelandica* fungal izolatların solda morfolojik (makroskobik) ve solda mikroskobik X40 özellikleri.

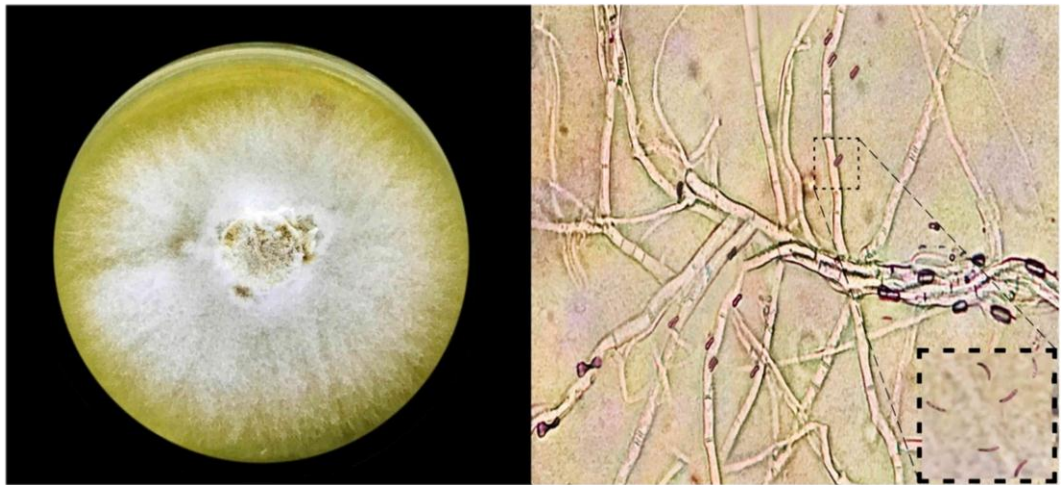
Çalışmamızdaki *G. butleri*'nin morfolojik özelliklerinin, her ikisinin Babu vd (2015) ve Valsalan vd (2022) çalışmasında belgelenen sonuçlarla oldukça tutarlı olduğu bulunmuştur. Fungus gelişmi yavaştı ve PDA ortamında beyaz tüylü bir büyüme oluşturdu. Küresel sporangiumlar sahip miselyum dallı idi ve sporangiosporlar oval ile düz formdaydı. Kolonilerin yüksekliğı yaklaşık 3-4 mm idi, doku yönlü ile pamuksuydu ve hifler hiyalin ve bölmeliydi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *G. butleri* fungal izolatların solda morfolojik (makroskobik) ve solda mikroskobik (X40, X100) özellikleri.

Glawe ve Rogers (1982) ve Trouillas vd (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, *D. stigma* fungusunun yoğun, yakından bastırılmış, merkezden uzanan kalınlaşmış radyal şeritlerle, merkeze yakın kahverengimsi, kenara doğru beyaza doğru uzandığı, kenar boşluğu düzensiz, kültüraltı rengi siyahtan zeytinimsiye kadar değiştiği gözlenmiştir.

Gelişen kültür plağı 9 günde kapladığı, 27 günde turuncu kütleler halinde konidi oluşturduğu,. Konidilerin neredeyse düzden hafif kavisliye kadar (Şekil 4.8), tabanları düz hiyalin formunda olduğu ifade edilmiştir. Sonuçlarımız bu yukarıdaki çalışmanın sonuçlarıyla yakından ilişkili idi.



Şekil 4.8. *D. stigma* fungal izolatların solda morfolojik (makroskobik) ve solda mikroskobik (X40, X100) özellikleri.

4.4. İzolatların Moleküler Karakterizasyonu

Endofitlerin cins düzeyinde tanımlanması morfolojik incelemeye bağlı olabilir (Wang vd, 2016). Ancak daha doğru bir tanımlama için DNA barkodlaması ile gerçekleştirilen bir moleküler incelemeye ihtiyaç duyulmaktadır (Lutzoni vd, 2004).

Elde ettiğimiz bakteri ve fungus izolatının DNA izolasyonu, Bölüm 3.7’de belirtildiği şekilde gerçekleştirildikten sonra sırasıyla endofitik bakteriler için 27F-1525R primer çifti ile endofitik funguslar için ITS5F-ITS4R primerleri kullanılarak 16S rDNA bölgesinin ve dahili Transkripsiyonlu Spacer (ITS) bölgesi PCR amplifikasyonu, bölüm 3.7.4. ve 3.7.5.’de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiştir.

PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen ampliconlar Şekil 4.9, dizi analizine tabi tutulmuş ve elde edilen diziler, NCBI veri tabanında Blast işlemine tabi tutuldu. İzolatların Blast analizi sonuçları Tablo 4.3’te verildi.

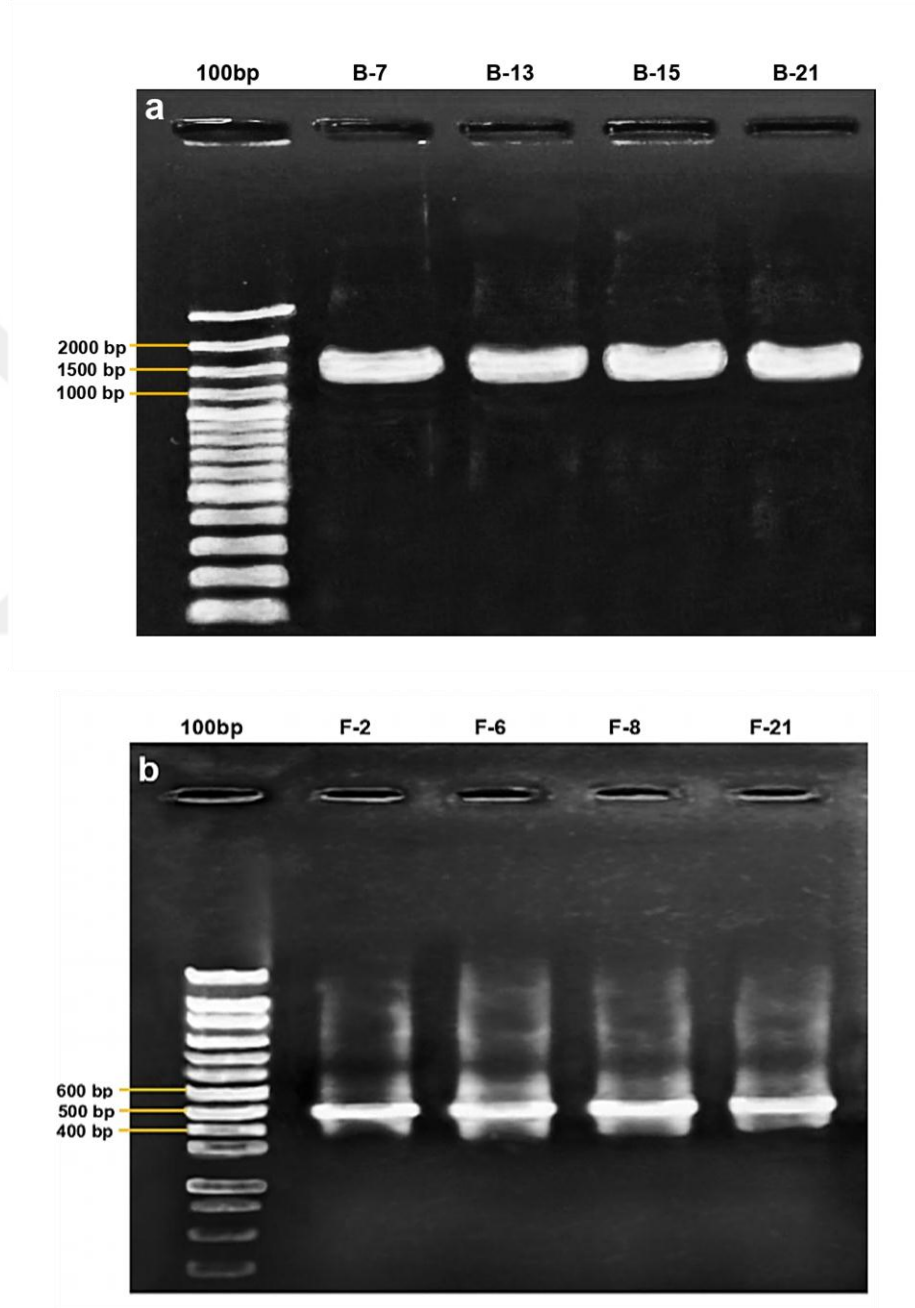
16S rDNA sekans analizleri ve BLAST analizleri sonucunda ise, ilgili bakteri izolatlarının *Pseudomonas umsongensis*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Bacillus subtilis* ve *Paracoccus litorisediminis* türleri ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. İzole edilen endofitik mikroorganizmaların filogenetik yakınlıklarını görebilmek için (ITS-5 ve ITS-4) bölgesi ve 16S rDNA bölgesine ait diziler kullanılarak filogenetik ağaç çizildi.

ITS1-5.8S-ITS2 sekans analizi ve filogenetik analizleri sonucunda da, endofirik fungal izolatların *Rhizopycnis vagum*, *Dactylonectria novozelandica*, *Gongronella butleri* ve *Diatrype stigma* türleri ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.3. 16S rDNA ve ITS Bölgesi Dizi Analizi Sonuçları

16S rDNA Bölgesi Dizi Analizi			
Bu çalışmada elde edilen izolatlar No.	Endofitik bakteri tür isimleri	BLAST % benzerlik değerleri	Gen Bank No.
B-7	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	100%	MT628350.1
B-13	<i>Pseudomonas brassicacearum</i>	100%	MT533925.1
B-15	<i>Bacillus subtilis</i>	100%	MT641205.1
B-21	<i>Paracoccus litorisediminis</i>	100%	MT355102.1

ITS Bölgesi Dizi Analizi			
Bu çalışmada elde edilen izolatlar No.	Endofitik fungus tür isimleri	BLAST % benzerlik değerleri	Gen Bank No.
F-2	<i>Rhizopycnis vagum</i>	99%	HQ610503.1
F-6	<i>Dactylonectria novozelandica</i>	99%	MN817697.1
F-8	<i>Gongronella butleri</i>	100%	MH990634.1
F-12	<i>Diatrype stigma</i>	99%	MT561405.1



Şekil 4.9. PCR amplifikasyonu sonucu elde edilen PCR ürünleri A) 27F-1525R Primerleri ile elde edilen PCR ürünleri, B) ITS1F-ITS4R Primerleri ile elde edilen PCR ürünleri.

A. melanocarpa, meyvelerindeki biyoaktif bileşiklerin zenginliğinden dolayı sağlık yararları için sıklıkla kullanılmaktadır. Meyvelerin artan prosiyanidin, antosiyanin, flavonoid ve fenolik asit içeriği nedeniyle serbest radikalleri temizleme konusunda güçlü bir yeteneğe sahip olduğu bilinmektedir (Cvetanović vd, 2018).

Aronia bitkisinin ekonomik önemi ve birçok ülkede yetiştiriciliğinin yaygınlaşmasına rağmen bilgilerimize göre bu bitkinin kökleri içerisinde yaşayan bakteri ve fungus türleri izole edilip tespit edilememiştir. Elde edilen sonuçlar, *Aronia* köklerinin birçok bakteri ve fungus türü için kuluçka makinesi olduğunu göstermektedir. Bu özellik, *Aronia* köklerinin insanlar ve bitkiler için değerli metabolitlerin üretilmesinde rol oynayabilecek önemli mikrobiyal türler içerebileceği yönündeki hipotezimizin geçerliliğini kanıtlamaktadır. Bu bilgi aynı zamanda bitki büyümesini ve verimliliğini artırmak için stratejiler geliştirmek için de kullanılabilir.

Endofitik bakterilerin bitki kısımlarındaki yerini belirlemek amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. Hallmann (2001), endofitik bakterilerin bitkinin kök, yumru, gövde, yaprak, meyve ve tohum gibi çeşitli kısımlarında kolonileştiğini bildirdiğini belirtmektedir (Hallmann, 2001). Hallmann ve Berg (2006), bitkilerde endofitik bakterilerin ana yerleşim yerinin köklerin olduğunu ve bunun da endofitik bakterilerin köklerde daha yaygın olmasını sağladığını belirtmişlerdir (Hallmann ve Berg, 2006) ve bu durum bizim sonuçlarımızla da doğrulanmıştır.

Köklerdeki endofitik bakteri yoğunluğunun yüksek olması, kök bölgesinin toprakta bulunması nedeniyle bakterilerin hava sıcaklığındaki dalgalanmalardan nispeten daha fazla korunmasını ve suyun bulunabilirliğini sağlamasından kaynaklanmaktadır (Munif ve Wiyono, 2012).

Çalışmamızda izole ettiğimiz bakterilerin çoğu, diğer bitkilerin köklerinin iç dokularından izole edilmiştir. Ancak *A. melanocarpa* köklerinden endofitik bakterilerin izolasyonuna dair herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Diğer bitkilerden elde edilen endofitlere dair bir çok yayın bulunmaktadır (Li vd, 2013; Yan ve, 2014; Egamberdieva vd, 2020).

Çalışmamızda gerçekleştirilen 16S RNA dizilimi ve BLAST analizleri sonucunda, *Aronia* köklerinden izole edilen bir izolatın *B. subtilis* olduğu tespit edilmiştir. Bu türün daha önce *Aronia* köklerinden izole edilmediği, ancak birçok çalışma tarafından diğer bitkilerin köklerinden başarıyla izole edildiği rapor

edilmiştir. Ayrıca, bu türün biyokontrol ajanı ve bitki büyüme uyarıcısı olarak potansiyeli de çalışmalarla gösterilmiştir (Saini vd, 2015; Xu vd, 2020; Bolivar-Anillo vd, 2021).

Sonuçlarımız arasında, *P. litorisediminis* bakterisinin başarılı bir şekilde izole edilip tanımlandığını gösteren bir bulgu da bulunmaktadır. Bu türün *Aronia* bitkisinin dokularından izolasyonuna dair daha önce bir rapor bulunamamıştır. Bu noktada, Penyalver vd (2022) tarafından yapılan bir çalışma, bu tür bakterinin bakteriyel turuncgil mikrobiyomu üzerinde olumlu etkiler sağlayabileceğini öne sürmektedir.

Her ne kadar endofitik funguslar *A. melanocarpa* köklerinden izole edilmemiş olsa da, ancak çalışmamızda elde ettiğimiz fungus türlerinin farklı bitkilerden izolasyonunu gösteren çok sayıda rapor bulunmaktadır.

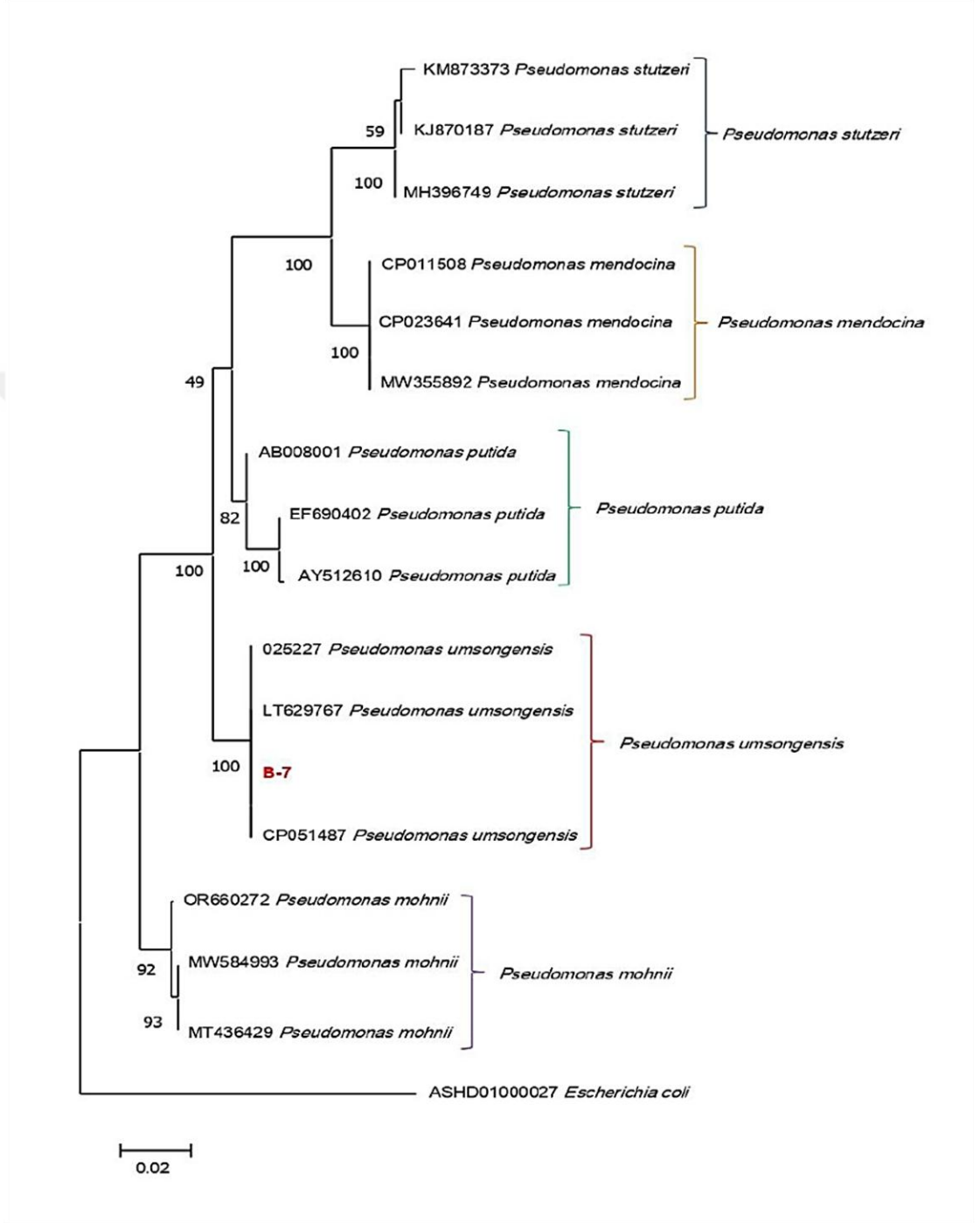
R. vagum fungusunun *Dioscorea zingiberensis* (Xu vd, 2008), *Juniperus communis* (Knapp vd, 2012), *Nicotiana tabacum* (Lai vd, 2016) ve *Zingiber officinale* (Ginting vd, 2013) türlerinde endofitik olduğu rapor edilmiştir. Capote vd (2022) tarafından badem ağaçları üzerinde yapılan benzer bir çalışmada, kök dokularından *D. novozelandica* fungusu izole edilmiştir. Başka bir çalışmada *G. butleri*, *Dalbergia odorifera*'nın öz odun ve diri odun dokularından endofitik fungus olarak izole edilmiştir (Liu vd, 2020). Sonuçları bizimkilerle tutarlı olan başka bir çalışmada Stranska vd. (2022), *D. Stigma*'yı *Vitis vinifera* bitkisinin dokularından endofitik bir fungus olarak izole etmiştir.

4.5. Filogenetik Analizler

İzole edilmiş endofitik türlerin metabolit üretimini elisitasyon yeteneği bağlamında, genetik benzerlikleri paylaşan ve bu nedenle benzer özellik ve davranışlara sahip olabilecek yakından ilişkili türleri tanımlamak üzere filogenetik ağaçlar kullanılabilmektedir.

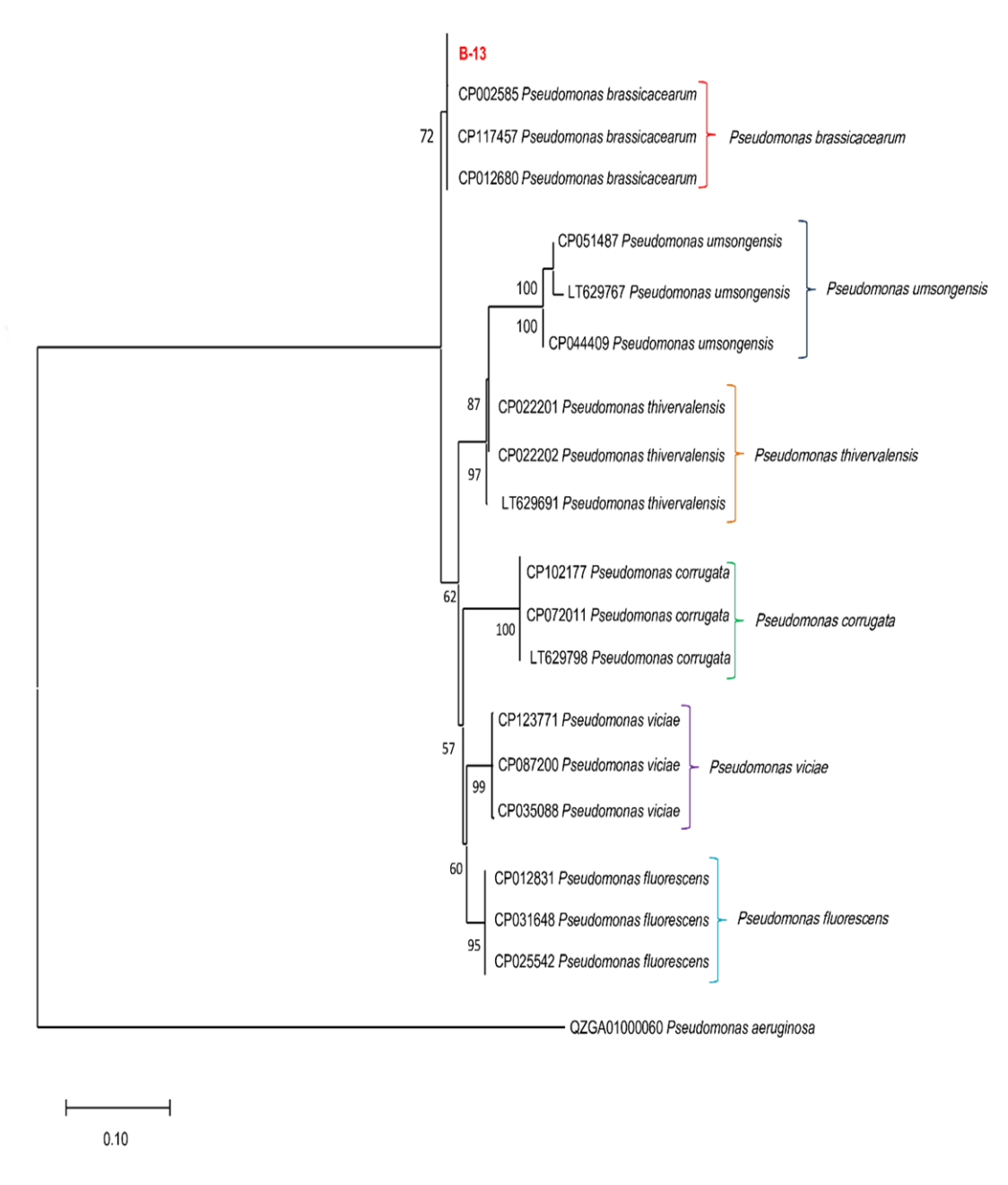
İzole edilen bakterilerin Şekil (4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13)'de ve fungusların Şekil (4.14, 4.15, 4.16 ve 4.17)'da filogenetik ağaçları ve ilişkili oldukları organizmalar gösterilmektedir.

Şekil 4.10.'daki filogenetik ağaç incelendiğinde, B-7 izolatının *P. umsongensis* ile ilişkili olduğu bulunmuştur. *Escherichia coli*, ağacı köklendirmek için kullanılmıştır.



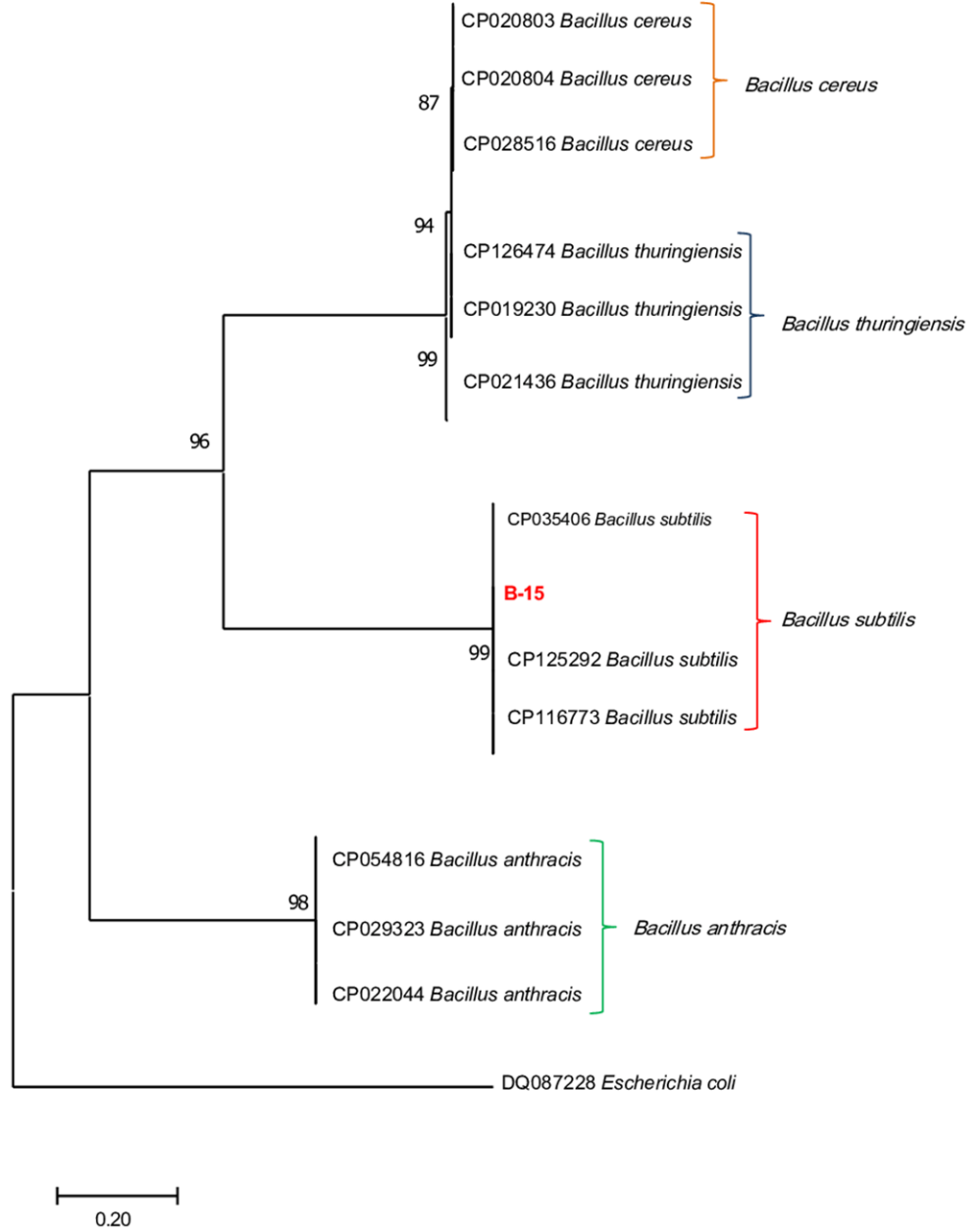
Şekil 4.10. *P. umsongensis* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.

Şekil 4.11.'daki Filogenetik ağaç incelendiğinde, B-13 nolu izolatin *P. brassicacearum* CP002585 ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Bu filogenetik ağacı oluştururken, ağacı köklendirmek için *Pseudomonas aeruginosa* QZGA01000060 kullanılmıştır.



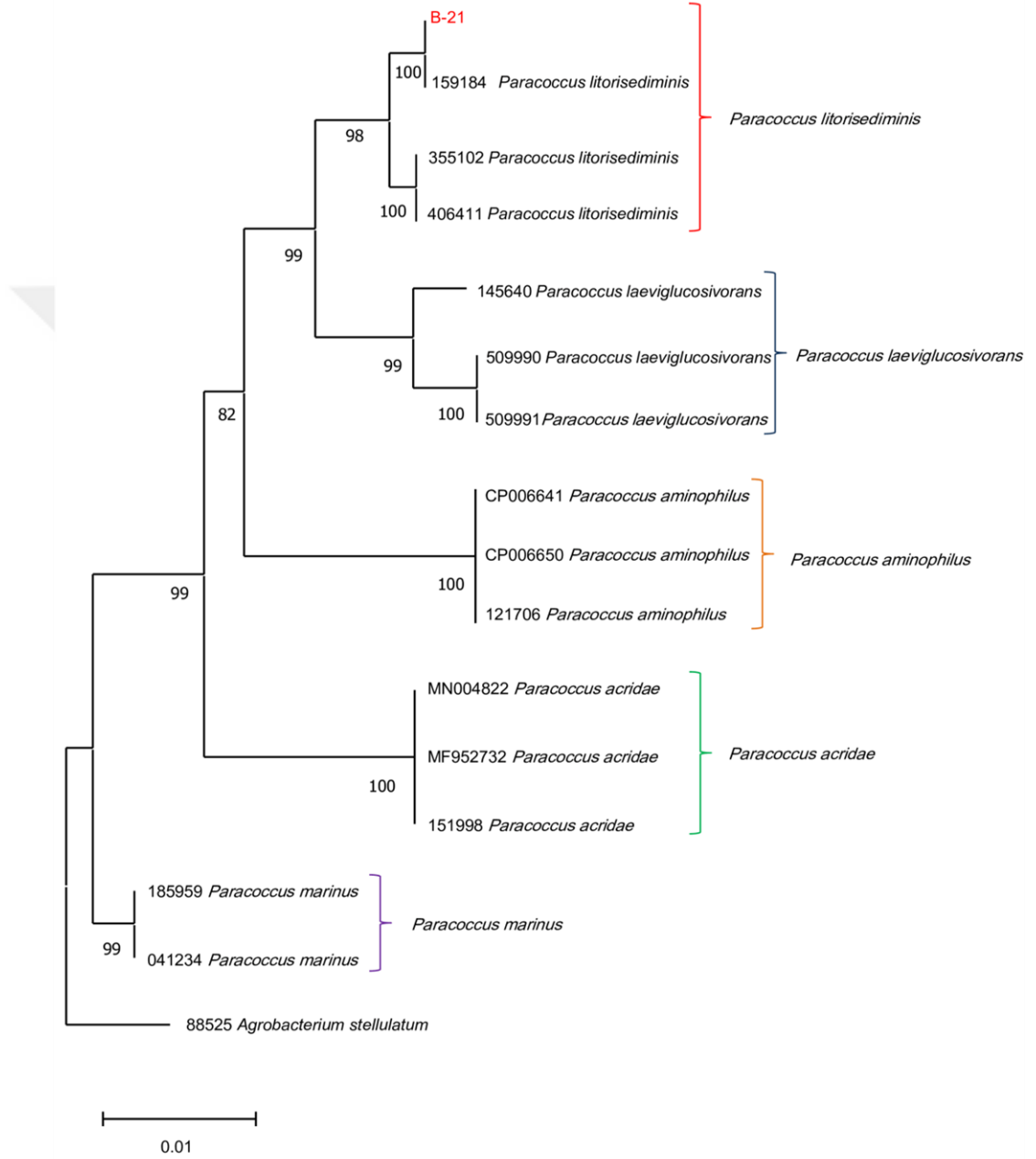
Şekil 4.11. *P. brassicacearum* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.

B-15 nolu izolatımızın filogenetik ilişkilerini belirlemek üzere oluşturulan ağaçta, izolatımızın *B. subtilis* CP35406 ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu filogenetik analizde de *Escherichia coli* DQ087228 outgrup olarak kullanılmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. *B. subtilis* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.

