

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

TEMEL BİYOTEKNOLOJİ

DOKTORA TEZİ

ARAP SÜMBÜLÜ (*MUSCARI NEGLECTUM* GUSS.) BİTKİSİNİN *İN VİTRO*  
KÜLTÜRÜNDE NEKROZU ÖNLEMEK İÇİN YAVAŞ HORMON SALINIMI YAPAN  
BİYOMATERYAL BAZLI TAŞIYICI SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ

Muhammad MUJTABA

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar BHATTI

Eş Danışman

Prof. Dr. Murat KAYA

Aralık

2020

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağlı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Muhammad MUJTABA

İmzası

## ÖZET

Doktora Tezi

Arap sümbülü (*Muscari neglectum* Guss.) bitkisinin *in vitro* kültüründe nekrozu önlemek için yavaş hormon salınımı yapan biyomateriyal bazlı taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi

Muhammad MUJTABA

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar BHATTI ve Eş danışman Prof. Dr. Murat KAYA

*In vitro* doku kültürü sırasında, reaktif Oksijen türleri (ROS) aracılı oksidatif doku kararması, araştırılan eksplantların rejenerasyon kabiliyetini sınırlayan başlıca kısıtlamalar arasında yer almaktadır. Bu fenomenin arkasındaki ana neden, ROS ve fitohormon hemostaz gardiyanının bozulmasıdır. Bu durum dokularda aşırı ROS birikmesine neden olup ciddi hücre ve doku hasarına yol açmaktadır. Mevcut tez çalışmasında, *M. negelectum* Guss.'un doku kararmasını kontrol etmek için yeni bir çözüm geliştirilmiştir. Bu amaç için üç farklı biyomateriyal tabanlı taşıyıcı, sırasıyla, *G. macandrewii*'den  $\gamma$ -APTES'ile işlevselleştirilmiş biyosilika boncuklar, *Juglans regia*'dan sporopollenin ve karides atığından kitin izole edilip farklı analitik araçlarla karakterize edilmiştir. İki farklı fitohormon (BAP ve NAA), izole edilmiş taşıyıcı sistemler içinde başarıyla enkapsüle edilmiştir. Sonuçlara göre, taşıyıcı sistemler, BAP ve NAA'nın sert dış koşullardan korunmasında önemli bir rol oynamıştır. BAP ve NAA'nın kontrollü salımı, eksplantların normal büyümesiyle sonuçlanmıştır. Geliştirilen her üç taşıyıcı sistemin tümü hem simüle edilmiş tampon hem de doku kültürü koşullarında kontrollü salım modelleri sergilemiştir. Yükleme yüzdeleri, halihazırda geliştirilmiş birçok taşıyıcı sistemden daha yüksek kaydedilmiştir. Ayrıca, tez çalışmanın hipotezi fizikokimyasal, enzimatik ve enzimatik olmayan analizlerle de desteklenmiştir. BAP ve NAA'nın kontrollü salımı, eksplantların normal büyümesiyle sonuçlanmıştır.

2020, 205 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Fitohormonlar, yavaş salım, biyosilika, sporopollenin, kitin

## ABSTRACT

PhD Thesis

Development of biomaterial based carrier systems for the slow release of hormones to prevent necrosis during *in vitro* culture of grape hyacinth (*Muscari neglectum* Guss.)

Muhammad MUJTABA

Ankara University Biotechnology Institute

Prof. Dr. Khalid Mahmood Khawar BHATTI and Co-Supervisor Prof. Dr. Murat KAYA

During the *in vitro* propagation, reactive Oxygen species (ROS) mediated oxidative tissue browning is among the major constraints limiting the regeneration ability of explants under investigation. The main reason behind this phenomenon is the disturbance of ROS and phytohormones hemostats gradient that leads to the excessive accumulation of ROS in tissue causing serious cell and tissue damage. In the current thesis, a novel solution has been developed to control the tissue browning of *M. negelectum* Guss. Three different biopolymeric based carriers i.e.,  $\gamma$ -APTES functionalized biosilica microbeads from *G. macandrewii*, sporopollenin from *Juglans regia* and chitin from shrimp waste were isolated and characterized through different analytical tools. Two different phytohormones (BAP and NAA) were successfully encapsulated inside the isolated carrier systems. The carrier systems played an important role in protecting the loaded BAP and NAA. All the three carrier systems displayed controlled release patterns for the loaded phytohormones in both simulated buffer and tissue culture conditions. The encapsulation percentages were recorded higher from many already developed carrier systems. The thesis hypothesis was also supported and confirmed by physicochemical enzymatic and non-enzymatic assays. Controlled release of BAP and NAA resulted in normal growth with higher regeneration from explants compared to the direct application of plant growth regulators.

2020, 205 pages

**Keywords:** Phytohormones, controlled release, biosilica, sporopollenin, chitin

## TEŞEKKÜR

Kariyerimdeki bu çok önemli dönüm noktasına ulaşmam için bana güç verdiği için Yüce Allah'a şükranlarımı sunarım.

Doktora danışmanım Prof. DR. Khalid Mahmood Khawar BHATTI ve eş-danışmanım Prof. Dr. Murat Kaya'ya koşulsuz destekleri için şükranlarımı sunarım.

Tez çalışmamı TBİTAK-2215 numaralı program kapsamında desteklediği için Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumuna sonsuz teşekkür ederim.

Biyoteknoloji enstitüsünde ihtiyaç duyulan desteği sağlayan Prof. Dr. Ali ERGÜL hocaya çok teşekkür ediyorum.

Doktora çalışmalarım süresince şartsız destekleri için özellikle Doç. Dr. İdris SARGIN ve Dr. ögr. Üye. Lalehan AKYÜZ'a şükranlarım sunarım.

Ayrıca, biyoteknoloji Enstitüsünün tüm hocalarıma güzel ve verimli dersleri için teşekkür ederim.

Benim için tüm bu yolculuğu koşulsuz desteği ve motivasyonu ile kolaylaştıran sevgilim Ayşe GÜNYAKTI'ya çok teşekkür ediyorum.

Bu dört yıllık süreçte çok güzel anları paylaştığım tüm enstitü arkadaşlarıma çok teşekkür ediyorum. Hepiniz özleneceksiniz.

Tez çalışmamı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ailesine sonsuz teşekkür ediyorum.

Bana bu çok güzel hayatı verdikleri için anneme (Khurshida BEGUM) ve her zaman kalbimde yaşayan Rahmetli babama (Faqir MUHAMMAD) teşekkür ederim.

Muhammad MUJTABA

Aralık, 2020

Bu çalışmayı geleceğim için hayatından ödün eden, hayatımın her aşamasında beni destekleyen Rahmetli babama ve canım anneme ithaf ediyorum.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                       |              |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>ETİK BEYAN .....</b>                                                                                               | <b>i</b>     |
| <b>ÖZET .....</b>                                                                                                     | <b>ii</b>    |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                                                                 | <b>iii</b>   |
| <b>TEŞEKKÜR.....</b>                                                                                                  | <b>iv</b>    |
| <b>İÇİNDEKİLER.....</b>                                                                                               | <b>vi</b>    |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>                                                                                           | <b>xiii</b>  |
| <b>ÇİZELGELER DİZİNİ.....</b>                                                                                         | <b>xviii</b> |
| <b>SİMGELER DİZİNİ .....</b>                                                                                          | <b>xix</b>   |
| <b>1 GİRİŞ .....</b>                                                                                                  | <b>1</b>     |
| <b>2 KURAMSAL TEMELLER.....</b>                                                                                       | <b>3</b>     |
| 2.1 BİTKİLERDE DOKU KARARMASI.....                                                                                    | 3            |
| 2.2 DOKU KARARMA MEKANİZMALARI.....                                                                                   | 6            |
| 2.2.1 ROS'UN SENTEZ YOLAKLARI.....                                                                                    | 7            |
| 2.3 ROS BİRİKİMİNİN, ENDOJEN BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN HEMOSTAZ<br>GRADİENTİNİ OLUMSUZ ŞEKİLDE ETKİLEMESİ ..... | 8            |
| 2.4 DOKU KARARMASINI ÖNLEMELİK İÇİN STAJERLER .....                                                                   | 9            |
| 2.4.1 ANTİOKSİDANLARIN UYGULANMASI .....                                                                              | 9            |
| 2.4.2 MOLEKÜLER İNHİBİSYON VE MEDİA MANUPULASYONU.....                                                                | 11           |
| 2.5 BİTKİ BİLİMİNDE BİYOMALZEMELERİN KULLANIMI .....                                                                  | 13           |
| 2.5.1 BİYOMALZEME BAZLI TAŞIYICILAR.....                                                                              | 15           |
| 2.5.1.1 Kitin .....                                                                                                   | 16           |

|            |                                                                                                     |           |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.5.1.1.1  | Kitinin bitki bilimindeki uygulamaları .....                                                        | 18        |
| 2.5.1.1.2  | Antimikrobiyal aktivite .....                                                                       | 18        |
| 2.5.1.1.3  | Kitinin bitki büyümesi, gelişimi, beslenmesi ve abiyotik strese karşı direnci üzerindeki rolü ..... | 19        |
| 2.5.1.1.4  | Kitin ve kitosan bazlı salım sistemleri .....                                                       | 20        |
| 2.5.1.2    | Biyosilikanın bitkilerdeki uygulamaları .....                                                       | 22        |
| 2.5.1.2.1  | Biyosilikanın kaynakları .....                                                                      | 22        |
| 2.5.1.2.2  | Silikatein aracılı biyosilika sentezi .....                                                         | 23        |
| 2.5.1.2.3  | Bitkilerde uygulamaları .....                                                                       | 23        |
| 2.5.1.2.4  | Tezde kullanılan biyosilika .....                                                                   | 24        |
| 2.5.1.2.5  | Silika/Biyosilika yüzey işlevselleştirilmesi .....                                                  | 24        |
| 2.5.1.3    | Sporopollenin .....                                                                                 | 25        |
| 2.5.1.3.1  | Uygulama alanları .....                                                                             | 25        |
| 2.5.1.4    | <i>Muscari neglectum</i> Guss. ....                                                                 | 27        |
| <b>3</b>   | <b><u>GEREKÇE VE AMAÇ .....</u></b>                                                                 | <b>29</b> |
| <b>4</b>   | <b><u>MATERYAL VE YÖNTEM .....</u></b>                                                              | <b>31</b> |
| <b>4.1</b> | <b>MATERYAL .....</b>                                                                               | <b>31</b> |
| <b>4.2</b> | <b>YÖNTEM .....</b>                                                                                 | <b>31</b> |
| 4.2.1      | SPOROPOLLENİN İZOLASYONU .....                                                                      | 31        |
| 4.2.2      | KİTİN İZOLASYONU .....                                                                              | 31        |
| 4.2.2.1    | Demineralizasyon .....                                                                              | 31        |

|         |                                                                                                    |           |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2.2.2 | Deproteinizasyon .....                                                                             | 32        |
| 4.2.2.3 | Dekolorizasyon .....                                                                               | 32        |
| 4.2.3   | BİYOSİLİKA BONCUKLARIN SÜNGERDEN İZOLE EDİLMESİ .....                                              | 32        |
| 4.2.3.1 | Asit uygulama ile minerallerin uzaklaştırılması .....                                              | 32        |
| 4.2.3.2 | Baz uygulaması ile protein ve benzeri yapıların uzaklaştırılması .....                             | 32        |
| 4.2.3.3 | Alkol uygulaması ile renk giderimi .....                                                           | 32        |
| 4.2.3.4 | Hidroflorik asit çözeltisi ile camın üst katmanlarının aşındırılması .....                         | 33        |
| 4.2.4   | IŞIK MİKROSKOBU ANALİZİ .....                                                                      | 33        |
| 4.3     | <b>STOK FİTOHORMON ÇÖZELTİSİ HAZIRLAMA (BAP, NAA).....</b>                                         | <b>33</b> |
| 4.4     | <b>BİYOSİLİKA BONCUKLARIN 3-AMİNOPROPİLTRİETOKSİSİLAN (3-APTES) İLE İŞLEVSELLEŞTİRİLMESİ .....</b> | <b>33</b> |
| 4.5     | <b>BAP VE NAA'NIN KİTİN, BİYOSİLİKA BONCUKLARA VE SPOROPOLLENİNE ENKAPSÜLAYONU.....</b>            | <b>34</b> |
| 4.6     | <b>ENKAPSÜLASYON VERİMLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ.....</b>                                              | <b>34</b> |
| 4.7     | <b>BAP VE NAA YÜKLÜ TAŞIYICILARLA <i>İN VİTRO</i> SALIM ÇALIŞMALAR .....</b>                       | <b>35</b> |
| 4.8     | <b>SALIM KİNETİĞİ ÇALIŞMALARI .....</b>                                                            | <b>36</b> |
| 4.9     | <b><i>MUSCARI NEGLECTUM</i> GUSS. DOKU KÜLTÜRÜ OPTİMİZASYONU .....</b>                             | <b>37</b> |
| 4.9.1   | ÖRNEK HAZIRLAMA.....                                                                               | 37        |
| 4.9.2   | MS HAZIRLANMASI .....                                                                              | 38        |
| 4.9.3   | <i>MUSCARI NEGLECTUM</i> GUSS. SOĞANLARININ STERİLİZASYONU .....                                   | 39        |
| 4.10    | <b>DOKU KÜLTÜRÜ ORTAMLARDA YAVAŞ SALIM.....</b>                                                    | <b>39</b> |
| 4.10.1  | SIVI MS ORTAMLARINDA DOKU KÜLTÜRÜ .....                                                            | 39        |
| 4.10.2  | KÜLTÜR ORTAMLARDA SALIM DENEYLERİ .....                                                            | 40        |
| 4.11    | <b>BİYOSİLİKA MİKRO KÜRELERİN, SPOROPOLLENİN VE KİTİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU .....</b>  | <b>41</b> |

|             |                                                                                                                 |           |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.11.1      | FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ/ ZAYIFLATILMIŞ TOPLAM YANSIMA KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ (FT-IR/ATR) ..... | 41        |
| 4.11.2      | XRD (X-IŞINI KIRINIM ANALİZİ) .....                                                                             | 41        |
| 4.11.3      | TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) ANALİZİ .....                                                                | 41        |
| 4.11.4      | TERMOGRAVİMETRİK ANALİZİ (TGA) .....                                                                            | 41        |
| 4.11.5      | ENERJİ DAĞILIM X-IŞINI SPEKTROSKOPİSİ (EDX).....                                                                | 42        |
| 4.11.6      | DİFERANSİYEL TARAMALI KALORİMETRE (DSC) .....                                                                   | 42        |
| 4.11.7      | NİNHİDRİN DENEYİ .....                                                                                          | 42        |
| <b>4.12</b> | <b>FOTOSENTETİK PİGMENTLERİN TAYİNİ.....</b>                                                                    | <b>42</b> |
| 4.12.1      | KLOROFİL .....                                                                                                  | 42        |
| 4.12.2      | KAROTENOİD MİKTAR TAYİNİ .....                                                                                  | 43        |
| 4.12.3      | BETA-KAROTEN MİKTAR TAYİNİ.....                                                                                 | 43        |
| 4.12.4      | LİKOPEN MİKTAR TAYİNİ .....                                                                                     | 43        |
| <b>4.13</b> | <b>TOPLAM FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİ.....</b>                                                                  | <b>43</b> |
| <b>4.14</b> | <b>ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ.....</b>                                                                             | <b>44</b> |
| 4.14.1      | ENZİM AKTİVİTESİ İÇİN <i>M. NEGLECTUM</i> SOĞANININ HOMOJENİZASYONU .....                                       | 44        |
| 4.14.2      | <i>M. NEGLECTUM</i> SOĞANININ PROTEİN TAYİNİ (BRADFORD YÖNTEMİ).....                                            | 44        |
| 4.14.3      | <i>M. NEGLECTUM</i> SOĞANININ SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİM AKTİVİTESİ.....                                   | 45        |
| 4.14.4      | <i>M. NEGLECTUM</i> SOĞANININ PEROKSİDAZ (POX) ENZİMİ AKTİVİTESİ .....                                          | 45        |
| 4.14.5      | <i>M. NEGLECTUM</i> SOĞANININ KATALAZ (CAT) ENZİM AKTİVİTESİ .....                                              | 46        |
| <b>5</b>    | <b><u>ARAŞTIRMA BULGULARI.....</u></b>                                                                          | <b>47</b> |
| 5.1         | IŞIK MİKROSKOP ANALİZİ .....                                                                                    | 47        |
| 5.2         | YÜKLEME VERİMLİLİĞİ.....                                                                                        | 48        |
| 5.3         | DOKU KÜLTÜRÜ OPTİMİZASYONU .....                                                                                | 50        |

|                                                                                                                      |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>5.4 BAP VE NAA YÜKLÜ TAŞIYICILAR İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN <i>İN VİTRO</i> SALIM ÇALIŞMALARI .....</b>                 | <b>51</b> |
| <b>5.5 KÜLTÜR ORTAMLARINDA SALIM DENEYLERİ .....</b>                                                                 | <b>55</b> |
| <b>5.6 SALIM KİNETİĞİ ÇALIŞMALARI .....</b>                                                                          | <b>59</b> |
| <b>5.7 BİYOSİLİKA BONCUKLARIN, SPOROPOLLENİN VE KİTİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU.....</b>                     | <b>60</b> |
| 5.7.1 FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ/ ZAYIFLATILMIŞ TOPLAM YANSIMA KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ (FT-IR/ATR)..... | 61        |
| 5.7.1.1 Biyosilika boncuk .....                                                                                      | 61        |
| 5.7.1.2 Sporopollenin.....                                                                                           | 62        |
| 5.7.1.3 Kitin .....                                                                                                  | 65        |
| 5.7.2 XRD (X-IŞINI KIRINIM ANALİZİ) .....                                                                            | 66        |
| 5.7.2.1 Biyosilika boncuk .....                                                                                      | 67        |
| 5.7.2.2 Sporopollenin.....                                                                                           | 68        |
| 5.7.2.3 Kitin .....                                                                                                  | 69        |
| 5.7.3 TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) ANALİZİ .....                                                               | 70        |
| 5.7.3.1 Biyosilika boncuk .....                                                                                      | 71        |
| 5.7.3.2 Sporopollenin.....                                                                                           | 73        |
| 5.7.3.3 Kitin .....                                                                                                  | 74        |
| 5.7.4 ENERJİ DAĞILIMLI X-IŞINI SPEKTROSKOPİSİ (EDX).....                                                             | 75        |
| 5.7.4.1 Biyosilika boncuk .....                                                                                      | 76        |
| 5.7.4.2 Sporopollenin.....                                                                                           | 76        |
| 5.7.4.3 Kitin .....                                                                                                  | 77        |

|         |                                                                     |            |
|---------|---------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.7.5   | TERMOGRAVİMETRİK ANALİZİ (TGA).....                                 | 78         |
| 5.7.5.1 | Biyosilika boncuk .....                                             | 78         |
| 5.7.5.2 | Sporopollenin.....                                                  | 80         |
| 5.7.5.3 | Kitin .....                                                         | 82         |
| 5.7.5.4 | BAP ve NAA .....                                                    | 83         |
| 5.7.6   | DİFERANSİYEL TARAMA KALORİMETRİSİ.....                              | 84         |
| 5.7.6.1 | Biyosilika boncuk .....                                             | 84         |
| 5.7.6.2 | Sporopollenin.....                                                  | 85         |
| 5.7.6.3 | Kitin .....                                                         | 86         |
| 5.8     | <b><i>M. NEGLECTUM</i>'UN REJENERASİYONU .....</b>                  | <b>88</b>  |
| 5.9     | <b>TOPRAK KOŞULLARINA ALIŞTIRMA .....</b>                           | <b>91</b>  |
| 5.10    | <b>FOTOSENTETİK PİGMENTLERİN TAYİNİ.....</b>                        | <b>92</b>  |
| 5.10.1  | KLOROFİL İÇERİĞİ .....                                              | 92         |
| 5.10.2  | LİKOPEN, KAROTENOİD VE BETA-KAROTEN İÇERİĞİ.....                    | 93         |
| 5.10.3  | TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ .....                                        | 94         |
| 5.11    | <b><i>M. NEGLECTUM</i> EKSPLANTLARINDA ENZİM AKTİVİTELERİ .....</b> | <b>95</b>  |
| 5.11.1  | KATALAZ (CAT) ENZİM AKTİVİTESİ .....                                | 95         |
| 5.11.2  | PEROKSİDAZ (POD) ENZİM AKTİVİTESİ.....                              | 97         |
| 5.11.3  | SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİM AKTİVİTESİ.....                     | 99         |
| 6       | <b><u>TARTIŞMA VE SONUÇ.....</u></b>                                | <b>102</b> |
| 6.1     | <b>TARTIŞMA .....</b>                                               | <b>102</b> |
| 6.1.1   | BIYOSİLİKA.....                                                     | 104        |
| 6.1.2   | SPOROPOLLENİN .....                                                 | 106        |

|                                                               |                                                                      |            |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.1.3                                                         | KİTİN.....                                                           | 108        |
| 6.1.4                                                         | BİTKİ BÜYÜME VE DÜZENLEYİCİ MADDELERİN YÜKLENMESİ VE KONTROLLU SALIM | 110        |
| 6.1.5                                                         | <i>M. NEGLECTUM</i> .....                                            | 113        |
| 6.1.6                                                         | FOTOSENTETİK ETKİ (KLOROFİL, KAROTENOİD VE LİKOPEN).....             | 114        |
| 6.1.7                                                         | TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ .....                                         | 115        |
| 6.1.8                                                         | <i>M. NEGLECTUM</i> BİTKİSİNİN ENZİM AKTİVİTELERİ.....               | 116        |
| 6.2                                                           | SONUÇ.....                                                           | 117        |
| <b><u>KAYNAKLAR.....</u></b>                                  |                                                                      | <b>119</b> |
| <b><u>EKLER.....</u></b>                                      |                                                                      | <b>140</b> |
| <b>EK 1: BAP VE NAA YÜKLEME VERİMİ STANDART EĞRİLERİ.....</b> |                                                                      | <b>140</b> |
| <b>EK 2: KİNETİK PARAMETRELERİN STANDART EĞRİLERİ.....</b>    |                                                                      | <b>141</b> |
| <b>EK 3: PROTEİN TAYİN STANDART EĞRİSİ .....</b>              |                                                                      | <b>153</b> |
| <b><u>ÖZGEÇMİŞ.....</u></b>                                   |                                                                      | <b>154</b> |
| <b><u>TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR.....</u></b>                      |                                                                      | <b>160</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. Doku kültürü sırasında meydana gelen doku kararması. ....                                                                                                                                                                                                            | 3  |
| Şekil 2.2. ROS'un bitki üzerinde etkileri ve hücre içi biriki (13). ....                                                                                                                                                                                                        | 4  |
| Şekil 2.3. Bitkilerde ROS üretimi ve programlı hücre ölümü. ....                                                                                                                                                                                                                | 5  |
| Şekil 2.4. Malzeme bazlı taşıyıcıların bitkilerdeki çeşitli uygulamaları (78). ....                                                                                                                                                                                             | 14 |
| Şekil 2.5. Polimerik taşıyıcıların salımdaki olumlu etkileri ve koruma mekanizması. ....                                                                                                                                                                                        | 16 |
| Şekil 2.6. Kitin ve kitosan izolasyonu. ....                                                                                                                                                                                                                                    | 17 |
| Şekil 2.7. <i>Muscari neglectum</i> Guss. bitkisinin dünya üzerine dağılım haritası (151). ....                                                                                                                                                                                 | 27 |
| Şekil 2.8. <i>Muscari neglectum</i> Guss. bitkisi (162). ....                                                                                                                                                                                                                   | 28 |
| Şekil 4.1. Tampon ortamlarda fitohormonların salım deney planı. ....                                                                                                                                                                                                            | 36 |
| Şekil 4.2. <i>Muscari neglectum</i> Guss. soğanların hazırlanması. ....                                                                                                                                                                                                         | 38 |
| Şekil 5.1. Işık mikroskop altında a, b) <i>J. regia</i> polenleri ve c, d) sporopollenlerin görüntüleri<br>.....                                                                                                                                                                | 47 |
| Şekil 5.2. a) <i>Geodia macandrewii</i> . Sünger, b, d) <i>Geodia macandrewii</i> süngerin'den izole<br>edilmiş silika cam mikrokürelerin ışık mikroskop görüntüleri c) <i>Geodia macandrewii</i><br>süngerin'den izole edilmiş silika cam mikrokürelerin dijital görüntü. .... | 48 |
| Şekil 5.3. Biyosilika, Kitin ve Sporopolleninin hormon yükleme oranları (%). ....                                                                                                                                                                                               | 49 |
| Şekil 5.4. Biyosilika bonucklar, Kitin ve Sporopolleninin enkapsülasyon verimliliği. ....                                                                                                                                                                                       | 49 |
| Şekil 5.5. Kitin, sporopollenin ve biyosilika'nın toplam hormon yükleme oranları ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ ).<br>.....                                                                                                                                                            | 50 |
| Şekil 5.6. Sterilizasyon çalışmalarında kaydedilen kontaminasyon görüntüleri. ....                                                                                                                                                                                              | 51 |

|                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.7. BAP ve NAA yüklü biyosilika boncukları ile gerçekleştirilen farklı tampon ortamlarında (pH 5,8) salım çalışmaları. ....                                                                                                  | 52 |
| Şekil 5.8. BAP ve NAA yüklü sporopollenin ile gerçekleştirilen farklı tampon ortamlarında (pH 7,4) salım çalışmaları. ....                                                                                                          | 53 |
| Şekil 5.9. BAP ve NAA yüklü kitin ile gerçekleştirilen farklı tampon ortamlarında (pH 7,4) salım çalışmaları. ....                                                                                                                  | 54 |
| Şekil 5.10. BAP ve NAA yüklü biyosilika boncukları ile gerçekleştirilen <i>Muscari neglectum</i> doku kültür ortamlarında kümülatif salım çalışmaları. ....                                                                         | 56 |
| Şekil 5.11. BAP ve NAA yüklü sporopollenin ile gerçekleştirilen <i>Muscari neglectum</i> doku kültür ortamlarında kümülatif salım çalışmaları. ....                                                                                 | 57 |
| Şekil 5.12. BAP ve NAA yüklü kitin ile gerçekleştirilen <i>Muscari neglectum</i> doku kültür ortamlarında kümülatif salım çalışmaları. ....                                                                                         | 58 |
| Şekil 5.13. Biyosilika boncukların $\gamma$ -APTES'ile işlevsellştirme mekanizması. ....                                                                                                                                            | 61 |
| Şekil 5.14. Biyosilika boncuk, biyosilika boncuk/ $\gamma$ -APTES ve hormone yüklü biyosilika boncuk için fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopi/ zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopi (FT-IR/ATR) spektrumu. .... | 62 |
| Şekil 5.15. BAP ve NAA için fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopi/ zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopi (FT-IR/ATR) spektrumu. ....                                                                               | 64 |
| Şekil 5.16. Polen, Sporopollenin ve hormon yüklü sporopollenin için fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopi/ zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopi (FT-IR/ATR) spektrumu. ....                                       | 65 |
| Şekil 5.17. Kitin ve fitohormon yüklü kitinin fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopi/ zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopi (FT-IR/ATR) spektrumu. ....                                                             | 66 |
| Şekil 5.18. Biyosilika boncuk, Biyosilika boncuk/ $\gamma$ -APTES ve hormon yüklü biyosilika boncuğun X-ışını Kırınım difraktogramları. ....                                                                                        | 68 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.19. Polen, sporopollenin ve hormon yüklü sporopolleninin X-ışını Kırınım difraktogramları. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 69 |
| Şekil 5.20. Kitin ve hormon yüklü kitin'in X-ışını kırınım difraktogramları. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 70 |
| Şekil 5.21. Süngerden Sterraster (orijinal boncuk) izolasyonu ve ardından gözenekli biyosilika boncukların üretimi. a) Çalışmada kullanılan sünger türü ( <i>G. macandrewii</i> ) ve üzerinde sterrasterler; b) süngerin dış kabuğundan içe doğru bir bölüm; c, d) Sterrasterlerin SEM görüntüleri. Sterrasterlerin ve kanalların merkezindeki boşluğu. Görüldüğü gibi kanallar dışarıya açılmıyor; e, f) hidrojen flüorür muamelesinden sonra. Kanallar boşluk çekirdeğine açılıyor ve gözenekli biyosilika boncuklar ortaya çıkıyor. Tüm kanallar, boncuğun ortasında açıkça bir boşluğa açılmaktadır..... | 72 |
| Şekil 5.22. SEM görüntüleri; a, b) hidrojen flüorür uygulamasından sonra gözenekli biyosilika boncukları, c, d) fitohormon yüklü biyosilika boncukları .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 73 |
| Şekil 5.23. SEM görüntüleri; a) polen, b) sporopollenin c, d) hormon yüklü sporopollenin .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 74 |
| Şekil 5.24. SEM görüntüleri; a, b) kitin, c) hormon yüklü kitin fiberleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 75 |
| Şekil 5.25. EDX spektrumları; Biyosilika boncuk, Biyosilika boncuk- $\gamma$ -APTES, Biyosilika boncuk- $\gamma$ -APTES/NAA ve Biyosilika boncuk- $\gamma$ -APTES/BAP (BB: Biyosilika boncuk).76                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
| Şekil 5.26. EDX spektrumları; Polen, Sporopollenin, Sporopollenin-BAP ve Sporopollenin-NAA. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 77 |
| Şekil 5.27. EDX spektrumları; Kitin, Kitin-NAA ve Kitin-BAP.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 78 |
| Şekil 5.28. Biyosilika boncuk, biyosilika boncuk/APTES ve hormon yüklü biyosilika boncukların termogravimetrik analizi. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 80 |
| Şekil 5.29. Polen, sporopollenin ve hormon yüklü sporopollenin'in termogravimetrik analizi. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 82 |
| Şekil 5.30. Kitin ve hormon yüklü kitin'in termogravimetrik analizi. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 83 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 5.31. NAA ve BAP'ın termogravimetrik analizi.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 84 |
| Şekil 5.32. Biyosilika boncuk ve BAP, NAA yüklü biyosilika boncukların DSC analizi. .                                                                                                                                                                                                                                                                             | 85 |
| Şekil 5.33. Polen, sporopollenin ve BAP, NAA yüklü sporopolleninin DSC analizi. ....                                                                                                                                                                                                                                                                              | 86 |
| Şekil 5.34. Kitin ve BAP, NAA yüklü kitinin DSC analizi.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 87 |
| Şekil 5.35. Doku kültürü ortamında taşıyıcılar aracılı salım yapılan ve serbest uygulanan explantlarda sürgün sayısı. ....                                                                                                                                                                                                                                        | 88 |
| Şekil 5.36. <i>M. neglectum</i> eksplant kültürü (10. gün); a,b) Serbest NAA ve BAP ile uygulama yapılan pul yaprak eksplantlar; c,d) Kitin-NAA ve kitin-BAP ile uygulama yapılan pul yaprak eksplantlar; e,f) biyosilika bonucuk-NAA ve biyosilika boncuk-BAP ile uygulama eksplantlar; g,h) Sporopollenin-NAA ve Sporopollenin-BAP ile uygulama eksplantlar.... | 89 |
| Şekil 5.37. <i>M. neglectum</i> eksplant kültürü (30. gün); a,b) Serbest NAA ve BAP ile uygulama eksplantlar; c,d) Kitin-NAA ve kitin-BAP ile uygulama eksplantlar; e,f) biyosilika bonucuk-NAA ve biyosilika boncuk-BAP ile uygulama eksplantlar; g,h) Sporopollenin-NAA ve Sporopollenin-BAP uygulama edilen eksplantlar. ....                                  | 90 |
| Şekil 5.38. <i>In vitro</i> kültürda rejenere olan <i>M. neglectum</i> biktilerini toprak koşullarına alıştırma; (a) Sporopollenin-NAA, (b) Sporopollenin-BAP, (c) Biyosilika boncuk-NAA, (e) Biyosilika-BAP, (d) Kitin-NAA ve (f) Kitin-BAP ile muamele edilen eksplantlardan gelişen bitkiler.....                                                              | 91 |
| Şekil 5.39. Serbest BAP, NAA ve sporopollenin, biyosilika boncuk ve kitin aracılı yavaş salınım yapılan <i>M. neglectum</i> bitki dokularında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriği ( $\text{mg g}^{-1}$ ). ....                                                                                                                                      | 93 |
| Şekil 5.40. Serbest BAP, NAA ve sporopollenin, biyosilika boncuk ve kitin aracılı yavaş salınım yapılan <i>M. neglectum</i> bitki dokularında beta karoten, likopen ve karoten içeriği ( $\text{mg g}^{-1}$ ). ....                                                                                                                                               | 94 |
| Şekil 5.41. Serbest BAP, NAA ve sporopollenin, biyosilika boncuk ve kitin aracılı yavaş salınım yapılan <i>M. neglectum</i> bitki dokuların toplam fenolik içeriği ( $\text{mgGAE } 100\text{g}^{-1}$ ). ....                                                                                                                                                     | 95 |

|                                                                                                                                                                                                                                  |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 5.42. <i>M. neglectum</i> bitkisine ait katalaz (CAT) enzim aktivitesi; a, b) katalaz enzim aktivitesi ( $\text{EU mL}^{-1}$ ), c, d) katalaz enzim aktivitesi ( $\text{EU mg}^{-1}$ ).....                                | 96  |
| Şekil 5.43. <i>M. neglectum</i> eksplantlarına ait peroksidaz (POD) enzim aktivitesi; a, b) peroksidaz (POD) enzim aktivitesi ( $\text{EU mL}^{-1}$ ), c, d) peroksidaz (POD) enzim aktivitesi ( $\text{EU mg}^{-1}$ ). ....     | 98  |
| Şekil 5.44. <i>M. neglectum</i> bitkisine ait süper oksidaz (SOD) enzim aktivitesi; a, b) Süper oksidaz (SOD) enzim aktivitesi ( $\text{EU mL}^{-1}$ ), c, d) Süper oksidaz (SOD) enzim aktivitesi ( $\text{EU mg}^{-1}$ ). .... | 100 |
| Şekil 6.1. Tez çalışmanın grafik özeti. ....                                                                                                                                                                                     | 117 |



## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Çizelge 5.1. BAP ve NAA yüklü taşıyıcılarla pH 5.8 ve pH 7.4'te <i>in vitro</i> salım.....                                                                                                                                                            | 55  |
| Çizelge 5.2. BAP ve NAA yüklü taşıyıcılarla doku kültürü ortamlarında salım. ....                                                                                                                                                                     | 59  |
| Çizelge 5.3. NAA ve BAP yüklü biyomateriyal tabanlı taşıyıcıların kinetik parametreleri (PBS pH: 5.8). ....                                                                                                                                           | 59  |
| Çizelge 5.4. NAA ve BAP yüklü biyomateryal tabanlı taşıyıcıların kinetik parametreleri (PBS pH: 7.4). ....                                                                                                                                            | 60  |
| Çizelge 5.5. Biyosilika bonuklarının termogravimetrik analiz sonuçları.....                                                                                                                                                                           | 79  |
| Çizelge 5.6. Polen, sporopollenin ve fitohormon yüklü sporopolleninin termogravimetrik analiz sonuçları.....                                                                                                                                          | 81  |
| Çizelge 5.7. Kitin ve fitohormon yüklü kitinin termogravimetrik analiz sonuçları. ....                                                                                                                                                                | 83  |
| Çizelge 5.8. 1-NAA ve 6-BAP'ın termogravimetrik analiz sonuçları. ....                                                                                                                                                                                | 84  |
| Çizelge 5.9. Biyosilika, Sporopollenin ve Kitin'in Tg ve $\Delta H$ sonuçları. ....                                                                                                                                                                   | 87  |
| Çizelge 5.10. Fitohormon yüklü polimerik taşıyıcılar ve serbest NAA ve BAP'ile uygulama yapılan <i>M. neglectum</i> eksplantlarına ait toplam fenolik, klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil, karotenoid, $\beta$ -karotin ve likopen içeriği. .... | 92  |
| Çizelge 5.11. <i>M. neglectum</i> eksplantlarına ait katalaz (CAT) enzim aktivitesi .....                                                                                                                                                             | 97  |
| Çizelge 5.12. <i>M. neglectum</i> eksplantlarına ait peroksidaz (POX) enzim aktivitesi .....                                                                                                                                                          | 99  |
| Çizelge 5.13. <i>M. neglectum</i> eksplantrına ait Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi .....                                                                                                                                                   | 101 |
| Çizelge 6.1. Fitohormonlar, ilaç ve zirai kimyasallar için kullanılan mikro ve makro taşıyıcılar. ....                                                                                                                                                | 112 |

## SİMGELER DİZİNİ

|        |                                                            |
|--------|------------------------------------------------------------|
| µg     | Mikrogram                                                  |
| µl     | Mikrolitre                                                 |
| µM     | Mikromolar                                                 |
| mg     | Miligram                                                   |
| N      | Normal                                                     |
| M      | Molar                                                      |
| TGA    | Termogravimetrik Analiz                                    |
| PAL    | Fenilalanin amonyak liyaz                                  |
| Bç     | Baz çift                                                   |
| AIP    | l-fenilalanin-amonyak liyaz                                |
| ROS    | Reaktif oksijen türleri ( <i>Reactive Oxygen Species</i> ) |
| NaOH   | Sodyum hidroksit                                           |
| HCl    | Hidroklorik asit                                           |
| DSC    | Diferansiyel tarama kalorimetrisi                          |
| UV-Vis | Ultraviyole görünüm                                        |
| SEM    | Taramalı Elektron Mikroskobu                               |
| PBS    | Fosfat tamponlu salin ( <i>Phospate Buffered Saline</i> )  |
| XRD    | X-ışını difraksiyon                                        |
| EDX    | Enerji yayımlı X-Işını Analizi                             |
| 1-NAA  | 1-Neftalin Asetik Asit (Hormon)                            |
| 6-BAP  | 6-benzylaminopurine (bitki büyüme düzenleyicisi)           |

|                 |                                                        |
|-----------------|--------------------------------------------------------|
| $\gamma$ -APTES | $\gamma$ -Aminopropil) tietoksisilan                   |
| CH <sub>3</sub> | Metil grubu                                            |
| IAA             | Bitki büyüme düzenleyici ( <i>Indol acetic acid</i> )  |
| C               | Karbon                                                 |
| N               | Azot ( <i>Nitrogen</i> )                               |
| O               | Oksijen                                                |
| °               | Derece (Degree)                                        |
| H               | Hidrojen                                               |
| Mg              | Magnezyum                                              |
| Si              | Silan                                                  |
| GAE             | Gallik asit eşdeğeri ( <i>Gallic acid equivalent</i> ) |
| Na              | Sodyum                                                 |
| BBD             | Bitki büyüme düzenleyici                               |

## 1 GİRİŞ

*In vitro* duyarsızlık olarak adlandırılan engelleyici faktörlerden birisi oksidatif kararma olup doku kültürü koşullarında birçok bitki türü, *in vitro* koşullarda rejenerasyonuna olumsuz şekilde etkilenmektedir (1). Son yıllardaki araştırmalar aşırı ROS (Reaktif Oksijen Türleri) üretiminin *in vitro* koşullarda, büyümenin engellenmesi, hücre ölümü, zayıf rejenerasyon, sürgünlerin kaçışı (*explant escape*) ve diğer bitki metabolik yollarının etkilenmesi gibi birçok yönden sınırlandırıcı bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. *In vitro* koşullarda yapılan çalışmalarda kararma şiddeti, hembitki türleri ve çeşitlerine bağlı olduğu kadar hemde dokunun fizyolojik durumuna göre değişmekte ve bitki büyümesini ciddi ölçüde sınırlamaktadır.

Doku kararmasının esas nedeni, doku ve kültür ortamlarında fenolik bileşiklerin birikmesi ve ardından bu bileşiklerin oksitlenmesidir. Ayrıca, eksplant hazırlığı sırasında yaralanma gibi *in vitro* mekanik hasarlar, ROS seviyesinde bir artışa neden olmakta ve buna bağlı olarak eksplanttan rejenerasyon ve kallus oluşumu sırasında kararma meydana gelmektedir (2). Stres koşullarında hücrelerde zincir şekilde üretilen ROS, polar oksin ve sitokin taşıyıcılarının baskılanması yoluyla büyüme düzenleyicilerin yeniden dağıtılması üzerinde etkili olabilmektedir. Kültür ortamlara büyüme hormonlarının dışardan takviyesi, kültür ortamında bitkilerin rejenere olmasına ve canlı kalmasına katkı sağlamaktadır. Ancak, rejenerasyon başlangıcından kısa bir süre sonra (3-4 gün) eksplantlarda kararma başlamakta ve nihayetinde kök ve gövde oluşum aşamasında, kallusun büyüme ve farklılaşma veriminde azalma meydana gelmektedir. Doku kültür ortamına dışardan büyüme düzenleyicilerinin takviyesi durumunda da doku kararması meydana gelmektedir, ancak bu kararma 1) uygulanan hormonların ani salımı 2) ışık, sıcaklık ve pH gibi çevresel faktörlerin etkisi ile hormonların işlevsiz hale gelmesinden kaynaklanmaktadır (3).

Biyomalzeme alanındaki yeni gelişmeler ve son teknolojiler, malzemelerin detaylı karakterizasyonuna olanak sağlamıştır. Bunun sonucu olarak biyomalzeme teknolojisi bitki bilimi de dahil olmak üzere yaşam bilimlerinin farklı dallarında uygulamaya girmiştir. Uygulanan zirai kimyasalların (herbisit, pestisit, büyüme düzenleyici maddeleri vb.) bitki tarafından yavaş ve sürdürülebilir bir şekilde alınması ve sonrasında kullanılması için kontrollü salınım sistemlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir. Bu bağlamda son yıllarda, bitki yetiştirmede kullanılan söz konusu kimyasalların miktarının azaltılması için biyobazlı

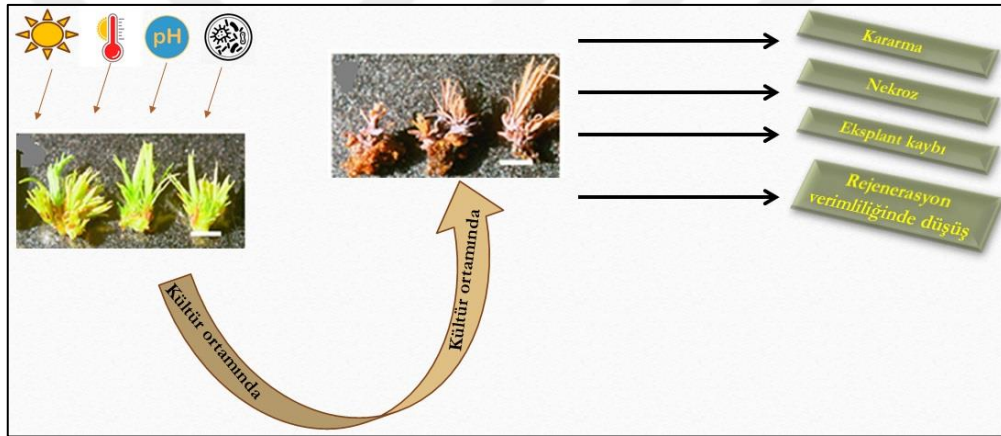
taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi oldukça dikkat çekmektedir (4). Bu kapsamda bitki gelişimi için gerekli olan besin maddelerinin ve büyüme düzenleyicilerinin yavaş salınımlarını sağlayarak erken kayıplarını önlemek için biyomalzemelerin modifikasyonu ile bir takım taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir. Diğer bir ifade ile biyomalzeme bazlı salınım sistemleri arasında, kontrollü ve sürdürülebilir salınım avantajına sahip kargo dağıtım sistemleri olarak önem kazanmıştır.

Bu tezin amacı fitohormon taşıyıcı sistemlerin geliştirileceği farklı kaynakların temini, bu taşıyıcı sistemlerin izolasyonu, kapsamlı fizikokimyasal karakterizasyonu, taşıyıcı sistemlere bitki büyüme ve düzenleyici maddelerinin yüklenmesi, bu hormonların *in vitro* ve *Muscari neglectum* (Arap sümbülü) bitki doku kültürü çalışmalarında ROS kaynaklı kararmanın engellenmesi amacıyla kontrollü salım deneylerinin gerçekleştirilmesi ve bu deneylerin teyitidir.

## 2 KURAMSAL TEMELLER

### 2.1 BİTKİLERDE DOKU KARARMASI

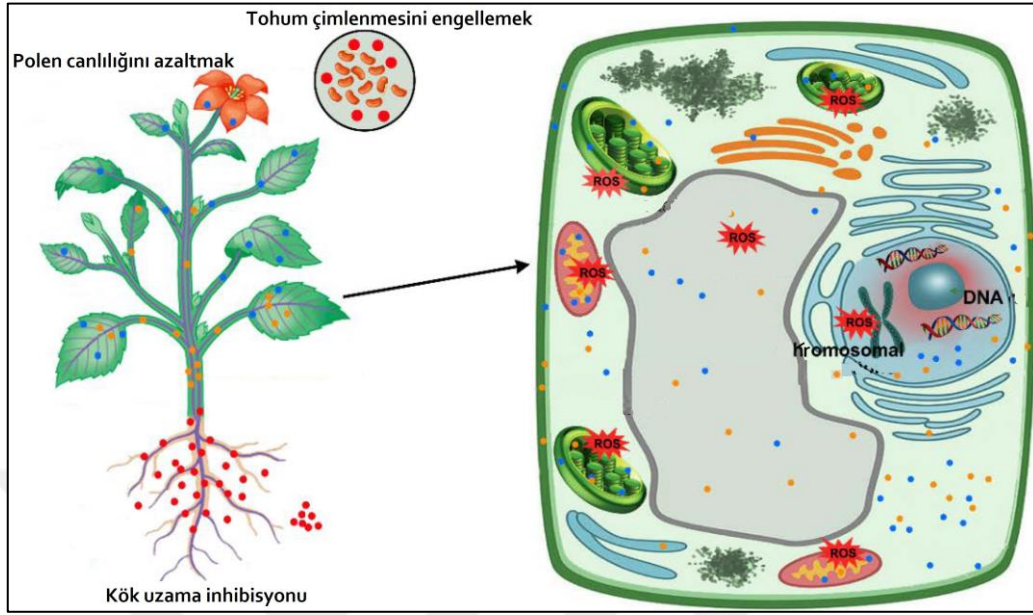
Oksidatif stres kaynaklı nekrotik hücre ölümü bitki doku kültürü çalışmaları yaparken ortaya çıkan en yaygın sorunlardan biridir (5). Nekroz, rejenerasyon ve çoğalma mekanizmalarını etkileyerek doku ölümüne yol açmaktadır (6). Doku kararmasının oluşumu ve sıklığı türden türe ve çeşide göre değişmektedir. Ayrıca, doku kararması, doku veya bitkinin fizyolojik durumuyla da ilişkilidir (7). Tüm bu faktörler, araştırmacıların bitki büyümesini, gelişimini ve rejenerasyonuna manipüle etme becerilerinin kısıtlanmasına neden olmaktadır (Şekil 2.1.) (8). Oksidatif doku kararmasının arkasında yatan temel neden, çeşitli fenolik bileşiklerin doku kültür ortamlarında aşırı birikmesi ve ardından bu fenolik bileşiklerin oksitlenmesidir (9).



Şekil 2.1. Doku kültürü sırasında meydana gelen doku kararması.

Tuzluluk, kuraklık, metal toksisitesi, aşırı sıcaklık, hava kirleticileri, ultraviyole-B (UV-B) radyasyonu, pestisitler ve patojen enfeksiyonu gibi çeşitli çevresel faktörlere maruz kalma, bitkilerde oksidatif strese neden olur ve bu da birden fazla şekilde oksijen temas sonucu üzerinde oluşan yaralar ile reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi yoluyla bitki hücrelerinde hidroksil radikallerini, tekli oksijeni ve hidrojen peroksiti içerir ve hücrel metabolizmada fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler mekanizmalarda bazı değişikliklere yol açan sinyal yollarını aktive etmektedir. Doku kültür koşullarında, fenolik bileşikler bitkinin özel dokularında sentezlenmekte ve yara, stres veya mikroorganizmalar gibi herhangi bir dış etmene karşı birincil savunma tepkisi olarak işlev görmektedir (10). Bilindiği üzere doku kültürü prosedürlerinin çoğu kesilmiş doku parçalarının, çeşitli fenolik bileşiklerin üretilmesine ve salınmasına yol açan simüle edilmiş ve stresli koşullarda kültürlenmesini

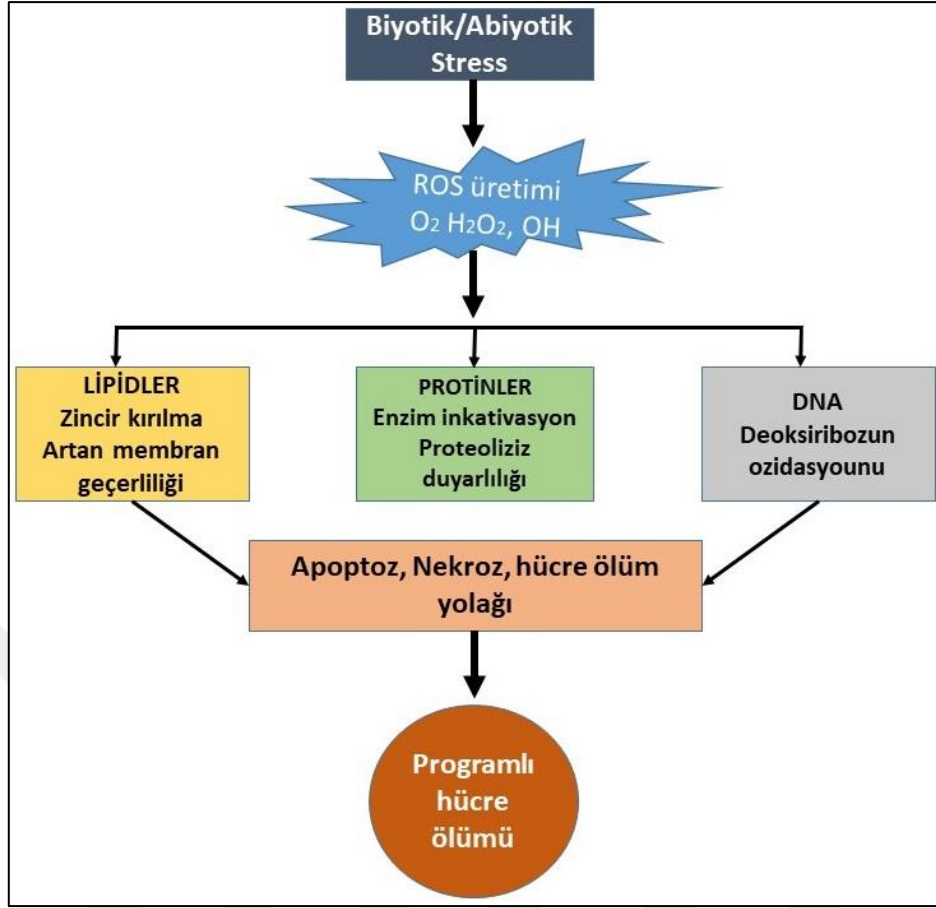
içermektedir (11). Bu toksik bileşiklerin dokularda aşırı birikimi hücre hasarına ve nihayetinde bitki ölümüne yol açmaktadır (11, 12).



Şekil 2.2. ROS'un bitki üzerinde etkileri ve hücre içi biriki (13).

Doku kültürü sırasında karşılaştıkları kısıtlamaları göz önünde bulundurarak, kültür ortamındaki doku kararmasını önlemek veya azaltmak için yeni protokollerin geliştirilmesi ve optimizasyonu üzerinde yoğunlaşmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüze kadar, araştırmacılar kararma ve doku ölümünü azaltmaya yönelik bazı önemli ilerlemeler kaydetmiştir (14-17). Bunlar, kültür koşullarının ve ortam bileşenlerinin sık sık manipülasyonunu içermektedir. Örnek olarak, karanlık koşullarda büyütülen dokularda, ışık altında büyüyen dokulara kıyasla daha düşük oranda kararma kaydedilmiştir (18). Bu durum ise, dokulardaki su moleküllerini iyonize ederek OH ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gibi fenolik bileşiklerin ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine yol açan ışık noksanlığına atfedilebilmektedir (Şekil 2.2.) (19).

Alternatif bir yaklaşım, büyüme ortamının bileşiminin değiştirilmesi ile doku kararmasının azaltılmasının sağlanabileceği konusunda önemli sonuçlar elde edilmiştir (20, 21). Araştırmacılar, kültür ortamlarında farklı bitki büyüme düzenleyicileri konsantrasyonlarını test etmişler ve bu deneylerden olumlu sonuçlar elde etmişlerdir (9, 22). Ayrıca, antioksidanların uygulanması, fenolik bileşiklerin zararlı etkilerini azaltmak için daha hedef odaklı bir yaklaşım olarak rapor edilmiştir (23).



Şekil 2.3. Bitkilerde ROS üretimi ve programlı hücre ölümü.

Doku kararması sırasında ortaya çıkan radikal molekülleri nötralize etmek için askorbik asit, melatonin ve sitrik asit gibi çok sayıda antioksidan kullanılmıştır (24-26). Bazı durumlarda stres altındaki dokulardan zararlı fenolik bileşiklerin salındığı rapor edilmiştir. Salınan bu fenolik bileşiklerin sağlıklı dokular etrafında da birikerek kararmaya yol açtığı bildirilmiştir. Ortamdan bu tür zararlı fenolik bileşiklerin uzaklaştırılması amacıyla aktif kömür ve polivinilpirolidon (PVP), gibi farklı emici malzemeler kullanılmıştır (17, 27). Tüm bu yaklaşımlar, farklı protokol aşamalarında dokuların alt kültürlenmesini içermektedir. Söz konusu alt kültürün, bitki dokusunu daha da zorlayarak sorunu artırdığı düşünülmektedir.

Yukarıda belirtilen yaklaşımlar, doku kararmasının bir dereceye kadar hafifletilmesine yardımcı olurken, problem hala devam etmektedir. Bu nedenle oksidatif kararma problemini tamamen çözmek için yeni protokollere ve metodolojilere ihtiyaç duymaktadır. Mevcut eğilimlere ve sorunun üstesinden gelmek için olası çözümlere geçmeden önce, doku kararması sürecine dahil olan mekanizmaları tanımlamak gerekmektedir.

## 2.2 DOKU KARARMA MEKANİZMALARI

Bitki rejenerasyonu ile ilgili olarak, ıslah, ekonomik açıdan önemli bitki türlerinin biyoteknolojik kullanımı için önemli bir sınırlayıcı faktör olabilir ve aynı zamanda *in vitro* koruma tekniklerinin daha geniş uygulamasına zarar verebilir. *In vitro* koşullarda çalışmalar yaparken bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının doku kültürü manipülasyonlarına yanıt verememesi “*in vitro rekalsitrans*” olarak bilinmektedir (28). *In vitro rekalsitrans*, hücresel yetersizlik ve nekroz gibi birçok faktör tarafından kontrol edilmekte ancak yine de bu sorunun kesin nedenleri belirsizliğini korumaktadır. Oksidatif doku kararması, *in vitro rekalsitrans* ve nekroz, *in vitro* koşullar altında genel doku rejenerasyon sürecini ciddi şekilde etkilemektedir (1).

Yukarıda bahsedildiği gibi, şimdiye kadar araştırmacılar tarafından, doku kararmasının altında yatan ana etmenin, kültür edilen dokularda stres durumuna bağlı olarak aşırı miktarlarda ROS sentezi olduğu belirlenmiştir. ROS’un aşırı birikimi, dokularda hücre ölümüne ve nekroza neden olmaktadır.

Literatür raporlarına göre ROS, birkaç reaktif molekülden oluşmaktadır (29-32). Bu moleküller, reaksiyonlarında yüksek derecede reaktif (hidroksil radikal) ve daha az reaktif (süperoksit ve hidrojen peroksit) olarak kategorize edilebilir. ROS, düşük moleküler ağırlıklı ve eşleşmemiş bir elektrona sahip moleküllerdir (Şekil 2.3.). ROS ve serbest radikaller, hücrelerde bulunan biyomoleküllerin çoğu ile reaksiyona girmekte ve serbest radikal üretiminin zincirleme reaksiyonunun başlamasına neden olmaktadır. Serbest radikal sentezinin bu zincirleme reaksiyonunu durdurmak için, bu moleküllerin ya başka bir serbest molekül ya da süpürücü bir molekül (antioksidanlar) ile karşı karşıya gelmesi gerekmektedir.

Redoks aktivitesi, normal koşullarda proliferasyon, transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu veya gen ifadesi gibi çok sayıda hücresel süreçte hayati bir rol oynamaktadır. Ancak oksidatif stres durumunda, bu olumlu etki negatif hale gelebilmekte ve doku kararmasına neden olabilmektedir.

ROS, tüm aerobik organizmalar tarafından üretilmekte ve parçalanmaktadır, bu durum ise ROS’un, ya normal hücre işlevi için gerekli olan fizyolojik konsantrasyonlarında ya da oksidatif stres olarak adlandırılan aşırı miktarlarda birikimlere yol açmaktadır (33-35). Aşırı

ROS üretimi genellikle oksidatif strese, hücre fonksiyonunun kaybına ve nihayetinde de proteinler, lipidler ve DNA dahil çeşitli biyomoleküllerle etkileşimi nedeniyle apoptoza veya nekroza yol açmaktadır (36). Normal hücresel süreçlerin devamı için oksidan ve antioksidan moleküllerin arasında bir dengenin oluşması gerekmektedir (37).

### 2.2.1 ROS'UN SENTEZ YOLAKLARI

Bitki hücresinde büyük hasarlara neden olan en belirgin ROS radikalleri arasında süperoksit radikali ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikaller ( $OH^\bullet$ ) ve peroksil radikali bulunmaktadır ( $RO_2^\bullet$ ) (38). *In vivo* sentezlenen süperoksit, büyük ölçüde süperoksit dismutaz (SOD) ile katalize edilmekte veya enzimsel olmayan dismutasyon yoluyla  $H_2O_2$ 'ye dönüştürülmektedir (39).  $H_2O_2$ 'nin glikolat oksidaz tarafından enzimatik üretimi rapor edilmiştir (40).  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'nin sınırlı reaktivitesine rağmen,  $H_2O_2$  hücrede moleküler hedefleri bulabilmekte ve doğrudan hasara neden olabilmektedir.  $H_2O_2$ 'nin zar geçirgenliği  $O_2$ 'den daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (41). Literatür raporlarında, hidroksil radikalının ( $OH^\bullet$ ) oksidatif doku kararmadan sorumlu reaktif türler arasında en aktif bir tür olduğu bildirilmiştir.

$OH^\bullet$  radikalının oluşumu üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir (42).

i) İlk sentez mekanizmasında, hidroksil radikalının ( $OH^\bullet$ ) üretimi sırasında, demir ve bakır gibi katalitik geçiş metal iyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu metal iyonları, hidroksil radikalının ( $OH^\bullet$ ) üretim sürecini katalize etmekte ve oksidatif doku kararmasına neden olmaktadır (43).

ii) Bir diğer mekanizma ise, hidroksil radikali ( $OH^\bullet$ ) üretimi, dokuların hidroksil radikal ( $OH^\bullet$ ) üretimini uyaran iyonlaştırıcı radyasyona maruz kalmasıyla gerçekleşmektedir. Radikalın sentezi, dokunun hücreleri içindeki su molekülünün iyonlaşma yoluyla bölünmesi ile gerçekleşmektedir. Bu mekanizmanın üretim hızı veya verimi, bir öncekine göre nispeten yavaştır (44).

iii) üçüncü olarak ise hidroksil radikalının ( $OH^\bullet$ ) sentezi de sırasıyla  $O_2^-$  serbest radikal nitrik oksit (NO) ve hipokloröz asidin (HOCl) reaksiyonu ile gerçekleşmektedir (45).

### 2.3 ROS BİRİKİMİNİN, ENDOJEN BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN HEMOSTAZ GRADİENTİNİ OLUMSUZ ŞEKİLDE ETKİLEMESİ

Bitki büyüme hormonları arasında yer alan oksin, rejenerasyon aşamasında bitkinin büyümesinde ve gelişmesinde önemli rol oynamaktadır. Oksin ve oksinin dağılım oranlarına bağlı olarak bitki büyümesi, apikal (tepe tomurcuğu hakimiyeti) ve vasküler gelişimi, tropik yanıtlar ve organ oluşumu gibi gelişimsel süreçlerin pek çok safhasında kilit rol oynamaktadır (46). Bitkilerde, oksin biyosentezi çoklu aşamalardan oluşmakta olup ve bu aşamalarda bitki türleri ve çeşitlerine özgü oksin üretilmektedir (47). Oksin, hidatodların yanı sıra yaprakların kenarları boyunca mezofil hücre adacıklarında üretilmektedir (48).

