

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AgNP) UYGULAMALARININ
OĞULOTU (*Melissa officinalis* L.) BİTKİSİNDE DOKU
KÜLTÜRÜ VE SEKONDER METABOLİT BİRİKİMİ ÜZERİNE
ETKİLERİ

Goncagül KAPDAN

Danışman
Prof. Dr. Yasemin COŞKUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2023



© 2023 [Goncagül KAPDAN]

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
2.1. Nanoteknolojinin Tanımı ve Uygulama Alanları.....	7
2.2. Bitkisel Sistemlerde Kullanılan Nanopartiküller.....	9
2.3. Bitki Doku Kültürü Tekniklerinde Nanopartiküllerin Kullanımı	12
2.4. <i>Melissa officinalis</i> L. (Oğulotu) Bitkisinin Genel Özellikleri	14
2.5. Bitki Doku Kültüründe Nanopartiküller ile Yapılan Çalışmalar	17
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.2. Yöntem	25
3.2.1. Ortam sterilizasyon koşulları	25
3.2.2. Yaprak eksplantlarının yüzey sterilizasyonu	26
3.2.3. AgNP içeren besin ortamlarının hazırlanması	26
3.2.4. Eksplantların kültür ortamına ekimi ve kallus oluşumundan sonra ölçümlerinin yapılması.....	27
3.2.5. Kalluslarda oluşan sekonder metabolitlerin tayini	29
3.2.6. Veri analizi	31
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	33
4.1. Oğulotu Bitkisinde AgNP Uygulamalarının Kallus Oluşumu, Ağırlığı, Çapı, Yapısı ve Rengi Üzerine Etkileri	33
4.1.1. AgNP uygulamalarının kallus oluşumu üzerine etkisi	35
4.1.2. AgNP uygulamalarının kallus ağırlığı üzerine etkisi	35
4.1.3. AgNP uygulamalarının kallus çapı üzerine etkisi	36
4.1.4. AgNP uygulamalarının kallus yapısı ve rengi üzerine etkisi	37
4.2. AgNP Uygulamalarının Oğulotu Kallus Kültüründe Fenolik Bileşikler Üzerine Etkisi.....	37
4.2.1. AgNP uygulamalarının rosmarinik asit miktarı üzerine etkisi	38
4.2.2. AgNP uygulamalarının kafeik asit miktarı üzerine etkisi.....	39
4.2.3. AgNP uygulamalarının klorojenik asit miktarı üzerine etkisi.....	39
4.2.4. AgNP uygulamalarının protokateşik asit miktarı üzerine etkisi	40
4.2.5. AgNP uygulamalarının hesperidin miktarı üzerine etkisi.....	41
4.2.6. AgNP uygulamalarının p-kumarik asit miktarı üzerine etkisi	42
4.3. AgNP Uygulamalarının Oğulotu Kalluslarında Aromatik Bileşikler Üzerine Etkisi.....	42
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	47
KAYNAKLAR.....	56
ÖZGEÇMİŞ.....	71

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GÜMÜŞ NANOPARTİKÜL (AgNP) UYGULAMALARININ OĞULOTU (*Melissa officinalis* L.) BİTKİSİNDE DOKU KÜLTÜRÜ VE SEKONDER METABOLİT BİRİKİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Goncagül KAPDAN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yasemin COŞKUN

Nanopartiküller (NP), bitki biyoteknolojisinde bilinen biyoelisitörlerdir ve bitkilerin sahip oldukları fiziksel özellikleri iyileştirmek amaçlı kullanılarak bitkiler üzerinde olumlu etkiler göstermektedir. Bitki doku kültürü tekniğinin son yıllarda popüleritesini koruyan nanoteknoloji alanıyla iç içe olup NP'lerin uygulanması, kallus indüksiyonunda, organogenezde, somatik embriyogenezde, somaklonal varyasyonda, genetik transformasyonda, ikincil metabolit üretiminde ve mikrobiyal kontaminantların eksplantlardan başarıyla uzaklaştırılmasına yol açmış ve NP'lerin olumlu rolünü göstermiştir.

Bu çalışmada, tıp, eczacılık, parfümeri, kozmetik ve gıda sanayinde çok sayıda kullanım alanına sahip olan oğulotunun (*Melissa officinalis* L.), çoğaltımı sırasında oluşan sorunların giderilmesi ve tohumlarının çok küçük yapıda olması nedeniyle tarlada düzenli bir ekime imkân vermemesi soruna karşın kallus kültürü yöntemleriyle içerdiği sekonder metabolit miktarlarının artırılması amaçlanmıştır. Denemelerde kalluslar, oğulotu yaprak eksplantlarından farklı miktarlarda (0, 25, 50, 75 ve 100 µg/l) gümüş nanopartikülü (AgNP) ve 2.0 mg/l BAP ve 1.0 mg/l NAA içeren MS besin ortamlarından elde edilmiştir. Kalluslar iki kez aynı ortamda alt kültüre alındıktan sonra kallus oluşum oranları (%), ağırlıkları (g) ve çapları (cm) ölçülüp, ayrıca yapıları ve renkleri tespit edilmiştir. Oğulotuna ait bazı önemli fenolik bileşikler (rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, proto-kateşik asit, hesperidin ve p-kumarik asit) HPLC, neral, geranial gibi aromatik yağlar ise GC-MS cihazları ile tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlara göre, kallus oluşum oranları tüm AgNP uygulamalarında kontrol grubuna göre artış göstermiştir. En yüksek kallus oluşum oranı 50 µg/l (% 97.8) AgNP içeren ortamlarda olmuştur. Kontrol grubuna (0.051 g - 0.8 cm) göre en fazla kallus ağırlığı (0.196 g) ve kallus çapı (1.1 cm) yine 50 µg/l AgNP uygulamasında görülmüştür. Bu uygulamada kallus yapısı sıkı ve rengi ise yeşil olarak tespit edilmiştir. Ayrıca neral ve geranial gibi bazı aromatik bileşiklerin ve diğer önemli fenolik bileşiklerin üretimi üzerine AgNP uygulamalarının olumlu etkilerde bulunduğu, kontrol grubuna kıyasla çoğu AgNP uygulamalarında daha yüksek değerlerin elde edildiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, aromatik bileşiklerden neral ve geranial bileşiklerinin 25 µg/l AgNP uygulamasında önemli

derecede arttığı belirlenmiştir. Kafeik asit, klorojenik asit, proto-kateşik asit, hesperidin ve p-kumarik asit gibi fenolik bileşiklerde de en fazla artış 75 µg/l AgNP uygulamasında görülmüştür. Rosmarinik asit bileşğinde ise en fazla artış 50 µg/l AgNP uygulamasında tespit edilmiştir.

Sunulan bu çalışmamızda, *M. officinalis* L. bitkisi kallus kültüründe uygulanan farklı AgNP konsantrasyonlarının, kallus oluşumu ve oranlarında, fenolik ve aromatik bileşik miktarlarında artışa sebep olduğundan olumlu etkiler sergilediği görülmüştür. Bu çalışma ile AgNP uygulamalarının oğulotu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin *in vitro* çalışmalarında sekonder metabolitlerinin istenilen kalite ve miktarda üretimini artırmada kullanılabilecek etkili bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Doku Kültürü, Gümüş Nanopartikül (AgNP), *Melissa officinalis* L., Oğul Otu, Sekonder Metabolit

2023, 71 sayfa



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

EFFECTS OF SILVER NANOPARTICLE (AgNP) APPLICATIONS ON TISSUE CULTURE AND SECONDARY METABOLITE ACCUMULATION IN LEMON BALM (*Melissa officinalis* L.)

Goncagül KAPDAN

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology**

Supervisor: Prof. Dr. Yasemin COŞKUN

Nanoparticles (NP) are bio elicitors known in plant biotechnology and show positive effects on plants when used to improve the physical properties of plants. The application of NPs, intertwined with the field of nanotechnology, which has maintained its popularity in plant tissue culture technique in recent years, has led to the successful removal of microbial contaminants from explants in callus induction, organogenesis, somatic embryogenesis, somaclonal variation, genetic transformation, secondary metabolite production, and demonstrated the positive role of NPs.

In this study, it is aimed to eliminate the problems that occur during the reproduction of lemon balm (*Melissa officinalis* L.), which has many uses in medicine, pharmacy, perfumery, cosmetics and food industries. At the same time, it is aimed to increase the amount of secondary metabolites it contains by callus culture methods, despite the problem that it does not allow regular planting in the field due to its very small structure. In the experiments, calli were obtained from lemon balm leaf explants from MS nutrient media containing different amounts (0, 25, 50, 75 and 100 µg/l) of silver nanoparticle (AgNP) and 2.0 mg/l BAP and 1.0 mg/l NAA. After the calli were subcultured twice in the same medium, the rate of callus formation (%), their weight (g) and diameter (cm) were measured, and their structures and colors were determined. Some important phenolic compounds (rosmarinic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, proto-catechic acid, hesperidin and p-coumaric acid) belonging to the lemon balm were detected by HPLC, and aromatic oils such as neral and geranial were detected by GC-MS devices.

According to the results obtained, callus formation rates increased in all AgNP applications compared to the control group. The highest rate of callus formation was in media containing 50 µg/l (97.8%) AgNP. Compared to the control group (0.051 g - 0.8 cm), the highest callus weight (0.196 g) and callus diameter (1.1 cm) were observed in 50 µg/l AgNP application. In this application, the callus structure was determined as compact and its color was green. In addition, it was determined that AgNP applications had positive effects on the production of some aromatic compounds such as neral and geranial and other important phenolic compounds, and higher values were obtained in most AgNP applications compared to the control group. However, it was determined that neral and geranial compounds of aromatic

compounds increased significantly in 25 µg/l AgNP application. The highest increase in phenolic compounds such as caffeic acid, chlorogenic acid, proto-catechic acid, hesperidin and p-coumaric acid was observed in 75 µg/l AgNP application. The highest increase in rosmarinic acid compound was detected in 50 µg/l AgNP application.

In our present study, it was observed that different AgNP concentrations applied in the callus culture of *M. officinalis* L. plant had positive effects on callus formation and rates, causing an increase in the amount of phenolic and aromatic compounds. In this study, it was determined that AgNP applications are an effective method that can be used to increase the desired quality and amount of secondary metabolites in *in vitro* studies of medicinal and aromatic plants such as lemon balm.

Keywords: Tissue Culture, Silver Nanoparticle (AgNP), *Melissa officinalis* L., Lemon balm, Secondary Metabolite

2023, 71 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmamın baőından sonuna kadar her aşamasında sabır ve özveri ile bilgi ve deneyimlerini bana aktaran, danıőmanım olmasından büyük bir onur duyduğum çok değerli Sn. Prof. Dr. Yasemin COŞKUN'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda bilgi, tecrübe, motivasyon, hoőgörü ve samimiyeti esirgemeyen Sn. Prof. Dr. Yasemin COŞKUN, Sn. Prof. Dr. Yusuf AYVAZ, Sn. Prof. Dr. Semra KILIÇ, Sn. Prof. Dr. Selda Tekin ÖZAN ve Sn. Prof. Dr. Rağbet Ezgi DURAN hocalarıma teőekkürlerimi sunarım.

FYL-2021-8463 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan ve haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim aileme de sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Goncagül KAPDAN
ISPARTA, 2023

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. <i>Melissa officinalis</i> L'nin genel görünümü.....	15
Şekil 2.2. <i>Melissa officinalis</i> L. bitkisinin çiçeklenmiş görünümü	16
Şekil 3.1. Bitki büyüme odasında yetiştirilen <i>M. officinalis</i> L. (Oğulotu) bitkileri....	25
Şekil 3.2. Yaprak eksplantlarının steril kabin içerisindeki yüzey sterilizasyonu	26
Şekil 3.3. Besin ortamlarının hazırlanması	27
Şekil 3.4. (a) Yaprak eksplantlarının MS ortamına ekilmesi ve (b) petri kabına yerleştirilen oğulotu yaprak parçaları	28
Şekil 3.5. Steril kabin içerisinde kallusların ölçümü	29
Şekil 3.6. Steril falkon tüplerine alınan kalluslar	29
Şekil 4.1. Oğulotu (<i>Melissa officinalis</i> L.) bitkisinde farklı AgNP uygulamalarında oluşan kalluslar	34
Şekil 4.2. AgNP uygulamalarının kallus oluşumu üzerine etkisi	35
Şekil 4.3. AgNP uygulamalarının kallus ağırlığı üzerine etkisi	36
Şekil 4.4. AgNP uygulamalarının kallus çapı üzerine etkisi.....	36
Şekil 4.5. AgNP uygulamalarının rosmarinik asit miktarı üzerine etkisi	38
Şekil 4.6. AgNP uygulamalarının kafeik asit miktarı üzerine etkisi	39
Şekil 4.7. AgNP uygulamalarının klorojenik asit miktarı üzerine etkisi	40
Şekil 4.8. AgNP uygulamalarının protokateşik asit miktarı üzerine etkisi	40
Şekil 4.9. AgNP uygulamalarının hesperidin miktarı üzerine etkisi	41
Şekil 4.10. AgNP uygulamalarının p-kumarik asit miktarı üzerine etkisi	42

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Fenolik bileşiklerin ölçüldüğü HPLC cihazının özellikleri	30
Çizelge 3.2. Aromatik bileşiklerin ölçüldüğü GC-MS/SPME cihazının özellikleri...	31
Çizelge 4.1. AgNP uygulamalarının kallus oluşumu, ağırlığı, çapı, yapısı ve rengi üzerine etkisi	33
Çizelge 4.2. AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarının fenolik bileşikler üzerine olan etkileri.....	38
Çizelge 4.3. AgNP uygulamalarının oğulotu bitkisinde aromatik bileşik sınıflandırmalarına etkisi	43
Çizelge 4.4. AgNP uygulamalarının oğulotu kalluslarında tespit edilen aromatik bileşikler üzerine etkisi.....	43



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABA	Absisik asit
Ag	Gümüş
Ag ⁺	Gümüş iyonu
AgNO ₃	Gümüş nitrat
Al	Alüminyum
Al ₂ O ₃	Alüminyum oksit
atm	Atmosfer basıncı
APX	Askorbat peroksidaz
Au	Altın
BAP	Benzil amino pürin
bio	Biyolojik
CAT	Katalaz
Cellul-N	Selüloz nanolif
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
CNT	Karbon Nanotüpler
CT-N	Kitin nanolif
CTS-N	Kitosan nanolif
CoO	Kobalt oksit
Cu	Bakır
dk	Dakika
DPPH	Difenilpikrilhidrazil
DW	Kuru ağırlık
Fe ₂ O ₃	Demir oksit
FW	Taze ağırlık
g	Gram
g/l	Gram/litre
HCl	Hidroklorik asit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
kg/cm ²	Kilogram/santimetrekare
kim	Kimyasal
Kin	Kinetin
l	Litre
mg	Miligram
mg/dm ³	Miligram/desimetreküp
mg/l	Miligram/litre
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MS	Murashige ve Skoog
NAA	Naftalen asetik asit
NaCl	Sodyum klorür
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaOH	Sodyum hidroksit
NC	Nanokompozit
nm	Nanometre
NP	Nanopartikül
PGR	Bitki büyüme düzenleyici
pH	Power of hydrogen

ppm	Milyonda bir
RA	Rosmarinik asit
SiO ₂	Silikon Dioksit
SOD	Süperoksit dismutaz
ssp	Alttür
TAC	Toplam antioksidan kapasite
TDZ	Thidiazuron
TFC	Toplam flavonoid içeriği
TiO ₂	Titanyum dioksit
TPC	Toplam fenolik içeriği
U/mg	Enzim birimi/miligram
UV	Ultraviyole
ZnO	Çinko oksit
°C	Santigrad derece
µg	Mikrogram
µg/g	Mikrogram/gram
µg/l	Mikrogram/litre
%	Yüzde

1. GİRİŞ

Gelişen teknolojinin sürekli hız kazanmasıyla birlikte her alanda yüksek teknolojiye olan ilginin artması, bilim insanlarını yeni malzeme ve üretim yöntemleri için araştırmaya zorlamıştır. Bu süreçte de yeni ve hızla gelişen bir teknoloji alanı olan nanoteknoloji ön plana çıkmıştır. Nano sözcüğü, “cüce” anlamına gelen yunanca bir kelimedir. Bilim ve teknolojinin ön eki olarak yer almasıyla nanobilim ve nanoteknoloji terimleri ortaya çıkmıştır (Keiper, 2003; Ormanoğlu vd., 2021).

Nanoteknoloji, maddeye atom ve molekül seviyesinde gelişmiş veya tamamen yeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazandıran bir teknoloji halini almıştır. Nanoteknoloji, terim olarak ilk kez 1974 yılında, Norio Taniguchi tarafından, malzemelerin atom ya da molekül boyutunda işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve bozulması olarak tanımlanmıştır (Hey, 1999). Nanoteknoloji ile fonksiyonel, hızlı, iletken, şeffaf, temiz, az yer kaplayan, az enerji sarf eden, mukavemetli, düşük maliyetli ve olağanüstü yeni özelliklere sahip maddelerin en iyi şekilde üretilmesi mümkündür. Nanoteknoloji, bilim ve teknolojik uygulamalarının pek çok alanını kapsayan oldukça umut ve heyecan verici, yenilikçi, bilimsel ve ekonomik büyüme alanı olan bir moleküler teknolojisidir (Ersöz vd., 2018).

Nanobilim, nanometre düzeyinde (0.1-100 nm çapında) materyallerin nano ölçekte sentezlenmesine, değiştirilmesine ve manipüle edilmesine olanak sağladığı için çoğu alan bu bilimden yararlanmaktadır (Ersöz vd., 2018). Nanoteknolojinin yaygınlaşmasıyla, malzeme ve imalat sektörü, havacılık ve uzay araştırmaları, nano elektrik-elektronik ve bilgisayar teknolojileri, çevre ve enerji, tıp ve sağlık sektörü, biyoteknoloji, biyoloji, kimya, fizik, tarım ve gıda gibi alanlarda yeni ürünler geliştirilerek, günümüzün üretim süreçleri ve yöntemleri de değişmektedir (Yu vd., 2016). Tüm bunların bilinmesiyle, nanoteknoloji üzerine çalışma yapan ülkelerin ulusal ve uluslararası rekabet gücünün artırılmasında, bu alana karşı duyulan öneme her geçen gün daha fazla değinilmektedir. Bununla birlikte sahip olduğu yüksek potansiyelden ötürü ülkeler açısından önemli bir kalkınmışlık aracı ve refah düzeyi olarak da görülmektedir (Tüylek, 2018).

Nanoteknolojinin yaygın olarak görülen ve alanlarından biri olan biyoteknolojinin de kullanılmasıyla, birçok başarılı çalışmalar kayıt altına alınmıştır. Medeniyetin başlangıcına kadar uzanan biyoteknoloji teknikleri yeni bir olgu olmamakla birlikte, insanlar için daha kolaylık sağlayan ve daha fazla ürün eldesinin imkan verdiği, canlı organizmaların ya da onlara ait herhangi bir kısmının kullanımını kapsayan her türlü teknoloji olarak isimlendirilmektedir (Bansal vd., 2012). Biyoteknolojinin sağlık, çevre, mühendislik ve tarım gibi değişik alanlarda yaygın olarak kullanıma başlanması, 1970'lerden sonraki hücre doku kültürünün, genetik araçların ve özellikle rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinden sonra ivme kazanıp modern teknoloji halini almıştır (Awais vd., 2010).

Biyoteknolojinin tarımda kullanılması, üretim ya da ürünlerin işlenmesi süreçlerinde organizmaların genetiğini anlamaya yarayan ve modifiye etmeye imkân sağlayan birçok araç ve yaklaşımı kapsamaktadır. İnsan popülasyonunda yaşanan sürekli artış da besin kaynakları üzerinde ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Popülasyon artışıdaki yaşanan durum dolayısıyla ihtiyaç duyulan besinlerin karşılanması için yaklaşık 2050 yılına kadar yüzde yetmiş bir artışla besin üretiminde gereksinim olduğu öngörülmektedir (Delaney, 2015). Bundan dolayı bitki biyoteknolojisindeki uğraşlar, bitki verim ve kalitesinin artırılmasına ya da stabilize edilmesine, pestisitlere, hastalıklara, biyotik ve abiyotik strese karşı direncin artırılmasına ve bitkilerdeki besin içeriğinin artırılmasını içermektedir (James, 2002; Coghlan, 2003; Cordell vd., 2009; Khan ve Khan, 2010; Wu vd., 2018). Yapılan çalışmalarda da bitki biyoteknolojisinde son zamanlarda popüler olan hüresel ürünler ve nano-biyoteknolojinin kullanımı üzerine odaklanılmıştır.

Gün geçtikçe yapılan çalışmalarla, insan ve hayvanların besin kaynağı olan tarım alanında nanoteknolojinin uygulanmasının önemli bir role sahip olduğu belirtilmiştir. Söz konusu alanda, atomik ve moleküler düzeyde manipüle edilen bir alan olmasından dolayı, kullanıldığı birçok uygulama alanının yanında tarım alanında da kullanılarak önemli çalışmalar ve gelişmeler meydana getiren bir bilim haline geldiği vurgulanmıştır (Gogos vd., 2012). Hayvancılık ve tarımda kullanılabilir arazi kıtlıkları, iklim değişiklikleri, kısıtlanmış su kaynakları vs. gibi faktörler verimde önemli derecede olumsuz etkiler meydana getirmektedir. Bu etkenlerden dolayı milyarlarca

insanın besin ihtiyaçlarının giderilmesi için besin üretiminin artırılması gibi çalışmaların yapılması gerektiği bildirilmiştir (Djanaguiraman vd., 2018).

Bitkiler için oldukça önemli bir yere sahip olan ve biyoteknolojik bir doğa bilimi olan doku kültürü tekniği ile tarım alanındaki eksikliklerin giderilmesi ve ayrıca nanoteknolojik uygulamaları çalışmalara dahil ederek daha etkili çalışmalar yapmak bilim insanları tarafından hedeflenmiştir. Bitki doku kültürü teknikleri ile hastalıksız bitki üretimi, oğalmasız zor olan bitki genotiplerinin hızlıca çoğaltılması, bitki genom transformasyonu ve önemli derecede ticari değere sahip bitki kaynaklı metabolitlerin üretimi gerçekleştirilmektedir. Bu teknikler; kallus kültürü, organogenesis, embriyo kültürü, hücre süspansiyon kültürü, protoplast kültürü, saçak kök kültürü, biyoreaktörler ve biyotransformasyon olarak sınıflandırılmaktadır (Espinosa-Leal vd., 2018).

Son yıllarda, oldukça fazla çalışma bulunan bitki doku kültürü alanında, nanoteknolojik uygulamaların meydana getirdiği olumlu girdileri ne süren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Nanopartiküllerin (NP'lerin) bu alanda uygulanmasıyla da bitkilerdeki; büyüme ve buna bağlı olarak verimin artması, korumanın sağlanması, tohum imlenmesindeki iyileştirmeler, genetik modifikasyonunun sağlanması ve bileşik üretiminin geliştirilmesi gibi birçok özellikler meydana gelmiştir (Wang vd., 2016).

Gümüş (Ag), bakterilere ve diğer mikroorganizmalara karşı gösterdiği aktivite sebebiyle uzun yıllardır birçok alanda antibakteriyel uygulamalarda kullanılmaktadır (Xu vd., 2012). Antibakteriyel özelliği sayesinde nanopestisit, nanolosyon ve nanojel gibi değişik uygulamalarda en sık kullanılan materyaldir. Bu uygulamalardan dolayı bu materyal, iyonik ve NP formunda doğaya salınmaktadır. Ag'n nanopartiküller formu, bitkilerde ve hayvanlarda toksisiteye sebep olduğu için etkileri çeşitli yönlerden analiz edilmiştir (Ahmed vd., 2016). Bitkilerin dış etkenlerden korunmasındaki en etkili NP de, AgNP'leridir. Tarım alanında çok fazla kullanılan ve küresel bir tehlike oluşturmaya başlayan herbisit ve pestisitlere alternatif çözümler araştırılmaktadır. Bu ilaçlar yerine antimikrobiyal ajanlar olarak AgNP'lerin

kullanımının daha ekonomik ve etkili olduğu yapılan araştırmalarda gör÷lmektedir (Kim vd., 2017).

NP'lerin bitki hücre ve organ kültüründe *in vitro* şartlarda sekonder metabolit üretiminde avantajı da kanıtlanmıştır. Hücre ve organ kültürlerindeki sekonder bileşiklerin içerikleri, nano elisitörlerin ve öncülerin dahil edilmesi, kültür ortamındaki bileşenlerinin optimizasyonu ve uygun kültür koşullarının sağlanmasıyla artış gerçeleştirilmiştir. Sekonder metabolitler, bitkilerden elde edilen, onların yaşamsal fonksiyonları üzerinde primer metabolitler gibi etkileri bulunmayan, buna karşın başta ilaç sanayisi olmak üzere; gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz kimyasallar olarak bilinmektedir (Wink, 1999).

Sekonder metabolitler çok sayıda bileşiği içeren zengin bir grup olup, bu grup içerisinde yer alan fenolik bileşikler üstlenmiş oldukları roller nedeniyle büyük önem taşımaktadırlar. Nitekim fenolik bileşiklerin, antikanserojen ve antimikrobiyal etkiler göstererek insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerde buldukları belirlenmiştir (Khalil vd., 2007). Ayrıca fenolik bileşiklerin, serbest radikaller olarak adlandırılan ve nükleik asitlere, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldırarak çeşitli tahribatlara neden olan bileşikleri kendilerine bağlayarak güçlü antioksidan etkiler gösterdikleri de bilinmektedir (Zhao vd., 1999; Khalil vd., 2007). İnsan sağlığı üzerine olan etkilerinin yanında, fenolik bileşiklerin bitkilerde kuraklık, tuzluluk, ultraviyole (UV) ışınları gibi farklı stres ortamlarına karşı koyma, mikroorganizmalar ile herbivorlara karşı savunma ve bitkilerde tozlaşma sırasında böcekleri kendine çekme gibi birçok önemli olayda da görev aldıkları bilinmektedir (Lila, 2005).

Sekonder metabolitlerin yüksek miktarlarda üretilmesi için kullanılan stratejilerden birini, metabolit üretimini artırıcı uygulamalarla birlikte yapılan kallus kültürleri oluşturmaktadır. Nitekim bazı stres yapıcı faktörler uygulandığında sekonder metabolitleri fazla miktarlarda üretmeyen kalluslardan daha yüksek miktarlarda üretimin gerçeleştirilebileceği gör÷lmektedir (Antognoni vd., 2007). Bu amaçla kültür ortamının değiştirilmesi, genetik mühendislik uygulamaları, ışık, jasmonik asit, ozon, ağır metal, etilen, kitosan ve sakkaroz uygulamaları gibi pek çok uygulama

yapılabilmektedir (Collin, 2001, Jun-Ge vd., 2006; Antognoni vd., 2007; Ahmed ve Baig, 2014).