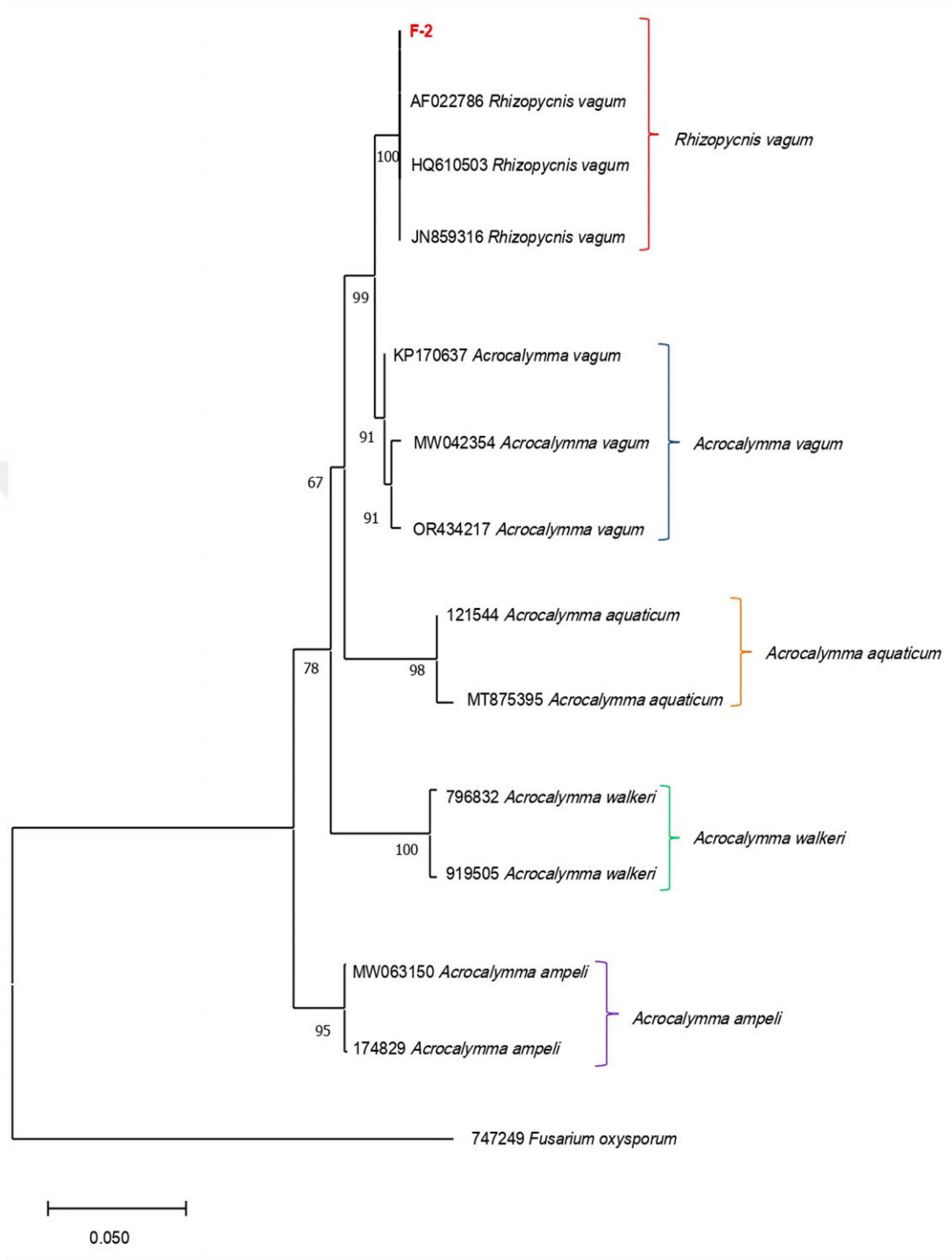
B-21 izolatu, %100 gibi bir bootstrep değeriyle genetik olarak 159184 *P. litorisediminis* ile ilişkili bulunmuştur. Bu ilişkileri ortaya çıkarmak üzere, bu filogenetik analizde *Agrobacterium stellulatum* outgrup olarak kullanılmıştır (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. *P. litorisediminis* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.

Fungusların filogenetik ağaçları incelendiğinde, F-2 izolatının *R. vagum* ile ilişkili olduğu bulunmuştur. *Fusarium oxysporum*, ağacı köklendirmek üzere

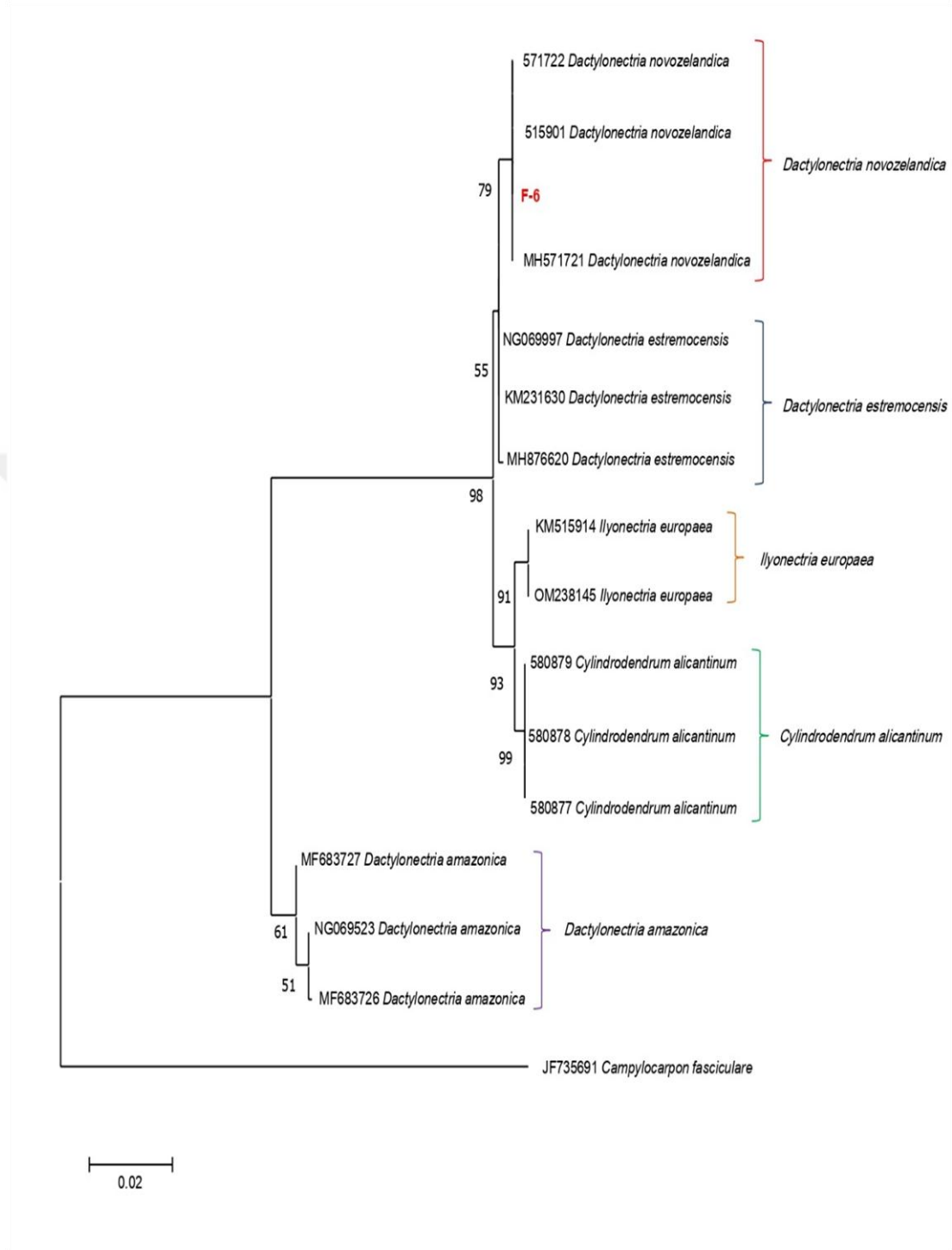
kullanılmıştır (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. *R. vagum* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.

Şekil 4.15.'teki Filogenetik ağaç incelendiğinde, F-6 nolu izolatin *D. novozelandica* MH571721 ile yakından ilişkili olduğu görülmüştür. Bu filogenetik ağacı oluştururken, ağacı köklendirmek için *Campylocarpum fasciculare* JF735691

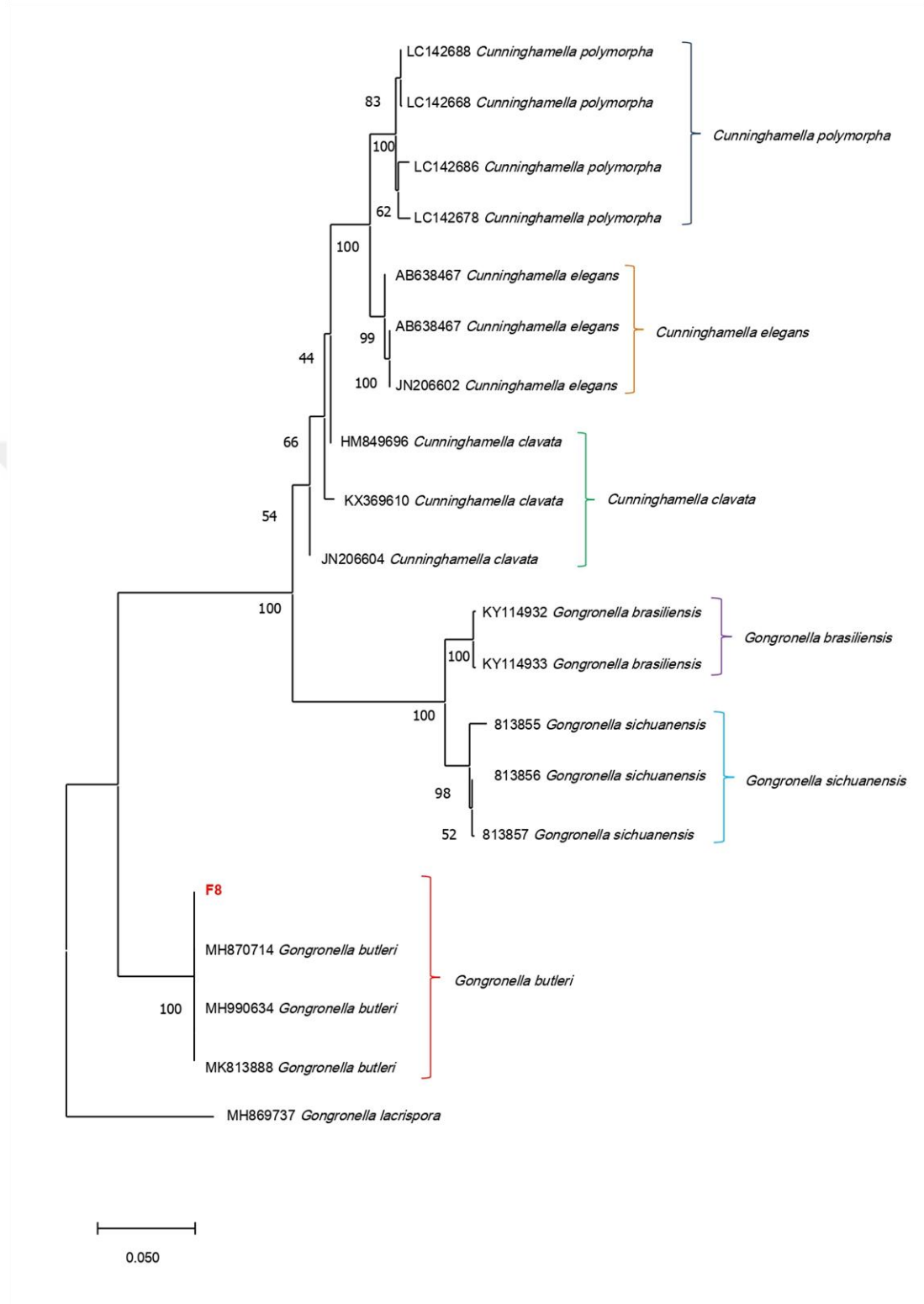
kullanılmıştır.



Şekil 4.15. *D. novozelandica* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.

F-8 nolu izolatomızın filogenetik ilişkilerini belirlemek üzere oluşturulan ağaçta, izolatomızın *G. butleri* MH870714 ile ilişkili olduğu görülmüştür. Bu filogenetik analizde de *Gongronella lacrispora* MH869737 outgrup olarak

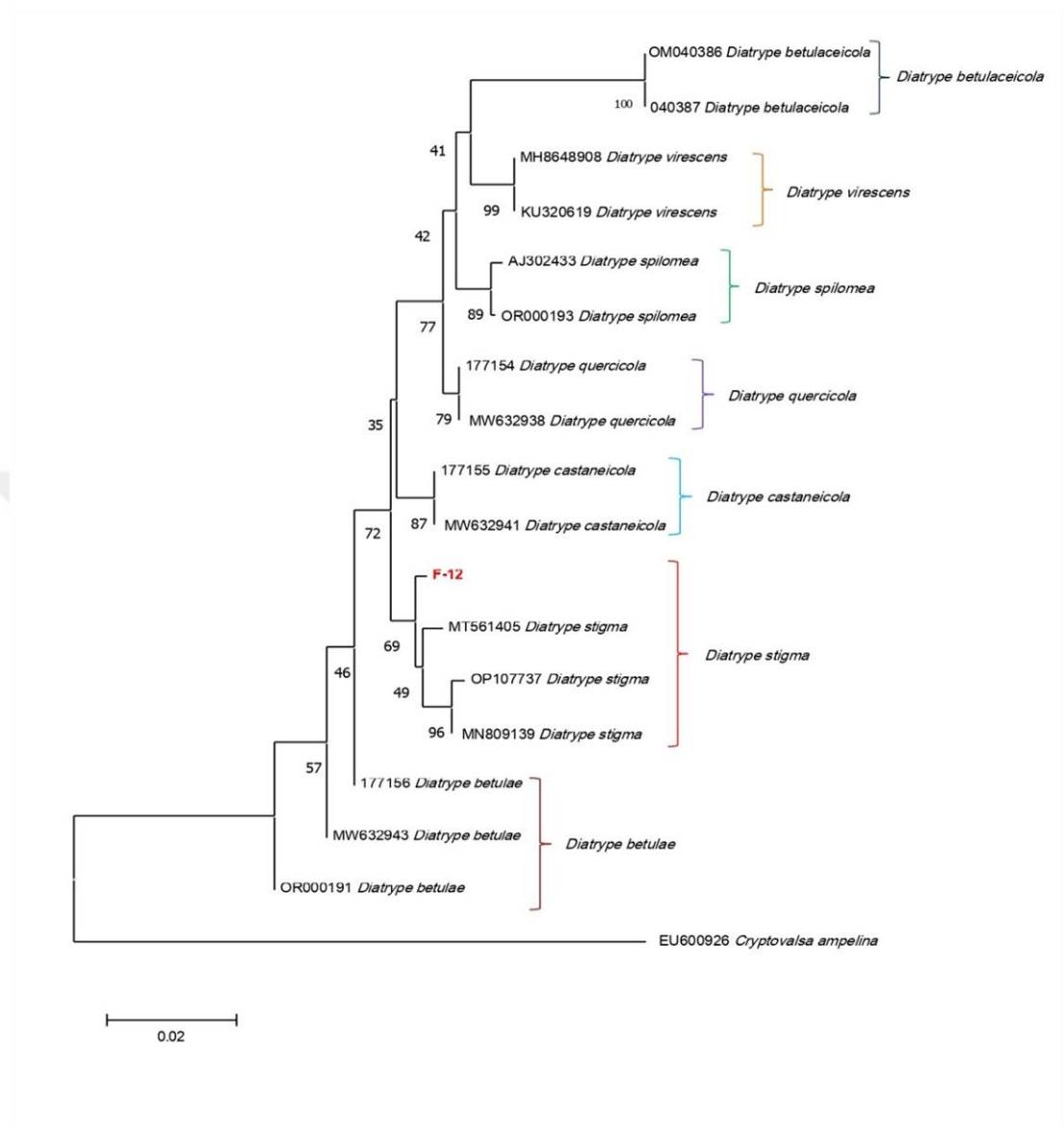
kullanılmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. *G. butleri* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.

F-12 izolatu, %69 gibi bir bootstrap değeriyle genetik olarak MT461405 *D. stigma* ile ilişkili bulunmuştur. Bu ilişkileri ortaya çıkarmak üzere, bu filogenetik

analizde *Cryptovalsa ampelina* outgrup olarak kullanılmıştır (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. *D. stigma* türünün ilişkilerini gösteren filogenetik ağaç.

Filogenetik analizler için bir veri seti (ITS ve 16S) oluşturmak üzere, izole ettiğimiz organizmaların gen dizileri ile NCBI veritabanındaki ilişkili diziler ve bu dizilerle birlikte veri setleri oluşturulduktan sonra dizileri hizalamak için ClustalX kullanılmıştır. İzolatlar arasındaki filogenetik ilişkileri belirlemek amacıyla, MEGA 6,06 programında Neighbour-Joining algoritması, Jukes ve Cantor (JC) ve Kimura 2-parametre modelleri kullanarak filogenetik ağaçlar üretilmiştir. Ağaçların istatistiksel güvenilirliğini değerlendirmek için 10000 tekrarlı bootstrap analizleri yapılmış ve 50'nin üzerindeki bootstrap değerleri ağaçlarda kullanılmıştır.

Çalışmamızda ilişkileri filogenetik olarak belirlenmiş olan *P. umsongensis*, *P. brassicacearum*, *B. subtilis* ve *P. litorisediminis* bakteri türleri ile *R. vagum*, *D. novozelandica*, *G. butleri* ve *D. stigma* fungus türlerinin kallustaki fenolik maddelerin arttırılmasında ve serbest radikallerin uzaklaştırılmasında elisitör rolü konusunda potansiyelleri değerlendirilmeye alınmıştır.

4.6. İzolatların Saklanması

Elde edilen izolatların saflıkları funguslar için PDA, bakteriler için NA besiyerlerinde saflıkları kontrol edilmiştir. İzolatların stokları funguslar için yatkı PDA, bakteriler için yatkı NA'da ekim yapılarak gerçekleştirilmiştir.

4.7. Kallus Üretiminin Aşamaları

4.7.1. Sürgün Çoğaltımı ve Eksplantların Seçimi

Bir eksplantın gelişim aşaması, in vitro çoğaltma için kültürlerin başlatılması için önemli bir faktördür. Dokular ne kadar genç olursa, in vitro yanıt da o kadar iyi olur. Stok bitkinin yaşı, eksplantın fizyolojik yaşı ve gelişim evresinin yanı sıra büyüklüğü bir prosedürün başarısını belirleyebilir. Olgun bitki türevli eksplantların in vitro olarak oldukça dirençli olduğu bildirilmiştir (Bhatia vd, 2015).

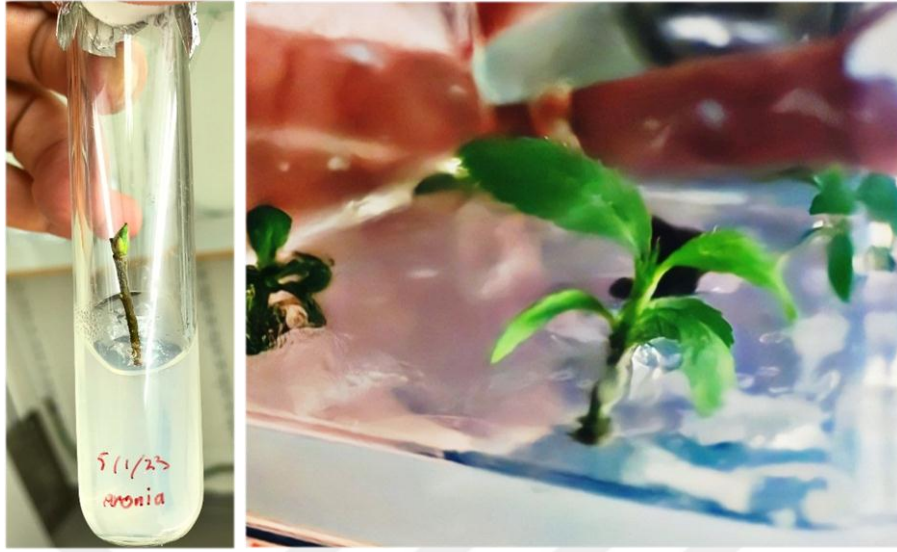
Ayrıca olgun dokularda yüksek derecede kontaminasyon olması kültür oluşumunda sorun teşkil etmektedir. Juvenil eksplantlar, kültürde olgun ağaçlardan alınan olgun eksplantlara göre daha duyarlıdır (Fraga vd, 2002; Chen vd, 2013; Zhang ve Li, 2020). *A. melanocarpa*'nın genç yaprakları %3 süzkroz ve % 0,7 agar katkılı MS besiyerinde 24 °C'de aydınlatma altında 16/8 saat fotoperiyot ve 60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foton akışı ile bir ay büyütüldükten sonra elde edildi. Elde edilen lateral sürgünlerin üzerinde bulunan genç, hastalıksız, sağlıklı, tamamen gelişmiş, açık yeşil renkli yapraklar kallus üretimi için eksplant kaynağı olarak kullanıldı (Şekil 4.18).

4.7.2. Yaprakların Yüzeysel Sterilizasyonu

In vitro çalışmalarda bitki materyallerinin etkili bir şekilde sterilizasyonu başarıyı etkileyen faktörlerin başında gelir. Bu nedenle, çalışmada ilk aşama kullanılacak olan bitkisel yaprakların yüzeysel sterilizasyonu için en uygun sterilizasyon metodunun belirlenmesidir.

Doku kültürü teknikleri bitki biyoteknolojisinde hayati bir rol oynamaktadır. Bu nedenle başarılı kültürlerin oluşturulması ve in vitro kontaminasyonun üstesinden

gelinmesi, eksplant dezenfeksiyonu için etkili bir protokol gerektirir.

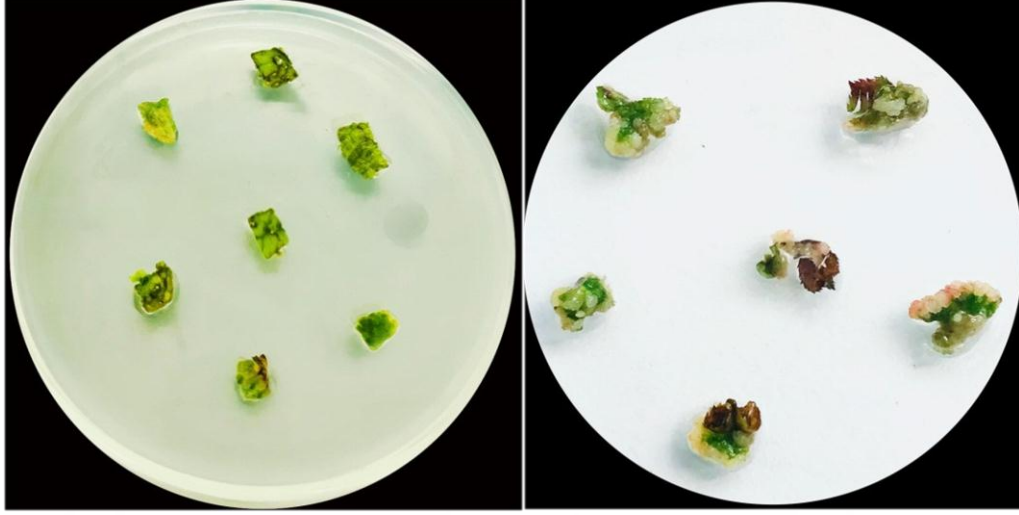


Şekil 4.18. *A. melanocarpa* sürgün çoğaltımı.

Öte yandan, özellikle doğal habitatlardan hazırlanan bitki materyallerinde temiz in vitro kültürlerin hazırlanması ve oluşturulması, başarılı bitki hücre ve doku kültüründe kritik bir aşamadır. Dezenfeksiyon prosedürleri, morfo-fizyolojik özelliklerine bağlı olarak farklı bitkiler için farklılık gösterebilir (Srivastava vd, 2010). NaOCl'nin geniş spektrumlu bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu ve bitkisel sporları, bakterileri, fungusları, protozoaları ve virüsleri hızla öldürebildiği iyi bilinmektedir (Joslyn ve Block, 1991; Tognetti vd, 2024).

Çalışmamızda *A. melanocarpa* yaprakları 2-3 kez akan su ile 30 dakika yıkandıktan sonra 30-40 dakika sıvı deterjan ile ön işleminden geçirildi. Yıkanan yapraklar, 1 dakika boyunca %70 etanol içine daldırıldı, ardından steril damıtılmış su ile yıkandı ve ardından birkaç damla Tween 20 içeren %2 sodyum hipoklorit (NaOCl) ile muamele edildi, ardından steril çift damıtılmış suyla 10 dakika durulandı.

1 ay gelişme periyodunun sonunda kültür ortamında normal olarak yapraklardan kallus oluştu, bu sürede bulaşma olmamış ve bitki dokuları zarar görmemiştir (Şekil 4.19). Sonuçlarımız, NaOCl ve etil alkolün onlara zarar vermeden bitki dokularını yüzeysel olarak sterilize etmede ve laboratuvarında doku kültürü sürecini başarılı kılmada oldukça etkili olduğunu kanıtlayan Acemi vd, 2012 ve Onwubiko vd, 2013 ve Cacaı vd, 2013'ün yaptığı çalışmalarla tutarlıdır.



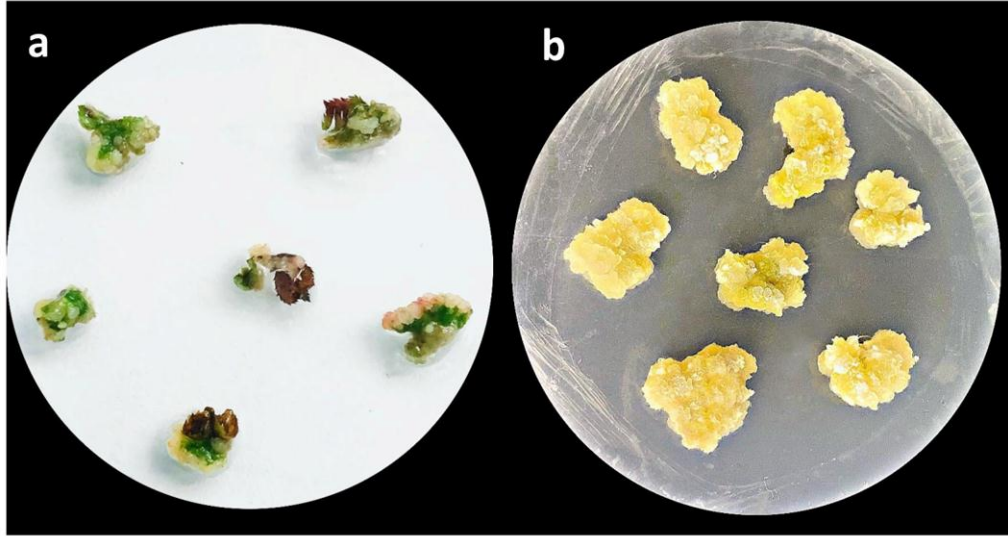
Şekil 4.19. *A. melanocarpa* türünde doku kültürü çalışmasında kallus oluşumu.

4.7.3. Kallus Üretimi

Bir aylık ekim sonrasında 2,4-D veya tek başına Kitin içeren Murashige ve Skoog ortamında kallus oluşumu gözlenmezken veya zayıf kalırken, Kin + 2,4-D içeren ortamlarda yetiştirilen yaprakların kesim yüzeylerinde yoğun kallus oluşumu gözlemlendi. İndüklenen kallus, her 4 haftada bir aynı ortamda alt kültürü yapıldı ve her seferinde 3 kat yayıldı, 1 ay sonra kırmızımsı beyaz bir kallus görünümü ortaya çıktı (Şekil 4.20a). 6 hafta sonra kallus sarımsı yeşil bir renk aldı ve topaklaştı (Şekil 4.20b).

Sitokinin ve oksinin konsantrasyonları ve kombinasyonları karşılaştırıldığında, MS ortamına Kin + 2,4-D kombinasyonunun eklenmesinin kallus indüksiyonunun %100 uyarılmasıyla sonuçlandığı gözlemlendi, Bu sonuçlar, kinetin ve 2,4-D'nin kallus oluşumu ve birikimi için kesinlikle gerekli olduğunu gösteren diğer yazarlarla (Dalila vd, 2013; Cambaz ve Çördük, 2023) uyumluluk göstermiştir.

Büyümeyi teşvik eden iki hormon olan oksin ve sitokinin kombinasyonunun bitki eksplantlarında in vitro kallus oluşturduğunun keşfedilmesinden bu yana, bu deneysel sistem yaygın olarak kullanılmıştır (Ikeuchi vd, 2013). Çeşitli kallusların kallus indüksiyonu ve farklılaşması dahil olmak üzere bitki doku kültüründe fitohormonların rolü iyi belgelenmiştir. Hem endojen hem de eksojen oksin ve sitokinin seviyeleri, çeşitli bitki türlerinde kallus oluşumunda rol oynar.



Şekil 4.20. a- Kallus 1 ay sonra, b- Kallus 6 hafta sonra.

Genel olarak, orta seviyede oksin ve sitokinin kallus indüksiyonunu arttırırken, yüksek oranlardaki oksinin sitokinin veya sitokinin-oksinin sırasıyla kök ve sürgün yenilenmesini uyarır (Skoog, 1957).

Sitokinin kullanımının, hücre duvarı lignifikasyonunu azaltarak kallus oluşumunu etkilediğine ve dolayısıyla in vitro kallus oluşumunu ve gelişimini arttırdığına inanılmaktadır. Kallus büyümesinin genellikle eksplantın kesildiği yüzeyde başladığı ve tüm eksplantı kaplayacak şekilde ilerlediği tespit edilmiştir (Hoque vd, 2006). Sonuçlarımız aynı zamanda sitokinin ve oksin kombinasyonunun, oksin veya sitokininlerin tek başına kullanılmasından daha üstün sonuçlar ürettiğini gösteren birçok çalışmayla da tutarlıdır (Yasmin vd, 2003, Shirin vd, 2007).

4.8. Elisitör Hazırlanması

4.8.1. Biyotik Elisitör Hazırlanması

Bakteriyel veya fungus kaynağından türetilen polisakkaritler, glikoproteinler, hücre duvarı fragmanları ve protein fraksiyonları gibi biyolojik kaynaklı elisitörler, bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolitlerin ortaya çıkarılması için yaygın olarak kullanılır (Namdeo, 2007).

Fenolik maddeler de dahil olmak üzere sekonder metabolitlerin bitki hücre kültürlerinden elde edilmesi yoluyla geliştirilmiş üretimi, ilaç endüstrisi için önemli ekonomik faydalar sağlayabilecek yeni bir araştırma alanı açmıştır. Elisitör konsantrasyonu ve seçiciliği, elisitöre maruz kalma süresi, kültürün yaşı, hücre

izgisi, büyüme düzenlemesi, besin bileşimi ve hücre duvarı malzemelerinin kalitesi gibi çeşitli parametreler ortaya çıkarmanın verimliliğini etkileyebilir. Ortaya ıkarma, yalnızca sağlam bitkilerde veya bitki organlarında değil, aynı zamanda bitki hücre kültürlerinde de savunma, koruyucu veya saldırgan reaksiyonların bir sonucu olarak ürün birikimini tetikleyebilir (Bajwa vd, 2021, Humbal ve Pathak, 2023).

Aronia yapraklarının kallus kültürlerinde fenolik maddeler ve biyoaktif maddeler üzerindeki potansiyel etkilerini araştırmak için açıkladığımız gibi bakteri ve fungus ekstraksiyonunu (şekil 4.21a, B) farklı konsantrasyonlarda elisitör olarak kullandık.



şekil 4.21a. Bakteri elisitörlerin hazırlanması.

4.8.2. Abiyotik Elisitör Hazırlanması

Laboratuvarımızda daha önceden sentezlenmiş olan Demir Oksit Nanopartiküllerin Fe_3O_4 nanopart lleri abiyotik elisitör olarak kullanıldı.

4.9. Biyotik ve Abiyotik Elisitörlerin Uygulanması

Bitkiler, sekonder metabolitler şeklinde biyolojik olarak aktif/farmasötik öneme sahip çeşitli bileşikler üretirler. Bitki hücre süspansiyon kültürlerine biyotik (endofitik fungus, bakteri) ve abiyotik (metal iyonları, fiziksel stres) elisitörlerin uygulanması, in vitro ortamda sekonder metabolit üretimini artırmak için etkili bir stratejidir.

A. melanocarpa, önemli bir tıbbi bitki olup, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan fenolik maddeler bakımından zengindir. Bu aktiviteler arasında antioksidan, anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve hepatoprotektif etkiler bulunmaktadır (Negreanu-

Pirjol vd, 2023).



Şekil 4.21b. Fungus elisitörlerin hazırlanması.

Bugüne kadar, *A. melanocarpa* yaprak kallus kültürleri ile fenolik madde uyarımı ve artan antioksidan kapasiteye dair herhangi bir rapor bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, aynı bitki türünden izole edilen endofitik bakteri ve fungusların yanı sıra aynı amaç için nanoparçacıkların kullanımıyla fenolik madde ve antioksidan aktivitenin artırılması rapor edilmektedir.

4.9.1. Bakteriyel Elisitörlerin Toplam Fenolik Madde ve Radikal Temizleme Aktivitesi Üzerindeki Etkisi

Tablo 4.4 ve Şekil 4.22a, özellikle *P. umsongensis*, *P. brassicacearum*, *B. subtilis* ve *P. litorisediminis* bakteri elisitörlerinin, *A. melanocarpa* kallusundaki toplam fenolik madde içeriği üzerindeki etkisini açıklamaktadır. Deney, kallusları bu bakteri elisitörlerinin farklı konsantrasyonları 0, 5, 10 ve 15 mL/100 mL ile işleme tabi tutarken, kontrol grubuna hiçbir elisitör uygulanmadı. Kalluslardaki toplam fenolik maddelerin miktarını belirleme, Folin-Ciocalteu'nun Spektrofotometrik Yöntemi testi kullanılarak on iki gün sonra gerçekleştirildi. Sonuçlar, Gallic Asit Eşdeğeri cinsinden gram kuru ağırlık (KA) başına miligram olarak sunulmaktadır

(mg GAE/g KA). Sonuçlar, farklı bakteri elisitörlerinin uygulanmasının *A. melanocarpa* kallus özütünde değişen düzeylerde toplam fenolik madde içeriğine yol açtığını göstermektedir.

Herhangi bir bakteri elisitörü içermeyen kontrol grubu (Kon.), toplam fenolik madde içeriği olarak $26,26 \pm 0,30$ mg GAE/g KA'ye sahiptir. Bu temel ölçüm, elisitörlerin etkisini değerlendirmek için bir referans noktası olarak kullanıldı. Test edilen bakteri elisitörleri arasında *B. subtilis*, toplam fenolik madde içeriği oluşturma bakımından en yüksek etkinliği sergiledi, onu sırasıyla *P. litorisediminis*, *P. brassicacearum* ve *P. umsongensis* takip etti.