Yaygın bir oksin formu olan indol-3-asetik asit (IAA) ise indol öncülerinden triptofan (Trp) bağımlı veya Trp-bağımsız olmak üzere iki yolakla sentezlenmektedir (49, 50). Bitki büyümesi ve gelişimi, büyük ölçüde oksin seviyelerinin ve dağılımının zamansal-uzamsal kontrolüne bağlıdır (51). Bu nedenle, oksin dengesi, bitki büyümesinin ve gelişiminin en iyi şekilde kontrol edilmesini sağlayan farklı mekanizmalarla yönetilmektedir. Bu mekanizmalar arasında oksinin *de novo* biyosentezi, taşınımı, bozulması ve konjugasyon-dekonjugasyon reaksiyonları bulunmaktadır (46).

İndükleyici ajanlara maruz bırakılarak oksidatif stres oluşturulan *Arabidopsis* fidelerinde, oksin hemostazında değişiklikler gözlenmiştir. Oksin hemostazındaki bu değişikliklere bağlı olarak tohum kabuğunun hızlı açılması, kök uzamasının engellenmesi, kotiledon sayısının azalması ve yaprak genişlemesi gibi fizyolojik değişiklikler yaşanmıştır (52). ROS seviyeleri, oksin gradientlerine, hassasiyetine, oksinin oksidatif bozulmasına (53), taşınmasına, dağılımına (54, 55), oksin taşıyıcı *PIN-FORMED* (PIN) proteinlerinin polariteleri ve hücreler arası oksin akışının yönünden etkilemektedir (56-58).

Bazen ROS birikiminin *in vitro* koşullarda oksin hemostazı üzerindeki olumsuz etkilerini dengelemek için, bitki kültür ortamlarına dışarıdan oksinler ve sitokinler gibi bazı bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilmektedir. Büyüme hormonlarının dışardan takviyesi, kültür ortamında bitkilerin rejenere olmasına ve canlı kalmasına katkı sağlamaktadır. Ancak, rejenerasyon başlangıcından kısa bir süre sonra (3-4 gün) yeni oluşan dokularda kararırma başlamakta ve bunun sonucunda kök ve gövde oluşum aşamasında, kallusun büyüme ve farklılaşma veriminde azalma meydana gelmektedir.

Doku kültür ortamına dışardan büyüme düzenleyicilerinin takviyesi durumunda dokuda kararma meydana gelmektedir, ancak bu kararma i) uygulanan hormonların ani salımı ii) ışık, iii) sıcaklık ve iv) pH gibi çevresel faktörlerden dolayı hormonların işlevsiz hale gelmesinden kaynaklanmaktadır (59). Doku kültüründe ilave edilen bitki büyüme düzenleyicilerinin ani salımı nedeniyle oluşan doku kararmasını önlemek amacıyla ise askorbik asit, melatonin veya sitrik asit gibi antioksidan maddelerin (60), sorbentlerin (aktif kömür veya PVPP gibi) eklenmesi veya ortamdaki hormon konsantrasyonunun değiştirilmesi gibi stratejiler geliştirilmiştir (60). Fenolik bileşiklerden kaynaklanan kararmayı azaltmaya yönelik bir strateji ise eksplantın sık aralıklarla alt-kültürlere alınması gerekmektedir. Ancak, birçok bitki türlerinde bu alt-kültür uygulamaları ise eksplantların daha fazla strese girmesine neden olmaktadır (61).

## **2.4 DOKU KARARMASINI ÖNLEMEK İÇİN STAREJİLER**

### **2.4.1 ANTİOKSİDANLARIN UYGULANMASI**

Oksidatif stres, çeşitli stres koşullarına maruz kalan tüm aerobik organizmalarda hücresel hasara neden olan ana unsurlardan biri olarak bildirilen bir fenomendir (62). Süperoksit radikalleri,  $H_2O_2$  ve OH radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin lipid peroksidasyonunda, membran hasarında ve dolayısıyla yaprak yaşlanmasında önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Yaprak yaşlanması sırasında serbest radikal süpürme aktivitesindeki azalma ile proteinler, fosfolipidler ve pigmentlerin serbest radikaller tarafından parçalanabileceği gösterilmiştir (63).

Serbest radikaller hem hayvan hem bitki hücrelerinde programlanmış hücre ölümünde önemli görevler üstlenmektedir (64). Antioksidan koruma, karotenoidler, askorbik asit, tokoferol, glutatyon, sistein, fenolikler ve flavonoidler gibi bileşikler ve süperoksit dismutaz (SOD), guiacol peroksidaz (GPX) ve askorbat peroksidaz (APX) katalaz (CAT) ve glutatyon redüktaz (GR) dahil olmak üzere bir dizi enzimi içermektedir (65).

SOD'un,  $O_2^{\cdot-}$ 'yi  $H_2O_2$  ve  $O_2$ 'ye dönüştürülmesini katalize ettiği için antioksidan sistemlerde önemli bir rol oynadığına düşünülmektedir (66).  $H_2O_2$ 'nin suya dönüşümü, APX ve GR'yi içeren askorbat-glutatyon döngüsü ile sitozol ve kloroplastlarda gerçekleşmektedir (67). Bitki hücreleri bu oksidatif hasara karşı askorbat peroksidaz, glutatyon redüktaz ve

süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin yanı sıra glutatyon, karotenoidler, askorbat ve  $\alpha$ -tokoferol gibi enzimatik olmayan bileşikler tarafından korunmaktadır (68). Poliaminlerde stres koşullarına yanıt olarak kolayca indüklenmekte ve bundan dolayı bitki hücrelerini oksidatif hasara karşı korumada rolü olduğunu rapor edilmiştir (69).

Yapılan bir çalışmada patlıcanın ekstraktı ve taze kesilmiş dokularında enzimatik kararmayı kontrol eden antioksidanların etkisi incelenmiştir. Deneyin ilk aşamasında askorbik asit, sitrik asit, perasetik asit, kalsiyum klorür, siklodekstrin, sistein, heksametafosfat ve 4-heksilresorsinolün antioksidan etkisi, patlıcan ekstrakt ve pelletlerinde farklı konsantrasyonlarda incelenmiştir. Hem ekstrakt hem de pelette siklodekstrin, sistein ve heksilin 10 mM'lık konsantrasyonları etkili olmuştur. Askorbik asit (20 mM), sitrik asit (50 mM) ve perasetik asit (50 mM) ile muamele edilen numunelerde ise enzimatik kararmanın etkili bir şekilde kontrol altına alınabilmesi için daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç olduğunu rapor edilmiştir. Daha sonra, askorbik asit, sitrik asit, perasetik asit, siklodekstrin, sistein ve heksil'in raf ömrü uzatmasındaki rollerinin araştırılması için farklı konsantrasyonlarda 5°C'de saklanmış taze kesilmiş patlıcan dokuları üzerinde uygulanmıştır. Sistein, %1 konsantrasyonda uygulandığında 5 °C'de patlıcan dokuların raf ömrünü 9 güne kadar uzattığı kaydedilmiştir. Sonuçlara göre askorbik asit ve hekzil konsantrasyonlarındaki artışın doku kararmasıyla doğru orantılı olduğunu rapor edilmiştir (70).

Ndakiemi, Mneney (24) tarafından yapılan bir çalışmada, nesli tehdit altında bir ağaç türü olan *Brachylaena huillensis* (Asteraceae)'de ölümcül doku kararmasını önleyerek rejenerasyon hızını arttırmak için askorbik asit uygulanmıştır. Dokular, 6-benzilaminopurin (BAP) ile birlikte farklı konsantrasyonlarda askorbik asit ile muamele edilmiştir. Sonuçlar, fenolik bileşiklerin üretiminde önemli bir azalma olduğunu ortaya koymuştur. En iyi kontrol, BAP ile zenginleştirilmiş odunsu bitki besiyerine askorbik asidin 200-250 mg/litre oranında eklenmesiyle elde edilmiştir.

Misra, Topppo (71) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, 15-20 günlük kültürlemeden sonra nodal eksplantlarda doku kararması gözlenmiştir. Doku kararması ve nekroz problemini çözmek için glutatyon, askorbik asit, tokoferol ve sistein gibi farklı antioksidan ajanlar besiyerinde ayrı ayrı ve bileşim halinde kullanılmıştır. Sonuçlar, fenolik bileşiklerin

retiminde önemli bir azalma olduğunu ortaya konmuştur. En iyi kontrol, askorbik asidin BAP içeren odunsu bitki besiyerine 200-250 mg/litre oranında eklenmesiyle elde edilmiştir.

Benzer bir çalışmada, 15-20 günlük kltrlemeden sonra nodal eksplantlarda doku kararması, glutatyon, askorbik asit, tokoferol ve sistein gibi farklı antioksidan ajanlar, doku kararması ve nekroz problemini önlemek amacıyla besiyerinde ayrı ayrı ve kombinasyon halinde uygulanmıştır (24). İndirgenmiş glutatyon ve askorbik asidin dahil edilmesi, mükemmel yaprak gölgelik alanına sahip çoğalan filizler, taze, yeşil ve herhangi bir alt kültür olmadan yapmadan 40 güne kadar rejeneratif kalmıştır. Öte yandan, süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerin aktiviteleri, kontrol sürgünlerinde daha yüksek olduğu izlenmiştir, bu da doku kararması/nekrozun oksidatif stres ile ilişkili olduğunu kanıtlanmıştır. Ayrıca kontrol sürgünlerinde daha yüksek H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve fenolik bileşik oranı bu delili desteklemiştir.

Anthony, Senaratna (72), tarafından yapılan başka bir çalışmada, *Conostephium pendulum* eksplantlarının embriyojenik yeterliliğini artırmadaki antioksidan etkilerini incelemek için üç antioksidan test yapılmıştır. Antioksidanlar, bitki eksplantlarına doğrudan n muamele ve kültür ortamlarına eklenme olmak üzere iki farklı yol ile uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, tri-potasyum sitrat ve sitrik asit ile ön işleme tabi tutulan kalluslarda nekroz oranında önemli azalma kaydedilmiştir. Kültür ortamına dahil edilen tri-potasyum sitrat ve sitrik asit kombinasyonu, fenolik kararmayı önemli ölçüde azaltmıştır, ancak bu uygulamanın somatik embriyoların sayısı üzerinde önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Bu durum, doku kararmasının önlenmesinin eksizyon sırasında oksijen ile teması azaltarak mümkün olabileceğini düşündürmektedir.

Askorbik asit ayrıca cv. Mzuzu yerel muz eksplantlarının hazırlanması sırasında ölümcül doku kararmasını kontrol etmek için de kullanılmıştır. Bu çalışmada, 6-benzilaminopurin (BAP) ile bileşim halinde uygulanan farklı askorbik asit konsantrasyonları kararmanın etkisini önlemiştir (73).

#### **2.4.2 MOLEKÜLER İNHİBİSYON VE MEDİA MANUPULASYONU**

Fenolik bileşiklerin birikimi ve oksidasyonu doku kararmasının ana öncüleri olmasına rağmen, doku kararması ayrıca fenilalanin amonyak-liyaz (PAL) aktivitesi ile de yakından ilişkilidir (6, 9). PAL, fenilalanini trans-sinamik aside dönüştürerek fenolik bileşiklerin

daha fazla sentezi için substrat sağlayan ilk özel enzimler arasında yer almaktadır (10). Bir dizi çalışma, doku kararması olayı sırasında veya öncesinde PAL aktivitesinin arttığını bildirmiştir. Doku kararmasının önlenmesine yönelik çalışmalar, büyük ölçüde PAL aktivitesinin azaltılmasına dayanmaktadır (6, 9, 10).

Yukarıda bahsedildiği üzere, fenolik oksidasyonun bir sonucu olarak üretilen radikal molekülerini temizlemek için bir dizi antioksidan uygulanmaktadır. Ancak, oksidasyon sonucunda oluşan kararmayı azaltmak için ana mantıksal yaklaşımın, doku kararma olayı sırasında daha yüksek PAL aktivitesini önlemek veya azaltmak olduğunu bilinmektedir. Yeni bir yaklaşım ise, aktif bir PAL inhibitörü olan aminoindan-2-fosfonik asit (AIP) eklenerek PAL'ın inhibe edildiği raporlarda bildirilmiştir.

AIP, *Artemisia annua*'nın kültür ortamına eklenmiş ve elde edilen sonuçlar, kültür koşullarında doku büyümesine eşlik eden doku kararmasında önemli bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir. Bu veriler, AIP ile fenilpropanoid biyosentezinin inhibe edilmesinin, *A. annua*'da doku kararmasını azaltmak için etkili bir yaklaşım olduğunu göstermektedir.

*Ulmus americana* ve *Acer saccharum* ile yapılan diğer araştırmalar, bu yaklaşımın birçok türde etkili olduğunu ve oksidatif karmanın gelişiminin kısıtladığı biyoteknolojik sistemlerde geniş bir uygulamaya sahip olabileceğini göstermektedir (18).

Doku kararması, sağlıklı fidelerin gelişme oranını engellediği için endüstriyel olarak önemli süs bitkilerinin kültüre alınmasında ve çoğalmasında büyük bir zorluk haline gelmektedir. Bu durum, önemli bir tıbbi ve süs bitkisi olan Ağaç şakayıklar için de (*Paeonia suffruticosa* Andrews) geçerlidir. Şakayıkların mikro kültürü, *in vitro* çoğaltma sırasında PAL aktivitesi ile hızlandırılan oksidatif kararma nedeniyle kısıtlanmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar, oksidatif kararma olayı sırasında farklı şekilde ifade edilen bir dizi geni analiz etmişlerdir. Transkriptom dizilimi ile taze yaprak sapından ve üç tür kararmış yaprak sapından toplam 218,957 unigen elde edilmiştir. Bu transkriplerin ortalama dizi uzunluğu 446 bp ve N50 için 493 bp olarak kaydedilmiştir. Fonksiyonel açıklama analizi, sırasıyla 43,428, 45,357, 31,194, 30,019 ve 21,357 unigenler NCBI-NR veri tabanı, Swiss-Prot, KOG, GO ve KEGG kullanılarak anote edilmiştir. Toplamda 33 farklı eksprese olan genin (DEG), kallus kararması ile potansiyel olarak ilişkili olduğu tanımlanmıştır. Bu farklı eksprese olan genler arasında, 12 genin fenolik bileşiklerin biyosentezine katıldığı, üç genin fenolik bileşiklerin

oksidasyonuna dahil olduğu ve altı genin kallus rejenerasyonuna katıldığı tahmin edilmektedir. Dahası, taze yaprak sapında altı transkripsiyon faktörünün ve ağaç şakayıklarında işlenmiş üç yaprak sapında farklı şekilde ifade edildiğı gözlenmiştir (74).

Stres koşulları sırasında PAL aktivitesinin inhibisyonu, çeşitli diğ er bitki sistemlerinde AIP ile önlenmiştir (75-77). *Kamelya sinensis* var. *Sinensis*'in *in vitro* çoğ altması sırasında doku kararması büyük bir problem haline gelmektedir. Bu kararmanın ana nedeni fenolik bileşiklerin birikimidir ve kararmayı önlemek amacıyla en iyi strateji olarak PAL inhibitörü olan AIP, test edilmiştir. Kontrol deneyi olarak, antibiyotikler bir grup ç ay eksplantlarına uygulanmıştır. Bu bileşikler, farklı konsantrasyonlarda 6-benzilaminopurin ve tidiazuron ile birlikte normal bitki büyüme ortamında uygulanmıştır. Veriler, 2 µM AIP'nin doku kararmasını etkili bir şekilde engellediğini, EGC bolluğunu önemli ölçüde azaltabildiğini ve kallus indüksiyonunu ve büyümesini büyük ölçüde iyileştirdiğini ortaya konmuştur.

Jones and Saxena (18) doku kültürü ortamına AIP eklenmesinin şeker akçaağacı (*Artemisia annua*) ve amerikan karaağacında doku kararmasını önlediğı gösterilmiştir. Benzer şekilde, kesilmiş marul yaprağının orta damardaki di-kafeoil tartarik ve 5-kafeoilkinik asit kaynaklı kararmanın AIP uygulaması nedeniyle azaldığı rapor edilmiştir.

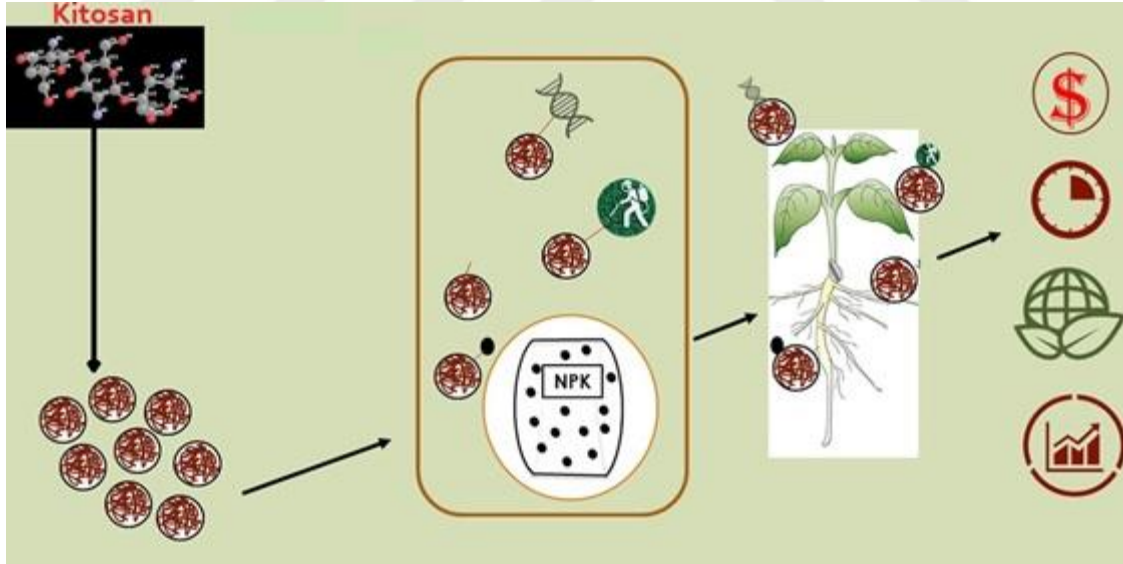
Yukarıda belirtilen tüm bu yaklaşımlar, bitkilerde stres indüksiyonu olasılığını artıran ve nihayetinde bitkilerde oksidatif kararmaya yol açan sürekli alt kültürlerin yapılmasını gerektirmektedir. Ayrıca uygulanan biyomoleküller veya antioksidanlar zamanla aktivitelerini kaybetmekte ve oksidatif kararma bitkiye yeniden saldırmaktadır. Bu tür yaklaşımlar, kısa süreli kültürleme gerektiren bitkiler için faydalı olabilmektedir ancak daha uzun süre kültür koşullarında kalması gereken bitkiler, çeşitli biyomoleküllerin veya antioksidanların uzun süreli aktivitesine ihtiyaç duymaktadır. Fakat ışık, ısı ve pH'daki değişiklikler gibi belirli dış etkenler bu molekülleri parçalamaktadır. Bu nedenle bu moleküllerin bu tür çevresel etkilerden korunması gerekmektedir.

## 2.5 BİTKİ BİLİMİNDE BİYOMALZEMELERİN KULLANIMI

Bitki biliminin su, gübre (azotlu, fosforik, potasik gübreler ve organometal) ve pestisit uygulamalarını eksik veya yanlış yönetimlerin kullanılmasıyla nedeniyle besin kayıpları, patojenler ve düşük ürün verimi gibi bir dizi zorlukla karşı karşıya olduğı iyi bilinmektedir.

Yoğun miktarda gübre kullanımı hem çevre hem de sağlık sorunlarına neden olmaktadır ve bu soruna, çiftçiler tarafından makro ve mikro besinlerin uygulanmaları yoluyla çözüm sunulmaktadır. Benzer sorunlar, bazı bitkilerin (süs bitkileri, tıbbi ürünler ve tahıllar) *in vitro* çoğaltılması sırasında da yaşanabilmektedir; burada ROS aracılı doku kararmasına neden olmakta ve eksplantların sağlıklı rejenerasyonunda önemli bir kısıtlayıcı güç haline gelmektedir.

Araştırmacılar, durumun üstesinden gelmek için, ortam içeriğindeki değişiklikler (hormonlar normalde farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda uygulanır), çeşitli antioksidanların uygulanması, ortama salınan fenolik bileşiklerin Emilimi için absorbanların uygulanması ve PAL enzimlerini inhibe edici moleküllerin kullanımı gibi çözümler üretmiştir. Ancak tüm bu alternatif yaklaşımlar, büyük deneysel çalışma, zaman, para ve en önemlisi eksplantlarda strese neden olan alt kültürlenmeyi gerektirmektedir. Ayrıca bu biyomoleküller, antioksidanlar ve hormonlar uygulandıktan kısa bir süre içinde ışık, sıcaklık ve yüksek pH koşulları gibi birtakım faktörlerden dolayı etkinliklerini yitirmektedir. Mevcut durum göz önüne alındığında hem besin kayıplarını hem de çevre ve sağlık tehlikelerini ortadan kaldırarak daha güvenli ve ekonomik alternatif yaklaşımları gerektirmektedir.



Şekil 2.4. Malzeme bazlı taşıyıcıların bitkilerdeki çeşitli uygulamaları (78).

Biyomateriyal bilimi ve nanoteknolojideki mevcut gelişmeler biyomalzemelere, bitki bilimLeri de dahil olmak üzere farklı alanlardaki uygulamaları açısından yeni perspektifler kazandırmaktadır (Şekil 2.4.). Besinler, fungusitler, fitohormonlar ve gübreler gibi farklı

biyomoleküllerin salımı için bu biyo-bazlı materyallerin kullanılması, biyo-uyumluluk, toksik olmama ve biyomoleküller için afinite, verimli kapsülleme, uzun süreli salınım vb. çeşitli avantajlar sunmaktadır (78).

Şimdiye kadar çok sayıda çalışma biyopolimerleri, bitkilerin ihtiyaç duyduğu farklı moleküllerin kontrollü salımı amacıyla başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Bu biyopolimerlerin kullanımı, sadece belirli streslerin azaltılmasına katkıda bulunmakla kalmayıp, aynı zamanda farklı bitkilerin büyümesini ve verimini de önemli ölçüde teşvik etmektedir. Biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama ve biyoyumluluk gibi istenen özelliklerin yanı sıra farklı bitki ortamlarında yük taşıma kapasitesine sahip yeni malzemeleri ortaya çıkarmak için kapsamlı araştırmalar devam etmektedir. Şimdiye kadar farklı biyopolimerler, biyolojik köken, toksik olmama, ekonomiklik, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve biyo-uyumluluk gibi çekici özellikleri ve benzersiz fizikokimyasal özellikleri sayesinde araştırmacıların dikkatini çekmiştir. Bu biyopolimerler arasında kitosan, selüloz, kitin ve lignin, farklı bitkilerde nano taşıyıcılardan elisitörlere kadar farklı formlarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

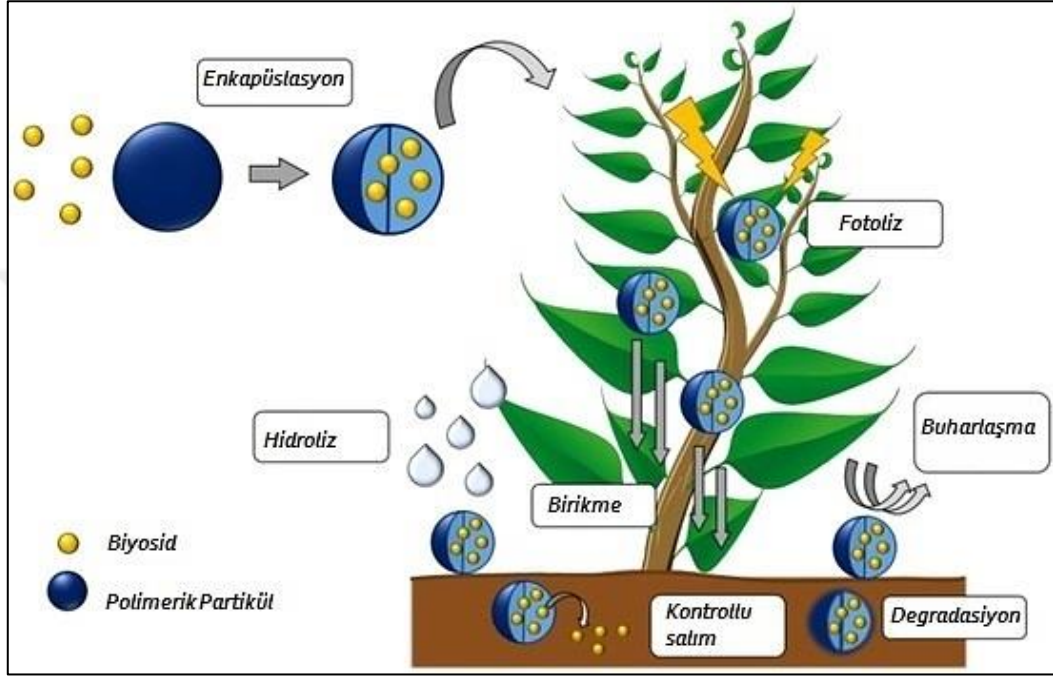
### **2.5.1 BİYOMALZEME BAZLI TAŞIYICILAR**

Biyomalzeme alanındaki yeni gelişmeler ve son teknolojiler, malzemelerin detaylı karakterizasyonuna olanak sağlamıştır (79). Uygulanan zirai kimyasalların (herbisit, pestisit, büyüme düzenleyicileri vb.) bitki tarafından yavaş ve sürdürülebilir bir şekilde alınması ve sonrasında kullanılması için kontrollü salınım sistemlerinin geliştirilmesi oldukça önemlidir (80, 81). Farklı biyopolimerik taşıyıcılar yoluyla kontrollü salım, buharlaşmayı kısıtlayarak aktif bileşenlerin kaybını ve etkinliğini arttırmakta, ayrıca kontaminasyon risklerini de çevre ve sağlık açısından önemli ölçüde önlemektedir.

Biyopolimerik taşıyıcılar, kapsüllenmiş moleküller (fitohormonlar, besinler, gübre, fungusitler) için koruyucu bir ortam sağlayıp bu moleküllerin kontrollü salımını gerçekleştirmektedir (Şekil 2.5.) (82, 83). Günümüze kadar selüloz, kitin, kitosan, kollajen, aljinat ve nişasta dahil olmak üzere çok çeşitli biyopolimerler, tarımsal kimyasalların kontrollü salımı için nanotaşıyıcılar olarak uygulanmıştır (84). Çalışmalar ayrıca selüloz

kullanımının nişasta veya lignin türevleri kadar kapsamlı olmadığını göstermektedir (85). Bu bağlamda son yıllarda, bitki yetiştirmede kullanılan söz konusu kimyasalların miktarının azaltılması için biyobazlı taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi oldukça dikkat çekmektedir.

Bu amaçla, tez çalışması kapsamında kitin fiberler, sporopollenin ve biyosilika boncuk olmak üzere biyomalzeme temelli üç farklı fitohormon taşıyıcı sistem seçilmiştir.

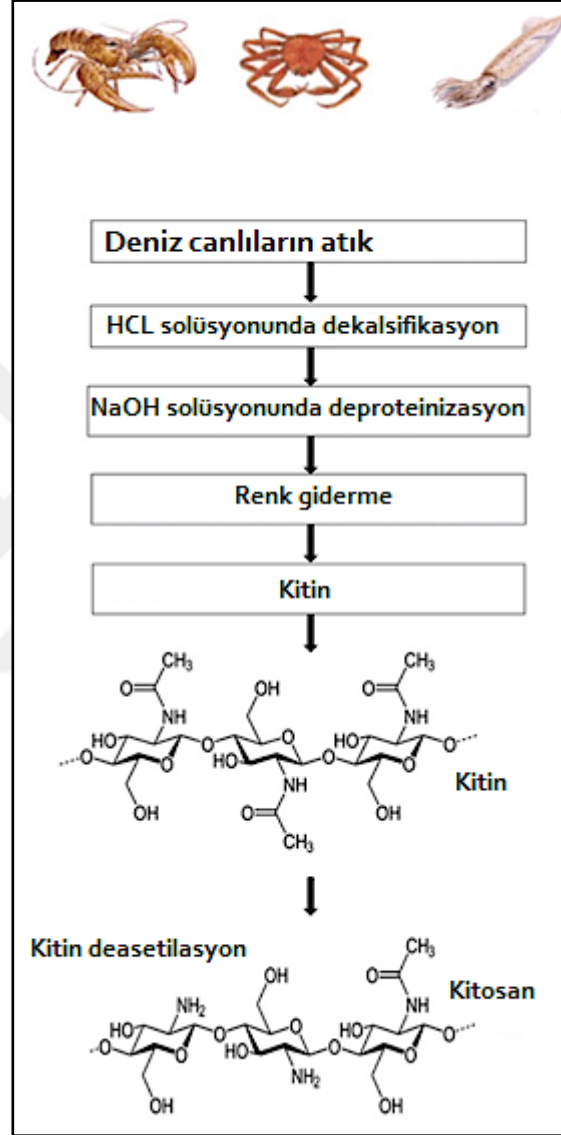


Şekil 2.5. Polimerik taşıyıcıların salımdaki olumlu etkileri ve koruma mekanizması.

### 2.5.1.1 Kitin

Kitin selülozdan sonra yeryüzünde en bol bulunan ikinci polimer olarak bilinmektedir. Kitin kabuklulardan eklembacaklılara kadar birçok organizma için temel yapısal desteği sağlamaktadır ve alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) ve gama ( $\gamma$ ) olmak üzere üç kristalografik formda bulunmaktadır.  $\alpha$  ve  $\beta$  en yaygın olarak bulunan kitin formlarıdır ve farklı kaynaklardan bol miktarda ve kolaylıkla izole edilebilmektedir. Bununla birlikte, gama kitinin kaynakları çok sınırlı olup, doğru karakterizasyonu bile uzun yıllar boyunca gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle son 16 yılda, tüm araştırmacılar, gama kitinin varlığı ve kimyası hakkında çok az bilgi veren yayınlanmış bir araştırma sonucu üzerinde hemfikir olmuşlardır (86). Ancak, güncel mevcut analitik araçlarla desteklenen ve tüm fizikokimyasal özellikleri bildiren yeni bir rapor bu durumu değiştirmiştir. Rapora göre, gama kitin alfa kitine fizikokimyasal özellikleri açısından benzerlik göstermektedir (87).

Kitin, 1–4 bağlarla bağlanmış 2-amino-2-deoksi-d-glikoz ve 2-asetamido-2-deoksi-d-glikoz monomerlerinden oluşan doğrusal bir polimerdir. Yapısal olarak  $\alpha$  ve  $\gamma$ , kitinin  $\beta$  formuna kıyasla fizikokimyasal özellikler açısından birbirine yakınlık göstermektedir. Moleküler ağırlık, biyolojik ve fizikokimyasal özellikler, saflık, kaynaktan kaynağa ve ayrıca ekstraksiyon yöntemine göre değişiklik göstermektedir (88).



Şekil 2.6. Kitin ve kitosan izolasyonu.

Kitosan, kitinin deasetillenmiş bir türevidir ve zincir boyunca uzanan amino grupları sayesinde daha işlevsel bir polimerdir (89). Kitosan, gıda kaplamaları, gıda ambalajları, karışım kompozit üretimi ve benzeri birçok uygulama alanında yararlı olmasını sağlayan mükemmel bir film oluşturma özelliğine sahiptir. Kitosanın başlıca özellikleri arasında

toksik olmayan ( $LD_{50} = 16$  g/kg sıçanlarda) muko yapışkanlığı (90), hemostatik, film oluşturma yeteneği (91), mükemmel adsorpsiyon matrisi, antiviral, antibakteriyel, antifungal (92), antioksidan (93), antikolesterolemik (94) gibi özellikleri sayesinde birçok uygulamada dikkat çekici bir bileşen haline getirmektedir.

#### **2.5.1.1.1 Kitinin bitki bilimindeki uygulamaları**

Kitin bitkilerde biyopestisitler, biyo gübreler ve tohumlarda, gıdalarda ve kaplamada tarım filmi gibi farklı uygulamalara sahiptir. Kitosan ayrıca, herhangi bir mikrobiyal hastalık durumunda bitkilerin doğal bağışıklık sistemini tetiklediği için farklı bitki hastalıklarına karşı bir uyarıcı olarak büyük ölçüde kullanılmıştır. Mahsul üretimini geliştirmek için bir dizi kitosan bazlı polimerler tasarlanmıştır. Toprağa kitin eklenmesi mikrobiyal toplulukları hem bollukta hem de yapı olarak geliştirmektedir. Bununla birlikte, bitkilerdeki tüm bu iyi uygulamalarına rağmen, suda veya zayıf asitlerde çözünür olmaması nedeniyle kitinden bu tür uygulamalarda yüksek verimlerde yararlanılamamaktadır.

#### **2.5.1.1.2 Antimikrobiyal aktivite**

Kitosanın toprak zenginleştirme ürünü olarak kullanılması, *Fusarium* solgunluğu (95, 96) ve gri küf (97, 98) gibi birçok mantar hastalığının önemli ölçüde kontrol altına alınmasını sağlamıştır. Kitosan ayrıca hem biyotrofik hem de nekrotrofik patojenlere karşı etkisini göstermiştir. Kitosan uygulamasının ayrıca oomycete patojenlerine karşı da etkili olduğu tespit edilmiş ve biberlerde *Phytophthora capsici* (99) ve patatesten *Phytophthora infestans* (100) patojenlerine karşı önemli sonuçlar elde edilmiştir. Karideslerden izole edilen kitinin, patates yumrularında kabuklanma hastalığına neden olan patojen *Streptomyces* patojeninin inhibisyonu için başarı ile kullanıldığı ve hastalık yoğunluğunun %22'den %4'e düşürüldüğü rapor edilmiştir (101).

Kitosan ayrıca, bitkilerde birçok viral hastalığa karşı antiviral aktiviteye sahiptir (102). Ancak literatürde kitosanın antiviral etkisinin, doğrudan ya da diğer moleküller aracılığıyla dolaylı olarak gerçekleşip gerçekleşmediği konusunda kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Kitin bazlı formülasyonların toprağa dahil edilmesi, fitopatogenik nematod türleri olan *Meloidogyne arenaria* ve *Heterodera glisinlerinin* seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu azalma oranı, ticari bulunan nematokistlerden (örneğin, ClandoSan® 618) daha yüksek olarak

kaydedilmiştir. Ayrıca, domates üzerinde yapılan bir çalışmada, kitin ilavesiyle bitki büyümesi iyileştirilirken, başarılı bir nematod kontrolü gözlenmiştir (103).

#### **2.5.1.1.3 Kitinin bitki büyümesi, gelişimi, beslenmesi ve abiyotik strese karşı direnci üzerindeki rolü**

Kitin bazı formülasyonların uygulanması, haşere ve hastalık kontrolü üzerindeki etkilerden bağımsız olduğu düşünülen çeşitli tarım ve süs bitkilerinde gelişmelerle sonuçlanmıştır. Kitinin uygulamasının, daikon turpları (*Raphanus sativus*) (104), lahana (*Brassica oleracea*) (105), soya fasulyesi filizi (106), tatlı fesleğen (107), asma (108), Gerbera ve Dendrobium orkideleri gibi süs bitkilerde (109) büyümeyi önemli ölçüde artırdığı rapor edilmiştir.

Bittelli ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (110), kitosan ile muamele edilmiş biber bitkilerinde %26-43 oranında su kullanıldığını bildirilmiştir. Bu sonuçlar araştırmacıları, kitosanın bitkiler üzerinde anti-transpirasyon etkiye neden olduğu sonucuna götürmektedir. Bu durum kitosanın, aşırı su kaybının istenmediği tarımsal uygulamalarda büyük ölçekte kullanım potansiyeli taşıdığını göstermektedir. Ayrıca araştırma sonuçları kitosan uygulamalarının, stomaların açılma ve kapanma mekanizmasında önemli bir role sahip olan ABA ve jasmonik asitin (111) konsantrasyonlarında artış sağladığını rapor etmişlerdir (112).

Bazı bahçe bitkileri üzerinde kitin ve kitosan uygulaması çiçeklenmeyi de tetiklemektedir. Yapılan bir çalışmada, kitosanın (deasetilasyon seviyeleri; %70-90) Dendrobium orkidelerine 1-100 mg/L konsantrasyonlarında uygulanması, vejetatif büyümede hiçbir değişikliğe neden olmaksızın erken çiçeklenmeye neden olmuştur (113).

Yapılan benzer bir çalışmada, toprak zenginleştirme ajanı olarak kitosan uygulamasından sonra, *Passiflora edulis*'te erken çiçeklenme oranının önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir (114).

Kitosan ve kitinin tohum oluşumu sırasında embriyojenezin indüksiyonunda rol oynadığı düşünülmektedir, ancak kesin mekanizma bilinmemektedir. Literatür verilerinde mısır ve buğday tohumlarının kitin ile işlenmesinden sonra çimlenme oranının iyileştiği kaydedilmiştir (115, 116).

Kitosan, çok sayıda literatür raporu ile belgelenmiş olan güçlü bir antioksidan polimerdir (117). Kitosan oligomerleri üzerinde bulunan hidroksile amino grupları, onları hidroksil radikalleri, hidrojen peroksit ve anyon süperoksit için son derece etkili süpürücüler haline getirmektedir (117). Ancak, stresli yetiştirme ortamlarında kitin bazlı işlemlerin bitkilerin hayatta kalmasını ve performansını nasıl arttırdığına dair yayınlanmış bir kanıt bulunmamaktadır. Stresli ortamlarda kitosan ile muamele edildikten sonra pirinç bitkilerinin büyümesinde ve üretiminde önemli bir artış bildirmiştir (113). Bu artışın nedeni olarak, kitosanın stomatal aktivite ve transpirasyon hızı üzerindeki etkilerine göstermekte ve dolayısıyla kitosan bitkilerde transpirasyon oranlarının azalmasına neden olmaktadır.

#### **2.5.1.1.4 Kitin ve kitosan bazlı salım sistemleri**

Birçok çalışma kitin ve kitosanın, farmasötik ilaçlar, biyomoleküller, nutrasötikler ve böcek ilaçları gibi etken maddelerinin salımı için kullanıldığını bildirmiştir. Şimdiye kadar bitkilerde, kitinin doğrudan bir salım malzemesi olarak ya da bitki hormonlarının kültür ortamına salımına yönelik herhangi bir çalışma rapor edilmemiştir. Ancak araştırmacıların kitosan bazlı taşıyıcıları, farklı bitki büyüme düzenleyicileri ve diğer tarımsal kimyasalların kontrollü salımı için kullandıkları çalışmalar büyük ölçüde rapor edilmiştir (113).

#### **Bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin salımı**

Bitkilerde biyotik ve abiyotik stres cevabının ve toleransının altında yatan mekanizmalar oldukça karmaşıktır. Fitohormonlar, yüksek verime sahip, çeşitli streslere karşı dirençli bitkiler üretmek için tercih edilen bir yöntemdir. Fitohormonlar, çok düşük konsantrasyonlarda üretilen, ancak bitkilerde çeşitli hücrel süreçleri düzenleyebilen moleküllerdir. Fitohormonlar, bitkilerin abiyotik stres yanıtı sırasında anahtar roller oynamakta, çeşitli sinyal iletim yollarını koordine etmektedir (113).

Pereira, Silva (118) tarafından yapılan bir çalışmada, giberellik asidin kontrollü salınımı için kitosan / aljinat ve kitosan / tripolifosfat nano taşıyıcılar kullanılmıştır. Nano taşıyıcılar, giberellik asit için %100 kapsülleme etkinliği göstermiştir. Kullanılan nano taşıyıcılarla, 60 gün boyunca giberellik asidin stabilitesi korunmuş ve her iki taşıyıcı için farklı salım kapasitesi gözlemlenmiştir. Salımdaki bu farklılıkları pH ve sıcaklık gibi faktörlere bağlı olduğu rapor edilmiştir.

*Phaseolus vulgaris* kullanılarak yapılan biyoaktivite analizleri, kitosan / aljinat / giberellik asit nanopartiküllerinin yaprak alanını ve klorofil ve karotenoid seviyelerini artırmada en etkili olduğunu ortaya konmuştur.

Pereira, Sandoval-Herrera (119) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, giberellik asitin salımı için  $\gamma$ -poliglutamik asit / kitosan nanopartiküller kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre giberellik asit, %60 değerindeki genel kapsülleme verimi ile nanopartiküllere başarıyla yüklenmiştir. TEM ve SEM görüntüleri, bitki hormonunun homojen dağılımını ve nanopartiküllere yüklendiğini doğrulamıştır. Çalışmada, 48 saatte %58 değerinde kümülatif salım belirlenmiş ve kapsüllenmiş giberellik asitin, yapraklarda ve ana ve yan kök gelişiminin indüksiyonunda serbest hormona göre daha verimli olduğu kaydedilmiştir.

Quiñones, García (120) tarafından, brassinosteroidlerin kontrollü salımı için kitosan mikrokürelerin kullanımı bildirilmiştir. Kitosan mikroküreler sodyum trifosfat varlığında koaservasyon-çapraz bağlama yoluyla üretilmiş ve kapsülleme verimi %10 ila %50 arasında kaydedilmiştir. Etanol ve su (pH 7.0) ortamında salım oranı, 10 saat boyunca sabit bir salım göstermiştir.

#### **2.5.1.1.4.1 Fungisit salımı**

Araştırmacılar, fungusit, insektisit ve herbisitlerin kontrollü salınımı için yeni mikro ve nano taşıyıcılar geliştirmektedir. Bu bileşiklerin kontrollü salımına duyulan ihtiyaç, bitkiler üzerinde uygulama sırasında karşılaşılan bir dizi problemten kaynaklanmaktadır. Bu sorunlar arasında bozulma, sızıntı, buharlaşma, kullanılan pestisit miktarı, uygulama sayısı ve toksik yan etkiler yer almaktadır (121). Araştırmacılar, tarım kimyasallarının etkinliğini, çözünürlüğünü ve stabilitesini arttırabilen bu mikro ve nano taşıyıcıların, küçük boyutları ve yüksek yüzey alanları sayesinde yukarıda belirtilen sorunların üstesinden gelmek için faydalı olabileceğini düşünmektedir.

Chauhan, Dilbaghi (122) tarafından yapılan bir çalışmada, heksakonazolün kontrollü salınımı için kitosan nanopartiküller kullanılmıştır. Nanopartiküller, iyotropik jelleşme olarak bilinen ve yaygın olarak kullanılan tekniklerle geliştirilmiştir. Fungisit kapsülleme etkinliği %73 olarak kaydedilmiş ve salım deneyi pH 4.0 ve pH 7'de gerçekleştirilmiştir. pH 4'te gerçekleşen salımın, 10 saat süren pH 7'ye kıyasla hızlı olduğu belirlenmiştir.

Yapılan başka bir çalışmada pestisit yavaş salınımı için kitosan kaplı silika nanopartiküller kullanılmıştır (123). Kapaksız ve kapaklı silika nanopartiküller için kapsüllüme verimliliği sırasıyla %26,7 ve %40,3 olarak kaydedilmiş ve sistem tarafından başarılı ve kontrollü bir salım gerçekleştirilmiştir.

#### **2.5.1.2 Biyosilikanın bitkilerdeki uygulamaları**

Biyomineraloji, doğal olarak oluşan biyomineralizasyon, demineralizasyon ve remineralizasyon fenomenleriyle ilgilenen disiplinler arası bir araştırma dalıdır. Biyomineralizasyonun modern tanımı, "*canlı organizmaların çok işlevli özelliklere sahip mineraller ürettikleri temel biyolojik süreçtir*" (113). Biyominirallerin, çoğunlukla hayvanlar tarafından üretilmektedir. Silikon doğal hali ile silisik asit formunda bulunmaktadır. Tatlı su ve okyanuslarda, silisik asit konsantrasyonları 10 ila 180  $\mu\text{M}$  arasında değişmekte ancak 2  $\mu\text{M}$ 'nin üzerindeki konsantrasyonlarda ve doğru pH'ta, bu doğal silisik asit otopolimerizasyon sürecinden geçmekte ve silikaya dönüşmektedir (113). Bu nedenle silikonun dış ortamlardan alınması ve canlı hücreler tarafından biyosilika'ya dönüştürülmesi çok özel bir biyokimyasal mekanizma gerektirmektedir. Bu karmaşık biyokimyasal süreçler, farklı yüzey morfolojileri ve özellikleri ile farklı yapısal geometrilerde biyosilika oluşumuna neden olmaktadır. Şimdiye kadar biyosilika'nın farklı yapısal organizasyonlarına doğada rastlanmıştır. Biyosilika, diatomlar, süngerler ve bitkiler gibi farklı organizma formlarından izole edilebilmektedir.

##### **2.5.1.2.1 Biyosilikanın kaynakları**

Modern silika üretim döngüsüne büyük ölçüde fitoplankton salgılayan silis hakimdir ve buna örnek olarak diatomlar verilebilmektedir. Günümüzde diatomlar, diğer tüm kaynaklar arasında en kapsamlı araştırılan organizmalardır. Bu tek hücreli mikro algler, asidik kaplıca suları (pH 1.5, 88°C) (113) ve Antarktika denizlerindeki buz bazlı köpükler içinde -20°C'lik ekstrem koşullarda bile organik şablonlar kullanarak silisli hücre duvarlarını üretebilmektedir (113, 124).

Biyosilika üreten organizmaların bir diğer grubu ise, tüm mevcut süngerlerin %95'ini içeren demospongialardır (Demospongiae Sollas 1885) (125). Süngerlerin iskeleti, ayrı liflerde kollajen benzeri bir protein süngeriyi veya gevşek bir şekilde kümelenmiş ve eğik kolajın liflerle birbirine bağlanan monoaksonik ve tetraksonik silisli spiküllerden oluşmaktadır.

Biyosilikanın yapı ve kompozisyonu, hafif yapılar, fotonik nanomalzemeler, sensörler, laboratuvarlarda çip yapıları, biyoyakıtlar, enerji depoları ve ilaç salımı için malzemelerin oluşturulması ve tasarımına ilişkin çeşitli biyomimetik sentez yaklaşımlarına ilham vermeye devam etmektedir (126-133).

#### **2.5.1.2.2 Silikatein aracılı biyosilika sentezi**

Morse ve arkadaşları tarafından, farklı organizmalarda biyosilika üretiminden sorumlu olan silikatin proteini tanımlanmıştır (134). Silikatin, silikanın silikon alkoksitlerden sentezini katalize eden enzimatik olarak aktif bir proteindir. Silikatein, diğerlerinin yanı sıra demospong golf topu sünger (*Tethya aurantium*) ve münzevi yengeç süngerinde (*Suberites domuncula*) bir protein olarak tanımlanmıştır (135-137). Biyosilika oluşumu sırasında silikatinin aktif rolü birçok çalışmada deneysel olarak kanıtlanmıştır. Silikateinin silikatein- $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  olarak bilinen üç izoformu bilinmektedir. Demosponge *S. domuncula*'dan (137) silikatein- $\alpha$  geninin birincil protein translasyon ürünü, bir sinyal dizisi, bir propeptid ve olgun, enzimatik olarak aktif proteinden oluşmaktadır.

Silikatein, enzimatik olarak sentezlenen ürün için hem bir enzim hem de bir iskelet görevi görmektedir (138). Mekanik olarak, silikatein ile katalize edilen polikondensasyon reaksiyonu, katalize edilmemiş reaksiyona benzemekte, ancak daha düşük konsantrasyonlarda ve nötr pH koşullarında gerçekleşebilmektedir. Katalitik triadin üç amino asidini de içeren silikatein aracılı polikondensasyon için bir reaksiyon mekanizması önerilmiştir (138).

#### **2.5.1.2.3 Bitkilerde uygulamaları**

Bugüne kadar, zirai kimyasalların yavaş salınımı için kapsüller, mikroküreler ve nanopartiküller şeklinde birçok nanoformülasyon geliştirilmiştir. Bu nanoformülasyonlar ya inorganik bileşiklerden sentetik olarak üretilmekte ya da doğal kaynaklardan elde edilmektedir.

Bildirilen tek bir çalışmada biyosilika, biyokömür ve saman külü ile karıştırılmıştır. Bu karışım daha sonra pestisitlere eklenmiştir. Biyosilika, gözenekli bir mikro/nanoyapıya sahiptir ve bu nedenle, bitki yapraklarının pürüzlü yüzeyi tarafından tutulma eğiliminde olan çok sayıda pestisit molekülünü adsorbe edebilmekte ve yapraklar üzerinde yüksek bir

yapışma performansı sergilemektedir, bu nedenle pestisit kaybı azalmakta, bitki için yeterli pestisit sağlanmakta ve pestisitlerin kirlilik riski önemli ölçüde azaltılabilmektedir (139).

#### **2.5.1.2.4 Tezde kullanılan biyosilika**

Biyosilika, morfogenetik olarak aktif ve biyoyumlu doğal inorganik bir polimerdir. İnorganik iskeletlerini oluşturmak için silisli süngerlerde bir silikatin aracılık ettiği reaksiyonu ile oluşmaktadır (140). İçi boş gözenekli silika küreler, daha yüksek enkapsülasyon kapasitesi sağlayabilmeleri ve kontrollü salım kinetiği göstermeleri nedeniyle, ilaç ve gen salımı için büyük dikkat çekmektedir.

Ancak, bugüne kadar hiçbir çalışmada, *in vitro* bitki kültür sırasında bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin (fitohormonların) kontrollü salımı için sünger silika mikrokürelerinin kullanıldığı rapor edilmemiştir. Mevcut tezde, *in vitro* bitki kültürü sırasında ROS birikimini önlemek için sitokin ve oksin fitohormonlarının kontrollü salınımı için sünger-mikroküreleri taşıyıcı ve salım sistemleri olarak ilk kez kullanılmıştır.

Çalışmada Geodiidae familyasına ait *Geodia macandrewii* mikroküre (oval, yuvarlak, vs.) şeklindeki sterrasters yapılarının kimyasal modifikasyonu sonucu, gözenekli mikro cam boncukların üretimi yapılmıştır. Ardından bu üretilen mikrokürelere belirlenen konsantrasyonlarda oksin ve sitokin fitohormonların enkapsülasyonu yapılmış ve *in vitro* bitki kültüründe kontrollü salımı incelenmiştir.

#### **2.5.1.2.5 Silika/Biyosilika yüzey işlevselleştirilmesi**

Hidrofilik silanol grubuna sahip silika makro ve nanopartiküller, substrat erişilebilirliğini kısıtlayarak istenen özelliklerin azalmasına neden olmaktadır. Silika ve biyosilikanın farklı uygulamalarda kullanılması için silika yüzeyini organik ve inorganik gruplarla işlevselleştirmek için bir dizi çalışma yapılmıştır. Bugüne kadar, silika / biyosilikanın yüzey aktivasyonu / işlevselleştirilmesi için iki yöntem yaygın olarak benimsenmiştir. Bu yöntemler, doğrudan birlikte yoğunlaşma sentezi (*direct co-condensation synthesis*) ve sentez sonrası aşılama olarak bilinmektedir (141). Sentez sonrası aşılama yöntemi, silis yüzeyine organosilan gruplarının eklenmesini içermektedir. Bu yöntem, silikanın yapısal bütünlüğüne herhangi bir zarar vermediğinden, silikanın işlevselleştirilmesi için yaygın olarak benimsenmiştir (142).

3-aminopropyltriethoxysilane (3-APTES), silika yüzeyini modifiye etmek için en sık kullanılan ajanlar arasında yer almaktadır. Bu ajan, kimyasal olarak reaktif amino gruplarını ( $-NH_2$ ) silikon bazlı substratlara bağlayan bir organosilan bağlama türüdür.  $-NH_2$  uç gruplarının mevcudiyeti, DNA, proteinler ve diğer biyomoleküller gibi birçok molekül için bağlayıcı bölge görevi görmektedir. Silika yüzeyinde bu amino gruplarının yokluğunda, biyomoleküllerin silikaya karşı çok düşük bir afinitesine sahip olduğunu bilinmektedir. Ayrıca, sulu koşullarda, bu gruplar  $SiO_2$ 'nin negatif yüklerini tersine çevirerek negatif yüklü moleküller için daha aktif hale getirmektedir (141).

Benzer şekilde, mevcut tezde biyosilika *G. macandrewii* 'den izole edilmiştir. İzole edilen biyosilika boncuklar, NAA ve BAP'ın kontrollü salımı için taşıyıcı olarak kullanılmıştır. Yüzey, biyosilika boncuklarının yükleme verimliliğini artırmak için APTES kullanılarak işlevselleştirilmiştir.

#### **2.5.1.3 Sporopollenin**

Bitkilerde, değerli genetik materyaller polen taneleri olarak bilinen özel koruyucu yapılar tarafından taşınmaktadır. Polen tanelerinin yapısı ve morfolojisi türden türe büyük ölçüde değişiklik göstermektedir (143). Polen tanelerinin yapısı *intine* (iç katman) ve *exine* (dış katman) olarak adlandırılan iki katmandan oluşmaktadır. Polen tanesinin yapısı, sporopollenin adı verilen bir polimerden oluşmaktadır. Sporopollenin, sert ve sağlam yapısal özellikleri sayesinde bitkiler aleminin elması olarak da adlandırmaktadır (144).

Sporopollenin, polen tanelerinin asit ve baz işlemleriyle mikrokapsül formunda kolayca izole edilebilmektedir. Asit ve baz işlemleri, proteinin ve diğer genetik materyallerin polen taneleri boşluğundan uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Ek olarak, kloroform işlemi, kalan lipidlerin veya renk pigmentlerinin çıkarılmaktadır. Sporopollenin, olağanüstü kimyasal direnç, yüksek termal stabilite, iç malzemeleri çıkardıktan sonra alerjik olmama ve doğada binlerce yıl bozulmadan kalabilme gibi muazzam özellikler sergileyen çapraz bağlı bir biyopolimerdir (145).

##### **2.5.1.3.1 Uygulama alanları**

Sporopollenin, ilaç salımı, kozmetik, farmasötik ve gıda endüstrileri gibi farklı alanlarda bir dizi farklı uygulamaya sahiptir (146). Homojen boyut ve dar gözenek dağılımı,

sporopollenini yavaş salımı için mükemmel bir materyal haline getirmektedir. Bir dizi çalışma, sporopolleninin farklı ilaç türleri için yavaş salım potansiyelini ortaya koymuştur. Sporopollenin, kapsüllenmiş malzeme (ilaçlar) için sert pH'lara, ışığa ve yüksek sıcaklığa karşı koruyucu bir kalkan sağlamaktadır. Kapsülleme verimliliği ve salım potansiyelleri farklı türlerde gözenek dağılımı ve gözenek morfolojisi nedeniyle türden türe değişiklik göstermektedir. Muhtaba, Sargin (145) tarafından, *Platanus orientalis*'in polenlerinden sporopollenin mikro kafesini izole edilmiştir. İzole edilen sporopolleninlerin fizikokimyasal özellikleri, FT-IR, TGA ve SEM gibi analitik tekniklerle doğrulanmıştır. Yükleme kapasitesi pasif yükleme tekniği için %8,2 ve buharlaştırmalı yükleme tekniği için %23,7 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmalar, *P. orientalis*'ten sporopolleninin, ilaç yükleme ve kontrollü salım çalışmaları için uygun bir taşıyıcı olarak önerilebileceğini ortaya çıkarmıştır.

Sporopollenin, polen tanelerinin dış kabuğundan ekstrakte edilen doğal bir biyopolimerdir (147). Sentetik ve diğer biyobazlı malzemelerle karşılaştırıldığında, sporopollenin asidik ve bazik ortamda yüksek stabilite, düşük maliyet, büyük iç boşluklu monodispers makro gözenekli partiküller, homojen boyutlar sergilemek gibi çeşitli avantajlara sahiptir (148).

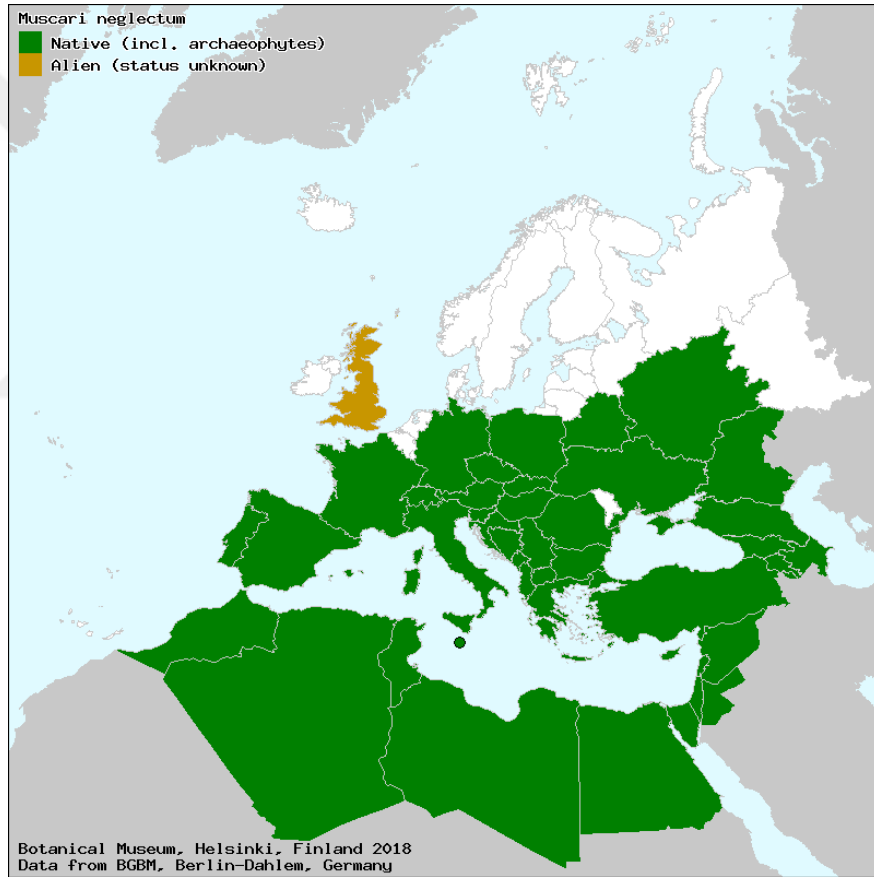
Sentetik olarak bu tarz geometrik özellikleri taşıyan malzemelerin enkapsülasyon uygulamalarına yönelik sentezi zor ve maliyetli bir işlemdir. Bu yönlerden sentetik taşıyıcı sistemlere kıyasla sporopollenin biyolojik olarak uyumludur ve doğal makro/mikro gözenekleri sayesinde ilaç salım sistemi olarak kullanılmaktadır. Sporopolleninin ilaç salım sistemleri olarak kullanım potansiyeli kısıtlı sayıda araştırmacı tarafından rapor edilmiştir (146). Bununla birlikte, sporopollenin aracılı kontrollü fitohormon salımına yönelik bir çalışma literatürde daha önce rapor edilmemiştir.

Bu bağlamda mevcut tez çalışmasında, *in vitro* bitki kültürü sırasında fitohormonların sporopolleninin ile enkapsülasyonu ve kontrollü salınım potansiyeli ilk kez ortaya konulacaktır. Bu amaçla *Juglans regia*'nın sporopollenleri fitohormon taşıyıcı sistemler olarak seçilmiştir. *J. regia* monad tip polenler olup, 26-50 µm arasında değişen (orta boy) boyutlara sahiptir ve porate sınıfında yer almaktadır. Polenin şekli daireseldir ve düzensiz katlanma özelliği sergilemektedir. Polenin yüzeyinde bulunan porların sayısı>6'dır. *J. regia* polenlerinin, bu tür bitki uygulamaları için uygun bir materyal olmasını sağlayan en büyük

avantaj doğada bol miktarda bulunması ve dolayısıyla kolaylıkla temin edilebilmesidir (149).

#### 2.5.1.4 *Muscari neglectum* Guss.

Mevcut tez çalışmasında *M. neglectum* (Arap sümbülü) model bitki olarak seçilmiştir. Arap sümbülü *Hyacinthaceae* (Sümbülgiller) familyasına aittir ve bataklık alanlar, tarlalarda yaşayan soğanlı, otsu bir bitki türüdür. Endemik *M. neglectum* Guss. Muscari türleri arasında en güzel kokulu bitkidir ve süs bitkisi olma potansiyeli yüksektir. Anavatanının Akdeniz, Kuzey Afrika, Güney Afrika, Güney Doğu ve Orta Asya ülkelerinin (Türkiye ve Yunanistan da dahil) olduğu bilinmektedir (Şekil 2.7.)(150).



Şekil 2.7. *Muscari neglectum* Guss. bitkisinin dünya üzerine dağılım haritası (151).

