

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAPRAKTAN UYGULANAN KİTOSAN, DEMİROKSİT VE
KİTOSAN-DEMİROKSİT KOMPLEKSİ
NANOPARTİKÜLLERİNİN *Hypericum triquetrifolium* TURRA'NIN
SEKONDER METABOLİTLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Ayşe BAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

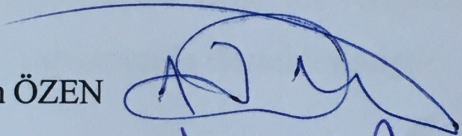
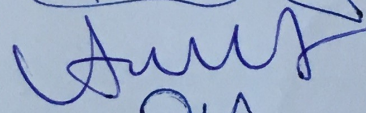
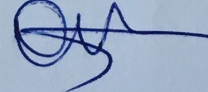
DIYARBAKIR

2019

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Ayşe BAL tarafından yapılan "kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartilüllerinin *hypericum triquetrifolium* Turra'nın sekonder metabolitler üzerine etkisi" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Ünvan	Ad Soyad	
Başkan	: Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN	
Üye	: Prof. Dr. Ahmet ONAY	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Özgür KARAKAŞ	

Tez Savunma Sınav Tarihi:17/06/2019

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../.../2019

Prof. Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam sırasında fikirleriyle yol gösteren yardımlarını ve hoşgörüsünü hiçbir zaman eksik etmeyen çalışmalarımın her aşamasında değerli, engin bilgileriyle ve eleştirileriyle beni yönlendiren değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN'e ve nanopartiküllerin sentezini sağlayan ikinci danışmanım Prof. Dr. Bilsen Tural'a teşekkürü bir borç bilirim.

İstatistik hesaplamaları yapan Dr. Öğr. Üyesi Veysi Kızmaz ve fenolik bileşiklerin özütlenmesinde yardımcı olan yüksek lisans öğrencisi Servan Savaşçı' ya çok teşekkür ederim.

Ayrıca eğitim, öğretim hayatım boyunca her daim yanımda olan maddi ve manevi desteğini gördüğüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından FEN.18.013 proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
KISALTMA VE SİMGELER.....	VIII
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	7
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Materyal	13
3.1.1. <i>Hypericum triquetrifolium</i> Turra (Hypericaceae)	13
3.1.1.1. <i>H. triquetrifolium</i> 'un Çimlendirilmesi.....	14
3.1.1.2. Kullanılan Kimyasallar.....	15
3.1.1.3. Cihazlar ve Gereçler.....	16
3.2. Metot.....	16
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	16
3.2.1.1. Kitosan Çözeltilisinin Hazırlanışı.....	16
3.2.1.2. Demiroksit (Fe ₃ O ₄) Nanopartikül Çözeltilisinin Hazırlanışı	17
3.2.1.3. Kitosan-Demiroksit Nanopartikül Çözeltilisinin Hazırlanışı	17
3.3. Kitosan-Demiroksit (KS-Fe ₃ O ₄) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	17
3.3.1. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM).....	17
3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	17

3.4.	Dinamik Işık Saçılımı (DLS).....	18
3.5.	Yapraktan Uygulama.....	19
3.6.	Fenolik Bileşiklerin Özütleme.....	19
3.7.	LC/MS/MS Analizi.....	19
3.7.1.	Hiperisin ve Türevleri İçin Belirlenen LC/MS/MS Çalışma Koşulları.....	20
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	21
4.1.	Genel Bulgular.....	21
4.1.1.	Çiçeklenme Öncesi Dönem.....	21
4.1.2.	Tam Çiçeklenme Dönemi.....	22
4.2.	Elisitörlerin Bileşikler Üzerine Olan Etkileri.....	23
4.2.1.	Kontrol Grubu.....	23
4.2.2.	Kitosan, Demiroksit ve Kitosan-Demiroksit Nanopartiküllerinin Etkileri	24
5.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	29
6.	KAYNAKLAR	31
	ÖZGEÇMİŞ.....	37

ÖZET

YAPRAKTAN UYGULANAN KİTOSAN, DEMİROKSİT VE KİTOSAN-DEMİROKSİT KOMPLEKSİ NANOPARTİKÜLLERİNİN *Hypericum triquetrifolium* TURRA'NIN SEKONDER METABOLİTLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ayşe BAL

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2019

Hypericum triquetrifolium Turra. hiperisin ve türevleri gibi antidepresan olarak kullanılan sekonder metabolitleri içeren tıbbi bir bitkidir. Bitkinin belirli gelişim aşamasında ya da stres sırasında üretilen sekonder metabolit miktarını artırmak için çeşitli elisitörler kullanılmaktadır. Son yıllarda daha kullanışlı olduğu ve kolay alınabildiği için nano elisitörlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. Bu çalışmada çiçeklenme öncesi ve tam çiçeklenme döneminde yapraktan uygulanan 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm ve 150 ppm konsantrasyonlarındaki kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartiküllerinin *H. triquetrifolium*'un fenolik bileşikleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır.

Çiçeklenme öncesi dönemde 75 ppm'lik demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartikülleri; hesperidin, klorojenik asit, hiperosit, rutin, kuersitrin, kampferol ve hiperforin miktarlarında istatistiksel bakımdan önemli artışlar meydana getirmiştir. Yine bu dönemde uygulanan 150 ppm'lik kitosan nanopartikülü; hesperidin, hiperosit ve hiperforin miktarlarını artırmıştır.

Tam çiçeklenme döneminde, 150 ppm demiroksit nanoparçacıkları hesperidin, klorojenik asit, hiperosit, rutin, kuersitrin, hiperforin ve kampferol miktarlarını arttırmıştır. 150 ppm kitosan'da klorojenik asit, hiperosit, kuersitrin, psödohiperisin ve hiperisin miktarları artmıştır. Aynı dönemde 100 ppm'lik kitosan rutin ve kampferol konsantrasyonu artmıştır. 100 ppm kitosan-demiroksit kompleksinin nanoparçacıkları da kuersitrin, kampferol ve psödohiperisin miktarını arttırmıştır.

Anahtar kelimeler: *Hypericum triquetrifolium*, fenolik bileşikler, nanopartikül, kitosan, demiroksit, kitosan-demiroksit kompleksi

ABSTRACT

THE EFFECT OF FOLIAR APPLICATION OF CHITOSAN, IRONOXIDE AND CHITOSAN-IRONOXIDE COMPLEX NANOPARTICULES ON SECONDARY METABOLITES OF *Hypericum triquetrifolium* TURRA

MSc THESIS

Ayşe BAL

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

2019

Hypericum triquetrifolium Turra. Is a medicinal plant containing secondary metabolites used as antidepressants, such as hypericin and its derivatives. Various elicitors are used to increase the amount of secondary metabolite produced at the particular stage of development or during stress. In recent years, the use of nano elicitors have become widespread since it is more convenient and easily available. In this study, the effect of 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm and 150 ppm concentrations of chitosan, ironoxide and chitosan-ironoxide complex nanoparticles on phenolic compounds of *H. triquetrifolium* were investigated before flowering and during full flowering period.

In the pre-flowering period, 75 ppm iron oxide and chitosan-iron oxide complex nanoparticles have increased statistically significant the amounts of hesperidine, chlorogenic acid, hyperoside, rutine, quercitrin, campferol and hyperforin. 150 chitosan nanoparticles applied in this period have increased the amounts of hesperidin, hyperoside and hyperforin.

In full flowering period, 150 ppm iron oxide nanoparticles have increased the amounts of hesperidine, chlorogenic acid, hyperoside, rutine, quercitrin, hyperforin and campferol. The amounts of chlorogenic acid, hyperoside, quercitrin, pseudohypericin and hypericin have increased in 150 ppm chitosan. In the same period the concentration of rutine and campferol have increased in 100 ppm chitosan Nanoparticles of chitosan-iron oxide complex of 100 ppm also increased the amount of quercitrin, campferol and pseudohypericin.

Keywords: *Hypericum triquetrifolium*, phenolic compounds, nanoparticles, chitosan, ironoxide, chitosan-ironoxide complex

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 3.1.	Demiroksit ve kitosan-demiroksit nanopartiküllerin dinamik ışık saçılımı	18
Çizelge 3.2.	Fenolik bileşik standartlarının LC-MS / MS kromatogramı	19
Çizelge 3.3.	Fenolik bileşiklerin LC-MS/MS analitik parametreleri	20
Çizelge 4.1.	Çiçeklenme öncesi dönemde <i>H. triquetrifolium</i> 'un fenolik bileşikler üzerine kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartiküllerinin değişik konsantrasyonlarının etkisi	21
Çizelge 4.2.	Tam çiçeklenme döneminde <i>H. triquetrifolium</i> 'un fenolik bileşikler üzerine kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartiküllerinin değişik konsantrasyonlarının etkisi	22

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 3.1.	<i>H. triquetrifolium</i> 'un arazideki genel görünümü	13
Şekil 3.2.	Çimlenmiş <i>H. triquetrifolium</i>	14
Şekil 3.3.	On beş günlük <i>H. triquetrifolium</i>	14
Şekil 3.4.	Bir aylık <i>H. triquetrifolium</i>	15
Şekil 3.5.	Kitosan-Demiroksit nanopartiküllerin TEM görüntüsü	17
Şekil 3.6.	Kitosan-Demiroksit nanopartiküllerin SEM görüntüsü	18

KISALTMA VE SİMGELER

A	: Kitosan nanopartikülü
B	: Demiroksit nanopartikülü
C	: Kitosan-demiroksit kompleksi nanopartikülü
°C	: Santigrat derece
O ₂	: Oksijen
%	: Yüzde değişimi
µg	: Mikrogram
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
cm	: Santimetre
mm	: Milimetre
M	: Molar
g	: Gram
L	: Litre
Ppm	: Milyonda kısım
Ppb	: Milyarda kısım
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
SEM	: Taramalı elektronik mikroskobu
LC/MS/MS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi

1. GİRİŞ

İnsanlar tarihinin ilk çağlarından beri bitkilerden çeşitli şekillerde faydalanmışlardır. Hala kullanımdaki birçok endüstriyel ve tedavi edici bileşikler bitki kökenlidir. Bitkisel doğal ürünler üzerine yapılan çalışmalar yeni moleküllerin keşfi için en etkili stratejidir (Mañero ve ark., 2012).

Tedavide kullanılan birçok bitki bulunmaktadır. Bunlar arasında içerdiği hiperisinve türevleri bakımından antidepresan özellik gösteren ve milyonlarca dolarlık pazarı bulunan *Hypericum* cinsi son yıllarda öne çıkan önemli bitkilerden biridir (Acar, 2018).

Hypericum cinsinin en yaygın kullanılan türü olan *Hypericum perforatum* L. uzun yıllardan beri antidepresan olarak kullanılmaktadır. *Hypericum*'dan elde edilen ilaçlar Avrupa ve Amerika'da marketlerde satılmaktadır (Mennini ve Gobbi, 2004).

H. perforatum 2008 yılında ABD'de ilaç pazarında satılan en iyi 10 bitkisel besin takviyesi arasındadır ve yaklaşık 8,2 milyon dolarlık ticareti bulunmaktadır. *H. perforatum* tıbbi ürünlerinin (Psychotonin®, Neuroplant® ve Hyperforat®) antidepresan uygulamaları, özellikle Avrupa'da giderek yaygınlaşmaktadır (Yamaner ve ark., 2013).

Hypericum özütleri antidepresan özellikleri dışında yara iyileştirici, bazı kanser türleri, diyabet, romatizma, mide ve bağırsak ülserleri, karaciğer, lenfatit, kabakulak ve hepatit gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Süntar ve ark., 2016; Mullaicharam ve Halligudi, 2018).