P. umsongensis ile yapılan işlem, 5 mL/100 mL'de toplam fenolik maddelerde hafif bir artış gösterdi ($26,37 \pm 0,15$ mg GAE/g). Ancak, elisitörün konsantrasyonu 10 ve 15 mL/100 mL'ye çıktıkça, toplam fenolik madde içeriğinde önemli bir artış gözlemlendi ve sırasıyla $31,89 \pm 0,20$ ve $32,08 \pm 0,98$ mg GAE/g'ye ulaşıldı.

P. brassicacearum elisitör muamelesi, kalluslardaki toplam fenolik madde birikiminde dikkate değer bir etki gösterdi, 5 mL/100 mL'de toplam fenolik madde içeriği $33,65 \pm 0,58$ mg GAE/g idi, bu miktar 10 mL/100 mL'de $39,88 \pm 1,44$ mg GAE/g'ye ve daha da artarak 15 mL'de $44,95 \pm 0,57$ mg GAE/g'ye yükseldi.

B. subtilis elisitörü, toplam fenolik maddeler üzerinde belirgin bir uyarma etkisi gösterdi ve sırasıyla 5, 10 ve 15 mL/100 mL'de $52,04 \pm 1,12$, $67,08 \pm 0,47$ ve $76,51 \pm 0,22$ mg GAE/g konsantrasyonlarına sahipti.

Son olarak, *P. litorisediminis* ile yapılan işlem, toplam fenolik maddelerde kademeli bir artışa yol açtı ve sırasıyla 5, 10 ve 15 mL/100 mL'de $29,59 \pm 0,42$, $37,34 \pm 0,15$ ve $40,60 \pm 0,19$ mg GAE/g değerlerine ulaştı.

Sonuçlar, konsantrasyonlar boyunca incelendiğinde, her bir bakteri türü için toplam fenolik madde içeriğin zirveye ulaştığı optimal bir konsantrasyon olduğu dikkat çekicidir. Bu, her bir bakteri türü için optimal bir elisitasyon koşulu bulunduğunu ve bu konsantrasyonun aşıldığında fenolik madde içeriğinde daha fazla bir artışa yol açmayabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, in vitro kültürlü bitki hücrelerinin çeşitli biyotik stres faktörlerine tepki olarak fenolik maddeler gibi sekonder metabolitleri ekstra miktarda sentezleyebileceğini gösteren diğer çalışmalarla uyumludur (Gandi vd, 2012; Chodisetti vd, 2013; Biswas vd, 2016, 2018; Quambusch ve Winkelmann,

2018).

Tablo 4.4. *A. melanocarpa* kallus ekstraktlarında bakteriyel elisitörlerin toplam fenolik madde içeriği ve antioksidan aktivite üzerindeki etkisi

Bakteri türü	Ekstrakt Kon. mL/100 mL	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g KA)	Serbest radikal giderme aktivitesi %
Kontrol	0	26,26±0,30 ⁱ	27,3±0,17 ^k
<i>P. umsongensis</i>	5	26,37±0,15 ⁱ	29,52±0,35 ^j
	10	31,89±0,20 ^g	38,11±0,50 ⁱ
	15	32,08±0,98 ^g	42,27±0,23 ^h
	5	33,65±0,58 ^g	66,34±0,43 ^e
<i>P. brassicacearum</i>	10	39,88±1,44 ^e	68,77±0,50 ^d
	15	44,95±0,57 ^d	72,59±0,43 ^c
	5	52,04±1,12 ^c	71,99±0,55 ^c
<i>B. subtilis</i>	10	67,08±0,47 ^b	78,75±0,18 ^b
	15	76,51±0,22 ^a	81,58±0,22 ^a
	5	29,59±0,42 ^h	44,38±0,45 ^g
<i>P. litorisediminis</i>	10	37,34±0,15 ^f	45,55±0,37 ^g
	15	40,60±0,19 ^e	50,56±0,47 ^f

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütunda ve aynı harflere (a-l) sahip gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. Farklı harfler p < 0.05 anlamlılığı temsil etmektedir.

Önceki çalışmalarda, özellikle *Bacillus* spp. ve *Pseudomonas* spp. gibi endofitik bakterilerin bitki dokularındaki yan ürünlerin birikimi açısından elisitör olarak kullanıldığı gösterilmiştir. Boonsongcheep vd (2019) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Clausena harmandiana* kallusunda *B. subtilis* kullanılarak sekonder metabolitlerin ve antioksidanların 5 kat arttığı gösterilmiş olup bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla uyumluluk göstermektedir.

2012'deki çalışmalarında, Algar vd, *Pseudomonas* spp. kaynaklı metabolik

elisitörlerin, farklı bitki kaynaklarında bulunan fenolik maddelerin bir kategorisi olan toplam izoflavonları artırma yeteneğine sahip olduğunu keşfettiler, özellikle, soya fasulyesi (*Glycine max*) kalluslarında %64,5'e kadar bir artış gözlemlenildi. Bakteriyel hücre yüzeyinin O-antijen polisakkaridi genellikle bir konukçuya özgü immünolojik yanıtı dahil olmuştur (Szafrank vd, 2005). Bu, çalışmamızda *A. melanocarpa* kallus dokusundaki fenollerin artmış birikiminin nedenlerinden biri olabilir.

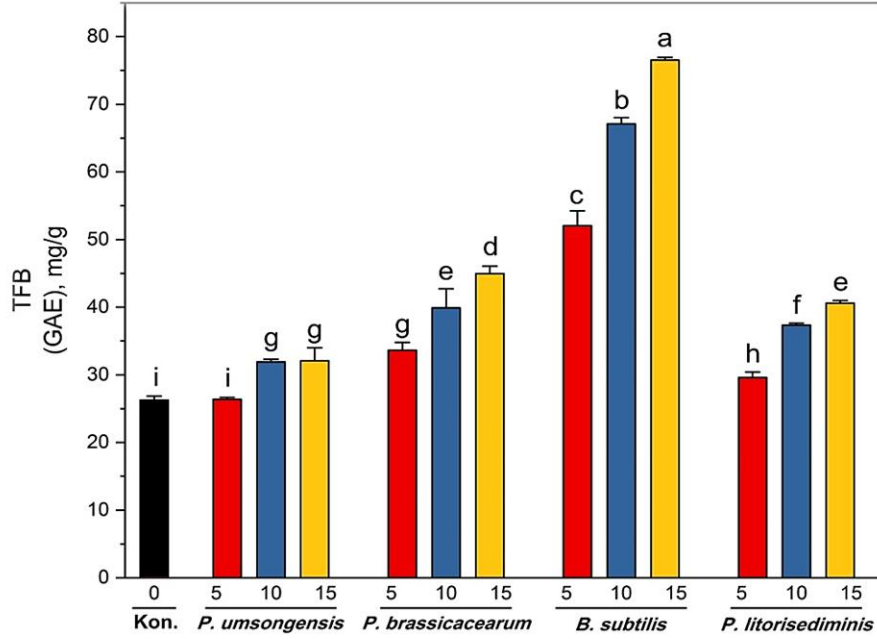
Ayrıca, çalışmamızda bir elisitör olarak kullanılan *Pseudomonas* spp. tarafından sentezlenen flagellar protein, hem hayvanları hem de bitkileri etkileyen patojen bakteriler için kritik bir virülans faktörü olarak hizmet eder; dolayısıyla, bu proteine bağlı olarak metabolik sekonder metabolitlerin artan birikimi ve serbest radikalleri yok etme yeteneğindeki artış da bu proteine atfedilebilir, ki bu da çalışmamızda katalitik bir rol oynamaktadır (Finlay ve Falkow, 1997; Gómez-Gómez ve Boller, 2000; Mani vd, 2023).

Mañero vd (2012), bir çalışmada, endofit bakterilerin filtrasyon kültürü, *Hypericum perforatum* bitkisinin doku kültürlerinde fenolik maddelerin üretiminde üç kat artış gösterdi. Sonuçlarımız ayrıca Gandhi vd (2012) tarafından yürütülen başka bir çalışmayı da destekliyor; bu çalışmada, birkaç bakterinin hücre içi ekstraktları, *B. subtilis* dahil olmak üzere, *Andrographis paniculata*'nın hücre süspansiyon kültürlerinde fenolik maddelerin üretimini uyarmak için kullanılmıştır. Araştırmalarının sonuçları, elisitörlerin uyartım sürecinde etkili olduğunu göstermiştir. Ptak vd'nin (2022) yaptıkları bir başka çalışmada, laboratuvarı *Leucojum aestivum* bitkilerinden izole edilen endofit bakterilerin Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan alkaloidlerin ve galantaminin üretimini artırdığı bulunmuştur. Bu, endofit bakterilerin bitki dokusu kültüründe biyosentez için potansiyel bir elisitör olarak yüksek yeteneğini vurgulamaktadır.

Toplam fenol içeriği için gözlemlenen eğilime benzer şekilde, DPPH inhibitörü tarafından ölçülen radikal süpürme kapasitesi, tüm bakteri türleri ve tüm konsantrasyon seviyeleri için bakteriyel elisitörlerin konsantrasyonu ile birlikte artmıştır.

Tablo 4.4 ve Şekil 4.22b, dört farklı tür endofitik bakteriden elde edilen elisitörlerin *A. melanocarpa* yapraklarının kallusları üzerindeki etkisini

göstermektedir. Elisitörler üç farklı konsantrasyonda (5, 10 ve 15 mL/100 mL) uygulanmış ve uyarmanın radikal süpürme yeteneğini artırma etkinliği on iki gün sonra değerlendirilmiştir. Kontrol grubu herhangi bir bakteri elisitörü içermeyen örnekleri temsil eder.



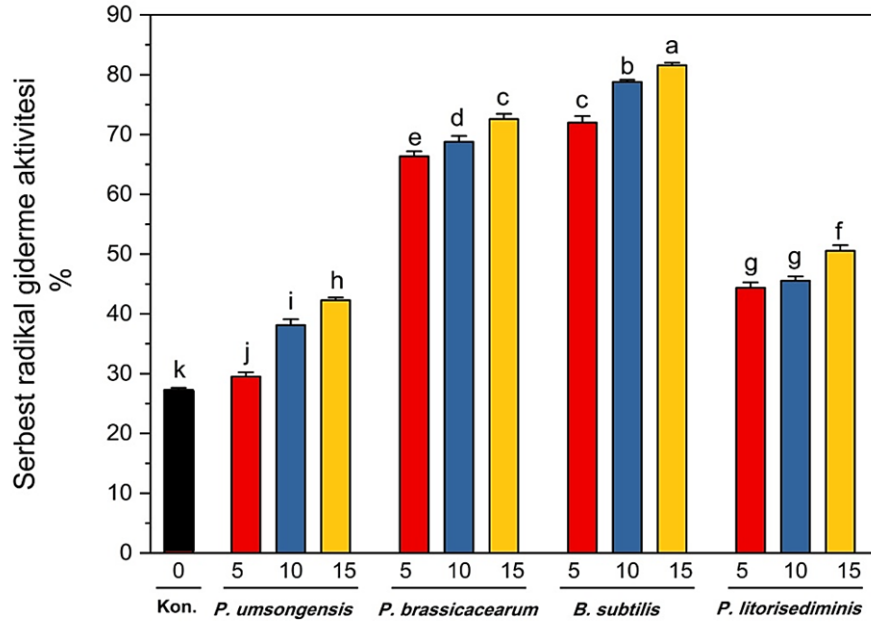
Şekil 4.22a. *A. melanocarpa* kallus ekstraktlarında bakteriyel elisitörlerin toplam fenolik içerik üzerindeki etkisi.

Kontrol grubunda herhangi bir bakteriyel elisitör bulunmadığında gözlemlenen antioksidan aktivite $27,3\pm0,17\%$ olarak ölçüldü. Ardından *P. umsongensis* elisitörü ile yapılan işlem, sırasıyla 5, 10 ve 15 mL/100 mL konsantrasyonlarıyla antioksidan aktivitesinde kademeli bir artışa neden oldu ve sırasıyla $29,52\pm0,35$, $38,11\pm0,50$ ve $42,27\pm0,23\%$ değerlerine ulaştı.

Benzer şekilde, *P. brassicacearum* elisitörünün uygulanması, antioksidan aktivitenin doza bağlı bir artışını gösterdi ve sırasıyla 5, 10 ve 15 mL/100 mL konsantrasyonları için $66,34\pm0,43\%$, $68,77\pm0,50$ ve $72,59\pm0,43\%$ değerlerine ulaştı. *B. subtilis* elisitör işlemi de antioksidan aktivitesinde konsantrasyona bağlı bir artışı gösterdi ve karşılık gelen konsantrasyonlar için sırasıyla $71,99\pm0,55$, $78,75\pm0,18$ ve $81,58\pm0,22\%$ değerlerini sergiledi.

P. litorisediminis elisitörü için antioksidan aktivite, sırasıyla 5 mL/100 mL'de $44,38\pm0,45\%$, 10 mL/L'de $45,55\pm0,37\%$ ve 15 mL/100 mL'de $50,56\pm0,47\%$ olarak

arttı.



Şekil 4.22b. *A. melanocarpa* kallus ekstraktlarında bakteriyel elisitörlerin DPPH radikali giderme üzerindeki etkisi.

Bu bulgular, özellikle *P. brassicacearum*, *B. subtilis* ve *P. litorisediminis*'den elde edilen bakteriyel elisitörlerin, *A. melanocarpa* kallus ekstratlarında antioksidan aktiviteyi önemli ölçüde artırdığını göstermektedir.

Çalışmamızda, izole edilmiş endofitik bakterilerin ekstraktı ile biyotik uyarımın, *A. melanocarpa* kallus kültüründen elde edilen ekstratların biyolojik aktivitesini nasıl etkilediğini değerlendirdik. İlk kez uyarılmış *A. melanocarpa* doku kültürünün antioksidan özellikleri, DPPH serbest radikalini temizleme üzerine dayalı bir yöntem kullanılarak değerlendirildi. Çalışmamızda toplam fenol birikimi yüksek olan kalluslar, önceki çalışmalarda bildirilen sonuçlarla uyumlu olarak DPPH serbest radikallerine karşı en yüksek aktiviteyi göstermiştir (Banasiuk vd, 2020; Ptak vd, 2022; Kanthaliya vd, 2023).

Çalışmamızda, bakteriyel ekstratların fenol üretimini ve kallustaki antioksidan kapasiteyi uyarma yeteneğinde varyasyon gözlemlendi. Bu, her bakteri türünün farklı miktarlarda farklı sekonder metabolitleri uyarabilmesinden kaynaklanabilir. Fark, elisitör-membran reseptör bağlanması, G proteinine bağlı reseptör (GPCR) aktivasyonu, sitoplazmik asidifikasyon ve reaktif oksijen türleri üretimi nedeniyle

olabilir (Zhao vd, 2005; Biswas vd, 2016; Biswas vd 2018).

Bitki kökenli ekstraların antioksidan potansiyeli, fenolik bileşiklerin miktarı ile sıkı bir şekilde ilişkilidir (Makowski vd, 2020, Platzer, 2022). Gözlemlenen sonuçlar, *A. melanocarpa* kallusunda radikal temizleme özelliklerine sahip biyoaktif bileşiklerin üretimini teşvik etme potansiyeli olan bakteriyel elisitörlerin potansiyel uygulamasını vurgulamaktadır. Toplam fenol içeriğindeki artış, radikal temizleme kapasitesinin artmasına uygun düşmektedir. Fenolik bileşikler iyi bilinen antioksidanlardır ve kallusta birikmeleri, radikalleri temizleme yeteneğinin iyileştirilmesine katkıda bulunmaktadır.

Toplam fenoller ile radikal temizleme kapasitesi arasındaki pozitif korelasyon, uyarım sürecinin *A. melanocarpa* kallusundaki antioksidan özelliklerden sorumlu biyoaktif bileşiklerin sentezini teşvik ettiği fikrini desteklemektedir. Sonuç olarak, bulgular, bakteriyel elisitör konsantrasyonu, toplam fenol içeriğindeki artış ve radikal temizleme kapasitesindeki iyileşme arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir. Bu bilgi, *A. melanocarpa* kallusunun antioksidan özelliklere sahip biyoaktif bileşikler üretme potansiyelini anlamak için önemlidir.

4.9.2. Fungus Elisitörlerin TPB ve Radikal Temizleme Aktivitesi Yüzdesi Üzerindeki Etkisi

Tablo 4.5 ve Şekil 4.23a, özellikle *R. vagum*, *D. novozelandica*, *G. butleri* ve *D. stigma* olmak üzere fungal elisitörlerin, *A. melanocarpa* kallusundaki toplam fenol içeriği ve antioksidan aktiviteler üzerindeki etkisini açıklamaktadır.

Çalışma, her bir elisitörünün üç farklı konsantrasyonunu (5, 10 ve 15 mL/ 100 mL) içermekte olup, sonuçlar toplam fenol içeriği (mg GAE/g) açısından oniki günlük bir inkübasyon süresinden sonra elde edilmiştir.

Herhangi bir fungus elisitörü içermeyen kontrol grubu (Kon.), toplam fenollerin baz seviyesini gösterdi ve ortalama olarak 26,26±0,30 mg GAE/g olarak kaydedildi. Bu temel değer, *A. melanocarpa* kallusunda fenol bileşiği sentezini indüklemenin fungus elisitörlerinin etkililiğini değerlendirmek için bir referans olarak hizmet etmektedir.

R. vagum kaynaklı elisitör, konsantrasyona bağlı bir tepki göstermiştir. En düşük konsantrasyonda (5 mL/100 mL) toplam fenol içeriği 32,31±0,37 mg GAE/g'ye yükselerek kontrolle karşılaştırıldığında dikkate değer bir artışı işaret

etmektedir. Ardından, 10 mL/100 mL'de teşvik daha belirgin hale geldi ve $56,43 \pm 0,37$ mg GAE/g'ye ulaştı. En yüksek konsantrasyon (15 mL/100 mL), toplam fenol içeriğinde önemli bir artışa neden oldu ve $75,54 \pm 1,25$ mg GAE/g değerini verdi. Bu, *R. vagum*'un, daha yüksek konsantrasyonlarda, *A. melanocarpa* kallusunda fenolik bileşik üretimini uyarmada özellikle etkili olduğunu düşündürmektedir.

Öte yandan, *D. novozelandica*'dan çıkarılan ekstraktör dikkate değer bir model sergiledi. 5 mL/100 mL'lik bir konsantrasyonda kullanıldığında genel fenolik bileşiklerde kayda değer bir artışa yol açsa da, daha yüksek konsantrasyonlarda etkisi azaldı. Spesifik olarak, 10 mL/100 mL'de toplam fenolik bileşik içerik $68,92 \pm 0,67$ mg GAE/g'ye düştü ve 15 mg/L'de daha da düşerek $54,40 \pm 0,43$ mg GAE/g'ye düştü.

G. butleri elisitörü, diğer taraftan, artan konsantrasyonlarla birlikte toplam fenollerde sürekli bir artış gösterdi. 5 mL/100 mL 'de içerik $29,52 \pm 0,60$ mg GAE/g'ye ulaştı ve bu değer 10 ve 15 mL/100 mL'de sırasıyla $43,44 \pm 0,41$ mg GAE/g ve $65,91 \pm 0,64$ mg GAE/g'ye yükseldi. Sonuçlar, *G. butleri* konsantrasyonu ile *A. melanocarpa* kallusunda fenolik bileşiklerin uyarılması arasında pozitif bir ilişki olduğunu göstermektedir.

Son olarak, *D. stigma* kaynaklı elisitör, *R. vagum* ve *G. butleri*'da gözlemlenen konsantrasyona bağlı bir uyarım deseni sergilemiştir. 5 mL/100 mL'de toplam fenoller $31,59 \pm 1,07$ mg GAE/g'ye yükselirken, 10 mL/100 mL'de önemli bir artışla $58,26 \pm 0,54$ mg GAE/g'ye çıkmış ve 15 mL/100 mL'de daha da artarak $81,79 \pm 0,58$ mg GAE/g'ye ulaşmıştır. Bu, *D. stigma* ekstraktının kallustaki fenol üretimini artırma potansiyeline sahip olduğunu ve daha yüksek konsantrasyonların daha güçlü etkilere yol açtığını göstermektedir.

Tablo 4.5 verileri açıkça göstermektedir ki *A. melanocarpa* kallusunun endofitik fungal biyotik uyarımı ile, sekonder metabolitleri olumlu bir şekilde artırmıştır. Sonuçlarımız, fungusların ekstraktları ve tüm konsantrasyonlarda tüm muamelede fenollerin ve antioksidanların birikiminde bir artış olduğunu göstermektedir.

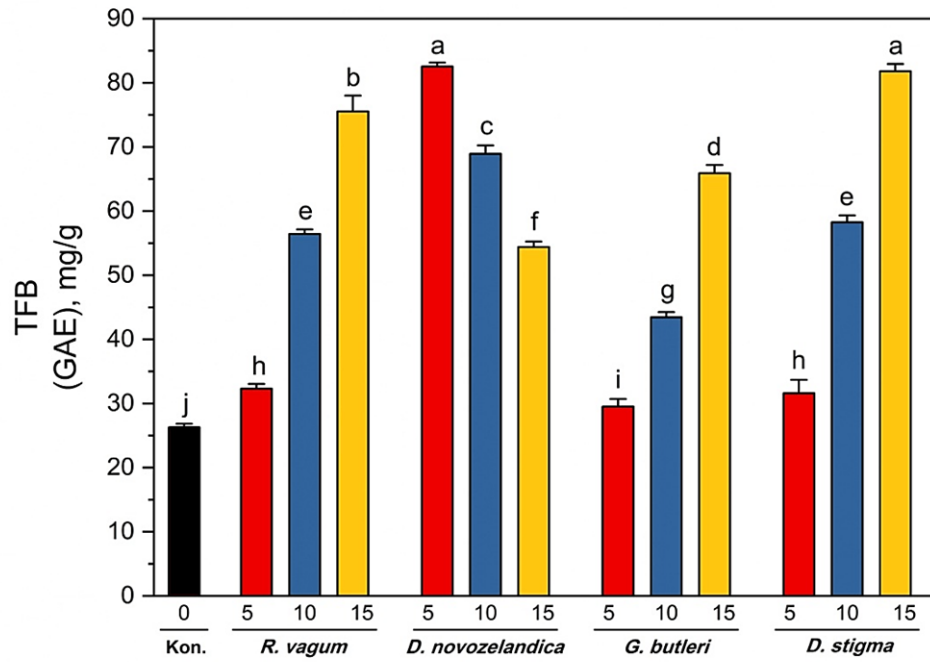
Bitki doku kültür sistemlerinde biyolojik uyarım, mikrobiyal saldırıya bir yanıt olarak fenilpropanoid yolunu uyararak fenolik bileşiklerin üretimini artıran bakteri ve fungus suşlarının inokülasyonuna dayanmaktadır (Al-Amier vd, 1999; Verpoorte vd, 1999; Halder vd, 2019; Chamkhi vd, 2021).

Tablo 4.5. *A. melanocarpa* callus ekstraktlarında fungal elisitörlerin toplam fenolik içerik ve antioksidan aktivite üzerindeki etkisi

Bakteri türü	Ekstrakt Kon. mL/100 mL	Toplam Fenol (mg GAE/g KA)	Serbest radikal giderme aktivitesi %
Kontrol	0	26,26±0,30 ^j	27,35±0,17 ⁱ
<i>R. vagum</i>	5	32,31±0,37 ^h	62,46±1,11 ^h
	10	56,43±0,37 ^e	76,37±0,41 ^e
	15	75,54±1,25 ^b	80,46±0,95 ^d
	5	80,55±0,31 ^a	88,59±0,46 ^b
<i>D. novozelandica</i>	10	68,92±0,67 ^c	76,66±0,67 ^e
	15	54,40±0,43 ^f	70,47±1,30 ^f
	5	29,52±0,60 ⁱ	77,43±0,38 ^e
<i>G. butleri</i>	10	43,44±0,41 ^g	80,11±0,76 ^d
	15	65,91±0,64 ^d	85,58±0,73 ^c
	5	31,59±1,07 ^h	66,50±0,99 ^g
<i>D. stigma</i>	10	58,26±0,54 ^e	78,75±1,16 ^{de}
	15	81,79±0,58 ^a	93,67±1,21 ^a

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütunda ve aynı harflere (a-l) sahip gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. Farklı harfler p < 0.05 anlamlılığı temsil etmektedir.

Birçok çalışma, fungusların bitki doku kültüründe metabolik ürünlerin ve antioksidanların birikimini uyarımındaki başarısının çeşitli yan ürünlerine ve bazı hücre duvarı fraksiyonlarına bağlı olduğunu bildirmiştir. Bazı endofitik fungus türevi polisakkaritlerin uyarım sürecinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Cheng vd, 2006; Wiktorowska vd, 2010; Acosta-Estrada vd, 2019).



Şekil 4.23a. *A. melanocarpa* callus ekstraktlarında fungal elisitörlerin toplam fenolik içerik üzerindeki etkisi.

Bu endojen organizmalar, mannan gibi yüksek etkinlikte polisakkaritler üretirler (Yadav vd, 2020). Mannan, genellikle fungus hücre duvarından çoğunlukla elde edilen birincil bir polisakkarittir. Mannan, *Hypericum adenotrichum* kültürlerinde sırasıyla fenolik maddeleri 2.8 kat daha fazla uyarmıştır (Yamaner vd, 2013).

Başka bir çalışmada, farklı elisitörlerden pectinazlar, kitosan ve maya ve fungus ekstresi, *Vitis vinifera* L. hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyanin ve fenolik maddeleri uyarmıştır. Pektin uyarılı kültürlerde 9. günde kontrol grubuna göre en yüksek antosiyanin üretimi (%1.8 daha fazla) gözlenmiştir (Cai vd, 2012; Elhamouly vd, 2022). Çinli bilim adamlarına göre üzüm hücre kültürüne endofitik fungus eklemek antosiyanin içeriğini %74 ve %28 artırmıştır. Çalışmaları, üzüm hücrelerini fungus endofitleri ile birlikte kültüre almanın koruyucu reaksiyonları tetiklediğini, metabolik değişikliklere neden olduğunu ve radikal temizleyici ürünlerin üretimini etkilediğini öne sürmektedir (Yu vd, 2020; Aleynova vd, 2021). Bu sonuçlar, çalışmamızda bulduklarımızla uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızda kullandığımız endofitik fungusların, onları kallustan elde edilen sekonder metabolitlerin başarılı bir şekilde teşvik sağlayan çeşitli özelliklere sahip

olduğu açıktır.

Fungal preparatlar olarak patojenik ve patojenik olmayan fungusların kullanımı, bitki hücrelerinde fenolik madde biyosentez yollarını uyarmanın en etkili stratejilerinden biri haline gelmiştir (Dixon vd, 2002; Lattanzio vd, 2006). Fungal patojen tarafından saldırılan bitki hücresinin erken savunma tepkisi, reaktif oksijen türlerinin hızlı ve geçici üretimini içerir. Bitki hücreleri, genellikle reaktif oksijen türlerinin zararlı etkilerine karşı non-enzimatik ve enzimatik antioksidan sistemlerin karmaşık bir kombinasyonu ile korunur (Gill ve Tuteja, 2010).

Fungal türlerin seçimi, sekonder metabolitlerin başarılı bir şekilde uyarılması için her zaman zorlu bir görevdir. Patojenik fungusların aksine, fungal endofitler genellikle güçlü aşırı duyarlılık tepkilerine neden olmazlar ve bu nedenle sekonder metabolit üretimi için giderek daha fazla kullanılmaktadırlar (Chen vd, 2016). Uyarın mekanizmalarının, fungal elisitörünün türüne bağlı olarak farklılık gösterebileceği önemlidir; çalışmamızda gözlemlediğimiz üzere, sekonder metabolitlerin birikimi ve serbest radikalleri temizleme yeteneği fungal kültür konsantrasyonu arttıkça artmaktadır. Bu durum *D. novozelandica* da tersine işlemektedir. Bu çalışmanın sonuçları, yüksek konsantrasyonlarda *D. novozelandica* ekstresinin kallus biyokütle büyümesini hücre bölünmesini inhibe ederek azalttığını ve fenolik maddelerin ile antioksidanların birikimini azalttığını göstermektedir. Bu azalma, fungus ekstresinin toksisitesinden veya aşırı miktarda stres iyonunun bulunabilirliğinden kaynaklanabilir (Tonk vd, 2023). Yüksek konsantrasyonlardaki fungal elisitörlerin bitki hücreleri üzerinde toksik etkilere sahip olabileceği unutulmamalıdır. Belirli bir yanıtı tetiklemek amacıyla kullanılan elisitörler, aşırı miktarda bulunduklarında genel metabolik aktivitede bir azalmaya neden olabilirler.

Bitki stresine maruz kaldığında, reaktif oksijen türleri (ROS), bitki biyokimyasal yollarında ortaya çıkar ve potansiyel olarak bitki hücrelerine, membran lipidlerine ve DNA'ya zarar verebilir. Terpenoidler, fenoller, flavonoidler, alkaloidler gibi BSM'leri, bitki hücreleri tarafından sentezlenir ve antioksidan ajanlar olarak hareket edebilir; bu da bitkileri oksidasyonun zararlı etkilerinden korur (Zaman vd, 2022; Gill ve Tuteja, 2010).

Bu çalışmada, *A. melanocarpa* kallusu fungal elisitörler ile uyarıldıktan sonra DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi belirlendi. *A. melanocarpa* kallus

kültürlerinin antioksidan aktiviteleri Tablo 4.5 ve Şekil 4.23b'da gösterildi. Farklı elisitörler arasında, fungal elisitörler, bitki in vitro kültürlerinde sekonder metabolitlerin eldesini uyarlamak için yaygın olarak kullanılır, bunun nedeni yüksek etkililikleri ve bitki hücreleri üzerindeki düşük toksisiteleridir (Elhamouly vd, 2022).

A. melanocarpa yapraklarının kallusu aynı elisitörler ve aynı konsantrasyonlarla muamele edildi. Antioksidan aktiviteyi değerlendirmek için oniki günlük bir inkübasyon süresinden sonra DPPH inhibisyon yüzdesi ölçüldü.

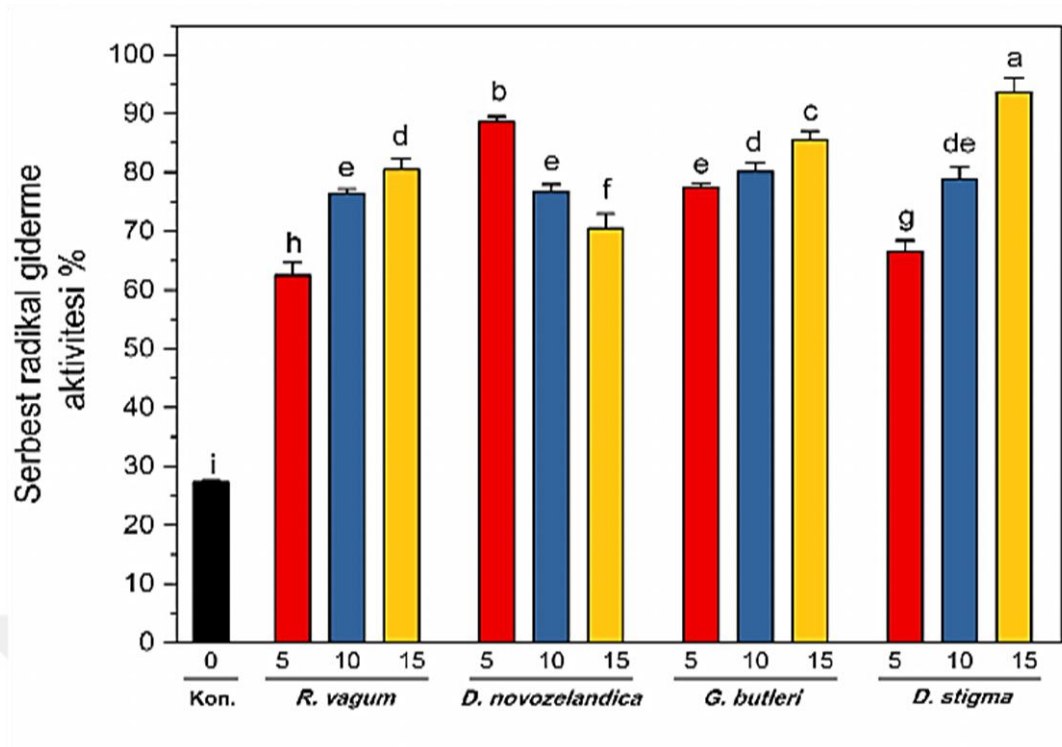
R. vagum ekstraktının kallus elisitör olarak uygulanması, DPPH inhibisyon yüzdesinde konsantrasyona bağlı bir artışı gösterdi, 5 mL/100 mL'de önemli bir artış olan $62,46 \pm 1,11$ 'e ulaşıldı ve 15 mL/100 mL'de maksimum $80,46 \pm 0,95$ 'e ulaşıldı. Bu, *R. vagum* uyarımının *A. melanocarpa* kallusu ekstraktlarının antioksidan aktivitesini olumlu bir şekilde etkilediğini göstermektedir.