Türkiye'de (Denizli, Karabük ve Antalya vb.) bulunan 25 muscari türünden, *M. neglectum* da dahil olmak üzere on tür endemiktir (152). Çok sayıda muscari türü süs bahçe bitkisi olarak kullanılmaktadır (Şekil 2.8.). Ancak, *M. neglectum* türünün kesme çiçek ve açık bahçe

bitkisi olarak ticari amaçla kullanımı henüz yaygınlaşmamıştır. Türkiye soğanlı çiçek ihracatı konusunda önemli bir yere sahiptir. Hollanda, Türkiye'den çok sayıda yabancı soğanlı çiçek türünü ithal etmekte ve bazı küçük işlemlerden sonra yeniden etiketleyerek tüm dünya pazarlarına ihraç etmektedir. Dolayısıyla, Hollanda bu ticaretin nihai faydalanıcısıdır. Günümüzde, *M. neglectum* popülasyonları, doğal kaynaklar üzerinde artan baskı, sürdürülemez tarım, ormancılık uygulamaları, hızlı kentleşme, artan sanayi faaliyetleri ve fosil yakıt tüketimine bağlı olarak artan CO<sub>2</sub> kirliliği dâhil olmak üzere, abiyotik ve biyotik stresler nedeniyle büyük baskı altında bulunmaktadır. Türkiye'de *M. neglectum* türü *ex situ* koruma için, ihracat yasaklı bitki türleri listesine dahil edilmiştir (153). Geçmiş literatür çalışmaları *M. Comosum* (154, 155), *M. Botryoides* (156), *M. Armeniacum* (157) *M. armeniacum*, *M. azureum*, *M. latifolium*, *M. moschatum*, *M. neglectum*, *M. paradoxum*, *M. tubergenianum* (158), *M. macrocarpum* (159), *M. Aucheri* (160), türleri üzerinde birkaç *in vitro* çoğaltma çalışma ile sınırlıdır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada (161), eksplant olarak olgunlaşmamış embriyoları kullanarak *M. muscarimi* türünün *in vitro* rejenerasyonunu rapor etmişlerdir. Ama doku kararma gibi sorunlardan dolayı rejenerasyon verimliğindeki düşüşler hala bu bitki için optimize bir çoğaltma protokolü bulunmamaktadır. Bu nedenle tez çalışmada, *M. neglectum* bitkilerini kentsel peyzaj planlama ve benzeri alanlarda ticari süs bitkisi olarak kullanılabilir hale getirmek için biyomalzeme destekli kullanışlı ve hızlı bir *in vitro* rejenerasyon tekniği geliştirilmiştir.



Şekil 2.8. *Muscari neglectum* Guss. bitkisi (162).

### 3 GEREKÇE VE AMAÇ

Bitkilerin *in vitro* kültürü sırasında doku kararması ortaya çıkan en yaygın sorunlardan biridir. Doku kararması, istenen sonuçlar için ilgili eksplantların manipüle edilmesini zorlaştırmaktadır. Oksidatif kararma olarak da bilinen doku kararmasının, fenolik bileşiklerin birikmesi ve oksidasyonundan kaynaklandığına inanılmaktadır (18).

Bitki hücresi ve dokusu içinde bu fenolik bileşiklerin yoğun birikimi ve oksidasyonu hücrelerin çoğalmasına engellemekte, doku ve eksplantların rejeneratif kabiliyetini azaltmaktadır (163-166). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, fenolik oksidasyon sürecine dahil olan reaktif oksijen türleri (ROS), fenolik bileşikler ve oksidatif enzimlerin varlığı/etkisi gibi doku kararmasından sorumlu birçok faktörü ortaya çıkarmıştır (167-169).

ROS, hücreler arası iletişim gibi bitkinin farklı süreçlerinde önemli roller oynamaktadır. Bununla birlikte, *in vitro* kültür sırasında yaralanma, soğuk, UV ışığı, tuzluluk, kuraklık ve patojenler ile kontaminasyon gibi farklı stres koşullarına yanıt olarak ROS seviyeleri artmaktadır (170). Eksplant hazırlığı sırasındaki mekanik hasarın, kallus indüksiyonu sırasında kararmaya neden olan ana faktör olduğu düşünülmektedir. Kültür koşullarında bitki hücresi, belirli bir ROS seviyesini korumakta ve bunu yalnızca hücreler arasındaki iletişim ve hücre içindeki diğer bazı önemli görevler için kullanmaktadır (171). ROS ayrıca sitokinler ve oksinler gibi endojen fitohormonların taşınmasında bilinen bir işleve sahiptir (172).

ROS'un aşırı birikimini dengelemede hücre içi fitohormonların rolü çok önemlidir. Hücre içi fitohormonlar biriken ROS moleküllerini detoksifiye etmek için belirli enzimatik yolları aktive etmektedir. Biyotik veya abiyotik stres durumunda, endojen fitohormonların konsantrasyonuna kıyasla ROS üretimi yüksek seviyelere çıkmaktadır. ROS ve hücre içi fitohormonların homeostaz gradiyentinin bozulması, dokuların nihai oksidatif kararmasına yol açan yolları tetiklemektedir (173). ROS ve hücre içi fitohormonların homeostaz gradiyentinin dengeli bir şekilde korunması gerekmektedir.

Şimdiye kadar araştırmacılar, bu durumun üstesinden gelmek için bir dizi önleyici stratejileri savunmuşlardır. Bu stratejiler, oksidatif kararma sırasında PAL aktivitesini inhibe etmek için moleküler inhibitörlerin eklenmesini, fazla ROS moleküllerini temizlemek için farklı

antioksidanların uygulanması, farklı fitohormonlarla kültür ortamının manipölasyonunu ve salgılanan fenolik bileşikler için absorbanların kullanımını içermektedir.

Fitohormonların ortama uygulanması, kararmayı önlemek için en sık uygulanan yöntemlerden biridir. Ancak bu yöntem kısa bir süre sonra etkisin kaybetmektedir. Bunun nedeni uygulanan fitohormonların bozulması ve ani salımıdır, dolayısıyla fitohormonlar, bitkiler tarafından ihtiyaç anında (abiyotik stres) kullanılamaz hale gelmektedir.

In vitro kültür sırasında doku kararmasını kontrol etmek için, yeni ve daha sürdürülebilir önleyici stratejilerin belirlenmesine yönelik gerçekleştirilen bu tez çalışmasında;

- a) Eksplantların ROS aracılı oksidatif kararmasını önlemek için kültür ortamında fitohormonların bozulmadan ve sürekli olarak verilmesine yönelik biyoyumlu ve toksik olmayan taşıyıcı sistemleri geliştirilmesi,
- b) Ve bu amaca ulaşmak için, mükemmel fizikokimyasal özellikleri nedeniyle işlevselleştirilmiş biyosilika, sporopollenin ve kitin gibi 1-NAA ve 6-BAP yüklü yeni biyopolimerik taşıyıcı sistemlerin izolasyonu ve test edilmesi,
- c) *M. neglectum* Guss'un in vitro kültür koşulunda geliştirilen taşıyıcı sistemlerin doku kararma önleyici etkisinin analiz edilmesi,

tezin gerekçesini oluşturmaktadır.

Bilgimiz dahilinde dünya literatüründe ilk çalışma özelliğinde olan bu araştırma sonuçlarıyla, 1-NAA ve 6-BAP gibi fitohormonlar için yeni biyomateriyal tabanlı taşıyıcı malzemelerin geliştirilmesi ve *M. neglectum* Guss. gibi ekonomik bir süs bitkisinin kullanılmasıyla doku kültürü sırasında ROS aracılı doku kararmasının önlenmesi hedeflenmiştir.

## 4 MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1 MATERYAL

Tezde kullanılacak kitin, biyosilika boncuklar ve sporopollenin taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi amacıyla üç farklı kaynaktan örnek toplanmıştır. Bitki sporopollenin bazı taşıyıcının geliştirilmesi için *Juglans regia* bitki türü seçilmiştir. Biyosilika boncuklar *Geodiia macandrewii* cinsine ait süngerden üretilmiştir. Çalışmada kullanılan hidroklorik asit (HCl), sodyum hidroksit (NaOH), kloroform, metanol, Sodyum hipoklorit (NaOCl), etil alkol ve hidroflorik asit gibi kimyasallar ise Merck (ABD)'dan temin edilmiştir.

### 4.2 YÖNTEM

#### 4.2.1 SPOROPOLLENİN İZOLASYONU

Sporopollenin izolasyonu için 10 g *J. regia* polenleri, 50°C' de 2 saat 4M HCl çözeltisi ile muamele edilmiştir. 110 µm gözenek boyutuna sahip filtre kâğıdı ile nötral pH ya ulaşıncaya kadar saf su ile yıkama yapılmıştır. Ardından 4 M NaOH çözeltisi ile 150°C' de 6 saat proteinlerin uzaklaşması için bekletilmiştir. Filtre kâğıdı ile pH nötrelenize oluncaya kadar saf su ile numuneler 2x tekrarlanarak durulanmıştır. Daha sonra asit ve bazla muamele edilen polen örnekleri, kloroform: metanol: su çözeltisi (4: 2: 1 v:v:v) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında (24±1 °C) bekletilmiştir. Son olarak, sporopollenin numuneleri saf su ile iyice yıkanmıştır ve etüvde 48 saat boyunca bekleterek 60°C'de kurutulmuştur (145).

#### 4.2.2 KİTİN İZOLASYONU

Karides örnekleri boyutlarına göre ayrılmış ve saf su ile yıkanarak vücut yapıları üzerindeki olası partiküller uzaklaştırılmıştır. Sonrasında kitin fiberlerin elde edilmesi amacıyla sırasıyla dekolorizasyon, deproteinizasyon ve demineralizasyon işlemleri uygulanmıştır.

##### 4.2.2.1 Demineralizasyon

Yapıda bulunan kalsiyum karbonatı uzaklaştırmak için 2M HCl kullanılarak demineralizasyon işlemi yapılmıştır (174).

#### **4.2.2.2 Deproteinizasyon**

Kitinle kuvvetli kovalent bağ ile bağlanan proteinleri çözmek için örnekleri 2M NaOH ile muamele edilmiştir. Örnekler %1'lik NaOCl çözeltisinde bekletilerek proteinlerin yapıdan tamamen uzaklaşması sağlanmıştır. Ardından elde edilen kitin örnekleri sonra saf su ile pH nötral (7,0) olana kadar yıkanmış olup kurutulmuştur (175).

#### **4.2.2.3 Dekolorizasyon**

Örnekler, üzerinde bulunan pigment türü bileşikleri uzaklaştırmak için %1'lik NaOCl çözeltisi ile 2 saat boyunca muamele edilmiştir (176).

### **4.2.3 BİYOSİLİKA BONCUKLARIN SÜNGERDEN İZOLE EDİLMESİ**

#### **4.2.3.1 Asit uygulama ile minerallerin uzaklaştırılması**

Biyosilika boncukların süngerden izole edilmesi için daha önce literatürde rapor edilen bir protokol takip edilmiştir (177). Süngerin yapısında bulunan silika harici mineral ve benzeri yapıların uzaklaştırılması işlemi için 2M'lık HCl çözeltisinde oda sıcaklığında 2 saat muamele edilmiştir. Ardından saf su ile nötral pH'ya ulaşıncaya kadar süzölmüştür. Bu basamakta süngerin yapısında bulunan mineral ve benzeri yapıların uzaklaştırılması sağlanmıştır.

#### **4.2.3.2 Baz uygulaması ile protein ve benzeri yapıların uzaklaştırılması**

Bu basamakta mineral ve benzeri yapılarından arındırılmış olan numuneye, 2M NaOH çözeltisi ile bir reflux sistemi içerisinde 100°C'de 2 saat muamele edilmiştir. Ardından protein ve benzeri yapıların uzaklaştırılması amacıyla yine saf su ile nötral pH'ya ulaşıncaya kadar süzölerek yıkanmıştır.

#### **4.2.3.3 Alkol uygulaması ile renk giderimi**

Burada %10'luk etil alkol çözeltisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilen örnekler ardından saf su ile nötral pH'ya ulaşıncaya kadar süzölerek yıkanmıştır. Bu basamakta elde edilen cam boncukların yüzeyinde kalabilecek herhangi bir pigment veya benzeri yapının uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir.

#### **4.2.3.4 Hidroflorik asit çözeltisi ile camın üst katmanlarının aşındırılması**

İstenilen yüzey geometrisine sahip gözenekli mikro cam kürelerin üretimini sağlamak için 50 mg cam boncuklara %25'lik hidroflorik asit çözeltisi ile oda sıcaklığında 20 dk. muamele edilmiştir. Ardından saf su ile nötral pH'ya ulaşıncaya kadar süzülerek yıkanmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında kurutulmuştur.

#### **4.2.4 IŞIK MİKROSKOBU ANALİZİ**

İzole edilmiş sporopollenin ve silika cam mikroküre örnekler ışık mikroskop altında incelenmiştir. Bu amaçla LEICA DM 4000 B Led markalı mikroskop kullanılmıştır. Analiz oda sıcaklık koşullarda gerçekleştirmiştir.

#### **4.3 STOK FİTOHORMON ÇÖZELTİSİ HAZIRLAMA (BAP, NAA)**

Naftalin asetik asit (NAA) ve 6-Benzylaminopurine (BAP) hormonlarının stok çözeltileri, enkapsülasyon ve salım çalışmaları için hazırlanmıştır. Kısaca 900 mg BAP ve NAA, 0.1333 N Sodyum Hidroksit (NaOH: 300 ml) çözeltisi içerisinde 3:1 oranında çözülmüştür. Hazırlanan stok çözeltiler, sonraki deneylerde kullanılmak üzere 4°C'de muhafaza edilmiştir.

#### **4.4 BİYOSİLİKA BONCUKLARIN 3-AMİNOPROPİLTRİETOKSİSİLAN (3-APTES) İLE İŞLEVSELLEŞTİRİLMESİ**

60 mL saf etanol ve silan bağlayıcı maddesi  $\gamma$ -APTES (yüzey hidroksil sayısına karşılık gelen miktarda) hacimce eşit oranlarda (v/v) karıştırılmıştır. 10 g biyosilika boncuklar hazırlanan bu çözeltisi içerisinde eklenerek, karışımın reaksiyona girmesi için 70°C'ye ayarlanan su banyosunda 2 saat süre ile inkübe edilmiştir. Süre sonunda, numune bir manyetik karıştırıcı kullanılarak 80°C'de 40 dk. süre ile karıştırılmıştır. Örnekler soğutulduktan sonra santrifüj işlemine tabi tutulmuştur (10.000 rpm ve 10 dk.). Santrifüj işlemi sonrası elde edilen pelletler, reaksiyona girmemiş  $\gamma$ -APTES'in uzaklaştırılması için saf etanol ile 2 veya 3x durulanmış, ardından 110°C'de 2 saat kurutulmuş ve sonra işlevsellendirilmiş silika elde edilmiştir.

#### **4.5 BAP VE NAA'NIN KİTİN, BİYOSİLİKA BONCUKLARA VE SPOROPOLLENİNE ENKAPSÜLAYONU**

Bu çalışmada, BAP ve NAA, Mundargi, Tan (178) tarafından bildirilen protokolde bazı değişiklikler yapılarak pasif yükleme tekniği ile kitin, biyosilika cam mikrokürelere ve sporopollenin içerisine enkapsüle edilmiştir. BAP ve NAA'nın sporopollenin, kitin ve silika mikro kürelere enkapsülasyonu için her bir taşıyıcıdan 90 mg alınarak yukarıda belirlenen konsantrasyonlarda (3:1) hazırlanan BAP ve NAA stok hormon (her bir malzeme için 50 mL) çözelti içerisinde 10 dk. vorteks işlemine tabi tutulmuş ve ardından 250 rpm'de 48 saat oda sıcaklığı koşullarında karıştırılmıştır. Enkapsüle edilmiş BAP ve NAA örnekleri, 110 µm gözenek çaplarına sahip Whatman filtre kağıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Örnekler 60°C'ye ayarlanan etüvde 2 saat süre ile kurutulmaya bırakılmıştır. Daha sonra kurutulan sporopollenin mikrokapsülleri, kitin ve biyosilika cam mikroküreler, +4°C'de diğer karakterizasyon deneyleri için muhafaza edilmiştir.

#### **4.6 ENKAPSÜLASYON VERİMLİLİĞİNİN BELİRLENMESİ**

BAP ve NAA'nın deneme de kullanılan üç farklı taşıyıcı malzemelere yüklenme verimliliğinin (enkapsülasyon verimi) değerlendirilmesi için Mundargi, Tan (178) tarafından bildirilen yöntem takip edilmiştir. Kalibrasyon eğrisini elde etmek için BAP ve NAA'nın farklı standart konsantrasyonları (5, 10, 15, 20 ve 25 µg/ml) hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin absorbansı, UV-vis spektrofotometre (Agilent- CN22804011) kullanılarak 285 nm'de ölçülmüş ve  $R^2$  değerleri hesaplanmıştır. Yükleme verimliliğinin hesaplanması çalışmalarında, 2 mg hormon yüklü mikro taşıyıcılar 3 mL PBS (pH 7.4) içerisinde süspanse edilmiştir. Süspansiyonlar 10 dakika süre ile vortekslenmiş ve ardından 6 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüjlenmiştir (Hettich Universal Santrifüj). Daha sonra süspansiyon halindeki mikro taşıyıcı numunelerinin her biri, SONICS vibra cell sonikator kullanılarak 15 dakika süreyle (60 genlik) sonike edilmiştir. Mikro taşıyıcı numunelerinin her birinin süpernatantları 125 µm gözenek boyutlu Whatman filtre kağıtları kullanılarak filtre edilmiştir. Çözeltideki BAP ve NAA miktarı (µg/mL), Agilent 8453 UV-vis spektrofotometre (285 nm'de) yardımı ile belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimliliği aşağıdaki denklemler kullanılarak hesaplanmıştır:

$$BBD \text{ miktarı (mg)} = \frac{(Absorbans \times seyreltme \text{ fatörü})}{Eğim \times 1000}$$

$$BBD \text{ yüklemesi (\%)} = \frac{\text{İlaç miktarı}}{\text{İlaç yüklü taşıyıcı kütlesi}} \times 100$$

$$BBD \text{ yükleme vermiliği (\%)} = \frac{\text{Hesaplama ilaç yükleme}}{\text{Teorik ilaç yükleme}} \times 100$$

BBD = Bitki büyüme düzenleyici madde

#### 4.7 BAP VE NAA YÜKLÜ TAŞIYICILARLA *in vitro* SALIM ÇALIŞMALAR

Pasif yükleme tekniği kullanılarak hazırlanan BAP ve NAA yüklü taşıyıcılardan, pH 7.4 ve 5.8'e ayarlanan (PBS) iki farklı simüle edilmiş *in vitro* bitki kültür ortamına salım çalışmaları, 120 saatlik inkübasyon süresi boyunca salımın takibi ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.1.). Bu amaçla kısaca, 5 mg hormon yüklü mikro taşıyıcılar, 5 ml PBS tamponu (5.8 ve 7.4) içerisinde süspanse edilmiş, daha sonra süspansiyonlar, diyaliz torbalarına (SERVAPOR®, MWCO 12000-14000) aktarılmıştır. Her bir numunenin eklendiği diyaliz torbaları, salım ortamı olarak hazırlanan 50 ml PBS tampon (pH 7.4 ve 5.8) içerisine aktarılmış ve 100 rpm ve 25°C'e ayarlanan çalkalamalı inkübatör (BELLCO, Shel Lab) kullanılarak 168 saat boyunca karıştırılmıştır. Mikro taşıyıcılardan simüle edilmiş ortama salınan BAP ve NAA miktarını hesaplamak için, farklı zaman aralıklarında (5 dk., 15 dk., 30 dk., 1. saat, 2. saat, 6. saat, 18. saat, 24. saat, 48. saat, 72. saat, 120. saat, 144. saat ve 168. saat) salım ortamından 2 ml numune alınmış ve aynı miktarda taze PBS tampon çözeltisi ortama ilave edilmiştir. Toplanan numunelerin, ortama salınan BAP ve NAA miktarına karşılık gelen absorbansı, 285 nm'de bir UV-VIS spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Ayrıca, her bir mikro taşıyıcıya yüklenen NAA ve BAP miktarlarına karşılık gelen saf NAA ve BAP (1.333 N NaOH içinde çözölmüş 3mg/mL hormon) konsantrasyonları PBS içerisine eklenmiş ve *in vitro* salım çalışmaları için kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekerrürlü olarak yürütölmüş ve veriler ortalama  $\pm$  SD (SD: standart sapma) olarak sunulmuştur. Aşağıda verilen denklemler NAA ve BAP hormonların kümülatif yüzde salımını hesaplamak için kullanılmıştır.

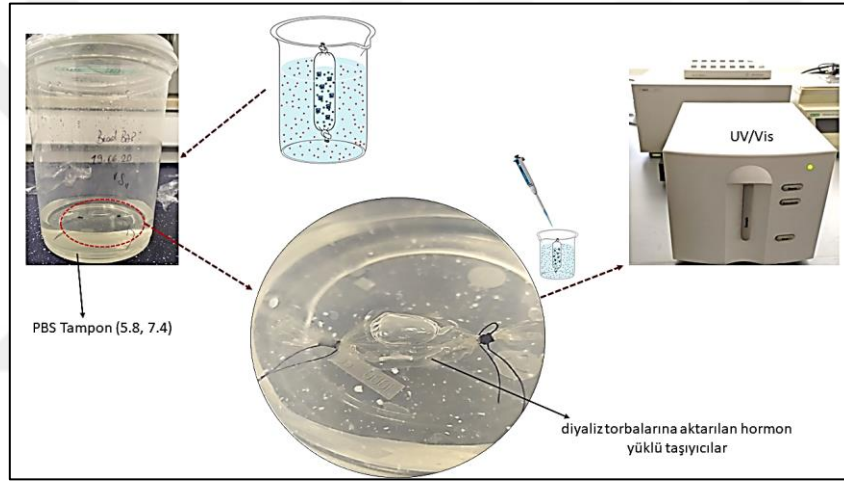
$$BBD \text{ konsantrasyonu } \left( \frac{mg}{ml} \right) = (Absorbans \times Eğim) \pm kesişim$$

$$BBD \text{ miktarı (mg)} = (Konsantrasyon \times \text{Çözünme küvet hacmi})$$

$$Kümülatif \text{ salım (\%)} = \left( \frac{\text{Örneğin alındığı hacim (ml)}}{Küvet hacmi (ml)} \times P(t-1) + P_t \right)$$

BBD = Bitki büyüme düzenleyici madde

P<sub>t</sub>, t zamanındaki serbest salınım oranını. P (t-1), t'den önceki serbest salınım oranını belirtmektedir.



Şekil 4.1. Tampon ortamlarda fitohormonların salım deney planı.

#### 4.8 SALIM KİNETİĞİ ÇALIŞMALARI

Literatür çalışmalarında, farklı ilaçların *in vitro* salımını rapor edilmiştir (145, 177). *In vitro* salım, ilaç salım çalışmalarının önemli bir unsurudur. Salınan ilaçların *in vitro* salınım davranışını daha iyi anlamak için farklı matematiksel modeller uygulanmıştır (145). Mevcut tez çalışmasında, BAP ve NAA'nın biyosilika boncuklar, sporopollenin ve kitinden salım kinetiklerini karşılaştırmak için sıfır derece (*First order*), birinci derece (*Second order*) ve Higuchi kinetik modelleri kullanılmıştır. Sıfır derece, birinci derece ve Higuchi kinetik modellerini hesaplamak için aşağıdaki denklemler kullanılmıştır.

Sıfır derece kinetik modeli aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır;

$$Q_t = Q_0 + K_0 t$$

$Q_t$ ,  $t$  zamanında salınan kümülatif ilaç miktarına karşılık gelmektedir;  $Q_0$ , ortamdaki başlangıç ilaç miktarına karşılık gelmektedir,  $k_0$ , sıfır dereceli salım sabitini temsil eder ve  $t$ , zamandır. PH 5.8 ve 7.4'te üç taşıyıcıdan BAP ve NAA'nın salım kinetiğini hesaplamak için, zamana (12 saat) karşı kümülatif ilaç salımı miktarı grafiği çizilmiştir.

Birinci derece kinetik modeli aşağıda verilen denkleme göre hesaplanmıştır (179);

$$\log Q_t = \log Q_0 + k_1 t / 2.303$$

$Q_t$ ,  $t$  zamanında salınan kümülatif ilaç miktarına karşılık gelir;  $Q_0$ , çözeltideki ilk ilaç miktarını temsil eder,  $k_1$ , birinci derece salım sabitine karşılık gelmektedir ve  $t$ , zamandır. Üç taşıyıcıdan BAP ve NAA'nın salım kinetiğini belirlemek amacıyla ilacın kümülatif yüzdesinin logaritması, zamana karşı çizilmiştir.  $k_1 / 2.303$  doğrunun eğimini vermektedir.

Higuchi modeli, zaman denkleminin basitleştirilmiş karekökü ile hesaplanmıştır. Model, Fickian difüzyon mekanizmasına dayanmaktadır (180).

$$Q_t = Q_0 + k_H t^{1/2}$$

Burada  $k_H$ , Higuchi sabiti ve  $t$ , zamandır. Salınan ilacın kümülatif miktarı, ilaç salım kinetiğini açıklamak için zamanın kareköküne göre çizilmiştir.

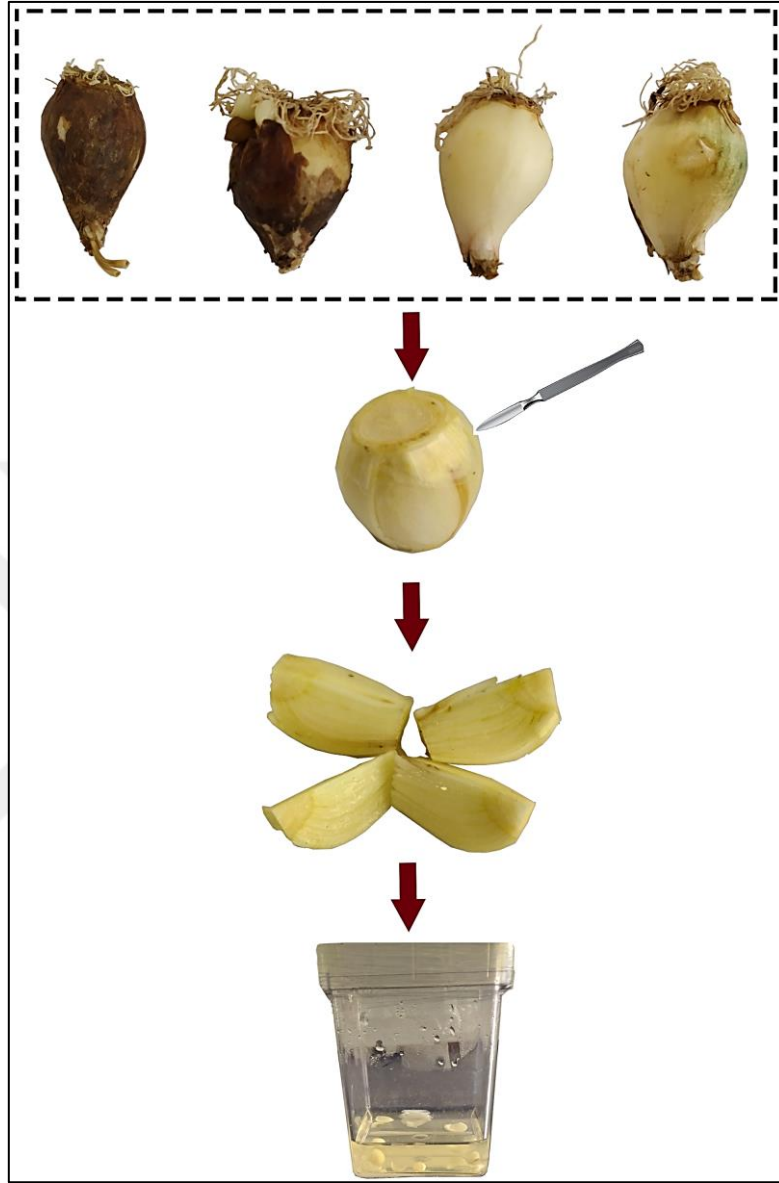
#### 4.9 *MUSCARI NEGLECTUM* GUSS. DOKU KÜLTÜRÜ OPTİMİZASYONU

*M. neglectum* için doku kültürü optimizasyon çalışmaları, % 5 ve % 10 olmak üzere iki farklı sodyum hipoklorit konsantrasyonunda gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sodyum hipoklorit muamelesi 10, 20 ve 30 dk. olmak üzere üç farklı inkübasyon süresi için gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler baz alınarak daha ileri doku kültürü çalışmaları için optimum konsantrasyon ve inkübasyon süresi seçilmiştir.

##### 4.9.1 ÖRNEK HAZIRLAMA

*M. neglectum* sıvı kültürünü optimize etmek için toplanan soğanların, kum ve diğer safsızlıklardan arındırılması için ticari deterjan ve steril su kullanılmıştır. Daha sonra

soğanların dış kabuğu, bisturi yardımı ile çıkarılmış ve soyulmuş soğanlar dört eşit parçaya bölünmüştür (Şekil 4.2.).



Şekil 4.2. *Muscari neglectum* Guss. soğanların hazırlanması.

#### 4.9.2 MS HAZIRLANMASI

*M. neglectum* soğanları hazırlandıktan sonra, doku kültürü çalışmaları için kullanılacak olan MS-0 medium, 30 mg/L sukrozun steril su içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Daha sonra çözeltiliye 4,13 mg/L oranında Murashige ve Skoog mediumu (MS) (Duchefa-M0222) ilave edilmiştir. Hazırlanan doku kültürü mediumu 350 rpm'de ve

oda sıcaklığında karıştırılmış, nihai pH'ı 5,8 olarak ayarlanmış ve 121°C'de 20 dakika boyunca otoklav yardımı ile steril edilmiştir.

#### **4.9.3 *MUSCARI NEGLECTUM* GUSS. SOĞANLARININ STERİLİZASYONU**

*M. neglectum* Guss. soğanlarının sterilizasyonu bir Laminer flow içerisinde gerçekleştirilmiştir. Deneye başlamadan önce, kabin içerisi %70 etanol ve ardından 30 dakikalık UV ile sterilize edilmiştir. Kesilen soğanlar, 1 ml Tween 20 içeren %5 ve %10 sodyum hipoklorit ile muamele edilmiştir. Bu muamele 10, 20 ve 30 dakika boyunca ortam koşullarında 120 rpm'e ayarlanan manyetik karıştırıcı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Belirtilen sürelerin sonunda soğanlar steril su kullanılarak üç kez yıkanmıştır. *M. neglectum* soğanlarının sterilizasyonunun test edilmesi için, steril MS ortamı içeren magenta kutuları kullanılmıştır. Sterilizasyon için gerekli sayıda magenta kutular otoklavlanmıştır (121°C'de 20 dk. boyunca). Her magenta kutuya yaklaşık olarak 30 mL hazırlanan MS-0 ortamı eklenmiştir. Daha sonra 250°C'de ısı ile sterilize edilmiş penset yardımıyla 3-4 adet soğan parçası, MS içeren magentalara yerleştirilmiştir. Daha sonra dokuların konuşturıldığı magenta kutulara, mikroorganizma ve diğer safsızlıkların steril kültür ortamına girmesini önlemek için streç film ile sarılmıştır. Magenta kutular, 100 rpm ve 25°C'ye ayarlanan thermoshaker içerisinde 7 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda doku kültürü ortamında herhangi bir kontaminantın olup olmadığı incelenmiştir.

#### **4.10 DOKU KÜLTÜRÜ ORTAMLARDA YAVAŞ SALIM**

##### **4.10.1 SIVI MS ORTAMLARINDA DOKU KÜLTÜRÜ**

*M. neglectum* soğanları hazırlandıktan sonra, doku kültürü çalışmaları için kullanılacak olan MS-0 medium, 30 mg/L sükrozun steril su içinde çözülmesi ile hazırlanmıştır. Daha sonra çözeltiye 4,13 mg/L oranında Murashige ve Skoog mediumu (MS) ilave edilmiştir. Hazırlanan doku kültürü ortamı 350 rpm'de ve oda sıcaklığında karıştırılmış, nihai ortam pH'ı 5,8 olarak ayarlanmış ve 121°C'de 20 dk. boyunca otoklavda steril edilmiştir.

Doku kültürü için gerekli sayıda magenta kutular 121°C'de 20 dakika otoklavlanmıştır. Her magenta kutuya hazırlanan MS ortamından yaklaşık olarak 30 mL eklenmiştir. Daha sonra 250°C'de ısı ile sterilize edilmiş penset yardımıyla 3-4 adet soğan parçası, MS-0 içeren magenta kutulara ekilmiştir. Daha sonra dokuları içeren magenta kutular, mikroorganizma

ve diğer safsızlıkların steril kültür ortamına girmesini önlemek için streç film ile sarılmıştır. Magenta kutuları, 100 rpm ve 25°C'ye ayarlanan termo çalkalayıcı içerisinde 4 gün boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda doku kültürü ortamında herhangi bir kontaminasyonun olup olmadığı kontrol edilmiştir.

#### 4.10.2 KÜLTÜR ORTAMLARDA SALIM DENEYLERİ

Belirlenen süre (4 gün) sonunda kontamine olmayan magenta kutuları salım deneyi için seçilmiştir. Pasif yükleme tekniği kullanılarak hazırlanan BAP ve NAA yüklü taşıyıcılardan, bitki kültür ortamına salım çalışmaları, 168 saat inkübasyon süresi boyunca salımın takibi ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kısa, 2 mg fitohormon (NAA, BAP) içeren mikro taşıyıcılar (silika boncuk, sporopollenin ve kitin), 5 ml PBS tamponu (5.8) içerisinde süspanse edilmiş, daha sonra süspansiyonlar, diyaliz torbalarına (SERVAPOR®, MWCO 12000-14000) aktarılmıştır. Her bir örneğin eklendiği diyaliz torbaları, bitki dokularını içeren sıvı MS ortamlarının içerisine aktararak 100 rpm ve 25°C'e ayarlanan çalkalamalı inkübatör yardımıyla 168 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Mikro taşıyıcılardan kültür ortamına salınan BAP ve NAA miktarını hesaplamak için, farklı zaman aralıklarında (5 dk., 15 dk., 30 dk., 1. saat, 2. saat, 6. saat, 18. saat, 24. saat, 48. saat, 72. saat, 120. saat, 144. saat ve 168. saat) salım ortamından 2 ml numune alınmış ve aynı miktarda taze PBS tampon çözeltisi ortama ilave edilmiştir.

Toplanan örneklerin, ortama salınan BAP ve NAA miktarına karşılık gelen absorbansı, 285 nm'de bir UV-VIS spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Ayrıca, her bir mikro taşıyıcıya yüklenen NAA ve BAP miktarlarına karşılık gelen saf NAA ve BAP (1.333 N NaOH içinde çözülmüş 3mg/ml) konsantrasyonları PBS içerisine eklenmiş ve kültür salım çalışmaları için kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Tüm deneyler üç tekerrürlü olarak yürütülmüş ve veriler ortalama  $\pm$  SD (SD: standart sapma) olarak sunulmuştur. Aşağıda verilen denklemler NAA ve BAP hormonların kümülatif yüzde salımını hesaplamak için kullanılmıştır.

$$BBD \text{ konsantrasyonu (mg/ml)} = (Absorbans \times Eğim) \pm kesişim$$

$$BBD \text{ miktarı (mg)} = (Konsantrasyon \times Çözünme küvet hacmi)$$

$$\text{Kümülatif salınım (\%)} = \left( \frac{\text{Örneğin alındığı hacimml (ml)}}{\text{Küvet hacmi (ml)}} \right) \times P(t-1) + P_t$$

BBD = Bitki büyüme düzenleyici madde

P<sub>t</sub>, t zamanındaki serbest salınım oranını. P (t-1), t'den önceki serbest salınım oranını belirtmektedir.

#### **4.11 BİYOSİLİKA MİKRO KÜRELERİN, SPOROPOLLENİN VE KİTİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU**

##### **4.11.1 FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ/ ZAYIFLATILMIŞ TOPLAM YANSIMA KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ (FT-IR/ATR)**

Tüm örnekler için FT-IR spektrumları, iç yansıma elmas kristal lens içeren ve Zayıflatılmış Toplam Yansıtma (ATR) teçhizatı ile donatılmış bir Perkin Elmer markalı FT-IR spektrometresi kullanılarak kaydedilmiştir. Spektral aralığı, 8 cm<sup>-1</sup> çözünürlük ile 600 ile 4000 cm<sup>-1</sup> arasında sabitlenmiştir.

##### **4.11.2 XRD (X-IŞINI KIRINIM ANALİZİ)**

Taşıyıcıların kristal yapıları, Cu-K $\alpha$  radyasyonu kullanılarak bir Bruker AXS D8 Advance difraktometre ile donatılmış X-ışını kırınım cihazı ile analiz edilmiştir. Analiz 2 $\theta$ 'da 40 kV ve 30 mA'da 10-70° tarama açısı aralığında gerçekleştirilmiştir. Step boyutu 0,04 ve step başına süre 353 sn. olarak ayarlanmıştır. Analiz, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

##### **4.11.3 TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) ANALİZİ**

Taşıyıcıların yüzey morfolojisi, ZEISS LS-10 Life Science Taramalı Elektron Mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir. Fotoğraf çekilmeden önce altın kaplama yapılmış ve görüntüler 500X-50.000X büyütme arasında çekilmiştir.

##### **4.11.4 TERMOGRAVİMETRİK ANALİZİ (TGA)**

Taşıyıcıların ısı kararlılıklarını ölçmek ve fitohomonların kapsüllenmesini doğrulamak için termogravimetrik analiz yapılmıştır. Analiz, 30-900°C (Exstar-TG/DTA 7300) aralığında 10°C/dk'lık bir ısıtma hızında nitrojen atmosferi altında gerçekleştirilmiştir.

#### 4.11.5 ENERJİ DAĞILIM X-IŞINI SPEKTROSKOPİSİ (EDX)

Biyosilika mikrokürelerin  $\gamma$ -APTES ile işlevselleştirilmesini ve üç taşıyıcı tarafından bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kapsüllenmesini doğrulamak amacıyla Enerji Dağılım Spektroskopisi analizi gerçekleştirilmiştir. Her numune için enerji dağılım spektrumu 20 kV ve 5.000X büyütmede (EDAX-Octane Pro) elde edilmiştir.

#### 4.11.6 DİFERANSİYEL TARAMALI KALORİMETRE (DSC)

Numunelerin termal özellikleri Mettler Toledo DSC822e (Schwerzenbach, İsviçre) aracılığıyla araştırılmıştır. Her test için 50 mg numune, N<sub>2</sub> atmosferi altında hermetik alüminyum tavada 25 ila 900°C'de ısıtılmıştır. Isıtma 5°C /dk. da yapılmıştır.

#### 4.11.7 NİNHİDRİN DENEYİ

Fonksiyonelleştirilmiş biyosilika mikro küreler üzerinde yüzey amin gruplarının varlığını doğrulamak için ninhidrin deneyi yapılmıştır. Ninhidrin reaktifi, etanol içinde %5 (ağırlık / hacim) bir çözelti olarak hazırlanmıştır. PBS (pH 7.4, 10 mM) içinde bir PBS boş veya 20 mg/ml nanopartikül çözeltisinin 1 ml'lik bir numunesi, 1 ml ninhidrin reaktifi ile karıştırılmıştır. Çözelti, 78 °C'lik bir su banyosunda 20 dk. süreyle inkübe edilmiş ve daha sonra 10 dk. boyunca soğumaya bırakılmıştır. Süre sonunda numunelerin görsel olarak renk değişikliği açısından değerlendirilmiş ve renk değişimi (koyu mor) pozitif bir sonuç olarak kabul edilmiştir (181).

### 4.12 FOTOSENTETİK PİGMENTLERİN TAYİNİ

#### 4.12.1 KLOROFİL

*M. neglectrum* dokuları (100 mg), %80 aseton (Merck) ile homojenize edilmiş ve ekstraktlar, 1 ml aseton ile süzölmüştür. Numuneler daha sonra 10 dk. süre ile 10000 rpm'de santrifüjlenmiştir. Süpernatantlar, 1.5 ml efendorp tüplerine aktarılmıştır ve Beckman sürgülü DU 730 Life Sciences UV / VIS Spektrofotometresi kullanılarak 663 nm ve 645 nm dalga boyunda okunmuştur. Klorofil içeriği aşağıda verilen formül kullanılarak hesaplanmıştır (182). Her okumadan önce, cihaz %80 aseton ile kör okuma kullanılarak sıfırlanmıştır.

$$\begin{aligned} \text{Klorofil } a \text{ (mg/g)} &= (12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645}) \times H / A \times 10000 \\ \text{Klorofil } b \text{ (mg/g)} &= (22.91 \times A_{645}) - (4.68 \times A_{663}) \times H / A \times 10000 \end{aligned}$$

$$\text{Toplam Klorofil} = \text{Klorofil } a + \text{Klorofil } b$$

#### 4.12.2 KAROTENOİD MİKTAR TAYİNİ

Karotenoid konsantrasyonu, 450 nm dalga boyunda (Beckman Coulter DU 730 Life Sciences UV/VIS Spektrofotometre) klorofil miktarının belirlenmesinde kullanılan ekstrakt okunmuş ve Jaspars formülü izlenerek hesaplanmıştır (182).

$$\text{Karotenoid (mg/g)} = (4.07 \times A_{450} - (0.0435 \times \text{klorofil } a + 0.367 \times \text{Klorofil } b))$$

#### 4.12.3 BETA-KAROTEN MİKTAR TAYİNİ

$\beta$ -karoten miktar tayini için 100 mg numune 1 ml aseton-heksan (92: 3, v : v) karışımı içinde 1 dk. homojenize edilip süzölmüştür. Filtratların absorbansı 453, 505 ve 663 nm'de kaydedilmiştir (182).  $\beta$ -karoten içeriğinin hesaplanması için aşağıdaki denklem kullanılmıştır.

$$\beta - \text{karoten (mg/g)}/100 \text{ mg} = 0.0458 \times A_{663} + 0.372 \times A_{505} - 0.0806 \times A_{453}$$

#### 4.12.4 LİKOPEN MİKTAR TAYİNİ

Likopen miktar tayini için 100 mg numune 1 ml aseton-heksan (92:3) (Sigma Aidrich ABD) karışımı içinde 1 dk. süre ile homojenize edilmiş ve süzölmüştür. Filtrelenmiş ekstraktlar 453, 505 ve 663 nm'deki absorbans değerlerinde ölçölmüştür. Likopen miktarını hesaplamak için aşağıdaki formöl kullanılmıştır (182).

$$\text{Likopen (mg/g)} = 0.216 \times A_{663} - 0.304 \times A_{505} + 0.452 \times A_{453}$$

#### 4.13 TOPLAM FENOLİK BİLEŞİKLERİN TAYİNİ

Toplam fenolik konsantrasyonun belirlenmesi için daha önce birkaç yazar tarafından bildirilen standart bir metodoloji takip edilmiştir (18). Yeni kesilmiş *M. neglectum* eksplantları (100 mg) su ile homojenize edilmiştir. Daha sonra örnekler 1,5 ml mikro

santrifüj tüpüne (Fisher Scientific, Canada) aktarılmıştır. Doku çözücü oranı 1:10 olacak şekilde her tüpe bir ekstraksiyon çözücüsü (1: 1: 1 su: metanol: aseton) aliquotu ilave edilmiştir. Tüpler daha sonra vortekslenmiş ve su banyosuna yerleştirilerek üç saat süreyle sonikasyona tabi tutulmuştur. Süre sonunda tüpler, 22,2 g'de 10 dk. santrifüjlenmiştir. Her numuneden alınan süpernatant, yeni bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır. 100 µl numune 900 µL distile su ile karıştırılmıştır. Her numuneye 1 ml Folin ve Ciocalteu fenol reaktifi eklenmiş ve örnekler 5 dk. inkübe edilmiştir. Daha sonra her numuneye 2 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (0,25 M) ilave edilmiş ve karanlık ortamda 90 dk. inkübe edilmiştir. 765 nm'de absorbans ölçülmüş, tüm numuneler kör kullanılarak standardize edilmiştir.

#### **4.14 ENZİM AKTİVİTESİ TAYİNİ**

##### **4.14.1 ENZİM AKTİVİTESİ İÇİN *M. NEGLECTUM* SOĞANININ HOMOJENİZASYONU**

*M. neglectum* Guss. soğan dokularındaki enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla -80°C'de muhafaza edilen numuneler soğuk zincir bozulmadan tartılıp sıvı azot yardımı ile parçalanarak toz haline getirilmiştir. Ardından her bir numune ağırlığının 3 katı kadar homojenat tamponu (pH:7,2 50 mM Potasyum-fosfat) eklenerek homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 4°C ve 15000 rpm'de 1 saat süreyle santrifüj edilmiştir. Süre sonunda üstte kalan süpernatant enzim çözeltisi olarak kullanılmıştır (183).

##### **4.14.2 *M. NEGLECTUM* SOĞANININ PROTEİN TAYİNİ (BRADFORD YÖNTEMİ)**

*M. neglectum* soğan dokularının protein tayininde Bradford yöntemi kullanılmıştır (183). Bradford yöntemi, Coomassie Brilliant (parlak mavisi) Blue G-250 boyasının farklı konsantrasyondaki protein çözeltilerindeki asidik ve bazik gruplar ile etkileşerek farklı şiddette mavi renk oluşturmaya esasına dayanmaktadır. Standart olarak ise, farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA (Bovine Serum Albumin) kullanılmıştır. Numunelerin protein tayini için cam tüplere 100 µL homojenat eklenmiş ve kör olarak enzim yerine saf su kullanılarak son hacim 5 mL olacak şekilde Coomassie Brilliant Blue G-250 boyası eklenilerek iyice vortekslenmiştir (184). Her bir numune 3 tekerrürlü olarak çalışılmış ve ardından 10 dk. süre ile inkübasyona bırakılmıştır. Örnekler 3 ml hacimde kuvars küvetlere

alınarak UV-Vis Spektrofotometrede (Thermo Scientific) 595 nm dalga boyunda okumalar alınmış ve absorbans değerleri kaydedilmiştir. BSA protein konsantrasyonları için elde edilen ortalama absorbans değerleri baz alınarak bir standart eğri çizilmiş ve  $y = ax \pm b$  denklemi oluşturulmuştur. *M. neglectum* numunelerinin farklı konsantrasyonları için kaydedilen absorbans değerleri denklemde yerine konularak protein tayini gerçekleştirilmiştir.

#### 4.14.3 *M. NEGLECTUM* SOĞANININ SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİM AKTİVİTESİ

*M. neglectum* soğan dokularının SOD enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Sun, Oberley (185) tarafından belirtilen yöntem bazı küçük modifikasyonlar yapılarak takip edilmiştir. 0,3 mmol/L ksantin stok çözeltisi 52 ml (400 mmol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile hazırlanmıştır), 0,6 mmol/L EDTA 20 mL, 150 µmol/L NBT 20 ml, 1g/L BSA 6 ml alınarak reaktif karışım hazırlanmış ve bu reaktif karışımdan 245 µL alınarak üzerine 10 µL homojenat ilave edilmiş ve ardından 40 µL distile su ilave edilmiştir. Daha sonra 2 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> soğuk çözelti ile seyreltilen 0,167 EU/ml olan Ksantin oksidaz enzim çözeltisinden 5 µL eklenmiştir. Örnekler 25°C'ye ayarlanan su banyosunda 20 dk. boyunca inkübe edilmiş ve üzerine 100 µL 0,8 mmol/L CuCl<sub>2</sub> ilave edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır. Kör olarak reaktif ve kontrol olarak homojenatsız karışım kullanılmıştır. Reaksiyonun sonlandırılmasının ardından 560 nm'de Multiskan GO (Thermo Scientific) cihazında absorbans değerleri okunmuştur.

$$\% \text{ İnhibisyon} = ((\text{Kontrol Abs} - \text{Numunenin Abs})) / (\text{Kontrol Abs}) \times 100$$

$$\text{EU/mL} = (\% \text{ İnhibisyon}) / (50 \times (0,01))$$

0, 01: Kullanılan Homojenat miktarı (mL)

50,0: NBT'nin %50'sini indirgeyen aktivite

#### 4.14.4 *M. NEGLECTUM* SOĞANININ PEROKSİDAZ (POX) ENZİMİ AKTİVİTESİ

*M. neglectum* soğan dokularının POX enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Dessler, Himmelhoch (186) tarafından tanımlanmış olan metot takip edilmiştir. 50 mM Potasyum

fosfat tamponu, 100 mM Guaiacol ve 0,0017% (w/w) Hidrojen Peroksit, pH 7.0 son hacim 100 mL olacak şekilde saf su ile hazırlanmıştır. Son hacim 3,035 mL olacak şekilde kuvars küvetlere tampon ve 35 µL homojenat eklenmiştir. Kör olarak enzimsiz karışım kullanılmıştır. Örneklerin, UV-Vis Spektrofotometrede (Thermo Scientific) 470 nm dalga boyunda 1 dk. daki absorbans artışı kaydedilerek absorbans farkı belirlenmiştir. Örneklerin, enzim aktivitesi aşağıda belirtilen formüller takip edilerek hesaplanmıştır.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot c$$

$$c = A/(\epsilon \cdot b)$$

A: 1 dk. sonunda okunan absorbans

B: Işığın geçtiği mesafe

C: Konsantrasyon (µmol/mL)

E: Ekstinksiyon katsayısı (5000 M<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>)

#### 4.14.5 *M. NEGLECTUM* SOĞANININ KATALAZ (CAT) ENZİM AKTİVİTESİ

*M. neglectum* soğan dokularının CAT enzim aktivitesi, Aebi (187) tarafından belirtilen metodoloji üzerinde bazı küçük modifikasyonlar yapılarak belirlenmiştir. 25 mM Potasyum fosfattan (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH:7.0) 1400 µL ve 15 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'den 1500 µL kullanılarak bir karışım hazırlanmış ve üzerine pipetaj yapılan soğan doku homojenatı 100 µL olacak şekilde eklenmiştir. Numuneler ve kör (enzimsiz karışım) UV-Vis Spektrofotometrede (Thermo Scientific) 240 nm dalga boyundaki absorbans düşüşü kaydedilerek 1 dk. sonundaki absorbans farkı belirlenmiştir. Enzim aktivitesi aşağıdaki formül kullanılarak EU/mL cinsinden hesaplanmıştır.

$$EU/mL: (\Delta OD / (0,0396)) * (V_t / V_e)$$

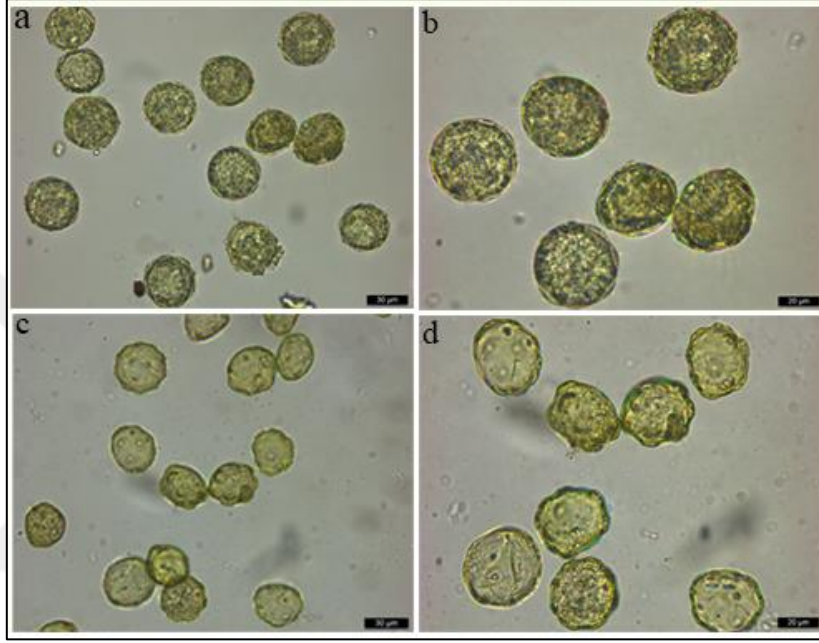
V<sub>t</sub>: Toplam hacim

V<sub>e</sub>: Enzim (homojenat) hacmi

## 5 ARAŞTIRMA BULGULARI

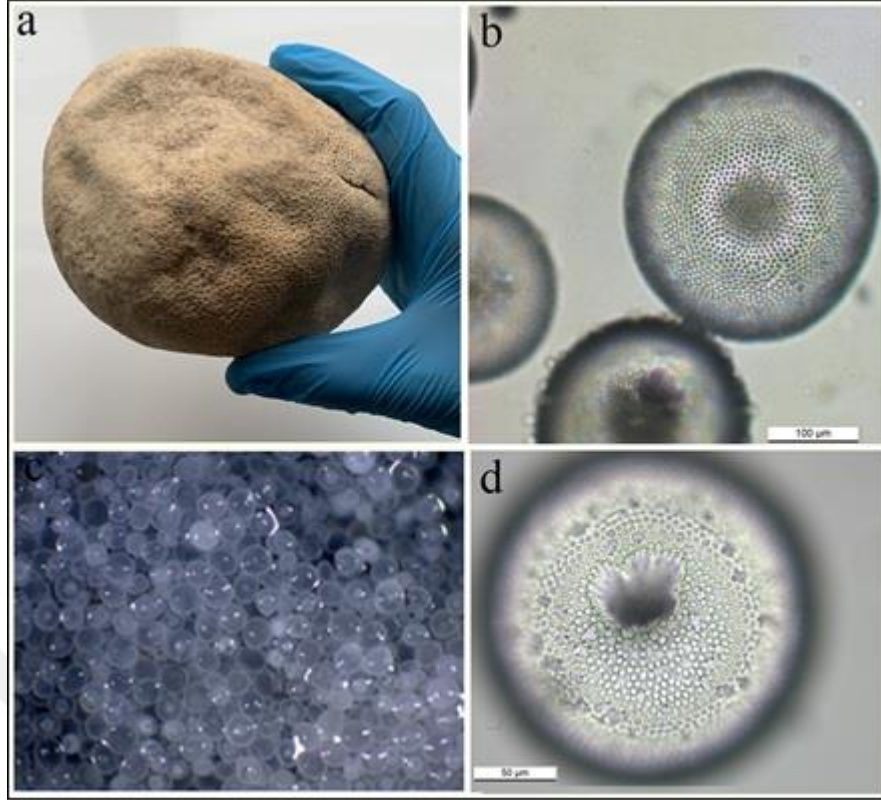
### 5.1 IŞIK MİKROSKOP ANALİZİ

Sporopollenin, karides kitin ve biyosilika boncuklar ışık mikroskobu ile ayrı ayrı analiz edilmiştir (Şekil 5.1.). Işık mikroskobu ile sporopollenin oluşumu da doğrulanmıştır. Hem polen hem de sporopollenin mikroskop altında analiz edilmiş ve iç genetik materyalin polenlerden başarıyla uzaklaştırıldığı tespit edilmiştir.



Şekil 5.1. Işık mikroskop altında a, b) *J. regia* polenleri ve c, d) sporopollenlerin görüntüleri

Işık mikroskobu görüntüleri, asit ve baz muamelelerinden sonra sporopollenin iç boşluklarının açık olduğunu ortaya konmuştur. İzole polenlerin ortalama çapı yaklaşık 200 µm olarak belirlenmiştir.



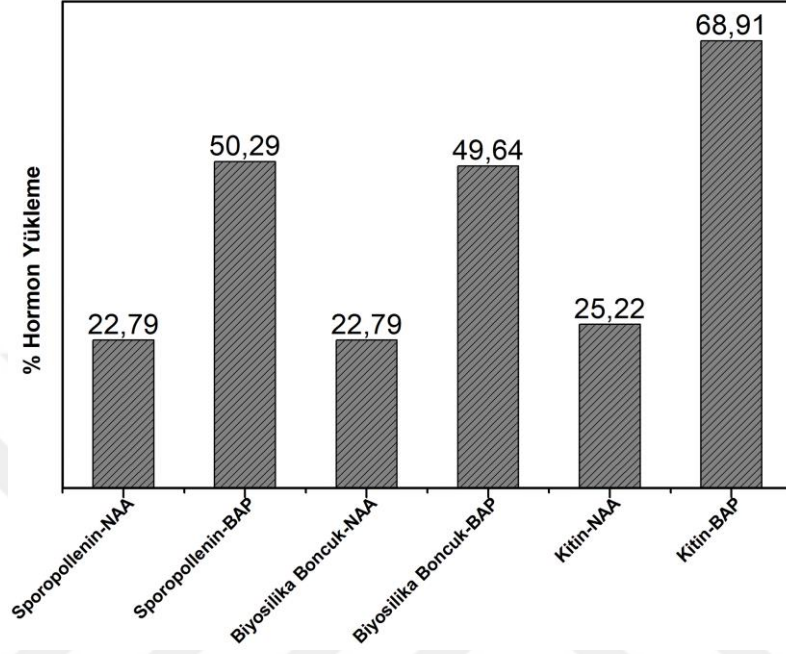
Şekil 5.2. a) *Geodia macandrewii*. Sünger, b, d) *Geodia macandrewii* süngerin’den izole edilmiş silika cam mikrokürelerin ışık mikroskop görüntüleri c) *Geodia macandrewii* süngerin’den izole edilmiş silika cam mikrokürelerin dijital görüntü.

Biyosilika boncukları ışık mikroskobu görüntüleri üst katmanın başarılı bir şekilde uzaklaştırıldığını ve böylece boncukların gözenekli katmanının açığa çıktığı belirlenmiştir (Şekil 5.2.). Ayrıca, bu sonuçlar ileride bahse edilecek SEM, FTIR ve EDX analiz sonuçlar tarafından da desteklenmiştir.

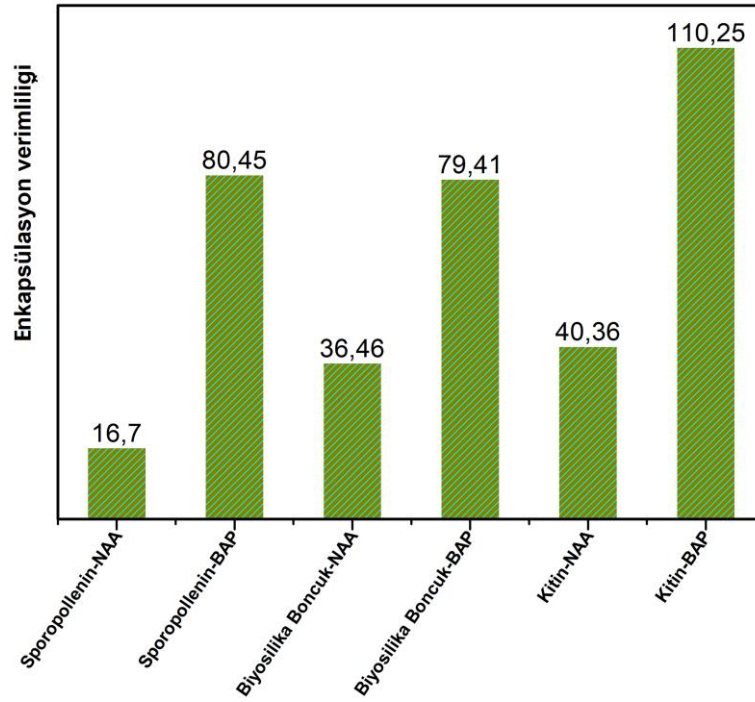
## 5.2 YÜKLEME VERİMLİLİĞİ

BAP ve NAA'nın yükleme etkinliği metodolojide verilen denklem kullanılarak hesaplanmıştır. Sonuçlara göre BAP için, üç taşıyıcı da NAA'ya kıyasla daha yüksek bir yükleme verimi kaydedilmiştir (Şekil 5.3.). Polen-NAA'nın enkapsülasyon verimi %16,70, toplam yüklü hormon ise %22,79 olarak kaydedilmiştir. Aynı şekilde sporopollenin-BAP için bu değerler %50,29 ve %80,29 olarak kaydedilmiştir. Biyosilika boncuk-NAA için, kapsülleme ve toplam hormon yüklenme verimliliği sırasıyla %22,79 ve %36,46 olarak kaydedilmiştir (Şekil 5.5.). Biyosilika boncuk-BAP için, bu değerler %49,64 ve %79,41 olarak belirlenmiş olup, biyosilika boncuk-NAA'nınkinden nispeten daha yüksek bir verim kaydedilmiştir. Kitin için hem BAP hem de NAA değerleri beklendiği gibi daha yüksek

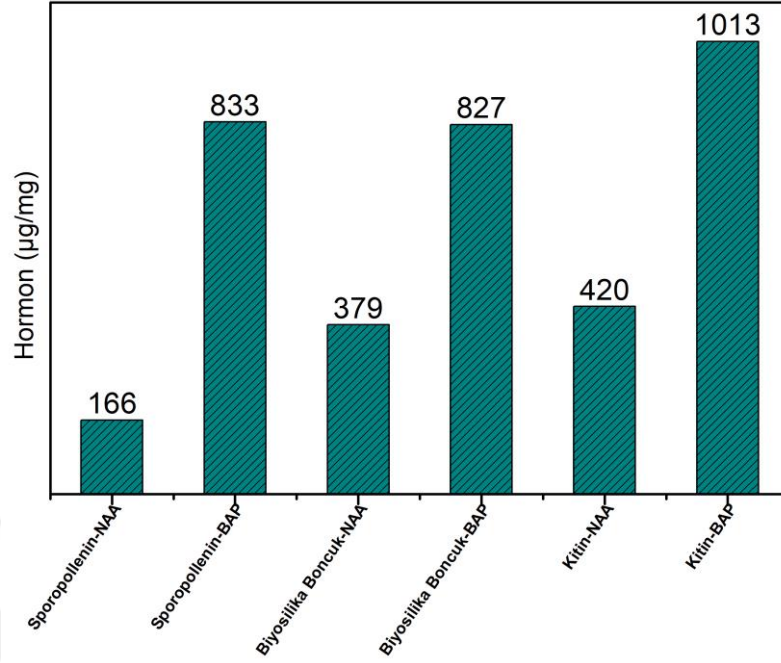
oranlarda kaydedilmiştir. Kitin-NAA durumunda, kapsülleme verimliliği ve hormon yüklemesi sırasıyla %25,22 ve %40,36 olarak belirlenmiştir. Kitin-BAP için ise bu değerler %68,91 ve %110,25 olarak kaydedilmiştir (Şekil 5.4.).



