

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI NANOPARTİKÜLLERİN *İN VİTRO* ORTAMDA
YETİŞTİRİLEN *Hypericum perforatum* L. ve *Hypericum retusum*
Aucher'in HİPERİSİN BİLEŞİKLERİNİN MİKTARI ÜZERİNE
ETKİLERİ

Ömer Faruk AKDEMİR

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

2019

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Ömer Faruk AKDEMİR tarafından yapılan “BAZI NANOPARTİKÜLLERİN *IN VITRO* ORTAMDA YETİŞTİRİLEN *Hypericum perforatum* L. ve *Hypericum. retusum* Aucher’in HİPERİSİN BİLEŞİKLERİNİN MİKTARI ÜZERİNE ETKİLERİ” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından BİYOLOJİ Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

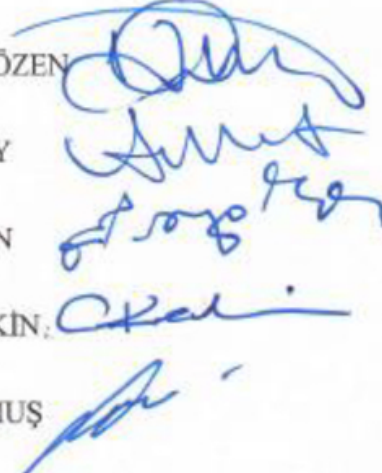
Başkan : Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN

Üye : Prof. Dr. Ahmet ONAY

Üye : Prof. Dr. Haluk AYDIN

Üye : Doç. Dr. Cumali KESKİN

Üye : Doç. Dr. Veysi OKUMUŞ



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 27/06/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.....

Prof. Dr. Sevtap SÜMER EKER

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmalarımın her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren danışman hocam Prof. Dr. Ahmet ONAY'a içten teşekkürlerimi sunarım. Fikirleriyle ufkumu açan çalışmalarımı zenginleştirmemde yönlendirici katkılarından dolayı ikinci danışmanım olan Dr. Hülya AKDEMİR'e teşekkür ederim. Tez çalışmalarımın her aşamasında çok büyük destekleri olan ve deneysel çalışmalarım sırasında çok değerli yardımlarını benden esirgemeyen Dr. Hilal Surmuş ASAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Kimyasal analizlerimi yapmamda yardımcı olan Dr. Mustafa Abdullah YILMAZ'a da teşekkürü bir borç bilirim. Zor zamanlar yaşadığım doktora çalışmalarım boyunca sürekli yanımda olan ve desteklerini hiçbir zaman benden esirgemeyen eşim Emine AKDEMİR'e ve değerli aileme teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmam,

Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından
FEN.16.006'nolu proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	X
ŞEKİL LİSTESİ.....	XIII
KISALTMA VE SİMGELER.....	XVI
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	9
2.1. <i>Hypericum</i> Cinsinin Kökeni ve Sistematığı.....	9
2.2. <i>Hypericum</i> Türlerinin Dağılışı.....	10
2.3. <i>Hypericum</i> Cinsinin Morfolojisi.....	10
2.4. <i>Hypericum</i> Cinsinin Üreme Biyolojisi.....	12
2.4.1. Geleneksel Çoğaltım.....	12
2.4.2. Doku Kültürü Çalışmaları.....	13
2.4.2.1. <i>H. perforatum</i> L.'nin <i>İn vitro</i> Çoğaltımı.....	13
2.4.2.2. <i>H. retusum</i> Aucher'in <i>İn vitro</i> Çoğaltımı.....	16
2.4.2.3. Diğer <i>Hypericum</i> Türlerinin <i>İn vitro</i> Çoğaltımı.....	17
2.5. <i>Hypericum</i> Türlerinin Tıbbi Özellikleri.....	18
2.5.1. <i>Hypericum</i> Türlerinin Geleneksel Kullanımları.....	18
2.5.2. <i>Hypericum</i> Türlerinin Antibakteriyel ve Antiviral Özellikleri.....	19
2.5.3. <i>Hypericum</i> Türlerinin Antikanser Özellikleri	20
2.5.4. <i>Hypericum</i> Türlerinin Antidepresan Özellikleri.....	21
2.5.5. <i>Hypericum</i> Türlerinin Yara İyileştirici Özellikleri.....	24

2.6.	Ekonomik Önemi.....	25
2.7.	Nanopartiküller.....	26
2.7.1.	Nanopartiküllerin Bitkiler Üzerinde Oluşturduğu Özellikleri.....	26
2.7.1.1.	Çinko (Zn) Nanopartiküller.....	27
2.7.1.2.	Alüminyum (Al) Nanopartiküller.....	29
2.7.1.3.	Demir (Fe) Nanopartiküller.....	30
2.7.1.4.	Titanyum (Ti) Nanopartiküller.....	32
2.7.1.5.	Bakır (Cu) Nanopartiküller.....	33
2.7.1.6.	Gümüş (Ag) Nanopartiküller.....	34
2.7.2.	Nanopartiküllerin Bitkiye Giriş Mekanizmaları.....	34
2.7.3.	Nanopartiküllerin Sekonder Metabolit Sentezinde Kullanımı.....	36
3.	MATERYAL VE METOT	41
3.1.	Materyal	41
3.1.1.	Bitki Örneklerinin Teşhisi ve Temini	41
3.1.2.	Kimyasal Analiz ve Doku Kültürü Çalışmaları İçin Bitki Örneklerinin Hazırlanması	42
3.1.3.	Deneylerde Kullanılan Nanopartiküllerin Temini ve Özellikleri.....	42
3.2.	Metot	42
3.2.1.	Bitki Doku Kültürü Ortamı	42
3.2.1.1.	Besi Ortamlarının Hazırlanması ve İn vitro Kültür Başlatmak İçin Yüzey Sterilizasyonu.....	43
3.2.1.2.	Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması.....	43
3.2.2.	Sterilizasyon.....	44
3.2.2.1.	Cam Malzemelerin Sterilizasyonu.....	44
3.2.2.2.	Kültür Kaplarının Sterilizasyonu.....	44
3.2.2.3.	Pens ve Bisturilerin Sterilizasyonu.....	44
3.2.2.4.	Transfer Odasının Hazırlanması ve Sterilizasyonu	44

3.2.3.	Bitki Büyüme Odasının Şartları	44
3.2.4.	Doku Kültürü Aşamaları	45
3.2.4.1.	Tohum Yüzey Sterilizasyonu	45
3.2.4.2.	Tohum Ekimi	45
3.2.4.3.	Sürgünlerin Çoğaltımı	45
3.2.4.4.	Nanopartikül Uygulamaları	46
3.2.5.	Metabolit Analizi	47
3.2.5.1.	Bitki Örneklerin Hazırlanması	47
3.2.5.2.	Ekstraksiyon İşlemleri	47
3.2.5.3.	Kimyasal Analizler	48
3.2.6.	Moleküler Analizler	51
3.2.6.1.	Total RNA İzolasyonu	51
3.2.6.2.	cDNA Sentezi.....	51
3.2.6.3.	Kantitatif PCR (qPCR) Analizi.....	52
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA.....	53
4.1.	Doğal Ortamda Yetişen <i>H. perforatum</i> L. ve <i>H. retusum</i> Aucher'in Farklı Dokularının Hiperisin ve Türevi Bileşiklerinin İçerikleri.....	53
4.2.	Tohum Çimlenmesi.....	57
4.3.	Nanopartiküllerin <i>In vitro</i> Kültürü Ortamına Verilmesi.....	57
4.3.1.	Alüminyum Oksit (Al_2O_3) Nanopartikülleri.....	58
4.3.1.1.	Al_2O_3 Nanopartiküllerinin <i>H. perforatum</i> 'un Sürgün (Genç filiz) Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	58
4.3.1.2.	Al_2O_3 Nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	60
4.3.1.3.	Al_2O_3Na Nopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un Sürgün Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	64
4.3.1.4.	Al_2O_3 Nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerinin Miktarına Etkisi.....	66

4.3.2.	Çinko Oksit (ZnO) Nanopartikülleri.....	72
4.3.2.1.	ZnO Nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un Sürgün (Genç filiz) Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	72
4.3.2.2.	ZnO Nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	74
4.3.2.3.	ZnO Nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un Sürgün Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	79
4.3.2.4.	ZnO Nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	81
4.3.3.	Demir(III) Oksit (Fe ₂ O ₃) Nanopartikülleri.....	87
4.3.3.1.	Fe ₂ O ₃ Nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un Sürgün (genç filiz) Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	87
4.3.3.2.	Fe ₂ O ₃ Nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	90
4.3.3.3.	Fe ₂ O ₃ Nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un Sürgün Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	94
4.3.3.4.	Fe ₂ O ₃ Nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşin Miktarına Etkisi.....	96
4.3.4.	Titanyum Dioksit (TiO ₂) nanopartikülleri.....	103
4.3.4.1.	TiO ₂ Nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un Sürgün (genç filiz) Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	103
4.3.4.2.	TiO ₂ Nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	106
4.3.4.3.	TiO ₂ Nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un Sürgün Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	110
4.3.4.4.	TiO ₂ Nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi.....	112
4.4.	Nanopartiküllerin Morfolojik Gelişime <i>İn vitro</i> Etkileri.....	118
4.5.	Nanopartiküllü Ortamda Yetiştirilmiş Bitkilerin Moleküler Analizleri.....	121
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER	129
6.	KAYNAKLAR	131
	ÖZGEÇMİŞ	149

ÖZET

BAZI NANOPARTİKÜLLERİN *İN VİTRO* ORTAMDA YETİŞTİRİLEN *Hypericum perforatum* L. ve *Hypericum. retusum* Aucher'in HİPERİSİN BİLEŞİKLERİNİN MİKTARI ÜZERİNE ETKİLERİ

DOKTORA TEZİ

Ömer Faruk AKDEMİR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2019

Bu çalışmada, *in vitro* koşullarda yetiştirilen *Hypericum perforatum* L. ve *Hypericum retusum* Aucher sürgünlerinde, 4 farklı nanopartikül uygulamasının, hiperisin ve türevi bileşikleri üzerindeki etkisi ile *HpPKS1* ve *HpPKS2* genlerinin ekspresyonları üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Bu amaçla öncelikle, *H. perforatum* ve *H. retusum*'un tohumları bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen, Murashige ve Skoog (MS) besi ortamında çimlendirilmiştir. Çimlenme ortamından elde edilen sürgünler 0.5 mgL^{-1} BA içeren MS besi ortamında belirli periyotlarda alt kültüre alınıp çoğaltılmış ve nanopartikül denemelerinde kullanılmıştır. Tez önerisi kapsamında gerçekleştirilen ilk denemelerde, farklı konsantrasyonlarda (25 , 75 ve 200 mgL^{-1}) demir (III) oksit (Fe_2O_3), titanyum dioksit (TiO_2), çinko oksit (ZnO) ve alüminyum oksit (Al_2O_3) nanopartikülleri *in vitro* ortamda yetişen sürgünlere uygulanmıştır. 200 mgL^{-1} ZnO veya 75 mgL^{-1} Al_2O_3 , Fe_2O_3 ve TiO_2 içeren besi ortamında büyütülen *H. perforatum* sürgünlerindeki hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarında artış gözlenmiştir. *H. retusum* sürgünlerinde ise artan hiperisin ve türevleri, 200 mgL^{-1} ZnO veya 25 mgL^{-1} Al_2O_3 , Fe_2O_3 ve TiO_2 içeren besi ortamında gözlenmiştir. İlk denemelerin ardından, *H. perforatum* sürgünleri ise 200 , 250 ve 300 mgL^{-1} ZnO , Fe_2O_3 ve Al_2O_3 ya da 15 , 25 ve 75 mgL^{-1} TiO_2 içeren besi ortamında kültüre alınmıştır. *H. retusum* sürgünleri, 10 , 15 ve 25 mgL^{-1} oranında Al_2O_3 , ZnO , Fe_2O_3 ve TiO_2 nanopartikülleri içeren besi ortamında büyütülmüştür. *H. perforatum*'un yapraklarındaki hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarı, kontrol grubuna göre 250 mgL^{-1} Al_2O_3 veya Fe_2O_3 , 200 mgL^{-1} ZnO veya 75 mgL^{-1} TiO_2 nanopartiküllerini içeren ortamda artış göstermiştir. *H. perforatum* gövdelerindeki hiperisin ve türevi bileşiklerin oranı ise, 300 mgL^{-1} Fe_2O_3 veya ZnO nanopartiküllerini içeren ortamda artış göstermiştir. *H. retusum* yapraklarında, Al_2O_3 ve ZnO nanopartiküllerinin ilgili bileşiklerin konsantrasyonu üzerinde olumlu bir etkisi olmazken, 15 mgL^{-1} Fe_2O_3 veya 10 mgL^{-1} TiO_2 içeren besi ortamında ise hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarında artış gözlenmiştir. *H. retusum* gövdelerinde ise hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarı ise 25 mgL^{-1} Al_2O_3 veya Fe_2O_3 ya da 10 mgL^{-1} ZnO ve TiO_2 varlığında artış göstermiştir.

H. perforatum'un qPCR analizi ile yaprak dokusunda Al_2O_3 ve TiO_2 nanopartikül uygulamalarının, *HpPKS1* gen anlatımı üzerinde saptanabilir bir etkisi olmadığını, Fe_2O_3 nanopartikül uygulamasında ise, nanopartikül konsantrasyonunun artımı ile paralel artış gösterdiği belirlenmiştir. Gövde dokusunda ise, farklı nanopartikül uygulamaları *HpPKS2* gen anlatımı üzerine etki göstermiş ancak kontrol grubuna göre farklı uygulama gruplarında gen anlatımının daha düşük olduğu belirlenmiştir. Alüminyum nanopartiküllerinin *HpPKS2* geninin yaprak dokusunda anlatımını nanopartikül konsantrasyonuna ters orantılı bir şekilde etkilediği gözlenmiştir. Gövde dokusunda ise *HpPKS2* gen anlatım miktarı saptanabilir sınırlar içinde bulunmadığı belirlenmiştir. *H. retusum* Aucher'de ise farklı nanopartikül uygulamaları sonucu *HpPKS2* gen ekspresyon analizi, Fe_2O_3 200 mgL^{-1} deney grubu hariç tüm örneklerde saptanabilmiştir. Bu deney grupları arasında 300 mgL^{-1} ZnO uygulaması *HpPKS2* gen anlatımını, gövdede arttırmıştır. *HpPKS1* için ise yaprak kontrol örneğinde gen anlatımı ölçülebilir sınırlarda değildir.

H. perforatum ve *H. retusum* türlerine uygulanan Al_2O_3 , Fe_2O_3 , ZnO ve TiO_2 nanopartikülleri hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarını artırma konusunda başarılı olmuştur. Denenen nanoartiküller içerisinde en küçük boyuta sahip olan TiO_2 nanopartikülünü diğer üç nanopartiküle göre daha başarılı sonuçlar vermiştir. Elde edilen sonuçları denenen nanopartikülün türü, boyutu ve konsantrasyonu etkilemiştir.

Anahtar sözcükler: *H. perforatum*, *H. retusum*, Hiperisin, Nanopartikül, gen ekspresyonu, *HpPKS1*, *HpPKS2*

ABSTRACT

THE EFFECTS OF SOME NANOPARTICLES ON THE AMOUNT OF HYPERICIN COMPOUNDS OF *Hypericum perforatum* L. and *Hypericum retusum* Aucher GROWN UNDER *IN VITRO* MEDIUM

PhD THESIS

Ömer Faruk AKDEMİR

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2019

In this study, the effect of 4 different nanoparticle applications on hypericin and its derivatives, and on the expression of *HpPKS1* and *HpPKS2* genes were investigated in the shoots of *Hypericum retusum* Aucher and *H. perforatum* L. grown under *in vitro* conditions.

For this purpose, the seeds of *H. retusum* and *H. perforatum* were germinated in Murashige and Skoog (MS) nutrient medium lacking plant growth regulator. The shoots obtained from germination medium were taken into subculture and replicated periodically in MS nutrient medium containing 0.5 mg⁻¹ BA, and were used in nanoparticle experiments. In the first experiments conducted within the scope of the thesis proposal, iron (III) oxide (Fe₂O₃), titanium dioxide (TiO₂), zinc oxide (ZnO) and aluminum oxide (Al₂O₃) nanoparticles in different concentrations (25, 75 and 200 mgL⁻¹) were applied to shoots grown under *in vitro* medium. An increase was observed in the amount of hypericin and derivative compounds in *H. perforatum* shoots grown in nutrient medium containing 200 mgL⁻¹ ZnO or 75 mgL⁻¹ Al₂O₃, Fe₂O₃ and TiO₂. Also, in *H. retusum* shoots; increased hypericin and its derivatives were observed in nutrient medium containing 200 mgL⁻¹ ZnO or 25 mgL⁻¹ Al₂O₃, Fe₂O₃ and TiO₂. After the first experiments, the *H. retusum* shoots were grown in nutrient medium containing Al₂O₃, ZnO, Fe₂O₃ and TiO₂ nanoparticles at 10, 15 and 25 mgL⁻¹ ratio. *H. perforatum* shoots were cultured in nutrient medium containing 200, 250 and 300 mgL⁻¹ ZnO, Fe₂O₃ and Al₂O₃ or 15, 25 and 75 mgL⁻¹ TiO₂. The amount of hypericin and derivative compounds in the leaves of *H. perforatum* increased in medium containing 250 mgL⁻¹ Al₂O₃ or Fe₂O₃, 200 mgL⁻¹ ZnO or 75 mgL⁻¹ TiO₂ nanoparticles, compared to the control group. The rate of hypericin and derivative compounds in *H. perforatum* bodies also increased in medium containing 300 mgL⁻¹ Fe₂O₃ and ZnO nanoparticles. In *H. retusum* leaves, while Al₂O₃ and ZnO nanoparticles did not have a positive effect on the concentration of related compounds, the amount of hypericin and derivative compounds increased in the nutrient medium containing 15 mgL⁻¹ Fe₂O₃ or 10 mgL⁻¹ TiO₂. In addition, in *H. retusum* shoots, the amount of hypericin and derivative compounds increased in the presence of 25 mgL⁻¹ Al₂O₃ or Fe₂O₃ or 10 mgL⁻¹ ZnO and TiO₂.

It has been determined that the application of Al_2O_3 and TiO_2 nanoparticles in leaf tissue by qPCR analysis of *H. perforatum* had no detectable effect on *HpPKS1* gene expression; on the other hand, it indicated parallel increase with increase in nanoparticle concentration for Fe_2O_3 nanoparticle application. In shoot tissue, different nanoparticle applications had an effect on *HpPKS2* gene expression but it was determined that gene expression was lower in different experiment groups compared to control group. It has been observed that aluminum nanoparticles affect expression of *HpPKS2* gene in leaf tissue in inversely proportional to nanoparticle concentration. It was determined that the amount of *HpPKS2* gene expression in the body tissue was not within detectable limits. In *H. retusum* Aucher, *HpPKS2* gene expression analysis was detected in all samples except Fe_2O_3 200 mgL^{-1} experimental group due to different nanoparticle applications. Among these experimental groups, application of 300 mgL^{-1} ZnO increased *HpPKS2* gene expression in the stem. For *HpPKS1* gene expression in the leaf control sample is not within measurable limits.

Al_2O_3 , Fe_2O_3 , ZnO and TiO_2 nanoparticles applied to *H. perforatum* and *H. retusum* species have been successful in increasing the amount of hypericin and derivative compounds. The TiO_2 nanoparticle having the smallest size among the tested nanoparticles has given more successful results than the other three nanoparticles. The obtained results have affected the type, size, and concentration of the nanoparticle tested.

Key words: *H. perforatum*, *H. retusum*, Hyperisin, Nanoparticle, gene expression, *HpPKS1*, *HpPKS2*

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1.	<i>H. perforatum</i> ve <i>H. retusum</i> 'un yetiştirme alanlarının coğrafik özellikleri*	10
Çizelge 2.2.	Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki etkileri	29
Çizelge 2.3.	Alüminyum oksit (Al ₂ O ₃) nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki etkileri*	30
Çizelge 2.4.	Demir (III) oksit (Fe ₂ O ₃) nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki etkileri*	31
Çizelge 2.5.	Titanyum dioksit (TiO ₂) nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki etkileri*	33
Çizelge 3.1.	Deneylerde kullanılan nanopartiküller	42
Çizelge 3.2.	Kullanılan Murashige ve Skoog (MS) besi yerinin içeriği	43
Çizelge 3.3.	MS Besi Ortamında Kullanılan Stok Çözeltilerin Hazırlanışı	46
Çizelge 3.4.	<i>H. perforatum</i> ve <i>H. retusum</i> sürgünlerine yapılan ilk nanopartikül uygulamalarında kullanılan konsantrasyonlar	46
Çizelge 3.5.	<i>H. perforatum</i> ve <i>H. retusum</i> sürgünlerine yapılan ikinci nanopartikül uygulamalarında kullanılan konsantrasyonlar	49
Çizelge 3.6.	15 fitokimyasalın analizi için LC-MS/MS metoduyla ilişkin analitik parametreler	52
Çizelge 3.7.	<i>Hypericum</i> bitkisine ait 18S rRNA, GAPDH ve <i>HpPKS1</i> ile <i>HpPKS2</i> genlerine ait qPCR primer dizileri	54
Çizelge 4.1.	Doğadan toplanmış <i>H. perforatum</i> L. ve <i>H. retusum</i> Aucher'in çiçek, yaprak, gövde ve kök bölümlerinin fenolik bileşikleri*	59
Çizelge 4.2.	Al ₂ O ₃ nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> L. sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*	60
Çizelge 4.3.	Al ₂ O ₃ nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> L.'nin gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*	61
Çizelge 4.4.	Al ₂ O ₃ nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> Aucher sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*	65
Çizelge 4.5.	Al ₂ O ₃ nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> Aucher'in gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi	67

Çizelge 4.6.	ZnO nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> L. sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*	73
Çizelge 4.7.	ZnO nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> L.'nin gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*	76
Çizelge 4.8.	ZnO nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*	80
Çizelge 4.9.	ZnO nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*	82
Çizelge 4.10.	Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*	88
Çizelge 4.11.	Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*	91
Çizelge 4.12.	Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*	95
Çizelge 4.13.	Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi* dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*	98
Çizelge 4.14.	TiO ₂ nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*	104
Çizelge 4.15.	TiO ₂ nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*	107
Çizelge 4.16.	TiO ₂ nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*	111
Çizelge 4.17.	TiO ₂ nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*	113
Çizelge 4.18.	Nanopartiküllerin <i>H. retusum</i> 'un büyümesi üzerindeki morfolojik etkileri	118
Çizelge 4.19.	Nanopartiküllerin <i>H. perforatum</i> 'un büyümesi üzerindeki morfolojik etkileri	119
Çizelge 4.20.	Q-RT-PCR analizlerinin değerlendirilmesinde kullanılan normalizasyon değerleri	121
Çizelge 4.21.	<i>HpPKS1</i> geninin <i>H. perforatum</i> bitkisindeki gen anlatım değerleri	122
Çizelge 4.22.	<i>HpPKS1</i> geninin <i>H. perforatum</i> bitkisindeki ifade edilen gen anlatım değerleri	122
Çizelge 4.23.	<i>HpPKS2</i> geninin <i>H. perforatum</i> bitkisindeki gen anlatım değerleri	123

Çizelge 4.24.	<i>HpPKS2</i> geninin <i>H. perforatum</i> bitkisindeki ifade edilen gen anlatım değerleri	123
Çizelge 4.25.	<i>HpPKS2</i> geninin <i>H. retusum</i> bitkisindeki gen anlatım değerleri	124
Çizelge 4.26.	<i>pPKS2</i> geninin <i>H. retusum</i> bitkisindeki ifade edilen gen anlatım değerleri	125
Çizelge 4.27.	<i>HpPKS1</i> geninin <i>H. retusum</i> bitkisindeki gen anlatım değerleri	125
Çizelge 4.28.	<i>HpPKS1</i> geninin <i>H. retusum</i> bitkisindeki ifade edilen gen anlatım değerleri	126



ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	<i>H. perforatum</i> ve <i>H. retusum</i> 'un ülkemizdeki yayılış alanları	1
Şekil 2.1.	<i>H. retusum</i> Aucher'in çiçeklenme dönemindeki genel görünüşü	11
Şekil 2.2.	<i>H. perforatum</i> L.'nin çiçeklenme dönemindeki genel görünüşü	12
Şekil 2.3.	Depresyon ve diğer yaygın ruhsal bozuklukların oranları	21
Şekil 2.4.	Nanopartiküllerin bitkilere giriş yolları	35
Şekil 3.1.	a) <i>H. retusum</i> Aucher, b) <i>H. perforatum</i> L.	41
Şekil 3.2.	Metabolit analizinde kullanılan 15 fitokimyasal standardın LC-MS/MS kromatogramı	50
Şekil 4.1.	a) <i>H. perforatum</i> L., b) <i>H. retusum</i> Aucher Haziran ayında çiçek açtıktan sonraki görüntüleri	53
Şekil 4.2.	Hormonsuz MS besisi ortamına ekilmiş a) <i>H. perforatum</i> L., b) <i>H. retusum</i> Aucher tohumları	57
Şekil 4.3.	Sürgün poliferasyon ortamındaki (0.5 mgL ⁻¹ BA ilaveli MS besisi ortamı) 4 haftalık a) <i>H. perforatum</i> L. ve b) <i>H. retusum</i> Aucher sürgünleri.	57
Şekil 4.4.	Al ₂ O ₃ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL ⁻¹ konsantrasyonunu içeren besisi ortamında gelişen <i>H. perforatum</i> sürgünleri	58
Şekil 4.5.	Al ₂ O ₃ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL ⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki <i>H. retusum</i> sürgünleri	64
Şekil 4.6.	ZnO nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL ⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki <i>H. perforatum</i> sürgünleri	72
Şekil 4.7.	ZnO nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL ⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki <i>H. retusum</i> sürgünleri	79
Şekil 4.8.	Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL ⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki <i>H. perforatum</i> sürgünleri	87
Şekil 4.9.	Fe ₂ O ₃ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL ⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki <i>H. retusum</i> sürgünleri	94
Şekil 4.10.	TiO ₂ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL ⁻¹ konsantrasyonunu içeren besisi ortamındaki <i>H. perforatum</i> sürgünleri	104

Şekil 4.11. TiO₂ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki *H. retusum* sürgünleri

110



KISALTMA VE SİMGELER

BAP	: 6-Benzil amino pürin
CNT	: Karbon nanotüpler
IAA	: İndolasetik asit
IBA	: İndol bütirik asit
NAA	: Naftalen asetik asit
BA	: 6-benzyladenine
TDZ	: Thidiazuron
2,4-D	: 2,4 diklorofenoksi asetik asit
Kn	: Kinetin
MS	: Murashige ve Skoog
Al ₂ O ₃	: Alüminyum oksit
Fe ₂ O ₃	: Demir oksit
ZnO	: Çinko oksit
TiO ₂	: Titanyum dioksit
Ag	: Gümüş
Cu	: Bakır
MÜN	: Mühendislik üretimi nanomateryaller
WHO	: Dünya sağlık örgütü
MAO-A	: Monoamin oksidazenzimi
ROS	: Reaktif oksijen türleri
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
Np	: Nanopartikül
nm	: Nanomateryal
nm	: Nanometre
µM	: Mikromolar
µmol/L	: Mikromol/Litre
mg	: Miligram

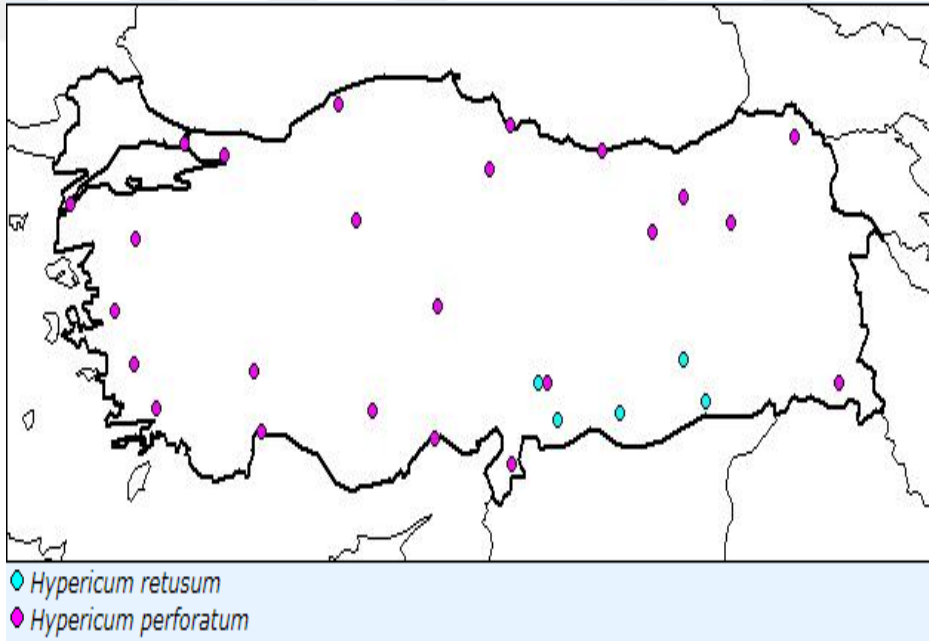
L : Litre
Kg : Kilogram
N : Normal
°C : Santigrat
DPPH : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
BHT : Bütilhidroksitoluen



1. GİRİŞ

Hypericum L., *Clusiaceae* ailesinin bir cinsi olarak *Hypericaceae* (*Guttiferae*) alt familyasına ait olup (Cronquist 1981), bu ailenin en çok bilinen cinsidir. *Hypericum* bilinen 484 türü olan çok yıllık otsu veya çalimsı formları bulunan ve dünyanın bütün kıtalarında (Antarktika dışında) yetişebilen bir cinstir (Crockett ve ark. 2011). Ülkemizde *Hypericum*'un 19 seksiyonu ve yaklaşık 100 tak sonu bulunmaktadır. Bu taksonlardan 45 tanesi endemiktir (Eroğlu ve ark. 2013). *H. perforatum* L., *Hypericum scabrum* L., *Hypericum triguetrifolium*, *Hypericum calycinum*, *Hypericum empetrifolium* Willd. ve *Hypericum tetrapterum* Fries ülkemizde en yaygın bulunan türlerdir (Robson 1967, Baytop 1974).

Bu çalışmada kullanılan *H. perforatum* L., Kuzey Afrika, Orta Asya, Sibirya, Avrupa ve Türkiye'nin bütün bölgelerinde yayılış gösterirken, *H. retusum* Suriye çölü ve Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış göstermektedir (Davis 1967, Davis 1988, Güner ve ark. 2000). *H. perforatum* ve *H. retusum*'un Türkiye'deki dağılışı Şekil 1.1.'de gösterilmektedir (TUBİVES 2018).



Şekil 1.1. *H. perforatum* ve *H. retusum*'un ülkemizdeki yayılış alanları

*Harita, Türkiye bitkileri veri servisinin sitesinden alınmıştır.

H. perforatum, bir veya daha fazla sayıda iki eşeyli çiçeklere sahiptir. Çanak ve taç yapraklar beşer adettir. Genellikle sarı, bazen kırmızı (*Hypericum capitatum* subsp. *capitatum*) veya kırmızı damarlıdır. Meyve kapsül formunda olup bölmelerden açılır

(Aslan 2014). Farklı salgısal yapı tiplerine (Oyuklar, saydam bezler, siyah nodüller ve salgı kanalları) sahip olması *Hypericum* türlerinin ayırt edici özelliklerindendir (Şengüler 2009).

H. perforatum, Anglo-sakson halk tıbbında “İng.: St. John’s Wort, Alm.: Johanniskraut” isimleriyle bilinirken, ülkemizde “bin bir delik otu, sarı kantaron, koyunkıran, kan otu, kılıç otu, mayasıl otu, yara otu ve batof” (Baytop 1991, GAP 2001) adlarıyla çok iyi bilinen tıbbi bir bitkidir. Bitkilerin yaprakları ışığa tutulduğunda yağ guddeleri çok miktarda parlak noktacıklar halinde kolaylıkla görülür. ‘Bin bir delik otu’ ismini bu özelliğinden dolayı almıştır (Robson 1967, Şengüler 2009).

Hypericum türleri tarihin her döneminde insanların tedavi amaçlı kullandığı bitkilerdendir. Antik Yunan ve Roma dönemlerinin hekimlerinden Dioscorides (MS 1.yy) ve Galen (MS 2.yy) *H. perforatum*’u yara iyileştirici, idrar söktürücü ve menstural rahatsızlıkların tedavisinde kullanmayı önermiştir.

16. yüzyıldan itibaren Avrupa’da bitkinin toprak üstü bölümlerinden elde edilen uçucu yağ yara iyileştirici olarak kullanılmaya başlamıştır. Cerrahlar tarafından çok etkili bulunan bu yağ Avrupa’nın ilk resmi farmakopisine “Oleum Hyperici” adıyla dahil edilmiştir (Çırak ve Kurt 2014). İngiliz bitki bilimci Gerard (1633) ve İngiliz hekim Culpeper (1652), *H. perforatum*’un yaralara, yanıklara ve zehirli hayvanların ısırık ile sokmalarına karşı iyileştirici etkisi olduğunu belirtmiştir (İstikoqlou ve ark. 2010). *H. perforatum*’un tıbbi kullanım yelpazesi zaman içerisinde sürekli olarak genişlemiştir. Bu bitkinin çayı böbrekteki kumun, idrar yollarındaki iltihabın giderilmesi (Hill 1808), sarılık, gut, böbrek taşı ve romatizma tedavisinde (Greene 1824), kullanılmıştır.

19.yy. sonlarında hazırlanan Amerikan kodeksinde *H. perforatum*’un histeri, üriner ağrılar, sarılık, ishal, ağrılı âdet, depresyonla ilgili sinirsel rahatsızlıkların tedavisindeki dahili kullanımından ve fiziksel travmaların tedavisindeki harici kullanımından bahsetmektedir (King 1876).

20. yy.’da rahim kanseri, yumurtalık polipleri, lenf tümörleri ve mide kanseri tedavisinde *H. perforatum*’un folklorik kullanımı Duke (1985), araştırmacı tarafından derlenmiştir. Ayrıca *H. perforatum*’un antitümör (Colasanti ve ark. 2000), antiviral (Tang ve ark. 1990, Kırbay 1999), antidepresan (Thiele ve ark. 1993), antibakteriyal

(Reichling ve ark. 2001), anti inflamatuvar (Çubuklu ve ark. 2002), analjezik (Önder 1995) ve hepatoprotektif (Herakman 1996) etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde de *H. perforatum* halk arasında mide-bağırsak rahatsızlıkları, iltihap kurutucu, sarılık, safra kanalı rahatsızlıkları, balgam söktürücü, kan yapıcı, yanık ve yara tedavilerindeki kullanımı gibi sağlıkla ilgili birçok alanda kullanılmaktadır (GAP 2001).

Hypericum türleri sekonder metabolitlerinin tıbbi etkileri nedeniyle birçok araştırmaya konu olmuştur. *Hypericum* türlerinin sekonder metabolitleri; hiperisin ve psödohiperisin ile temsil edilen antrakınonlar/naftodiantronlar, hiperforin ile floroglusinol türevleri, kuersetin, kuersitrin, hiperosit ve rutin ile flavonoidler, biflavonlar, ksantonlar, kumarinler, karotenoidler ve taninler (Porzel ve ark. 2014, Tusevski ve ark. 2014, Brasili ve ark. 2016) olarak sıralanabilir. Naftodiantronlar, floroglusinollar ve flavonoidler bitkinin toprak üstü bölümlerinde dağılmışken ksantonlar başlıca köklerde üretilir (Tocci ve ark. 2011).

Son yıllarda *Hypericum* türlerinin özellikle desarı kantaron'un kullanımı yaygınlaşarak artmaktadır. Bunun temel nedeni ise gösterdiği antidepresan özelliğidir. Bu özellik, içerdiği hiperisin ve türevleri (psödohiperisin) bileşiklerinden gelmektedir.

Lisanslı *Hypericum* L. preparatlarıAlmanya'da reçeteli olarak en çok satılan 7. ilaçtır. Avrupa'da stres, uykusuzluk gibi insanın hayatını kötü etkileyen rahatsızlıklarla hafif ve orta şiddetli depresyonların tedavisinde, piyasada satılan antidepresanlara alternatif olarak bitkiden elde edilen preparatlar kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan bir çok araştırmada, sarı kantaronun karaciğer hipertrofinin, jeneralize anksiyete bozukluklarının, akciğer enfeksiyonunun, somatoform rahatsızlıkların, uyku bozukluklarının, şizofreninin, obsesifkompulsif rahatsızlığın ve mevsimsel duygu bozukluğunun tedavisinde de etkili olduğu kanıtlanmıştır (Newell ve ark. 1996).

H. perforatum'un ticari özütlerinin standart antidepresan ilaçlarının yerine depresyon tedavisinde kullanılması tedavi maliyetlerini büyük oranda düşürmektedir. Antidepresan olarak satılan sentetik ilaçlar uykusuzluk, seksüel bozukluklar, kilo kaybı gibi olumsuzluklara neden olurken *H. Perforatum* antidepresan ilaçlarının neden olduğu ciddi yan etkilere sebep olmamaktadır (Solgar 2012).

Türkiye'de yılda yaklaşık 9 milyon kişinin ruh ve sinir hastalıkları nedeniyle doktora başvurduğu rapor edilmiştir (Beyazyürek 2018). Ülkemizde antidepresan

kullanımı son 5 yılda %27 artmıştır. 2009 yılından 2013 yılına, antidepresan tüketim miktarı neredeyse iki kat artarak 37 milyon 867 bin 254'e vardığı tespit edilmiştir. 2016 yılının ilk 9 ayında ise 33 milyon 638 bin 916 kutu antidepresan ilaç tüketildiği bildirilmiştir (Ayhan 2018).

Günümüzde insanların %25'inin hayatının bir döneminde ruhsal hastalıklardan etkilendiği belirtilmiştir. Özellikle 75 yaşına gelmiş bireyler arasında da herhangi bir ruh hastalığı yaşamış olanların oranı ise %50.8 olarak tespit edilmiştir. Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO 2017), göre ise 300 milyondan fazla bireyde depresif bozukluk, 250 milyondan fazla kişide ise kaygı bozukluğu olduğu belirtilmiştir. Bu iki rahatsızlığın üretkenliği azalttığı ve bunun dünya ekonomisine maliyetinin ise 1 trilyon dolardan fazla olduğu kaydedilmiştir.

H. perforatum'dan hazırlanan değişik formlardaki antidepresif farmakolojik ürünlerin yıllık satış değerine bakıldığında Avrupa pazarlarında 100 milyon doları, ABD'de ise 500 milyon doları aştığı görülür. Dünya genelinde ise 1 milyar doları bulduğu rapor edilmiştir (Solomon ve ark. 2013).

Dünya'nın farklı bölgelerinde *H. perforatum*'dan başka *Hypericum angustifolium*, *Hypericum androsaemum* ve *Hypericum brasiliense* gibi diğer bazı *Hypericum* türlerinin de üretimi yapılmaktadır (Şatana ve Arslan 2012). *Hypericum* L. cinsinin gen merkezi olan ülkemizde, *Hypericum empetrifolium*'un çiçekleri Batı Anadolu'da kumaşları sarıya boyamak için kullanılmıştır (Baytop 1984). Türkiye'den her yıl tonlarca kantaron bitkisi ihraç edilmektedir. Bilhassa da Karadeniz Bölgesi'nde *H. perforatum* ve benzer diğer türleri doğadan toplanıp hem yurtiçinde hem de yurtdışında satılmaktadır (Çırak ve ark. 2005).

Kimyasal ilaçlara göre olumsuz etkilerinin daha az olması nedeniyle bitkisel kökenli doğal ürünlere talep her geçen gün artmaktadır. Bitkilere talep artarken tarım alanlarının azalması, iklimsel değişiklikler, artan nüfus ve sanayileşme, doğal bitki türlerinin büyüme ortamlarının bozulmasına ve bazı türlerinin de doğadan aşırı bir şekilde toplanması nedeniyle neslinin tehlikeye girmesine neden olmuştur.

Emek kaybının engellenmesi, maliyetlerin düşürülmesi, doğa tahribatının önlenmesi ve mevsime bağlı kalmaksızın bitkisel kökenli doğal ürünlerin elde edilmesinde bitki doku kültürü yöntemlerinin kullanılması büyük avantaj sağlamaktadır.

Sekonder metabolitlerin üretiminde bitki hücre ve doku kültürleri alternatif bir yöntem olarak gelişmektedir.

Bitki doku kültürleri kullanılarak çok sayıda fitokimyasal sentezlenebilmekte ve aynı yöntemle kimyasal bağ içeren 30000'i aşkın bileşik elde edilebilmektedir. Oysaki mikroorganizmalar kullanılarak sentezlenebilecek fitokimyasal sayısı, bu sayının 1/4'ü kadardır (Zhong 2001).

Değerli sekonder metabolitler içeren *Hypericum* türleri de bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak araştırmacılar tarafından çoğaltılmıştır. *H. perforatum* ile *Hypericum bupleuroides* (Çırak 2006), *Hypericum spectabile* (Karakuş 2011), *Hypericum adenotrichum* Spach. (Yamaner 2011) ve *H. Scabroides* (Surmuş 2006) bitki doku kültürleri yoluyla çoğaltılan türlerden bazılarıdır.

Bitki doku kültürü yöntemleriyle bitkilerden elde edilen sekonder metabolitlerin üretimi artırmak için nanopartiküllerin kullanımıyla ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır. Çalışmaların sonuçları analiz edildiğinde nanopartiküllerin bazı bitkilerde sekonder metabolit içeriğini artırırken, bazı bitkilerde ise toksik etki yaptığı tespit edilmiştir. Artan çinko nanopartikül konsantrasyonu *Stevia rebaudiana* Bertoni'daki stevioside üretimini azaltmıştır (Desai ve ark. 2015). *S. rebaudiana* Bertoni'nin mikroçoğaltılan sürgünlerine uygulanan çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri steviol glikozitlerin miktarını yaklaşık iki kat artırmıştır (Javed ve ark. 2017). *Artemisia annua*'nın hücre süspansiyon kültürlerine uygulanan kobalt nanopartikülleri artemisinin içeriğinde yaklaşık 2.25 kat artış sağlamıştır (Ghasemi ve ark. 2015). *Hyoscyamus reticulatus* L.'nin saçak kök kültürüne uygulanan demir oksit (Fe₃O₄) nanopartikülleri hyoscyamine ve scopolamine üretimini yaklaşık 5 katına çıkarmıştır (Moharrami ve ark. 2017). *Calendula officinalis* L. bitkisine uygulanan gümüş nanopartikülleri anthocyanin, flavonoid ve karotenoid içeriğinde önemli bir düşüşe neden olurken saponin içeriğinde %177'e kadar artış olmuştur (Ghanati ve Bakhtiarian 2014). *Lilium ledebourii* Bioss'in *in vitro* ortamdaki sürgünlerine uygulanan çinko oksit nanopartikülleri flavonoid içeriğinde yaklaşık iki kat, fenolik içeriğinde sekiz kat, antosiyanin içeriğinde ise yedi kat artış sağlamıştır (Chamani ve ark. 2015).

Sharafi ve ark. (2013), St John's Wort'un hücre süspansiyon kültüründe çinko ve demir nano oksitlerini kullanarak hiperisin ve hiperforin bileşiklerinin miktarını önemli

ölçüde artırmışlardır. Sharafi ve ark. (2013), çalışmasının dışında *Hypericum* türlerinde nanopartiküller kullanılarak sekonder metabolit sentezlemeyle ilgili başka çalışma bulunamamıştır.

Hypericum türlerinin sentezlediği hipersin ve hiperforin bileşiklerinin biyosentez mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması amacıyla gen düzeyinde çalışmalar yapılmıştır. *HpPKS1*, *HpPKS2* ve *hyp-1* genlerinin hiperisin ve hiperforin gibi önemli metabolitlerinin biyosentez yollarında yer alan genler olduğu tespit edilmiştir (Karppinen 2010).

H. perforatum'dan *HpPKS1* ve *HpPKS2* olarak adlandırılan poliketid sentazları (PKSs) kodlayan önceden tanımlanmamış iki cDNA izole edilmiştir. *H. perforatum* dokularındaki *HpPKS1*'in ekspresyonunun hiperforin ve adhiperforin konsantrasyonlarıyla, *HpPKS2*'nin ekspresyonunun ise hiperisin ve psödohiperisin konsantrasyonları ile bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Karppinen 2008).

Litertürden derlenen bilgiler ışığında sunulan bu tez çalışmasının temel amacı, *in vitro* kültür ortamına eklenecek nanopartiküller yoluyla *H. perforatum* ve *H. retusum*'dan elde edilen hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarında artış sağlamaktır. Bununla birlikte nanopartiküllerin hiperisin ve türevi bileşiklerin sentezinden sorumlu genlerin ekspresyon seviyelerinde meydana getirdiği değişimler de moleküler analizlerle incelenecektir. Ayrıca nanopartiküllerin bitkilerin morfolojisinde oluşturduğu etkilerin de gözlemlenmesi amaçlanmaktadır. Çalışmayı gerçekleştirebilmek için *H. perforatum* ve *H. retusum* bitki doku kültürleri yoluyla çoğaltılacaktır. Doğadan toplanan *H. perforatum* ve *H. retusum*'un tohumları *in vitro* ortamda çimlendirilecektir. Çimlenme ortamından elde edilen sürgünler alt kültür ortamına aktarılacaktır. Belli periyotlarla yapılan alt kültürlerle her iki tür de çoğaltılacaktır. Yeterli sayıda elde edilecek sürgünlerin ortamına farklı konsantrasyonlarda alüminyum oksit (Al_2O_3), demir (III) oksit (Fe_2O_3), titanyum dioksit (TiO_2) ve çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri verilecektir.

Bu çalışmaların sonucunda bitkilerden sekondermetabolit sentezi konusunda elde edilecek verilerin literatüre sağlayacağı katkıları şöyle özetleyebiliriz.

1-*H. perforatum* ve *H. retusum*'un *in vitro* sürgün kültürü ortamlarına hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarının artırılması için dört farklı nanopartikül teşvik edici

elisitör olarak eklenecektir. Böylece nanopartiküllerin yeni bir elisitör türü olup olamayacağı konusunda veriler sağlanmış olacaktır. Çünkü bitki doku kültürleri yoluyla sekondermetabolit üretiminin başarılı bir şekilde gerçekleşmesi için kültür ortamı optimizasyonu ile kültürleri teşvik edici uygun elisitörlerin ortama verilmesi çok önemli iki faktördür.

2-Çalışmada dört nanopartikülün denenecek olması farklı nanopartiküllerin *in vitro* sürgün kültürleri üzerinde oluşturduğu etkiler gözlemlenebilecektir.

3-Nanopartikülleraynı cinsin iki farklı türü üzerinde kullanılmıştır. Bu şekilde aynı nanopartiküllere farklı türlerin vereceği cevapları karşılaştırma imkanı sağlanacaktır.

4-Doğadan toplanan *H. perforatum* ve *H. retusum*'un farklı dokularının fenolik içerikleri ile *in vitro* ortamda nanopartikül uygulanmış olanların içeriklerini karşılaştırma fırsatı verecektir.

5-Nanopartiküller kültürlerle uygulandıktan sonra 3 hafta boyunca kültürlerin morfolojik değişimlerini incelemek maksadıyla belli aralıklarla gözlemler yapılacaktır. Elde edilecek veriler nanopartiküllerin kültürlerin morfolojik gelişiminde yarattığı etkilere ışık tutacaktır.

6-*H. perforatum* ve *H. retusum*'un nanopartikül uygulanmış *in vitro* sürgün kültürlerinin nanopartiküllere verdiği tepkiler LC-MS/MS analizleriyle kimyasal düzeyde ve yapılacak olan moleküler analizlerle de gen düzeyinde değerlendirme yapılabilecektir.

7-Son olarak bu çalışmanın verileri geleceğin tarımında var olacağı düşünülen nanogübreler için ön bilgiler sağlamış olacaktır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu bölümde *Hypericum* cinsine ait *H. perforatum* ve *H. retusum* türlerinin biyolojik özellikleri, çalışma materyalleri olarak seçilmelerinin gerekçesi olan tıbbi etkileri ve ekonomik önemleri ile nanopartiküller önceki çalışmalar ışığında açıklanmıştır.

Hiperisin ve türevi bileşiklerin üretilmesi için *H. perforatum*'un hücre süspansiyon ve kallus kültürleri hakkında çok sayıda çalışma yapılmıştır. Fakat sürgün primordiumu olan kallus (Gadzovska ve ark. 2005), adventif kök kültürleri (Cui ve ark. 2010 a,b,c, 2011, 2014; Wu ve ark. 2014), genç bitki veya sürgün (Kirakosyan ve ark. 2000, Sirvent ve Gibson 2002, Pasqua ve ark. 2003, Zobayed ve ark. 2003, 2004; Gadzovska ve ark. 2005, Pavlik ve ark. 2007, Savio ve ark. 2012) kültürü gibi organize kültürlerin, hiperisin üretimi için daha ideal olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada da *H. perforatum* ve *H. retusum*'un *in vitro* sürgün kültürü yapılmıştır. Sürgün kültürü ortamlarında hiperisin ve türevi bileşiklerin üretimlerinin artırılması için kültür ortamlarında elisitör olarak farklı nanopartiküller denenmiştir. Bu bölümde, çalışmada kullanılan bitkisel materyaller ve elisitör olarak kullanılan nanopartiküllerle ilgili bilgiler verilmiştir.

2.1. *Hypericum* Cinsinin Kökeni ve Sistematığı

“*Hypericum*” ismi, Yunanca hyper (üstünde) ve eikon (ikon ya da resim) sözcüklerinin bir araya gelmesiyle oluşmuştur. *Hypericum*'un ilk genel tanımı Tournefort'a (1700:254, t.131) aittir (Nürk 2011). *Hypericum* cinsinin en çok tanınan türü olan *H. perforatum*'unasıl kromozom sayısı $x=8$ olup genel anlamda tetraploid ($2n=4x=32$) bir bitkidir. Bunun yanı sıra diploid ve hekzaploid kromozomlu olma durumları da mevcuttur (Robson ve Adams 1968).

H. perforatum büyük ihtimalle çok eski dönemlerde *H. attenuatum* L. ve *H. maculatum* Crantz arasında kendiliğinden meydana gelen melezlemenin ve ardı sıra gelen kromozom katlanmalarının neticesinde meydana gelmiştir (Robson 1981). *H. perforatum* Kuzey Amerika ve Avrupa'nın yağışsız (kurak) bölgelerinden kökenini almıştır (Deltito ve Bayer 1998).

Siélaïn (1899) ve Bonnier (1934), *Hypericum* cinsini *Hypericineae* familyasında incelerken yine Bonnier (1934), *Hypericineae* ve *Hypericoideae*'yi anlamdaş olarak verir. *Hypericum* cinsinin sistematik yeri Harder ve ark.'nın (1965), yaptığı sınıflandırma çerçevesinde verilmiştir. Buna göre *Hypericum* cinsi Angiospermae bölümü, Dicotyledonae sınıfı, Dialypetalae altsınıfı, Parietales takımı, *Hypericaceae* familyası içinde yer almaktadır.

2.2. *Hypericum* Türlerinin Dağılışı

Hypericum türleri Türkiye'de doğal olarak 750 ila 3200 rakım aralığında yetişir (Çakır ve ark. 1997). *H. perforatum* (*Clusiaceae*) anavatanı Avrupa'nın batısı, Kuzey Afrika ve Asya'dır (Walker ve ark. 2001). *H. perforatum*, ülkemizin tüm coğrafi bölgelerinde yayılış göstermektedir. Dünya'daki yayılışı ise Avrupa, Kuzey Afrika, Kafkasya, Sibirya, Orta Asya, İran, Kuzey Irak, Kıbrıs, Batı Suriye'dir (Uçur 2012). *H. retusum* ise ülkemizde Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yayılış göstermektedir. Genel yayılış alanı ise Suriye çölüdür (TUBİVES 2018). Çizelge 2.1.'de bu çalışmada kullanılan *H. perforatum* ve *H. retusum*'un yetiştirme alanlarının coğrafi özellikleri verilmiştir.

Çizelge 2.1. *H. perforatum* ve *H. retusum*'un yetiştirme alanlarının coğrafi özellikleri*

Coğrafi özellik	<i>H. perforatum</i> L.	<i>H. retusum</i> Aucher
Ömür	Çok yıllık	Çok yıllık
Yapı	Ot	Ot
Çiçeklenme	4-8	4-6
Habitat	Mezofitik bölgelerdeki kuru habitatlar	Kalkerli step tepe ve tarla kenarları
Yükseklik	0-2500 m	360-1150 m
Endemik	Endemik değil	Endemik değil
Element	Bilinmiyor	İran-Turan
Türkiye dağılımı	Kuzey, Batı, Orta, Doğu ve Güney Anadolu	Güneydoğu Anadolu
Genel Dağılımı	Avrupa, K. Afrika, Kafkasya, Sibirya, Orta Asya, İran, Kuzey Irak, Kıbrıs, Batı Suriye	Suriye çölü

*Çizelgedeki veriler TUBİVES (Türkiye bitkileri veri servisi) sitesinden alınmıştır.

2.3. *Hypericum* Cinsinin Morfolojisi

Hypericum cinsi serbest dallanmanın tipik olarak 40 ila 80 cm arasında değiştiği, dört veya beş taç yapraklı, tek bir dişi organ (Degar ve ark. 1992) ile çok sayıda erken organa sahip sarı veya bakırmısi renkte çiçekleri olan ot ve çalı tipi formlar içerir

(Muenscher 1946, Gleason ve Cronquist 1991). Gövde ve dalların boyu 1-3 cm uzunluğunda ve 0.3-1.0 cm genişliğinde dikdörtgenimsi, pürüzsüz kenarlı yapraklar ile yoğun bir şekilde kaplıdır. Olgun bitkilerin üst kısımları, tipik olarak 1-2 cm genişliğinde birkaç düzine beş yapraklı sarı çiçek üretebilir. Taç yaprakların kenarları genellikle siyah noktalar ile kaplıdır (Shrivastava ve Dwivedi 2015).