Hypericum türlerinden elde edilen hiperisin ve hiperforinin değişik kanser türlerinde hücre ölümlerine yol açtığı belirlenmiştir. Prostat kanser hücre hatları üzerine zehir etkisi yaptığı bildirilmiştir. Hiperisin, yaygın olarak *H. perforatum*'da (St. John's Wort) bulunmaktadır. Bu tür *Hypericum* cinsinin kansere karşı kullanılan en önemli elemanıdır (Agostinis ve ark., 2002).

Dünyanın her kıtasına yayılmış olan 469 *Hypericum* türü bulunmaktadır. Anadolu *Hypericum* türleri bakımından zengindir ve burada yetişen 96 türün 46'sı endemiktir. Cinsin en iyi bilinen üyeleri *H. perforatum* ve *H. triquetrifolium* Turra'dır.

1.GİRİŞ

Bu türler halk arasında kantaron, binbirdelik otu, kan otu, kılıç otu, yara otu, kuzukıran gibi bölgesel adlarla anılır (Baytop, 1999).

Hypericum türleri naftodiantronlar, floroglusinol, flavonoidler, çeşitli organik asitler, uçucu yağlar, ksantonlar, tanenler ve diğer suda çözünen bileşenleri içeren çok sayıda ikincil metabolit bulundurmaktadır (Oskay ve Oskay, 2009).

Sekonder metabolitler bitkilerin savunma mekanizmalarının önemli bir kısmını oluştururlar. Bu bileşikler ilaç sanayi, gıda, kozmetik vs. gibi birçok alanda ticari olarak kullanılmaktadır (Vanisree ve ark., 2004).

Sekonder metabolitlerin, bitkiler ve mikroorganizmalar, böcekler ve hayvanlar arasındaki ilişkileri düzenlemede ekolojik rolleri vardır (Alvarez, 2014).

Bitkinin belirli gelişim aşamasında ya da stres sırasında çok az miktarlarda üretilen sekonder metabolitlerin miktarlarının artırılması son zamanlarda çalışılan önemli konuların başında gelmektedir. Bu yöndeki çalışmalarda elisitör kullanımı yaygınlaşarak devam etmektedir. Hedef canlı organizmanın fizyolojik değişimlerini çeşitli yönlerden indükleyebilecek moleküller olan elisitörler, kimyasal veya biyolojik kökenli olabilirler. Son yıllarda özellikle nanopartikül elisitör kullanımı bitkilerdeki sekonder metabolitlerin miktarını artırma çalışmalarına önemli katkı sunmaktadır (Thakur ve ark., 2018).

Nano kelimesi Yunan dilinde son derece küçük, ufacık anlamında kullanılmaktadır ve metrenin milyarda birini temsil eder. Nanoteknoloji ise, büyüklüğü 100 nm'den daha ufak olan madde ve sistemleri inceleyen bir bilim dalıdır (Manjunatha ve ark., 2016).

Nispi yüzey alanının küçüklüğü ve kuantum etkilerinin artması gibi iki temel faktör nanomateriyallerin özelliklerini diğer malzemelerden önemli ölçüde farklılaştırır (Divya ve Jisha, 2017).

Nano boyutlu metal komplekslerin sentezi, son yıllarda geniş uygulama alanları bulmuş ve benzersiz özellikleri nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Tavallali, 2018).

Nanopartiküller çevreye yeni değildirler ve doğal olarak mineraller, killeri ve bakteri ürünleri şeklinde bulunurlar. Eski zamanlardan beri metaller için bir renklendirici olarak kullanılmış ancak çeşitli kullanımlar için nanopartiküllerin

sistematiik tasarımı ve mühendisliği sadece son birkaç yılda başlamıştır. Tasarlanmış nanopartiküller aynı malzemededen dökme numunelerde bulunmayan özelliklere sahip olacak şekilde tasarlanmıştır (Radad ve ark., 2012; Maurer-Jones ve ark., 2013).

Son yıllarda nanoteknoloji insan yararına olan tüm olaylarda kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle bitkisel ürün verimi ve kalitesini artırmak için üretilmeye başlanan nano gübreler, gelecekte önemli bir teknoloji kolu olacaktır (Dağhan, 2017).

Nano gübreler, toprak verimliliğini arttırmak için kullanılan nanoteknolojik bileşiklerdir (Burunert ve ark., 2006).

Topraktan veya yaprak temasıyla bitkiler tarafından alınan nanopartiküllerin çoğu, hem fizyolojik hem de morfolojik düzeyde çeşitli etkilere sahiptirler. Bu bileşiklerin etkileri, bitkinin türüne, büyüme aşamasına, büyüme koşullarına, uygulama yöntemine, dozuna ve diğer faktörlerle birlikte maruz kalma süresine bağlı olarak değişmektedir (Rizwan ve ark., 2017).

Nano gübreler bitkilere besin sağlamak için kullanılırlar. 30 ila 40 nm arasında değişen çok küçük boyutlara sahiptirler ve yüksek yüzey alanlarından dolayı sayısız iyonları tutabilmekte ve bitkinin ihtiyacını karşılamak için zamanında ve yavaşça salınmaktadırlar. Yavaş salımlı ve süper emici fosfat ve azotlu gübreler vardır. Nano gübreler, üretimde artış, ultra yüksek emilim, fotosentezde artış ve yaprak yüzey alanında belirgin genişleme gibi benzersiz özelliklere sahiptir (Abdel-Aziz ve ark., 2018).

Son yıllarda yararlılığını artırmak üzere gübrelerin nano gübreler formuna çevrilerek kullanılması çalışılmaya başlanmıştır. Nano gübreler; bitkinin ihtiyaç duyduğu besin elementlerinin bitkiye alınmasını kolaylaştırır. Bu durumda gübre kullanımının azalması üretim maliyetlerini de düşürecektir.

Nano gübreler yavaş çözünürler ve toprakta, organik madde, kil ve kireç gibi bileşiklerle etkileşmezler (Dağhan, 2017; Singh, 2017).

Bu gübreler yavaş çözündüklerinden bitki için daha fazla yararlı olabilirler. Parçacık boyutu küçük olduğu için birim alana düşen miktarı yüksektir. Nano parçacıklar içine kapsüllenen nano gübreler yavaş salındığı için bitkiye daha yararlı

1.GİRİŞ

forma gelir. Bunun dışında, yapraktan uygulanan nano gübreler toprakta aşırı gübre birikimini önleyecek bir yöntem olarak ön plana çıkabilir (Dağhan, 2017).

Çalışmada kullanılan nano elisitörlerden biri olan kitosan, kitinin kısmi deasetilasyonu ile elde edilen bir biyopolimerdir. Beyaz renkte sert ve elastik olmayan azotlu bir polisakkarittir (Muxika ve ark., 2017).

Kitin ilk kez 1811 yılında Henri Braconnot tarafından mantarlar üzerinde araştırma yapılırken keşfedilmiştir (Divya ve Jisha, 2018). Daha sonra böceklerin dış kabuklarında da bulunduğu tespit edilmiştir. N-asetil-d-glukozamin birimlerinden oluşan kitin doğrusal bir polisakkarittir ve doğada mevcut olan en yüksek üretim hızına ve biyolojik olarak bozunurluğa sahip maddelerden biridir (Ferri ve Tassoni, 2011).

Kitosan, hem bütünlüğü bozulmamış bitkide hem de *in vitro* sistemlerde farmasötik olarak faydalı bileşiklerin üretimini uyarmak için kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2019).

Kitosan uygulaması, *H. perforatum*'un *in vitro* saçak kök kültürlerinde, ksantonlar ve diğer polifenoller gibi sekonder metabolit üretimini arttırmak için etkili bir strateji olarak kabul edilmiştir (Brasili ve ark., 2014).

Kitosan, ilginç özellikleri nedeniyle biyomedikal sanayi, tarım, genetik mühendisliği, gıda endüstrisi, çevre kirliliğinin kontrolü, su arıtma, kağıt üretimi, fotoğrafçılık vb. alanlarda kullanılmaktadır (Malerba ve Cerana, 2016).

Kitosanın bitki büyümesini teşvik ettiği, yenilebilir ürünlerin güvenliğini koruduğu ve çeşitli bahçe bitkilerinde abiyotik ve biyotik stres toleransını uyardığı kanıtlanmıştır (Abdel-Aziz ve ark., 2018).

Kitosanın abiyotik ve biyotik streslere karşı bitkinin savunma yanıtlarını arttırdığı gösterilmiştir. Bunun, bitki savunma enzimlerinin indüksiyonuna ve polifenolikler, lignin, flavonoidler ve fitoaleksinler gibi sekonder metabolitlerin sentezlenmesine yol açabileceği düşünülmektedir (Malerba ve Cerana, 2016).

Kitosan nanopartikülleri mükemmel fizikokimyasal özelliklere sahip doğal malzemelerdir ayrıca çevre dostu ve biyoaktifirler. Kitosan nanopartikülü; yüzey alanı, boyutu, katyonik yapısı gibi değiştirilmiş fizikokimyasal özellikleri ile farklı biyolojik aktiviteler sunmaktadır (Abdel-Aziz ve ark., 2018).

Çalışmada ayrıca demiroksit nanopartiküllerinin (Fe_2O_3 NP) hiperisin ve türevlerinin miktarı üzerine etkisi de araştırılmıştır. Elektron taşıma zincirinin önemli bir parçası olan ve klorofil sentezi ile birçok enzimin aktifleşmesi için gerekli olan demir yeryüzünde en bol bulunan elementlerden biridir. Ancak düşük çözünürlüğü nedeniyle genellikle bitki tarafından kısıtlıdır.

Daha yararlı hale getirmek için son yıllarda nanopartikül halinde kullanılmaya başlanan demiroksit, böylelikle geniş bir yüzey alanına ve yüksek bir reaktiviteye sahip olur. Bunun yanında, diğer birçok metalik nanopartiküllerle karşılaştırıldığında, demiroksit nanopartikülleri, daha az maliyetli ve daha az toksiktir (Askary ve ark., 2017).

Bitki hücre duvarı tarafından minerallerin alımını arttırmak için yapraklardan uygulanan nanopartiküllerin kullanımı, bitki hücrelerinde ZnO ve Fe_3O_4 gibi metal bazlı bileşiklerin etkileşimlerini incelemek bakımından önemlidir (Rezapour-Osalou ve ark., 2015).

Son yıllarda bitkilere uygulanacak gübrelerin iyonlarının bitkiye daha kolay alınmasını sağlamak için kitosan-metal oksit nanopartikülleri kullanılmaya başlanmıştır (Abdel-Aziz ve ark., 2018). Bu nedenle kitosan-demiroksit kompleksi oluşturularak demiroksitin bitkiye daha etkin bir şekilde taşınmasının hiperisin ve türevleri miktarı üzerine ne gibi etkiler yaptığı da araştırılmıştır.

Bu çalışmada *H. triquetrifolium*'un hiperisin ve türevleri miktarını artırmak için; kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartiküllerinin kullanımının uygun olup olmadığı araştırılmaya çalışılmıştır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Dünyadaki yıllık ticareti yüz milyonlarca doları aşan *Hypericum* türleri uzun yıllardan beri doğal tedavide kullanılmaktadır.

H. perforatum L. bu cinsin en önemli türlerinden biridir. Bu bitki, hafif ile orta şiddette depresyon tedavisinde etkinliği için büyük ölçüde kullanılmaktadır. Bu cinse ait diğer bazı türler de geleneksel tıpta kullanılmaktadır. *Hypericum* türleri en az on farklı sınıfa ait biyolojik olarak aktif sekonder metabolitleri içerir; naftodiantronlar (hiperisinve türevleri) ve flavonoidler (rutin, hiperosit, kuersitrin) bunlar arasında öne çıkan sekonder metabolitlerdir (Marelli ve ark., 2016).

H. triquetrifolium geleneksel tedavide yatıştırıcı, antihelmintik, antienflamatuvar ve antiseptik, yanık tedavisi ve gastrointestinal hastalıklara karşı kullanılır (Conforti ve ark., 2002; 2007).