Şekil 5.3. Biyosilika, Kitin ve Sporopolleninin hormon yükleme oranları (%).



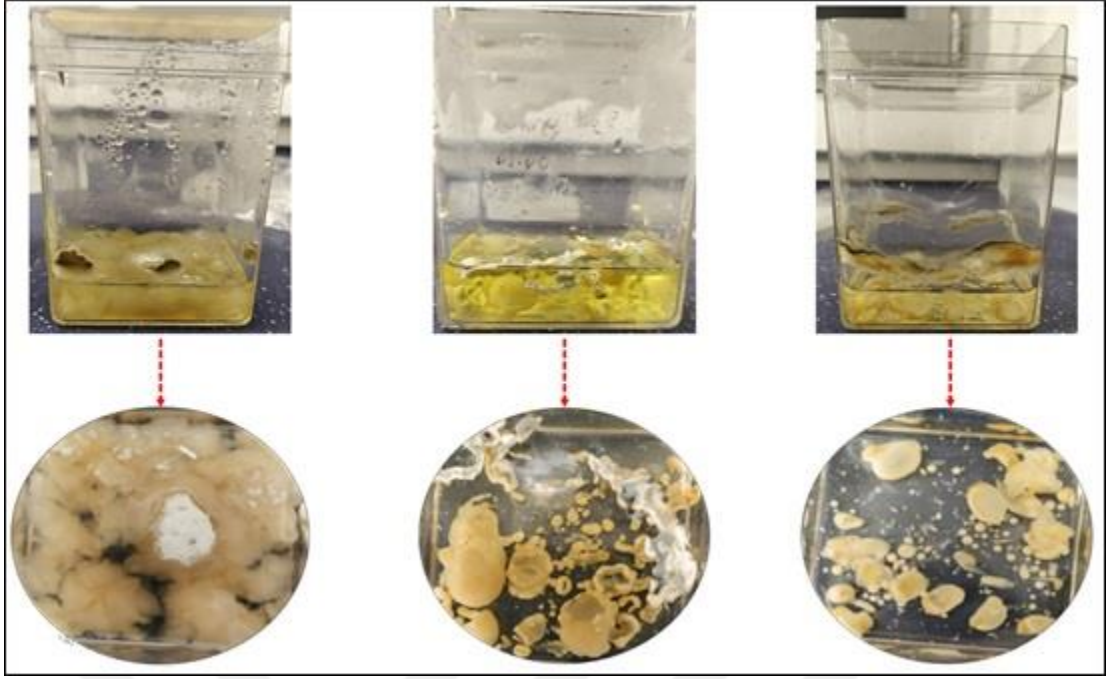
Şekil 5.4. Biyosilika bonucklar, Kitin ve Sporopolleninin enkapsülasyon verimliliği.



Şekil 5.5. Kitin, sporopollenin ve biyosilika'nın toplam hormon yükleme oranları ( $\mu\text{g mg}^{-1}$ ).

### 5.3 DOKU KÜLTÜRÜ OPTİMİZASYONU

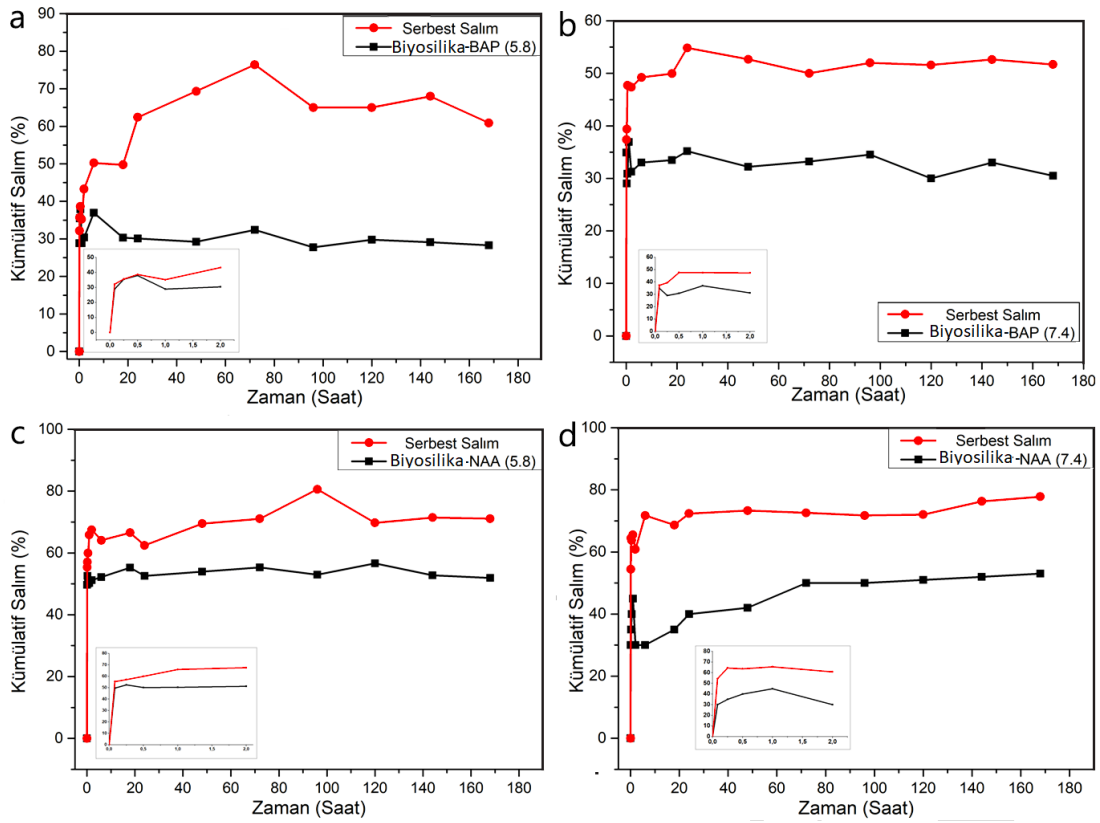
Yapılan denemeler sonucunda en iyi sonuçlar %5 sodyum hipoklorit ile 30 dk. süre ile muamele edilen *M. neglectum* soğan örnekleri için kaydedilmiştir. Diğer iki parametre için soğan kültürü ortamlarında kontaminasyon kaydedilmiştir (Şekil 5.6.).



Şekil 5.6. Sterilizasyon çalışmalarında kaydedilen kontaminasyon görüntüleri.

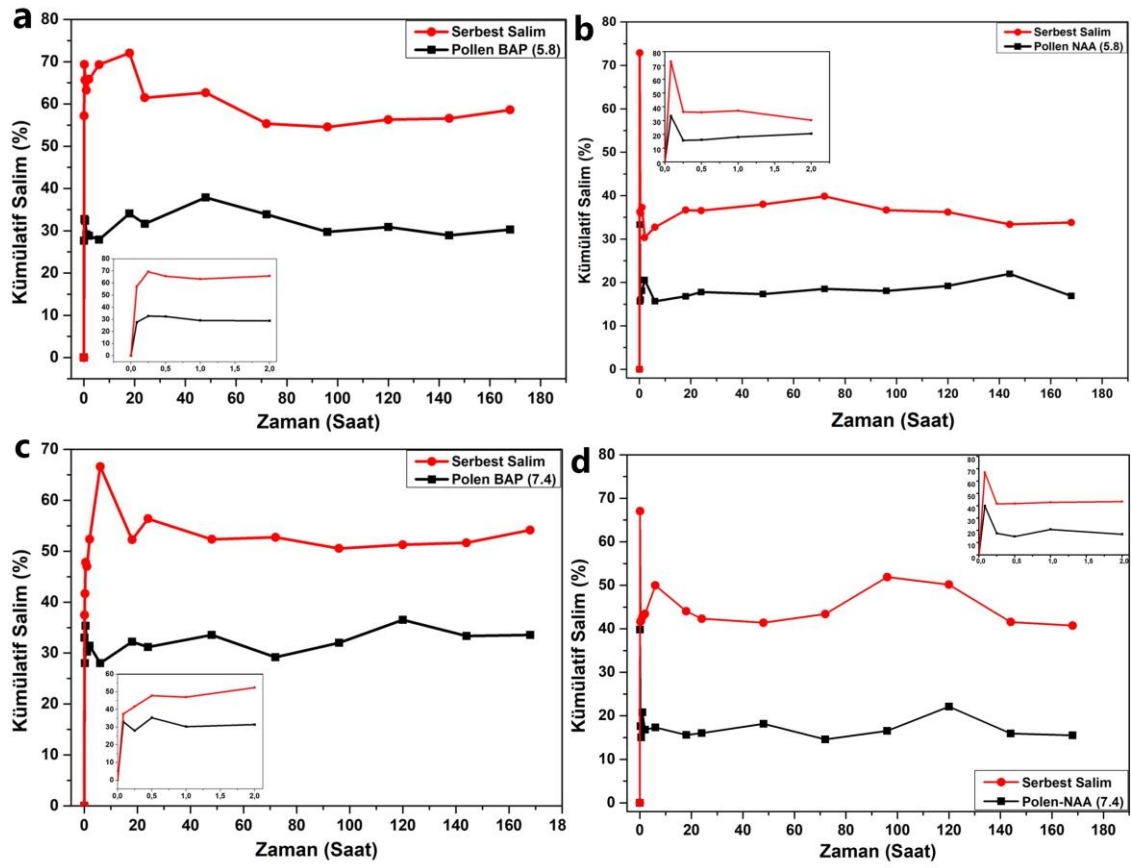
#### 5.4 BAP VE NAA YÜKLÜ TAŞIYICILAR İLE GERÇEKLEŞTİRİLEN *in vitro* SALIM ÇALIŞMALARI

NAA ve BAP'ın *in vitro* salım çalışması, 5.8 ve 7.4 olmak üzere iki farklı pH koşulunda gerçekleştirilmiştir. Bu, tez çalışmasında kullanılan üç polimerik taşıyıcının yavaş salınım yeteneğini doğrulamak için bir ön kontrol çalışmasıdır. *In vitro* bitki kültürü sırasında gerekli pH 5,6-5,8 civarındadır (Şekil 5.7.). Mevcut çalışmada kullanılan pH koşulları da *in vitro* kültür koşullarına göre seçilmiştir. Ayrıca, mevcut çalışmada, taşıyıcıların yavaş salım kapasitelerindeki pH'ya bağlı değişiklikleri doğrulamak için nötr pH 7,4' de kullanılmıştır. Sonuçlar Çizelge 5.1'te verilmiştir.



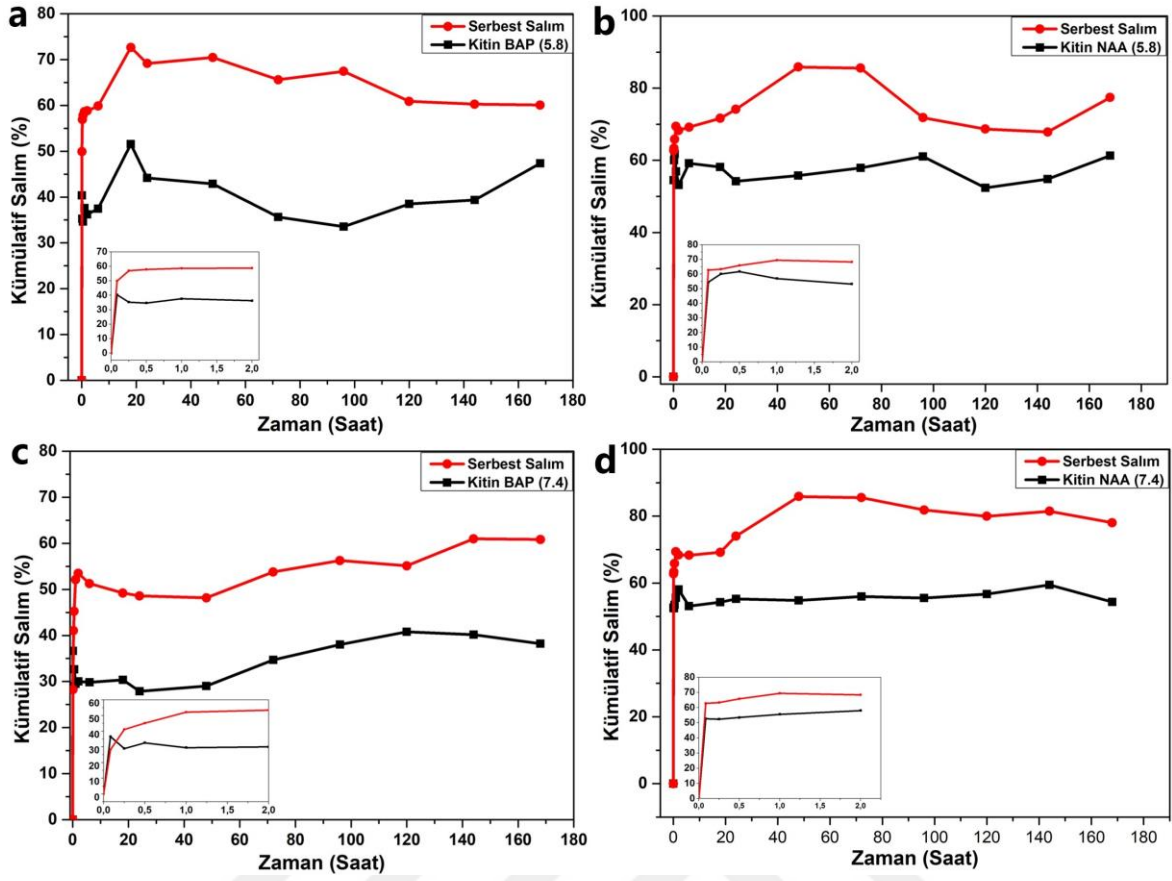
Şekil 5.7. BAP ve NAA yüklü biyosilika boncukları ile gerçekleştirilen farklı tampon ortamlarında (pH 5,8) salım çalışmaları.

Sonuçlar, kitin, biyosilika ve sporopolleninden tampon çözeltilerinde kapsüllenmiş bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kontrollü salımını gerçekleştirdiğini ortaya çıkarmıştır (Şekil 5.8.). Kitinden bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin salınımı, sporopollenin ve biyosilikadan nispeten daha hızlı gerçekleşmiştir. Bu görüngü, kullanılan kitinin yapısal morfolojisine bağlantılı olduğu düşünülmektedir. Burada karideslerden izole edilen kitin, derin gözenekleri olmayan sıkı bir şekilde paketlenmiş lifli bir yapıya sahiptir. Bu tip yüzey morfolojisi, bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin yalnızca yüzeyde adsorpsiyonuna yol açmıştır. Ayrıca, biyosilika ve sporopollenin mükemmel enkapsülasyon yüzdesi ve daha kontrollü salım patenleri sergilemiştir.



Şekil 5.8. BAP ve NAA yüklü sporopollenin ile gerçekleştirilen farklı tampon ortamlarında (pH 7,4) salım çalışmaları.

Biyosilikanın yüzeyindeki mükemmel gözenekleri, biyosilika yapısının merkezi boşluğu içinde BAP ve NAA'nın kapsüllenmesine teşvik etmiştir. Ek olarak, 3-APTES ile yüzeyin işlevselleştirilmesi, biyosilikanın kapsülleme verimliliğini artırarak daha fazla BAP ve NAA molekülünün bağlanmasına yardımcı olmuştur. Aynı şekilde, sporopollenin yüzeyindeki gözenekler, mikro kafeslerin boşluğu içinde BAP ve NAA'nın kapsüllenmesini kolaylaştırmıştır (Şekil. 5.9). Üç taşıyıcının tümü için kümülatif salım değeri, serbestçe uygulanan BAP ve NAA'dan daha düşük kaydedilmiştir. Ek olarak, ilk iki saatte, tüm taşıyıcılar nispeten daha yüksek bir BAP ve NAA salımı sergilenmiştir.



Şekil 5.9. BAP ve NAA yüklü kitin ile gerçekleştirilen farklı tampon ortamlarında (pH 7,4) salım çalışmaları.

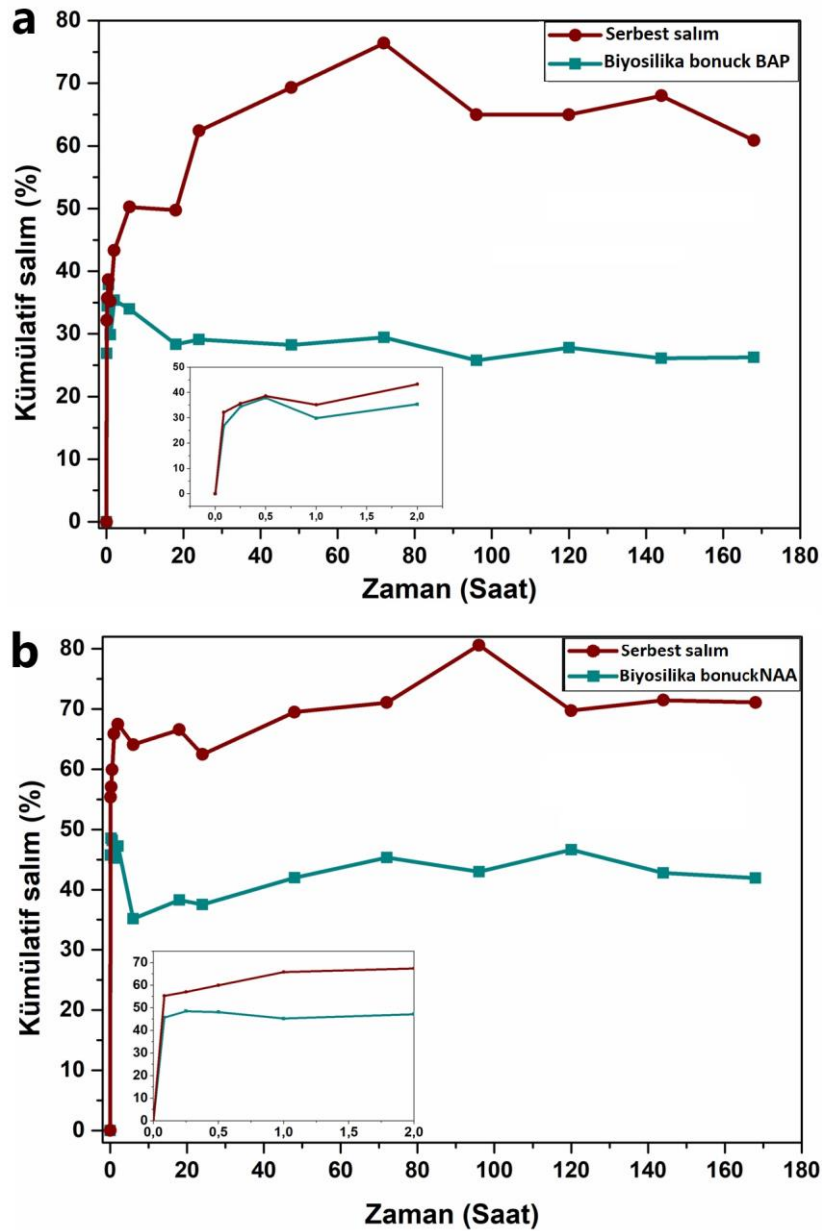
Bu ilk ani salım etkisi, yüzeysel olarak bağlanmış fitohormonlara bağlı olduğunu düşünülmektedir. İki saat sonra, 168 saate kadar sabit bir salım paterni gözlemlenmiştir. Öte yandan, serbestçe uygulanan BAP ve NAA için salım modeli yukarı yönde olup, iki saat içinde BAP ve NAA'nın tam salımını izlenmiştir. Genel olarak, üç taşıyıcı da her iki pH koşulunda BAP ve NAA için yavaş bir salım göstermiştir.

Çizelge 5.1. BAP ve NAA yüklü taşıyıcılarla pH 5.8 ve pH 7.4'te *in vitro* salım.

| Numuneler             | pH 5.8'da ilk iki saat sonunda salım (%) | 5.8 pH'da 168 saat sonunda salım (%) | 7.4 pH'da ilk iki saat sonunda salım (%) | 7.4 pH'da 168 saat sonunda salım (%) |
|-----------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------------|
| Biyosilika boncuk-NAA | 48,23                                    | 52,19                                | 28,36                                    | 52,68                                |
| Serbest Kontrol       | 70,23                                    | 71,72                                | 62,98                                    | 77,71                                |
| Biyosilika boncuk-BAP | 51,34                                    | 51,24                                | 31,63                                    | 29,67                                |
| Serbest Kontrol       | 72,43                                    | 78,12                                | 48,23                                    | 51,86                                |
| Sporopollenin-NAA     | 15,12                                    | 14,40                                | 20,45                                    | 20,11                                |
| Serbest Kontrol       | 42,36                                    | 41,04                                | 50,45                                    | 48,23                                |
| Sporopollenin-BAP     | 29,90                                    | 29,18                                | 31,32                                    | 33,11                                |
| Serbest Kontrol       | 65,12                                    | 58,88                                | 52,21                                    | 54,23                                |
| Kitin-NAA             | 60,77                                    | 49,45                                | 57,61                                    | 53,15                                |
| Serbest Kontrol       | 76,57                                    | 71,12                                | 70,12                                    | 77,65                                |
| Kitin-BAP             | 36,18                                    | 47,39                                | 29,12                                    | 37,58                                |
| Serbest Kontrol       | 57,45                                    | 59,15                                | 54,45                                    | 60,53                                |

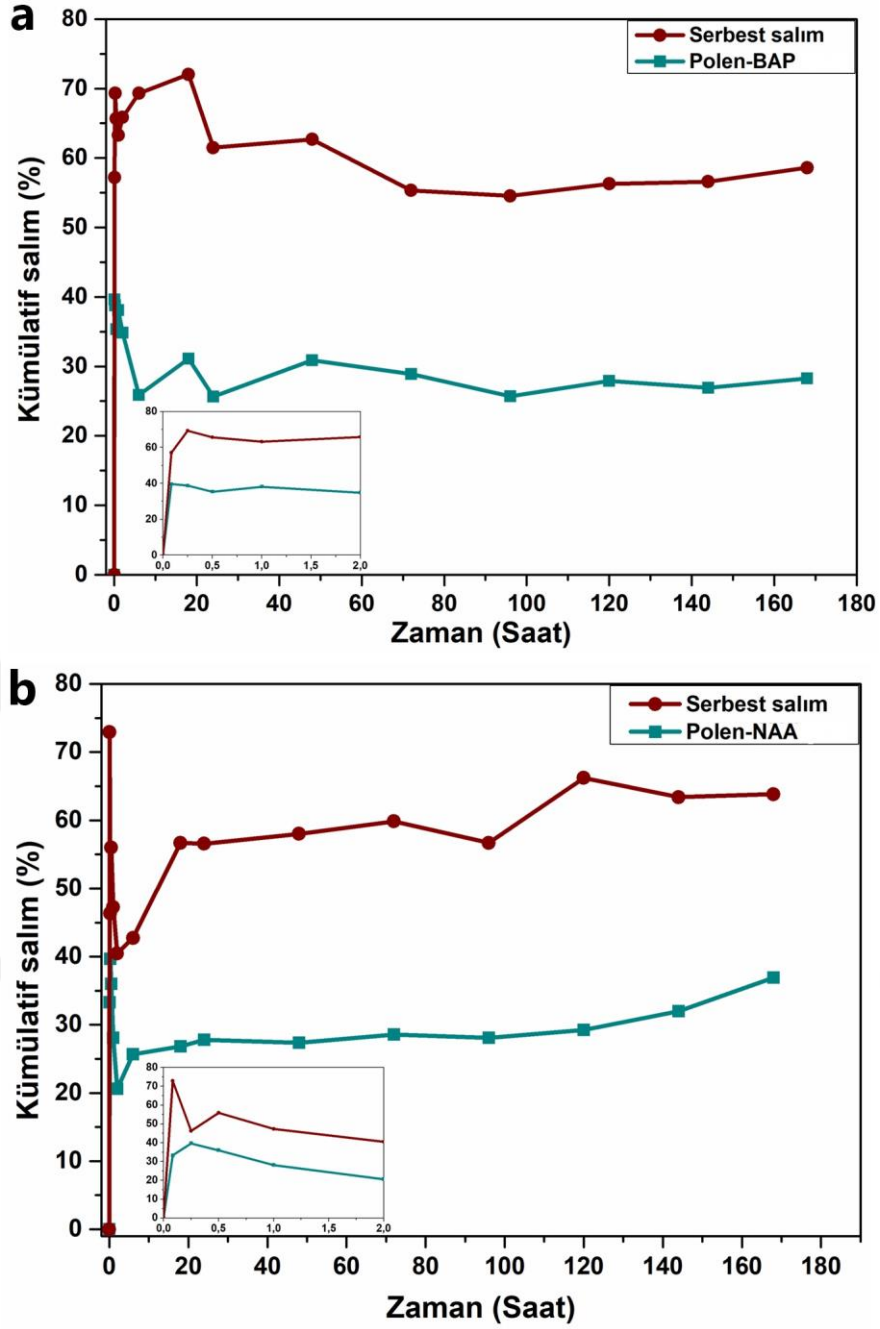
## 5.5 KÜLTÜR ORTAMLARINDA SALIM DENEYLERİ

*M. neglectrum* Guss.'ın *in vitro* kültür sırasında nekrozun üstesinden gelebilmesi için, kültür ortamında kitin, biyosilika ve sporopolleninin aracılı NAA ve BAP fitohormonların bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin salım gerçekleştirilmiştir (Çizelge 5.2.). Seçilen biyomateriyal tabanlı taşıyıcılar hem BAP hem de NAA için kontrollü bir salım modeli sergilemiştir. Kitin salınım yüzdesi, biyosilika ve sporopolleninden daha yüksek kaydedildi. Bu, lifli yüzey morfolojisine bağlı olduğunu düşünülmektedir (Şekil 5.10.).



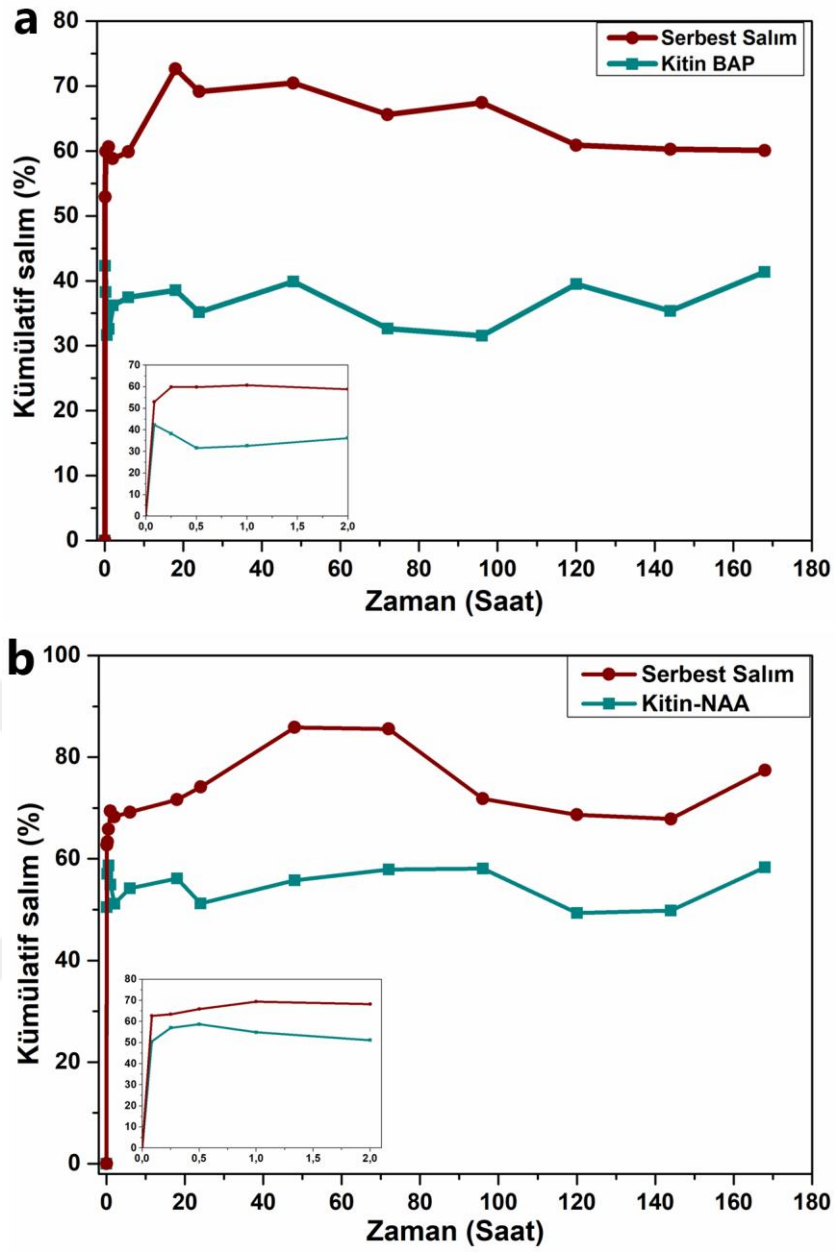
Şekil 5.10. BAP ve NAA yüklü biyosilika bonucukları ile gerçekleştirilen *Muscari neglectum* doku kültür ortamlarında kümülatif salım çalışmaları..

Kitin içindeki gözenek ve boşluk eksikliğinden dolayı, BAP ve NAA adsorpsiyonu yalnızca lifler tarafından gerçekleşir. Lifli yapıdan salınım daha hızlı bir şekilde gerçekleşmiştir (Şekil 5.12.). Bunu neden ise hiçbir morfolojik veya geometrik kuvvet etmemesidir. Kitinden BAP ve NAA salımı sırasıyla %44,34 ve %60,32 olarak kaydedilmiştir. Öte yandan biyosilika'dan salım yüzdesi 168 saatin sonunda %43,98 (NAA için) ve %30,40 (BAP için) olarak kaydedilmiştir. Bu, her iki hormonun serbest salınımından önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur.



Şekil 5.11. BAP ve NAA yüklü sporopollenin ile gerçekleştirilen *Muscari neglectum* doku kültür ortamlarında kümülatif salım çalışmaları.

Ayrıca, deneyin ilk iki saatinde, yüzeysel olarak eklenmiş BAP ve NAA'ya bağlı yüksek oranda bir salım atışı kaydedilmiştir. Sporopollenin için salınım yüzdesi, 168 saatin sonunda %36,83 (NAA için) ve %35,12 (BAP için) olarak kaydedilmiştir. Bu salım, *M. neglectum* kültürü ortamına serbestçe uygulanan BAP ve NAA'ninkinden önemli ölçüde daha düşük olarak gözlemlenmiştir (Şekil 5.11.). İlk iki saat boyunca ilk yüksek oranda salım artışı, BAP ve NAA'nın kültür ortamına aniden salınması ile ilişkili bulunmuştur..



Şekil 5.12. BAP ve NAA yüklü kitin ile gerçekleştirilen *Muscari neglectum* doku kültürü ortamlarında kümülatif salım çalışmaları.

Çizelge 5.2. BAP ve NAA yüklü taşıyıcılarla doku kültürü ortamlarında salım.

| Nümüne                | İlk iki saat sonunda salım (%) | Serbest salım | 168. saat sonunda salım (%) | Serbest salım |
|-----------------------|--------------------------------|---------------|-----------------------------|---------------|
| Biyosilika boncuk-NAA | 48.24                          | 65.16         | 43.98                       | 72.31         |
| Biyosilika boncuk-BAP | 35.31                          | 45.12         | 30.40                       | 64.23         |
| Sporopollenin-NAA     | 28.12                          | 48.91         | 36.83                       | 65.34         |
| Sporopollenin-BAP     | 28.34                          | 45.12         | 35.12                       | 76.12         |
| Kitin-NAA             | 53.12                          | 70.23         | 60.32                       | 81.56         |
| Kitin-BAP             | 38.12                          | 59.56         | 44.34                       | 63.13         |

## 5.6 SALIM KİNETİĞİ ÇALIŞMALARI

BAP ve NAA iki farklı pH koşulunda (5,8 ve 7,4) biyosilika boncuklar, sporopollenin ve kitinden salımının kinetik parametreleri, kinetik modellerinden (Birinci derece, sıfır derece ve Higuchi) hesaplanmıştır.

pH 5.8'de biosilika boncuklar, sıfır derecesinde ve Higuchi'de en iyi korelasyon katsayısını ( $R^2$ ) göstermiştir (Çizelge 5.3.). Aynı şekilde, sporopollenin için her üç modelde de en iyi korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) kaydedilmiştir. Kitin için her üç modelin hepsinde neredeyse benzer bir korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) ortaya çıkardı. Tüm kinetik parametre sonuçlar, üç biyomateriyal tabanlı taşıyıcıdan salımının Fickian difüzyon yoluyla gerçekleştiği ortaya koymuştur.

Çizelge 5.3. NAA ve BAP yüklü biyomateriyal tabanlı taşıyıcıların kinetik parametreleri (PBS pH: 5.8).

| Kinetik modeller (PBS pH: 5.8) | Sıfır derece (Zero-order) | Birinci derece (First-order) | Higuchi |
|--------------------------------|---------------------------|------------------------------|---------|
|                                | $R^2$                     | $R^2$                        | $R^2$   |
| Biyosilika boncuk-BAP          | 0,955                     | 0,602                        | 0,928   |
| Biyosilika boncuk-NAA          | 0,902                     | 0,643                        | 0,895   |
| Sporopollenin-BAP              | 0,915                     | 0,924                        | 0,907   |
| Sporopollenin-NAA              | 0,901                     | 0,901                        | 0,785   |
| Kitin-BAP                      | 0,888                     | 0,886                        | 0,882   |
| Kitin-NAA                      | 0,818                     | 0,821                        | 0,797   |

pH 7.4'te biosilika boncuklar her üç modelde de en iyi korelasyon katsayısını ( $R^2$ ) göstermiştir ve  $R^2$  0,900'ün üzerinde kaydedilmiştir (Çizelge 5.3.). Aynı şekilde, sporopollenin-BAP her üç modelde de en iyi korelasyon katsayısını ( $R^2$ ) göstermiştir. Sporopollenin-NAA için  $R^2$ , her üç modelde de 0,900'ün altında kaydedilmiştir. Kitin için üç modelin hepsinde neredeyse benzer bir korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) ortaya çıkarmıştır. Tüm kinetik parametre sonuçlarından, üç biyomateryal bazlı taşıyıcıdan salınımın Fickian difüzyonundan kaynaklandığı sonucuna varılabilir. Bu sonuçlar, farklı kaynaklardan sporopolleninin farklı terapötik ilaçlar için bir taşıyıcı olarak kullanıldığı önceki literatür raporlarıyla uyumlu olarak bulunmuştur (145, 188).

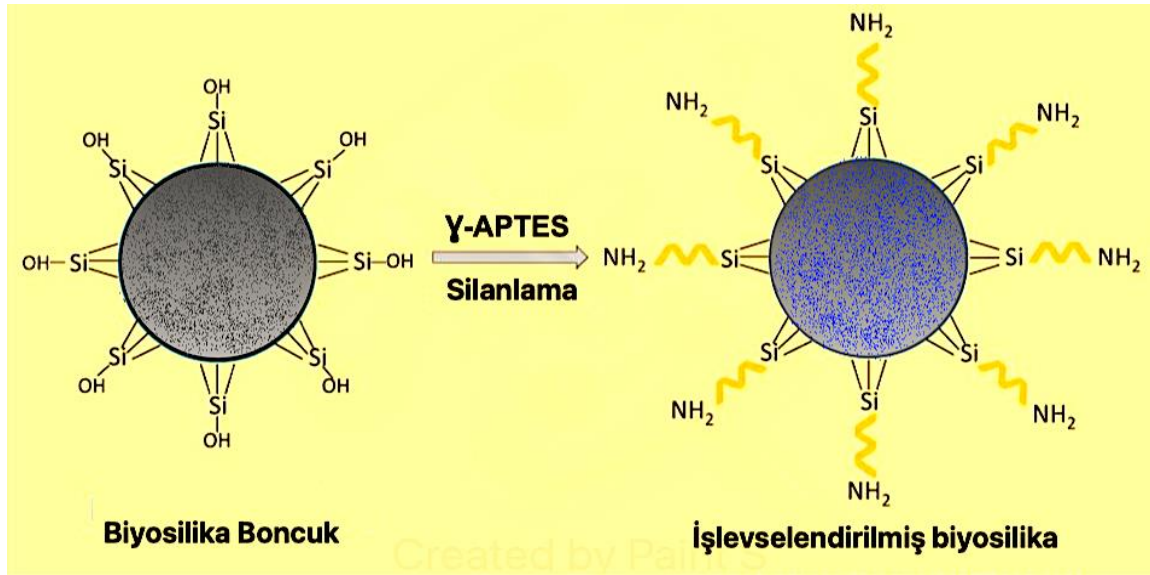
Çizelge 5.4. NAA ve BAP yüklü biyomateryal tabanlı taşıyıcıların kinetik parametreleri (PBS pH: 7.4).

| Kinetik modeller<br>(PBS pH: 7.4) | Sıfır derece<br>(Zero-order)<br>$R^2$ | Birinci derece<br>(First-order)<br>$R^2$ | Higuchi<br>$R^2$ |
|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------|------------------|
| <b>Biyosilika boncuk-BAP</b>      | 0,907                                 | 0,904                                    | 0,939            |
| <b>Biyosilika boncuk-NAA</b>      | 0,970                                 | 0,971                                    | 0,954            |
| <b>Sporopollenin-BAP</b>          | 0,928                                 | 0,925                                    | 0,952            |
| <b>Sporopollenin-NAA</b>          | 0,885                                 | 0,884                                    | 0,872            |
| <b>Kitin-BAP</b>                  | 0,890                                 | 0,887                                    | 0,957            |
| <b>Kitin-NAA</b>                  | 0,966                                 | 0,967                                    | 0,942            |

## 5.7 BİYOSİLİKA BONCUKLARIN, SPOROPOLLENİN VE KİTİNİN FİZİKOKİMYASAL KARAKTERİZASYONU

### 5.7.1 NİNHİDRİN ANALİZ

Ninhidrin testi, yüzeyde  $\gamma$ -APTES moleküllerinin aşılınmış olduğunu doğrulamak için uygulanmıştır. Mor-mavi renk, biyosilika boncukların yüzeyinde  $\gamma$ -APTES moleküllerinin başarılı bir şekilde aşılınmasını doğrulayarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar önceki literatür ile uyumlu olarak kaydedilmiştir (189).



Şekil 5.13. Biyosilika boncukların  $\gamma$ -APTES'ile işlevsellendirme mekanizması.

## 5.7.2 FOURIER DÖNÜŞÜM KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ/ ZAYIFLATILMIŞ TOPLAM YANSIMA KIZILÖTESİ SPEKTROSKOPİ (FT-IR/ATR)

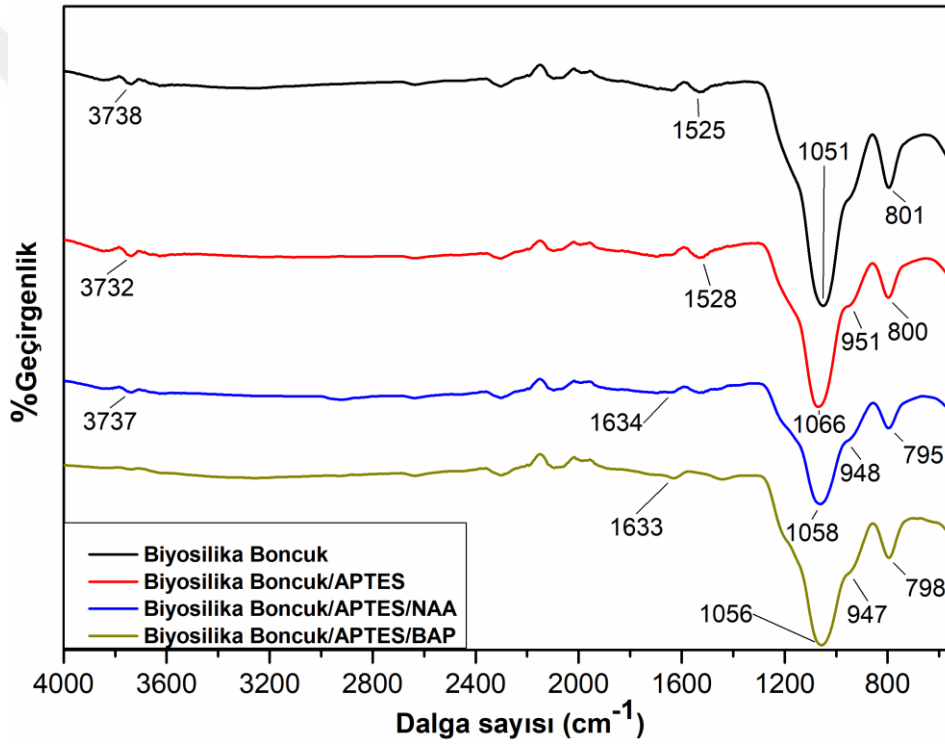
Fourier-transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR), farklı malzemelerin kızılötesi spektrumunun soğurulması veya yayılması hakkında bilgi edinmek için kullanılan analitik bir tekniktir. Geniş bir spektral aralıkta yüksek çözünürlüklü bir veri toplanmakta, bu da onu dağınık spektrometreye göre daha avantajlı hale getirmektedir. Zayıflatılmış toplam yansıma (ATR), katı veya ince film numunelerinin hacim özelliklerinden ziyade yüzey özelliklerini ölçmek için kullanılan FTIR spektrofotometrenin bir aksesuarıdır. Genel olarak, ATR, numune koşullarına bağlı olarak yaklaşık 1 veya 2 mikrometre penetrasyon derinliğine sahiptir.

Mevcut çalışmada, seçilen taşıyıcıların BAP ve NAA'nın kapsüllenmesinin doğrulanması amacıyla bu bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin yüklü olduğu biyosilika, kitin ve sporopollenin numuneleri için FT-IR/ATR analizi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, sporopollenin ve işlevselleştirilmiş biyosilika üretimi de FT-IR / ATR analizi ile doğrulanmıştır.

### 5.7.2.1 Biyosilika boncuk

Biyosilika boncukların,  $\gamma$ -APTES fonksiyonelleştirilmiş biyosilika boncukların, NAA yüklü biyosilika boncukların ve BAP yüklü biyosilika boncukların FT-IR / ATR spektrumları Şekil 5.14'te gösterilmiştir. Dört farklı biyosilika örneğinin spektrumlarında  $\sim 1050 \text{ cm}^{-1}$ 'de geniş

bir pik kaydedilmiştir. Bu pik Si—O—Si gerilmesinin varlığına bağlanabilmektedir. ~1525  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen küçük bir N-H bağlanma piki  $\text{NH}_2$  gruplarının varlığından kaynaklanmaktadır. N—H gerilmesine karşılık gelen pikin O—H gruplarının 3500  $\text{cm}^{-1}$ 'deki gerilme titreşimleri ile örtüşmesi beklenmektedir. Biyosilika  $\gamma$ -APTES ile muamele edildikten sonra ~950  $\text{cm}^{-1}$ 'de küçük bir pik olduğu bilinmektedir (190). Bu pikin görünümü, silis yüzeyinde silanol gruplarının varlığına karşılık gelmektedir. Biyosilikanın yüzeyinde silanol gruplarının varlığı, yüzeydeki serbest -OH gruplarının mevcudiyetini doğrulamıştır. BAP spektrumlarında 1634  $\text{cm}^{-1}$  ve 1633  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pikler, sırasıyla BAP ve NAA'nın enkapsülasyonunu doğrulayan  $\nu$  ( $\text{C}=\text{N}$ ) titreşimlerine karşılık gelmektedir.



Şekil 5.14. Biyosilika boncuk, biyosilika boncuk/  $\gamma$ -APTES ve hormone yüklü biyosilika boncuk için fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi/ zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopisi (FT-IR/ATR) spektrumu.

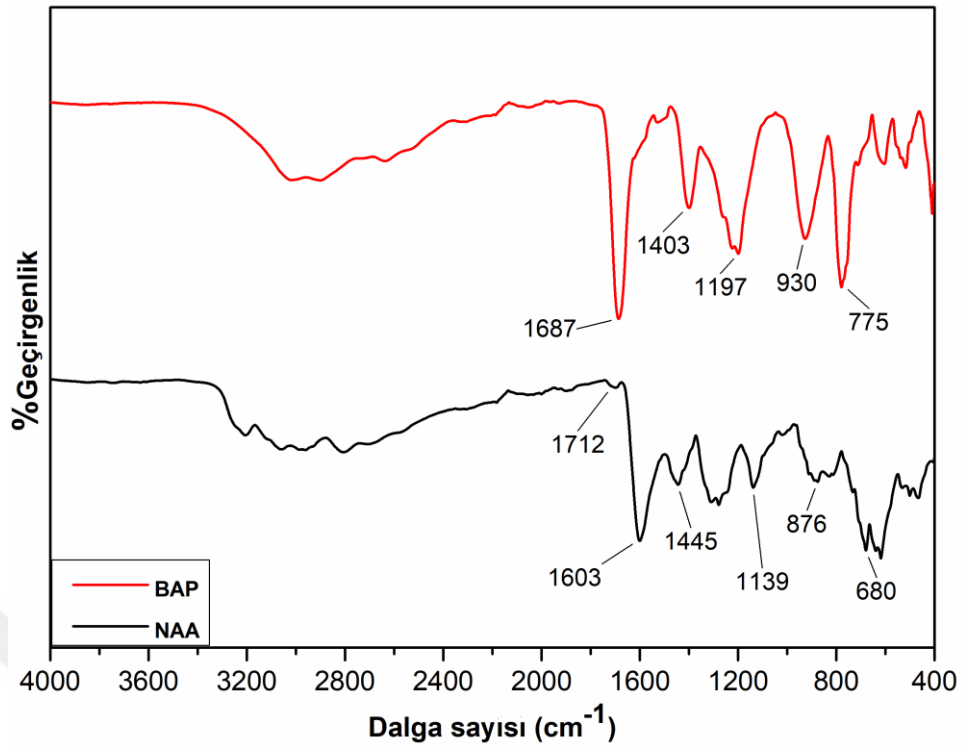
#### 5.7.2.2 Sporopollenin

*J. regia* poleni, sporopollenin ve fitohormon yüklü sporopolleninlerin FT-IR/ATR spektrumları, farklı izolasyon ve enkapsülasyon aşamalarında meydana gelen kimyasal değişiklikleri açıklamak için ölçülmüştür. *J. regia* polenin, spektrumlarında 3276  $\text{cm}^{-1}$ 'de

gözlenen geniş pik O-H bağı ile ilişkilendirilmiştir. 2918  $\text{cm}^{-1}$  ve 2850  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen iki keskin pik ise alifatik C—H germe titreşimlerine karşılık gelmektedir. Polisakkarit emilimi ise 1032  $\text{cm}^{-1}$ 'de keskin bir pike atfedilebilmektedir. 1641  $\text{cm}^{-1}$ 'deki zayıf pik ise, polenin  $\beta$ -tabaka protein yapılarının amid I bağlantısından kaynaklanmaktadır (191). 1541  $\text{cm}^{-1}$  ve 1512  $\text{cm}^{-1}$ 'de zayıf pik C—N ve N—H bükülmesine karşılık gelmektedir.

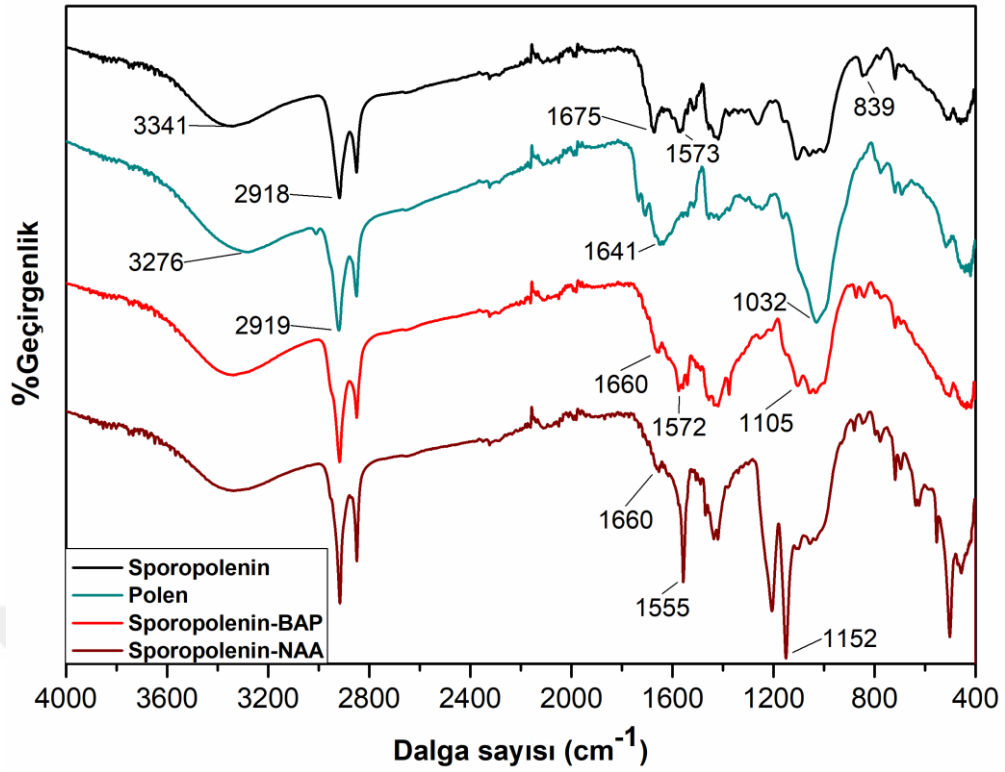
Şimdiye kadar, sporopolleninin kesin kimyasal yapısı tam olarak tanımlanmamıştır, ancak araştırmacılar, yapı ile birlikte bazı fonksiyonel grupları tanımlamışlardır. Bu fonksiyonel grupların, uzun yağ asitlerini ve aromatik grupları içerdiği bilinmektedir (146, 192, 193). *J. regia* polenin kimyasal yapısında asit ve baz muamelesinden sonra bazı değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 5.16.). Bu değişiklikler, bazı piklerin kayması ve kaybolmasıyla birlikte yeni IR pikleri şeklinde yansımıştır. Polen spektrumundaki O-H bağında gözlenen geniş pik 3276  $\text{cm}^{-1}$ 'den 3341  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. 1675  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen keskin pik ise, sporopollenindeki karbonil fonksiyonel gruplara karşılık gelmektedir. 1573  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen pik (alifatik C-C germe), sporopollenindeki doymamış yağ asit yapılarını temsil etmektedir. 1511  $\text{cm}^{-1}$ 'de ki pik de sporopolleninde karakteristik C-C gerilmesine atfedilmektedir. Sporopolleninin aromatik doğası, ester bağlı n-karboksilik asit monomerlerinin alkalın hidrolizinden kaynaklanmaktadır (194).

BAP ve NAA'nın IR spektrumları kaydedilmiş ve sonuçlar Şekil 5.15'da gösterilmiştir. BAP spektrumlarında 1687  $\text{cm}^{-1}$ 'de gözlenen keskin pik,  $\nu$  (C=N) titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1197  $\text{cm}^{-1}$ 'de bir C—O gerilme piki kaydedilmiştir. Ek olarak, 930  $\text{cm}^{-1}$ 'de keskin bir C-C bükülme piki ve 775  $\text{cm}^{-1}$ 'de keskin bir C—H piki kaydedilmiştir. NAA'nın IR spektrumları da BAP'ın kine benzer birkaç pik vermiştir. NAA spektrumlarında, 1603  $\text{cm}^{-1}$ 'de keskin bir C-C gerilme piki, 1445  $\text{cm}^{-1}$ 'de güçlü bir O—H bükülme piki ve 1712  $\text{cm}^{-1}$ 'de küçük bir C-O germe piki gözlenmiştir. Ayrıca, 680 ve 650  $\text{cm}^{-1}$ 'de bölünmüş pikler C-C bükülmesi olarak kaydedilmiştir.



Şekil 5.15. BAP ve NAA için fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi/ zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopisi (FT-IR/ATR) spektrumu.

BAP ve NAA yüklü sporopolleninin (sporopollenin-BAP ve sporopollenin-NAA) FT-IR spektrumları Şekil 5.7'de gösterilmiştir. Her iki fitohormonun varlığı, sporopollenin-NAA ve sporopollenin-BAP spektrumlarında yeni piklerin ortaya çıkması ve bazı mevcut piklerin kaymasıyla doğrulanmıştır. Sporopollenin-BAP spektrumunda,  $\nu$  ( $C=N$ ) titreşimlerine karşılık gelen  $1660\text{ cm}^{-1}$ 'de yeni küçük bir pik ortaya çıkmıştır.  $1262\text{ cm}^{-1}$ 'de bir  $C-N$  gerilme piki,  $1377\text{ cm}^{-1}$ 'ye kaymıştır. Bu değişim BAP'ın varlığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca, BAP'ın kimyasal bağına bağlı olarak  $1112\text{ cm}^{-1}$ 'de ki pik  $1105\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. Sporopollenin-NAA spektrumunda,  $\nu$  ( $C-N$ ) titreşimlerine karşılık gelen  $1660\text{ cm}^{-1}$ 'de yeni bir küçük pik ortaya çıkmıştır. Ek olarak, NAA'nın varlığına karşılık gelen  $1437\text{ cm}^{-1}$ 'de küçük bir  $O-H$  bükülme piki de ortaya çıkmıştır.  $1203\text{ cm}^{-1}$ 'de  $C-O$  ve  $1152\text{ cm}^{-1}$ 'de  $C-N$  gerilme pikleri, NAA'nın yapıya dahil edilmesiyle daha keskin hale gelmiştir. Spektrumlarda, sporopollenin yapısındaki NAA'nın varlığını güçlü bir şekilde doğrulayan yeni bir  $C-H$  bükülme piki de belirlenmiştir.

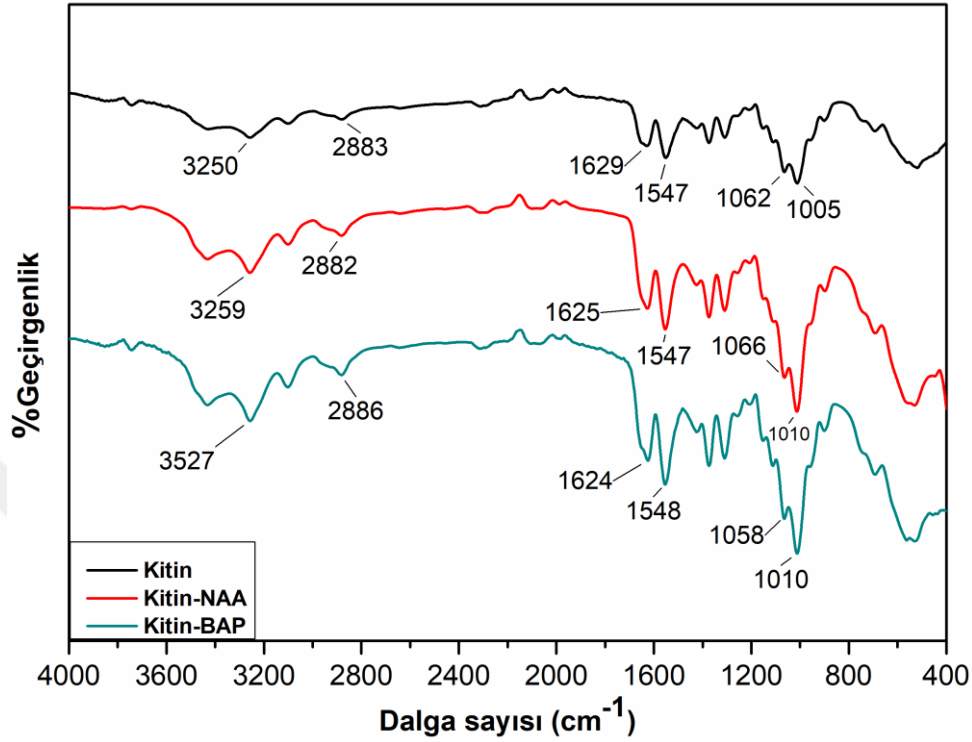


Şekil 5.16. Polen, Sporopollenin ve hormon yüklü sporopollenin için fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopi/ zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopi (FT-IR/ATR) spektrumu.

### 5.7.2.3 Kitin

Kitin saflığı ve kitine BAP ve NAA kapsüllemesinden sonra meydana gelen kimyasal değişikliklerin gözlemlenmesi amacıyla FT-IR analizinden yararlanılmıştır (Şekil 5.17.). Kitinin IR spektrumlarında,  $3438\text{ cm}^{-1}$ 'de majör bir pik gözlenmiştir ve bu pik O—H'a atfedilmektedir.  $3256\text{ cm}^{-1}$  ve  $3098\text{ cm}^{-1}$ 'de ki iki pik  $\text{—C=O}\cdots\text{NH—}$  bağına karşılık gelmektedir (195). Literatürde,  $\alpha$  kitin için üç karakteristik pik bulunmaktadır, yani  $1650\text{ cm}^{-1}$ ,  $1620\text{ cm}^{-1}$  ve  $1554\text{ cm}^{-1}$ , amid I (C=O ikincil amid gerilmesi), amid II (N—H bükülmesi, C—N gerilmesi) olarak tanımlanmıştır (196). Mevcut çalışmada bu pikler  $1653\text{ cm}^{-1}$ ,  $1629\text{ cm}^{-1}$  ve  $1547\text{ cm}^{-1}$  olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, izole edilmiş kitinin  $\alpha$ -kitin olduğunu doğrulamıştır.  $1360\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen pik simetrik  $\text{CH}_3$  ve CH bükülmesini temsil ederken,  $1005\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen daha keskin pik C—O gerilmesine bağlanabilir (197). Kitin-NAA'da,  $1629\text{ cm}^{-1}$ 'deki pik NAA'dan dolayı  $1625\text{ cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. Ayrıca NAA kapsüllemesinden sonra  $1448\text{ cm}^{-1}$  ve  $876\text{ cm}^{-1}$ 'deki pikler daha yoğun hale gelmiştir. Kitin-BAP spektrumlarında  $1457\text{ cm}^{-1}$ ,  $1158\text{ cm}^{-1}$ ,  $775\text{ cm}^{-1}$ 'de pikler BAP adsorpsiyonundan

sonra daha yoğun hale gelmiştir. Sonuçlar daha önceki literatür ile uyumlu olarak gözlenmiştir (198).