Şekil 2.1. *H. retusum* Aucher'in çiçeklenme dönemindeki genel görünüşü

Bitkinin çiçek ve yaprak kenarlarında yoğun bir şekilde siyah bezeler bulunur. Bu siyah bezeler elle ovulduğunda kırmızı renkli bir sıvı açığa çıkar. Bu sıvının renginden dolayı bitkiye halk arasında verilen isimlerden biri de “kan otu” olmuştur. Kırmızı renkli sıvı hiperisin olup sadece siyah bezeleri taşıyan türlerde bulunur (Çırak ve Kurt 2014). *Hypericum* türleri yapılarındaki farklı salgı sistemlerinin (Saydam bezeler veya oyuklar, salgı kanalları ve siyah nodüller) varlığı ile özdeşleşmiştir (Şengüler 2009).

H. perforatum toprak üstünde yayılan sürgünlerin düğümlerinden kökler oluşturmaktadır. Çok dallanan kökleri iğ şeklindedir. *H. perforatum*'un çiçekleri hermafrodittir. Tohumlar endospermsizdir. Meyve kapsular, tohum septisidal olarak ayrılır. Meyvede genellikle salgı içeren keseler mevcuttur (Şengüler 2009).



Şekil 2.2. *H. perforatum* L.'nin çiçeklenme dönemindeki genel görünüşü

2.4. *Hypericum* Cinsinin Üreme Biyolojisi

2.4.1 Geleneksel Çoğaltım

Ülkemizin iklim koşullarında *H. perforatum*'da çiçeklenme Mayıs ayında başlayıp Haziran ortalarında en üst düzeye çıkarak Ağustos ayına kadar devam etmektedir. Meyveler Temmuz ayının başında oluşmaya başlayıp Ağustos başında ise olgunlaşır. Başta yeşil renkte olan meyve olgunlaştığında kahverengi olur. Kapsül formundaki meyveler olgunlaştığında çatlayarak tohum döker (Çırak ve Kurt 2014). Tohumlar toprakta on seneden fazla canlı kalabilirken çimlenme oranı çok düşüktür (Çırak ve ark. 2004). Bitki çoğunlukla vejetatif üremeyi tercih etmektedir. Vejetatif üreme çeşitlerinden de özellikle döllenme yapmadan ve kromozom sayısını yarıya düşürmeden yumurta hücresinden tohum oluşturma (apomiksis) yöntemi çoğunlukla görülür (Qu ve ark. 2010).

Hypericum türleri içinde, en fazla 16 apomiktik tür tanımlanmıştır (Matzk ve ark. 2003). İlk olarak Noack (1939), tarafından *H. perforatum* ve Myers (1964), tarafından *H. virginicum* L. için tarif edilmiştir. Saha koşullarında, St. John's Wort çiçek açar ve yetiştiriciliğin ikinci yılında hasat edilir ve tarla bitkileri her 2 ila 3 yılda yeniden dikilebilir (McCoy ve Camper 2002).

2.4.2. Doku Kültürü Çalışmaları

2.4.2.1. *H. perforatum* L.'nin *In vitro* Çoğaltımı

Cellarova ve Kımakova (1999), oksin ve sitokinin farklı konsantrasyonlarının *H. perforatum* sürgünlerine morfogenetik etkisini belirlemek için yaptıkları bu çalışmada indole-3-asetik asit (IAA) ve indol-3-bütirik asit (IBA) etkisi altında konsantrasyona bağlı köklenme yeteneğinin uyarıldığını gözlemlemişlerdir. Köklendirme, 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 1-naftalen asetik asitin (NAA) etkileri ile artırılmamıştır.

Pretto ve Santarém (2000), *H. perforatum* kalluslarından sürgün oluşturup çoğaltmak için, MS tuzları, vitaminler, 4.4 μM BA, 30 gl^{-1} süktroz ve 3 gl^{-1} fitagel içeren ortam kullandıklarını bildirmişlerdir.

McCoy ve Camper (2002), *H. perforatum*'un nodal segment, aksiller tomurcuk ile yaprak disk eksplantlarından indol asetik asit (5.71, 2.85, 0.57 μM IAA) ve benzilaminopürin (8.88, 4.44, 2.22 μM BA) kombinasyonları ile desteklenmiş MS besi ortamından çoklu sürgün ve kallus üretmeyi amaçlamışlardır. IAA/BA'nın test edilen bütün kombinasyonlarında sürgün gelişiminin olduğunu ancak, bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen besi ortamlarında çok az sayıda sürgün elde edildiğini belirtmişlerdir. Kallus ise 4.44 μM BA+2.85 μM IAA veya 5.71 μM IAA içeren ortamdan sağlanmıştır.

Santarém ve Astarita (2003), olgun *H. perforatum*'un nodal segmentlerini 4.5 μM BA, kinetin (KIN), tidiazuron (TDZ) ile desteklenmiş MS besi ortamı üzerine ayrı ayrı veya 0.05 μM NAA ile karıştırarak kültür başlatmışlardır. Organojenik eksplantlar, BA veya KIN'in bulunduğu veya naftalen asetik asit'in (NAA) bunlarla kombine edildiği besi ortamında gözlemlenmiştir. Organojenik eksplantların 4.5 μM BA içeren proliferasyon ortamındaki alt-kültürü organojenik cevabı desteklemiştir. Ortalama olarak en yüksek sürgün oluşumu (52.6 sürgün) BA ve NAA'nın varlığında gerçekleşmiştir.

Ayan ve ark. (2005), *H. perforatum* için etkili bir mikroçoğaltım sistemi tanımlamak ve hiperisini doku kültürü yöntemiyle üretmek için bir çalışma yapmışlardır. Yaprak diskleri ile gövdeden alınan bölümler kinetin, 2,4-D (0.5, 1 ve 1.5 mgL^{-1}) ve süktroz (30, 40 ve 50 gl^{-1}) bulunan MS besi ortamlarında kültüre alınmışlardır.

Kallus oluşumu bitki büyüme düzenleyicileri içeren tüm ortamlarda gözlenmiştir. Fakat kallus oluşum sıklığı açısından en yüksek değerler 30 gL⁻¹ sükroz, 0.5 mgL⁻¹ 2,4-D ve 0.5 mgL⁻¹ KIN içeren MS besisi ortamından alınmıştır. Elde edilen kalluslar, sürgün üretmek için 1 mgL⁻¹ BA, kök oluşturmak içinde 1 mgL⁻¹ IAA içeren MS ortamlarında alt kültüre alınmışlardır. Yaprak disklerinden meydana gelen kallusların herbirinden ortalama 19 adet sürgün elde edilmiş olup hiperisin içerikleri %0.048 olarak tespit edilmiştir.

Çırak (2006), *H. bupleuroides* ve *H. perforatum* türleri için etkin bir mikroçoğaltım ve sekonder metabolit üretim metodu geliştirmeye çalışmıştır. Steril sürgünler kallus meydana getirmeleri için BA (1, 2.5 ve 5 mg/L), 2,4-D ve KIN (0.5, 1 ve 1.5 mg/L) ile destekli MS besisi ortamında kültüre alınmıştır. İki türde de denenen tüm ortamlardan kallus elde edilmiştir. *H. perforatum*'a ait kalluslar 1 mg/L BA, *H. bupleuroides* kallusları ise 2 mg/L BA içeren ortamda yoğun bir sürgün gelişimi olduğu rapor edilmiştir. *H. bupleuroides* sürgünleri hormon içermeyen MS ortamında yüksek oranlarda köklenmiştir. *H. perforatum*'da ise sürgünler, kök gelişimini başlatmak için 1 mg/L IAA ek olarak jasmonik asit (JA, 0.1, 0.15 ve 0.2 mg/L) ve mannan (M, 0.05, 0.1 ve 0.15 mg/L) elisitörlerini içeren MS besisi ortamlarına aktarılmıştır. Köklenme için uygulanan hormon ve elisitörler etkisiz olduğu bildirilmiştir.

Murch ve ark. (2006), *H. perforatum*'a aithipokotillerden, 5 µmol/L TDZ bulunan MS besisi ortamında sürgün oluşumu gerçekleştirmiştir. Bununla birlikte BAP ve IAA hipokotiller üzerinde etki göstermediğini tespit etmişlerdir.

Franklin ve Dias (2006), *H. perforatum* için 2.2 mM BA ve 5.7 mM IAA ile takviye edilmiş MS optimal sürgün gelişim ortamını kullanmışlardır.

Karppinen ve ark. (2007), *H. perforatum*'dan çimlenme sonucu oluşan sürgünleri 0.1 mgL⁻¹ benziladenin (BA), 30 gL⁻¹ sükroz, 0.1 gL⁻¹ myo-inositol ve 3.5 gL⁻¹ fitagel içeren MS ortamında çoğaltmıştır.

Pasqua ve ark. (2008), *H. perforatum* var. *angustifolium* Borkh'un yapraklarından elde ettikleri kalluslardan, somatik embriyogenezis ve sürgün oluşumu başlatmışlardır. Ayrı morfogenetik programlar kullanılarak somatik embriyogenezis ve sürgün rejenerasyonu yoluyla iyi gelişmiş bitkiler elde edilmiştir. 5.8 µM 2,4-D, 1.34 µM NAA ve 1.16 µM KIN ile desteklenmiş sıvı B5 ve MS besisi ortamında

proembriyonik kütleler üretilip hormon içermeyen ortama aktarılmıştır. Bu ortamda kültüre alınan eksplantlar küresel ve beyazımsı yapılar oluşturmuştur. Farklı konsantrasyonlarda (3, 6, 9, 12 μM) TDZ ve 2 μM IBA ihtiva eden MS besi ortamından yalnızca sürgün oluşumu ile somatik olmayan embriyogenezis elde edilmiştir. 3 μM TDZ varlığında sürgün sayısında önemli bir artış sağlanmıştır.

Savio ve ark. (2011), *H. perforatum*'un *in vitro* ortamda yetişmiş sürgünlerinden nodal segmentler alıp üç farklı sıvı kültür sisteminde [toplam daldırma (TI), kısmi daldırma (PI) ve kağıt köprü desteği (PB)] geliştirmişler. Yarı katı ortam (3 gL^{-1} fitagel) kontrol olarak kullanılmıştır. Adventif sürgünlerin başlatılması ve çoğaltılması açısından PI ve SS sistemlerinin benzer sonuçlar (Sırasıyla 65.3 ve 71.3 sürgün), PB sisteminin ise eksplant başına en az sayıda sürgün (29,5 sürgün) verdiği rapor edilmiştir. Boyca en uzun sürgünler PI sisteminde meydana gelmiştir. En yüksek miktardaki hiperisin ve fenolik bileşikler PI ve PB sistemlerinden türetilmiş sürgünlerde gözlemlenmiştir.

Akhtar ve ark. (2013), *H. perforatum*'un dört genotipini farklı BAP (0.5, 1.0 ve 1.5 mgL^{-1}) ve IAA (0.0 ve 0.5 mgL^{-1}) kombinasyonlarını içeren MS ortamlarında *in vitro* sürgün rejenerasyonu ve hiperisin içeriğini araştırmışlardır. "Topas" ve "Helos" genotipleri en yüksek sürgün sayısını verirken, en düşük sürgün sayısı Ardabil'de elde edilmiştir. En yüksek sürgün indüksiyonu, eksplant başına sırasıyla 42.4 ve 37.9 sürgünle 1.0 ve 1.5 mgL^{-1} BAP destekli besi ortamından sağlamıştır. Maksimum hiperisin seviyesi, 1.0 ve 1.5 mgL^{-1} BAP altındaki "Helos", "Topas" ve "New Stem" genotiplerinden elde edilmiştir. Ardabil genotipinde ise 1.5 mgL^{-1} BAP konsantrasyonu hiperisin üretimi için uygun ortam olarak vurgulanmıştır.

Sood ve ark. (2015), farklı büyüme hormonları ve ışık, sıcaklık gibi fiziksel koşulların *H. perforatum* sürgünlerinin hiperisin üretimine olan etkisini incelemişlerdir. Aydınlik ortam ve $25\pm 2^\circ\text{C}$ ortam sıcaklığında, sükroz (%3), IBA (3 mg/L), KIN (1 mg/L) ve agar (%0.9) içeren MS besi ortamında yetişen sürgünlerde 0.119 mg/g düzeyde en yüksek hiperisin muhtevası tespit edilmiştir.

Khakpour ve ark. (2015), *H. perforatum*'un en uygun mikroçoğaltımı için B grubu vitaminlerinden olan Tiamin HCl, piridoksin HCl ile nikotinik asitin farklı konsantrasyonlarını (kontrol ve MS'in 100 katı) ve sükrozun (30 ve 40 g/L) sürgün

çoğaltımına etkisini araştırmışlardır. *İn vitro* koşullarda yetiştirilen tek nodlu sürgün gövdelerini eksplant olarak kullanan araştırmacılar, 40 g.l⁻¹ sükroz ile 100 kat MS vitaminlerini içeren besi ortamındaki eksplantlardan en yüksek sürgün ve yaprak sayısını elde ettiklerini bildirmişlerdir. En yüksek sürgün ve yaprak uzunluğu 30 gl⁻¹ sükroz ile desteklenen ortamda başarılmıştır. En yüksek nod sayıları 40 gl⁻¹ sükroz ile nikotnik asit konsantrasyonlarında başarılmıştır. Bitkiler büyüdüktan iki ay sonra açık ve koyu renkli gaddelerin miktarı sayılmıştır. Maksimum sayıda açık renkli gude 30 gl⁻¹ sükroz ile 100 kat tiamin ve piridoksin içeren ortamdan elde edilmiştir. Fakat en yüksek sayıda koyu renkli gude 40 gl⁻¹ sükroz ile 100 kat tiamin veya piridoksin içeren ortamda meydana geldiği rapor edilmiştir. *H. perforatum*'un sürgünlerini çoğaltmada 0.5 mgL⁻¹ BAP içeren MS ortamını kullanmışlardır.

Kwiecień ve ark. (2018), *in vitro* ortamda kültürü yapılan *H. perforatum*'un üç çeşidinin gelişimi ve flavonoid üretimi üzerine besi ortamı kompozisyonunun etkisini araştırmışlardır. *İn vitro* ortamda yetiştirilmiş sürgünler 0.1-3.0 mgL⁻¹ NAA ve BAP ile desteklenmiş Linsmaier ve Skoog (LS) ve Murashige ve Skoog (MS) ortamlarında paralel olarak kültüre alınmıştır. Tüm çeşitlerin sürgünleri, düşük seviyede bitki büyüme düzenleyicileri (0.1 mgL⁻¹) içeren LS ve MS ortamlarında yüksek miktarda flavonoid biriktirmiştir. En yüksek miktarlar, MS ortamında yetişen "Elixir" çeşidinin sürgünlerinde tespit edilmiştir.

2.4.2.2. *H. retusum* Aucher'in *İn vitro* Çoğaltımı

Namlı ve ark. (2010), *H. retusum* tohumlarını hormonsuz MS besi ortamında çimlendirerek çok sayıda sürgün elde etmişlerdir. Araştırmacılar sürgün gelişimi üzerine BAP ve KIN'in farklı konsantrasyonlarının etkisini incelemeye yönelik çalışmalarında, en fazla sürgün sayısını (64.25 sürgün/eksplant) 0.5 mg L⁻¹ BAP içeren besi ortamından elde etmişlerdir. Test edilen KIN konsantrasyonları arasında en iyi yanıtı 27.87 (sürgün/eksplant) sürgün ile 1.5 mg L⁻¹ KIN içeren besi ortamından almışlar. Besi ortamında oksinin etkisini belirlemeye yönelik sürgünler üç farklı oksin grubuyla (0.25 mgL⁻¹ IAA, NAA, IBA) kombine edilen BAP (0.5 mgL⁻¹) veya KIN (1.5 mgL⁻¹) bulunan MS ortamında kültüre alınmışlardır. Sürgün uzunluğu ve sayısı bakımından en iyi sonuç 0.5 mgL⁻¹ BAP+0.25 mgL⁻¹ IBA (54.12 sürgün/eksplant, 3.36 sürgün boyu)

ile destekli besi ortamından sağlanmıştır. *H. retusum*'ünün *vitro* çoğaltımında BAP'ın KIN'den daha iyi yanıt verdiği sonucuna varılmıştır.

Asan (2013), *H. retusum*'un kallus ve süspansiyon kültürlerini yaparak hiperisin türevlerini üretmeye çalışmıştır. *In vitro* ortamda çimlendirilen tohumlardan elde edilen sürgünler 0.5 mg/L BAP'lı MS besi ortamında çoğaltılarak 0.5 mg/L KIN+1.0 mg/L 2,4-D içeren ortamdan %70 oranında kallus oluşumunun gerçekleştirildiği rapor edilmiştir. En iyi süspansiyon kültürleri 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ve 0.5 mg/L KIN+1.0 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamında gelişen kalluslardan elde edilmiş ve süspansiyon kültürlerinin başlatılmasında bu ortamlar kullanılmıştır. En yüksek fenolik bileşik miktarı (hiperisin ve hiperosid hariç) pH'nin 4.5 olduğu, 0.1 mg/L BAP+0.5 mg/L 2,4-D ve 15 g/L sükroz içeren ortamdaki kültürlerden elde edildiği bildirilmiştir.

Hypericum cinsinin en verimli türü olan *H. perforatum*'un yanı sıra diğer türlerinin de tıbbi ve endüstriyel olarak değerlendirilebileceği araştırmacılar tarafından ortaya konulmuştur. Örneğin *H. scabrum*'un boyar madde kaynağı olarak değerlendirilebileceği (Merdan ve ark., 2008), *H. maculatum*'un içerdiği sekonder metabolitler bakımından *H. perforatum*'a yakın bir potansiyel taşıdığı (Băcilă ve ark. 2010), *H. triquetrifolium*'un birçok tıbbi özelliğinden dolayı (anti-nosiseptif, anti-enflamatuar, antibakteriyel, antifungal, antitümör ve antioksidan) tedavi edici olarak kullanılabileceği (Tahir ve ark. 2017), tespit edilmiştir. Bu çalışmada *H. perforatum*'un yanı sıra Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetiştirilen *H. retusum* da tıbbi ve ekonomik olarak değerlendirebilmek için çalışılmıştır.

2.4.2.3. Diğer *Hypericum* Türlerinin *In vitro* Çoğaltımı

Karakaş ve ark.(2009), *H. triquetrifolium*'un tohumlarını BAP (0.5, 1.0 ve 2.0 mgL⁻¹), sükroz (%3) ve agar (%5.5) içeren MS besi ortamında çimlendirmiştir. Akselik sürgünler, BAP'ın (0.0, 0.5, 1.0 ve 2.0 mgL⁻¹) farklı miktarlarını içeren MS besi ortamlarında kültüre alınarak sürgün sayısı ve hiperisin miktarına etkileri araştırılmıştır. Sonuçta en yüksek sayıda sürgün, 2.0 mgL⁻¹ BAP ilaveli ortamdan ve hiperisinin en yüksek miktarı da 1.0 mgL⁻¹ BAP bulunduran ortamdan elde edilmiştir.

Meyer ve ark. (2009), *Hypericum frondosum*, *Hypericum galioides* ve *Hypericum kalmianum* türlerinden 5 µM BA+2.5 µM IAA destekli besi ortamında kalluslardan *in vitro* sürgünler elde etmiştir.

Oluk ve ark.(2010), *H. triquetrifolium* kotiledonlarını 0.5 mg/L IAA ve 2 mg/L BAP ihtiva eden yarı katı MS ortamında kültüre alıp kallus oluşturmuşlar ve üretilen embriyojenik kalluslarda hiperisin miktarını 48 µM/g olarak tespit etmişler.

Bacila ve ark. (2010), *H. maculatum* için etkili bir mikro çoğaltım protokolü oluşturmayı hedeflemişlerdir. Çalışmada eksplant kaynağı olarak steril koşullarda çimlenme ortamından elde edilen sürgünlerin nodal segmentleri kullanılmıştır. Nodal segmentler 0.1 mg/L KIN + 0.5 mg/L γ,γ-(dimethylallyl) amino pürin (2iP) + 0.2 mg/L BAP + 0.05 mg/L NAA içeren MS besi ortamına alınarak sürgün oluşumu gerçekleştirilmiştir. Sürgün uzaması ve köklenme için sürgünler, 0.5 mg/L giberellik asit (GA₃) ve iki farklı oksinin (IAA ve IBA), üç farklı konsantrasyonunu (0,0.5 ve 1.0 mg/L) içeren yarı kuvvetteki MS ortamı aktarılmışlar. Kök sayısı, uzunluğu ve sürgün ağırlığı için en etkili kültür ortamı 1.0 mg/L IAA bulunduran yarı kuvvetteki MS ortamının olduğu kaydedilmiştir.

Hypericum türlerinin *in vitro* sürgün çoğaltımı için yapılmış olan çalışmaların çoğunda en etkili besi ortamının MS, bitki büyüme düzenleyicisinin de BA olduğusaptanmıştır. BA için araştırmacıların ağırlıklı olarak denediği konsantrasyon aralığında 0.5-2.0 mg/L⁻¹ BA'dır. BA'nın belirtilen aralıktaki miktarları denenerek en etkili konsantrasyon tespit edilip bu çalışmadaki sürgün çoğaltımı aşamalarında kullanılmıştır.

2.5. *Hypericum* Türlerinin Tıbbi Özellikleri

2.5.1. *Hypericum* Türlerinin Geleneksel Kullanımları

Hypericum türleriyle ilgili bilgiler MÖ 400 yılına kadar dayanmaktadır. Eski Yunan ve Roma uygarlıkları birçok hastalığın tedavisinde *H. perforatum*'un kullanımından bahsetmişlerdir. Antik Yunan herbalistlerinden **Hipokrat** (ca. MÖ 460-370;“Corpus Hippocraticum”), **Theophrastus** (MÖ 371-286;“De Historia Plantarum”), **Dioscorides** (Birinci yüzyıl;“De Materia Medica”), ve **Galen** (ca. 130–220), bitkinin çiçek açan kısımlarını sürünge/yılan ısırığı, adet krampı, gastrointestinal sıkıntı, ülser, depresyon, yüzeysel yaralar, yanıklar ve siyatik gibi çeşitli tıbbi endikasyonları tedavi etmek için önermişlerdir (Gunther 1968, Bombardelli ve Morazzoni 1995, Hobbs 1990, Leung ve Foster 1996, Upton 1997).

H. perforatum yağının yara ve morlukların tedavisindeki etkinliğinden dolayı Londra'nın ilk farmakopisinde "Hyperici Oleum" olarak dahil edilmiştir (Urdang 1944).

Amerikan Kızılderili kabileleri hastalıkların tedavisinde *Hypericum* türlerinden faydalanmıştır. Cherokee, Iroquois ve Montagnais kabilelerinin *H. perforatum*'u kullandıklarıyla ilgili kayıtları bilinmektedir (Vogel 1970, Moerman 1998). Bu kabileler bitkiyi öksürük ilacı olarak kullanmış görünüyorlar ancak Cherokee, bitkiyi daha geniş bir şekilde kullanmıştır (Galeotti 2017). Günümüzde, modern Amerikan bitki uzmanları hala *H. perforatum*'u yıllarca önerildiği koşulların çoğunda kullanıyorlar (Lust 1974, Moore 1979).

Türkiye'de *H. perforatum* halk arasında mide-bağırsak rahatsızlıkları, sarılık, safra kanalı rahatsızlıkları, iltihap kurutucu, balgam söktürücü, kan yapıcı ve yanık ve yara tedavisindeki kullanımı rapor edilmiştir (GAP 2001).

Hypericum bitkilerinin terapötik etkisi, içerdikleri biyoaktif bileşikler olan flavonoidler (örneğin rutin, hiperosit, kersetin ve kuersitrin), floroglusinoller (örneğin, hiperforin), naftodianthronlar (örneğin hiperisinler), fenolik asitler (klorojenik asit gibi) ve uçucu yağlardan kaynaklanmaktadır (Velingkar ve ark. 2017).

Hypericum türlerindeki kırmızı pigmentler üzerine ilk mantıksal araştırma 1830 yılında Buchner tarafından yapılmıştır. Buchner pigmente '*Hypericumrot*' adını vermiştir. 1895 yılında emilim spektrumu (alkolik çözelti) araştırılmıştır (Mohammed 2016). 1911'de moleküler formülünü ($C_{16}H_{10}O_5$) analiz eden Cerny '*Hypericin*' adını vermiştir (Müller 2005).

2.5.2. *Hypericum* Türlerinin Antibakteriyel ve Antiviral Özellikleri

Hiperforin antibakteriyel bir bileşen olup özellikle tüm gram pozitif bakterilerin büyümesini inhibe ettiği bilinmektedir. Fakat gram negatif bakterilerde büyüme önleyici etkisi gözlenmemiştir (Bystrov ve ark. 1975).

Hiperisin, zarflı virüsleri yaşam döngüleri boyunca farklı noktalarda (Lenard ve ark. 1993) ve hücre zarlarıyla birleşmelerinde (Degar ve ark. 1929, Lenard ve ark. 1993) etkisiz hale getirmiştir. Hiperisin insan kanında bulunan birçok zarflı virüsü etkisiz hale getirmek ve AIDS (Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu) hastalarını tedavi etmek için doğal bir aday olarak kullanılabildiği belirtilmiştir (Holden 1991, Meruelo 1993).

Hepatit B ve C virüsü (HBV ve HCV) gibi diğer ters transkripsiyonlu virüslerin, *in vitro* koşullarda hiperisin tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (Muller ve ark. 1997, Thiede ve Walper 1994).

H. perforatum preparatları, antiviral (Weber ve ark. 1994), antitümoral (Varghese ve Sooriamuthu 2013), antimikrobiyal (Simic ve ark. 2014), antioksidan (Encarnaç o ve ark. 2016), anti-inflamatuar (Tanideh ve ark. 2014) olarak kullanılabilir ve yara iyileşmesinin tedavisinde kullanılmaktadır (Derun ve ark. 2013).

2.5.3. *Hypericum* Türlerinin Antikanser Özellikleri

Hiperforin ve hiperisin antikanser özellikleri açısından da incelenmiştir. Hiperforin *in vitro* koşullarda tümör hücresinin büyümesini inhibe etmiştir (Schempp 2002). Çalışmalar, polifenolik prosiyanidin B2 ile birlikte hiperforinin, K562 ve U937 hücrelerinde, beyin glioblastoma hücrelerinde LN229 ve normal insan astrositlerinde lösemnin büyümesini etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir (Hostanska 2003).

T24 ile NBT-II mesane kanseri hücre dizilerine karşı *H. perforatum*'untoksik etkileri rapor edilmiştir (Skalkos ve ark.2005).

HT-29 kolon kanseri ve H-460 akciğer kanseri hücre dizilerine karşı *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* ve *H. ternum*' n hekzan ekstraktının antikanser etki gösterdiği tespit edilmiştir (Ferraz ve ark.2005).

Tümör oluşturan MT-450 meme kanseri hücreleri farelere enjekte edilmiştir. Daha sonra farelere hiperforin verilmiştir. Hiperforin farelerde tümör büyümesini engelleyip tümör hücrelerini apoptozise yönlendirmiştir. Bunun yanı sıra damarlanmayı da önlemiştir (Schempp ve ark. 2005).

Yapılan başka bir çalışmada hiperforin, matriks metalloproteinazların aktivasyonunu engelleyerek tümör hücrelerinin invazyon ve metastaz yapmasının önüne geçmiştir (Dell'Aica ve ark. 2007).

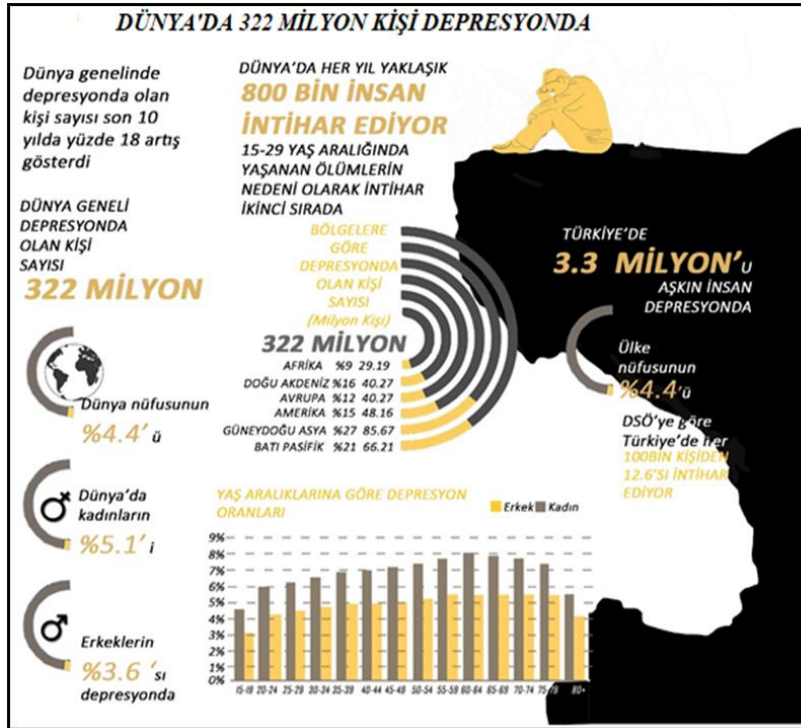
Sagr tini ve ark. (2008), İtalya'da yetişen sekiz *Hypericum* L. alt türünün kimyasal bileşenlerinin miktarını, antioksidan ve serbest radikal temizleyici özelliği bakımından incelemişlerdir. Çalışılan materyallerde kayda değer antioksidan aktivite tespit edilmiştir.

H. retusum'un tohum, meyve ve çiçek ekstraktlarının güçlü bir antioksidan ve anti-genotoksik sergilediği rapor edilmiştir. *H. retusum*'un çiçek metanol özütü HeLa ve NRK-52E hücre hatlarına karşı önemli sitotoksik aktivite göstermiştir. Ayrıca, tohum metanol ekstresinin asetil ve butiril-kolinesteraz inhibitör aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Keskin ve ark. 2017).

2.5.4. *Hypericum* Türlerinin Antidepresan Özellikleri

Depresyon; sensomotorik duyarlılığın azalmasının en hafif biçimi, ruhsal veya bedensel düşkünlük durumu, genel davranışların hafif derecede azalması, sensomotorik duyarlılığın azalmasıdır (TDK 2018).

Günümüzde psikiyatrik sorunların varlığı dikkat çekecek ölçüde artmıştır. Bu hem bireysel hem de toplumsal boyutta önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Depresyon nüfusun %10'unu etkilemektedir. Dünya çapında ise 340 milyon kişi bu hastalığa yakalanmıştır. 2020 yılında depresyonun dünyanın önde gelen hastalıkları arasında 2. sırada olacağı düşünülmektedir. Avrupa, Kuzey Afrika, Kuzey Amerika ve Çin'de çok yaygındır.



Şekil 2.3. Depresyon ve diğer yaygın ruhsal bozuklukların oranları (WHO 2017)

Depresyon belirtileri; mutsuzluk, ilgisizlik, karamsarlık, özgüven eksikliği, suçluluk, konsantre olamama ya da iş, libido kaybı, uykusuzluk, motivasyonsuzluk ve

iştah kaybıdır. Yapılan son çalışmalara göre, beyindeki serotonin, dopamin ve noradrenalin seviyesindeki azalmanın depresyona neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle depresyon hastalığını tedavi etmenin bir yolu MAO-A enzimini inhibe ederek bu nörotaşıyıcıların seviyesini yükseltmektir. Bu tür ilaçlara “MAO-A inhibitörü” denir (Keşkek 2016).

Anti-depresan etkisiyle tıp sektörünün dikkatini çeken, *H. perforatum*’dan elde edilen hiperisin bileşiği “Monoamin Oksidaz İnhibitörü” olarak etki gösterir (Erol 2017). Muller ve Russol (1994), Bladt ve Wagner (1994), Perovic ve Muller (1995), Bol’shakova ve ark. (1997), yaptıkları çalışmalarında bileşiğin etkisinin merkezi sinir sistemindeki post sinaptik (sinir hücrelerinin bağlantı sonrasında bulunan bölge) reseptörler tarafından, serotonin hormonunun geri alınmasını engelleyerek çalıştığını, bu konuda da hiperisinin uygulanma dozları, kullanım süresi, etki ettiği yaş grubu, yağın hareketiyle ilgili olarak birçok çalışma olduğu bilinmektedir. (Muldner ve Zoller 1984, Sommer ve Harrer 1994, Woelk ve ark. 1994, Witte ve ark. 1995, Linde ve ark. 1996). Hiperisin bileşiğinin görülen depresyon semptomlarını ortadan kaldırdığı, bilinç açarak anlama ve algılama gücünü arttırdığı, yorgunluk, donukluk ve uyku halini gidererek kullanıldığında dinçlik görüldüğü tespit edilmiştir (Okpanyi ve ark. 1990, Jhonson ve ark. 1994, Hubner ve ark. 1994). Sommer ve Harrer (1994), Witte ve ark. (1995) ve Linde ve ark. (1996), yaptıkları araştırmalarda anti-depresan yönüyle önemli bir etkiye sahip olan bu bileşiğin hiç bir yan etkisinin olmadığını bildirmişlerdir.

H. perforatum depresyon rahatsızlığının tedavisindeki kullanımıyla dünya genelinde iyi tanınan tıbbi bir bitkidir. *Hypericum* ekstratları içerisinde antidepresan etkinin daha ziyade hiperforin, hiperisin ve kuersitrinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Westerhoff ve ark., 2002).

H. perforatum İsviçreli hekim Paracelsus’un zamanından beri (ca. 1493–1541), nevroz, anksiyete, nevroz ve depresyon gibi psikiyatrik bozuklukların tedavisinde Avrupa’nın geleneksel tıbbında yüzyıllardır kullanılmaktadır (Reuter 1998, Rasmussen 1998).

H. perforatum, hafif ve orta düzeyde depresyon ve nevroz bozuklukları için en etkili tedavi olarak kabul edilmektedir (Wada ve ark. 2002, Puri ve ark. 2006, Moretti ve ark. 2009).

Hypericum'un tüm türleri sakinleştirici, antiseptik ve antispazmodik olarak kullanılıyorken özellikle *H. perforatum*, Avrupa'da düşük ve orta dereceli depresyon tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Fiebich ve ark. 2011, Camas ve ark. 2014).

H. perforatum plasebo, trisiklik antidepresanlar ve selektif serotonin gerilim inhibitörü (SSGİ) grubu standart antidepresanlar ile yan etkileri ve ilaç etkileşimleri bakımından karşılaştırma yapılan birçok çalışma mevcuttur. *H. perforatum* ekstraktlarının hafif orta dereceli ve major depresyon hastalarında plaseboya göre çok daha etkin olduğu tespit edilmiştir (Lehrl ve Woelk 1993, Hübner ve ark. 1994, Hansgen ve Vesper 1996, Laakmann ve ark. 1998, Kalb ve ark. 2001, HDTs Group 2002, Lecrubier ve ark. 2002, Philipp ve ark. 1999, Kasper ve ark. 2006, 2008 a,b).

H. perforatum ekstraktları trisiklik antidepresanlar ile karşılaştırıldığında trisiklik antidepresanlar kadar etkin olduğu ve bu ilaçlardan daha iyi tolere edildiğini bildiren çok sayıda çalışma da mevcuttur (Bergmann ve ark. 1993, Harrer ve ark. 1994, Wheatley 1997, Philipp ve ark. 1999, Woelk 2000).

Antidepresan olarak kullanımı, klinik veriler tarafından bugüne kadar desteklenen tek bitkisel preparat olan *H. perforatum*'un Avrupa İlaç Ajansı tarafından kabul edilmiş yerleşik bir tıbbi kullanımı mevcuttur (EMA 2009).

Major depresif bozukluk tanısı alan 33 çocuktan oluşan 6-16 yaş arası açık etiketli bir pilot çalışma, 8 hafta sonunda hastaların %75'inin (n=25) yanıt kriterlerini karşıladığı kanıtlanmıştır. Sekiz hafta boyunca uygulanan 450-900 mg *H. perforatum*'un etkili bir tedavi olduğunu tespit edilmiştir (Findling ve ark. 2003).

Çocuklarda depresyonu tedavi etmek önemli bir zorluk teşkil eder ve maalesef geleneksel antidepresanlar, bu popülasyonda yer alan sayısız yan etki nedeniyle çoğu zaman iyi tolere edilmez. Bu nedenle, St. John's Wort, üstün güvenlik profili nedeniyle antidepresanlara olası bir alternatif olarak araştırılmıştır (Monograf 2014).

Genellikle *H. perforatum*'un antidepresan ilaç olarak kullanılmasının (Bombardelli ve Morazzoni 1995), yanı sıra birçok çalışmada karaciğer hipertrofinin, akciğer enfeksiyonunun, jeneralize anksiyete bozukluklarının, somatoform rahatsızlıkların, uyku bozukluklarının, şizofreninin, obsesif kompulsif rahatsızlığın ve mevsimsel duygulanım bozukluğunun tedavisinde de etkili olduğu kanıtlanmıştır (Newell ve ark. 1996).

2.5.5. *Hypericum* Türlerinin Yara İyileştirici Özellikleri

Halk tıbbında yaraların ve yanıkların iyileşmesini hızlandırmak için *H. perforatum*'un tropikal olarak uygulanması çok yaygın bir kullanım şeklidir. Bitkinin bu etkisinin bir kısmının antibakteriyel aktivitesinden kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Saddiqe ve ark. 2010). Bitkinin içerdiği hiperisin, amentoflavon ve hiperforin gibi kimyasal bileşikler bitkinin antiviral, antiinflamatuvar ve antibakteriyel olarak kullanılmasını sağlıyor. *H. perforatum* ile yapılan *in vivo* ve *in vitro* ortam çalışmalarında fibroblast göçünü hızlandırdığı, kollajen depolanmasını arttırdığı, enflamasyon periyodunu kısalttığı ve daha iyi epitelizasyonu gerçekleştirdiği ispat edilmiştir (Altan ve ark. 2015).

Aynısefa (*Calendula* sp.) ve *H. perforatum* yağ karışımı (30:70) ile buğday tohumu yağı ve plasebo karışımı yara iyileştirebilme etkileri bakımından karşılaştırılmıştır. Bu çalışma sezaryen yoluyla doğum yapmış 24 hasta üzerinde gerçekleştirilmiştir. Aynısefa ve kantaron yağı karışımı uygulanan hastaların ameliyat kesiğinde kapanma oranı %38 iken plasebo ve buğday tohumu yağı uygulanan hastalarda bu oran %16 olmuştur (Lavagna ve ark. 2001). Yara iyileştirici yağlı preparatın aktif ana maddesinin de hiperforin olduğu tespit edilmiştir (Maisenbacher ve Kovar 1992).

Hindistan'da *H. hookerianum* ve *H. patulum* türlerine ait yapraklar yara iyileştirici olarak kullanılmaktadır. Mukherjee ve ark. (2000), bu iki türün metanolik ekstarktının farelerde kesik yaralarını bitiştirici, doku yenileyici ve yara yüzeyinde epitelyum oluşumunu hızlandırıcı etkileri olduğunu tespit etmişlerdir.

İspanya'nın Kanarya takımadalarına has endemik tür olan *H. reflexum*'un metanollü ve sulu ekstraktlarının farelerde asetik asit uygulaması ile oluşturulan ağrıları ve tetrakanoliforbol asetat uygulaması ile oluşturulan kulak ödemi büyük ölçüde azalttığı; bu nedenle *Hypericum reflexum*'un ağrılı ve iltihabi rahatsızlıkların tedavisinde kullanılabileceği ortaya konulmuştur (Sanchez-Mateo ve ark. 2006). Başka bir tür olan *Hypericum perforatum*'u çocuklarda kulak ağrısı tedavisinde kullanılmaktadır (Sarrell ve ark. 2003).

2.6. Ekonomik Önemi

Günümüzde bitkilerle tedavi her geçen gün artmaktadır. Dünya genelindeki nüfusun %60'ı ve gelişmekte olan ülkelerdeki nüfusunun %80'i tedavi ihtiyaçlarını büyük oranda tıbbi bitkilerden karşılamaktadır (Dhillon ve ark. 2002). Bitkilerden elde edilen yaklaşık 100.000 adet biyolojik aktif bileşen tespit edilmiş olup bu sayı her sene artmaktadır (Penna, 2001). Bugün dünya üzerinde kabul görülmüş ilaçların %25'i ve 121 adet etken madde bitkisel kökenlidir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından temel olarak kabul edilmiş 252 ilacın 28'i (%11.1) bitkisel kökenli olup önemli bir bölümü de doğal hammaddelerden elde edilen sentetik ilaçlardır (Hoareau ve DaSilva, 1999). Tıbbi ve aromatik bitkilerin piyasasının 2017 yılında 107 milyar dolara yaklaştığını, bundan en yüksek payı da Kuzey Amerika ülkeleri ile Avrupa ve Japonya'nın aldığını saptanmıştır (Aydın 2018).

Hypericum türleri de tıbbi ve ekonomik bitkiler arasında yer almaktadır. İlaç yapımında çok geniş bir yelpazede kullanım alanları mevcuttur. *H.perforatum*'un ticari ekstraktlarının antidepresan ilaç olarak kullanımı tüm dünyada yaygındır. Almanya'da reçeteli olarak en çok satılan 7. ilaç, lisanslı *Hypericum* L. preparatlarıdır (Solgar 2012). Amerika ve Almanya'da depresyon tedavisinde sıklıkla başvurulmuş bu bitkiden hazırlanan preparatların satışı Amerika'da 270 milyon doları, dünyada ise 570 milyon doları aşmıştır (Grünwald 1999). Ülkemizde Karadeniz Bölgesi'nde *H. perforatum* türü ve benzer diğer türleri doğadan toplanıp yurtiçi ve yurtdışı pazarlara satılmaktadır (Çırak ve ark. 2005).

Hypericum ürünleri birçok ülkede besin takviyeleri olarak satılmaktadır. *H. perforatum*'un besin takviyesi olarak 2015 yılında ABD'de 6 milyon dolarlık satışı yapılmıştır (Smith ve ark. 2016). Başlıca Avrupa üretim bölgeleri Almanya (2003 yılında 600 ha'dan fazla, Gärber ve Schenk 2004), Polonya ve Mallorca'da bulunmaktadır (Roth 1990, Schempp ve ark. 2002, Gaudin ve ark. 2003). Avrupa Konseyi tarafından hiperisin ve xanthone'larda sınırlamalarla doğal bir gıda aroma kaynağı (kategori 5) olarak sınıflandırılmıştır (Council of Europe 2000).

Hypericum türleri bu kullanımları dışında bitkisel çay olarak ve aynı zamanda kırmızı ve sarı boya üretmek için kullanılmaktadır.

2.7. Nanopartiküller

Nanoteknolojinin tanımı, Yunanca “cüce” anlamına gelen “nano” önekiyle dayanmaktadır. Daha teknik terimlerle, “nano” kelimesi 10^{-9} veya bir şeyin milyarda biri anlamına gelir (Joseph ve Morrison 2006). Yaşamın her yönünün nano dokunuşu olduğu dönem olan “Nano Çağ”da yaşıyoruz. 2000’li yılların başında, nanoteknolojide 35’ten fazla ülkenin araştırma programlarını açmasıyla nano dönem başlamıştır. Nano dönem, mühendislik üretimi nanomateryallerin (MÜN) üretiminde istikrarlı bir artışı beraberinde getirmiştir (Roco 2003). 1-100 nm arasında değişen boyutlardaki nanopartiküller, geniş yüzey alanlarına, daha küçük boyutlarına atfedilen spesifik fiziko-kimyasal özelliklere ve büyüklüklerine oranla yüksek reaktiviteye sahiptirler (Yadav ve ark. 2013). Nanomateryallerin (Nm) küçük boyutu, spesifik hücresel bölgelere nüfuz etmelerine yardımcı olur ve bunların ek yüzey alanı, daha fazla adsorpsiyon ve hedeflenen maddelerin dağıtılmasında kolaylık sağlamaktadır (Kashyap ve ark. 2015).

Eşdeğer hacimli malzemelerle karşılaştırıldığında daha yüksek yüzey alanı-hacim oranı ve reaktivite gibi mühendislik çalışmalarıyla üretilmiş nanomateryallerin özel karakteristikleri, farklı teknolojilerde kullanımlarına izin vermiştir (Zuverza-Mena ve ark. 2016). Üretim, elektronik, iletişim, ilaç, su ve atıksu arıtma, kişisel bakım, tarım ve gıda paketlenme teknolojileri, karbon bazlı [fullerenler, grafen ve karbon nanotüpler (CNT’ler)] ve metal bazlı (Kuantum noktaları, metal ve metal oksit) MÜN’lerin kullanıldığı rapor edilmiştir (Klaine ve ark. 2008, Peralta-Videa ve ark. 2011, Roco ve ark. 2011, Bandyopadhyay ve ark. 2013). Ayrıca, nano (n) ölçekli boyutlarda üretilen MÜN’ler genellikle dört tipte gruplandırılmıştır: Karbon bazlı, metal bazlı, metal oksitler, dendrimerler ve kompozitler (Yu-Nam ve Lead 2008). MÜN’ler bitki bilimi de dahil olmak üzere neredeyse bütün bilim alanlarında devrim yarattılar. Nanomateryaller yaşam döngüsünün her aşamasında bitkileri etkilediği gösterilmiştir (Canas ve ark. 2008, Lahiani ve ark. 2013, Siddiqui ve Al-Whaibi 2014, Liu ve ark. 2016).

2.7.1. Nanopartiküllerin Bitkiler Üzerinde Oluşturduğu Özellikleri

Nanopartiküller bitkilerin fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri üzerinde birçok etki meydana getirebilmektedir. Nanopartiküllerin oluşturduğu etkiler bitki türüne,

nanopartikülün cinsine, boyutuna, verilme şekline ve süresine bağlıdır. Bu çalışmada kullanılan nanopartiküller de dahil olmak üzere bazı nanopartiküllerin bitkilerde oluşturdukları etkiler ayrıntılı olarak rapor edilmiştir.

2.7.1.1.Çinko (Zn) Nanopartiküller

Çinko hücre zarlarının yapısal stabilizesinin korunmasında ve sürdürülmesinde temel bir rol oynar (Welch ve ark. 1982, Çakmak 2000). Çinko çevresel strese toleransta, hücre uzamasında, membran fonksiyonunda ve protein sentezinde kullanılmaktadır (Çakmak 2000). Çinko bakımından fakir olan topraklarda yetişen bitkilerde çinko eksikliği görülür ve bitkiler zayıf fide mücadelesine sahip olurlar (Yılmaz ve ark. 1998). Gelişmiş bitkiler Zn'yi divalent katyon olarak genellikle enzimlerin metal bileşeni, fonksiyonel bir yapı veya çok sayıda enzimin düzenleyici kofaktörü olarak absorbe ederler. Bitkilerin büyümesi ve verimliliği için çinkonun rolüve gerekliliği bir grup araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (Camp ve Fudge 1945, Chapman 1966, Viets 1966, Anderson 1972, Mengel ve Kirkby 1978, Marschner 1993, Brown ve ark. 1993, Fageria ve ark. 2002).

Çinko elementinin bitkiler tarafından kolaylıkla alınabilmesi için nanoboyutta çinko sentezi yapılmaktadır. Nanoboyuttaki çinko oksit [nano (n)-ZnO] optik, antimikrobiyal, geniş bant aralığı, artan katalitik verim ve yüzey alanı gibi benzersiz özelliklerinden dolayı geniş bir uygulama alanına sahiptir (Kołodziejczak-Radzimska ve Jesionowski 2014). Nano boyut davranışta, reaktivitede ve toksisitede önemli rol oynar. Bu yönleri düşünüldüğünde nanopartiküllerin bitkiler için birçok olumlu etkisi olabildiği gibi olumsuz etkilerinin olabileceği de unutulmamalıdır.

Prasad ve ark. (2012), *Arachis hypogaea* L.'yi 3 saat boyunca 1000 mg/L ZnO nanopartikül süspansiyonuna maruz bırakmış ve çimlenme ile fide canlılığında artış olduğunu tespit etmiştir. Öte yandan, ZnO nanopartiküllerin 2000 mg/L konsantrasyona sahip bir süspansiyonunda 2 saat süreyle inkübe edilen mısır çekirdekleri çimlenme inhibisyonu göstermiştir (Lin ve Xing 2007).

Bezelyenin (*Pisum sativum*) ZnO nanopartiküllere maruz kalması kök uzunluğuna etki edip birinci ve ikinci derece lateral köklerin sayısını azaltmıştır (Huang ve ark. 2014). ZnO nanopartiküllerine maruz kalan turp (*Raphanus sativus*), kolza (*Brassica napus*), çavdar (*Lolium sp.*), marul (*Lactuca sativa*), mısır ve salatalık

fidelerinde de daha kısa kök oluşumu gözlemlenmiştir (Lin ve Xing 2007). Ayrıca Yoon ve ark. (2014), büyüme ortamı olarak toprağı ve 500 mg/kg'lık bir ZnO nanopartikül konsantrasyonunu kullanarak benzer sonuçlar bildirmiştir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, 250 mg/kg'a kadar olan konsantrasyonlarda ZnO nanopartikülleriyle iyileştirilen toprakta yetiştirilen domates (*Solanum lycopersicum*) fidelerinin boyunun arttığı tespit edilmiştir (Raliya ve ark. 2015).

Çinko fitotoksitesisi daha küçük yaprak oluşumu ve antosiyanin üretiminden dolayı genç yaprakların kızarmasıyla sonuçlanabilen klorozisi ortaya çıkardığı rapor edilmiştir (Masarovičová ve ark. 2003). Ağır durumlarda bitkilerin, yapraklarında nekrotik lezyonlar oluşabilmekte ve bu süreç yaprakların ölümüyle sonuçlanabilmektedir (Harmens ve ark. 1993). Nanopartiküller reaktif oksijen türlerinde (ROS) artışa neden olmalarından dolayı hücre ile temas halindeki lipid membran peroksidasyonu artırabilir (Nel ve ark. 2006). Bitkiler bu toksik karşılıkların üstesinden gelmek için ROS temizleyici enzim üretimini artırır. ZnO np'lerin *Cyamopsis tetragonoloba* L. ve *S. lycopersicum*'a yapraktan uygulanması biyokütle, klorofil ve toplam çözünebilir yaprak protein içeriğı açısından olumlu bir tepki gösterdiği bildirilmiştir (Raliya ve Tarafdar 2013, 2015).

Kumari ve ark. (2011), Zn^{2+} iyonları ile karşılaştırıldığında ZnO np'lerin daha yüksek toksisiteye sahip olduğunu, soğandaki(*Allium cepa*) hidroponik bir çalışmaya dayanarak rapor etmişler. Fakat Wang ve ark. (2013), ZnO nanopartikülleri veya iyon Zn ile iyileştirilmiş toprakta börülcenin (*Vigna unguiculata*) büyümesi ve gelişimi açısından hiçbir fark göstermediğini belirtmişlerdir. Bu sonuçlar nanopartikül-bitki etkileşimlerinde hidroponik ve toprak deneyleri arasında farklılık olduğunu göstermektedir.

Başka araştırmacılar tarafından yapılan çalışmalarda reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, farklı ürün bitkilerinin (*Lolium perenne*, *Glycine max*, *Cucumis sativus* ve *Triticum aestivum*) yapraklarında oluşturduğu sarı pigmentasyonlar ve birlikte nekrotik lezyonların oluşumundan dolayı ZnO nanopartiküller büyük ölçüde fitotoksik olarak bildirilmiştir (Lin ve Xing 2008, Lopez-Moreno ve ark. 2010, Kim ve ark. 2012). Toksisitenin etkileri nanopartiküllerin büyüklüğü ve metal iyonlarının çözünmesi ile

bitki hücrelerine alım ve translokasyonlarına bağlıdır (Franklin ve ark. 2007, Jiang ve ark. 2009). Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerin bazı bitkiler üzerinde göstermiş olduğu etkiler Çizelge 2.2.'de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Çinko oksit (ZnO) nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki etkileri

Bitki	Np Boyut (nm)	Np konsantrasyon (ppm)	Büyüme ortamı/Np'nin verilme şekli	Np'nin Verilme süresi	Fizyolojik/ Biyokimyasal etkileri	Referans* (Du ve ark. 2017'den değiştirilerek)
Farekulağı teresi	44.4	400, 2000, 4000 mg/L	Agar-Yarı güçteki MS, büyüme ortamındaki nanopartiküller	18 gün	Tohum çimlenmesine engelleyici etkiler Kök uzamasına ve toplam yaprak sayısında inhibe edici etkiler.	Lee ve ark. 2010
Farekulağı teresi	<100	100 mg/L	MS ortamı-6 haftalık bitkilerin büyüme ortamlarına np'ler eklendi	7 gün	Bitki biyokütlesinde% 81,4 azalma. Tohum çimlenmesine engelleyici etkiler. 660 yukarı regüle edilmiş gen ve 826 aşağı regüle edilmiş gen	Landa ve ark. 2012
Mısır ve lahana	10	0.1-1000 mg/L	<i>In vitro</i> -np'lerin süspansiyonundaki yetiştirilen tohumlar	6-7 gün	Her iki bitkide de çimlenme ve kök uzama sonuçları serbest iyonlara kıyasla daha düşük NP toksisitesi göstermiştir.	Pokhrel ve Dubey 2013
Kolza, turp, çavdar, marul, mısır ve salatalık	20	2000 mg/L	<i>In vitro</i> -Tohum aşılama	2 saat	Zea mays'ta çimlenme inhibisyonu gözlemlendi. Bütün bitki türlerinde kök büyümesi inhibisyonu gözlemlendi	Lin ve Xing., 2007
Pirinç	<100	10, 100, 500, 1000 mg/L	<i>In vitro</i> -Tohum aşılama	1, 2 ve 3 gün	Tohum çimlenmesi üzerinde etkisi gözlenmedi. Kök uzunluğu ve sayısı azaltıldı	Boonyanitipong ve ark. 2011
Soya fasulyesi	<50	50 ve 500 mg/toprak kg	Toprak-Kök	8-9 hafta	Önemli oranda uzunluğu, yüzey alanını, toplam kök ve gövde hacmini azaltmıştır. 500 mg/kg dozda ortalama gövde çapını düşürmüştür.	Yoon ve ark. 2014
Buğday Turp Burçak	<100	1000 mg/L	Toprak-Kök	21 gün	Turp çimlenmesini inhibite etmiştir. Burçağın sürgün uzunluğunu artırmıştır.	Garcia-Gomez ve ark. 2015

2.7.1.2. Alüminyum (Al) Nanopartiküller

Nano-alüminyum birçok sektörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ekosistemin önemli bir bölümünü oluşturan yüksek bitkiler ile nano materyallerin etkileşimi sürpriz sonuçlar doğurabilir (Nair ve ark. 2010).