Buna karşılık, *D. novozelandica* ilginç bir desen sergiledi. 5 mL/100 mL işlemi en yüksek DPPH inhibisyonunu ($88,59 \pm 0,46$) sağlarken, daha yüksek konsantrasyonlarda (10 ve 15 mL/100 mL) aşamalı bir azalma meydana geldi. Antioksidan aktivitesindeki bu düşüş, *D. novozelandica* uyarımının olumsuz etkilere sahip olabileceğinin bir göstergesi olabilir.

G. butleri uyarımı sürekli olarak antioksidan aktiviteyi artırdı. Sırasıyla 5, 10 ve 15 mL/100 mL'de DPPH inhibisyon yüzdesi $77,43 \pm 0,38$, $80,11 \pm 0,76$ ve $85,58 \pm 0,73$ idi. Bu istikrarlı artış, *G. butleri* elisitörlerinin *A. melanocarpa* kallus ekstraktlarının serbest radikal süpürme yeteneği üzerindeki olumlu etkisini göstermektedir.

Antioksidan aktivitesindeki en dikkate değer artış, *D. stigma* elisitörü ile gözlemlendi. Konsantrasyona bağlı bir artış açıkça görüldü ve sırasıyla 5, 10 ve 15 mL/100 mL'de DPPH inhibisyon yüzdeleri $66,50 \pm 0,99$, $78,75 \pm 1,16$ ve $93,67 \pm 1,21$ idi. Bu, *D. stigma*'nın *A. melanocarpa* kallusu ekstraktlarının antioksidan kapasitesini artırmak için etkili bir elisitör olduğunu göstermektedir.

Fungal endofitler, farklı elisitörler veya diğer sinyalleşme moleküllerini üretebilir; bu da farklı metabolik değişikliklere neden olabilir, bu nedenle oksidatif yanıt, bitki hücrelerinin endofitlerin konak bitkilerindeki metabolizma değişikliklerine verdiği ortak bir hücresel yanıtın bir sonucu olabilir (Ramírez-Suero vd, 2014). Bu, çalışmamızda doğrulanan bir durumdur.



Şekil 4.23b. *A. melanocarpa* kallus ekstraktlarında fungal elisitörlerin DPPH radikali giderme üzerindeki etkisi.

Önceki çalışmalarda; Kordi vd (2014) *Cicer spiroceras* üzerinde, Rady vd (2018) *Echinacea purpurea* üzerinde ve Zaman vd (2022) *Ocimum basilicum* üzerinde fungal biyotik elisitörlerle muamele edilen in vitro kültürlerde çeşitli sekonder metabolitlerin konsantrasyonunda bir artışın, antioksidan kapasitelerinde bir artışla eşlik ettiği doğrulanmıştır.

Fungal-konukçu etkileşiminde, bitki hücreleri, patojeni etkileyebilecek bir oksidatif patlama yoluyla belirli bir miktarda ROS üretir; ancak konukçu hücreler yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip değilse, bu sadece saldırgan patojeni değil, aynı zamanda konukçu hücreleri de etkileyebilir. Bu sonuçlar, fungal saldırı altında bitki antioksidan enzimlerinde bir artışı rapor eden önceki çalışmalarla iyi bir uyum içindedir (Polkowska-Kowalczyk vd, 2007; Nowogórska ve Patykowski, 2015).

Fungal elisitörü tarafından kallus kültürlerinde artan toplam fenolik madde ile antioksidanlar arasında anlamlı bir korelasyon bulundu, bu da fenolik maddelerin antioksidanlar olarak potansiyel rolünü göstermektedir. Bu nedenle, uyarılmış hücrelerde fenolik maddelerin birikmesi, biyotik stresin sonuçlarını en aza indirmek amacıyla hücrel redoks homeostasisini sürdürme çabasını göstermektedir.

Fungal elisitörlerin BSM birikimine hızlı ve güçlü bir şekilde elisitör etkisi,

önemli ölçüde dikkat çekmektedir (de Ascensao ve Dubery, 2003; Li vd, 2014).

Bu çalışmada, toplam fenolik madde üretimindeki artışın eş zamanlı olarak antioksidan aktivitelerdeki yükselmenin, fungal uyarılmanın farklı fenolik madde gruplarını artırma ve böylece serbest radikal temizleme kapasitesini artırma konusunda etkili bir strateji temsil ettiği gösterilmiştir.

Özetle, bu çalışma, fungal elisitörlerin, özellikle *R. vagum*, *D. novozelandica*, *G. butleri* ve *D. stigma*'dan elde edilenlerin, *A. melanocarpa* kallus ekstraktlarının antioksidan aktivitesini önemli ölçüde artırabileceğini göstermektedir. Gözlemlenen konsantrasyona bağlı tepkiler, en yüksek yararlı etkileri elde etmek için elisitör konsantrasyonlarını optimize etmenin önemini vurgular.

Elisitörlerle fenolik bileşik miktarlarının artırılması, kallus kültürlerinden süspansiyon kültürlerin kurulması yoluyla biyoreaktörlerde tıbbi metabolit üretimine önemli katkılar sağlayabilir. Bu yöntem, bitki hücrelerinin fenolik bileşik üretim potansiyelini artırarak biyoteknolojik uygulamalarda daha yüksek verim elde edilmesini mümkün kılar (El-Sayed, 2020). Bu sonuçlar, *A. melanocarpa* yapraklarının kallusunda sekonder metabolitlerin üretimini arttırmak için fungus elisitörlerinin olası kullanımına ilişkin önemli bilgiler sunmaktadır. Bu, akademik ve endüstriyel bağlamlarda daha fazla araştırmanın yolunu açmaktadır.

4.9.3. Demir Oksit Nanopartiküllerinin (Fe₃O₄) Toplam Fenolik Madde ve Radikal Temizleme Aktivitesi Yüzdesi Üzerindeki Etkisi

Çeşitli çalışmalar, nanoparçacıkların bitkilerle etkileşiminin bitki büyümesi sırasında birçok fizyolojik ve biyokimyasal değişikliği beraberinde getirdiğini rapor etmiştir. Bu tür değişikliklerin, nanoparçacıkların boyutu ve konsantrasyonu ile birlikte doğasına bağlı olduğu bildirilmiştir (Khodakovskaya vd, 2012). Bu çalışmada, *A. melanocarpa* yapraklarının kallus kültürlerinde Fe₃O₄ NP'lerinin total fenolik madde ve antioksidan kapasite üzerindeki etkilerini değerlendirdik.

Dactylonectria torresensis'den laboratuvarımızda biyolojik sentezlenen Fe₃O₄ nanopartikülleri (Al-bayati, 2023), 15 ila 35 nm arasında değişen parçacık boyutuna sahip küresel bir morfolojiye sahiptir. Nanopartiküllerin elementel bileşimini Fe, O, C ve S'nin ağırlık yüzdeleri sırasıyla %42,5, %25,2, %15,2 ve %4,7 olarak da bulunmuştur.

Tablo 4.6. *A. melanocarpa* callus ekstraktlarında Fe₃O₄ NP elisitörlerin toplam fenolik madde içerik ve antioksidan aktivite üzerindeki etkisi

NP	Konsantrasyon (mg/L)	Toplam Fenolik Madde (mg GAE/g KA)	Serbest radikal giderme aktivitesi %
Kontrol	-	26,26±0,30 ^d	27,35±0,17 ^d
Fe ₃ O ₄ NP	10	28,50±0,44 ^c	51,56±0,80 ^c
	15	32,40±0,99 ^b	54,26±0,37 ^b
	20	38,46±0,60 ^a	67,72±0,65 ^a

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütunda ve aynı harflere (a-l) sahip gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. Farklı harfler p < 0.05 anlamlılığı temsil etmektedir.

Farklı konsantrasyonlarda Fe₃O₄ NP'leri ile muamele edilen *A. melanocarpa* kalluslarının toplam fenolik madde içeriği, Tablo 4.6 ve Şekil 4.24a'da gösterilmiştir. Kontrol grubu, 26,26 ± 0,30 mg GAE/g bazal total fenolik madde içeriği sergilemiştir. Kallus, 10 mg/L konsantrasyonda Fe₃O₄ NP'leri ile muamele edildiğinde, total fenolik maddelerde dikkate değer bir artış gözlemlendi ve içerik 28,50 ± 0,44 mg GAE/g'ye yükseldi.

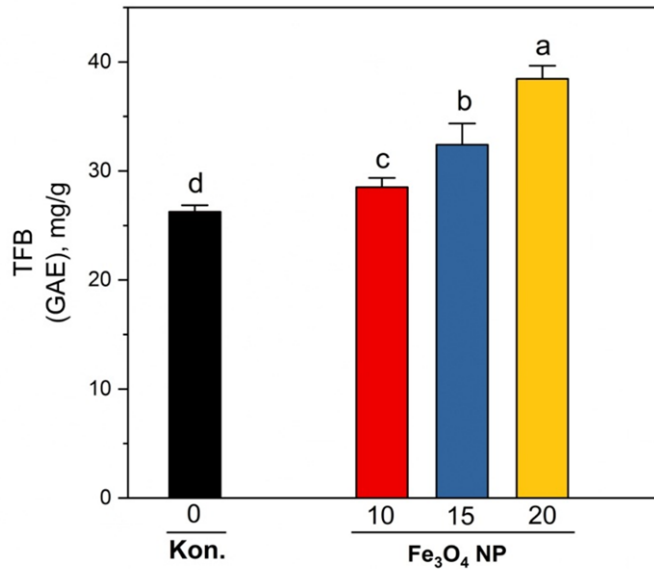
Bu başlangıç tepkisi, Fe₃O₄ NP'lerinin *A. melanocarpa* kallusunda fenolik maddelerin sentezini artırma potansiyelini göstermektedir.

Fe₃O₄ NP'lerinin konsantrasyonu 15 mg/L'ye yükseltildiğinde, total fenollerde daha belirgin bir artış ortaya çıktı ve içerik 32,40 ± 0,99 mg GAE/g'ye ulaştı. Bu konsantrasyon bağımlı etki, elisitorün fenolik madde sentezi üzerindeki etkisinin sadece mevcut olmadığını, aynı zamanda uygulanan konsantrasyona duyarlı olduğunu düşündürmektedir.

Yirmi mg/L konsantrasyonu, bu çalışmada kaydedilen en yüksek toplam fenolik madde içeriğine yol açtı ve kontrolle karşılaştırıldığında belirgin bir artışla 38,46 ± 0,60 mg GAE/g'ye ulaştı.

Aynı Tablo ve Şekilde 4.24b, *A. melanocarpa* yapraklarının kallusları üzerinde Fe₃O₄ NP'lerinden elde edilen bir elisitorün, özellikle DPPH radikali karşıtı temizleme aktivitesini artırma yeteneğini değerlendiren etkisi sunulmaktadır. Elisitor aynı konsantrasyonlarda ve koşullarda uygulanmıştır. Fe₃O₄ NP'leri elisitorü eklenmeyen kontrol grubu, 27,35 ± 0,17% bazal serbest radikal temizleme aktivitesi sergilemiştir. Bu değer, Fe₃O₄ NP'leri elisitörünün kallus üzerindeki etkisini

değerlendirmek için bir referans olarak hizmet etmektedir.



Şekil 4.24a. *A. melanocarpa* kallus ekstraktlarında Fe₃O₄ NP elisitörlerin toplam fenolik içerik üzerindeki etkisi.

Fe₃O₄ NP'leri elisitörünün 10 mg/L, 15 mg/L ve 20 mg/L konsantrasyonlarında uygulanmasıyla doz bağımlı bir serbest radikal temizleme aktivitesinde artış gözlemlenmiştir. 10 mg/L'de temizleme aktivitesi, kontrole karşılaştırıldığında önemli bir artış göstererek $51,56 \pm 0,80\%$ 'ye yükselmiştir.

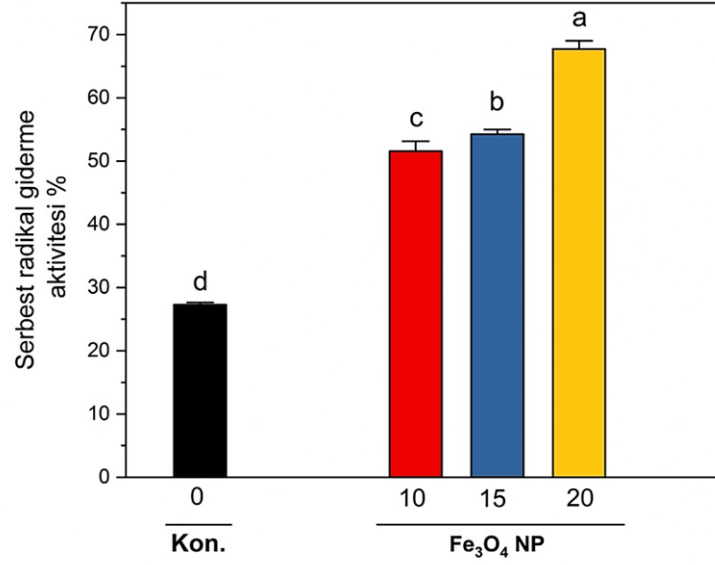
Elisitör konsantrasyonlarındaki artışlar, sürekli olarak radikal temizleme aktivitesinde iyileşmelere yol açmış ve 15 mg/L'de $54,26 \pm 0,37\%$ ve dikkate değer 20 mg/L'de $67,72 \pm 0,65\%$ 'e ulaşmıştır.

Bu bulgular, Fe₃O₄ NP elisitörünün kallusun DPPH serbest radikallerini temizleme yeteneğini olumlu bir şekilde etkilediğini, daha yüksek konsantrasyonların daha belirgin etkileri ortaya koyduğunu öne sürmektedir. Doz bağımlı yanıt, Fe₃O₄ NP'nin *A. melanocarpa* yapraklarının kalluslarında antioksidan özellikleri artırmak için bir elisitör olarak potansiyelini vurgulamaktadır.

Sonuçlarımız, nanopartiküllerin büyüme ortamına eklenmesinden sonra kallus büyümesinde bir azalma ve renginin yeşilden sarı ila kahverengine değişmesini göstermektedir (Şekil 4.25).

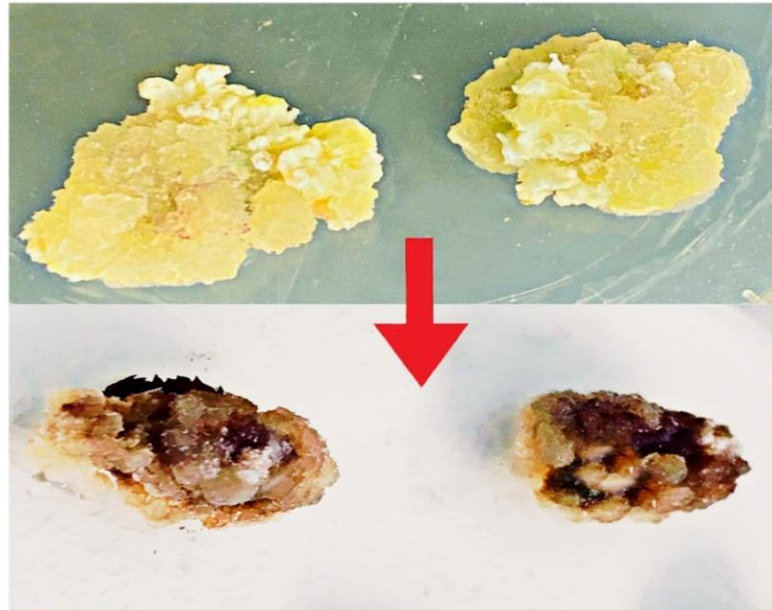
Fe₃O₄ NP konsantrasyonlarının artması ile birlikte büyümenin azalması, bitki

hücrelerinin NP'e toksisiteye ve daha az uyum yeteneğine sahip olmasından kaynaklanabilir (Sanzari vd, 2019).



Şekil 4.24b. *A. melanocarpa* callus ekstraktlarında Fe₃O₄ NPs elisitörlerin DPPH radikali giderme üzerindeki etkisi.

Ayrıca, renk değişikliği, nanopartiküllerin kallus ile etkileşimi ve fenolik maddeler gibi önemli sekonder metabolitleri üreten hücrelerin savunma yanıtının uyarılması nedeniyle olabilir (Begum vd, 2009, Chung vd, 2018, Begum vd, 2020).



Şekil 4.25. *A. melanocarpa* kallus ekstraktlarında Fe₃O₄ NP elisitörlerin DPPH radikali giderme üzerindeki etkisi.

Yukarıdakiler, biyo-uyaranlara kıyasla toplam fenolik madde ve kateşinlerin daha düşük uyarılmasının nedenini açıklayabilir (Zhang vd, 2016).

Çalışmalarımızda, Fe₃O₄ NP'nün farklı konsantrasyonları ile işlenen kallus kültürünün kontrol kallus kültürlerine göre daha yüksek miktarda TPC ürettiği görülmüştür. Demir oksit nanopartiküller tarafından uyarılan oksidatif stresin indüksiyonuna bağlı olarak, bitkilerden gelen çoğu sekonder metabolit savunma metabolitleridir ve çeşitli elisitörler tarafından uyarılabilirler (Moharrami vd, 2017).

Nano elisitörlerin, antioksidan bileşiklerin üretimini, yani fenolik maddeler ve flavonoidleri önemli ölçüde artırdığı bildirilmiştir, (Shoja vd, 2022). fenolik maddeler ve flavonoidler gibi fitokimyasallar, farklı streslere yanıt olarak üretilen sekonder metabolitlerdir. Bu fitokimyasallar genellikle bitkilerin antioksidan potansiyeline katkıda bulunur. Genel olarak, toplam fenolik maddedeki artışın antioksidan savunma mekanizmalarının aktivasyonunda bir artışla ilişkili olduğunu gözlemliyoruz, bu da sonuçlarımızdan açıkça anlaşılmaktadır (Huq, 2020, Huq ve Akter 2021, Ayoobi vd, 2023).

Gonçalves vd'nin (2021) benzer bir çalışmasına göre, *Thymus lotocephalus* kallusunda 5 ve 10 mg/L konsantrasyonlarındaki Fe₃O₄ NP işlemleri, toplam fenolik madde ve antioksidan aktivite bileşiklerini önemli ölçüde artırmıştır. Ayrıca, Fe₃O₄ NP, *Dracocephalum polychaetum* hücre süspansiyon kültürlerinde toplam fenolik maddeinin yanısıra flavonoid, antosiyanin ve lignin içeriğini artırmıştır; ayrıca, naringin, rutin, quercetin, apigenin, rosmarinik asit, timol ve karvakrol gibi birkaç fenolik maddein içeriğini artırmıştır (Taghizadeh vd, 2019).

Bitki ortamına metal nanopartikül takviyesinin ROS oluşturduğu varsayımı vardır ve bu da bitki dokusunda oksidatif stresi tetikler ve bitkilerde savunma sisteminin aktivasyonuna ve dokularda fenolik maddeler gibi antioksidan bileşiklerin birikimine neden olur (Khan vd, 2017).

Önceki verilere göre, bitkiler üzerinde NP'in etkilerini inceleyen benzer çalışmalarda genellikle 30 mg/L'den (Wang vd, 2011) 500 mg/L'ye (Zhu vd, 2008) kadar olan konsantrasyonlarda magnetit NP'ler kullanılmıştır. Ancak, bu çalışmada demir oksit NP'in (10, 15, 20 mg/L) düşük konsantrasyonlarının etkinliği keşfedilmiştir.

Bir çalışmada, *Cress Lepidum sativum* L. bitkilerinde Fe₃O₄ NP'inin etkisi

araştırılmıştır. Ahamed tarafından 2018 yılında yapılan bir çalışmada, 0.81 ppm Fe₃O₄ NP uygulamasının bitkilerde toplam fenolik madde içeriği (13027 mg GAE/g) ve flavonoid içeriğini (453 mg GAE/g) önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (Ahamed ve Ahamed, 2018).

Gözlemlenen konsantrasyona bağlı toplam fenolik madde içeriğindeki artış, nanopartiküllerin elisitörler olarak hareket edebileceği düşüncesini desteklemekte olup, toplam fenolik madde içeriğindeki artış, *A. melanocarpa* kallus özütlerinde antioksidan aktivitesinde potansiyel bir artışı göstermektedir. Fenolik maddeler, antioksidan özellikleriyle bilinir ve bu bileşiklerin konsantrasyonundaki artış, serbest radikal temizleme yeteneklerinin iyileştirilmesine katkıda bulunabilir. Bu sonuçlar, bitki kallus kültürlerinde antioksidan özelliklere sahip biyoaktif bileşiklerin üretimini artırmada nanopartikül elisitörlerinin potansiyelini vurgulamaktadır, bu da bitki biyoteknolojisi ve sekonder metabolit üretimi alanında daha fazla keşif imkanı açmaktadır.

4.10. Antimikrobiyal Aktivitenin Tespiti

Bulaşıcı hastalıkların çoğu, tüm dünyada hala sağlık sorunları için büyük bir sorun olmaya devam ediyor. Antibiyotiklere karşı direncin ortaya çıkması sorunu daha da şiddetlendirmiştir (Singh vd, 2024; Rolff vd, 2024). Yeni antimikrobiyal bileşiklere ihtiyaç zorunlu hale gelmiştir. Farklı ekstraktların in vitro antifungal ve antibakteriyel aktiviteleri, yeni potansiyel ilaçların geliştirilmesine yönelik ilk adımdır.

Dokuz farklı uygulama arasında *D. stigma* (15 mg/L), diğer uygulamalarla karşılaştırıldığında sekonder metabolitler açısından daha yüksek artışla sonuçlanmıştır, dolayısıyla bu işlemlerden elde edilen kalluslar antimikrobiyal kapasitenin değerlendirilmesi için dikkate alınmıştır. Elde edilen kallus ekstraktı, insanları etkileyen beş tür patojen bakteriye karşı etkinlik gösterdi: *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. cereus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*. Ayrıca *A. niger*, *T. rubrum*, *R. microsporus*, *A. flavus* ve *M. canis* olmak üzere beş fungal patojene karşı da etkili olduğu tespit edilmiştir.

Seçilen kallusun disk difüzyon test sonuçları Tablo 4.7 ve 4.8'de gösterilmiştir. Kallus ekstraktlarının test edilen tüm patojenlere karşı antibakteriyel ve antifungal tarama testlerinin sonuçları Şekil 4.26a, 4.26b ve 4.27a, 4.27b'de gösterilmektedir.

Tablo 4.7. *A. melanocarpa* kallus ekstraktının disk difüzyon deneyinde farklı insan patojen bakteri türlerine karşı antibakteriyel aktivitesi

Ekstrakt konsantrasyonu (mg/mL/disk)	Mikroorganizma				
	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
	İnhibisyon zon çaplar (mm) Ort. ± S. sapma				
10	11,50±0,00 ⁱ	9,08±0,50 ^{kl}	10,55±0,37 ^{jk}	-	8,28±0,08 ^l
30	13,70±0,37 ⁱ	11,49±0,87 ^j	14,25±0,34 ^{hi}	-	8,00±0,82 ^l
50	15,43±0,15 ^{fgh}	14,14±1,00 ^{hi}	15,02±0,68 ^{ghi}	-	9,35±0,19 ^k
80	20,50±0,79 ^d	17,07±0,00 ^{ef}	16,00±0,90 ^{efg}	9,21±1,04 ^k	10,03±1,00 ^{jk}
100	26,01±0,37 ^b	22,87±0,36 ^c	21,10±0,86 ^d	11,23±0,33 ^j	13,56±0,00 ⁱ
Negatif K. (DMSO)	-	-	-	-	-
Pozitif K. (GEN)	28,18±0,00 ^a	21,06±0,00 ^d	24,00±0,45 ^c	21,00±0,29 ^d	17,15±0,00 ^e

Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütunda ve aynı harflere (a-l) sahip gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. Farklı harfler p < 0.05 anlamlılığı temsil etmektedir.

- : İnhibisyon zonu yok

Mikroorganizmaların solvante (Negatif K.) karşı gelişimi değerlendirildiğinde, büyümede belirgin bir inhibisyon görülmedi. Ortaya çıkan kallusların metanolle çözündürülmüş ekstraktı, test edilen her mikroorganizmaya karşı umut verici bir inhibisyon potansiyeli gösterdi; bu, *A. melanocarpa* kalluslarının önemli antimikrobiyal özelliklere sahip olduğunu gösteriyor.

Elde edilen sonuçlar ekstraktın değişen miktarlarda antibakteriyel aktivite gösterdiğini ortaya çıkardı. İnhibisyon zonları ekstraktın konsantrasyonuna ve test edilen organizmalara göre değişiklik gösterdi ve ekstraktın konsantrasyonun 10 mg/mL'den 100 mg/mL'ye artırılmasıyla inhibisyon bölgesinin arttığı ortaya çıktı. Sonuçlar bazen pozitif kontrol olarak kullanılan antibiyotik GEN ile karşılaştırılabilir nitelikteydi.

Sonuçlar Tablo 4.7'de kallus ekstraktının bakteri suşlarının büyümesini inhibe ettiğini göstermektedir. Test edilen bakterilerin duyarlılığına ve ekstraktın konsantrasyonuna bağlı olarak Gram pozitif bakteriler için 9,08 ila 26,01 mm arasında ve Gram negatif bakteriler için 8,28 ila 13,56 mm arasında değişen bir inhibisyon bölgesi oluşturdu. Gram pozitif bakteriler arasında en yüksek inhibisyon zonu *S. aureus*'a 26,01 mm gözlemlendi ve bunu *E. faecalis* 22,87 mm ve *B. cereus* 20,10 mm 'lık inhibisyon zonu iletakip etti.

Tablo 4.8. *A. melanocarpa* kallus ekstraktının disk difüzyon deneyinde farklı insan patojen fungus türlerine karşı antifungal aktivitesi

Ekstrakt konsantrasyonu (mg/mL/disk)	Mikroorganizma				
	<i>A. niger</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>R. microsporus</i>	<i>A. flavus</i>	<i>M. canis</i>
	İnhibisyon zon çapları (mm) Ort. ± S.sapma				
10	-	-	-	13,41±0,30 ^f	9,48±0,78 ⁱ
30	-	-	-	15,00±0,28 ^e	10,00±0,35 ⁱ
50	-	-	-	17,11±0,64 ^d	13,13±0,00 ^{fg}
80	9,33±0,37 ⁱ	13,09±0,58 ^{fg}	-	18,10±0,71 ^d	16,00±0,26 ^e
100	12,01±0,44 ^h	15,68±0,00 ^e	12,27±0,50 ^{gh}	23,00±0,69 ^b	21,13±0,00 ^c
Negatif K. (DMSO)	-	-	-	-	-
Pozitif K. (KLT)	15,10±0,59 ^e	25,00±0,00 ^a	13,05±0,27 ^{fgh}	26,00±0,00 ^a	23,00±0,38 ^b

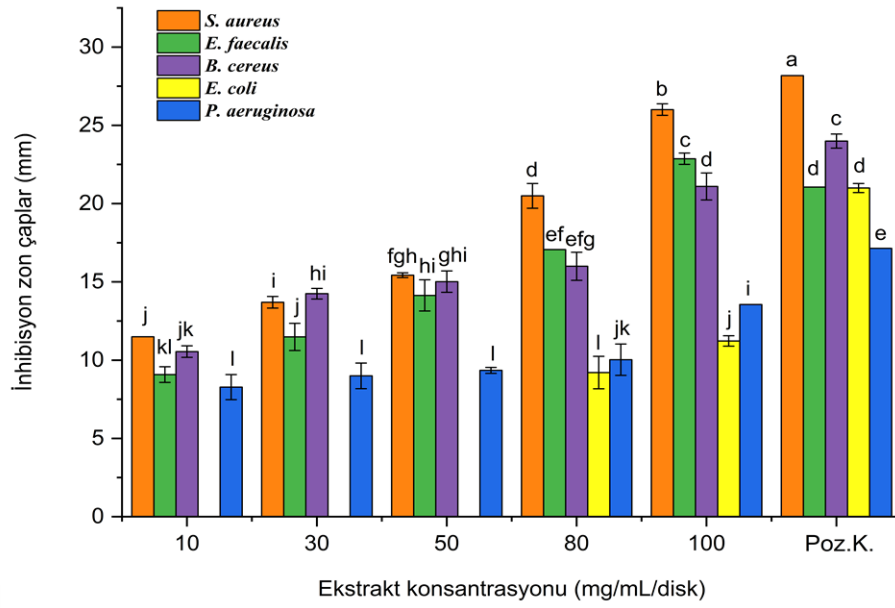
Veriler ortalama±standart sapma olarak verilmiştir. Aynı sütunda ve aynı harflere (a-l) sahip gruplar arasında anlamlı farklılık yoktur. Farklı harfler p < 0.05 anlamlılığı temsil etmektedir.

- : İnhibisyon zonu yok

Gram negatifler arasında en yüksek inhibisyon zonu *P. aeruginosa*'da 13,56 mm ile gözlemlendi. Bakteriler için pozitif kontrol olarak kullanılan GEN için inhibisyon zonu (30 µg/disk) 17,15 ile 28,18 mm arasında değişmiştir.

Elde edilen kallus ekstraktının beş farklı konsantrasyonda (10, 30, 50, 80 ve 100 mg/mL/disk) antifungal aktivitesi *A. niger*, *T. rubrum*, *R. microsporus*, *A. flavus* ve *M. canis* için Tablo 4.8'de gösterilmiştir. Buna göre ekstraktlara en duyarlı olan *A. flavus* olup onu *M. canis* takip ederken, sırasıyla *R. microsporus*, *A. niger* ve *T. rubrum* ekstraktlara en az duyarlı olan tür olmuştur.

Metanolik ekstrakt, konsantrasyonda 23,00 mm *A. flavus*, 21,13 mm *M. canis*, 15,68 mm *T. rubrum*, 12,27 mm *R. microsporus* ve 12,01 mm *A. niger*'e eşit inhibisyon bölgeleriyle test edilen tüm fungus türlerine karşı maksimum aktivite gösterdi. 100 mg/mL *A. melanocarpa* kallusunun metanol ekstraktları, 10 - 50 mg/mL aralığındaki konsantrasyonlarda *A. niger*, *T. rubrum*, *R. microsporus*'a karşı etkili değildi. Sonuçlar, *A. flavus*'a karşı 26,00 mm, *T. rubrum*'a karşı 25,00 mm, *M. canis*'e karşı 23,00 mm'ye eşit inhibisyon bölgesi sergileyen standart antifungal ilaç Klotrimazol (KLT) (25 µg/disk) ile karşılaştırıldı. *A. niger*'e karşı 15,10 mm ve *R. microsporus*'a karşı 13,05 mm. %10 DMSO (Negatif kontrol), test edilen fungus suşlarının hiçbirine karşı hiçbir aktivite göstermedi.



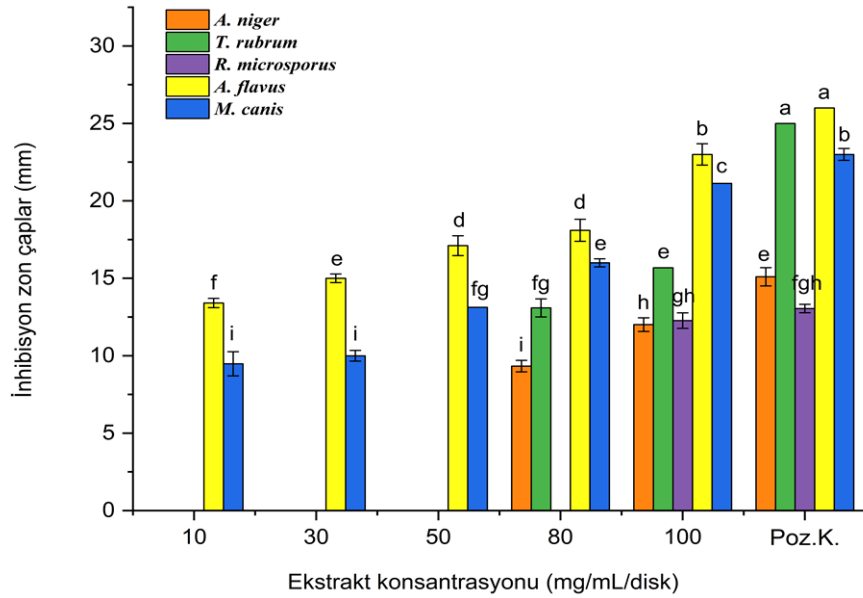
Şekil 4.26a. Farklı kallus konsantrasyonunun patojen bakterilere karşı oluşturduğu inhibisyon bölgesini gösteren grafik.

Bu çalışma, *A. melanocarpa* kallusundan elde edilen metanolik ekstraktın, farklı bakteri türlerine karşı dikkate değer bir etkinlik gösterdi. Ek olarak, funguslara karşı etkisi nispeten daha düşük olmasına rağmen fungus türlerine karşı da bir miktar inhibisyon etkisi tesbit edildi. Genel olarak Gram pozitif bakteriler, Gram negatif bakterilerden daha duyarlıydı; bu durum, hücre yüzeyi yapılarındaki veya mikrobiyal suşlar arasında kolayca aktarılabilen plazmitlerin genetik içeriğindeki farklılıkları yansıtır olabilir (Helander vd, 1998; Karaman vd, 2003; Shan vd, 2007).