Melissa officinalis L. (limon nanesi, oğul otu, kovan otu) Lamiaceae (Labiatae) familyasının *Melissa* genusuna ait çok yıllık otsu bir bitkidir. İspanya ve Doğu Avrupa'da içerdiği yüksek orandaki esansiyel yağlardan dolayı kültüre alınmış, limon kokulu tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Çağımızda yürütülen çalışmalar sonucunda ise; stres yatıştırıcı, spazmolitik ve antibakteriyel etkileri yanı sıra sinir hastalıkları, gastrointestinal bozukluklar, uyku sorunları, aşırı heyecanlanma üzerine olumlu fonksiyonları hakkında raporlar yayınlanmıştır (Kennedy vd., 2002). Oğulotunun, yan etkileri ile ilgili herhangi bir bilgi bulunmamıştır (Wong vd., 1998). *M. officinalis*, merkez ve güney Avrupa ile Anadolu'da (Akdeniz ve Doğu Anadolu) yaygın olarak yetişen bir bitki olmasının yanı sıra tanıdığı özellikler nedeni ile de dünyada yetiştiriciliği yapılmaktadır (Dastmalchi vd., 2008).

M. officinalis L. subsp. *officinalis* ekstraktlarında bulunan fenolik madde içeriğinin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu ve kanser riskini azalttığı belirtilmiştir (Dastmalchi vd., 2008). Bu bitki üzerindeki fitokimyasal çalışmalar, *M. officinalis* L.'nin sinarosid, kosmosin, ramnositrin, izokuersetin, ursolik ve oleanolik asit, kafeik ve rosmarinik asit gibi flavonoidlerce ve esansiyel yağ (neral ve jeranial gibi) bakımından zengin olduğunu göstermiştir (Carnat vd., 1998; Herodez vd., 2003). *M. officinalis*, ağırlıklı olarak bir kafeik asit esteri (3,4-dihidroksifenil laktik asit) olan rosmarinik asiti içermektedir. Rosmarinik asit antienflamatuar etkiye sahiptir. Ayrıca antioksidatif, antimutajen, antibakteriyel ve antiviral özelliğe sahip olduğu da bilinmektedir. Diğer fenolik bileşiklerde olduğu gibi, kanser hastalığını (tümör oluşumunu) önlemede rolü olan rosmarinik asit, aynı zamanda antioksidan etkisinden dolayı kozmetik endüstrisinde de kullanılmaktadır (Pereira vd., 2005).

Bu tez çalışmasında, oğulotu bitkisinin çoğaltımı sırasında oluşan sorunların giderilmesi ve tohumlarının çok küçük yapıda olması nedeniyle tarlada düzenli bir ekime imkan vermemesi sorununa karşın kallus kültürü yöntemleriyle içerdiği sekonder metabolitlerin miktarının artırılması amaçlanmıştır. Nanoteknolojik uygulamalardan olan AgNP uygulamalarının oğulotu bitkisinin doku kültüründe

kallus oluşumu ve özellikle sekonder metabolit miktarlarına etkileri üzerine herhangi bir literatüre rastlanmamıştır. AgNP uygulamaları ile oğulotu bitkisinin doku kültüründe kallus ortamına çeşitli konsantrasyonları ilave edilerek kallus oluşturma konusundaki etkileri karşılaştırılmış ve sekonder metabolit üretimini teşvik edici bir yöntem olarak kullanılma olanakları araştırılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Nanoteknolojinin Tanımı ve Uygulama Alanları

Nanoteknoloji, nano ve teknoloji terimlerinin birleşmesiyle oluşmuş 21. yüzyılın en popüler teknolojisi haline gelmiştir. "Nano", herhangi bir fiziksel boyutun milyarda biri ($1 \text{ nm}=10^{-9} \text{ m} / 1 \text{ m}=10^9 \text{ nm}$) anlamına gelen Yunanca "cüce" kelimesinden türemiştir (Keiper, 2003). Nanoteknoloji, herhangi bir maddenin atomik-moleküler düzeyde mühendisliğin yapılarak yepyeni fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler kazandırılması olarak tanımlanmaktadır. 1959 yılında Richard Feynman, birçok alanda atomik ve moleküler boyutlarda, yeni imalatlar yapılarak daha önemli hale gelen yeni keşiflerin olabileceği fikrini nanoteknoloji terimini kullanmadan dile getirmiştir. Bu fikrinden sonra Feynman, modern nanoteknolojinin fikir babası olarak kabul edilmiştir. Richard Feynman'ın bu görüşünden sonra 1974 yılında, Norio Taniguchi nanoteknoloji terimini ilk kez kullanarak, malzeme ve cihazların atomik, moleküler veya supramoleküler yapılar düzeyinde imalatı, kullanılması ve birçok yeni özelliklerinden yararlanılması olarak tanımlamıştır. Bir başka tanımlaması ise malzemelerin bir atomik veya bir moleküler seviyede işlenmesi, birleştirilmesi, ayrılması ve bozulması olayıdır (Ersöz vd., 2018).

Nanoteknoloji araştırmaları, nano ölçekteki maddelerin, hayal edilmeyen ve yeni işlemlere izin veren belirli özellikleri nedeniyle büyük umutlar doğuran multidisipliner bir bilim olarak kayıtlara geçmiştir. Nanoteknoloji tıp, sağlık, eczacılık, ziraat, gıda, çevre, mühendislik, biyoloji, kimya, fizik, materyal bilimi ve biyoteknoloji gibi birçok alanda kullanılarak hayatımızı kolaylaştıran ve olumlu kılan bir bilim haline gelmiştir (Yu vd., 2016). Nanoteknolojinin, öncelikli etkisi malzeme ve aygıtlardaki boyutların azalması ardından ise dayanıklı, hafif, üretiminde minimum enerji gerektiren vs. olarak söylenebilir. Kullanıldığı alanlarda oldukça çarpıcı gelişmelere imkan sağladığı görülen nanoteknoloji, yapılan uygulamaların sayısının kısıtlı olmasına rağmen gelecek adına daha çok çalışmalarla daha geniş alanlara yayılabileceği apaçık ortadadır. Nanoteknolojik uygulamaların gerçekleşmesi ve sonrasında da artışıyla birlikte nanomateryaller/nanomalzeme, pek çok tüketici ürünü için kullanılmaya başlanmıştır (Demirbilek, 2015).

Nanoteknolojinin asıl amaçları; nano ölçekteki yapıların analizi, fiziksel özellikleriyle incelenmesi, nano ölçekli cihazların geliştirilmesi, yeni yapıların oluşturulması/üretilmesi ve araştırılan uygun yöntemlerle makroskobik ve nanoskopik arasında ilişki kurulmasıdır. Bilindiği üzere her maddenin kendine özgü kimyasal, fiziksel, mekanik vb. çok çeşitli özellikleri vardır fakat makro düzeydeki davranışı ile nano düzeydeki davranışı arasında önemli farklar bulunmaktadır. Kuantum etkilerinden dolayı da, nano ölçekteki maddeler makro ölçekte olan maddelere göre daha farklı özelliklere sahip olduğu söylenebilir (Mousavi ve Rezaei, 2011).

Günümüzde bilinen tanımına göre, en az bir boyutu 100 nanometreden (nm) küçük olan ya da bu küçük malzemelerin bir araya gelmesiyle oluşan yapılar olarak adlandırılan nanomalzemeler; mikro ve makro boyutlu benzerleri ile karşılaştırıldığında iletkenlik, dayanıklılık, reaktivite, optik gibi fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı olağanüstü davranışlar sergilemektedirler. Çevre, sağlık, tıp gibi bazı alanlarda ise bu boyut aralıkları 0.3 nm ile 300 nm arasında değişkenlik göstermektedir (Çiftçi ve Altınkut Uncuoğlu, 2019).

Nanomalzemeler yapılarına, şekil ve boyutlarına, kimyasal bileşenlerine ve uygulama alanlarına göre farklı sınıflara ayrılmaktadır. NP'ler, nanokristaller, nanotüpler, nanoçubuklar, nano ince filmler ve nanoteller bu sınıfları oluşturan önemli yapılarıdır. Nanomalzemeler günlük hayatımızda sürekli kullanımlarına ihtiyaç duyduğumuz malzemelerdir. Örneğin, demir oksit (Fe_2O_3) NP kozmetik sektörü ürünlerinde, titanyum dioksit (TiO_2) NP ve çinko oksit (ZnO) NP güneş kremlerinde, alüminyum (Al) NP şampuan ve temizlik sektörü ürünlerinde ve diğer NP de diğer birçok alanlarda kullanılmaktadır (Remedios vd., 2012). Nanomalzemeler, sahip olduğu yüksek yüzey-hacim oranı ile büyük önem taşımaktadır. İlaç sanayi, sensörler, katalizörler, optik materyaller vs. gibi alanlarda uygulamaları bulunmaktadır (Haverkamp ve Marshall, 2009). Nanomateryallerin işlevleri ve kullanım alanları NP'lerin boyut ve bileşimine göre değişkenlik göstermektedir (Haverkamp vd., 2007).

Günümüzde sıklıkla kullanılan nanoteknolojik ürünlerin temel taşı olan ve son dönemlerde büyük öneme sahip olan NP'ler, 19. yüzyılın ortalarında araştırılmaya başlanmıştır (Ersöz vd., 2018). NP'ler, doğada kendiliğinden oluşabilen ya da kazara

salınan, 1-100 nm arasındaki uzunluklara sahip olan ve ince yapılı parçacıklar olarak tanımlanmaktadır (Ramsden, 2011). NP'ler; organik bazlı nanomateryaller (miseller, polimer NP'ler, dendrimerler, lipozomlar), inorganik bazlı nanomateryaller (titanyum dioksit, demir oksit, çinko oksit, gümüş, altın, kuantum noktaları), karbon bazlı nanomateryaller (karbon nanofiberler, grafen, fullerenler, karbon nanotüpler) ve kompozit bazlı nanomateryaller (polilaktik asit, kitosan, hidroksietil metakrilat) olarak sınıflandırılmışlardır (Jeevanandam vd., 2018). NP'ler, diğer ticari materyallerden üstün ve farklı özellikler taşımaktadır. Çekici özelliklere sahip olan bu yapılar, yüzey atomlarının benzeri olmayan karakterleri, etkili kuantum boyutları, elektronik yapılarının boyutları ve hacimsel olarak daha büyük parçacık boyuttaki yapılarla karşılaştırma yapıldığında yüzey/hacim oranlarının genişliği belirgin özelliklere sahip olduğunun göstergeleridir (Liveri, 2006; Nowack ve Bucheli, 2007; Haverkamp ve Marshall, 2008; Dietz ve Herth, 2011).

NP'ler, çok küçük yapılarından dolayı benzeri olmayan birçok farklı parametrelere (fizikokimyasal ve morfolojik özel yapılara) sahiptir (Haverkamp vd., 2007). Bu özelliklerinden dolayı nanoteknolojinin temelini oluşturarak; çeşitli sanayi üretim dallarında, kozmetikte, biyomedikal alanında (Uskoković, 2015), tarım alanında, otomotiv alanında, mücevhercilikte, elektrokimyasal sensörler ve biyosensör (Yu vd., 2016) uygulamalarında, tıp alanında (Zhu vd., 2016) spor malzemelerinde, ev aletlerinde, inşaat malzemelerinde ve daha birçok alanda kullanılarak popülaritesini kazanmıştır ve ticarileştirilmiştir (Buzea vd., 2007).

NP'ler uygulama alanlarına göre çok fazla "anti-" özelliklere sahiptirler. Bu özellikler başta antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiparazit ve antikanser olmakla beraber, fotonik ya da kataliz alanlarda uygulamalara da rastlanmıştır (Miazek vd., 2015). NP'lerin bu özelliklere sahip olması tarım alanında oldukça dikkat çekmiş olup birçok çalışmayla olumlu sonuçlara yer vermiştir (Çiftçi ve Altınkut Uncuoğlu, 2019).

2.2. Bitkisel Sistemlerde Kullanılan Nanopartiküller

Fitopatolojik olarak yeni yaklaşımlar ve gelişmelerin ortaya çıkmasında etkili olan nanoteknoloji, birçok farklı etki mekanizmalarına ve çok küçük boyutlara sahip olan

NP ile bitki hastalıklarının mücadelesinde etkin bir kontrol sağlamaktadır (Atakan ve Özkaya, 2018). Pestisit veya herbisitlerin salımının izlenmesi için geliştirilmiş sistemlerin kullanılması da bu alan ile sağlanmaktadır. Nanomateryallerin bitkisel sistemlere uyarlanması ile; tarımdaki kimyasalların kontrolü, istenilen DNA, protein veya aktivatör gibi biyomoleküllerin hedef alana iletiminin programlanabilmesi ve oldukça fazla işlevsellik kazandırılması olasıdır (Fraceto vd., 2016; Kottegoda vd., 2017). Nanoteknolojinin tarımda kullanımı ile daha iyi, verimli ve kaliteli çıktı için bitki hastalıkları ve büyümesi yönetilebilmekte ve bunun yanı sıra bitki patojen teşhisi/tespiti ve mahsul koruması da sağlanabilmektedir (Kashyap vd., 2016).

NP'lerin, genetik mühendisliğine uygun koşullarda modifiye edilmeleri ile tohum çimlenmesinde, bitki büyüme ve gelişmesindeki etkileri ve toksik etkili tarımsal kimyasalların belirlenmesindeki etkileri gösterilmiştir (Nuruzzaman vd., 2016). Ardından nanobiyoteknoloji ile de kimyasalların tarımdaki yoğun kullanımı ve genetik mühendisliği alanında farklı bir mekanizmayla tarımsal üretimin sürdürülebilir hale gelmesi hedef alınmıştır (Kah vd., 2018; White ve Gardea-Torresdey, 2018; Kah vd., 2019).

Bitkiler NP'ler ile çevre arasındaki bağlantıyı sağlamada oldukça önemli olan ara birimlerdir. Bitkiler NP'leri yapılarına alıp taşıyabilir ve bazı organlarında biriktirebilirler. Bugüne kadar sınırlı sayıda bitki türü, NP'lerin etkilerinin araştırıldığı çalışmalara konu olmuştur (Tripathi vd., 2017). Bitkisel sistemlerde kullanılan NP'ler, kimyasal bileşim (organik/inorganik), boyut, konsantrasyon, yüzey alanı, hacim, köken, oluşum gibi özelliklerine bakılarak belirlenmektedir. Bu NP'ler başlıca; Titanyum Dioksit (TiO₂) NP, Çinko Oksit (ZnO) NP, Karbon Nanotüpler (CNT), Silikon Dioksit (SiO₂) NP, Altın (Au) NP, Gümüş (Ag) NP'lerdir (Çiftçi ve Altınkut Uncuoğlu, 2019).

NP'lerin, bitkiler ile etkileşiminde meydana getirdiği büyüme ve gelişim etkileri, olumlu ya da olumsuz olarak değişiklik göstermektedir. Bitkilerde meydana gelen bu fizyolojik ve morfolojik değişiklikler hem bitki türüne, büyüme evresine ve hidrofobik/hidrofilik özelliklerine hem de kullanılan NP'lerin boyutuna, şekline, yüzey alanına, konsantrasyonuna ve kimyasal bileşimine bağlı olarak değişkenlik

gösterdiği belirtilmektedir (Ma vd., 2010; Sharifi vd., 2012). NP'ler bitkilerdeki senesens zamanını, çiçek ve meyve verme zamanını, absisyon ve dormansiye etkilediği de gözlemlenmiştir (Gardea-Torresdey vd., 2004; Vernay vd., 2008; Thul ve Sarangi, 2015).

TiO₂ NP, çeşitli bitki türlerinde fizyolojik, morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinde bazı büyük etkiler meydana getirmiştir. Bitkiler üzerinde uygulanan bu NP ile fotosentetik ve klorofil oluşma oranında ve antioksidan ve rubisko enzim aktivitelerinde iyileşmeler oluşturulduğu tespit edilmiştir. Bunun sonucunda da mahsul veriminde artışların saptandığı bildirilmiştir (Abdel Latef vd., 2018; Gohari vd., 2020). ZnO NP, bitkilerde tohum çimlenme hızı, büyüme hızı, büyüme süresi, metabolizma ve gelişim gibi etkileri birçok çalışma ile gösterilmiştir. Ayrıca bitkide daha erken meyve verme ve daha yüksek klorofil içerme özelliği gözlemlenmiştir (Çiftçi ve Altinkut Uncuoğlu, 2019). CNT sayesinde, bitkilerde var olan hastalıkların en kısa sürede hızlıca yok edilmesi, oluşacak hastalıkların önüne geçilmesi ve bitkinin topraktan alacağı ve ihtiyacı olan besin elementlerinin emiliminin yüksek miktarda artırılması sağlanabilmektedir. SiO₂ NP, bitkide çimlenme, fide gelişimi, protein, klorofil ve fenoller gibi organik bileşiklerin üretiminin artışı gibi etkileri bulunmaktadır (Suriyaprabha vd., 2002; Sabaghnia ve Janmohammadi, 2015). AuNP bitkilerde, boyut, yaprak yüzeyi ve sayısı, klorofil ve şeker içerik miktarının artışı gözlemlenmiştir (Arora vd., 2012; Gopinath vd., 2014).

Gümüş iyonu ve gümüş bazlı bileşikler toksik bir yapıya sahip oldukları için mikrobiyal türlere karşı güçlü bir biyosidal etki göstermektedirler. Çünkü bunlar geniş yüzey alanlarında oldukça büyük bir etkiye sahip reaktif türlerdir (Ghosh vd., 2012; Malabadi vd., 2012). AgNP, kendine özgü algılama, katalitik, optik ve antimikrobiyal özelliklerinden ve çeşitli biyomoleküllerin tespiti ve biyolojik dönüşümlerin izlenmesi için verimli algılayıcı olmasından dolayı en çok çalışılan türlerden biridir (Batley vd., 2013; Sharma vd., 2014; Sharma vd., 2015). Günümüzde AgNP'ler çok çeşitli ticari ürünlerde bulunan ve en çok üretilen nanomalzemelerdir (Ahamed vd., 2010). AgNP'lerin uygun konsantrasyonlarının tohum çimlenmesi (Barrena vd., 2009; Shelar ve Chavan 2015) ve bitki büyümesini (Sharma vd., 2012; Kaveh vd., 2013; Vannini vd., 2013) artırmada, fotosentetik verimliliği ve klorofil içeriğinin iyileştirilmesinde,

su ve gübre kullanımının artırılması (Sharma vd., 2012; Hatami ve Ghorbanpour 2013) gibi pek çok alanda tarım için önemli etkileri rapor edilmiştir (Sadak, 2019).

Nanoteknolojide, metal ve metal oksit NP antimikrobiyal, antibakteriyel ve antiviral gibi özellikler taşımasından dolayı, bitki doku kültürü çalışmalarında gerekli sterilizasyon etkinliği göstererek önemli bir yere sahiptir (Wang vd., 2017). Bu yüzden bitki doku kültürü aşamasında AgNP başta olmak üzere birçok NP çeşitinin mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Beyth vd., 2015).

2.3. Bitki Doku Kültürü Tekniklerinde Nanopartiküllerin Kullanımı

Dünya nüfusunun hızlı bir şekilde artışı ve iklimde görülen değişiklikler besin kaynakları için oldukça önemli bir tehdit unsurudur. Bu yüzden, canlı yaşamı için gerekli besin kaynaklarının sürekliliği, kalitesi, faydası ve daha birçok olumlu girdileri için bitki biyoteknolojisinden yararlanılmaktadır. Biyoteknoloji bakteri ve virüsleri ele alan, bitkisel ve hayvansal organizmalarda ve diğer mikroorganizmalarda uygulanabilen bir teknolojidir. Tarımsal biyoteknolojinin modern hali ise üretim ya da ürünlerin işlenmesi süreçlerinde organizmaların genetiğini anlamaya yarayan ve modifiye etmeye imkân sağlayan birçok araç ve yaklaşımı kapsamaktadır. Bitki biyoteknolojisinde çeşitli genetik mühendisliği ve doku kültürü teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknoloji, bitkilerden elde edilmek istenen verimin artırılmasında, bitkilerde oluşan hastalıkların korunmasında, pestisitlerin önlenmesinde, biyotik/abiyotik strese karşı direncin artırılmasında ve bitkilerdeki önemli besin içeriklerinin artırılmasında büyük rol oynamaktadır (James, 2002; Coghlan, 2003; Cordell vd., 2009; Khan ve Khan, 2010).

Bitki biyoteknolojisinin en önemli ticari değere sahip çoğaltım araç ve teknikleri, bitki hücre, doku ve organ kültürleri teknikleridir. Bitki doku kültürü; yeni bir doku, bir bitki veya bitkisel bir ürün elde etmek amacıyla, bir bitkinin tümünün ya da hücre, doku ve organ gibi kısımlarının yapay besin ortamlarında steril şartlara uygun kültüre alınması işlemi olarak ifade edilmektedir (Onay vd., 2012). Bitki doku kültürünün asıl temelini totipotensi oluşturmaktadır. Totipotensi, bitki hücrelerinde bulunan genetik

bilgilerin bütün bir bitki üretebilme yeteneği olarak ifade edilmektedir. Bitki doku kültürü üzerine yapılmış ilk çalışma ise 1902 yılında Gottlieb Haberlandt tarafından totipotensi kavramına dayanarak yapılmıştır (Dias vd., 2016). Bitki doku kültürünün uygulanmasındaki asıl amaç; çoğaltımı kolay olmayan bitkilerin çoğaltımı/klonal olarak hızlı çoğaltımı, kaybolmakta olan türlerin korunması, hastalıklı bitkilerin patojenlerden arındırılması, bitkideki gen kaynaklarının muhafaza edilmesi, somaklonal varyantların, ikincil bileşiklerin (sekonder metabolitlerin) ve haploid bitkilerin elde edilmesidir (El Meskaaoui, 2013).

Bitki doku kültürü tekniklerinin amaçlarından biri olan sekonder metabolit üretimi son derece önemli bir yere sahiptir. Sekonder metabolitler, bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az bitkinin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili primer metabolitler (aminoasitler, organik asitler ve nükleotitler) kadar önemli bileşiklerdir. Sekonder metabolitler bitkilerin, çevresel koşullara uyum sağlama, savunma, korunma, hayatta kalma, neslini sürdürme ve ekosistemle ilişkilerini düzenlemelerinde yardımcı olurlar (Tiring vd., 2021). Sekonder metabolitler, başta ilaç sanayisi olmak üzere; gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz kimyasallar olarak belirtilmektedir (Wink, 1999).

Bitki doku kültürü tekniğinin son yıllarda popüleritesini koruyan nanoteknoloji alanıyla iç içe olup NP'lerin uygulanması, mikrobiyal kontaminantların eksplantlardan başarıyla uzaklaştırılmasına yol açmış ve NP'lerin kallus indüksiyonunda, organogenezde, somatik embriyojenezde, somaklonal varyasyonda, genetik transformasyonda ve ikincil metabolit üretiminde olumlu rolünü göstermiştir. Son yıllarda bitki doku kültürü alanında, nanoteknolojik uygulamaların meydana getirdiği olumlu girdileri belirten çok sayıda çalışmalar bulunmaktadır. NP'lerin bahsi geçen alanda uygulanmasıyla; bitkilerdeki tohum çimlenmesinin iyileştirilmesi, bitki korumasının sağlanması, bitki büyüme ve veriminin artırılması, biyoaktif bileşik üretiminin geliştirilmesi, bitki genetik modifikasyonunun sağlanması gibi özellikler meydana gelmiştir (Wang vd., 2016).

NP'lerin bitki doku kültürü üzerindeki olumlu etkileri; kallus indüksiyonu, köklenme, yüzey dezenfeksiyonu, kök büyümesi, somaklonal varyasyon, ikincil metabolitlerin geliştirilmesi, organogenez ve genetik transformasyon yönünde olabilmektedir (Kim vd., 2017). Elisitörler kaynaklarına göre biyotik ve abiyotik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Bitki doku kültürü çalışmalarında bir hücre kültürünün ortaya çıkmasında fiziksel faktör olarak kabul edilen elisitörler sorumludur. Bu nedenle kallus kültürlerinde biyotik veya abiyotik elisitörlerin uygulanması, biyoteknolojik hücre kültürlerinde ana yöntem olarak kabul edilmektedir (Zhao vd., 2005). Elisitörler tarafından kullanılan mekanizma, ikincil metabolitlerin üretimini hem niceliksel hem de niteliksel olarak etkileyebilmektedir (Giri ve Zaheer, 2016). Nanomalzemeler, hem besin maddeleri hem de elisitörler olarak hücre kültürlerine eklenmeye uygundur (Kim vd., 2017) ve nano-elisitörlerin hücre kültürleri üzerindeki olumlu etkilerini bildiren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Poborilova vd., 2013; Raei vd., 2014; Chamani vd., 2015; Talankova-Sereda vd., 2016; Vahide vd., 2021).

2.4. *Melissa officinalis* L. (Oğulotu) Bitkisinin Genel Özellikleri

Türkiye'nin, coğrafi konumu ve iklim çeşitliliği göz önünde bulundurulduğunda, tarım alanında oldukça elverişli olduğu ve ayrıca zengin bir floraya sahip olduğu bilinmektedir. Türkiye genelinde yaklaşık 11000 bitki taksonu olduğu ve 500 kadarının alternatif tıp alanında kullanıldığı belirtilmiştir (Göktaş ve Gıdık, 2019). Bu da tıbbi ve aromatik bitki yönünden geniş bir alana sahip olduğunu göstermektedir (Kızıllı vd., 2010). Ülkemizde, tıbbi ve aromatik bitkilerin en çok yayılış gösterdiği bölgeler ise Akdeniz, Marmara, Doğu Karadeniz ve Güneydoğu Anadolu ve Ege bölgeleridir (Yıldıztekin vd., 2019).