Herhangi bir modifikasyona tabi tutulmayan saf alüminyum oksit (13 nm) nano tanecikleri mısır (*Zea mays*), salatalık (*Cucumis sativus*), soya fasulyesi (*Glycine max*), havuç (*Daucus carota*) ve lahana (*Brassica oleracea*) bitkileri üzerinde denenmiştir. Bu bitkilerde kök uzunluğunu azaltmıştır bu nedenle bu bitkilerin büyümesini geciktirmiştir (Yang ve Watts 2005). Fakat nanopartiküller fenantren ile yüklenince (polisiklik aromatik hidrokarbonların önemli bir bileşeni), toksisiteleri önemli ölçüde azalmış ve bitki kökleri üzerinde herhangi bir olumsuz etki göstermemiştir (Nair ve ark. 2010).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Al₂O₃ ve onun karboksilat ligand kaplama tanecikleri (100nm büyüklüğünde), Kaliforniya kırmızı böbrek fasulyesi (*Phaseolus vulgaris*) ve çavdar otu (*Lolium perenne*) üzerindeki çalışıldı ve bitkilerin büyümesi üzerine olumsuz etkisi olmadığı belirtilmiştir (Lin ve Xing 2007, Doshi 2008). Al₂O₃ nanopartiküllerin bazı bitkiler üzerinde gösterdiği etkiler Çizelge 2.3.'te verilmiştir.

Çizelge 2.3. Alüminyum oksit (Al₂O₃) nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki etkileri*

Bitki	Np Boyut (nm)	Np konsantrasyon (ppm)	Büyüme ortamı /Np'nin verilme şekli	Np'nin Verilme süresi	Fizyolojik/ Biyokimyasal etkileri	Referans *(Du ve ark. 2017'den değiş.)
Su mercimeği	20	Yığın halde alüminyum 1-1000 mg/L ⁻¹	Yarı kuvvette Hutner's medium- Besi ortamına karıştırılarak	7 gün	Büyümeyi teşvik edip biyokümenin artışında rol oynamıştır	Juhel ve ark. 2011
Mısır Salatalık Soya fasulyesi Lahana Havuç	13	2 mg/ml	Milli-Q su- Kök	24 saat	Test edilen tüm türlerde kök büyümesini inhibite etmiştir.	Yang ve Watt 2005
Farekulağı teresi	150	400, 2000 ve 4000 mg/L	Yarı kuvvette MS ortamı- Kök	18 gün	Çimlenmesi ve yaprak sayısı üzerinde etki göstermemiştir. Kök uzamasını artırmıştır	Lee ve ark. 2010
Tütün	-	0.1, 0.5 ve %1	MS ortamı- Kök	3 hafta	Verilen konsantrasyona bağlı olarak biyokütle, kök uzaması ve yaprak sayısını inhibe etmiştir	Sheykhabaglou ve ark. 2010
Tütün	-	100, 500, 1,000 mg/L	Petri kapları- Tohumlar üzerine uygulama	3 hafta	Doza bağlı olarak fidelerinin yaprak sayısında, ortalama kök uzunluğu ve ortalama biyokütlede azalma meydana gelmiştir.	Burklew ve ark. 2012

2.7.1.3. Demir (Fe) Nanopartiküller

Nano FeOx'in organizmalar tarafından nadiren alınmasından dolayı çevre için genel olarak toksik değildir. 20 nm'den büyük nanopartiküllerin hücre duvarlarına nüfuz edemediği düşünüldüğünde, nFeOx plazma membranları boyunca taşınmadığı bildirilmiştir (Rico ve ark. 2013 a,b,c; Martínez-Fernandez ve ark. 2016).

Nano FeOx'un bitkiler üzerindeki etkileri, bitki köklerinin yüzeyinde partiküllerin toplanmasıyla ilişkilidir. nFeOx'un tıkanma etkileri, yeterli su alımını engelleyerek, kök hidrolik iletkenliğini azalttığı tespit edilmiştir (Ma ve ark. 2013 a,b; Martínez-Fernandez ve ark. 2015). Martínez-Fernandez ve ark. (2016), ayçiçeği sürgünlerinde makro besinlerde (Ca, K, Mg ve S) bir azalma olduğunu bulunmuştur. Bunun, suda çözünmüş besinleri değiştiren nFeOx'un su engelleme etkilerinden

kaynaklandığı düşünülmektedir. Örneğin, $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ ile muamele edilen bitkilerde antioksidan enzim aktivitelerindeki artış, $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ 'ün doğrudan etkilerinden ziyade mineral alımının bozulmasıyla ilgili olduğu ileri sürülmüştür (Trujillo-Reyes ve ark. 2014). Lipit peroksidasyonundaki artış, $n\text{Fe}_3\text{O}_4$ 'ün aquaporinleri tıkanması ve kökteki solunum oranının bozulmasından kaynaklanmaktadır (Wang ve ark. 2011 a,b). Nano FeOx kök iletkenliğinde azalmaya neden olduğundan özellikle magnezyumun (Mg) yeterli miktarda taşınmasına engel olmaktadır. Bu nedenle yapraklarda klorofil birikimi azalır çünkü Mg klorofil senteziyle ilişkilidir (Ma ve ark. 2013 a,b; Trujillo-Reyes ve ark. 2014; Martínez-Fernandez ve ark. 2016). Nano FeOx bitkiler için toksik değildir, fakat kök yüzeyine potansiyel bağlılıkları nispeten yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında bitkilerde olumsuz etkilere neden olduğu belirlenmiştir (Zuverza-Mena ve ark. 2016).

Delfani ve ark. (2014), Fe ve Mg nanogübre uygulamasının bakla başına tohum sayısını ve kara gözlü bezelye de tohumunun protein içeriğini önemli ölçüde iyileştirdiğini rapor etmiştir. Fe_2O_3 nanopartiküllerin bazı bitkiler üzerinde gösterdiği etkiler Çizelge 2.4.'te verilmiştir.

Çizelge 2.4. Demir (III) oksit (Fe_2O_3) nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki etkileri*

Bitki	Np Boyut (nm)	Np konsantrasyon (ppm)	Büyüme ortamı/ Np'nin verilme şekli	Np'nin Verilme süresi	Fizyolojik/ Biyokimyasal etkileri	Referans *(Du ve ark. 2017'den değiştirilerek)
Ayçiçeği	20-100	50, 100 mg/L	Perlit substratı, Sonrahidroponik-20 gün sonra, NP'ler büyüme ortamına dahil edildi	5 gün	Alım ve translokasyonsızlığı, Kökün hidrolik iletkenliğinin azaltma	Martínez-Fernandez ve ark., 2016a
Farekulağı teresi	22-67	4 mg/kg (72mM)	Agar-Nanopartiküller agar içinde	0, 7, 12, 18, 56 gün	Daha az klorofil, düşük bitki biyokütlesi	Marusenko ve ark., 2013
Marul, turp, Salatalık	246	1000 mg/L	Sulu Petri kabı-Nanopartiküller büyüme ortamında	3 gün	Tohum yüzeylerinde adsorbe eğilimi	Wu ve ark., 2012
Soya fasülyesi	-	0, 0.25, 0.5, 0.75, 1 g/L	Tarlada-Püskürtme	Olgunlaşma sürecine kadar farklı evrelerde püskürtme	Artan yaprak ve kuru baklagil ağırlığı, Tanecik veriminde% 48 artış	Sheykhabglou ve ark., 2010
Farekulağı teresi	<50	400, 2000 ve 4000 mg/L	Yarı kuvvette MS ortamı-Kök	18 gün	Yaprak üzerinde etkili olmamıştır. Kök uzamasını azaltmıştır.	Lee ve ark. 2010
Ispanak	-	100, 150 ve 200 mg/L	Hidroponik kültür-Kök	45 gün	200 mg/L yaş ve kuru ağırlık önemli ölçüde azalmıştır.	Jeyasubramanian ve ark. 2016

2.7.1.4. Titanyum (Ti) Nanopartiküller

Titanyum dioksit (TiO₂) nanopartikülleri diğer nanopartiküller gibi bitkiler üzerinde çeşitli etkiler oluşturmaktadır. Zheng ve ark. (2005), nano TiO₂'nin (5nm, %0.254) ıspanak tohumlarının su emilimini arttırdığını ve çimlenmenin hızlanmasını sağladığını bildirmişlerdir. Nano ölçekli TiO₂, ıspanak büyümesini ve fotosentezi teşvik ettiğide belirtilmiştir (Hong ve ark. 2005, Yang ve ark. 2006).

Titanyum nanopartiküllerin fotokatalitik özellikleri nedeniyle, TiO₂ nanopartiküllerinin yaprak seviyesinde kullanıldığı çalışmaların çoğu, bitki üzerinde olumlu etkiler göstermiştir (Gao ve ark. 2008, Jaberzadeh ve ark. 2013, Raliya ve ark. 2015). TiO₂ nanopartiküllerinin etkisi altındaki ıspanak bitkisinin, taze ve kuru ağırlığında %60'dan fazla artış olduğu rapor edilmiştir (Gao ve ark. 2008). Araştırmacı ayrıca fotosentezde rubisco aktivazının miktarındaki ve aktivitesindeki artışı da gözlemlemiştir. Domatese (*Solanum lycopersicum*) nTiO₂'nin yaprak uygulaması, klorofil konsantrasyonunda ve meyve veriminde artış ile daha iyi bir bitki büyümesi gösterdiği rapor edilmiştir (Raliya ve ark. 2015).

Jaberzadeh ve ark. (2013), nTiO₂'nin ekmeklik buğdayın (*Triticum aestivum* L.) tarımsal özelliklerini geliştirerek su stresine karşı koyduğunu tespit etmişler. Feizi ve ark. (2012), nTiO₂'ye (20 nm, 1-500 mg/L), maruz kalan buğday tanelerinin çimlenmesinde değişiklik olmadığını, 10 mg/L TiO₂ uygulamasının ise tohumların çimlenme süresini kısalttığını bildirmişlerdir. Fakat Castiglione ve ark. (2011), nTiO₂'nin (<100 nm, %0.2-4.0) *Vicia narbonensis* tohumlarında çimlenmeyi geciktirdiğini rapor etmiştir.

Titanyum dioksit (TiO₂) nanopartiküllerin bazı bitkiler üzerinde gösterdiği etkiler Çizelge 2.5.'te verilmiştir.

Çizelge 2.5. Titanyum dioksit (TiO₂) nanopartiküllerin bitkiler üzerindeki etkileri*

Bitki	Np Boyut (nm)	Np konsantrasyon (ppm)	Büyüme ortamı/Np'nin verilme şekli	Np'nin Verilme süresi	Fizyolojik/ Biyokimyasal etkileri	Referans *(Du ve ark. 2017'den değiştirilerek)
Su mercimeği	5-10	0, 10, 50, 100, 200, 1.000, 2000 mg/L	1/10 modifiye Steinberg besiyeri-Nano partiküllü ortam	30 günlük bitkiler, 7 günlük maruz kalma	Artan enzimatik aktivite SOD, CAT ve POD	Song ve ark. 2012
Ispanak	4-6	0.25%	nTiO ₂ içinde 2 gün önceden işlenmiş tohumlar, daha sonra Hoagland'ın NS'inde büyümüş-Fideler iki yaprak gösterdiğinde bir kez püskürtülür	45 günde hasat	Ispanak büyümesinde faydalı etkiler. Artan glutamat dehidrojenaz (GDH), glutamin sentetaz (GS) ve glutamik piruvik transaminaz (GPT) aktivitesi	Yang ve ark. 2006
Ada çayı	21	5, 20, 40, 60 ve 80 mg/L	Filtreli petri kabı-Kök	21 gün	Çimlenme oranını artırıp süresini düşürmüştür. Sürgün, kök, fide uzaması ve biyokütle üzerinde önemli bir etkisi olmamıştır.	Feizi ve ark. 2013
Tütün	<25	0.1, 1, 2.5 ve % 5	MS besi ortamı-Kök	3 hafta	Doza bağlı olarak çimlenme, bitki gelişimi, biyokütle ve kök uzamasını azaltmıştır.	Frazier ve ark. 2014
Mısır	25	300 mg/L	Hidroponik ortam-Çimlenmiş tohumlara uygulama	6 hafta	Yaprak büyümesi inhibe ve kök su taşınımı üzerindeki fiziksel etkiler yoluyla terleme	Asli and Neumann 2009

2.7.1.5. Bakır (Cu) Nanopartiküller

Bakır nanopartiküllerifarklı bitki türleri üzerinde denenmiştir. Bitki türüne göre bakır nanopartiküllerin meydana getirdiği etkiler farklılık göstermiştir. Bakır nanopartikülleri kabak bitkisinin köklerinin uzunluğunda azalmaya neden olmuştur (Stampoulis 2009). Marul tohumlarının çimlenmesinde ortama verilen Cu nanopartiküllerinin, kontrol bitkilerine kıyasla sürgünlerdeki kök oranını artırdığı rapor edilmiştir. Ayrıca marul tohumlarının Cu nanopartikülleri ile filizlenmesi, kontrol bitkileri ile karşılaştırıldığında kök filiz oranında bir artış gösterdiği belirtilmiştir (Shah ve Belozeroova 2009).

Cu nanopartiküllerine maruz bırakılan maş fasülyesi (*Phaseolus radiatus* L.) ve ekmeklik buğdayda (*T. aestivum* L.) büyüme oranının inhibite olduğunu ve nanopartikül konsantrasyonuyla fide boyunun negatif kolerasyonda olduğu tespit edilmiştir (Lee ve ark. 2008).

Bakır oksit (CuO) ve çinko oksit (ZnO) ile muamele edilen meyan kökü fidanlarının; antosiyanin, flavonoid, glisirizin, tanen vefenolik bileşiklerinin içeriğinde artış meydana geldiği saptanmıştır (Oloumi ve ark. 2015).

2.7.1.6. Gümüş (Ag) Nanopartiküller

Gümüş nanopartiküller bitki biyoteknolojisinde farklı amaçlar için kullanılmaktadır. Üçgen şekilli Ag nanopartiküller, küresel olanlardan daha biyoaktif olduğu bildirilmiştir (Pal ve ark. 2007). Kabak bitkisinin hidroponik solüsyonuna eklenen Ag nanopartikülleri kabak tohumlarının çimlenme ve kök büyümesine herhangi bir olumsuz etkide bulunmadığı ve Ag np'lerinin varlığında kabak büyümesi devam ederken biyokütle ve transpirasyonda bir azalma olduğu kaydedilmiştir (Stampoulis ve ark. 2009).

Ag nanopartiküllerin çeşitli fitopatojenleri kontrol etmek için birçok antimikrobiyal fonksiyonu olduğu tespit edilmiştir (Jo ve Kim 2009, Kim 2009). Ag nanopartiküllerin sitotoksik ve genotoksik etkileri, soğanın kök uçları kullanılarak incelenmiştir. Ag nanopartiküllerin hücre bölünmesi aşamalarını bozduğu ve hücre parçalanmasına neden olduğu saptanmıştır (Kumari ve ark. 2009).

Abdi ve ark. (2008), *Valeriana officinalis*'de bakteriyel kontaminasyonu kontrol etmek için Ag nanopartikülleri kullanmıştır. Bu süreç %89 kontaminasyon barındırmayan kültürlerle sonuçlandığı bildirilmiştir.

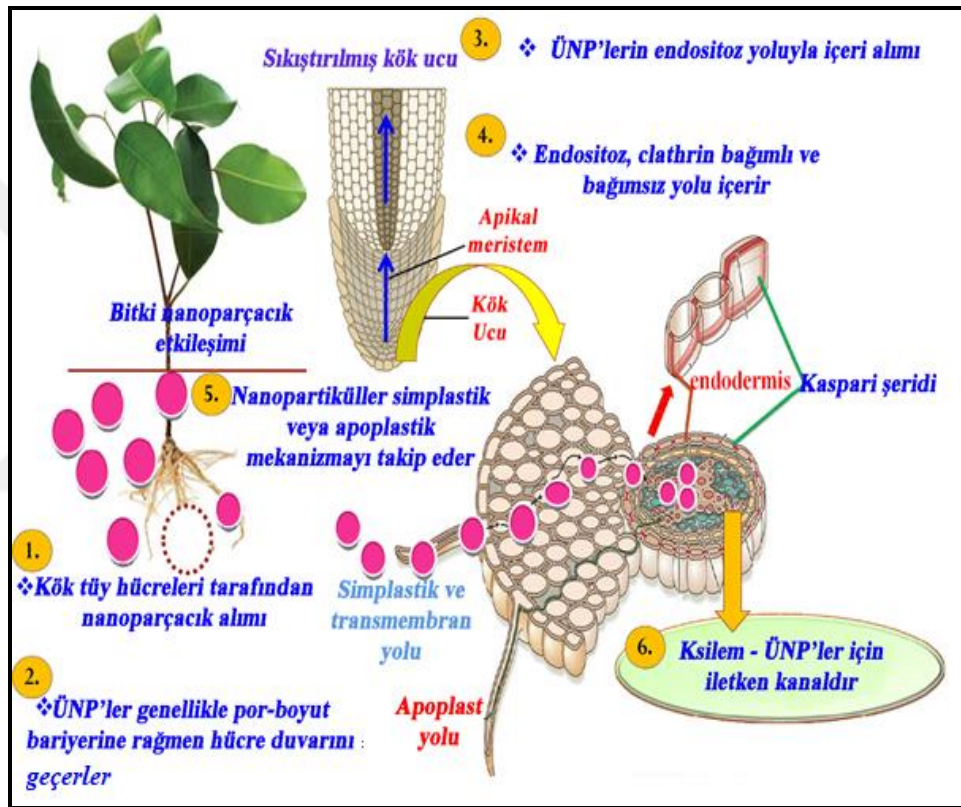
2.7.2. Nanopartiküllerin Bitkiye Giriş Mekanizmaları

Nanopartiküllerin bitkiler tarafından alınıp taşınması ve oluşturdukları etkilerle ilgili yapılmış bazı çalışmalar mevcuttur. Genel olarak çalışmalardan birbirini desteklemeyen farklı sonuçlar elde edilmiştir. Çünkü çalışmalarda kullanılan nanopartikülün türü, boyutu ve uygulandığı bitki türü sonuçların farklı olmasına neden olmuştur.

Bitkiler nanopartikülleri kökleri veya toprak üstü bölümleri vasıtasıyla alabilirler. Nanopartiküller bitkilerle etkileşime girdiğinde karşılaştıkları ilk engelingözenek boyutu 5 ile 20 nm arasında olan bitki hücre duvarı olduğu görülmüştür (Dietz ve Herth 2011). Küçük boyuttaki nanopartiküller daha büyük boyuttaki nanopartiküllere göre nispeten daha kolay bir şekilde bu tabaka boyunca ilerleyip plazma membranına ulaşabildiği saptanmıştır (Rastogi ve ark. 2017).

Bazı nanopartiküllerin bitkilerin hücre duvarında büyük gözeneklerin oluşumunu indükleyerek büyük nanopartiküllerin girişini kolaylaştırdığı tespit edilmiştir (Navarro

ve ark. 2008, Kurepa ve ark. 2010). Hücre duvarı porlarından geçemeyecek kadar büyük boyuttaki nanopartiküllerin aquaporinler (Miwa ve ark. 2010), endositozlar (Eggenberger ve ark., 2009), membran taşıma sistemleri (Gojon ve ark. 2009, Miwa ve ark. 2010), çevre ortamındaki organik kimyasallara veya taşıyıcı proteinlere bağlanma (Rico ve ark. 2011), hücre duvarı bileşenlerinin çapraz bağlanması ile yeni porlar yaratma (Fleischer ve ark. 1999) gibi farklı mekanizmaları bitki kök hücrelerine girebilmek için kullandıkları belirtilmiştir (Iannone ve ark. 2016). Nanopartiküllerin bitkilere giriş yolları Şekil 2.4.'te ayrıntılı olarak verilmiştir.



Şekil 2.4. Nanopartiküllerin bitkilere giriş yolları (Tripathi ve ark. 2017)

Nanopartiküllerin çeşidine göre floem ve ksilem vasıtasıyla diğer dokulara taşınabildiği veya kökte birikebildiği görülmüştür (Cifuentes ve ark. 2010). Nanopartiküllerin hücreler arasındaki hareketi plasmodesmata aracılığıyla ve hücreler içinde, onlar simplast ve apoplast üzerinden veya endo-ekzositoz ile taşınabildikleri kaydedilmiştir (Cifuentes ve ark. 2010, Rico ve ark. 2011, Chichiricò ve Poma 2015).

Yaprak yüzeyine uygulanan nanopartiküllerin ise stoma açıklıkları boyunca ya da trikom tabanları aracılığıyla, çeşitli dokulara translokasyon yoluyla girebildiği

araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Eichert ve ark. 2008, Fernandez ve ark. 2009, Uzu ve ark. 2010).

2.7.3. Nanopartiküllerin Sekonder Metabolit Sentezinde Kullanımı

In vitro koşullarda bitki hücre ve organ kültürleri ile sekonder metabolitlerin üretilmesi, geleneksel metotlara kıyasla belirgin avantajlara sahiptir. Kültür ortamlarının optimize edilmesi, uygun elisitörlerin kullanımı üretilen sekonder metabolit içeriğini önemli ölçüde artırabilir.

Hücre süspansiyon kültüründe ortamdaki mikro elementlerin miktarının düzenlemesi sekonder metabolit içeriğini artırmak için uygun bir strateji olduğu belirtilmiştir (Jimenez-Aparicio ve Gutierrez-Lopez 1999). Örneğin nikel, kobalt, bakır, çinko, demir gibi divalent metal iyonlarının sekonder metabolit üretimini etkilediği rapor edilmiştir (Trejo-Tapia ve ark. 2001). Bu metal iyonları, organizmaların büyümesini sağlayan proteinlerin aktivitelerinde önemli rol oynamalarına rağmen, yüksek konsantrasyonları canlı organizmalar için zararlıdır (Viehweger 2014). Nikel, kobalt, çinko ve manganez gibi metal iyonlar yüksek konsantrasyonlarda oldukça toksik olmalarına rağmen enzim aktivitelerini düzenlemek için gereklidir (Ovečka ve Takač 2014). Bakır (Cu^{2+}) ve kadminyumun (Cd^{2+}) *Catharanthus roseus*'te alkaloid üretimi üzerindeki pozitif etkisi tespit edilmiştir (De Backer-Royer ve ark. 1990). *Beta vulgaris*'ten betalains üretimi için kültür ortamına verilen kobalt (Co^{2+} , 1–5 μM 'ye kadar artışı) betalains üretiminde %60'a kadar artış sağlamıştır (Trejo-Tapia ve ark. 2001).

Mikroelementlerin nanopartikül olarak ortama verilmesi durumunda oluşturacağı etkiler, yeni bir araştırma konusu olup sonuçları henüz iyi bir şekilde tanımlanamamıştır. Çünkü nano boyutta maddelerin özellikleri değişiyor ve daha önemlisi yüzeyde atomların sayısı artış sağlıyor. Bir yüzeydeki atom sayısını artırarak, toplam serbest enerji de artacaktır ki bu da materyallerin bazı özelliklerini değiştirebilmektedir (Ghasemi ve ark. 2015). Bu fonksiyonlarıyla nanopartiküller, bitki biyoteknolojisinde, sekonder metabolit üretimi için yeni ve etkili elisitörler olma potansiyele sahiptirler (Fakruddin ve ark. 2012). *In vitro* kültür ortamındaki bitkilere verilen nanopartiküller, besin kaynağı ve elisitör olarak hareket edebilir (Kim ve ark. 2017).

Literatürde bu konuda yapılan çalışmalar mevcuttur. Örneğin *Artemisia annua*'nın saçak kök kültüründe gümüş nanopartiküller (Ag-SiO₂, çekirdek-kabuk) kullanılarak, artemisin içeriği artırılmıştır (Zhang ve ark. 2013).

H. perforatum'dan üretilen hiperisin ve hiperforin üretimini artırmak için hücre süspansiyon kültür ortamına çinko ve demir nano-oksitler verilmiştir. Çinko ve demir nano-oksitler uygulanan hücrelerin hiperisin ve hiperforin düzeyleri kontrol hücrelerine göre çok daha yüksek çıkmıştır. Bununla birlikte, yüksek konsantrasyonlardaki çinko ve demir nano- oksitlerin (150 ppb) hiperisin ve hiperforin üretimini üzerinde olumsuz etkilediği de kaydedilmiştir (Sharafi ve ark. 2013).

Tütün hücre süspansiyon kültürlerine verilen Al₂O₃ nanopartiküllerinin (10–100 µg mL⁻¹), fenolik bileşik içeriğini önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir (Poborilova ve ark. 2013).

Calendula officinalis'in uçucu yağ içeriği, MS besi ortamına eklenen 0.3 mgL⁻¹ gümüş nanopartikülleriyle büyük ölçüde artmıştır (Al-oubaidi ve Ameen 2014).

Cicer arietinum'un embriyonik kallusundaki gallik asit, klorojenik asit, o-kumarik asit, tanik asit ve sinnamik asit içeriği, TiO₂ np'lerinin (4.5 veya 6.0 mgL⁻¹) varlığında önemli ölçüde artış göstermiştir (Al-oubaidi ve Kasid 2015).

S. khuzestanica yaprak kültürleri, B5 ortamına çok duvarlı karbon nanotüplerin dahil edilmesi (25 veya 50 mgmL⁻¹), maksimum kallus büyümesi sağlamıştır. Buna rağmen en yüksek fenolik, flavonoid, rosmarinik asit ve kafeik asit içeriği 100 veya 250 mgmL⁻¹ çok duvarlı karbon nanotüpler içeren B5 ortamından elde edilmiştir (Ghorbanpour ve Hadian 2015)

Datura metel'in saçak kök kültürleri biyotik (*Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*) ve abiyotik (AgNO₃ ve Ag nanopartiküller) elisitörlere 12, 24 ve 48 saat için elisitörlere maruz bırakılmıştır. Elisitörlerin atropin üretimine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışılan elisitörler arasında gümüş (Ag) nanopartiküller, saçak köklerinde atropin içeriğinin artırılmasında en etkili elisitörler olmuştur (Shakeran ve ark. 2015).

S. rebaudiana'dan stevioside üretimine çinko nanopartiküllerinin etkisinin incelenmesi için *Stevia*'nın nodal eksplantları çinko nanopartiküllerinin farklı

konsantrasyonlarını [Zn-np (< 100 nm) 50, 100, 200, 400 ve 1000 mgL⁻¹] içeren MS ortamında *in vitro* kültüre alınmıştır. Çinko nanopartiküller, 400 ve 1000 mg/L konsantrasyonda fitotoksik olarak bulunmuştur. Zn nanopartiküllerinin konsantrasyonuna bağlı olarak stevioside üretiminin önemli ölçüde düştüğü rapor edilmiştir (Desai ve ark. 2015).

Prunella vulgaris'in kallus kültürlerine, altın-gümüş (Au-Ag, 1:3) nanopartiküllerin uygulanması toplam flavonoid ve fenolik bileşiklerin maksimum birikimini indüklemiştir (Fazal ve ark. 2016).

Verbena bipinnatifida fidelerinin toplam fenolik içeriği, 5 mM bakır (CuSO₄) nanopartiküllerini içeren MS besi ortamında büyütüldüklerinde iki kat artış gösterdiği belirtilmiştir (Genady ve ark. 2016).

Mentha longifolia'yabakır (Cu) ve kobalt (Co) nanopartiküllerinin uygulanması, esansiyel yağ içeriğini sırasıyla %2.226 ve %2.19 oranında artırdığı rapor edilmiştir (Talankova-Sereda ve ark. 2016).

Capsicum frutescens'in hücre süspansiyonuna 3 mgL⁻¹ gümüş nanopartiküllerin eklenmesinin, kapsaisin içeriğini yaklaşık 2 kat artırdığı tespit edilmiştir (Bhat ve Bhat 2016).

Corylus avellana hücre süspansiyon kültürünün 5 mgL⁻¹ Ag nanopartikülleri ile muamelesi taksol üretimini önemli ölçüde artırdığı görülmüştür (Jamshidi ve ark. 2016).

Hyoscyamus reticulatus'un saçak kök kültürlerinde hiposikamin ve skopolamin içeriğini arttırmak için Fe₃O₄ nanopartiküllerin (450-3600 mgL⁻¹) elisite etme potansiyeli araştırılmıştır. Saçak kök kültürlerinin 24 saat süreyle 900 mgL⁻¹ Fe₃O₄ nanopartikülleriyle ve 48 saat boyunca 450 mgL⁻¹ Fe₃O₄ nanopartiküllerine maruz kalması hiposikamin ve skopolaminin bileşiklerinin miktarını beş kat artırdığı saptanmıştır (Moharrami ve ark. 2017).

S. rebaudiana'nın sürgün kültürlerinde steviol glikozit birikimi, 1 mgL⁻¹ çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri ile güçlendirilmiş MS besi ortamında önemli ölçüde artmıştır. Ayrıca toplam flavonoid ve fenolik içeriği de ZnO uygulaması ile artış göstermiştir. Ancak, ZnO'nun daha yüksek konsantrasyonları fitotoksik etkilerinden dolayı sekonder metabolit üretimini azaltmıştır (Javed ve ark. 2017).

Bitkilerden elde edilen sekonder metabolitlerin üretilen miktarlarını artırmak için nanoparçacıkların elisitör olarak kullanılması mevcuttur. Ancak bu bitkinin türüne nanopartikülün konsantrasyona türene boyutuna göre değişmektedir. Şekil 5.'te görüldüğü gibi her bitki türündeki yolakların değiştiği görüldüğünden dolayı her türde ayrı ayrı rapor edilmesi gerekmektedir. Gelecek için ümit vadeci bir strateji olarak görünmektedir. Ancak nanopartiküllerin sekonder metabolitlerin üretim mekanizmalarına olan etkilerini tam olarak aydınlatmak için daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.





3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Örneklerinin Teşhisi ve Temini

Dört farklı nanopartikül (Al_2O_3 , Fe_2O_3 , ZnO ve TiO_2) kullanılarak *in vitro* sürgün kültürleri yoluyla *H. retusum* ve *H. perforatum*'da hiperisin ve türevi bileşikleri artırmaya yönelik uygulamaların yapıldığı bu tez çalışmasında *H. retusum* Türkiye, Mardin, Kasımiye medresesi çevresinden [02.07.2017 Ö. Faruk Akdemir -02 (DUF)], *H. perforatum* Türkiye, Van çevresinden, [05.07.2017 Ö. Faruk Akdemir -01 (DUF)] toplanmıştır (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. a) *H. retusum* Aucher, b) *H. perforatum* L.

H. retusum'un teşhisi Prof Dr.A. Selçuk ERTEKİN tarafından, *H. perforatum*'un teşhisi ise Dr. Öğretim görevlisi Mehmet FİDAN tarafından yapılmıştır. Çalışma için toplanan bitki örnekleri Dicle Üniversitesi Fen Fakültesinde bulunan herbaryumda muhafaza edilmiştir.

3.1.2. Kimyasal Analiz ve Doku Kültürü Çalışmaları İçin Bitki

Örneklerinin Hazırlanması

Doğadan toplanan *H. perforatum* ve *H. retusum* bitkileri kök, gövde, yaprak, çiçek ve tohum bölümlerine ayrılmıştır. Bitkilerin kök, gövde, yaprak ve çiçek bölümleri oda sıcaklığında 1 hafta süreyle kurutulmuştur. Kurutulmuş bitkiler hipersin ve türevi bileşiklerin tespiti için analiz edilmiştir. Bitkilerden alınan tohumlar ağzı kapalı film kutularında buzdolabında (+4 °C'de) muhafaza edilmiştir. Tohumlar *in vitro* kültür ortamında sürgünler elde etmek için çimlendirilmiştir.

3.1.3. Deneylerde Kullanılan Nanopartiküllerin Temini ve Özellikleri

Tez çalışmasında ticari alüminyum oksit (Al_2O_3), çinko oksit (ZnO), demir(III) oksit (Fe_2O_3) ve titanyum dioksit (TiO_2) nanopartiküller kullanılmıştır. Kullanılan nanopartiküllerin isimleri ve boyutları Çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneylerde kullanılan nanopartiküller

Nanopartikül	Boyut	Üretim	Firma
Al_2O_3	40 nm	Ticari	Sigma (544883)
TiO_2	<25 nm	Ticari	Alfa Aesar (044690)
ZnO	<100 nm	Ticari	Sigma (544906)
Fe_2O_3	<50 nm	Ticari	Sigma (544884)

3.2. Metot

3.2.1. Bitki Doku Kültürü Ortamı

Bitki doku kültürü disiplininde bazı standart uygulamalar vardır. Bunlar transfer ve büyüme odasının koşulları, çalışmalarda kullanılan alet ve ekipmanların sterilizasyon işlemleri ile besi yerinin hazırlanmasıdır. Tezin metodunu ayrıntılı bir şekilde açıklamak için bu işlemlerle ilgili detaylar aşağıda verilmiştir.

3.2.1.1. Besi Ortamlarının Hazırlanması ve *In vitro* Kültür Başlatmak İçin Yüzey Sterilizasyonu

Çalışmalarda temel olarak Murashige ve Skoog (1962), tarafından geliştirilen besi yeri kullanılmıştır. Amaca göre besi yeri içeriğinde bazı değişiklikler yapılmıştır. Çimlendirme ve sürgün çoğaltımı çalışmalarında besi yerinin katılaştırılması için 5.85 gr/L agar (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır. Bütün kültür besi ortamlarında pH 5.8-5.85 aralığına ayarlanmıştır.

Çizelge 3.2. Kullanılan Murashige ve Skoog (MS) besi yerinin içeriği

Madde	Miktar
MS ana çözeltisi (Makro elementler)	100 cc
Mikro elementler I	10 cc
Mikro elementler II	1 cc
Kompleks kelatör	10 cc
Vitamin karışımı	1 cc
Myo-inositol	10 cc
Sukroz	30 g
Distile su	1000 cc

MS besi ortamları hazırlanırken Çizelge 3.2’de verilen altı çözelti kullanılmıştır. Bu çözeltilere ek olarak ihtiyaca göre besi ortamlarında bitki büyüme düzenleyicileri de kullanılmıştır. Çözeltiler stok olarak hazırlanıp ihtiyaç duyuldukça kullanılmıştır. Çizelge 3.3.’te içerikleri verilen çözeltilerin hazırlanmasında steril saf su kullanılmıştır. Stok çözeltiler renkli şişelerde buzdolabında (+4 °C) muhafaza edilip belli aralıklarla tazelenmiştir.

Çizelge 3.3. MS Besi Ortamında Kullanılan Stok Çözeltilerin Hazırlanışı

Stok Çözelti	Kullanılan Kimyasal	Kullanılan Miktar	Distile su ile tamamlanan miktarı
MS Ana Çözeltisi (makro elementler)	NH ₄ NO ₃	16.5 g	1000 cc
	KNO ₃	19.0 g	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	4.4 g	
	MgSO ₄ .7H ₂ O	3.7 g	
	KH ₂ PO ₄	1.7 g	
Mikro Elementler I	H ₃ BO ₃	620 mg	1000 cc
	MnSO ₄ .4H ₂ O	2230 mg	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg	
	KI	83 mg	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg	
Mikro Elementler II	CuSO ₄ .5H ₂ O	25 mg	100 cc
	CoCl ₂ .6H ₂ O	25 mg	
Kompleks Kelatör	FeSO ₄ .7H ₂ O	2.78 g	1000 cc
	Na ₂ EDTA	3.73 g	
Vitamin Karışımı	Nikotinik asit	50 mg	100 cc
	Glisin	2.0 mg	
	Pridoksin HCl	50 mg	
B1 Vitamini Çözeltisi	Tiamin HCl	100 cc	100 cc

3.2.1.2. Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Sürgün poliferasyonunda bitki büyüme düzenleyicisi olarak 6-benzyladenine (BA) kullanılmıştır. 1 mg/mL konsantrasyonda BA’nın stok çözeltileri hazırlanmış ve besi ortamlarında ihtiyaç miktarınca kullanılmıştır. Stok çözeltileri, 100 mL’lik balon joje de 100 mg olarak tartılan bitki büyüme düzenleyicilerinin birkaç mL çözücü içinde manyetik karıştırıcı ile çözdürülerek hazırlanmıştır. Ardından steril saf su ile istenilen hacime tamamlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiler, renkli şişeler içerisinde, buzdolabında 4 °C’de muhafaza edilmiş ve belli periyotlarla tazelemek için yeniden

hazırlanmışlardır. BA gibi sitokininlerin stok çözeltilerinin hazırlanmasında 0.1 N'lik NaOH kullanılmıştır.

3.2.2. Sterilizasyon

3.2.2.1 Cam Malzemelerin Sterilizasyonu

Cam malzemeler (erlenmayer, mezür, balon joje, pipet, beher) bulaşık makinesinde yıkandıktan sonra saf sudan geçirilmiştir. 180 °C'de etüvde iki saat bekletilerek sterilizasyon işlemleri yapılmıştır.

3.2.2.2. Kültür Kaplarının Sterilizasyonu

Kültür kabı olarak Magenta GA7'ler kullanıldı. Kaplar bulaşık makinesinde yıkandı. Magentalar makineden çıkarılarak önce sıcak sudan sonra da saf sudan geçirilerek temizlik işlemleri yapılmıştır. Magenta GA-7'lerin sterilizasyonu ise 121°C' de ve 1 atm. basınçta 20 dakika süre ile otoklavda yapılmıştır.

3.2.2.3. Pens ve Bisturilerin Sterilizasyonu

Pens ve bisturiler önce % 96'lık etil alkol ile silinip alüminyum folyolarla sarılarak etüvde 180°C'de 2 saat süre ile sterilizasyonları yapılmıştır.

3.2.2.4. Transfer Odasının Hazırlanması ve Sterilizasyonu

Kültür işlemlerinin gerçekleştirildiği transfer odası, kültür yapılmadan bir gün önce seyreltilmiş ticari çamaşır suyu kullanılarak temizlenmiştir. Kültür transfer odasının ortam sterilizasyonu odada bulunan UV lambasının kültür yapılmadan önce 30 dakika süreyle açık bırakılmasıyla sağlanmıştır. Bitki kültür işlemlerinin yapıldığı laminar hava akışlı kabin kültür işlemlerinden önce ve sonra %96'lık etil alkol ile silinerek temizlenmiştir. Ayrıca kabinin içerisinde bulunan UV lambası kültür yapılmadan önce 30 dakika açık tutularak kabinin sterilizasyonu sağlanmıştır.

3.2.3. Bitki Büyüme Odasının Şartları

Büyüme odası, beyaz floresan lamba ile aydınlatılmış ve bitkisel materyalin gelişimi için gerekli olan fotoperiyot, ışıklandırma sisteminin 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık olacak şekilde zaman ayarlayıcısı ile ayarlanmıştır. Ortam sıcaklığı, klima yardımı ile 25 ± 2 °C'de tutulmuştur. Klimalardan birinin arızalanması durumunda

ortam sıcaklığının kontrol altında tutulması için yedek bir klima büyüme odasına takılmıştır

3.2.4. Doku Kültürü Aşamaları

H. retusum ve *H. perforatum*'da tohum çimlendirme ve sürgün çoğaltım çalışmaları ile sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik çalışmaların aşamaları ve içerikleri aşağıda sunulmuştur.

3.2.4.1. Tohum Yüzey Sterilizasyonu

H. perforatum ve *H. retusum*'un tohumları ayrı ayrı erlenmeyerlere konularak %75'lik ethanol çözeltisinde 45 saniye çalkalanmıştır. Daha sonra tohumlar %10'luk sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisine konularak 10 dakika süreyle çalkalanmıştır. Bu işlemden sonra da tohumlar 4 defa 5'er dakika süreyle steril saf suda çalkalanarak yüzey sterilizasyonları yapılmıştır.

3.2.4.2. Tohum Ekimi

Yüzey sterilizasyonu yapıldıktan sonra tohumlar besi ortamına aktarılmadan önce steril kurutma kağıtları üzerinde kurumaları için bekletildiler. Daha sonra tohumlar çimlenmeleri için herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen (hormonsuz) MS besi ortamında kültüre alınmıştır (Namlı ve ark. 2010). Tohumlar çıtlatılarak ekimi yapılmıştır. Çıtlatılmadan ekilen tohumlarda çimlenme oranı çok düşük olmuştur. Tohumlar ekimden sonra 1 hafta içerisinde tohumların büyük çoğunluğu çimlenmiştir. *H. perforatum* tohumlarının çimlenme oranı *H. retusum*'a göre genellikle düşük olmuştur. *H. retusum* tohumlarında çimlenme başarısı yaklaşık %90 iken, *H. perforatum* bu oran yaklaşık %60 civarında kalmıştır.

3.2.4.3. Sürgünlerin Çoğaltımı

Tohumların çimlenmesiyle elde edilen sürgünler, 0.5 mg/L BA'nın bulunduğu MS besi ortamına aktarılarak sürgünlerin geliştirilmesi ve çoğaltımı sağlanmıştır (Namlı ve ark. 2010). Sürgün poliferasyonu *H. retusum*'da sayıca çok ve hızlı bir şekilde gerçekleşirken *H. perforatum*'da sürgün poliferasyonu daha az sayıda ve yavaş gerçekleşmiştir.

3.2.4.4. Nanopartikül Uygulamaları

In vitro ortamda sürgün çoğaltımları yapılan *H. perforatum* ve *H. retusum*'adört farklı nanopartikülle iki ayrı uygulama yapılmıştır. Nanopartiküllerle yapılan ilk uygulamada nanopartiküllerin konsantrasyon aralıklı geniş tutularak uygulanmıştır (Çizelge 3.4.). İlk uygulama sonucunda bitkiler sürgün (tüm bitki) olarak kurutulup sekonder metabolit içerikleri analiz edilmiştir.

Çizelge 3.4. *H. perforatum*ve*H. retusum*sürgünlerine yapılan ilk nanopartikül uygulamalarında kullanılan konsantrasyonlar

Nanopartikül	Konsantrasyon (mgL ⁻¹)	
	<i>H. retusum</i> Aucher	<i>H. perforatum</i> L.
Al ₂ O ₃	25-75-200	25-75-200
Fe ₂ O ₃	25-75-200	25-75-200
TiO ₂	25-75-200	25-75-200
ZnO	25-75-200	25-75-200

*Her parametreden 250ml'lik besi yeri hazırlandığı için verilen oranın 1/4 ü kullanılmıştır.

İlk uygulamanın sekonder metabolit içeriklerinin analiz sonuçları değerlendirilerek ikinci nanopartikül uygulamasında kullanılan konsantrasyonlar belirlenmiştir (Çizelge 3.5) .İkinci nanopartikül uygulamasında bitkiler yaprak ve gövde bölümlerine ayrılarak sekonder metabolit içerikleri analiz edilmiştir.

Çizelge 3.5. *H. perforatum* ve *H. retusum* sürgünlerine yapılan ikinci nanopartikül uygulamalarında kullanılan konsantrasyonlar

Nanopartikül	Konsantrasyon (mgL ⁻¹)	
	<i>H.retusum</i> Aucher	<i>H. perforatum</i> L.
Al ₂ O ₃	10-15-25	200-250-300
Fe ₂ O ₃	10-15-25	200-250-300
TiO ₂	10-15-25	15-25-75
ZnO	10-15-25	200-250-300

*Her parametreden 250ml'lik besi yeri hazırlandığı için verilen oranın 1/4 ü kullanılmıştır.

Dört farklı nanopartikülün her bir konsantrasyonundan 5'er kap besi yeri hazırlanmıştır. Herhangi bir nanopartikül içermeyen 5 kap kontrol grubu hazırlanmıştır. Bu işlemler hem *H. perforatum* hem de *H. retusum* türleri için uygulanmıştır. Yapılan iki nanopartikül uygulamasının her birinde kontrol grubu da dahil edildiğinde her bir tür için 65 kap, toplamda ise 130 kap besi yeri hazırlanmıştır. Hazırlanan besi yerlerinde 0.5 mgL⁻¹ BA içerenMS ortamı kullanılmıştır. Nanopartiküllerin bitkiler tarafından etkin bir şekilde alınabilmesi için agar 5 gr/L kullanılmıştır. Nanopartiküllü besi

ortamları otoklava konulmadan önce nanopartiküllerin ortama homojen olarak dağılması için 20 dakika ultrasonik banyoya konulmuştur. Besi yerleri, otoklavlandıktan sonra nanopartiküllerde oluşabilecek topaklaşmanın önüne geçebilmek için 20 dakika süreyle tekrardan ultrasonik banyoyatutulmuşlardır. Nanopartiküllü besi ortamında 21 günlük kültür sürecinden sonrasürgünlerbesi ortamından alınıp saf suyla iyice yıkandıktan sonra oda sıcaklığında bir hafta süreyle kurumaya bırakıldılar. Kurutulmuş bitkiler sekonder metabolit analizleri için kullanıldılar.

3.2.5. Metabolit Analizi

3.2.5.1. Bitki Örneklerin Hazırlanması

H.retusum ve *H.perforatum*'un doğadan toplanan örnekleri, kök, gövde ve yaprak bölümlerine ayrıldıktan sonra kurutma kağıtlarının üstüne serilerek oda sıcaklığında 2 hafta süreyle kurumaya bırakıldı. Kurumuş örnekler bir öğütücü yardımıyla toz haline getirildi. Her bir türün farklı dokularına ait toz haldeki örneklerden 200 mg tartıldı. Deneylerde kullanılmak üzere muhafaza edildi.

In vitro ortamda üretilmiş sürgünler besi yerlerinden çıkarıldıktan sonra saf su ile üç defa yıkandı. Sürgünlerin istenmeyen kısımları pens ve bisturi yardımıyla kesilerek uzaklaştırıldı. Bitkiler gövde ve yaprak olarak ayrılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında, kurutma kağıtları üzerinde 1 hafta kurumaya bırakıldı. Kuruyan örnekler bir öğütücü de toz haline getirildi.

3.2.5.2. Ekstraksiyon İşlemleri

Bitkilerin kurutulan örneklerinin her birinden alınan 0.20 g'lık örneklerin üzerine 10 mL metanol ilave edilip çözelti sonikatörde 5 dakika süreyleözütlendi. Özütleme işleminin ardındanoluşan çözelti vakum düzeneği yardımıyla süzüldü. Bu işlemler 3 defatekrar edildi. Üç işlem neticesinde elde edilen metanollü özüt 50 mL'lik cam balonlarda toplandı. Özütlerdekimetanol evaporatör vasıtasıyla uzaklaştırılmasının ardından kabın içinde, hiperisin bileşiklerini içeren renkli bir tortu oluştu. Bu tortu metanol ile çözülüp uygun oranda seyreltme işleminden sonra LC-MS/MS'e enjekte edildi.

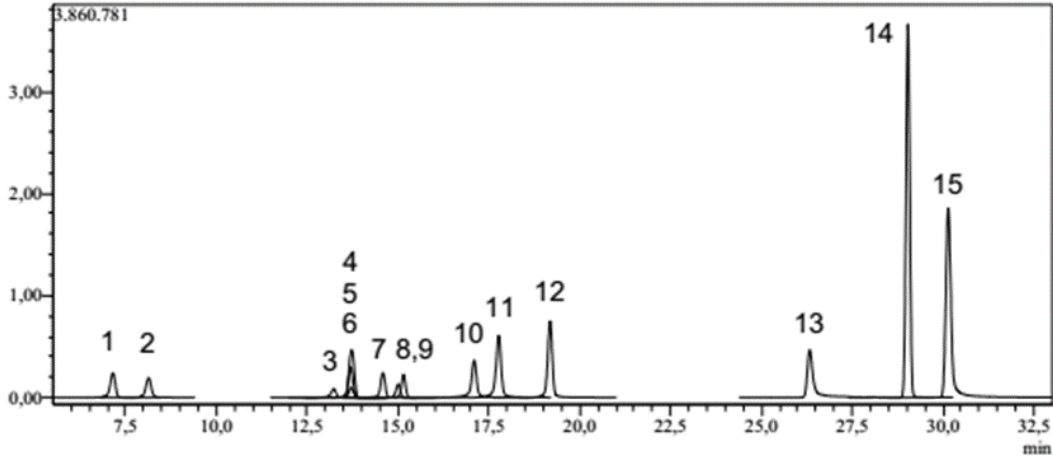
3.2.5.3. Kimyasal Analizler

Çalışmanın hiperisin ve türevi içerik analizleri, Dicle Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Kimyasal Analiz Laboratuvarı, Kütle Spektrometre ve Kromatografi Ünitesi'nde yapılmıştır. *Hypericum*'ların LC-MS/MS metoduyla analizi yöntemine ilişkin parametreler *Hypericum* türlerinin LC-MS/MS analizi için Akdeniz ve ark.'nın (2018), optimize ettiği yöntem kullanılmıştır.



Çizelge 3.6. 15 fitokimyasalın analizi için LC-MS/MS metoduyla ilişkin analitik parametreler

No	Analit	A.Z. ^a	Ana iyon (m/z) ^b	Parçalanma iyonları	İyonlaşma modu	Kalibrasyon Denklemi	R ²	Doğrusallık (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^c	(% RSD ^d)		Geri Kazanım (%)		U ^f
										Gün içi	Günler arası	Gün içi	Günler arası	
1	Protokateşik asit	7.00	153.4	109,1-108,0	Neg	y=590,460x+120226	0.9909	100-3200	4,26/5,32	0.0060	0.0060	10.096	0.9988	0.0215
2	Klorojenik asit	08.Mar	353.3	191,2-85,0	Neg	y=697,935x+87418,5	0.9910	75-2400	2,44/3,36	0.0074	0.0055	0.9941	0.9999	0.0299
3	Luteolin-7 glukozit	13.20	447.0	285,1-284,1	Neg	y=215,412x+36852,1	0.9939	75-2400	2,30/3,02	0.0052	0.0037	10.014	10.072	0.0086
4	Rutin	13.67	609.1	300,1-301,1	Neg	y=469,333x+30144,8	0.9902	100-3200	1,283/1,90	0.0063	0.0070	10.049	10.037	0.0136
5	Hesperidin	13.68	611.1	303,0-449,3	Poz	y=2539,52x+123981	0.9942	50-1600	0,96/1,44	0.0081	0.0073	10.053	0.9994	0.0162
6	Hiperozit	13.69	463.0	300,1-271,0	Neg	y=185,593x+8126,67	0.9905	100-3200	5,48/6,50	0.0074	0.0056	10.039	10.015	0.0126
7	Apigetrin	14.54	431.0	268,1-269,1	Neg	y=1052,01x+146897	0.9902	50-1600	1,23/1,75	0.0047	0.0067	10.060	10.047	0.0132
8	Kersitrin	14.98	447.0	300,0-301,1	Neg	y=175,298x+33626,6	0.9918	100-3200	10,51/11,65	0.0079	0.0063	0.9999	10.002	0.0133
9	Astragalin	15.13	447.0	284,1-227,1	Neg	y=329,506x+44598,6	0.9900	100-3200	5,52/6,77	0.0086	0.0077	10.002	10.017	0.0153
10	Kersetin	17.Eki	301.2	151,1-179,1	Neg	y=1826,89x-146948	0.9962	50-1600	1,25/1,81	0.0177	0.0227	10.010	10.012	0.0573
11	Luteolin	17.78	285.2	133,1-151,0	Neg	y=3166,03x+495252	0.9901	50-1600	0,61/0,87	0.0119	0.0079	0.9961	10.007	0.0188
12	Apigenin	19.20	269.2	117,0-151,1	Neg	y=3115,89x+483037	0.9910	50-1600	0,32/0,52	0.0087	0.0090	0.9985	10.022	0.0181
13	Psödohiperisin	26.34	519.0	487,1-475,1	Neg	y=2548,96x+468900	0.9908	50-1600	2,152,55	0.0061	0.0089	10.033	10.034	0.0172
14	Hiperforin	28.97	535.3	383,3-315,2	Neg	y=44260,6x+203394	0.9901	10-320	0,32/0,51	0.0218	0.0164	10.076	10.061	0.0418
15	Hiperisin	30.18	503.0	405,1-433,1	Neg	y=7676,03x+605593	0.9925	50-1600	1,27/1,88	0.0093	0.0095	10.104	10.034	0.0189
^a AZ: Alıkonma Zamanı, Ana iyon(m/z):Molecular ions of standard compounds (m/z oranı), ^c R ² :Korelasyon Katsayısı, ^d RSD: Bağlı Standart Sapma,														
^e LOD/LOQ (µg/L): Tespit Limiti/Tayin Limiti, ^f U (%): 95% güven aralığında (k=2) yüzde bağlı belirsizlik														



Şekil 3.2. Metabolit analizinde kullanılan 15 fitokimyasal standardın LC-MS/MS kromatogramı

15 Fitokimyasalın kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılan LC-MS/MS sistemi; Shimadzu Nexera model UHPLC cihazı ile Shimadzu LCMS 8040 model üçlü kuadrupol kütle spektrometre cihazının birleşiminden oluşmaktadır. Kullanılan sıvı kromatografi sistemi LC-30 AD model gradient pompa, DGU-20A3R model degazer, CTO-10ASvp model kolon fırını ve SIL-30AC model oto örnekleyiciden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım, Agilent Poroshell 120 (EC-C18 2,7 μ m, 4,6 mm $\times$ 150 mm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında kolon fırını 40 °C'ye ayarlanmıştır. Elüsyon gradiyentinde hareketli faz A için ultrasaf su ve hareketli faz B için metanol kullanılmıştır. Ayrıca, daha iyi bir kromatografik ayırım ve iyonlaştırmayı kolaylaştırmak için her iki faza 5 mM amonyum format ve %0,15 formik asit eklenmiştir. Analitlerin optimum ayırımının gerçekleşmesi için yapılan pek çok denemenin ardından en uygun UHPLC gradiyent profili 20-100% B (0-25 dk), 100% B (25-35 dk), 20% B (35-45 dk) şeklinde optimize edilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0,5 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 2 μ L olarak belirlenmiştir.