Bu umut verici bir bulgudur, çünkü birçok antibiyotiğin Gram negatif bakterilere karşı Gram pozitif bakterilere göre daha az aktif olması, muhtemelen Gram negatif bakterilerin daha karmaşık hücre duvarı yapısına ve dış yüzeylerinde ilave lipopolisakkaritlerin varlığına bağlıdır. Son zamanlarda Saavedra vd (2010), antibiyotik streptomisin ile gallik asit gibi bazı fenolik maddeler arasında Gram-negatif bakterilere karşı sinerjistik bir etki olduğunu bildirmiştir. Klinik açıdan bakıldığında bu bulgu, oral bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için gerekli olan antibiyotik konsantrasyonunu azaltmak açısından ilginç olabilir.

Çalışmamızda antimikrobiyal ilacın konsantrasyonundaki artışın kolonilerin inhibisyonu ile doğru orantılı olduğu görüldü. Ham ilaç dozunun konsantrasyonunun arttırılması, bakteriyel büyümenin inhibisyonu sürecini hızlandıran fitometabolitlerin

etkinliğinin ve konsantrasyonunun artmasına neden olabilir (Mogashoa vd, 2019).



Şekil 4.27a. Farklı kallus konsantrasyonunun patojen fungus karşı oluşturduğu inhibisyon bölgesini gösteren grafik.

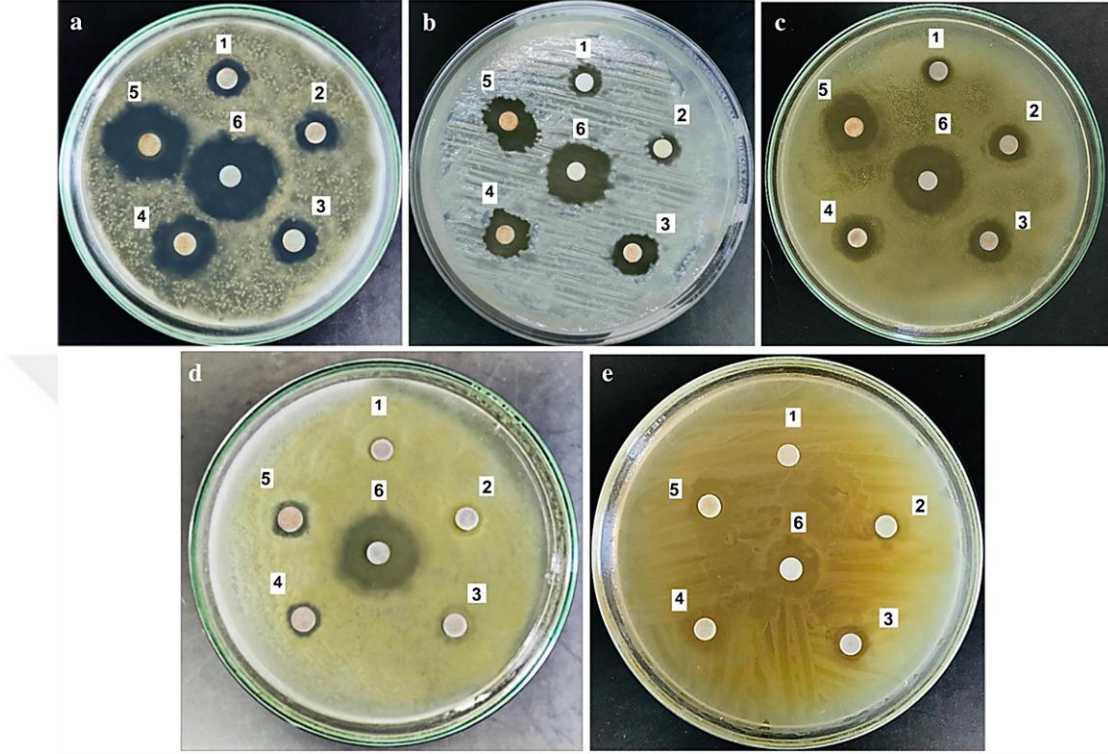
Bildiğimiz kadarıyla bu, in vitro kallusun antimikrobiyal potansiyelini analiz eden ilk çalışmadır, bu nedenle bulgularımız diğer çalışmalarla karşılaştırılamamıştır. Ancak yaprak ve meyve ekstraktlarının farklı insan patojenik mikroplarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri rapor edilmiştir.

Bu çalışmada, *Aronia* yapraklarının kallusunun, uyarıldıktan ve metabolik ürünlerini arttırıldıktan sonra, insanlara patojen olan suşları engellemede büyük etkinliğe sahip olduğunu gösterdik. Sonuçlar, in vitro kültürlerin bu ekstraktlarının etkinliğinin standart antibiyotiklere benzer olduğunu gösterdi.

Kültürel koşulların optimizasyonunun, kültürü yapılmış hücrelerdeki belirli bir metabolitin içeriğini, sağlam ana bitkideki konsantrasyonla karşılaştırıldığında birçok kez artırabildiği (Verpoorte vd, 1994) ve hatta kültürü yapılmış hücrelerin, metabolitleri sentezlemesini teşvik edebildiği rapor edilmiştir. Kültür koşullarının optimize edilmesinin, kültürü yapılan hücrelerdeki belirli bir metabolitin içeriğini, ana bitkideki konsantrasyonla karşılaştırıldığında birkaç kat artırabildiği ve hatta kültürü yapılan hücreleri, doğal ana bitkide tespit edilemeyen metabolitleri sentezlemesi için uyurabildiği rapor edilmiştir (Verpoorte vd, 1994; Khafagi, 2007).

Uyarılmış kallusun toplam fenolik maddelerinin analizi, yüksek oranda fenolik

madde, fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve tanenler gibi bitki kaynaklı fenolikler içerdiğini, gıdayla ilgili patojenlerin yanı sıra klinik açıdan önemli bakteriler, funguslar ve protozoalar gibi birçok mikroorganizmanın büyümesini ve aktivitesini engelleyebildiğini ortaya çıkardı. (Daglia, 2012; Li vd, 2014).

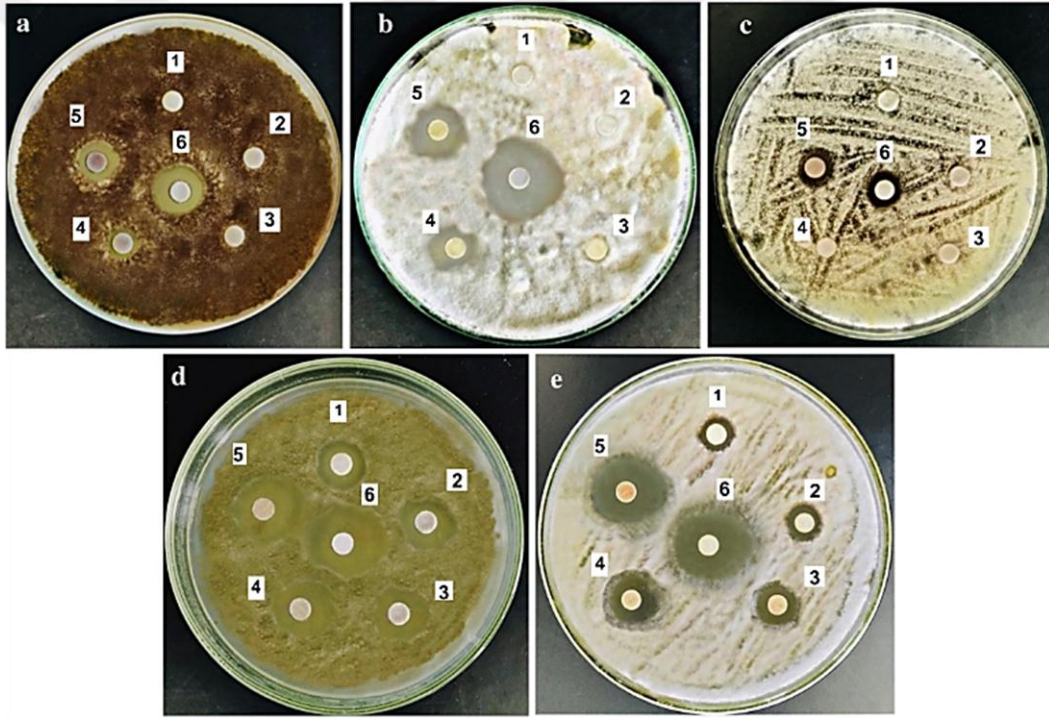


Şekil 4.26b. *A. melanocarpa* kallus metanol ekstraktlarının a- *S. aureus*, b- *E. faecalis*, c- *B. cereus*, d- *E. coli* ve e- *P. aeruginosa*'ya karşı inhibisyon bölgesi (mm). Disklerdeki sayılar (1-10, 2-30, 3-50, 4-80 ve 5-100 mg/mL/disk) *A. melanocarpa* kallus ekstraktının konsantrasyonlarını temsil eder. 6- pozitif kontrolü temsil etmektedir.

Farklı moleküller Tablo 2.3'de gösterildiği gibi yapı ve kimyasal bileşim bakımından farklılık gösterdiğinden, plazma zarının geçirgenleştirilmesi ve dengesizleştirilmesi veya hücre dışı enzimlerin inhibisyonu gibi çeşitli antimikrobiyal etkiler sergileyebilirler. Üstelik bu etki mekanizmaları, bitki fenolik maddelerini ilaca dirençli patojenlere karşı etkili kılabilen geleneksel antibiyotiklerin etki mekanizmalarından farklıdır (Alli vd, 2011; Górniak vd, 2019).

fenolik maddeler mikrobisid etkilerini farklı etki şekilleriyle gösterebilirler. Bu moleküller çeşitli mikrobiyal virülans faktörlerini baskılayabilir (örn., biyofilm oluşumunun engellenmesi, konakçı ligand yapışmasının azaltılması ve bakteriyel

toksinlerin nötralizasyonu yoluyla), membran akışkanlığını azaltabilir, nükleik asitlerin sentezini ve hücre duvarını veya enerji metabolizmasını inhibe edebilir (Górniak vd, 2019; Quideau vd, 2011). Ek olarak birçok fenolik madde, antibiyotiklerle sinerji göstererek etkinliklerini artırabilir ve kullanım dozunu azaltabilir (Sanhueza vd, 2017; Mikłasińska-Majdanik vd, 2018; Stefanović, 2018). Ek olarak, hidroksil grubunun pozisyonundaki değişiklikler antimikrobiyal aktivitede (Figueiredo vd, 2008) ve hücre zarı yapılarıyla etkileşimlerde (Oteiza vd, 2005) önemli bir rol oynayabilir. Örneğin Karvakrol durumunda, hidroksil grubunun ve delokalize elektron sisteminin varlığının, sitoplazmik membran dengesizliğinden ve sonunda *Bacillus cereus* hücrelerinin ölümüne yol açan proton hareket kuvvetinin çöküşünden sorumlu olduğu düşünülmektedir (Ultee vd, 2002).



Şekil 4.27b. *A. melanocarpa* callus metanol ekstraktlarının a- *A. niger*, b- *T. rubrum*, c- *R. microsporus*, d- *A. flavus* ve e- *M. canis*e karşı inhibisyon bölgesi (mm). Disklerdeki sayılar (1-10, 2-30, 3-50, 4-80 ve 5-100 mg/mL) *A. melanocarpa* kallus ekstraktının konsantrasyonlarını temsil eder. 6- pozitif kontrolü temsil etmektedir.

fenolik maddelerin antimikrobiyal etkisi molekülden moleküle farklılık gösterebilir. Engels vd (2009) çalışmasında, mango çekirdeğinden izole edilen gallotanninler, *B. subtilis*'in ve *S. aureus* ve *E. coli* gibi diğer gıda kaynaklı

patojenlerin büyümesini inhibe etmiştir. Gallotanninlerin engelleyici etkileri, demir kompleksleştirici özelliklerine ve proteinlerle etkileşime girme ve enzim aktivitelerini engelleme yeteneklerine bağlanabilir (Engels vd, 2009). Aynı zamanda flavonoidler, nükleik asit sentezinin inhibisyonu (Wu vd, 2013), sitoplazmik membran hasarının indüksiyonu (Tsuchiya, 2015; Sanver vd, 2016) ve enerji metabolizmasının inhibisyonu (Eumkeb ve Chukrathok, 2013), biyofilm oluşumu (Zambrano vd, 2019) ve bakteriyel toksin üretimi (Soromou vd, 2013) gibi farklı etki mekanizmalarına sahip bir dizi antibakteriyel etkiye sahiptir. Flavonoid kateşin, membranın lipit çift katmanlarına nüfuz edebilir, bu da intramembranöz materyallerin sızmasına ve lipozom agregasyonuna neden olabilir (Ikigai vd, 1993; Taylor vd, 2005).

Bahsedilenlere ek olarak, bitki ekstraktlarında ayrı ayrı ya da hep birlikte farklı fenolik maddelerin de antifungal aktiviteden çoğunlukla sorumlu olduğu literatürde belirtilmektedir (Hussin vd, 2009; Chavez-Santiago vd, 2021). Diğer veriler bu çalışmanın sonuçlarını güçlendirmekte ve desteklemektedir. Örneğin Joaquín-Ramos vd (2020), ekstraktların geliştirdiği en yüksek antifungal aktivitenin fenolik maddelerin içeriğiyle ilgili olabileceğini bildirmiştir. Farklı uygulamaların inhibisyon değerlerindeki farklılıklar, fenolik maddeler ile patojen fungusların membran proteinleri arasındaki etkileşime ve mikroorganizmaların fenollere ve flavonoidlere yanıt vermek için kullandıkları mekanizmalara bağlı olabilir.

Kısaca literatür son zamanlarda fenolik asitlerin ve flavonoidlerin bitkileri fitopatojenik funguslara karşı doğal olarak koruduğunu ve bu nedenle fenolik maddeler içeren bitki ekstraktlarının geleneksel fungusitlere doğal alternatifler olarak kabul edildiğini göstermiştir (Filippi vd, 2020). Bu sonuçlar, bu tür yaklaşımların daha yüksek biyokütle üretimi ve ticari amaçlar için biyoreaktöre dönüştürülmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, *Aronia melanocarpa* yaprağının kallus kültürlerinde sekonder metabolit üretiminin artırılması araştırılmaktadır. Araştırma, biyotik ve abiyotik ortaya çıkarma tekniklerini kullanarak, biyoaktif bileşiklerin büyük ölçekli üretimi için uygulanabilir biyoteknolojik stratejiler oluşturmayı amaçlamaktadır.

1. Bir aylık ekimden sonra, Kin + 2,4-D içeren ortamda yetiştirilen yaprakların kesik yüzeylerinde yoğun kallus oluşumu gözlenmiştir; bu, spesifik büyüme ortamı bileşenlerinin etkinliğini ortaya koymuştur.
2. *A. melanocarpa* köklerinden dört endofitik bakteri (*Pseudomonas umsongensis*, *Pseudomonas brassicacearum*, *Bacillus subtilis* ve *Paracoccus litorisediminis*) ve dört fungus suşunun (*Rhizopycnis vagum*, *Dactylonectria novozelandica*, *Gongronella butleri* ve *Diatrype stigma*) izolasyonu ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.
3. Değişen konsantrasyonlarda hücre dışı kültür filtratları ve Fe₃O₄ nanopartikülleri ile kallus kültürlerinin ortaya çıkarılması, biyotik elisitörlerin optimal etkinlik göstermesiyle birlikte toplam fenolik maddelerin birikiminde ve DPPH serbest radikal temizleme aktivitesinde önemli bir artışla sonuçlanmıştır.
4. *Diatrype stigma* fungusundan hücre dışı kültür filtratı ile elde edilen kallus *A. melanocarpa* yaprak biyokütlesinin metanolik ekstraktı, en yüksek fenolik madde ve antioksidan birikimini sergilenmiştir.
5. Bu ekstrakt, *Staphylococcus aureus* ve *Aspergillus flavus* gibi önemli patojenlere karşı dikkate değer inhibitör etkisi göstermiştir.

Çalışma, antimikrobiyal ajanların geliştirilmesinde pratik uygulamalarla birlikte, bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini arttırmaya yönelik stratejilerin geliştirilmesine önemli ölçüde katkılar sağlayacaktır. Özellikle klinik açıdan önemli patojenlerle mücadelede, farmasötik uygulamalar için ortaya çıkan ekstraktların potansiyelini vurgulamaktadır. Uyarma koşullarının daha fazla optimizasyonu ve altta yatan mekanizmaların araştırılması, farmasötik önemi olan biyoaktif bileşiklerin sürdürülebilir üretimine yol açabilir. Bu araştırma bitki biyoteknolojisi alanına katkıda bulunmakta olup doğal bazlı farmasötiklerin ve

antimikrobiyal ürünlerin geliştirilmesine yönelik bilgiler sunarak büyük ölçekli tıbbi bileşik üretimi için umut verici beklentiler sunmaktadır.



KAYNAKLAR

- Abdelaziz, A. M., El-Wakil, D. A., Attia, M. S., Ali, O. M., AbdElgawad, H., & Hashem, A. H. (2022). Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in *Zea mays* L. using endophytic *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Fungi*, 8(5), 482.
- Abdulfafiz, F., Mohammed, A., Reduan, M. F. H., Kari, Z. A., Wei, L. S., & Goh, K. W. (2022). Plant cell culture technologies: A promising alternatives to produce high-value secondary metabolites. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(11), 104161.
- Acemi, A., Ozen, F., & Kiran, R. (2012). Development of an efficient callus production protocol for *Amsonia orientalis*: A critically endangered medicinal plant. *Eurasian Journal of Biosciences*, 6.
- Acosta-Estrada, B. A., Villela-Castrejón, J., Perez-Carrillo, E., Gómez-Sánchez, C. E., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2019). Effects of solid-state fungi fermentation on phenolic content, antioxidant properties and fiber composition of lime cooked maize by-product (nejayote). *Journal of Cereal Science*, 90, 102837.
- Adebo, O. A., & Gabriela Medina-Meza, I. (2020). Impact of fermentation on the phenolic compounds and antioxidant activity of whole cereal grains: A mini review. *Molecules*, 25(4), 927.
- Adediji, W. A. (2016). The treasure called antibiotics. *Annals of Ibadan postgraduate medicine*, 14(2), 56.
- Adeleke, B. S., Babalola, O. O., & Glick, B. R. (2021). Plant growth-promoting root-colonizing bacterial endophytes. *Rhizosphere*, 20, 100433.
- Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, metatranscriptomics, and metabolomics approaches for microbiome analysis: supplementary issue: bioinformatics methods and applications for big metagenomics data. *Evolutionary Bioinformatics*, 12, EBO-S36436.
- Ahamed, T. E. S., & Ahamed, E. S. S. (2018). Synergy prospect low gamma irradiation doses incorporating elicitation with iron nanoparticles to hyper production biomass yield and bioactive secondary metabolites for cress, medicinal plant. *Plant Sci*, 6(5), 157-163.
- Ahmad, M., Ali, Q., Hafeez, M. M., & Malik, A. (2021). Improvement for biotic and abiotic stress tolerance in crop plants. *Biological and Clinical Sciences Research Journal*, 2021(1).
- Akindahunsi, A. A., Adeyemo, S. M., & Adeoye, A. (2021). The use of bacteria (*Bacillus subtilis*) in improving the mechanical properties of concrete. *Journal of Building Pathology and Rehabilitation*, 6, 1-8.
- Akula, R., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
- Alamgir, A. N. M., & Alamgir, A. N. M. (2018). Biotechnology, in vitro production of natural bioactive compounds, herbal preparation, and disease management (treatment and prevention). *Therapeutic Use of Medicinal Plants and their Extracts: Volume 2: Phytochemistry and Bioactive Compounds*, 585-664.
- Al-Amier, H., Mansour, B. M. M., Toaima, N., Korus, R. A., & Shetty, K. (1999). Tissue culture based screening for selection of high biomass and phenolic producing clonal lines of lavender using *Pseudomonas* and azetidine-2-carboxylate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2937-2943.
- Alara, O. R., Abdurahman, N. H., & Ukaegbu, C. I. (2021). Extraction of phenolic compounds: A review. *Current Research in Food Science*, 4, 200-214.

- Alasalvar, C., Grigor, J. M., Zhang, D., Quantick, P. C., & Shahidi, F. (2001). Comparison of volatiles, phenolics, sugars, antioxidant vitamins, and sensory quality of different colored carrot varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(3), 1410-1416.
- Al-Bayati, A. I. N. (2023, Kasım). Farklı Yöntemlerle Sentezlenen Nanopartiküllerin *Anacamptis Laxiflora* Tohumlarının Çimlenme, Glikomannan İçerikleri ve İlişkili Mikrobiyom Üzerine Olan Etkilerinin Belirlenmesi (Doktora tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Biyoloji Ana Bilim Dalı, Samsun, Türkiye).
- Albuquerque, B. R., Heleno, S. A., Oliveira, M. B. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. (2021). Phenolic compounds: Current industrial applications, limitations and future challenges. *Food & function*, 12(1), 14-29.
- Aleynova, O. A., Suprun, A. R., Nityagovsky, N. N., Dubrovina, A. S., & Kiselev, K. V. (2021). The influence of the grapevine bacterial and fungal endophytes on biomass accumulation and stilbene production by the in vitro cultivated cells of *Vitis amurensis* Rupr. *Plants*, 10(7), 1276.
- Algar, E., Gutierrez-Mañero, F. J., Bonilla, A., Lucas, J. A., Radzki, W., & Ramos-Solano, B. (2012). *Pseudomonas fluorescens* N21. 4 metabolites enhance secondary metabolism isoflavones in soybean (*Glycine max*) calli cultures. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(44), 11080-11087.
- Ali, A., Mohammad, S., Khan, M. A., Raja, N. I., Arif, M., Kamil, A., & Mashwani, Z. U. R. (2019). Silver nanoparticles elicited in vitro callus cultures for accumulation of biomass and secondary metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 47(1), 715-724.
- Alli, A. I., Ehinmidu, J. O., & Ibrahim, Y. K. E. (2011). Preliminary phytochemical screening and antimicrobial activities of some medicinal plants used in Ebiraland. *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 4(1), 10-16.
- Almagro, L., López Perez, A. J., & Pedreño, M. A. (2011). New method to enhance ajmalicine production in *Catharanthus roseus* cell cultures based on the use of cyclodextrins. *Biotechnology letters*, 33, 381-385.
- Al-Mamary, M. A., & Moussa, Z. (2021). Antioxidant activity: The presence and impact of hydroxyl groups in small molecules of natural and synthetic origin. *Antioxidants—Benefits, sources, mechanisms of action*, 318-377.
- Ancheeva, E., Daletos, G., & Proksch, P. (2020). Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi. *Current medicinal chemistry*, 27(11), 1836-1854.
- Andreozzi, A., Prieto, P., Mercado-Blanco, J., Monaco, S., Zampieri, E., Romano, S., ... & Bianco, C. (2019). Efficient colonization of the endophytes *Herbaspirillum huttiense* RCA24 and *Enterobacter cloacae* RCA25 influences the physiological parameters of *Oryza sativa* L. cv. Baldo rice. *Environmental Microbiology*, 21(9), 3489-3504.
- Angelova, Z., Georgiev, S., & Roos, W. (2006). Elicitation of plants. *Biotechnol. Biotechnological Equipment*. 20 (2): 72-83.
- Ansari, M. A., Anurag, A., Fatima, Z., & Hameed, S. (2013). Natural phenolic compounds: a potential antifungal agent. *Microb. Pathog. Strateg. Combat. Sci. Technol. Educ*, 1, 1189-1195.
- Araújo, W. L., Marcon, J., Maccheroni Jr, W., Van Elsas, J. D., Van Vuurde, J. W., & Azevedo, J. L. (2002). Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylella fastidiosa* in citrus plants. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 4906-4914.

- Armengol, J., Vicent, A., Martínez-Culebras, P., Bruton, B. D., & García-Jiménez, J. (2019). Identification, occurrence and pathogenicity of *Rhizopycnis vagum* on muskmelon in Spain. *Plant Pathology*, 52(1), 68-73.
- Asaf, S., Hamayun, M., Khan, A. L., Waqas, M., Khan, M. A., Jan, R., ... & Hussain, A. (2018). Salt tolerance of *Glycine max.* L induced by endophytic fungus *Aspergillus flavus* CSH1, via regulating its endogenous hormones and antioxidative system. *Plant physiology and biochemistry*, 128, 13-23.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., & Arif, M. S. (2018). Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. *Plant metabolites and regulation under environmental stress*, 153-167.
- Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.
- Ayoobi, A., Asgarani, E., & Efferth, T. (2023). Iron oxide nanoparticle (Fe₃O₄-NP) elicitation of *Artemisia annua* L. in vitro toward enhancing artemisinin production through overexpression of key genes of terpenoids biosynthesis pathway and induction of oxidative stress.
- Ayoub, M., de Camargo, A. C., & Shahidi, F. (2016). Antioxidants and bioactivities of free, esterified and insoluble-bound phenolics from berry seed meals. *Food chemistry*, 197, 221-232.
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Sandhu, S. K., & Bhargav, V. K. (2014). Influence of different solvents in extraction of phenolic compounds from vegetable residues and their evaluation as natural sources of antioxidants. *Journal of food science and technology*, 51, 2568-2575.
- Babu, A. G., Kim, S. W., Adhikari, M., Yadav, D. R., Um, Y. H., Kim, C., ... & Lee, Y. S. (2015). A new record of *Gongronella butleri* isolated in Korea. *Mycobiology*, 43(2), 166-169.
- Badawy, A. A., Alotaibi, M. O., Abdelaziz, A. M., Osman, M. S., Khalil, A. M., Saleh, A. M., ... & Hashem, A. H. (2021). Enhancement of seawater stress tolerance in barley by the endophytic fungus *Aspergillus ochraceus*. *Metabolites*, 11(7), 428.
- Badimon, L., Chagas, P., & Chiva-Blanch, G. (2019). Diet and cardiovascular disease: effects of foods and nutrients in classical and emerging cardiovascular risk factors. *Current medicinal chemistry*, 26(19), 3639-3651.
- Bafana, A. (2013). Diversity and metabolic potential of culturable root-associated bacteria from *Origanum vulgare* in sub-Himalayan region. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(1), 63-74.
- Bajwa, M. N., Bibi, A., Idrees, M. Z., Zaman, G., Farooq, U., & Bhatti, T. T. (2021). Elicitation, a mechanistic approach to change the metabolic pathway of plants to produce pharmacological important compounds in in-vitro cell cultures. *J. Eng*, 8, 1-7.
- Bakker, P. A., & Mercado-Blanco, J. (2012). The rhizosphere microbiota and plant health. *Plant and Soil*.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food chemistry*, 99(1), 191-203.
- Ballard, C. R., & Junior, M. R. M. (2019). Health benefits of flavonoids. In *Bioactive compounds* (pp. 185-201). Woodhead Publishing.

- Banasiuk, R., Krychowiak, M., Swigon, D., Tomaszewicz, W., Michalak, A., Chylewska, A., ... & Krolicka, A. (2020). Carnivorous plants used for green synthesis of silver nanoparticles with broad-spectrum antimicrobial activity. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 1415-1428.
- Baniwal, P., Mehra, R., Kumar, N., Sharma, S., & Kumar, S. (2021). Cereals: Functional constituents and its health benefits. *The Pharma Innovation*, 10(2), 343-349.
- Barbosa, C. H., Andrade, M. A., Vilarinho, F., Fernando, A. L., & Silva, A. S. (2021). Active Edible Packaging. *Encyclopedia* 2021, 1, 360–370.
- Barouh, N., Bourlieu-Lacanal, C., Figueroa-Espinoza, M. C., Durand, E., & Villeneuve, P. (2022). Tocopherols as antioxidants in lipid-based systems: The combination of chemical and physicochemical interactions determines their efficiency. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 642-688.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., & Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of plant growth regulation*, 32, 216-232.
- Bashan, Y., Holguin, G., & Lifshitz, R. (1993). Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. *Methods in plant molecular biology and biotechnology*, 331-345.
- Begum, N. A., Mondal, S., Basu, S., Laskar, R. A., & Mandal, D. (2009). Biogenic synthesis of Au and Ag nanoparticles using aqueous solutions of Black Tea leaf extracts. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 71(1), 113-118.
- Begum, S., Zahid, A., Khan, T., Khan, N. Z., & Ali, W. (2020). Comparative analysis of the effects of chemically and biologically synthesized silver nanoparticles on biomass accumulation and secondary metabolism in callus cultures of *Fagonia indica*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 1739-1750.
- Behl, T., Bungau, S., Kumar, K., Zengin, G., Khan, F., Kumar, A., ... & Mosteanu, D. E. (2020). Pleiotropic effects of polyphenols in cardiovascular system. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 130, 110714.
- Berg, G., Grube, M., Schlöter, M., & Smalla, K. (2014). The plant microbiome and its importance for plant and human health. *Frontiers in microbiology*, 111795.
- Bhatia, S., Sharma, K., Dahiya, R., & Bera, T. (2015). Plant tissue culture. *Modern applications of plant biotechnology in pharmaceutical sciences*, 31-107.
- Biswas, T., Kalra, A., Mathur, A. K., Lal, R. K., Singh, M., & Mathur, A. (2016). Elicitors' influenced differential ginsenoside production and exudation into medium with concurrent Rg3/Rh2 panaxadiol induction in *Panax quinquefolius* cell suspensions. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 4909-4922.
- Biswas, T., Pandey, S. S., Maji, D., Gupta, V., Kalra, A., Singh, M., ... & Mathur, A. K. (2018). Enhanced expression of ginsenoside biosynthetic genes and in vitro ginsenoside production in elicited *Panax sikkimensis* (Ban) cell suspensions. *Protoplasma*, 255, 1147-1160.
- Bodilis, J., & Barray, S. (2006). Molecular evolution of the major outer-membrane protein gene (oprF) of *Pseudomonas*. *Microbiology*, 152(4), 1075-1088.
- Böhm, M., Hurek, T., & Reinhold-Hurek, B. (2007). Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N₂-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(5), 526-533.
- Bolivar-Anillo, H. J., González-Rodríguez, V. E., Cantoral, J. M., García-Sánchez, D., Collado, I. G., & Garrido, C. (2021). Endophytic bacteria *Bacillus subtilis*, isolated

- from *Zea mays*, as potential biocontrol agent against *Botrytis cinerea*. *Biology*, 10(6), 492.
- Boonsongcheep, P., Daodee, S., Kitisripanya, T., & Putalun, W. (2019). Increased carbazole alkaloid accumulation in *clausena harmandiana* callus culture by treatments of biocontrol agent, *trichoderma harzianum* and *bacillus subtilis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 189(3), 871-883.
- Bouaziz, M., Chamkha, M., & Sayadi, S. (2004). Comparative study on phenolic content and antioxidant activity during maturation of the olive cultivar Chemlali from Tunisia. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(17), 5476-5481.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., & Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- Brader, G., Corretto, E., & Sessitsch, A. (2017). Metagenomics of plant microbiomes. *Functional metagenomics: tools and applications*, 179-200.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Bright, M., & Bulgheresi, S. (2010). A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 218-230.
- Brovarets, O. H. O., & Hovorun, D. M. (2020). Conformational transitions of the quercetin molecule via the rotations of its rings: A comprehensive theoretical study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38(10), 2865-2883.
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Van Themaat, E. V. L., & Schulze-Lefert, P. (2013). Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual review of plant biology*, 64, 807-838.
- Bushmeleva, K., Vyshtakalyuk, A., Terenzhev, D., Belov, T., Nikitin, E., & Zobov, V. (2023). *Aronia melanocarpa* flavonol extract—Antiradical and immunomodulating activities analysis. *Plants*, 12(16), 2976.
- Butkhup, L., Chowtivannakul, S., Gaensakoo, R., Prathepha, P., & Samappito, S. (2010). Study of the phenolic composition of Shiraz red grape cultivar (*Vitis vinifera* L.) cultivated in north-eastern Thailand and its antioxidant and antimicrobial activity. *South African Journal for Enology & Viticulture*, 31(2), 89.
- Cacai, G., Ahanhanzo, C., Adjanohoun, A., Houédjissin, S., Azokpota, P., & Agbangla, C. (2013). Hormonal influence on the in vitro bud burst of some cassava varieties and accessions from Benin. *African Journal of Biotechnology*, 12(13).
- Cai, Z., Kastell, A., Mewis, I., Knorr, D., & Smetanska, I. (2012). Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 108, 401-409.
- Cai, Z., Riedel, H., Thaw Saw, N. M. M., Kütük, O., Mewis, I., Jäger, H., ... & Smetanska, I. (2011). Effects of pulsed electric field on secondary metabolism of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Fréaux suspension culture and exudates. *Applied biochemistry and biotechnology*, 164, 443-453.
- Calderón-Oliver, M., & Ponce-Alquicira, E. (2018). Fruits: A source of polyphenols and health benefits. In *Natural and artificial flavoring agents and food dyes* (pp. 189-228). Academic Press.
- Cambaz, E., & Çördük, N. U. R. Ş. E. N. (2023). Secondary metabolite production in callus culture of *Verbascum scamandri* Murb. *ACTA SOCIETATIS BOTANICORUM POLONIAE*, 92(1).