Geçmişten günümüze çeşitli amaçlarla kullanılan tıbbi ve aromatik bitkiler, ilaç, tarım, kozmetik, parfümeri, gıda ve tekstil gibi birçok alanda kullanılarak insanlığa fayda sağlamaktadır (Göktaş ve Gıdık, 2019). Tıbbi ve aromatik bitkiler bu tür endüstriyel kullanımlar için yetiştirilmektedir fakat bazıları hala doğadan yabani olarak toplanmaktadır. Kontrolsüzce yapılan toplamaların bu bitki türlerine zarar vermesi bitkilerin geleceğinin tehlike altına girmesine sebep olmuştur. Tıbbi ve aromatik bitkilerin bahsi geçen çoğu alanda kullanılması ve gün geçtikçe bu talebin artmış

olması, yenilenebilir endüstriyel ürün kaynaklarının yanı sıra bitki biyoçeşitliliğini koruma ihtiyacı oluşturmuştur. Bundan dolayı doğadan kontrolsüzce ve aşırı miktarda toplanan önemli bitki türlerinin tarımına geçilip popülasyonunun artırılması zorunluluk haline gelmiştir (Yıldıztekin vd., 2019).

Tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alan ve pek çok alanda yararlanılan bitkilerden birisi de *M. officinalis* L. (oğulotu)'dır. *M. officinalis* L., Lamiaceae (Labiatae) familyasının *Melissa* genusuna ait ve çok yıllık otsu bir bitkidir. *Melissa* cinsinin üç alt türü (subspecies=ssp.) bulunmakta olup (ssp. *officinalis*, ssp. *altissima*, ssp. *inodora*), bunlardan sadece ssp. *officinalis* tıbbi ve ticari değere sahip bir bitki olarak kullanılmaktadır (Katar ve Gürbüz, 2008). *M. officinalis* L., ismini yunancada "Melitto" kelimesinden almış olup bal arısı anlamı taşımaktadır. Bitkinin çiçekleri arılar tarafından cezbedici bulunduğu için en kaliteli ve lezzetli bal üretimi bu çiçeklerle beslenen arılar tarafından yapılmaktadır. Bu yüzden arıcılıkta, oğul ekmede etkili olduğu bilinen bu bitki oğul otu ismiyle de bilinmektedir.

Oğul otunun morfolojik yapısı incelendiğinde, bitkinin boyu, gövdesi ve yaprak boyu genotip ve çevre faktörlerine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Bitki boyu genelde 1,5 metreye kadar ulaşabilir ve 0,5-1,0 metreye kadar da yayılış gösterebilmektedir. Bitki yaprakları ise kalp şeklinde ve üzeri salgı tüyleri ile kaplıdır. Alt yapraklar üst yapraklara göre daha büyük formda olup dekussat dizilim göstermektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. *Melissa officinalis* L'nin genel görünümü (Tarbigem, 2018)

Yapraklar limon kokulu olduğu için halk arasında limon otu olarak da bilinmektedir. Çiçekleri, küçük ve beyaz veya açık sarı renginden lila rengine kadar olgunlaşmaktadır

(Şekil 2.2) (Topdemir vd., 2018). *M. officinalis*, merkez ve güney Avrupa ile Anadolu'da (Akdeniz ve Doğu Anadolu) yaygın olarak yetişen bir bitki olmasının yanı sıra taşıdığı özellikler nedeni ile de dünyada yetiştiriciliği yapılmaktadır (Dastmalchi vd., 2008).



Şekil 2.2. *Melissa officinalis* L. bitkisinin çiçeklenmiş görünümü (Tarbigem, 2018)

M. officinalis L'nin kimyasal içeriğindeki uçucu yağ oranı diğer Lamiaceae ailesine ait üyelerine göre oldukça düşüktür ve bu oran %0.02 - %0.30 arasında değişmektedir. Bitkinin tıbbi ve ekonomik değerinin yüksek olup uçucu yağ oranının bu kadar düşük olması, bitki üretim maliyetini ve piyasadaki fiyatını yüksek kılmaktadır. Bitkinin sahip olduğu uçucu yağlardaki temel bileşenler; yağ içeriğinin yaklaşık %96'sını oluşturan sitral (geraniol ve neral), sitronellal, linalool, geraniol, β -pinen, α -pinen, β -karyofilen ve β -karyofilen oksittir (Sarı ve Ceylan, 2002; Sağlam vd., 2004). *M. officinalis* L. üzerinde yapılan fitokimyasal çalışma ve araştırmalar sonucu fenolik bileşikler ve terpenler gibi fitokimyasallar da tespit edilmiştir (Allahverdiyev vd., 2004; Moradkhani vd., 2010). Polifenolik bileşikler, rosmarinik asit (RA) de dahil olmak üzere büyük miktarlarda kafeik asit türevleri, trimerik bileşikler ve luteolin-7-O-glukozid gibi flavonoidler de bitkinin içerdiği uçucu yağlardandır (Encalada vd., 2011).

M. officinalis L.'nin; antispazmodik, antibakteriyel, antiviral, antifungal, (Farahani vd., 2009), antimikrobiyal, antidepresif, antispazmolitik (Basta vd., 2005; Hussain vd., 2011; Vitullo vd., 2011;), antitümoral (De Sousa vd., 2004) ve antioksidatif (Labuda vd., 2002) etkileri olduğu belirtilmiştir. Ayrıca yüksek ateş, baş ağrısı, migren, baş dönmesi, kulak ağrısı, kronik bronşiyal katar, hazımsızlık, kolik, bulantı, uykusuzluk, ülser, histeri ve hipertansiyon gibi sorunlarda da etkisini göstermiştir (Herodez vd.,

2003; Uzun vd., 2004). Bitkinin yatıştırıcı/sakinleştirici, hafızayı güçlendirici etkilerinin yanı sıra, sinirlilik, anemi, senkop, halsizlik, tiroid, epilepsi, depresyon ve psikoz tedavilerinde de etkili olduğu söylenmiştir (Kaçar vd., 2010; Chaiyana ve Okonogi, 2012; Miraj vd., 2017). Yan etkileri ile ilgili herhangi bir bilgiye rastlanmamıştır (Wong vd., 1998).

2.5. Bitki Doku Kültüründe Nanopartiküller ile Yapılan Çalışmalar

Dehghani-Aghchekohal vd. (2022), yapmış oldukları çalışmada, AgNP'lerin (50 ve 100 mg/l) *Carum carvi* hücre süspansiyon kültürlerinde ikincil metabolitler üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. GC/MS ve GC/FID sonuçları, AgNP'lerin *C. carvi*'nin hücre süspansiyon kültürlerinde ikincil metabolitleri güçlü bir şekilde etkilediğini göstermiştir. Sonuçlara göre, 50 mg/l konsantrasyonundaki AgNP'ler, kontrole kıyasla p-simen ve karvon içeriğini arttırmıştır. Bitkilerin 100 mg/l AgNP'lere maruz kalması ise, timol ve karvakrol üretimini tetiklemiştir. Bu çalışma, AgNP'lerin elisitör olarak hücre süspansiyon kültürlerinde kullanılmasının, *in vitro* sekonder metabolitlerin üretimini teşvik etmek için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Hayat vd. (2021), tıbbi bir bitki olan *Artemisia absinthium* (pelin otu) bitkisinin kallus kültürlerinde, NP'lerin biyokütle birikimi, sekonder bileşik üretimi, antioksidatif enzim ve antioksidan aktivite üzerine etkilerini belirlemek amacıyla çalışmalar yapmışlardır. Bunun için kültür ortamına biyolojik olarak üretilmiş NP'ler (Ag ve Cu) veya her iki NP'nin (Ag ve Cu) kombinasyonuna farklı oranlarda (1:2, 2:1, 1:3 ve 3:1) thidiazuron (TDZ) (4 mg/l) eklemişlerdir. Ag ve Cu NP'ler, indirgeme ve kapatma maddesi olarak *Moringa oleifera* yaprakları kullanılarak sentezlenmiştir ve ayrıca UV-Görünür spektroskopisi ve SEM ile karakterize edilmiştir. Ag ve Cu NP'lerin (1:2, 2:1) ve 4 mg/l TDZ'nin 30 µg/l süspansiyonu, kontrol (%86) ile karşılaştırıldığında %100 biyokütle birikimi göstermiştir. AgNP'ler ile kombinasyon halinde TDZ, büyüme kinetiğinin log fazlarında biyokütleyi arttırmıştır. Tek başına CuNP'ler, kallus kültürlerinde süperoksit dismutaz aktivitesini (0.56 nM/dk/mg taze ağırlık) ve peroksidaz aktivitesini (0.31 nM/dk/mg taze ağırlık) arttırmıştır. Bununla birlikte, Ag ve Cu NP'lerin TDZ ile kombinasyonu, toplam fenolik (7.31 µg/g kuru ağırlık) ve flavonoid içeriklerini (9.27 µg/g kuru ağırlık) arttırmıştır. Ayrıca, antioksidan aktivite

Ag ve Cu NP'ler (3:1) ile güçlendirilmiş ortamda en yüksek (%86) olmuştur. Bu çalışma, biyolojik olarak üretilmiş tekli NP'lerin (Ag ve Cu) veya her iki NP'nin (Ag ve Cu) bir kombinasyonunun farklı oranlarda (1:2, 2:1, 1:3 ve 3:1) TDZ (4 mg/l) ile birlikte *A. absinthium* kallus kültürlerinde kallus gelişimi, endojen enzimlerin üretimi, enzimatik olmayan bileşenler ve daha fazla antioksidan aktivite üzerine ilk verileri sağlamıştır.

Vahide vd. (2021), *Betula pendula* (huş ağacı) hibritinin gövde kallus kültürlerinde elisitör olarak kitosan nanolif (CTS-N), kitin nanolif (CT-N) ve selüloz nanoliflerini (Cellul-N) kullanarak betulin ve betulinik asit üretimi üzerinde biyo NP'lerin etkilerini incelemiştir. Huş ağacı kabuğu örneklerine, üç farklı WPM, NT ve B5 kültür ortamında üç hormon uygulaması yapılmıştır. Kallus oluşumunun maksimum yüzdesini sağlayan seçili ortamda (1.5 mg/l 2,4-D + 0.5 mg/l BAP ile zenginleştirilmiş NT ortamı) kalojenez tekrarlanarak 5 ay boyunca gözlemlenmiştir. Kalluslar 0.5, 0.75 ve 1 mg/l lik farklı konsantrasyonlarda, CTS-N, CT-N ve Cellul-N içeren ortamda yeniden kültürlenerek belirli zaman aralıklarında yaş ve kuru ağırlıkları belirlenmiştir. Ayrıca betulin ve betulinik asit seviyeleri HPLC (High Performance Liquid Chromatography) ile belirlenmiştir. Sonuç olarak, en yüksek betulin (0,7 mg/1) miktarı % 0,5 Cellul-N ile bir günlük uygulamada elde edilmiştir. En yüksek betulinik asit miktarı (0,98 mg/1) ise 3 gün boyunca % 0,5 CT-N ile muamele edilen kalluslarda elde edilirken, kontrol muameleleri için karşılık gelen ağırlıklar sırasıyla 0,08 mg/1 ve 0,002 mg/1 ölçülmüştür.

Begum vd. (2020) yaptıkları çalışmada, *Fagonia indica* bitkisinin kallus kültürlerinde elisitör olarak kullanılan farklı konsantrasyonlardaki kimyasal (kim) ve biyolojik (bio) olarak sentezlenmiş AgNP'lerin etkisini araştırmışlardır. Çalışmada, AgNP'lerin kallus biyokütlesi ve kalluslardan ekstrakte edilen toplam fenolik (TPC) ve flavonoid içeriği (TFC) ve antioksidan aktivitesi üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre genel olarak, bioAgNP'ler, biyokütle birikimi, fenolik bileşikler ve flavonoidleri tetikleme açısından olumlu sonuçlar göstermiştir. KimAgNP'lerin ara konsantrasyonları da ayrıca TPC ve TFC üretimini olumlu etkilemiştir. Ayrıca, farklı bioAgNP konsantrasyonlarının antioksidan aktiviteyi de arttırdığını ortaya koymuştur. Bu çalışmada, bioAgNP'lerin optimal konsantrasyonlarında maksimum hücre

büyümesi ve sekonder metabolit üretimi elde edilmiştir. Yeşil sentezlenmiş AgNP'lerin kullanımı da, sentez ve uygulama sırasında daha az toksisite gösterdiğinden kimAgNP'lere göre daha umut verici bulunmuştur.

Fatima vd. (2020), *Artemisia annua* L.'nin kök, sürgün ve yaprağından elde edilen kalluslarda sekonder metabolitlere ve antioksidan aktivitelerine farklı konsantrasyonlarda ZnO, CuO ve CoO NP'lerin etkisini incelemiştir. Kallus biyokütlesi yüksek NP konsantrasyonlarından etkilenmiştir. Fenolik içerik, sürgün kallusunda 0.1 mg/l CuONP uygulamasında maksimum olarak (60 µg) gözlenmiştir. Toplam antioksidan aktivite, kök kallusunda 0.1 mg/l ZnONP uygulamasında maksimum olarak (33 µg) gözlenmiştir. Kök kallusunda 0,05 mg/l CoONP konsantrasyonunda toplam indirgeme gücü maksimum olarak (33 µg) gözlenmiştir. Sürgün kallusunda maksimum radikal süpürme aktivitesi 0.05 mg/l ZnONP de gözlenmiştir. Rutin, gallik asit ve kafeik asit örnekleri HPLC ile belirlenmiştir. Bu çalışma, CuONP'lerin *A. annua* bitkisinde sekonder metabolitlerin uyarılması üzerinde olumlu etkiye sahip olduğu sonucuna varmıştır.

Karakaş (2020), AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarının (0, 0.25, 0.5, 1, 1.5 ve 2 mg/l) *Isatis constricta* bitkisinin *in vitro* yetiştirilen sürgünlerinin yapraklarındaki indigo, indirubin ve triptantrin bileşiklerinin üretimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Uygulamadan sonraki 5 günde 2 mg/l AgNP (1003 ± 11.42 µg/g) ile desteklenmiş MS ortamında oluşan sürgünlerin yapraklarında indigo üretimi kontrol uygulamasının 1.15 katı (869 ± 8.33 µg/g) olmuştur. Triptantrin üretimi tüm AgNP uygulamalarında artış göstermiştir. Ancak en yüksek artış 2 mg/l (4,59 ± 0,046 µg/g) konsantrasyonunda gözlenmiş ve bu artış kontrolün 1,71 katı (2,68 ± 0,031 µg/g) kadar olmuştur. Bu çalışma, *in vitro* ortamda AgNP uygulamalarının farklı konsantrasyonları ve uygulama sürelerinin *I. constricta*'nın yaprak eksplantında indigo, indirubin ve triptantrin üretimi üzerinde farklı etkiler gösterdiğini göstermiştir. AgNP uygulamalarının, *in vitro* koşullarda indirubin miktarını azalttığı için üretiminde etkili olmazken, indigo ve triptantrin üretiminde miktarlarını artırdığından dolayı olumlu etki göstermiştir.

Ali vd. (2019), *Caralluma tuberculata* bitkisinin kallus kültürlerinde NP'lerin biyokütle ve antioksidan sekonder metabolit üretimine etkilerini araştırmak için farklı

oranlarda AgNP'ler ve bitki büyüme düzenleyicileri (PGR'ler) eklemiştir. Sonuçlar, çeşitli AgNP konsantrasyonlarının, MS (Murashige ve Skoog) ortamında PGR'ler ile birleştirildiğinde kallus çoğalmasında önemli ölçüde etkilediğini ve kallus biyokütlesini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. En yüksek taze (0.78 g/l) ve kuru (0.051 g/l) kallus biyokütle birikimi, 0.5 mg/l 2,4-D artı 3.0 mg ile kombinasyon halinde 60 µg/l AgNP'lerde, *in vitro* olarak yetiştirilen kültürlerde gözlenmiştir. MS ortamına eklenmiş 90 µg/l AgNP'lerin kallus kültürlerinin fitokimyasal analizi, kallusta sırasıyla daha yüksek fenolik üretimi (TPC: 3.0 mg), flavonoidler (TFC: 1.8 mg), fenilalanin amonyaliz aktivitesi (PAL: 5.8 U/mg) ve antioksidan aktivite (%90) göstermiştir. Ayrıca, MS ortamında kallus çoğalması için tek başına ilave edilen AgNP'lerin daha yüksek seviyesinde (90 µg/l), süperoksit dismutaz (SOD: 4.8 U/mg), peroksidaz (POD: 3.3 U/mg), katalaz (CAT: 2.5 U/mg) ve askorbat peroksidaz (APX: 1.9 U/mg) gibi antioksidan enzimlerin aktivitelerini arttırmıştır. Bu çalışmanın, AgNP'lerin, oldukça şifalı ve nesli tehdit altında bir bitki olan *C. tuberculata*'nın kallus kültürlerinde biyoaktif antioksidanların artırılması için etkin bir şekilde kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır. Bu protokol, *C. tuberculata*'da bitki biyokütlesinin ve farmakolojik olarak güçlü metabolitlerin endüstriyel üretimi için kullanılabilir bulunmuştur.

Ebadollahi vd. (2019), perlit NP'lerinin ve TiO₂/perlit nanokompozitlerinin (NC'ler) *Hypericum perforatum* kallus kültürlerinin büyüme özellikleri ve sekonder metabolit üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Perlit NP'lerin ve TiO₂/perlit NC'lerin kültür ortamına 25–200 mg/l konsantrasyon aralığında eklenmesi, *H. perforatum* kalluslarının büyüme özellikleri üzerinde olumsuz bir etki göstermediği belirtilmiştir. GC-MS analizine göre, perlit NP'lerinin ve TiO₂/perlit NC'lerinin neden olduğu stres, uçucu bileşiklerin çeşit, miktar ve sayısında artışa neden olmuştur. *In vitro* yetiştirilen bitkilerden elde edilen kalluslar, nanomateryal stres koşulları altında tarlada yetiştirilen bitkilerden elde edilen kalluslara göre daha fazla uçucu bileşikler üretmiştir. İstenilen nanomalzemelerin ortaya çıkarılması altında kallus kültürlerinde, hiperisin ve psödohiperisin üretimi gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, perlit NP'lerinin ve TiO₂/perlit NC'lerinin, *H. perforatum*'un kallus kültürlerinde uçucu bileşikler, hiperisin ve psödohiperisin üretimi için etkili elisitörler olarak kabul edilebileceğini göstermektedir.

Mosavat vd. (2019), yaptıkları çalışmada 3 farklı *Thymus* türü (*T. vulgaris*, *T. daenensis* ve *T. kotschyanus*) ve *Zataria multiflora* bitkisi üzerinde ZnO NP'lerin kallus çoğalması ile timol ve karvakrol üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla, farklı bitki büyüme düzenleyicileri (PGR'ler) içeren MS besiyerinde kallus indüksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kallus büyümesinin optimizasyonundan sonra, farklı ZnONP konsantrasyonlarının (100 ve 150 mg/l) etkileri araştırılmıştır. 2 mg/l 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 1 mg/l kinetin (Kin) içeren MS ortamı, *T. kotschyanus*'ta önemli ölçüde en yüksek taze kallus ağırlığını (0.18 g) ortaya çıkarmıştır. Benzer koşullardaki en yüksek kallus büyüme hızı (0,079 mm/gün) *T. vulgaris*'te saptanmıştır. Ayrıca 2,5 mg/l 2,4-D içeren MS'de, en yüksek kallus indüksiyonu (%92,50) *T. kotschyanus* tarafından sağlanmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile değerlendirilen en yüksek timol (22,8 mg/l) ve karvakrol (0,68 mg/l) içeriği ile ilgili olarak en iyi sonuçlar *T. kotschyanus* ve *T. daenensis* türlerinde görülmüştür.

Chung vd. (2018), *Cucumis anguria* saçak kök kültürlerinde fenolik bileşik üretimini arttırmak için gümüş iyonunun (Ag⁺) ve biyolojik olarak sentezlenmiş AgNP'lerinin elisitör olarak etkisini araştırmışlardır. AgNP'lerle muamele edilen saçak köklerin, Ag⁺ ile muamele edilenlere göre önemli ölçüde, daha yüksek miktarda fenolik bileşik (flavonoller, hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitler), toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin üretildiği görülmüştür. AgNP'lerin saçak kök kültürlerinde fitokimyasal üretimi arttırmak için etkili bir elisitör olabileceği öngörülmüştür.

Javed vd. (2018), tıbbi bir bitki olan *Stevia rebaudiana* (şeker otu)'nın yaprak eksplantlarından oluşan kallusların rejenerasyonu için bitki büyüme düzenleyicilerine sahip MS ortamında ZnO ve CuO NP etkilerini araştırmışlardır. ZnO ve CuO NP'lerinin farklı konsantrasyonlarda bulunması, farklı rejenerantlarda farklı fizyolojilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. 1 ve 10 mg/l, çeşitli fizyolojik parametreler açısından en iyi ZnO ve CuO NP konsantrasyonları olarak tespit edilmiştir. Steviol glikozitleri hiçbir kallus uygulamasında tespit edilememiştir. Ayrıca, farklı ZnO ve CuO NP konsantrasyonları altında *S. rebaudiana*'nın fitokimyasal özelliklerinden yararlanılmıştır. En yüksek toplam fenolik içerik (TPC), toplam flavonoid içeriği (TFC), toplam antioksidan kapasite (TAC) ve 1,1-difenil-2-

pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal temizleme aktivitesi 100 mg/l ZnONP'lerinde elde edilirken, TPC, TAC, TRP ve DPPH serbest radikal süpürme aktivitesi en yüksek 10 mg/l CuO NP konsantrasyonunda elde edilmiştir. Bununla birlikte, en yüksek TRP ZnO uygulamasında ve en yüksek TFC CuO uygulamasında, sırasıyla 50 ve 100 mg/l'de elde edilmiştir. Bu çalışma, CuONP'lerin, ZnONP'lerine kıyasla Stevia kallusları için daha toksik olduğunu açıkça göstermektedir. Ayrıca çeşitli tıbbi bitkilerde ticari olarak önemli ikincil metabolitlerin geliştirilmesi için ZnO veya CuO NP uygulamalarının kullanımı için gelecekteki çalışmalar için ışık tutmaktadır.

Bhat ve Bhat (2016), *Capsicum frutescens* bitkisinde AgNP uygulamasının kapsaisin miktarına etkisini araştırmıştır. Bunun için farklı hormon kombinasyonları (5 mg/l BA + 0.1 mg/l NAA, 5 mg/l adenin sülfat + 0.1 mg/l NAA, 5 mg/l Ba + 3 mg/l AgNP, 2 mg/l 2,4-D + 1 mg/l kinetin) bulunana kültür ortamları hazırlanmıştır. Çalışmanın 3. ve 6. günlerinde 3 mg/l AgNP kullanılan ortamlarda kapsaisin miktarında iki kat artış görülmüştür. Yapılan başka bir çalışmada ise Jamshidi vd. (2016), *Corylus avellana* hücre süspansiyon kültüründe 5 mg/l AgNP uygulamasının taksol üretimini oldukça arttırdığını belirtmiştir. Ancak, 2.5 ve 10 mg/l AgNP ile yapılan muamele, hücrelerin taksol üretim potansiyelini sırasıyla kontrole göre %60 ve %56 azaltmıştır.

Fazal vd. (2016), *Prunella vulgaris* L. bitkisinde yaptıkları çalışmada, farklı oranlarda (1:2, 1:3, 2:1 ve 3:1) Ag ve Au NP'leri, tek başına veya kombinasyon halinde naftalin asetik asit (NAA) ile kallus kültürü gelişimi ve sekonder metabolitlerin üretimi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Ag (30 µg/l), AgAu (1:2) ve AgAu NP'ler (2:1), NAA (2,0 mg/l) ile kombinasyon halinde kontrole (%95) kıyasla kallus çoğalmasını (%100) artırmıştır. Test edilen farklı NP'ler arasında, NAA içeren veya içermeyen AuNP'ler, büyüme kinetiğinin log fazlarında (35-42 gün) daha yüksek biyokütle artışında etkili olmuştur. AgAu (1:3) ve AuNP'ler tek başına, toplam protein içeriğini (855 ug-BSAE/mg-taze ağırlık (FW)), süperoksit dismutaz (0,54 nM/dak/mg-FW) ve peroksidaz (0,39 nM/dak/mg-FW) enzimlerini kallus kültürlerinde artırmıştır. NAA ile kombinasyon halindeki AgAu NP'ler (1:3), fenoliklerin (TPC 9,57 mg/g-kuru ağırlık (DW)) ve flavonoid (6,71 mg/g-DW) içeriğinin maksimum birikimini indüklemiştir. Ayrıca, NAA içermeyen AgAuNP'ler (3:1) antioksidan aktiviteyi

(%87.85) arttırmıştır. Bu çalışma, *P. vulgaris*'te NP etkisinin kallus kültürü gelişimi ve doğal antioksidanların üretimi üzerindeki ilk kanıtı sunmaktadır.

Chamani vd. (2015), *Lilium ledebourii*'de bazı biyoaktif bileşenlerin birikiminin MS ortamındaki ZnONP'lerin konsantrasyonuna bağlı değiştiğini ortaya koymuşlardır. Flavonoidlerin, fenoliklerin ve antosiyaninlerin en yüksek içeriği sırasıyla, 25, 75 ve 100 mg/l ZnONP eklene MS ortamlarında elde edilmiştir. Başka bir çalışmada ise Javed vd. (2017), *S. rebaudiana*'nın filiz kültürlerinin steviol glikozid birikimi, MS ortamında güçlendirilmiş 1 mg/l ZnONP'leri ile büyük oranla iyileştirilmiştir. Ayrıca, ZnONP uygulamasıyla toplam flavonoid ve fenolik içeriği de yükselmiştir. Fakat daha yüksek ZnONP konsantrasyonları fitotoksik etkiler yüzünden ikincil metabolit üretimini azaltmıştır.

Shakeran vd. (2015), *Datura metel* bitkisinin saçak kök kültürlerinde biyotik (*Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*) ve abiyotik ($AgNO_3$ ve AgNP) elisitörlerin atropin üretimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Saçak kök kültürleri 12, 24 ve 48 saat elisitörlere maruz bırakılmış ve tüm elisitörlerin, biyokütle birikimini ve atropin üretimini etkilediği tespit edilmiştir. Test edilen elisitörler arasında, AgNP'lerin saçak köklerde atropin içeriğini artırmada en etkili elisitör olduğu belirlenmiştir.

Raei vd. (2014), 0.625 mg/l AgNP veya 120 mg/l TiO_2NP 'leri ile etkileşime geçen *Aloe vera* süspansiyon hücrelerinin aloin içeriği açısından yüksek bir artış yaşadığını gözlemlemiştir. En yüksek aloin içeriği TiO_2NP muamelesinden sonra görülmüştür. Poborilova vd. (2013), tarafından tütün bitkisinde yapılan çalışmada, Al_2O_3NP 'lerin (10 - 100 mg/ml) süspansiyon kültürü fenolik içeriğini önemli miktarda yükselttiği görülmüştür. Hücrelerde fenolik birikimi, doz ve kullanım süresine bağlı olmuştur.