Üçlü kuadrupol kütle spektrometresi hem negatif hem de pozitif modda çalışan bir ESI (elektrosprey iyonlaştırma) kaynağı ile donanımlıdır. LC-ESI-MS/MS verileri cihazda kayıtlı olan LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japonya) yazılımı ile toplanarak işlenmiştir. Analitlerin miktarsal tayini için cihaz ile MRM (multiple reaction monitoring) modunda çalışılmış ve moleküler (parent) iyonlar bir veya iki parçalanma ürünü (product ions) (ilki kantitatif amaçlı diğeri kalitatif amaçlı kullanılmıştır) ile kombine edilmiştir. Kütle spektrometresinde optimize edilen diğer parametreler şunlardır: ara yüz (interface) sıcaklığı; 350 °C, DL sıcaklığı; 250 °C, heat block

sıcaklığı; 400 °C, nebulizer gaz (N₂) akışı; 3 L/dk ve kurutma gazı (N₂) sıcaklığı; 15 L/dk. (Akdeniz 2018).

3.2.6. Moleküler Analizler

3.2.6.1. Total RNA İzolasyonu

Bitki yaprak ve gövde dokularından 20-30 mg alınarak, ticari RNA izolasyon kiti kullanılarak (Intron, easy-spin™ IIP Plant RNA extraction Kit) total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, bitki dokuları öncelikle sıvı azotta parçalanarak homojene edilmiş ve sonra RNA izolasyon kit protokolü uygulanmıştır. Elde edilen RNA'lar öncelikle %2 agaroz jelde yürütülerek görüntülenmiş, daha sonra miktar tayini için nano-drop spektrofotometrede ölçüm alınmıştır.

3.2.6.2. cDNA Sentezi

Total RNA izolasyonunun ardından, cDNA sentezi aşağıda belirtilen ticari kit (Invitrogen- SuperScript® III First-Strand Synthesis System) protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir: Total RNA'dan, mRNA'ların seçilimi için kit içerisindeki oligo(dT)₂₀ primeri kullanılmıştır. Total RNA (100ng), 1 µL 50 µM oligo(dT)₂₀ primeri, 1 µL 10 mM dNTP mix ve DEPC-water ile karıştırılarak, 65°C'ta 5 dk inkübe edildikten sonra, en az 1 dk buz üstünde bekletilmiştir. Daha sonra bu karışımın üzerine, 2 µL 10x RT buffer, 4 µL 25 mM MgCl₂, 2 µL 0.1 M DTT, 1 µL RNaseOUT (40 U/µL), 1 µL SuperScript III RT (200 U/µL) eklenerek, sentez için 50°C'ta 50 dk inkübe edilmiştir. Reaksiyonun sonlandırılması için, bu karışım 85°C'ta 5 dk inkübe edilip, buza alınmıştır. 1 µL RNase H eklenerek, 37°C'ta 20 dk inkübasyon gerçekleştirilip, elde edilen cDNA'lar kullanıma kadar -20 °C'ta saklanmıştır.

3.2.6.3. Kantitatif PCR (qPCR) Analizi

Hypericum bitkisine ait 18S rRNA, GAPDH ve *HpPKS1* ile *HpPKS2* genlerine ait qPCR primer dizileri şu şekildedir.(Çizelge 3.7.)

Çizelge 3.7. *Hypericum* bitkisine ait 18S rRNA, GAPDH ve *HpPKS1* ile *HpPKS2* genlerine ait qPCR primer dizileri

<i>HpPKS1</i>	TGT ACG TCT CAT CCA GTG AGC (forward) ACA CCA CCG TAA CAG CCT AAG (reverse)
<i>HpPKS2</i>	TAC ACA AGG AGA CAC CCA AGC (forward) GGA ACT GGC AAC ATA GCA TCC (reverse)
18S rRNA	AAA CGG CTA CCA CAT CCA AG (forward) CAA CCC AAA GTC CAA CTA CG (reverse)
GAPDH	ATG GAC CAT CAA GCA AGG ACT G (forward) GAA GGC CAT TCC AGT CAA CTT C (reverse)

Yapılan tüm analizlerde Biorad iTaQ Universal SYBR Green Supermix q-PCR ticari karışımı kullanılmıştır. Her bir gen için 2 farklı türün 2 farklı dokusunda farklı uygulama grubuna ait cDNA örnekleri ayrı ayrı kullanılarak en az 3 tekrarlı şekilde Biorad CFX96 q-PCR cihazı ile yürütülmüş ve analiz edilmiştir. Elde edilen qPCR'ların sonuçları $\Delta\Delta C_T$ metoduna göre analiz edilmiştir ve her bir uygulama örneğinde gen anlatım seviyeleri dokunun kontrol grubuyla karşılaştırılmak suretiyle göreceli anlatım seviyesi olarak belirtilmiştir. Primer özgünlüğü denetlemek amacıyla her bir örnek için erime eğrisi analizi yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Doğal Ortamda Yetişen *H. perforatum* L. ve *H. retusum* Aucher'in Farklı Dokularının Hiperisin ve Türevi Bileşiklerinin İçerikleri

H. perforatum ve *H. retusum*'un türlerinin tohumları doğal ortamlarından toplandı (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1. a) *H. perforatum* L., b) *H. retusum* Aucher Haziran ayında çiçek açtıktan sonraki görüntüleri

Doğal ortamdan toplanan iki türün kök, gövde, yaprak ve çiçeklerinden örnekler alınıp oda sıcaklığında kurutuldu. *H. perforatum* ve *H. retusum*'un farklı kök, gövde, yaprak ve çiçekdokularının fenolik içerikleri LCMS/MS cihazı ile tespit edildi (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Doğadan toplanmış *H. perforatum* L. ve *H. retusum* Aucher' in çiçek, yaprak, gövde ve kök bölümlerinin fenolik bileşikleri*

Fenolik bileşik**	<i>Hypericum retusum</i> Aucher				<i>Hypericum perforatum</i> L.			
	Çiçek	Yaprak	Gövde	Kök	Çiçek	Yaprak	Gövde	Kök
Hiperisin	489303±92,5	309146,2±58,4	31592,4±6	11969±2,3	517203,5±97,8	195369,2±36,9	20241,3±3,8	33472,9±6,3
Hiperforin	7627,5±3,2	27816,4±11,6	779,3±0,3	18937,5±7,9	1709277±714,5	1010741,2±422,5	156557,4±65,4	82482,6±34,5
Hiperozit	4093518,2±515,8	669690,4±84,4	87676,3±11	383346,3±48,3	33353374,4±4202,5	32974074,2±4154,7	2121538,1±267,3	134851,2±17
Psödohiperisin	864761,7±148,7	357502,2±61,5	63084,7±10,9	28816,1±5	790643,1±136	322981,2±55,6	54565,4±9,4	78637,4±13,5
Kersetin	159526,9±91,4	27257,1±15,6	3731,7±2,1	6664,1±3,8	294801,4±168,9	1517,2±0,9	4843,9±2,8	2405,9±1,4
Rutin	810487,5±110,2	---	17762,3±2,4	202007,1±27,5	2954234,6±401,8	5895749±801,8	473748,6±64,4	22478,5±3,1
Kersitrin	11901431,1±1582,9	32385871,8±4307,3	11980629,1±1593,4	35346480±4701,1	3924054,8±521,9	17865290,4±2376,1	455259,4±60,5	180504,6±24
Klorojenik asit	463370,9±138,5	1116329,3±333,8	306067,4±91,5	7692,9±2,3	13081,8±3,9	13328,7±4	6827,6±2	4424,9±1,3
Protokatesik asit	34720,5±7,5	18677,2±4	13946,9±3	15160,7±3,3	15871,1±3,4	5044,5±1,1	3286,7±0,7	5929,7±1,3
Hesperidin	263375,4±42,7	109615,8±17,8	9824,5±1,6	116630,3±18,9	634410,3±102,8	1375992,6±222,9	224115,3±36,3	13270,7±2,1
Luteolin	2501,5±0,5	1816±0,3	2085,4±0,4	5582,4±1	5107,8±1	1517,2±0,3	3835,6±0,7	590,8±0,1
Luteolin-7 glukozit	2582,5±0,2	3100±0,3	---	11181,4±1	9293,1±0,8	5539,7±0,5	2487,7±0,2	519±0
Astragalin	15771±2,4	10831,1±1,7	870±0,1	7136,2±1,1	39600±6,1	148930,8±22,8	4008,5±0,6	93,8±0
Apigetrin	556,2±0,1	---	---	---	494,4±0,1	---	---	---
Apigenin	660,5±0,1	318,9±0,1	530,9±0,1	323,9±0,1	797,7±0,1	311,6±0,1	726,1±0,1	86,8±0

*Soniclar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Doğadan toplanan örneklerin fenolik içerikleri *in vitro* ortamda yetiştirilenler ile karşılaştırma yapabilmek için tespit edilmiştir. Çizelge 4.1.'de *H. perforatum* ve *H. retusum*'un farklı dokularının fenolik bileşiklerinin miktarlarında farklılık olduğu görülmektedir. *H. perforatum*'da fenoliklerin bileşiklerinin miktarca daha fazla olduğu saptanmıştır.

H. retusum'un çiçeklerinde majör bileşikler kersitrin ve hiperozit olarak tespit edilmiştir. Hiperisin, psödohiperisin, kersetin, rutin, klorojenik asit ve hesperidin miktarca yüksek olan diğer bileşikler olarak belirlenmiştir. *H. retusum* yapraklarındaki majör bileşikler kersitrin ve klorojenik asit iken miktarca fazla olan diğer bileşikler ise hiperisin, hiperozit, psödohiperisin ve hesperidin olarak tespit edilmiştir. *H. retusum* yapraklarında rutin bileşiği tespit edilmemiştir. *H. retusum* gövdelerinde miktarı en yüksek olan bileşik kersitrin olduğu görülmüştür. Hiperisin, hiperozit, psödohiperisin, rutin, klorojenik asit ve protokateşik asit miktarı yüksek olan diğer bileşiklerdir. *H. retusum* köklerinde kersitrin miktarca en fazla bileşiktir. Hiperozit ve rutin yüksek oranda bulunan diğer bileşiklerdir. Fenolik bileşikler miktarca en fazla sırasıyla çiçek, yaprak, kök ve gövde de tespit edilmiştir. *H. retusum*'un bütün dokularında miktarca en fazla olan fenolik bileşik kersitrin olmuştur. Hiperisin bileşiği *H. retusum*'da en fazla çiçekte tespit edilmiştir. Çırak ve ark.'nın (2016), *H. retusum*'un çiçek, yaprak ve gövde bölümlerinde tespit ettikleri kersitrin ve hiperforin bileşiklerinin miktarı, çalışmamızdaki *H. retusum*'a ait çiçek, yaprak ve gövde bölümlerinden düşük çıkarken hiperozit, rutin ve kersetin bileşiklerleri çalışmamızdaki değerlerden yüksek çıkmıştır. *H. retusum*'un gövdesindeki hiperisin ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarı çalışmamızda yüksek çıkarken, Çırak ve ark.'nın (2016), çalışmasındaki çiçek ve yaprak değerleri bizim çalıştığımız çiçek ve yaprak değerlerinden yüksek çıkmıştır.

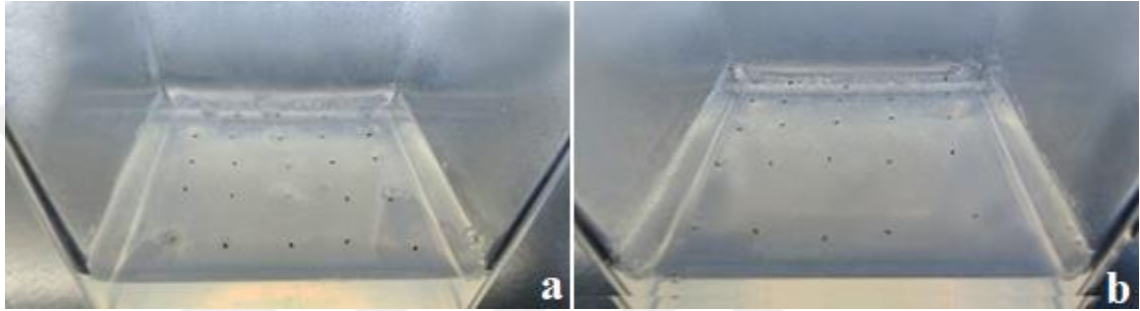
H. perforatum'un çiçeklerinde ise miktarı en fazla olan bileşikler hiperforin, hiperozit, rutin ve kersitrin bileşikleridir. Miktarı yüksek olan diğer bileşikler ise hiperisin, kersetin ve hesperidindir. *H. perforatum* yapraklarında en fazla hiperforin, hiperozit, rutin, kersitrin ve hesperidin bileşikler bulunmuştur. Hiperisin, psödohiperisin ve astragalin miktarı fazla olan diğer bileşikler olarak saptanmıştır. *H. Perforatum* gövdelerinde majör bileşik olarak hiperozit tespit edilmiştir. Hiperforin, hiperozit, rutin, kersitrin ve hesperidin miktarı fazla diğer bileşiklerdir. *H. perforatum*

köklerinde hiperozit ve kersitrin majör bileşiklerdir. Hiperisin, hiperforin, psödohiperisin ve hesperidin miktarca fazla olan diğre bileşiklerdir. Fenolik bileşikler miktarca en fazla sırasıyla çiçek, yaprak, gövde ve kökte tespit edilmiştir. *H. perforatum*'un bütün dokularında miktarca en fazla olan fenolik bileşik hiperozittir. Hiperisin bileşiğı *H.perforatum*'da en fazla çiçekte bulunmuştur. Tusevski ve ark. (2018), *H. perforatum*'un çiçekli sürgünlerindeki hiperisin, hiperforin, psödohiperisin, kersetin ve rutin bileşiklerinin çalışmamızdaki *H. perforatum* ve *H. retusum*'un tüm sonuçlarından daha yüksek çıkmıştır. Aynı çalışmada *H. perforatum*'un çiçeksiz sürgünlerindeki hiperisin hiperozit, Psödohiperisin, kersetin ve kersitrin ve miktarları çalışmamızdaki *H. perforatum*'un çiçek ve yaprak değerlerinden düşük çıkmıştır. Ayan ve Çırak (2008), *H. perforatum*'un gövde, yaprak ve çiçeklerinde tespit ettikleri hiperisin miktarı, çalışmamızdaki *H. perforatum*'un gövde yaprak ve çiçek değerlerinden daha yüksek miktarda olduğu tespit edilmiştir. Psödohiperisin bileşiğı de çalışmamızdaki sadece çiçekteki miktarından daha düşük çıkmıştır.

Hypericum türlerindeki hiperisinlerin fonksiyonu hala net olmamakla birlikte, otoburlara ve bitki patojenlerine karşı savunmaya dayalı bir rol oynadıkları düşünülmektedir (Fields ve ark. 1990, Fornasiero ve ark. 1998, Agostinis ve ark. 2002, Onelli ve ark. 2002, Sirvent ve Gibson 2002, Sirvent ve ark. 2003, Bruni ve Sacchetti 2009).Yapılan önceki çalışmalarla hiperisin lokalizasyonu iyi bir şekilde tespit edilmiştir (Briskin ve Gawienowski 2001). Bu bileşiklerin bitkinin tüm toprak üstü kısımlarında (çiçekler, kapsüller, yapraklar, gövdeler) dağılmış olan siyah bezelerde (Čellárová ve ark. 1994; Onelli ve ark., 2002) sentezlendiğı bulunmuştur. *Hypericum* türlerinde siyah bezeler en fazla çiçekte, sonrasında ise en yoğun oldukları yer yaprak kenar boşluklarıdır. Hiperisin ve psödohiperisin bileşiklerinin öncelikle *H. perforatum* çiçeklerinde ve yaprak kenar boşlukları bulunan çok hücreli siyah bezelerin içine biriktiğı yapılan çalışmalarla saptanmıştır (Briskin ve Gawienowski 2001, Onelli ve ark. 2002, Zobayed ve ark. 2006, Košuth ve ark. 2007). Siyah bezeler köklerde bulunmazken gövde ise seyrek bir şekilde bulunmaktadır (Holzl ve Petersen 2003).

4.2. Tohum Çimlenmesi

H. perforatum ve *H. retusum* tohumları, hormonsuz MS besisi ortamına her bir kaptaki 20 tohum olmak üzere her türden 20 Magenta tohum ekimi yapıldı (Şekil 4.2.). Tohumların çimlenmesi sonucunda her kaptan ortalama 15 sürgün elde edildi (Şekli 4.3). Sürgünler poliferasyon için Namlı ve ark. (2010), kullanmış oldukları 0.5 mgL^{-1} BA ilaveli MS besisi ortamı kullanıldı ve bu şekilde stok kültürler üretildi.



Şekil 4.2. Hormonsuz MS besisi ortamına ekilmiş a) *H. perforatum* L., b) *H. retusum* Aucher tohumları.



Şekil 4.3. Sürgün poliferasyon ortamındaki (0.5 mgL^{-1} BA ilaveli MS besisi ortamı) 4 haftalık a) *H. perforatum* L. ve b) *H. retusum* Aucher sürgünleri.

4.3. Nanopartiküllerin *In vitro* Kültürü Ortamına Verilmesi

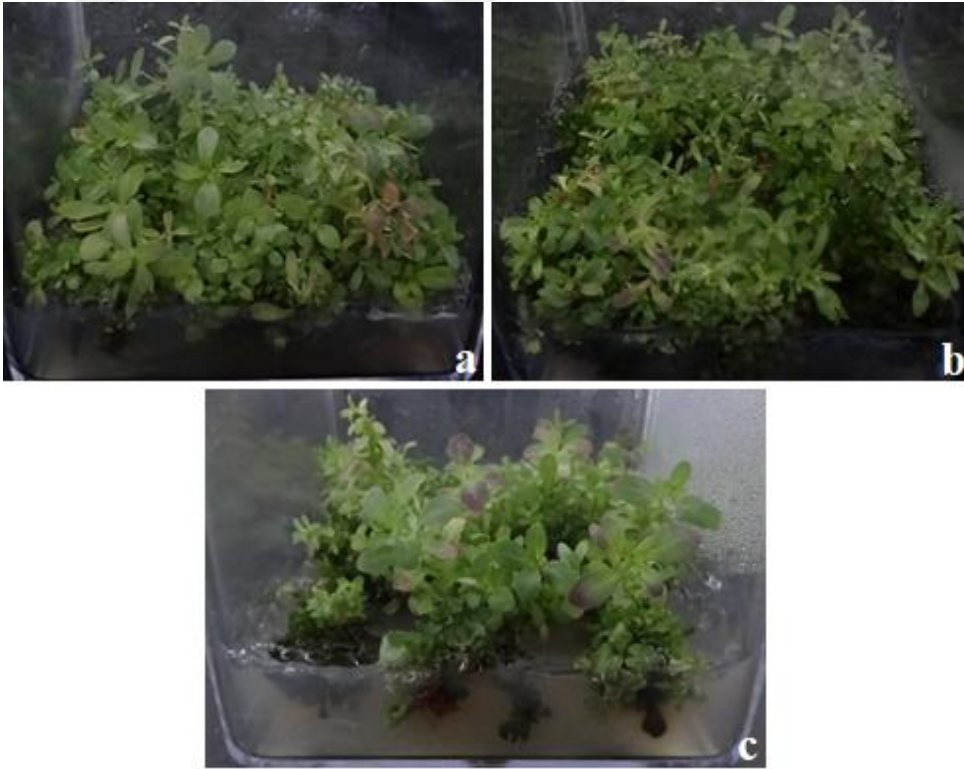
Fe_2O_3 , Al_2O_3 , ZnO ve TiO_2 nanopartikülleriyle yapılan deneylerde 0.5 mgL^{-1} BA içeren standart MS besisi ortamı kullanılmıştır. Çalışmanın bitki materyalleri besisi ortamlarında 4 hafta süreyle kültüre alınıp gelişimleri sağlanan *H. perforatum* ve *H. retusum* sürgünleridir. Gelişen sürgünler iki defa alt kültüre alındıktan sonra sürgünlerden ortalama uzunluğu 20 mm olan eksplantlar kesilerek nanopartikül deneylerinde kullanılmıştır. Deney ortamlarında gelişen bitkilerin hiperisin ve türevi

bileşikler ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği Materyal ve metotta(Bölümde 3.2.5.) verilen yöntemle analiz edilmiştir.

4.3.1. Alüminyum Oksit (Al_2O_3) Nanopartikülleri

4.3.1.1. Al_2O_3 Nanopartiküllerinin *H. perforatum*'un Sürgün (Genç filiz) Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. perforatum eksplantları Al_2O_3 nanopartiküllerinin 25, 75 ve 200 mgL^{-1} konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındı (Şekil 4.4.). Bütün deney gruplarında 0.5 mgL^{-1} BA içeren standart MS besi ortamı kullanıldı.



Şekil 4.4. Al_2O_3 nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL^{-1} konsantrasyonunu içeren besi ortamında gelişen *H. perforatum* sürgünleri

Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.2.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.2. Al₂O₃ nanopartiküllerin *H. perforatum* L. sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Kontrol	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹	200 mgL ⁻¹
Hiperisin	8373.2±1.6	14450.7±2.7	22088.6±4.2	29207.6±5.5
Hiperforin	48.7±0.1	62.4±0.1	127.2±0.1	35.6±0.1
Hiperozit	727166.5±91.6	806883.2±101.7	974579.7±122.8	1075739.3±135.5
Psödohiperisin	116608.9±20.1	163957.4±28.2	200832.8±34.5	231973.5±39.9
Kersetin	9334.7±5.3	6666±3.8	13809.2±7.9	7914±4.5
Rutin	---	---	---	---
Kersitrin	302880.6±40.3	327140.8±43.5	495865±66	488850±65
Klorojenik asit	995302.3±297.6	1188212±355.3	1264968.8±378.2	1284070.7±383.9
Protokateşik asit	3101.7±0.7	3389.2±0.7	4726.1±1	5014.4±1.1
Hesperidin	---	---	---	---
Luteolin	1211.5±0.2	2683.8±0.5	2866.4±0.5	3174.7±0.6
Luteolin-7 glukozit	3361±0.3	4392.1±0.4	7979.1±0.7	7963.6±0.7
Astragalin	2278.1±0.3	4045.6±0.6	4013±0.6	4258.2±0.7
Apigenin	158.7±0.1	356.3±0.1	378.1±0.1	447.8±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilen fenolik bileşiklerden hiperisin bileşiği, kontrol grubundaki miktarının 1.7 katına; psödohiperisin bileşiği ise kontrolün 1.4 katına çıktığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.). Hiperforin ve hiperozit bileşiklerinin miktarında ise çok düşük oranda artış meydana gelmiştir. 25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında rutin bileşiği tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışındaki bileşiklerden olan luteolin bileşiği kontrol grubunun 2.2 katına, astragalin bileşiği 1.7 katına, apigenin bileşiği ise 2.2 katına çıkmıştır. Kersetin bileşiğinin miktarında ise kontrol grubundaki miktarına göre azalma meydana gelmiştir. 25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikülleri *H. perforatum* L. sürgünlerinde tespit edilen fenolik bileşiklerden birçoğunun miktarını artırmada etkili bir uygulama olmuştur.

75 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiğinin 2.6 katına, hiperozitin 1.3 katına, psödohiperisin 1.7 katına, kersetinin ise 1.5 katına çıktığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.). Hiperforin bileşiğinin miktarı kontrol grubunun yaklaşık 2.5 katına çıktığı saptanmıştır. 75 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında rutin bileşiği tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışındaki kersitrin bileşiği kontrol grubunun 1.6 katına, protokateşik asit 1.5 katına, luteolin 2.3 katına, luteolin-7 glukozit 2.3 katına, astragalin 1.7 katına, apigenin bileşiği ise 2.3 katına çıkmıştır. 75 mgL⁻¹'lik Al₂O₃

nanopartikülleri, *H. perforatum* L. sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin fenolik bileşiklerin tamamının miktarında artış sağlayan etkili bir uygulama olmuştur.

200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiğinin miktarı 3.4 katına, hiperozit bileşiği 1.4 katına, psödohiperisin bileşiği ise 1.9 katına çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.2.). Hiperforin ve kersetin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu saptanmıştır. 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında rutin bileşiği tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşikler kontrol grubundaki miktarlarıyla karşılaştırıldığında kersitrin ve protokateşik asit bileşikleri 1.6 katına, klorojenik asit bileşiği ise 1.2 katına çıkmıştır. Hesperidin bileşiği 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilememiştir. Luteolin bileşiği kontrol grubunun 2.6 katına, luteolin-7 glukozit bileşiği 2.3 katına, astragalin bileşiği 1.8 katına, apigenin bileşiği ise 2.8 katına çıkmıştır. 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. perforatum* sürgünlerinde fenolik bileşiklerin birçoğunun miktarını artırırken özellikle hiperisin bileşiğinin miktarını yüksek bir oranda artırmıştır.

H. perforatum sürgünlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarını artırmada Al₂O₃ nanopartiküllerinin üç farklı konsantrasyon uygulaması da etkili olmuştur. Hiperisin ve türevi bileşiklerin (ilk altı bileşik) miktarını artırmada Al₂O₃ nanopartiküllerinin 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasının, 25 ve 75mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.3.1.2. Al₂O₃ Nanopartiküllerin *H. perforatum*'un Gövde ve Yaprak

Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. perforatum eksplantları Al₂O₃ nanopartiküllerinin 200, 250 ve 300 mgL⁻¹'lik konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır. Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin gövde ve yaprak dokularındaki hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.3.'te sunulmuştur

Çizelge 4.3. Al₂O₃ nanopartiküllerin *H. perforatum* L.'nin gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi

Fenolik bileşik**	Gövde				Yaprak			
	Kontrol	200 mgL ⁻¹	250 mgL ⁻¹	300 mgL ⁻¹	Kontrol	200 mgL ⁻¹	250 mgL ⁻¹	300 mgL ⁻¹
Hiperisin	5130.3±1	6614.5±1.3	11835.9±2.2	7157.5±1.4	23588.5±4.5	21448.6±4.1	37880.5±7.2	37664.2±7.1
Hiperforin	50587±21.1	68345.1±28.6	96221.8±40.2	104403.7±43.6	195479.8±81.7	199815.7±83.5	302158.4±126.3	220744.2±92.3
Hiperozit	266036.6±33.5	356953.6±45	568371.7±71.6	532030.5±67	1259560.3±158.7	1185626.6±149.4	1807341.7±227.7	1562243.8±196.8
Psödohiperisin	63798.9±11	62685.3±10.8	104997.9±18.1	69849.8±12	195550.6±33.6	171699.9±29.5	252936.7±43.5	249505.2±42.9
Kersetin	2901±1.7	3908.5±2.2	6864.9±3.9	3177.9±1.8	27954.7±16	27842.1±16	35193.1±20.2	22902.5±13.1
Rutin	---	---	808.8±0.1	---	737±0.1	549.9±0.1	894.5±0.1	825±0.1
Kersitrin	53385.4±7.1	77165.5±10.3	126607.2±16.8	115562.3±15.4	467297.3±62.2	412492.6±54.9	697885.2±92.8	581055.3±77.3
Klorojenik asit	769413.8±230.1	853095.3±255.1	1190849.8±356.1	1084558.2±324.3	2237552.5±669	2400692.2±717.8	4099254.4±1225.7	2581236.3±771.8
Protokateşik asit	762.2±0.2	891.6±0.2	1429.5±0.3	910.2±0.2	645.5±0.1	1007.9±0.2	1544.9±0.3	1592±0.3
Hesperidin	---	---	305.1±0	145±0.1	503.5±0.1	313.6±0.1	421.5±0.1	442.8±0.1
Luteolin	1487.2±0.3	2733±0.5	6518.1±1.2	2228.5±0.4	868±0.2	1462.7±0.3	2494.2±0.5	1423±0.3
Luteolin-7 glukozit	2990.6±0.3	5770.8±0.5	8863.5±0.8	6595.7±0.6	4226.9±0.4	4103±0.4	5347.8±0.5	6039.8±0.5
Astragalin	1270.1±0.2	2921.8±0.4	5180.2±0.8	3610.2±0.6	20319.6±3.1	16255.2±2.5	25964.4±4	24723.4±3.8
Apigenin	337.9±0.1	582.5±0.1	946±0.2	682.2±0.1	242.9±0.1	275.7±0.1	393.6±0.1	433.7±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen bileşiklerden hiperisin bileşiğini kontrol grubundaki miktarının 1.2 katına, hiperforin, hiperozit ve kersetin bileşikler ise 1.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.3.). Yapılan bu uygulama neticesinde psödohiperisin miktarında azalma olurken rutin bileşiği ise tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarında artış olduğu görülmüştür. Hesperidin bileşiği ise kontrol ve 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilememiştir. 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen bileşiklerden olan psödohiperisin miktarında azalmaya neden olurken geriye kalan bileşiklerin tamamının miktarında artış sağlayarak etkili bir uygulama olmuştur.

250 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği kontrol grubunun 2.3 katına, hiperforin bileşiği 1.9 katına, hiperozit bileşiği 2 katına, psödohiperisin bileşiği 1.6 katına, kersetin bileşiği ise 2.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.3.). Rutin bileşiği ise kontrol grubunda tespit edilememişken 250 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarında artış olduğu görülmüştür. Hesperidin bileşiği kontrol grubunda yokken 250 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespiti yapılmıştır. 250 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin tamamının miktarında artış gerçekleşmiştir.

300 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.3 katına; hiperforin 2 katına, hiperozit 1.9 katına çıkmıştır (Çizelge 4.3.). Psödohiperisin ve kersetin bileşikler kontroldeki miktarıyla olduğu görülürken, rutin bileşiği ise tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarında artış saptanmıştır. Hesperidin bileşiği ise kontrol grubunda tespit edilememişken, 250 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. 300 mgL⁻¹'lik Al₂O₃

nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarını artıran etkili bir uygulama olmuştur.

H. perforatum'un gövde dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarı Al_2O_3 nanopartikül uygulamalarıyla arttığı belirlenmiştir. *H. perforatum*'un gövde dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını en fazla artıran 250 mgL^{-1} 'lik Al_2O_3 nanopartikül uygulaması olmuştur.

200 mgL^{-1} 'lik Al_2O_3 nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin, hiperozit, psödohiperisin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarı kontrol grubuna göre azalmıştır (Çizelge 4.3.). Hiperforin bileşiğinin miktarında ise önemli bir değişim olmadığı saptanmıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin ve apigenin bileşiklerinin miktarının arttığı, kersitrin, hesperidin, luteolin-7 glukozit ve astragalin bileşiklerinin miktarının ise azaldığı görülmektedir. 200 mgL^{-1} 'lik Al_2O_3 nanopartikül uygulaması, *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin çoğunun miktarında azalmaya neden olan başarısız bir uygulama olmuştur.

250 mgL^{-1} 'lik Al_2O_3 nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği kontrol grubundaki miktarının 1.6 katına, hiperforin bileşiği 1.5 katına, hiperozit bileşiği 1.4 katına, psödohiperisin, kersetin ve rutin bileşikler ise 1.2 katına çıkmıştır (Çizelge 4.3.). İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden hesperidin bileşiğinin miktarında azalma olurken, kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarında artış gerçekleşmiştir. 250 mgL^{-1} 'lik Al_2O_3 nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerden hesperidin hariç diğerlerinin miktarını artırdığı tespit edilmiştir.

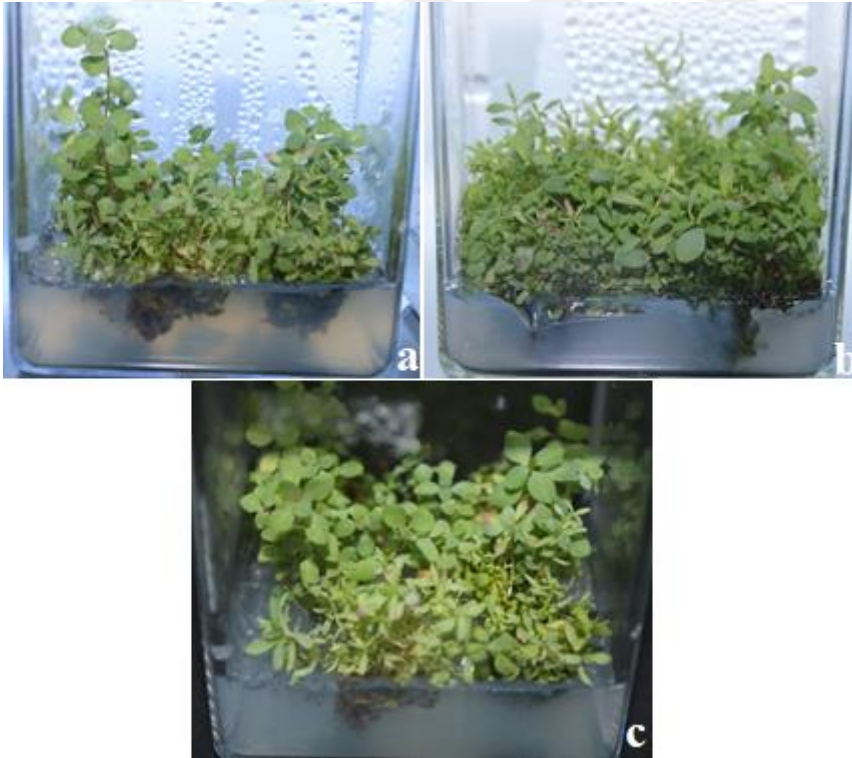
300 mgL^{-1} 'lik Al_2O_3 nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği kontrol grubunun 1.5 katına, hiperozit bileşiği 1.2 katına, psödohiperisin bileşiği ise 1.2 katına çıkmıştır (Çizelge 4.3.). Hiperforin ve rutin bileşiklerinin miktarında ise çok düşük oranda artış meydana gelmiştir. Kersetin bileşiğinin miktarında ise azalma olduğu görülmektedir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden hesperidin bileşiğinin miktarında azalma olurken, kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarında artış

gerçekleşmiştir. 300 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin kersetin ve hesperidin dışındaki bütün bileşiklerin miktarını artıran etkili bir uygulama olmuştur.

H. perforatum'un yapraklarında tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarını, Al₂O₃ nanopartiküllerinin 250 ve 300 mgL⁻¹'lik konsantrasyonları artırmıştır. 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması ise fenolik bileşiklerin miktarında azalmaya neden olmuştur. *H. perforatum*'un yapraklarında fenolik bileşiklerin miktarını en fazla artıran 250 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması olmuştur.

4.3.1.3. Al₂O₃Na Nopartiküllerin *H. retusum*'un Sürgün Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. retusum eksplantları Al₂O₃ nanopartiküllerinin 25, 75 ve 200 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar (Şekil 4.5.). Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır.



Şekil 4.5. Al₂O₃ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki *H. retusum* sürgünleri

Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.4.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Al₂O₃ nanopartiküllerin *H. retusum* Aucher sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Kontrol	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹	200 mgL ⁻¹
Hiperisin	42428.6±8	53352.4±10.1	52998.5±10	48087.3±9.1
Hiperforin	48.4±0	141.6±0.1	628.2±0.3	99.5±0.1
Hiperozit	442378.2±55.7	524899.6±66.1	512505.8±64.6	457761.6±57.7
Psödohiperisin	420341.2±72.3	463286.3±79.7	437394.9±75.2	426717.2±73.4
Kersetin	12852.3±7.4	11378.1±6.5	10436.7±6	9611.8±5.5
Rutin	42087.5±5.7	62651.4±8.5	65053.9±8.8	49798±6.8
Kersitrin	476609.8±63.4	590442.1±78.5	588837.8±78.3	507358.5±67.5
Klorojenik asit	19668.6±5.9	21726.5±6.5	19330.9±5.8	15480.3±4.6
Protokateşik asit	7404.7±1.6	6911.1±1.5	7129.7±1.5	7247.3±1.6
Hesperidin	19119.2±3.1	28273.4±4.6	28451.9±4.6	22662.7±3.7
Luteolin	1706.1±0.3	1910.4±0.4	1300.6±0.2	1594.8±0.3
Luteolin-7 glukozit	8007.6±0.7	8116.4±0.7	8830.6±0.8	8340.2±0.7
Astragalin	4810.9±0.7	6203.1±0.9	5834.3±0.9	5531±0.8
Apigenin	344.9±0.1	358.8±0.1	291.5±0.1	356.3±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.2 katına; hiperforin bileşiği 2.9 katına, rutin bileşiği ise 1.4 katına çıktığı saptanmıştır (Çizelge 4.4.). Hiperozit ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarında çok düşük oranlarda artış olurken, kersetin bileşiğinin miktarında ise azalma olduğu tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerin miktarı kontrol grubundaki miktarıyla karşılaştırıldığında, kersitrin 1.2 katına, hesperidin 1.4 katına, astragalin bileşiğinin ise 2 katına çıktığı görülmektedir. Klorojenik asit ve luteolin bileşiklerinde çok düşük oranda artış olmuşken, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise değişim olmadığı saptanmıştır. Protokateşik asit bileşiğinin miktarının azaldığı belirlenmiştir. 25 mgL⁻¹'lik nanopartikül uygulaması *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen fenolik bileşiklerin özellikle de ilk beş bileşiğin miktarını artırıcı bir uygulama olmuştur.

75 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.2 katına, hiperforin bileşiği 13 katına, rutin bileşiği de 1.5 katına çıkmıştır (Çizelge 4.4.). Hiperozit bileşiğinde ise çok düşük oranda bir artış gerçekleşirken,

psödohiperisinin bileşiğinin miktarında ise değişim olmadığı saptanmıştır. Kersetin bileşiğinin miktarı, 75 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında azalmıştır. İlk altı bileşik dışındaki bileşiklerin miktarı, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kersitrin bileşiği 1.2 katına, hesperidin bileşiği 1.4 katına, astragalin bileşiğinin de 1.2 katına çıktığı tespit edilmiştir. Luteolin-7 glukozit miktarında çok düşük orandabir artış gerçekleşmişken, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin ve apigenin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu görülmüştür. 75 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum* sürgünlerinde özellikle hiperforin bileşiğinin miktarını artırmada etkili olmuştur.

200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında kontrol grubuna göre hiperisin, hiperozit ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarında değişim olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.4.). Hiperforin miktarı kontrol grubunun 2 katına çıkarken, kersetin bileşiğinin miktarında azalma görülmüştür. Rutin bileşiğinde çok düşük orandabir artış gerçekleşmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin bileşiğinin miktarında değişim olmazken, klorojenik asit, protokateşik asit ve luteolin bileşiklerinin miktarında ise azalma tespit edilmiştir. Hesperidin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında çok düşük oranda artış olmuştur. 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması ile *H. retusum* sürgünlerindeki fenolik bileşiklerin miktarında önemli orandabir değişim meydana gelmemiştir.

H. retusum sürgünlerinde 25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması, 75 ve 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamalarına oranla özellikle ilk altı bileşiğin miktarını artırma konusunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.3.1.4 Al₂O₃ Nanopartiküllerin *H. retusum*'un Gövde ve Yaprak

Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerinin Miktarına Etkisi

H. retusum eksplantları Al₂O₃ nanopartiküllerinin 10, 15 ve 25 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır. Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin gövde ve yaprak dokularındaki hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.5.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Al₂O₃ nanopartiküllerin *H. retusus* Aucher'in gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi

Fenolik bileşik**	Gövde				Yaprak			
	Kontrol	10 mgL ⁻¹	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹	Kontrol	10 mgL ⁻¹	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹
Hiperisin	13970.8±2.6	24650.8±4.7	34978.7±6.6	40646±7.7	50662.9±9.6	74873.5±14.2	73114.8±13.8	69196.1±13.1
Hiperforin	307694.2±128.6	245663.7±102.7	255551.4±106.8	330222.6±138	607520.7±253.9	597219±249.6	418777.6±175	530951.2±221.9
Hiperozit	450227.6±56.7	483374.2±60.9	703827.4±88.7	779617.1±98.2	1713474.9±215.9	1969196.2±248.1	1382191.2±174.2	1789341.4±225.5
Psödohiperisin	199406.6±34.3	235299.4±40.5	273575.5±47.1	315365.1±54.2	422071.7±72.6	472951.3±81.3	455915.6±78.4	463944.1±79.8
Kersetin	28441.1±16.3	25059.6±14.4	41566.9±23.8	51181.9±29.3	121111.6±69.4	93863.4±53.8	90437.9±51.8	101893±58.4
Rutin	33304.8±4.5	43356.6±5.9	56661.3±7.7	55544.3±7.6	135872.9±18.5	123500.4±16.8	79314.7±10.8	108707.3±14.8
Kersitrin	470251.8±62.5	547001.9±72.8	796369.8±105.9	989987.5±131.7	1693904.7±225.3	1977016±262.9	1672283.1±222.4	2186234±290.8
Klorojenik asit	40789.5±12.2	28523.8±8.5	47864.8±14.3	42924.3±12.8	130287.2±39	144052.1±43.1	61420.9±18.4	68433.1±20.5
Protokateşik asit	2125.3±0.5	1969.5±0.4	2761.2±0.6	3757.5±0.8	2309.6±0.5	3528.1±0.8	3683.8±0.8	4321.1±0.9
Hesperidin	17211.4±2.8	21316.9±3.5	28386±4.6	29031.6±4.7	71614.1±11.6	65793.9±10.7	40196±6.5	53698.3±8.7
Luteolin	1925.7±0.4	2993.9±0.6	1856.6±0.3	1647.3±0.3	1667.7±0.3	2796.6±0.5	1970.1±0.4	2795.8±0.5
Luteolin-7 glukozit	9310.7±0.8	16884.9±1.5	9230.7±0.8	10170.6±0.9	5851.7±0.5	9388.7±0.8	5779±0.5	6074.9±0.5
Astragalin	4398.5±0.7	2944.1±0.5	8490±1.3	8895.9±1.4	26245.2±4	32055.6±4.9	20947.7±3.2	28742.5±4.4
Apigenin	525.4±0.1	583.6±0.1	507.9±0.1	455.6±0.1	263±0.1	349.4±0.1	231±0.1	412.8±0.1

*Sonnuçlar üç tekrarin ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

10 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.7 katına; rutin bileşiği ise 1.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.5.). Hiperozit ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli oranda bir değişim meydana gelmemiştir. Hiperforin ve kersetin bileşiklerinin miktarında ise azalma olduğu tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden klorojenik asit, protokateşik asit ve astragalin bileşiklerinin miktarında azalma gerçekleşirken, kersitrin, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin de miktarında artış olmuştur. 10 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerden özellikle hiperisin ve rutin miktarının arttığı saptanmıştır.

15 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 2.5 katına; hiperozit 1.5 katına, psödohiperisin 1.3 katına, kersetin 1.4 katına, rutin bileşiği ise 1.7 katına çıkmıştır (Çizelge 4.5.). Hiperforin bileşiğinin miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarında azalma, kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin ve astragalin bileşiklerinin miktarında ise artış saptanmıştır. 15 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum*'un gövde dokusunda özellikle hiperisin bileşiğinin miktarını artırmada etkili bir uygulama olmuştur.

25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 2.9 katına; hiperozit 1.7 katına, psödohiperisin 1.5 katına, kersetin 1.7 katına, rutin bileşiği ise 1.6 katına çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.5.). Hiperforin bileşiğinin miktarında önemli oranda bir değişim olmamıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden luteolin ve apigenin miktarları azalırken, kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin, luteolin-7 glukozit ve astragalin bileşiklerinin miktarı ise artmıştır. 25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarını artıran etkili bir uygulama olmuştur.

H. retusum'un gövde dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda, 25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması, 10 ve 15 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur

10 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği kontrol grubunun 1.4 katına çıkmıştır (Çizelge 4.5.). Hiperforin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarının ise azaldığı belirlenmiştir. Hiperozit ve psödohiperisin miktarında çok düşük oranda artış olduğu tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden hesperidin bileşiğinin miktarında azalma olurken, kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarında artış gerçekleşmiştir. 10 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum*'un yaprak dokusundaki ilk altı bileşiğin miktarını artırmada başarısız bir uygulama olmuştur.

15 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği kontrol grubundaki miktarının 1.4 katına çıkmıştır (Çizelge 4.5.). Hiperforin, hiperozit, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında ise azalma olduğu tespit edilmiştir. Psödohiperisin bileşiğinin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında değişmediği saptanmıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden olan protokateşik asit ve luteolin bileşiklerinin miktarı artmışken, kersitrin, klorojenik asit, hesperidin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarının azaldığı görülmüştür. 15 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen birçok bileşiğin miktarı kontrolden daha düşük çıkmıştır.

25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.5.). Hiperforin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Hiperozit ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında değişmediği saptanmıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden olan klorojenik asit ve hesperidin bileşiklerinin miktarı azalırken, kersitrin, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarı artmıştır. 25 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum*'un yaprak dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını arttırmada yeterince etkili olmamıştır.

H. retusum'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarını artırmak için yapılan Al₂O₃ nanopartiküllerinin üç farklı konsantrasyonu başarısız olarak gerçekleşmiştir.

Bitkilerin büyüme ortamlarına ortamlarına eklenen nanopartiküllerin bitkileri doğrudan etkileyemediği ama dolaylı olarak bitkilerdeki biyokimyasal süreçlere müdahale ederek bitkilerde değişimlere yol açtığı düşünülmektedir (Navarro ve ark. 2008). Nanopartiküller bitkilerle etkileşime girdiğinde karşılaştıkları ilk engel hücre duvarıdır. Hücre duvarının varlığından dolayı bitkiye girmekte zorlanmaktadırlar. Nanopartiküller hücre zarlarına zarar veren ve geçirgenliği değiştiren hidroksil radikalleri ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırabilirler (Hussain ve ark. 2017). Bunun sonucu olarak, nanopartiküllerin bitkiye girişi daha kolay hale geliyor ve bu nanopartiküller tarafından indüklenen stres, sekonder metabolitlerin üretiminin artmasına neden olur (Kim ve ark. 2007). Sekonder metabolitlerin miktarının artması uygulanan nanopartikül çeşidine, dozuna ve bitki türüne göre değişiklik gösterebilmektedir. Bitki ve nanopartikül etkileşimi optimum koşullarda sağlanamadığında nanopartiküller bitki açısından toksik etki gösterip beklenilenin aksi sonuçlarda verebilmektedir.

H. perforatum sürgünlerinde 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması özellikle hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarını artırmada en etkili uygulama olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.). *H. perforatum* sürgünlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarlarını artırmada besi ortamına eklenen Al₂O₃ nanopartiküllerinin konsantrasyon artışının olumlu etkide bulunduğu söylenebilir.

H. perforatum'un gövde ve yaprak dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırmada 250 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulaması, 200 ve 300 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur (Çizelge 4.3.). *H. perforatum*'un gövde ve yaprak dokusunda Al₂O₃ nanopartiküllerinin konsantrasyon artışı bileşiklerin miktarını artırmada olumlu etkide bulunmuştur. Çünkü 300 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasında her ne kadar fenolik bileşiklerin miktarı 250 mgL⁻¹'lik konsantrasyona göre düşmüşse bile kontrol grubu ve 200 mgL⁻¹'lik Al₂O₃ nanopartikül uygulamasındaki miktarından yine de yüksek çıkmıştır. *H. perforatum* sürgün, gövde ve yaprak dokularının fenolik bileşiklerinin miktarını artırmada Al₂O₃ nanopartikül uygulamalarının etkili olduğu görülmektedir. Elde edilen sonuçlardan anlaşılan bitkilerde sekonder metabolitlerin miktarını artırılabilmesi için en önemli noktanın nanopartiküllerin bitkinin olumlu cevap verebileceği uygun konsantrasyonlarda ortama

verilmesidir. Benzer sonuçlara Poborilova ve ark. (2013), Al_2O_3 nanopartiküllerini (10–100 mg mL^{-1}) tütün hücresi süspansiyon kültürlerine verdikleri çalışmada da ulaşmışlardır. Al_2O_3 nanopartiküllerinin fenolik içeriğin önemli ölçüde arttığını rapor etmişler. Bununla birlikte tütün hücresi süspansiyon kültürlerine Al_2O_3 nanopartiküllerin eklenmesinin, reaktif oksijen (ROS) ve azot türleri (RNS) oluşumu yoluyla hücre canlılığını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir. Al_2O_3 nanopartikülleri tarafından oluşturulan bu stres durumu bitkinin kendini korumak için sekonder metabolit sentezini artırdığı düşünülebilir. Fakat nanopartikül konsantrasyonunun artışıyla birlikte bitki hücreleri için toksik etki oluşturduğu bu dolayıda sekonder metabolitlerin miktarında düşüşe neden olduğu bildirilmiştir.

H. retusum sürgünlerinde 25 mg L^{-1} 'lik Al_2O_3 nanopartikül uygulaması özellikle ilk altı bileşiğin miktarını artırma konusunda en etkili uygulama olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.4.). 75 ve 200 mg L^{-1} 'lik Al_2O_3 nanopartikül uygulamalarında her ne kadar fenolik bileşiklerin miktarı 25 mg L^{-1} 'lik konsantrasyona göre düşmüşse bile kontrol grubundaki miktarından yine de yüksek çıkmıştır. Bu nedenle *H. retusum* sürgünlerinde Al_2O_3 nanopartiküllerinin konsantrasyon artışı fenolik bileşiklerin miktarını artırmada olumlu etkide bulunmuştur

H. retusum'un gövde dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını en fazla artıran 25 mg L^{-1} 'lik Al_2O_3 nanopartikül uygulaması olmuştur (Çizelge 4.5.). Al_2O_3 nanopartiküllerinin konsantrasyonunun artışı *H. retusum*'un gövde dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda olumlu etkide bulunduğu söylenebilir. *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarını artırmak için yapılan Al_2O_3 nanopartikül uygulamaları (10, 15 ve 25 mg L^{-1}) başarısız olmuştur (Çizelge 4.5.). *H. retusum*'un sürgünlerinde Al_2O_3 nanopartiküllerinin düşük konsantrasyonu etkili olurken gövde bölümünde yapılan en yüksek konsantrasyonun etkili olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan nanopartikül konsantrasyonuna göre elde edilen sonuçlar farklılık göstermiştir. Benzer şekilde Jamshidi ve ark. (2016), *Corylus avellana* hücre süspansiyon kültürüne yaptıkları 5 mg L^{-1} Ag nanopartikül muamelesi taksol üretimini önemli ölçüde artırmıştır. Bununla birlikte, 2.5 ve 10 mg L^{-1} Ag nanopartiküllerle muamele edilmesi, hücrelerin taksol üretim potansiyelini, kontrolün sırasıyla % 60 ve % 56'sına indirmiştir. *H. retusum*'da sürgün ve gövde nanopartikül

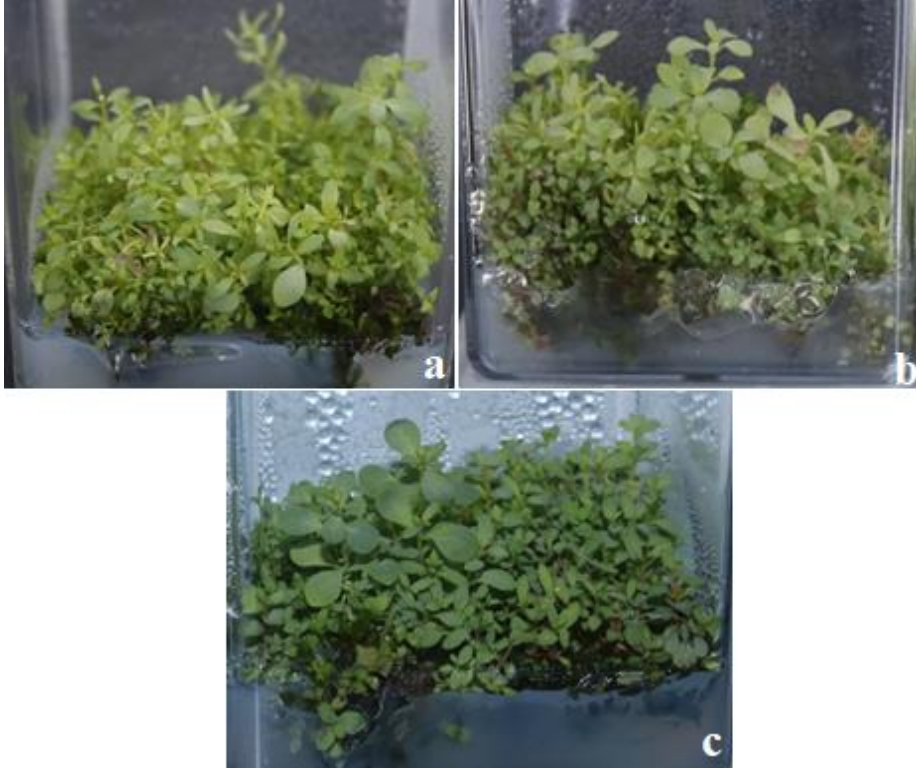
uygulamasına olumlu cevap verirken yaprak dokusunda beklenen sonuç elde edilememiştir. Bu noktanın aydınlatılması ilerde yapılacak çalışmalarla gerçekleştirilebilir.