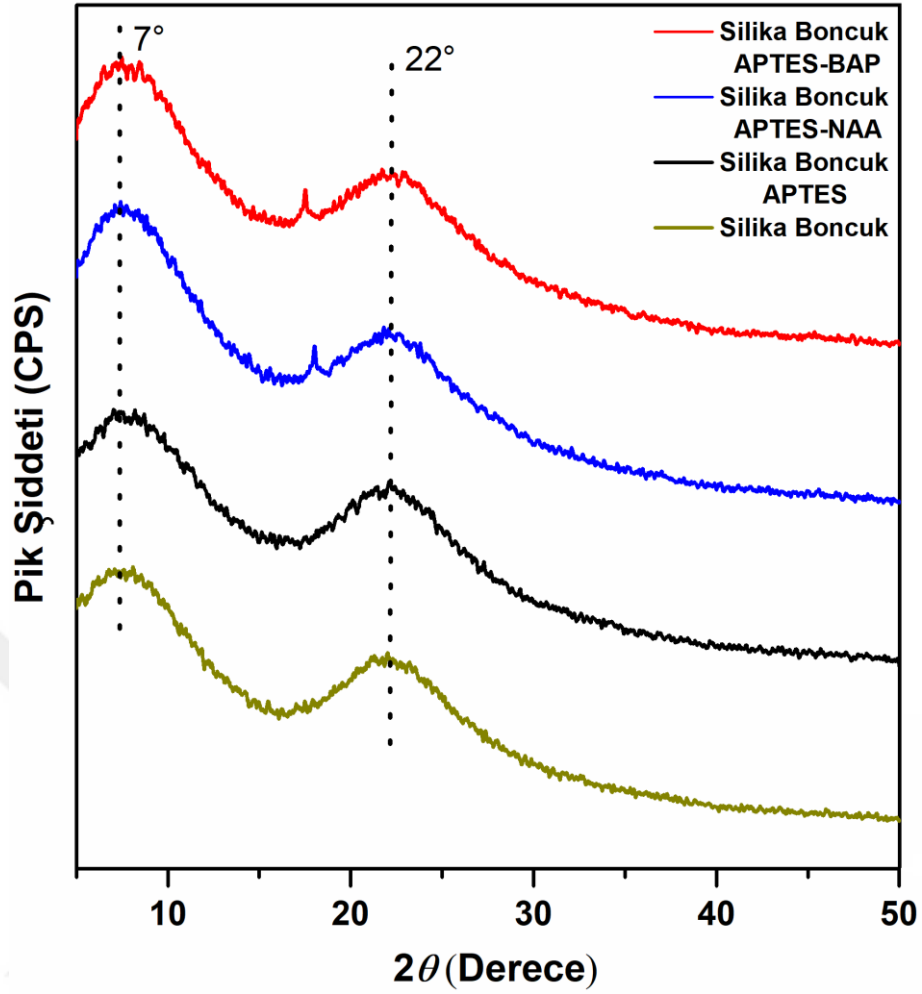
Şekil 5.17. Kitin ve fitohormon yüklü kitinin fourier dönüşüm kızılötesi spektroskopisi/zayıflatılmış toplam yansıma kızılötesi spektroskopisi (FT-IR/ATR) spektrumu.

### 5.7.3 XRD (X-IŞINI KIRINIM ANALİZİ)

X Işını Kırınımı, sıklıkla XRD olarak kısaltılmakta ve kristalin malzemelerin yapısını analiz etmek için kullanılan tahribatsız bir analiz yöntemidir. XRD analizi, kristal yapının incelenmesi yoluyla, bir malzemede bulunan kristalin fazlarını tanımlamak ve böylece kimyasal bileşim bilgilerini ortaya çıkarmak için kullanılmaktadır. Bu çalışmada, BAP ve NAA'nın kapsüllenmesinden sonra seçilen taşıyıcıların faz değişimleri hakkında bilgi almak için BAP ve NAA yüklü Biyosilika, kitin ve sporopollenin numuneleri için XRD analizi yapılmıştır. Ayrıca, sporopollenin ve  $\gamma$ -APTES ile işlevselleştirilmiş biyosilika da XRD analizi ile doğrulanmıştır.

### 5.7.3.1 Biyosilika boncuk

BAP ve NAA yüklü biyosilika, biyosilika-APTES ve biyosilika boncuklar için XRD analizi gerçekleştirilmiştir. Difraktogramlar Şekil 5.18'de gösterilmiştir. Doğal biyosilika boncuklar için,  $22^\circ$  merkezli maksimum yoğunluk ile  $16^\circ$  ile  $35^\circ$  arasında  $2\theta$  da tek bir geniş pik gözlemlenmiştir. Diğer piklerin yokluğu, *G. macandrewii*'den izole edilmiş biyosilikanın nihai saflığını göstermiştir. Biyosilika ve biyosilika-APTES difraktogramları arasında önemli bir fark gözlenmemiştir.  $\gamma$ -APTES ile modifikasyondan sonra,  $22^\circ$  'deki geniş amorf silis piki, pikin yoğunluğunda hafif bir azalma olsa da bozulmadan kalmıştır. Yoğunluktaki bu azalma aynı zamanda silikanın makroskopik düzeninin işlevselleşmeye bağlı olarak azalmasının bir sonucudur (199). Bu,  $\gamma$ -APTES'in biyosilika yapısını değiştirmediğini göstermiştir. Bu sonuçlar aynı zamanda aşılama reaksiyonunun baskın olarak silikanın dış yüzeyinde (yani, genellikle katmanların kenarlarında) maksimum ve katman arası boşlukta minimum modifikasyon ile gerçekleştiğini göstermiştir (200). NAA ve BAP yüklü biyosilika örnekleri için,  $19^\circ$  'de küçük bir pik gözlemlenmiştir. Bu yeni gözlenen pik, biyosilikadaki NAA ve BAP'ın varlığı nedeniyle ortaya çıkmıştır. Önceki yapılan bir çalışmada da XRD pikini  $19,5^\circ$  'de bildirmişlerdir ve bu çalışmanın sonuçları ile benzer olduğu gözlenmiştir (198).

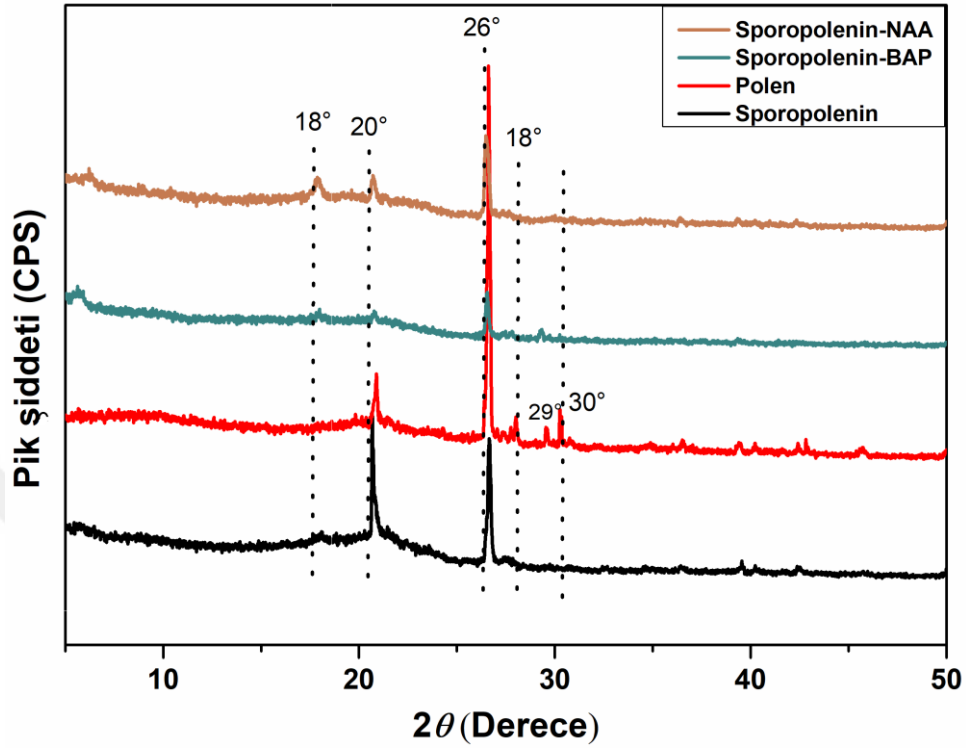


Şekil 5.18. Biyosilika boncuk, Biyosilika boncuk/  $\gamma$ -APTES ve hormon yüklü biyosilika boncuğun X-ışını Kırınım difraktogramları.

#### 5.7.3.2 Sporopollenin

*J. regia* polen, sporopollenin ve BAP, NAA yüklü sporopollenin için XRD analizi yapılmıştır (Şekil 5.19.). *J. regia* polenin difraktogramında iki ana pik ( $20^\circ$  ve  $26^\circ$ ) ve üç küçük pik ( $27^\circ$ ,  $29^\circ$  ve  $30^\circ$ ) gözlenmiştir. Gözlemlenen bu pikler, polenin kristal yapısını tanımlamaktadır. XRD analizi, *J. regia* poleninden, sporopollenin mikro kafeslerinin başarılı bir şekilde izole edildiğini doğrulamıştır. Sporopollenin difraktogramında  $27^\circ$ ,  $29^\circ$  ve  $30^\circ$ 'de pikler kaybolmuştur.  $20^\circ$  ve  $26^\circ$  'de sadece iki pik kaydedilmiştir. Sporopolleninde  $18^\circ$ 'de yeni bir pik ortaya çıkmıştır. Sporopolleninlerin difraktogramından küçük piklerin kaybolması, genetik materyalin, lipidlerin, proteinlerin ve diğer pigmentlerin polenden tamamen uzaklaştırıldığını doğrulamıştır. Sporopollenin-BAP ve sporopollenin-NAA'da  $18^\circ$  ve  $26^\circ$ 'de yansıma piklerinin yoğunluklarında bir azalma kaydedilmiştir. Bu, moleküler

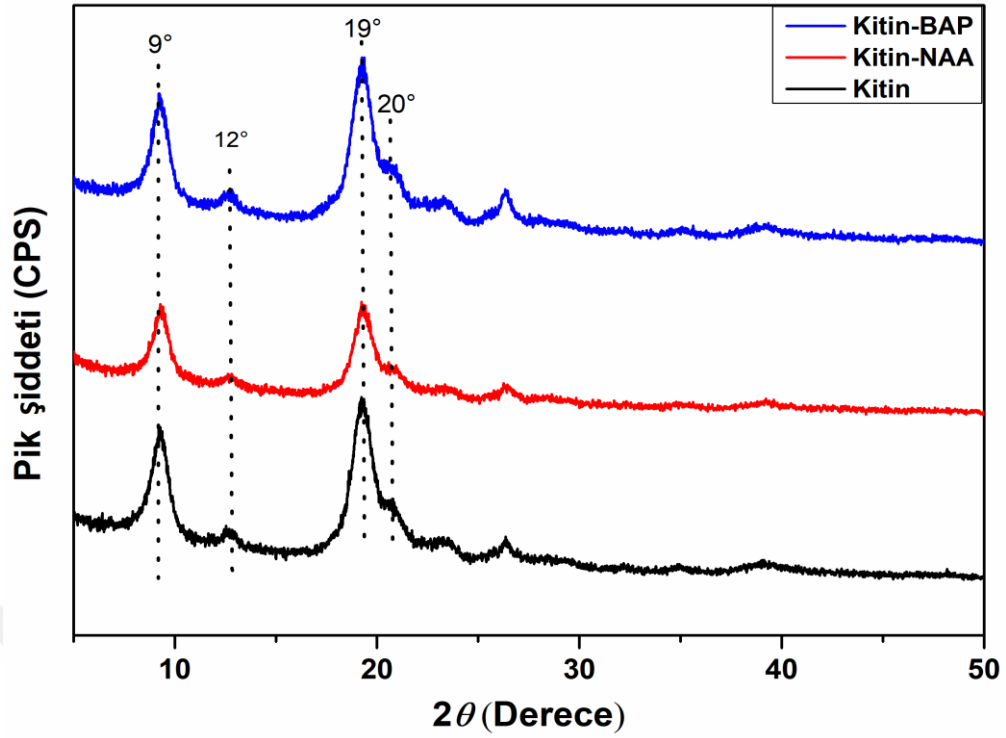
düzeyde sporopollenin ve bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin etkileşimine karşılık dayandırabilir. Bu sonuçlar önceki ilgili literatür ile uyumludur (201).



Şekil 5.19. Polen, sporopollenin ve hormon yüklü sporopolleninin X-ışını Kırınım difraktogramları.

### 5.7.3.3 Kitin

Kitinin XRD pikleri,  $2\theta$  aralığında toplam altı yansıma göstermiştir. Majör pik yansımaları  $9^\circ$  ve  $19^\circ$ 'de kaydedilirken, minör pikler ise  $12^\circ$ ,  $20^\circ$ ,  $23^\circ$  ve  $27^\circ$ 'de kaydedilmiştir (Şekil 5.20.). Tüm bu XRD yansımaları,  $\alpha$ -kitin için karakteristik yansıma pikleri olarak rapor edilmektedir (87). NAA ve BAP yüklenmiş kitinin difraktogramlarında büyük bir fark gözlenmemiştir. Çünkü  $19^\circ$ 'da NAA ve BAP'a karşılık gelen XRD yansıması, kitinin doğal pik noktasıdır. Bununla birlikte, kitin-NAA ve kitin-BAP difraktogramlarındaki piklerin yoğunluklarındaki azalma, BAP ve NAA'nın moleküler düzeyde kitin ile etkileşimini yansıtmıştır.



Şekil 5.20. Kitin ve hormon yüklü kitin'in X-ışını kırınım difraktogramları.

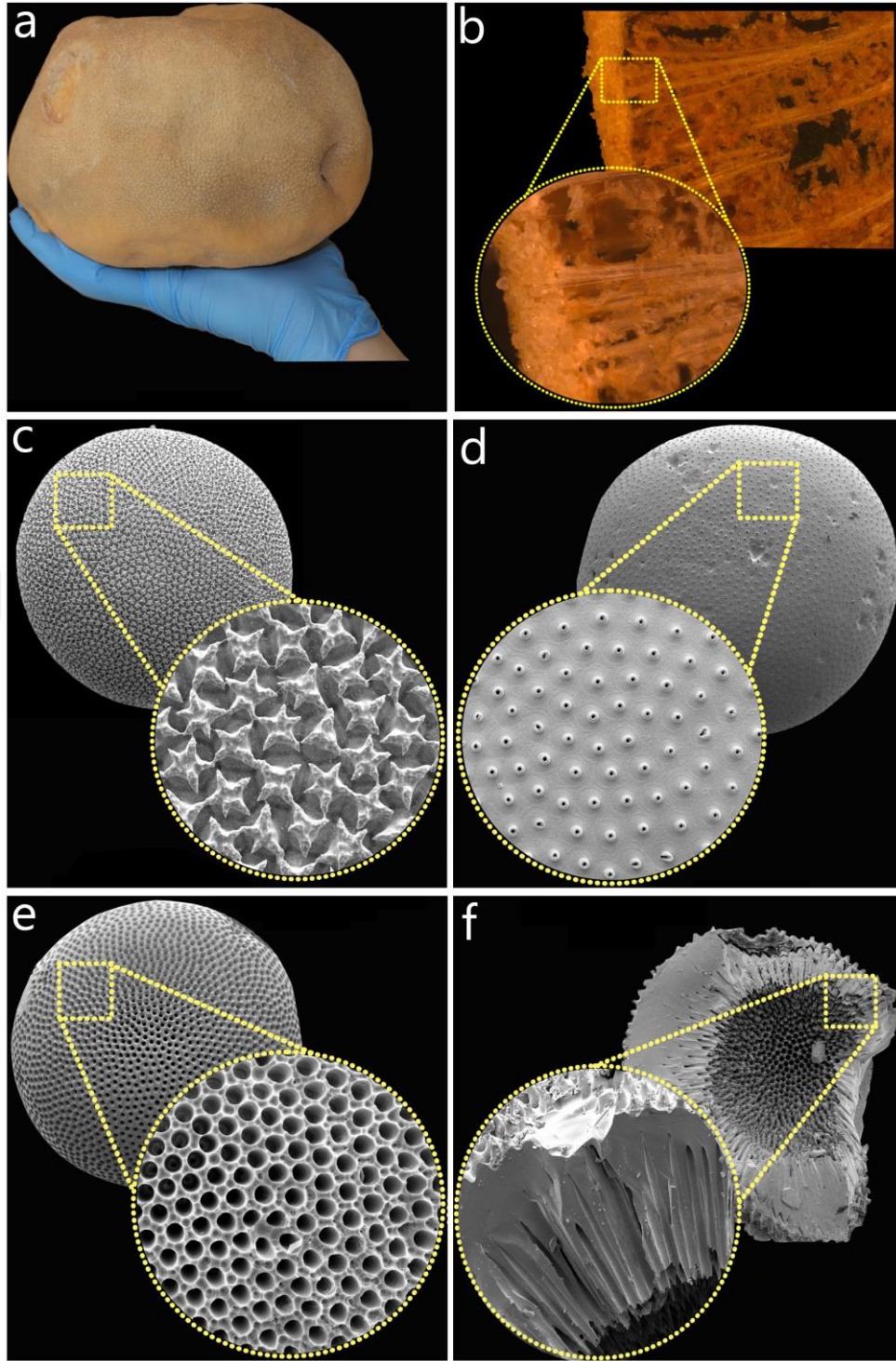
#### 5.7.4 TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBU (SEM) ANALİZİ

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), görüntü oluşturmak için bir yüzey üzerinde odaklanmış elektron ışık demetini taramaktadır. Işık demetindeki elektronlar, yüzey yapısı ve bileşimi hakkındaki verilere ulaşmak için kullanılabilecek farklı sinyaller üreterek numune ile etkileşime girmektedir. SEM'de elde edilen maksimum çözünürlük, elektron ışık demeti boyutu ve elektron ışınının örnek ile etkileşim hacmi gibi birçok faktöre bağlıdır. Atomik çözünürlük sağlayamasa da bazı SEM'ler 1.0 nm'nin altında çözünürlüğe ulaşabilmektedir. Tipik olarak, modern tam boyutlu SEM'ler 1-20 nm arasında bir çözünürlük sağlarken, masaüstü sistemler 20 nm veya daha fazla çözünürlük sağlayabilmektedir.

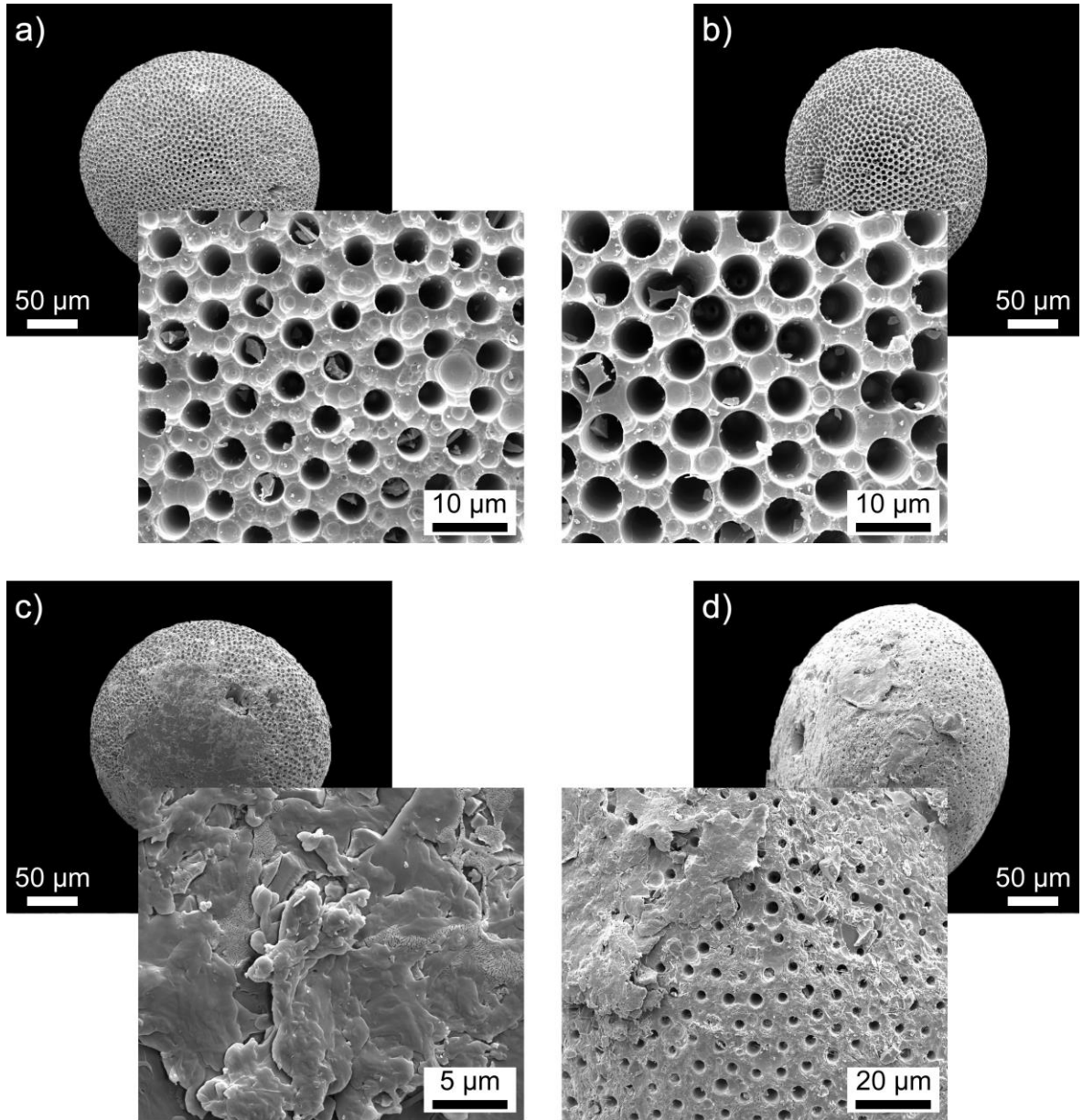
Bu çalışmada, seçilen fitohormon taşıyıcılarının yüzey morfolojileri SEM aracılığıyla analiz edilmiştir. BAP ve NAA'nın enkapsüllendiği de SEM analizi ile doğrulanmıştır. Ek olarak, biyosilika ve sporopollenin gözenekli yapıların açığa çıkarılması da SEM analizi ile doğrulanmıştır.

#### 5.7.4.1 Biyosilika boncuk

Gözenekli biyosilika boncuklar, *G. macandrewii* doğal süngerin korteks yapısından hafif bir hidrojen flüorür çözeltisi ile muamele edildikten sonra elde edilmiştir. Stereo mikroskop görüntülerinden de gözlenebileceği üzere, sterassterler dış kortekte yoğun bir şekilde paketlenmiştir. Bu küresel boncukların altında iğne benzeri yapılar da mevcuttur. Bu iğneye benzeyen yapılar oyuktur ve biyosilikadan oluşmaktadır. Orijinal boncuk yapılarının dış çıkıntıları vardır ve bu çıkıntıların altında orta boşluğa açılan kanallar bulunmaktadır. Hidrojen flüorür (HF) işleminden önce bu gözenekler, koruyucu bir tabaka ile kaplıdır. HF işlemi tabakayı aşındırarak bu gözeneklerin açılmasına neden olmaktadır (Şekil 5.21.). Gözenekli boncukların çapları  $209,4 \pm 38,5 \mu\text{m}$  ve boncukların yüzeyindeki gözeneklerin (kanalların) çapları ise  $2,3 \pm 1,1 \mu\text{m}$ 'dir. Tüm kanallar (yaklaşık 3000 adet) birbirine temas etmeyen bağımsız bir merkezi boşluğa açılmaktadır (140). SEM görüntüleri ile başarılı bir şekilde gözenekli biyosilika boncuk izolasyonunun yapıldığı doğrulanmıştır. BAP ve NAA yüklenmiş biyosilika boncukların görüntüleri, Şekil 5.21'de gösterilmiştir. Fitohormonlar biyosilika boncukların gözeneklerinin içinde ve yüzeyinde açıkça görülebildiği için BAP ve NAA'nın kapsüllenmesi bu görüntülerden doğrulanmıştır.



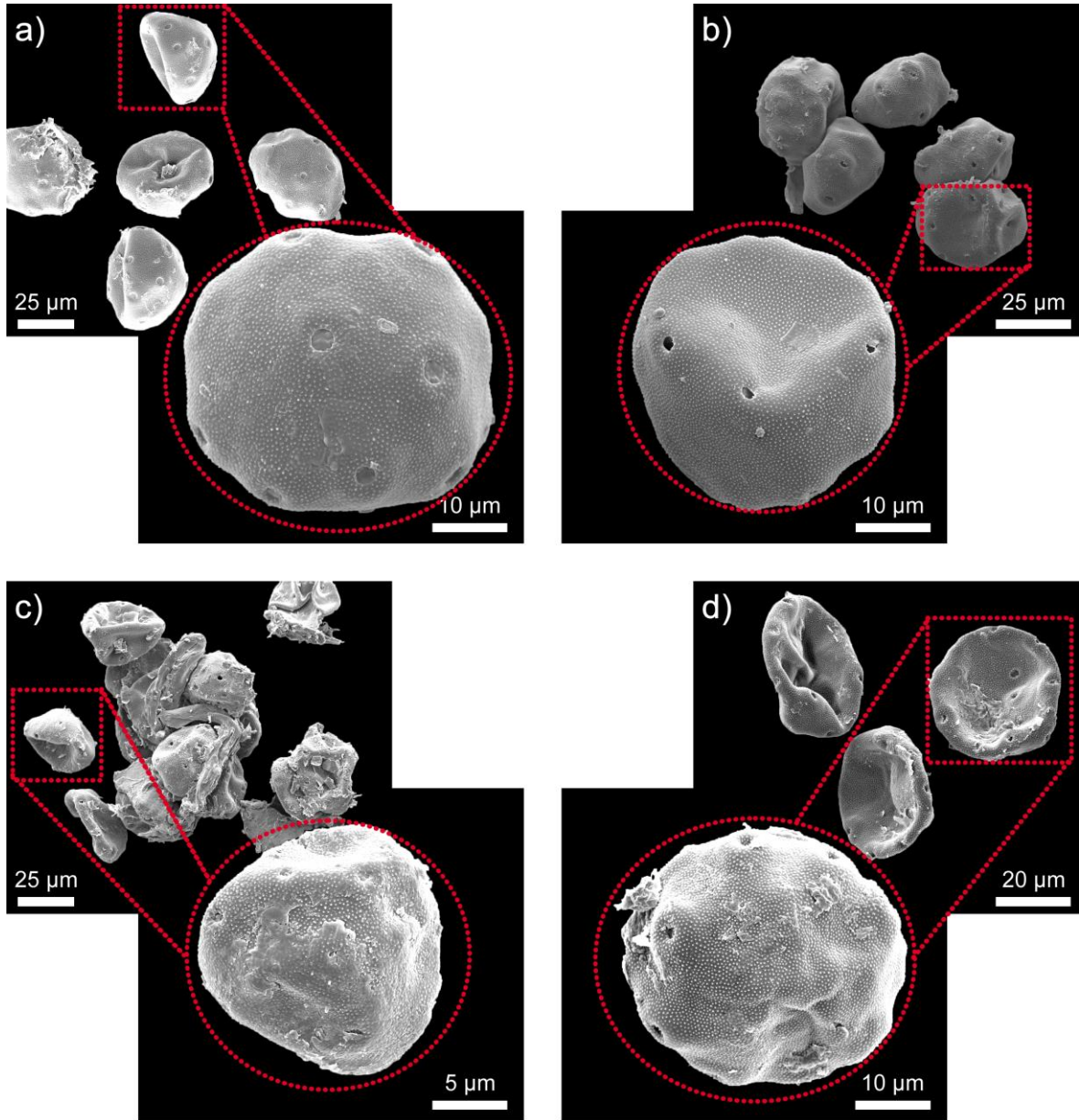
Şekil 5.21. Süngerden Sterraster (orijinal boncuk) izolasyonu ve ardından gözenekli biyosilika boncukların üretimi. a) Çalışmada kullanılan sünger türü (*G. macandrewii*) ve üzerinde sterrasterler; b) süngerin dış kabuğundan içe doğru bir bölüm; c, d) Sterrasterlerin SEM görüntüleri. Sterrasterlerin ve kanalların merkezindeki boşluğu. Görüldüğü gibi kanallar dışarıya açılmıyor; e, f) hidrojen flüorür muamelesinden sonra. Kanallar boşluk çekirdeğine açılıyor ve gözenekli biyosilika boncuklar ortaya çıkıyor. Tüm kanallar, boncuğun ortasında açıkça bir boşluğa açılmaktadır.



Şekil 5.22. SEM görüntüleri; a, b) hidrojen flüorür uygulamasından sonra gözenekli biyosilika boncukları, c, d) fitohormon yüklü biyosilika boncukları

#### 5.7.4.2 Sporopollenin

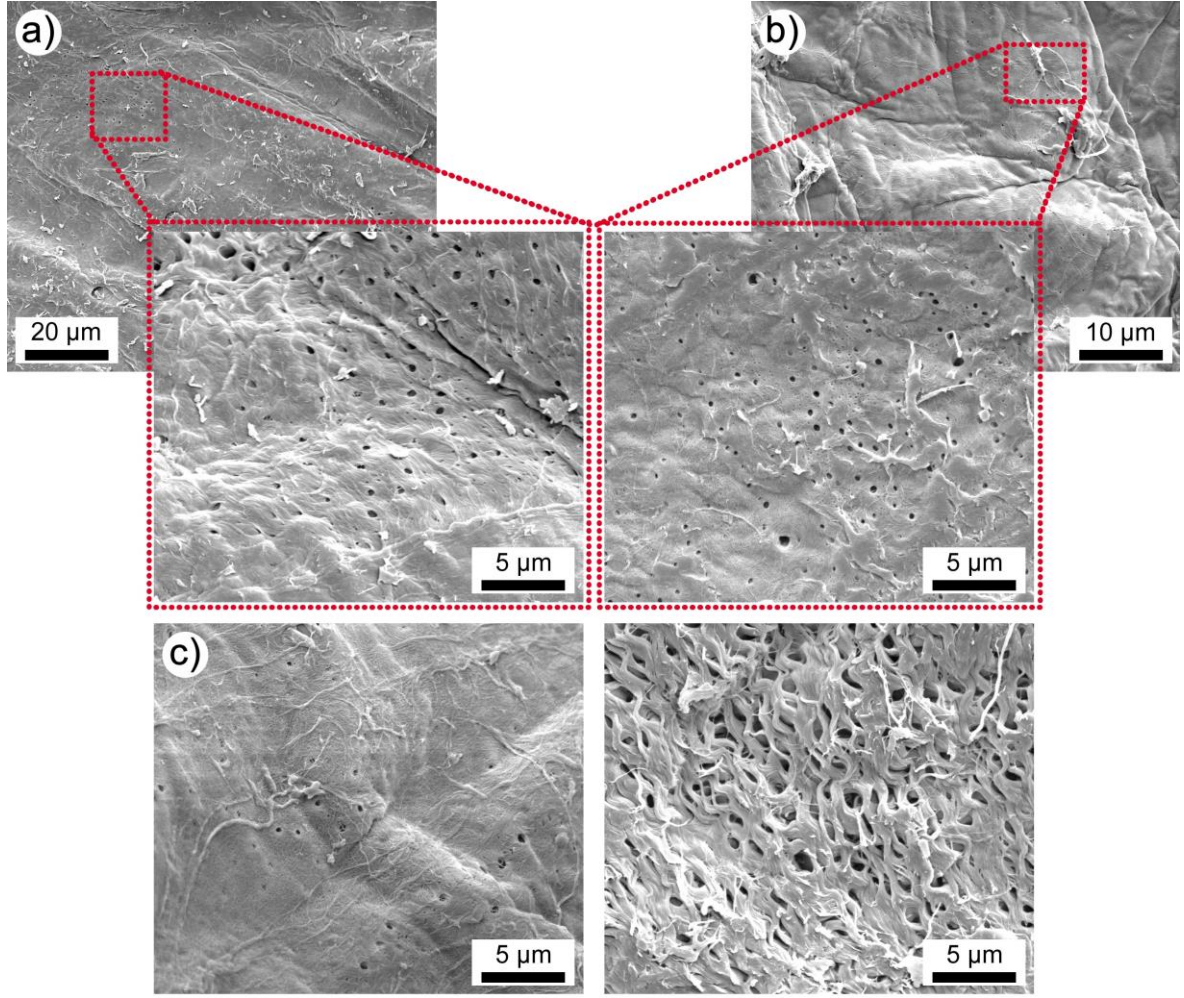
*J. regia* polenleri, polenin yüzeyi boyunca dağılmış kapalı yüzeysel porlar ile yuvarlak üçgen bir şekle sahiptir. Polenlerin boyutu yaklaşık olarak 38 µm olarak ölçülmüştür. Porlar sporopolleninde asit ve baz muamelesinden sonra ortaya çıkmıştır. NAA ve BAP enkapsüllemiş sporopollenin de SEM ile analiz edilmiştir. Porların içinde ve sporopollenin yüzeyinde fitohormonlar gözlenmiştir (Şekil 5.23.). SEM mikrografları başarılı bir şekilde BAP ve NAA'nın sporopollenine homojen olarak enkapsüllendiğini göstermiştir.



Şekil 5.23. SEM görüntüleri; a) polen, b) sporopollenin c, d) hormon yüklü sporopollenin

#### 5.7.4.3 Kitin

İzole edilen kitinin yüzey morfolojisi SEM ile analiz edilmiştir (Şekil 5.24.). SEM mikrografları, kitinin gözenekli ve lifli yüzey morfolojisine sahip olduğunu göstermiştir. Bu mikro gözenekler kitinin yüzeyi boyunca dağılmıştır ve yüzeyinde kalın lifler de gözlenmiştir. Kitin üzerinde BAP ve NAA'nın adsorpsiyonu ve buna bağlı olarak yüzeyin tamamen BAP ve NAA ile kaplandığı görülmüştür. Fitohormon yüzeysel kalıntıları, kitinin yüzeyi boyunca gözlenmiştir. Ayrıca, fitohormonlar, kitin yüzeyindeki gözenekli yapılar tarafından da adsorbe edilmiştir.



Şekil 5.24. SEM görüntüleri; a, b) kitin, c) hormon yüklü kitin fiberleri

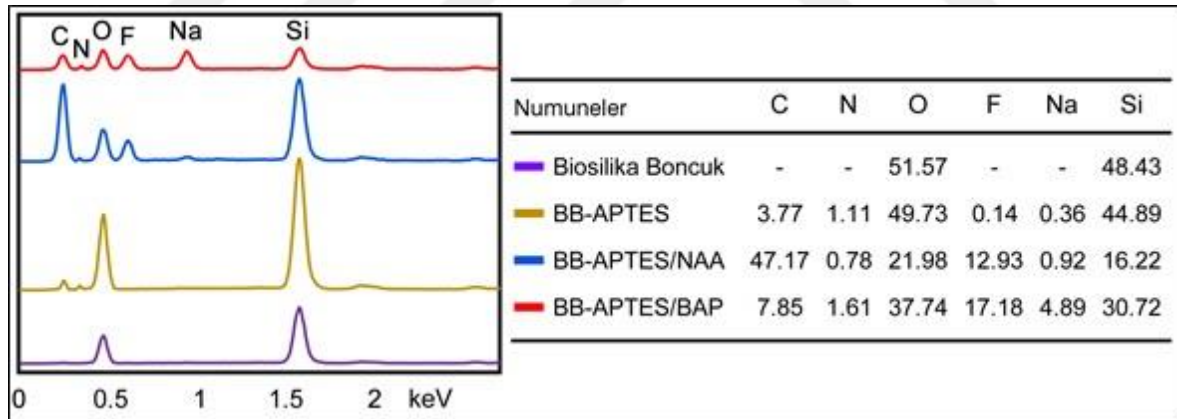
### 5.7.5 ENERJİ DAĞILIMLI X-IŞINI SPEKTROSKOPİSİ (EDX)

Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), katı yüzeylerin temel bileşimini analiz etmek için kullanılmaktadır. X ışını emisyonu, yüzeyin yüksek enerjili yüklü parçacık ışınıyla veya odaklanmış bir X ışını ışınlanmasıyla uyarılmaktadır. Bir atomun elektronik yapısının uyarılması, her elementin benzersiz bir özelliği olan kendine özgü bir X-ışını emisyonu üretebilmektedir. Bu nedenle, referans spektrumlarla karşılaştırma yoluyla element tanımlamasına izin veren bir "parmak izi" veya "imza" spektrumu elde edilebilmektedir.

Mevcut çalışmada, kimyasal modifikasyonlardan (yalnızca biyosilika boncuklar için) ve BAP ve NAA'nın enkapsülasyonundan (üç taşıyıcı için) sonra yüzey değişikliklerini doğrulamak için tüm taşıyıcılar EDX aracılığı ile analiz edilmiştir.

### 5.7.5.1 Biyosilika boncuk

$\gamma$ -APTES ile biyosilika boncukların yüzey işlevselliği EDX analizi yapılarak doğrulanmıştır (Şekil 5.25). O (%51,57) ve Si'nin (%48,43) iki güçlü sinyali, modifiye edilmemiş biyosilika boncuklar için kaydedilmiştir (Şekil 5.24.). Başka herhangi bir sinyalin olmaması, biyosilika boncuk örneklerinin saflığını doğrulamıştır.  $\gamma$ -APTES ile yüzey modifikasyonundan sonra, O ve Si' nin yanı sıra C (% 3,77) ve N (% 1,11) için ekstra sinyaller kaydedilmiştir. C ve N'un varlığı, biyosilika örneklerindeki aminopropilden kaynaklanmaktadır (202). Si ve O konsantrasyonundaki hafif bir azalma, bu serbest grupların aminopropile bağlanmasına atfedilmiştir. BAP'ın biyosilika boncuklara enkapsülasyonu de EDX ile doğrulanmıştır. Biyosilika boncuklar-NAA'nın spektrumlarında güçlü bir C (%47,17) sinyali kaydedilmiştir. C içeriğindeki bu belirgin artış, NAA'nın ( $C_{12}H_{10}O_2$ ) varlığından kaynaklanmaktadır. NAA enkapsüllemesinden sonra genel N, O ve Si konsantrasyonları azalmıştır. Bu, NAA ve yüzey ana grupları arasındaki bağ oluşumuna dayandırılmıştır. Benzer şekilde, biyosilika boncuklar-BAP spektrumu N (%1,61) ve O (%37,74) artışını ortaya çıkarmıştır. N konsantrasyonundaki bir artış, biyosilika boncuklarda BAP ( $C_{12}H_{11}N_5$ ) varlığından kaynaklanmaktadır.

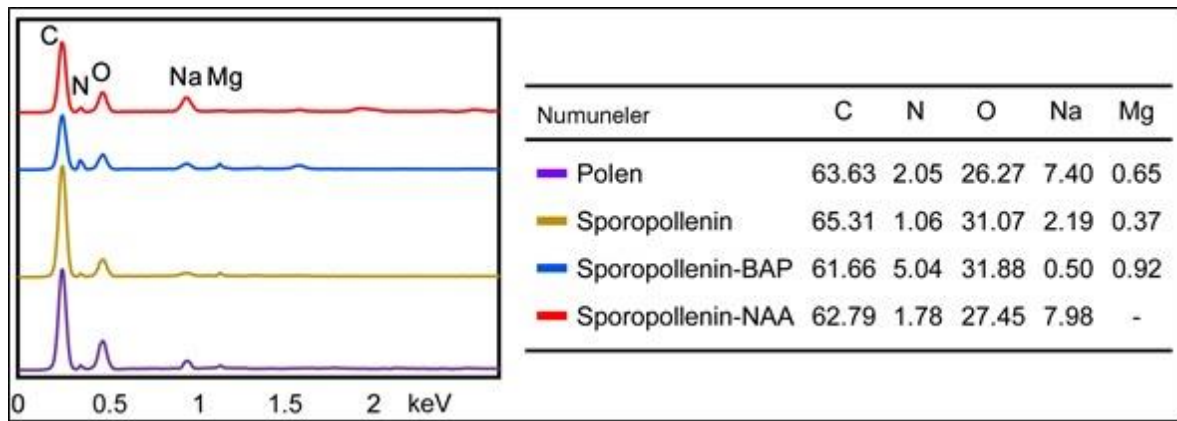


Şekil 5.25. EDX spektrumları; Biyosilika boncuk, Biyosilika boncuk-  $\gamma$ -APTES, Biyosilika boncuk-  $\gamma$ -APTES/NAA ve Biyosilika boncuk-  $\gamma$ -APTES/BAP (BB: Biyosilika boncuk).

### 5.7.5.2 Sporopollenin

Polen ve sporopolleninin EDX spektrumu, *J. regia* poleninin sporopollenine dönüşümü hakkında önemli bilgiler ortaya çıkarmaktadır (Şekil 5.26). Polen için güçlü C (%63,63), N (%2,05), O (%26,27) ve Na (%7,40) sinyalleri kaydedilmiştir. Sporopollenin'de, organik

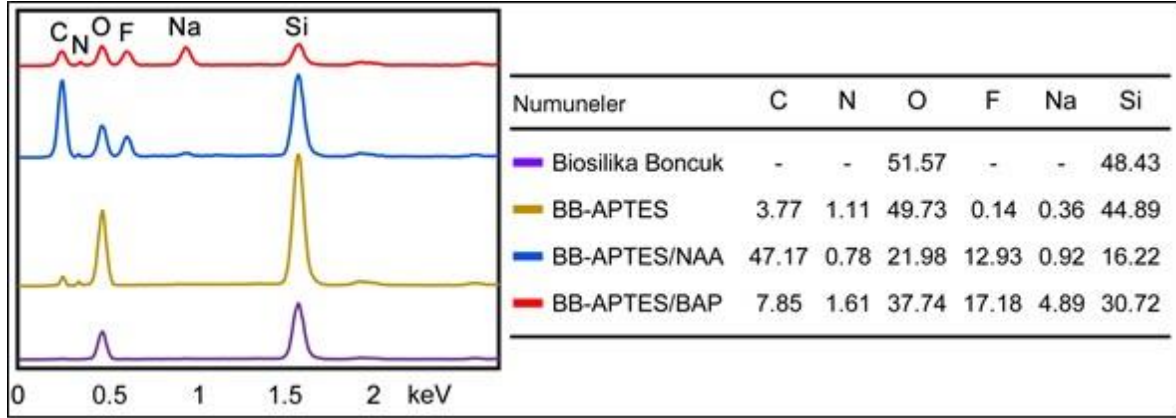
genetik materyallerin, lipidlerin ve renk pigmentlerinin uzaklaştırılmasından dolayı, N (%2,05'dan %1,06'a) ve Na' da (%7,40'dan %2,19'a) belirgin bir düşüş kaydedilmiştir. Ayrıca, sporopolleninde C ve O konsantrasyonlarında artış gözlenmiştir. EDX analizi, BAP ve NAA'nın sporopollenin mikro kafesleri içine başarılı bir şekilde enkapsülendiğini göstermiştir. Sporopollenin-BAP spektrumlarındaki N (%5,04) artışı, BAP ( $C_{12}H_{11}N_5$ ) varlığından kaynaklanmaktadır. Sporopollenin-BAP ile karşılaştırıldığında, sporopollenin-NAA spektrumları yüksek C konsantrasyonu (%62,79) ve düşük bir N konsantrasyonu (%1,78) göstermiştir. Elementlerin konsantrasyonlarındaki bu değişiklikler NAA ( $C_{12}H_{10}O_2$ ) varlığına karşılık gelmektedir.



Şekil 5.26. EDX spektrumları; Polen, Sporopollenin, Sporopollenin-BAP ve Sporopollenin-NAA.

### 5.7.5.3 Kitin

EDX spektrumları, BAP ve NAA bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kitine başarılı bir şekilde enkapsüle edildiğini göstermiştir (Şekil 5.27.). Yalnızca kitin (herhangi bir fitohormon içermeyen) C (%42,33), N (%7,44), O (%46,72) ve Na (%3,50) için güçlü pikler sergilemiştir. Bu piklerin yoğunlukları, BAP ve NAA yüklendikten sonra dalgalanma göstermiştir. Kitin-BAP için, C konsantrasyonu BAP ( $C_{12}H_{11}N_5$ ) varlığına bağlı olarak artmıştır (%42,33'ten %60,87'ye). Ayrıca, kitin yüzeyi tarafından BAP'ın başarılı adsorpsiyonuna işaret eden O konsantrasyonu azalmıştır. Benzer şekilde, N (%7,44'ten %11,45'e) konsantrasyonundaki artış, NAA'nın kitin yüzeyi tarafından başarılı bir şekilde adsorpsiyonunu kanıtlamıştır.



Şekil 5.27. EDX spektrumları; Kitin, Kitin-NAA ve Kitin-BAP.

### 5.7.6 TERMOGRAVİMETRİK ANALİZİ (TGA)

Termogravimetrik analiz (TGA), bir numune sabit bir oranda ısıtıldığında oluşan ağırlık değişimini izleyerek bir malzemenin termal stabilitesini ve uçucu bileşen fraksiyonunu belirlemek için kullanılan analitik bir tekniktir. TGA, önceden belirlenmiş ısıtma hızı ve sıcaklık koşulları altında ısıtmaya tabi tutulan nanomalzemeler ve polimer kompozitlerle ilişkili termal olayları anlamak için değerli bir araç görevi görmektedir.

Bu teknik, malzemenin kimyasal bileşimi hakkında bilgi vermektedir, çünkü farklı elementler ve bileşikler farklı bozulma sıcaklıkları göstermektedir. Bu çalışmada, NAA ve BAP'ın enkapsülasyonu veya adsorpsiyonundan sonra tüm numunelerin saflıklarını ve kimyasal değişimlerini öğrenmek için TGA analizi yapılmıştır.

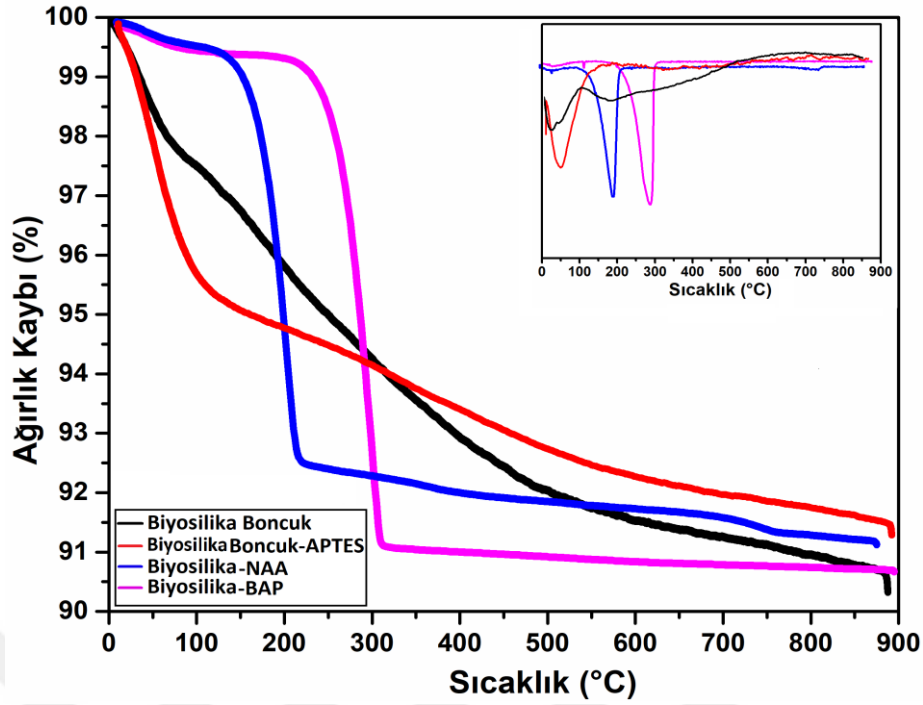
#### 5.7.6.1 Biyosilika boncuk

Biyosilika boncukların termal özellikleri TGA analizi ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.28.). Modifiye edilmemiş biyosilika boncuklar için kütle kaybı iki aşamada kaydedilmiştir. İlk bozulma 120 °C' nin altında %1,75 olarak belirlenmiştir (Çizelge 5.5.). Bu bozulma, silika yapıdan adsorbe edilmiş suyun buharlaşmasından kaynaklanmaktadır. İkinci kütle kaybı ise %5,13 olarak 120°C ile 900°C arasında gözlenmiştir. Bu kütle kaybı, artık organik maddenin biyosilika boncuklarının yüzeyinden ayrışmasına bağlanabilmektedir. Bu sonuçların önceki literatür raporlarıyla da uyumlu olduğu görülmüştür (140, 203).  $\gamma$ -APTES ile modifiye edilmiş biyosilika boncuklar için, ilk bozulma piki 0-100°C olarak kaydedilmiştir. NAA ile enkapsüllenmiş biyosilika boncuklar için üç degradasyon aşaması kaydedilmiştir. %2,44'lük ilk bozulma 120°C'nin altında kaydedilmiştir. Bu bozulma, biyosilika yapısından su

buharlaşmasına bağlanabilmektedir. %51,75 civarında ikinci bozulma 224°C'de kaydedilmiştir. Bu kütle kaybı,  $\gamma$ -APTES ile modifiye edilmiş biyosilika boncuklar içine kapsüllenmiş NAA'nın bozulmasından kaynaklanmaktadır. Benzer şekilde, BAP yüklü biyosilika boncuklar için kütle kaybı üç farklı aşamada kaydedilmiştir. Yaklaşık %2,72'lik ilk kütle kaybı 200 °C'nin altında gözlenmiştir. Bu kütle kaybı, suyun buharlaşmasına bağlanabilmektedir. Yaklaşık %0,19'luk ikinci kütle kaybı 312,3°C'de meydana gelmiştir. Bu kütle kaybı, BAP'ın bozulmasından kaynaklanmaktadır. Üçüncü kütle kaybı ise 320°C'den 900°C'ye %46,92 civarında gözlenmiştir. Bu, biyosilika yapısındaki organik kalıntının bozulmasına bağlanabilmektedir.

Çizelge 5.5. Biyosilika bonuklarının termogravimetrik analiz sonuçları.

| Numuneler              | 1. kütle kaybı |       | 2. kütle kaybı |         | 3. kütle kaybı |         |
|------------------------|----------------|-------|----------------|---------|----------------|---------|
|                        | %              | °C    | %              | °C      | %              | °C      |
| Biyosilika boncuk (BB) | 1,75           | 120   | 5,13           | 120-900 | -              | -       |
| BB- $\gamma$ -APTES    | 1,02           | 0-100 | -              | -       | -              | -       |
| BB-NAA                 | 2,44           | 120   | 51,75          | 224     | -              | -       |
| BB-BAP                 | 2,72           | 200   | 0,19           | 312,3   | 46,92          | 320-900 |



Şekil 5.28. Biyosilika boncuk, biyosilika boncuk/APTES ve hormon yüklü biyosilika boncukların termogravimetrik analizi.

#### 5.7.6.2 Sporopollenin

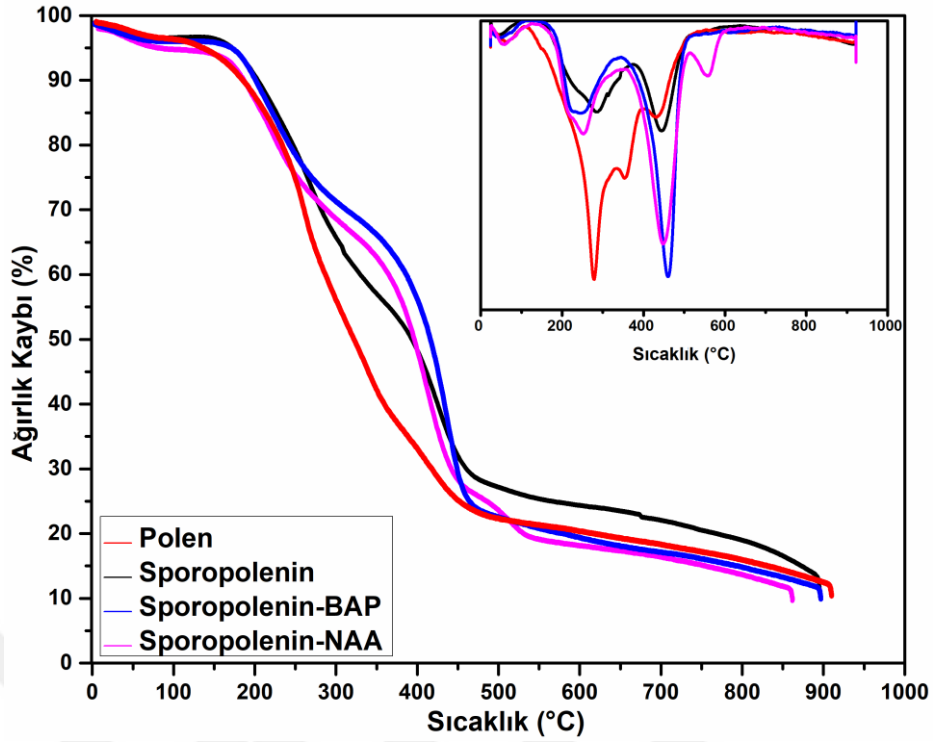
*J. regia* poleni ve sporopolleninin termal özellikleri TGA ile değerlendirilmiştir (Şekil 5.29.). Polen için kütle kaybı dört farklı bozulma aşamasında kaydedilmiştir. İlk kütle kaybı, yapıdan su kaybına karşılık gelebilecek 100°C'nin altında gözlenmiştir (Çizelge 5.6.). Sporopollenin dışındaki polimerik yapıların bozulmasına bağlı olarak maksimum bozulma sıcaklığı 278°C olarak belirlenmiştir. Bu selülozik bileşenlere veya hemiselüloza atfedilebilmektedir. Sporopollenin için kütle kaybı ise üç farklı aşamada kaydedilmiştir. Bu, polenden başarılı sporopollenin üretimini doğrulamaktadır. Maksimum bozulma sıcaklığı 444°C olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, aynı zamanda önceki ilgili bir çalışma ile uyumludur (204). Sporopollenin-BAP için, üç bozulma aşamasında kütle kaybı meydana gelmiştir. 120°C'de %2,23 olarak gözlenen ilk bozulma aşaması, sporopolleninin polimer yapısından suyun buharlaşmasına karşılık gelmektedir. 200-300°C arasındaki ikinci kütle kaybı, BAP ve sporopolleninin diğer organik bileşenlerinin bozulmasından kaynaklanmaktadır.

TGA/dTG sonuçları, BAP'ın sporopollenine enkapsüle olduğunu kanıtlamaktadır. Bu sonuçlar, BAP yüklü sporopolleninin kütle kaybında azalmayı ortaya koymuştur. Bu

azalmanın NaOH hidrolizinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Her iki fitohormonun sporopollenine enkapsülasyonu 1,33 N NaOH solüsyonunda gerçekleştirilmiştir. NaOH'nin BAP ve NAA için bir çözücü olarak rolünün yanı sıra, sporopolleninde kalan herhangi bir organik bileşeni de ortadan kaldırdığı düşünülmektedir. Üçüncü kütle kaybı 458°C'de gözlenmiştir ve bu, BAP yüklü sporopolleninin degradasyonuna karşılık gelmektedir. Sonuçlardan da görülebileceği gibi dTGmax 444,0 °C' den 458,4 °C' ye çıkmaktadır. DTGmax' ta ki bu artış, sporopollenin içinde kalan BAP'ın degradasyonundan kaynaklanmaktadır. Sporopollenin-NAA için benzer şekilde, üç degradasyon aşaması gözlenmiştir. 100°C' nin altındaki ilk bozulma suyun buharlaşmasına atfedilmektedir. 250,0 °C' deki ikinci bozulma ise NAA'nın bozulmasına karşılık gelmektedir. Üçüncü bozulma ve dTGmax 449,0 °C' de kaydedilmiştir.

Çizelge 5.6. Polen, sporopollenin ve fitohormon yüklü sporopolleninin termogravimetrik analiz sonuçları.

| Numuneler         | 1. kütle kaybı |       | 2. kütle kaybı |       | 3. kütle kaybı |       | 4. kütle kaybı |     |
|-------------------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-------|----------------|-----|
|                   | %              | °C    | %              | °C    | %              | °C    | %              | °C  |
| Polen             | 1,86           | 0-100 | 33,01          | 278,3 | 11,93          | 430,1 | 17,17          | 900 |
| Sporopollenin     | 1,90           | 0-100 | 35,69          | 284,6 | 37,97          | 444,7 | -              | -   |
| Sporopollenin-BAP | 2,23           | 0-100 | 23,45          | 241,0 | 50,61          | 458,4 | -              | -   |
| Sporopollenin-NAA | 2,69           | 0-100 | 22,98          | 250,3 | 34,66          | 449,0 | -              | -   |



Şekil 5.29. Polen, sporopollenin ve hormon yüklü sporopollenin'in termogravimetrik analizi.

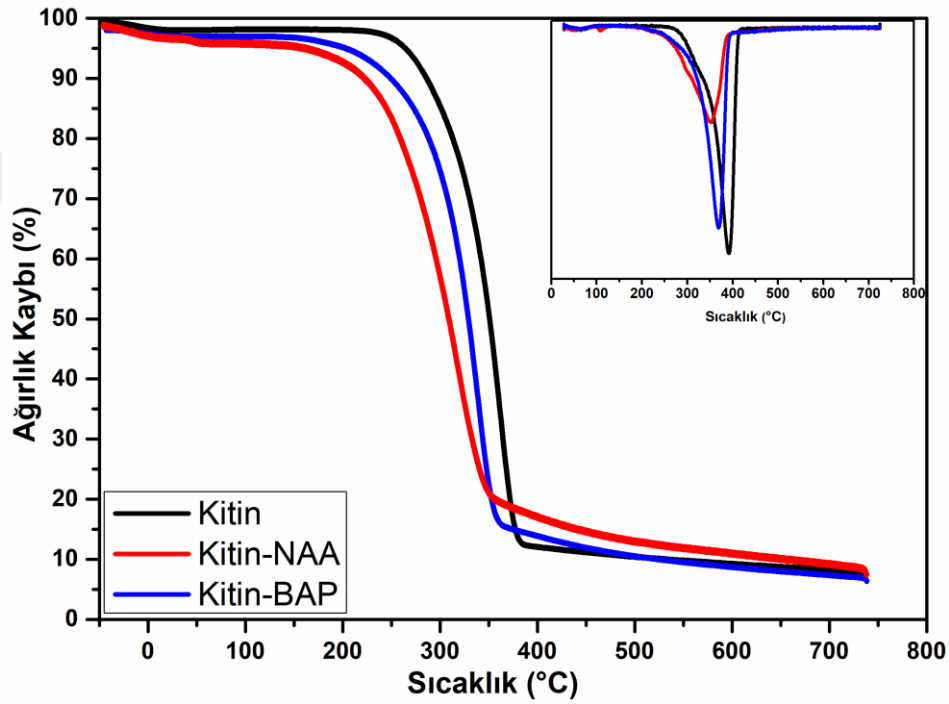
#### 5.7.6.3 Kitin

Kitinin termal özellikleri TGA ile analiz edilmiştir (Şekil 5.30.). Kitin için iki bozulma piki kaydedilmiştir. İlk kütle kaybı 0-100 °C'de %1,31 olarak gözlenmiştir (Çizelge 5.7.). Bu kütle kaybı, kitinin polimerik yapısından dolayı suyun buharlaşmasına bağlanabilir. Saniyede kütle kaybı 389,6 °C' de %92,28 olarak belirlenmiştir. İkinci kütle kaybı, polimerik yapının çoğunun bozunduğu dTGmax olarak adlandırılmıştır. Başka herhangi bir pikin olmaması, izole edilmiş kitinin saflığını göstermektedir.

Kitin-NAA için suyun buharlaşması %1,95 kütle kaybına neden olmuştur. NAA'nın bozulması 100-350°C arasında gerçekleşmiştir. Kitin-BAP için ise suyun buharlaşması %0,96 oranında kütle kaybına neden olmuştur. DTGmax 367,9 °C olarak kaydedilmiştir. DTGmax' da ki genel artış, NAA'nın bozulmasından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 5.7. Kitin ve fitohormon yüklü kitinin termogravimetrik analiz sonuçları.

| Numuneler | 1. kütle kaybı |       | 2. kütle kaybı |         |
|-----------|----------------|-------|----------------|---------|
|           | %              | °C    | %              | °C      |
| Kitin     | 1,31           | 0-100 | 92,2           | 389     |
| Kitin-NAA | 1,95           | 0-100 | 76,9           | 100-350 |
| Kitin-NAA | 0,96           | 0-100 | 84,6           | 367,9   |



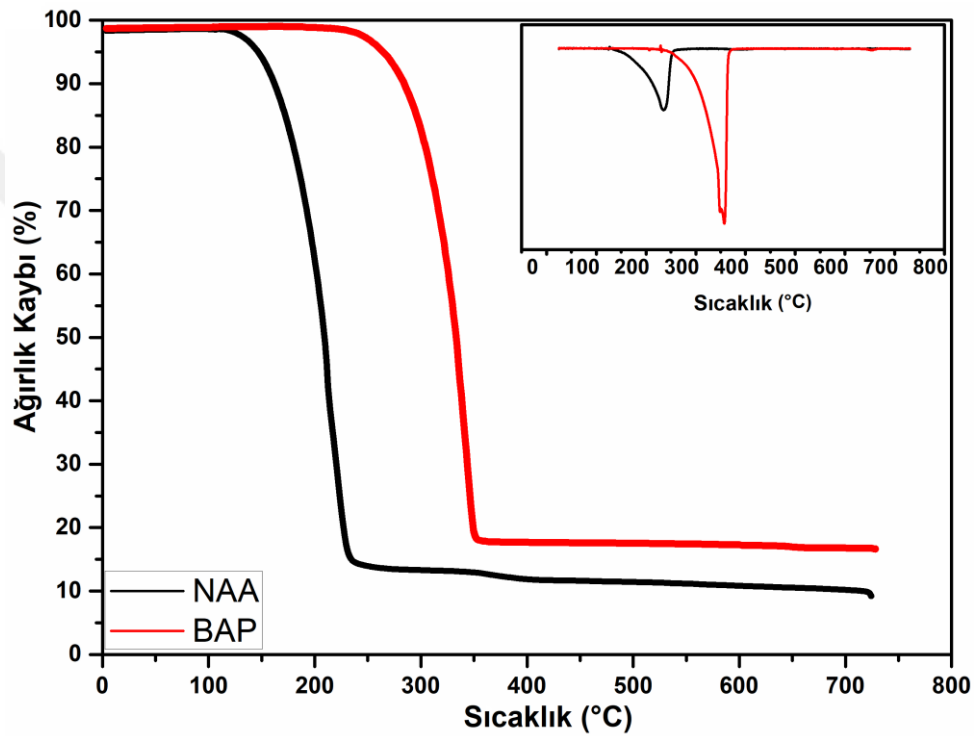
Şekil 5.30. Kitin ve hormon yüklü kitin'in termogravimetrik analizi.