- Capote, N., Del Río, M. Á., Herencia, J. F., & Arroyo, F. T. (2022). Molecular and pathogenic characterization of *Cylindrocarpum*-like anamorphs causing root and basal rot of almonds. *Plants*, 11(7), 984.
- Cappuccino, J. G., & Sherman, N. (1996). *Instructor's guide for microbiology: a laboratory manual*. Benjamin/Cummings Publishing Company.
- Carluccio, M. A., Siculella, L., Ancora, M. A., Massaro, M., Scoditti, E., Storelli, C., ... & De Caterina, R. (2003). Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation: antiatherogenic properties of Mediterranean diet phytochemicals. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 23(4), 622-629.
- Ch, B., Rao, K., Gandi, S., & Giri, A. (2012). Abiotic elicitation of gymnemic acid in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 741-747.
- Chamkhi, I., Benali, T., Aanniz, T., El Menyiy, N., Guaouguaou, F. E., El Omari, N., ... & Bouyahya, A. (2021). Plant-microbial interaction: The mechanism and the application of microbial elicitor induced secondary metabolites biosynthesis in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 167, 269-295.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME journal*, 8(4), 790-803.
- Chaparro, J. M., Sheflin, A. M., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2012). Manipulating the soil microbiome to increase soil health and plant fertility. *Biology and Fertility of Soils*, 48, 489-499.
- CHAVEZ-SANTIAGO, J. O., RODRÍGUEZ-CASTILLEJOS, G. C., Montenegro, G., Bridi, R., Valdes-Gomez, H., Alvarado-Reyna, S., ... & Santiago-Adame, R. (2021). Phenolic content, antioxidant and antifungal activity of jackfruit extracts (*Artocarpus heterophyllus* Lam.). *Food Science and Technology*, 42, e02221.
- Chen, F., Ren, C. G., Zhou, T., Wei, Y. J., & Dai, C. C. (2016). A novel exopolysaccharide elicitor from endophytic fungus *Gilmaniella* sp. AL12 on volatile oils accumulation in *Atractylodes lancea*. *Scientific reports*, 6(1), 34735.
- Chen, Y. T., Shen, C. H., Lin, W. D., Chu, H. A., Huang, B. L., Kuo, C. I., ... & Chang, I. F. (2013). Small RNAs of *Sequoia sempervirens* during rejuvenation and phase change. *Plant Biology*, 15(1), 27-36.
- Cheng, X. Y., Zhou, H. Y., Cui, X., Ni, W., & Liu, C. Z. (2006). Improvement of phenylethanoid glycosides biosynthesis in *Cistanche deserticola* cell suspension cultures by chitosan elicitor. *Journal of biotechnology*, 121(2), 253-260.
- 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.
- Chintalwar, G. J., Gupta, S., Roja, G., & Bapat, V. A. (2003). Protoberberine alkaloids from callus and cell suspension cultures of *Tinospora cordifolia*. *Pharmaceutical biology*, 41(2), 81-86.
- Chodiseti, B., Rao, K., Gandi, S., & Giri, A. (2013). Improved gymnemic acid production in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre* through biotic elicitation. *Plant biotechnology reports*, 7, 519-525.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in microbiology*, 6, 137829.
- Chrubasik, C., Li, G., & Chrubasik, S. (2010). The clinical effectiveness of chokeberry: a systematic review. *Phytotherapy Research*, 24(8), 1107-1114.

- Chung, I. M., Rajakumar, G., & Thiruvengadam, M. (2018). Effect of silver nanoparticles on phenolic compounds production and biological activities in hairy root cultures of *Cucumis anguria*. *Acta Biologica Hungarica*, 69, 97-109.
- Compant, S., Kaplan, H., Sessitsch, A., Nowak, J., Ait Barka, E., & Clément, C. (2008). Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS microbiology ecology*, 63(1), 84-93.
- Compant, S., Mitter, B., Colli-Mull, J. G., Gangl, H., & Sessitsch, A. (2011). Endophytes of grapevine flowers, berries, and seeds: identification of cultivable bacteria, comparison with other plant parts, and visualization of niches of colonization. *Microbial ecology*, 62, 188-197.
- Compant, S., Samad, A., Faist, H., & Sessitsch, A. (2019). A review on the plant microbiome: Ecology, functions, and emerging trends in microbial application. *Journal of advanced research*, 19, 29-37.
- Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564-578.
- Cvetanović, A., Zengin, G., Zeković, Z., Švarc-Gajić, J., Ražić, S., Damjanović, A., ... & Mitić, M. (2018). Comparative in vitro studies of the biological potential and chemical composition of stems, leaves and berries *Aronia melanocarpa*'s extracts obtained by subcritical water extraction. *Food and Chemical Toxicology*, 121, 458-466.
- Cvetković, D., Stanojević, L., Zvezdanović, J., Savić, S., Ilić, D., & Karabegović, I. (2018). *Aronia* leaves at the end of harvest season—Promising source of phenolic compounds, macro-and microelements. *Scientia Horticulturae*, 239, 17-25.
- Da Silva Pinto, M., Lajolo, F. M., & Genovese, M. I. (2007). Bioactive compounds and antioxidant capacity of strawberry jams. *Plant foods for human nutrition*, 62, 127-131.
- Daenen, K., Andries, A., Mekahli, D., Van Schepdael, A., Jouret, F., & Bammens, B. (2019). Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatric nephrology*, 34, 975-991.
- Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 174-181.
- Dalila, Z. D., Jaafar, H., & Manaf, A. A. (2013). Effects of 2, 4-D and kinetin on callus induction of *Barringtonia racemosa* leaf and endosperm explants in different types of basal media. *Asian Journal of Plant Sciences*, 12(1), 21-27.
- Dawidowicz, A. L., Bernacik, K., & Typek, R. (2016). Does the plant matrix type have impact on rutin transformation during its extraction?. *Food Analytical Methods*, 9(7), 2042-2051.
- de Ascensao, A. R., & Dubery, I. A. (2003). Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytochemistry*, 63(6), 679-686.
- De Filippis, L. F. (2016). Plant secondary metabolites: From molecular biology to health products. *Plant-Environment Interaction: Responses and Approaches to Mitigate Stress*, 263-299.
- de Laureto, P. P., Palazzi, L., & Acquasaliente, L. (2019). Polyphenols as potential therapeutic drugs in neurodegeneration. In *Neuroprotection-New Approaches and Prospects*. Rijeka, Licko-Senjska, Croatia: IntechOpen.
- del Carmen Orozco-Mosqueda, M., del Carmen Rocha-Granados, M., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2018). Microbiome engineering to improve biocontrol and plant growth-promoting mechanisms. *Microbiological research*, 208, 25-31.

- Delgoda, R., & Murray, J. E. (2017). Evolutionary perspectives on the role of plant secondary metabolites. In *Pharmacognosy* (pp. 93-100). Academic Press.
- Denev, P., Číž, M., Kratchanova, M., & Blazheva, D. (2019). Black chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenols reveal different antioxidant, antimicrobial and neutrophil-modulating activities. *Food chemistry*, 284, 108-117.
- Deng, G. F., Lin, X., Xu, X. R., Gao, L. L., Xie, J. F., & Li, H. B. (2013). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. *Journal of functional foods*, 5(1), 260-266.
- Deng, G. F., Shen, C., Xu, X. R., Kuang, R. D., Guo, Y. J., Zeng, L. S., ... & Li, H. B. (2012). Potential of fruit wastes as natural resources of bioactive compounds. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8308-8323.
- Deng, G. F., Xu, X. R., Zhang, Y., Li, D., Gan, R. Y., & Li, H. B. (2013). Phenolic compounds and bioactivities of pigmented rice. *Critical reviews in food science and nutrition*, 53(3), 296-306.
- Deshmukh, R. K., & Gaikwad, K. K. (2022). Natural antimicrobial and antioxidant compounds for active food packaging applications. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-22.
- Deshmukh, S. K., Gupta, M. K., Prakash, V., & Saxena, S. (2018). Endophytic fungi: A source of potential antifungal compounds. *Journal of Fungi*, 4(3), 77.
- Deshmukh, S., Hückelhoven, R., Schäfer, P., Imani, J., Sharma, M., Weiss, M., ... & Kogel, K. H. (2006). The root endophytic fungus *Piriformospora indica* requires host cell death for proliferation during mutualistic symbiosis with barley. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49), 18450-18457.
- Dhayanithy, G., Subban, K., & Chelliah, J. (2019). Diversity and biological activities of endophytic fungi associated with *Catharanthus roseus*. *BMC microbiology*, 19(1), 1-14.
- Dhyani, A., Jain, R., & Pandey, A. (2019). Contribution of root-associated microbial communities on soil quality of oak and pine forests in the Himalayan ecosystem. *Tropical Ecology*, 60(2), 271-280.
- Dias, D. A., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336.
- Ding, W. J., Wang, S. S., Ren, J. Q., Li, G., & Zhan, J. P. (2015). Progress on plant endophyte. *Curr. Biotechnol*, 5, 425-428.
- Ditano-Vázquez, P., Torres-Peña, J. D., Galeano-Valle, F., Pérez-Caballero, A. I., Demelo-Rodríguez, P., Lopez-Miranda, J., ... & Alvarez-Sala-Walther, L. A. (2019). The fluid aspect of the Mediterranean diet in the prevention and management of cardiovascular disease and diabetes: the role of polyphenol content in moderate consumption of wine and olive oil. *Nutrients*, 11(11), 2833.
- Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S., & Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Molecular plant pathology*, 3(5), 371-390.
- Domínguez, R., Barba, F. J., Gómez, B., Putnik, P., Kovačević, D. B., Pateiro, M., ... & Lorenzo, J. M. (2018). Active packaging films with natural antioxidants to be used in meat industry: A review. *Food research international*, 113, 93-101.

- Dong, J., Wan, G., & Liang, Z. (2010). Accumulation of salicylic acid-induced phenolic compounds and raised activities of secondary metabolic and antioxidative enzymes in *Salvia miltiorrhiza* cell culture. *Journal of biotechnology*, 148(2-3), 99-104.
- Dudeja, S. S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., & Kothe, E. (2012). Interaction of endophytic microbes with legumes. *Journal of basic microbiology*, 52(3), 248-260.
- Durazzo, A., Lucarini, M., Souto, E. B., Cicala, C., Caiazzo, E., Izzo, A. A., ... & Santini, A. (2019). Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. *Phytotherapy Research*, 33(9), 2221-2243.
- Dutta, R., Santra, H. K., & Banerjee, D. (2024). Microbial plant growth promoters and their role in abiotic stress management. In *Fungal Secondary Metabolites* (pp. 317-335). Elsevier.
- Edreva, A., Velikova, V., Tsonev, T., Dagnon, S., Gürel, A., Aktaş, L., & Gesheva, E. (2008). Stress-protective role of secondary metabolites: diversity of functions and mechanisms. *Gen. Appl. Plant Physiol*, 34(1-2), 67-78.
- Efferth, T. (2019). Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering*, 5(1), 50-59.
- Egamberdieva, D., Shurigin, V., Alaylar, B., Wirth, S., & Bellingrath-Kimura, S. D. (2020). Bacterial endophytes from horseradish (*Armoracia rusticana* G. Gaertn., B. Mey. & Scherb.) with antimicrobial efficacy against pathogens. *Plant, Soil and Environment*, 66(7), 309-316.
- Eibl, R., Meier, P., Stutz, I., Schildberger, D., Hühn, T., & Eibl, D. (2018). Plant cell culture technology in the cosmetics and food industries: current state and future trends. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 8661-8675.
- Ek-Ramos, M. J., Gomez-Flores, R., Orozco-Flores, A. A., Rodríguez-Padilla, C., González-Ochoa, G., & Tamez-Guerra, P. (2019). Bioactive products from plant-endophytic gram-positive bacteria. *Frontiers in microbiology*, 10, 463.
- Elbeltagy, A., Nishioka, K., Suzuki, H., Sato, T., Sato, Y. I., Morisaki, H., ... & Minamisawa, K. (2000). Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil science and plant nutrition*, 46(3), 617-629.
- Elhamouly, N. A., Hewedy, O. A., Zaitoon, A., Miraples, A., Elshorbagy, O. T., Hussien, S., ... & Peng, D. (2022). The hidden power of secondary metabolites in plant-fungi interactions and sustainable phytoremediation. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1044896.
- Elmagzob, A. A. H., Ibrahim, M. M., & Zhang, G. F. (2019). Seasonal diversity of endophytic bacteria associated with *Cinnamomum camphora* (L.) Presl. *Diversity*, 11(7), 112.
- El-Sayed, E. P. (2020). Elicitors in plant tissue culture. *Plant Biotechnology Journal*, 12(3), 317-332.
- Engels, C., KNOdler, M. A. T. T. H. I. A. S., Zhao, Y. Y., Carle, R., Gänzle, M. G., & Schieber, A. (2009). Antimicrobial activity of gallotannins isolated from mango (*Mangifera indica* L.) kernels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(17), 7712-7718.
- Ensign, J. C. (1992). Introduction to the actinomycetes. *The prokaryotes*, 1, 811-15.
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: the blurred functional trichotomy. *Plant physiology*, 184(1), 39-52.

- Ertürk, Ö. (2006). Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia*, 61, 275-278.
- Etalo, D. W., Jeon, J. S., & Raaijmakers, J. M. (2018). Modulation of plant chemistry by beneficial root microbiota. *Natural product reports*, 35(5), 398-409.
- Eumkeb, G., & Chukrathok, S. (2013). Synergistic activity and mechanism of action of ceftazidime and apigenin combination against ceftazidime-resistant *Enterobacter cloacae*. *Phytomedicine*, 20(3-4), 262-269.
- Everette, J. D., Bryant, Q. M., Green, A. M., Abbey, Y. A., Wangila, G. W., & Walker, R. B. (2010). Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(14), 8139-8144.
- Faeth, S. H. (2002). Are endophytic fungi defensive plant mutualists?. *Oikos*, 98(1), 25-36.
- Fantini, M., Benvenuto, M., Masuelli, L., Frajese, G. V., Tresoldi, I., Modesti, A., & Bei, R. (2015). In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. *International journal of molecular sciences*, 16(5), 9236-9282.
- Farr, D. F., Miller, M. E., & Bruton, B. D. (1998). *Rhizopycnis vagum* gen. et sp. nov., a new coelomycetous fungus from roots of melons and sugarcane. *Mycologia*, 90(2), 290-296.
- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C., & Duarte, A. P. (2010). Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. *Molecules*, 15(12), 9308-9322.
- Ferri, M., Righetti, L., & Tassoni, A. (2011). Increasing sucrose concentrations promote phenylpropanoid biosynthesis in grapevine cell cultures. *Journal of Plant Physiology*, 168(3), 189-195.
- Figueiredo, A. R., Campos, F., de Freitas, V., Hogg, T., & Couto, J. A. (2008). Effect of phenolic aldehydes and flavonoids on growth and inactivation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *Food Microbiology*, 25(1), 105-112.
- Filippi, D., Rodrigues, L. B., Priamo, W. L., Chiomento, J. L. T., & Friedrich, M. T. (2020). Phenolic compounds in *Physalis peruviana* Linneus extracts and action of the extracts on the phytopathogen *Botrytis cinerea* Pers. *Brazilian Journal of Development*, 6(10), 78370-78385.
- Finlay, B. B., & Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 61(2), 136-169.
- Fiorentino, A., D'Abrosca, B., Pacifico, S., Mastellone, C., Piscopo, V., Caputo, R., & Monaco, P. (2008). Isolation and structure elucidation of antioxidant polyphenols from quince (*Cydonia vulgaris*) peels. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(8), 2660-2667.
- Forni, C., Facchiano, F., Bartoli, M., Pieretti, S., Facchiano, A., D'Arcangelo, D., ... & Jadeja, R. N. (2019). Beneficial role of phytochemicals on oxidative stress and age-related diseases. *BioMed research international*, 2019.
- Fraga, M. F., Rodríguez, R., & Cañal, M. J. (2002). Genomic DNA methylation–demethylation during aging and reinvigoration of *Pinus radiata*. *Tree physiology*, 22(11), 813-816.
- Frank, A. C., Saldierna Guzmán, J. P., & Shay, J. E. (2017). Transmission of bacterial endophytes. *Microorganisms*, 5(4), 70.
- Frank, M., Rupp, H. M., Prinsen, E., Motyka, V., Van Onckelen, H., & Schmölling, T. (2000). Hormone autotrophic growth and differentiation identifies mutant lines of

- Arabidopsis with altered cytokinin and auxin content or signaling. *Plant Physiology*, 122(3), 721-730.
- Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Qin, X. S., Gan, R. Y., & Li, H. B. (2010). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules*, 15(12), 8602-8617.
- Gajić, D., Stojanović, I., Koprivica, I., Pejnović, N., Šavikin, K., Čujić-Nikolić, N., & Saksida, T. (2022). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract abrogates melanoma progression through boosting up IFN- γ -producing cells. *Journal of Functional Foods*, 95, 105185.
- Gandi, S., Rao, K., Chodisetti, B., & Giri, A. (2012). Elicitation of andrographolide in the suspension cultures of *Andrographis paniculata*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 168, 1729-1738.
- Gaspar, D. P., Lechtenberg, M., & Hensel, A. (2021). Quality assessment of bilberry fruits (*Vaccinium myrtillus*) and bilberry-containing dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(7), 2213-2225.
- Gautheret, R. J. (1939). Sur la possibilité de réaliser la culture indéfinie des tissus de tubercules de carotte. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris*, 208, 118.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Ginting, R. C. B., Sukarno, N., Widyastuti, U. T. U. T., Darusman, L. K., & KANAYA, S. (2013). Diversity of endophytic fungi from red ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) plant and their inhibitory effect to *Fusarium oxysporum* plant pathogenic fungi. *HAYATI Journal of Biosciences*, 20(3), 127-137.
- Giri, C. C., & Zaheer, M. (2016). Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126, 1-18.
- Glawe, D. A., & Rogers, J. D. (1982). Observations on the anamorphs of six species of *Diatrype* and *Diatrypella*. *Canadian Journal of Botany*, 60(3), 245-251.
- Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular cell*, 5(6), 1003-1011.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., La Greca, M., & Fregapane, G. (2006). Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7130-7136.
- Gonçalves, S., Mansinhos, I., Rodríguez-Solana, R., Pereira-Caro, G., Moreno-Rojas, J. M., & Romano, A. (2021). Impact of Metallic Nanoparticles on In Vitro Culture, Phenolic Profile and Biological Activity of Two Mediterranean Lamiaceae Species: *Lavandula viridis* L'Hér and *Thymus lotocephalus* G. López and R. Morales. *Molecules*, 26(21), 6427.
- Gorelick, J., & Bernstein, N. (2014). Elicitation: an underutilized tool in the development of medicinal plants as a source of therapeutic secondary metabolites. *Advances in agronomy*, 124, 201-230.
- Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry reviews*, 18, 241-272.
- Gueven, A., & Knorr, D. (2011). Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. *Journal of Food Engineering*, 103(3), 237-243.

- Guo, Y. J., Deng, G. F., Xu, X. R., Wu, S., Li, S., Xia, E. Q., ... & Li, H. B. (2012). Antioxidant capacities, phenolic compounds and polysaccharide contents of 49 edible macro-fungi. *Food & Function*, 3(11), 1195-1205.
- Gupta, S., & Chaturvedi, P. (2019). Enhancing secondary metabolite production in medicinal plants using endophytic elicitors: a case study of *Centella asiatica* (Apiaceae) and asiaticoside. *Endophytes for a growing world*, 310-323.
- Gupta, S., Bhatt, P., & Chaturvedi, P. (2018). Determination and quantification of asiaticoside in endophytic fungus from *Centella asiatica* (L.) Urban. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34, 1-10.
- Gupta, S., Chaturvedi, P., Kulkarni, M. G., & Van Staden, J. (2020). A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi. *Biotechnology advances*, 39, 107462.
- 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.
- Haberlandt, G. (1902). Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien. *Math Naturwiss*, 111, 69-92.
- Hadacek, F. (2002). Secondary metabolites as plant traits: current assessment and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 21(4), 273-322.
- Halder, M., Sarkar, S., & Jha, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in life sciences*, 19(12), 880-895.
- Hallmann, J. (2001). Plant interactions with endophytic bacteria. Biotic Interactions in Plant–Pathogen Associations (Jeger MJ & Spence NJ, eds).
- Hallmann, J., & Berg, G. (2006). Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. *Microbial root endophytes*, 15-31.
- Harborne, J. B. (1964). Biochemistry of phenolic compounds. *Biochemistry of phenolic compounds*.
- Harborne, J. B. (2013). The flavonoids: advances in research since 1980.
- Hardoim, P. R., Van Overbeek, L. S., Berg, G., Pirttilä, A. M., Compant, S., Campisano, A., ... & Sessitsch, A. (2015). The hidden world within plants: ecological and evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiology and molecular biology reviews*, 79(3), 293-320.
- Hatami, M., & Ghorbanpour, M. (2014). Defense enzyme activities and biochemical variations of *Pelargonium zonale* in response to nanosilver application and dark storage. *Turkish Journal of Biology*, 38(1), 130-139.
- Hawksworth, D. L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological research*, 95(6), 641-655.
- Hayes, A. J. (1979). The microbiology of plant litter decomposition. *Science Progress* (1933-), 66(261), 25-42.
- He, P. X., Zhang, Y., Zhou, Y., Li, G. H., Zhang, J. W., & Feng, X. S. (2019). Supercritical fluid chromatography—a technical overview and its applications in medicinal plant analysis: An update covering 2012–2018. *Analyst*, 144(18), 5324-5352.
- Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., ... & von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(9), 3590-3595.

- Hemmati, N., Azizi, M., Spina, R., Dupire, F., Arouei, H., Saeedi, M., & Laurain-Mattar, D. (2020). Accumulation of ajmalicine and vinblastine in cell cultures is enhanced by endophytic fungi of *Catharanthus roseus* cv. Icy Pink. *Industrial Crops and Products*, 158, 112776.
- Heydari, A., & Pessarakli, M. (2010). A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of biological sciences*, 10(4), 273-290.
- Hodgson, S., de Cates, C., Hodgson, J., Morley, N. J., Sutton, B. C., & Gange, A. C. (2014). Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and evolution*, 4(8), 1199-1208.
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). Bergey's Manual of determinate bacteriology.
- Hoque, A., Nahar, A., Razvy, M. A., Biswas, M. K., & Kabir, A. H. (2006). Micropropagation of water chestnut (*Trapa* sp.) through local varieties of Rajshahi Division. *Asian Journal of Plant Sciences*.
- Hosseinzadeh, A., Kamrava, S. K., Joghataei, M. T., Darabi, R., Shakeri-Zadeh, A., Shahriari, M., ... & Mehrzadi, S. (2016). Apoptosis signaling pathways in osteoarthritis and possible protective role of melatonin. *Journal of pineal research*, 61(4), 411-425.
- Hu, X., Chen, Y., Wu, X., Liu, W., Jing, X., Liu, Y., ... & Qin, W. (2022). Combination of calcium lactate impregnation with UV-C irradiation maintains quality and improves antioxidant capacity of fresh-cut kiwifruit slices. *Food Chemistry: X*, 14, 100329.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 1.
- Humbal, A., & Pathak, B. (2023). Influence of Exogenous Elicitors on the Production of Secondary Metabolite in Plants: A review ("VSI: Secondary Metabolites"). *Plant Stress*, 100166.
- Huq, M. A. (2020). *Paenibacillus anseongense* sp. nov. a silver nanoparticle producing bacterium isolated from rhizospheric soil. *Current Microbiology*, 77, 2023-2030.
- Huq, M. A., & Akter, S. (2021). Bacterial mediated rapid and facile synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial efficacy against pathogenic microorganisms. *Materials*, 14(10), 2615.
- Hussain, M. S., Fareed, S., Ansari, S., Rahman, M. A., Ahmad, I. Z., & Saeed, M. (2012). Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 4(1), 10.
- Hussein, R. A., & El-Anssary, A. A. (2019). Plants secondary metabolites: the key drivers of the pharmacological actions of medicinal plants. *Herbal medicine*, 1(3).
- Hussin, N. M., Muse, R., Ahmad, S., Ramli, J., Mahmood, M., Sulaiman, M. R., ... & Aziz, K. N. K. (2009). Antifungal activity of extracts and phenolic compounds from *Barringtonia racemosa* L.(Lecythidaceae). *African Journal of Biotechnology*, 8(12).
- Hyde, K. D., Xu, J., Rapior, S., Jeewon, R., Lumyong, S., Niego, A. G. T., ... & Stadler, M. (2019). The amazing potential of fungi: 50 ways we can exploit fungi industrially. *Fungal Diversity*, 97, 1-136.
- Igiehon, N. O., & Babalola, O. O. (2018). Rhizosphere microbiome modulators: contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture. *International journal of environmental research and public health*, 15(4), 574.

- Igiehon, N. O., Babalola, O. O., Cheseto, X., & Torto, B. (2021). Effects of rhizobia and arbuscular mycorrhizal fungi on yield, size distribution and fatty acid of soybean seeds grown under drought stress. *Microbiological Research*, 242, 126640.
- Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4), 1821-1835.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K., & Iwase, A. (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The plant cell*, 25(9), 3159-3173.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1147(1), 132-136.
- Irum, S., Jabeen, N., Ahmad, K. S., Shafique, S., Khan, T. F., Gul, H., ... & Hussain, S. Z. (2020). Biogenic iron oxide nanoparticles enhance callogenesis and regeneration pattern of recalcitrant *Cicer arietinum* L. *Plos one*, 15(12), e0242829.
- Jaisi, A., & Panichayupakaranant, P. (2016). Increased production of plumbagin in *Plumbago indica* root cultures by biotic and abiotic elicitors. *Biotechnology letters*, 38, 351-355.
- Jamali, H., Sharma, A., Roohi, N., & Srivastava, A. K. (2020). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* RH5 against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. *Journal of basic microbiology*, 60(3), 268-280.
- James, E. K., Gyaneshwar, P., Mathan, N., Barraquio, W. L., Reddy, P. M., Iannetta, P. P., ... & Ladha, J. K. (2002). Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(9), 894-906.
- Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. *Journal of drug delivery science and technology*, 53, 101174.
- Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Lubna, L., & Kim, K. M. (2021). Plant Secondary Metabolite Biosynthesis and Transcriptional Regulation in Response to Biotic and Abiotic Stress Conditions. *Agronomy* 2021, 11, 968.
- Jasuja, N. D., Saxena, R., Chandra, S., & Joshi, S. C. (2013). Isolation and identification of microorganism from polyhouse agriculture soil of Rajasthan. *African Journal of Microbiology Research*, 7(41), 4886-4891.
- Jiang, N., Doseff, A. I., & Grotewold, E. (2016). Flavones: from biosynthesis to health benefits. *Plants*, 5(2), 27.
- Jin, L., Yang, L., Li, W., Xu, D., Yang, N., Li, G., & Wan, P. (2021). Diversity and biocontrol potential of culturable endophytic fungi in cotton. *Frontiers in Microbiology*, 12, 698930.
- Joaquín-Ramos, A. D. J., López-Palestina, C. U., Pinedo-Espinoza, J. M., Altamirano-Romo, S. E., Santiago-Saenz, Y. O., Aguirre-Mancilla, C. L., & Gutiérrez-Tlahque, J. (2020). Phenolic compounds, antioxidant properties and antifungal activity of jarilla (*Barkleyanthus salicifolius* ENT# 91; KunthENT# 93; H. Rob & Brettell). *Chilean journal of agricultural research*, 80(3), 352-360.
- Joslyn, L. J., & Block, S. S. (1991). Disinfection, sterilization, and preservation. by Block SS, Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 515-526.
- Kabera, J. N., Semana, E., Mussa, A. R., & He, X. (2014). Plant secondary metabolites: biosynthesis, classification, function and pharmacological properties. *J. Pharm. Pharmacol*, 2(7), 377-392.

- Kala, S. C., Muvva, V., Khalivulla, S. I., & Kokkanti, M. (2014). Phytochemical and antimicrobial analysis of callus extracts of *Biophytum sensitivum* (Linn) DC. *British Microbiology Research Journal*, 4(8), 869-884.
- Kandar, C. C. (2021). Secondary metabolites from plant sources. *Bioactive natural products for pharmaceutical applications*, 329-377.
- Kandoudi, W., & Németh-Zámboiné, É. (2022). Stimulating secondary compound accumulation by elicitation: Is it a realistic tool in medicinal plants in vivo?. *Phytochemistry Reviews*, 21(6), 2007-2025.
- Kanthaliya, B., Joshi, A., Arora, J., Alqahtani, M. D., & Abd_Allah, E. F. (2023). Effect of Biotic Elicitors on the Growth, Antioxidant Activity and Metabolites Accumulation in In Vitro Propagated Shoots of *Pueraria tuberosa*. *Plants*, 12(6), 1300.
- Karaman, I., Şahin, F., Güllüce, M., Ögütçü, H., Şengül, M., & Adıgüzel, A. (2003). Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *Journal of ethnopharmacology*, 85(2-3), 231-235.
- Karuppusamy, S. (2009). A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by in vitro tissue, organ and cell cultures. *J Med Plants Res*, 3(13), 1222-1239.
- Kessler, A., & Kalske, A. (2018). Plant secondary metabolite diversity and species interactions. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 115-138.
- Khafagi, I. K. (2007). Variation of callus induction and active metabolite accumulation in callus cultures of two varieties of *Ricinus communis* L. *Biotechnology*, 6(2), 193-201.
- Khan, M. A., Ali, A., Mohammad, S., Ali, H., Khan, T., Mashwani, Z. U. R., ... & Ahmad, P. (2020). Iron nano modulated growth and biosynthesis of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143, 121-130.
- Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Ullah, I., Ali, S., Kang, S. M., & Lee, I. J. (2019). Alleviation of salt stress response in soybean plants with the endophytic bacterial isolate *Curtobacterium* sp. SAK1. *Annals of Microbiology*, 69(8), 797-808.
- Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., AlMutairi, K. A., & Siddiqui, Z. H. (2017). Role of nanomaterials in plants under challenging environments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 194-209.
- Kharwar, R. N., Mishra, A., Gond, S. K., Stierle, A., & Stierle, D. (2011). Anticancer compounds derived from fungal endophytes: their importance and future challenges. *Natural product reports*, 28(7), 1208-1228.
- Khodakovskaya, M. V., De Silva, K., Biris, A. S., Dervishi, E., & Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS nano*, 6(3), 2128-2135.
- Kieran, P. M., MacLoughlin, P. F., & Malone, D. M. (1997). Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59(1-2), 39-52.
- Kil, H. Y., Seong, E. S., Ghimire, B. K., Chung, I. M., Kwon, S. S., Goh, E. J., ... & Yu, C. Y. (2009). Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food chemistry*, 115(4), 1234-1239.
- Kilicoglu, M. C., Baialieva, G., & Ozkoc, I. (2024). Molecular characterization of fungal endophytes associated with *Hypericum perforatum* in Samsun, Turkey. *World News of Natural Sciences*, 54, 58-69.
- Kim, D. H., Gopal, J., & Sivanesan, I. (2017). Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. *RSC advances*, 7(58), 36492-36505.

- Kim, J. H., Auger, C., Kurita, I., Anselm, E., Rivoarilala, L. O., Lee, H. J., ... & Schini-Kerth, V. B. (2013). Aronia melanocarpa juice, a rich source of polyphenols, induces endothelium-dependent relaxations in porcine coronary arteries via the redox-sensitive activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nitric Oxide*, 35, 54-64.
- Knapp, D. G., Pintye, A., & Kovács, G. M. (2012). The dark side is not fastidious—dark septate endophytic fungi of native and invasive plants of semiarid sandy areas. *PLOS one*, 7(2), e32570.
- Kogel, K. H., Franken, P., & Hückelhoven, R. (2006). Endophyte or parasite—what decides?. *Current opinion in plant biology*, 9(4), 358-363.
- Kolewe, M. E., Gaurav, V., & Roberts, S. C. (2008). Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Molecular pharmaceuticals*, 5(2), 243-256.
- Komaraiah, P., Kishor, P. K., Carlsson, M., Magnusson, K. E., & Mandenius, C. F. (2005). Enhancement of anthraquinone accumulation in *Morinda citrifolia* suspension cultures. *Plant Science*, 168(5), 1337-1344.
- Kong, Y., Yan, T., Tong, Y., Deng, H., Tan, C., Wan, M., ... & Wang, Y. (2021). Gut microbiota modulation by polyphenols from *Aronia melanocarpa* of LPS-induced liver diseases in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(11), 3312-3325.
- Kordi, T. E., Jafar, V., & Moharam, V. (2014). In vitro production of secondary metabolites in *Cicer spiroceras* using elicitors. *Global Journal of Research on Medicinal Plants & Indigenous Medicine*, 3(2), 48.
- Kotte, W. (1922). Kulturversuche mit isolierten Wurzelspitzen. *Beitr. Allg. Bot*, 2, 413-434.
- Krga, I., & Milenkovic, D. (2019). Anthocyanins: From sources and bioavailability to cardiovascular-health benefits and molecular mechanisms of action. *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(7), 1771-1783.
- Kuhnau, J. (1976). Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition. *World review of nutrition and dietetics*.
- Kulling, S. E., & Rawel, H. M. (2008). Chokeberry (*Aronia melanocarpa*)—A review on the characteristic components and potential health effects. *Planta medica*, 74(13), 1625-1634.
- Kumar, A., Droby, S., Singh, V. K., Singh, S. K., & White, J. F. (2020). Entry, colonization, and distribution of endophytic microorganisms in plants. In *Microbial endophytes* (pp. 1-33). Woodhead Publishing.
- Kumar, A., Raj, K., Chugh, R. K., Saini, A. K., & Rani, M. (2023). Evaluation of Endophytic Bacterial Isolates *Withania somnifera* under In-Vitro Conditions. *Indian Journal of Ecology*, 50(1), 162-166.
- Kumar, C. M. K., Yugandhar, P., & Savithramma, N. (2016). Biological synthesis of silver nanoparticles from *Adansonia digitata* L. fruit pulp extract, characterization, and its antimicrobial properties. *Journal of intercultural ethnopharmacology*, 5(1), 79.
- Kumar, D. (2020). PLANT IMMUNE RESPONSE STRATEGIES AGAINST PATHOGENS. *Plant Archives* (09725210), 20(2).
- Kumar, K., Mehra, R., Guiné, R. P., Lima, M. J., Kumar, N., Kaushik, R., ... & Kumar, H. (2021). Edible Mushrooms: A comprehensive review on bioactive compounds with health benefits and processing aspects. *Foods*, 10(12), 2996.
- Kumar, P., Chaturvedi, R., Sundar, D., & Bisaria, V. S. (2016). *Piriformospora indica* enhances the production of pentacyclic triterpenoids in *Lantana camara* L. suspension cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125, 23-29.