Zhang vd. (2013), *Artemisia annua* saçak kök kültürlerindeki artemisinin içeriği üzerinde AgNP'lerin etkisini incelemiştir. Kültürler 3 gün boyunca 900 mg/l AgNP'lerle muamele edilince artemisinin içeriği 1.67 mg/g kuru ağırlıktan, 2.86 mg/g kuru ağırlığa yükselmiştir. AgNP uygulamaları, 20 günlük saçak kök kültürlerinde artemisinin üretimini 13.3 mg/l ye yükselterek, kontrol grubuna göre %3.9 oranında artış sağlamıştır. Bu sonuçlar, AgNP'lerin, bitki sekonder metabolitlerinin üretimi için bitki biyoteknolojisinde yeni ve etkili bir elisitör olarak kullanılabileceğini

göstermektedir. Benzer bir çalışmada ise en yüksek artemisinin içeriği (kontrol ile 2.2 katına çıkmıştır) 5 mg/l CoNP'lerle 24 saat muamele edilen *A. annua* hücre süspansiyon kültürlerinde de gözlemlenmiştir.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez çalışmasında, bitkisel materyal olarak *M. officinalis* L. (oğulotu) türüne ait fideler kullanılmıştır. Fideler yerel fidancılardan temin edilmiş olup, 3:1 oranında torf toprağı:kum karışımı ile saksılara dikimleri yapılmıştır. Fideler denemelerde kullanılmaya kadar gelişimlerini sağlamak için Biyoloji Bölümüne ait Bitki Biyoteknolojisi Laboratuvarı'nda bitki büyüme odasında uygun şartlarda yetiştirilmiştir (Şekil 3.1). Haftada 2 kez düzenli olarak sulamaları yapılmıştır. Yetiştirilme koşulları olarak; 16 / 8 saat (ışık / karanlıkta), $24 \pm 2^\circ\text{C}$ / $18 \pm 2^\circ\text{C}$ (ışık / karanlık) sıcaklık, 12 000 lüks ışık şiddeti ve % 51-54 nem oranı (PeakTeach 3695) ayarlanmıştır. Eksplant çeşidi olarak yetiştirilen bitkinin genç yaprakları kullanılmıştır.



Şekil 3.1. Bitki büyüme odasında yetiştirilen *M. officinalis* L. (Oğulotu) bitkileri

3.2. Yöntem

3.2.1. Ortam sterilizasyon koşulları

Denemelerin gerçekleştirildiği laboratuvarın zemin temizliği her işlem öncesi seyreltilmiş ticari çamaşır suyu ile yapılmıştır. Her çalışma öncesinde steril kabin kapağında bulunan UV-C lamba ½-1 saat çalıştırılarak kabin sterilizasyonu sağlanmıştır. Ayrıca, çalışma öncesinde steril kabin içi %70'lik etil alkol ile silinmiş

ve 10 dakika (dk) boş olarak çalıştırılmıştır. Çalışmalarda kullanılacak malzemelerin (cam beherler, cam petriler, pinsetler ve saf su) sterilizasyonu ise, 121 °C'de, 1.1 atm basınçta (1 kg/cm²), 40 dk boyunca otoklavda gerçekleştirilmiştir.

3.2.2. Yaprak eksplantlarının yüzey sterilizasyonu

Eksplantların yüzey sterilizasyonu için 30-40 günlük fidelerden seçilen genç yapraklar ilk önce makas yardımıyla saplarından kesilerek temiz beherlere aktarılmıştır. Daha sonra akan çeşme suyu altında 2-3 kez yıkanarak toprak kalıntılarından iyice arındırılmış, sonrasında ise steril kabine aktarılmıştır. Steril kabin içerisindeki yaprak eksplantlarının yüzey sterilizasyonu önceden 121°C'de, 1.1 atm basınçta (1 kg/cm²) ve 40 dk süreyle otoklavlanmış steril beherler içerisinde yapılmıştır (Şekil 3.2). Bunun için ilk etapta eksplantlar %70'lik etil alkol içerisinde 1 dakika bekletilmiş, ardından 5 kez birer dk süreyle steril saf su ile durulanmıştır. İkinci etapta, temiz behere aktarılan eksplantlar %10'luk NaOCl çözeltisi ve iki damla Tween-20 eklenerek 5 dk boyunca işlem yapılmıştır. Son işlem etabında ise 5 kez birer dk süreyle steril saf su ile yıkanarak eksplant yüzey sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

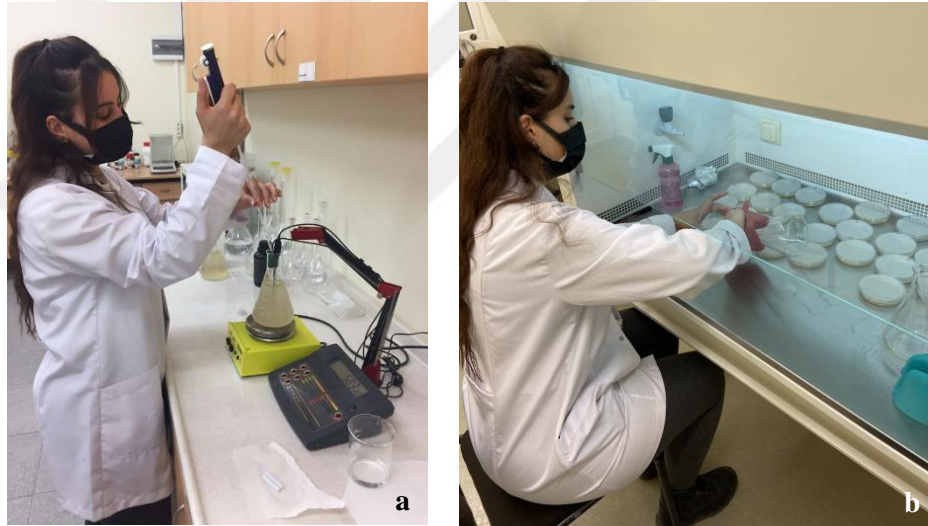


Şekil 3.2. Yaprak eksplantlarının steril kabin içerisindeki yüzey sterilizasyonu

3.2.3. AgNP içeren besin ortamlarının hazırlanması

Yapılan çalışmalarda, besin ortamlarının hazırlanması için steril erlenmayerler kullanılmıştır. Kültür ortamı olarak hazır (Sigma M9274-1L) MS (Murashige ve

Skoog, 1962) besin ortamı kullanılmıştır. Besin ortamına, bitki büyüme düzenleyicilerinden 2.0 mg/l BAP (Sigma B3274-50ml) ve 1.0 mg/l NAA (Sigma N1641-50ml), 1.0 mg/ml'lik stok solüsyonlarından alınarak eklenmiştir. Ayrıca, AgNP [Sigma-Aldrich 730807- 40nm (TEM)] lerin çeşitli konsantrasyonları (0, 25, 50, 75 ve 100 µg/l) 0.02 mg/ml olarak hazırlanmış stok solüsyonlarından alınarak besin ortamına ilave edilmiştir. Daha sonra ortam pH'ı 5.8 olacak şekilde, NaOH (0.1 ve/veya 1 N) veya HCl (0.1 ve/veya 1 M) çözeltileri ile ayarlanmıştır (Şekil 3.3.a). Erlenmayerlerde hazırlanan ortamların ağızları yeterli miktarda pamuk ve alüminyum folyo ile kapatılarak sterilizasyon işlemleri için otoklava konulmuştur. Otoklav, 121 °C'de, 1.1 atm basınçta (1 kg/cm²) ve işlem süresi 20 dk olarak ayarlanmıştır. Sterilizasyon işlemi tamamlanan kültür ortamlarının dağıtımları, tek kullanımlık steril plastik petri kaplarına (90 mm) 2/3 oranında (~ 20 ml) olacak şekilde steril kabinde gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3.b).

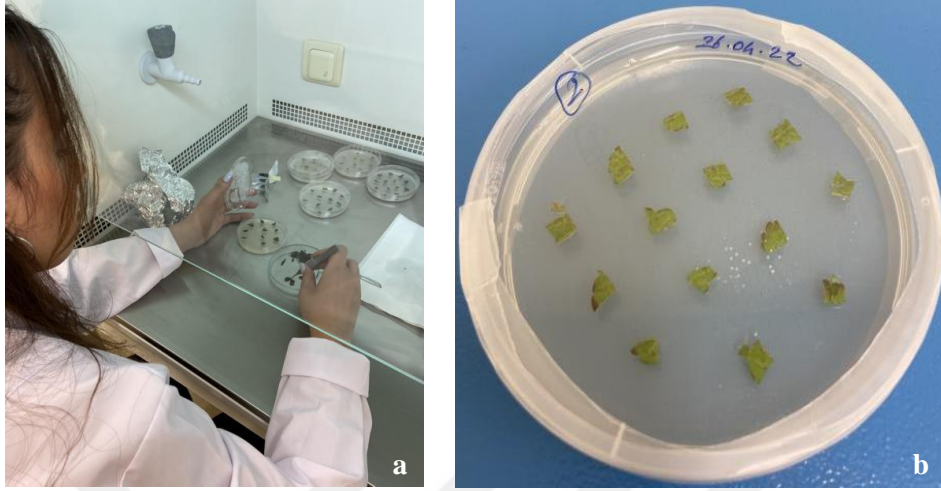


Şekil 3.3. Besin ortamlarının hazırlanması (a) pH ayarlanması ve (b) besin ortamının petrilere dökülmesi

3.2.4. Eksplantların kültür ortamına ekimi ve kallus oluşumundan sonra ölçümlerinin yapılması

Sterilizasyon işlemleri sonrasında yaprak eksplantları, steril bistüri yardımıyla 0.5-1 cm² parçalara ayrılmıştır. Daha sonra, kallus gelişimi için hazırlanan MS ortamlarına

steril pinset ile ekimleri yapılmıştır (Şekil 3.4.a). Her bir petriye ortalama 16 eksplant eşit aralıklarla yerleştirilmiştir (Şekil 3.4.b).



Şekil 3.4. (a) Yaprak eksplantlarının MS ortamına ekilmesi ve (b) petri kabına yerleştirilen oğulotu yaprak parçaları

Tüm petrilerin etrafı kontaminasyon riskini önlemek amacıyla parafilm ile iki tur çevrilerek sarılmıştır. Kallus oluşumu için tüm petriler inkübatöre yerleştirilerek, 30-35 gün süreyle $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve karanlık koşullarda tutulmuştur. 30-35 gün sonunda oluşum gösteren kallusların kallus oluşum oranları (%), çapları (cm), ağırlıkları (g) ölçülüp renk (beyaz, yeşil veya kahverengi) ve tipleri (sıkı veya gevşek) belirlenmiştir. Sonrasında tüm kalluslar sekonder metabolit analizi için falkon tüplere alınmıştır.

Kallus oluşum oranları; ekimi yapılan her bir petrideki kallus oluşturan örnekler sayılmış ve yüzde oranları hesaplanmıştır:

Kallus oluşum oranı (%) = $(\text{Kallus oluşturan eksplantların sayısı} / \text{petrideki toplam eksplant sayısı}) \times 100$

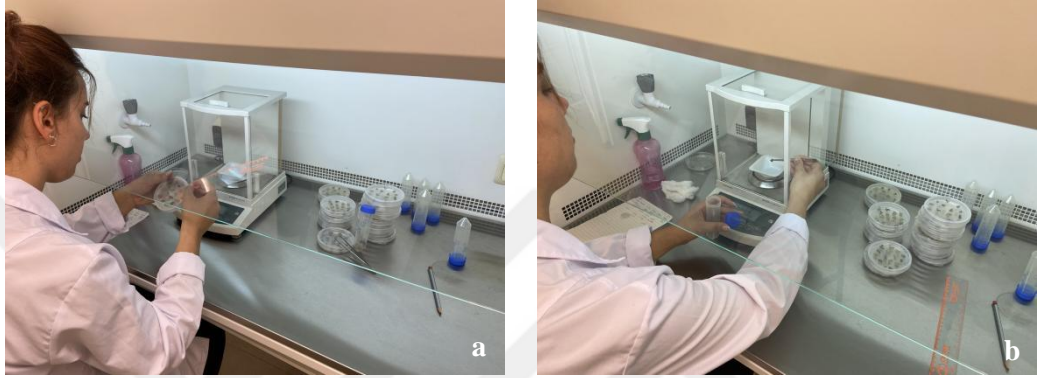
Kallus çaplarının ölçümü (Şekil 3.5.a); steril kabin içerisinde her bir kallusun cetvel yardımıyla ölçümleri (cm) yapılmıştır.

Kallus çapı (cm) = $\sqrt{\text{uzunluk} \times \text{genişlik}}$

Kallus ağırlıklarının ölçümü (Şekil 3.5.b); steril kabin içerisinde her bir kallusun hassas terazi yardımıyla ağırlıkları (g) ölçülmüştür.

Kallus renkleri; kallusların beyaz, yeşil ya da kahverengi renkleri morfolojik olarak tespit edilmiştir.

Kallus tipleri; kallusların sıkı ya da gevşek yapısı morfolojik olarak tespit edilmiştir.



Şekil 3.5. Steril kabin içerisinde kallusların (a) çaplarının ve (b) ağırlıklarının ölçümü

3.2.5. Kalluslarda oluşan sekonder metabolitlerin tayini

Kallus oluşumundan sonra gelişimlerinin devam etmesi için kültürler iki kez aynı ortamda alt kültüre alınmıştır. Kalluslar (hücrelerin hızlı büyüme safhalarının oldukları alt kültürün 12. gününde), uçucu yağ analizi ve fenolik bileşiklerin tayini için steril kapaklı falkon tüplerine alınarak -20 °C'de depolanmıştır (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Steril falkon tüplerine alınan kalluslar

Numune hazırlama işlemleri SDU-YETEM (Yenilikçi Teknolojiler Uygulama ve Araştırma Merkezi) tarafından gerçekleştirilmiştir. Kalluslardaki sekonder metabolit miktarının belirlenmesi amacıyla alınan kallus örnekleri, havanda sıvı azot kullanılarak iyice ezilmiştir. Sıvı azotla ezilen örneklerden 2 g alınarak üzerine 10 ml %96'lık etil alkol ilave edilerek 2 dakika süreyle homojenizatörde karıştırılmıştır. Ardından 1 gece 45°C'deki su banyosunda bekletilmiştir. Bu süre sonunda örnekler, 5 dk süreyle 4000 d/d'de santrifüj edilerek fenolik bileşikleri içeren süpernatant kısım alınarak 45°C'de tamamen kuruncaya kadar rotary evaporatörde uçurulmuştur (Çetin vd., 2011). Daha sonra ekstrantlar metil alkolde çözülerek ölçüm için hazır hale getirilmiştir. Fenolik madde analizi HPLC (Çizelge 3.1), uçucu yağ analizleri ise GC-MS/SPME (Çizelge 3.2) cihazları ile ölçülmüştür. Analizler, SDU-YETEM'de yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Fenolik bileşiklerin ölçüldüğü HPLC cihazının özellikleri

Parametreler	Özellikler
Marka	Shimadzu
Dedektör	DAD dedektör ($\lambda_{max} = 278nm$)
Otomatik örnekleyici	SIL-10AD vp
Sistem kontrol ünitesi	SCL-10Avp
Pompa	LC-10ADvp
Gaz arındırıcı	DGU- 14A
Kolon fırını	CTO-10Avp
Kolon	Agilent Eclipse XDB-C18 (250 x 4,60 mm) 5 mikron
Mobil faz	A: %3 asetik asit, B: Metanol
Akış hızı	0.8 ml/dakika
Kolon sıcaklığı	30 °C
Enjeksiyon hacmi	20 mikrolitre

Çizelge 3.2. Aromatik bileşiklerin ölçüldüğü GC-MS/SPME cihazının özellikleri

Parametreler	Özellikler
Kullanılan Cihaz	Shimadzu (Japan) GC- 2010 Plus Shimadzu GCMS-QP2010 SE (Dedektör)
Enjeksiyon Bloğu	250 °C
Dedektör	250 °C
Akış Hızı	1,61 ml/dakika
Dedektör	70 eV
İyonlaştırma Türü	EI
Kullanılan Gaz	Helyum
Kullanılan Kolon	Restek Rx-5Sil MS 30 m * 0.25 mm, 0.25 um katalog no: Restek 13623
Sıcaklık Programı	40 °C de 2 dakika bekledikten sonra 250 °C'ye dakikada 4 °C'lik artışla ulaşıyor. 250 °C'de 5 dakika bekliyor.
Kullanılan Kütüphaneler	Wiley, Nist, Tutor, FFNSC
SPME Şartları	Fused silica SPME fiber CAR/PDMS numune 60 °C de fibersiz 15 dakika fiber ile 30 dakika bekletilip 250° C de desorbe edilir. Katalog no: supelco 57318
SPME VİAL	Supelco 27159 15 mL clear PTFE /Silicone septa Cap

3.2.6. Veri Analizi

Denemeler, Tesadüf Parselleri Deneme Desenine göre 3 tekrarlamalı olarak yürütülmüştür. Her bir tekrarda bir çeşit deneme için 30 petri kullanılmıştır. Bir petriye ortalama 16 eksplant yerleştirilmiştir. Eksplant tipi olan yaprak parçalarının AgNP'nin farklı konsantrasyonlarında kallus kültürüne ve sekonder metabolitlere olan etkileri karşılaştırılmıştır. Toplamda 5 çeşit deneme kurulmuştur;

1. MS + 2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA (Kontrol)
2. MS + 2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA + 25 µg/l AgNP
3. MS + 2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA + 50 µg/l AgNP
4. MS + 2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA + 75 µg/l AgNP
5. MS + 2.0 mg/l BAP + 1.0 mg/l NAA + 100 µg/l AgNP

Elde edilen verilerin SPSS (ver:23.0) paket programından yararlanılarak istatistiksel değerlendirilmesi varyans analizi (ANOVA) ve Duncan 's Multiple Range Testine göre yapılmıştır. Sonuçlar SPSS ortamında $p \leq 0.05$ önem düzeyinde tanımlanmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Oğulotu bitkisine ait yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslara farklı konsantrasyonlarda uygulanan AgNP'lerin kallus oluşumu, ağırlığı, çapı, yapısı ve rengi ile fenolik ve aromatik bileşiklerin birikimi üzerine olan etkilerini araştıran bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda şekil ve çizelgeler halinde verilmiştir. AgNP'lerin en etkili dozununun belirlenmesi için MS ortamına çeşitli konsantrasyonlarda (0, 25, 50, 75 ve 100 µg/l) AgNP ve bitki büyüme düzenleyicilerinden BAP (2.0 mg/l) ve NAA (1.0 mg/l) eklenerek toplamda 5 farklı uygulama yapılmıştır.

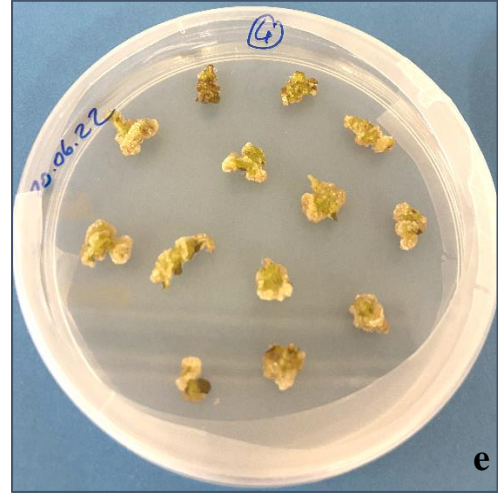
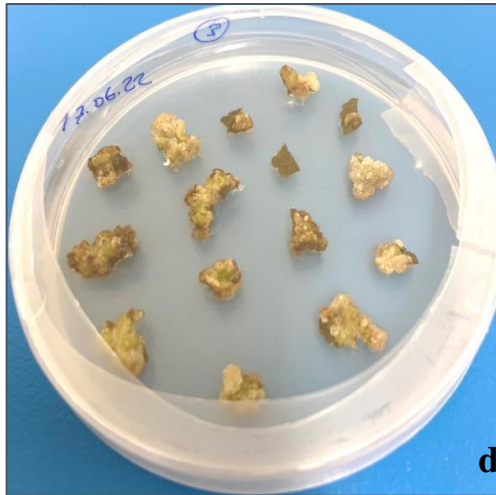
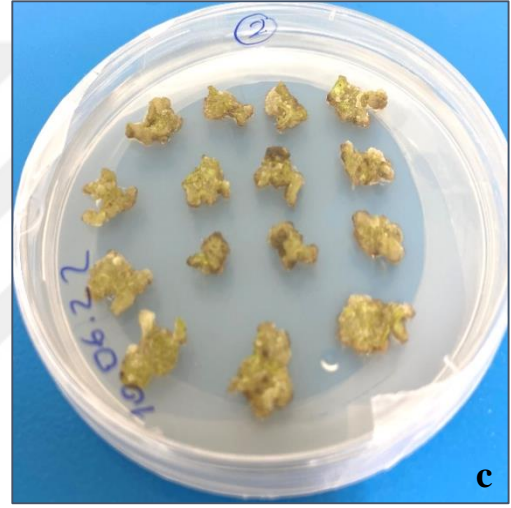
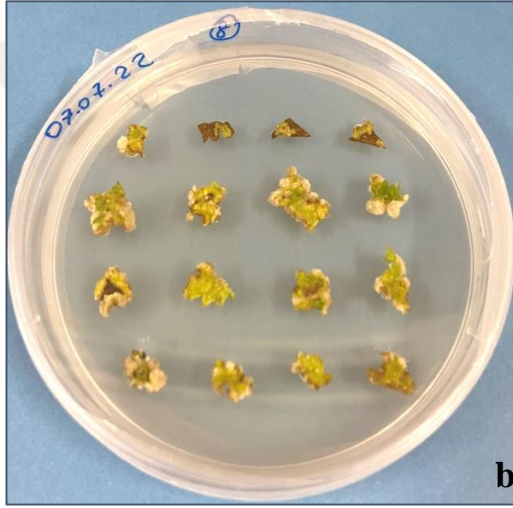
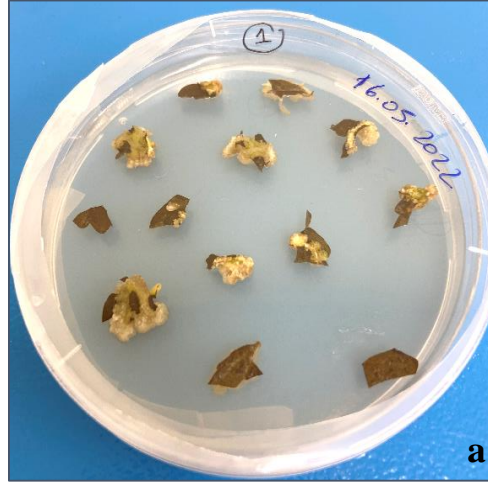
4.1. Oğulotu Bitkisinde AgNP Uygulamalarının Kallus Oluşumu, Ağırlığı, Çapı, Yapısı ve Rengi Üzerine Etkileri

Araştırmada kallus kültüründe incelenen özellikler kallus oluşum oranları, ağırlıkları, çapları, yapıları ve renkleri olup, denemelerde 5 farklı AgNP uygulaması sonucunda kallus oluşum oranlarının istatistiksel olarak önemli derecede değiştiği görülmüştür ($p<0.05$). Farklı konsantrasyonlarda uygulanan AgNP ile kallus yapıları sıkı bir yapı oluştururken (Şekil 4.1), kallus oluşum oranları, ağırlıkları, renkleri ve çapları farklılıklar göstermiştir. Elde edilen veriler Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. AgNP uygulamalarının kallus oluşumu, ağırlığı, çapı, yapısı ve rengi üzerine etkisi

Uygulamalar	Kallus Oluşum Oranı (%)	Kallus Ağırlığı (g)	Kallus Çapı (cm)	Kallus Yapısı	Kallus Rengi
2 mg/l BAP+1 mg/l NAA (kontrol)	78.7 ^d	0.051 ^e	0.8 ^{bc}	Sıkı	Kahverengi
2 mg/l BAP+1 mg/l NAA+ 25 µg/l AgNPs	93.8 ^b	0.187 ^b	0.9 ^b	Sıkı	Beyaz Yeşil
2 mg/l BAP+1 mg/l NAA+ 50 µg/l AgNPs	97.8 ^a	0.196 ^a	1.1 ^a	Sıkı	Yeşil
2 mg/l BAP+1 mg/l NAA+ 75 µg/l AgNPs	92.4 ^b	0.152 ^c	0.8 ^{bc}	Sıkı	Kahverengi Yeşil
2 mg/l BAP+1 mg/l NAA+ 100 µg/l AgNPs	87.9 ^c	0.145 ^d	0.7 ^c	Sıkı	Kahverengi Yeşil

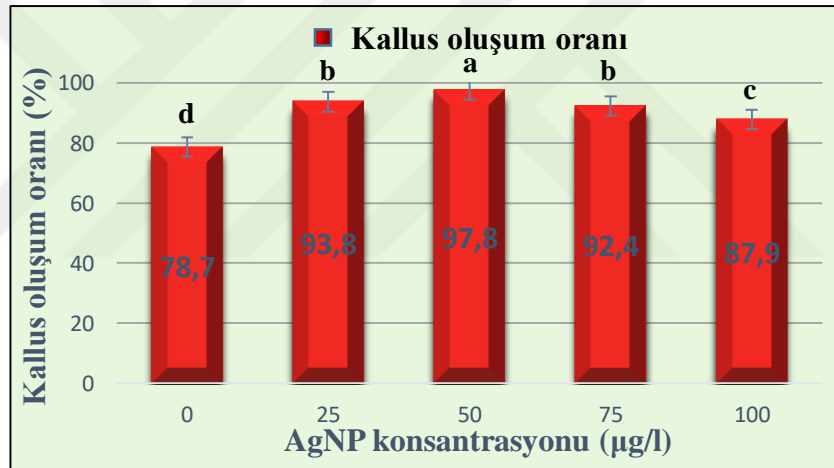
*Her bir sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunur ($p\leq 0.05$).