4.3.2. Çinko Oksit (ZnO) Nanopartikülleri

4.3.2.1. ZnO Nanopartiküllerin *H. perforatum*'un Sürgün (Genç filiz)

Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. perforatum eksplantları ZnO nanopartiküllerinin 25, 75 ve 200 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar (Şekil 4.6.). Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır.



Şekil 4.6. ZnO nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki *H. perforatum* sürgünleri

Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.6.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. ZnO nanopartiküllerin *H. perforatum* L. sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Kontrol	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹	200 mgL ⁻¹
Hiperisin	8373.2±1.6	20577.1±3.9	17477.9±3.3	28542.9±5.4
Hiperforin	48.7±0.1	149.1±0.1	35.6±0	503.5±0.2
Hiperozit	727166.5±91.6	820096.1±103.3	791227.5±99.7	783164.9±98.7
Psödohiperisin	116608.9±20.1	171713.9±29.5	156617.5±26.9	184292.4±31.7
Kersetin	9334.7±5.3	10645.1±6.1	8456.2±4.8	8594.3±4.9
Rutin	---	8225.4±1.1	7509.9±1	6980.6±0.9
Kersitrin	302880.6±40.3	509605.2±67.8	486800.6±64.7	549659.2±73.1
Klorojenik asit	995302.3±297.6	1058956.1±316.6	1037391.6±310.2	999391.2±298.8
Protokateşik asit	3101.7±0.7	3683.6±0.8	4353±0.9	4126.8±0.9
Hesperidin	---	21531.9±3.5	22360.6±3.6	21435.8±3.5
Luteolin	1211.5±0.2	4041.6±0.8	8967.4±1.7	26399.3±5
Luteolin-7 glukozit	3361±0.3	9222.9±0.8	19290.5±1.7	29057±2.5
Astragalin	2278.1±0.3	9531.1±1.5	8133.6±1.2	4022.8±0.6
Apigenin	158.7±0.1	720.2±0.1	550.6±0.1	808.5±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarı kontrol grubundakimiktari ile karşılaştırıldığında, hiperisin bileşigi 2.4 katına; hiperforin bileşigi 3katına, psödohiperisin bileşigi ise 1.4 katına çıkmıştır (Çizelge 4.6.). Hiperozit ve kersetin bileşiklerinin miktarında çok düşük oranda artış gerçekleşmiştir. Rutin bileşigi ise kontrol grubunda tespit edilemezken, 25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışındaki bileşiklerden kersitrin bileşigi 1.6 katına; luteolin bileşigi 3.3katına, luteolin-7 glukozit bieşigi 2.7katına, astragalin bileşigi 4katına, apigenin bileşigi ise 4.5 katına çıktığı görülmüştür. Klorojenik asit miktarında değişim gerçekleşmezken, protokateşik asit miktarında çok düşük oranda artış gerçekleşmiştir. Hesperidin bileşigi ise kontrol grubunda tespit edilemezken, 25 mgL⁻¹ ZnO nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. 25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, *H. perforatum* sürgünlerindeki özellikle hiperisin, hiperforinve psödohiperisin bileşiklerinin miktarını arttırma konusunda etkili bir uygulama olmuştur.

75 mgL⁻¹'lik Zn Onanopartikül uygulamasında *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşigi 2 katına, psödohiperisin bileşiginin ise 1.3 katına çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.6.).

Hiperozit bileşiğinin miktarında değişim gerçekleşmezken, hiperforin ve kersetin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu belirlenmiştir. Rutin bileşiği ise kontrol grubunda tespit edilemezken, 75mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışındaki bileşiklerden kersitrin 1.6 katına, protokateşik asit 1.4katına, luteolin 7.4katına, luteolin-7 glukozit 5.7katına, astragalin 3.5katına ve apigenin bileşiği ise 3.4 katına çıkmıştır. Klorojenik asit miktarında değişim olmadığı saptanmıştır. Hesperidin bileşiği kontrol grubunda görülmezken, 75mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. 75 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, *H. perforatum* sürgünlerindeki hiperisin, psödohiperisin, kersitrin, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarını artırmada etkili bir uygulama olmuştur.

200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiği 3.4 katına, hiperforin bileşiği 10 katına, psödohiperisin bileşiği de 1.5 katına çıkmıştır (Çizelge 4.6.). Hiperozit bileşiğinin miktarında değişim olmazken, kersetin bileşiğinin miktarında azalma olduğu görülmüştür. Rutin bileşiği kontrol grubunda bulunamazken, 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışındaki bileşiklerden kersitrin bileşiği 1.8 katına, protokateşik asit 1.3katına, luteolin 21katına, luteolin-7 glukozit 8.6katına, astragalin 1.7katına, apigenin bileşiği ise 5 katına çıktığı saptanmıştır. Klorojenik asit miktarında kontrol grubundaki miktarına göre değişim olmadığı görülmüştür. Hesperidin bileşiği ise kontrol grubunda tespit edilemezken 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül konsantrasyonu *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarını artırmada oldukça etkili bir uygulama olmuştur.

H. perforatum sürgünlerinde 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, 25 ve 75 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamalarına oranla özellikle hiperisin ve türevi miktarını artırma konusunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir

4.3.2.2. ZnO Nanopartiküllerin *H. perforatum*'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. perforatum eksplantları ZnO nanopartiküllerinin 200, 250 ve 300 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört

farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL^{-1} BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır. Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin gövde ve yaprak dokularındaki hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar çizelge 4.7.'de sunulmuştur.



Çizelge 4.7. ZnO nanopartiküllerin *H. perforatum* L.'nin gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Gövde				Yaprak			
	Kontrol	200 mgL ⁻¹	250 mgL ⁻¹	300 mgL ⁻¹	Kontrol	200 mgL ⁻¹	250 mgL ⁻¹	300 mgL ⁻¹
Hiperisin	5130.3±1	5090.3±1	7154.4±1.4	11274.9±2.1	23588.5±4.5	45283.7±8.6	28773.7±5.4	43447±8.2
Hiperforin	50587±21.1	72707±30.4	78966.3±33	67105.6±28.1	195479.8±81.7	201821±84.4	170930.5±71.4	284893.1±119.1
Hiperozit	266036.6±33.5	240126.6±30.3	222748.8±28.1	270335.8±34.1	1259560.3±158.7	1643469.4±207.1	1183301.9±149.1	1321882±166.6
Psödohiperisin	63798.9±11	49937.4±8.6	66955±11.5	78108.9±13.4	195550.6±33.6	283982.4±48.8	200473.3±34.5	252938.3±43.5
Kersetin	2901±1.7	6983.2±4	6675.9±3.8	7316.7±4.2	27954.7±16	35729.8±20.5	21229.5±12.2	24857.5±14.2
Rutin	---	379.7±0.1	775.7±0.1	---	737±0.1	1231±0.2	---	711.4±0.1
Kersitrin	53385.4±7.1	71597±9.5	86579±11.5	84534.2±11.2	467297.3±62.2	660401.1±87.8	422381.1±56.2	552201.9±73.4
Klorojenik asit	769413.8±230.1	658588±196.9	625630.2±187.1	666983.3±199.4	2237552.5±669	2997691.3±896.3	2576614.3±770.4	2634136.1±787.6
Protokateşik asit	762.2±0.2	1310.7±0.3	1385.8±0.3	1478.4±0.3	645.5±0.1	1017.2±0.2	934.8±0.2	1588.6±0.3
Hesperidin	---	325±0.1	565.2±0.1	---	503.5±0.1	658.5±0.1	235.9±0	427.9±0.1
Luteolin	1487.2±0.3	36198.2±6.8	34889.7±6.6	36397.4±6.8	868±0.2	11890.2±2.2	15920.1±3	26829.2±5
Luteolin-7 glukozit	2990.6±0.3	7904±0.7	6936.8±0.6	10911.5±0.9	4226.9±0.4	2994.4±0.3	3494.5±0.3	8303.2±0.7
Astragalin	1270.1±0.2	2546.8±0.4	2782.2±0.4	2635.9±0.4	20319.6±3.1	26041.7±4	16511.4±2.5	18248.2±2.8
Apigenin	337.9±0.1	1678.5±0.3	1492.4±0.3	1568.2±0.3	242.9±0.1	500.4±0.1	816.1±0.1	789.1±0.1

*Sonn  lar    tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri   g analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan b  t  n bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin, hiperozit ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarı, kontrol grubundaki miktarına göre azaldığı saptanmıştır (Çizelge 4.7.). Hiperforin bileşiği, kontrol grubunun 1.4 katına; kersetin bileşiği ise 2.4 katına çıkmıştır. Rutin bileşiği kontrol grubunda tespit edilemezken, 200 mgL⁻¹ ZnO nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden klorojenik asit bileşiğinin miktarı azalırken, kersitrin, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında artma gerçekleşmiştir. 200 mgL⁻¹ ZnO nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un gövde dokusundaki hiperforin, kersetin ve ilk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden yedi tanesinin miktarında artışgerçekleştiren etkili bir uygulama olmuştur.

250 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.3 katına; hiperforin 1.5 katına, kersetin bileşiği ise 2.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.7.). Hiperozit bileşiğinin miktarı azalırken, psödohiperisin bileşiğinin miktarında önemli oranda bir değişim meydana gelmemiştir. Rutin bileşiği kontrol grubunda tespit edilememişken, 250 mgL⁻¹'lik ZnO uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden klorojenik asit bileşiğinin miktarı azalırken, kersitrin, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında artma gerçekleşmiştir. 250 mgL⁻¹ ZnO nanopartikül uygulamasıyla *H. perforatum*'un gövde dokusundaki hiperisin, hiperforin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarının artmasını sağlamıştır.

300 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 2.1 katına; hiperforin 1.3 katına, psödohiperisin 1.2 katına, kersetin bileşiği ise 2.5 katına çıkmıştır (Çizelge 4.7.). Hiperozit bileşiğinin miktarında değişim gerçekleşmezken, rutin bileşiği ise tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden klorojenik asit bileşiğinin miktarı azalırken, kersitrin, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında artma gerçekleşmiştir. 300mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin genelinin miktarının artmasında etkili olmuştur.

H. perforatum'un gövde dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda, 300 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, 200 ve 250 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur

200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.9 katına; hiperozit 1.3katına, psödohiperisin 1.4 katına, kersetin 1.2 katına, rutin bileşiği ise 1.6 katına çıkmıştır (Çizelge 4.7.). Hiperforin bileşiğinin miktarında da çok düşük oranda bir artış meydana gelmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden luteolin-7 glukozit bileşiğinin miktarı azalırken, kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında artma gerçekleşmiştir. 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarının artmasını sağlayan etkili bir uygulama olmuştur.

250 mg/L'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.2 katına çıkmıştır. Hiperforin ve hiperozit bileşiklerinin miktarında azalma meydana gelmiştir (Çizelge 4.7.). Kersetin bileşiğinin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında değişmediği saptanmıştır. Rutin bileşiğinin kontrol grubunda tespiti yapılmışken, 250 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, hesperidin, astragalin ve luteolin-7 glukozit bileşiklerinin miktarında azalma meydana gelirken, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, ve apigenin bileşiklerinin miktarında artış gerçekleşmiştir. 250 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin çoğunluğunda miktar artışı sağlayamadığından başarısız bir uygulama olmuştur.

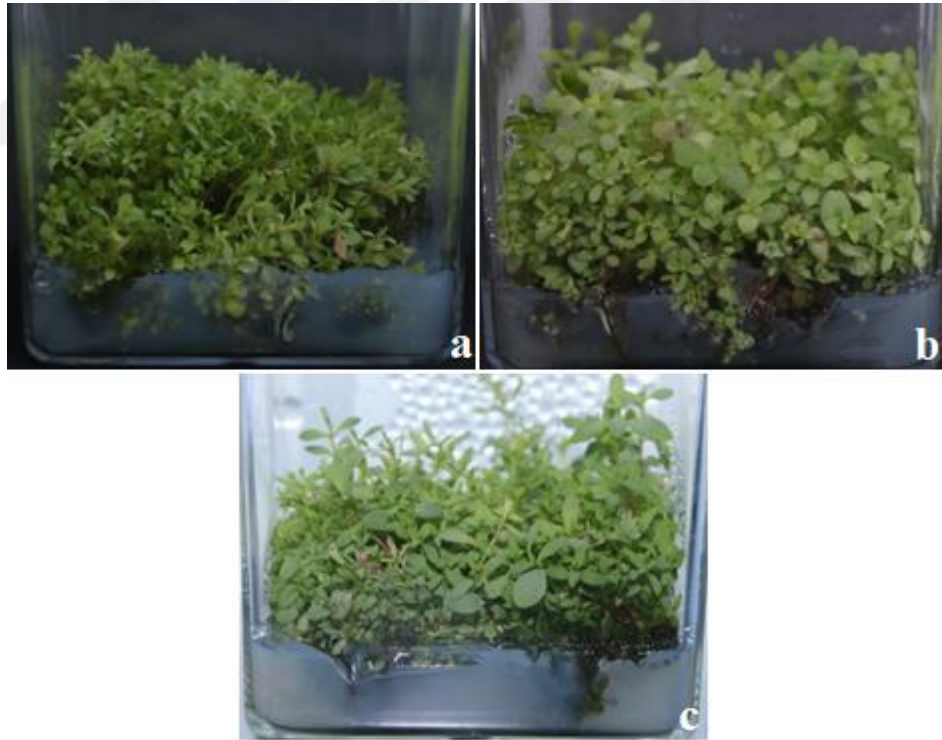
300 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.8katına; hiperforin bileşiği 1.4katına, psödohiperisin bileşiği ise 1.2 katına çıkmıştır (Çizelge 4.7.). Hiperozit bileşiğinin miktarında önemli oranda bir değişim meydana gelmemiştir. Kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarı kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden hesperidin ve astragalin bileşiklerinin miktarı azalırken, kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarında artış gerçekleşmiştir. 300 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül

uygulaması, *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerden sadece hiperisin, hiperforin ve psödohiperisin miktarında artış gerçekleştirirken, diğer bileşiklerde miktar artışı konusunda yeterince etkili bir uygulama olmamıştır.

H. perforatum'un yaprak dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırmada 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, 250 ve 300 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur

4.3.2.3. ZnO Nanopartiküllerin *H. retusum*'un Sürgün Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. retusum eksplantları ZnO nanopartiküllerinin 25, 75 ve 200 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır.



Şekil 4.7. ZnO nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki *H. retusum* sürgünleri

Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerin içeriği analiz edilerek sonuçlar çizelge 4.8.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.8. ZnO nanopartiküllerin *H. retusum* sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Kontrol	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹	200 mgL ⁻¹
Hiperisin	42428.6±8	38418.1±7.3	44385.1±8.4	42908.8±8.1
Hiperforin	48.4±0.1	144.3±0.1	574.5±0.2	87.5±0.1
Hiperozit	442378.2±55.7	498625.6±62.8	427850.2±53.9	422602.1±53.2
Psödohiperisin	420341.2±72.3	407110.2±70	404237.8±69.5	380012.2±65.4
Kersetin	12852.3±7.4	13774.1±7.9	13055.4±7.5	13712.9±7.9
Rutin	42087.5±5.7	34869.5±4.7	39978.7±5.4	49048.2±6.7
Kersitrin	476609.8±63.4	540567.8±71.9	548242.5±72.9	603109.5±80.2
Klorojenik asit	19668.6±5.9	21726.5±6.5	15936.2±4.8	22074.5±6.6
Protokateşik asit	7404.7±1.6	5479.6±1.2	5787.6±1.2	6472.3±1.4
Hesperidin	19119.2±3.1	16955.6±2.7	17416.7±2.8	22763.8±3.7
Luteolin	1706.1±0.3	1897.8±0.4	2016.2±0.4	7768.6±1.5
Luteolin-7 glukoze	8007.6±0.7	7418.9±0.6	5543±0.5	16027.6±1.4
Astragalin	4810.9±0.7	4933.9±0.8	5230.5±0.8	4647.7±0.7
Apigenin	344.9±0.1	264.8±0.1	301.3±0.1	752.6±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır.**Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen hiperisin, psödohiperisin ve rutin bileşiklerinin miktarı, kontrol grubuna göre azaldığı görülmektedir (Çizelge 4.8.). Hiperforin bileşiğinin miktarı, kontrol grubunun 2.9 katına çıkmıştır. Hiperozit ve kersetin bileşiklerinin miktarında çok düşük oranda bir artış meydana gelmiştir. İlk altı bileşik dışındaki bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, luteolin ve astragalin bileşiklerinin miktarında kontrol grubuna göre çok düşük oranda artış meydana gelmiştir. Protokateşik asit, hesperidin, luteolin-7 glukoze ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise azalma olduğu tespit edilmiştir. 25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, *H. retusum* sürgünlerindeki hiperforin bileşiği dışındakifenolik bileşiklerin miktarında çok düşük oranda artış oluşturmuştur.

75 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen hiperisin, psödohiperisin, kersetin ve hiperozit bileşiklerinin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında önemli oranda bir değişim olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.8.). Hiperforin bileşiğinin miktarı miktarının 11 katına çıkarken, rutin bileşiğinin miktarında azalma gerçekleşmiştir. İlk altı bileşik dışındaki bileşiklerin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kersitrin ve luteolin miktarında çok düşük

oranda artış olduğu görülmüştür. Klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise azalma olduğu tespit edilmiştir. Astragalin bileşiğinin miktarında ise değişim olmadığı belirlenmiştir. 75 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması *H. retusum* sürgünlerindeki hiperforin bileşiği dışındakifenolik bileşiklerin miktarını artıramamıştır.

200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerden hiperforin bileşiğinin miktarı, kontrol grubunun 1.8 katına çıktığı; hiperisin bileşiğinin miktarının ise değişmediği görülmüştür (Çizelge 4.8.). Hiperozit ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarında azalma gerçekleşmişken, kersetin bileşiğinin miktarı değişmemiştir. Rutin bileşiğinde ise çok düşük oranda bir artış meydana gelmiştir. İlk altı bileşik dışındaki bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit ve hesperidin bileşiklerinin miktarında çok düşük oranda bir artış olduğu belirlenmiştir. Protokateşik asit ve astragalinin miktarı ise azalmıştır. Luteolin bileşiğinin miktarı 4.5 katına, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarı da 2 katına çıkmıştır. 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, *H. retusum* sürgünlerindeki bileşiklerden hiperforinin, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin miktarında artış sağlarken geriye kalan diğer bileşiklerin miktarını artırmada yeterince etkili olamamıştır.

H. retusum sürgünlerinde ilk beş bileşik dışındaki bileşiklerin miktarını artırma konusunda 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, 25 ve 75 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamalarına oranla daha etkili olmuştur (Çizelge 4.8.). İlk beş arasında yer alan hiperozit ve kersetin bileşikleri 25 mgL⁻¹ ZnO uygulaması ile en yüksek miktarına ulaşmışken, hiperisin ve hiperforin bileşikleri ise 75 mgL⁻¹'lik uygulamada en yüksek miktarına ulaşmıştır.

4.3.2.4. ZnO Nanopartiküllerin *H. retusum*'un Gövde ve Yaprak

Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. retusum eksplantları ZnO nanopartiküllerinin 10, 15 ve 25mgL⁻¹ konsantrasyonunu içeren üç farklı grup ile bir kontrol grubunda kültüre alınmışlardır. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır. Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin gövde ve yaprak dokularındaki hiperisin ve türevi bileşikler ile bazı fenolik bileşiklerin içeriği analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.9.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.9. ZnO nanopartiküllerin *H. reussum*'un gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Gövde				Yaprak			
	Kontrol	10 mgL ⁻¹	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹	Kontrol	10 mgL ⁻¹	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹
Hiperisin	13970.8±2.6	40201.7±7.6	20249.1±3.8	26410.6±5	50662.9±9.6	49566±9.4	54337.2±10.3	59508.6±11.2
Hiperforin	307694.2±128.6	455395.7±190.4	320085±133.8	261810.1±109.4	607520.7±253.9	545727.9±228.1	572779.1±239.4	627799.3±262.4
Hiperozit	450227.6±56.7	1143161.3±144	529661.9±66.7	551637.3±69.5	1713474.9±215.9	1683244.5±212.1	1538770.7±193.9	1643527.7±207.1
Psödohiperisin	199406.6±34.3	330636.7±56.9	220471.5±37.9	247907.3±42.6	422071.7±72.6	391177±67.3	427056.3±73.5	452178.8±77.8
Kersetin	28441.1±16.3	76501.2±43.8	28945±16.6	30387.1±17.4	121111.6±69.4	82806.5±47.4	69790.1±40	85756.8±49.1
Rutin	33304.8±4.5	78552.2±10.7	45365.1±6.2	45696.5±6.2	135872.9±18.5	134331.3±18.3	111041.8±15.1	116548.8±15.9
Kersitrin	470251.8±62.5	1347925.8±179.3	615372±81.8	544850.1±72.5	1693904.7±225.3	1789428.6±238	1648110.4±219.2	1863383.4±247.8
Klorojenik asit	40789.5±12.2	65562.4±19.6	33516±10	37097.9±11.1	130287.2±39	96029.7±28.7	83069.5±24.8	99876.5±29.9
Protokateşik asit	2125.3±0.5	2795.7±0.6	2686.1±0.6	2846.2±0.6	2309.6±0.5	2803.4±0.6	2772.7±0.6	3187.4±0.7
Hesperidin	17211.4±2.8	38156.9±6.2	21819.3±3.5	20712.5±3.4	71614.1±11.6	63890.1±10.4	53821.5±8.7	56083.8±9.1
Luteolin	1925.7±0.4	4134.3±0.8	3742.9±0.7	3747.5±0.7	1667.7±0.3	1590.2±0.3	1399.4±0.3	2567±0.5
Luteolin-7 glukozit	9310.7±0.8	11465.7±1	8615.2±0.7	12445.6±1.1	5851.7±0.5	5506.7±0.5	4640.8±0.4	6532.8±0.6
Astragalin	4398.5±0.7	13004.4±2	5427.2±0.8	3289.8±0.5	26245.2±4	30145.7±4.6	23006.2±3.5	22763±3.5
Apigenin	525.4±0.1	1078.5±0.2	1069±0.2	600.4±0.1	263±0.1	151.7±0	288.8±0.1	278.7±0.1

*Sonnçular üç tekrarin ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerdendirilmiştir.

10 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 2.8 katına; hiperforin bileşiği 1.4katına, hiperozit bileşiği 2.5katına, psödohiperisin bileşiği 1.6katına, kersetin bileşiği 2.6katına, rutin bileşiği ise 2.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.9.). İlk altı bileşik dışındaki bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında da artış gerçekleşmiştir. 10 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarını artırarak oldukça etkili bir uygulama olmuştur.

15 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.4katına; rutin bileşiği ise 1.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.9.). Hiperforin bileşiğinin miktarında, kontrol grubuna göre değişim olmadığı görülmüştür. Hiperozit, psödohiperisin ve kersetin bileşiklerinin miktarında çok düşük oranda artış meydana gelmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerinden klorojenik asit ve luteolin-7 glukozit miktarında azalma gerçekleşirken, kersitrin, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise artış olduğu saptanmıştır. 15 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, hiperisin ve rutin miktarını artırırken diğer fenolik bileşiklerin miktarını artıramamıştır.

25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.8 katına; hiperozit ve psödohiperisin bileşikleri 1.2katına, rutin bileşiği ise 1.3 katına çıktığı görülmüştür (Çizelge 4.9.). Hiperforin bileşiğinin miktarı azalmıştır. Kersetin bileşiği miktarında, kontrol grubundaki miktarıyla karşılaştırıldığında değişim olmadığı saptanmıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerinden klorojenik asit ve astragalin miktarında azalma olurken, diğer bileşiklerin miktarlarında da artış gerçekleşmiştir. 25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, *H. retusum*'un gövde dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını artıran etkili bir uygulama olmuştur.

H. retusum'un gövde dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırmada, 10 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, 15 ve 25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur

10 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin, hiperforin, hiperozit, psödohiperisin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında kontrol grubuna göre azalma meydana gelmiştir (Çizelge 4.9.). İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerinden kersitrin, protokateşik asit ve astragalin bileşiklerinin miktarında artma olurken diğer bileşenlerin miktarında azalma olmuştur. 10 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasıyla *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda başarısız bir uygulama olmuştur.

15 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarında değişme olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.9.). Hiperforin, hiperozit, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerinden protokateşik asit ve apigenin miktarında artma olduğu görülmüştür. Kersitrin, klorojenik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit ve astragalin bileşiklerinin miktarında ise azalma meydana gelmiştir. 15mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, *H. retusum*'un yaprak dokusundaki fenolik bileşiklerin birçoğunun miktarında artma olmazken bazı bileşiklerin miktarı kontrol grubuna göre azalmıştır.

25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin ve hiperforin bileşiklerinin miktarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çok düşük oranda bir artış olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9.). Hiperozit, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu saptanmıştır. Psödohiperisin bileşiğinin miktarında değişim olmamıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerinden kersitrin, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin miktarında artış gerçekleşmişken klorojenik asit, hesperidin ve astragalin miktarında azalma olduğu görülmüştür. 25 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusundaki hiperozit, psödohiperisin, kersetin ve rutin gibi önemli bileşiklerin miktarında artış gerçekleşmemiştir.

ZnO nanopartiküllerinin üç farklı uygulaması da *H. retusum*'un yapraklarındaki fenolik bileşenlerin miktarını artırmada konusunda başarısız olmuştur.

Sekonder metabolitlerin üretiminde nanopartiküllerin etkisi üzerine yok denecek kadar az sayıda çalışma bulunmaktadır. Sekonder metabolitlerin bitkideki üretim nedenlerinden biri de stres durumlarına karşı bitkiyi savunmadır. Bu çalışmada bitkiye ZnO nanopartikülleri verilerilerek bitkide stres durumunun oluşturulması hedeflenmiştir. Çünkü nanopartikül durumundaki bileşikler sahip oldukları spesifik özelliklerden dolayı bitki sistemine etkili bir şekilde nüfus edebilirler. Bu çalışmada da *H. perforatum* ve *H. retusum* bitkilerindeki sekonder metabolitlerin üretimine ZnO nanopartiküllerinin etkisi ölçülmüştür.

H. perforatum'un sürgünlerindeki özellikle hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarını en fazla artıran 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması olmuştur (Çizelge 4.6). *H. perforatum* sürgünlerindeki fenolik bileşiklerin miktarı uygulanan ZnO nanopartiküllerinin konsantrasyonu artıkça artış gösterdiği söylenebilir.

H. perforatum'un gövdesindeki fenolik bileşiklerin miktarı ZnO nanopartiküllerinin üç farklı uygulamasında da artırmıştır. Gövde bulunan fenolik bileşiklerin miktarını en fazla artıran 300 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması olmuştur (Çizelge 4.7). *H. perforatum*'un gövde dokusunda uygulanan ZnO nanopartiküllerinin konsantrasyon artışı bileşiklerin miktarını artırmada olumlu etkide bulunduğu tespit edilmiştir. *H. perforatum*'unyaprak dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarı ZnO nanopartiküllerinin üç farklı uygulamasında da arttığı görülmüştür. 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması fenolik bileşiklerin miktarını artırmada en etkili uygulama olmuştur (Çizelge 4.7). Fenolik bileşikler miktarındaki artma ve azalmalar ZnO nanopartiküllerinin her konsantrasyonuna farklı tepkiler verdiğiinden konsantrasyona göre sabit bir eğilim tespiti yapılamamıştır.

Elde edilen sonuçlardan *H. perforatum*'un sürgün, gövde ve yapraklarının fenolik asit bileşiklerinin miktarca artırma konusunda yüksek konsantrasyondaki ZnO nanopartiküllerinin daha etkili olduğu görülmektedir. Javed ve ark. (2017), *Stevia rebaudiana* Bertoni'nin doku kültürü ortamındaki sürgünlerine ZnO nanopartiküllerinin farklı konsantrasyonlarını (0, 0.1, 1.0, 10, 100 veya 1000 mgL⁻¹) uyguladıkları çalışmada 1 mgL⁻¹ ZnO konsantrasyonunda steviol glikozitlerin miktarı kontrol grubunun 2 katına çıkmıştır. 1 mgL⁻¹ konsantrasyonundan daha yüksek konsantrasyonlardaki ZnO nanopartiküllerinin *S. rebaudiana* Bertoni'de fitotoksik etki

oluşturup steviol glikozitlerin miktarında düşüşe sebep olmuşlardır. Mevcut verilerden hareketle ZnO nanopartiküllerinin her bitki türünde farklı konsantrasyonlarda etkin olabileceği sonucu ortaya çıkmaktadır.

H. retusum sürgünlerinde 200 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması, ilk beş bileşik dışındaki bileşiklerin miktarını artırmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.8.). İlk beş bileşik için geçerli olmamakla beraber genel olarak ZnO nanopartikül konsantrasyonunun artışı *H. retusum* sürgünlerindeki fenolik bileşiklerin miktarını artırmıştır.

H. retusum'un gövde dokusunda ZnO nanopartikül uygulamaları tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarını artırmıştır. Bileşenlerin miktarının artırılmasında 10 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulaması en etkili uygulama olmuştur (Çizelge 4.9.). Fenolik bileşikler miktarındaki artma ve azalmalar ZnO nanopartiküllerinin her konsantrasyonuna farklı tepkiler verdiğinden konsantrasyona göre sabit bir eğilim tespiti yapılamamıştır. *H. retusum*'un yaprak dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda, ZnO nanopartikül uygulamaları başarısız olmuştur.

H. retusum'da sürgün ve gövde de ZnO nanopartikülleri olumlu etki oluştururken, yaprakta fenolik bileşiklerin miktarını düşürmüştür. *H. retusum* yapraklarında toksik etki oluşturduğu düşünülmektedir. Desai ve ark. (2015), tarafından *S. Rebaudiana*'nın sürgün kültürlerinde stevioside üretimini artırma amacıyla 400 ve 1000 mgL⁻¹ konsantrasyonda verilen çinko nanopartiküllerin fitotoksik etki oluşturduğu rapor edilmiştir. 50–1000 mgL⁻¹ konsantrasyon aralığındaki Zn nanopartikülleri *S. rebaudiana*'nın sürgün kültürlerinde steviosid üretimini azalttığı saptanmıştır. Nanopartiküllerin bitkiler üzerinde oluşturduğu etkiler türe özgü olarak değişebilirken aynı zaman aynı bitkinin farklı dokularında da etkinliklerinin farklı olabileceği anlaşılmaktadır.

H. perforatum sürgünlerine yapılan 200 mgL⁻¹'lik ZnO hiperisin bileşiği 3.4 katına, hiperforin bileşiği 10 katına, çıkmıştır. *H. retusum* sürgünlerine yapılan 75 mgL⁻¹'lik ZnO hiperisin miktarı değişmezken, hiperforin bileşiğinin miktarı 11 katına çıktığı görülmüştür. Yapılan ZnO uygulamaları değerlendirildiğinde genel olarak hiperforin bileşiğinin miktarı hiperisin miktarından daha çok artış gösterdiği tespit

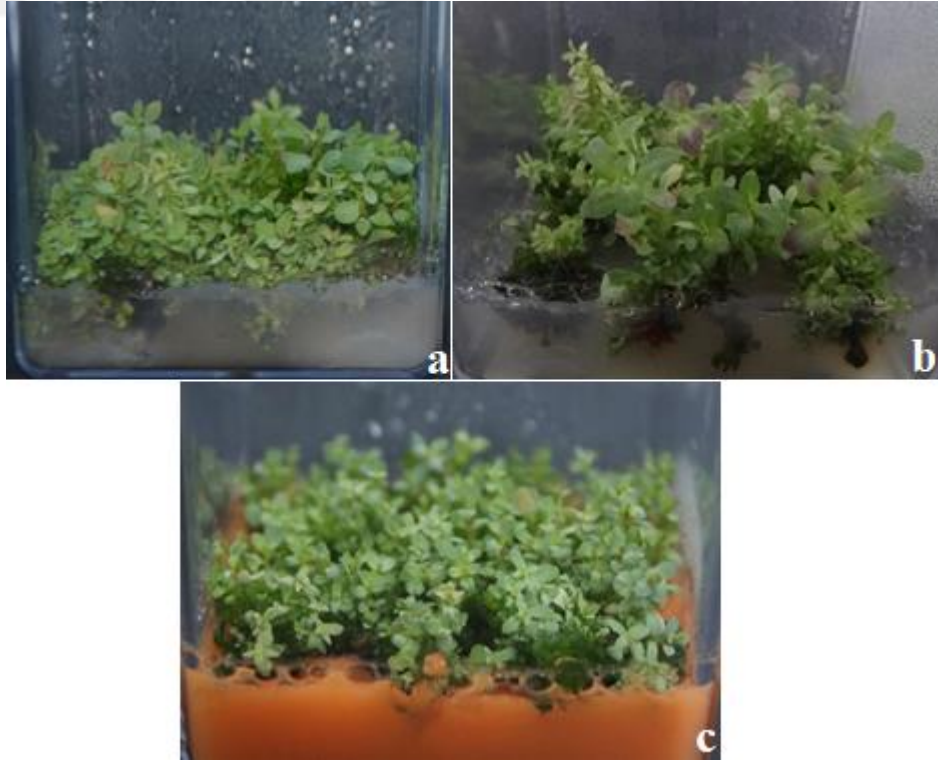
edilmiştir. Sharafi ve ark. (2013), çinko oksit (100 ppb) farklı konsantrasyonlarını (0, 50, 100 ve 150 ppb) *H. perforatum* hücre süspansiyon kültüründe denemişlerdir. Çinko nano-oksit tarafından uyarılan kültürlerde, hiperisin ve hiperforin üretimi, kontrol grubuna göre 3 ve 13 kat daha yüksek olanlara ulaşmıştır. Çinko nano-oksitler ile muamele edilen hücre kültürlerinde hiperisine kıyasla hiperforin üretiminin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç olarak nanopartiküller spesifik bazı sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılabilecek uygun bir strateji olduğunu kanıtlamaktadır.

4.3.3. Demir(III) Oksit (Fe_2O_3) Nanopartikülleri

4.3.3.1. Fe_2O_3 Nanopartiküllerin *H. perforatum*'un Sürgün (genç filiz)

Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. perforatum eksplantları Fe_2O_3 nanopartiküllerinin 25, 75 ve 200 mgL^{-1} konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL^{-1} BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır.



Şekil 4.8. Fe_2O_3 nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL^{-1} konsantrasyonunu içeren ortamdaki *H. perforatum* sürgünleri

Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar çizelge 4.10.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.10. Fe₂O₃ nanopartiküllerin *H. perforatum* sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Kontrol	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹	200 mgL ⁻¹
Hiperisin	8373.2±1.6	23000.3±4.3	23552.8±4.5	25758±4.9
Hiperforin	48.7±0.1	140.5±0.1	242.7±0.1	32.1±0.1
Hiperozit	727166.5±91.6	3573.3±0.5	4858.8±0.6	4235.8±0.5
Psödohiperisin	116608.9±20.1	175470.5±30.2	220337.1±37.9	220463.5±37.9
Kersetin	9334.7±5.3	4480.2±2.6	6708.3±3.8	7854.6±4.5
Rutin	---	440865.2±60	519900±70.7	586879.5±79.8
Kersitrin	302880.6±40.3	217649.4±28.9	256046.2±34.1	299936.8±39.9
Klorojenik asit	995302.3±297.6	3118.7±0.9	3749.8±1.1	4267.4±1.3
Protokateşik asit	3101.7±0.7	3118.7±0.7	3749.8±0.8	4267.4±0.9
Hesperidin	---	314.8±0.1	294.1±0.1	253.9±0.1
Luteolin	1211.5±0.2	1994.4±0.4	2772.4±0.5	2501.8±0.5
Luteolin-7 glukozit	3361±0.3	3573.3±0.3	4858.8±0.4	4235.8±0.4
Astragalin	2278.1±0.3	2378.1±0.4	2568.7±0.4	2550.2±0.4
Apigenin	158.7±0.1	366.3±0.1	340.8±0.1	464.9±0.1

*

Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır.**Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiği 2.7 katına, hiperforin bileşiği 2.8 katına, psödohiperisin bileşiği ise 1.5 katına çıkmıştır (Çizelge 4.10.). 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması hiperozit ve kersetin bileşiklerinin miktarında azalmaya neden olmuştur. Rutin bileşiği de kontrol grubunda tespit edilemezken, 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin ve klorojenik asit bileşiklerinin miktarı azalırken, protokateşik asitin miktarı kontrol grubuyla aynı çıkmıştır. Hesperidin bileşiği kontrol grubunda görülmezken, 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında görülmüştür. Luteolin bileşiği 1.6 katına, apigenin bileşiği ise kontrol grubundaki miktarının 2.3 katına çıkmıştır. Luteolin-7 glukozit ve astragalin bileşiklerinin miktarında değişim olmadığı tespit edilmiştir. 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. perforatum* sürgünlerinde hiperisin, hiperforin, psödohiperisin ve rutin gibi önemli bileşiklerin miktarını artırdığı için etkili bir uygulama olmuştur.

75 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, hiperisin bileşiği 2.8 katına; hiperforin bileşiği 4.9katına, psödohiperisin bileşiği ise 1.8 katına çıkmıştır (Çizelge 4.10.). Hiperozit ve kersetin bileşiklerinin miktarında azalmaya olduğu görülmüştür. Rutin bileşiği kontrol grubunda tespit edilememişken, 75 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin ve klorojenik asit miktarında azalma meydana gelmiştir. Protokateşik asit bileşiğinde çok düşük oranda bir artış meydana gelmiştir. Hesperidin bileşiği kontrol grubunda görülmezken, 75 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında bulunmuştur. Luteolin bileşiği, kontrol grubundaki miktarının 2.2 katına; luteolin-7 glukozit bileşiği 1.4 katına, apigenin bileşiği ise 2 katına çıkmıştır. Astragalin bileşiğinde de çok düşük oranda bir artış gerçekleşmiştir. 75 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum* sürgünlerinde hiperisin, hiperforin psödohiperisin verutin bileşiklerinin miktarını artırmada oldukça etkili bir uygulama olmuştur.

200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubundaki miktarıyla karşılaştırıldığında, hiperisin bileşiği 3 katına; psödohiperisin bileşiği ise 1.8 katına çıkmıştır (Çizelge 4.10.). Hiperforin, hiperozit ve kersetin bileşiklerinin miktarında azalmaya olduğu görülmüştür. Rutin bileşiği kontrol grubunda tespit edilememişken, 200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin ve klorojenik asit miktarında azalma meydana gelmiştir. Protokateşik asit, luteolin-7 glukozit ve astragalin bileşiklerinin miktarında çok düşük oranda bir artış gerçekleşmiştir. Hesperidin bileşiği ise kontrol grubunda tespiti yokken, 200 mgL⁻¹ Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında bulunmuştur. Luteolin bileşiği kontrol grubunun 2 katına, apigenin bileşiği ise 2.9 katına çıkmıştır. 200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum* sürgünlerinde özellikle hiperisin bileşiğinin miktarını artırmada etkili bir uygulama olmuştur.

H. perforatum sürgünlerinde 75 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması, 25 ve 200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamalarına oranla hiperisin ve türevi bileşiklerin (ilk altı bileşik) miktarlarını artırmada etkili olduğu tespit edilmiştir

4.3.3.2. Fe₂O₃ Nanopartiküllerin *H. perforatum*'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. perforatum eksplantları Fe₂O₃ nanopartiküllerinin 200, 250 ve 300 mg/L konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır. Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin gövde ve yaprak dokularındaki hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar çizelge 4.11.'de sunulmuştur.



Çizelge 4.11. FeO₃ nanopartiküllerin *H. perforatum*'un gövde ve yaprak dokularındaki fenolikbileşiklerin miktarına etkisi*

Fenolik bileşen**	Gövde				Yaprak			
	Kontrol	200 mgL ⁻¹	250 mgL ⁻¹	300 mgL ⁻¹	Kontrol	200 mgL ⁻¹	250 mgL ⁻¹	300 mgL ⁻¹
Hiperisin	5130.3±1	4136.3±0.8	5019.8±0.9	8127.2±1.5	23588.5±4.5	26128.4±4.9	36397±6.9	25475.7±4.8
Hiperforin	50587±21.1	75828.3±31.7	94632±39.6	137217.6±57.4	195479.8±81.7	275451.9±115.1	270314.9±113	287686.6±120.3
Hiperozit	266036.6±33.5	268957.3±33.9	285380±36	398829.4±50.3	1259560.3±158.7	1112669.9±140.2	1492138.8±188	1411407.6±177.8
Psödohiperisin	63798.9±11	46734.6±8	54163.1±9.3	81374.4±14	195550.6±33.6	204537.4±35.2	265189.3±45.6	222865.4±38.3
Kersetin	2901±1.7	5736.2±3.3	6183±3.5	11420.5±6.5	27954.7±16	30610.4±17.5	43370.7±24.9	26993.6±15.5
Rutin	---	392.7±0.1	---	1068.6±0.1	737±0.1	1489±0.2	791.1±0.1	444.8±0.1
Kersitrin	53385.4±7.1	81222.1±10.8	104581.9±13.9	154283.8±20.5	467297.3±62.2	466758.3±62.1	639316.8±85	548242.9±72.9
Klorojenik asit	769413.8±230.1	754068.5±225.5	918138.1±274.5	962563.3±287.8	2237552.5±669	2185129.2±653.4	2725358.4±814.9	3060964.7±915.2
Protokateşik asit	762.2±0.2	1087.7±0.2	901.7±0.2	1715.2±0.4	645.5±0.1	2266.3±0.5	1673.8±0.4	2020.9±0.4
Hesperidin	---	241.6±0.1	---	763.2±0.1	503.5±0.1	610.3±0.1	445.1±0.1	358.1±0.1
Luteolin	1487.2±0.3	1175.6±0.2	1251.5±0.2	1838.4±0.3	868±0.2	648.1±0.1	647±0.1	544.2±0.1
Luteolin-7 glukozit	2990.6±0.3	2057±0.2	1860.2±0.2	1421.1±0.1	4226.9±0.4	1796.8±0.2	2302.4±0.2	2926±0.3
Astragalin	1270.1±0.2	2830.9±0.4	3012.9±0.5	7191.9±1.1	20319.6±3.1	19166.5±2.9	28629±4.4	25442±3.9
Apigenin	337.9±0.1	450.3±0.1	473.4±0.1	522.8±0.1	242.9±0.1	131.6±0.1	134.7±0.1	98.8±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen bileşiklerden hiperisin ve psödohiperisin miktarı kontrol grubuna göre azalmıştır (Çizelge 4.11.). Hiperozit miktarında çok düşük miktarda bir artış meydana gelmiştir. Hiperforin bileşiğinin miktarı 1.4 katına, kersetin bileşiği ise 1.9 katına çıkmıştır. Rutin bileşiği kontrol grubunda tespit edilememişken, 200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, protokateşik asit, hesperidin, astragalin ve apigenin miktarı artarken, klorojenik asit, luteolin ve luteolin-7 glukozit bileşiklerinin miktarı azalmıştır. 200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum*'un gövde dokusundaki hiperisin ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarında azalma olurken hiperozit, hiperforin kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında artış gerçekleşmiştir.

250 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen bileşiklerden hiperisin ve psödohiperisin miktarı kontrol grubuna göre azalmıştır (Çizelge 4.11.). Hiperforin bileşiği 1.8 katına, kersetin bileşiği ise 2.1 katına çıkmıştır. Rutin bileşiği 250 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilememiştir. Hiperozit bileşiğinin miktarı, kontrol grubundaki miktarı karşılaştırıldığında çok düşük miktarda arttığı saptanmıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, astragalin ve apigenin miktarında artış olduğu görülmüştür. Hesperidin, luteolin ve luteolin-7 glukozit bileşiklerinin miktarında azalma gerçekleşmiştir. 250 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un gövde dokusuna ait fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda birkaç bileşik dışında etkili bir uygulama olmuştur.

300 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen bileşiklerden hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.5 katına; hiperforin bileşiği 2.7 katına, hiperozit bileşiği 1.4 katına, psödohiperisin bileşiği 1.2 katına, kersetin bileşiği ise 3.9 katına çıkmıştır (Çizelge 4.11.). Rutin bileşiği kontrol grubunda tespit edilememişken, 300 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, astragalin ve apigenin miktarı artmıştır. Hesperidin bileşiği kontrol grubunda tespit edilememişken, 300 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. Luteolin ve luteolin-7 glukozit bileşiklerinin miktarında azalma olduğu

saptanmıştır. 300 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un gövde dokusuna ait fenolik bileşiklerin miktarını artıran bir uygulama olmuştur.

H. perforatum'un gövde dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda, 300 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması 200 ve 250 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur

200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen bileşiklerden hiperisin bileşiğinin miktarında kontrol grubuna göre çok düşük oranda bir artış olmuştur (Çizelge 4.11.). Hiperforin bileşiği, kontrol grubunun 1.4 katına; rutin bileşiği ise 2 katına çıkmıştır. Hiperozit bileşiğinin miktarında ise azalma gerçekleşmiştir. Psödohiperisin ve kersetin bileşiklerinin miktarında değişim görülmemiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden protokateşik asit, hesperidin ve luteolin-7 glukozit miktarında artış olmuştur. Kersitrin, klorojenik asit, luteolin, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise azalma olduğu saptanmıştır. 200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un yaprak dokusuna ait fenolik bileşiklerden hiperisin, hiperforin, rutin, protokateşik asit, hesperidin ve luteolin-7 glukozit miktarını artırma çok düşük oranlarda artırırken hiperozit, kersitrin, klorojenik asit, luteolin, astragalin ve apigenin miktarında azalma gerçekleşmiştir.

250 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.5 katına; hiperforin bileşiği 1.3 katına, psödohiperisin bileşiği 1.3 katına, kersetin bileşiği ise 1.5 katına çıkmıştır (Çizelge 4.11.). Hiperozit bileşiğinin miktarında çok düşük oranda bir artış gerçekleşmiştir. Rutin bileşiğinin miktarında değişim olmadığı saptanmıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit ve astragalin miktarında artış gerçekleştiği tespit edilmiştir. Hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise azalma olduğu görülmüştür. 250 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum*'un yaprak dokusuna ait fenolik bileşiklerin miktarını artırmada etkili bir uygulama olmuştur.

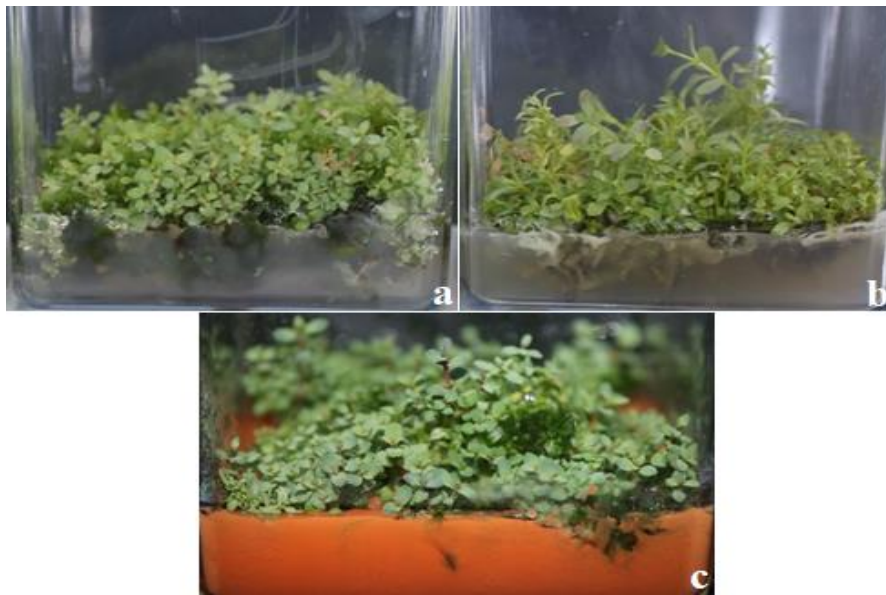
300 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında miktarında değişim olmadığı saptanmıştır (Çizelge 4.11.). Hiperozit ve psödohiperisin

bileşiklerinin miktarında çok düşük oranda bir artış meydana gelmiştir. Hiperforin bileşiği kontrol grubundaki miktarının 1.4 katına çıkmıştır. Kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında azalma gerçekleşmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit ve astragalin miktarında artış olduğu görülmüştür. Hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise azalma tespit edilmiştir. 300 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un yaprak dokusundaki hiperozit, psödohiperisin, hiperforin kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit ve astragalin miktarını artırırken kersetin, rutinhesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin miktarında azalmaya neden olmuştur.

H. perforatum'un yaprak dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda 250 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması en etkili uygulama olmuştur.

4.3.3.3. Fe₂O₃ Nanopartiküllerin *H. retusum*'un Sürgün Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. retusum eksplantları Fe₂O₃ nanopartiküllerinin 25, 75 ve 200 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar (Şekil 4.9.). Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır.



Şekil 4.9. Fe₂O₃ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki *H. retusum* sürgünleri

Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.12.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.12. Fe₂O₃ nanopartiküllerin *H. retusum* sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Kontrol	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹	200 mgL ⁻¹
Hiperisin	42428.6±8	75774.3±14.3	50318.3±9.5	56845.7±10.7
Hiperforin	48.4±0.1	203.3±0.1	1357.3±0.6	337.9±0.1
Hiperozit	442378.2±55.7	638658.1±80.5	570493.1±71.9	478576.3±60.3
Psödohiperisin	420341.2±72.3	512536.2±88.2	456088.4±78.4	456656±78.5
Kersetin	12852.3±7.4	15818.5±9.1	14887.6±8.5	14013.1±8
Rutin	42087.5±5.7	64386.4±8.8	63365.6±8.6	39915.8±5.4
Kersitrin	476609.8±63.4	792977.9±105.5	652416.6±86.8	586372.5±78
Klorojenik asit	19668.6±5.9	22231.3±6.6	28718.3±8.6	14070.7±4.2
Protokateşik asit	7404.7±1.6	8174.1±1.8	7773.9±1.7	7521.4±1.6
Hesperidin	19119.2±3.1	28944.1±4.7	28793.9±4.7	17052.2±2.8
Luteolin	1706.1±0.3	1195.8±0.2	1800.7±0.3	1357.4±0.3
Luteolin-7 glukozit	8007.6±0.7	7715.7±0.7	6396.4±0.6	5843.3±0.5
Astragalin	4810.9±0.7	792977.9±121.3	652416.6±99.8	586372.5±89.7
Apigenin	344.9±0.1	248±0.1	258.4±0.1	218.5±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubundaki miktarıyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiği 1.7 katına, hiperforin bileşiği 4.2 katına, hiperozit bileşiği 1.4 katına, psödohiperisin ve kersetin bileşikler 1.2 katına, rutin bileşiği ise 1.5 katına çıkmıştır (Çizelge 4.12.). İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin kontrol grubundaki miktarının 1.6 katına çıkmıştır. Klorojenik asit ve protokateşik asit bileşiklerinde de çok düşük oranda artış gerçekleşmiştir. Luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşikler kontrol grubuyla karşılaştırıldığında miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Hesperidin bileşiği 1.5 katına, astragalin bileşiği ise kontrol grubundaki miktarının 164 katına çıktığı görülmüştür. 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen fenolik bileşiklerin özellikle de hiperforin bileşiğinin miktarının artmasında etkili olmuştur.

75 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubundaki miktarıyla karşılatırıldığında hiperisin de çok düşük oranda bir artış gerçekleşmiştir (Çizelge 4.12.). Hiperforin

bileşiğı 28 katına, hiperozit bileşiğı 1.2 katına, rutin bileşiğı ise 1.5 katına çıkmıştır. Psödohiperisin ve kersetin bileşiklerinin miktarlarında kayda değer bir artış gerçekleşmemiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, kontrol grubundaki miktarının 1.3 katına; klorojenik asit 1.4 katına, hesperidin ise 1.5 katına çıktığı görülmüştür. Luteolin bileşiğinin miktarı kontrol grubuna göre değişmemişken, luteolin-7 glukozit bileşiğinin miktarında azalma gerçekleşmiştir. Astragalin bileşiğı kontrol grubundaki miktarının 135 katına çıkarken, apigenin bileşiğinin miktarında ise azalma gerçekleşmiştir. 75 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerden özellikle hiperforin bileşiğinin miktarında yüksek oranda bir artış olmuştur.

200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiğı 1.3 katına, hiperforin bileşiğı ise 6.9 katına çıkmıştır (Çizelge 4.12.). Hiperozit, psödohiperisin ve kersetin bileşiklerinin miktarında kayda değer bir değişim olmamıştır. Rutin bileşiğinin miktarında azalma meydana gelmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin bileşiğı kontrol grubundaki miktarının 1.2 katına çıkmıştır. Klorojenik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise azalma gerçekleşmiştir. Astragalin bileşiğı kontrol grubunun 121 katına çıkmıştır. 200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerden özellikle hiperforin bileşiğinin miktarını artırmada etkili bir uygulama olmuştur.