Çalışmaya konu olan *H. triquetrifolium*, (*Hypericaceae*) dünyada sıcak ılıman bölgelerde yayılış gösterir. Yaklaşık 400 tür içeren *Hypericum* cinsinin bir üyesi olan bu bitki genellikle kuru, taşlı veya kumlu yerlerde yetişen çok yıllık bir bitkidir. *H. triquetrifolium*, oksidatif strese bağlı çeşitli hastalıkların önlenmesinde yardımcı olabilecek yüksek antioksidan aktiviteler sunmaktadır (Couladis ve ark., 2002).

H. triquetrifolium köklerinin metanolik ekstraktlarının hiperisin içeriği konusunda yapılan çalışmalar bu bitkinin tedavide etkin bir şekilde kullanılabilceğini göstermiştir (Alali ve ark., 2004; Ayan ve Çırak, 2008).

Hosni ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *H. triquetrifolium*'un farklı büyüme dönemlerindeki fenolik bileşiklerin miktarını incelemiş ve burada ana bileşikler olarak rutin, hiperosit, kuersitrin ve kuersetin tespit etmişlerdir.

Çırak ve ark. (2011) çeşitli coğrafik bölgelerden topladıkları *H. triquetrifolium* bitkilerinde populasyonlar arasında hiperisin türevleri bakımından farklılıklar elde etmişlerdir.

Son yıllarda kurutulmuş bitki yerine içindeki bileşiklerin özütlenerek kullanılması yaygınlaşmaya başlanmıştır. Buna bağlı olarak da bazı elisitörleri kullanarak etken maddelerin miktarını artırma çalışmalarına hız verilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çeşitli biyotik ve abiyotik elisitörler kullanılarak hiperisin türevlerinin miktarını artırma çalışmaları uzun yıllardan beri yapılmaktadır (Ferri ve Tassoni, 2011). Elisitör uygulaması bitkilerde savunma veya stres kaynaklı tepkileri uyararak ikincil metabolit üretimini arttırmaktadır (Malerba ve Cerana, 2016).

Bitkilere daha kolay alınması nedeniyle son yıllarda elisitör olarak kullanılan çeşitli bileşiklerin nanopartikülleri oluşturulmuş ve bu şekliyle bitkiye uygulanmaya başlanmıştır.

Nanopartiküller çevreye yeni değildirler ve doğal olarak mineraller, killer ve bakteri ürünleri şeklinde bulunurlar. Eski zamanlardan beri metaller için bir renklendirici olarak kullanılmış, ancak çeşitli kullanımlar için nanopartiküllerin sistematik tasarımı ve mühendisliği sadece son birkaç yılda başlamıştır (Maurer-Jones ve ark., 2013).

Yeni ve hızla gelişen bir bilim alanı olan nanoteknoloji, başta biyoteknoloji ve tarım alanında olmak üzere birçok alanda ileri araştırmalara olanak sağlamaktadır. Son yıllarda, nanopartiküller tarımda nano-böcek öldürücüler ve nano gübre olarak kullanılmak üzere geliştirilmiştir (Wang ve ark., 2016).

Bitkinin büyüme ve gelişmesine önemli katkılar sağlayan gübrelerin daha yararlı hale gelmesi için bu bileşiklerin nanopartiküllerini oluşturmak yaygınlaşmıştır. Bu şekilde yavaş salınımlı gübre formlarının elde edilmesi bitki beslenmesi bakımından önemli olacağı düşünülmektedir (Siddiqui ve ark., 2015).

Nano gübreler, tarımda, besin kullanım verimliliğini arttırmak, gübre israfını azaltmak ve ekim maliyetini düşürmek suretiyle ürün büyümesini, verimini ve kalite parametrelerini iyileştirmek için önemli araçlardır. Nano gübreler, tarımda hassas besin yönetimi için çok etkilidir ve besin için ürünün büyüme evresi ile eşleşir ve büyüme dönemi boyunca besin sağlayabilir.

Nano gübreler, bitkide fotosentez oranını arttıran ve daha fazla kuru madde ve ürün verimi sağlayan farklı metabolik reaksiyonlar için daha fazla yüzey alanı sağlar. Aynı zamanda farklı biyotik ve abiyotik streslerden bitkiyi korur (Morales-Díaz ve ark., 2017; Singh, 2017).

Ayrıca nanopartiküllerin, bitkiler üzerine çeşitli fizyolojik, morfolojik ve genotoksik etkiler gösterdiği ortaya konulmuştur. Bu nedenle, tarımda nanoteknolojinin etkin kullanımı için, belirli nanopartiküllerin rolünün iyi bilinmesi önemlidir (Nair, 2010).

Çalışmamızda elisitör olarak önceki bazı çalışmalarda sekonder metabolitler üzerinde etkili olduğu bildirilen kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartikülleri kullanılarak *H. triquetrifolium*'un sekonder metabolit miktarlarındaki değişim araştırılmıştır.

Çeşitli elisitörlerin uygulanması sonucu *Hypericum*'da hiperisinve türevleri miktarlarında olumlu yönde değişimler olduğu ortaya çıkarılmıştır.

Kitosan, farmakolojik açıdan değerli olan bazı bitki sekonder metabolitlerinin biyosentezini uyarmak için kullanılan en önemli elisitörlerden biridir. Daha önce yapılan çalışmalar, bu belirleyicinin *H. perforatum* kökü kültürlerinde ksanton biyosentezini artırmada çok etkili olduğunu göstermiştir (Tocci ve ark., 2010; 2011; Brasili ve ark., 2014)

Kitinin kısmi deasetilasyonu ile oluşan kitosan nanopartikülleri, yaprakların epidermisi tarafından stomalar aracılığıyla kolayca alınmaktadır (Malerba ve Cerana, 2016).

Kitosan uygulamasının azot metabolizmasının anahtar enzimlerinin (nitrat redüktaz, glutamin sentetaz ve proteaz) aktivitelerini artırdığı ve böylelikle bitkinin büyüme ve gelişmesini etkilediği ortaya konulmuştur (Mondal ve ark., 2012).

Kitin, pektin ve dekstran gibi polisakkarit elisitörler *H. perforatum*'un sürgün kültürlerinde fenilpropanoidlerin ve naftodiantronların (hiperisin ve psödohiperisin) üretimi artırmıştır (Gadzovska Simic ve ark., 2014).

Ksantonlar, çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olan bir fenolik bileşik grubudur. Bu bileşiklerin antiinflamatuvar, antikanser kemopreventif ve kardiyovasküler koruyucu etkileri bulunmaktadır (Tocci ve ark., 2010), Yine Tocci ve ark., (2011) yaptıkları çalışmalarda kitosan uygulamasının *H. perforatum*'un kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde ksanton biyosentezi üzerine olumlu etkiler yaptığını gözlemişlerdir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tocci ve ark. (2012) yaptıkları başka bir çalışmada, *H. perforatum*'un hücre kültürlerine kitosan uygulamasının ksanton üretimini artırdığını, flavonoid miktarını ise azalttığını göstermişlerdir.

Aynı şekilde kitosan uygulanan *H. perforatum* kültürlerinde ksanton içeriğini artırmış ve buna paralel olarak da elde edilen özütler *Candida* spp., *C. neoformans* ve *Trichophyton mentagrophytesin*'e karşı etkili olmuştur (Tocci ve ark., 2012).

Brasili ve ark. (2014) *H. perforatum*'un kök kültürlerinde kitosan uygulamasının fenolik bileşiklerin miktarını artırdığını göstermişlerdir.

Shakya ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada *H. perforatum*'un hücre süspansiyon kültürleri üzerine biyotik ve abiyotik elisitörlerin kullanılmasıyla fenolik bileşiklerin miktarında artışlar olduğunu ortaya koymuşlardır.

Nano gübreler; bitkiye yararlı besin sağlayan nano malzemeler olarak tanımlanabilir (Liu ve Lal, 2016; Chhipa ve Joshi, 2016). Bu çeşit gübrelerin çözünmesi yavaş olduğu için etkinlikleri diğer gübrelerde daha yüksektir (Servin ve ark., 2015).

Nano gübrelerin kullanımı günümüzde tarımsal araştırmalarda öncü bir yaklaşım haline gelmiştir. Yaprak yüzeyine uygulanan kitosan nanopartikülleri stoma yoluyla yapraklara toprak sisteminden almandan daha etkili bir şekilde girmiştir.

Abdel-aziz ve ark., (2018) yaptıkları çalışmada nano kitosan gübresinin yaprak uygulamasının buğday tanelerinin kimyasal bileşimi üzerindeki etkisini araştırmışlar. Nano gübrelerin yapraktan uygulanması, kil-kumlu, killi ve kumlu topraklarda yetişen buğday tanelerinin toplam şeker içeriğinde önemli bir artış gözlemişlerdir.

Sharafi ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada çinko ve demiroksit nanopartikülleri kullanılarak *H. perforatum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde hiperisin ve hiperforin üretimlerinde artışlar elde etmişlerdir.

Mohammadi ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada nano-demiroksit ve çinko sülfat gübrelerinin tarla koşullarında nane üzerine etkisini değerlendirmişler. Dört seviyede Fe ve Zn gübre uygulaması, nane içindeki fotosentetik pigmentleri, mineral besin içeriği, uçucu yağ konsantrasyonunu ve kuru madde verimini önemli ölçüde iyileştirmiştir.

Kitosan nanopartikülleri son zamanlarda bitkilere uygulanacak gübrelerin iyonlarını bitkiye daha kolay bir yolla taşımak için kullanılmaktadır (Abdel-Aziz ve ark., 2018; Choudhary ve ark., 2017).





3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. *Hypericum triquetrifolium* Turra (Hypericaceae)

Tür: *Hypericum triquetrifolium* Turra



Şekil 3.1. *H. triquetrifolium*'un arazideki genel görünümü

H. triquetrifolium, *Hypericum crispum* L. olarak da bilinir. *H. triquetrifolium*, dünya çapında sıcak bölgelerde yaygın, kuru, taşlı ve kumlu yerlerde çok yıllık bir bitkidir (Robson, 2002).

H. triquetrifolium ilk defa Vicenza'da İtalyan botanikçi Antonio Turra (1736-1797) tarafından tanımlanmıştır. Bu tür çoğunlukla Doğu Akdeniz bölgesine özgüdür fakat aynı zamanda İspanya, Güney Fransa, Güney İtalya, Sicilya, Malta, Tunus, Cezayir, Libya, Karadağ, Arnavutluk, Yunanistan, Kıbrıs, Türkiye, Kuzey Suriye, Lübnan, İsrail, Ürdün, Mısır (Sina), Irak ve kuzey-batı İran'da da yayılış gösterir (Marrelli ve ark., 2016).

H. triquetrifolium 15-77 cm boyunda çok yıllık, ince tüylü, siyah küçük bezler içeren uzun ömürlü bir bitkidir (Davis, 1966).

3.1.1.1. *H. triquetrifolium*'un Çimlendirilmesi

Nemli kurutma kağıtları arasında buzdolabında +4°C de 15 gün saklanan tohumlar bu sürenin sonunda alınarak 16 saat gündüz 8 saat karanlık periyotta gündüz +25°C gece de +15 °C'a ayarlanmış bitki büyüme kabinine bırakıldı. Tohumlar bu ortamda yaklaşık 20 gün sonra çimlenmeye başladı.



Şekil 3.2. Çimlenmiş *H. triquetrifolium*



Şekil 3.3. On beş günlük *H. triquetrifolium*



Şekil 3.4. Bir aylık *H. triquetrifolium*

3.1.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler Fluka, Sigma-Aldrich ve Merck marka olup ayrıca saflaştırma işlemine gerek duyulmamıştır.

Demir (II) klorür tetrahidrat ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$): (Fluka) Fe_3O_4 (manyetit) nanopartiküllerin sentezlenmesinde kullanıldı.

Demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$): (Merck) Fe_3O_4 (manyetit) nanopartiküllerin sentezlenmesinde kullanıldı.