#### 5.7.6.4 BAP ve NAA

BAP ve NAA'nın termal özellikleri de TGA ile analiz edilmiştir (Şekil 5.31). Sonuçlara göre NAA 248°C 'de, BAP ise 380-400°C'de bozulmuştur (Çizelge 5.8.). Başka degradasyon basamaklarının olmaması, kullanılan bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin saflığını göstermektedir.

Çizelge 5.8. 1-NAA ve 6-BAP'ın termogravimetrik analiz sonuçları.

| Numuneler | 1. kütle kaybı |       | 2. kütle kaybı |         |
|-----------|----------------|-------|----------------|---------|
|           | %              | °C    | %              | °C      |
| 1-NAA     | 0,85           | 0-100 | 87             | 248     |
| 6-BAP     | 0,92           | 0-100 | 89             | 380-400 |



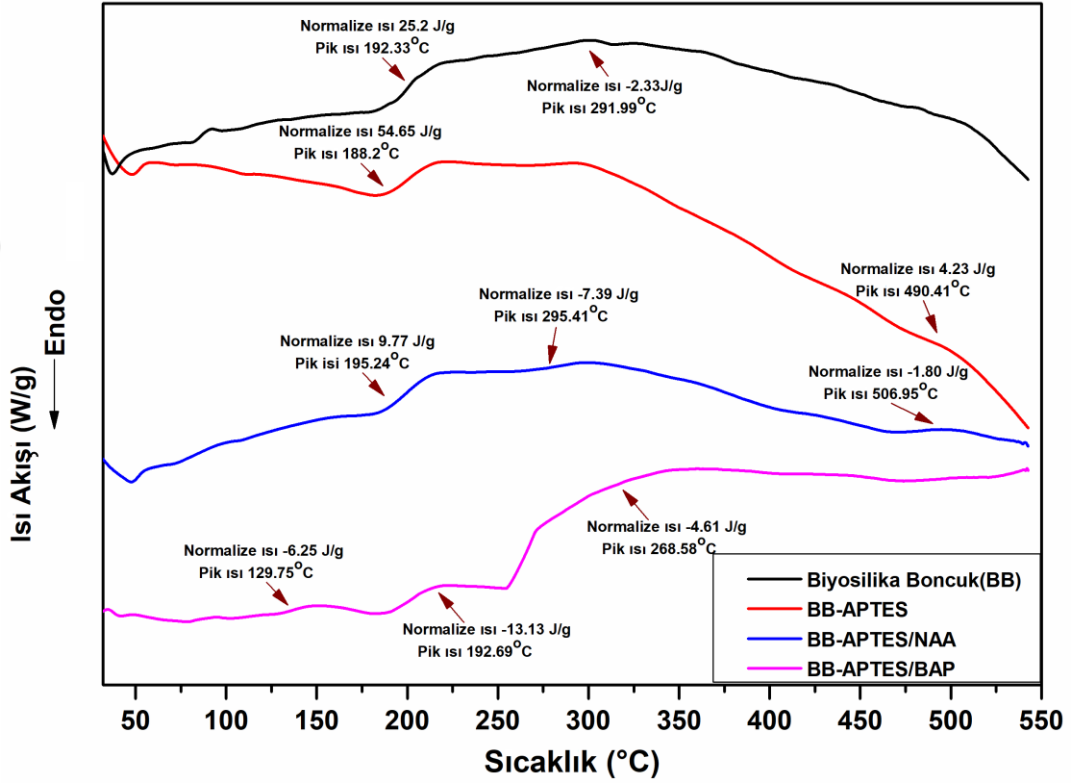
Şekil 5.31. NAA ve BAP'ın termogravimetrik analizi.

## 5.7.7 DİFERANSİYEL TARAMA KALORİMETRİSİ

### 5.7.7.1 Biyosilika boncuk

Biyosilika boncukların ve fitohormon yüklü biyosilika boncukların termal özellikleri DSC analizi ile tespit edilmiştir (Şekil 5.32.). Tüm örnekler için camsız geçiş sıcaklığı ( $T_g$ ) ve entalpi değişiminin detayı Çizelge 5.9'de verilmiştir. Biyosilika boncuklar için 141,67°C'de (ayrıca  $T_g$ ) bir endotermik pik kaydedilmiştir.  $\gamma$ -APTES ile modifiye edilmiş biyosilika boncuklar için,  $T_g$  pikleri 125,26 °C' de kaydedilirken, ikinci ekzotermik pik 457,20 °C' de kaydedilmiştir. İkinci ekzotermik pik, biyosilikanın yüzeyinde bulunan organik kalıntı  $\gamma$ -

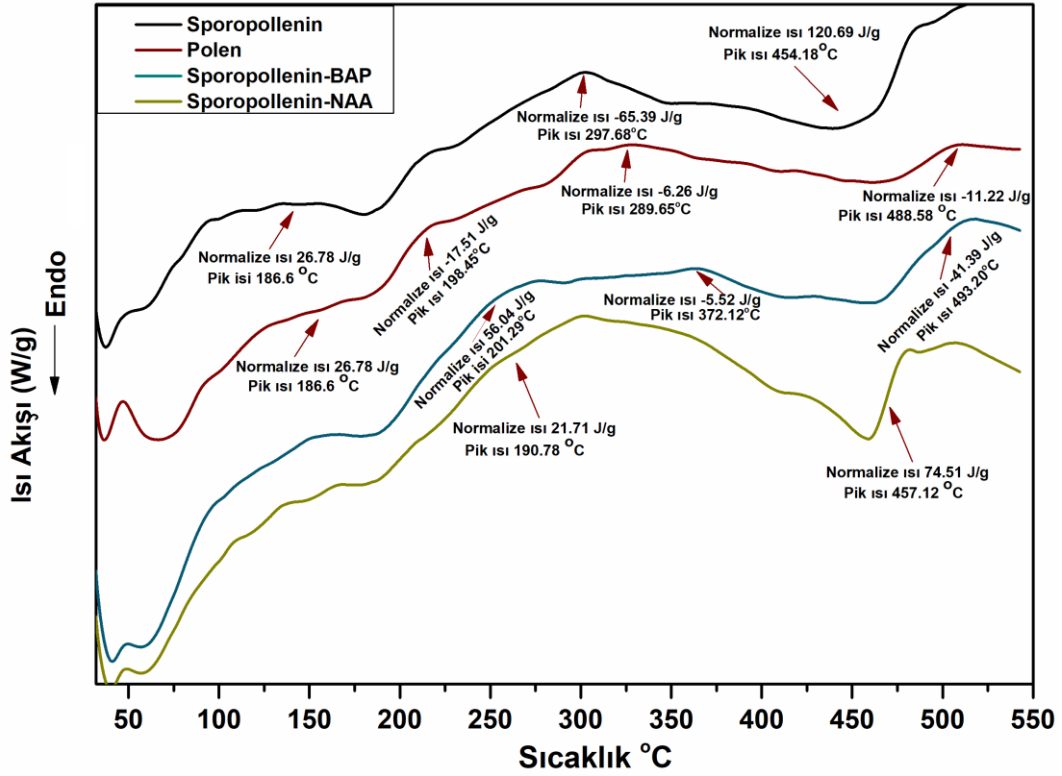
APTES' in bozulmasına karşılık gelmektedir. Bu aynı zamanda,  $\gamma$ -APTES aracılığıyla biyosilikanın başarılı bir şekilde yüzey işlevselleştirmesini de doğrulamıştır. NAA kapsüllenmiş biyosilika boncuklar için  $T_g$  piki 165,00°C olarak kaydedilmiştir.  $T_g$ 'de ki bu artış, NAA'nın organik bileşeninin bozulmasından kaynaklanmaktadır. BAP kapsüllenmiş biyosilika boncuklar için, ikinci endotermik pik 268,58°C'de kaydedilmiştir ve bu, BAP'ın degradasyonuna karşılık gelmektedir. Bu sonuçlar da dTG/TGA sonuçlarıyla uyumludur.



Şekil 5.32. Biyosilika boncuk ve BAP, NAA yüklü biyosilika boncukların DSC analizi.

### 5.7.7.2 Sporopollenin

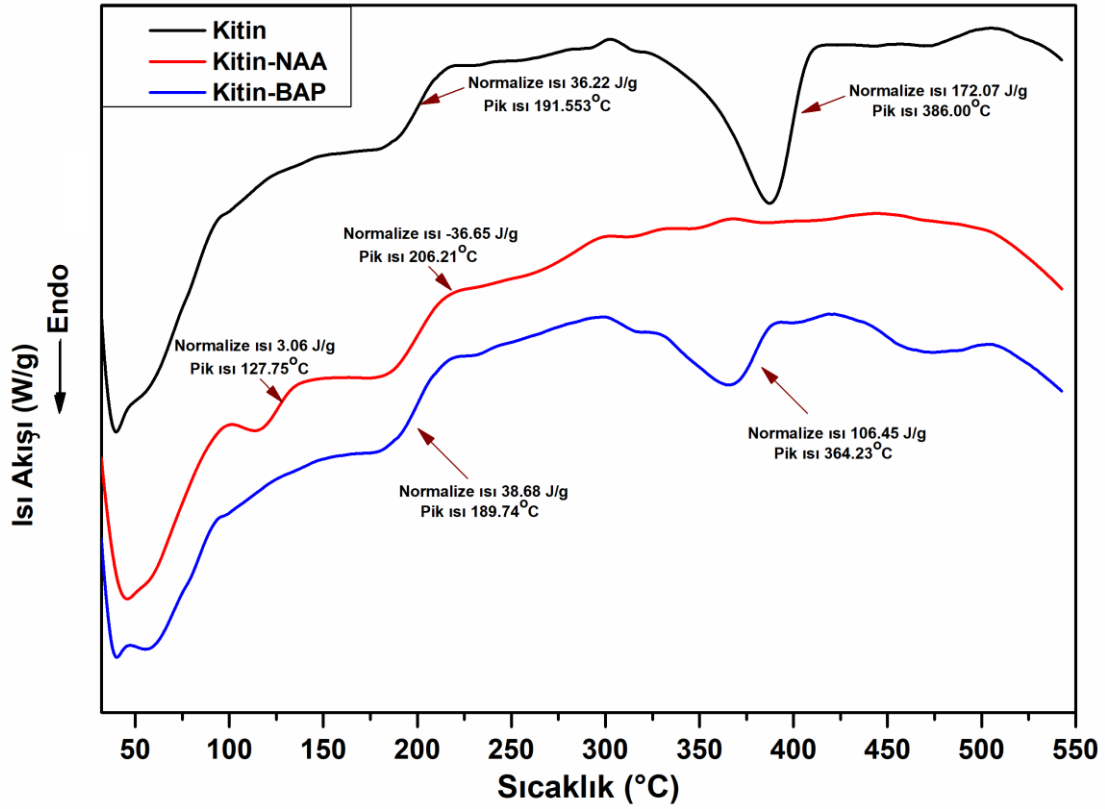
*J. regia* poleni ve sporopollenin DSC analizi Şekil 5.33'de gösterilmiştir. Sporopolleninin polenden izolasyonu, DSC analizi yoluyla başarıyla kanıtlanmıştır. Sporopollenin için 186°C ve 454°C'de (erime zirvesi) iki endotermik piki kaydedilmiştir.  $T_g$  değerleri polen, sporopollenin ve fitohormon yüklü sporopollenin için 37-39°C arasında kaydedilmiştir. Sporopollenin-BAP ve Sporopollenin-NAA için, sporopollenin yapısındaki BAP ve NAA nedeniyle farklı endotermik pikler gözlemlenmiştir. Bu sonuçların önceki literatür raporlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.



Şekil 5.33. Polen, sporopollenin ve BAP, NAA yüklü sporopolleninin DSC analizi.

### 5.7.7.3 Kitin

Kitin için, DSC analizinde iki ana endotermik pik kaydedilmiştir (Şekil 5.34.). İlk endotermik pik, suyun polimerik yapıdan buharlaşmasından kaynaklanmaktadır (87). İkinci endotermik pik ise kitinin polimer yapısının bozulmasına karşılık gelmektedir. Bu sonuçlar da TGA sonuçlarıyla uyum göstermiştir. NAA yüklü kitin örnekleri için, 126°C ve 206°C'de ( $T_{max}$ ) iki endotermik pik gözlenmiştir. İlk endotermik pik, suyun buharlaşmasından ve ikinci endotermik pik ise NAA'nın bozulmasına karşılık gelmektedir. BAP enkapsülenmiş kitin örnekleri için 187 °C ve 364 °C' de iki endotermik pik kaydedilmiştir. Birinci pik, suyun yapıdan buharlaşmasına, ikinci pik ise BAP'ın bozulmasına karşılık gelmiştir. DSC analizi, kitin yüzeyinde hem BAP hem de NAA bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin başarılı bir şekilde adsorpsiyonunu doğrulamıştır.



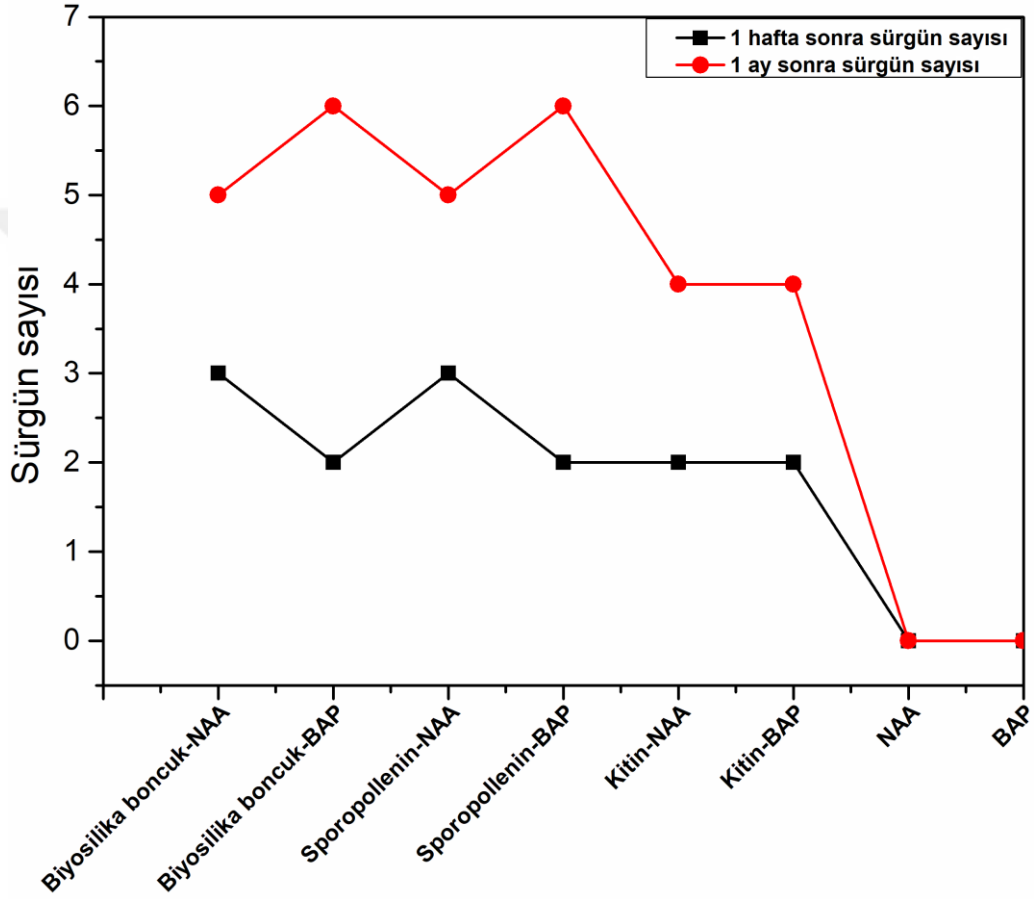
Şekil 5.34. Kitin ve BAP, NAA yüklü kitinin DSC analizi.

Çizelge 5.9. Biyosilika, Sporopollenin ve Kitin'in Tg ve  $\Delta H$  sonuçları.

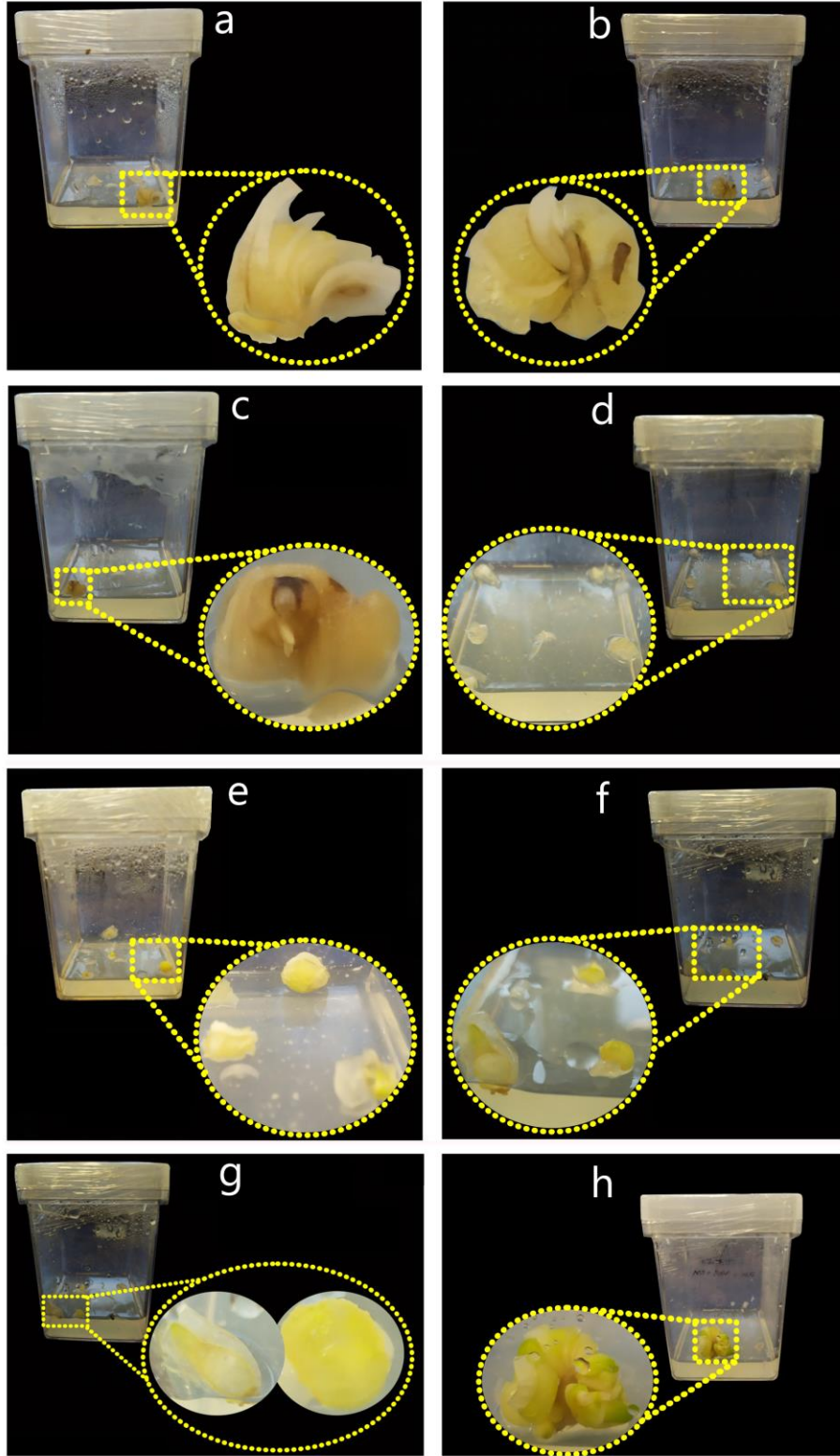
| Örnek                  | Tg (°C) | $\Delta H$ (J g <sup>-1</sup> ) |
|------------------------|---------|---------------------------------|
| Biyosilika Boncuk (BB) | 141,67  | 25,20                           |
| BB-APTES               | 125,26  | 54,65                           |
| BB-APTES/BAP           | 120,63  | -6,25                           |
| BB-APTES/NAA           | 165,00  | 9,77                            |
| Polen                  | 37,50   | -17,51                          |
| Spropollenin           | 38,61   | 26,78                           |
| Spropollenin/BAP       | 39,32   | 56,04                           |
| Spropollenin/NAA       | 38,23   | 21,71                           |
| Kitin                  | 147,73  | 36,22                           |
| Kitin/BAP              | 105,33  | 3,06                            |
| Kitin/NAA              | 147,57  | 39,66                           |

## 5.8 *M. NEGLECTUM*'un REJENERASİYONU

NAA ve BAP yüklü polimerik taşıyıcılar ile muamele edilen pul yaprak eksplantlar, serbest NAA ve BAP ile muamele edilen eksplantlara kıyasla daha yüksek rejenerasyon oranı sergilemiştir (Şekil 5.35.). Sonuçlara göre, kültürün 1 haftasından sonra başarılı bir kallus rejenerasyonu gözlemlemiştir (Şekil 5.36.). 30 gün sonra, rejenere kallustan soğan gelişimi gözlemlemiştir (Şekil 5.37.).



Şekil 5.35. Doku kültürü ortamında taşıyıcılar aracılı salım yapılan ve serbest uygulanan explantlarda sürgün sayısı.



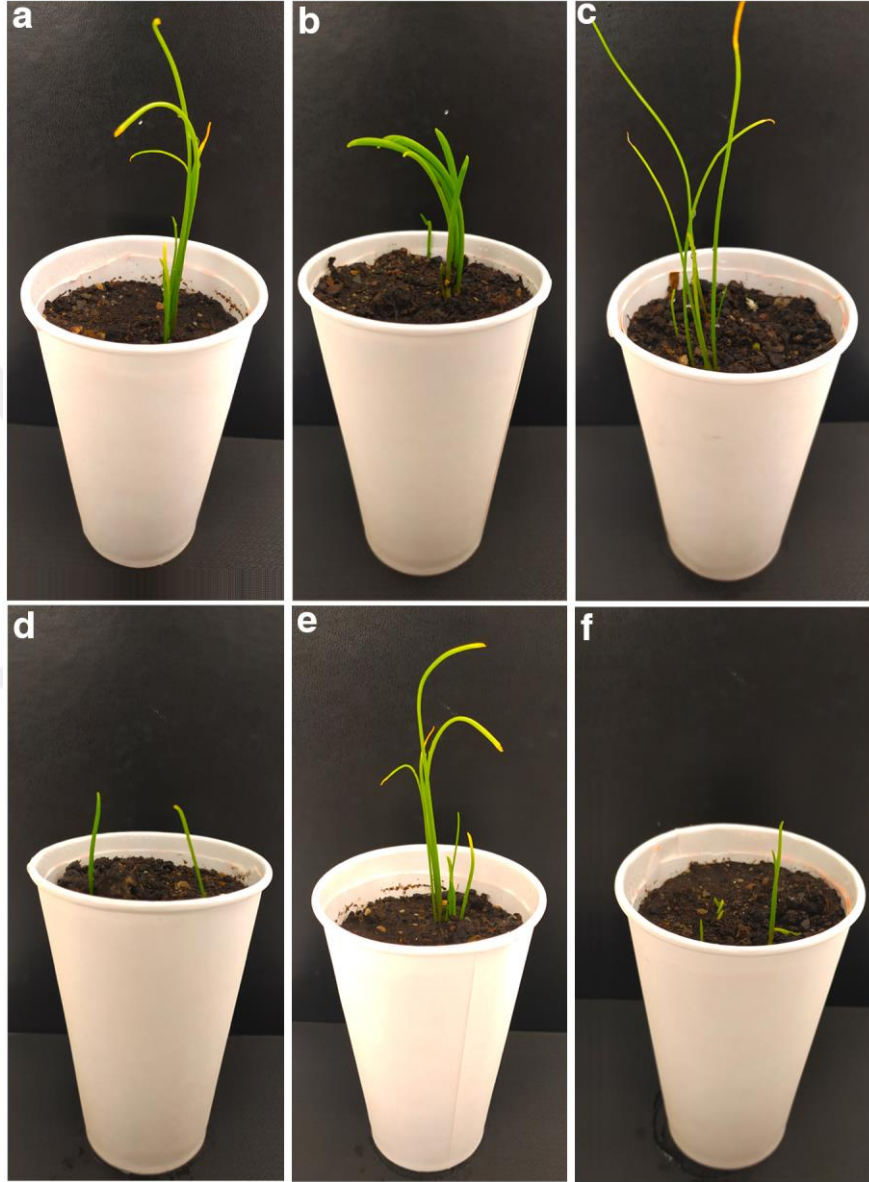
Şekil 5.36. *M. neglectum* eksplant kültürü (10. gün); a,b) Serbest NAA ve BAP ile uygulama yapılan pul yaprak eksplantlar; c,d) Kitin-NAA ve kitin-BAP ile uygulama yapılan pul yaprak eksplantlar; e,f) biyosilika bonucuk-NAA ve biyosilika boncuk-BAP ile uygulama eksplantlar; g,h) Sporopollenin-NAA ve Sporopollenin-BAP ile uygulama eksplantlar.



Şekil 5.37. *M. neglectum* eksplant kültürü (30. gün); a,b) Serbest NAA ve BAP ile uygulama eksplantlar; c,d) Kitin-NAA ve kitin-BAP ile uygulama eksplantlar; e,f) biyosilika bonucuk-NAA ve biyosilika boncuk-BAP ile uygulama eksplantlar; g,h) Sporopollenin-NAA ve Sporopollenin-BAP uygulama edilen eksplantlar.

## 5.9 TOPRAK KOŞULLARINA ALIŞTIRMA

Taşıyıcı malzemeler ile muamele edilen ve *in vitro* kültüründe geliştirilen *M. neglectum* Guss. bitkileri (50 günlük) toprak ortamlarına aktarılmıştır (Şekil 5.38.). Serbest NAA ve BAP ile muamele edilen soğan dokuları aşırı kararmadan dolayı rejenere olamamıştır.



Şekil 5.38. *In vitro* kültürda rejenere olan *M. neglectum* biktilerini toprak koşullarına alıştıırma; (a) Sporopollenin-NAA, (b) Sporopollenin-BAP, (c) Biyosilika boncuk-NAA, (e) Biyosilika-BAP, (d) Kitin-NAA ve (f) Kitin-BAP ile muamele edilen eksplantlardan gelişen bitkiler.

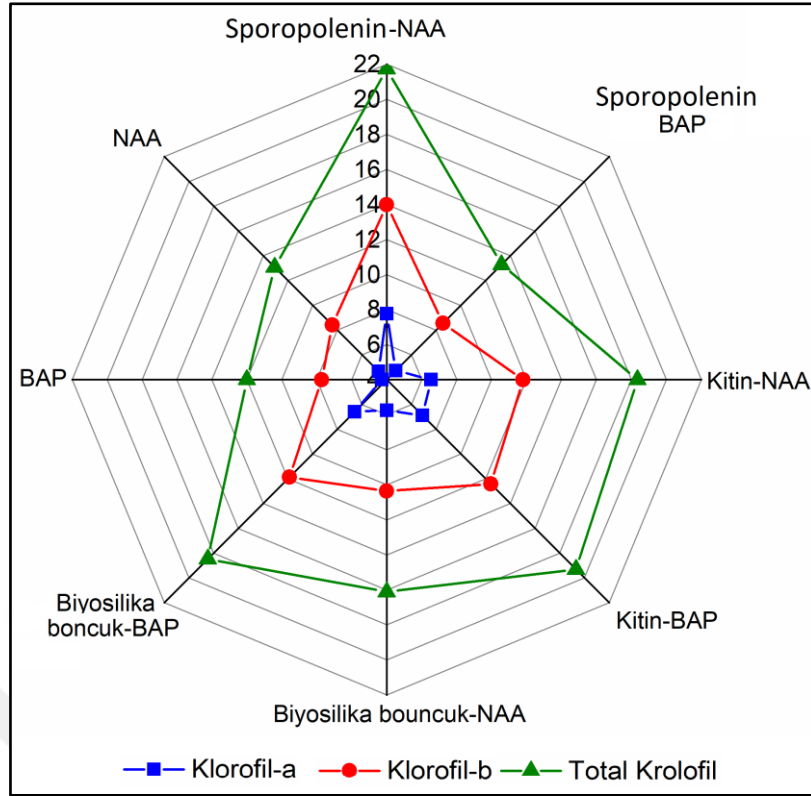
## 5.10 FOTOSENTETİK PİGMENTLERİN TAYİNİ

### 5.10.1 KLOROFİL İÇERİĞİ

Klorofil içeriği, herhangi bir biyotik veya abiyotik stres durumunda önemli farklılıklar gösteren önemli parametreler arasındadır. Bu çalışmada, kontrollü ve serbest BAP ve NAA uygulanmış *M. neglectum* eksplantları *in vitro* koşullarda toplam klorofil içeriği için önemli farklılıklar ortaya koymuştur (Şekil 5.39.). Fitohormonun biyomateriyal tabanlı taşıyıcılar ile dokulara salımı klorofil içeriğini normal seviyelerdeyken, serbest formdaki fitohormon verilen dokularda klorofil içeriğinde düşüş gözlenmiştir (Çizelge 5.10.). Elde edilen sonuçlara göre sporopollenin-NAA ile muamele edilmiş eksplant için en yüksek toplam klorofil içeriği ( $21,73 \pm 0,35$ ) (klorofil-a + klorofil-b) tespit edilmiştir. En düşük toplam klorofil içeriği ( $11,99 \pm 0,33$ ), serbest BAP fitohormon ile muamele edilmiş eksplant için kaydedilmiştir. Genel olarak, polimerik taşıyıcılar kullanılarak gerçekleştirilen kontrollü salıma tabi tutulan eksplantlar, serbest BAP ve NAA hormonları ile muamele edilmiş eksplantlara kıyasla daha yüksek klorofil içeriği göstermiştir. Bu sonuçlar, bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kontrollü salımının, NAA ve BAP'ın aktivitesini koruduğunu ve dolayısıyla dokulardaki stres koşullarını azaltarak kültür koşullarındaki eksplantların büyümesini olumlu yönde etkilediğini açıkça ortaya koymuştur.

Çizelge 5.10. Fitohormon yüklü polimerik taşıyıcılar ve serbest NAA ve BAP'ile uygulama yapılan *M. neglectum* eksplantlarına ait toplam fenolik, klorofil-a, klorofil-b, toplam klorofil, karotenoid,  $\beta$ -karotin ve likopen içeriği.

| Örnekler  | Toplam fenolik içeriği (mgGAE 100g <sup>-1</sup> ) | Klorofil-a mg L <sup>-1</sup> | Klorofil-b mg L <sup>-1</sup> | Total Klorofil mg L <sup>-1</sup> | Karotenoid mg g <sup>-1</sup> | $\beta$ -karotin mg g <sup>-1</sup> | Likopen mg g <sup>-1</sup> |
|-----------|----------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| BB-NAA    | 21,71 $\pm$ 0,45                                   | 5,74 $\pm$ 0,52               | 10,35 $\pm$ 0,56              | 16,10 $\pm$ 0,41                  | 1,61 $\pm$ 0,32               | 0,18 $\pm$ 0,09                     | 0,16 $\pm$ 0,04            |
| BB-BAP    | 22,82 $\pm$ 0,63                                   | 6,59 $\pm$ 0,65               | 11,88 $\pm$ 0,45              | 18,47 $\pm$ 0,11                  | 2,34 $\pm$ 0,58               | 0,19 $\pm$ 0,08                     | 0,19 $\pm$ 0,03            |
| SP-NAA    | 18,09 $\pm$ 0,12                                   | 7,75 $\pm$ 0,60               | 13,97 $\pm$ 0,26              | 21,73 $\pm$ 0,35                  | 2,71 $\pm$ 0,56               | 0,22 $\pm$ 0,03                     | 0,22 $\pm$ 0,08            |
| SP-BAP    | 18,65 $\pm$ 0,36                                   | 4,74 $\pm$ 0,55               | 8,54 $\pm$ 0,22               | 13,29 $\pm$ 0,85                  | 1,68 $\pm$ 0,65               | 0,14 $\pm$ 0,09                     | 0,16 $\pm$ 0,03            |
| Kitin-NAA | 23,09 $\pm$ 0,85                                   | 6,54 $\pm$ 0,14               | 11,88 $\pm$ 0,48              | 18,35 $\pm$ 0,49                  | 2,33 $\pm$ 0,23               | 0,19 $\pm$ 0,03                     | 0,19 $\pm$ 0,09            |
| Kitin-BAP | 23,88 $\pm$ 0,45                                   | 6,89 $\pm$ 0,16               | 12,41 $\pm$ 0,32              | 19,30 $\pm$ 0,56                  | 2,85 $\pm$ 0,18               | 0,20 $\pm$ 0,04                     | 0,19 $\pm$ 0,04            |
| NAA       | 39,42 $\pm$ 0,14                                   | 4,66 $\pm$ 0,35               | 8,40 $\pm$ 0,65               | 13,06 $\pm$ 0,29                  | 1,48 $\pm$ 0,29               | 0,12 $\pm$ 0,01                     | 0,12 $\pm$ 0,08            |
| BAP       | 38,42 $\pm$ 0,23                                   | 4,28 $\pm$ 0,25               | 7,71 $\pm$ 0,36               | 11,99 $\pm$ 0,33                  | 1,60 $\pm$ 0,65               | 0,13 $\pm$ 0,06                     | 0,12 $\pm$ 0,09            |

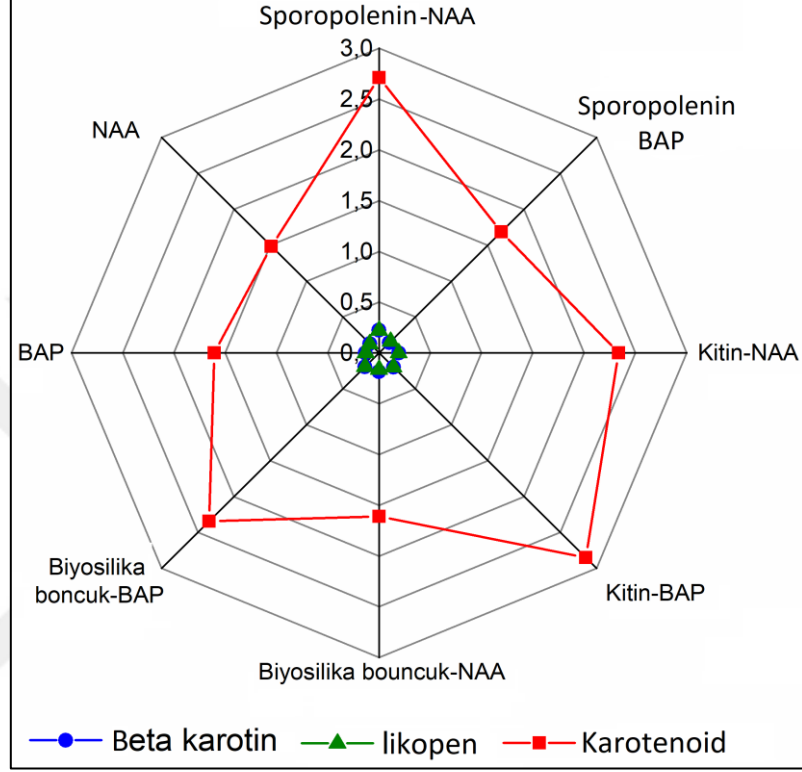


Şekil 5.39. Serbest BAP, NAA ve sporopollenin, biyosilika buncuk ve kitin aracılı yavaş salınım yapılan *M. neglectum* bitki dokularında klorofil a, klorofil b ve toplam klorofil içeriği (mg g<sup>-1</sup>).

### 5.10.2 LİKOPEN, KAROTENOİD VE BETA-KAROTEN İÇERİĞİ

Karotenoidler ve likopen de bitkilerde biyotik ve abiyotik stres durumunda süpürücü molekül görevi gören önemli antioksidan bileşikler arasındadır. Aynı bağlamda, kültür koşullarında kallusun oksidatif kararması sırasında likopen ve karotenoidler klorofilin fotoksidasyonunu önlemek gibi bazı önemli düzenleyici fonksiyonlarda görev almaktadır. Bu çalışmada, kontrollü ve serbest BAP ve NAA uygulanmış *M. neglectum* eksplantlarında toplam likopen, karotenoidler ve beta-karotenoid içeriği hesaplanmıştır (Şekil 5.40.). Likopen, karotenoid ve  $\beta$ -karoten içerikleri, BAP ve NAA yüklü biyomateriyal tabanlı taşıyıcılar ile muamele edilen eksplantlarda, bu bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin serbest formda uygulanmasına nazaran daha yüksek oranlarda kaydedilmiştir. En yüksek karotenoid içeriği ( $2.85 \pm 0,18$  mg g<sup>-1</sup>), BAP yüklenmiş kitin taşıyıcıların uygulandığı eksplantlarda kaydedilmiştir (Çizelge 5.10.). En düşük karotenoid içeriği ise ( $1.48 \pm 0,29$  mg g<sup>-1</sup>), serbest NAA dozu ile muamele edilen eksplantlarda kaydedilmiştir. En yüksek  $\beta$ -karoten içeriği ( $0,22 \pm 0,03$  mg g<sup>-1</sup>), NAA yüklenmiş sporopollenin taşıyıcıların uygulandığı

eksplantlar için kaydedilmiştir. En düşük  $\beta$ -karoten içeriği ( $0,12 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ ) serbest doz NAA ile muamele edilen eksplantlar için kaydedilmiştir. Benzer şekilde, NAA yüklenmiş sporopollenin taşıyıcıların uygulandığı eksplantlar için en yüksek likopen içeriği kaydedilmiştir. En düşük  $\beta$ -karoten içeriği ( $0,12 \pm 0,01 \text{ mg g}^{-1}$ ) serbest NAA dozu ile muamele edilmiş eksplantlar için kaydedilmiştir.

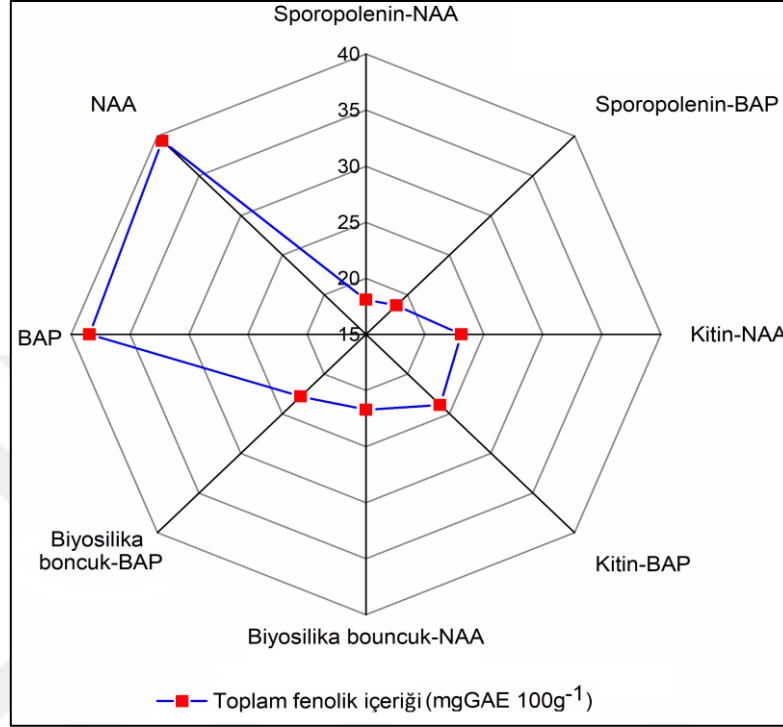


Şekil 5.40. Serbest BAP, NAA ve sporopollenin, biyosilika buncuk ve kitin aracılı yavaş salınım yapılan *M. neglectum* bitki dokularında beta karotin, likopen ve karoten içeriği ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

### 5.10.3 TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ

Bilindiği gibi fenolik içerik, bitkilerin in vitro kültürü sırasında doku kararmasının arkasında yatan en önemli nedenlerden bir tanesidir. Bu bağlamda, mevcut çalışmada, kontrollü ve serbest BAP ve NAA uygulanmış *M. neglectum* bitki dokularının toplam fenolik içerikleri hesaplanmıştır (Şekil 5.41.). Sonuçlara göre, serbest BAP ve NAA hormonlarına tabi tutulan eksplantlar için, taşıyıcılara enkapsüle edilen hormon formuna kıyasla daha yüksek toplam fenolik içerik göstermiştir (Çizelge 5.10.). Bu sonuçlar, bitki dokularının ilk hasarından sonra BAP ve NAA'nın yavaş salınmasının ve dolayısıyla BAP ve NAA bitki hormonlarının kültür ortamında sürekli mevcudiyeti nedeniyle ROS üretiminin yavaşladığı ve bu sayede

homeostaz gradiyentinin verimli bir şekilde dengelediğini açıkça göstermiştir. Sonuçlara göre en yüksek fenolik içerik serbest doz BAP ( $38,42 \pm 0,23$ ) ve NAA ( $39,42 \pm 0,14$ ) ile muamele edilen eksplantta kaydedilmiştir. En düşük fenolik içerik ise, NAA ( $18,09 \pm 0,12$ ) ve BAP ( $18,65 \pm 0,36$ ) taşıyan sporopollenin ile muamele eksplantlarda kaydedilmiştir.



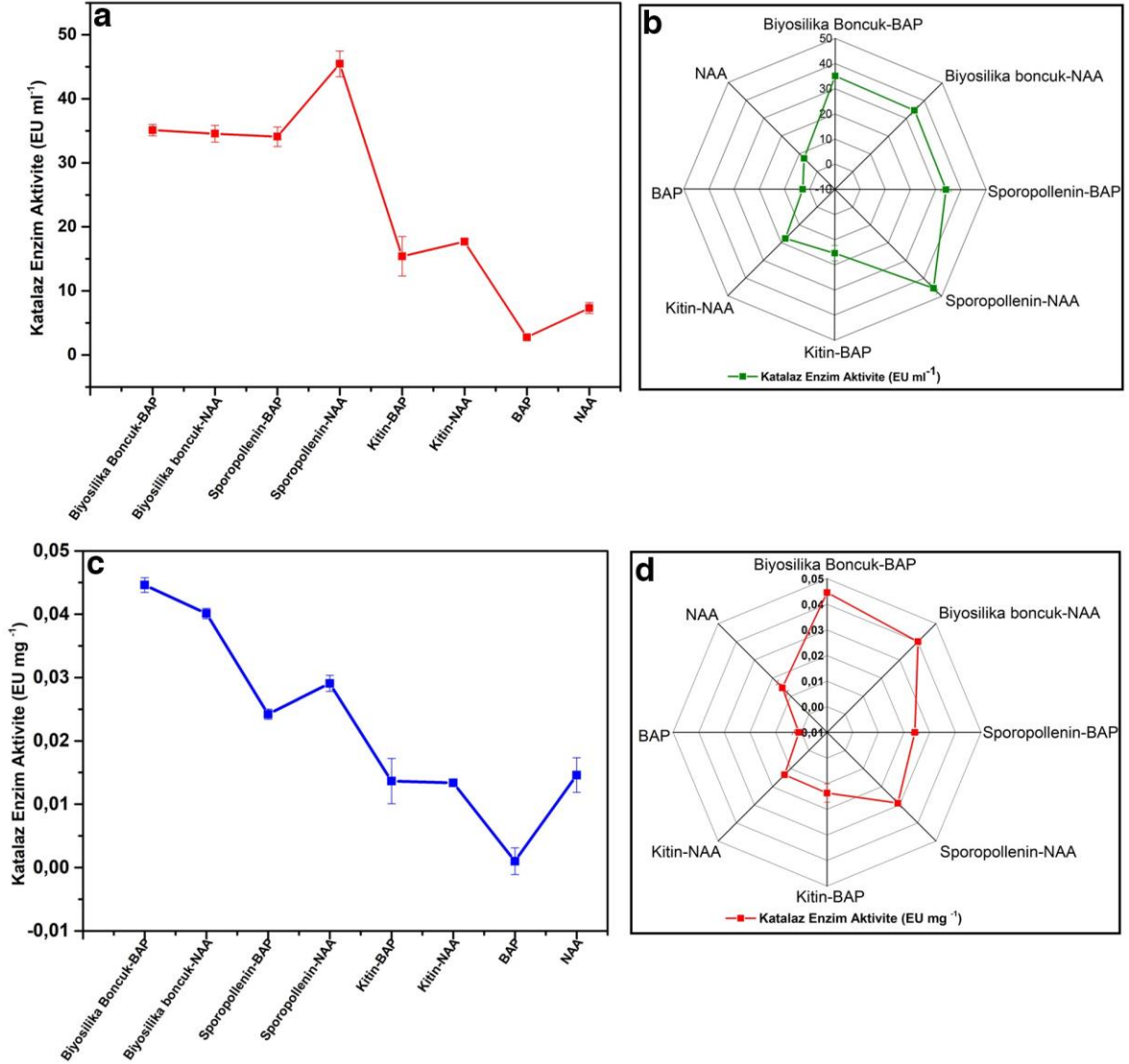
Şekil 5.41. Serbest BAP, NAA ve sporopollenin, biyosilika boncuk ve kitin aracılı yavaş salınım yapılan *M. neglectum* bitki dokularının toplam fenolik içeriği (mgGAE 100g<sup>-1</sup>).

## 5.11 *M. NEGLECTUM* EKSPLANTLARINDA ENZİM AKTİVİTELERİ

### 5.11.1 KATALAZ (CAT) ENZİM AKTİVİTESİ

*M. neglectum* bitkilerinin katalaz enzim aktivitesi (CAT) analiz edilmiş ve elde edilen sonuçlara göre, en yüksek CAT aktivitesi sporopollenin-NAA ( $45,45 \pm 2,00$ ) için kaydedilmiş ve bu sonucu BAP ve NAA içeren biyosilika boncuklar ( $34,55 \pm 1,31$  ve  $35,10 \pm 0,87$ ) takip etmiştir (Şekil 5.42.). En düşük CAT aktivitesi, serbest NAA ve BAP dozlarının uygulandığı eksplantlar için sırasıyla  $7,32 \pm 0,87$  ve  $2,75 \pm 0,00$  değerlerinde kaydedilmiştir. Sonuçlar, kültür ortamlarında kontrollü NAA ve BAP salınımının, CAT süpürücü moleküllerin seviyelerini arttırdığını ortaya koymuştur. Kültür koşullarında, eksplantlar, kesik, yaralanma ve kültür ortamlarının neden olduğu birçok stres koşulları altında kalmaktadır. Böyle bir durumda ROS moleküllerinin birikimi hemen başlamaktadır. Hormonların mevcudiyeti,

CAT ve SOD gibi süpürücü moleküllerin üretiminde önemli rol oynamaktadır (205). CAT, stres koşulları sırasında üretilen ROS'un detoksifikasyonunda önemli bir rol oynamaktadır.



Şekil 5.42. *M. neglectum* bitkisine ait katalaz (CAT) enzim aktivitesi; a, b) katalaz enzim aktivitesi (EU mL<sup>-1</sup>), c, d) katalaz enzim aktivitesi (EU mg<sup>-1</sup>).

Mevcut çalışmada, CAT seviyesi, deney gruplarında kontrol eksplantlarına kıyasla önemli ölçüde artmıştır. Artan CAT seviyesi, üretilen ROS moleküllerini önemli ölçüde detoksifiye etmekte ve eksplantı, programlı hücre ölümünden veya oksidatif kararma gibi doku hasarından korumaktadır (205). Kontrol grubu eksplantlarında, NAA ve BAP'ın serbest dozlarının kısa bir süre sonra aktivitesini kaybetmesi nedeniyle bu hormonlar eksplantlar için mevcut değildir (Çizelge 5.11.). Sonuç olarak, stres koşulları sırasında üretilen ROS

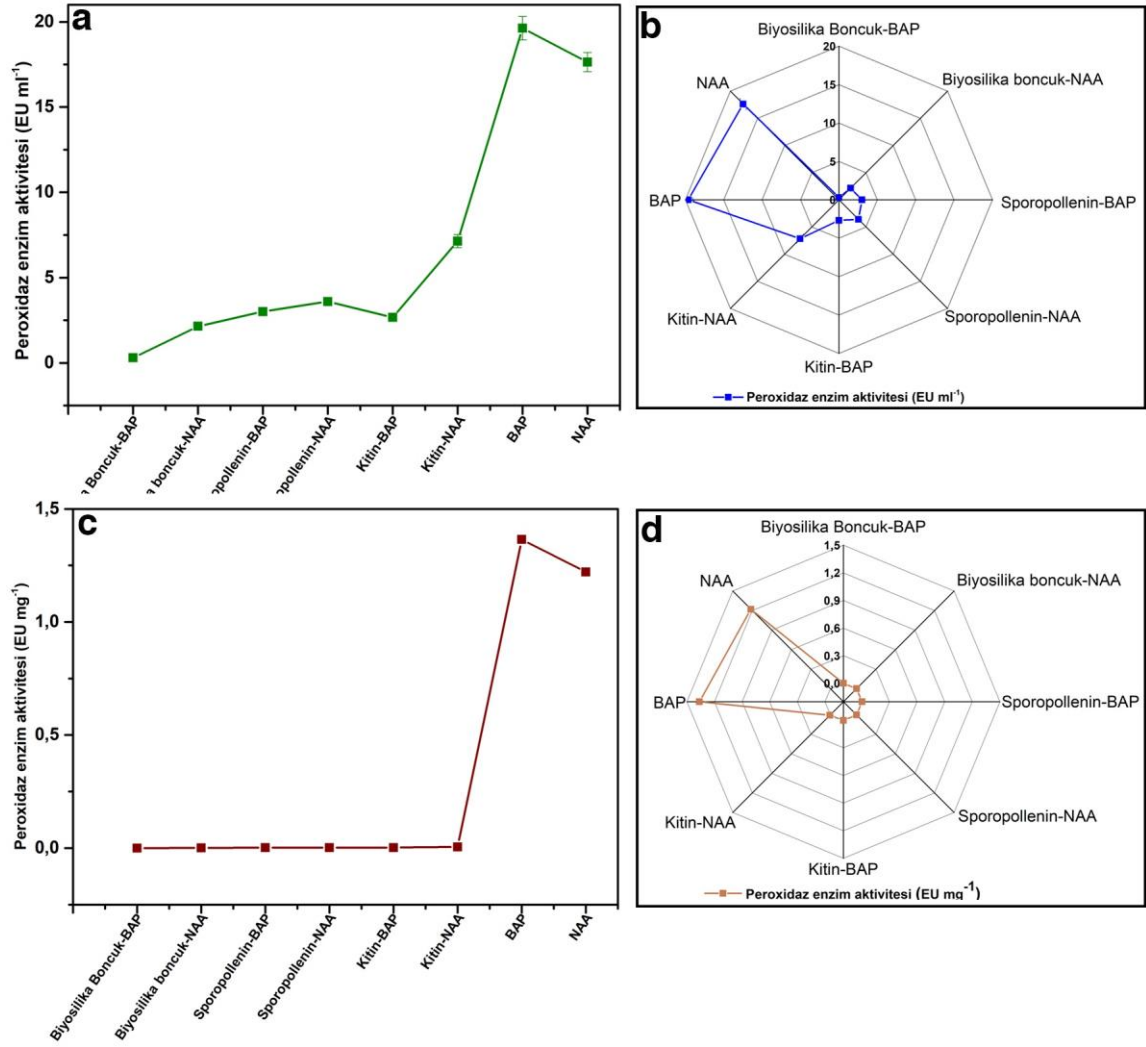
molekülleri, doku kararmasına neden olan CAT süpürücü moleküllerin yokluğunda daha yüksek konsantrasyonlarda birikmiştir.

Çizelge 5.11. *M. neglectum* eksplantlarına ait katalaz (CAT) enzim aktivitesi

| Örnekler              | EU/mL      | EU/mg       |
|-----------------------|------------|-------------|
| Biyosilika boncuk-BAP | 35.10±0.87 | 0,045±0,001 |
| Biyosilika bonuck-NAA | 34.55±1.31 | 0,040±0,001 |
| Sporopollenin-BAP     | 34.09±1.52 | 0,024±0,001 |
| Sporopollenin-NAA     | 45.45±2.00 | 0,029±0,001 |
| Kitin-BAP             | 15.40±3.06 | 0,014±0,004 |
| Kitin-NAA             | 17.68±0.44 | 0,013±0,000 |
| BAP                   | 2.75±0.00  | 1,059±0,032 |
| NAA                   | 7.32±0.87  | 0,015±0,003 |

#### 5.11.2 PEROKSİDAZ (POD) ENZİM AKTİVİTESİ

Peroksidaz enzimi (POD), fenolik bileşiklerin oksidasyonunu aktive etmekte ve hidrojen peroksit varlığında çeşitli antioksidan bileşiklerin tek elektron oksidasyonunu katalize etmektedir (206). POD enzimlerinin, bitkilerde doku kararması için bir aday olduğu da düşünülmektedir (Şekil 5.43.). Bitkilerde doku kararmasının önemli bir aday enzimi olan POD enzimlerinin seviyeleri, bu çalışmada, *M. neglectum* dokularında analiz edilmiştir.



Şekil 5.43. *M. neglectum* eksplantlarına ait peroksidaz (POD) enzim aktivitesi; a, b) peroksidaz (POD) enzim aktivitesi (EU mL<sup>-1</sup>), c, d) peroksidaz (POD) enzim aktivitesi (EU mg<sup>-1</sup>).

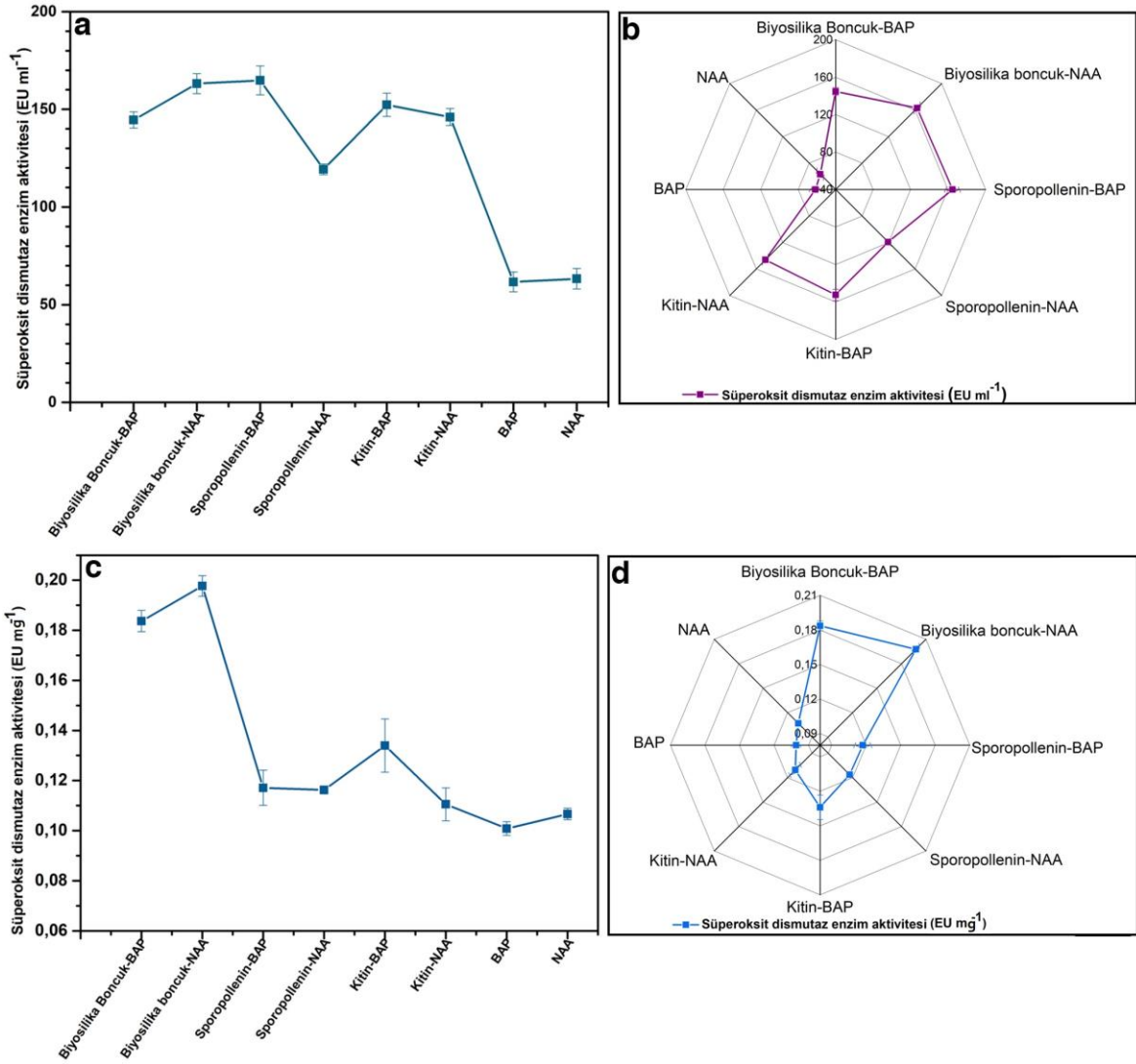
Sonuçlara göre, NAA ve BAP'ın serbest dozları ile muamele edilen eksplantlarda daha yüksek POD enziminin seviyeleri ( $19.63 \pm 0.68$  ve  $17.64 \pm 0.55$  EU mL<sup>-1</sup>) kaydedilmiştir. Öte yandan, NAA ve BAP enkapsüle edilmiş taşıyıcılarla muamele edilen eksplantlarda daha düşük POD enzim seviyeleri kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, doku kararomasında yavaş salınmanın rolünü doğrulamıştır (Çizelge 5.12.). Biyomateriyal tabanlı taşıyıcılar, NAA ve BAP salınımına aracılık etmiş, bu da hormonların eksplantlar tarafından daha uzun süre kullanılabilmesini sağlamıştır. Bu, CAT ve SOD yoluyla fenolik bileşiklerin zamanında inaktivasyonunu kolaylaştırmıştır. Kültür ortamında ROS ve diğer fenolik bileşiklerin bulunmaması, bu moleküllerin oksidasyonu, POD'un aktivitesini baskılamaktadır.

Çizelge 5.12. *M. neglectum* eksplantlarına ait peroksidaz (POX) enzim aktivitesi

| Örnekler              | EU/mL      | EU/mg          |
|-----------------------|------------|----------------|
| Biyosilika Boncuk-BAP | 0.30±0.055 | 0,0003±0,00008 |
| Biyosilika Bonuck-NAA | 2.15±0.122 | 0,001±0,00006  |
| Sporopollenin-BAP     | 3.01±0.094 | 0,002±0,00007  |
| Sporopollenin-NAA     | 3.59±0.268 | 0,004±0,00020  |
| Kitin-BAP             | 2.66±0.069 | 0,002±0,00013  |
| Kitin-NAA             | 7.14±0.382 | 0,005±0,00026  |
| BAP                   | 19.63±0.68 | 1,364±0,0087   |
| NAA                   | 17.64±0.55 | 1,221±0,0010   |

### 5.11.3 SÜPEROKSİT DİSMUTAZ (SOD) ENZİM AKTİVİTESİ

Süperoksit dismutazlar (SOD'lar) metalo enzimlerdir ve antioksidan savunmada önemli bir rol oynamaktadırlar (207). SOD'lar  $O_2^{\cdot-}$ 'nin  $H_2O_2$ 'e dismutasyonunu katalize ederken,  $H_2O_2$ 'nin uzaklaştırılması katalazlar ve/veya peroksidazlar tarafından gerçekleştirilmektedir. Mevcut çalışmada da *M. neglectum* bitki dokularında SOD seviyeleri NAA ve BAP'ın enkapsüle edilmiş ve serbest dozları ile muamele edilen eksplantlarda analiz edilmiştir (Şekil 5.44.).