H. retusum sürgünlerinde 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması, 75 ve 200 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamalarına oranla özellikle hiperisin ve türevi bileşiklerin (ilk altı bileşik) miktarlarını artırmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.3.3.4. Fe₂O₃ Nanopartiküllerin *H. retusum*'un Gövde ve Yaprak Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşin Miktarına Etkisi

H. retusum eksplantları Fe₂O₃ nanopartiküllerinin 10, 15 ve 25 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır. Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin

gövde ve yaprak dokularındaki hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.13.'te sunulmuştur.



Çizelge 4.13. Fe₂O₃ nanopartiküllerin *H. retusum*'ün gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Gövde				Yaprak			
	Kontrol	10 mgL ⁻¹	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹	Kontrol	10 mgL ⁻¹	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹
Hiperisin	13970.8±2.6	26172.7±4.9	24370.9±4.6	29862±5.6	50662.9±9.6	58744.8±11.1	99090±18.7	55385.4±10.5
Hiperforin	307694.2±128.6	219436.3±91.7	257061.3±107.5	272773.9±114	607520.7±253.9	487167.7±203.6	555668.2±232.3	399736±167.1
Hiperozit	450227.6±56.7	462076.4±58.2	530768.9±66.9	671222.1±84.6	1713474.9±215.9	1934122.6±243.7	2131764.7±268.6	1547579±195
Psödohiperisin	199406.6±34.3	235815.9±40.6	223111.1±38.4	276483.2±47.6	422071.7±72.6	426806.2±73.4	550696.5±94.7	446935.7±76.9
Kersetin	28441.1±16.3	29642.5±17	28472±16.3	40646.4±23.3	121111.6±69.4	102141.5±58.5	117700.7±67.4	73808.4±42.3
Rutin	33304.8±4.5	37459.4±5.1	44591.3±6.1	51725.4±7	135872.9±18.5	128795.2±17.5	134973±18.4	91080.2±12.4
Kersitrin	470251.8±62.5	499867.4±66.5	495161.7±65.9	701895.2±93.4	1693904.7±225.3	1854259.7±246.6	2102750.4±279.7	1474378.6±196.1
Klorojenik asit	40789.5±12.2	26437.6±7.9	54753.6±16.4	38390.8±11.5	130287.2±39	103668±31	131752.1±39.4	64747.8±19.4
Protokateşik asit	2125.3±0.5	2940.2±0.6	2908±0.6	2407.5±0.5	2309.6±0.5	3557.1±0.8	2695.5±0.6	3383.4±0.7
Hesperidin	17211.4±2.8	18231±3	21676.6±3.5	24598.6±4	71614.1±11.6	60445.8±9.8	63937.1±10.4	44634.3±7.2
Luteolin	1925.7±0.4	2032.3±0.4	2631.4±0.5	2104±0.4	1667.7±0.3	2737±0.5	1965.2±0.4	1799.9±0.3
Luteolin-7 glukozit	9310.7±0.8	8257.3±0.7	9334.7±0.8	9588.4±0.8	5851.7±0.5	8728.9±0.8	6672.2±0.6	4428.8±0.4
Astragalin	4398.5±0.7	4559.8±0.7	2656.2±0.4	7666.8±1.2	26245.2±4	31682±4.8	29190.9±4.5	21288.7±3.3
Apigenin	525.4±0.1	469.5±0.1	567.9±0.1	428±0.1	263±0.1	303.1±0.1	200.6±0.1	243.4±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

10 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen bileşiklerden hiperisin miktarı kontrol grubunun 1.8 katına çıkmıştır (Çizelge 4.13.). Hiperforin bileşiğinin miktarında ise azalma olduğu saptanmıştır. Hiperozit ve kersetin bileşiklerinin miktarında değişim olmamıştır. Psödohiperisin ve rutin bileşiklerinin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çok düşük oranda bir artış olduğu tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, protokateşik asit, hesperidin, luteolin ve astragalin miktarında artış gerçekleşmiştir. Klorojenik asit, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise azalma olduğu tespit edilmiştir. 10 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması, *H. retusum*'un gövde dokusundaki hiperisin, psödohiperisin ve rutin bileşiklerin miktarını artırmıştır. Fakat yapılan uygulama neticesinde bileşiklerin genelinde miktar olarak yüksek oranda bir artış sağlanamamıştır.

15 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen bileşiklerden hiperisin bileşiğinin miktarı, kontrol grubunun 1.7 katına; rutin bileşiği ise 1.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.13.). Hiperforin bileşiğinin miktarında azalma olduğu saptanmıştır. Hiperozit, psödohiperisin ve kersetin bileşiklerinin miktarında ise çok düşük oranda artış gerçekleşmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden astragalin hariç diğer bileşiklerin miktarında artış olduğu görülmüştür. 15 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum*'un gövde dokusundaki hiperisin, rutin, hiperozit, psödohiperisin ve kersetin bileşiklerinin miktarında artış gerçekleştirmiştir. Bu uygulama bileşiklerin miktarını çok düşük oranlarda artırmıştır.

25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen bileşiklerden hiperisin bileşiğinin miktarı, kontrol grubunun 2 katına; hiperozit bileşiği 1.4 katına, psödohiperisin bileşiği 1.3 katına, kersetin bileşiği 1.4 katına, rutin bileşiği ise 1.5 katına çıkmıştır (Çizelge 4.13.). Hiperforin bileşiğinin miktarında ise azalma meydana gelmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden klorojenik asit ve apigenin miktarında azalma olduğu, kersitrin, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit ve astragalin bileşiklerinin miktarında ise artma olduğu saptanmıştır. 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum*'un gövde

dokusundaki hiperisin, hiperozit, psödohiperisin, kersetin ve rutin gibi önemli bileşiklerin miktarını artırdığından etkili bir uygulama olmuştur.

H. retusum'un gövde dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ uygulaması, 10 ve 15 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamalarına göre etkili olmuştur.

10 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen bileşiklerden hiperisin ve hiperozit miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çok düşük oranda artış gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.13.). Hiperforin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu saptanmıştır. Psödohiperisin bileşiğinin miktarında değişim olmadığı belirlenmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden klorojenik asit ve hesperidin bileşiklerinin miktarında azalma olurken, kersitrin, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında ise artma olmuştur. 10 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusundaki fenolik bileşiklerin çoğunluğunun miktarında artış gerçekleşmemiştir.

15 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.9 katına; hiperozit bileşiği 1.2 katına, psödohiperisin bileşiği ise 1.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.13.). Hiperforin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında ise azalma olduğu saptanmıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden hesperidin ve apigenin miktarında azalma olurken kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit ve astragalin bileşiklerinin miktarında artma olduğu belirlenmiştir. 15 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması, *H. retusum*'un yaprak dokusuna ait fenolik bileşiklerin miktarlarını artırmada etkili bir uygulama olmuştur.

25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarında kontrol grubuyla karşılaştırıldığında kayda değer bir değişim olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.13.). Hiperforin, hiperozit, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu saptanmıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden protokateşik asit ve luteolin miktarında artma olurken, kersitrin, klorojenik asit, hesperidin, luteolin-7 glukozit,

astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu görülmüştür. 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması *H. retusum*'un yaprak dokusuna ait fenolik bileşiklerin çoğunun miktarında artma olmadığı gibi bazı bileşiklerin miktarında azalma olduğundan başarısız bir uygulama olmuştur.

H. retusum'un yaprak dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını artırmak yapılan 15 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması, 10 ve 25 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur.

Bitkilerin kültüre alındığı *in vitro* kültür ortamlarında mikro elementlerin miktarının düzenlenmesi metabolitlerin içeriğini artırmak için uygun bir strateji olduğu belirtilmiştir (Jimenez-Aparicio ve Gutierrez-Lopez 1999). Demir, çinko, bakır, kobalt ve nikel gibi divalent iyonların sekonder metabolitlerin üretimini etkilediği rapor edilmiştir (Trejo-Tapia ve ark. 2001). Fakat çok yüksek konsantrasyonlarının canlı organizmalar için zararlı olduğu bilinmektedir. Soya fasülyesinde, demir oksit nanopartiküllerinin klorofil içeriğini etkilediği ve fotosentez reaksiyonlarının farklı aşamalarında biyokimyasal ve enzimatik etkinlik üzerinde etkisi olabileceği tespit edilmiştir (Ghafariyan ve ark. 2013). Bu çalışmada divalent iyonlardan demir elementi hücrelere nüfus etme konusunda etkin olan Fe₂O₃ nanopartikülleri formunda *H. perforatum* ve *H. retusum* bitkilerinde sekonder metabolitlerin miktarını artırma amacıyla kullanılmıştır.

H. perforatum sürgünlerine uygulanan üç farklı Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması fenolik bileşenlerin neredeyse tamamında miktar artışı gerçekleşmiştir. Fenolik bileşiklerin miktarında en fazla artış 75 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartiküllerini içeren ortamdan sağlanmıştır (Çizelge 4.10). Fe₂O₃ nanopartiküllerinin konsantrasyon artıkcı *H. perforatum* sürgünlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarı da artış göstermiştir.

Fe₂O₃ nanopartikülleri *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin neredeyse tamamının miktarını artırmıştır. Gövde dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını en fazla artıran 300 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikülleri olmuştur (Çizelge 4.11). *H. perforatum*'un gövde dokusunda Fe₂O₃ nanopartiküllerinin konsantrasyon artışı bileşiklerin miktarını artırmada olumlu etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Fe₂O₃ nanopartiküllerin sadece 250 mgL⁻¹'lik uygulaması *H. perforatum* yaprak dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda etkili bir uygulama

olmuştur (Çizelge 4.11). *H. perforatum*'un yaprak dokusunda Fe_2O_3 nanopartiküllerinin konsantrasyonunun 250 mgL^{-1} kadar artışı bileşiklerin miktarını artırmada olumlu etkide bulunurken konsantrasyon artışının devam ettirilip 300 mgL^{-1} yapıldığında bileşiklerin miktarında düşüş yaşandığı görülmüştür.

H. perforatum'un sürgünleri ile gövde ve yaprak dokularına uygulanan Fe_2O_3 nanopartiküllerinin özellikle yüksek konsantrasyonlarının hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarını artırma konusunda daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Fe_2O_3 nanopartiküllerini benzer şekilde yüksek konsantrasyonlarda kullanan araştırmacı Moharrami ve ark (2017), *Hyoscyamus reticulatus*'un saçak kök kültürlerinde hiposikamin ve skopolamin içeriğini arttırmak için Fe nanopartiküllerin ($450\text{-}3600 \text{ mgL}^{-1}$) elisite etme potansiyelini araştırmıştır. Saçak kök kültürlerinin 24 saat süreyle 900 mg L^{-1} Fe nanopartiküllerine ve 48 saat boyunca 450 mgL^{-1} Fe nanopartiküllerine maruz kalması, hiposikamin ve skopolamin üretimini artırdıklarını rapor etmişler.

Fe_2O_3 nanopartiküllerinin bulunduğu ortamlar *H. retusum* sürgünlerinde fenolik bileşiklerin miktarını artırmıştır. Bileşiklerin miktarını artırmada en etkili uygulama 25 mgL^{-1} 'lik Fe_2O_3 nanopartiküllerini içeren ortam olmuştur (Çizelge 4.12.). *H. retusum* sürgünlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarlarını artırmada besi ortamına eklenen Fe_2O_3 nanopartiküllerinin 25 mgL^{-1} 'den sonraki konsantrasyon artışları olumsuz etkide bulunmuştur.

H. retusum'un gövde dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda, 25 mgL^{-1} 'lik Fe_2O_3 nanopartikül uygulaması en etkili uygulama olmuştur (Çizelge 4.13.). *H. retusum*'un gövde dokusunda Fe_2O_3 nanopartiküllerinin konsantrasyon artışı bileşiklerin miktarını artırmada olumlu etkide bulunduğu tespit edilmiştir. *H. retusum*'un yaprak dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda, 15 mgL^{-1} 'lik Fe_2O_3 nanopartikül uygulaması en etkili uygulama olmuştur (Çizelge 4.13.). Fenolik bileşikler miktarındaki artma ve azalmalar Fe_2O_3 nanopartiküllerinin her konsantrasyonuna farklı tepkiler verdiğinden konsantrasyona göre sabit bir eğilim tespiti yapılamamıştır.

H. retusum'un sürgünlerinde kullanılan Fe_2O_3 nanopartikülleri özellikle hiperforin bileşiğinin miktarında yüksek oranda artış sağlamıştır. Benzer bir sonuç

araştırmacı Sharafi ve ark. (2013), tarafından demir oksitin (100 ppb) farklı konsantrasyonlarını (0, 50, 100 ve 150 ppb) *H. perforatum* hücre süspansiyon kültüründe denedikleri çalışmalarından elde edilmiştir. Demir nano-oksit tarafından uyarılan kültürlerde, hiperisin ve hiperforin üretimi, kontrol grubuna göre 5.4 ve 12 kat daha yüksek olanlara ulaşmıştır. Demir nano-oksitler ile muamele edilen hücre kültürlerinde hiperisine kıyasla hiperforin üretiminin daha fazla olduğu belirlenmiştir. Bu hareketle nanopartiküller spesifik bazı sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılabilecek uygun bir strateji olduğunu kanıtlamaktadır.

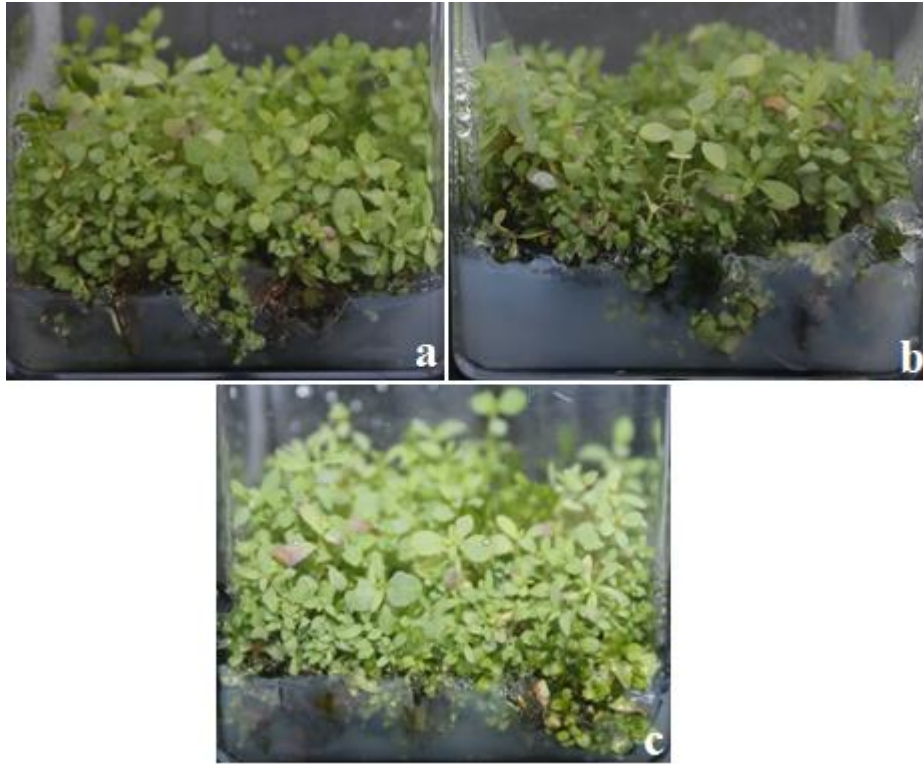
Sonuç olarak Fe₂O₃ nanopartikülleri sekonder metabolitleri artırma konusunda *H. perforatum*'da, *H. retusum*'dan daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.3.4. Titanyum Dioksit (TiO₂) nanopartikülleri

4.3.4.1. TiO₂ Nanopartiküllerin *H. perforatum*'un Sürgün (genç filiz)

Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. perforatum eksplantları TiO₂ nanopartiküllerinin 25, 75 ve 200 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar (Şekil 4.10.). Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır.



Şekil 4.10. TiO₂ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL⁻¹ konsantrasyonunu içeren besi ortamındaki *H. perforatum* sürgünleri

Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar çizelge 4.14.'te sunulmuştur.

Çizelge 4.14. TiO₂ nanopartiküllerin *H. perforatum* sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Kontrol	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹	200 mgL ⁻¹
Hiperisin	8373.2±1.6	33112±6.3	47289±8.9	27016.7±5.1
Hiperforin	48.7±0.1	95.6±0.1	403.7±0.2	59.6±0.1
Hiperozit	727166.5±91.6	574217.5±72.4	586931.2±74	400151.5±50.4
Psödohiperisin	116608.9±20.1	248870.2±42.8	261433±45	203257.4±35
Kersetin	9334.7±5.3	7760.8±4.4	6664.7±3.8	9126.5±5.2
Rutin	---	---	---	---
Kersitrin	302880.6±40.3	309778.3±41.2	309989.9±41.2	193442.4±25.7
Klorojenik asit	995302.3±297.6	903207.2±270.1	886571.3±265.1	703372.8±210.3
Protokateşik asit	3101.7±0.7	4149.6±0.9	5239.7±1.1	4036.1±0.9
Hesperidin	---	---	---	---
Luteolin	1211.5±0.2	2930.1±0.6	5088.6±1	3011±0.6
Luteolin-7 glukozit	3361±0.3	4972.7±0.4	6582.3±0.6	3164.8±0.3
Astragalin	2278.1±0.3	2706.9±0.4	2771.9±0.4	1835.8±0.3
Apigenin	158.7±0.1	478.7±0.1	727.2±0.1	335.9±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır.**Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiği 3.9 katına, hiperforin bileşiği 1.9katına, psödohiperisin bileşiği ise 2 katına çıkmıştır (Çizelge 4.14.). Hiperozit ve kersetin bileşiklerinin miktarı kontrol grubuna göre azalmıştır. Rutin ve hesperidin bileşikleri tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin miktarında değişim olmazken, klorojenik asit miktarının azaldığı görülmektedir. Protokateşik asit bileşiği 1.3 katına, luteolin bileşiği 2katına, luteolin-7 glukozit bileşiği 1.4 katına, apigenin bileşiğinin ise 3 katına çıktığı görülmüştür. Astragalin bileşiğinin miktarına ise çok düşük oranda bir artış gerçekleşmiştir. 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması *H. perforatum* sürgünlerinde hiperisin, hiperforin ve psödohiperisin bileşiklerinin miktarında yüksek oranda artış sağlayarak etkili bir uygulama olmuştur.

75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiği 5.6 katına, hiperforin bileşiği 8.2 katına, psödohiperisin bileşiği ise 2.2 katına çıkmıştır (Çizelge 4.14.). Hiperozit ve kersetin bileşiklerinin miktarlarında azalma meydana gelmiştir. Rutin bileşiği ise tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin miktarı değişmezken klorojenik asit miktarında ise azalma meydana gelmiştir. Protokateşik asit bileşiği 1.6 katına, luteolin bileşiği 4.2 katına, luteolin-7 glukozit bileşiği 1.9 katına, astragalin bileşiği 1.2 katına, apigenin bileşiği ise 4.5 katına çıkmıştır. 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında hesperidin bileşiği ise tespit edilememiştir. *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarı 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasıyla oldukça yüksek oranlarda artış göstermiştir.

200 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiği 3.2 katına, hiperforin bileşiği 1.7katına, psödohiperisin bileşiği 1.7 katına çıktığı görülmektedir (Çizelge 4.14.). Hiperozit ve kersetin bileşiklerinin miktarında ise azalma olmuştur. Rutin bileşiği tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, luteolin-7 glukozit ve astragalin kontrol grubuyla karşılaştırıldığında miktarında azalma olduğu saptanmıştır. Protokateşik asit bileşiği 1.3

katına, apigenin bileşiği 2katına, luteolin bileşiği ise 2.4 katına çıkmıştır. Hesperidin bileşiği tespit edilememiştir. 200 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması *H. perforatum* sürgünlerindeki fenolik bileşiklerin miktarını artırmada etkili bir uygulama olmuştur.

H. perforatum sürgünlerine uygulanan TiO₂ nanopartiküllerinin üç farklı uygulamasıda fenolik bileşiklerin miktarını artırmıştır. Bileşiklerin miktarının artmasında en etkili uygulama 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ uygulaması olmuştur.

4.3.4.2. TiO₂ Nanopartiküllerin *H. perforatum*'un Gövde ve Yaprak

Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. perforatum eksplantları TiO₂ nanopartiküllerinin 15, 25 ve 75mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır. Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin gövde ve yaprak dokularındaki hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar Çizelge 4.15.'da sunulmuştur.

Çizelge 4.15. TiO₂ nanopartiküllerin *H. perforatum*'un gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Gövde				Yaprak			
	Kontrol	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹	Kontrol	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹
Hiperisin	5130.3±1	12827.9±2.4	14198.3±2.7	11761.8±2.2	23588.5±4.5	51915.7±9.8	68047±12.9	96417.8±18.2
Hiperforin	50587±21.1	157022.7±65.6	126510.4±52.9	105675.1±44.2	195479.8±81.7	333608.7±139.4	370707.9±155	375841.2±157.1
Hiperozit	266036.6±33.5	869752.9±109.6	865594.3±109.1	422966±53.3	1259560.3±158.7	1832544.7±230.9	2068518.9±260.6	2940573.2±370.5
Psödohiperisin	63798.9±11	111238.4±19.1	118072.7±20.3	91751±15.8	195550.6±33.6	295290.8±50.8	322382.9±55.4	391940.6±67.4
Kersetin	2901±1.7	8999.2±5.2	8186.4±4.7	10313.4±5.9	27954.7±16	42597.5±24.4	38408±22	86863.9±49.8
Rutin	---	402±0.1	---	358.6±0.1	737±0.1	969.2±0.1	1002.7±0.1	1515.2±0.2
Kersitrin	53385.4±7.1	190662.2±25.4	171057.2±22.8	142698.6±19	467297.3±62.2	715364.4±95.1	795483.5±105.8	1237686.6±164.6
Klorojenik asit	769413.8±230.1	1592369.2±476.1	1564970.2±467.9	873553±261.2	2237552.5±669	3039774.2±908.9	3202935.4±957.7	3579999.9±1070.4
Protokateşik asit	762.2±0.2	1403.1±0.3	1563.9±0.3	1817.7±0.4	645.5±0.1	962.9±0.2	1360.4±0.3	2879.8±0.6
Hesperidin	---	189.9±0.1	271.4±0.1	428.2±0.1	503.5±0.1	496.9±0.1	567.7±0.1	946±0.2
Luteolin	1487.2±0.3	2347.9±0.4	2378.4±0.4	2844.4±0.5	868±0.2	928.5±0.2	1005.8±0.2	1347±0.3
Luteolin-7 glukozit	2990.6±0.3	11029±0.9	6154.9±0.5	4033.3±0.3	4226.9±0.4	5114.3±0.4	4889.3±0.4	3585.5±0.3
Astragalin	1270.1±0.2	9201.6±1.4	8870.9±1.4	6810.4±1	20319.6±3.1	31604.7±4.8	33297.4±5.1	51132±7.8
Apigenin	337.9±0.1	523.4±0.1	547.5±0.1	387.3±0.1	242.9±0.1	182.3±0.1	248.8±0.1	148.5±0.1

*Sonuçlar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 2.4 katına; hiperforin bileşiği 3 katına, hiperozit bileşiği 3.2 katına, psödohiperisin bileşiği 1.7 katına, kersetin bileşiğinin ise 3 katına çıktığı saptanmıştır (Çizelge 4.15.). Rutin bileşiği kontrol grubunda tespit edilememişken, 15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarının artış gösterdiği görülmüştür. 15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması *H. perforatum*'un gövde dokusundaki bileşiklerin tamamının miktarını kontrol grubuna göre artırmıştır.

25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 2.7 katına; hiperforin bileşiği 2.5 katına, hiperozit bileşiği 3.2 katına, psödohiperisin bileşiği 1.8 katına, kersetin bileşiği ise 2.8 katına çıkmıştır (Çizelge 4.15.). 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında, rutin bileşiği tespit edilememiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarında artış olduğu saptanmıştır. 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen bileşiklerin tümünün miktarında artış sağladığından etkili bir uygulama olarak gerçekleşmiştir.

75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 2.2 katına; hiperforin bileşiği 2katına, hiperozit bileşiği 1.5 katına, psödohiperisin bileşiği 1.4katına, kersetin bileşiği ise 3.5 katına çıkmıştır (Çizelge 4.15.). 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında rutin bileşiği tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarında artış olduğu görülmüştür. 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum*'un gövde dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin miktarını artırmada etkili olmuştur.

H. perforatum'un gövde dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda 15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması 25 ve 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur

15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 2.2 katına; hiperforin bileşiği 1.7 katına, hiperozit bileşiği 1.4 katına, psödohiperisin bileşiği 1.5 katına, kersetin bileşiği 1.5 katına, rutin bileşiği ise 1.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.15.). İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden hesperidin ve apigenin miktarı azalırken, kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, ve astragalin bileşiklerinin miktarında ise artış gerçekleşmiştir. 15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında, *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hesperidin ve apigenin bileşikleri hariç diğer bileşiklerin tümünün miktarında artış gerçekleşmiştir.

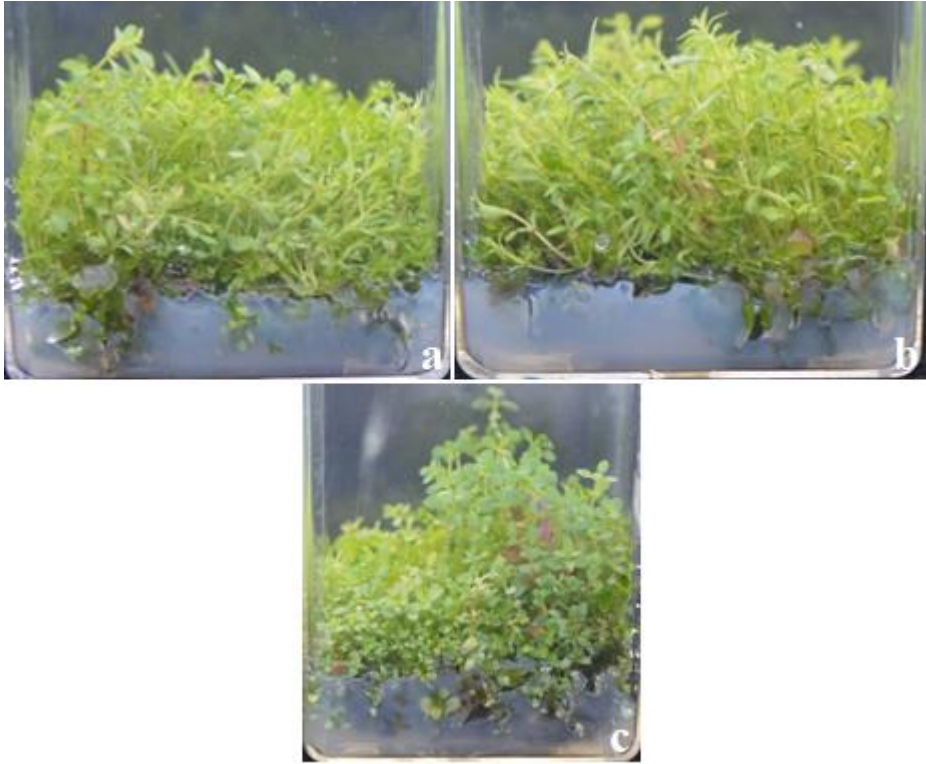
25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 2.8 katına; hiperforin bileşiği 1.8 katına, hiperozit bileşiği 1.6 katına, psödohiperisin bileşiği 1.6 katına, kersetin bileşiği 1.3 katına, rutin bileşiği ise 1.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.15.). İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin miktarında artış olduğu görülmüştür. 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin tamamının miktarında artış gerçekleştiren başarılı bir uygulamadır.

75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. perforatum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği kontrol grubunun 4 katına, hiperforin bileşiği 1.9 katına, hiperozit bileşiği 2.3 katına, psödohiperisin bileşiği 2 katına, kersetin bileşiği 3.1 katına, rutin bileşiği ise 2 katına çıkmıştır (Çizelge 4.15.). İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden luteolin-7 glukozit ve apigenin miktarı azalırken, kersitrin, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin, luteolin ve astragalin miktarında artış olduğu saptanmıştır. 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması, *H. perforatum*'un yaprak dokusundaki hiperforin, hiperozit, psödohiperisin, kersetin, rutin ve özellikle de hiperisin bileşiklerinin miktarında yüksek oranda artış sağlayan etkili bir uygulama olmuştur.

H. perforatum'un yaprak dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması, 15 ve 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur.

4.3.4.3. TiO₂ Nanopartiküllerin *H. retusum*'un Sürgün Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. retusum eksplantları TiO₂ nanopartiküllerinin 25, 75 ve 200 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır.



Şekil 4.11. TiO₂ nanopartiküllerinin a) 25, b) 75 ve c) 200 mgL⁻¹ konsantrasyonunu içeren ortamdaki *H. retusum* sürgünleri

Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar çizelge 4.16.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.16. TiO₂ nanopartiküllerin *H. retusum* sürgünlerinin fenolik bileşiklerinin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Kontrol	25 mgL ⁻¹	75 mgL ⁻¹	200 mgL ⁻¹
Hiperisin	42428.6±8	60459.9±11.4	46762±8.8	51925.7±9.8
Hiperforin	48.4±0.1	260.9±0.1	458.2±0.2	305.9±0.1
Hiperozit	442378.2±55.7	613249.4±77.3	499174.2±62.9	549535±69.2
Psödohiperisin	420341.2±72.3	550209.7±94.6	425708.3±73.2	461617.5±79.4
Kersetin	12852.3±7.4	15689.8±9	12326.6±7.1	14024.7±8
Rutin	42087.5±5.7	48778.8±6.6	40653.6±5.5	48698.5±6.6
Kersitrin	476609.8±63.4	670346.2±89.2	562407.5±74.8	622097±82.7
Klorojenik asit	19668.6±5.9	22892.6±6.8	21240.7±6.4	17941.6±5.4
Protokateşik asit	7404.7±1.6	6198.2±1.3	5969.1±1.3	6446.3±1.4
Hesperidin	19119.2±3.1	23568.7±3.8	18898.7±3.1	21900.9±3.5
Luteolin	1706.1±0.3	1225.7±0.2	1566.2±0.3	1081.6±0.2
Luteolin-7 glukozit	8007.6±0.7	6884.4±0.6	5924.7±0.5	6649±0.6
Astragalin	4810.9±0.7	7850.6±1.2	5911.4±0.9	6642.4±1
Apigenin	344.9±0.1	287.1±0.1	285.4±0.1	213.9±0.1

*Sunuşlar üç tekrarın ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiği 1.4 katına, hiperforin bileşiği 5.3 katına, hiperozit bileşiği 1.3 katına, psödohiperisin bileşiği 1.3katına, kersetin bileşiği ise 1.2 katına çıkmıştır (Çizelge 4.16.). Rutin bileşiğinin miktarında ise çok düşük oranda bir artış gerçekleşmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan kersitrin bileşiği 1.4 katına, astragalin bileşiği ise 1.6 katına çıkmıştır. Klorojenik asit ve hesperidin bileşiklerinin miktarında çok düşük oranda artış gerçekleşmiştir. Protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşikleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında miktarlarında azalma olduğu tespit edilmiştir. 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen fenolik bileşiklerin özellikle de hiperforin bileşiğinin miktarını yüksek oranda artırmıştır.

75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin ve hiperozit bileşiklerinin miktarında çok düşük oranda bir artış gerçekleşmiştir(Çizelge 4.16.). Hiperforin bileşiği 9.4. katına çıkmıştır. Psödohiperisin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarlarında önemli bir değişim olmamıştır. İlk altı bileşik dışında kalan kersitrin ve klorojenik asit bileşiklerinin miktarlarında kayda değer bir değişim gerçekleşmemiştir. Protokateşik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit ve

apigenin bileşiklerinin miktarlarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Astragalin bileşiği ise kontrol grubundaki miktarının 1.2 katına çıkmıştır. 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen hiperforin bileşiğinin miktarını yüksek oranda artırırken diğer bileşiklerin miktarlarında önemli bir değişim olmamıştır.

200 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen bileşiklerin miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiği 1.2 katına, hiperforin bileşiği 6.3 katına, hiperozit bileşiği ise 1.2 katına çıkmıştır (Çizelge 4.16.). Psödohiperisin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarında değişim gerçekleşmemiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin bileşiği kontrol grubunun 1.3 katına çıkmıştır. Klorojenik asit, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit ve apigenin bileşiklerinin miktarlarında azalma olduğu tespit edilmiştir. Hesperidin bileşiği kontrol grubuna göre çok düşük oranda artış gösterirken, astragalin bileşiği ise 1.3 katına çıkmıştır. 200 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması *H. retusum* sürgünlerinde tespit edilen fenolik bileşiklerde özellikle de hiperforin bileşiğinde yüksek oranda bir artış gerçekleştirmiştir.

H. retusum sürgünlerinde 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması, 75 ve 200 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamalarına oranla özellikle hiperisin ve türevi bileşiklerin (ilk altı bileşik) miktarlarını artırmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

4.3.4.4 TiO₂ Nanopartiküllerin *H. retusum*'un Gövde ve Yaprak

Dokularındaki Hiperisin ve Türevi Bileşiklerin Miktarına Etkisi

H. retusum eksplantları TiO₂ nanopartiküllerinin 10, 15 ve 25 mgL⁻¹ konsantrasyonlarından oluşan üç farklı grup ve bir kontrol grubu olmak üzere dört farklı grupta kültüre alındılar. Bütün deney gruplarında 0.5 mgL⁻¹ BA içeren standart MS besi ortamı kullanılmıştır. Yirmi bir günlük kültür süreci sonunda gelişen bütün sürgünlerin gövde ve yaprak dokularındaki hiperisin ve türevi bileşikleri ile bazı fenolik bileşiklerinin içeriği analiz edilerek sonuçlar çizelge 4.17'de sunulmuştur.

Çizelge 4.17. TiO₂ nanopartiküllerin *H. retusus*'ün gövde ve yaprak dokularındaki fenolik bileşiklerin miktarına etkisi*

Fenolik bileşik**	Gövde				Yaprak			
	Kontrol	10 mgL ⁻¹	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹	Kontrol	10 mgL ⁻¹	15 mgL ⁻¹	25 mgL ⁻¹
Hiperisin	13970.8±2.6	20261.7±3.8	11581.7±2.2	11967.8±2.3	50662.9±9.6	75605.6±14.3	57122.4±10.8	39458.5±7.5
Hiperforin	307694.2±128.6	394258.7±164.8	259438.4±108.4	231340.7±96.7	607520.7±253.9	654849.8±273.7	679047.3±283.8	532196.3±222.5
Hiperozit	450227.6±56.7	426195.2±53.7	256178.8±32.3	259512.4±32.7	1713474.9±215.9	2056830.3±259.2	1749303.2±220.4	1331022.3±167.7
Psödohiperisin	199406.6±34.3	217484.7±37.4	147672.3±25.4	180624±31.1	422071.7±72.6	510026±87.7	441158.5±75.9	389622.6±67
Kersetin	28441.1±16.3	38177.7±21.9	35031.1±20.1	21391.5±12.3	121111.6±69.4	106112.8±60.8	97010.3±55.6	80382±46.1
Rutin	33304.8±4.5	37697.8±5.1	22568±3.1	22608.7±3.1	135872.9±18.5	129444.8±17.6	139208.5±18.9	97757.7±13.3
Kersitrin	470251.8±62.5	438775.3±58.4	335086.6±44.6	305342±40.6	1693904.7±225.3	2145164.7±285.3	1894713.2±252	1183634.8±157.4
Klorojenik asit	40789.5±12.2	28195.6±8.4	23763.2±7.1	25405.3±7.6	130287.2±39	115159.3±34.4	128758.9±38.5	130053.6±38.9
Protokateşik asit	2125.3±0.5	3466.9±0.7	4640.7±1	2924.5±0.6	2309.6±0.5	2951.8±0.6	4089.9±0.9	2411.9±0.5
Hesperidin	17211.4±2.8	17610.8±2.9	11306.5±1.8	11220.1±1.8	71614.1±11.6	62907.7±10.2	70652.2±11.4	49044.3±7.9
Luteolin	1925.7±0.4	2491.1±0.5	2399±0.5	1295.5±0.2	1667.7±0.3	2081.9±0.4	2675.2±0.5	1321.4±0.2
Luteolin-7-glukozit	9310.7±0.8	7329.1±0.6	5634.2±0.5	3661.9±0.3	5851.7±0.5	4505.5±0.4	6836.7±0.6	3358.3±0.3
Astragalin	4398.5±0.7	4461.8±0.7	2714.4±0.4	2980.3±0.5	26245.2±4	40995.8±6.3	34941.9±5.3	20567.3±3.1
Apigenin	525.4±0.1	597.5±0.1	518.5±0.1	304.1±0.1	263±0.1	444±0.1	316.9±0.1	155.4±0.1

*Sonuçlar üç tekrarin ortalamasıdır. **Analit derişimleri µg analit/kg bitki olarak verilmiştir.

Tespiti yapılan bütün bileşiklerdeki artma veya azalma oranları, kontrol grubu esas alınarak değerlendirilmiştir.

10 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.4 katına; hiperforin bileşiği 1.2 katına, kersetin bileşiği ise 1.3 katına çıkmıştır (Çizelge 4.17.). Psödohiperisin bileşiğinin miktarı değişmemişken, hiperozit bileşiğinin miktarında azalma olduğu saptanmıştır. Rutin bileşiğinin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çok düşük oranda artış meydana geldiği tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, protokateşik asit, hesperidin, luteolin, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında artış olurken, klorojenik asit ve luteolin-7 glukozit bileşiklerinin miktarı azalma olduğu tespit edilmiştir. 10 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması, *H. retusum*'un gövde dokusundakihiperozit, klorojenik asit ve luteolin-7 glukozit bileşiklerinin miktarında azalamaya neden olurken geriye kalan bileşiklerden 10 tanesinin miktarında artış gerçekleşmiştir.

15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin, hiperforin, hiperozit, psödohiperisin ve rutin bileşiklerinin miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.17.). Kersetin bileşiğinin miktarı 1.2 katına çıkmıştır. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden protokateşik asit ve luteolin bileşiklerinin miktarı artarken, kersitrin, klorojenik asit, hesperidin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. 15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasıyla, *H. retusum*'un gövde dokusundaki hiperisin, hiperforin, hiperozit, psödohiperisin ve rutin gibi önemli bileşiklerin miktarında kontrol grubuna göre azalma olduğundan yapılan uygulama başarısız olarak gerçekleşmiştir.

25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un gövde dokusunda tespit edilen hiperisin, hiperforin, hiperozit, psödohiperisin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.17.). İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden protokateşik asit bileşiğinin miktarı artarken, kersitrin, klorojenik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir. 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasının *H. retusum*'un gövde dokusundakiprotokateşik asit hariç geriye kalan bileşiklerin miktarında azalma olduğundan uygulama başarısız olmuştur.

H. retusum'un gövde dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda 10 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması 15 ve 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur.

10 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin bileşiği, kontrol grubunun 1.4 katına; hiperozit bileşiği 1.2 katına, psödohiperisin bileşiği ise 1.2 katına çıkmıştır (Çizelge 4.17.). Hiperforin bileşiğinin miktarında değişim olmadığı saptanmıştır. Kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarı kontrol grubuyla kıyaslandığında azaldığı tespit edilmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, protokateşik asit, luteolin, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarının arttığı klorojenik asit, hesperidin ve luteolin-7 glukozit bileşiklerinin miktarının ise azaldığı belirlenmiştir. 10 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında, *H. retusum*'un yaprak dokusundaki hiperisin, hiperozit, psödohiperisinkersitrin, protokateşik asit, luteolin, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarında artış olduğundan etkili bir uygulama olmuştur.

15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin ve hiperforin bileşiklerinin miktarları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında çok düşük oranda artış olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.17.). Hiperozit, psödohiperisin ve rutin bileşiklerinin miktarlarının değişmediği saptanmıştır. Kersetin bileşiğinin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azaldığı belirlenmiştir. İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden kersitrin, protokateşik asit, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarları artmışken, klorojenik asit ve hesperidin bileşiklerinin miktarlarının azaldığı tespit edilmiştir. 15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen fenolik bileşiklerin çoğunun miktarında artış sağlayamadığından etkili bir uygulama olmamıştır.

25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında *H. retusum*'un yaprak dokusunda tespit edilen hiperisin, hiperforin, hiperozit, psödohiperisin, kersetin ve rutin bileşiklerinin miktarı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.17.). İlk altı bileşik dışında kalan bileşiklerden protokateşik asit bileşiğinin miktarı artarken, kersitrin klorojenik asit, hesperidin, luteolin, luteolin-7 glukozit, astragalin ve apigenin bileşiklerinin miktarının azaldığı saptanmıştır. 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması *H. retusum*'un yaprak dokusundaki hiperisin, hiperforin,

hiperozit, psödohiperisin, kersetin ve rutingibi önemli bileşiklerin miktarında artış sağlayamadığından başarısız bir uygulama olarak gerçekleşmiştir.

H. retusum'un yaprak dokusunda fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda 10 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması 15 ve 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamalarına göre daha etkili olmuştur

Bitki, hücre ve organ kültürleri çeşitli biyoaktif sekonder metabolitlerin üretimi için etkili bir araç olduğu bilinmektedir. *In vitro* bitki kültür ortamlarında sekonder metabolitlerin içeriğinin artırılması için kültür ortamının optimize edilmesi, ortama uygun öncüllerin ve elisitörlerin dahil edilmesi en önemli unsurlardır. Nanopartiküller *in vitro* bitki kültür ortamlarına ilave edilen besin kaynağı veya elisitör olarak hareket edebilir (Kim ve ark., 2017). Çünkü nanopartiküller yüzey karakteristiklerinden dolayı önemli ve sıradışı özelliklere sahiptir. Zhang ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada Ag-SiO₂ kabuk-(Ag nanopartiküller) çekirdek kullanılarak, *Artemisia annua*'nın saçak kök kültüründe artemisin içeriğini artırmıştır.

Bu çalışmada da TiO₂ nanopartikülleri *H. perforatum* ve *H. retusum*'un *in vitro* sürgün kültürü ortamlarına hiperisin ve türevi bileşiklerin miktarını artırma amacıyla verilmiştir. *H. perforatum* sürgünlerinde 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması, 25 ve 200 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamalarına oranla özellikle hiperisin ve türevi bileşiklerin (ilk altı bileşik) miktarlarını artırmada daha etkili olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.14 ve 4.16). *H. perforatum* sürgünlerinde bulunan fenolik bileşiklerin miktarlarını artırmada besi ortamına eklenen TiO₂ nanopartiküllerinin konsantrasyonunun artışı olumlu etkide bulunduğu söylenebilir.

H. perforatum'un gövde dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarı, TiO₂ nanopartiküllerinin üç farklı uygulamasında da arttığı belirlenmiştir. Bazı fenolik bileşiklerin miktarı kontrol grubuna göre üç kata kadar artmıştır. *H. perforatum*'un gövde dokusundaki fenolik bileşiklerin miktarını en fazla artıran uygulama ise 15 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulaması olmuştur (Çizelge 4.15.). TiO₂'nin konsantrasyon artışı *H. perforatum*'un gövde dokusunda fenolik bileşiklerin miktarında azalmaya neden olmuştur. *H. perforatum*'un yaprak dokusunun fenolik bileşik miktarını artırmada TiO₂ nanopartikülleri etkili olmuştur. En etkili uygulama ise 75 mgL⁻¹'lik

TiO₂ nanopartikül uygulaması olmuştur. Yapılan bu uygulama fenolik bileşenlerin miktarını üç kata kadar arttırmıştır. *H. perforatum*'un yaprak bulunan fenolik bileşiklerin miktarlarını artırmada besi ortamına eklenen TiO₂ nanopartiküllerinin konsantrasyon artışı olumlu etkide bulunmuştur.

H. perforatum sürgünlerine yapılan 75 mgL⁻¹ TiO₂ uygulamasının sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırıldığında hiperisin bileşiği 5.6 katına, hiperforin bileşiği 8.2 katına, psödohiperisin bileşiğinin ise 2.2 katına çıktığı görülmektedir. TiO₂ uygulamaları, *H. perforatum*'un gövde ve yaprak dokularında da sekonder metabolitlerin miktarında önemli oranda artış gerçekleşmiştir. Raei ve ark. (2014), *Aloe vera* süspansiyon hücrelerinin, 48 saat boyunca 0.625 mg L⁻¹ Ag nanopartikülleri veya 120 mg L⁻¹ TiO₂ nanopartikülleri ile etkileştiğinde, önemli ölçüde artan aloin içeriği sergilediklerini bildirmiştir. TiO₂np uygulamasının ardından en yüksek aloin içeriği elde edildiği belirtilmiştir.

H. retusum sürgünlerinde TiO₂ nanopartiküllerinin üç farklı konsantrasyonunda da fenolik bileşiklerin miktarının arttığı saptanmıştır. Bileşiklerin miktarının artmasında en etkili uygulama 25 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartiküllerini içeren ortam olmuştur (Çizelge 4.16.). Fenolik bileşikler miktarındaki artma ve azalmalar TiO₂ nanopartiküllerinin her konsantrasyonuna farklı tepkiler verdiğinden konsantrasyona göre sabit bir eğilim tespiti yapılamamıştır.

H. retusum'un gövde dokusundaki bazı fenolik bileşenlerin miktarı, TiO₂ nanopartikül uygulamalarının sonucunda çok düşük oranda artırdığı görülmüştür. Fenolik bileşenlerin miktarını artırmada en etkili uygulama 10 mgL⁻¹'lik TiO₂ uygulaması olmuştur (Çizelge 4.17.). Fenolik bileşikler miktarındaki artma ve azalmalar TiO₂ nanopartiküllerinin her konsantrasyonuna farklı tepkiler verdiğinden konsantrasyona göre sabit bir eğilim tespiti yapılamamıştır. *H. retusum*'un yapraklarının fenolik bileşik içerikleri TiO₂ nanopartikül uygulamasıyla düşük miktarlarda da olsa artmıştır. Fenolik bileşiklerin miktarını artırmada en etkili uygulama 10 mgL⁻¹'lik TiO₂ uygulaması olmuştur. TiO₂'nin konsantrasyon artışı *H. retusum*'un yaprak dokusunda fenolik bileşiklerin miktarında azalmaya neden olmuştur.

H. retusum sürgünlerinde 25 mgL⁻¹, gövde ve yaprak dokusunda ise 10 mgL⁻¹ nanopartikül uygulaması fenolik bileşiklerin miktarını artırma konusunda en etkili

uygulamalar olmuştur. Bu sonuçlar gösteriyor ki *H. retusum*'da TiO_2 nanopartiküllerinin düşük konsantrasyonları etkili olmuştur. *H. retusum*'da TiO_2 nanopartiküllerinin daha düşük konsantrasyonlarda kullanılması metabolitlerin miktarını artırma konusunda daha etkili olabilirdi. Al-oubaidi ve Kasid (2015), yaptıkları çalışmada TiO_2 nanopartiküllerini düşük konsantrasyonlarda (4.5 veya 6.0 mg/L^{-1}) kullanarak *Cicer arietinum*'un embriyonik kallusundaki gallik asit, klorojenik asit, o-kumarik asit, tanik asit ve sinnamik asit içeriğini önemli ölçüde arttırdıklarını rapor etmişlerdir.

4.4. Nanopartiküllerin Morfolojik Gelişime *İn vitro* Etkileri

Nanopartiküllerin bitkilerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Nanopartiküller bitkiler üzerinde oluşturacağı etkiler nanopartikülün cinsine, büyüklüğüne, maruz kalma ortamına süresine ve bitkinin türüne bağlıdır. Bu çalışmada 0.5 mg/L^{-1} BA içeren MS besisi ortamında *H. perforatum* ve *H. retusum* türleri farklı konsantrasyonlardaki Fe_2O_3 , TiO_2 , Al_2O_3 ve ZnO nanopartiküllerine 21 gün süreyle maruz bırakılmıştır. Bitkilerde kontrol grubuna kıyasla meydana gelen morfolojik değişimler tespit edilip çizelge 4.18. ve 4.19.'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Nanopartiküllerin *H. retusum* 'un büyümesi üzerindeki morfolojik etkileri

Nanopartikül	NP boyutu (nm)	Konsantrasyon (mg/L)	Bitki üzerindeki morfolojik etkileri
Alüminyum oksit (Al_2O_3)	40	10, 15 ve 25	✓ Tabanda çoklu sürgün oluşumu var alt yapraklar çok sayıda olup küçüktür. ✓ Yaprak deformasyonu ve klorofil kaybı vardır. Alüminyum konsantrasyonu arttıkça özellikle alt yapraklarda klorofil kaybı çoktur. ✓ Üst yapraklarda şekil bozukluğu vardır. ✓ Kök uzaması inhibe olmuştur
Çinko oksit (ZnO)	<100	10, 15 ve 25	✓ Yapraklar açık yeşil renkte dipteki yapraklar çok küçük, tepe yapraklar normal büyüklüktedir. ✓ Klorofil kaybı var. ✓ Kök uzaması inhibe olmuştur
Demir (III) oksit (Fe_2O_3)	65	10, 15 ve 25	✓ Sürgün gelişimi yok. ✓ Gelişen sürgün uçlarında da kuruma var. ✓ Besi yeriyle temas yerinde vitrifikasyon var. ✓ Köke yakın çoklu sürgün var. ✓ Klorofil kaybı var. ✓ Kök uzaması inhibe olmuştur
Titanyum IV oksit (TiO_2)	21	10, 15 ve 25	✓ Titanyum oranı arttıkça sürgün oluşumunda azalma yapraklarda klorofil kaybı yaşandı. ✓ Yaprak kuruması ve kıvrılması gerçekleşmiştir. Titanyumun yüksek konsantrasyonlarında (15 ve 25 mg/L) nod ve internod arasında açılma gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.19. Nanopartiküllerin *H.perforatum* 'un büyümesi üzerindeki morfolojik etkileri

Nanopartikül	Np boyutu (nm)	Konsantrasyon (mgL ⁻¹)	Bitki üzerindeki morfolojik etkileri
Alüminyum oksit (Al ₂ O ₃)	40	200, 250 ve 300	✓ Sürgün sayısı çok fazla sürgün gelişimi yok. ✓ Vitrifikasyon var. ✓ Kök uzaması inhibe olmuştur
Çinko oksit (ZnO)	<100	200, 250 ve 300	✓ Gelişim geriliği var. ✓ Yapraklarda klorofil kaybı var. ✓ Gelişen sürgünlerin uçlarında klorozis var. ✓ Kök uzaması inhibe olmuştur
Demir (III) oksit(Fe ₂ O ₃)	65	200, 250 ve 300	✓ Gelişim yok sürgün gelişimi yok. ✓ Yapraklarda klorofil kaybı var. ✓ Kök uzaması inhibe olmuştur
Titanyum IV oksit (TiO ₂)	21	15, 25 ve 75	✓ Herhangi bir gelişme yok sürgünler vitrifiye olmuş. Nod ve internod arası daralmıştır. ✓ Kök uzaması inhibe olmuştur

H. retusum'da alüminyum, demir ve çinko nanopartikülleri kök uzamasını inhibe ettiği tespit edilmiştir. *H. perforatum*'da uygulanan dört nanopartikülde kök uzamasını inhibe etmiştir. Alüminyum nanopartiküllerin, mısır, salatalık ve lahanayı (*Brassica oleracea*) içeren çeşitli türlerde kök uzamasını engellediği rapor edilmiştir (Yang ve Watts 2005, Lin ve Xing 2007). Benzer şekilde demir (Fe₃O₄) nanopartiküllerin salatalıkta (Rem'edios 2012), çinko (ZnO) nanopartiküllerin buğday, mısır ve soya fasülyesinde (Dimkpa ve ark. 2012, Yoon 2014, Zhang 2015) kök uzamasını inhibe ettiği kaydedilmiştir. Sonuçlar nanopartiküller birçok bitkide kök uzamasını engellediğini ortaya koymaktadır. Çünkü kökler np'lerle doğrudan temas halindeyken kök dokusunda veya kök yüzeyinde birikmesi daha kısa kök uzunluğuna neden olur. Agar ortamında nanopartiküllerin bulunması kök uzaması üzerinde olumsuz etki yaratır çünkü agar ortamı gözeneksiz, daha az çözünmüş oksijen içeren ve nanopartiküllerden dolayı daha az su emilen ortamdır (Langerud ve Sandvik 1987).

H. perforatum'da ZnO ve Fe₂O₃ nanopartikülleri klorofil kaybına neden olmuştur. *H. retusum*'da ise dört farklı nanopartikül uygulamasında da klorofil kaybı meydana gelmiştir. Klorofil sentezinin azalmasının nedeni kök hidrolik iletkenliğinin azalmasıyla ilişkili olabilmektedir. Nanopartiküller apoplastik akımda gözenekleri ve bariyerleri tıkama bunun sonucunda besin maddelerinin alımı ile hidrolik transferlerde azalmaya (Dietz ve Herth 2011, Aken Van 2015) neden olmaktadır. Kök hidrolik iletkenliğinin azalması ile de çözünmüş besinlerin azalması özellikle de Mg taşınmasının azalması klorofil kaybın neden olmaktadır. Çünkü magnezyum (Mg)

klorofillerin sentezi ile ilişkili bir besindir (Ma ve ark. 2013 a,b; Trujillo-Reyes ve ark. 2014, Martínez-Fernandez ve ark. 2016).

Al₂O₃ nanopartikülleri *H. retusum*'da yaprak deformasyonuna ve üst yapraklarda şekil bozukluğuna, *H. perforatum*'da ise sürgün gelişimini inhibe etmeye ve vitrifikasyona yol açmıştır.

ZnO nanopartikülleri *H. retusum*'da sürgünlerin alt yapraklarının çok küçük olmasına, *H. perforatum*'da ise gelişim geriliğine ve gelişen sürgün uçlarında klorozise sebep olmuştur.