Amonyak (NH_3): (Merck) Fe_3O_4 (manyetit) nanopartiküllerin sentezlenmesinde kullanıldı.

Sodyum hidroksit (NaOH): pH ayarlama işlemlerinde ve Fe_3O_4 -Kitosan etkileşiminde nötralleşme ve küresel yapılar oluşturmak için kullanıldı.

Hidroklorik asit (HCl): (Merck) pH'ın ayarlanmasında kullanıldı.

Asetik asit (CH_3COOH): (Merck) Kitosan jel oluşturmak için kullanıldı.

Kitosan (Yüksek Molekül Ağırlıklı): (Sigma-aldrich) Fe_3O_4 (manyetit) nanopartiküllerin kitosan ile kaplanmasında kullanıldı.

3.1.1.3. Cihazlar ve Gereçler

TEM: (JEOL 2100 F) Yapı aydınlatma çalışmalarında kullanıldı.

VSM: (Quantum Design PPMS-9T) Yapı aydınlatma çalışmalarında kullanıldı.

FT-IR: (Perkin ElmerMattson 1000) Yapı aydınlatma çalışmalarında kullanıldı.

DLS: (Mastersizer 2000) Yapı aydınlatma çalışmalarında kullanıldı.

Elektronik teraziler: Hassas tartımlarda kullanıldı.

Çalkalamalı inkübatör: Deneysel çalışmalarda kullanıldı.

Isıtmalı manyetik karıştırıcı: Deneysel çalışmalarda kullanıldı.

pH Metre: pH ayarlama çalışmalarında kullanıldı.

3.2. Metot

Bu çalışmada kullanılan kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartikülleri Dicle Üniveristesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Kimya Anabilim Dalı laboratuvarında Prof. Dr. Bilsen Tural ve Doktora Öğrencisi Erdal Ertaş tarafından sentezlenmiş ve tanımlanmıştır.

Tez kapsamında yapılan çalışmalar;

- Kitosan hazırlanması
- Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi
- Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülün kitosan ile kaplanması

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.1.1. Kitosan Çözeltisinin Hazırlanışı

Kitosan çözeltileri, %10'luk asetik asit çözeltisinde 50,75, 100 ve 150 ppm derişimlerinde hazırlandı.

3.2.1.2. Demiroksit (Fe_3O_4) Nanopartikül Çözeltisinin Hazırlanışı

Demiroksit nanopartikül çözeltileri, hassas terazide tartımları alınarak 50, 75, 100 ve 150 ppm derişimlerinde suda dispers edildi.

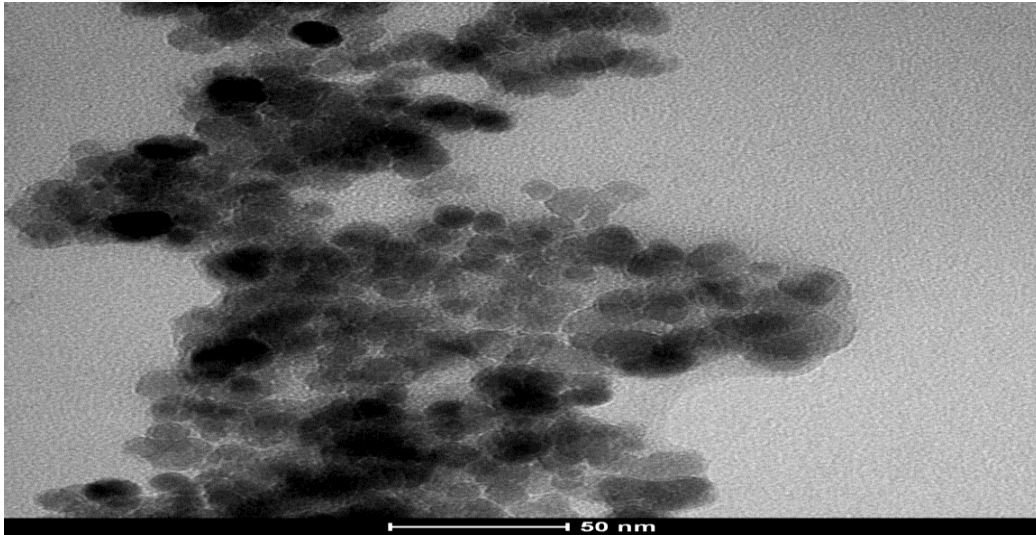
3.2.1.3. Kitosan-Demiroksit Nanopartikül Çözeltisinin Hazırlanışı

Kitosan-demiroksit nanopartikülleri hassas terazide tartılarak 50,75, 100 ve 150 ppm derişimlerinde suda dispers edildi.

3.3. Kitosan-Demiroksit ($\text{KS-Fe}_3\text{O}_4$) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.3.1. Geçirimli Elektron Mikroskopisi (TEM)

Şekil 3.5’de kitosan-demiroksit nanopartiküllerin geçirimli elektron mikroskopisi 50 nm boyutlugörüntüsü verilmektedir. Şekil 3.5’de kitosan-demiroksit nanopartiküllerin görüntüsünde koyu renkte görülen alanlar demiroksit nanopartikül kristallerini açık renkte görülen alanlar ise kitosan ile alakalı kısmı göstermektedir. Kitosan-demiroksit nanopartiküller 9 ile 13 nm arasında boyutta dağılım göstermektedir (Tural ve ark., 2016).

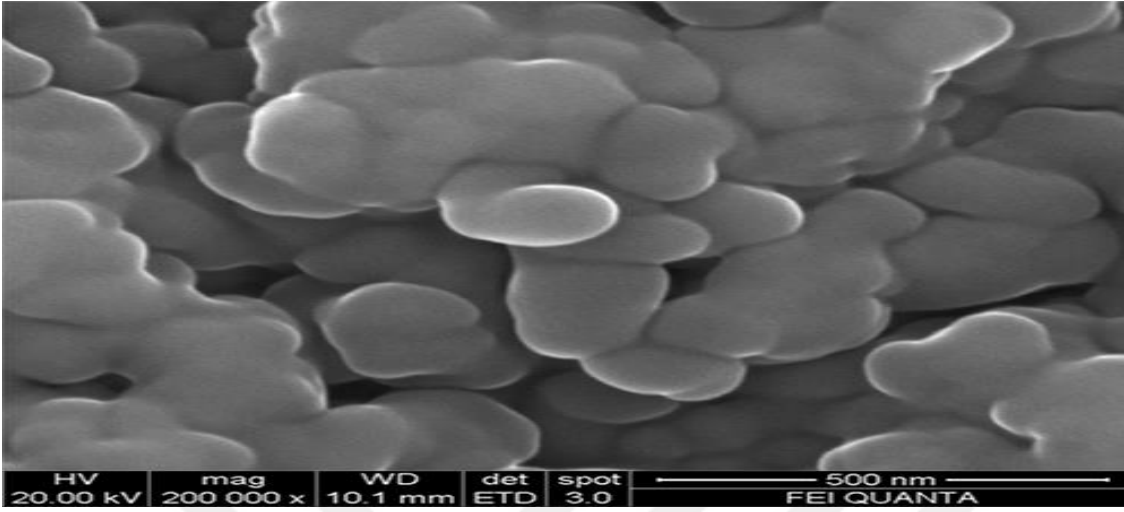


Şekil 3.5. Kitosan-Demiroksit nanopartiküllerin TEM görüntüsü

3.3.2. Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM)

Şekil 3.6’da kitosan-demiroksit nanopartiküllerin taramalı elektron mikroskopu görüntüsü gösterilmektedir. İncelenen SEM görüntüsünde kitosan-demiroksit nanopartiküllerin küresel ve ortalama 150-300 nm boyutta olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca kitosan-demiroksit nanopartiküllerin TEM ve SEM görüntüleri küresel oldukları ile ilgili benzerlik göstermektedir (Tural ve ark., 2016).

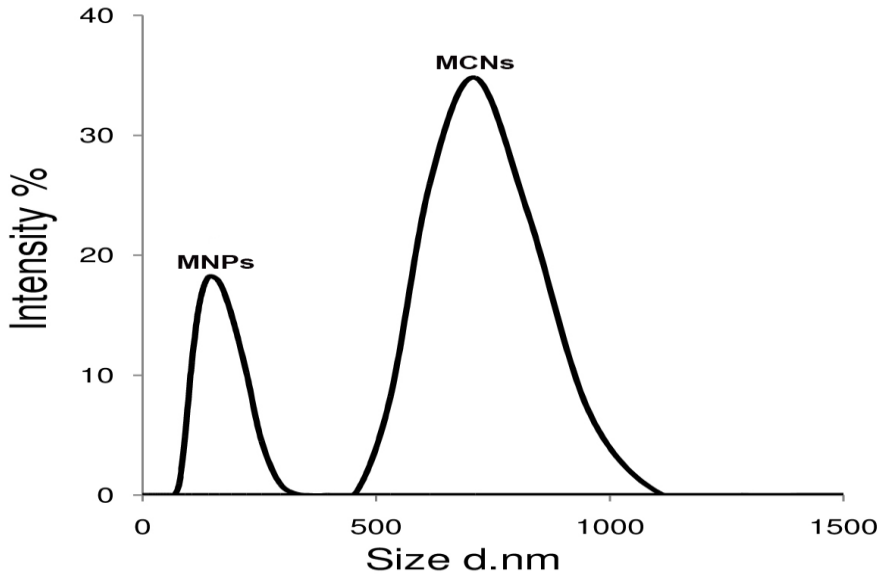


Şekil 3.6. Kitosan-Demiroksit nanopartiküllerin SEM görüntüsü

3.4. Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Demiroksit ve kitosan-demiroksit nanopartiküllerinin boyut dağılımı dinamik ışık saçılımı (DLS) (Mastersizer 2000, Malvern, England) ile elde edilmiştir.

Çizelge 3. 1. Demiroksit ve kitosan-demiroksit nanopartiküllerin dinamik ışık saçılımı



3.5. Yapraktan Uygulama

İki ayrı bitki grubu seçilerek birinci gruba çiçeklenme dönemi öncesi, ikinci gruba da tam çiçeklenme döneminde olmak üzere 50, 75, 100 ve 150 ppm konsantrasyonlarında kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartikülleri yapraktan uygulandı. Uygulamadan 10 gün sonra bitkiler hasat edildi.

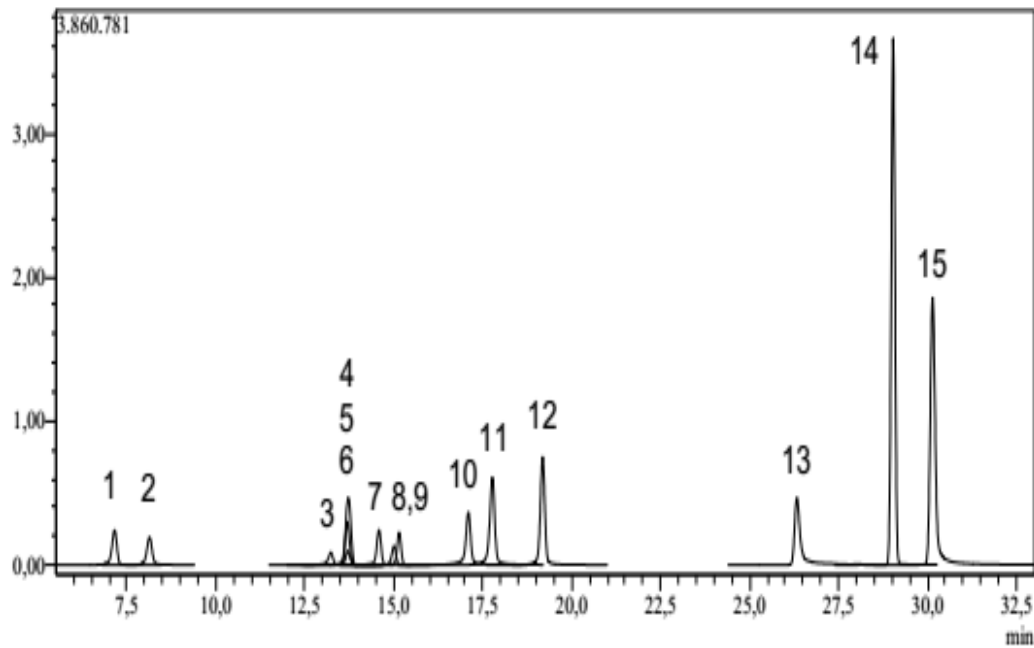
3.6. Fenolik Bileşiklerin Özütleme

Öğütülmüş 0.2 g bitki örneğine 10 mL kloroform eklenerek 20 dakika süreyle Sanyo MSE-Soniprep 150, U.K. ile sonike edildi. Numuneler 5 dakika 5000 devirde santrifüjlendi. Süpernatanttan 100 mikrolitre alınıp metanolla 100 mikrolitreye tamamlandı ve viallere bırakılarak LC-MS/MS analizine kadar buzdolabında saklandı.