- Kushwaha, P., Kashyap, P. L., Kuppusamy, P., Srivastava, A. K., & Tiwari, R. K. (2020). Functional characterization of endophytic bacilli from pearl millet (*Pennisetum glaucum*) and their possible role in multiple stress tolerance. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 154(4), 503-514.
- Kuzmanović Nedeljković, S., Radan, M., Čujić Nikolić, N., Mutavski, Z., Krgović, N., Marković, S., ... & Šavikin, K. (2023). Microencapsulated Bilberry and Chokeberry Leaf Extracts with Potential Health Benefits. *Plants*, 12(23), 3979.
- Kwon, S. W., Kim, J. S., Park, I. C., Yoon, S. H., Park, D. H., Lim, C. K., & Go, S. J. (2003). *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov. and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in Korea. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(1), 21-27.
- Lai, D., Wang, A., Cao, Y., Zhou, K., Mao, Z., Dong, X., ... & Liu, Y. (2016). Bioactive dibenzo- α -pyrone derivatives from the endophytic fungus *Rhizopycnis vagum* Nitaf22. *Journal of natural products*, 79(8), 2022-2031.
- Landa, P., Marsik, P., Vanek, T., Rada, V., & Kokoska, L. (2006). In vitro anti-microbial activity of extracts from the callus cultures of some *Nigella* species. *Biologia*, 61, 285-288.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., & Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in research*, 66(2), 23-67.
- Lawrence, D. P., Nouri, M. T., & Trouillas, F. P. (2019). Taxonomy and multi-locus phylogeny of cylindrocarpon-like species associated with diseased roots of grapevine and other fruit and nut crops in California. *Fungal systematics and evolution*, 4(1), 59-75.
- Lebeis, S. L. (2014). The potential for give and take in plant–microbiome relationships. *Frontiers in plant science*, 5, 287.
- Lee, J. E., Kim, G. S., Park, S., Kim, Y. H., Kim, M. B., Lee, W. S., ... & Shin, S. C. (2014). Determination of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) polyphenol components using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: Overall contribution to antioxidant activity. *Food chemistry*, 146, 1-5.
- Leibowitz, A., Volkov, A., Voloshin, K., Shemesh, C., Barshack, I., & Grossman, E. (2016). Melatonin prevents kidney injury in a high salt diet-induced hypertension model by decreasing oxidative stress. *Journal of pineal research*, 60(1), 48-54.
- Lemanceau, P., Blouin, M., Muller, D., & Moënne-Loccoz, Y. (2017). Let the core microbiota be functional. *Trends in Plant Science*, 22(7), 583-595.
- Letsiou, S., Pyrovolou, K., Konteles, S. J., Trapali, M., Krisilia, S., Kokla, V., ... & Batrinou, A. (2024). Exploring the Antifungal Activity of Various Natural Extracts in a Sustainable *Saccharomyces cerevisiae* Model Using Cell Viability, Spot Assay, and Turbidometric Microbial Assays. *Applied Sciences*, 14(5), 1899.
- Li, A. N., Li, S., Zhang, Y. J., Xu, X. R., Chen, Y. M., & Li, H. B. (2014). Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047.
- Li, P., Luo, H., Meng, J., Sun, W., Wang, X., Lu, S., ... & Zhou, L. (2014). Effects of oligosaccharides from endophytic *Fusarium oxysporum* Dzf17 on activities of defense-related enzymes in *Dioscorea zingiberensis* suspension cell and seedling cultures. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(4), 156-161.
- Li, Q. Z., Xiong, C., Wong, W. C., & Zhou, L. W. (2024). Medium composition optimization and characterization of polysaccharides extracted from *Ganoderma*

- boninense along with antioxidant activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129528.
- Li, S., Deng, G. F., Li, A. N., Xu, X. R., Wu, S., & Li, H. B. (2012). Effect of ultrasound-assisted extraction on antioxidant activity of rose (*Rosa hybrida*) petals. *Int. J. Modern Biol. Med*, 2, 91-100.
- Li, X. J., Tang, H. Y., Duan, J. L., Gao, J. M., & Xue, Q. H. (2013). Bioactive alkaloids produced by *Pseudomonas brassicacearum* subsp. *Neaurantiaca*, an endophytic bacterium from *Salvia miltiorrhiza*. *Natural product research*, 27(4-5), 496-499.
- Li, Y., Kong, D., Fu, Y., Sussman, M. R., & Wu, H. (2020). The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80-89.
- Li, Z., Liu, J., Ma, W., & Li, X. (2023). Characteristics, Roles and Applications of Proteinaceous Elicitors from Pathogens in Plant Immunity. *Life*, 13(2), 268.
- Liu, C. L., Zhou, G. Y., Xiao, B., & Liu, J. A. (2020). Diversity of endophytic fungi in heartwood and sapwood of *Dalbergia odorifera*. *For. Sci*, 56, 109-120.
- Lombardino, J. G. (2000). A brief history of Pfizer Central Research. *Bull. Hist. Chem*, 25(6).
- Lopez-Fernandez, J. S., Mazzoni, V., Bianchedi, P., Pertot, I., & Campisano, A. (2016). Insect-mediated transfer of microbial communities across plants. In *FA COST Action FA1405: using three-way interactions between plants, microbes and arthropods to enhance crop protection and production, Malaga, Spain, February 10-12, 2016* (p. 18).
- Lorian, V. (Ed.). (2005). *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Loyola-Vargas, V. M., & Vázquez-Flota, F. (2006). An introduction to plant cell culture: back to the future. *Plant cell culture protocols*, 3-8.
- Lu, Z., Guo, W., & Liu, C. (2018). Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3), 427-433.
- Ludwig-Müller, J. (2015). Plants and endophytes: equal partners in secondary metabolite production?. *Biotechnology letters*, 37, 1325-1334.
- Lutzoni, F., Kauff, F., Cox, C. J., McLaughlin, D., Celio, G., Dentinger, B., ... & Vilgalys, R. (2004). Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits. *American journal of botany*, 91(10), 1446-1480.
- Madhankumar, R., Sivasankar, P., Kalaimurugan, D., & Murugesan, S. (2020). Antibacterial and larvicidal activity of silver nanoparticles synthesized by the leaf extract of *Andrographis serpyllifolia* wight. *Journal of Cluster Science*, 31, 719-726.
- Maeda, H. A. (2019). Evolutionary diversification of primary metabolism and its contribution to plant chemical diversity. *Frontiers in Plant Science*, 10, 881.
- Mahmoud Al Zoubi, O. (2019). Evaluation of Anti-microbial Activity of Ex vitro and Callus Extracts from *Commiphora gileadensis*. *Pakistan Journal of Biological Sciences: PJBS*, 22(2), 73-82.
- Makowski, W., Tokarz, K. M., Tokarz, B., Banasiuk, R., Witek, K., & Królicka, A. (2020). Elicitation-based method for increasing the production of antioxidant and bactericidal phenolic compounds in *Dionaea muscipula* J. Ellis tissue. *Molecules*, 25(8), 1794.
- Malinowska, J., Babicz, K., Olas, B., Stochmal, A., & Oleszek, W. (2012). *Aronia melanocarpa* extract suppresses the biotoxicity of homocysteine and its metabolite on the hemostatic activity of fibrinogen and plasma. *Nutrition*, 28(7-8), 793-798.

- Mandalari, G., Bennett, R. N., Bisignano, G., Saija, A., Dugo, G., Lo Curto, R. B., ... & Waldron, K. W. (2006). Characterization of flavonoids and pectins from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a major byproduct of essential oil extraction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 197-203.
- Mañero, F. J. G., Algar, E., Martin Gomez, M. S., Saco Sierra, M. D., & Solano, B. R. (2012). Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures. *Pharmaceutical biology*, 50(10), 1201-1209.
- Manassis, G., Kalogianni, A. I., Lazou, T., Moschovas, M., Bossis, I., & Gelasakis, A. I. (2020). Plant-derived natural antioxidants in meat and meat products. *Antioxidants*, 9(12), 1215.
- Mani, T., Joshi, J. B., Priyadharshini, R., Sharmila, J. S., & Uthandi, S. (2023). Flagellin, a plant-defense-activating protein identified from *Xanthomonas axonopodis* pv. *Dieffenbachiae* invokes defense response in tobacco. *BMC microbiology*, 23(1), 284.
- Maniatis, T. (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*.
- Marasco, R., Rolli, E., Ettoumi, B., Vigani, G., Mapelli, F., Borin, S., ... & Daffonchio, D. (2012). A drought resistance-promoting microbiome is selected by root system under desert farming. *PloS one*, 7(10), e48479.
- Marchisio, V. F., & Airaudi, D. (2001). Temporal trends of the airborne fungi and their functional relations with the environment in a suburban site. *Mycologia*, 93(5), 831-840.
- Mark, R., Lyu, X., Lee, J. J., Parra-Saldívar, R., & Chen, W. N. (2019). Sustainable production of natural phenolics for functional food applications. *Journal of Functional Foods*, 57, 233-254.
- Marslin, G., Sheeba, C. J., & Franklin, G. (2017). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. *Frontiers in plant science*, 8, 832.
- Matsuda, M., & Shimomura, I. (2014). Roles of adiponectin and oxidative stress in obesity-associated metabolic and cardiovascular diseases. *Reviews in endocrine and metabolic disorders*, 15, 1-10.
- McFarland, J. (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association*, 49(14), 1176-1178.
- Medina-Bolivar, F., Condori, J., Rimando, A. M., Hubstenberger, J., Shelton, K., O'Keefe, S. F., ... & Dolan, M. C. (2007). Production and secretion of resveratrol in hairy root cultures of peanut. *Phytochemistry*, 68(14), 1992-2003.
- Mendes, R., Kruijt, M., De Bruijn, I., Dekkers, E., Van Der Voort, M., Schneider, J. H., ... & Raaijmakers, J. M. (2011). Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 332(6033), 1097-1100.
- Mercado-Blanco, J., Abrantes, I., Barra Caracciolo, A., Bevivino, A., Ciancio, A., Grenni, P., ... & Proença, D. N. (2018). Belowground microbiota and the health of tree crops. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1006.
- Meshram, V., Saxena, S., & Paul, K. (2016). Xylarinase: a novel clot busting enzyme from an endophytic fungus *Xylaria curta*. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(6), 1502-1511.
- Mikłasińska-Majdanik, M., Kępa, M., Wojtyczka, R. D., Idzik, D., & Wąsik, T. J. (2018). Phenolic compounds diminish antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* clinical

- strains. *International journal of environmental research and public health*, 15(10), 2321.
- Mishra, D., Tripathi, S., Pant, S., & Chaturvedi, P. (2022). Nanomaterials and Plant Tissue Culture: Developmental Path and Contradictory Facts. In *Commercial Scale Tissue Culture for Horticulture and Plantation Crops* (pp. 153-172). Singapore: Springer Nature Singapore.
- Mishra, S., Bhattacharjee, A., & Sharma, S. (2021). An ecological insight into the multifaceted world of plant-endophyte association. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 40(2), 127-146.
- Miyazaki, J., Tan, B. H., Errington, S. G., & Kuo, J. J. (2011). Bacterial endophyte in *Macropidia fuliginosa*: its localisation and eradication from in vitro cultured basal-stem callus. *Australian Journal of Botany*, 59(4), 363-368.
- Mogashoa, M. M., Masoko, P., & Eloff, J. N. (2019). Different *Combretum molle* (Combretaceae) leaf extracts contain several different antifungal and antibacterial compounds. *South African Journal of Botany*, 126, 322-327.
- Moharram, H. A., & Youssef, M. M. (2014). Methods for determining the antioxidant activity: A review. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 11(1), 31-42.
- Moharrami, F., Hosseini, B., Sharafi, A., & Farjaminezhad, M. (2017). Enhanced production of hyoscyamine and scopolamine from genetically transformed root culture of *Hyoscyamus reticulatus* L. elicited by iron oxide nanoparticles. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53, 104-111.
- Moissl-Eichinger, C., Pausan, M., Taffner, J., Berg, G., Bang, C., & Schmitz, R. A. (2018). Archaea are interactive components of complex microbiomes. *Trends in microbiology*, 26(1), 70-85.
- Moore BD, Andrew RL, Kulheim C, Foley WJ (2014) Explaining intraspecific diversity in plant secondary metabolites in an ecological context. *New Phytol* 201:733–750
- Munif, A., & Wiyono, S. (2012). Isolasi bakteri endofit asal padi gogo dan potensinya sebagai agens biokontrol dan pemacu pertumbuhan. *Jurnal Fitopatologi Indonesia*, 8(3), 57-57.
- Munir, S., Li, Y., He, P., He, P., Ahmed, A., Wu, Y., & He, Y. (2020). Unraveling the metabolite signature of citrus showing defense response towards *Candidatus Liberibacter asiaticus* after application of endophyte *Bacillus subtilis* L1-21. *Microbiological research*, 234, 126425.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murthy, H. N., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2014). Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 118, 1-16.
- Mustafa, L. B., AL-BAYATI, A. I., Fathi, D. N., & ÖZKOÇ, I. (2024)a. Biological control of pathogenic fungi using *Pseudomonas brassicacearum* isolated from *Aronia × prunifolia* (Marshall) Rehder roots. *International Journal of Secondary Metabolite*.
- Mustafa, L. B., Al-Bayati, A. I. N., & Özkoç, I. (2024)b. Salt-tolerant endophytic *Pseudomonas putida* isolated from *Aronia prunifolia* root with plant growth-promoting potential. *World News of Natural Sciences*, 53, 212-222.
- Müller, D. B., Vogel, C., Bai, Y., & Vorholt, J. A. (2016). The plant microbiota: systems-level insights and perspectives. *Annual review of genetics*, 50, 211-234.

- Naczek, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.
- Naczek, M., & Shahidi, F. (2006). Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 41(5), 1523-1542.
- Nagata, T., & Takebe, I. (1971). Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, 99(1), 12-20.
- Naik, P. M., & Al-Khayri, J. M. (2016). Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. *Abiotic and biotic stress in plants—recent advances and future perspectives. Rijeka: InTech*, 247-277.
- Nair, D. N., & Padmavathy, S. (2014). Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Najmi, A., Javed, S. A., Al Bratty, M., & Alhazmi, H. A. (2022). Modern approaches in the discovery and development of plant-based natural products and their analogues as potential therapeutic agents. *Molecules*, 27(2), 349.
- Namdeo, A. G. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacogn Rev*, 1(1), 69-79.
- Nascimento, N. C. D., & Fett-Neto, A. G. (2010). Plant secondary metabolism and challenges in modifying its operation: an overview. *Plant secondary metabolism engineering*, 1-13.
- Nasr, A., Saleem Khan, T., & Zhu, G. P. (2019). Phenolic compounds and antioxidants from *Eucalyptus camaldulensis* as affected by some extraction conditions, a preparative optimization for GC-MS analysis. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 49(5), 464-476.
- Nasri, H., Baradaran, A., Shirzad, H., & Rafieian-Kopaei, M. (2014). New concepts in nutraceuticals as alternative for pharmaceuticals. *International journal of preventive medicine*, 5(12), 1487.
- Ncube, B., Finnie, J. F., & Van Staden, J. (2012). Quality from the field: The impact of environmental factors as quality determinants in medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 82, 11-20.
- Negreanu-Pirjol, B. S., Oprea, O. C., Negreanu-Pirjol, T., Roncea, F. N., Prelipcean, A. M., Craciunescu, O., ... & Popoviciu, D. R. (2023). Health Benefits of Antioxidant Bioactive Compounds in the Fruits and Leaves of *Lonicera caerulea* L. and *Aronia melanocarpa* (Michx.) Elliot. *Antioxidants*, 12(4), 951.
- Netala, V. R., Kotakadi, V. S., Gaddam, S. A., Ghosh, S. B., & Tarte, V. (2016). Elicitation of gymnemic acid production in cell suspension cultures of *Gymnema sylvestre* R. Br. through endophytic fungi. *3 Biotech*, 6, 1-11.
- Nguema-Ona, E., Vicré-Gibouin, M., Gotté, M., Plancot, B., Lerouge, P., Bardor, M., & Driouich, A. (2014). Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: aspects of biosynthesis and function. *Frontiers in plant science*, 5, 499.
- Nicoletti, R., & Fiorentino, A. (2015). Plant bioactive metabolites and drugs produced by endophytic fungi of Spermatophyta. *Agriculture*, 5(4), 918-970.
- Nikolić, I. L., Savić-Gajić, I. M., Tačić, A. D., & Savić, I. M. (2017). Classification and biological activity of phytoestrogens: A review. *Advanced technologies*, 6(2), 96-106.
- Nikolova, E., Valcheva-Kuzmanova, S., Markova, T., Krachanova, M., & Denev, P. (2012). Chemoprotective, antioxidant and immunomodulatory in vitro effects of *Aronia*

- melanocarpa* total extract on laboratory-cultivated normal and malignant cells. *Journal of BioScience and Biotechnology*, SE, 35, 43.
- Nisa, H., Kamili, A. N., Nawchoo, I. A., Shafi, S., Shameem, N., & Bandh, S. A. (2015). Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. *Microbial pathogenesis*, 82, 50-59.
- Nobecourt, P. (1990). Sur la perennite et l'augmentation de volume des cultures de tissus vegetaux [premieres approches, histoire]. *Colloques de l'INRA (France)*. no. 51.
- Nogueira, B. A., Santos, A. S., & Chisté, R. C. (2024). *Garcinia macrophylla*: a Promising Underutilized Source of Bioactive Compounds in the Amazonia—A Review. *Plant Foods for Human Nutrition*, 1-8.
- Nowak, J., Asiedu, S. K., Lazarovits, G., Pillay, V., Stewart, A., Smith, C., & Liu, Z. (1995). Enhancement of in vitro growth and transplant stress tolerance of potato and vegetable plantlets co-cultured with a plant growth promoting pseudomonad bacterium. In *Ecophysiology and photosynthetic in vitro cultures, Aix en Provence (France)*, 1-3 Dec 1993. CEA.
- Nowogórska, A., & Patykowski, J. (2015). Selected reactive oxygen species and antioxidant enzymes in common bean after *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola and *Botrytis cinerea* infection. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1-10.
- Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Hong, S., Jang, M. O., Jin, Y. W., Lee, E. K., & Loake, G. J. (2016). Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB reports*, 49(3), 149.
- Odelade, K. A., & Babalola, O. O. (2019). Bacteria, fungi and archaea domains in rhizospheric soil and their effects in enhancing agricultural productivity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(20), 3873.
- Ogita, S. (2015). Plant cell, tissue and organ culture: the most flexible foundations for plant metabolic engineering applications. *Natural Product Communications*, 10(5), 1934578X1501000527.
- Oksman-Caldentey, K. M., & Inzé, D. (2004). Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. *Trends in plant science*, 9(9), 433-440.
- Onwubiko, N. C., Nkogho, C. S., Anyanwu, C. P., & Onyeishi, G. C. (2013). Effect of different concentration of sterilant and exposure time on sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) explants. *International journal of current microbiology and applied sciences*, 2(8), 14-20.
- Oteiza, P. I., Erlejman, A. G., Verstraeten, S. V., Keen, C. L., & Fraga, C. G. (2005). Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface?. *Clinical and Developmental Immunology*, 12(1), 19-25.
- Ozyigit, I. I., Dogan, I., Hocaoglu-Ozyigit, A., Yalcin, B., Erdogan, A., Yalcin, I. E., ... & Kaya, Y. (2023). Production of secondary metabolites using tissue culture-based biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 14.
- Önder, A. (2020). Anticancer activity of natural coumarins for biological targets. *Studies in Natural Products Chemistry*, 64, 85-109.
- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y. K. (2015). Secondary metabolites of plants and their role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(3), 293-304.
- Pan, W., Liu, K., Guan, Y., Tan, G. T., Hung, N. V., Cuong, N. M., ... & Zhang, H. (2014). Bioactive compounds from *Vitex leptobotrys*. *Journal of natural products*, 77(3), 663-667.

- Pandey, K. B., & Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2, 270-278.
- Pandey, S. S., Jain, R., Bhardwaj, P., Thakur, A., Kumari, M., Bhushan, S., & Kumar, S. (2022). Plant Probiotics–Endophytes pivotal to plant health. *Microbiological Research*, 127148.
- Pandey, S. S., Singh, S., Babu, C. V., Shanker, K., Srivastava, N. K., & Kalra, A. (2016). Endophytes of opium poppy differentially modulate host plant productivity and genes for the biosynthetic pathway of benzyloisoquinoline alkaloids. *Planta*, 243, 1097-1114.
- Papik, J., Folkmanova, M., Polivkova-Majorova, M., Suman, J., & Uhlik, O. (2020). The invisible life inside plants: Deciphering the riddles of endophytic bacterial diversity. *Biotechnology advances*, 44, 107614.
- Park, S., & Jung, S. (2017). Antioxidant compounds and activities as well as caffeine content of Aronia melanocarpa leaf tea according to pan-roasting conditions. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 46(5), 639-645.
- Park, S., Choi, J., Choi, S. J., & Yoon, J. H. (2017). Paracoccus litorisediminis sp. nov., isolated from a tidal flat. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(11), 4760-4766.
- Parsaeimehr, A., Sargsyan, E., & Javidnia, K. (2010). Influence of plant growth regulators on callus induction, growth, chlorophyll, ephedrine and pseudoephedrine contents in Ephedra procera. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(13), 1308-1317.
- Patchett, A., & Newman, J. A. (2021). Comparison of plant metabolites in root exudates of Lolium perenne infected with different strains of the fungal endophyte Epichloë festucae var. lolii. *Journal of Fungi*, 7(2), 148.
- Patel, P., Patel, V., Modi, A., Kumar, S., & Shukla, Y. M. (2022). Phyto-factories of anti-cancer compounds: a tissue culture perspective. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 11(1), 43.
- Pathak, P., Rai, V. K., Can, H., Singh, S. K., Kumar, D., Bhardwaj, N., ... & Kumar, A. (2022). Plant-endophyte interaction during biotic stress management. *Plants*, 11(17), 2203.
- Patil, J. G., Ahire, M. L., Nitnaware, K. M., Panda, S., Bhatt, V. P., Kishor, P. B. K., & Nikam, T. D. (2013). In vitro propagation and production of cardiogenic glycosides in shoot cultures of Digitalis purpurea L. by elicitation and precursor feeding. *Applied microbiology and biotechnology*, 97, 2379-2393.
- Pavlović, A. V., Papetti, A., Zagorac, D. Č. D., Gašić, U. M., Mišić, D. M., Tešić, Ž. L., & Natić, M. M. (2016). Phenolics composition of leaf extracts of raspberry and blackberry cultivars grown in Serbia. *Industrial crops and products*, 87, 304-314.
- Pawar, K. D., Yadav, A. V., Shouche, Y. S., & Thengane, S. R. (2011). Influence of endophytic fungal elicitation on production of inophyllum in suspension cultures of Calophyllum inophyllum L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106, 345-352.
- Penyalver, R., Roesch, L. F., Piquer-Salcedo, J. E., Forner-Giner, M. A., & Alguacil, M. D. M. (2022). From the bacterial citrus microbiome to the selection of potentially host-beneficial microbes. *New Biotechnology*, 70, 116-128.
- Pichersky, E., & Gang, D. R. (2000). Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. *Trends in plant science*, 5(10), 439-445.
- Pisoschi, A. M., & Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European journal of medicinal chemistry*, 97, 55-74.

- Platzer, M., Kiese, S., Tybussek, T., Herfellner, T., Schneider, F., Schweiggert-Weisz, U., & Eisner, P. (2022). Radical scavenging mechanisms of phenolic compounds: A quantitative structure-property relationship (QSPR) study. *Frontiers in nutrition*, 9, 882458.
- Poborilova, Z., Opatrilova, R., & Babula, P. (2013). Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a BY-2 plant cell suspension culture model. *Environmental and experimental Botany*, 91, 1-11.
- Polkowska-Kowalczyk, L., Wielgat, B., & Maciejewska, U. (2007). Changes in the antioxidant status in leaves of *Solanum* species in response to elicitor from *Phytophthora infestans*. *Journal of plant physiology*, 164(10), 1268-1277.
- Popli, D., Anil, V., Subramanyam, A. B., MN, N., VR, R., Rao, S. N., ... & Govindappa, M. (2018). Endophyte fungi, *Cladosporium* species-mediated synthesis of silver nanoparticles possessing in vitro antioxidant, anti-diabetic and anti-Alzheimer activity. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*, 46(sup1), 676-683.
- Pott, D. M., Osorio, S., & Vallarino, J. G. (2019). From central to specialized metabolism: An overview of some secondary compounds derived from the primary metabolism for their role in conferring nutritional and organoleptic characteristics to fruit. *Frontiers in plant science*, 835.
- Poulev, A., O'Neal, J. M., Logendra, S., Pouleva, R. B., Timeva, V., Garvey, A. S., ... & Raskin, I. (2003). Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46(12), 2542-2547.
- Pouteau, C., Dole, P., Cathala, B., Avérous, L., & Boquillon, N. (2003). Antioxidant properties of lignin in polypropylene. *Polymer Degradation and Stability*, 81(1), 9-18.
- Prabhu, G. R. D., Williams, E. R., Wilm, M., & Urban, P. L. (2023). Mass spectrometry using electrospray ionization. *Nature Reviews Methods Primers*, 3(1), 23.
- Prabhu, S., Molath, A., Choksi, H., Kumar, S., & Mehra, R. (2021). Classifications of polyphenols and their potential application in human health and diseases. *Int. J. Physiol. Nutr. Phys. Educ*, 6(1), 293-301.
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Ptak, A., Morańska, E., Warchoń, M., Gurgul, A., Skrzypek, E., Dziurka, M., ... & Simlat, M. (2022). Endophytic bacteria from in vitro culture of *Leucojum aestivum* L. a new source of galanthamine and elicitor of alkaloid biosynthesis. *Scientific Reports*, 12(1), 13700.
- Putalun, W., Luealon, W., De-Eknamkul, W., Tanaka, H., & Shoyama, Y. (2007). Improvement of artemisinin production by chitosan in hairy root cultures of *Artemisia annua* L. *Biotechnology letters*, 29, 1143-1146.
- Puthur, J. T. (2016). Antioxidants and cellular antioxidation mechanism in plants. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 2(1), 9-13.
- Qin, S., Li, J., Chen, H. H., Zhao, G. Z., Zhu, W. Y., Jiang, C. L., ... & Li, W. J. (2009). Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China. *Applied and environmental microbiology*, 75(19), 6176-6186.
- Quambusch, M., & Winkelmann, T. (2018). Bacterial endophytes in plant tissue culture: Mode of action, detection, and control. *Plant cell culture protocols*, 69-88.

- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
- Quiza, L., St-Arnaud, M., & Yergeau, E. (2015). Harnessing phytomicrobiome signaling for rhizosphere microbiome engineering. *Frontiers in plant science*, 6, 507.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and applied biochemistry*, 37(1), 91-102.
- Rady, M. R., Aboul-Enein, A. M., & Ibrahim, M. M. (2018). Active compounds and biological activity of in vitro cultures of some Echinacea purpurea varieties. *Bulletin of the National Research Centre*, 42(1), 1-12.
- Ramawat, K. G., Dass, S., & Mathur, M. (2009). The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. *Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine*, 7-32.
- Ramirez-Estrada, K., Vidal-Limon, H., Hidalgo, D., Moyano, E., Golenioswki, M., Cusidó, R. M., & Palazon, J. (2016). Elicitation, an effective strategy for the biotechnological production of bioactive high-added value compounds in plant cell factories. *Molecules*, 21(2), 182.
- Ramírez-Suero, M., Bénard-Gellon, M., Chong, J., Laloue, H., Stempien, E., Abou-Mansour, E., ... & Bertsch, C. (2014). Extracellular compounds produced by fungi associated with Botryosphaeria dieback induce differential defence gene expression patterns and necrosis in Vitis vinifera cv. Chardonnay cells. *Protoplasma*, 251, 1417-1426.
- Rana, K. L., Kour, D., Sheikh, I., Yadav, N., Yadav, A. N., Kumar, V., ... & Saxena, A. K. (2019). Biodiversity of endophytic fungi from diverse niches and their biotechnological applications. *Advances in endophytic fungal research: present status and future challenges*, 105-144.
- Rao, S. R., & Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
- Raomai, S., Kumaria, S., Kehie, M., & Tandon, P. (2015). Plantlet regeneration of Paris polyphylla Sm. via thin cell layer culture and enhancement of steroidal saponins in mini-rhizome cultures using elicitors. *Plant growth regulation*, 75, 341-353.
- Rasouli, H., Farzaei, M. H., & Khodarahmi, R. (2017). Polyphenols and their benefits: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(sup2), 1700-1741.
- Reddy, P. L. N., Babu, B. S., Radhaiah, A., & Sreeramulu, A. (2014). Screening, identification and isolation of cellulolytic fungi from soils of Chittoor district, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(7), 761-771.
- Reinhold-Hurek, B., Maes, T., Gemmer, S., Van Montagu, M., & Hurek, T. (2006). An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte Azoarcus sp. strain BH72. *Molecular plant-microbe interactions*, 19(2), 181-188.
- Robbins, W. J. (1922). Cultivation of excised root tips and stem tips under sterile conditions. *Botanical gazette*, 73(5), 376-390.
- Robledo-O’Ryan, N., Matos, M. J., Vazquez-Rodriguez, S., Santana, L., Uriarte, E., Moncada-Basualto, M., ... & Olea-Azar, C. (2017). Synthesis, antioxidant and antichagasic properties of a selected series of hydroxy-3-arylcoumarins. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 25(2), 621-632.
- Rodríguez, C. E., Antonielli, L., Mitter, B., Trognitz, F., & Sessitsch, A. (2020). Heritability and functional importance of the Setaria viridis bacterial seed microbiome. *Phytobiomes Journal*, 4(1), 40-52.

- Rodriguez, R. J., White Jr, J. F., Arnold, A. E., & Redman, A. R. A. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New phytologist*, 182(2), 314-330.
- Rodriguez, R., & Redman, R. (2008). More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of experimental botany*, 59(5), 1109-1114.
- Rolff, J., Bonhoeffer, S., Klot, C., Leistner, R., Regoes, R., & Hochberg, M. E. (2024). Forecasting antimicrobial resistance evolution. *Trends in Microbiology*.
- Royal Horticultural Society (Great Britain). (1995). *Extracts from the Proceedings of the Royal Horticultural Society*. (Vol. 119). Royal Horticultural Society.
- Rustamova, N., Bozorov, K., Efferth, T., & Yili, A. (2020). Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. *Phytochemistry reviews*, 19, 425-448.
- Rysz, J., Franczyk, B., Rysz-Górczyńska, M., & Gluba-Brzózka, A. (2021). Ageing, age-related cardiovascular risk and the beneficial role of natural components intake. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(1), 183.
- Saavedra, M. J., Borges, A., Dias, C., Aires, A., Bennett, R. N., Rosa, E. S., & Simões, M. (2010). Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Medicinal Chemistry*, 6(3), 174-183.
- Sahu, P. K., Jayalakshmi, K., Tilgam, J., Gupta, A., Nagaraju, Y., Kumar, A., ... & Rajawat, M. V. S. (2022). ROS generated from biotic stress: Effects on plants and alleviation by endophytic microbes. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1042936.
- Saini, R., Dudeja, S. S., Giri, R., & Kumar, V. (2015). Isolation, characterization, and evaluation of bacterial root and nodule endophytes from chickpea cultivated in Northern India. *Journal of basic microbiology*, 55(1), 74-81.
- Salim, V., Sasidharan, A., & Kumar, R. (2024). Endophytic bacteria-mediated resistance to plant diseases: Bioengineering approaches. In *Biotechnology of Emerging Microbes* (pp. 31-44). Academic Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (No. Ed. 2). Cold spring harbor laboratory press.
- Sandu, M., Bîrsă, L. M., & Bahrin, L. G. (2017). Flavonoids—small molecules, high hopes. *Acta Chemica Iasi*, 25(1), 6-23.
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., & Wilkens, M. (2017). Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PloS one*, 12(2), e0172273.
- Santamaria, A. R., Innocenti, M., Mulinacci, N., Melani, F., Valletta, A., Sciandra, I., & Pasqua, G. (2012). Enhancement of viniferin production in *Vitis vinifera* L. cv. Alphonse Lavallée cell suspensions by low-energy ultrasound alone and in combination with methyl jasmonate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(44), 11135-11142.
- Sanver, D., Murray, B. S., Sadeghpour, A., Rappolt, M., & Nelson, A. L. (2016). Experimental modeling of flavonoid–biomembrane interactions. *Langmuir*, 32(49), 13234-13243.
- Sanzari, I., Leone, A., & Ambrosone, A. (2019). Nanotechnology in plant science: to make a long story short. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 120.