Şekil 4.1. Oğulotu (*Melissa officinalis* L.) bitkisinde farklı AgNP uygulamalarında oluşan kalluslar a) 0 µg/l AgNP (kontrol), b) 25 µg/l AgNP, c) 50 µg/l AgNP, d) 75 µg/l AgNP, e) 100 µg/l AgNP

4.1.1. AgNP uygulamalarının kallus oluşumu üzerine etkisi

Yapılan uygulamalarda farklı AgNP konsantrasyonlarının (0, 25, 50, 75 ve 100 µg/l) kallus oluşumu üzerine etkileri Şekil 4.2’de verilmiştir. Şekil incelendiğinde, en yüksek kallus oluşum oranı %97.8 ile 50 µg/l AgNP’nin kullanıldığı uygulamada tespit edilmiştir. Bu uygulamayı 25 ve 75 µg/l AgNP konsantrasyonlarının takip ettiği ve bu uygulamalarda kallus oluşum oranlarının sırasıyla %93.8 ve %92.4 olduğu görülmüştür. En düşük kallus oluşum oranı ise %78.7 ile kontrol grubunda saptanmıştır. Şekil incelendiğinde kallus oluşum oranı üzerinde AgNP uygulamalarının olumlu bir etkisinin olduğu ve bu olumlu etkinin 50 µg/l AgNP uygulamasına kadar konsantrasyon artışı ile doğru orantılı olarak arttığı, 75 ve 100 µg/l AgNP uygulamalarında ise azaldığı tespit edilmiştir.

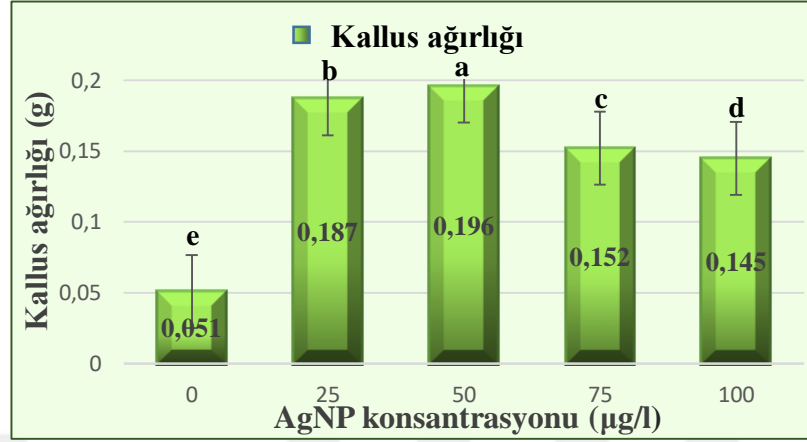


Şekil 4.2. AgNP uygulamalarının kallus oluşumu üzerine etkisi

4.1.2. AgNP uygulamalarının kallus ağırlığı üzerine etkisi

Kallus ağırlığı bakımından yapılan istatistiksel analizler sonucunda, AgNP uygulamaları ile kallus ağırlığının önemli derecede değiştiği görülmüştür ($p < 0.05$). Şekil 4.3’te görüldüğü gibi, tüm AgNP uygulamaları kallus ağırlıklarını önemli derecede artırmış, en yüksek kallus ağırlığı 0.196 g ile 50 µg/l AgNP uygulaması ile elde edilmiştir. Bu değer en düşük değerin görüldüğü kontrol grubuna (0.051 g) kıyasla 3.84 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. 50 µg/l AgNP uygulamasını 0.187 g ile 25 µg/l AgNP uygulaması takip ederken, 75 ve 100 µg/l AgNP

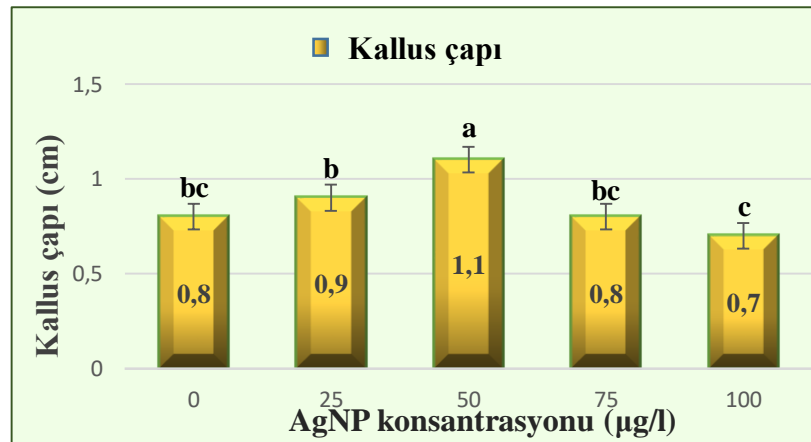
konsantrasyonlarında bu uygulamalara göre sırasıyla 0.152 ve 0.145 g kallus ağırlıkları ile bir düşüş görülmüştür.



Şekil 4.3. AgNP uygulamalarının kallus ağırlığı üzerine etkisi

4.1.3. AgNP uygulamalarının kallus çapı üzerine etkisi

Araştırmada farklı konsantrasyonlardaki AgNP uygulamalarının kallus çapı üzerindeki etkisi Şekil 4.4'te sunulmuştur. Kallus çapları 0.7 ve 1.1 cm arasında değişiklik göstermiştir. Kallus çapının en yüksek olduğu uygulama 1.1 cm ile 50 µg/l AgNP konsantrasyonu iken, en düşük kallus çapı ise 0.7 cm ile 100 µg/l AgNP konsantrasyonunda ölçülmüştür. 25 µg/l AgNP uygulamasında kallus çapı 0.9 cm iken, kontrol grubu ve 75 µg/l AgNP uygulamasında bu oran 0.8 cm olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. AgNP uygulamalarının kallus çapı üzerine etkisi

AgNP uygulamalarının farklı konsantrasyonları arasında, 50 µg/l AgNP uygulamasının en fazla kallus oluşturduğu ve yine en yüksek kallus ağırlığı ile en uzun kallus çapının bu uygulamada ölçüldüğü tespit edilmiştir. Kontrol grubunun (0.0 µg/l AgNP) ise en düşük kallus oluşumu gösterdiği ve kallus ağırlığının da diğer uygulamalara göre daha az olduğu saptanmıştır ($p \leq 0.05$).

4.1.4. AgNP uygulamalarının kallus yapısı ve rengi üzerine etkisi

Uygulamalar sonrasında yapılan morfolojik gözlemlere göre, farklı konsantrasyonlarda uygulanan AgNP'lerin kallus oluşum oranlarında değişkenlik gösterdiği ancak kallus yapısının tüm uygulamalarda sıkı formda olduğu tespit edilmiştir.

Kalluslar üzerinde gözlemlenen renkler ise; kontrol grubunda kahverengi, 25 µg/l AgNP konsantrasyonu uygulamasında beyaz-yeşil, 50 µg/l AgNP konsantrasyonu uygulamasında yeşil, 75 ve 100 µg/l AgNP konsantrasyonları uygulamalarında ise kallus renkleri kahverengi-yeşil olarak tespit edilmiştir.

4.2. AgNP Uygulamalarının Oğulotu Kallus Kültüründe Fenolik Bileşikler Üzerine Etkisi

Yapılan *in vitro* uygulamalarda *M. officinalis* yaprak eksplantlarının MS ortamına ekilmesi sonucu meydana gelen kallusların analizleri sonrasında, HPLC cihazı ile rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, proto-kateşik asit, hesperidin ve p-kumarik asit şeklinde tespit edilen 6 fenolik bileşiğin değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Buna göre, oğulotu yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslardan ölçülen fenolik bileşik miktarlarının farklı AgNP uygulamalarına göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$).

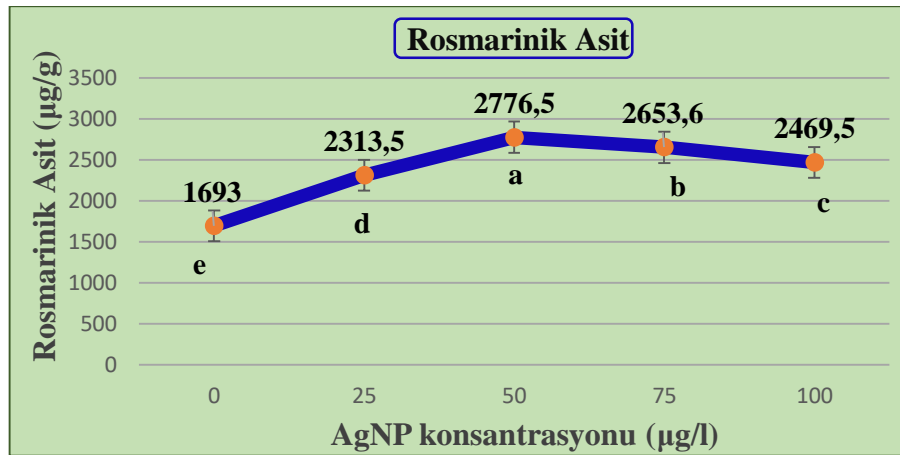
Çizelge 4.2. AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarının fenolik bileşikler üzerine olan etkileri

AgNP Konsantrasyonları (µg/l)	Rosmarinik asit (µg/g)	Kafeik asit (µg/g)	Klorojenik asit (µg/g)	Proto-kateşik asit (µg/g)	Hesperidin (µg/g)	p-Kumarik asit (µg/g)
Kontrol	1693.0 ^e	34.8 ^d	4.7 ^d	3.5 ^d	3.9 ^d	0.6 ^{bc}
25	2313.5 ^d	38.4 ^c	5.4 ^c	4.6 ^c	4.1 ^c	0.5 ^c
50	2776.5 ^a	40.5 ^b	6.1 ^b	5.4 ^b	7.3 ^a	0.7 ^b
75	2653.6 ^b	46.7 ^a	9.4 ^a	7.3 ^a	7.2 ^a	1.3 ^a
100	2469.5 ^c	34.9 ^d	6.4 ^b	5.1 ^b	5.8 ^b	0.5 ^c

*Her bir sütunda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunur ($p \leq 0.05$).

4.2.1. AgNP uygulamalarının rosmarinik asit miktarı üzerine etkisi

Araştırmada, oğulotu yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslardaki rosmarinik asit miktarının kontrol grubunda 1693.0 µg/g olarak tespit edilirken, yapılan tüm AgNP uygulamalarının kontrole göre rosmarinik asit miktarını önemli ölçüde artırdığı belirlenmiştir ($p \leq 0.05$). Elde edilen veriler Şekil 4.5'te sunulmuştur.

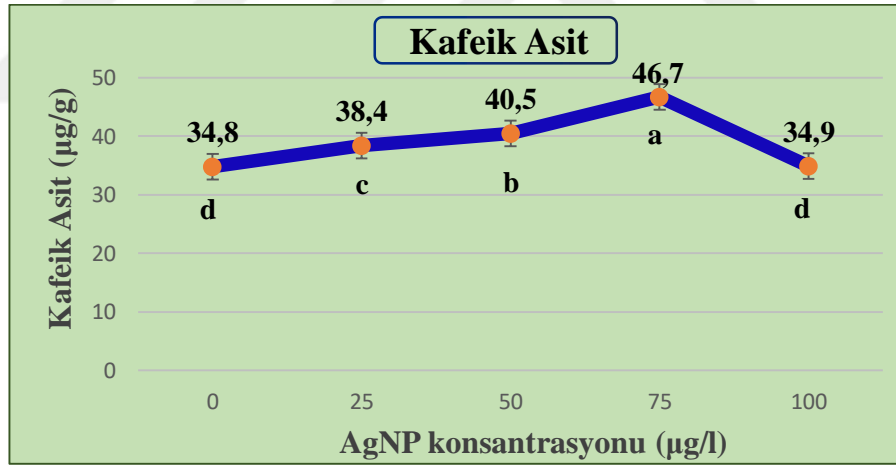


Şekil 4.5. AgNP uygulamalarının rosmarinik asit miktarı üzerine etkisi

Kalluslardaki en yüksek rosmarinik asit miktarı 2776.5 µg/g ile 50 µg/l AgNP konsantrasyonu uygulamasında tespit edilmiştir. Bu değer, 50 µg/l AgNP varlığının kontrol grubuna göre rosmarinik asit miktarını 1,6 kat artırdığını göstermiştir. Bu artışı 2653.6, 2469.5 ve 2313.5 µg/g ile sırasıyla 75, 100 ve 25 µg/l AgNP uygulamaları takip etmiştir.

4.2.2. AgNP uygulamalarının kafeik asit miktarı üzerine etkisi

Oğulotu yaprak eksplantlarından oluşan kalluslarda meydana gelen kafeik asit miktarı Şekil 4.6'da görüldüğü gibi, 25, 50 ve 75 µg/l AgNP uygulamalarındaki artışa paralel olarak artış göstermiştir ($p \leq 0.05$). En yüksek kafeik asit miktarı 46.7 µg/g ile 75 µg/l AgNP uygulamasında görülmüştür. Diğer uygulamalarda ise bu oran sırasıyla 50 µg/l AgNP konsantrasyonunda 40.5 µg/g ve 25 µg/l AgNP konsantrasyonunda 38.4 µg/g şekilde artış göstermiştir. En düşük kafeik asit miktarı ise 100 µg/l AgNP konsantrasyonunda 34.9 µg/g ve kontrol grubunda 34.8 µg/g olarak tespit edilmiştir.

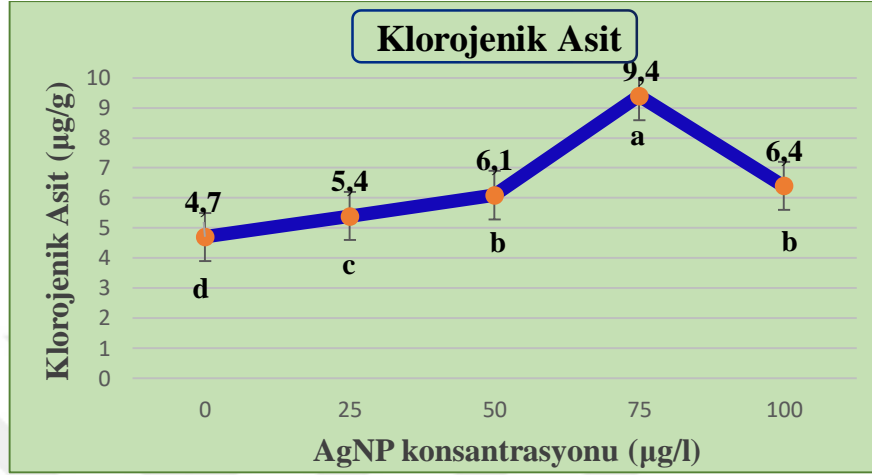


Şekil 4.6. AgNP uygulamalarının kafeik asit miktarı üzerine etkisi

4.2.3. AgNP uygulamalarının klorojenik asit miktarı üzerine etkisi

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik de klorojenik asit olup, Şekil 4.7'deki verilerin incelenmesinden de görüldüğü gibi tüm AgNP uygulamalarında klorojenik asit miktarında kontrol grubuna göre bir artış tespit edilmiştir. En yüksek klorojenik asit miktarı 9.4 µg/g ile 75 µg/l AgNP uygulamasında olduğu ve bu oranın kontrol

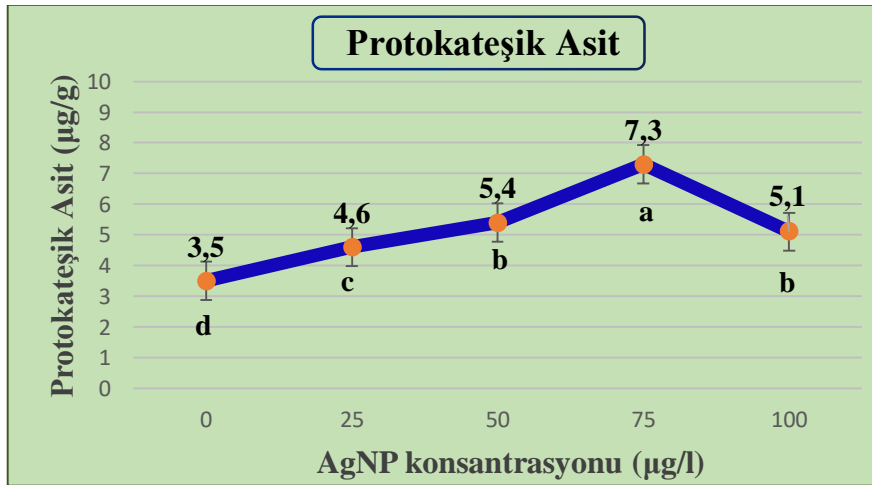
grubuna (4.7 µg/g) kıyasla 2 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir. Diğer uygulamalarda da klorojenik asit miktarı kontrol grubuna göre artış göstermiştir. 100, 50 ve 25 µg/l AgNP uygulamalarında ise klorojenik asit miktarı sırasıyla 6.4 µg/g, 6.1 µg/g ve 5.4 µg/g olarak elde edilmiştir.



Şekil 4.7. AgNP uygulamalarının klorojenik asit miktarı üzerine etkisi

4.2.4. AgNP uygulamalarının protokateşik asit miktarı üzerine etkisi

Yaprak kalluslarında tespit edilen bir diğer fenolik bileşik protokateşik asittir. Şekil 4.8'de görüldüğü gibi, yapılan tüm AgNP uygulamalarının yaprak kalluslarındaki protokateşik asit miktarını kontrole kıyasla artırmış olduğu belirlenmiştir ($p \leq 0.05$).

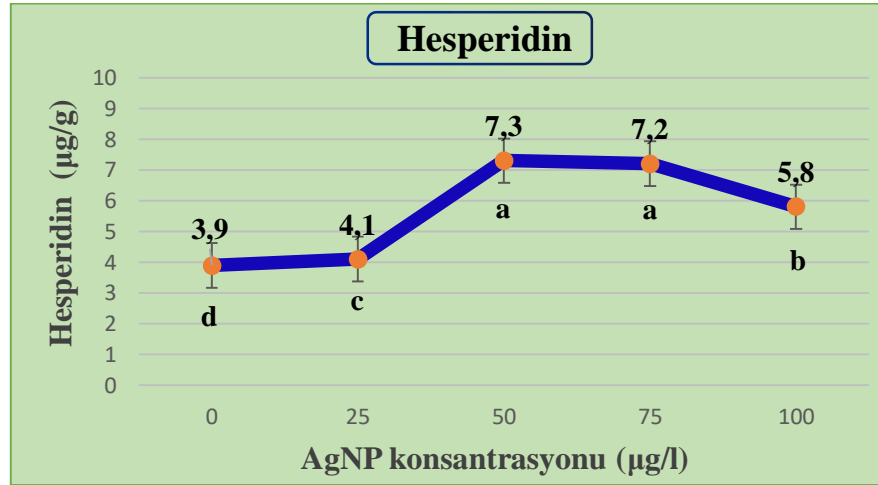


Şekil 4.8. AgNP uygulamalarının protokateşik asit miktarı üzerine etkisi

Hiçbir AgNP uygulaması yapılmayan kontrol grubunda 3.5 µg/g ile tespit edilen protokateşik asit miktarı, araştırmada elde edilen en düşük değer olarak belirlenmiştir. Artışın en etkili olduğu konsantrasyon 75 µg/l AgNP uygulaması olmuştur. Bu konsantrasyon uygulaması ile elde edilen en yüksek protokateşik asit miktarı 7.3 µg/g'dır ve kontrol grubuna göre 2.1 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Diğer uygulamalar olan 50 µg/l, 100 µg/l ve 25 µg/l AgNP konsantrasyonlarında bu oranlar sırasıyla 5.4 µg/g, 5.1 µg/g ve 4.6 µg/g şeklinde tespit edilmiştir.

4.2.5. AgNP uygulamalarının hesperidin miktarı üzerine etkisi

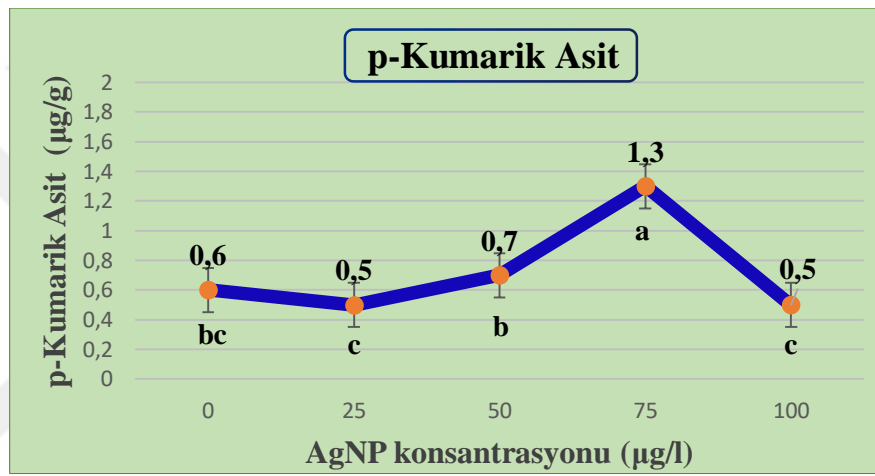
Araştırmada oğulotu bitkisine ait yaprak parçalarına yapılan AgNP uygulamalarının hesperidin miktarı üzerine etkileri Şekil 4.9'da sunulmuştur. Farklı AgNP konsantrasyonları uygulamalarındaki en düşük hesperidin miktarı kontrol grubunda 3.9 µg/g olarak saptanmıştır. Çalışmada tüm AgNP uygulamalarında bir artış görülmüş olup, en yüksek hesperidin miktarları 50 ve 75 µg/l AgNP konsantrasyonlarında 7.3 µg/g ve 7.2 µg/g olarak tespit edilmiştir. Hesperidin miktarı diğer uygulamalar olan 100 µg/l AgNP konsantrasyonunda 5.8 µg/g ve 25 µg/l AgNP konsantrasyonunda 4.1 µg/g olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.9. AgNP uygulamalarının hesperidin miktarı üzerine etkisi

4.2.6. AgNP uygulamalarının p-kumarik asit miktarı üzerine etkisi

Araştırmada son olarak incelenen fenolik bileşik p-kumarik olup, diğer incelenen bütün fenolik bileşiklerden farklı olarak kontrol grubuna (0.6 µg/g) kıyasla 25 ve 100 µg/l AgNP uygulamalarında 0.5 µg/g olarak azaldığı tespit edilmiştir. Şekil 4.10 incelendiğinde AgNP konsantrasyonlarının p-kumarik asit miktarı üzerine olan etkili konsantrasyonun 1.3 µg/g ile 75 µg/l olduğu ve kontrol grubuna kıyasla p-kumarik asit miktarında 2.2 kat artış olduğu görülmüştür. 50 µg/l AgNP uygulamasında elde edilen p-kumarik asit miktarı ise 0.7 µg/g olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.10. AgNP uygulamalarının p-kumarik asit miktarı üzerine etkisi

4.3. AgNP Uygulamalarının Oğulotu Kalluslarında Aromatik Bileşikler Üzerine Etkisi

Aromatik bileşik miktarı üzerine oğulotu yaprak eksplantlarına uygulanan farklı AgNP konsantrasyonlarının etkilerinin de incelendiği araştırmada, istatistiksel analiz sonucunda aromatik bileşik miktarının yapılan uygulamalara göre önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). GC-MS/SPME cihazına göre elde edilen sonuçlarda toplamda 71 adet aromatik bileşik tespit edilmiştir. Bu aromatik bileşikler en fazla monoterenler ve seskiterpenler olmak üzere, aldehit, keton, hidrokarbon ve diğer türevleri olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. AgNP uygulamalarının oğulotu bitkisinde aromatik bileşik sınıflandırmalarına etkisi

Aromatik Bileşik Sınıflandırması (%)	AgNP Konsantrasyonu (µg/l)				
	0	25	50	75	100
Monoterpen	42.69	66.54	49.12	28.53	40.14
Seskiterpen	31.96	6.91	22.42	31.58	21.49
Aldehit	3.79	7.21	7.93	13.97	11.57
Keton	1.31	0.9	0.49	1.26	0.97
Hidrokarbon	0.69	0.26	0.92	1.74	1.14
Diğer	19.54	18.44	19.54	23.01	26.27

Her bir uygulamanın aromatik bileşik içeriği %100 olarak değerlendirilmiş ve 71 bileşiğin toplamına eşdeğer olması temelinde hesaplanarak nispi yüzde olarak verilmiştir. Bileşiklere ait türevler ve farklı konsantrasyonlardaki her bir toplam değerleri Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. AgNP uygulamalarının oğulotu kalluslarında tespit edilen aromatik bileşikler üzerine etkisi

No	Alınma zamanı (dk.)	Aromatik Bileşikler (%)	Sınıflandırma	AgNP Konsantrasyonu (µg/l)				
				0	25	50	75	100
1	1.514	Dimetil sülfid // 2-Tiyapropan	Organo sülfür	17.53 ^d	17.44 ^d	18.11 ^c	20.62 ^b	21.77 ^a
2	1.639	İzobütanal	Aldehit	0.04 ^c	0.00 ^d	0.11 ^b	0.06 ^c	0.15 ^a
3	1.773	3-Metil-2-pentanon	Keton	0.04 ^c	0.04 ^c	0.00 ^d	0.10 ^b	0.26 ^a
4	2.257	3-Metilbütanal	Aldehit	0.49 ^d	0.27 ^d	1.42 ^c	2.93 ^a	2.08 ^b
5	2.349	2-Metilbütanal	Aldehit	0.22 ^c	0.11 ^c	0.79 ^b	1.36 ^a	0.96 ^b
6	4.662	Heksanal	Aldehit	0.82 ^d	1.62 ^c	2.11 ^b	3.01 ^a	2.05 ^b
7	5.549	Furfural	Aldehit	0.60 ^b	0.86 ^a	0.00 ^d	0.24 ^c	0.56 ^b
8	6.164	2-Heksanal	Aldehit	0.97 ^c	2.67 ^a	1.03 ^c	1.04 ^c	1.81 ^b
9	7.340	Stiren	Benzen	0.09 ^b	0.00 ^c	0.06 ^b	0.29 ^a	0.00 ^c
10	7.764	Heptanal	Aldehit	0.04 ^d	0.17 ^c	0.15 ^c	0.28 ^b	0.87 ^a
11	7.941	3-(Metil Tio) propiyonaldehit	Aldehit	0.11 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c	0.36 ^a
12	9.911	Benzaldehit	Aldehit	0.34 ^d	1.41 ^b	0.69 ^c	2.40 ^a	1.19 ^b
13	10.859	3-Oktanon	Keton	1.07 ^a	0.79 ^b	0.49 ^c	0.31 ^c	0.71 ^b
14	11.000	β-Mirsen	Monoterpen	0.46 ^{bc}	0.56 ^b	0.32 ^c	0.00	1.38 ^a
15	12.036	2,3-Dimetil sikloheksanon	Keton	0.13 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.39 ^a	0.00 ^c
16	12.499	Limonen	Monoterpen	0.09 ^c	0.18 ^b	0.21 ^b	0.19 ^b	1.25 ^a
17	13.071	Benzen asetaldehit	Flavonoit	0.73 ^b	0.26 ^c	0.30 ^c	0.88 ^b	1.26 ^a
18	15.009	Rosefuran	Furan	0.10 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
19	15.513	Nonanal	Aldehit	0.16 ^b	0.10 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.32 ^a
20	16.985	3,3,5-Trimetil-	Diğer	0.08 ^b	0.14 ^a	0.07 ^b	0.00 ^c	0.04 ^b