3.7. LC/MS/MS Analizi

LC/MS/MS koşulları Akdeniz, M. 2018'e göre yapılmıştır.

Çizelge 3. 2. Fenolik bileşik standartlarının LC-MS / MS kromatogramı



3.7.1. Hiperisin ve Türevleri İçin Belirlenen LC/MS/MS Çalışma Koşulları

Çizelge 3. 3. Fenolik bileşiklerin LC-MS/MS analitik parametreleri

No	Analytes	RT ^a	Precursorion (m/z) ^b	Fragmentions	Ionizationmode	Equation	R ²	Linearity (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^c	(% RSD ^d)		Recovery (%)		U ^f
										Intraday	Interdays	Intraday	Interdays	
1	Protocatechuic acid	7.00	153.4	109,1-108,0	Neg	y=590,460x±120226	0.9909	100-3200	4,26/5,32	0.0060	0.0060	1.0096	0.9988	0.0215
2	Chlorogenicacid	8.03	353.3	191,2-85,0	Neg	y=697,935x±87418,5	0.9910	75-2400	2,44/3,36	0.0074	0.0055	0.9941	0.9999	0.0299
3	Luteolin-7-glucoside	13.20	447.0	285,1-284,1	Neg	y=215,412x±36852,1	0.9939	75-2400	2,30/3,02	0.0052	0.0037	1.0014	1.0072	0.0086
4	Rutin	13.67	609.1	300,1-301,1	Neg	y=469,333x±30144,8	0.9902	100-3200	1,283/1,90	0.0063	0.0070	1.0049	1.0037	0.0136
5	Hesperidin	13.68	611.1	303,0-449,3	Neg	y=2539,52x±123981	0.9942	50-1600	0,96/1,44	0.0081	0.0073	1.0053	0.9994	0.0162
6	Hyperoside	13.69	463.0	300,1-271,0	Neg	y=185,593x±8126,67	0.9905	100-3200	5,48/6,50	0.0074	0.0056	1.0039	1.0015	0.0126
7	Apigetrin	14.54	431.0	268,1-269,1	Neg	y=1052,01x±146897	0.9902	50-1600	1,23/1,75	0.0047	0.0067	1.0060	1.0047	0.0132
8	Quercitrin	14.98	447.0	300,0-301,1	Neg	y=175,298x±33626,6	0.9918	100-3200	10,51/11,65	0.0079	0.0063	0.9999	1.0002	0.0133
9	Astragalin	15.13	447.0	284,1-227,1	Neg	y=329,506x±44598,6	0.9900	100-3200	5,52/6,77	0.0086	0.0077	1.0002	1.0017	0.0153
10	Quercetin	17.10	301.2	151,1-179,1	Neg	y=1826,89x-146948	0.9962	50-1600	1,25/1,81	0.0177	0.0227	1.0010	1.0012	0.0573
11	Luteolin	17.78	285.2	133,1-151,0	Neg	y=3166,03x±495252	0.9901	50-1600	0,61/0,87	0.0119	0.0079	0.9961	1.0007	0.0188
12	Apigenin	19.20	269.2	117,0-151,1	Neg	y=3115,89x±483037	0.9910	50-1600	0,32/0,52	0.0087	0.0090	0.9985	1.0022	0.0181
13	Pseudohypericin	26.34	519.0	487,1-475,1	Neg	y=2548,96x±468900	0.9908	10-320	2,152,55	0.0061	0.0089	1.0033	1.0034	0.0172
14	Hyperforin	28.97	535.3	383,3-315,2	Neg	y=44260,6x±203394	0.9901	50-1600	0,32/0,51	0.0218	0.0164	1.0076	1.0061	0.0418
15	Hypericin	30.18	503.0	405,1-433,1	Neg	y=7676,03x±605593	0.9925	50-1600	1,27/1,88	0.0093	0.0095	1.0104	1.0034	0.0189

^aRT: Alıkonma süresi, ^bÖnceki (m / z): Standart bileşiklerin moleküler (m / z oranı), ^cR²: Korelasyon katsayısı, ^dRSD: Relatifler standartlı,

^eLOD / LOQ (µg / L): Belirleme sınırı / Miktar belirleme sınırı, ^fU (%):% 95 güvencesinde yüzde kestirimsizlik oranı (k = 2)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Genel Bulgular

Bu çalışmada *H. triquetrifolium*'un içeriğinde bulunan ve yaygın olarak bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan sekonder metabolitlerin miktarlarını artırmak için kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartiküllerinin 50, 75, 100 ve 150 ppm konsantrasyonları çiçeklenme öncesi ve tam çiçeklenme döneminde yapraklardan uygulanmış ve her bir serinin sekonder metabolitlerine LC-MS/ MS aracılığıyla bakılmıştır.

4.1.1. Çiçeklenme Öncesi Dönem

Çizelge 4.1. Çiçeklenme öncesi dönemde *H. triquetrifolium*'un fenolik bileşikleri üzerine kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartiküllerinin değişik konsantrasyonlarının etkisi

Bileşik mg/ml	Elisitör nanopartikül	Kontrol	50 ppm	75 ppm	100 ppm	150 ppm
Hesperidin	A	0,35±0,01 ^a	0,25±0,01 ^b	0,29±0,01 ^c	0,21±0,01 ^d	0,41±0,01 ^e
	B		0,37±0,01 ^b	0,42±0,01 ^c	0,15±0,00 ^d	0,30±0,01 ^e
	C		0,15±0,00 ^b	0,38±0,01 ^c	0,24±0,01 ^d	0,33±0,01 ^e
Klorojenik asit	A	2,21±0,06 ^a	1,52±0,04 ^b	1,85±0,05 ^c	1,30±0,04 ^d	2,23±0,04 ^a
	B		2,38±0,07 ^b	3,11±0,09 ^c	0,90±0,03 ^d	1,57±0,05 ^e
	C		0,64±0,02 ^b	3,01±0,09 ^c	1,82±0,05 ^d	2,40±0,07 ^e
Hiperosit	A	6,85±0,20 ^a	4,53±0,13 ^b	5,82±0,17 ^c	4,01±0,12 ^d	7,22±0,21 ^e
	B		6,73±0,19 ^b	8,50±0,24 ^c	2,70±0,08 ^d	6,42±0,18 ^e
	C		2,94±0,08 ^b	10,56±0,30 ^c	5,79±0,17 ^d	9,08±0,26 ^e
Rutin	A	3,51±0,10 ^a	2,57±0,07 ^b	3,30±0,09 ^c	2,18±0,06 ^d	3,21±0,09 ^e
	B		3,27±0,09 ^b	4,12±0,12 ^c	1,26±0,04 ^d	3,41±0,10 ^e
	C		1,37±0,04 ^b	4,64±0,13 ^c	2,86±0,08 ^d	4,18±0,12 ^e
Kuersitrin	A	0,37±0,01 ^a	0,29±0,01 ^b	0,28±0,01 ^c	0,20±0,01 ^d	0,26±0,01 ^e
	B		0,35±0,01 ^b	0,72±0,02 ^c	0,37±0,01 ^a	0,38±0,01 ^a
	C		0,15±0,00 ^b	0,50±0,01 ^c	0,21±0,01 ^d	0,32±0,01 ^e
Kampferol	A	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a	0,01±0,00 ^b	0,02±0,00 ^a
	B		0,02±0,00 ^a	0,03±0,00 ^b	0,01±0,00 ^c	0,02±0,00 ^a
	C		0,01±0,00 ^b	0,04±0,00 ^c	0,02±0,00 ^a	0,03±0,00 ^d
Hiperforin	A	0,09±0,00 ^a	0,03±0,00 ^b	0,07±0,00 ^c	0,06±0,00 ^c	0,25±0,01 ^d
	B		0,03±0,00 ^b	0,20±0,01 ^c	0,02±0,00 ^b	0,14±0,00 ^d
	C		0,03±0,00 ^b	0,10±0,00 ^c	0,07±0,00 ^d	0,14±0,00 ^e
Psödohiperisin	A	0,56±0,02 ^a	0,27±0,01 ^b	0,28±0,01 ^b	0,22±0,01 ^c	0,21±0,01 ^c
	B		0,27±0,01 ^b	0,29±0,01 ^c	0,20±0,01 ^d	0,23±0,01 ^d
	C		0,14±0,00 ^b	0,28±0,01 ^c	0,25±0,01 ^d	0,27±0,01 ^c
Hiperisin	A	0,38±0,01 ^a	0,22±0,01 ^b	0,26±0,01 ^c	0,17±0,00 ^d	0,19±0,01 ^e
	B		0,25±0,01 ^b	0,27±0,01 ^c	0,15±0,00 ^d	0,20±0,01 ^e
	C		0,09±0,00 ^b	0,28±0,01 ^c	0,24±0,01 ^d	0,25±0,01 ^d

A:kitosan, B:demiroksit, C:kitosan-demiroksit kompleksi nanopartikülleri. Aynı satırdaki bir bileşik için ayrı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark Turkey HSD testine göre istatistiki bakımdan önemlidir ($p<0.05$). Veriler üç tekrarı ortalamasıdır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Çiçeklenme öncesi dönemde 75 ppm'lik demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartikülleri; hesperidin, klorojenik asit, hiperosit, rutin, kuersitrin, kampferol ve hiperforin miktarlarında istatistiksel bakımdan önemli artışlar meydana getirmiştir. Yine bu dönemde uygulanan 150 ppm'lik kitosan nanopartikülü; hesperidin, hiperosit ve hiperforin miktarlarını artırmıştır (çizelge 4.1.).