- Savangikar, V. A. (2004, February). Role of low cost options in tissue culture. In *Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a Technical Meeting organized by the Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture* (pp. 11-15).
- Shahidi, F., & Yeo, J. (2018). Bioactivities of phenolics by focusing on suppression of chronic diseases: A review. *International journal of molecular sciences*, 19(6), 1573.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18, 757-781.
- Shahzad, A., Yadav, V., & Ahmad, Z. (2016). Plant Tissue Culture: Profile of Pioneers. *Biotechnological strategies for the conservation of medicinal and ornamental climbers*, 141-162.
- Shaikh, S., Shriram, V., Khare, T., & Kumar, V. (2020). Biotic elicitors enhance diosgenin production in *Helicteres isora* L. suspension cultures via up-regulation of CAS and HMGR genes. *Physiology and molecular biology of plants*, 26, 593-604.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2007). Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(14), 5484-5490.
- Sharafi, E., Khayam Nekoei, S. M., Fotokian, M. H., Davoodi, D., Mirzaei, H. H., & Hasanloo, T. (2013). Improvement of Hypericin and Hyperforin Production Using Zinc and Iron Nano-oxides as Elicitors in Cell Suspension Culture of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). *Journal of Medicinal plants and By-product*, 2(2), 177-184.
- Sharif, T., Stambouli, M., Burrus, B., Emhemmed, F., Dandache, I., Auger, C., ... & Fuhrmann, G. (2013). The polyphenolic-rich *Aronia melanocarpa* juice kills teratocarcinoma cancer stem-like cells, but not their differentiated counterparts. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1244-1252.
- Sharma, A., Mathur, A. K., Ganpathy, J., Joshi, B., & Patel, P. (2019). Effect of abiotic elicitation and pathway precursors feeding over terpenoid indole alkaloids production in multiple shoot and callus cultures of *Catharanthus roseus*. *Biologia*, 74, 543-553.
- Sharma, A., Pandey, H., Nampoothiri Devadas, V. A. S., Kartha, B. D., & Jha, R. (2023). Production of, Factors Affecting, Gene Regulations, and Challenges in Tissue Cultured Plant through Soilless Culture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(14), 5804-5811.
- Sharma, M., Ahuja, A., Gupta, R., & Mallubhotla, S. (2015). Enhanced bacoside production in shoot cultures of *Bacopa monnieri* under the influence of abiotic elicitors. *Natural product research*, 29(8), 745-749.
- Shen, F. T., Yen, J. H., Liao, C. S., Chen, W. C., & Chao, Y. T. (2019). Screening of rice endophytic biofertilizers with fungicide tolerance and plant growth-promoting characteristics. *Sustainability*, 11(4), 1133.
- Shi, L., Zhao, W., Yang, Z., Subbiah, V., & Suleria, H. A. R. (2022). Extraction and characterization of phenolic compounds and their potential antioxidant activities. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(54), 81112-81129.
- Shirin, F., Hossain, M., Kabir, M. F., Roy, M., & Sarker, S. R. (2007). Callus induction and plant regeneration from internodal and leaf explants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars. *World J. Agric. Sci*, 3(1), 01-06.
- Shoja, A. A., Çirak, C., Ganjeali, A., & Cheniany, M. (2022). Stimulation of phenolic compounds accumulation and antioxidant activity in in vitro culture of *Salvia tebesana*

- Bunge in response to nano-TiO₂ and methyl jasmonate elicitors. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 149(1-2), 423-440.
- Sieber, T. N. (2007). Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. *Fungal biology reviews*, 21(2-3), 75-89.
- Sindhi, V., Gupta, V., Sharma, K., Bhatnagar, S., Kumari, R., & Dhaka, N. (2013). Potential applications of antioxidants—A review. *Journal of pharmacy research*, 7(9), 828-835.
- Singh, C. R. (2011). Antimicrobial effect of callus and natural plant extracts of *Premna serratifolia* L. *Int J Pharm Biomed Res*, 2(1), 17-20.
- Singh, M., Kumar, A., Singh, R., & Pandey, K. D. (2017). Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *3 Biotech*, 7, 1-14.
- Singh, N., Sharma, V., & Kalita, R. D. (2024). Interaction between plants and endophytes: evolutionary significance and its role in plants development. In *Plant Endophytes and Secondary Metabolites* (pp. 295-312). Academic Press.
- Singh, R., Kumari, N., & Nath, G. (2016). Antimicrobial efficacy of callus and in vitro leaf extracts of *Sapindus Mukorossi* Gaertn. Against pathogenic microbes. *Mathews Journal of Pharmaceutical Science*, 2(1), 1-4.
- Singh, V. P., Jha, D., Rehman, B. U., Dhayal, V. S., Dhar, M. S., & Sharma, N. (2024). A mini-review on the burden of antimicrobial resistance and its regulation across one health sectors in India. *Journal of Agriculture and Food Research*, 100973.
- Singh, Y., Kumar, U., Panigrahi, S., Balyan, P., Mehla, S., Sihag, P., ... & Dhankher, O. P. (2023). Nanoparticles as novel elicitors in plant tissue culture applications: Current status and future outlook. *Plant Physiology and Biochemistry*, 108004.
- Singla, R. K., Dubey, A. K., Garg, A., Sharma, R. K., Fiorino, M., Ameen, S. M., ... & Al-Hiary, M. (2019). Natural polyphenols: Chemical classification, definition of classes, subcategories, and structures. *Journal of AOAC International*, 102(5), 1397-1400.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299, pp. 152-178). Academic press.
- Sivanandhan, G., Arun, M., Mayavan, S., Rajesh, M., Mariashibu, T. S., Manickavasagam, M., ... & Ganapathi, A. (2012). Chitosan enhances withanolides production in adventitious root cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Industrial crops and products*, 37(1), 124-129.
- Sivanesan, I., Saini, R. K., & Kim, D. H. (2016). Bioactive compounds in hyperhydric and normal micropropagated shoots of *Aronia melanocarpa* (michx.) Elliott. *Industrial Crops and Products*, 83, 31-38.
- Skoog, F. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured in vitro. In *Symp. Soc. Exp. Biol.* (Vol. 11, pp. 118-130).
- Skoog, F., & Miller, C. O. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In "The Biological Action of Growth Substances"(HK Porter, ed.).
- Skupień, K., Kostrzewa-Nowak, D., Oszmiański, J., & Tarasiuk, J. (2008). In vitro antileukaemic activity of extracts from chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx] Elliott) and mulberry (*Morus alba* L.) leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 22(5), 689-694.

- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1997). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture*, 28(1), 49-55.
- Soberanes, Y., Navarro, R. E., Inoue, M., Velázquez-Contreras, E. F., Beltran Torres, M., Lugo, G., ... & Salazar-Medina, A. J. (2019). Syntheses, characterization, and antioxidant evaluation of Cu²⁺, Mn²⁺, and Fe³⁺ complexes with a 14 membered EDTA-Derived macrocycle. *Molecules*, 24(19), 3556.
- Sökmen, A., & Gürel, E. (2001). Sekonder metabolit üretimi. *Bitki Biyoteknolojisi*, 1, 211-267.
- Soromou, L. W., Zhang, Y., Cui, Y., Wei, M., Chen, N., Yang, X., ... & Wang, D. (2013). Subinhibitory concentrations of pinocembrin exert anti-Staphylococcus aureus activity by reducing α -toxin expression. *Journal of Applied Microbiology*, 115(1), 41-49.
- Sosan, A., Svistunenko, D., Straltsova, D., Tsiurkina, K., Smolich, I., Lawson, T., ... & Demidchik, V. (2016). Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify the physiology of Arabidopsis thaliana plants. *The Plant Journal*, 85(2), 245-257.
- Specian, V., Sarragiotto, M. H., Pamphile, J. A., & Clemente, E. (2012). Chemical characterization of bioactive compounds from the endophytic fungus Diaporthe helianthi isolated from Luehea divaricata. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43, 1174-1182.
- Spencer, J. P., Abd El Mohsen, M. M., Minihaane, A. M., & Mathers, J. C. (2008). Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *British Journal of Nutrition*, 99(1), 12-22.
- Srivastava, P., Kasoju, N., Bora, U., & Chaturvedi, R. (2010). Accumulation of betulinic, oleanolic, and ursolic acids in in vitro cell cultures of Lantana camara L. and their significant cytotoxic effects on HeLa cell lines. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 15, 1038-1046.
- Srivastava, S., Rana, M., Sarma, B. K., & Meshram, S. (2024). Endophyte-mediated modulation of secondary metabolism in crops for biotic stress management. In *Plant Endophytes and Secondary Metabolites* (pp. 205-233). Academic Press.
- Stefanović, O. D. (2018). Synergistic activity of antibiotics and bioactive plant extracts: a study against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Bacterial Pathogenesis and Antibacterial Control*, 23, 23-48.
- Stepanova, A. Y., Malunova, M. V., Gladkov, E. A., Evsyukov, S. V., Tereshonok, D. V., & Solov'eva, A. I. (2022). Collection of hairy roots as a basis for fundamental and applied research. *Molecules*, 27(22), 8040.
- Stevenson, D. D., & Szczeklik, A. (2006). Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118(4), 773-786.
- Steward, F. C., Mapes, M. O., & Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 705-708.
- Stierle, A., Strobel, G., & Stierle, D. (1993). Taxol and taxane production by Taxomyces andreanae, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 260(5105), 214-216.
- Stranska, M., Dzuman, Z., Prusova, N., Behner, A., Kolouchova, I., Lovecka, P., ... & Hajslova, J. (2022). Fungal Endophytes of Vitis vinifera—Plant Growth Promoters or Potentially Toxinogenic Agents?. *Toxins*, 14(2), 66.
- Stranska, M., Lovecka, P., Vrchotova, B., Uttl, L., Bechynska, K., Behner, A., & Hajslova, J. (2021). Bacterial Endophytes from Vitis vinifera L.—Metabolomics Characterization of Plant-Endophyte Crosstalk. *Chemistry & Biodiversity*, 18(12), e2100516.

- Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 491-502.
- Suárez-Moreno, Z. R., Devescovi, G., Myers, M., Hallack, L., Mendonça-Previato, L., Caballero-Mellado, J., & Venturi, V. (2010). Commonalities and differences in regulation of N-acyl homoserine lactone quorum sensing in the beneficial plant-associated Burkholderia species cluster. *Applied and environmental microbiology*, 76(13), 4302-4317.
- Sun, W., & Shahrajabian, M. H. (2023). Therapeutic potential of phenolic compounds in medicinal plants—Natural health products for human health. *Molecules*, 28(4), 1845.
- Suryanarayanan, T. S., Venkatesan, G., & Murali, T. (2003). Endophytic fungal communities in leaves of tropical forest trees: diversity and distribution patterns. *Current Science*, 489-493.
- Szafranek, J., Czerwicka, M., Kumirska, J., Paszkiewicz, M., & Łojkowska, E. (2005). Repeating unit structure of Enterobacter sakazakii ZORB A 741 O-polysaccharide. *Pol J Chem*, 79, 287-295.
- Taghizadeh, M., Nasibi, F., Kalantari, K. M., & Ghanati, F. (2019). Evaluation of secondary metabolites and antioxidant activity in Dracocephalum polychaetum Bornm. cell suspension culture under magnetite nanoparticles and static magnetic field elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 136, 489-498.
- Tagliani, C., Perez, C., Curutchet, A., Arcia, P., & Cozzano, S. (2019). Blueberry pomace, valorization of an industry by-product source of fibre with antioxidant capacity. *Food Science and Technology*, 39, 644-651.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Secondary metabolites and plant defense. *Plant physiology*, 4, 315-344.
- Tapia-Guerrero, Y. S., Del Prado-Audelo, M. L., Borbolla-Jiménez, F. V., Giraldo Gomez, D. M., García-Aguirre, I., Colín-Castro, C. A., ... & Magaña, J. J. (2020). Effect of UV and gamma irradiation sterilization processes in the properties of different polymeric nanoparticles for biomedical applications. *Materials*, 13(5), 1090.
- Taylor, P. W., Hamilton-Miller, J. M., & Stapleton, P. D. (2005). Antimicrobial properties of green tea catechins. *Food science and technology bulletin*, 2, 71.
- Tekiner-Gulbas, B., D Westwell, A., & Suzen, S. (2013). Oxidative stress in carcinogenesis: new synthetic compounds with dual effects upon free radicals and cancer. *Current medicinal chemistry*, 20(36), 4451-4459.
- Thi, N., & Hwang, E. S. (2018). Anti-cancer and anti-inflammatory activities of aronia (Aronia melanocarpa) leaves. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(12), 586.
- Thuy, N. M., Ben, T. C., Minh, V. Q., & Van Tai, N. (2021). Effect of extraction techniques on anthocyanin from butterfly pea flowers (Clitoria ternatea L.) cultivated in Vietnam. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 9(6), 173-180.
- Tian, Y., Liimatainen, J., Alanne, A. L., Lindstedt, A., Liu, P., Sinkkonen, J., ... & Yang, B. (2017). Phenolic compounds extracted by acidic aqueous ethanol from berries and leaves of different berry plants. *Food Chemistry*, 220, 266-281.
- Tiwari, S., Rajak, S., Mondal, D. P., & Biswas, D. (2018). Sodium hypochlorite is more effective than 70% ethanol against biofilms of clinical isolates of Staphylococcus aureus. *American journal of infection control*, 46(6), e37-e42.
- Tognetti, V. M., Toledo, E. D. S., Alves, T. M., Rizzardi, K. F., Parisotto, T. M., & Pascon, F. M. (2024). Effect of two irrigating solutions on antimicrobial activity and clinical

- and radiographic success after endodontic treatment in primary teeth: a randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*, 28(1), 81.
- Tonk, D., Mujib, A., Maqsood, M., Khusrau, M., Alsughayyir, A., & Dewir, Y. H. (2023). Fungal Elicitation Enhances Vincristine and Vinblastine Yield in the Embryogenic Tissues of *Catharanthus roseus*. *Plants*, 12(19), 3373.
- Tran, H. M., Nguyen, D. T. T., Mai, N. T., Do, H. T., Nguyen, T. K. T., Nguyen, T. K. N., ... & Pham, H. T. (2022). Notes on Culturable Endophytic Microorganisms Isolated from 14 Medicinal Plants in Vietnam: A Diversity Analysis to Predict the Host-Microbe Correlations. *Current Microbiology*, 79(5), 140.
- Trouillas, F. P., Urbez-Torres, J. R., & Gubler, W. D. (2010). Diversity of diatrypaceous fungi associated with grapevine canker diseases in California. *Mycologia*, 102(2), 319-336.
- Tsuchiya, H. (2015). Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. *Molecules*, 20(10), 18923-18966.
- Turner, T. R., James, E. K., & Poole, P. S. (2013). The plant microbiome. *Genome biology*, 14(6), 1-10.
- Udomsuk, L., Jarukamjorn, K., Tanaka, H., & Putalun, W. (2011). Improved isoflavonoid production in *Pueraria candollei* hairy root cultures using elicitation. *Biotechnology letters*, 33, 369-374.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. J. A. E. M. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-1568.
- Uzombah, T. A. (2022). The implications of replacing synthetic antioxidants with natural ones in the food systems.
- Vaher, M., Ehala, S., & Kaljurand, M. (2005). On-column capillary electrophoretic monitoring of rapid reaction kinetics for determination of the antioxidative potential of various bioactive phenols. *Electrophoresis*, 26(4-5), 990-1000.
- Valsalan, R., Mathew, D., & Devaki, G. (2022). Draft genome of *Gongronella butleri* reveals the genes contributing to its biodegradation potential. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 20(1), 1-11.
- Van Der Wolf, J., & De Boer, S. H. (2015). Phytopathogenic bacteria. In *Principles of plant-microbe interactions: Microbes for Sustainable Agriculture* (pp. 65-77). Cham: Springer International Publishing.
- Van Wyk, B. E., & Wink, M. (2018). *Medicinal plants of the world*. CABI.
- Varga, T., Hixson, K. K., Ahkami, A. H., Sher, A. W., Barnes, M. E., Chu, R. K., ... & Doty, S. L. (2020). Endophyte-promoted phosphorus solubilization in *Populus*. *Frontiers in plant science*, 1585.
- Vasconsuelo, A., & Boland, R. (2007). Molecular aspects of the early stages of elicitation of secondary metabolites in plants. *Plant science*, 172(5), 861-875.
- Vattem, D. A., Randhir, R., & Shetty, K. (2005). Cranberry phenolics-mediated antioxidant enzyme response in oxidatively stressed porcine muscle. *Process biochemistry*, 40(6), 2225-2238.
- Velderrain-Rodríguez, G. R., Palafox-Carlos, H., Wall-Medrano, A., Ayala-Zavala, J. F., Chen, C. O., Robles-Sánchez, M., ... & González-Aguilar, G. A. (2014). Phenolic compounds: their journey after intake. *Food & function*, 5(2), 189-197.

- Verma, S. K., Kharwar, R. N., & White, J. F. (2019). The role of seed-vectored endophytes in seedling development and establishment. *Symbiosis*, 78, 107-113.
- Vermerris, W., & Nicholson, R. (2007). *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- Verpoorte, R., Contin, A., & Memelink, J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry reviews*, 1, 13-25.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R. T. J. M., Ten Hoopen, H. J. G., & Memelink, J. (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology letters*, 21, 467-479.
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Hoge, J. H. C., & Ten Hoopen, H. J. G. (1994). Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. *Pure and Applied Chemistry*, 66(10-11), 2307-2310.
- Veselinovic, M., Barudzic, N., Vuletic, M., Zivkovic, V., Tomic-Lucic, A., Djuric, D., & Jakovljevic, V. (2014). Oxidative stress in rheumatoid arthritis patients: relationship to diseases activity. *Molecular and cellular biochemistry*, 391, 225-232.
- Vigliacca, M., González, P., Machín, A., Vicente, E., & Silvera-Pérez, E. (2022). First report of root and crown rot caused by *Dactylonectria novozelandica* on strawberry in Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 26(2).
- Vogl, A. E. (1898). Mehl und die anderen Mehlprodukte der Cerealien und Leguminosen. *Nahrungsm. Unters. Hyg. Warenk*, 12, 25-29.
- Wang, H., Kou, X., Pei, Z., Xiao, J. Q., Shan, X., & Xing, B. (2011). Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. *Nanotoxicology*, 5(1), 30-42.
- Wang, J. W., Zheng, L. P., Zhang, B., & Zou, T. (2009). Stimulation of artemisinin synthesis by combined cerebroside and nitric oxide elicitation in *Artemisia annua* hairy roots. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 285-292.
- Wang, J., Li, J. Z., Lu, A. X., Zhang, K. F., & Li, B. J. (2014). Anticancer effect of salidroside on A549 lung cancer cells through inhibition of oxidative stress and phospho-p38 expression. *Oncology Letters*, 7(4), 1159-1164.
- Wang, S. S., Liu, J. M., Sun, J., Huang, Y. T., Jin, N., Li, M. M., ... & Wang, F. Z. (2022). Analysis of endophytic bacterial diversity from different *Dendrobium* stems and discovery of an endophyte produced dendrobine-type sesquiterpenoid alkaloids. *Frontiers in Microbiology*, 12, 775665.
- Wang, Y. H., Avula, B., Nanayakkara, N. D., Zhao, J., & Khan, I. A. (2013). Cassia cinnamon as a source of coumarin in cinnamon-flavored food and food supplements in the United States. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(18), 4470-4476.
- Wang, Z., Nilsson, R. H., James, T. Y., Dai, Y., & Townsend, J. P. (2016). Future perspectives and challenges of fungal systematics in the age of big data. *Biology of microfungi*, 25-46.
- Wani, Z. A., Ashraf, N., Mohiuddin, T., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2015). Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 2955-2965.
- Waterhouse, A. L. (2002). Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*, 6(1), I1-1.
- Wearn, J. A., Sutton, B. C., Morley, N. J., & Gange, A. C. (2012). Species and organ specificity of fungal endophytes in herbaceous grassland plants. *Journal of Ecology*, 100(5), 1085-1092.

- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Welch, C. R., Wu, Q., & Simon, J. E. (2008). Recent advances in anthocyanin analysis and characterization. *Current analytical chemistry*, 4(2), 75-101.
- White, P. R. (1939). Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany*, 59-64.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Wiktorowska, E., Długosz, M., & Janiszowska, W. (2010). Significant enhancement of oleanolic acid accumulation by biotic elicitors in cell suspension cultures of *Calendula officinalis* L. *Enzyme and Microbial Technology*, 46(1), 14-20.
- Wilson, S. A., & Roberts, S. C. (2012). Recent advances towards development and commercialization of plant cell culture processes for the synthesis of biomolecules. *Plant biotechnology journal*, 10(3), 249-268.
- Winter, J. M., & Tang, Y. (2012). Synthetic biological approaches to natural product biosynthesis. *Current opinion in biotechnology*, 23(5), 736-743.
- Wisdom, N. N., Bassey, E. E., Jelani, F. B., Ishaku, G. A., Uwem, U. M., & Joseph, S. C. (2016). Biochemical Studies of *Ocimum sanctum* and *Olax subscorpioidea* leaf extracts. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 12, 1-9.
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., ... & Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic acids research*, 46(D1), D1074-D1082.
- Wloch, M., Valzer, E., Pouységu, L., & Quideau, S. (2023). ortho-Quinols in (Bio) Synthesis of Natural Products. *European Journal of Organic Chemistry*, 26(13), e202201224.
- Wright, J. S., Johnson, E. R., & DiLabio, G. A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, 123(6), 1173-1183.
- Wrolstad, R. E. (2004). Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties. *Journal of Food Science*, 69(5), C419-C425.
- Wu, B., Hussain, M., Zhang, W., Stadler, M., Liu, X., & Xiang, M. (2019). Current insights into fungal species diversity and perspective on naming the environmental DNA sequences of fungi. *Mycology*, 10(3), 127-140.
- Wu, S., Chen, W., Lu, S., Zhang, H., & Yin, L. (2022). Metabolic engineering of shikimic acid biosynthesis pathway for the production of shikimic acid and its branched products in microorganisms: advances and prospects. *Molecules*, 27(15), 4779.
- Wu, T., Zang, X., He, M., Pan, S., & Xu, X. (2013). Structure–activity relationship of flavonoids on their anti-*Escherichia coli* activity and inhibition of DNA gyrase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(34), 8185-8190.
- Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., & Li, H. B. (2010). Biological activities of polyphenols from grapes. *International journal of molecular sciences*, 11(2), 622-646.
- Xu, J. X., Li, Z. Y., Lv, X., Yan, H., Zhou, G. Y., Cao, L. X., ... & He, Y. H. (2020). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* strain 1-L-29, an endophytic bacteria from *Camellia oleifera* with antimicrobial activity and efficient plant-root colonization. *PLoS One*, 15(4), e0232096.

- Xu, L., Zhou, L., Zhao, J., Li, J., Li, X., & Wang, J. (2008). Fungal endophytes from *Dioscorea zingiberensis* rhizomes and their antibacterial activity. *Letters in Applied Microbiology*, 46(1), 68-72.
- Xu, M. J., Dong, J. F., & Zhu, M. Y. (2005). Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiology*, 139(2), 991-998.
- Yadav, A. N., Verma, P., Kour, D., Rana, K. L., Kumar, V., Singh, B., ... & Dhaliwal, H. S. (2017). Plant microbiomes and its beneficial multifunctional plant growth promoting attributes. *Int J Environ Sci Nat Resour*, 3(1), 1-8.
- Yadav, B., Mora-Montes, H. M., Wagener, J., Cunningham, I., West, L., Haynes, K., ... & Gow, N. A. (2020). Differences in fungal immune recognition by monocytes and macrophages: N-mannan can be a shield or activator of immune recognition. *The Cell Surface*, 6, 100042.
- Yadav, N. P., & Dixit, V. K. (2008). Recent approaches in herbal drug standardization. *Int J Integr Biol*, 2(3), 195-203.
- Yamaner, Ö., Erdağ, B., & Gökbulut, C. (2013). Stimulation of the production of hypericins in in vitro seedlings of *Hypericum adenotrichum* by some biotic elicitors. *Turkish Journal of Botany*, 37(1), 153-159.
- Yan, Y., Zhang, S., Zhang, J., Ma, P., Duan, J., & Liang, Z. (2014). Effect and mechanism of endophytic bacteria on growth and secondary metabolite synthesis in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Acta physiologiae plantarum*, 36, 1095-1105.
- Yang, C. S., Lee, M. J., Chen, L., & Yang, G. Y. (1997). Polyphenols as inhibitors of carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 105(suppl 4), 971-976.
- Yang, L., Wen, K. S., Ruan, X., Zhao, Y. X., Wei, F., & Wang, Q. (2018). Response of plant secondary metabolites to environmental factors. *Molecules*, 23(4), 762.
- Yang, S. K., Xiao, L., Li, J., Liu, F., & Sun, L. (2014). Oxidative stress, a common molecular pathway for kidney disease: role of the redox enzyme p66Shc. *Renal failure*, 36(2), 313-320.
- Yasmin, S., Nasiruddin, K. M., Begum, R., & Talukder, S. K. (2003). Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA. *Asian journal of plant sciences*.
- Yu, M., Chen, J. C., Qu, J. Z., Liu, F., Zhou, M., Ma, Y. M., ... & Yang, M. Z. (2020). Exposure to endophytic fungi quantitatively and compositionally alters anthocyanins in grape cells. *Plant Physiology and Biochemistry*, 149, 144-152.
- Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products, *Molecules* 21.
- Yue, W., Ming, Q. L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C. J., Han, T., & Qin, L. P. (2016). Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2), 215-232.
- Yukimune, Y., Tabata, H., Higashi, Y., & Hara, Y. (1996). Methyl jasmonate-induced overproduction of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nature biotechnology*, 14(9), 1129-1132.
- Zachow, C., Müller, H., Monk, J., & Berg, G. (2017). Complete genome sequence of *Pseudomonas brassicacearum* strain L13-6-12, a biological control agent from the rhizosphere of potato. *Standards in genomic sciences*, 12, 1-7.

- Zaheer, K., & Humayoun Akhtar, M. (2017). An updated review of dietary isoflavones: Nutrition, processing, bioavailability and impacts on human health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(6), 1280-1293.
- Zaman, G., Farooq, U., Bajwa, M. N., Jan, H., Shah, M., Ahmad, R., ... & Abbasi, B. H. (2022). Effects of yeast extract on the production of phenylpropanoid metabolites in callus culture of purple basil (*Ocimum Basilicum* L. var *purpurascens*) and their in-vitro evaluation for antioxidant potential. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 150(3), 543-553.
- Zambrano, C., Kerekes, E. B., Kotogán, A., Papp, T., Vágvolgyi, C., Krisch, J., & Takó, M. (2019). Antimicrobial activity of grape, apple and pitahaya residue extracts after carbohydrase treatment against food-related bacteria. *Lwt*, 100, 416-425.
- Zampetaki, A., Dudek, K., & Mayr, M. (2013). Oxidative stress in atherosclerosis: the role of microRNAs in arterial remodeling. *Free Radical Biology and Medicine*, 64, 69-77.
- Zdunić, G., Aradski, A. A., Godevac, D., Živković, J., Laušević, S. D., Milošević, D. K., & Šavikin, K. (2020). In vitro hypoglycemic, antioxidant and antineurodegenerative activity of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) leaves. *Industrial Crops and Products*, 148, 112328.
- Zhang, B., Zheng, L. P., Yi Li, W., & Wen Wang, J. (2013). Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by Ag-SiO₂ core-shell nanoparticles. *Current Nanoscience*, 9(3), 363-370.
- Zhang, C., & Fevereço, P. S. (2007). The effect of heat shock on paclitaxel production in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures: role of abscisic acid pretreatment. *Biotechnology and bioengineering*, 96(3), 506-514.
- Zhang, X.-F.; Liu, Z.-G.; Shen, W. (2016). Gurunathan, S. Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17, 1534.
- Zhang, Z., Sun, Y., & Li, Y. (2020). Plant rejuvenation: from phenotypes to mechanisms. *Plant Cell Reports*, 39, 1249-1262.
- Zhao, J. L., Zhou, L. G., & Wu, J. Y. (2010). Effects of biotic and abiotic elicitors on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 137-144.
- Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 23(4), 283-333.
- Zheng, L. P., Tian, H., Yuan, Y. F., & Wang, J. W. (2016). The influence of endophytic *Penicillium oxalicum* B4 on growth and artemisinin biosynthesis of in vitro propagated plantlets of *Artemisia annua* L. *Plant Growth Regulation*, 80, 93-102.
- Zheng, R., Li, S., Zhang, X., & Zhao, C. (2021). Biological activities of some new secondary metabolites isolated from endophytic fungi: A review study. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(2), 959.
- Zhong, J. J., Bai, Y., & Wang, S. J. (1996). Effects of plant growth regulators on cell growth and ginsenoside saponin production by suspension cultures of *Panax quinquefolium*. *Journal of Biotechnology*, 45(3), 227-234.
- Zhou, J. Y., Sun, K., Chen, F., Yuan, J., Li, X., & Dai, C. C. (2018). Endophytic *Pseudomonas* induces metabolic flux changes that enhance medicinal sesquiterpenoid accumulation in *Atractylodes lancea*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 130, 473-481.

- Zhu, H., Han, J., Xiao, J. Q., & Jin, Y. (2008). Uptake, translocation, and accumulation of manufactured iron oxide nanoparticles by pumpkin plants. *Journal of Environmental monitoring*, 10(6), 713-717.
- Zhu, S., Vivanco, J. M., & Manter, D. K. (2016). Nitrogen fertilizer rate affects root exudation, the rhizosphere microbiome and nitrogen-use-efficiency of maize. *Applied Soil Ecology*, 107, 324-333.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The plant cell*, 5(10), 1411.
- Zimmerman, N. B., & Vitousek, P. M. (2012). Fungal endophyte communities reflect environmental structuring across a Hawaiian landscape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(32), 13022-13027.
- Zou, L., Wang, J., Gao, Y., Ren, X., Rottenberg, M. E., Lu, J., & Holmgren, A. (2018). Synergistic antibacterial activity of silver with antibiotics correlating with the upregulation of the ROS production. *Scientific Reports*, 8(1), 11131.



ÖZ GEÇMİŞ

Luay Burhan Mustafa, Alvatan Lisesi'ni bitirdikten sonra Tikrit Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Biyoloji bölümünden 2007 tarihinde mezun oldu. 2008 yılında Tikrit Üniversitesi Eğitim Fakültesi, Biyoloji bölümünden Yüksek Lisans derecesi aldı. 2011 yılında aynı bölüme araştırma görevlisi olarak atandı, halen bu görevine devam etmektedir. 2019 yılında OMÜ Fen Fakültesi Biyoloji Ana Bilim Dalı Doktora programına girdi. B1 derecede İngilizce bilmektedir (2024).

İletişim Bilgileri

ORCID ID : <https://orcid.org/0000-0001-8197-4357>

Yayınlar:

1. Mustafa, L. B., & Thalij, K. M. (2016). The inhibitory Effect of *Lactobacillus bulgaricus* against some Pathogenic and Toxin Producing Fungi which isolated from soil. *Tikrit Journal of Pure Science*, 21(5), 60-66. <https://doi.org/10.25130/tjps.v21i5.1029>
2. Mustafa, L. B. (2016). Inhibition Effect of *Bifidobacterium bifidus* Against Some Locally Isolates of Pathogenic Fungi Species. *Tikrit Journal for Agricultural Sciences*, 16(4). <https://doi.org/10.25130/tjps.v21i5.1029>
3. Salman, Y. J., & Mustafa, L. B. (2016). Role of Cytomegalovirus and *Toxoplasma gondii* in women abortion and congenital anomalies in Kirkuk city using ELISA. *The Egyptian Journal of Medical Microbiology (EJMM)*, 25(4). <https://doi.org/10.12816/0037024>
4. Özkoç, İ., Bilgi, M., Gürkanlı, C. T., & Mustafa, L. B. (2023). Bazı Orkide Türlerinde Ekim Öncesi Tohum Uygulamaları ve Bu Uygulamaların Tohum Çimlenme ve Gelişmesine Olan Etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 13(4), 2476-2484. <https://doi.org/10.21597/jist.1357244>
5. Al-Bayati, A. I. N., Özkoç, H. S., Burhan Mustafa, L., & Özkoç, I. (2024). The Effect of Heavy Metals on Bacterial Community Structure and Functional Profile in Surface Soils of Baiji Oil Refinery and Baghdad City, Iraq. *Geomicrobiology Journal*, 41(1), 48-60. <https://doi.org/10.1080/01490451.2023.2270482>

6. Mustafa, L. B., Al-Bayati, A. I. N., & Özkoç, I. (2024). Salt-tolerant endophytic *Pseudomonas putida* isolated from *Aronia prunifolia* root with plant growth-promoting potential. *World News of Natural Sciences*, 53, 212-222.
7. Mustafa, L. B., AL-BAYATI, A. I., Fathi, D. N., & ÖZKOÇ, I. (2024). Biological control of pathogenic fungi using *Pseudomonas brassicacearum* isolated from *Aronia × prunifolia* (Marshall) Rehder roots. *International Journal of Secondary Metabolite*.
8. Mustafa, L. B., Albayati, A., Fathi, D. N., & Özkoç, İ. (2024). Biogenic synthesis of silver and iron oxide nanoparticles using *Aronia prunifolia* leaf extract and its inhibitory action against pathogenic fungi. *The Black Sea Journal of Sciences*, 14(2), 589-604. <https://doi.org/10.31466/kfbd.1399112>

Kazanılan Ödüller, Teşvikler ve Burslar

Türkiye Bursları: Doktora Programı