		1,4-hekzadien						
21	17.155	2,2-Dimetil-3,4-oktadienal	Keton	0.07 ^a	0.07 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
22	17.328	β -Sitronellal	Monoterpen	0.23 ^a	0.06 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.00 ^c
23	17.685	trans-p-Mentha-1(7),8-dien-2-ol	Monoterpen	0.25 ^a	0.29 ^a	0.17 ^b	0.00 ^c	0.25 ^a
24	18.007	Etil benzoat	Ester	0.34 ^b	0.16 ^c	0.13 ^c	0.00 ^d	0.53 ^a
25	18.400	Carane, 4,5-epoxy-, trans	Monoterpen	0.35 ^c	0.59 ^a	0.37 ^c	0.00 ^d	0.46 ^b
26	19.172	Dodekan	Hidrokarbon	0.19 ^a	0.00 ^b	0.19 ^a	0.20 ^a	0.17 ^a
27	20.582	Z-Sitral (B) (Neral)	Monoterpen	14.13 ^b	18.92 ^a	12.58 ^c	11.22 ^d	10.79 ^e
28	21.272	Metil sitronellat	Monoterpen	0.06 ^a	0.05 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
29	21.689	E-Sitral (A) (Geranial)	Monoterpen	22.68 ^c	35.49 ^a	28.98 ^b	11.48 ^e	15.87 ^d
30	23.545	Metil geranat	Monoterpen	4.29 ^d	9.78 ^a	5.90 ^c	5.49 ^c	7.41 ^b
31	25.524	Linalil asetat	Monoterpen	0.06 ^a	0.08 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
32	25.903	β -Elemene	Seskiterpen	0.25 ^a	0.00 ^c	0.00 ^c	0.07 ^b	0.09 ^b
33	26.290	Tridekan	Hidrokarbon	0.25 ^a	0.00 ^d	0.18 ^b	0.18 ^b	0.10 ^c
34	26.908	Karyofilen	Seskiterpen	1.41 ^a	0.49 ^c	0.19 ^e	0.92 ^b	0.24 ^d
35	28.011	Farmesen <(E)- β ->	Seskiterpen	0.10 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.12 ^a	0.00 ^b
36	28.115	α -Humulen	Seskiterpen	0.08 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
37	28.241	2,6-di-tert-Bütilkinon	Monoterpen	0.09 ^b	0.00 ^c	0.17 ^a	0.00 ^c	0.09 ^b
38	28.570	α -Muuroolen	Seskiterpen	0.80 ^a	0.10 ^c	0.00 ^d	0.54 ^b	0.00 ^d
39	29.181	Eremofilen	Seskiterpen	28.15 ^a	6.10 ^d	22.23 ^b	28.59 ^a	20.97 ^c
40	29.421	α -Selinin	Seskiterpen	0.93 ^a	0.15 ^b	0.00 ^c	1.03 ^a	0.19 ^b
41	29.621	Bütillenmiş hidroksi tolüen	Fenol	0.67 ^b	0.17 ^e	0.35 ^d	0.54 ^c	0.80 ^a
42	29.801	Küporen	Seskiterpen	0.11 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.24 ^a	0.00 ^c
43	32.665	Tetradekan	Hidrokarbon	0.07 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
44	34.404	Valerenal	Seskiterpen	0.13 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
45	35.603	Pentadekan	Hidrokarbon	0.09 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
46	44.950	Dehidrobietan	Hidrokarbon	0.09 ^a	0.07 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
47	1.820	Hekzan	Hidrokarbon	0.00 ^c	0.03 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.18 ^a
48	1.925	3-Bromopropen	Hidrokarbon	0.00 ^c	0.08 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.20 ^a
49	11.060	(3E)-2,6-Dimetil-3,5-heptadien-2-ol	Monoterpen	0.00 ^b	0.10 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
50	11.578	Felandren	Monoterpen	0.00 ^d	0.12 ^b	0.15 ^b	0.08 ^c	0.89 ^a
51	12.307	Simol	Monoterpen	0.00 ^d	0.15 ^b	0.14 ^b	0.09 ^c	0.77 ^a
52	12.815	cis-Osimen	Monoterpen	0.00 ^c	0.07 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.50 ^a
53	13.216	β -trans-Osimen	Monoterpen	0.00 ^c	0.10 ^b	0.00 ^c	0.00 ^c	0.18 ^a
54	18.460	Naftalen	Hidrokarbon	0.00 ^c	0.08 ^b	0.00 ^c	0.20 ^a	0.11 ^b
55	32.120	Karyofilen oksit	Seskiterpen	0.00 ^b	0.07 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b
56	1.433	2-Propenal	Aldehit	0.00 ^b	0.00 ^b	0.63 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b
57	6.627	o-Ksilen	Hidrokarbon	0.00 ^c	0.00 ^c	0.15 ^b	0.29 ^a	0.00 ^c
58	8.801	α -Pinen	Monoterpen	0.00 ^b	0.00 ^b	0.13 ^a	0.00 ^b	0.00 ^b
59	12.961	Metil 2-etil heksanoat	Hidrokarbon	0.00 ^c	0.00 ^c	0.14 ^b	0.00 ^c	0.27 ^a
60	15.314	3,7-Dimetildekan	Diğer	0.00 ^c	0.00 ^c	0.10 ^b	0.17 ^a	0.08 ^b
61	19.667	2,4-Dimetilbenzaldehit	Aldehit	0.00 ^c	0.00 ^c	1.00 ^b	2.65 ^a	1.22 ^b
62	20.881	m-Di-tert-bütilbenzen	Hidrokarbon	0.00 ^d	0.00 ^d	0.26 ^b	0.41 ^a	0.11 ^c

63	2.700	2,3-Pentanedion	Diketon	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.34 ^a	0.00 ^b
64	3.884	Tolüen	Hidrokarbon	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.07 ^a	0.00 ^b
65	6.335	Etil benzen	Hidrokarbon	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.15 ^a	0.00 ^b
66	10.997	Fenkon	Monoterpen ve Keton	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.46 ^a	0.00 ^b
67	15.529	2,6,11- Trimetildodekan	Hidrokarbon	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.16 ^a	0.00 ^b
68	30.152	β -Guaien	Seskiterpen	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.14 ^a	0.00 ^b
69	30.603	1-Klorotetradekan	Hidrokarbon	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.08 ^a	0.00 ^b
70	11.672	δ 3-Karen	Monoterpen	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.26 ^a
71	13.634	γ -Terpinen	Monoterpen	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.00 ^b	0.13 ^a

*Her bir satırda farklı harflerle gösterilen rakamlar arasında istatistiksel olarak önemli derecede farklılık bulunur ($p \leq 0.05$).

AgNP uygulamalarının oğulotu kalluslarında tespit edilen aromatik bileşiklerden kontrol grubunda en fazla miktarda ölçülen, Neral (Z-sitral, sitral B), Geranial (E-sitral, sitra-A) ve Eremofilen'dir. Neral ve Geranial, turuncgiller familyasının ana lezzet bileşenlerinden olup, bazı uçucu yağların bileşiminde bulunur. Asiklik monoterpenlerin önemli bir üyesi olan sitral, doğada sitral a (geranial, E-izomer) (I) ve sitral b (Neral, Z-izomer) (II) olarak isimlendirilen iki izomerin karışımı olarak bulunur. Sitral, antibakteriyel, antifungal, antiviral, spazmolitik gibi farmakolojik aktiviteler gösteren ve A vitamininin kimyasal sentezinde de kullanılan fakat vitamin aktivitesine sahip olmayan bir terpendir.

Çizelge 4.4 incelendiğinde, Neralin sadece %18.92 ile 25 $\mu\text{g/l}$ AgNP uygulamasında kontrol grubuna (%14.13) göre 1.34 kat artış gösterdiği, diğer AgNP uygulamalarında ise Neralin kontrol grubuna göre azaldığı tespit edilmiştir. En düşük Neral miktarı %10.79 ile 100 $\mu\text{g/l}$ AgNP uygulamasında görülmüştür. Diğer uygulamalar olan 50 ve 75 $\mu\text{g/l}$ AgNP konsantrasyonlarında bu oranlar sırasıyla %12.58 ve %11.21 olmuştur. Diğer sitral türevi olan Geranial ise yine 25 $\mu\text{g/l}$ AgNP uygulamasında %35.49 ile en yüksek değerde olup, kontrol grubuna (%22.68) göre 1.56 kat artış göstermiştir. 50 $\mu\text{g/l}$ AgNP uygulaması da %28.98 oranında tespit edilerek kontrol grubuna göre artış göstermiştir. 100 ve 75 $\mu\text{g/l}$ AgNP uygulamalarında ise sırasıyla %15.87 ve %11.48 değerleri ile kontrol grubuna göre azalış gözlemlenmiştir.

Araştırmadaki diğer önemli bileşiklerden olan Eremofilen ise bir seskiterpendir ve antibakteriyel aktivite göstermesi nedeniyle önemli bir yere sahiptir. Çizelge 4.4'e göre, Eremofilenin en yüksek değeri %28.59 ile 75 $\mu\text{g/l}$ AgNP uygulamasında tespit

edilmiştir. Kontrol grubunda ise bu oran %28.15 olup, 75 µg/l AgNP uygulaması arasında istatistiksel bir fark bulunamamıştır ($p \leq 0.05$). Diğer uygulamalar olan 50 µg/l, 100 µg/l ve 25 µg/l AgNP konsantrasyonlarında sırasıyla bu oran %22.23, %20.97 ve %6.10 olarak tespit edilmiştir.

Araştırmada incelenen bir diğer aromatik bileşik olan β -Mirsen, en fazla 100 µg/l AgNP uygulamasında %1.38 olarak tespit edilmiştir. AgNP'nin bu uygulamasında kontrol grubuna (%0.46) göre 3 kat artış görülmüştür. Diğer bir monoterpen olan Limonen bileşiğinde ise 100 µg/l AgNP uygulamasında %1.25 olarak tespit edilen aromatik bileşik miktarı kontrol grubuna (%0.09) göre yaklaşık 14 kat artış göstermiştir. Bir başka monoterpen sınıfına dahil olan metil geranat bileşiği 25 µg/l AgNP uygulamasında %9.78 olarak belirlenmiş ve bu oran kontrol grubuna (%4.29) göre yaklaşık 2.3 kat artış göstermiştir. Diğer uygulamalarda da metil geranat miktarında artışlar gözlemlenmiştir (Çizelge 4.4).

Monoterpen sınıflandırmasına ait olan β -Sitronellal ve seskiterpenlerden β -Elemene, Karyofilen ve α -Selenin bileşiklerinin AgNP uygulamalarındaki miktarları kontrol grubuna göre daha düşük olmuştur. 25 µg/l AgNP uygulamasında %0.06 olarak tespit edilen β -Sitronellal, kontrol grubunda %0.23 olarak belirlenmiştir. Diğer uygulamalarda ise hiç görülmemiştir. Bahsedilen seskiterpenlerde ise özellikle 50 µg/l AgNP uygulamasında önemli düşüşler gözlemlenmiştir.

Kontrol grubunda bulunmayan fakat AgNP uygulamaları ile tespit edilen aromatik bileşikler de olmuştur. Felandren, Simol, cis-Osimen, β -trans-Osimen, α -Pinen, β -Guaien ve γ -Terpinen kontrol grubunda olmayıp çeşitli AgNP uygulamalarında tespit edilen önemli aromatik bileşiklerdir ($p \leq 0.05$). Felandren ve Simol monoterpen sınıfına giren önemli bileşiklerden olup 100 µg/l AgNP uygulamasında sırasıyla %0.89 ve %0.77 oranında tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Oğulotu bitkisi ile gerçekleştirilen bu çalışmada, nanoelisitör olarak kullanılan AgNP'lerin *in vitro* ortamda kallus oluşumu ile tıbbi ve ekonomik olarak değerli olan sekonder metabolitlerin birikimine olan etkileri incelenmiştir. Araştırmamızda, AgNP'lerin farklı konsantrasyonlarının bitkideki sekonder metabolitlerin miktarını, kallus oluşum oranını, kallus çapını ve kallus ağırlığını önemli derecede etkilediği tespit edilmiştir.

Son yıllarda bitkilerdeki sekonder metabolitlerin ticari önemlerinin artması, doku kültürü teknolojisiyle üretimini artırma yollarının araştırılmasına neden olmuştur (Tiwari ve Rana, 2015). Fenolik bileşikler, genellikle çevresel stres koşullarında bitki adaptasyonunda yer alır (Farah ve Donangelo, 2016). Uçucu yağ olarak bilinen aromatik bileşikler ise karakteristik tat ve koku özellikleri ile biyolojik aktivitelere sahiptir. Sekonder metabolitler, bitki metabolizmasında ultraviyole radyasyona, patojen, parazit veya böceklere karşı savunmada (Dai ve Mumper, 2010), pigmentasyonda, herbivorlara karşı korunmada, çimlenmenin düzenlenmesinde, büyüme ve gelişmede önemli roller oynamaktadır. Ayrıca insanlar tarafından ilaç yapımında ve tıpta tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Cowan, 1999; Greathead, 2003; Silva ve Fernandes Júnior, 2010; Samarth vd., 2017).

Doku kültürü ile nanoteknolojinin entegrasyonu ve NP'lerin uygulanması, kallusun uyarılmasında, sekonder metabolitlerin üretiminde, somatik embriyogenezde, organogenezde, mikrobiyal kontaminantların ortadan kaldırılmasında ve genetik transformasyonda olumlu etkiler göstermiştir (Singh ve Ahamad, 2022). Sekonder metabolitlerin önemi göz önüne alındığında, bu metabolitlere karşı duyulan ihtiyaçların sürekliliği ve sentezi için *in vitro* ortamda elisitörlerden stres faktörü olarak yararlanılmaktadır (Mulabagal ve Tsay, 2004; Shilpa vd., 2010; Karataş vd., 2016). Ek olarak, nano-elisitörler kullanılarak yapılan kallus kültürlerinin, bitkilerdeki alkaloid (Fouad vd., 2021), flavonoid ve fenolik bileşikleri (Khan vd., 2021) artırmak için umut verici bir strateji olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada ise oğulotu yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslardan aromatik ve fenolik bileşiklerin üretimini artırmak amacıyla nanoelisitör olarak AgNP'leri kullanılmıştır.

Çalışmamızda, oğulotu bitkisine ait kallus kültüründe AgNP uygulamalarının hem kallus indüksiyonunu hem de sekonder metabolitlerin artışını önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Buna göre kültür ortamına uygulanan NAA ve BAP hormonlarının ve farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin kallus indüksiyonu üzerine olan etkilerinin belirlenmesine yönelik kallus oluşum oranı, kallus ağırlığı, kallus çapı ve kallus rengi gibi değerler incelenmiştir. Araştırmada oğulotu kallus kültüründe kullanılan AgNP'lerin her bir konsantrasyonu kallus oluşum oranında olumlu bir etki gösterdiği tespit edilmiştir. En etkili konsantrasyon 50 µg/l AgNP olmuştur ve kallus oluşum oranı %97.8 ile kontrol grubuna (%78.7) kıyasla 1.24 kat artmıştır. Kallus ağırlığında da farklı AgNP uygulamalarının her bir konsantrasyonunda olumlu etkiler görülmüş ve oluşum oranındaki gibi en etkili konsantrasyonun 50 µg/l AgNP olduğu saptanmıştır. Bu konsantrasyonda kallus ağırlığı 0.196 g olarak kaydedilmiş ve kontrol grubuna (0,051 g) göre 3,84 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir. NP'lerin elisitör amaçlı kullanıldığı diğer doku kültürü çalışmalarında da kallus oluşumu ve taze ağırlığında olumlu etkilerin olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara paralel olarak Javed vd. (2018) tarafından yapılan bir çalışmada düşük konsantrasyonda ZnONP'lerinin *Stevia rebaudiana*'da kallus kültürü indüksiyonu ve biyokütle oluşumu üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Shehzad vd. (2021)'nin yaptıkları bir çalışmada, yaygın olarak süt devedikeni olarak bilinen *Silybum marianum* L. kök eksplantları üzerinde ZnONP'leri ve farklı ışık kombinasyonları uygulanmıştır. Kültürlerin, 0.15 mg/l ZnONP içeren ortam üzerinde büyütülmesi ardından ilk iki hafta boyunca karanlıkta bırakılmışlardır. Ardından normal ışığa aktarıldığında, kallus çoğalmasında (FW: 2294 mg) önemli bir artış gözlemlendiği belirtilmiştir. Yine yapılan başka bir çalışmada, El-Saber vd. (2021), MNP'lerin ortama eklenmesi ile *Ginkgo biloba* L. (mabet ağacı)'nin kallus oluşumunda artış sağlandığını ve kallus taze ağırlığının arttığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde Kavianifar vd. (2018), *Linum usitatissimum* L. (keten) bitkisinde müsilağ üretimi üzerine yaptıkları bir çalışmada, MS ortamının ZnONP'ler ile desteklenmesinin, kallus taze ağırlığı artışında etkili olduğunu ve en yüksek kallus taze ağırlığının (0.79 g) 5 mg/L ZnONP konsantrasyonunda elde edildiğini belirtmişlerdir. Ayrıca bu konsantrasyon uygulamasında %2.8 oranla en fazla müsilağ üretiminin (22.3 mg) gerçekleştirdiği de bildirilmişlerdir. Nazir vd. (2021), *Ocimum basilicum* (fesleğen) bitkisinin kallus kültüründe, 10 mg/l CuONP'lerle desteklenmiş MS

ortamında yetiştirilen kallusun biyokütlesinde bir artış olduğunu tespit etmişlerdir. Bir başka çalışmada ise *Brassica napus* L. (kanola) bitkisinin kallus indüksiyonunda, hipokotil eksplantları kültüre alınmıştır. ZnONP'lerin etkisini doğru bir şekilde değerlendirmek için ZnONP'lerin, ZnO yığın parçacıklarının (BP'ler) ve Zn²⁺ iyonlarının doku kültürü üzerindeki etkisini karşılaştırmalı olarak araştırılmıştır. Sonrasında sonuç olarak, sadece 10 mg/l ZnONP konsantrasyonunda kallus taze ağırlığının önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir (Mousavi Kouhi ve Lahouti, 2018). Bu sonuçlardan da anlaşıldığı üzere NP'lerin farklı boyut veya konsantrasyonunun, farklı bitkilerde uygulanmasıyla kallus oluşumu ve taze ağırlığı üzerindeki etkilerinin olumlu olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızdaki farklı konsantrasyonlardaki AgNP uygulamalarının en yüksek kallus oluşumu ve ağırlığının 50 µg/l konsantrasyonunda ölçüldüğü tespit edilmiştir.

Araştırmamızda, uygulanan AgNP konsantrasyonlarının oğulotu kallus çapı üzerindeki en yüksek oranı 1.1 cm olarak 50 µg/l uygulamasında kaydedilmiştir. Bu artışı ardından 25 µg/l AgNP konsantrasyonu (0.9 cm) takip etmiştir. 75 µg/l (0.8 cm) ve 100 µg/l (0.7) AgNP konsantrasyonlarında ise kontrol grubuna kıyasla (0.8 cm) herhangi bir artış gözlemlenmemiştir. Yapılan uygulamalar ardından farklı konsantrasyonlardaki AgNP'lerin kallus oluşumlarında değişiklik gösterirken kallus yapısının sadece sıkı formda olduğu tespit edilmiştir. Bu da AgNP uygulamalarının kallus yapısı üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Kallus renklerinde ise; kontrol grubunda kahverengi, 25 µg/l ile beyaz-yeşil, 50 µg/l ile yeşil, 75 ve 100 µg/l AgNP ile kahverengi-yeşil olarak tespit edilmiştir.

Araştırmada yapılan *in vitro* uygulamalarda oğulotu kalluslarının analizleri sonrasında rosmarinik asit, kafeik asit, klorojenik asit, protokateşik asit, hesperidin ve p-kumarik asit gibi 6 adet fenolik bileşik saptanmıştır. Farklı AgNP uygulamalarına göre bu bileşiklerdeki miktarların kontrole göre önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Buna göre, kalluslardaki rosmarinik asit miktarı kontrol grubunda 1693.0 µg/g iken AgNP uygulamasında en yüksek birikimin 2776.5 µg/g ile 50 µg/l konsantrasyonunda olduğu belirlenmiştir. En yüksek kafeik asit miktarı 46.7 µg/g ile 75 µg/l AgNP uygulamasında görülmüş ve kontrol grubunda bu oran 34.8 µg/g olarak tespit edilmiştir. Yine 75 µg/l AgNP uygulamasının en yüksek miktarda (9.4 µg/g) birikim

gösterdiği bileşik klorojenik asittir ve kontrol grubunda bu oran 4.7 µg/g şeklinde görülmüştür. 75 µg/l AgNP uygulamasının en etkili olduğu diğer bir bileşik ise protokatesik asit miktarında görülmüştür. Bu miktar 7.3 µg/g şeklinde tespit edilirken kontrol grubunda 3.5 µg/g olarak tespit edilmiştir. Hesperidin miktarı üzerindeki en etkili konsantrasyonlar da; 50 µg/l ve 75 µg/l'dir ve bu konsantrasyonlardaki birikim miktarları da sırasıyla 7.3 µg/g ve 7.2 µg/g'dır ve kontrol grubunda kaydedilen oran da 3.9 µg/g'dır. Son olarak AgNP uygulamalarından 75 µg/l konsantrasyonu p-kumarik asit miktarı üzerinde de en etkili konsantrasyon olarak saptanmıştır ve elde edilen miktar 1.3 µg/g ile kontrol grubundan (0.6 µg/g) fazla olduğu tespit edilmiştir.

Elde ettiğimiz bulgulara göre yapılan diğer çalışmalara paralel olarak NP'lerin elisitör amaçlı kullanılmasıyla fenolik bileşiklerin artışıdaki etkileri örtüşmektedir. Zhang vd. (2013), *in vitro* koşullarda *Artemisia annua* (yavşan otu)'nın tüylü kök kültürlerinde elisitör olarak kullanılan AgNP'lerin artemisinin üretimini kontrole göre 3,9 kat artırdıklarını tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Nazir vd. (2021), *Ocimum basilicum* (fesleğen) bitkisinin kallus kültüründe, 10 mg/l CuONP'lerin kontrole kıyasla daha yüksek rosmarinik asit (11.4 mg/g DA), şikorik asit (16.6 mg/g DA), siyanidin (2.02 mg/g DA), peonidin (1.18 mg/g), öjenol (0.21 mg/g DW), metil öjenol (0.17 µg/g DW), şavikol (0.30 µg/g DW) ve metil şavikol (0.17 µg/g DW) üretimiyle sonuçlandığını göstermiştir. Bir başka çalışmada, *Calendula officinalis* L. (aynısefa) bitki parçalarına uygulanan 0.4 mM AgNP ve 100 µM Methyl Jasmonate (MeJA) ile bitkideki en yüksek saponin içeriği, kontrol grubuna kıyasla %177 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (Ghanati ve Bakhtiarian, 2014). Khattab vd. (2022), *Lavandula officinalis* eksplantlarına uygulanan düşük konsantrasyonlardaki AgNP ve SiNP'lerin kumarin bileşiminde kontrole kıyasla en yüksek artışın görüldüğü tespit edilmiştir. Yine, Ghanati ve Bakhtiarian (2014) ve Spinoso-Castillo vd. (2017), AgNP'lerin uygulanmasının sırasıyla *Calendula officinalis* ve *Vanilla planifolia* eksplantlarında saponin ve toplam fenolik bileşiklerin üretimini arttırdığını bildirmiştir. *Solanum tuberosum* eksplantları üzerinde yapılan bir araştırma da, AgNP'lerin *in vitro* eklenmesinin antosiyanin, flavonoid ve diğer fenoliklerin seviyesini artırdığı tespit edilmiştir (Homae ve Ehsanpour, 2015). Bunlara ek olarak Ramezannezhad vd. (2019) de, *Echinacea purpurea* yaprağı ve kök eksplantlarının kallus indüksiyonu için MS ortamında büyütülmesi ardından kikorik asit üretimi için elisitör olarak AgNP'lerin

varlığında hücre süspansiyon kültürü üretilmiştir. 2 mg/l'de AgNP'lere maruz bırakıldıktan sonra en yüksek miktarda şikorik asidin kök süspansiyon kültüründe üretildiği saptanmıştır. Aynı şekilde Li vd. (2020), gelişmiş kereviz yapraklarına uygulanan 5 mg/l selenyum NP'lerin toplam antioksidan kapasiteyi (%46.7), apigenin, p-kumarik asit, ferulik asit, toplam fenoller (%21,4) ve C vitamini (%26.7), luteolin ve kaempferol gibi toplam flavonoidleri (%50) artırdığını bulmuşlardır. El-Saber vd., (2021), farklı boyutlardaki MNP'lerin *Ginkgo biloba* L. kallusuna uygulanmasıyla, fenolik bileşik sayısı üzerinde net bir etkisi olduğunu tespit etmiştir. Kuersetin, kemferol, p-kumarik asit, rutin ve kafeik asit bileşenlerinin maksimum değerlerin, 2 ppm + 10.77 nm boyut ile ölçüldüğünü tespit etmişlerdir. Bunların yanı sıra Shehzad vd. (2021) tarafından, *Silybum marianum* L. üzerine yapılan çalışmada, yalnızca 0.15 mg/l konsantrasyonundaki ZnONP lerinin silimarin üretimini (14.6 ± 0.023 mg/g) ve ikincil metabolit içeriğini önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır. Yapılan tüm bu araştırmalara göre fenolik bileşik üretiminde NP'lerin etkili bir elisitör olarak kullanılması, araştırmamızdaki elde ettiğimiz bulgularla benzerlik göstermektedir.