4.1.2. Tam Çiçeklenme Dönemi

Çizelge 4.2. Tam çiçeklenme döneminde *H. triquetrifolium*'un fenolik bileşikleri üzerine kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit kompleksi nanopartiküllerinin değişik konsantrasyonlarının etkisi

Bileşik mg/ml	Elisitör nanopartikül	Kontrol	50 ppm	75 ppm	100 ppm	150 ppm
Hesperidin	A	0,19±0,01 ^a	0,18±0,01 ^b	0,21±0,01 ^c	0,22±0,01 ^d	0,16±0,00 ^e
	B		0,16±0,00 ^b	0,12±0,00 ^c	0,16±0,00 ^b	0,21±0,00 ^d
	C		0,13±0,00 ^b	0,15±0,00 ^c	0,16±0,00 ^d	0,13±0,00 ^b
Klorojenik asit	A	2,53±0,07 ^a	2,33±0,07 ^b	2,48±0,07 ^c	2,25±0,07 ^d	2,59±0,07 ^e
	B		2,29±0,07 ^b	1,80±0,05 ^c	2,47±0,07 ^d	2,96±0,09 ^e
	C		1,68±0,05 ^b	2,10±0,06 ^c	2,11±0,06 ^c	1,74±0,05 ^d
Hiperosit	A	14,61±0,42 ^a	18,03±0,52 ^b	18,19±0,52 ^b	18,42±0,52 ^b	19,33±0,56 ^c
	B		14,58±0,42 ^a	13,49±0,39 ^b	18,02±0,52 ^c	20,50±0,59 ^d
	C		10,87±0,31 ^b	12,69±0,37 ^c	14,88±0,43 ^a	12,15±0,35 ^c
Rutin	A	2,12±0,06 ^a	2,28±0,07 ^b	2,64±0,08 ^c	2,77±0,08 ^d	1,99±0,06 ^e
	B		2,04±0,06 ^b	1,61±0,05 ^c	2,12±0,06 ^a	2,96±0,09 ^d
	C		1,59±0,05 ^b	2,09±0,06 ^a	2,31±0,07 ^c	1,77±0,05 ^d
Kuersitrin	A	0,50±0,01 ^a	0,69±0,02 ^b	0,59±0,02 ^c	0,70±0,02 ^d	0,87±0,03 ^e
	B		0,67±0,02 ^b	0,61±0,02 ^c	0,70±0,02 ^d	0,72±0,02 ^e
	C		0,43±0,01 ^b	0,54±0,02 ^c	1,07±0,03 ^d	0,46±0,01 ^e
Kampferol	A	0,11±0,00 ^a	0,18±0,01 ^b	0,19±0,01 ^c	0,21±0,01 ^d	0,19±0,01 ^c
	B		0,17±0,00 ^b	0,13±0,00 ^c	0,16±0,00 ^d	0,20±0,01 ^e
	C		0,12±0,00 ^b	0,15±0,00 ^c	0,24±0,01 ^d	0,12±0,00 ^b
Hiperforin	A	4,29±0,12 ^a	2,93±0,08 ^b	3,23±0,09 ^c	1,78±0,05 ^d	4,30±0,12 ^a
	B		3,22±0,09 ^b	5,36±0,15 ^c	5,26±0,15 ^c	5,17±0,15 ^d
	C		2,65±0,08 ^b	3,64±0,10 ^c	2,80±0,08 ^d	4,52±0,13 ^e
Psödohiperisin	A	0,37±0,01 ^a	0,37±0,01 ^a	0,34±0,01 ^b	0,43±0,01 ^c	0,46±0,01 ^d
	B		0,42±0,01 ^b	0,34±0,01 ^c	0,38±0,01 ^d	0,41±0,01 ^e
	C		0,34±0,01 ^b	0,38±0,01 ^c	0,43±0,01 ^d	0,36±0,01 ^e
Hiperisin	A	0,31±0,01 ^a	0,27±0,01 ^b	0,26±0,01 ^c	0,31±0,01 ^a	0,33±0,01 ^d
	B		0,29±0,01 ^b	0,24±0,01 ^c	0,30±0,01 ^a	0,27±0,01 ^d
	C		0,22±0,01 ^b	0,26±0,01 ^c	0,29±0,01 ^d	0,21±0,01 ^e

A:kitosan, B:demiroksit, C:kitosan-demiroksit nanopartikülleri.

Aynı satırdaki bir bileşik için ayrı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark Turkey HSD testine göre istatistiksel bakımdan önemlidir.(p<0.05)

Veriler üç tekrarın ortalamasıdır.

Tam çiçeklenme döneminde; 150 ppm'lik demiroksit nanopartikülleri hesperidin, klorojenik asit, hiperosit, rutin, kuersitrin, hiperforin ve kampferol miktarlarında; 150 ppm'lik kitosan ise klorojenik asit, hiperosit, kuersitrin, psödohiperisin ve hiperisin miktarlarında artış oluşturmuştur. Bu dönemde uygulanan 100 ppm'lik kitosan rutin ve kampferol; 100 ppm'lik kitosan-demiroksit kompleksi nanopartikülleri de kuersitrin, kampferol ve psödohiperisin miktarlarında artış sağlamıştır (çizelge 4.2.).

4.2. Elisitörlerin Bileşikler Üzerine Olan Etkileri

Hypericum türleri, hiperisin, psödohiperisin, hiperforin, adhiperforin, ksantoksiller, flavonoidler, tanenler ve fenolik asitler gibi biyolojik olarak aktif bir dizi bileşik içerir. Tedavideki en önemli bileşikler olan hiperisin türevleri (hiperisin ve psödohiperisin), naftodiantronlar olarak bilinen bir gruba dahildir (Yamaner ve ark., 2013).

Hypericum türlerinin içerdiği hiperisin, psödohiperisin, klorojenik asit, hiperosit, kuersitrin, rutin, hiperforin ve hesperidin gibi bileşikler tedavi edici olarak büyük potansiyel değere sahiptir (Jat, 2013).

4.2.1. Kontrol Grubu

Doğal ortamlardan toplanan *H. triquetrifolium*'un çeşitli büyüme evrelerindeki sekonder metabolit miktarları çeşitli araştırmalara konu olmuştur (Hosni ve ark., 2011; Çırak ve ark., 2011).

Ayan ve Çırak (2008) *H. triquetrifolium* üzerine yaptıkları çalışmada toprak üstü organlardaki hiperisin miktarını 2,07 mg/ml ve psödohiperisin miktarını da 2,47 mg/ml olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamız sonucu hiç bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubundan elde ettiğimiz hiperisin 0,38 mg/ml ve psödohiperisin ise 0,56 mg/ml olarak saptanmıştır.

Çırak ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada farklı bölgelerden toplamış oldukları *H. triquetrifolium*'un sekonder metabolitlerinden klorojenik asit, rutin, hiperosit, kuersitrin ve kampferol çalışmamızdan sonuçlar ile uyum içinde iken, kuersitrin daha düşük bulunmuştur.

Hosni ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada *H. triquetrifolium* kaynaklı sekonder metabolitlerin fenolojik varyasyonlarına çiçeklenme öncesi ve çiçeklenme dönemine bakmışlar ve elde ettikleri sonuçlara göre; hiperisin, psödohiperisin, klorojenik asit, rutin, hiperosit ve kuersitrin miktarları bizim kontrol grubundan elde ettiğimiz verilerden daha yüksek bulunmuştur.

Alali ve ark. (2004) *H. triquetrifolium*'daki hiperisin içeriğinin 0,36 mg/ml olarak saptamışlardır. Bu sonuç bizim elde ettiğimiz 0,38 ve 0,31 mg/ml uyum içinde görünmektedir.

Bu çalışmada herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol grubu bitkilerdeki sekonder metabolit içerikleri genellikle önceki çalışmalara yakın bulunmuştur.

4.2.2. Kitosan, Demiroksit ve Kitosan-Demiroksit Nanopartiküllerinin Etkileri

H. triquetrifolium'daki sekonder metabolitlerin miktarlarının yapraktan uygulanan çeşitli elisitörlerden nasıl etkilendiği araştırmamızın ana konusudur. Bu bakımdan elde ettiğimiz bileşiklerin özelliklerini sunmak ve bu bileşiklerin elisitörlerden etkilenip etkilenmediğini açıklamak önemli olacaktır.

Tocci ve ark. (2012) *H. perforatum*'da ksanton üretimini ve antifungal aktiviteyi arttırmak için kitosan kullanarak ksanton üretimini 2.7 kat artırmayı başarmışlardır.

Kitosan uygulamasının azot metabolizmasının anahtar enzimlerinin (nitrat redüktaz, glutamin sentetaz ve proteaz) aktivitelerini artırdığı ve böylelikle bitkinin büyüme ve gelişmesini etkilediği ortaya konulmuştur (Mondal ve ark., 2012).

Esas olarak *Gentianaceae* ve *Hypericaceae* familyaları tarafından üretilen ksantonlar, çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olan bir fenolik bileşik grubudur. Anti enflamatuvar, kanser kemopreventif ve kardiyovasküler koruyucu etkileri bulunmaktadır (Tocci ve ark., 2010). Yine Tocci ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda kitosan uygulamasının *H. perforatum*'un kallus ve hücre süspansiyon kültürlerinde ksanton biyosentezi üzerine olumlu etkiler yaptığını gözlemişlerdir.

Brasili ve ark. (2014) *H. perforatum* kök kültürleri üzerine kitosan uygulamasının fenolik bileşiklerin miktarını artırdığını saptamışlardır.

Shakya ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada *H. perforatum*'un hücre süspansiyon kültürleri üzerine biyotik ve abiyotik elisitörlerin kullanılmasıyla fenolik bileşiklerin miktarında artışlar olduğunu ortaya koymuşlardır.

Hypericum türlerinde yaygın olarak bulunan ve kanser riski ile kemik kaybını azalttığı bilinen hesperidin (Chiba ve ark., 2003); çiçeklenme öncesi dönemde yapraktan uygulanan elisitörlerin bazı konsantrasyonlarından etkilenmiştir. 150 ppm kitosan (0,41 mg/ml), 75 ppm demiroksit (0,42 mg/ml) ve 75 ppm kitosan-demiroksit (0,38 mg/ml) nanopartikülleri uygulaması kontrolle (0,35 mg/ml) karşılaştırıldığında istatistiki bakımdan önemli artışlar meydana getirmiştir. Bunun yanında tam çiçeklenme döneminde uygulanan elisitörlerden 100 ppm kitosan (0,22 mg/ml) ve 150 ppm demiroksit (0,21 mg/ml) nanopartikülleri hesperidin miktarında kontrole (0,19 mg/ml) göre artış sağlamıştır. *H. perforatum*'un hücre süspansiyon kültürleri üzerine kitosanın etkisi üzerine yapılan çalışmalarda hesperidin içeriğinde bir değişim gözlenmemiştir (Tocci ve ark., 2010).

Bazı metabolik hastalıkları iyileştirdiği yönünde kanıtlar bulunan klorojenik asit (Lukitasari ve ark., 2018) çiçeklenme öncesi dönemde yapraktan uygulanan elisitörlerin bazı konsantrasyonlarında değişiklikler göstermiştir. 150 ppm kitosan (2,23 mg/ml), 75 ppm demiroksit (3,11 mg/ml) ve 75 ppm kitosan-demiroksit (3,01 mg/ml) nanopartiküllerinin kontrolle (2,21 mg/ml) karşılaştırıldığında artış göstermiştir. Ancak tam çiçeklenme döneminde uygulanan elisitörlerden 150 ppm kitosan (2,59 mg/ml) ve 150 ppm demiroksit (2,96 mg/ml) nanopartikülleri klorojenik asit miktarında kontrole (2,53 mg/ml) göre artış sağlamıştır.

Antienflamatuar, antidepresan, antidiyabet, antikanser, antifungal, mide koruyucu ve antioksidan aktiviteler gibi farklı farmakolojik etkilere sahip olan hiperosit (Raza ve ark.; 2017; Wang ve ark.; 2016) çiçeklenme öncesi dönemde yapraktan uygulanan elisitörlerin bazı konsantrasyonlarından etkilenmiştir. 150 ppm kitosan (7,22 mg/ml), 75 ppm demiroksit (8,50 mg/ml) ve 75 ppm kitosan-demiroksit (10,56 mg/ml) nanopartiküllerinin kontrolle (6,85 mg/ml) karşılaştırıldığında istatistiki bakımdan önemli artışlar meydana getirmiştir. Tam çiçeklenme döneminde uygulanan elisitörlerden 150 ppm kitosan (19,33 mg/ml) 150 ppm demiroksit (20,50 mg/ml) nanopartiküllerinin hiperosit miktarında kontrole (14,61 mg/ml) göre artış sağlamıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tocci ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada kitosan uygulanan *H. perforatum*'da hiperosit miktarını artırmadığını ortaya koymuşlardır.