Fe₂O₃ nanopartikülleri *H. retusum* ve *H. perforatum*'da sürgün gelişiminin durmasına neden olmuştur. Ayrıca *H. retusum*'da Fe₂O₃ nanopartikülleri gelişen sürgün uçlarında kurumaya, besi yeriyle temas yerinde vitrifikasyona neden olmuştur.

TiO₂ nanopartiküllerin konsantrasyon arttıkça *H. retusum*'da sürgün oluşumunda azalma, yaprak kuruma ve kıvrılmasına yol açmıştır. *H. perforatum*'da ise gelişimi engelleme ve sürgünlerde vitrifikasyon oluşturmıştır. *H. retusum*'da titanyumun yüksek konsantrasyonları (15 ve 25 mgL⁻¹) nod ve internod arasında açılmaya, *H. perforatum*'da nod ve internod arasında daralma meydana getirmiştir.

H. retusum'a uygulanan nanopartiküller bitkinin gelişimini ve fizyolojisini olumsuz etkilemiştir. Çalışmada kullanılan nanopartiküllerin dördü de metal nanopartiküllerdir. Metal nanopartiküllerin buğday (*Triticum aestivum* L.), pirinç (*Oryza sativa* L.), mısır (*Zea mays* L.) ve soya fasülyesi gibi önemli bitkilerinde gelişimi ve fizyolojisini olumsuz etkilediği rapor edilmiştir (Dimkpa ve ark. 2012, Antisari ve ark. 2015).

Bu çalışmada kullanılan nanopartiküller gibi tasarlanmış olan nanopartiküller bitkiler üzerinde fotosentetik işlemlerde azalma ve reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna (Dietz ve Herth 2011, Miralles ve ark. 2012, Aken Van 2015) ve DNA yapılarında hasara neden olma (Rico ve ark. 2011, Aken Van 2015) gibi toksik etkilerinin oluşturduğu tespit edilmiştir.

4.5. Nanopartiküllü Ortamda Yetiştirilmiş Bitkilerin Moleküler Analizleri

Farklı konsantrasyonda çeşitli nanopartikül uygulanmış *H. perforatum* ve *H. retusum* bitkilerinde *HpPKS1* ve *HpPKS2* genleri anlatım seviyeleri Q-RT-PCR yöntemi ile çalışılmıştır. Bitkilerin yaprak ve gövde dokularından ayrı ayrı RNA izole edilmesinin ardından, bu RNA molekülleri cDNA sentezinde kullanılmıştır. Farklı deneysel grupların birbiri ile karşılaştırılabilmesi amacıyla 18S rRNA miktarları ile GeNorm yazılımı kullanılarak normalizasyon gerçekleştirilmiştir. Normalizasyon faktör değerleri şu şekildedir.

Çizelge 4.20. Q-RT-PCR analizlerinin değerlendirilmesinde kullanılan normalizasyon değerleri

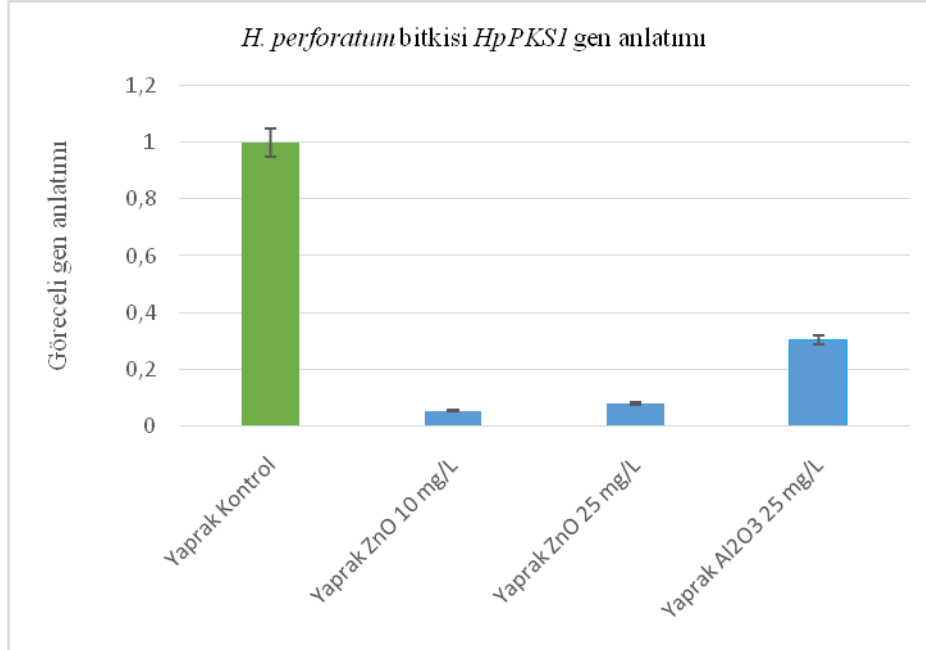
<i>H. perforatum</i> L.				<i>H. retusum</i> Aucher		
Doku	Uygulama	Konsantrasyon (mgL ⁻¹)	Normalleştirme Faktörü (w/18S rRNA)	Uygulama	Konsantrasyon (mgL ⁻¹)	Normalleştirme Faktörü (w/18S rRNA)
Yaprak	Kontrol	-	1.0914	Kontrol	-	1.2730
	ZnO	200	0.9555	ZnO	10	0.9144
	ZnO	250	0.9653	ZnO	15	0.9267
	ZnO	300	0.9947	ZnO	25	0.8026
	Al ₂ O ₃	200	1.0616	Al ₂ O ₃	10	1.0120
	Al ₂ O ₃	250	0.9060	Al ₂ O ₃	15	1.0292
	Al ₂ O ₃	300	1.0888	Al ₂ O ₃	25	1.1346
	TiO ₂	15	1.0282	TiO ₂	10	1.1034
	TiO ₂	25	1.1345	TiO ₂	15	1.0486
	TiO ₂	75	1.0395	TiO ₂	25	0.9395
	Fe ₂ O ₃	200	1.0092	Fe ₂ O ₃	10	1.0732
	Fe ₂ O ₃	250	1.0153	Fe ₂ O ₃	15	1.0751
Gövde	Fe ₂ O ₃	300	1.0224	Fe ₂ O ₃	25	0.9910
	Kontrol	-	1.1473	Kontrol	-	0.9475
	ZnO	200	0.7846	ZnO	10	1.0041
	ZnO	250	0.9272	ZnO	15	1.1080
	ZnO	300	1.0586	ZnO	25	0.6387
	Al ₂ O ₃	200	1.0353	Al ₂ O ₃	10	1.0340
	Al ₂ O ₃	250	0.9313	Al ₂ O ₃	15	1.0544
	Al ₂ O ₃	300	0.9521	Al ₂ O ₃	25	1.0622
	TiO ₂	15	0.9484	TiO ₂	10	1.0233
	TiO ₂	25	0.9964	TiO ₂	15	0.8778
	TiO ₂	75	1.1235	TiO ₂	25	0.7767
	Fe ₂ O ₃	200	1.0262	Fe ₂ O ₃	10	1.1291
	Fe ₂ O ₃	250	0.9114	Fe ₂ O ₃	15	1.0980
	Fe ₂ O ₃	300	0.9321	Fe ₂ O ₃	25	1.1663

Q-RT-PCR deneyleri sonucu elde edilen $\Delta\Delta Cq$ değerleri, normalizasyon faktörleri ile değerlendirilmiştir ve ardından göreceli gen anlatımı $\Delta\Delta Cq$ yöntemi ile hesaplanmıştır. Bu gen anlatım değerleri de her dokunun kontrol grubuna karşılaştırılarak sunulmuştur. *H. perforatum*'da gen anlatımları şu şekildedir:

Çizelge 4.21. HpPKS1 geninin *H. perforatum* bitkisindeki gen anlatım değerleri

Doku	Uygulama	Konsantrasyon (mgL ⁻¹)	HpPKS1	ΔΔct	Göreceli İfade
Yaprak	Kontrol	-	29.42213	0.000	1.000
	ZnO	200	36.6133	7.191	0.007
	ZnO	250	36.60891	7.187	0.007
	ZnO	300	nd	nd	nd
	Al ₂ O ₃	200	nd	nd	nd
	Al ₂ O ₃	250	nd	nd	nd
	Al ₂ O ₃	300	nd	nd	nd
	TiO ₂	15	nd	nd	nd
	TiO ₂	25	nd	nd	nd
	TiO ₂	75	nd	nd	nd
	Fe ₂ O ₃	200	35.08733	5.665	0.020
	Fe ₂ O ₃	250	34.13623	4.714	0.038
	Fe ₂ O ₃	300	33.7576	4.335	0.050
Gövde	Kontrol	-	27.98816	0.000	1.000
	ZnO	200	43.41764	0.000	1.000
	ZnO	250	36.47716	15.429	0.000
	ZnO	300	36.82187	8.489	0.003
	Al ₂ O ₃	200	32.56476	8.834	0.002
	Al ₂ O ₃	250	36.50301	4.577	0.042
	Al ₂ O ₃	300	37.28605	8.515	0.003
	TiO ₂	15	37.19816	9.298	0.002
	TiO ₂	25	34.60858	9.210	0.002
	TiO ₂	75	nd	nd	nd
	Fe ₂ O ₃	200	nd	nd	nd
	Fe ₂ O ₃	250	nd	nd	nd
	Fe ₂ O ₃	300	nd	nd	nd

nd: Değer saptanabilir sınırların altındadır.

Çizelge 4.22. HpPKS1 geninin *H. perforatum* bitkisindeki ifade edilen gen anlatım değerleri

Yaprak dokusunda Al₂O₃ ve TiO₂ nanopartikülleri uygulamaları, HpPKS1 gen anlatımı üzerinde saptanabilir bir etki göstermemiştir. Fe₂O₃ nanopartikül uygulaması,

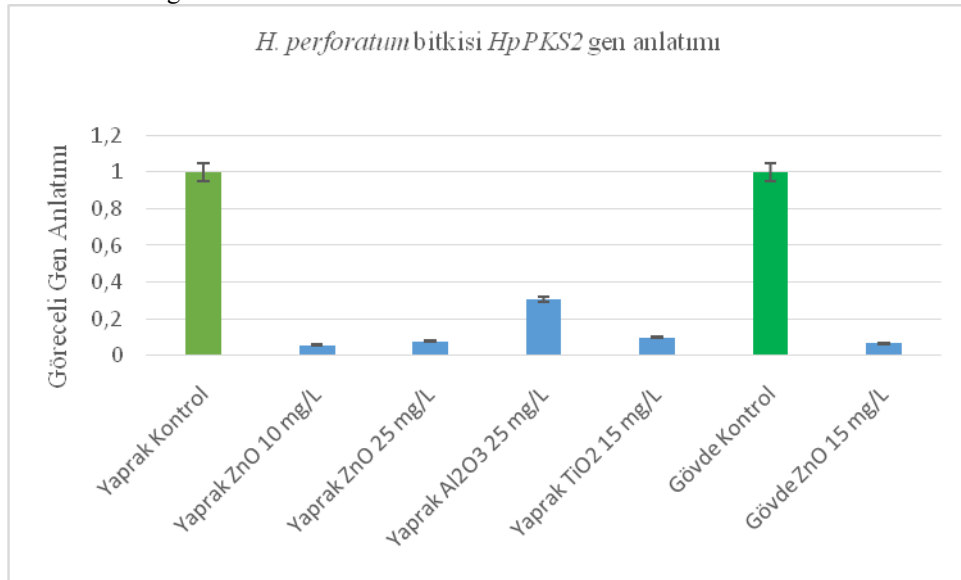
nanopartikül konsantrasyonunun artımı ile paralel artış göstermektedir. Gövde dokusunda ise, farklı nanopartikül uygulamaları *HpPKS2* gen anlatımı üzerine etki göstermiştir ancak kontrol grubuna göre farklı uygulama gruplarında gen anlatımı düşük miktardadır.

Çizelge 4.23. *HpPKS2* geninin *H. perforatum* bitkisindeki gen anlatım değerleri

Doku	Uygulama	Konsantrasyon (mgL ⁻¹)	<i>HpPKS2</i>	$\Delta\Delta ct$	Göreceli anlatım
Yaprak	Kontrol	-	33.06897	0.000	1.000
	ZnO	200	nd	nd	Nd
	ZnO	250	nd	nd	Nd
	ZnO	300	nd	nd	Nd
	Al ₂ O ₃	200	34.58101	1.512	0.351
	Al ₂ O ₃	250	36.03772	2.969	0.128
	Al ₂ O ₃	300	nd	nd	Nd
	TiO ₂	15	33.09575	0.027	0.982
	TiO ₂	25	nd	nd	Nd
	TiO ₂	75	35.93215	2.863	0.137
	Fe ₂ O ₃	200	nd	nd	Nd
	Fe ₂ O ₃	250	nd	nd	Nd
Gövde	Fe ₂ O ₃	300	37.80187	4.733	0.038
	Kontrol	-	nd	nd	Nd
	ZnO	200	nd	nd	Nd
	ZnO	250	41.20129	nd	Nd
	ZnO	300	36.22675	nd	Nd
	Al ₂ O ₃	200	nd	nd	Nd
	Al ₂ O ₃	250	36.86273	nd	Nd
	Al ₂ O ₃	300	nd	nd	Nd
	TiO ₂	15	43.02882	nd	Nd
	TiO ₂	25	nd	nd	Nd
	TiO ₂	75	34.99747	nd	Nd
	Fe ₂ O ₃	200	nd	nd	Nd
	Fe ₂ O ₃	250	nd	nd	Nd
	Fe ₂ O ₃	300	nd	nd	Nd

nd: Değer saptanabilir sınırların altındadır.

Çizelge 4.24. *HpPKS2* geninin *H. perforatum* bitkisindeki ifade edilen gen anlatım değerleri

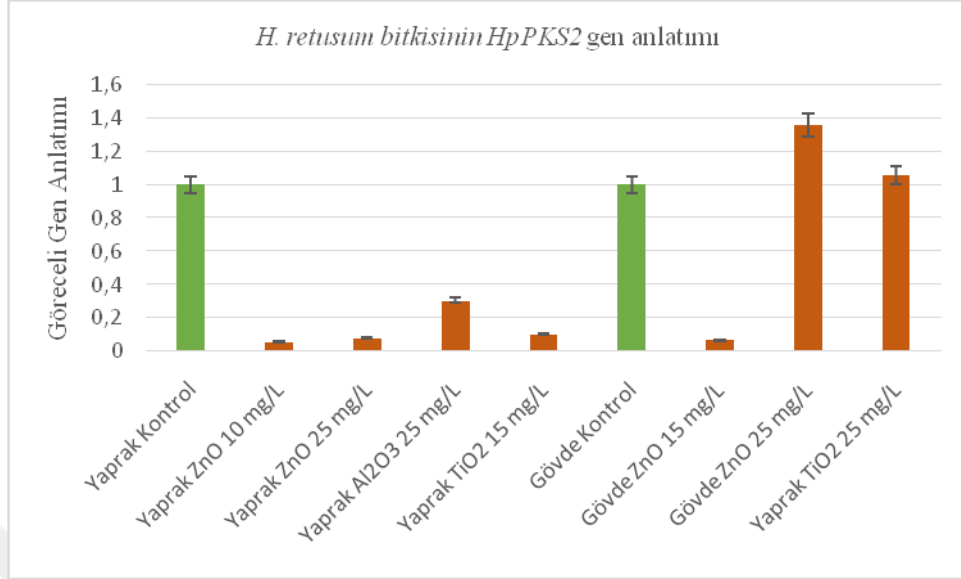


Al_2O_3 nanopartikülleri *HpPKS2* geninin yaprak dokusunda anlatımını nanopartikül konsantrasyonuna ters orantılı bir şekilde etkilemiştir. Gövde dokusunda ise *HpPKS2* gen anlatım miktarı saptanabilir sınırlar içinde olmadığından, diğer dokularda düşük miktarda anlatım gözlenmiş olmasına rağmen göreceli bir şekilde gösterilememiştir. *H. retusum* bitkisine uygulanan farklı nanopartiküllerin *HpPKS2* geninin anlatımı üzerindeki etkisi şu şekildedir.

Çizelge 4.25. *HpPKS2* geninin *H. retusum* bitkisindeki gen anlatım değerleri

Doku	Uygulama	Konsantrasyon (mgL^{-1})	<i>HpPKS2</i>	$\Delta\Delta\text{ct}$	Göreceli Anlatım
Yaprak	Kontrol	-	26.118900	0.000	1.000
	ZnO	10	30.271254	4.152	0.056
	ZnO	15	33.390696	7.272	0.006
	ZnO	25	29.769088	3.650	0.080
	Al_2O_3	10	34.018947	7.900	0.004
	Al_2O_3	15	43.140408	17.022	0.000
	Al_2O_3	25	27.834555	1.716	0.304
	TiO_2	10	34.476761	8.358	0.003
	TiO_2	15	29.431375	3.312	0.101
	TiO_2	25	31.865929	5.747	0.019
	Fe_2O_3	10	30.861191	4.742	0.037
	Fe_2O_3	15	31.069946	4.951	0.032
	Fe_2O_3	25	33.620676	7.502	0.006
	Kontrol	-	28.807499	0.000	1.000
Gövde	ZnO	10	50.892891	22.085	0.000
	ZnO	15	32.712958	3.905	0.067
	ZnO	25	28.364240	-0.443	1.360
	Al_2O_3	10	34.907025	6.100	0.015
	Al_2O_3	15	37.861338	9.054	0.002
	Al_2O_3	25	36.015171	7.208	0.007
	TiO_2	10	37.384428	8.577	0.003
	TiO_2	15	35.172261	6.365	0.012
	TiO_2	25	28.725462	-0.082	1.059
	Fe_2O_3	10	nd	Nd	nd
	Fe_2O_3	15	38.814336	10.007	0.001
	Fe_2O_3	25	35.721418	6.914	0.008

Farklı nanopartikül uygulamaları sonucu *HpPKS2* gen anlatımı ölçümü, Fe_2O_3 10 mgL^{-1} uygulaması hariç tüm örneklerde saptanabilmiştir. Bu deney grupları arasında $\text{ZnO}25\text{mgL}^{-1}$ uygulaması *HpPKS2* gen anlatımını, *H. retusum* bitkisinde gövdede artırmıştır.

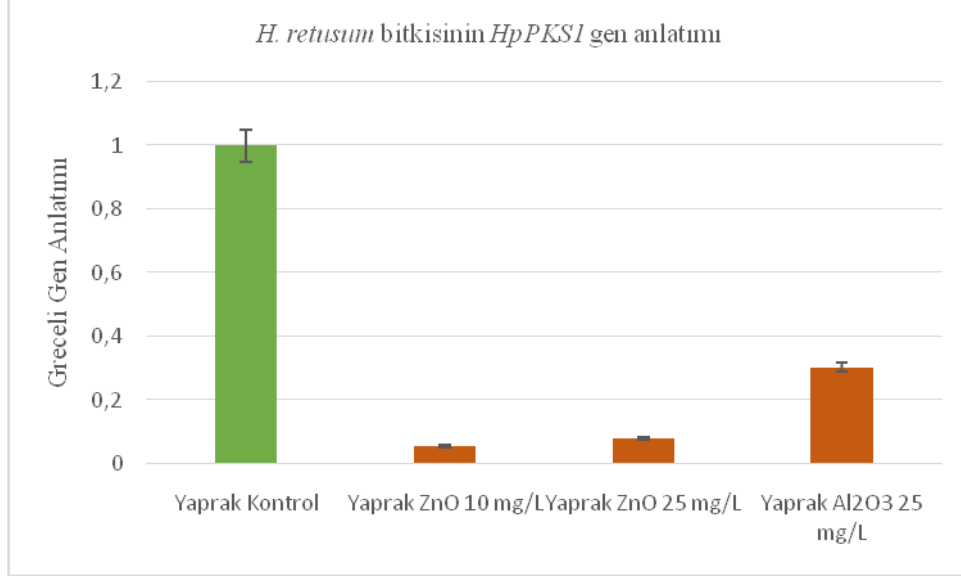
Çizelge 4.26. *HpPKS2* geninin *H. retusum* bitkisindeki ifade edilen gen anlatım değerleri

HpPKS1 için ise yaprak kontrol örneğinde gen anlatımı ölçülebilir sınırlarda değildir. Ancak gövde örnekleri için relative gen anlatımları belirtilebilmiştir.

Çizelge 4.27. *HpPKS1* geninin *H. retusum* bitkisindeki gen anlatım değerleri

Doku	Uygulama	Konsantrasyon (mgL ⁻¹)	<i>HpPKS1</i>	$\Delta\Delta ct$	Göreceli İfade
Yaprak	Kontrol	-	nd	nd	nd
	ZnO	10	nd	nd	nd
	ZnO	15	nd	nd	nd
	ZnO	25	32.99633	nd	nd
	Al ₂ O ₃	10	33.09264	nd	nd
	Al ₂ O ₃	15	39.41522	nd	nd
	Al ₂ O ₃	25	nd	nd	nd
	TiO ₂	10	34.76853	nd	nd
	TiO ₂	15	31.49395	nd	nd
	TiO ₂	25	34.26782	nd	nd
	Fe ₂ O ₃	10	35.31523	nd	nd
	Fe ₂ O ₃	15	34.13623	nd	nd
	Fe ₂ O ₃	25	33.7576	nd	nd
Gövde	Kontrol	-	26.97707	0.000	1.000
	ZnO	10	nd	nd	nd
	ZnO	15	nd	nd	nd
	ZnO	25	26.5348	-0.442	1.359
	Al ₂ O ₃	10	33.66425	6.687	0.010
	Al ₂ O ₃	15	37.46404	10.487	0.001
	Al ₂ O ₃	25	38.39413	11.417	0.000
	TiO ₂	10	33.73982	6.763	0.009
	TiO ₂	15	31.50584	4.529	0.043
	TiO ₂	25	27.68705	0.710	0.611
	Fe ₂ O ₃	10	32.62461	5.648	0.020
	Fe ₂ O ₃	15	38.09386	11.117	0.000
	Fe ₂ O ₃	25	31.0153	4.038	0.061

HpPKS2 gen anlatımında gözleendiği gibi, *HpPKS1* gen anlatımı da ZnO25mgL⁻¹ nanopartikül uygulaması sonucu gövde dokusunda artmış, ancak diğer uygulamalarda ve diğer dokularda düşük miktarda gözlenmiştir.

Çizelge 4.28. *HpPKS1* geninin *H. retusum* bitkisindeki ifade edilen gen anlatım değerleri

HpPKS1 ve *HpPKS2* genlerinin, *H. perforatum* bitkisinde hiperisin ve hiperforin fenolik bileşiklerinin sentezinde görevli anahtar enzimleri şifreleyen genler olduğu literatürde yapılan çalışmalarda önerilmiştir. *HpPKS1* ve *HpPKS2* genlerinin dokuya özgü ekspresyon profilleri qPCR analizi ile *H. perforatum* kök, gövde, yaprak iç kısımları, yaprak kenarları ve çiçek tomurcuklarında incelenmiştir (Karppinnen ve Hohtola 2008). Bu genlerin dokuya özgü ekspresyon profilleri bu iki genin sekonder metabolitlerin iki farklı tipinin biyosentezinden sorumlu olabileceğini göstermiştir. *HpPKS1* geni çoğunlukla çiçek tomurcuklarında eksprese edilirken, gövde, yaprak iç kısımları ve yaprak kenarlarında düşük oranda eksprese edilmiştir. *HpPKS1*'in köklerde ise çok düşük oranda eksprese edildiği belirlenmiştir. *HpPKS2* ise çiçek dokularında çok yüksek oranda eksprese edilirken, kök, gövde ve yaprak iç kısımlarına görece yüksek ekspresyonu yaprak kenarlarında belirlenmiştir. Hiperforin bileşeni, *H. perforatum* bitkisinde, incelenen farklı dokular arasında en yüksek miktarda çiçek tomurcuğunda gözlenmiştir ve bu bulguya paralel olarak *HpPKS1* geni anlatımı da hiperforin varlığı ve miktarının yüksek olduğu dokularda daha yüksek olarak ölçülmüştür. Aynı bitkide hiperisin bileşiği de çiçek tomurcuğunda ve bu dokuya ek olarak yaprak kenarlarında en yüksek miktarda gözlenmiştir. Bu kimyasalın varlığı da doku bazında, *HpPKS2* geni anlatımı ile pozitif ilinti göstermiştir (Karppinnen ve Hohtola 2008). Hiperisin ve psödohiperisin, özellikle yaprak kenarları ve çiçeklerde bulunan çok hücreli koyu bezelerde (dark glands) biriktirilirler (Briskin ve Gawenowski

2001). *H. perforatum* gövdeleri genellikle daha az koyu beze içerirken, kökler ise bu bezeleri hiç içermez (Kosuth ve ark. 2007). Bitkinin toprak üstü organlarında, hiperisinin böceklerle karşı bitkinin kendi savunmasında rol aldığı düşünülürse aslında köklerde bu metabolitlerinin biriktirilmesine ihtiyaç yoktur (Sirvent ve ark. 2003, Kosuth ve ark. 2007).

Yapılan çalışmada *H. perforatum* ve *H. retusum* bitkilerine farklı konsantrasyonlarda dört farklı nanopartikül uygulanmış ve bu uygulama sonucu gövde ve yaprak dokularında fenolik bileşen miktarları ile *HpPKS1* ve *HpPKS2* gen anlatımları çalışılmıştır. Gen anlatımları 18S rRNA geni ile normalize edilip kontrol grubuna göre göreceli anlatım şeklinde sunulmuştur.

Uygulanan nanopartiküllerden ZnO, *H. perforatum* bitkisi gövdesinde *HpPKS2* gen anlatımını etkilememiş ancak hiperisin miktarının bu uygulama sonucu arttığı gözlenmiştir. *HpPKS2* geninin anlatımı ile hiperisin birikimi arasında doğru orantı *H. retusum* bitkisinde gözlenebilmiştir ancak bu örnekteki gen anlatım miktarı da kontrol grubuna göre düşüktür.

Al₂O₃ nanopartikülü uygulamasının *H. perforatum* bitkisi gövdesinde hem hiperisin hem de hiperforin miktarlarını arttırdığı gözlenmiş ancak bu durum gen anlatımına yansımamıştır.

TiO₂ nanopartikülü uygulaması da *H. perforatum* bitkisinde hem hiperisin hem de hiperforin bileşenlerinin birikimine yol açmıştır ve bu bileşenlerin miktarı artan TiO₂ konsantrasyonu ile doğru orantı gözlenmiştir. *HpPKS2* geni anlatımı da TiO₂ konsantrasyonu arttıkça artış göstermiştir. TiO₂ uygulamasının en düşük konsantrasyonda *HpPKS2* gen anlatımını uyarmış olması olasıdır ve bu durum sonucu hiperisin miktarında da artış gözlenmiştir. *H. perforatum* bitkisine uygulanan Fe₂O₃ nanopartikül sonucu gövdede nanopartikül miktarı ile doğru orantılı olarak hiperisin ve hiperforin miktarı artmıştır. Aynı zamanda *HpPKS1* gen anlatımı da uygulanan Fe₂O₃ konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmıştır ancak bu artış kontrol grubundan düşük miktarda kalmıştır.

Gen anlatım sonuçları gen fonksiyonları hakkında aydınlatıcı bilgi vermektedir ancak bitkiler gibi kompleks canlı sistemlerinde bu ilişki her zaman doğrudan

olmayabilir. Hiperisin ve hiperforin sentezinde *HpPKS1* ve *HpPKS2* genlerinin ve uygulanan nanopartiküller sonucu bu fenolik bileşiklerin sentezinde yine *HpPKS1* ve *HpPKS2* gen ürünlerinin katkısı çok yüksek olabilir. Ancak eğer bu gen ürünleri sentez mekanizmasında erken basamaklarda görevlilerse fenolik bileşen birikimi sırasında anlatımlarının düşmüş olması ve buna bağlı olarak ölçülememiş olmaları olasıdır. Ayrıca kullanılan 18S rRNA, *HpPKS1* ve *HpPKS2* primerleri *H. perforatum* bitkisine ait dizi bilgisinden yararlanılarak tasarlanmıştır. PKS gen ailesi farklı türler arası belirli bir miktarda benzerlik gösterse dahi, *H. perforatum*'a özgün olan qPCR primerleri *H. retusum* örnekleri ile %100 verimle çalışmamıştır. Bu nedenle, bu bitki örneklerinden elde edilen sonuçların yorumlanması pek mümkün değildir.

Yapılan çalışmalarda, bu iki gen ile özellikle hiperisin ve hiperforin miktarı arasında bir ilişki olduğu bulunmuşsa da çalışmamızda böyle bir gözlemlenememiştir. İlgili bileşenlerin biyosentezinin moleküler mekanizması hala tam aydınlatılamamıştır. Başka birçok genin (*hyp1* gibi), bu metabolitlerin biyosentezinde rol aldığı düşünülmektedir. Örneğin hiperisin biyosentezinde görevli olduğu düşünülen *hyp1* geni, hiperisin miktarı köklerde eser miktarda bulunmasına karşılık, bu dokuda en yüksek oranda eksprese edilmiştir (Kosuth ve ark. 2007). Bu durum da, hiperisin biyosentezinin son aşamalarının, doğrudan koyu bezlerle ilişkili olmayan ve hiperisin birikimi gerçekleşmeyen dokularda gerçekleşebileceğini de göstermektedir. Ayrıca bu durum, biyosentez mekanizmasında görevi olan genler hakkında soru işareti yaratmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hypericum türlerinin insanoğlu tarafından tıbbi amaçlarla kullanımı tarihin başlangıcına dayanmaktadır. *Hypericum* türleri içerdikleri sekonder metabolitler nedeniyle başta yanık ve yara iyileştirici olmak üzere idrar söktürücü, anti mikrobiyal etkileri bakımından kullanılmıştır. Son zamanlarda yaygın olarak düşük ve orta düzeydeki depresyon tedavisinde kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında *H. perforatum* ve *H. retusum*'un hiperisin bileşiklerinin miktarını artırmak için *in vitro* sürgün kültürlerine nanopartikül stresi uygulanmış ve bu durumun hiperisin bileşiklerinin miktarı ile gen düzeyinde ne gibi değişiklikler oluşturduğu incelenmiştir.

H. perforatum'un yapraklarındaki fenolik bileşiklerin miktarında en fazla artış 75 mgL⁻¹'lik TiO₂ nanopartikül uygulamasında gerçekleşmiştir. *H. perforatum* gövdelerindeki bileşikler ise en fazla artışı 300 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında göstermiştir.

H. retusum yapraklarındaki fenolik bileşik miktarı en fazla 15 mgL⁻¹'lik Fe₂O₃ nanopartikül uygulamasında artış göstermiştir. *H. retusum* gövdelerindeki bileşikler ise 10 mgL⁻¹'lik ZnO nanopartikül uygulamasında artış gerçekleşmiştir.

In vitro ortamda yetiştirilen *H. perforatum* ve *H. retusum* bitkilerindeki fenolik bileşiklerin miktarını artırma amacıyla kullanılan nanopartiküller kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında bileşiklerin miktarını artırmada etkili olmuşlardır. Özellikle Fe₂O₃ nanopartikülleri her iki türde de bileşiklerin miktarını artırmıştır. Çalışmamızdaki *in vitro* ortamlardan elde edilen bileşik miktarları doğal ortamda yetişen *H. perforatum* ve *H. retusum*'un yaprak ve gövde değerlerinden düşük çıkmıştır.

Sonuç olarak nanopartiküller bitki sekonder metabolitlerinin miktarını artırmak için bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılabilir. Fakat hangi bitkinin hangi nanopartiküle olumlu cevap vereceği tam olarak bilinmemektedir. Bu nedenle yapılacak çalışmalarda farklı çeşit, boyut ve konsantrasyonlarda nanopartiküllerin *in vivo* ya da *in vitro* koşullarda denenmesi ve optimize edilmesi gerekmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abdi, G. H., Salehiand, H. and Khosh-Khui, M. 2008. Nano silver: A novel nanomaterial for removal of bacterial contaminants in valerian (*Valeriana officinalis* L.) tissue culture. *Acta Physiol. Plant.*, 30(5):709-714.
- Agostinis P., Vantieghem A., Merlevede W & de Witte PAM (2002). Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol*, 34: 221–241.
- Akdeniz, M. 2018. screening of chemical content specific to *Hypericum* species growing in different parts of turkey by LC-MS/MS and method validation; investigation of their biological activities and chemometric evaluation. PhD Thesis, Dicle University Institute of Science Department of Chemistry, Diyarbakır, 70.
- Aken Van, B. 2015. Gene expression changes in plants and microorganisms exposed to nanoparticles. *Curr. Opin. Biotech.*, 33, 206–219.
- Akhtar, N.F., Aharizad, S., Mohammadi, S.A., Motallebi-Azar, A., Movafeghi, A. and Banan Khojasteh, S.M. 2013. *In vitro* shoot regeneration and hypericin production in four *Hypericum perforatum* L. genotypes. *IJARR.*, 3(4): 887-893.
- Altan, A., Damlar, İ., Aras, M.H., Alpaslan, C. 2015. Sarı Kantaronun (*Hypericum perforatum*) yara iyileşmesi üzerine etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 24(4):578-591.
- Ayan, A. K., & Çirak, C. 2008. Hypericin and Pseudohypericin Contents in Some *Hypericum* Species Growing in Turkey. *Pharmaceutical biology*, 46(4), 288-291.
- Anderson, W. B. 1972. Zinc in soils and plant nutrition. *ADV Agron.*, 24: 147–186.
- Antisari, LV., Carbone, S., Gatti, A., Vianello, G., Nannipieri, P. 2015. Uptake and translocation of metals and nutrients in tomato grown in soil polluted with metal oxide (CeO₂, Fe₃O₄, SnO₂, TiO₂) or metallic (Ag, Co, Ni) engineered nanoparticles. *Environ Sci Pollut Res*, 22:1841–1853.
- Asan, H.S. 2013. *Hypericum retusum* Auher'in kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde hiperisin türevlerinin üretilmesi. Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır 45.
- Aslan, S. 2014. *Hypericaceae* L. (Editor) Akkemik, U. Türkiye'nin Doğal-Egzotik Ağac ve Calıları II. Orman Genel Müdürlüğü Yayınları, s: 2-15, Ankara.
- Asli, S., Neumann, PM. 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant Cell Environ.*, 32:577–584.
- Ayan, A.K., Çirak, C., Kevseroğlu, K., Sökmen A. 2005. Effects of explant types and different concentrations of sucrose and phytohormones on plant regeneration and hypericin content in *Hypericum perforatum* L. *Turk J Agric For.*, 29 (2005) 197-204.
- Aydın, E. 2018. Türkiye Büyük Millet Meclisi Basın Açıklamaları. https://meclishaber.tbmm.gov.tr/develop/owa/haber_portal.aciklama?p1=145579, Erişim:23.12.2018.
- Ayhan, D. 2018. Antidepresan Kullanımı. <https://www.sozcu.com.tr/2018/saglik/antidepresan-kullanimi-4-yilda-iki-katina-cikti-2639076/>, Erişim: 22.12.2018-01:00Bâcilâ, I., Coste, A., Halmagyi, A., Deliu, C. 2010. Micropropagation of *Hypericum maculatum* Cranz an important medicinal plant. *Rom Biotechnol Lett.*, 15:86–91.
- Bandyopadhyay, S., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. 2013. Advanced analytical techniques for the measurement of nanomaterials in food and agricultural samples: A review. *Environ. Eng. Sci.*, 3030, 118-125.
- Baytop, A. 1991. Farmasötik Botanik Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Basımevi ve Film Merkezi, 219, İstanbul.
- Baytop, T. 1974. Farmakognazi ders kitabı. İst. Üniv. Yay., 256, İstanbul.

- Baytop, T. 1984. Türkiye’de bitkiler ile tedavi: Geçmişte ve bugün. İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3255 – Eczacılık Fakültesi No: 40, 520, İstanbul.
- Bergmann, R., Nussner, H., Demling, J. 1993. Behandlung leichter bis mittelschwerer depressionen. **Therapiewoche Neurol. Psychiatr.**, 7, 235–240.
- Beyazyürek, M. 2018. Antidepresan kullanımı. <https://www.haberturk.com/antidepresan-kullanimi-yuzde-27-artti-2192785>, |Erişim: 22.12.2018.
- Bhat, P., and Bhat, A. 2016. Silver nanoparticles for the enhancement of accumulation of capsaicin in suspension culture of *Capsicum* sp. **J. Exp. Sci.**, 7(2): 1–6.
- Bladt, S., Wagner, H., 1994. Inhibition of MAO by fractions and Constituents of *Hypericum* Extract, **J. Geriatr Psychiatry Neurol**, 7 Suppl 1S, 57-59.
- Bol’shakova, I.V., Lozovskaya, E.L., Sapezhinskii. 1997. Antioxidant Properties of A series of Extracts from Medicinal Plants. **Biofizika**, 42(2):480–3.
- Bombardelli, E., Morazzoni, P. 1995. *Hypericum perforatum*. **Fitoterapia**, 66, 43-68.
- Bonnier, G. 1912-1934. Flore Complete Illustree en Couleurs de France Suisse et Belgique. Vol I-XII, Neuchatel, Paris, Bruxelles.
- Boonyanitipong, P., Kositsup, B., Kumar, P., Baruah, S., Dutta, J. 2011. Toxicity of ZnO and TiO₂ nanoparticles on germinating rice seed *Oryza sativa* L. **Int. J. Biosci. Biochem. Bioinform.**, 1, 282.
- Brasili, E., Tocci, N., Valletta, A., Pasqua, G., Miccheli, A., Marini, F., Pratico, G., Sciubba, F., Di, C.M.E., Cechinel, V.F. 2016. Metabolic profile and root development of *Hypericum perforatum* L. *in vitro* roots under stress conditions due to chitosan treatment and culture time. **Front. Plant Sci.**, 7, 507.
- Briskin, DP., Gawienowski, MC. 2001. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. **Plant Physiol Biochem**, 39: 1075–1081.
- Brown, PH., Cakmak, I., Zhang, Q. 1993. Form and function of zinc in plants. Chap. 7. In: Bobson AD (ed) Zinc in soils and plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 90–106.
- Bruni, R., Sacchetti, G. 2009. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John’s Wort (*Hypericum perforatum* L. *Hypericaceae*/Guttiferae). **Molecules**, 14: 682–725.
- Burklew, C.E., Ashlock, J., Winfrey, W.B. and Zhang, B.H. 2012. Effects of aluminum oxide nanoparticles on the growth, development, and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). **PLoS ONE**, 7, -34783.
- Bystrov, N.S., Chernov, B.K., Dobrynin, V.N., Kolosov, M.N. 1975. The structure of hyperforin, Tetrahedron Letters 32, 2791–2794. 110 M.A. Medina et al., **Life Sci.**, 79 (2006) 105–111.
- Çakmak, I. 2000. Role of zinc in protecting plant cells from reactive oxygen species. **New Phytol.**, 146:185–205.
- Camas, N., Radusiene, J., Ivanauskas, L., Jakstas, V., Kayıkcı, S., Çırak C. 2014. Chemical composition of *Hypericum* species from the Taeniocarpium and Drosanthe sections. **Plant Syst Evol.**, 300: 953–960.
- Camp, A.F., Fudge, B.R. 1945. Zinc as a nutrient in plant growth. **Soil Science**, 60: 157–164.
- Canas, J.E., Long, M., Nations, S., Vadan, R., Dai, L., Luo, M.X., Ambikapathi, R., Lee, E.H., Olszyk, D. 2008. Effects of functionalized and nonfunctionalized single walled carbon nanotubes on root elongation of select crop species. **Environ. Toxicol. Chem.**, 27, 1922-1931.
- Castiglione, M.R., Giorgetti, L., Geri, C., Cremonini, R. 2011. The effects of nano-TiO₂ on seed germination, development and mitosis of root tip cells of *Vicia narbonensis* L. and *Zea mays* L. **J. Nanopart. Res.**, 13, 2443-2449.
- Čellárová, E., Kimáková, K., Halušková, J., Daxnerová, Z. 1994. The variability of hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum*. **Acta Biotechnol.**, 14:267–274.
- Cellarova, E., Kımakova, K. 1999. Morphoregulatory effect of plant growth regulators on *Hypericum perforatum* L. seedlings. **Acta Biotechnol.**, 19, 2. 163-169.

- Chamani, E., Ghalehtaki, S.K., Mohebodini, M., Ghanbari, A. 2015. The effect of zinc oxide nano particles and Humic acid on morphological characters and secondary metabolite production in *Lilium ledebourii* Bioss. **IJGPB.**, vol.4, no.2.
- Chapman, H.D. 1966. Zinc. In: Diagnostic Criteria for Plant and Soils. University of California, Div. Agricultural Science, 793,Riverside, CA:
- Chichiriccò, G., Poma, A. 2015. Penetration and toxicity of nanomaterials in higher plants. **Nanomaterials**, 5, 851–873.
- Cifuentes, Z., Custardoy, L., de la Fuente, J.M., Marquina, C., Ibarra, M.R., Rubiales, D., Pérez-de-Luque, A. 2010. Absorption and translocation to the aerial part of magnetic carbon–coated nanoparticles through the root of different crop plants. **J. Nanobiotechnol.**, 8, 26.
- Colasanti, A., Kisslinger, A., Liuzzi, R. 2000. Hypericin photosensitization of tumor and metastatic cell lines of human prostate. **J Photochem Photobiol B**, 54(2-3):103-7.
- Council of Europe. 2000. Natural sources of Flavourings. Council of Europe. Report, Strasbourg,1-299.
- Crockett, S.L. and Robson, N.K.B. 2011. Taxonomy and Chemotaxonomy of the Genus *Hypericum*. **Med Aromat Plant Sci Biotechnol.**, 5 (Special Issue 1), 1-13.
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1262, US.
- Cui, XH., Chakrabarty, D., Lee, EJ., Paek, KY. 2010a. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. **Bioresour Technol**, 101:4708–4716.
- Cui, XH., Murthy, HN., Jin, YX., Yim, YH., Kim, JY., Paek, KY. 2011. Production of adventitious root biomass and secondary metabolites of *Hypericum perforatum* L. in a balloon type airlift bioreactor. **Bioresour Technol**, 102:10072–10079
- Cui XH, Murthy HN, Paek, KY. 2014a. Pilot-scale culture of *Hypericum perforatum* L. Adventitious root in airlift bioreactors for the production of bioactive compounds. **Appl Bichem Biotechnol**. doi:10.1007/s12010-014-1123-8.
- Cui, XH., Murthy, HN., Wu, CH., Paek, KY. 2010b. Adventitious root suspension cultures of *Hypericum perforatum*: effect of nitrogen source on production of biomass and secondary metabolites. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, 46:437–444.
- Cui, XH., Murthy, HN., Wu, CH., Paek, KY. 2010c. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell Tiss Organ Cult**, 103:7–14.
- Culpeper, N. 1652. The english physician or an astrologo-physical disclosure on the vulgar herbs of this Nation. Nathaniel Brook, 320, London, England.
- Çakır, A., Duru, M.E., Harmandar, M., Ciriminna, R., Passannanti, S., Piozzi, F. 1997. Comparision of volatile oils of *Hypericum scabrum* L. and *Hypericum perforatum* L. from Turkey. **Flavour Fragr. J.**, 12, 285-287.
- Çırak, C., Ayan, A., Kevseroğlu, K. 2004. The effects of light and some presoaking treatments on germination rate of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) seeds. **PJBS.**, 7:182-186.
- Çırak, C., Sağlam, B., Ayan, AK., Kevseroğlu, K. 2005. Karadeniz Bölgesi yabani kantaron (*H. perforatum*) populasyonlarında uçucu yağ varyasyonu üzerine bir araştırma. Türkiye VI. Tarla Bitkileri Kongresi, Antalya, Cilt:1, 211-215, 5-9.
- Çırak, C. 2006. Farklı doku kültürü uygulamalarının iki kantaron türünde (*Hypericum perforatum* ve *H. bupleuroides*) mikroçoğaltım yeteneği ve hiperisin ile toplam fenolik birikimi üzerine etkileri. Doktora Tezi, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, SAMSUN, 1-92.
- Çırak, C., Kurt, D. 2014. Önemli Tıbbi Bitkiler Olarak *Hypericum* Türleri. **Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi**, 24 (1), 38-52.

- Çırak C, Radusiene J, Jakstas V, Ivanauskas L, Yayla F, Seyis F, et al. 2016. Secondary metabolites of *Hypericum* species from the Drosanthe and Olympia sections. *South African J Bot.*, 104: 82–90.
- Çubuklu, B., Meriçli, A.H, Mar, A., Sarıyar, G., Sütülpınar, N., Meriçli, F. 2002. Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Yayınları, 2007, İstanbul.
- Davis, P.H. 1967. Flora Of Turkey And The East Aegean Islands. v.2. Edinburgh University Pres, p.400, Edinburgh.
- Davis, P.H. 1988. Flora Of Turkey and The East Aegean Islands. Edinburg University Pres, 96-103, Edinburgh.
- De Backer-Royer, C., Vannereau, A., Duret, S., Villavignes, R. & Cosson, L. 1990. Action de metaux lourds Cu et Cd sur des cellules de *Catharanthus roseus* cultivées *in vitro*: adaptation et production alcaloïdique. **Col. Inst. Nat. Res. Alim.** 51: 247–251.
- Degar, S., Prince, AM., Pascual, D., Lavie, G., Levin, B., Mazur, Y., Lavie, D., Ehrlich, LS., Carter, C., Meruelo, D. 1992. Inactivation of the human immunodeficiency virus by hypericin: evidence for photochemical alterations of p24 and a block in uncoating. **AIDS Res Hum Retrovir.**, 8:1929–1936.
- Delfani, M., Firouzabadi, M.B., Farrokhi, N. and Makarian, H. 2014. Some physiological responses of black-eyed pea to iron and magnesium nanofertilizers. **Commun Soil Sci Plan.**, 45, 530-540.
- Dell'Aica, I., Caniato, R., Biggin, S., & Garbisa, S. 2007. Matrix proteases, green tea, and St. John's wort: biomedical research catches up with folk medicine. *Clinica Chimica Acta*; **Clin Chim Acta.**, 381(1), 69–77.
- Della Penna, D. 2001. Plant metabolic engineering. **Plant Physiol.**, 125: 160-163.
- Deltito, J., Bayer, D., 1998. The scientific, quasi-scientific and populer literature on the use of St. John's wort in the treatment of depression. **J. Affect. Disort.**, 51:345-351.
- TDK 2018. Depresyon nedir?. www.tdk.gov.tr/index.php?option=com_bts&view=bts&kategori=veritbn&kelimesec=89237 Erişim: 23.12.2018.
- Derun, E, M., Eslek, Z., Piskin, S., 2013. Extraction and Analysis of *Hypericum perforatum* L. from Turkey. **International Journal of Chemical, Molecular, Nuclear, Materials and Metallurgical Engineering**, 7: 72-79.
- Desai, C.V., Desai, H.B., Suthar, K.P., Singh, D., Patel, R.M., Taslim, A. 2015. Phytotoxicity of zinc-nanoparticles and its influence on stevioside production in *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Appl. Biol. Res.** 17, 1-7.
- Dhillon, S.S., Svarstad, H., Amundsen, C., Bugge, H. C. 2002. Bioprospecting: effects on development and environment. **AMBIO**, 31: 491–493.
- Dietz, KJ., Herth, S. 2011. Plant nanotoxicology. **Trends Plant Sci.**;16(11):582-9.
- Dimkpa, CO., McLean, JE., Latta, DE., Manangón, E., Britt, DW., Johnson, WP., Boyanov, MI., Anderson, AJ. 2012. Cu and ZnO nanoparticles: phytotoxicity, metal speciation, and induction of oxidative stress in sand-grown wheat. **J Nanopart Res.**, 14:1–15.
- Doshi, R., Braidia, W., Christodoulatos, C., Wazne, M., O'Connor, G. 2008. Nanoaluminium: transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities. **Environ. Res.**, 106, 296–303.
- Du, W., Tan, W., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., Ji, R., Yin, Y., et al. (2017). Interaction of metal oxide nanoparticles with higher terrestrial plants: Physiological and biochemical aspects. **Plant Physiol. Biochem.**, 110, 210–225.
- Duke, J.A. 1985. Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press, pp. 242–243, Boca Raton, FL.
- Eggenberger, K., Birtalan, E., Schröder, T., Bräse, S., Nick, P. 2009. Passage of Trojan peptoids into plant cells. **ChemBioChem.**, 10(15):2504-12 .

- EMA (European Medicines Agency) 2009. Community Herbal Monograph on *Hypericum perforatum* L. Herba (Well-established Medicinal Use). EMA/HMPC/101304/2008. European Medicines Agency, London
- Encarnação, S., de Mello-Sampayo, C., Graça, N.A., Catarino, L., da Silva, I.B.M., Lima, B.S., Silva, O.M.D., 2016. Total phenolic content, antioxidant activity and pre-clinical safety evaluation of an *Anacardium occidentale* stem bark Portuguese hypoglycemic traditional herbal preparation. **Ind Crops Prod.**, 82: 171-178.
- Eroğlu, Ö.E., Demirci, B., Ünsal, G.Ç., Kültür, Ş., Mat, A., Başer, K.H.C.2013. Composition of Essential Oils from Five Endemic *Hypericum* Species of Turkey. **Organic Chemistry Curr Res.**, 2:1.
- Erol, G. 2017. *Hypericum* (Kantaron) türlerinden elde edilen uçucu yağların herbisidal etkilerinin belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, s. 23.
- Fageria, N. K., Baligar, V. C., and Clark, R. B. 2002. Micronutrients in crop production. **Adv. Agron.**, 77: 189–272.
- Fakruddin, MD., Hossain, Z., Afroz, H. 2012. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. **J Nanobiotechnology**, 10:1–8.
- Fazal, H., Abbasi, B. H., Ahmad, N., and Ali, M. 2016. Elicitation of medicinally important antioxidant secondary metabolites with silver and gold nanoparticles in callus cultures of *Prunella vulgaris* L. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 180, 1076–1092.
- Feizi, H., Amirmoradi, S., Abdollahi, F., Pour, S.J. 2013. Comparative effects of nanosized and bulk titanium dioxide concentrations on medicinal plant *Salvia officinalis* L. **Annu. Rev. Res. Biol.**, 3, 814–824.
- Feizi, H., Moghaddam, P.R., Shahtahmassebi, N., Fotovat, A. 2012. Impact of bulk and nanosized titanium dioxide (TiO₂) on wheat seed germination and seedling growth. **Biol. Trace Elem. Res.**, 146, 101-106.
- Fernandez, V., Eichert, T. 2009. Uptake of hydrophilic solutes through plant leaves: current state of knowledge and perspectives of foliar fertilization. **Crit Rev Plant Sci.**, 28:36-68.
- Ferraz, A., Faria, D.H., Benneti, M.N., Da Rocha, A.B., Schwartzmann, G., Henriques, A. and Von Poser, G.L. 2005. Screening For Antiproliferative Activity of Six Southern Brazilian Species of *Hypericum*. **Phytomedicine.**, 12; 112-115.
- Fiébach B. L., Knörle R., Apel K., Kammler T., Weiss G. 2011. Pharmacological studies in an herbal drug combination of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) and passion flower (*Passiflora incarnata*): *in vitro* and *in vivo* evidence of synergy between *Hypericum* and *Passiflora* in antidepressant pharmacological models. **Fitoterapia**, 82: 474–480.
- Fields, PG., Arnason, JT., Fulcher, RG. 1990. The spectral properties of *Hypericum perforatum* leaves: the implications for its photoactivated defences. **Can J Bot.**, 68: 1166–1170.
- Findling, RL., McNamara, NK., O'Riordan, MA., Reed, MD., Demeter, CA., Branicky, LA., Blumer, JL. 2003. An open-label pilot study of St. John's wort in juvenile depression. **J Am Acad Child Adolesc Psychiatry**, 42:908-914.
- Fleischer, A., O'Neill, M.A., Ehwald, R. 1999. The pore size of non-graminaceous plant cell walls is rapidly decreased by borate ester cross-linking of the pectic polysaccharide rhamnogalacturonan II. **Plant Physiol.**, 121, 829–838.
- Fornasiero, RB., Bianchi, A., Pinetti, A. 1998. Anatomical and ultrastructural observations in *Hypericum perforatum* L. leaves. **J Herbs Spices Med Plants**, 5: 21–33.
- Franklin, G., Dias, ACP. 2006. Organogenesis and embryogenesis in several *Hypericum perforatum* genotypes. **In Vitro Cell Dev Biol Plant**, 42:324–330.
- Franklin, N.M., Rogers, N.J., Apte, S.C., Batley, G.E., Gadd, G.E., Casey, P.S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl₂ to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The importance of particle solubility. **Environ. Sci. Technol.**, 41, 8484-8490.