Uçucu yağların bileşimi esas olarak bitki genotipine bağlıdır, ancak bileşimi, güneşe maruz kalma, bitki yaşı, fide toplama yöntemi veya uçucu yağ izolasyon yöntemi gibi gelişimsel ve çevresel faktörlerin etkisi altında farklılık gösterebilmektedir (Wesołowska vd., 2015; Wesołowska vd., 2016). *M. officinalis* L. limon kokulu olmasından dolayı *Melissa* genusundaki en bilindik türdür. Bitki, % 36 oranında sitronellal ve yaklaşık % 12 oranında da Neral ve Geranial gibi yağları yüksek oranda içermesiyle kültüre alınmış olup tıbbi ve aromatik bitkiler arasında yer alarak birçok çalışmaya konu olmuştur (Carnat vd., 1998; Kennedy vd., 2002; Kaçar vd., 2010; Ilić vd., 2022). Araştırmamızda AgNP uygulamalarının oğulotu kalluslarındaki aromatik bileşiklerin birikimi üzerine olan etkileri incelendiğinde; tespit edilen aromatik bileşiklerden Neral ve Geranial miktarlarında değişkenlik gösterdiği belirlenmiştir. Uçucu yağlar, çok sayıda uçucu bileşiğin karışımından oluşmakta ve bu karışımda monoterpenler ve seskiterpenler genelde baskın olmaktadır (De Falco vd., 2013). Sital, antibakteriyal (Morris vd., 1979; Onawunmi vd., 1984), antifungal (Batt vd., 1983), antiviral (Koch-Heitzmann ve Schultze, 1984; Dorner, 1985), spazmolitik (Koch-Heitzmann ve Schultze, 1984) gibi farmakolojik özellikleri ile monoterpenler grubunda yer alan önemli bir uçucu yağdır. AgNP uygulamalarında bu uçucu yağların

etkileri ise şu şekilde sonuçlanmıştır: Neral bileşiği en yüksek değerini (%18.92) sadece 25 µg/l konsantrasyonunda göstermiştir. Diğer konsantrasyonlarda bu bileşiğin miktarı kontrol grubuna (%14.13) kıyasla azaldığı saptanmıştır. Geranial bileşiği ise en yüksek değerini (%35.49) yalnızca 25 ve 50 µg/l konsantrasyonunda (%28.98) sergilemiştir ve bu oranlar kontrol grubuna (%22.68) kıyasla artış göstermiştir. Çalışmamıza paralel olarak Mosavat vd. (2019), NP'lerin aromatik bileşiklerdeki etkisini gösteren çalışmalarında *Thymus* türlerinde (*T. vulgaris*, *T. daenensis* ve *T. kotschyanus*) ve *Zataria multiflora* da 100 ve 150 mg/l ZnONP konsantrasyonlarının timol ve karvakrol üretimi üzerinde olumlu etki gösterdiğini belirtmişlerdir. En yüksek timol (22.8 mg/l) ve karvakrol (0.68 mg/l) içeriği ile ilgili olarak, sırasıyla en iyi sonuçların *T. kotschyanus* ve *T. daenensis* de olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Andújar vd., (2023), farklı seviyelerdeki (0.0-37.5 mg/l) AgNP'lerin *Stevia rebaudiana* bitkisi üzerine uygulanması sonucu en yüksek diterpen miktarının, 12.5 mg/l AgNP'lerin uygulanmasıyla elde edildiği ve AgNP'lerin bitkideki diterpen üretimini teşvik etmek için elisitör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Hatami vd. (2016) ve Ghanati ve Bakhtarian (2013), doğal koşullar altında büyüyen bitkilere metal NP uygulanmasının, dokularından ekstrakte edilen esansiyel yağ içeriğinde değişikliğe yol açtığını tespit etmişlerdir. Bu bilgiye dayanarak Wesolowska vd. (2019) yaptıkları çalışmada *in vitro* kültürlerde üretilen *Lavandula angustifolia*'da Au ve Ag nanokolloidlerin uçucu yağların bileşimini etkilediğini doğrulamıştır. Sonuç olarak, en yüksek borneol (%16.46) ve 1,8-sineol (%4.58) konsantrasyonları, 50 mg/dm³AuNP ile takviye edilmiş besiyerinde yetiştirilen bitkilerden izole edilen uçucu yağda elde edilmiştir. Büyütme ortamına 50 mg/dm³ AgNP' eklenmesi, yağdaki γ-kadinen (%6.08) ve karyofillen oksit (%12.23) içeriğini artırmıştır. Ayrıca, MS ortamında yetiştirilen lavantadan elde edilen uçucu yağların, β-pinen (%3.14), α-pinen (%1.46), p-simen (%1.39), kamfen (%1.08) ve δ-3-careen açısından daha zengin olduğu tespit edilmiştir (%0.93).

Araştırmamızdaki diğer bir önemli aromatik bileşik β-mirsen'dir. Limon otu, şerbetçiotu ve mineçiçeği de dahil olmak üzere birçok bitkinin uçucu yağın bileşiminde bulunan hoş kokulu bir monoterpendir. Parfüm üretiminde ve gıda endüstrisinde aroma katkı maddesi olarak uzun süredir kullanılan uçucu yağların bir bileşenidir. β-mirsen, anti-ülser, anksiyolitik, antioksidan, yaşlanma karşıtı, iltihap

önleyici, analjezik özellikler ve aktivite mekanizmaları mevcuttur (Surendran vd., 2021). Çalışmamızda elde edilen β -mirsen miktarı, en fazla (%1.38) 100 $\mu\text{g/l}$ AgNP uygulamasında tespit edilmiş ve bu oranın kontrol grubuna (%0.46) kıyasla 3 kat artış göstermiştir.

Limonen bileşiği ise antikanser özelliğe sahip monoterpenoid bileşiktir. Bu çalışmada uygulanan AgNP'lerden limonen birikiminde en etkili konsantrasyonun 100 $\mu\text{g/l}$ olduğu görülmüştür. Kontrolle (%0.09) kıyasla 1.25 oranında artış gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgulara istinaden benzer şekilde Ebodallahi vd. (2019) tarafından yapılan bir çalışmada, *Hypericum perforatum* kallus kültür ortamına 25–200 mg/l konsantrasyon aralığında perlit NP'ler ve TiO_2 /perlit NC'lerin eklenmesi sonucu, NP'lerin bitkide stres oluşturmasıyla uçucu bileşiklerin çeşit, miktar ve sayısında artışa neden olduğu ve hiperisin ve psödohiperisin üretiminde de etkili bir elisitör olduğu saptanmıştır. Bunlara ek olarak, başka bir çalışmada, Ag^+ 'nın *Salvia miltiorrhiza*'nın tüylü kök kültüründe ikincil metabolit üretimini uyarmak için abiyotik bir elisitör olarak kullanılmıştır. Kültürün ortamında 15-40 μM $\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$ uygulanması, tanshinon ve kriptotanshinonun verimlerinde 2 kattan fazla artışla sonuçlanmıştır. Bu uyarıcı etki Ag^+ dozuna, Ag^+ 'nin kültüre eklendiği güne ve tanshinon türlerine bağlıyken, üç tanshinonun (TT) toplam verimi esas olarak Ag^+ dozuna bağlı olduğu ve en yüksek değer 30 μM 'de elde edildiği görülmüştür. Özellikle Ag^+ uygulaması ile TT verimi kontrolle (7.3 mg/l'ye karşı 55.7 mg/l) göre 6.6 kat arttığı bildirilmiştir (Zhang vd., 2004).

Araştırmada tespit edilen diğer bir bileşik ise β -sitronellal'dir. Sitronellal uçucu yağ, çok eski yıllardan bu yana bitkisel sivrisinek repellentleri veya böcek savar olarak kullanılan önemli bir monoterpenoid bileşiktir (Kim vd., 2005). Ayrıca, antibakteriyel etki ve sedatif etki (Koch-Heitzmann ve Schultze, 1984) gösterdiği de çok eskiye dayanan çalışmalarda gösterilmiştir. Çalışmamızdaki AgNP uygulamalarının diğer bileşiklerde gösterdiği olumlu etkiyi β -sitronellal'de göstermemiştir. Analizler sonucu β -sitronellal miktarı kontrol grubuna (%0.23) kıyasla daha düşük olmuştur. Yalnızca 25 $\mu\text{g/l}$ AgNP uygulamasında %0.06 olarak tespit edilen β -sitronellal miktarı, diğer uygulamalarda hiç görülmemiştir. Bu sonuca benzer olarak Wesolowska vd. (2019) de, 10 ve 50 mg/dm^3 AgNP'ler ile desteklenmiş besiyerinden elde edilen L.

angustifolia bitkisindeki uçucu yağlarda bulunan linalool (%0.30–0.77), 1,8-sineol (%2.80–4.58) ve kafur (%2.05–2.79) içeriği, kontrole göre çok daha düşük olmuştur. Çalışmamızda yine terpenler grubunda yer alan β -Elemene, Karyofilen ve α -Selenin bileşikleri de, uygulamalar sonrasında kontrol grubuna kıyasla miktarlarında düşüş görülen bileşiklerdendir. Antibakteriyel özelliğe sahip olan Eremofilen ise seskiterpenler arasında önemli bir yere sahiptir. AgNP konsantrasyon uygulamaları sonrasında bu bileşiğin miktarı en yüksek 75 $\mu\text{g/l}$ 'de %28.59 oranında saptanmıştır fakat kontrol grubuna (%28.15) göre istatistiksel bir fark görülememiştir.

Son olarak, kontrol grubunda görülmeyen fakat AgNP uygulamaları sonrasında elde edilen, Felandren, Simol, cis-Osimen, β -trans-Osimen, α -Pinen, β -Guaien ve γ -Terpinen gibi aromatik bileşikler de tespit edilmiştir. Bu sonuca benzerlik gösteren bir çalışmada 10 mg/dm^3 AgNP'ler ile takviye edilmiş kültür ortamında lavanta dokularından ekstrakte edilen yağda, kontrol grubunda gözlemlenen 13 tane bileşik tespit edilmiştir. Ayrıca kültür ortamına AuNP'lerin ve AgNP'lerin eklenmesi, moleküler ağırlığı daha düşük olan bileşiklerin (α - ve β -pinen, kamfen, δ -3-karen, p-simon, 1,8-sineol, trans-pinokarveol, kamfor ve borneol) azalmasına ve bunların yerini daha yüksek moleküler ağırlıklı bileşiklerin (τ - ve α -kadinol 9-sedranon, kadalen, α -bisabolol, cis-14-nor-Muurool-5-en-4-one, (E,E)-farnesol) oluşmasına neden olmuştur. Kısaca, NP ile kültür ortamında *in vitro* çoğaltılan bitkilerden ekstrakte edilen yağlarda, kontrol ortamında yetiştirilen bitkilerden elde edilen yağda bulunmayan çeşitli bileşikler tanımlanmıştır (Wesolowska vd., 2019). Sonuçlar, kültür ortamına farklı AgNP konsantrasyonlarının eklenmesinin somaklonal varyasyon oluşturduğu ve farklı esansiyel yağları elde etmek için kullanılabilir bir yöntem olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, çalışmamızda oğulotu (*M. officinalis* L.) bitkisinin doku kültüründe kallus oluşumu, çapı ve ağırlığı ile neral ve geranial gibi bazı aromatik bileşikler ve diğer önemli fenolik bileşiklerin üretimi üzerine AgNP uygulamalarının olumlu etkilerde bulunduğu, kontrol grubuna kıyasla çoğu AgNP uygulamalarında daha yüksek değerlerin elde edildiği tespit edilmiştir. Kallus oluşum oranı (%97.8), kallus ağırlığı (0.196 g) ve çapı (1.1 cm) için en etkili konsantrasyon 50 $\mu\text{g/l}$ AgNP uygulamasında görülmüştür. Tüm AgNP uygulamalarında sıkı kallus yapısı görülürken, kallus rengi artan AgNP uygulamaları ile kahverengi – beyaz - yeşil

arasında değişkenlik göstermiştir. AgNP uygulamalarının fenolik bileşikler üzerinde olumlu etkisi olmuştur. Kafeik asit, klorojenik asit, proto-kateşik asit, hesperidin ve p-kumarik asit bileşiklerinde en fazla artış 75 µg/l AgNP uygulamasında görülmüştür. Rosmarinik asit bileşiğinde ise en fazla artış 50 µg/l AgNP uygulamasında tespit edilmiştir. AgNP uygulamalarının aromatik bileşiklerin birikimi üzerine olan etkileri incelendiğinde, neral ve geranial bileşiklerinin 25 µg/l AgNP uygulamasında önemli derecede arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, kontrol grubunda olmayan bazı önemli aromatik bileşiklerin de AgNP uygulamaları ile yaprak eksplantından elde edilen kalluslarda görülmesi sekonder metabolit potansiyelini artıracakını düşündürmüştür.

Sunulan bu çalışmamızda, bitki biyoteknolojisinden yararlanarak bitkilerin sahip oldukları fitokimyasal bileşikleri artırmak amaçlı nano elisitörlerden AgNP'leri kullanarak günümüzün son teknolojik çalışmaları arasında yer almak hedeflenmiştir. Gerek sağlık gerekse ekonomik açıdan değerli sekonder metabolitlere sahip *M. officinalis* L. bitkisi üzerinde uygulanan farklı oranlardaki AgNP konsantrasyonlarının, bitki doku kültürü tekniklerinde göstermiş olduğu verimlilik ile elde edilen kallus oluşumları ve artış oranlarının, fenolik ve aromatik bileşiklerdeki miktarların, yapılan uygulamalar ve analizler sonucunda olumlu etkiler sergilediği gözlemlenmiştir. Bitkideki sekonder metabolitlerin istenilen kalite ve miktarda üretimine yönelik olarak duyulan ihtiyacın karşılanması, yapılan bu çalışma ile destekleneceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdel Latef, A.A.H., Srivastava, A.K., El-sadek, M.S.A., Kordrostami, M., Tran, L. S.P., 2018. Titanium Dioxide Nanoparticles Improve Growth and Enhance Tolerance of Broad Bean Plants under Saline Soil Conditions. *Land Degradation and Development*, 29(4), 1065-1073.
- Ahamed, M., AlSalhi, M. S., Siddiqui, M.K.J., 2010. Silver Nanoparticle Applications and Human Health. *Clinica Chimica Acta*, 411(23-24), 1841-1848.
- Ahmed, S.A., Baig, M.M.V., 2014. Biotic Elicitor Enhanced Production of Psoralen in Suspension Cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 21(5), 499-504.
- Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B.L., Ikram, S., 2016. A Review on Plants Extract Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles for Antimicrobial Applications: A Green Expertise. *Journal of Advanced Research*, 7(1), 17-28.
- Ali, A., Mohammad, S., Khan, M.A., Raja, N.I., Arif, M., Kamil, A., Mashwani, Z.U.R., 2019. Silver Nanoparticles Elicited *In Vitro* Callus Cultures for Accumulation of Biomass and Secondary Metabolites in *Caralluma tuberculata*. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 715-724.
- Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M., Koltas, S., 2004. Antiviral Activity of the Volatile Oils of *Melissa officinalis* L. against Herpes Simplex Virus Type-2. *Phytomedicine*, 11(7-8), 657-661.
- Andújar, I., González, M., García-Ramos, J.C., Hajari, E., Bogdanchikova, N., Pestryakov, A., Concepción, O., Lorenzo, J.C., Escalona, M., 2023. Are Silver Nanoparticles the “Silver Bullet” to Promote Diterpene Production in *Stevia rebaudiana*?. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-7.
- Antognoni, F., Zheng, S., Pagnucco, C., Baraldi, R., Poli, F., Biondi, S., 2007. Induction of Flavonoid Production by UV-B Radiation in *Passiflora quadrangularis* Callus Cultures. *Fitoterapia*, 78(5), 345-352.
- Arora, S., Sharma, P., Kumar, S., Nayan, R., Khanna, P.K., Zaidi, M.G.H., 2012. Gold-Nanoparticle Induced Enhancement in Growth and Seed Yield of *Brassica juncea*. *Plant Growth Regulation*, 66, 303-310.
- Atakan, A., Özkaya, H.Ö., 2018. Fitopatolojide Nanoteknoloji. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, 22(2), 296-303.
- Awais, M., Pervez, A., Yaqub, A., Sarwar, R., Alam, F., Siraj, S., 2010. Current Status of Biotechnology in Health. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 7(2), 210-220.
- Bansal, S., Sharma, A.K., Bhatnagar, S.K., 2012. Landmarks of Biotechnology in Agriculture: An over-view. *Vegetos*, 25(1), 83-88.

- Barrena, R., Casals, E., Colón, J., Font, X., Sánchez, A., Puntès, V., 2009. Evaluation of the Ecotoxicity of Model Nanoparticles. *Chemosphere*, 75(7), 850-857.
- Basta, A., Tzakou, O., Couladis, M., 2005. Composition of the Leaves Essential Oil of *Melissa officinalis* s.l. from Greece. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6), 642-644.
- Batley, G.E., Kirby, J.K., McLaughlin, M.J., 2013. Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments. *Accounts of Chemical Research*, 46(3), 854-862.
- Batt, C., Solberg, M., Ceponis, M., 1983. Effect of Volatile Components of Carrot Seed Oil on Growth and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Food Science*, 48(3), 762-764.
- Begum, S., Zahid, A., Khan, T., Khan, N.Z., Ali, W., 2020. Comparative Analysis of the Effects of Chemically and Biologically Synthesized Silver Nanoparticles on Biomass Accumulation and Secondary Metabolism in Callus Cultures of *Fagonia indica*. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26, 1739-1750.
- Beyth, N., Houry-Haddad, Y., Domb, A., Khan, W., Hazan, R., 2015. Alternative Antimicrobial Approach: Nano-Antimicrobial Materials. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015:246012.
- Bhat, P., Bhat, A., 2016. Silver Nanoparticles for Enhancement of Accumulation of Capsaicin in Suspension Culture of *Capsicum sp.* *Journal of Experimental Sciences*, 7, 1-6.
- Buzea, C., Pacheco, I.I., Robbie, K., 2007. Nanomaterials and Nanoparticles: Sources and Toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
- Carnat, A.P., Carnat, A., Fraisse, D., Lamaison, J.L., 1998. The Aromatic and Polyphenolic Composition of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L. subsp. *officinalis*) Tea. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 72(5), 301-305.
- Chaiyana, W., Okonogi, S., 2012. Inhibition of Cholinesterase by Essential Oil from Food Plant. *Phytomedicine*, 19(8-9), 836-839.
- 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. *Iranian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 4(2), 11-19.
- Chung, I.M., Rajakumar, G., Thiruvengadam, M., 2018. Effect of Silver Nanoparticles on Phenolic Compounds Production and Biological Activities in Hairy Root Cultures of *Cucumis anguria*. *Acta Biologica Hungarica*, 69, 97-109.
- Coghlan, A., 2003. 'Potato' to feed India's Poor. *New Scientist*, 177(2376), 7-7.

- Collin, H.A., 2001. Secondary Product Formation in Plant Tissue Cultures. *Plant Growth Regulation*, 34, 119-134.
- Cordell, D., Drangert, J.O., White, S., 2009. The Story of Phosphorus: Global Food Security and Food for Thought. *Global Environmental Change*, 19(2), 292-305.
- Cowan, M.M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564-582.
- Çiftçi, Y.Ö., Altınkut Uncuoğlu, A., 2019. Bitki Biyoteknolojisinde Güncel Yaklaşımlar. Palme Yayınevi, 382s., Ankara.
- Dai, J., Mumper, R.J., 2010. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352.
- Dastmalchi, K., Dorman, H.J.D., Oinonen, P.P., Darwis, Y., Laakso, I., Hiltunen, R., 2008. Chemical Composition and *In Vitro* Antioxidative Activity of a Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Extract. *LWT-Food Science and Technology*, 41(3), 391-400.
- De Falco, E., Mancini, E., Roscigno, G., Mignola, E., Tagliatela-Scafati, O., Senatore, F., 2013. Chemical Composition and Biological Activity of Essential Oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under Different Growth Conditions. *Molecules*, 18(12), 14948-14960.
- Dehghani-Aghchekohal, Z., Omidi, M., Azizinezhad, R., Etminan, A., 2022. Stimulation of Secondary Metabolites and Γ -Terpinene Synthase by Silver Nanoparticles in Callus Cultures of *Carum carvi*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 194(7), 3228-3241.
- Delaney, B., 2015. Safety Assessment of Foods from Genetically Modified Crops in Countries with Developing Economies. *Food and Chemical Toxicology*, 86, 132-143.
- Demirbilek, M.E., 2015. Tarımda ve Gıdada Nanoteknoloji. *Gıda ve Yem Bilimi Teknolojisi Dergisi*, (15).
- De Sousa, A.C., Gattass, C.R., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Blank, A.F., Alves, P.B., 2004. *Melissa officinalis* L. Essential Oil: Antitumoral and Antioxidant Activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(5), 677-681.
- Dias, M.I., Sousa, M.J., Alves, R.C., Ferreira, I.C., 2016. Exploring Plant Tissue Culture to Improve the Production of Phenolic Compounds: A Review. *Industrial Crops and Products*, 82, 9-22.
- Dietz, K.J., Herth, S., 2011. Plant Nanotoxicology. *Trends in Plant Science*, 16(11), 582-589.
- Djanaguiraman, M., Nair, R., Giraldo, J.P., Prasad, P.V.V., 2018. Cerium Oxide Nanoparticles Decrease Drought-Induced Oxidative Damage in Sorghum

- Leading to Higher Photosynthesis and Grain Yield. ACS Omega, 3(10), 14406-14416.
- Dorner, W.G., 1985. Die Melisse-Immer Noch zu Überraschungen Fähig. Pharmazie in Unserer Zeit, 14(4), 112-121.
- Ebadollahi, R., Jafarirad, S., Kosari-Nasab, M., Mahjouri, S., 2019. Effect of Explant Source, Perlite Nanoparticles and TiO₂/Perlite Nanocomposites on Phytochemical Composition of Metabolites in Callus Cultures of *Hypericum perforatum*. Scientific Reports, 9(1), 1-15.
- El Meskaoui, A., 2013. Plant Cell Tissue and Organ Culture Biotechnology and its Application in Medicinal and Aromatic Plants. Medicinal and Aromatic Plants, 2, e147.
- El-Saber, M.M., Diab, M., Hendawey, M., Farroh, K., 2021. Magnetite Nanoparticles Different Sizes Effectiveness on Growth and Secondary Metabolites in *Ginkgo biloba* L. Callus. Egyptian Journal of Chemistry, 64(9), 4523-5432.
- Encalada, M.A., Hoyos, K.M., Rehecho, S., Berasategi, I., de Ciriano, M.G.Í., Ansorena, D., Astiasarán, I., Navarro-Blasco I., Cavero, R.Y., Calvo, M.I., 2011. Anti-Proliferative Effect of *Melissa officinalis* on Human Colon Cancer Cell Line. Plant Foods for Human Nutrition, 66, 328-334.
- Ersöz, M., Işıtan, A., Balaban, M., 2018. Nanoteknoloji 1: Nanoteknolojinin Temelleri.
- Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A., García-Lara, S., 2018. In Vitro Plant Tissue Culture: Means for Production of Biological Active Compounds. Planta, 248, 1-18.
- Farah, A., Donangelo, C.M., 2006. Phenolic Compounds in Coffee. Brazilian Journal of Plant Physiology, 18, 23-36.
- Farahani, H.A., Valadabadi, S.A., Daneshian, J., Khalvati, M.A., 2009. Evaluation Changing of Essential Oil of Balm (*Melissa officinalis* L.) under Water Deficit Stress Conditions. Journal of Medicinal Plants Research, 3(5), 329-333.
- Fatima, K., Abbas, S.R., Zia, M., Sabir, S.M., Khan, R.T., Khan, A.A., Khan Z., Hassan, R., Zaman, R., 2020. Induction of Secondary Metabolites on Nanoparticles Stress in Callus Culture of *Artemisia annua* L. Brazilian Journal of Biology, 81, 474-483.
- Fazal, H., Abbasi, B.H., Ahmad, N., Ali, M., 2016. Elicitation of Medicinally Important Antioxidant Secondary Metabolites with Silver and Gold Nanoparticles in Callus Cultures of *Prunella vulgaris* L. Applied Biochemistry and Biotechnology, 180, 1076-1092.
- Fouad, A., Hegazy, A.E., Azab, E., Khojah, E., Kapiel, T., 2021. Boosting of Antioxidants and Alkaloids in *Catharanthus roseus* Suspension Cultures using

- Silver Nanoparticles with Expression of CrMPK3 and STR Genes. *Plants*, 10(10), 2202.
- Fraceto, L.F., Grillo, R., de Medeiros, G.A., Scognamiglio, V., Rea, G., Bartolucci, C., 2016. Nanotechnology in Agriculture: Which Innovation Potential Does It Have?. *Frontiers in Environmental Science*, 20.
- Gardea-Torresdey, J.L., Peralta-Videa, J.R., Montes, M., De la Rosa, G., Corral-Diaz, B., 2004. Bioaccumulation of Cadmium, Chromium and Copper by *Convolvulus arvensis* L.: Impact on Plant Growth and Uptake of Nutritional Elements. *Bioresource Technology*, 92(3), 229-235.
- Ghanati, F., Bakhtiarian, S., 2013. Changes of Natural Compounds of *Artemisia annua* L. by Methyl Jasmonate and Silver Nanoparticles. *Advances in Environmental Biology*, 2251-2259.
- Ghanati, F., Bakhtiarian, S., 2014. Effect of Methyl Jasmonate and Silver Nanoparticles on Production of Secondary Metabolites by *Calendula officinalis* L (Asteraceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(11), 1783-1789.
- Ghosh, S., Patil, S., Ahire, M., Kitture, R., Kale, S., Pardesi, K., Cameotra, S.S., Bellare, J., Dhavale, D.D., Jabgunde, A., Chopade, B.A., 2012. Synthesis of Silver Nanoparticles using *Dioscorea bulbifera* Tuber Extract and Evaluation of its Synergistic Potential in Combination with Antimicrobial Agents. *International Journal of Nanomedicine*, 483-496.
- Giri, C.C., Zaheer, M., 2016. Chemical Elicitors versus Secondary Metabolite Production *In Vitro* Using Plant Cell, Tissue and Organ Cultures: Recent Trends and A Sky Eye View Appraisal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 126, 1-18.
- Gogos, A., Knauer, K., Bucheli, T.D., 2012. Nanomaterials in Plant Protection and Fertilization: Current State, Foreseen Applications, and Research Priorities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(39), 9781-9792.
- Gohari, G., Mohammadi, A., Akbari, A., Panahirad, S., Dadpour, M.R., Fotopoulos, V., Kimura, S., 2020. Titanium Dioxide Nanoparticles (TiO₂NPs) Promote Growth and Ameliorate Salinity Stress Effects on Essential Oil Profile and Biochemical Attributes of *Dracocephalum moldavica*. *Scientific Reports*, 10(1), 1-14.
- Gopinath, K., Gowri, S., Karthika, V., Arumugam, A., 2014. Green Synthesis of Gold Nanoparticles from Fruit Extract of *Terminalia arjuna*, for the Enhanced Seed Germination Activity of *Gloriosa superba*. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, 4, 1-11.
- Göktaş, Ö., Gıdık, B., 2019. Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Kullanım Alanları. *Bayburt Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 2(1), 145-151.