Mide koruyucu, hepatit ve antidiyabetik etkilere sahip olan rutin (Motamedshariaty ve ark., 2014) çiçeklenme öncesi dönemde yapraktan uygulanan elisitörlerin bazı konsantrasyonlarından etkilenmiştir. 75 ppm demiroksit (4,12 mg/ml) ve 75 ppm kitosan-demiroksit (4,64 mg/ml) nanopartiküllerinin kontrole (3,51 mg/ml) karşılaştırıldığında artışlar meydana getirmiştir. Tam çiçeklenme döneminde uygulanan elisitörlerden 100 ppm kitosan (2,77 mg/ml), 150 ppm demiroksit (2,96 mg/ml) nanopartikülleri rutin miktarında kontrole (2,12 mg/ml) göre artış sağlamıştır.

Antidepresan ve antikanser özellikler gösteren kuersitrin (Dai ve ark. 2013) miktarları çiçeklenme öncesi dönemde yapraktan uygulanan elisitörlerin bazı konsantrasyonlarından artış göstermiştir. 75 ppm demiroksit (0,72 mg/ml) ve 75 ppm kitosan-demiroksit (0,50 mg/ml) nanopartiküllerinin kontrole (0,37 mg/ml) karşılaştırıldığında kuersitrin miktarında önemli artışlar meydana getirmişlerdir. Tam çiçeklenme döneminde uygulanan elisitörlerden 150 ppm kitosan (0,87 mg/ml), 150 ppm demiroksit (0,72 mg/ml) ve 100 ppm kitosan-demiroksit (1,07 mg/ml) nanopartiküllerinin kuersitrin miktarında kontrole (0,50 mg/ml) göre artış sağlamıştır. Yukarıdaki bulguların tersine, Tocci ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada kitosan uygulanan *H. perforatum*'un içerdiği kuersitrin miktarında düşüşler saptamışlardır.

Antioksidan, antiobezite, antiosteoporotik, antikanser, antiülser ve antidiyabetik özelliklere sahip olan kampferol (Riaz ve ark., 2018) çiçeklenme öncesi dönemde yapraktan uygulanan elisitörlerin bazı konsantrasyonlarında etkilenmiştir. 75 ppm demiroksit (0,03 mg/ml) ve 75 ppm kitosan-demiroksit (0,04) nanopartiküllerinin kontrole (0,02 mg/ml) karşılaştırıldığında kampferol miktarında istatistiki bakımdan artışlar meydana getirmişlerdir. Tam çiçeklenme döneminde uygulanan elisitörlerden 100 ppm kitosan (0,21 mg/ml), 150 ppm demiroksit (0,20 mg/ml) ve 100 ppm kitosan demiroksit (0,24 mg/ml) nanopartiküllerinin kampferol miktarında kontrole (0,11 mg/ml) göre istatistiki bakımdan artış sağlamıştır.

Antidepresan özellik gösteren hiperforin (Jat 2013) miktarları çiçeklenme öncesi dönemde yapraktan uygulanan elisitörlerin bazı konsantrasyonlarından etkilenmiştir. 150 ppm kitosan (0,25 mg/ml) 75 ppm demiroksit (0,20 mg/ml) ve 150 ppm kitosan

demiroksit (0,14 mg/ml) nanopartikülleri kontrole (0,09 mg/ml) karşılaştırıldığında hiperforin miktarında istatistiki bakımdan önemli artışlar meydana getirmiştir. Bunun yanında tam çiçeklenme döneminde uygulanan elisitörlerden 150 ppm kitosan (4,3 mg/ml), 75 ppm demiroksit (5,36 mg/ml) ve 150 ppm kitosan-demiroksit (4,52 mg/ml) nanopartiküllerinin hiperforin miktarında kontrole (4,29 mg/ml) göre artış gözlenmiştir.

Sharafi ve ark. (2013) demiroksit nanopartiküllerinin (100 ppb), *H. perforatum* hücre süspansiyon kültüründe hiperisin ve hiperforin üretimini desteklediğini ortaya koymuşlardır.

Anti depresan ve anti kanser özellikler gösteren hiperisin ve psödohiperisinin (Vandenbogaerde ve ark., 1998; Wurglics ve Schubert-Zsilavecz, 2006) miktarları çiçeklenme öncesi dönemde yapraktan uygulanan elisitörlerin hiçbirine hiçbir konsantrasyonda olumlu bir yanıt vermemiş ve kontrole karşılaştırıldığında büyük oranlarda düşüş göstermiştir. Ancak tam çiçeklenme döneminde psödohiperisin, uygulanan elisitörlerden 150 ppm kitosan (0,46 mg/ml), 50 ppm demiroksit (0,42 mg/ml) ve 100 ppm kitosan-demiroksit (0,43 mg/ml) nanopartiküllerinin psödohiperisin miktarında kontrole (0,37 mg/ml) göre istatistiki bakımdan önemli olabilecek artışlar meydana getirmişlerdir. Yine tam çiçeklenme döneminde hiperisin (0,33 mg/ml) sadece kitosan nanopartikülünün 150 ppm'lik konsantrasyonuna kontrole (0,31 mg/ml) göre cevap vermiş ve miktar artışı göstermiştir.

Gadzovska Simic ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada kitin, pektin ve dekstran gibi polisakarit elitleyicilerin, *H. perforatum* sürgün kültürlerinde fenilpropanoidlerin (fenolikler ve flavonoidler) ve naftodiantronların (hiperisin ve psödohiperisin) üretimi üzerindeki etkileri incelemiş ve hiperisin miktarında önemli artışlar olduğunu göstermişlerdir.

Sharafi ve ark. (2013) ile Singh ve ark. (2015) yaptıkları çalışmalarda çinko ve demiroksit nanopartikülleri kullanılarak *H. perforatum*'un hücre süspansiyon kültürlerinde hiperisin ve hiperforin üretimlerinde artışlar elde etmişlerdir.

Biyotik ve abiyotik elisitörlerin etkisiyle sekonder metabolitlerin miktarlarında görülen artışlar, *H. triquetrifolium*'un savunma cevaplarının bir gereği olarak ortaya çıktığı söylenebilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

H. triquetrifolium'un içeriğinde bulunan ve yaygın olarak antidepresan ve anti kanser özellikler gösteren sekonder metabolitlerin miktarlarını artırmak için; kitosan, demiroksit ve kitosan-demiroksit nanopartikülleri gibi elisitörlerin 50, 75, 100 ve 150 ppm konsantrasyonları çiçeklenme öncesi ve tam çiçeklenme döneminde yapraktan uygulanmıştır.

Ticari olarak değerli olan hiperisin ve psödohiperisin içeriği tam çiçeklenme döneminde uygulanan elisitörlerden etkilenmiştir.

Hiperisin içeriği sadece tam çiçeklenme döneminde 150 ppm'lik kitosandan etkilenmiş ve artış göstermiştir.

Tam çiçeklenme döneminde yapraktan uygulanan 150 ppm'lik kitosan ve 100 ppm'lik kitosan-demiroksit nanopartikül çözeltileri psödohiperisin miktarını değiştirmiş ve istatistiksel bakımdan önemli olabilecek artışlar sağlamıştır.

Hiperisin ve psödohiperisin miktarını artırmak için kitosan nanopartikül çözeltilisinin 150 ppm'lik konsantrasyonu bu konuda ileride yapılacak çalışmalar için önerilebilir.



6. KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, H., Hasaneen, M. N., & Omar, A. (2018). Effect of Foliar Application of Nano Chitosan NPK Fertilizer on the Chemical Composition of Wheat Grains. *Egyptian Journal of Botany*, **58(1)**, 87-95.
- Acar, Ü. (2018). Sarı kantaron (*Hypericum perforatum*) yağının sazan yavrularının (*Cyprinus carpio*) büyüme performansı ve bazı kan parametreleri üzerine etkisi. *Alinteri Ziraat Bilimler Dergisi*, **33(1)**, 21-27.
- Agostinis, P., Vantieghem, A., Merlevede, W., & de Witte, P. A. (2002). Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **34(3)**, 221-241.
- Akdeniz, M. 2018. Screening of Chemical Content Specific to *Hypericum* Species Growing in Different Parts of Turkey by LC-MS/MS and Method Validation; Investigation of Their Biological Activities and Chemometric Evaluation. Dicle University Institute of Science Department of Chemistry, PhD Thesis, Diyarbakır
- Alali, F., Tawaha, K., & Al-Eleimat, T. (2004). Determination of hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra (*Hypericaceae*) growing wild in Jordan. *Natural product research*, **18(2)**, 147-151.
- Alvarez M A (2014) *Plant Biotechnology for Health : From Secondary Metabolites to Molecular Farming*, Springer International Publishing
- Askary, M., Talebi, S. M., Amini, F., & Bangan, A. D. B. (2017). Effects of iron nanoparticles on *Mentha piperita* L. under salinity stress. *Biologija*, **63(1)**.
- Ayan, A. K., & Çirak, C. (2008). Hypericin and Pseudohypericin Contents in Some *Hypericum* Species Growing in Turkey. *Pharmaceutical biology*, **46(4)**, 288-291.
- Baytop, T. (1999). *Türkiye'de bitkiler ile tedavi: geçmişte ve bugün*. Nobel Tıp Kitabevleri.
- Brasili, E., Pratico, G., Marini, F., Valletta, A., Capuani, G., Sciubba, F., ... & Pasqua, G. (2014). A non-targeted metabolomics approach to evaluate the effects of biomass growth and chitosan elicitation on primary and secondary metabolism of *Hypericum perforatum* in vitro roots. *Metabolomics*, **10(6)**, 1186-1196.
- Brunnert I., Wick P., Manserp., Spohnp., Grass R. N., Limbach L. K., Bruinink A. and Stark W. J. (2006) *Environmental Science & Technology*, **40**, 4374-4381.
- Chiba, H., Uehara, M., Wu, J., Wang, X., Masuyama, R., Suzuki, K., ... & Ishimi, Y. (2003). Hesperidin, a citrus flavonoid, inhibits bone loss and decreases serum and hepatic lipids in ovariectomized mice. *The Journal of nutrition*, **133(6)**, 1892-1897.
- Chhipa, H., & Joshi, P. (2016). Nanofertilisers, nanopesticides and nanosensors in agriculture. *In Nanoscience in Food and Agriculture 1* (pp. 247-282). Springer, Cham.
- Choudhary, R. C., Kumaraswamy, R. V., Kumari, S., Sharma, S. S., Pal, A., Raliya, R., ... & Saharan, V. (2017). Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.). *Scientific reports*, **7(1)**, 9754.
- Conforti, F., Statti, G. A., Tundis, R., Menichini, F., & Houghton, P. (2002). Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. *Fitoterapia*, **73(6)**, 479-483.
- Conforti, F., Loizzo, M. R., Statti, A. G., & Menichini, F. (2007). Cytotoxic activity of antioxidant constituents from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Natural product research*, **21(1)**, 42-46.