- Frazier, T.P., Burklew, C.E., Zhang, B. 2014. Titanium dioxide nanoparticles affect the growth and microRNA expression of tobacco (*Nicotiana tabacum*). **Funct. Integr. Genom.**, 14, 75-83.
- Gadzovska, S., Maury, S., Ounnar, S., Righenza, M., Kascakova, S., Refregiers, M., Spasenoski, M., Joseph, C., Hagege, D. 2005. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. *in vitro* cultures. **Plant Physiol Biochem**, 43:591-601.
- Galeotti, N., 2017. *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: a therapeutic perspective for pain conditions. **J. Ethnopharmacol.**, 200, 136-146.
- Gao F, Liu C, Qu C, Zheng L, Yang F, Su M, Hong F. 2008. Was improvement of spinach growth by nano-TiO₂ treatment related to the changes of Rubisco activase. **Biometals**, 21, 211-217.
- GAP 2001. Gap Yöresindeki Endemik ve Tıbbi Bitkiler. Türkiye Çevre Vakfı, ISBN 975-7250-55-4, TÇV Yayın:143, (2001).
- Gärber, U. & Schenk, R. 2004. Johanniskrautwelke, Colletotrichum cf. gloeosporioides – Ergebnisse mehrjähriger Forschungsarbeiten im Überblick. **Drogenreport**, 16: 23-28.
- Garcia-Gomez, C., Babin, M., Obrador, A., Alvarez, J., Fernandez, M., 2015. Integrating ecotoxicity and chemical approaches to compare the effects of ZnO nanoparticles, ZnO bulk, and ZnCl₂ on plants and microorganisms in a natural soil. **Environ. Sci. Pollut. R.**, 22, 16803-16813.
- Gaudin, M., Simonnet, X., Debrunner, N. 2003. Colletotrichum gloeosporioides as cause of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) dieback in Switzerland and breeding for tolerant variety. In: E. Ernst[ed]. *Hypericum—The genus Hypericum*. Taylor and Francis, Pp 23-42, London, New York.
- Genady, E. A., Qaid, E. A. and Fahmy, A. H. 2016. Copper sulfate nanoparticules *in vitro* applications on *Verbena bipinnatifida* Nutt. stimulating growth and total phenolic content increasments. **Int. J. Pharm. Res and Allied Sci.**, 5(1): 196-202.
- Gerard, J. 1597. The Herball or General History of Plantes. Imprinted by John Norton, p. 1678, London.
- Ghafariyan, M.H., Malakouti, M.J., Dadpour, M.R., Stroeve, P., Mahmoudi, M. 2013. Effects of magnetite nanoparticles on soybean chlorophyll. **Environ. Sci. Technol.**, 47, 10645-10652.
- Ghanati, F. and Bakhtiarian, S. 2014. Effect of Methyl Jasmonate and Silver Nanoparticles on Production of Secondary Metabolites by *Calendula officinalis* L (Asteraceae). **Trop J Pharm Res.**, 13 (11): 1783-1789.
- Ghasemi, B., Hosseini, R., Dehghan nayeri, F. 2015. Effects of cobalt nanoparticles on artemisinin production and gene expression in *Artemisia annua*. **Turk J Bot.**, 39: 769-777.
- Ghorbanpour, M., Hadian, J. 2015. Multi-walled carbon nanotubes stimulate callus induction, secondary metabolites biosynthesis and antioxidant capacity in medicinal plant *Satureja khuzestanica* grown *in vitro*. **Carbon**, 94, 749-759.
- Gleason, H.A., Cronquist, A. 1991. Manual of Vascular Plants of Northeastern United States and Adjacent Canada. 2nd ed. Bronx, NY: The New York Botanical Garden, p. 910, England.
- Gojon, A., Nacry, P., Davidian, J.C. 2009. Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, 12, 328-338.
- Greene, T. 1824. The Universal Herbal. Caxton Press, p. 1602, London.
- Grünwald, J. 1999. The World Market for Hypericum Products. **Nutraceuticals World**, May/June p. 22-25.
- Gunther, R.T. 1968. The Greek Herbal of Dioscorides. Hafner Publishing Company, p. 702, UK.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. & Başer, K.H.C. 2000. Flora of Turkey and The East Aegean Island (Supplement 2). Edinburg University Pres.
- Mohammed Al-oubaidi, H.K. and Mohammed-Ameen, A.S. 2013. The effect of (AgNO₃) NPs on increasing of secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. *in vitro*. **Int. J. Pharm. Ther.**, 5 (4), 267-272.

- Mohammed Al-oubaidi, H. K. and Kasid, N. M. 2015. Increasing phenolic and flavonoids compounds of *Cicer arietinum* L. from embryo explant using titanium dioxide nanoparticle *in vitro*, **World J. Pharm. Res.**, 4, 1791–1799.
- Hänsgen, K.D., Vesper, J. 1996. Antidepressive wirksamkeit eines hochdosierten *Hypericum* -extraktes. **Münch. Med. Wochenschrift**, 138, 29–33.
- Harder ve ark. 1965. Strasburger's Textbook of Botany, 28. Ed., English Edition, Longmans, Green and Co. Ltd, London.
- Harmens, H., Paul, R., Hartog, D., Bookum, W.M.T. and Verkleij, J.A.C. 1993. Increased zinc tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke is not due to increased production of phytochelatin. **Plant Physiol.**, 103: 1305-1309.
- Harrer, G., Hubner, W.D., Podzuweit, H. 1994. Effectiveness and tolerance of the *Hypericum* extract LI 160 compared to maprotiline: a multicenter double-blind study. **J. Geriatr. Psychiatry Neurol.**, 7 (Suppl 1), s24–s28.
- Herakman, T. 1996. *Hypericum perforatum* fraksiyonlarının hepatoprotektif etkilerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst., Eskişehir, s. 1-10.
- Hill, J. 1808. The Family Herbal. C. Brightly & T. Kinnersley, p. 538, Bungay.
- Hoareau, L. and DaSilva, E.J. 1999. Medicinal plants: A re-emerging health aid. **Electron. J. Biotechnol.**, Vol.2 No.2.
- Hobbs, A., 1990. St. John's wort-ancient herbal protector. **Pharm. Hist.**, 32, 166–169.
- Holden, C. 1991. Treating AIDS with worts. **Science**, 254:522.
- Holz, J., Petersen, M. 2003. Chemical constituents of *Hypericum* ssp. In: Ernst E (ed.) *Hypericum*, The Genus *Hypericum*. **Taylor & Francis Group**, pp. 77–93, New York, USA.
- Hong, F. S, F. Yang, Z. N. Ma, J. Zhou, C. Liu, C. Wu, and P. Yang. 2005. Influences of nano-TiO₂ on the chloroplast ageing of spinach under light. **Biol Trace Elem Res.**, 104: 249–260.
- Hostanska, K., Reichling, J., Bommer, S., Weber, M., Saller, R. 2003. Hyperforin a constituent of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, 56 (1), 121–132.
- Huang, Y.C., Fan, R., Grusak, M.A., Sherrier, J.D., Huang, C.P. 2014. Effects of nano-ZnO on the agronomically relevant Rhizobium-legume symbiosis. **Sci. Total Environ.**, 497, 78-90.
- Hubner, W.D., Lande, S., Podzuweit, H. 1994. *Hypericum* Treatment of Mild Depression with Somatic Symptoms. **J. Geriatr Psychiatry Neurol**, 7 Suppl 1S. 12-14.
- Hussain, M., Raja, N.I., Mashwani, Z.R., Iqbal, M., Sabir, S., Yasmeen, F. 2017. *In vitro* seed germination and biochemical profiling of *Artemisia absinthium* exposed to various metallic nanoparticles. **3 Biotech**, 7(2):101–108.
- Hutchinson, J. 1959. The Families of the Flowering Plants. Oxford University Press, p. 274, Oxford, England.
- Hypericum Depression Trial Study (HDTs) Group 2002. Effect of *Hypericum perforatum* (St John's wort) in major depressive disorder: a randomized controlled trial. **JAMA**, 287, 1807–1814.
- Hypericum perforatum* Monograph. 2004. **Altern Med Rev.**, Volume 9, Number 3.
- Iannone, M.F., Groppa, M.D., Elisa de Sousa, M., Fernández van Raap, M.B., Benavides, M.P. 2016. Impact of magnetite iron oxide nanoparticles on wheat (*Triticum aestivum* L.) development: Evaluation of oxidative damage. **Environ Exper Bot.**, 131 (2016) 77–88.
- Istikoglou, C., Mavreas, V., Geroulanos, G. 2010. History and therapeutic properties of *Hypericum perforatum* from antiquity until today. **Psychiatriki**, 21: 332-8.

- Jaberzadeh, A., Moaveni, P., Moghadam, H. R. T., and Zahedi, H. 2013. Influence of bulk and nanoparticles titanium foliar application on some agronomic traits, seed gluten and starch contents of wheat subjected to water deficit stress. **Not. Bot. Horti Agrobot.**, 41, 201–207.
- Jamshidi, M., Ghanati, F., Rezaei, A., Bemani, E. 2016. Change of antioxidant enzymes activity of hazel (*Corylus avellana* L.) cells by AgNPs. **Cytotechnology**, 68(3):525–530.
- Javed, R., Usman, M., Yucesan, B., Zia, M. and Gürel, E. 2017. Effect of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on physiology and steviol glycosides production in micropropagated shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Plant Physiol Biochem.**, Vol. 110, January 2017, Pages 94-99.
- Jeyasubramanian, K., Thoppey, U.U.G., Hikku, G.S., Selvakumar, N., Subramania, A., Krishnamoorthy, K. 2016. Enhancement in growth rate and productivity of spinach grown in hydroponics with iron oxide nanoparticles. **RSC Adv.**, 6, 15451-15459.
- Jhonson, D., Ksciuk, H., Woelk, H., Sauerwein-Giese, E. 1994. Frauendor Ç. A., Effects of Hypericum Extract L 160 Compared with Maprotiline on Resting EEG and Evoked Potentials in 24 Volunteers, **J. Geriatr Psyciatry Neurol**, 7 Suppl 1S. 44-46.
- Jiang, W., Mashayekhi, H., Xing, B.S. 2009. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. **Environ. Pollut.**, 157, 1619-1625.
- Jiménez-Aparicio, A., Gutiérrez-López, G. 1999. Production of food related colorants by culture of plant cells. **Adv Exp Med Biol.**, 464: 195–210.
- Jo, Y.K., Kim, B.H., and Jung, G. 2009. Antifungal activity of silver ions and nanoparticles on phytopathogenic fungi. **Plant Dis.**, 93:1037-1043.
- McCoy, J.-A. and Camper, N.D. 2002. Development of a Micropropagation Protocol for St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). **Hortscience**, 37(6):978–980. 2002.
- Joseph, T., Morrison, M. 2006. Nanotechnology in agriculture and food: a nanoforum report. www.nanoforum.org, Accessed 19 November, 2011.
- Juhel, G., Batisse, E., Hugues, Q., Daly, D., Van Pelt, F.N., O'Halloran, J., Jansen, M.A. 2011. Alumina nanoparticles enhance growth of *Lemna minor*. **Aquat. Toxicol.**, 105 (3), 328-336.
- Kalb, R., Trautmann-Sponsel, R.D., Kieser, M. 2001. Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract WS 5572 versus placebo in mildly to moderately depressed patients. A randomized double blind multicenter clinical trial. **Pharmacopsychiatry**, 34, 96–103.
- Karakas, O., Toker, Z., Tilkat, E., Ozen H.C., Onay, A. 2009. Effects of different concentrations of benzylaminopurine on shoot regeneration and hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra. **Nat. Prod. Res.**, Formerly Natural Product Letters, 23:1459-1465.
- Karakuş, P. 2011. Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde yetişen ve endemik bir tür olan *Hypericum spectabile*'nin *in vitro* mikroçoğaltım yollarının araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, s.73.
- Karppinen, K. 2010. Biosynthesis of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort)- precursors and gene involved. Academic dissertation. PhD Thesis, Faculty of sciences, Department of Biology, University of OULU, Finland, p. 76.
- Karppinen, K., Hohtola, A. 2008. Molecular cloning and tissue-specific expression of two cDNAs encoding polyketide synthases from *Hypericum perforatum*. **J Plant Physiol.**, 165(10):1079-86.
- Kashyap, P.L., Xiang, X., Heiden, P. 2015. Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture. **Int. J. Biol. Macromol.**, 77, 36-51.
- Kasper, S., Anghelescu, I.G., Szegedi, A., Dienel, A., Kieser, M. 2006. Superior efficacy of St John's wort extract WS 5570 compared to placebo in patients with major depression: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center trial. **BMC Med.**, 4, 14.

- Kasper, S., Gastpar, M., Müller, W.E., Volz, H.P., Dienel, A., Kieser, M., Möller, H.J. 2008a. Efficacy of St. John's wort extract WS 5570 in acute treatment of mild depression: a reanalysis of data from controlled clinical trials. **Eur. Arch. Psychiatr. Clin. Neurosci.**, 258, 59–63.
- Kasper, S., Volz, H.P., Möller, H.J., Dienel, A., Kieser, M. 2008b. Continuation and long-term maintenance treatment with *Hypericum* extract WS 5570 after recovery from an acute episode of moderate depression—a double-blind, randomized, placebo controlled long-term trial. **Eur. Neuropsychopharmacol.**, 18: 803-813.
- Keskin, C., Aktepe, N., Yukselten, Y., Sunguroglu, S., Boga, M. 2017. *In vitro* antioxidant, cytotoxic, cholinesterase inhibitory activities and anti-genotoxic effects of *Hypericum retusum* Aucher flowers, fruits and seeds methanol extracts in human mononuclear leukocytes. **Iran J Pharm Res.**, 16(1): 210-220.
- Keşkek, Y. 2016. Kantaron flavonoidlerinin moleküler modelleme ve deneysel çalışmalar ile depresyon tedavisinde kullanılacak yeni mao-a inhibitörlerinin tasarlanması. Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, s.159.
- Khakpur, S., Azar, A.M., Hosseini, B., Salte, S.A., Hasani, A. 2015. Optimization of Micropropagation by Different Concentration of Vitamins and Sucrose in St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). **Plant Breeding and Seed Science.**, 71:67 – 79.
- Kırbay, S. 1999. *Hypericum perforatum* L.'un değişik ekstratlarının antimikrobiyal etkileri. **J. Qafqaz Univ.**, (2):121-136.
- Kim, JS., Kuk, E., Yu, KN. 2007. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine**, 3:95–101.
- Kim, D.H., Gopal, J. and Sivanesan, I. 2017. Nanomaterials in plant tissue culture: the disclosed and undisclosed. **RSC Advances.**, 7, 36492.
- Kim, S., Lee, S., Lee, I. 2012. Alteration of phytotoxicity and oxidant stress potential by metal oxide nanoparticles in *Cucumis sativus*. **Water, Air, Soil Pollut.**, 223, 2799-2806.
- Kim, SW., Kim, KS., Lamsal, K., Kim, YJ., Kim, SB., Jung, M., Sim, SJ., Kim, HS., Chang, SJ., Kim, JK., Lee, YS. 2009. An *in vitro* study of the antifungal effect of silver nanoparticles on oak wilt pathogen *Raffaelea* sp. **J Microbiol Biotechnol.**, 19(8):760-4.
- King, K. 1876. The American Dispensatory, tenth ed. Wilstach, Baldwin & Company, p. 1576, Cincinnati.
- Kirakosyan, A., Hayashi, HY., Inoue, K., Charchoglyan, A., Vardapetyan, H. 2000. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. **Phytochemistry**, 53: 345–348.
- Klaine, S.J., Alvarez, P.J., Batley, G.E., Fernandes, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R. 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environ. Toxicol. Chem.**, 37(8):2029-2063.
- Kosuth, J., Katkovcinova, Z., Olexova, P., Cellarova, E.2007. Expression of the hyp-1 gene in early stages of development of *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell Rep.**, 26:211-7.
- Kołodziejczak-Radzimska, A., Jesionowski, T., 2014. Zinc oxidized from synthesis to application: a review. **Materials** (Basel), 7(4):2833-2881.
- Košuth, J., Katkovčinová, Z., Olexová, P.& Čellárová, E. 2007. Expression of the *hyp-1* gene in early stages of development of *Hypericum perforatum* L. **Plant Cell Rep**, 26: 211–217.
- Kumari, M., Khan, S.S., Pakrashi, S., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2011. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **J. Hazard. Mater.**, 190 (1), 613-621.
- Kumari, M., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. 2009. Genotoxicity of silver nanoparticles in *Allium cepa*. **Sci Total Environ.**, 407(19):5243-6.
- Kurepa, J., Paunesku, T., Vogt, S., Arora, H., Rabatic, B. M., Lu, J., et al. 2010. Uptake and distribution of ultrasmall anatase TiO₂ Alizarin red S nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. **Nano Lett.**, 10, 2296–2302.

- Kwiecień, I., Smolin, J., Beerhues, L., Ekiert, H. 2018. The impact of media composition on production of flavonoids in agitated shoot cultures of the three *Hypericum perforatum* cultivars “Elixir”, “Helos” and “Topas”. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 54:332–340.
- Laakmann, G., Schule, C., Baghai, T., Kieser, M. 1998. St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry*, 31 (Suppl 1), 54–59.
- Lahiani, M.H., Dervishi, E., Chen, J., Nima, Z., Gaume, A., Biris, A.S., Khodakovskaya, M.V. 2013. Impact of carbon nanotube exposure to seeds of valuable crops. *ACS Appl. Mater.*, Interfaces 5, 7965–7973.
- Landa, P., Vankova, R., Andrlova, J., Hodek, J., Marsik, P., Storchova, H., White, J.C., Vanek, T., 2012. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. *J. Hazard. Mater.*, 241,55–62.
- Langerud, BR., Sandvik, M. 1987. Development of containerized *Picea abies* (L.) Karst. seedlings grown with heavy watering on various peat, perlite, and mineral wool mixtures. *New Forests*, 1: 89–99.
- Lavagna, S.M., Secci, D., Chimenti, P., Bonsignore, L., Ottaviani, A., Bizzarri, B., 2001. Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. *Farmaco*, 56, 451–453.
- Lecrubier, Y., Clerc, G., Didi, R., Kieser, M. 2002. Efficacy of St. John's wort extract WS 5570 in major depression: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am. J. Psychiatry*, 159, 1361–1366.
- Lee, C.W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y.C., Braam, J., Alvarez, P.J., 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29 (3), 669–675.
- Lee, C.W., Mahendra, S., Zodrow, K., Li, D., Tsai, Y.C., Braam, J., Alvarez, P.J. 2010. Developmental phytotoxicity of metal oxide nanoparticles to *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 29 (3), 669–675.
- Lee, W.M., An, Y.J., Yoon, H. and Kwbon, H.S. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): Plant agar test for water-insoluble nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27: 1915–1921.
- Lehrl, S., Woelk, H. 1993. Ergebnisse von messungen der kognitiven leistungsfähigkeit bei patienten unter der therapie mit johanniskraut. *Nervenheilkunde*, 12, 281–284.
- Lenard, J., Rabson, A., Vanderoef, R. 1993. Photodynamic inactivation of infectivity of human immunodeficiency virus and other enveloped viruses using hypericin and rose bengal: inhibition of fusion and syncytia formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90:156–162.
- Leung, A.Y., Foster, S. 1996. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs and Cosmetics 2nd ed.. John Wiley and Sons, p. 845, New York.
- Linde, K., Ramirez, G., Mulrow, C.D., Pauls, A., Weidenhammer, W., Melchart, D., 1996. St John's wort for Depression an Overview and Meta-analysis of Randomised Clinical Trials. *BMJ*, 313(7052):253–8.
- Lin, D. and Xing, B. 2008. Root uptake and phytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Environ Sci Technol.*, 42: 5580–5585.
- Lin, D., Xing, B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.*, 150, 243–250.
- Liu, R., Zhang, H., Lal, R. 2016. Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients. *Water Air Soil Pollut.*, 227, 42.
- Lopez-Moreno, ML., de la Rosa, G., Hernandez-Viezcás, JA., Castillo-Michel, H., Botez, CE., Peralta-Videa, JR., Gardea-Torresdey, JL. 2010. Evidence of the differential biotransformation and genotoxicity of ZnO and CeO₂ nanoparticles on soybean (*Glycine max*) plants. *Environ Sci Technol*, 44(19):7315–7320.

- Lust, J., 1974. The Herb Book. Bantam Books. Random House Publishing Group, p. 688, New York.
- Ma, C.X., Chhikara, S., Xing, B.S., Musante, C., White, J.C., Dhankher, O.P. 2013b. Physiological and molecular response of *Arabidopsis thaliana* (L.) to nanoparticle cerium and indium oxide exposure. **ACS Sustain. Chem. Eng.**, 1 (7), 768-778.
- Ma, X., Gurung, A., Deng, Y. 2013a. Phytotoxicity and uptake of nanoscale zerovalent iron (nZVI) by two plant species. **Sci. Total Environ.**, 443, 844-849.
- Maisenbacher, P., Kovar, K.A. 1992. Adhyperforin: a homologue of hyperforin from *Hypericum perforatum*. **Planta Medica**, 58, 291–293.
- Marschner, H. 1993. Zinc uptake from soils. In: Zinc in Soils and Plants, ed. A. D. Robson, pp. 59–79. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Martínez-Fernandez, D., Barroso, D., Komarek, M. 2016. Root water transport of *Helianthus annuus* L. under iron oxide nanoparticle exposure. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, 23, 1732e1741.
- Martínez-Fernandez, D., Vítková, M., Bernal, M.P., Komarek, M. 2015. Effects of nano-maghemite on trace element accumulation and drought response of *Helianthus annuus* L. in a contaminated mine soil. **Water Air Soil Pollut.**, 226, 1-4.
- Marusenko, Y., Shipp, J., Hamilton, G.A., Morgan, J.L.L., Keebaugh, M., Hill, H., Dutta, A., Zhuo, X., Upadhyay, N., Hutchings, J., Herckes, P., Anbar, A.D., Shock, E., Hartnett, H.E. 2013. Bioavailability of nanoparticulate hematite to *Arabidopsis thaliana*. **Environ. Pollut.**, 174, 150-156.
- Masarovičová, E., Králová, K. and Streško, V. 2003. Effect of metal ions on some medicinal plants. **Ecol. Chem. Eng.**, 10: 275-279.
- Matzk, F., Hammer, K. & Schubert, I. 2003. Coevolution of apomixis and genome size within the genus *Hypericum*. **Sex Plant Reprod.**, 16: 51–58.
- Mengel, L. and Kirkby, E.A. 1978. Principles of Plant Nutrition. International Potash Institute, p. 673, Basel, Switzerland.
- Merdan, H., Eray, F., Onal, A. and Kavak, F. 2008. Extraction of total dyestuff from centaury (*Hypericum scabrum* L.) and dyeing of natural fibres under different conditions. **Asian J Chem.**, 20(1): 608–614.
- Meruelo, D. 1993. The potential use of hypericin as inactivator of retroviruses and other viruses in blood products. **Blood**, 82:205A.
- Meyer, E.M., Touchell, D.H., Ranney, T.G. 2009. *In vitro* shoot regeneration and polyploid induction from leaves of *Hypericum* species. **Hortscience**, 44(7):1957–1961.
- Miralles, P., Church, T.L., Harris, A.T., 2012. Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanoparticles in vascular plants. **Environ. Sci. Technol.**, 46 (17), 9224–9239.
- Miwa, K., Tanaka, M., Kamiya, T., Fujiwara, T. 2010. Molecular mechanisms of boron transport in plants: involvement of *Arabidopsis* NIP5;1 and NIP6;1. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 679, 83–96.
- Moerman, D.E. 1998. Native American Ethnobotany. Timber Press, p.927, Portland, OR.
- Mohammed, N.R. 2016. *In vitro* regeneration of *Hypericum perforatum* L. (St. John's Wort) and investigation of its secondary metabolites. Yüksek lisans tezi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Van. 11
- 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 Cell. Dev. Biol.—Plant**, 53:104–111.
- Moore, M., 1979. Medicinal Plants of the Mountain West. Museum of New Mexico, Santa Fe.
- Moretti, M.E., Maxson, A., Hanna, F., Koren, G., 2009. Evaluating the safety of St. John's Wort in human pregnancy. **Reprod Toxicol.**, 28(1): 96-99.
- Muenschler, W.C. 1946. Weeds. p. The Macmillan Co., p. 506, New York.

- Mukherjee, P.K., Verpoorte, R., Suresh, B., 2000. Evaluation of *in vivo* wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: *Hypericaceae*) leaf extract on different wound model in rats. **J Ethnopharmacol.**, 70, 315–321.
- Muldner, H., Zoller, M., 1984. Antidepressive effect of a *Hypericum* extract standardized to an active hypericine complex. Biochemical and clinical studies. **Arzneimittel forschung**, 34, 918–920.
- Muller, WE., Rolli, M., Schafer, C. et al 1997. Effects of *Hypericum* extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. **Pharmacopsychiatry**, 30 Suppl 2:102-7.
- Muller, W.E., Russol, R., 1994. Effects of *Hypericum* Extract on the Expression of Serotonin Receptors. **J. Geriatr Psychiatry Neurol.**, 7 Suppl 1S, 63-64.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol. Plant**, 15: 473-497.
- Murch, S.J., Saxena, P.K. 2006. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.): Challenges and strategies for production of chemically-consistent plants, **Can. J. Plant Science**, 86: 765-771.
- Müller, W.E., 2005. St. John's Wort and Its Active Principles in Depression and anxiety. Birkhäuser Basel, s.188, Germany.
- Myers, OJ. 1964. Megasporogenesis, megagametophyte development and endosperm development in *Hypericum virginicum*. **Am J Bot.**, 51: 664.
- Nair, R., Varghese, S.H., Nair, B.G., Maekawa, T., Yoshida, Y., Kumar, D.S. 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. **Plant Sci.**, 179, 154–163.
- Namlı, S., Akbaş, F., Işıkalın, Ç., Tilkat, E.A. and Başaran, D. 2010. The effect of different plant hormones (PGRs) on multiple shoots of *Hypericum retusum* Aucher. **POJ**, 3(1):12-17.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N. et al. 2008. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environ. Sci. Technol.**, 42, 8959–8964.
- Nel, A., Xia, T., Madler, L. and Li, N. 2006. Toxic potential of materials at the nano-level. **Science**, 311: 622–627.
- Newell, CA., Anderson, LA., Phillipson, JD. 1996. Herbal medicines: a guide for health care professionals. The Pharmaceutical Press, s. 432, London UK.
- Noack, KL. 1939. Über *Hypericum* -Kreuzungen VI – Fortpflanzungsverhältnisse und Bastarde von *Hypericum perforatum* L. **Z Indukt Abstamm Vererbungsl**, 76: 569–601.
- Nürk, N.M. 2011. Phylogenetic analyses in St. John's wort (*Hypericum*) Inferring character evolution and historical biogeography. PhD Thesis, University of Bayreuth, s.20.
- Okpanyi, S.N., Weischer M.L. 1990. Animal Experiments on the Psychotropic Action of a *Hypericum* Extracts. **Arzneimittelforsch.**, 37(1110-13).
- Oloumi, H., Soltaninejad, R. and Baghizadeh, A. 2015. The comparative effects of nano and bulk size particles of CuO and ZnO on glycyrrhizin and phenolic compounds contents in *Glycyrrhiza glabra* L. seedlings. **Indian J. Plant Physiol.**, 20, 157–161.
- Oluk, E.A., Orhan, S., Karakas, O., Cakir, A. and Gonuz, A. 2010. High efficiency indirect shoot regeneration and hypericin content in embryogenic callus of *Hypericum triquetrifolium* Turra. **Afric. J. of Biotechnology**, 9(15): 2229-2233.
- Onelli, E., Rivetta, A., Giorgi, A., Bignami, M., Cocucci, M. & Patrignani, G. 2002. Ultrastructural studies on the developing secretory nodules of *Hypericum perforatum*. **Flora**, 197: 92–102.
- Ovečka, M., Takáč, T. 2014. Managing heavy metal toxicity stress in plants: biological and biotechnological tools. **Biotechnol Adv.**, 32: 73–86.
- Önder, F., Karsavuran, Y., Pehlivan, E., Turanlı, F. 1995. Güneydoğu Anadolu Projesi (GAP) Uygulama Alanında Saptanan *Pentatomoidea* (Heteroptera) Türleriyle İlgili Bir Değerlendirme. GAP Bölgesi Bitki Koruma Sorunları ve Çözüm Önerileri Sempozyumu, Şanlıurfa, 120-130.

- Pal, S., Tak, YK., Song, JM. 2007. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Appl Environ Microbiol.**, 73:1712–1720.
- Pasqua, G., Avato, P., Monacelli, B., Santamaria, AR., Argentieri, MP. 2003. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. **Plant Sci**, 165:977–982.
- Pasqua, G., Santamaria, A.R., Filippini, R. 2008. Somatic embryogenesis and shoot regeneration from leaf derived callus of *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin. Frohlich) Borkh. **Plant Biosyst.**, 142:106 – 110.
- Pavlik, M., Vacek, J., Kledus, B., Kuban, V. 2007. Hypericin and hyperforin production in St. John's wort *in vitro* culture: influence of saccharose, polyethylene glycol, methyl jasmonate and *Agrobacterium tumefaciens*. **J Agric Food Chem**, 55:6147–6153.
- Peralta-Videa, J.R., Zhao, L., Lopez-Moreno, M.L., de la Rosa, G., Hong, J., Gardea-Torresdey, J.L. 2011. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008-2010. **J Hazard Mater.**, v. 186(1); p. 1-15.
- Perovic, S., Muller, W.E. 1995. Pharmacological profile of *Hypericum* Extracts. Effect on Serotonin uptake by postsynaptic receptors. **Arzneimittelforsch.**, 45(11). 1145-1148.
- Philipp, M., Kohnen, R., Hiller, K.O. 1999. *Hypericum* extract versus imipramine or placebo in patients with moderate depression: randomised multicenter study of treatment for eight weeks. **BMJ**, 319, 1534–1538.
- Poborilova, Z., Opatrilova, R., Babula, P. 2013. Toxicity of aluminium oxide nanoparticles demonstrated using a BY-2 plant cell suspension culture model. **Environ. Exp. Bot.**, 91, 1-11.
- Pokhrel, L.R., Dubey, B., 2013. Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles. **Sci. Total Environ.**, 452, 321-332.
- Porzel, A., Farag, M.A., Mülbradt, J., Wessjohann, L.A., 2014. Metabolite profiling and fingerprinting of *Hypericum* species: a comparison of MS and NMR metabolomics. **Metabolomics**, 10, 574–588.
- Pretto, FR., Santarém, ER. 2000. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. **Plant Cell Tis. Org. Cult.**, 62:107-113.
- Puri, S., Handa, G., Kalsotra, A.K., Gupta, V.K., Shawl, A.S., Suri, O.P., Qazi, G.N. 2006. Preparative high-performance liquid chromatographic separation of naphthodianthrones from St. John's wort. **JCS.**, 44(4): 177-180.
- Qu, L., Widrechner, M.P., Rigby, S.M. 2010. Analysis of breeding systems, ploidy, and the role of hexaploids in three *Hypericum perforatum* L. populations. **Ind Crops Prod.**, 32:1-6.
- Raei, M., Angaji, SA., Omid, M. et al. 2014. Effect of abiotic elicitors on tissue culture of *Aloe vera*. **Int J Biosci**, 5:74–81.
- Raliya, R., Nair, R., Chavalmane, S., Wang, W.N., Biswas, P. 2015. Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant. **Metallomics**, 7, 1584-1594.
- Raliya, R., Tarafdar, J.C. 2013. ZnO nanoparticle biosynthesis and its effect on phosphorous-mobilizing enzyme secretion and gum contents in Clusterbean (*Cyamopsis tetragonoloba* L.). **Agric. Res.**, 2, 48-57.
- Rasmussen, P., 1998. St. John's wort – a review of its use in depression. **Aust. J. Med. Herbal.**, 10, 8–13.
- Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, HM., He, X., Mbarki, S. and Brestic, M. 2017. Impact of Metal and Metal Oxide Nanoparticles on Plant: A Critical Review. **Front. Chem.**, 5:78.
- Reichling, J., Weseler, A., Saller, R. 2001. A current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. **Pharmacopsychiatry**, 34 (Suppl. 1), pp. S116-S118
- Remédios, C., Rosário, F., Bastos, V. 2012. Environmental nanoparticles interaction with plants: morphological, physiological and genotoxic aspects. **J Bot.**, 751686:8.

- Reuter, A.Reuter, 1998A., 1998. Phytomedicines of Europe-Chemistry and Biological Activity, American Chemical Society, Lawson, L.D. , Bauer, R. Lawson, L.D., Bauer, R., ed. Washington, D.C. pp. 287–98
- Rico, C.M., Hong, J., Morales, M.I., Zhao, L.J., Barrios, A.C., Zhang, J.Y., Peralta- Vide, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. 2013b. Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and *in vivo* fluorescence imaging. **Environ. Sci. Technol.**, 47 (11), 5635-5642.
- Rico, C.M., Majumdar, S., Duarte-Gardea, M., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J. L. 2011. Interaction of nanoparticles with edible plants and their possible implications in the food chain. **J. Agric. Food Chem.**, 59, 3485–3498.
- Rico, C.M., Morales, M.I., Barrios, A.C., McCreary, R., Hong, J., Lee, W.Y., Nunez, J., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. 2013a. Effect of cerium oxide nanoparticles on the quality of rice (*Oryza sativa* L.) grains. **J. Agric. Food Chem.**, 61 (47), 11278-11285.
- Rico, C.M., Morales, M.I., McCreary, R., Castillo-Michel, H., Barrios, A.C., Hong, J., Alejandro, T., Lee, W.Y., Armando, V.R., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. 2013c. Cerium oxide nanoparticles modify the antioxidative stress enzyme activities and macromolecule composition in rice seedlings. **Environ. Sci. Technol.**, 47 (24), 14110-14118.
- Robson, N.K.B., Adams, P. 1968. Chromosome number in *Hypericum* and related genera. **Brittonia.**, 20:95-106.
- Robson, N.K.B. 1967. *Hypericum* L. In: Davis, P.H. (Ed.), Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press, Vol. 2:355, Edinburgh, U.K.
- Robson, N.K.B. 1981. Studies in the genus *Hypericum* L.(Guttiferae) 2. Characters of the genus. Bulletin of the British Museum (Natural History).**Botany Series**, 8, 55-226.
- Roco, M.C. 2003. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Curr. Opin. Biotechnol.**, 14, 337-346.
- Roco, M.C., Harthorn, B., Guston, D., Shapira, P. 2011. Innovative and responsible governance of nanotechnology for societal development. **J. Nanopart. Res.**, 13, 3557-3590.
- Roth, L., 1990. *Hypericum*, Hypericin (Botanik, Inhaltsstoffe, Wirkung). Ecomed Verlagsgesellschaft mbH, Landsberg.
- Saddiqe, Z., Naeem, I., Maimoona, A. 2010. A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. **J Ethnopharmacol.**, 131:511-21.
- Sagratini, G., Ricciutelli, M., Vittori, S., Ozturk, N., Ozturk, Y., Maggi, F. 2008. Phytochemical and antioxidant analysis of eight *Hypericum* taxa from Central Italy. **Fitoterapia**, 72, 210–213.
- Sánchez-Mateo, CC., Bonkanka, CX., Hernández-Pérez, M., Rabanal, RM. 2006. Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil.. **J Ethnopharmacol.**, 107(1):1-6.
- Santarém, E.R. and Astarita, L.V. 2003. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. **Braz. J. Plant Physiol.**, 15(1):43-47.
- Sarrell, E.M., Cohen, H.A., Kahan, E. 2003. Naturopathic treatment for ear pain in children. **Pediatrics**, 111: 574-579.
- Savio, LE., Astarita, LV., Santarem, ER. 2012. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium. **Plant Cell Tiss Organ Cult.**, 108:465–472.
- Schemmp, C.M., Kiss, J., Kirkin, V., Averbek, M., Haarhaus, B.S., Kremer, B., Termeer, C.C., Sleeman, J. and Simon, J.C. 2005. Hyperforin Acts As An Angiogenesis inhibitor *in vitro* and *in vivo*. *Planta Med.*, 71; 999-1004.
- Schempp, C., Müller, K., Winghofer, B., Schöpf, E. & Simon, J. 2002. Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.). Eine Pflanze mit Relevanz für die Dermatologie. **Der Hautarzt**, 53: 316–321.

- Schempp, C.M., Kirkin, V., Simon-Haarhaus, B., Kersten, A., Kiss, J., Termeer, C.C., Gilb, B., Kaufmann, T., Borner, C., Sleeman, J.P., Simon, J.C. 2002, Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. **Oncogene**, 21 (8), 1242–1250.
- Shah, V., Belozeroval, I. 2009. Influence of metal nanoparticles on the soil microbial community and germination of lettuce seeds. **Water Air Soil Pollut.**, 197, 143–148.
- Shakeran, Z. Keyhanfar, M. Asghari, G. Ghanadian, M. 2015. Improvement of atropine production by different biotic and abiotic elicitors in hairy root cultures of *Datura metel*. **Turk. J. Biol.**, 39, 111–118.
- Sharafi, E., Nekoei, S.M.K., Fotokian, M.H., Davoodi, D., Mirzaei, H.H, and 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.). **JMPB.**, 2:177-184.
- Sheykhabaglou, R., Sedghi, M., Shishevan, M.T., Sharifi, R.S. 2010. Effects of nano-iron oxide particles on agronomic traits of soybean. **Not. Sci. Biol.**, 2 (2), 112.
- Shrivastava, M. and Dwivedi, L.K. 2015. Therapeutic Potential of *Hypericum perforatum*: A Review. **Int J Pharm Sci Res.**, 6(12): 1000-07
- Siddiqui, M.H., Al-Whaibi, M.H. 2014. Role of nano-SiO₂ in germination of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seeds. **Saudi J. Biol. Sci.**, 21, 13-17.
- Simic, SG., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C., Hagege, H. 2014. Effects of polysaccharide elicitors on secondary metabolite production and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. **Sci. World J.**, 10 (2014) 609649.
- Sirven, T, Gibson, D. 2002. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. **Physiol Mol Plant Pathol**, 60:311–320.
- Sirvent, TM., Krasnoff, SB., Gibson, DM. 2003. Induction of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* in response to damage by herbivores. **J Chem Ecol.**, 29: 2667–2681.
- Smith, T., Kawa, K., Eckl, V., and Johnson, J. 2016. Sales of Herbal Dietary Supplements in US Increased 7.5% in 2015 Consumers spent \$6.92 billion on herbal supplements in 2015, marking the 12th consecutive year of growth. **HerbalGram**, 111, 67–73.
- Skalkos, D., Stavropoulos, N.E., Tsimaris, I., Gioti, E., Stalikas, C.D., Nseyo, U.O., Ioachim, E. and Agnantis, N.J. 2005. The Lipophilic Extract of *Hypericum perforatum* Exerts Significant Cytotoxic Activity Against T24 and Nbt-1 Urinary Bladder Tumor Cells. **Planta Med.**, 71; 1030-1035.
- Solgar 2012. Solgar Tanıtım broşürü. <https://solgar.com.tr/>, 05.07.2012.
- Solomon, D., Adams, J., Graves, N., 2013. Economic evaluation of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) for the treatment of mild to moderate depression. **J Affect Disord.**, 148: 228-234.
- Sommer, H., Harrer, G., 1994. Placebo-Controlled Double-Blind Study Examining the Effectiveness of an *Hypericum* Preparation in 105 mildly depressed patients. **J. Geriatr Pschiatr Neurol**, 7 Suppl 1S. 9-11.
- Song, G., Gao, Y., Wu, H., Hou, W., Zhang, C., Ma, H., 2012. Physiological effect of anatase TiO₂ nanoparticles on *Lemna minor*. **Environ. Toxicol. Chem.**, 31, 2147–215
- Sood, H., Shitiz, K., Sharma, N., 2015. Rapid method for *In vitro* multiplication of Hypericin rich shoots of *Hypericum perforatum*. **J. Plant. Sci.**, 3, 279–284.
- Stampoulis, D., Sinha, S.K., White, J.C. 2009. Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants, **Environ. Sci. Technol.**, 43 (24), pp 9473–9479.
- Surmuş, H. 2006. *Hypericum scabroides*'in doku kültürü ile yetiştirilmesi ve hiperisin içeriklerinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, s.8.
- Şatana, A., Arslan, B. 2012. Türkiye'de *Hypericum* L. türlerinin yayılışı ve farmakolojik özellikleri. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Tokat, S.33-44.

- Şengüler, K., 2009. Ege Bölgesi'nin Farklı Lokasyonlarına ait *Hypericum perforatum* L. türünde morfolojik, anatomik çalışmalar. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 1-107.
- Prasad, TNVKV., Sudhakar, P., Sreenivasulu, Y., Latha, P., Munaswamy, V., Raja Reddy, K., Sreepasad, T. S., Sajanalal, P.R., and Pradeep, T. 2012. Effect of nanoscale zinc oxide particles on the germination, growth and yield of peanut. *J Plant Nutr.*, 35(6):905–927.
- Tahir, NA., Azeez, HA., Muhammad, KA., Faqe, SA., Omer, DA. 2017. Exploring of bioactive compounds in essential oil acquired from the stem and root derivatives of *Hypericum triquetrifolium* callus cultures. *Natural Product Research*, 33 (10):1-15.
- Talankova-Sereda, TE., Liapina, KV., Shkopinskij, EA., Ustinov, AI., Kovalyova, AV., Dulnev, PG., Kucenko, NI. 2016. The influence of Cu and Co nanoparticles on growth characteristics and biochemical structure of *Mentha longifolia* in vitro. *Nanosci Nanoeng.*, 4:31–39.
- Tang, J., Colacino, J.M., Larsen, S.H., Spitzer, W. 1990. Virucidal activity of hypericin against enveloped and non-enveloped DNA and RNA viruses. *Antiviral research.*, 13, 313-325.
- Tanideh, N., Namazi, F., Tadbir, A.A., Ebrahimi, H., Koohi-Hosseinabadi, O. 2014. Comparative assessment of the therapeutic effects of the topical and systemic forms of *Hypericum perforatum* extract on induced oral mucositis in golden hamsters. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, 43(10): 1286-1292.
- Thiele, B., Brink, I., Ploch, M. 1994. Modulation of cytokine expression by hypericin extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol*, 7 (Suppl. 1):S60-S62.
- Tripathi, D.K., Shweta, Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V.P., et al. (2016). An overview on manufactured nanoparticles in plants: uptake, translocation, accumulation and phytotoxicity. *Plant Physiol. Biochem.*, 110, 2–12.
- Tocci, N., Simonetti, G., D'Auria, FD., Panella, S., Palamara, AT., Valletta, A. and Pasqua, G. 2011. Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 91 (4): 977-987.
- Tournefort, J.P. 1700. Institutiones rei herbariae. Typographia Regia, p.489, Paris, France.
- Trejo-Tapia, G., Jiménez-Aparicio, A., Rodríguez-Monroy, M., De Jesús Sánchez, A., Gutiérrez-López, G. 2001. Influence of cobalt and other microelements on the production of betalains and the growth of suspension cultures of *Beta vulgaris*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 67(1):19-23.
- Trujillo-Reyes, J., Majumdar, S., Botez, C.E., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. 2014. Exposure studies of core-shell Fe/Fe₃O₄ and Cu/CuO NPs to lettuce (*Lactuca sativa*) plants: are they a potential physiological and nutritional hazard. *J. Hazard. Mater.* 267, 255-263.
- Tusevski, O., Petreska Stanoeva, J., Stefova, M., Pavokovic, D., Gadzovska Simic, S., 2014. Identification and quantification of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. transgenic shoots. *Acta Physiol. Plant.*, 36, 2555–2569.
- Tusevski, O., Krstikj, M., Stanoeva, J., Stefova, M., & Simic, S. G. 2018. Phenolic profile and biological activity of *Hypericum perforatum* L.: Can roots be considered as a new source of natural compounds? *South African Journal of Botany*, 117, 301–310.
- Uçur, B. 2012. Bursa ve çevresinde yayılışı olan *Hypericum* L. taksonları üzerinde taksonomik ve korolojik araştırmalar. Yüksek Lisans Tezi, Uludağ Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bursa, s.2.
- Upton, R. 1997. St. John's wort (*Hypericum perforatum*). American Herbal Pharmacopoeia (AHP). In HerbalGram 40. American Herbal Pharmacopoeia: Santa Cruz. 132
- Urdang, G. 1944. Pharmacopoeia londinensis of 1618. State Historical Society of Wisconsin, 299, New York.
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Munoz, M., Dumat, C. 2010. Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *Environ Sci Technol.*, 44(3):1036–1042.

- Varghese, R.J., Sooriamuthu, S., 2013. Differences in hypericin synthesis between experimentally induced seedling shoot cultures of *Hypericum hookerianum* Wight & Arn. **Plant Biotechnol. Rep.**, 7(4): 511-518.
- Velingkar, V.S., Gupta, G.L., Hegde, N.B., 2017. A current update on phytochemistry, pharmacology and herb–drug interactions of *Hypericum perforatum*. **Phytochem Rev.**, 16, 725–744.
- Viehweger, K. 2014. How plants cope with heavy metals. **Bot Stud.**, 55: 1–12.
- Viets, F.G. 1966. Zinc deficiency in the soil-plant system. In: Zn Metabolism, ed. A. S. Prasad, pp. 90–128. Springfield, IL: Thomas.
- Vogel, V. 1970. American Indian Medicine, University of Oklahoma Press, 256, Norman.
- Wada, A., Sakaeda, T., Takara, K., Hirai, M., Kimura, T., Ohmoto, N., Zhou, J., Nakamura, T., Kobayashi, H., Okamura, N., Yagami, T., Okumura, K. 2002. Effects of St John's wort and hypericin on cytotoxicity of anticancer drugs. **Drug Metab Pharmacok.**, 17(5): 467-474.
- Walker, L., Sirvent, T., Gibson, D., Vance, N. 2001. Regional differences in hypericin and pseudohypericin concentrations and five morphological traits among *Hypericum perforatum* Plants in the Northwestern United States. **Can J Bot.**, 79:1248-1255.
- Wang, H., Kou, X., Pei, Z., Xiao, J.Q., Shan, X., Xing, B. 2011a. Physiological effects of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and pumpkin (*Cucurbita mixta*) plants. **Nanotoxicology**, 5, 30-42.
- Wang, P., Menzies, N.W., Lombi, E., McKenna, B.A., Johannessen, B., Glover, C.J., Kappen, P., Kopittke, P.M. 2013. Fate of ZnO nanoparticles in soils and cowpea (*Vigna unguiculata*). **Environ. Sci. Technol.**, 47 (23), 13822-13830.
- Wang, Z., Li, J., Zhao, J., Xing, B. 2011b. Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. **Environ. Sci. Technol.**, 45, 6032-6040.
- Weber, N.D., Murray, B.K., North, J.A., Wood, S.G. 1994. The antiviral agent hypericin has *in vitro* activity against HSV-1 through non-specific association with viral and cellular membranes. **Antivir Chem Chemother.**, 5(2): 83-90.
- Welch, RM., Webb, MJ., Loneragan, JF. 1982. Zinc in membrane function and its role in phosphorus toxicity. In A Scaife, ed, Plant Nutrition, Proceedings of the Ninth International Plant Nutrition Colloquium, Warwick University, England, August 22-27, 1982. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham House, Farnham Royal, UK, pp 710-715
- Westerhoff, K., Kaunzinger, A., Wurglics, M., Dressman, J., Schubert-Zsilavecz, M. 2002. Biorelevant dissolution testing of St John's wort products. **J. Pharm. Pharmacol.**, 54, 1615–1621.
- Wheatley, D. 1997. LI 160, an extract of St. John's wort, versus amitriptyline in mildly to moderately depressed outpatients—a controlled 6-week clinical trial. **Pharmacopsychiatry**, 30 (Suppl 2), 77–80.
- WHO. 2017. Depression and other common mental disorders: Global Health Estimates. World Health Organization, Geneva: Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
- Witte, B., Harrer, G., Kaptan, T., Podzuweit, H., Schmidt, U., 1995. Treatment of depressive symptoms with a high concentration *Hypericum* preparation. A Multicenter Placebo -controlled Double-blind Study. **Fortschritte Her Medizin**, 113 (281) 404-408).
- Woelk, H. 2000. Comparison of St John's wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial. **BMJ**, 321, 536–539.
- Woelk, H., Burkard, G., Grunwald, J. 1994. Benefits and Risks of the *Hypericum* Extract LI160: Drug Monitoring Study with 3250 Patients. **J. Geriatr Psychiatri Neurol**, 7 Supply i, S34-38.
- Wu, SQ., Yu, XK., Lian, ML., Park, SY., Piao, XC. 2014. Several factors affecting hypericin production of *Hypericum perforatum* during adventitious root culture in airlift bioreactors. **Acta Physiol Plant.**, 36:975–981.

- Wu, S.G., Huang, L., Head, J., Chen, D.R., Kong, I.-C., Tang, Y.J. 2012. Phytotoxicity of metal oxide nanoparticles is related to both dissolved metals ions and adsorption of particles on seed surfaces. **J. Pet. Environ. Biotechnol.**, 3 (4), 1000126.
- Yadav, V. 2013. Nanotechnology, big things from a tiny world: A review. **AEEEE.**, 3, 771-778.
- Yamaner, Ö. 2011. *Hypericum adenotrichum* Spach'un doku kültürü teknikleri ile çoğaltılması ve *in vitro* koşullarda sekonder metabolit değişiminin araştırılması. Doktora Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 137s.
- Yang, F., Hong, F.S., You, W.J., Liu, C., Gao, F.Q., Wu, C. and Yang, P. 2006. Influences of nano-anatase TiO₂ on the nitrogen metabolism of growing spinach. **Biol Trace Elem Res.**, 110: 179–190.
- Yang, L., Watts, D.J., 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. **Toxicol Lett.**, 158 (2), 122-132.
- Yılmaz, A., H. Ekiz, I. Gultekin, B. Torun, H. Barut, S. Karanlik, and I. Cakmak. 1998. Effect of seed zinc content on grain yield and zinc concentration of wheat growth in zinc-deficient calcareous soils. **J Plant Nutr.**, 21: 2257–2264.
- Yoon, S.J., Kwak, J.I., Lee, W.M., Holden, P.A., An, Y.J. 2014. Zinc oxide nanoparticles delay soybean development: a standard soil microcosm study. **Ecotoxicol Environ Saf.**, 100: 131-137.
- Yu-Nam, Y., Lead, R. 2008. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. **Sci. Total Environ.**, 400, 396-414.
- Zhang, R., Zhang, H., Tu, C., Hu, X., Li, L., Luo, Y., Christie, P. 2015. Phytotoxicity of ZnO nanoparticles and the released Zn (II) ion to corn (*Zea mays* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.) during germination. **Environ Sci Pollut Res.**, 22:11109–11117.
- Zhang, B., Zheng, L.P., Yi Li, W., Wen Wang, J. 2013. Stimulation of artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots by AgSiO₂ core-shell nanoparticles. **Curr. Nanosci.**, 9: 363–370.
- Zheng, L., Hong, F.S., Lu, S.P., Liu, C. 2005. Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. **Biol. Trace Elem. Res.**, 104 (1), 83-91.
- Zhong, J.J. 2001. Biochemical engineering of the production of plant-specific secondary metabolites by cell suspension cultures. **In: Plant Cells.**, (Chief ed), Vol. 72, Springer -Berlin /Heidelberg, pp. 1-26.
- Zobayed, S.M.A., Afreen, F., Goto, E., Kozai, T. 2006. Plant–environment interactions: accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. **Ann Bot.**, 98: 793–804.
- Zobayed, S.M.A., Murch, S.J., Rupasinge, H.P.V., Saxena, P.K. 2003. Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors. **Plant Cell Tissue Organ Cult.**, 75:143–149.
- Zobayed, S.M.A., Murch, S.J., Rupasinghe, H.P.V., Saxena, P.K. 2004. *In vitro* production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv. 'New Stem'). **Plant Sci.**, 166:333–340.
- Zuverza-Mena, N., Martínez-Fernández, D., Du, W., Hernandez-Viezcás, J.A., Bonilla-Bird, N., López-Moreno, M.L., Komárek, M., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L. 2016. Exposure of engineered nanomaterials to plants: Insights into the physiological and biochemical responses-A review. **Plant Physiol Biochem.**, 110:236-264.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Diyarbakır'da doğdu. İlkokulu Mehmet İçkale İlkokulu'nda, Ortaokulu Huzurevleri Ortaokulunda ve Lise öğrenimini Ziya Gökalp Y.D.A lisesi'nde tamamladı. 2003 yılında Dicle Üniversitesi Siirt Eğitim Fakültesi Fen ve Teknoloji Öğretmenliği Bölümüne kayıt oldu. Fen ve Teknoloji Öğretmenliği Bölümünden 2007 yılında mezun oldu. 2007 yılında Milli Eğitim Bakanlığı bünyesinde öğretmenlik görevine başladı. 2011-2013 yılları arasında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda '*İn vivo* ve *in vitro* şartlarda yetiştirilen *Pistacia lentiscus* L. (Sakız ağacı)'nin yağ asiti ve uçucu yağ içeriklerinin belirlenmesi' konulu yüksek lisans tezini tamamladı. 2013 yılında Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda doktora programına başladı. Ömer Faruk AKDEMİR öğretmenlik görevine Diyarbakır'ın Bağlar ilçesine bağlı Bilim ve Sanat Merkezinde devam etmektedir.





DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

ADI VE SOYADI	Ömer Faruk AKDEMİR
ÖĞRENCİ NO	13801501
EĞİTİM - ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	☐ Güz ☒ Bahar
ANABİLİM DALI	Biyoloji
PROGRAM	Doktora

TEZ KONUSU

BAZI NANOPARTİKÜLLERİN İN VİTRO ORTAMDA YETİŞTİRİLEN
Hypericum perforatum L. ve *Hypericum retusum* Aucher'in HİPERİSİN
BİLEŞİKLERİNİN MİKTARI ÜZERİNE ETKİLERİ

İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ

RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	167
BENZERLİK ORANI	% 10
RAPORLAMA TARİHİ	24/07/2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 167 sayfalık kısmına ilişkin, 24/07/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 10 'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- ☐ Kabul/Onay sayfaları hariç,
☒ Kaynakça hariç
☐ Alıntılar hariç/dâhil
☐ Diğer

Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Ömer Faruk AKDEMİR

29.07/2019

Prof Dr Ahmet ONAY

29.07/2019

Prof Dr Yüksel COŞKUN

...07/2019

Doç. Dr. M. Zehir Din V.

Formdaki bilgiler bilgisayar ortamında doldurulmalıdır. El yazısı ile doldurulan formlar geçersiz sayılmaktadır.

KGK-FRM-340/00