- Greathead, H., 2003. Plants and Plant Extracts for Improving Animal Productivity. *Proceedings of The Nutrition Society*, 62(2), 279-290.
- Hatami, M., Ghorbanpour, M., 2013. Effect of Nanosilver on Physiological Performance of Pelargonium Plants Exposed to Dark Storage. *Journal of Horticultural Research*, 21(1).
- Hatami, M., Hatamzadeh, A., Ghasemnezhad, M., Sajidi, R.H., 2016. Variations of the Phytochemical Compounds in Rose-scented Geranium Plant Exposed to Nanosilver Particles. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(7), 1747-1753.
- Haverkamp, R.G., Marshall, A.T., van Agterveld, D., 2007. Pick Your Carats: Nanoparticles of Gold–Silver–Copper alloy Produced *In Vivo*. *Journal of Nanoparticle Research*, 9, 697-700.
- Haverkamp, R.G., Marshall, A.T., 2009. The Mechanism of Metal Nanoparticle Formation in Plants: Limits on Accumulation. *Journal of Nanoparticle Research*, 11, 1453-1463.
- Hayat, K., Ali, S., Ullah, S., Fu, Y., Hussain, M., 2021. Green Synthesized Silver and Copper Nanoparticles Induced Changes in Biomass Parameters, Secondary Metabolites Production, and Antioxidant Activity in Callus Cultures of *Artemisia absinthium* L. *Green Processing and Synthesis*, 10(1), 61-72.
- Herodež, Š.S., Hadolin, M., Škerget, M., Knez, Ž., 2003. Solvent Extraction Study of Antioxidants from Balm (*Melissa officinalis* L.) Leaves. *Food Chemistry*, 80(2), 275-282.
- Hey, T., 1999. Richard Feynman and Computation. *Contemporary Physics*, 40(4), 257-265.
- Homaee, M.B., Ehsanpour, A.A., 2015. Physiological and Biochemical Responses of Potato (*Solanum tuberosum*) to Silver Nanoparticles and Silver Nitrate Treatments under *In Vitro* Conditions. *Indian Journal of Plant Physiology*, 20, 353-359.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Nigam, P.S., Sarker, S.D., Moore, J.E., Rao, J.R., Mazumdar, A., 2011. Antibacterial Activity of Some Lamiaceae Essential Oils Using Resazurin as an Indicator of Cell Growth. *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 1199-1206.
- Ilić, Z.S., Milenković, L., Tmušić, N., Stanojević, L., Stanojević, J., Cvetković, D., 2022. Essential Oils Content, Composition and Antioxidant Activity of Lemon Balm, Mint and Sweet Basil From Serbia. *Lwt*, 153, 112210.
- James, C., 2002. *Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2001 Feature: Bt Cotton* (Vol. 26). Ithaca, NY: ISAAA.
- Javed, R., Usman, M., Yücesan, B., Zia, M., Gürel, E., 2017. Effect of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles on Physiology and Steviol Glycosides Production in

- Micropropagated Shoots of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Physiology and Biochemistry, 110, 94-99.
- Javed, R., Yucesan, B., Zia, M., Gurel, E., 2018. Elicitation of Secondary Metabolites in Callus Cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni Grown under ZnO and CuO Nanoparticles Stress. Sugar Tech, 20, 194-201.
- Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y.S., Dufresne, A., Danquah, M.K., 2018. Review on Nanoparticles and Nanostructured Materials: History, Sources, Toxicity and Regulations. Beilstein Journal of Nanotechnology, 9(1), 1050-1074.
- Jun-Ge, Q.U., Zhang, W., Mei-Fang, J.I.N., Xing-Ju, Y.U., 2006. Effect of Homogeneity on Cell Growth and Anthocyanin Biosynthesis in Suspension Cultures of *Vitis vinifera*. Chinese Journal of Biotechnology, 22(5), 805-810.
- Kaçar, O., Göksu, E., Azkan, N., 2010. The Effect of Different Plant Densities on some Agronomic Characteristics At Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Cultivation. Ziraat Fakültesi Dergisi, Uludağ Üniversitesi, 24(2), 59-71.
- Kah, M., Kookana, R.S., Gogos, A., Bucheli, T.D., 2018. A Critical Evaluation of Nanopesticides and Nanofertilizers Against Their Conventional Analogues. Nature Nanotechnology, 13(8), 677-684.
- Kah, M., Tufenkji, N., White, J.C., 2019. Nano-Enabled Strategies to Enhance Crop Nutrition and Protection. Nature Nanotechnology, 14(6), 532-540.
- Karakaş, Ö., 2020. Effect of Silver Nanoparticles on Production of Indole Alkaloids in *Isatis constricta*. Iranian Journal of Science and Technology, Transactions A: Science, 44(3), 621-627.
- Karataş, İ., Karataş, R., Elmastaş, M., 2016. Antosiyaninlerin Kallus ve Hücre Süspansiyon Kültürüyle Üretimi. Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi, (12), 80-91.
- Kashyap, P.L., Rai, P., Sharma, S., Chakdar, H., Kumar, S., Pandiyan, K., Srivastava, A.K., 2016. Nanotechnology for the Detection and Diagnosis of Plant Pathogens. Nanoscience in Food and Agriculture 2, 253-276.
- Katar, D., Gürbüz, B., 2008. Oğulotu *Melissa officinalis* L.'nda Farklı Bitki Sıklığı ve Azot Dozlarının Drog Yaprak Verimi ve Bazı Özellikler Üzerine Etkisi. Journal of Agricultural Sciences, 14(01), 78-81.
- Kaveh, R., Li, Y.S., Ranjbar, S., Tehrani, R., Brueck, C.L., Van Aken, B., 2013. Changes in *Arabidopsis thaliana* Gene Expression in Response to Silver Nanoparticles and Silver Ions. Environmental Science & Technology, 47(18), 10637-10644.

- Kavianifar, S., Ghodrati, K., Naghdi Badi, H., Etminan, A.R., 2018. Effects of Nano Elicitors on Callus Induction and Mucilage Production in Tissue Culture of *Linum usitatissimum* L. *Journal of Medicinal Plants*, 17(67), 45-54.
- Keiper, A., 2003, *The Nanotechnology Revolution*, The New Atlantis (2), 17-34.
- Kennedy, D.O., Scholey, A.B., Tildesley, N.T., Perry, E.K., Wesnes, K.A., 2002. Modulation of Mood and Cognitive Performance Following Acute Administration of *Melissa officinalis* (Lemon Balm). *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 72(4), 953-964.
- Khalil, M.Y., Moustafa, A.A., Naguib, N., 2007. Growth, Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Some Medicinal Plants Grown under Organic Farming Condition. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(4), 451-457.
- Khan, S., Khan, J., 2010. Drought Tolerant Wheat Cultivar (Raj) for Rainfed Areas of KPK, Pakistan. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 47(4), 355-359.
- Khan, A.K., Kousar, S., Tungmunnithum, D., Hano, C., Abbasi, B.H., Anjum, S., 2021. Nano-Elicitation as an Effective and Emerging Strategy for *In Vitro* Production of Industrially Important Flavonoids. *Applied Sciences*, 11(4), 1694.
- Khattab, S., El Sherif, F., AlDayel, M.F., Yap, Y.K., Meligy, A.M.A., Islam, V.H., 2022. Silicon Dioxide and Silver Nanoparticles Elicit Antimicrobial Secondary Metabolites while Enhancing Growth and Multiplication of *Lavandula officinalis In-Vitro* Plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 149(1-2), 411-421.
- Kızıl, S., Bayram, E., Kırıcı, S., Tansi, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S., Telci, I., 2010. Tibbi ve Aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, 11, 15.
- Kim, J.K., Kang, C.S., Lee, J.K., Kim, Y.R., Han, H.Y., Yun, H.K., 2005. Evaluation of Repellency Effect of Two Natural Aroma Mosquito Repellent Compounds, Citronella and Citronellal. *Entomological Research*, 35(2), 117-120.
- Kim, D.H., Gopal, J., Sivanesan, I., 2017. Nanomaterials in Plant Tissue Culture: The Disclosed and Undisclosed. *RSC Advances*, 7(58), 36492-36505.
- Koch-Heitzmann, I., Schultze, W., 1984. *Melissa officinalis* L. Eine alte Arzneipflanze Mit Neuen Therapeutischen Wirkungen. *Dtsch. Apoth. Ztg*, 124, 2137-2145.
- Kottegoda, N., Sandaruwan, C., Priyadarshana, G., Siriwardhana, A., Rathnayake, U.A., Berugoda Arachchige, D.M., Kumarasinghe, A.R., Dahanayake, D., Karunaratne, V., Amaratunga, G.A., 2017. Urea-hydroxyapatite Nanohybrids for Slow Release of Nitrogen. *ACS Nano*, 11(2), 1214-1221.
- Labuda, J., Bučková, M., Heilerova, L., Čaniová-Žiaková, A., Brandšteterová, E., Mattusch, J., Wennrich, R., 2002. Detection of Antioxidative Activity of Plant Extracts at the DNA-Modified Screen-Printed Electrode. *Sensors*, 2(1), 1-10.

- Li, D., An, Q., Wu, Y., Li, J.Q., Pan, C., 2020. Foliar Application of Selenium Nanoparticles on Celery Stimulates Several Nutrient Component Levels By Regulating The A-Linolenic Acid Pathway. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(28), 10502-10510.
- Lila, M.A., 2005. Valuable Secondary Products from *In Vitro* Culture. P: 285-289. *Plant Development and Biotechnology*, Eds. Trigiano, RN and Gray D. CRC Pres, London, New York, Washington.
- Liveri, V.T., 2006. Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems. Springer Science & Business Media.
- Ma, Y., Kuang, L., He, X., Bai, W., Ding, Y., Zhang, Z., Zhao Y., Chai, Z., 2010. Effects of Rare Earth Oxide Nanoparticles on Root Elongation of Plants. *Chemosphere*, 78(3), 273-279.
- Malabadi, R.B., Meti, N.T., Mulgund, G.S., Nataraja, K., Kumar, S.V., 2012. Synthesis of silver Nanoparticles from *In Vitro* Derived Plants and Callus Cultures of *Costus speciosus* (Koen.); Assessment of Antibacterial Activity. *Research in Plant Biology*, 2(4).
- Miazek, K., Iwanek, W., Remacle, C., Richel, A., Goffin, D., 2015. Effect of Metals, Metalloids and Metallic Nanoparticles on Microalgae Growth and Industrial Product Biosynthesis: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23929-23969.
- Miraj, S., Rafieian-Kopaei, Kiani, S., 2017. *Melissa officinalis* L: A Review Study with an Antioxidant Prospective. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine*, 22(3), 385-394.
- Moradkhani, H., Sargsyan, E., Bibak, H., Naseri, B., Sadat-Hosseini, M., Fayazi-Barjin, A., Meftahizade, H., 2010. *Melissa officinalis* L., A Valuable Medicine Plant. *Journal of Medicinal Plant Research*, 4, 2753-2759.
- Morris, J.A., Khettry, A., Seitz, E.W., 1979. Antimicrobial Activity of Aroma Chemicals and Essential Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 56(5), 595-603.
- Mosavat, N., Golkar, P., Yousefifard, M., Javed, R., 2019. Modulation of Callus Growth and Secondary Metabolites in Different *Thymus* species and *Zataria multiflora* Micropropagated under ZnO Nanoparticles Stress. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 66(3), 316-322.
- Mousavi, S.R., Rezaei, M., 2011. Nanotechnology in Agriculture and Food Production. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*, 1(10), 414-419.
- Mousavi Kouhi, S.M., Lahouti, M., 2018. Application of ZnO Nanoparticles for Inducing Callus in Tissue Culture of Rapeseed. *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 14(2), 133-141.

- Mulabagal, V., Tsay, H.S., 2004. Plant Cell Cultures-An Alternative and Efficient Source for the Production of Biologically Important Secondary Metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2(1), 29-48.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, Behavior and Effects of Nanoparticles in The Environment. *Environmental Pollution*, 150(1), 5-22.
- Nuruzzaman, M.D., Rahman, M.M., Liu, Y., Naidu, R., 2016. Nanoencapsulation, Nano-Guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(7), 1447-1483.
- Onawunmi, G.O., Yisak, W.A., Ogunlana, E.O., 1984. Antibacterial Constituents in the Essential Oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. *Journal of Ethnopharmacology*, 12(3), 279-286.
- Onay, A., Yıldırım, H., Pirinç, V., Tilkat, E., Çiftçi, Y. Ö., Akdemir, H., Süzerer, V., Çalar, N., Binici, M., Akdemir, Ö. F., 2012. Bitkilerin Biyoteknolojik Yöntemlerle Ticari Çoğaltımı; Mevcut ve Gelecekteki Durum. *Batman Üniversitesi Yaşam Bilimleri Dergisi*, 1(2), 11-28.
- Ormanoğlu, N., Emekci, M., Ferizli, A., 2021. Böceklerle Mücadelede Nanoteknoloji. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 181-202.
- Pereira, P., Tysca, D., Oliveira, P., da Silva Brum, L.F., Picada, J.N., Ardenghi, P., 2005. Neurobehavioral and Genotoxic Aspects of Rosmarinic Acid. *Pharmacological Research*, 52(3), 199-203.
- Poborilova, Z., Opatrilova, R., Babula, P., 2013. Toxicity of Aluminium Oxide Nanoparticles Demonstrated using A BY-2 Plant Cell Suspension Culture Model. *Environmental and Experimental Botany*, 91, 1-11.
- Raei, M., Angaji, S.A., Omid, M., Khodayari, M., 2014. Effect of Abiotic Elicitors on Tissue Culture of *Aloe vera*. *Ici*, 5(1), 74-81.
- Ramezannezhad, R., Aghdasi, M., Fatemi, M., 2019. Enhanced Production of Cichoric Acid in Cell Suspension Culture of *Echinacea Purpurea* by Silver Nanoparticle Elicitation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 139, 261-273.
- Ramsden, J., 2011. *Nanoteknolojinin Esasları*. ODTÜ Yayıncılık.
- Remédios, C., Rosário, F., Bastos, V., 2012. Environmental Nanoparticles Interactions with Plants: Morphological, Physiological, and Genotoxic Aspects. *Journal of Botany*.
- Sabaghnia, N., Janmohammadi, M., 2015. Effect of Nano-Silicon Particles Application on Salinity Tolerance in Early Growth of Some Lentil Genotypes.

in *Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Sectio C–Biologia* (Vol. 69, No. 2, p. 39).

- Sadak, M.S., 2019. Impact of Silver Nanoparticles on Plant Growth, Some Biochemical Aspects, and Yield of Fenugreek Plant (*Trigonella foenum-graecum*). *Bulletin of the National Research Centre*, 43(1), 1-6.
- Saglam, C., Atakisi, I., Turhan, H., Kaba, S., Arslanoglu, F., Onemli, F., 2004. Effect of Propagation Method, Plant Density, and Age on Lemon Balm (*Melissa officinalis*) Herb and Oil Yield.
- Samarth, R.M., Samarth, M., Matsumoto, Y., 2017. Medicinally Important Aromatic Plants with Radioprotective Activity. *Future Science OA*, 3(4), FSO247.
- Sarı, A.O., Ceylan, A., 2002. Yield Characteristics and Essential Oil Composition of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Grown in the Aegean Region of Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 26(4), 217-224.
- 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*. *Turkish Journal of Biology*, 39(1), 111-118.
- Sharifi, S., Behzadi, S., Laurent, S., Forrest, M.L., Stroeve, P., Mahmoudi, M., 2012. Toxicity of Nanomaterials. *Chemical Society Reviews*, 41(6), 2323-2343.
- Sharma, P., Bhatt, D., Zaidi, M.G.H., Saradhi, P.P., Khanna, P.K., Arora, S., 2012. Silver Nanoparticle-Mediated Enhancement in Growth and Antioxidant Status of *Brassica juncea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 2225-2233.
- Sharma, V.K., Siskova, K.M., Zboril, R., Gardea-Torresdey, J.L., 2014. Organic-Coated Silver Nanoparticles in Biological and Environmental Conditions: Fate, Stability and Toxicity. *Advances in Colloid and Interface Science*, 204, 15-34.
- Sharma, V.K., Filip, J., Zboril, R., Varma, R.S., 2015. Natural Inorganic Nanoparticles–Formation, Fate, and Toxicity in the Environment. *Chemical Society Reviews*, 44(23), 8410-8423.
- Shehzad, M.A., Khan, M.A., Ali, A., Mohammad, S., Noureldeen, A., Darwish, H., Ali, A., Ahmad, A., Khan, T., Khan, R.S., 2021. Interactive Effects of Zinc Oxide Nano Particles and Different Light Regimes on Growth and Silymarin Biosynthesis in Callus Cultures of *Silybum marianum* L. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 49(1), 523-535.
- Shelar, G.B., Chavan, A.M., 2015. Myco-Synthesis of Silver Nanoparticles from *Trichoderma harzianum* and its Impact on Germination Status of Oil Seed. *Biolife*, 3(1), 109-113.
- Shilpa, K., Varun, K., Lakshmi, B.S., 2010. An Alternate Method of Natural Drug Production: Eliciting Secondary Metabolite Production using Plant Cell Culture. *Journal of Plant Sciences*, 5(3), 222-247.

- Silva, N.C.C., Fernandes Júnior, A., 2010. Biological Properties of Medicinal Plants: A Review of their Antimicrobial Activity. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 16, 402-413.
- Singh, R., Ahamad, S., 2022. Integration of Nanotechnology in Plant Tissue Culture. *Current Nanoscience*, 18(5), 604-610.
- Spinoso-Castillo, J.L., Chavez-Santoscoy, R.A., Bogdanchikova, N., Perez-Sato, J.A., Morales-Ramos, V., Bello-Bello, J.J., 2017. Antimicrobial and Hormetic Effects of Silver Nanoparticles on *In Vitro* Regeneration of Vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) using a Temporary Immersion System. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 129, 195-207.
- Surendran, S., Qassadi, F., Surendran, G., Lilley, D., Heinrich, M., 2021. Myrcene— What Are the Potential Health Benefits of this Flavouring and Aroma Agent?. *Frontiers in Nutrition*, 8, 699666.
- Suriyaprabha, R., Karunakaran, G., Yuvakkumar, R., Rajendran, V., Kannan, N., 2012. Silica Nanoparticles for Increased Silica Availability in Maize (*Zea mays*. L) Seeds under Hydroponic Conditions. *Current Nanoscience*, 8(6), 902-908.
- Talankova-Sereda, T.E., Liapina, K.V., Shkopinskiy, E.A., Ustinov, A.I., Kovalyova, A.V., Dulnev, P.G., Kucenko, N.I., 2016. The Influence of Cu и Co Nanoparticles on Growth Characteristics and Biochemical Structure of *Mentha longifolia* *In Vitro*. In *Nanophysics, Nanophotonics, Surface Studies, and Applications: Selected Proceedings of the 3rd International Conference Nanotechnology and Nanomaterials (NANO2015)*, August 26-30, 2015, Lviv, Ukraine (pp. 427-436). Springer International Publishing.
- Tarbigem (Tarla Bitkileri Üreticileri Merkez Birliği), 2018. Tıbbi ve Aromatik Baharat Bitkileri: Oğul Otu (*Melissa officinalis*). Erişim Tarihi: 27.05.2023. <https://www.tarbigem.com.tr/urunler/tibbi-ve-aromatik-baharat-bitkiler/ogul-otumelissa-officinalis>
- Thul, S.T., Sarangi, B.K., 2015. Implications of Nanotechnology on Plant Productivity and its Rhizospheric Environment. *Nanotechnology and Plant Sciences: Nanoparticles and their Impact on Plants*, 37-53.
- Tiring, G., Satar, S., Özkaya, O., 2021. Sekonder Metabolitler. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 35(1), 203-215.
- Tiwari, R., Rana, C.S., 2015. Plant Secondary Metabolites: A Review. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(5), 661-670.
- Topdemir, A., Nazmi, G.Ü.R., Demir, Z., 2018. *Melissa officinalis* L. Kallus Kültürlerinin Antoksidan Özellikleri. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 1(1), 12-15.
- Tripathi, D.K., Singh, S., Singh, S., Pandey, R., Singh, V.P., Sharma, N.C., Prasad, S.M., Dubey, N.K., Chauhan, D.K., 2017. An Overview on Manufactured

Nanoparticles in Plants: Uptake, Translocation, Accumulation and Phytotoxicity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 110, 2-12.

Tüylek, Z., 2018. Nanoteknolojinin Çevre ve İnsan Sağlığı Üzerindeki Riskleri. *Kilis 7 Aralık Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(2), 1-12.

Uskoković, V., 2015. When $1+1 > 2$: Nanostructured Composites for Hard Tissue Engineering Applications. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 434-451.

Uzun, E., Sariyar, G., Adsersen, A., Karakoc, B., Ötük, G., Oktayoglu, E., Pirildar, S., 2004. Traditional Medicine in Sakarya Province (Turkey) and Antimicrobial Activities of Selected Species. *Journal of Ethnopharmacology*, 95(2-3), 287-296.

Vahide, P., Negar, K., Raziéh, J.H., 2021. Bio Nanoparticles as Elicitors Increase Accumulation of Betulin and Betulinic Acid in Callus Cultures. *South African Journal of Botany*, 141, 431-439.

Vannini, C., Domingo, G., Onelli, E., Prinsi, B., Marsoni, M., Espen, L., Bracale, M., 2013. Morphological and Proteomic Responses of *Eruca sativa* Exposed to Silver Nanoparticles or Silver Nitrate. *Plos One*, 8(7), e68752.

Vernay, P., Gauthier-Moussard, C., Jean, L., Bordas, F., Faure, O., Ledoigt, G., Hitmi, A., 2008. Effect of Chromium Species on Phytochemical and Physiological Parameters in *Datura innoxia*. *Chemosphere*, 72(5), 763-771.

Vitullo, M., Ripabelli, G., Fanelli, I., Tamburro, M., Delfine, S., Sammarco, M.L., 2011. Microbiological and Toxicological Quality of Dried Herbs. *Letters in Applied Microbiology*, 52(6), 573-580.

Wang, L., Hu, C., Shao, L., 2017. The Antimicrobial Activity of Nanoparticles: Present Situation and Prospects for the Future. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1227.

Wang, P., Lombi, E., Zhao, F.J., Kopittke, P.M., 2016. Nanotechnology: A New Opportunity in Plant Sciences. *Trends in Plant Science*, 21(8), 699-712.

Wesołowska, A., Grzeszczuk, M., Kulpa, D., 2015. GC-MS Analysis of the Essential Oil from Flowers of *Chrysanthemum coronarium* L. Propagated Conventionally and Derived from *In Vitro* Cultures. *Acta Chromatographica*, 27(3), 525-539.

Wesołowska, A., Grzeszczuk, M., Wilas, J., Kulpa, D., 2016. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis of Indole Alkaloids Isolated from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don Cultivated Conventionally and Derived from *In Vitro* Cultures. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 44(1), 100-106.

Wesołowska, A., Jadczyk, P., Kulpa, D., Przewodowski, W., 2019. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) Analysis of Essential Oils

- from Agnps and Aunps Elicited *Lavandula angustifolia* *In Vitro* Cultures. *Molecules*, 24(3), 606.
- White, J.C., Gardea-Torresdey, J., 2018. Achieving Food Security through the Very Small. *Nature Nanotechnology*, 13(8), 627-629.
- Wink, M., 1999. Biochemistry, Role and Biotechnology of Secondary Metabolites. In: *Function of Plant Secondary Metabolites and their Exploitation in Biotechnology*. Annu Plant Rev, Vol: 3, Sheffield Academic Press and CRC Press, pp: 1-16.
- Wong, A. H., Smith, M., Boon, H.S., 1998. Herbal Remedies in Psychiatric Practice. *Archives of General Psychiatry*, 55(11), 1033-1044.
- Wu, H., Shabala, L., Shabala, S., Giraldo, J.P., 2018. Hydroxyl Radical Scavenging by Cerium Oxide Nanoparticles Improves *Arabidopsis salinity* Tolerance by Enhancing Leaf Mesophyll Potassium Retention. *Environmental Science: Nano*, 5(7), 1567-1583.
- Xu, H., Qu, F., Xu, H., Lai, W., Andrew Wang, Y., Aguilar, Z. P., Wei, H., 2012. Role of Reactive Oxygen Species in the Antibacterial Mechanism of Silver Nanoparticles on *Escherichia coli* O157: H7. *Biometals*, 25, 45-53.
- Yıldıztekin, M., Ulusoy, H., Tuna, A.L., 2019. Türkiye’de Tıbbi ve Aromatik Bitkilerin Yetiştiriciliği ve Sürdürülebilir Gelişimi. In 4th International Symposium on Innovative Approaches in Engineering and Natural Sciences (Vol. 4, No. 6, pp. 481-484).
- Yu, Y., Guo, M., Yuan, M., Liu, W., Hu, J., 2016. Nickel Nanoparticle-Modified Electrode for Ultra-Sensitive Electrochemical Detection of Insulin. *Biosensors and Bioelectronics*, 77, 215-219.
- Zhang, B., Zheng, L.P., Yi Li, W., Wen Wang, J., 2013. Stimulation of Artemisinin Production in *Artemisia annua* Hairy Roots by Ag-SiO₂ Core-Shell Nanoparticles. *Current Nanoscience*, 9(3), 363-370.
- Zhang, C., Yan, Q., Cheuk, W.K., Wu, J., 2004. Enhancement of Tanshinone Production in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Culture By Ag⁺ Elicitation and Nutrient Feeding. *Planta Medica*, 70(02), 147-151.
- Zhao, J., Wang, J., Chen, Y., Agarwal, R., 1999. Anti-Tumor-Promoting Activity of a Polyphenolic Fraction Isolated From Grape Seeds in the Mouse Skin Two-Stage Initiation–Promotion Protocol and Identification of Procyanidin B5-3'-Gallate as the Most Effective Antioxidant Constituent. *Carcinogenesis*, 20(9), 1737-1745.
- Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor Signal Transduction Leading to Production of Plant Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283-333.

Zhu, K., Wu, M., Lai, H., Guo, C., Li, J., Wang, Y., Chen, Y., Wang, C., Shi, J., 2016. Nanoparticle-Enhanced Generation of Gene-Transfected Mesenchymal Stem Cells For *In Vivo* Cardiac Repair. *Biomaterials*, 74, 188-199.