6. KAYNAKLAR

- Couladis, M., Baziou, P., Verykokidou, E., & Loukis, A. (2002). Antioxidant activity of polyphenols from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 16(8), 769-770.
- Çırak, C., Radusiene, J., Janulis, V., Ivanauskas, L., Çamaş, N., & Ayan, A. K. (2011). Phenolic constituents of *Hypericum triquetrifolium* Turra (Guttiferae) growing in Turkey: variation among populations and plant parts. *Turkish Journal of Biology*, 35(4), 449-456.
- Dağhan, H. (2017) Nano Gübreler. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 4(2), 197-203.
- Dai, X., Ding, Y., Zhang, Z., Cai, X., & Li, Y. (2013). Quercetin and quercitrin protect against cytokine-induced injuries in RINm5F β -cells via the mitochondrial pathway and NF- κ B signaling. *International journal of molecular medicine*, 31(1), 265-271.
- Davis, P.H. 1966. Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume 2 Edinburg University Press Edinburg. s,400—401.
- Divya, K., & Jisha, M. S. (2018). Chitosan nanoparticles preparation and applications. *Environmental Chemistry Letters*, 1-12.
- Ferri, M., & Tassoni, A. (2011). Chitosan as elicitor of health beneficial secondary metabolites in in vitro plant cell cultures. *Handbook of Chitosan Research and Applications; Mackay, RG, Tait, JM, Eds*, 389-414.
- Gadzovska Simic, S., Tusevski, O., Maury, S., Delaunay, A., Joseph, C., & Hagège, D. (2014). Effects of polysaccharide elicitors on secondary metabolite production and antioxidant response in *Hypericum perforatum* L. shoot cultures. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Hosni, K., Msaada, K., Taârit, M. B., & Marzouk, B. (2011). Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(1), 43-50.
- Jat, L. R. (2013). Hyperforin: a potent anti-depressant natural drug. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, 5, 9-13.
- Khan, T., Khan, T., Hano, C., & Abbasi, B. H. (2019). Effects of chitosan and salicylic acid on the production of pharmacologically attractive secondary metabolites in callus cultures of *Fagonia indica*. *Industrial Crops and Products*, 129, 525-535.
- Liu, R., Zhang, H., & Lal, R. (2016). Effects of stabilized nanoparticles of copper, zinc, manganese, and iron oxides in low concentrations on lettuce (*Lactuca sativa*) seed germination: nanotoxicants or nanonutrients?. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(1), 42.
- Lukitasari, M., Nugroho, D. A., & Widodo, N. (2018). Chlorogenic acid: the conceivable chemosensitizer leading to cancer growth suppression. *Journal of evidence-based integrative medicine*, 23, 2515690X18789628.
- Malerba, M., & Cerana, R. (2016). Chitosan effects on plant systems. *International journal of molecular sciences*, 17(7), 996.
- Mañero, F. J. G., Algar, E., Martín Gómez, M. S., Saco Sierra, M. D., & Solano, B. R. (2012). Elicitation of secondary metabolism in *Hypericum perforatum* by rhizosphere bacteria and derived elicitors in seedlings and shoot cultures. *Pharmaceutical biology*, 50(10), 1201-1209.
- Manjunatha, S. B., Biradar, D. P., & Aladakatti, Y. R. (2016). Nanotechnology and its applications in agriculture: A review. *Journal of Farm Science*, 29(1), 1-13.
- Marrelli, M., Statti, G., Conforti, F., & Menichini, F. (2016). New potential pharmaceutical applications of hypericum species. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 16(9), 710-720.

- Maurer-Jones, M. A., Gunsolus, I. L., Murphy, C. J., & Haynes, C. L. (2013). Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. *Analytical chemistry*, **85**(6), 3036-3049
- Mennini, T., & Gobbi, M. (2004). The antidepressant mechanism of Hypericum perforatum. *Life sciences*, **75**(9), 1021-1027.
- Mohammadi, M., Majnoun Hoseini, N., Chaichi, M. R., Alipour, H., Dashtaki, M., & Safikhani, S. (2018). Influence of nano-iron oxide and zinc sulfate on physiological characteristics of peppermint. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **49**(18), 2315-2326.
- Mondal, M. M. A., Malek, M. A., Puteh, A. B., Ismail, M. R., Ashrafuzzaman, M., & Naher, L. (2012). Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. *Australian Journal of Crop Science*, **6**(5), 918.
- Morales-Díaz, A. B., Ortega-Ortíz, H., Juárez-Maldonado, A., Cadenas-Pliego, G., González-Morales, S., & Benavides-Mendoza, A. (2017). Application of nanoelements in plant nutrition and its impact in ecosystems. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, **8**(1), 013001.
- Motamedshariaty, V. S., Farzad, S. A., Nassiri-Asl, M., & Hosseinzadeh, H. (2014). Effects of rutin on acrylamide-induced neurotoxicity. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, **22**(1), 27.
- Mullaicharam, AR ve Halligudi, N. (2018). St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): Kimyasının, Farmakolojisinin ve Klinik Özelliklerinin İncelenmesi. *Uluslararası Fitokimyasal ve Farmakolojik Bilimler Araştırmaları Dergisi*, **1** (1), 5-11.
- Muxika, A., Etxabide, A., Uranga, J., Guerrero, P., & De La Caba, K. (2017). Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International journal of biological macromolecules*, **105**, 1358-1368.
- Nair, R., Varghese, SH, Nair, BG, Maekawa, T., Yoshida, Y., & Kumar, DS (2010). Bitkilere nanopartikül materyali teslimi. *Bitki bilimi*, **179** (3), 154-163.
- Oskay, D., & Oskay, M. (2009). Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi. *Ecological Life Sciences*, **4**(2), 31-41.
- Radad, K., Al-Shraim, M., Moldzio, R., & Rausch, W. D. (2012). Recent advances in benefits and hazards of engineered nanoparticles. *Environmental toxicology and pharmacology*, **34**(3), 661-672.
- Raza, A., Xu, X., Sun, H., Tang, J., & Ouyang, Z. (2017). Pharmacological activities and pharmacokinetic study of hyperoside: A short review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **16**(2), 483-489.
- Rezapour-Osalou, P., Tajbakhsh, M., Asri-Rezaei, S., & Hasanzadeh, A. (2015). Foliar application of nano-Fe₃O₄ induced Iron Content and Phytase Activity in corn seed Single Cross 704. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi; Vol 36, No 3 (2015): Special Issue I*; 664-671.
- Riaz, A., Rasul, A., Hussain, G., Zahoor, M. K., Jabeen, F., Subhani, Z., ... & Selamoglu, Z. (2018). Astragalín: a bioactive phytochemical with potential therapeutic activities. *Advances in pharmacological sciences*, **2018**.
- Rizwan, M., Ali, S., Qayyum, M. F., Ok, Y. S., Adrees, M., Ibrahim, M., ... & Abbas, F. (2017). Effect of metal and metal oxide nanoparticles on growth and physiology of globally important food crops: A critical review. *Journal of hazardous materials*, **322**, 2-16.

6. KAYNAKLAR

- Robson, N. K. (2002). Studies in the genus *Hypericum* L.(Guttiferae) 4 (2). Section 9. *Hypericum sensu lato* (part 2): subsection 1. *Hypericum* series 1. *Hypericum*. ***Bulletins of the Natural History Museum: Botany Series*, 32(2)**, 61-123.
- Servin, A., Elmer, W., Mukherjee, A., De la Torre-Roche, R., Hamdi, H., White, J. C., ... & Dimkpa, C. (2015). A review of the use of engineered nanomaterials to suppress plant disease and enhance crop yield. ***Journal of Nanoparticle Research*, 17(2)**, 92.
- Shakya, P., Marslin, G., Siram, K., Beerhues, L., & Franklin, G. (2019). Elicitation as a tool to improve the profiles of high-value secondary metabolites and pharmacological properties of *Hypericum perforatum*. ***Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(1)**, 70-82.
- Sharafi, E., Khayam Nekoei, S. M., Fotokian, M. H., Davoodi, D., Hadavand Mirzaei, H., & Hasanloo, T. (2013). Improvement of hypericin and hyperforin production using zinc and iron nano-oxides as elicitors in cell suspension culture of St John's wort (*Hypericum perforatum* L.). ***JMPB*, 2**, 177-184.
- Siddiqui, M. H., Al-Wahaibi, M. H., Firoz, M., & Al-Khaishany, M. Y. (2015). Role of nanoparticles in plants. **In *Nanotechnology and Plant Sciences*** (pp. 19-35). Springer, Cham.
- Singh, A., Singh, N. B., Hussain, I., Singh, H., & Singh, S. C. (2015). Plant-nanoparticle interaction: an approach to improve agricultural practices and plant productivity. ***Int J Pharm Sci Invent*, 4(8)**, 25-40.
- Singh, M. D. (2017). Nano-Fertilizers is a New Way to Increase Nutrients Use Efficiency in Crop Production. ***International Journal of Agriculture Sciences*, ISSN, 0975-3710**.
- Süntar, I., Oyardı, O., Akkol, E. K., & Özçelik, B. (2016). Antimicrobial effect of the extracts from *Hypericum perforatum* against oral bacteria and biofilm formation. ***Pharmaceutical biology*, 54(6)**, 1065-1070.
- Tavallali, V. (2018). Effects of iron nano-complex and Fe-EDDHA on bioactive compounds and nutrient status of purslane plants. ***International Agrophysics*, 32(3)**, 411-419.
- Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P. K., & Puri, S. (2018). Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. ***Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants***.
- Tocci, N., Ferrari, F., Santamaria, A. R., Valletta, A., Rovardi, I., & Pasqua, G. (2010). Chitosan enhances xanthone production in *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* cell cultures. ***Natural product research*, 24(3)**, 286-293.
- Tocci, N., Simonetti, G., D'Auria, F. D., Panella, S., Palamara, A. T., Valletta, A., & Pasqua, G. (2011). Root cultures of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* elicited with chitosan and production of xanthone-rich extracts with antifungal activity. ***Applied microbiology and biotechnology*, 91(4)**, 977-987.
- Tocci, N., D'Auria, F. D., Simonetti, G., Panella, S., Palamara, A. T., & Pasqua, G. (2012). A three-step culture system to increase the xanthone production and antifungal activity of *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium* in vitro roots. ***Plant Physiology and Biochemistry*, 57**, 54-58.
- Tural, B., Ertaş, E., & Tural, S. (2016). Removal of phenolic pollutants from aqueous solutions by a simple magnetic separation. ***Desalination and Water Treatment*, 57(54)**, 26153-26164
- Vandenboogaer, AL, Delaey, EM, Vantieghem, AM, Himpens, BE, Merlevede, WJ, ve de Witte, PA (1998). Fotosensitizasyondan sonra hiperisin ve türevlerinin sitotoksikite ve antiproliferatif etkisi. ***Fotokimya ve fotobiyoloji* , 67 (1)**, 119-125.

Vanisree M, Lee CY, Lo SH, Nalawade SM, Lin CY, Tsay SH. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica.*, 45: 1-22.

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.

Wurglics, M., ve Schubert-Zsilavecz, M. (2006). Hypericum perforatum: 'Modern' bir bitkisel antidepresan. *Klinik farmakokinetik* , 45 (5), 449-468.

Yamaner, Ö., Erdağ, B., & Gökbulut, C. (2013). Stimulation of the production of hypericins in in vitro seedlings of Hypericum adenotrichum by some biotic elicitors. *Turkish Journal of Botany*, 37(1), 153-159.





ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ayşe Bal

Doğum yeri ve tarihi: Diyarbakır, 06.06.1986

Medeni hali: Bekar

Yabancı dili: İngilizce

Eğitim Bilgileri:

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalı	2019
Lisans	Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği	2012
Lise	Ziya Gökalp Lisesi	2004



DICLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ İNTİHAL FORMU

ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

ADI VE SOYADI	Ayşe BAL
ÖĞRENCİ NO	14801003
EĞİTİM - ÖĞRETİM YILI	2018-2019
YARIYIL	<input type="checkbox"/> Güz <input checked="" type="checkbox"/> Bahar
ANABİLİM DALI	Biyoloji
PROGRAM	Yüksek Lisans / Doktora
TEZ KONUSU	Yapraktan Uygulanan Kitosan, Demiroksit ve Kitosan-Demiroksit Kompleksi Nanopartiküllerinin <i>Hypericum triquetrifolium</i> Turra.'nın Sekonder Metabolitleri Üzerine Etkisi.

İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ

RAPOR TÜRÜ	Tez Savunma Sınavı Sonrası
SAYFA SAYISI	45
BENZERLİK ORANI	%9
RAPORLAMA TARİHİ	21/06/2019

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, sonuç ve tartışma kısımlarından oluşan toplam 45 sayfalık kısmına ilişkin, 21/06/2019 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %9'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Ayşe BAL
(İMZA/TARİH)

Prof. Dr. Hasan Çetin ÖZEN
Tez Danışmanı
(İMZA/TARİH)

Prof. Dr. Yüksel COŞKUN
Anabilim Dalı Başkanı
(İMZA/TARİH)

09 Temmuz 2019

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