Şekil 5.44. *M. neglectum* bitkisine ait süper oksidaz (SOD) enzim aktivitesi; a, b) Süper oksidaz (SOD) enzim aktivitesi (EU mL<sup>-1</sup>), c, d) Süper oksidaz (SOD) enzim aktivitesi (EU mg<sup>-1</sup>).

Elde edilen sonuçlara göre, enkapsüle edilmiş BAP ve NAA ile muamele bitki eksplantları, yüksek seviyelerde SOD aktivitesi göstermiştir. Bununla birlikte, NAA ve BAP'ın serbest dozları ile muamele edilen eksplantlar, düşük SOD seviyeleri göstermiştir. Bu sonuçlar, eksplant kararmasında NAA ve BAP'ın yavaş salınmasının rolünü bir kez daha kanıtlamıştır (Çizelge 5.13.). Serbest NAA ve BAP dozları ile muamele edilen bitki eksplantları, 1 haftalık kültürden sonra kararmaya başlamış ve 30 günlük kültürden sonra tamamen kararma gözlenmiştir.

Çizelge 5.13. *M. neglectum* eksplantrına ait Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi

| Örnekler              | EU/mL         | EU/mg       |
|-----------------------|---------------|-------------|
| Biyosilika Boncuk-BAP | 144,583±4,192 | 0,184±0,004 |
| Biyosilika Bonuck-NAA | 163,187±5,120 | 0,098±0,004 |
| Sporopollenin-BAP     | 164,795±7,404 | 0,117±0,007 |
| Sporopollenin-NAA     | 119,294±2,747 | 0,076±0,002 |
| Kitin-BAP             | 152,316±6,007 | 0,134±0,011 |
| Kitin-NAA             | 146,052±4,306 | 0,110±0,007 |
| BAP                   | 61,668±5,035  | 0,100±0,002 |
| NAA                   | 63,259±17,259 | 0,106±0,022 |

## 6 TARTIŞMA VE SONUÇ

### 6.1 TARTIŞMA

Bitkilerin *in vitro* kültürü sırasında doku kararması ortaya çıkan en yaygın sorunlardan biridir. Doku kararması, istenen sonuçlar için ilgili eksplantların manipüle edilmesini zorlaştırmaktadır. Oksidatif kararma olarak da bilinen doku kararmasının, fenolik bileşiklerin birikmesi ve oksidasyonundan kaynaklandığına inanılmaktadır (18). Bitki hücresi ve dokusu içinde bu fenolik bileşiklerin yoğun birikimi ve oksidasyonu büyümeyi engellemekte, doku ve eksplantların genel rejeneratif kabiliyetini azaltmaktadır (163-166). Şimdiye kadar yapılan çalışmalar, fenolik oksidasyon sürecine dahil olan reaktif oksijen türleri (ROS), fenolik bileşikler ve oksidatif enzimlerin varlığı/etkisi gibi doku kararmasından sorumlu birçok faktörü ortaya çıkarmıştır (167-169). Normal koşullarda ROS, hücreler arası iletişim gibi bitkinin farklı süreçlerinde önemli roller oynamaktadır. Bununla birlikte, *in vitro* kültür sırasında yaralanma, soğuk, UV ışığı, tuzluluk, kuraklık ve patojenler ile kontaminasyon gibi farklı stres koşullarına yanıt olarak ROS seviyeleri artmaktadır (170). Eksplant hazırlığı sırasındaki mekanik hasarın, kallus indüksiyonu sırasında kararmaya neden olan anahtar faktör olduğu düşünülmektedir. Normal koşullarda bitki hücresi, belirli bir ROS seviyesini korumakta ve bunu yalnızca hücreler arasındaki iletişim ve hücre içindeki diğer bazı önemli görevler için kullanmaktadır (171). ROS ayrıca sitokinler ve oksinler gibi endojen fitohormonların taşınmasında bilinen bir işleve sahiptir (172). Biyotik veya abiyotik stres durumunda, endojen bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin konsantrasyonuna kıyasla ROS üretimi yüksek seviyelere çıkmaktadır. ROS ve hücre içi bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin homeostaz gradiyentinin bozulması, dokuların nihai oksidatif kararmasına yol açan yolları tetiklemektedir (173).

Şimdiye kadar, ROS'un homeostazını ve endojen fitohormon seviyesini dengelemek için belirli önleyici stratejiler önerilmiştir (173). *In vitro* kültür sırasında, belirli bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kültür ortamına verilmesi, eksplantların istenmeyen kararmasını önlemek için birçok stratejiden biridir. Ancak dışarıdan uygulanan fitohormonlar çok kısa sürede aktivitelerini kaybetmekte ve eksplantlar için kullanılamaz hale gelmektedir (208). Bu amaçla fitohormonların korunaklı ve daha uzun sürelerde salınması gerekmektedir. Bu durum, dışarıdan uygulanan fitohormonların salınımını düzenleyerek başarılabilir. Bu amaçla, kapsüllenmiş bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin korumak ve bunların kültürü

ortamlarında uzun süre kullanılabilirliğini garanti etmek için uygun taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Gelişmiş analitik araçların geliştirilmesiyle polimer teknolojisindeki gelişmeler, farklı uygulama alanlarındaki çeşitli organik polimerik bileşiklerin ve malzemelerin gerçek potansiyelini ortaya çıkarmaktadır. En yaygın olarak kullanılan biyopolimerler arasında kitosan, kitin, selüloz, aljinat ve farklı formlardaki silika (nanopartiküller, mikropartiküller, mikro boncuklar, hidrojeller, nano veya mikrofiberler, vb.) bulunmaktadır (78). Bu malzemeler, biyolojik olarak parçalanabilirlik, toksik olmama, biyolojik uyumluluk gibi çeşitli avantajlı özellikleri sayesinde tıptan bitki bilimlerine kadar pek çok uygulamada kullanılabilmektedir (209). Fitohormonların kontrollü salımı için bu materyalleri kullanmak amacıyla bir dizi başarılı girişimde bulunulmuştur (210, 211). Ancak bu çalışmaların büyük bir kısmı, simüle edilmiş tampon sistemlerinde bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kapsüllenmesini ve kontrol salımını rapor etmektedir (212, 213). Çalışmalarda incelenen materyaller, sert kimyasal işlemler ve prosesler sonrasında üretilmektedir ve bu da genel prosesi ekonomik olmaktan çıkarıp, zaman alıcı hale getirmekte ayrıca vasıflı bir işgücü gerektirmektedir.

**Günümüze kadar, bitki kültürü koşullarında kontrollü fitohormon salımının etkisini bildiren bir çalışma bulunmamaktadır. Ayrıca, NAA ve BAP gibi bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kontrollü salımının, eksplantların oksidatif kararma üzerindeki etkisini rapor eden hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Bununla birlikte, bitkilerde kontrollü salım veya diğer bir uygulama amacıyla birçok keşfedilmemiş doğal biyomalzemeleri hala kullanılmayı beklemektedir. Örneğin sporopollenin, biyosilika ve kitin, kültür koşullarında eksplantların kararmasını önlemek için bitkilerde bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kontrollü salım uygulamaları için kullanılmayan biyomalzemelerin arasındadır.**

**Mevcut tez çalışmasında, konudaki araştırma boşluğunu kapatmak ve bitki kültürü ortamlarına bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kontrollü, koruyucu ve sürekli salımı amacıyla yeni taşıyıcı sistemler geliştirmek için öncü çalışmalarda bulunulmuştur.**

Bu tezde, BAP ve NAA'nın kontrollü salımı için üç doğal taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Bu sistemler *G. macandrewii*'den biyosilika boncuklar, *J. regia*'dan sporopollenin mikro

kafesleri ve karides iskeleti kaynaklı kitin'dir. Geliştirilen taşıyıcıların, fizikokimyasal özellikleriyle kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir.

### 6.1.1 BİYOSİLİKA

Mevcut literatür ışığında, oksidatif kararmaya bağlı eksplantların nekrozunu önlemek için kültür ortamında bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kontrollü salımı için biyosilika kullanıldığı rapor edilmemiştir. Bu tezde, *G. macandrewii*'den yeni izole edilen biyosilika mikro boncukları ilk kez bitki büyüme düzenleyicilerinin (BAP ve NAA) kontrol salım uygulaması için kullanılmıştır. Ayrıca, *G. macandrewii*'den yeni izole edilmiş biyosilika mikro boncukların yüzey işlevselleştirmesi ( $\gamma$ -APTES ile) üzerine ilk rapor olacaktır.

Biyosilika mikro boncuklar, çok temel bir kimyasal işlem takip edilerek *G. macandrewii*'den başarıyla üretilmiştir. İzole edilmiş boncuklar, FTIR, SEM, TGA, XRD, DSC ve EDX gibi bir dizi farklı analitik araç kullanılarak fizikokimyasal özellikleri için kapsamlı bir şekilde karakterize edilmiştir.

BAP ve NAA'nın başarılı bir şekilde yüklenmesi için ilk kez yeni izole edilmiş biyosilika boncukların yüzey işlevselleştirilmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla,  $\gamma$ -APTES,  $\text{NH}_2$  gruplarını biyosilikanın yüzeyine bağlamak için kullanmıştır. Hidroflorik asit muamelesi sonrası SEM görüntüleri açık gözenekleri ortaya çıkarmıştır.  $\gamma$ -APTES ile yüzey işlevselleştirme FT-IR ve EDX analizi ile onaylanmıştır. Fonksiyonelleştirilmiş biyosilika boncukların IR spektrumlarında,  $950\text{ cm}^{-1}$ 'de bir pikin varlığını göstermiştir ve pik silanol gruplarına karşılık gelmektedir.

Elde edilen bu sonuçlar, önceki literatür bildirişleri ile da uyumlu bulunmuştur (190). Shafqat, Khan (190) amino işlevli silika nanopartiküllerin üretimini bildirmiştir (40). Bu çalışmada yazar, silika yüzeyinin  $\gamma$ -APTES modifikasyonundan sonra en yüksek ana pikleri rapor etmiştir. Bu çalışmada da, biyosilika yüzeyinin  $\gamma$ -APTES ile başarılı bir şekilde işlevselleştirildiğini doğrulayan hemen hemen benzer pikler gözlemlenmiştir.

SEM görüntüleri, HF muamelesinden sonra kapalı gözeneklerin açıldığını doğrulanmıştır. Biyosilika boncukların çapı yaklaşık  $207,4 \pm 37,5\text{ }\mu\text{m}$  olarak kaydedilmiş ve boncukların yüzeyindeki gözeneklerin (kanalların) çapları  $2,3 \pm 1,2\text{ }\mu\text{m}$  olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar,

*G. macandrewii*'den biyosilika boncukların ilk izolasyonunu bildiren yakın zamanda yayınlanan makalelerimizden biri ile uyumludur (126).  $\gamma$ -APTES ile yüzey modifikasyonundan sonra, EDX sonuçları O ve Si'nin yanı sıra C (% 3,77) ve N (% 1,11) için ekstra sinyaller kaydedilmiştir. C ve N'nin varlığı, biyosilika örneklerindeki aminopropilden kaynaklanmaktadır. Bu çalışmadaki EDX sonuçları, aminopropil varlığının bildirdiği önceki literatür tarafından da desteklenmiştir (214).

Biyosilika boncuklarla BAP ve NAA'nın kapsülleme verimliliği sırasıyla %79,41 ve %36,46 olarak kaydedilmiştir.  $\gamma$ -APTES'deki XRD piklerinin şiddet değişimi, biyosilika yüzeyine amin gruplarının bağlanmasını önemli ölçüde doğrulanmıştır. Benzer bir çalışmada silika,  $\gamma$ -APTES kullanılarak modifiye edilmiştir. Araştırmacılar tarafından silikanın  $\gamma$ -APTES modifikasyonundan sonra pik şiddetindeki değişimi belirten benzer bir XRD difraktogramı bildirilmiştir (215).

BAP ve NAA'nın biyosilika boncuklara kapsüllemesi de FTIR, XRD, TGA ve EDX sonuçlarıyla doğrulanmıştır. Ek olarak, SEM görüntüleri, BAP ve NAA'nın biyosilika boncukların gözenekleri içine başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Kapsüllemiş biyosilika boncuklarının spektrumlarında BAP ve NAA'ya karşılık gelen önemli pikler kaydedilmiştir. Benzer bir çalışmada NAA, kontrollü salınımı için bir kitosan membranında kapsüllemişdir.

NAA enkapsüle edilen kitosanın IR spektrumlarında benzer FT-IR pikleri gözlenmiştir. Ayrıca NAA'nın yaklaşık %25'i ilk 6 saatte salınmıştır. Bununla birlikte, mevcut çalışmada, daha yavaş bir kümülatif salım kaydedilmiştir (216).

İzole edilen biyosilika boncukların termal olarak stabil olduğu belirlenmiş ve ikinci bozulma aşamasında sadece %5,13 bozulma kaydedilmiştir. Bu sonuçlar daha önce bildirilen verilerle uyum içinde gözlemlenmiştir (203). BAP ve NAA'nın biyosilika boncuklarına kapsüllemesinden sonra, 224°C ve 312°C'de yeni bozulma pikleri kaydedilmiştir. Bu bozulma pikleri, BAP ve NAA bozulma sıcaklıklarına benzerdir. Bu yeni bozulma piklerinin varlığı, BAP ve NAA'nın başarılı bir şekilde enkapsüllemesini açıkça doğrulamıştır.

Amorf biyosilika boncuklar için XRD desenleri  $2\theta$  'de kaydedilmiştir. Sonuçlara göre 22° de sadece tek bir geniş pik kaydedilmiştir. Diatom mikroalglerden doğal olarak organik

işlevselleştirilmiş 3D biyosilikanın izolasyonunu rapor edildiği önceki bir çalışmada da benzer sonuçlar bildirilmiştir (217). BAP ve NAA'nın kapsüllenmesi EDX analizi ile doğrulanmıştır. Biyosilika boncuklarının enkapsülasyonundan sonra EDX analiz sonuçlarında her iki hormonun tüm ana elementleri tespit edilmiştir.

DSC analizi, biyosilika boncuklarının faz değişimi ve kimyasal yapısı hakkında önemli bilgiler ortaya koymuştur. 141°C ve 457°C'de kaydedilen endotermik piklerin benzer bir çalışmanın sonuçlarına yakın olduğu gözlemlenmiştir. Bu çalışmada, silisli spiküllerin deniz süngerlerinden izole edildiğini rapor edilmiştir. İzole edilmiş spiküller için DSC endotermik zirveleri 116°C ve 432°C civarında kaydedilmiştir (218). Benzer şekilde NAA ve BAP kapsüllenmiş biyosilika boncukları, BAP ve NAA'ya özgü endotermik pikler sergilemiştir. Ayrıca DSC sonuçlarının, TGA sonuçları ile uyum içinde olduğunu gözlemlenmiştir.

### 6.1.2 SPOROPOLLENİN

**Tez çalışmasında; ilk kez sporopollenin *J. regia*'dan izole edilmiştir. Sporopolleninin polenlerden izolasyonu, önceki literatür bildirişlerini küçük değişikliklerle takip ederek gerçekleştirilmiştir (188).** Yeni izole edilen sporopollenin, ana özelliklere tam bir genel bakış elde etmek için bir dizi fizikokimyasal analize tabi tutulmuştur. *J. regia* poleninden başarılı sporopollenin üretimi, ışık mikroskobu, SEM, TGA, FT-IR, EDX ve XRD gibi farklı analizlerle doğrulanmıştır.

Işık mikroskobu görüntüleri, polenlerin asit ve baz hidrolizinden sonra dahili genetik materyallerin çıkarıldığını açık bir şekilde göstermiştir. Benzer şekilde, SEM görüntüleri de kimyasal işleminden sonra porların açıldığını ortaya çıkarmıştır. Benzer bir çalışmada, *Betula pendula* polenlerinden sporopollenin mikrokapsüllerinin üretimi, ışık mikroskobu görüntüleri ve SEM analizi ile doğrulanmıştır. Araştırmacılar, polenlerin asit ve baz hidrolizinden sonra iç genetik materyallerin ve diğer organik içeriğin uzaklaştırdığını bildirmişler (219)

Polen ve sporopolleninin IR spektrumları, başarılı izolasyonu doğrulayan büyük değişiklikler göstermiştir. Polen spektrumundaki O-H bağındaki geniş pik 3276 cm<sup>-1</sup>'den 3341 cm<sup>-1</sup>'e kaymıştır. 1675 cm<sup>-1</sup>'de keskin bir pik, sporopollenindeki karbonil fonksiyonel

gruplara karşılık gelmektedir. 1573  $\text{cm}^{-1}$ 'de pik (alifatik C=C germe), sporopollenindeki doymamış yağ asitleri yapılarını temsil etmektedir. 1511  $\text{cm}^{-1}$ 'de bir pik, sporopolleninde karakteristik C=C gerilmesine dayandırılmaktadır. Benzer bir çalışmada *Betula pendula*'dan izole edilen sporopolleninin IR spektrum için benzer sonuçlar kaydedilmiştir (204).

Sporopolleninin termal özellikleri TGA analizi ile belirlenmiştir. İç genetik materyallerin, pigmentlerin ve lipidlerin sporopolleninden uzaklaştırılması, 444°C'lik yüksek bir dTGmax değeri ile sonuçlanmıştır. Ayrıca, polende sporopolleninin bozulma aşamaları dörtten üçe indirilerek, sporopollenin izolasyonu teyit edilmiştir. Sporopolleninin *Platanus orientalis*'ten izole edildiği önceki bir çalışma da benzer şekilde bozulma basamakları bildirilmiştir (145).

Sporopollenin ve polen 'in XRD difraktogramları, sporopolleninin difraktogramında bazı pikler olmadığı için önemli bir fark ortaya çıkarmıştır. Bu, *J. regia* poleninin polimerik yapısından organik madde ve pigment kaybından kaynaklanmaktadır. Yeni izole edilmiş sporopollenin için 19° ve 20° 'de tipik pikler kaydedilmiştir. Benzer pikler, sporopolleninin *Lycopodium clavatum*'dan izole edildiği önceki bir çalışmada da bildirilmiştir (201).

Ayrıca EDX ve DSC analiz sonuçları, izolasyonun her aşamasında önemli bilgiler ortaya çıkarmıştır. EDX mikro analizi, asit ve baz hidrolizinden sonra N ve Mg konsantrasyonunda (%) önemli bir azalmayı işaret etmiştir. Bu sonuçların önceki literatür raporuyla uyumlu olduğunu göstermiştir (220).

BAP ve NAA'nın kapsüllenmesi de bir dizi fizikokimyasal analizlerle doğrulanmıştır. SEM mikrografları, yüzey üzerinde ve sporopollenin içinde fitohormonların varlığını açıkça göstermiştir. Ayrıca, bu fitohormonlarla yüklü sporopolleninin IR spektrumlarında BAP ve NAA'nın karakteristik pikleri kaydedilmiştir. Bu sonuçların önceki literatür bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür (221).

Benzer şekilde, BAP ve NAA'nın kapsüllenmesini doğrulamak için TGA analizi gerçekleştirmiştir. BAP ve NAA'dan sorumlu degradasyon basamakları, bu bitki büyüme ve düzenleyici maddeleri ile yüklü sporopolleninin TGA termogramlarında kaydedilmiştir.

Bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin temel unsurları, yüklü sporopolleninin EDX spektrumlarında tespit edilmiştir. Bu sonuçlar önceki literatür bulguları ile uyumlu olarak

kaydedilmiştir (210). BAP ve NAA enkapsüle edilmiş sporopolleninin DSC analizi, NAA ve BAP için tipik endotermik pikleri ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar da TGA sonuçlarıyla uyumlu olarak kaydedilmiştir.

### 6.1.3 KİTİN

Karides kitin, *M. neglectum* dokularında oksidatif kararmayı önlemek için NAA ve BAP için bir taşıyıcı sistem olarak kullanılmıştır. İzole edilmiş kitin, fizikokimyasal özelliklere kısa bir bakış açısı elde etmek için farklı analitik araçlarla analiz edilmiştir. **Şimdiye kadar hiç bir çalışma, kitinin fitohormonlar için bir taşıyıcı sistem olarak doğrudan kullanıldığını bildirmemiştir. Bu tez, kitinin bu amaçla doğrudan kullanımına ilişkin ilk rapor olacaktır.**

İzole edilen kitinin saflığı ve kristalografik formu FT-IR spektroskopisi ile analiz edilmiştir. IR spektrumları, amid I (C=O ikincil amid gerilmesi), amid II'ye (N—H bükülme, C—N germe) karşılık gelen üç karakteristik pik, yani 1650 cm<sup>-1</sup>, 1620 cm<sup>-1</sup> ve 1554 cm<sup>-1</sup> olmak üzere tüm ana pikleri sergilemiştir. İzole edilmiş kitin,  $\alpha$ -kitin olarak tanımlanmıştır. Bu sonuçlar, önceki literatür raporları tarafından da desteklenmiştir (182, 183). Benzer şekilde, termal özellikler TGA ve DSC analitik araçlarıyla analiz edilmiştir.

TGA analizinde ilk kütle kaybı 0-100°C'de %1,31 olarak gözlenmiştir. Bu kütle kaybı, kitinin polimerik yapısından suyun buharlaşmasına bağlanabilmektedir. İkinci kütle kaybı 389,6°C'de %92,28 olarak kaydedilmiştir. İkinci kütle kaybı, polimerik yapının çoğunun bozulduğu dTGmax olarak adlandırılmıştır. Başka herhangi bir pikin olmaması, izole edilmiş kitinin saflığının göstergesi olarak değerlendirilmektedir. Bu sonuçların, önceki literatür sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (222-224).

Karidesten elde edilen kitinin yüzey morfolojisinin, yüzey boyunca dağılmış mikro gözenekli liflerden oluştuğu gözlenmiştir. Bu, karideslerde yaygın olarak bulunan bir yüzey morfolojisidir, ancak bazı durumlarda, habitat ve organizmanın vücut kısımlarına bağlı olarak değişiklikler görülebilir. Hemen hemen benzer morfolojiler önceki bir literatür çalışmasında bildirilmiştir (225).

Kitinin XRD difraktogramları, 9° ve 19°'de majör pik yansımaları ortaya çıkarmıştır. Bunlar,  $\alpha$ -kitin'in karakteristik pikleridir. XRD analizi ayrıca izole edilmiş kitinin saflığını da doğrulanmıştır. Kitin izolasyonu ile ilgili benzer bir çalışmada, yakın benzerlikteki pikler bildirilmiştir (226).

Kitinin EDX spektrumları, izole edilmiş kitinin saflığını göstermiştir. Spektrumlarda tüm temel elementler tespit edilmiştir. Sonuçlara göre C (%42,33), N (%7,44), O (%46,72) ve Na (%3,50) için güçlü pikler kaydedilmiştir. Kalıntı Na'nın varlığı, baz hidrolizi sırasında kitin yüzeyindeki NaOH kalıntılarından kaynaklanmaktadır. Spektrumda, karidesten izole edilmiş kitinin saf olduğunu gösteren başka hiçbir istenmeyen element kaydedilmemiştir. Bu değerler önceki literatür raporu ile uyumlu görülmüştür (227).

DSC analizi, kitinin önemli endotermik pikleri ortaya çıkarmıştır. Sonuçlara göre, kitin için iki endotermik pik kaydedilmiştir. Benzer bir çalışmada, neredeyse benzer pikler rapor edilmiştir (228).

NAA ve BAP'ın kitin taşıyıcılarına yüklenmesi çeşitli analitik araçlarla takip edilmiştir. SEM, bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kitine yüklenmesi hakkında önemli bilgiler ortaya konmuştur. SEM görüntülerine göre, izole edilmiş kitinin yüzey morfolojisi, yüzey boyunca dağılmış liflerden ve mikro gözeneklerden oluşmaktadır. Bu tür bir yüzey morfolojisi, BAP ve NAA'nın yüzeye adsorpsiyonunu teşvik etmiştir. Diğer iki taşıyıcı sistemde, kafes benzeri bir yapının varlığı nedeniyle kapsülleme kaydedilmiştir.

Ayrıca, BAP ve NAA yüklü kitinin IR spektrumları, BAP ve NAA'ya karşılık gelen tipik pikler ortaya çıkarmıştır. Kitin-NAA'da 1629  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik NAA nedeniyle 1625  $\text{cm}^{-1}$ 'e kaymıştır. Ayrıca NAA kapsüllemeden sonra 1448  $\text{cm}^{-1}$  ve 876  $\text{cm}^{-1}$ 'deki piklerin keskinliği artmıştır. Kitin-BAP spektrumlarında 1457  $\text{cm}^{-1}$ , 1158  $\text{cm}^{-1}$ , 775  $\text{cm}^{-1}$ 'de pikler BAP adsorpsiyonundan sonra daha keskin hale gelmiştir. Sonuçlar önceki ilgili literatüre uygun olarak gözlemlenmiştir (198).

Termal özellikler, bitki büyüme ve düzenleyici

maddelerin yüklenmesinden sonra örneklerle başarılı bir yükleme gösteren bir kayma ortaya çıkarmıştır. TGA termogramları, BAP ve NAA için karşılık gelen bozulma pik noktalarını ortaya çıkarmıştır. Ayrıca DSC sonuçları TGA sonuçları ile uyum içinde kaydedilmiştir.

DSC'de ana endotermik olaylar, BAP ve NAA yüklendikten sonra kaydedilmiştir. Bu sonuçlar, önceki literatür bildirileri ile uyumlu olarak gözlenmiştir. (229).

EDX spektrumları, kitin numunelerinin yüzeyinde hormonların varlığını açık bir şekilde göstermiştir. Bu piklerin yoğunlukları, BAP ve NAA yüklendikten sonra değişikliklere uğramıştır. Kitin-NAA için, C konsantrasyonu (%42,33'ten %60,87'ye), BAP ( $C_{12}H_{11}N_5$ ) varlığına bağlı olarak artmıştır. Ayrıca, kitin yüzeyi tarafından BAP'ın başarılı adsorpsiyonuna işaret eden O konsantrasyondaki azalmadır. Benzer şekilde, N (%7,44'ten %11,45'e) konsantrasyonundaki bir artış, NAA'nın kitin yüzeyi tarafından başarılı bir şekilde adsorpsiyonunun kanıtı olarak değerlendirilmiştir.

#### **6.1.4 BİTKİ BÜYÜME VE DÜZENLEYİCİ MADDELERİN YÜKLENMESİ VE KONTROLLÜ SALIM**

Bu tezde, dokunun oksidatif kararmasını önlemek için *M. neglectum* kültür koşullarında BAP ve NAA bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kontrollü salımı için üç biyomateriyal tabanlı taşıyıcı sistem tasarlanmıştır. Bu sistemler, iki farklı pH (5,8 ve 7,4) koşulunda kontrollü salım özellikleri açısından test edilmiştir. İki pH sistemi kullanmanın arkasındaki sebep, değişen pH koşullarının salım profili üzerindeki etkisini test etmektir. Bir bitki kültürünün gerekli pH değerinin 5,8 olduğu bilindiği için, bu çalışmada da salım, bitki kültürü koşullarında test edilmeden önce pH 5,8'lik bir tampon sisteminde gerçekleştirilmiştir. Bu tezde BAP ve NAA, bitkilerin yaşamsal gelişim sürecinde aktif rol alan en önemli fitohormonlar arasında yer almaları nedeniyle seçilmiştir. Ayrıca, kültür koşullarında, araştırmacılar, esas olarak oksidatif kararmaya bağlı doku kaybını önlemek, istenen sonuçlar için eksplantların normal büyümesini teşvik etmek amacıyla kültür durumunu manipüle etmek için bu fitohormonları sıklıkla kullanmaktadır.

Şimdiye kadar birçok çalışma, bitkilerin tarımsal kimyasal, mikro ve makro besin maddelerinin kontrollü salımı için farklı taşıyıcı sistemlerin geliştirildiğini ve uygulandığını bildirmiştir. Ancak, kültür koşullarında oksidatif kararmayı önlemek amacıyla fitohormonların kontrollü salımı için biyomateriyal tabanlı yavaş salım sistemlerinin kullanıldığı hiçbir çalışma bildirilmemiştir. **Bu tez, kültür koşullarında doku ve eksplantların oksidatif kararmasını önlemek için BAP ve NAA gibi bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kontrollü salımına yönelik yeni biyopolimerik sistemlerin**

**kullanımını öneren ilk çalışma olacaktır. Bu taşıyıcı sistem, BAP ve NAA'nın kültür koşullarında daha uzun süre kullanılabilir olmasını sağlamıştır, böylece bitkiler hücrel homeostazlarını (hormon = ROS) korumak için onları daha uzun süre kullanabilmektedirler.**

Mevcut tezde, *M. neglectrum* bitki dokularının oksidatif kararmasını önlemek amacıyla BAP ve NAA bitki büyüme ve düzenleyici maddelerin kontrollü salımı, süngerlerden yeni keşfedilen Biyosilika boncukları, *J. regia* polenlerinden sporopollenin ve karidesten kitin taşıyıcılar ile gerçekleştirilmiştir.

Şimdiye kadar sporopollenin, farklı terapötik ilaçların, antibiyotiklerin ve diğer aktif moleküllerin kontrollü salımı için başarıyla kullanılmıştır. Yavaş salım söz konusu olduğunda, farklı bitki türlerinden sporopollenin bazı önemli sonuçlar göstermiştir. Ayrıca, boyut ve sağlamlık bakımından tekdüze olması sayesinde, çok yönlü ortamlarda farklı aktif moleküllerin salınması için kullanılabilir. Mevcut tezde *J. regia*'nın polenleri sporopollenin mikro kafeslerinin izolasyonu için kullanılmıştır. Sporopollenin-NAA'nın enkapsülasyon verimi %16,70 ve toplam yüklü hormon verimi ise %22,79 olarak kaydedilmiştir. Aynı şekilde sporopollenin-BAP için bu değerler sırasıyla %50,29 ve %80,29 olarak kaydedilmiştir. Bu kapsülleme değerleri, fitohormonların kontrollü salımı için geliştirilen çoğu taşıyıcı sistemden daha yüksek değerlerde kaydedilmiştir. Sporopolleninin kümülatif salım etkinliği, fitohormonların serbest salımına kıyasla çok daha kontrollü olarak kaydedilmiştir. Hem BAP hem de NAA için tanımlanmış 168 saat boyunca yavaş salım paterni kaydedilmiştir, ancak serbest uygulanan hormonlar için uygulamanın ilk 2 saatinde büyük bir yüzde (%70-80) salınmıştır. Mevcut tez çalışmasında, geliştirilen sistemlerin verimliliği hakkında genel bir fikir edinmek için, fitohormonların ve diğer agrokimyasalların biyopolimerik aracılı kontrollü salımını bildiren önceki bazı çalışmalara ayrıntılı bir genel bakış sağlanmıştır.

Çizelge 6.1. Fitohormonlar, ilaç ve zirai kimyasallar için kullanılan mikro ve makro taşıyıcılar.

| Biyopolimer matris                                   | Salınan malzeme                               | Salım kinetiği                    | Etki                                                        | Salım ortamı                                      | Referans |
|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|----------|
| <b>Poliglutamik asit / kitosan nanopartiküller</b>   | Gibberellik asit                              | 61% /yavaş salım                  | Çimlenme oranını arttırmak                                  | Tohum                                             | (119)    |
| <b>Kitosan mikro küreleri</b>                        | Naftalin-1-asetik asit ve indol-3-asetik asit | 68% ve 56%/yavaş salım            | -                                                           | <i>In vitro</i> salım /tamponlu ortamlarında      | (210)    |
| <b>Kitosan mikroküreler</b>                          | Brassinosteroidler ve diosgenin               | % 10 -% 50 / yavaş salım          | -                                                           | pH 7.0'da etanol ve su                            | (120)    |
| <b>Kitosan nanopartiküller</b>                       | Sodyum tripolifosfat, saponin ve Cu iyonları  | Antifungal deneyi                 | Antifungal                                                  | -                                                 | (230)    |
| <b>Kitosan mikroküreler</b>                          | Üre                                           | % 99.0 ve% 78.5 / yavaş salım     | Üre gübresinin kontrollü salımı                             | Distile su                                        | (231)    |
| <b>Karboksimetil kitosan / bentonit kompozit jel</b> | Atrazine ve Imidacloprid                      | Difüzyon kontrollü salım          | Sudaki salınımı kontrol edin ve toprakta sızmalarını önleme | Su ve toprak                                      | (232)    |
| <b>Aljinat / kitosan nanopartiküller</b>             | Paraquat                                      | 8 saat sonra% 100 salım           | Su                                                          | Paraquatın neden olduğu olumsuz etkileri azaltmak | (233)    |
| <b>Kitosan mikrokpsülleri</b>                        | 3-Hidroksi-5-metilzoksazol                    | 80-160 saat boyunca sürekli salım | Su                                                          | Toprak kirlenmesini önlemek                       | (234)    |
| <b>O-naftilasetil kitosan</b>                        | 1-naftilasetik asit                           | Yavaş salım                       | Farklı pH tampon çözeltileri                                | NAA'nın uzun süreli salınımı                      | (211)    |
| <b>Zn – Al katmanlı çift hidroksit nanokompozit</b>  | 1-naftilasetik asit                           | Yavaş salım                       | Farklı pH tampon çözeltileri                                | Yavaş salım                                       | (213)    |
| <b>Lignin Nanomikropartiküller</b>                   | Işığa duyarlı absisik asit                    | Yavaş salım                       | Kültür ortamları / su solüsyonu                             | Işık altında büyümeyi artırmak                    | (235)    |
| <b>Kitosan zarı</b>                                  | Çinko, NAA, Potasyum, Üre, Bakır              | Ani salım                         | Su                                                          | Sızıntı, buharlaşma ve yüzey göçü                 | (216)    |
| <b>Kitosan nanopartiküller</b>                       | Indol-3-asetik asit                           | Yavaş salım                       | Kültür koşulları                                            | Bitki büyümesi, yaprak sayısında artış            | (236)    |
| <b>Selüloz türevi</b>                                | Metil 1-Naftilasetat                          | Yavaş salım                       | pH solüsyon                                                 | Toprak asitlenmes                                 | (237)    |
| <b>β-Siklodekstrin (βCD)</b>                         | Tebuconazole                                  | Tohum sosu                        | Sera uygulaması                                             | Antifungal                                        | (238)    |
| <b>Poli (metil metakrilat)</b>                       | Tebuconazole                                  | Yavaş salım                       | Tohum/Su                                                    | Buğday kök mantar                                 | (239)    |
| <b>Nişasta-aljinat boncuklar</b>                     | Thiram                                        | Difüzyon                          | Su                                                          | Zirai kimyasallar için salım sistem               | (240)    |
| <b>Gözenekli içi boş silika nanosferler</b>          | Tebuconazole                                  | Yavaş salım                       | Su                                                          | Herbisit salım                                    | (241)    |

|                                                              |                           |                |                                     |                                                   |       |
|--------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------|-------------------------------------|---------------------------------------------------|-------|
| <b>Aljinat-bentonit</b>                                      | Atrazin                   | Yavaş salım    | Toprak katmanları                   | Atrazin sızıntılarını azaltılması                 | (242) |
| <b>Poli (hidroksibutirat-ko-hidroksvalerat) mikroküreler</b> | Atrazin                   | Yavaş salım    | Su                                  | Çevresel etkini azaltması                         | (243) |
| <b>Aljinat / kitosan nanopartiküller</b>                     | Paraquat                  | İçine çekme    | Toprak                              | Paraquatın neden olduğu olumsuz etkileri azaltmak | (233) |
| <b>Silika nano küreler</b>                                   | 1-naftilasetik asit       | Yavaş salım    | Tampon Çözeltisi pH 5               | Uzun süreli sürekli salım                         | (244) |
| <b>İçi boş silika nanopartiküller</b>                        | Avermektin                | Yavaş salım    | Etanol / su karışımı (30:70, v / v) | Aktif madde salım sistemi                         | (245) |
| <b>Betula pendula Sporopollenin</b>                          | Imatinib mesilat          | Yavaş salım    | Tampon solüsyon                     | Hücre toksisitesini önlemek için yavaş salınım    | (219) |
| <b>Phoenix dactylifera L. Sporopollenin</b>                  | Ibuprofen                 | Yavaş salım    | Tampon solüsyon                     | Hücre toksisitesini önlemek için yavaş salınım    | (246) |
| <b>Platanus orientalis Sporopollenin</b>                     | Paracetamol               | Yavaş salım    | Tampon solüsyon                     | Hücre toksisitesini önlemek için yavaş salınım    | (145) |
| <b>Lycopodium clavatum sporopollenin</b>                     | Antibiyotiks              | Yavaş salım    | Funugal kültür                      | Antifungal                                        | (247) |
| <b>Ayçiçek Sporopollenin</b>                                 | Biyoaktif Makromoleküller | In vitro salım | Tampon solüsyon                     | Salım kinetiği                                    | (248) |
| <b>Diruthenium Kompleksleri</b>                              | IAA 2,4-D 1 ve NAA        | Tabakalaşma    | Arabidopsis thaliana                | Büyüme geliştirme                                 | (249) |

### 6.1.5 *M. neglectum*

Mevcut tez çalışmasında *M. neglectum* (Arap sümbülü) model bitki olarak seçilmiştir. Arap sümbülü Hyacinthaceae (Sümbülgiller) familyasına aittir ve bataklık alanlar, tarlalarda yaşayan soğanlı, otsu bir bitki türüdür. Endemik *M. neglectum* Muscari türleri arasında en güzel kokulu bitkidir ve süs bitkisi olma potansiyeli yüksektir. Anavatanının Akdeniz, Kuzey Afrika, Güney Afrika, Güney Doğu ve Orta Asya ülkelerinin (Türkiye ve Yunanistan da dahil) olduğu bilinmektedir (150). Türkiye'de (Denizli, Karabük ve Antalya vb.) bulunan 25 Muscari türünden, *M. neglectum* da dahil olmak üzere on tür endemiktir (152). Çok sayıda Muscari türü süs bahçe bitkisi olarak kullanılmaktadır. Ancak, *M. neglectum* türünün kesme çiçek ve açık bahçe bitkisi olarak ticari amaçla kullanımı henüz yaygınlaşmamıştır. Türkiye soğanlı çiçek ihracatı konusunda önemli bir yere sahiptir. Hollanda, Türkiye'den çok sayıda yabancı soğanlı çiçek türünü ithal etmekte ve bazı küçük işlemlerden sonra yeniden etiketleyerek tüm dünya pazarlarına ihraç etmektedir. Dolayısıyla, Hollanda bu ticaretin nihai faydalanıcısıdır. Günümüzde, *M. neglectum* popülasyonları, doğal kaynaklar üzerinde

artan baskı, sürdürülemez tarım, ormancılık uygulamaları, hızlı kentleşme, artan sanayi faaliyetleri ve fosil yakıt tüketimine bağlı olarak artan CO<sub>2</sub> kirliliği dâhil olmak üzere, abiyotik ve biyotik stresler nedeniyle büyük baskı altında bulunmaktadır. Türkiye'de *M. neglectum* türü ex situ koruma için, ihracat yasaklı bitki türleri listesine dahil edilmiştir (153). Geçmiş literatür çalışmaları *M. Comosum* (154, 155), *M. Botryoides* (156), *M. Armeniacum* (157) *M. armeniacum*, *M. azureum*, *M. latifolium*, *M. moschatum*, *M. neglectum*, *M. paradoxum*, *M. tubergenianum* (158), *M. macrocarpum* (159), *M. Aucheri* (160), türleri üzerinde birkaç *in vitro* çoğaltma çalışma ile sınırlıdır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada (161), eksplant olarak olgunlaşmamış embriyoları kullanarak *M. muscarimi* türünün *in vitro* rejenerasyonunu rapor etmişlerdir. Ama doku kararma gibi sıkıntılardan dolayı rejenerasyon verimliğindeki düşüşler hala bu bitki için optimize bir çoğaltma protokolü bulunmamaktadır. **Bu nedenle tez çalışmada, *M. neglectum* bitkilerini kentsel peyzaj planlama ve benzeri alanlarda ticari süs bitkisi olarak kullanılabilir hale getirmek için biyomalzeme destekli kullanışlı ve hızlı bir *in vitro* rejenerasyon tekniği geliştirilmiştir.**

#### 6.1.6 FOTOSENTETİK ETKİ (KLOROFİL, KAROTENOİD VE LİKOPEN)

Bu çalışmada, BAP ve NAA'nın kontrollü ve serbest salınımının etkisini görmek için *M. neglectum* eksplantlarının klorofil, karoten/  $\beta$ -karoten ve likopen içerikleri analiz edilmiştir. Sonuçlar, NAA ve BAP yüklü biyomateriyal taşıyıcılar ile muamele edilen eksplantlarda klorofil, karoten/  $\beta$ -karoten ve likopen seviyelerinin arttığını ortaya koymuştur. Aksine, bu konsantrasyonlar, NAA ve BAP'ın serbest dozları ile muamele edilen eksplantlarda önemli ölçüde düşük seviyelerde kaydedilmiştir.

Önceki literatür raporlarında, farklı bitkilerde oksidatif stres sonucunda klorofil, karoten/ $\beta$ -karoten ve likopen konsantrasyonlarının azaldığı bildirilmiştir. Klorofil ve karotenoid içeriklerindeki düşüş, oksidatif kararmaya bağlı doku hasarı ile bağlantılıdır (6, 250). Klorofilin bozulması, klorofil oksidasyondan kaynaklanan renk değişikliklerinin başlıca nedenlerinden biridir. Klorofilin bozulması, fenolik oksidasyondan türetilen fenoksi radikali tarafından oksidasyon nedeniyle meydana gelmektedir (251, 252). Dahası, karotenoidler önemli pigmentlerdir ve tekli oksijeni, klorofilin üçlü durumunu ve diğer tehlikeli serbest radikalleri temizleyerek klorofilin yok edilmesini önlemede önemli bir rol oynamaktadır

(253). Ayrıca karotenoidler, fazla enerjiyi klorofilden uzaklaştırmanın yanı sıra ışığı emmekte ve enerjilerini fotosentez için klorofile iletmektedir. İkinci işlev, fotosentetik aparatı stres koşulları altında ROS aracılı hasardan korumaktır (254, 255). Likopen, iki rakip siklaz,  $\epsilon$ -siklaz (LCY- $\epsilon$ ) ve  $\beta$ -siklaz (LCY- $\beta$ ) için substrat fonksiyonu görmektedir. LCY- $\epsilon$ , tek bir  $\epsilon$  halka sunmakta, böylece likopeni  $\delta$ -karotene dönüştürmekte ve LCY- $\beta$ ,  $\beta$ -karoten oluşturmak için likopenin her iki ucunda bir veya iki  $\beta$ -halka sunmaktadır.

Mevcut çalışmada, stres sırasında eksplant kararmasında bu bileşiklerin etkileşimli rolü göz önünde bulundurularak, klorofil, karoten/ $\beta$ -karoten ve likopen konsantrasyonları üzerinde serbest ve enkapsüle NAA ve BAP salımının etkisi hakkında genel bir bakış elde etmek için bu moleküllerin seviyeleri analiz edilmiştir.

*Jatropha curcas* eksplant kültürü (250) ve sürgün proliferasyonu (71) sırasında klorofil ve karotenoid konsantrasyonlarında sabit bir azalma gözlemlenmiştir. Mevcut durumda benzer şekilde, serbest NAA ve BAP dozları ile sağlanan eksplantlardaki klorofil içeriğinde (klorofil a ve klorofil b) bir düşüş gözlenmiştir. Bunun nedeni, kültür ortamında ROS seviyelerini dengeleyerek homeostazı sağlayan fitohormonların bulunmaması ve oksidatif kararmaya yol açan ROS birikimi olabilmektedir.

### 6.1.7 TOPLAM FENOLİK İÇERİĞİ

Biyotik ve abiyotik stres sırasında üretilen fenolik bileşiklerin doku kararmasında önemli rol oynadığının bilinmesinin yanı sıra fenolikler, birkaç oksidatif enzim için substrat görevi görmektedir. Bu nedenle mevcut tez çalışmasında kontrollü ve serbest NAA ve BAP fitohormonlar ile muamele edilen *M. neglectum* bitki eksplantlarının toplam fenolik içeriği analiz edilmiştir. Sonuçlar, NAA ve BAP'nin serbest dozları ile muamele edilen eksplantların toplam fenolik içeriğinin, enkapsüle NAA ve BAP ile muamele edilen eksplantlara kıyasla daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, mevcut tez çalışmasının ana hipotezini desteklemiştir; "Eksplantlarda serbest hormon verilmesi, ROS aracılı oksidatif stres nedeniyle doku kararmasına neden olur". Ayrıca daha önceki literatür çalışmalarında benzer sonuçlar bildirilmiştir. Avrupa ve Kanada porsuk (*Taxus baccata* L. ve *Taxus. Canadensis* Marsh.) (256) ve *Cicer arietinum*'da (257). Ayrıca benzer bir çalışmada *Pistacia vera* L. callus'ta toplam fenolik içeriğin ve kararma yüzdesinin

kontrollerden sırasıyla yaklaşık 2 ve 2,3 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (258, 259).

#### 6.1.8 *M. NEGLECTUM* BİTKİSİNİN ENZİM AKTİVİTELERİ

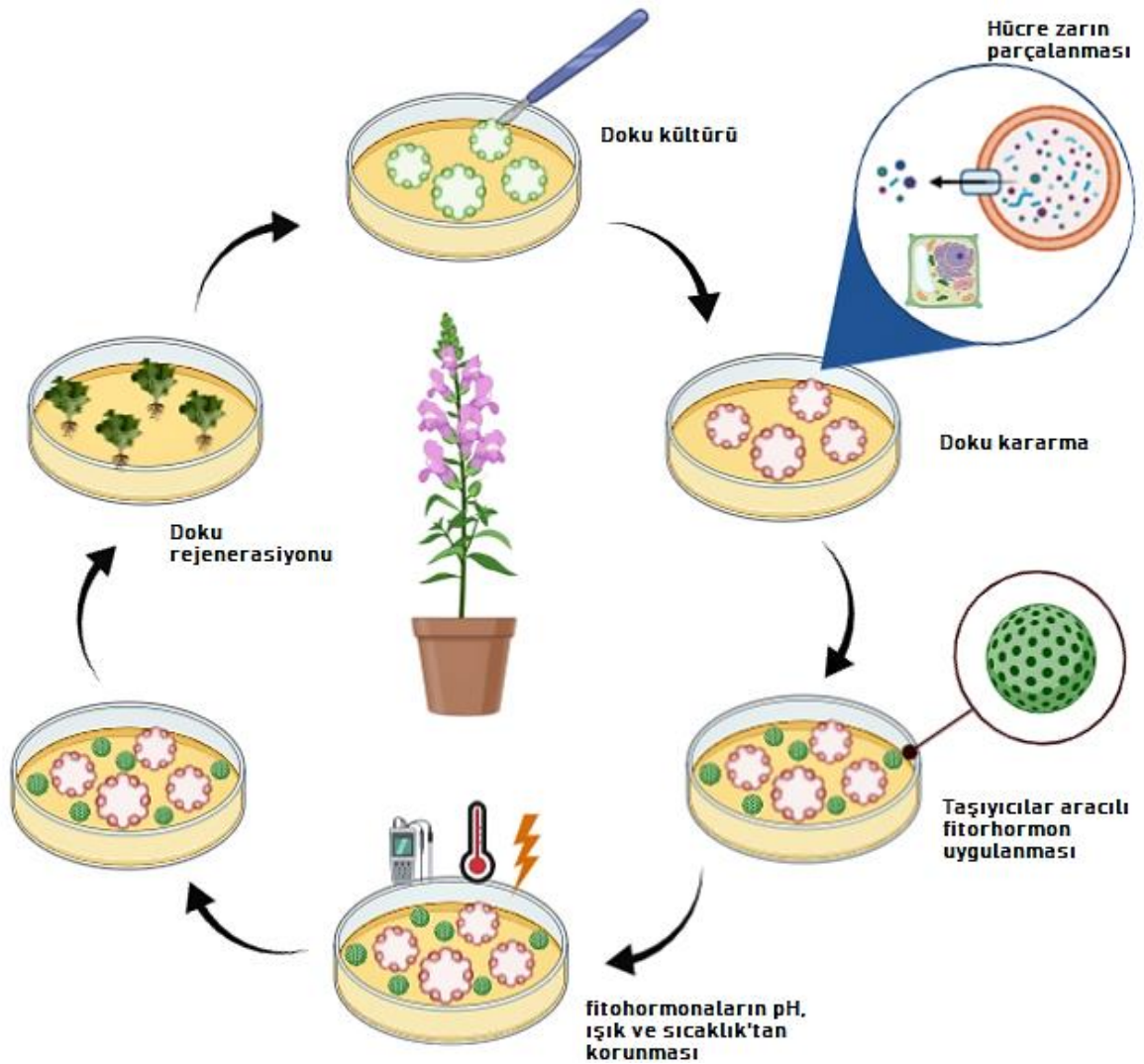
Hücre hasarı sırasında, membran bütünlüğü zarar görmekte ve dolayısıyla sitoplazma ve vakuoller hücre içerikleri gibi bozulmaktadır. Hücre içindeki fenolik içerikler, hava, POD'lar veya PPO'lar tarafından oksidasyonuna yol açmaktadır. POD'lar, hidrojen peroksit varlığında fenollerin kinonlara oksitleyici ana maddesi olarak işlev görmektedir (210). Transgenik bitki üretiminin in vitro çoğaltılması için enfeksiyonlara, ozon maruziyetine, kirliliğe, radyasyona, beslenme bozukluklarına, tuzluluğa, yaşlanmaya veya dokunun kesilmesine bağlı olarak meydana gelen hücre hasarı anında POD aktivitesinde yükselmelere neden olmaktadır (260, 261).

Mevcut tez çalışmasında, *M. neglectum* eksplantları, serbest ve taşıyıcılara enkapsüle edilmiş fitohormonlar ile muamele edildikten sonra CAT, SOD ve POD seviyeleri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, NAA ve BAP ile kapsüllenmiş polimer taşıyıcılar ile muamele edilen eksplantlarda SOD ve CAT daha yüksek seviyelerde gözlenirken, bu eksplantlarda POD seviyeleri düşük olarak kaydedilmiştir. Diğer yandan, serbest NAA ve BAP dozları ile muamele edilen eksplantlarda SOD ve CAT düşük seviyeleri kaydedilirken, eksplantlarda daha yüksek POD seviyeleri gözlenmiştir. **Bu sonuçlar beklentilerle uyumlu bulunmuş ve tez çalışmasının hipotezini güçlü bir şekilde doğrulamıştır.** Hormonların kontrollü salımı, bitki hücrelerinin yaşamsal işlevleri için gerekli olan ROS düzeylerini korumaktadır. Kontrol eksplantlarındaki PODs seviyeleri, bu eksplantların, ihtiyaç duyulan NAA ve BAP'ın bulunmamasından dolayı yüksek stres altında olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Liu and Chen (262) tarafından yapılan benzer bir çalışmada, kallus oluşumu sırasında, süperoksit anyonlar ( $O_2^{\cdot -}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikalleri ( $\cdot OH$ ) gibi çeşitli ROS türlerinin üretiminin önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir. Fazla ROS üretimi ile ilişkili olan oksidatif stres, bitki büyümesi ve gelişimi üzerinde olumsuz bir etkiye neden olmaktadır (263, 264). Bununla birlikte, katalaz (CAT) ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi enzimatik kararmaya dahil olan birçok oksidatif enzim türü bulunmaktadır (265).

## 6.2 SONUÇ

Doku kültürü ortamında eksplantların ROS aracılı nekrozu veya oksidatif kararmanın eksplantların yayılma oranını önemli ölçüde etkilediği için önlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla, bu tez çalışmasında, 6-BAP ve 1-NAA fitohormonlarının kontrollü salımı yoluyla oksidatif doku kararmayı kontrol etmek için yeni bir çözüm önerilmiştir. Biyosilika, sporopollenin ve kitin dahil olmak üzere üç yeni taşıyıcı sistem izole edilip ve gelişmiş analitik araçlar kullanılarak karakterize edilmiştir. Taşıyıcılara fitohormonlar yüklenmiştir. Bu yeni geliştirilen taşıyıcıların salım kapasiteleri, simüle edilmiş tampon koşullarında ve *Muscari neglectum* Guss'un kültür koşullarında test edilmiştir.



Şekil 6.1. Tez çalışmanın grafik özeti.

Genel sonuçlar dikkate alınarak aşağıdaki başlıca sonuçlara ulaşılmıştır;

- Biyomateriyal tabanlı taşıyıcı sistemler, hammaddelerden başarılı bir şekilde izole edilmiştir. Başarılı izolasyon, SEM, FTIR, TGA, DSC ve XRD gibi fizikokimyasal analizlerle doğrulanmıştır.
- Biyosilika boncuklar, 6-BAP ve 1-NAA'nın artırılmış kapsülleme etkinliği için 3-APTES ile yüzey işlevselleştirilmiştir. Yüzey işlevselliği EDX, FTIR, TGA, XRD ninhidrin analizi ile doğrulanmıştır.
- Serbest olarak uygulanan fitohormonlara kıyasla üç taşıyıcı için kontrollü salım paternleri gösterilmiştir.
- Enzimatik (CAT, SOD ve POX) ve enzimatik olmayan testler (toplam klorofil, likopen, karotenoid içerikleri), ROS birikiminin önlendiğini başarıyla doğrulamıştır.
- 1-NAA ve 6-BAP yüklü taşıyıcılarla uygulama yapılan *M. neglectum* eksplantları mükemmel soğan rejenerasyonu sergilemiştir. Öte yandan, serbest 1-NAA ve 6-BAP ile uygulama yapılan eksplantlarda, kısa bir süre sonra kahverengileşme gözlemlenmiştir.
- Bu tez sonuçları, doku kararmasının önlenmesi için bitkilerde biyomateriyal esaslı malzemelerin uygulanmasına öncü bir bakış açısı sağlamıştır.

## KAYNAKLAR

1. Benson EE. In vitro plant recalcitrance: an introduction. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. 2000;141-8.
2. Wang X-D, Nolan KE, Irwanto RR, Sheahan MB, Rose RJ. Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. Annals of botany. 2011;107(4):599-609.
3. Santo Pereira AE, Silva PM, Oliveira JL, Oliveira HC, Fraceto LF. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2017;150:141-52.
4. Ekebafé L, Ogbeifun D, Okieimen F. Polymer applications in agriculture. Biokemistri. 2011;23(2).
5. Krishna H, Sairam R, Singh S, Patel V, Sharma R, Grover M, et al. Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. Scientia horticulturae. 2008;118(2):132-8.
6. Laukkanen H, Rautiainen L, Taulavuori E, Hohtola A. Changes in cellular structures and enzymatic activities during browning of Scots pine callus derived from mature buds. Tree Physiology. 2000;20(7):467-75.
7. Beckman CH. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? Physiological and molecular plant pathology. 2000;57(3):101-10.
8. Aliyu OM. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale* L.) breeding: An appraisal. African Journal of Biotechnology. 2005;4(13).
9. Toth K, Haapala T, Hohtola A. Alleviation of browning in oak explants by chemical pretreatments. Biologia plantarum. 1994;36(4):511-7.
10. Dixon RA, Paiva NL. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The plant cell. 1995;7(7):1085.
11. Bhat S, Chandel K. A novel technique to overcome browning in tissue culture. Plant Cell Reports. 1991;10(6-7):358-61.
12. Dalal MA, Sharma B, Rao MS. Studies on stock plant treatment and initiation culture mode in control of oxidative browning in in vitro cultures of grapevine. Scientia horticulturae. 1992;51(1-2):35-41.
13. Yan A, Chen Z. Impacts of silver nanoparticles on plants: a focus on the phytotoxicity and underlying mechanism. International Journal of Molecular Sciences. 2019;20(5):1003.
14. Madhusudhanan K, Rahiman B. The effect of activated charcoal supplemented media to browning of in vitro cultures of *Piper* species. Biologia plantarum. 2000;43(2):297-9.

15. Tang W, Harris LC, Outhavong V, Newton RJ. Antioxidants enhance in vitro plant regeneration by inhibiting the accumulation of peroxidase in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill.). *Plant cell reports*. 2004;22(12):871-7.
16. Tang W, Newton RJ, Outhavong V. Exogenously added polyamines recover browning tissues into normal callus cultures and improve plant regeneration in pine. *Physiologia Plantarum*. 2004;122(3):386-95.
17. Thomas TD. The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances*. 2008;26(6):618-31.
18. Jones AMP, Saxena PK. Inhibition of Phenylpropanoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L.: A Novel Approach to Reduce Oxidative Browning in Plant Tissue Culture. *PLOS ONE*. 2013;8(10):e76802. doi: 10.1371/journal.pone.0076802.
19. Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma O. The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*. 1995;33(7):601-17.
20. Pandey S, Sundararajan S, Ramalingam S, Pant B. Effects of sodium nitroprusside and growth regulators on callus, multiple shoot induction and tissue browning in commercially important *Valeriana jatamansi* Jones. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2020;142(3):653-60.
21. Irshad M, He B, Liu S, Mitra S, Debnath B, Li M, et al. In vitro regeneration of *Abelmoschus esculentus* L. Cv. Wufu: Influence of anti-browning additives on phenolic secretion and callus formation frequency in explants. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2017;58(5):503-13.
22. Lestari NKD, Deswiniyanti NW, Astarini I, Arpiwi LM. Morphogenesis in vitro Flower Pedicel of *Lilium longiflorum* with NAA and BAP. *KnE Life Sciences*. 2020.
23. Dan Y. Biological functions of antioxidants in plant transformation. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2008;44(3):149-61.
24. Ndakidemi CF, Mneney E, Ndakidemi PA. Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning in in vitro culture of *Brahylaena huillensis* using nodal segments. *American Journal of Plant Sciences*. 2014;2014.
25. Arnao MB, Hernández - Ruiz J. Functions of melatonin in plants: a review. *Journal of pineal research*. 2015;59(2):133-50.
26. Erland LA, Saxena PK. Melatonin in plant morphogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2018;54(1):3-24.
27. Cai X, Wei H, Liu C, Ren X, Jeong BR. Synergistic Effect of NaCl Pretreatment and PVP on Browning Suppression and Callus Induction from Petal Explants of *Paeonia Lactiflora* Pall. 'Festival Maxima'. *Plants*. 2020;9(3):346.

28. Benson EE. Sepecial symposium: In vitro plant recalcitrance in vitro plant recalcitrance: An introduction. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2000;36(3):141-8.
29. Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry*. 1989;264(14):7761-4.
30. Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annual review of nutrition*. 1996;16(1):33-50.
31. Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Radical Research*. 1999;31(4):261-72. doi: 10.1080/10715769900300841.
32. Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism - Clinical and Experimental*. 2000;49(2):3-8. doi: 10.1016/S0026-0495(00)80077-3.
33. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*. 1987;327(6122):524-6. doi: 10.1038/327524a0.
34. Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10(2):248-53. Epub 1998/04/30. doi: 10.1016/s0955-0674(98)80147-6. PubMed PMID: 9561849.
35. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med*. 1999;31(2):53-9. Epub 1999/07/20. doi: 10.1038/emmm.1999.9. PubMed PMID: 10410302.
36. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*. 2000;21(3):361-70. Epub 2000/02/26. doi: 10.1093/carcin/21.3.361. PubMed PMID: 10688856.
37. Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg, 2001, Karolinska Institute, Stockholm, ISBN 91-631-1064-4. *Free Radical Biology and Medicine*. 2001;31(11):1287-312. doi: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(01\)00724-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(01)00724-9).
38. Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J, Aruoma OI. The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol*. 1995;33(7):601-17. Epub 1995/07/01. doi: 10.1016/0278-6915(95)00024-v. PubMed PMID: 7628797.
39. Baxter A, Mittler R, Suzuki N. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany*. 2013;65(5):1229-40. doi: 10.1093/jxb/ert375.
40. Bailey-Serres J, Mittler R. The Roles of Reactive Oxygen Species in Plant Cells. *Plant Physiology*. 2006;141(2):311-. doi: 10.1104/pp.104.900191.
41. Mittler R. ROS Are Good. *Trends in Plant Science*. 2017;22(1):11-9. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>.

42. Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85. Epub 1990/01/01. doi: 10.1016/0076-6879(90)86093-b. PubMed PMID: 2172697.
43. Miller DK, Smith VL, Kanner J, Miller DD, Lawless HT. Lipid Oxidation and Warmed-Over Aroma in Cooked Ground Pork from Swine Fed Increasing Levels of Iron. *Journal of Food Science.* 1994;59(4):751-6. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb08119.x>.
44. O'Neill P. The Chemical Basis of Radiation Biology. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine.* 1987;52(6):976-. doi: 10.1080/09553008714552571.
45. Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine.* Pergamon; 1985.
46. Woodward AW, Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany.* 2005;95(5):707-35.
47. Mano Y, Nemoto K. The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of experimental Botany.* 2012;63(8):2853-72.
48. Teale WD, Paponov IA, Palme K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2006;7(11):847-59.
49. Chandler JW. Local auxin production: a small contribution to a big field. *Bioessays.* 2009;31(1):60-70.
50. Zhao Y. Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular plant.* 2012;5(2):334-8.
51. Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen J-G, Wu M-J, et al. Cell surface-and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in Arabidopsis. *Cell.* 2010;143(1):99-110.
52. Pasternak T, Potters G, Caubergs R, Jansen MA. Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level. *Journal of Experimental Botany.* 2005;56(418):1991-2001.
53. Achard P, Renou J-P, Berthomé R, Harberd NP, Genschik P. Plant DELLAs restrain growth and promote survival of adversity by reducing the levels of reactive oxygen species. *Current Biology.* 2008;18(9):656-60.
54. Raeymaekers T, Potters G, Asard H, Guisez Y, Horemans N. Copper-mediated oxidative burst in *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow 2 cell suspension cultures. *Protoplasma.* 2003;221(1-2):093-100.
55. Santelia D, Henrichs S, Vincenzetti V, Sauer M, Bigler L, Klein M, et al. Flavonoids redirect PIN-mediated polar auxin fluxes during root gravitropic responses. *Journal of Biological Chemistry.* 2008;283(45):31218-26.

56. Minglin L, Yuxiu Z, Tuanyao C. Identification of genes up-regulated in response to Cd exposure in *Brassica juncea* L. *Gene*. 2005;363:151-8.
57. Junghans U, Polle A, DÜchting P, Weiler E, Kuhlman B, Gruber F, et al. Adaptation to high salinity in poplar involves changes in xylem anatomy and auxin physiology. *Plant, cell & environment*. 2006;29(8):1519-31.
58. Park J-E, Park J-Y, Kim Y-S, Staswick PE, Jeon J, Yun J, et al. GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(13):10036-46.
59. Pereira J, Jordán F. Multi-node selection of patches for protecting habitat connectivity: Fragmentation versus reachability. *Ecological Indicators*. 2017;81:192-200.
60. Uchendu EE, Paliyath G, Brown DC, Saxena PK. In vitro propagation of North American ginseng (*Panax quinquefolius* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2011;47(6):710-8.
61. Shukla PS, Agarwal PK, Jha B. Improved salinity tolerance of *Arachis hypogaea* (L.) by the interaction of halotolerant plant-growth-promoting rhizobacteria. *Journal of plant growth regulation*. 2012;31(2):195-206.
62. Urquiaga I, Leighton F. Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress. *Biological research*. 2000;33(2):55-64.
63. Lim PO, Kim HJ, Gil Nam H. Leaf senescence. *Annu Rev Plant Biol*. 2007;58:115-36.
64. Benson EE. Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 2000:163-70.
65. Alici EH, Arabaci G. Determination of SOD, POD, PPO and cat enzyme activities in *Rumex obtusifolius* L. *Annual Research & Review in Biology*. 2016:1-7.
66. Berwal MK, Ram C. Superoxide Dismutase: A stable biochemical marker for abiotic stress tolerance in higher plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants: IntechOpen*; 2018.
67. Lins S, Yusuf A. Upregulation of Chloroplast Antioxidant System to Alleviate Salt Dependent Oxidative System in Rice Varieties. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*. 2020;16(3).
68. Sereflioglu S, Dinler BS, Tasci E. Alpha-tocopherol-dependent salt tolerance is more related with auxin synthesis rather than enhancement antioxidant defense in soybean roots. *Acta Biologica Hungarica*. 2017;68(1):115-25.
69. Chen D, Shao Q, Yin L, Younis A, Zheng B. Polyamine function in plants: metabolism, regulation on development, and roles in abiotic stress responses. *Frontiers in plant science*. 2019;9:1945.

70. Ghidelli C, Mateos M, Rojas - Argudo C, Pérez - Gago MB. Effect of antioxidants on enzymatic browning of eggplant extract and fresh - cut tissue. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014;38(4):1501-10.
71. Misra P, Toppo DD, Gupta N, Chakrabarty D, Tuli R. Effect of antioxidants and associate changes in antioxidant enzymes in controlling browning and necrosis of proliferating shoots of elite *Jatropha curcas* L. *biomass and bioenergy*. 2010;34(12):1861-9.
72. Anthony J, Senaratna T, Dixon K, Sivasithamparam K. The role of antioxidants for initiation of somatic embryos with *Conostephium pendulum* (Ericaceae). *Plant cell, tissue and organ culture*. 2004;78(3):247-52.
73. Gupta SD, Datta S. Antioxidant enzyme activities during in vitro morphogenesis of gladiolus and the effect of application of antioxidants on plant regeneration. *Biologia Plantarum*. 2003;47(2):179-83.
74. Gao J, Xue J, Xue Y, Liu R, Ren X, Wang S, et al. Transcriptome sequencing and identification of key callus browning-related genes from petiole callus of tree peony (*Paeonia suffruticosa* cv. Kao) cultured on media with three browning inhibitors. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2020;149:36-49.
75. Teklemariam TA, Blake TJ. Phenylalanine ammonia - lyase - induced freezing tolerance in jack pine (*Pinus banksiana*) seedlings treated with low, ambient levels of ultraviolet - B radiation. *Physiologia plantarum*. 2004;122(2):244-53.
76. Nybakken L, Keski-Saari S, Falck MA, Julkunen-Tiitto R. Restoration of secondary metabolism in birch seedlings relieved from PAL-inhibitor. *Trees*. 2007;21(3):273-81.
77. Oh M-M, Trick HN, Rajashekar C. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce. *Journal of plant physiology*. 2009;166(2):180-91.
78. Mujtaba M, Khawar KM, Camara MC, Carvalho LB, Fraceto LF, Morsi RE, et al. Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;154:683-97. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.128>.
79. Gandini A, Lacerda TM, Carvalho AJ, Trovatti E. Progress of polymers from renewable resources: furans, vegetable oils, and polysaccharides. *Chemical reviews*. 2015;116(3):1637-69.
80. Qiao D, Liu H, Yu L, Bao X, Simon GP, Petinakis E, et al. Preparation and characterization of slow-release fertilizer encapsulated by starch-based superabsorbent polymer. *Carbohydrate polymers*. 2016;147:146-54.
81. Zhan F, Liu M, Guo M, Wu L. Preparation of superabsorbent polymer with slow - release phosphate fertilizer. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004;92(5):3417-21.

82. Baker S, Satish S, Prasad N, Chouhan RS. Nano-agromaterials: Influence on plant growth and crop protection. *Industrial Applications of Nanomaterials*: Elsevier; 2019. p. 341-63.
83. Wani TA, Masoodi F, Baba WN, Ahmad M, Rahmanian N, Jafari SM. Nanoencapsulation of agrochemicals, fertilizers, and pesticides for improved plant production. *Advances in Phytonanotechnology*: Elsevier; 2019. p. 279-98.
84. Choudhary RC, Kumari S, Kumaraswamy R, Sharma G, Kumar A, Budhwar S, et al. Chitosan nanomaterials for smart delivery of bioactive compounds in agriculture. *Nanoscale Engineering in Agricultural Management*. 2019;124.
85. Ugbede Itodo H. Controlled Release of Herbicides Using Nano-Formulation: A Review. *Journal of Chemical Reviews*. 2019;1(2):130-8.
86. Jang MK, Kong BG, Jeong YI, Lee CH, Nah JW. Physicochemical characterization of  $\alpha$  - chitin,  $\beta$  - chitin, and  $\gamma$  - chitin separated from natural resources. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 2004;42(14):3423-32.
87. Kaya M, Mujtaba M, Ehrlich H, Salaberria AM, Baran T, Amemiya CT, et al. On chemistry of  $\gamma$ -chitin. *Carbohydrate Polymers*. 2017;176:177-86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.076>.
88. Beaney P, Lizardi-Mendoza J, Healy M. Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2005;80(2):145-50. doi: <https://doi.org/10.1002/jctb.1164>.
89. Abdou ES, Nagy KSA, Elsabee MZ. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Bioresource Technology*. 2008;99(5):1359-67. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.051>.
90. Shan X, Xu T, Liu Z, Hu X, Zhang YD, Wang B. Safety and toxicology of the intravenous administration of Ang2-siRNA plasmid chitosan magnetic nanoparticles. *Mol Med Rep*. 2017;15(2):736-42. Epub 2016/12/31. doi: 10.3892/mmr.2016.6090. PubMed PMID: 28035391; PubMed Central PMCID: PMC5364838.
91. Mujtaba M, Morsi RE, Kerch G, Elsabee MZ, Kaya M, Labidi J, et al. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019;121:889-904. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.109>.
92. Akyuz L, Kaya M, Koc B, Mujtaba M, Ilk S, Labidi J, et al. Diatomite as a novel composite ingredient for chitosan film with enhanced physicochemical properties. *Int J Biol Macromol*. 2017;105(Pt 2):1401-11. Epub 2017/09/04. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.161. PubMed PMID: 28866017.
93. Xie W, Xu P, Liu Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2001;11(13):1699-701. doi: [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)00285-2](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)00285-2).

94. Hayes M. Chitin, Chitosan and their Derivatives from Marine Rest Raw Materials: Potential Food and Pharmaceutical Applications. In: Hayes M, editor. *Marine Bioactive Compounds: Sources, Characterization and Applications*. Boston, MA: Springer US; 2012. p. 115-28.
95. Rabea EI, Badawy ME, Stevens CV, Smagghe G, Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*. 2003;4(6):1457-65. Epub 2003/11/11. doi: 10.1021/bm034130m. PubMed PMID: 14606868.
96. Laflamme P, Benhamou N, Bussi res G, Dessureault M. Differential effect of chitosan on root rot fungal pathogens in forest nurseries. *Canadian Journal of Botany*. 2000;77(10):1460-8. doi: 10.1139/b99-111.
97. Aziz A, Trotel-Aziz P, Dhucq L, Jeandet P, Couderchet M, Vernet G. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology*. 2006;96(11):1188-94. Epub 2008/10/24. doi: 10.1094/phyto-96-1188. PubMed PMID: 18943955.
98. Ben-Shalom N, Ardi R, Pinto R, Aki C, Fallik E. Controlling gray mould caused by *Botrytis cinerea* in cucumber plants by means of chitosan. *Crop Protection*. 2003;22(2):285-90. doi: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(02\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(02)00149-7).
99. Xu J, Zhao X, Han X, Du Y. Antifungal activity of oligochitosan against *Phytophthora capsici* and other plant pathogenic fungi in vitro. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2007;87(3):220-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2006.07.013>.
100. O'Herlihy EA, Duffy EM, Cassells AC. The effects of arbuscular mycorrhizal fungi and chitosan sprays on yield and late blight resistance in potato crops from microplants. *Folia Geobotanica*. 2003;38(2):201-7. doi: 10.1007/BF02803152.
101. Vrugink H. The effect of chitin amendment on actinomycetes in soil and on the infection of Potato tubers by *Streptomyces scabies*. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 1970;76(5):293-5. doi: 10.1007/BF03041359.
102. Kulikov SN, Chirkov SN, Il'ina AV, Lopatin SA, Varlamov VP. Effect of the molecular weight of chitosan on its antiviral activity in plants. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006;42(2):200-3. doi: 10.1134/S0003683806020165.
103. B lair G, Tremblay N. The influence of chitin-urea amendments applied to an organic soil on a *Meloidogyne hapla* population and on the growth of greenhouse tomato. *Phytoprotection*. 1995;76(2):75-80. doi: <https://doi.org/10.7202/706087ar>.
104. Tsugita T. The application of chitin/chitosan for agriculture. *Proc of the Special Sess 7th Symposium on Chitin and Chitosan*, 1993. 1993:21-2.
105. Hirano S, Kitaura S, Sasaki N, Sakaguchi H, Sugiyama M, Hashimoto K, et al. Chitin biodegradation and wound healing in tree bark tissues. *Journal of environmental polymer degradation*. 1996;4(4):261-5. doi: 10.1007/BF02070695.

106. Young-Sang L, Yong-Ho K, Sung-Bae K. Changes in the Respiration, Growth, and Vitamin C Content of Soybean Sprouts in Response to Chitosan of Different Molecular Weights. *HortScience HortSci*. 2005;40(5):1333-5. doi: 10.21273/HORTSCI.40.5.1333.
107. Kim H-J, Chen F, Wang X, Rajapakse NC. Effect of Chitosan on the Biological Properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005;53(9):3696-701. doi: 10.1021/jf0480804.
108. Ait Barka E, Eullaffroy P, Clément C, Vernet G. Chitosan improves development, and protects *Vitis vinifera* L. against *Botrytis cinerea*. *Plant Cell Reports*. 2004;22(8):608-14. doi: 10.1007/s00299-003-0733-3.
109. Sharp RG. A Review of the Applications of Chitin and Its Derivatives in Agriculture to Modify Plant-Microbial Interactions and Improve Crop Yields. *Agronomy*. 2013;3(4):757-93. PubMed PMID: doi:10.3390/agronomy3040757.
110. Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*. 2006;444(7117):323-9. doi: 10.1038/nature05286.
111. Herde O, PeÑA-CortÉS H, Willmitzer L, Fisahn J. Stomatal responses to jasmonic acid, linolenic acid and abscisic acid in wild-type and ABA-deficient tomato plants. *Plant, Cell & Environment*. 1997;20(1):136-41. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-11.x>.
112. Linden JC, Phisalaphong M. Oligosaccharides potentiate methyl jasmonate-induced production of paclitaxel in *Taxus canadensis*. *Plant Science*. 2000;158(1):41-51. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(00\)00306-X](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(00)00306-X).
113. Uthairatanakij A, Teixeira da Silva J, Obsuwan K. Chitosan for improving orchid production and quality. *Orchid Science and Biotechnology*. 2007;1(1):1-5.
114. Utsunomiya N, Kinai H, Matsui Y, Takebayashi T. The Effects of Chitosan Oligosaccharides Soil Conditioner and Nitrogen Fertilizer on the Flowering and Fruit Growth of Purple Passionfruit (*Passiflora edulis* Sims var. *edulis*). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. 1998;67(4):567-71. doi: 10.2503/jjshs.67.567.
115. Guan Y-j, Hu J, Wang X-j, Shao C-x. Seed priming with chitosan improves maize germination and seedling growth in relation to physiological changes under low temperature stress. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2009;10(6):427-33. doi: 10.1631/jzus.B0820373.
116. Grover A. Plant Chitinases: Genetic Diversity and Physiological Roles. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 2012;31(1):57-73. doi: 10.1080/07352689.2011.616043.
117. Sun T, Yao Q, Zhou D, Mao F. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2008;18(21):5774-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.09.072>.

118. Pereira AES, Silva PM, Oliveira JL, Oliveira HC, Fraceto LF. Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2017;150:141-52. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.027>.
119. Pereira AES, Sandoval-Herrera IE, Zavala-Betancourt SA, Oliveira HC, Ledezma-Pérez AS, Romero J, et al.  $\gamma$ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: Characterization and evaluation of biological activity. *Carbohydrate Polymers*. 2017;157:1862-73. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.11.073>.
120. Quiñones JP, García YC, Curiel H, Covas CP. Microspheres of chitosan for controlled delivery of brassinosteroids with biological activity as agrochemicals. *Carbohydrate Polymers*. 2010;80(3):915-21. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.006>.
121. Mogul MG, Akin H, Hasirci N, Trantolo DJ, Gresser JD, Wise DL. Controlled release of biologically active agents for purposes of agricultural crop management. *Resources, conservation and recycling*. 1996;16(1-4):289-320.
122. Chauhan N, Dilbaghi N, Gopal M, Kumar R, Kim K-H, Kumar S. Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;97:616-24. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.059>.
123. Cao L, Zhang H, Cao C, Zhang J, Li F, Huang Q. Quaternized chitosan-capped mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers for controlled pesticide release. *Nanomaterials*. 2016;6(7):126.
124. Ehrlich H, Bazhenov VV, Debitus C, de Voogd N, Galli R, Tsurkan MV, et al. Isolation and identification of chitin from heavy mineralized skeleton of *Suberea clavata* (Verongida: Demospongiae: Porifera) marine demosponge. *International journal of biological macromolecules*. 2017;104:1706-12.
125. Van Soest RW, Boury-Esnault N, Vacelet J, Dohrmann M, Erpenbeck D, De Voogd NJ, et al. Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS one*. 2012;7(4):e35105.
126. Hamm CE. The evolution of advanced mechanical defenses and potential technological applications of diatom shells. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2005;5(1):108-19.
127. Yoneda S, Ito F, Yamanaka S, Usami H. Optical properties of nanoporous silica frustules of a diatom determined using a 10  $\mu$ m microfiber probe. *Japanese Journal of Applied Physics*. 2016;55(7):072001.
128. Yang W, Lopez PJ, Rosengarten G. Diatoms: self assembled silica nanostructures, and templates for bio/chemical sensors and biomimetic membranes. *Analyst*. 2011;136(1):42-53.
129. Sumper M, Brunner E. Learning from diatoms: nature's tools for the production of nanostructured silica. *Advanced Functional Materials*. 2006;16(1):17-26.

130. Mishra M, Arukha AP, Bashir T, Yadav D, Prasad G. All new faces of diatoms: potential source of nanomaterials and beyond. *Frontiers in microbiology*. 2017;8:1239.
131. Nowak AP, Lisowska-Oleksiak A, Wicikowska B, Gazda M. Biosilica from sea water diatoms algae—electrochemical impedance spectroscopy study. *Journal of Solid State Electrochemistry*. 2017;21(8):2251-8.
132. Aw MS, Simovic S, Addai-Mensah J, Losic D. Silica microcapsules from diatoms as new carrier for delivery of therapeutics. *Nanomedicine*. 2011;6(7):1159-73.
133. Papathanasiou KE, Turhanen P, Brückner SI, Brunner E, Demadis KD. Smart, programmable and responsive injectable hydrogels for controlled release of cargo osteoporosis drugs. *Scientific Reports*. 2017;7(1):1-9.
134. Aizenberg J, Weaver JC, Thanawala MS, Sundar VC, Morse DE, Fratzl P. Skeleton of *Euplectella* sp.: structural hierarchy from the nanoscale to the macroscale. *Science*. 2005;309(5732):275-8.
135. Shimizu K, Cha J, Stucky GD, Morse DE. Silicatein  $\alpha$ : cathepsin L-like protein in sponge biosilica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(11):6234-8.
136. Cha JN, Shimizu K, Zhou Y, Christiansen SC, Chmelka BF, Stucky GD, et al. Silicatein filaments and subunits from a marine sponge direct the polymerization of silica and silicones in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999;96(2):361-5.
137. Krasko A, Lorenz B, Batel R, Schröder HC, Müller IM, Müller WE. Expression of silicatein and collagen genes in the marine sponge *Suberites domuncula* is controlled by silicate and myotrophin. *European Journal of Biochemistry*. 2000;267(15):4878-87.
138. Schröder HC, Wang X, Manfrin A, Yu S-H, Grebenjuk VA, Korzhev M, et al. Acquisition of structure-guiding and structure-forming properties during maturation from the pro-silicatein to the silicatein form. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(26):22196-205.
139. Cai D, Wang L, Zhang G, Zhang X, Wu Z. Controlling Pesticide Loss by Natural Porous Micro/Nano Composites: Straw Ash-Based Biochar and Biosilica. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2013;5(18):9212-6. doi: 10.1021/am402864r.
140. Kaya M, Bilican I, Mujtaba M, Sargin I, Erginer Haskoylu M, Toksoy Oner E, et al. Sponge-derived natural bioactive glass microspheres with self-assembled surface channel arrays opening into a hollow core for bone tissue and controlled drug release applications. *Chemical Engineering Journal*. 2020:126667. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.126667>.
141. Otalvaro JO, Avena M, Brigante M. Adsorption of organic pollutants by amine functionalized mesoporous silica in aqueous solution. Effects of pH, ionic strength and some consequences of APTES stability. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2019;7(5):103325. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103325>.

142. Sun B, Zhou G, Zhang H. Synthesis, functionalization, and applications of morphology-controllable silica-based nanostructures: A review. *Progress in Solid State Chemistry*. 2016;44(1):1-19. doi: <https://doi.org/10.1016/j.progsolidstchem.2016.01.001>.
143. Mackenzie G, Boa AN, Diego-Taboada A, Atkin SL, Sathyapalan T. Sporopollenin, the least known yet toughest natural biopolymer. *Frontiers in Materials*. 2015;2:66.
144. Atkin SL, Barrier S, Beckett ST, Brown T, Mackenzie G, Madden L. Towards the use of sporopollenin in drug delivery: Efficient encapsulation of oligonucleotides. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*. 2015;7:307-11.
145. Mujtaba M, Sargin I, Akyuz L, Ceter T, Kaya M. Newly isolated sporopollenin microcages from *Platanus orientalis* pollens as a vehicle for controlled drug delivery. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;77:263-70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.02.176>.
146. Diego-Taboada A, Beckett ST, Atkin SL, Mackenzie G. Hollow pollen shells to enhance drug delivery. *Pharmaceutics*. 2014;6(1):80-96.
147. Sargin İ, Arslan G. Chitosan/sporopollenin microcapsules: Preparation, characterisation and application in heavy metal removal. *International journal of biological macromolecules*. 2015;75:230-8.
148. Kaya M, Akyuz L, Sargin I, Mujtaba M, Salaberria AM, Labidi J, et al. Incorporation of sporopollenin enhances acid–base durability, hydrophobicity, and mechanical, antifungal and antioxidant properties of chitosan films. *Journal of industrial and engineering chemistry*. 2017;47:236-45.
149. Atalay FE, Bingol A, Kaya H, Emre Y, Bas HH, Culum AA. Juglans Sporopollenin for High-Performance Supercapacitor Electrode Design. *ACS omega*. 2020;5(32):20417-27.
150. SARGIN SA, SELVİ S, AKÇİÇEK E. Alaşehir (Manisa) ve çevresinde yetişen bazı geofitlerin etnobotanik açıdan incelenmesi. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*. 2013;29(2):170-8.
151. Mifsud S. *Muscari neglectum* (Southern Grape Hyacinth): MaltaWildPlants. com-the online Flora of the Maltese Islands. 2002.
152. Davis P, Stuart D. *Muscari Miller*. In: Davis, PH (ed.), *Flora of Turkey and the east Aegean Islands*. Vol. 8. Edinburgh Univ. Press, pp. 245-265; 1984.
153. Ekim T, Koyuncu M, Vural M, Duman H, Aytaç Z, Adıgüzel N. Red data book of Turkish plants (Pteridophyta and Spermatophyta). *Barışcan Ofset, Ankara*. 2000:246.
154. Saniewski M. Induction of bulblet formation by benzyladenine in *Muscari* bulbs. 1979.
155. Saniewski M. REGENERATION OF PANTLETS ON LEAVES AND INFLORESCENCE STALK OF MUSCARI THROUGH TISSUE CULTURE. 1979.

156. Saniewski M, Puchalski J. The effect of methyl jasmonate and abscisic acid on differentiation of benzyladenine-induced bulblets in *Muscari* bulbs. *Biologia plantarum*. 1987;29(1):63.
157. Suzuki S, Nakano M. Organogenesis and somatic embryogenesis from callus cultures in *Muscari armeniacum* Leichtl. ex Bak. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 2001;37(3):382-7.
158. Mori S, Nakano M. Somatic embryo induction from leaf-and flower bud-derived calli in several *Muscari* species and cultivars. *Propag Ornament Plant*. 2004;4:58-62.
159. Ozel CA, Khawar KM. In vitro bulblet regeneration of *Ornithogalum oligophyllum* ED Clarke using twin scale bulb explants. *Propagation of Ornamental Plants*. 2007;7(2):82-8.
160. Uranbey S. Stimulating effects of different basal media and cytokinin types on regeneration of endemic and endangered *Muscari aucheri*. *Arch Biol Sci*. 2010;62(3):663-7.
161. Uzun S, Parmaksiz I, Uranbey S, Mirici S, SARIHAN EO, Ipek A, et al. In vitro micropropagation from immature embryos of the endemic and endangered *Muscari muscarimi* Medik. *Turkish Journal of Biology*. 2014;38(1):83-8.
162. Lim TK. *Muscari neglectum*. In: Lim TK, editor. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants: Volume 7, Flowers*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2014. p. 122-5.
163. López Arnaldos T, Muñoz R, Ferrer MA, Calderón AA. Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria* × *ananassa*, cv. Chandler) callus culture. *Physiologia Plantarum*. 2001;113(3):315-22.
164. Ling A, Yap C, Shaib JM, Vilasini P. Induction and morphogenesis of *Phalaenopsis* callus. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*. 2007;35(1):147.
165. Chugh S, Guha S, Rao IU. Micropropagation of orchids: a review on the potential of different explants. *Scientia Horticulturae*. 2009;122(4):507-20.
166. Mondal T, Aditya S, Banerjee N. In vitro Axillary Shoot Regeneration and Direct Protocorm-like Body Induction from Axenic Shoot Tips of *Doritis pulcherrima* Lindl. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 2013;23(2):251-61.
167. Hesami M, Tohidfar M, Alizadeh M, Daneshvar MH. Effects of sodium nitroprusside on callus browning of *Ficus religiosa*: an important medicinal plant. *Journal of Forestry Research*. 2020;31(3):789-96. doi: 10.1007/s11676-018-0860-x.
168. Verma V, Zinta G, Kanwar K. Optimization of efficient direct organogenesis protocol for *Punica granatum* L. cv. Kandhari Kabuli from mature leaf explants. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 2020. doi: 10.1007/s11627-020-10111-x.
169. Sui L, Kong L, Liu X, Zhang Y. Anti-browning in Tissue Culture of ‘Donghong’ Kiwifruit. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. 2020;740:012195. doi: 10.1088/1757-899x/740/1/012195.

170. Xu C, Zeng B, Huang J, Huang W, Liu Y. Genome-Wide Transcriptome and Expression Profile Analysis of *Phalaenopsis* during Explant Browning. *PLOS ONE*. 2015;10(4):e0123356. doi: 10.1371/journal.pone.0123356.
171. Choi W-G, Miller G, Wallace I, Harper J, Mittler R, Gilroy S. Orchestrating rapid long-distance signaling in plants with  $\text{Ca}^{2+}$ , ROS and electrical signals. *The Plant Journal*. 2017;90(4):698-707. doi: <https://doi.org/10.1111/tpj.13492>.
172. Joo JH, Bae YS, Lee JS. Role of Auxin-Induced Reactive Oxygen Species in Root Gravitropism. *Plant Physiology*. 2001;126(3):1055-60. doi: 10.1104/pp.126.3.1055.
173. TOGNETTI VB, MÜHLENBOCK P, VAN BREUSEGEM F. Stress homeostasis – the redox and auxin perspective. *Plant, Cell & Environment*. 2012;35(2):321-33. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2011.02324.x>.
174. Bulut E, Sargin I, Arslan O, Odabasi M, Akyuz B, Kaya M. In situ chitin isolation from body parts of a centipede and lysozyme adsorption studies. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;70:552-63.
175. Erdogan S, Kaya M. High similarity in physicochemical properties of chitin and chitosan from nymphs and adults of a grasshopper. *International journal of biological macromolecules*. 2016;89:118-26.
176. Kaya M, Lelešius E, Nagrockaitė R, Sargin I, Arslan G, Mol A, et al. Differentiations of chitin content and surface morphologies of chitins extracted from male and female grasshopper species. *PloS one*. 2015;10(1):e0115531.
177. Kaya M, Bilican I, Mujtaba M, Sargin I, Haskoylu ME, Oner ET, et al. Sponge-derived natural bioactive glass microspheres with self-assembled surface channel arrays opening into a hollow core for bone tissue and controlled drug release applications. *Chemical Engineering Journal*. 2020:126667.
178. Mundargi RC, Tan E-L, Seo J, Cho N-J. Encapsulation and controlled release formulations of 5-fluorouracil from natural *Lycopodium clavatum* spores. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2016;36:102-8.
179. Costa P, Lobo JMS. Modeling and comparison of dissolution profiles. *European journal of pharmaceutical sciences*. 2001;13(2):123-33.
180. Higuchi T. Mechanism of sustained - action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. *Journal of pharmaceutical sciences*. 1963;52(12):1145-9.
181. Rosen JE, Gu FX. Surface Functionalization of Silica Nanoparticles with Cysteine: A Low-Fouling Zwitterionic Surface. *Langmuir*. 2011;27(17):10507-13. doi: 10.1021/la201940r.

182. Turfan N. Effect of Some Abiotic Stress Factories on Savrun Spinach (*Spinacea oleracea* L.). *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*. 2017;5(6):660-7.
183. Akkemik E, Taser P, Bayindir A, Budak H, Ciftci M. Purification and characterization of glutathione S-transferase from turkey liver and inhibition effects of some metal ions on enzyme activity. *Environmental Toxicology and pharmacology*. 2012;34(3):888-94.
184. Spector T. Refinement of the Coomassie blue method of protein quantitation: a simple and linear spectrophotometric assay for  $\leq 0.5$  to 50  $\mu\text{g}$  of protein. *Analytical biochemistry*. 1978;86(1):142-6.
185. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*. 1988;34(3):497-500.
186. Dessler RK, Himmelhoch SR, Evans WH, Januska M, Mage M, Shelton E. Guinea pig heterophil and eosinophil peroxidase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1972;148(2):452-65.
187. Aebi H. [13] Catalase in vitro. *Methods in enzymology*. 105: Elsevier; 1984. p. 121-6.
188. Akyuz L, Sargin I, Kaya M, Ceter T, Akata I. A new pollen-derived microcarrier for pantoprazole delivery. *Materials Science and Engineering: C*. 2017;71:937-42. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.009>.
189. Hozhabr Araghi S, Entezari MH, Chamsaz M. Modification of mesoporous silica magnetite nanoparticles by 3-aminopropyltriethoxysilane for the removal of Cr(VI) from aqueous solution. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2015;218:101-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2015.07.008>.
190. Shafqat SS, Khan AA, Zafar MN, Alhaji MH, Sanaullah K, Shafqat SR, et al. Development of amino-functionalized silica nanoparticles for efficient and rapid removal of COD from pre-treated palm oil effluent. *Journal of Materials Research and Technology*. 2019;8(1):385-95.
191. Kong J, Yu S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2007;39(8):549-59.
192. Zetzsche F, Kalt P, Liechti J, Ziegler E. Zur Konstitution des Lycopodium - Sporonins, des Tasmanins und des Lange - Sporonins. XI. Mitteilung über die Membran der Sporen und Pollen. *Journal für Praktische Chemie*. 1937;148(9 - 10):267-86.
193. Watson JS, Sephton MA, Sephton SV, Self S, Fraser WT, Lomax BH, et al. Rapid determination of spore chemistry using thermochemolysis gas chromatography-mass spectrometry and micro-Fourier transform infrared spectroscopy. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2007;6(6):689-94.

194. Watson JS, Fraser WT, Sephton MA. Formation of a polyalkyl macromolecule from the hydrolysable component within sporopollenin during heating/pyrolysis experiments with Lycopodium spores. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2012;95:138-44.
195. Hajji S, Ghorbel-Bellaaj O, Younes I, Jellouli K, Nasri M. Chitin extraction from crab shells by *Bacillus* bacteria. Biological activities of fermented crab supernatants. *International journal of biological macromolecules*. 2015;79:167-73.
196. Du Q, Sun J, Li Y, Yang X, Wang X, Wang Z, et al. Highly enhanced adsorption of congo red onto graphene oxide/chitosan fibers by wet-chemical etching off silica nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*. 2014;245:99-106.
197. Kaya M, Tozak KÖ, Baran T, Sezen G, Sargin I. Natural porous and nano fiber chitin structure from *Gammarus argaeus* (Gammaridae Crustacea). *Excli Journal*. 2013;12:503.
198. bin Hussein MZ, Zainal Z, Yahaya AH, Foo DWV. Controlled release of a plant growth regulator,  $\alpha$ -naphthaleneacetate from the lamella of Zn–Al-layered double hydroxide nanocomposite. *Journal of controlled release*. 2002;82(2-3):417-27.
199. Aguado J, Arsuaga JM, Arencibia A, Lindo M, Gascón V. Aqueous heavy metals removal by adsorption on amine-functionalized mesoporous silica. *Journal of hazardous materials*. 2009;163(1):213-21.
200. Park M, Shim I-K, Jung E-Y, Choy J-H. Modification of external surface of laponite by silane grafting. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*. 2004;65(2-3):499-501.
201. Dyab AK, Sadek KU. Microwave assisted one-pot green synthesis of cinnoline derivatives inside natural sporopollenin microcapsules. *RSC advances*. 2018;8(41):23241-51.
202. Rahman I, Jafarzadeh M, Sipaut C. Synthesis of organo-functionalized nanosilica via a co-condensation modification using  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Ceramics International*. 2009;35(5):1883-8.
203. Mueller R, Kammler HK, Wegner K, Pratsinis SE. OH surface density of SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> by thermogravimetric analysis. *Langmuir*. 2003;19(1):160-5.
204. Baran T, Sargin I, Kaya M, Menteş A, Ceter T. Design and application of sporopollenin microcapsule supported palladium catalyst: Remarkably high turnover frequency and reusability in catalysis of biaryls. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2017;486:194-203. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.071>.
205. Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*. 2002;7(9):405-10.
206. Espín J, Tomas-Barberan F. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of fruits and vegetables quality. *J Sci Food Agric*. 2001;81:853-76.
207. Scandalios JG. Oxygen stress and superoxide dismutases. *Plant physiology*. 1993;101(1):7.

208. Chen Y, Li X, Bai J, Shi F, Xu T, Gong Q, et al. A supramolecular hydrogel for spatial-temporal release of auxin to promote plant root growth. *Chemical Communications*. 2018;54(83):11721-4. doi: 10.1039/C8CC05999C.
209. Şenel S, McClure SJ. Potential applications of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56(10):1467-80. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2004.02.007>.
210. Fan L, Jin R, Le X, Zhou X, Chen S, Liu H, et al. Chitosan microspheres for controlled delivery of auxins as agrochemicals. *Microchimica Acta*. 2012;176(3):381-7. doi: 10.1007/s00604-011-0732-y.
211. Tao S, Pang R, Chen C, Ren X, Hu S. Synthesis, characterization and slow release properties of O-naphthylacetyl chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 2012;88(4):1189-94. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.076>.
212. Atta S, Ikbāl M, Kumar A, Pradeep Singh ND. Application of photoremovable protecting group for controlled release of plant growth regulators by sunlight. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2012;111:39-49. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.03.008>.
213. bin Hussein MZ, Zainal Z, Yahaya AH, Foo DWV. Controlled release of a plant growth regulator,  $\alpha$ -naphthaleneacetate from the lamella of Zn–Al-layered double hydroxide nanocomposite. *Journal of Controlled Release*. 2002;82(2):417-27. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(02\)00172-4](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(02)00172-4).
214. Rahman IA, Jafarzadeh M, Sipaut CS. Synthesis of organo-functionalized nanosilica via a co-condensation modification using  $\gamma$ -aminopropyltriethoxysilane (APTES). *Ceramics International*. 2009;35(5):1883-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2008.10.028>.
215. Ali N, Ali F, Ullah I, Ali Z, Duclaux L, Reinert L, et al. Organically modified micron-sized vermiculite and silica for efficient removal of Alizarin Red S dye pollutant from aqueous solution. *Environmental Technology & Innovation*. 2020;19:101001.
216. Chen C, Gao Z, Qiu X, Hu S. Enhancement of the controlled-release properties of chitosan membranes by crosslinking with suberoyl chloride. *Molecules*. 2013;18(6):7239-52.
217. Sprynskyy M, Pomastowski P, Hornowska M, Król A, Rafińska K, Buszewski B. Naturally organic functionalized 3D biosilica from diatom microalgae. *Materials & Design*. 2017;132:22-9.
218. Croce G, Frache A, Milanesio M, Marchese L, Causa M, Viterbo D, et al. Structural characterization of siliceous spicules from marine sponges. *Biophysical Journal*. 2004;86(1):526-34.
219. Sargin I, Akyuz L, Kaya M, Tan G, Ceter T, Yildirim K, et al. Controlled release and anti-proliferative effect of imatinib mesylate loaded sporopollenin microcapsules extracted from pollens of *Betula pendula*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2017;105:749-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.093>.

220. Palazzo I, Mezzetta A, Guazzelli L, Sartini S, Pomelli CS, Parker WO, et al. Chiral ionic liquids supported on natural sporopollenin microcapsules. *RSC advances*. 2018;8(38):21174-83.
221. Li X, Deng S, Fu H, Mu G. Inhibition effect of 6-benzylaminopurine on the corrosion of cold rolled steel in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution. *Corrosion Science*. 2009;51(3):620-34.
222. Soon CY, Tee YB, Tan CH, Rosnita AT, Khalina A. Extraction and physicochemical characterization of chitin and chitosan from *Zophobas morio* larvae in varying sodium hydroxide concentration. *International journal of biological macromolecules*. 2018;108:135-42.
223. Kaya M, Sargin I, Tozak KÖ, Baran T, Erdogan S, Sezen G. Chitin extraction and characterization from *Daphnia magna* resting eggs. *International journal of biological macromolecules*. 2013;61:459-64.
224. Kaya M, Baran T, Karaarslan M. A new method for fast chitin extraction from shells of crab, crayfish and shrimp. *Natural Product Research*. 2015;29(15):1477-80.
225. Kaya M, Baran T, Montes A, Asaroglu M, Sezen G, Tozak KO. Extraction and characterization of  $\alpha$ -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates. *Food biophysics*. 2014;9(2):145-57.
226. Basosidik S, Pankaew P, Hoonnivathana E, Limsuwan P, Naemchanthara K, editors. Characterization of Chitin extracted from waste sources via XRD, FTIR, and TGA techniques. *Advanced Materials Research*; 2012: Trans Tech Publ.
227. Cárdenas G, Cabrera G, Taboada E, Miranda SP. Chitin characterization by SEM, FTIR, XRD, and <sup>13</sup>C cross polarization/mass angle spinning NMR. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004;93(4):1876-85.
228. Guinesi LS, Cavaleiro ÉTG. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. *Thermochimica Acta*. 2006;444(2):128-33.
229. Zamecnik J, Faltus M, Kotkova R, Hejnak V. Glass transition determination in Allium shoot tips after dehydration. *Acta Hort(ISHS)*. 2011;908:33-8.
230. Saharan V, Mehrotra A, Khatik R, Rawal P, Sharma SS, Pal A. Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2013;62:677-83. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.012>.
231. Hussain MR, Devi RR, Maji TK. Controlled release of urea from chitosan microspheres prepared by emulsification and cross-linking method. *Iranian Polymer Journal*. 2012;21(8):473-9. doi: 10.1007/s13726-012-0051-0.
232. Li J, Yao J, Li Y, Shao Y. Controlled release and retarded leaching of pesticides by encapsulating in carboxymethyl chitosan /bentonite composite gel. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. 2012;47(8):795-803. doi: 10.1080/03601234.2012.676421.

233. Silva MdS, Cocenza DS, Grillo R, Melo NFSd, Tonello PS, Oliveira LCd, et al. Paraquat-loaded alginate/chitosan nanoparticles: Preparation, characterization and soil sorption studies. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;190(1):366-74. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.03.057>.
234. Yeom C, Kim Y, Lee J. Microencapsulation of water - soluble herbicide by interfacial reaction. II. Release properties of microcapsules. *Journal of applied polymer science*. 2002;84(5):1025-34.
235. Yin J-m, Wang H-l, Yang Z-k, Wang J, Wang Z, Duan L-s, et al. Engineering Lignin Nanomicroparticles for the Antiphotolysis and Controlled Release of the Plant Growth Regulator Absciscic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020;68(28):7360-8. doi: 10.1021/acs.jafc.0c02835.
236. Valderrama N A, Jacinto H C, Lay J, Flores E Y, Zavaleta C D, Delfin AR. Factorial design for preparing chitosan nanoparticles and its use for loading and controlled release of indole-3-acetic acid with effect on hydroponic lettuce crops. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2020;26:101640. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101640>.
237. Pang L, Gao Z, Feng H, Wang S, Cong H, Yu B, et al. Preparation of pH-responsive cellulose derivative with surfactant-property for methyl 1-Naphthylacetate controlled release. *Industrial Crops and Products*. 2019;135:57-63. doi: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.04.027>.
238. Balmas V, Delogu G, Sposito S, Rau D, Migheli Q. Use of a Complexation of Tebuconazole with  $\beta$ -Cyclodextrin for Controlling Foot and Crown Rot of Durum Wheat Incited by *Fusarium culmorum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(2):480-4. doi: 10.1021/jf0523014.
239. Asrar J, Ding Y, La Monica RE, Ness LC. Controlled Release of Tebuconazole from a Polymer Matrix Microparticle: Release Kinetics and Length of Efficacy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2004;52(15):4814-20. doi: 10.1021/jf0306385.
240. Singh B, Sharma DK, Gupta A. A study towards release dynamics of thiram fungicide from starch–alginate beads to control environmental and health hazards. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;161(1):208-16. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2008.03.074>.
241. Qian K, Shi T, He S, Luo L, Liu X, Cao Y. Release kinetics of tebuconazole from porous hollow silica nanospheres prepared by miniemulsion method. *Microporous and Mesoporous Materials*. 2013;169:1-6. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.10.017>.
242. Fernández-Pérez M, González-Pradas E, Villafranca-Sánchez M, Flores-Céspedes F. Mobility of atrazine from alginate-bentonite controlled release formulations in layered soil. *Chemosphere*. 2001;43(3):347-53. doi: [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00112-0).
243. Lobo FA, de Aguirre CL, Silva MS, Grillo R, de Melo NFS, de Oliveira LK, et al. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) microspheres loaded with atrazine herbicide:

screening of conditions for preparation, physico-chemical characterization, and in vitro release studies. *Polymer Bulletin*. 2011;67(3):479-95. doi: 10.1007/s00289-011-0447-6.

244. Ao M, Zhu Y, He S, Li D, Li P, Li J, et al. Preparation and characterization of 1-naphthylacetic acid–silica conjugated nanospheres for enhancement of controlled-release performance. *Nanotechnology*. 2012;24(3):035601.

245. Li Z-Z, Xu S-A, Wen L-X, Liu F, Liu A-Q, Wang Q, et al. Controlled release of avermectin from porous hollow silica nanoparticles: Influence of shell thickness on loading efficiency, UV-shielding property and release. *Journal of Controlled Release*. 2006;111(1):81-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2005.10.020>.

246. Alshehri SM, Al-Lohedan HA, Chaudhary AA, Al-Farraj E, Alhokbany N, Issa Z, et al. Delivery of ibuprofen by natural macroporous sporopollenin exine capsules extracted from *Phoenix dactylifera* L. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;88:158-65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2016.02.004>.

247. Hamad SA, Dyab AF, Stoyanov SD, Paunov VN. Encapsulation of living cells into sporopollenin microcapsules. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21(44):18018-23.

248. Deng Z, Pei Y, Wang S, Zhou B, Hou X, Li J, et al. Designable Carboxymethylpachymaran/Metal Ion Architecture on Sunflower Sporopollenin Exine Capsules as Delivery Vehicles for Bioactive Macromolecules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020. doi: 10.1021/acs.jafc.0c05169.

249. Coloma I, Cortijo M, Fernández-Sánchez I, Perles J, Priego JL, Gutiérrez C, et al. pH- and Time-Dependent Release of Phytohormones from Diruthenium Complexes. *Inorganic Chemistry*. 2020;59(11):7779-88. doi: 10.1021/acs.inorgchem.0c00844.

250. He Y, Guo X, Lu R, Niu B, Pasapula V, Hou P, et al. Changes in morphology and biochemical indices in browning callus derived from *Jatropha curcas* hypocotyls. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2009;98(1):11-7.

251. Yamauchi N, Funamoto Y, Shigyo M. Peroxidase-mediated chlorophyll degradation in horticultural crops. *Phytochemistry reviews*. 2004;3(1-2):221-8.

252. Toivonen PM, Brummell DA. Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest biology and technology*. 2008;48(1):1-14.

253. Zhang X, Ervin E, Schmidt R. The role of leaf pigment and antioxidant levels in UV-B resistance of dark-and light-green Kentucky bluegrass cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2005;130(6):836-41.

254. Römer S, Fraser PD. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. *Planta*. 2005;221(3):305-8.

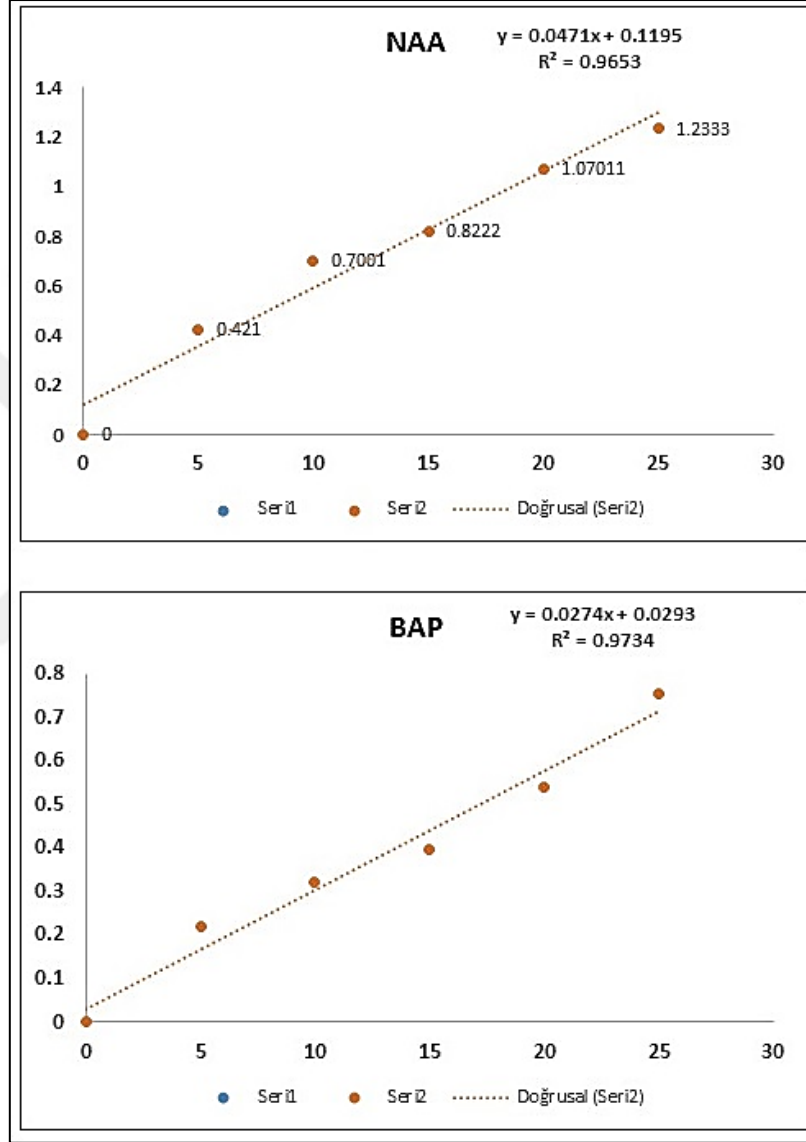
255. Han H, Li Y, Zhou S. Overexpression of phytoene synthase gene from *Salicornia europaea* alters response to reactive oxygen species under salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Biotechnology letters*. 2008;30(8):1501-7.

256. Dubravina G, Zaytseva S, Zagoskina N. Changes in formation and localization of phenolic compounds in the tissues of European and Canadian yew during dedifferentiation in vitro. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2005;52(5):672-8.
257. Naz S, Ali A, Iqbal J. Phenolic content in vitro cultures of chick pea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis. *Pak J Bot*. 2008;40(6):2525-39.
258. Leng P, Su S, Wei F, Yu F, Duan Y. Correlation between browning, total phenolic content, polyphenol oxidase and several antioxidation enzymes during pistachio tissue culture. *Acta horticulturae*. 2009;829:127-32.
259. Kaewubon P, Hutadilok-Towatana N, da Silva JAT, Meesawat U. Ultrastructural and biochemical alterations during browning of pigeon orchid (*Dendrobium crumenatum* Swartz) callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2015;121(1):53-69.
260. Préstamo G, Manzano P. Peroxidases of selected fruits and vegetables and the possible use of ascorbic acid as an antioxidant. *HortScience*. 1993;28(1):48-50.
261. Campa A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. *Peroxidases in chemistry and biology*. 1991:25-50.
262. Liu F, Chen L. Redox dynamics during embryogenic callus induction of *Phalaenopsis* spp. *Journal of Wuhan Botanical Research*. 2010;28(6):737-43.
263. de Pinto MC, De Gara L. Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation. *Journal of experimental botany*. 2004;55(408):2559-69.
264. Pitzschke A, Djamei A, Bitton F, Hirt H. A major role of the MEKK1–MKK1/2–MPK4 pathway in ROS signalling. *Molecular plant*. 2009;2(1):120-37.
265. Xu CJ, Li L. Preliminary studies on the elements of browning and the changes in cellular texture of leaf explant browning in *Phalaenopsis*. *한국원예학회 기타간행물*. 2006:221-.

## EKLER

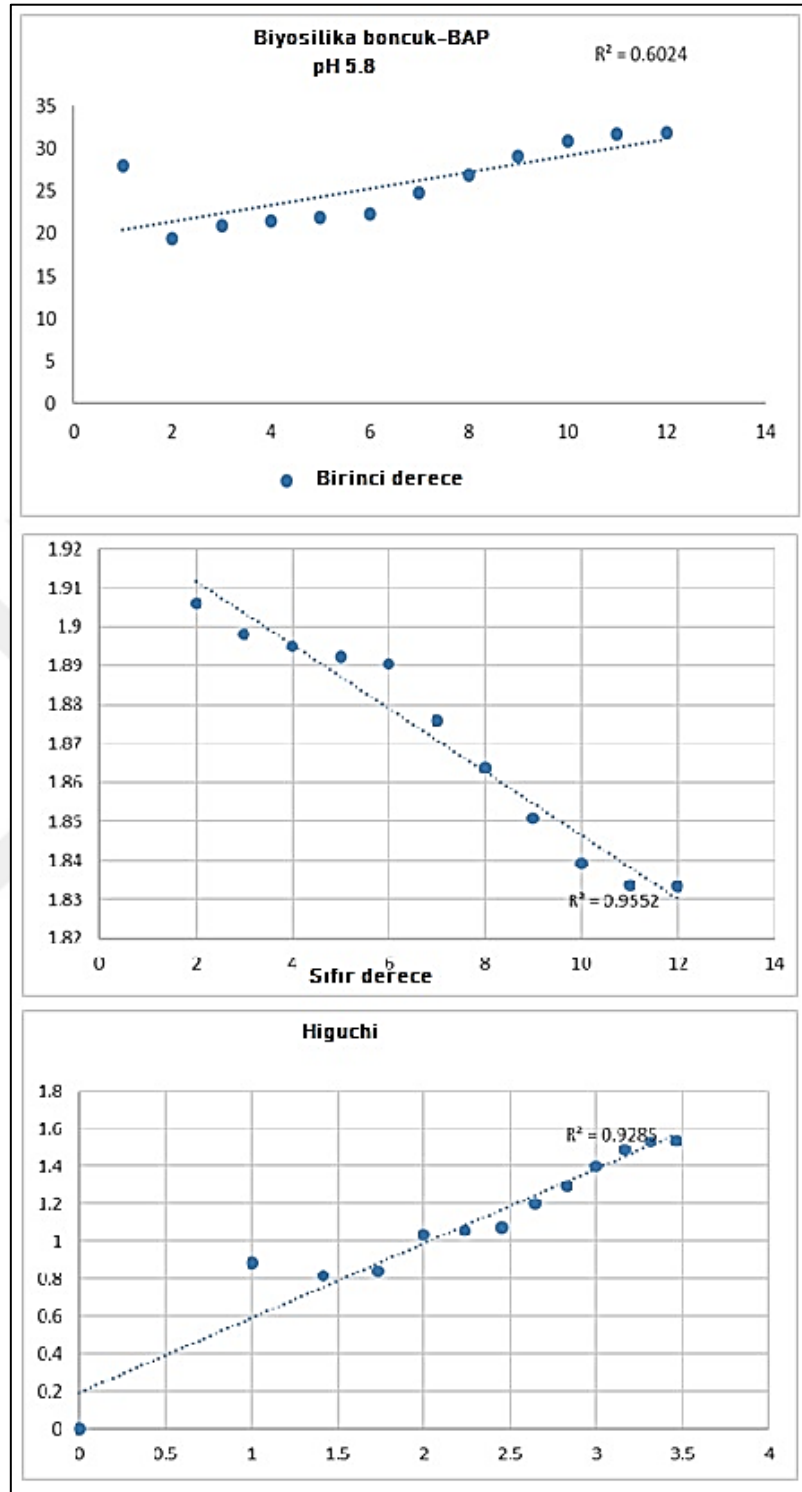
Kinetik parametreler, yükleme verimi, enzimetik çalışmalarında hesaplanan standart eğrileri ek olarak verilmiştir.

### EK 1: BAP VE NAA YÜKLEME VERİMİ STANDART EĞİRLERİ

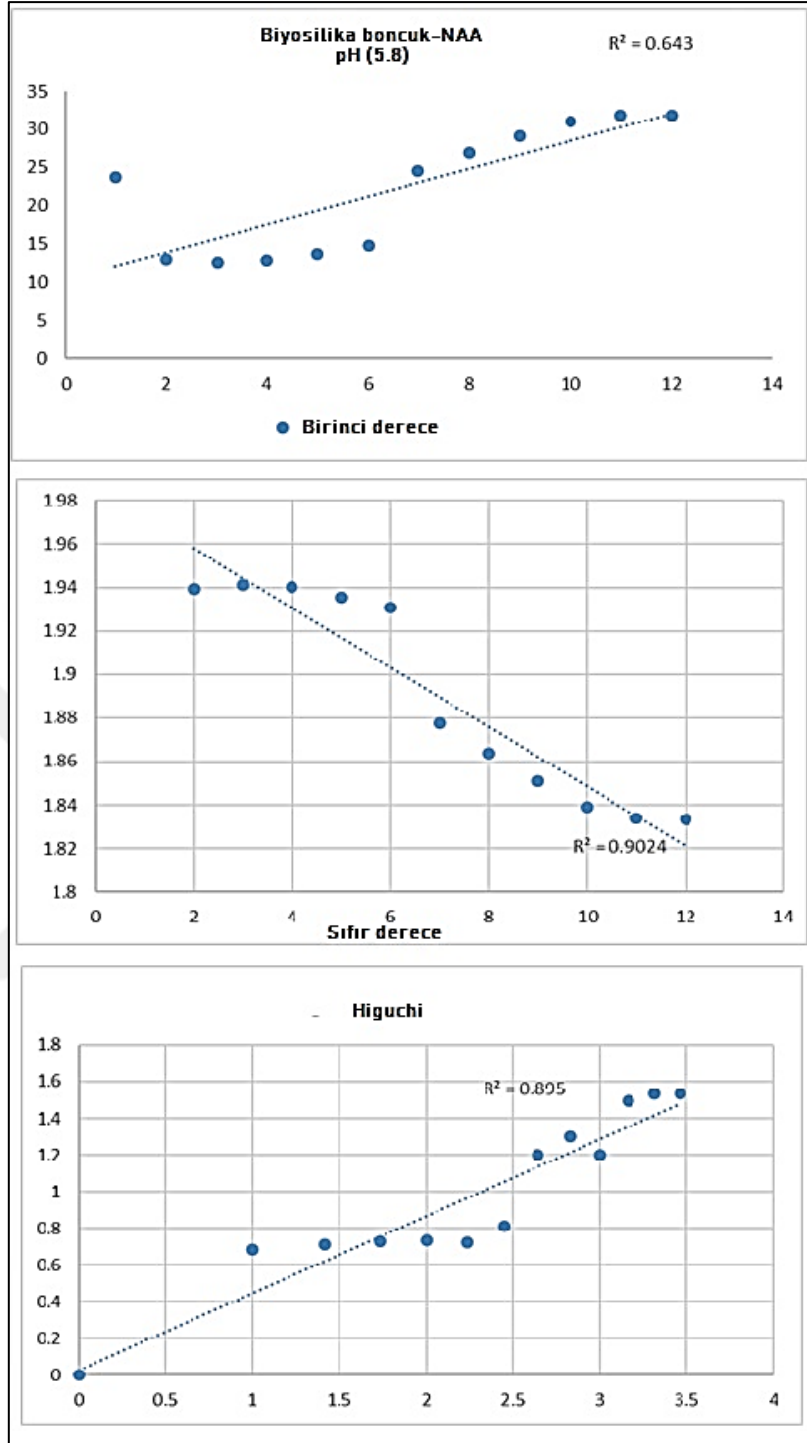


BAP ve NAA yükleme verimi standart eğrileri.

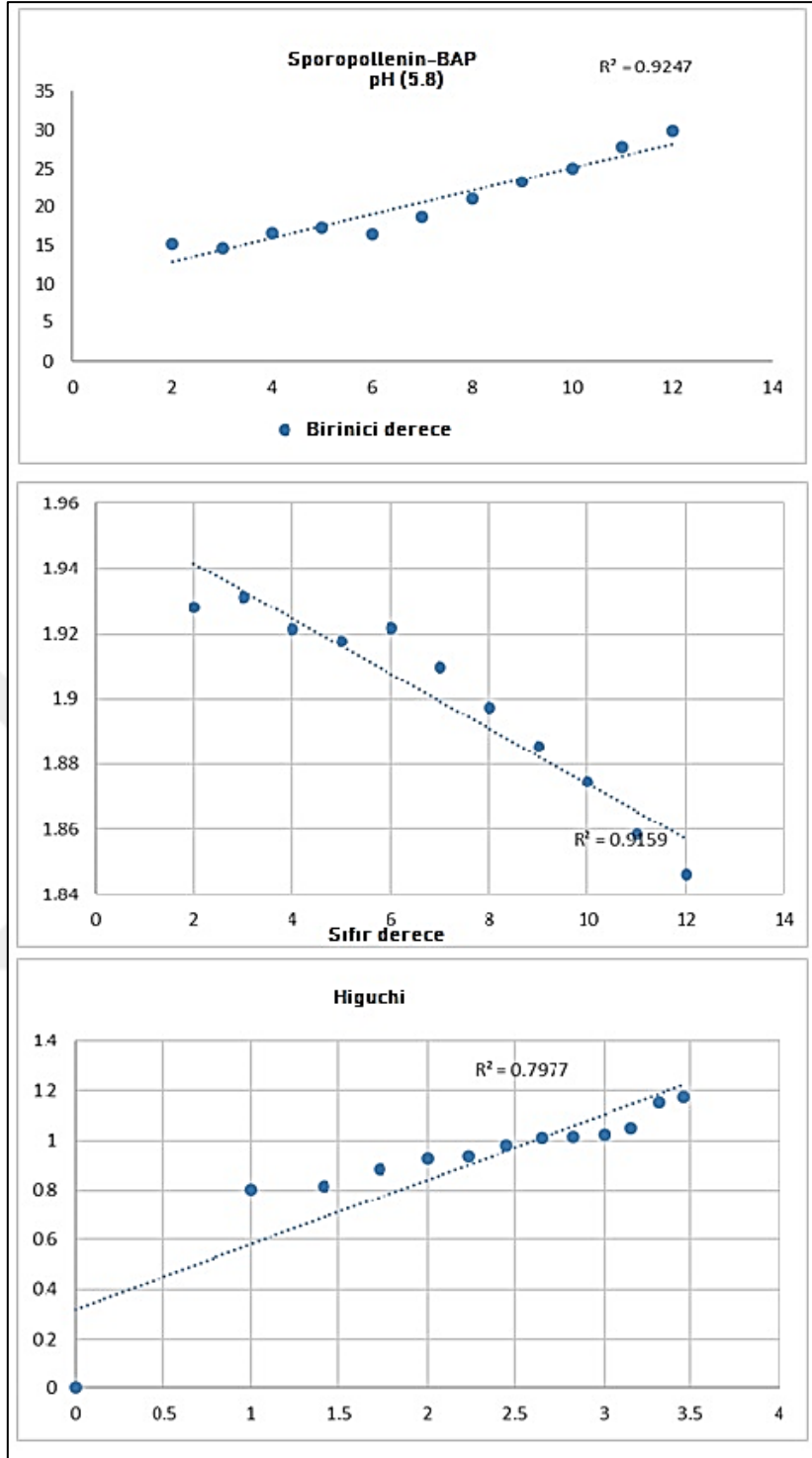
## EK 2: KİNETİK PARAMETRELERİN STANDART EĞRİLERİ



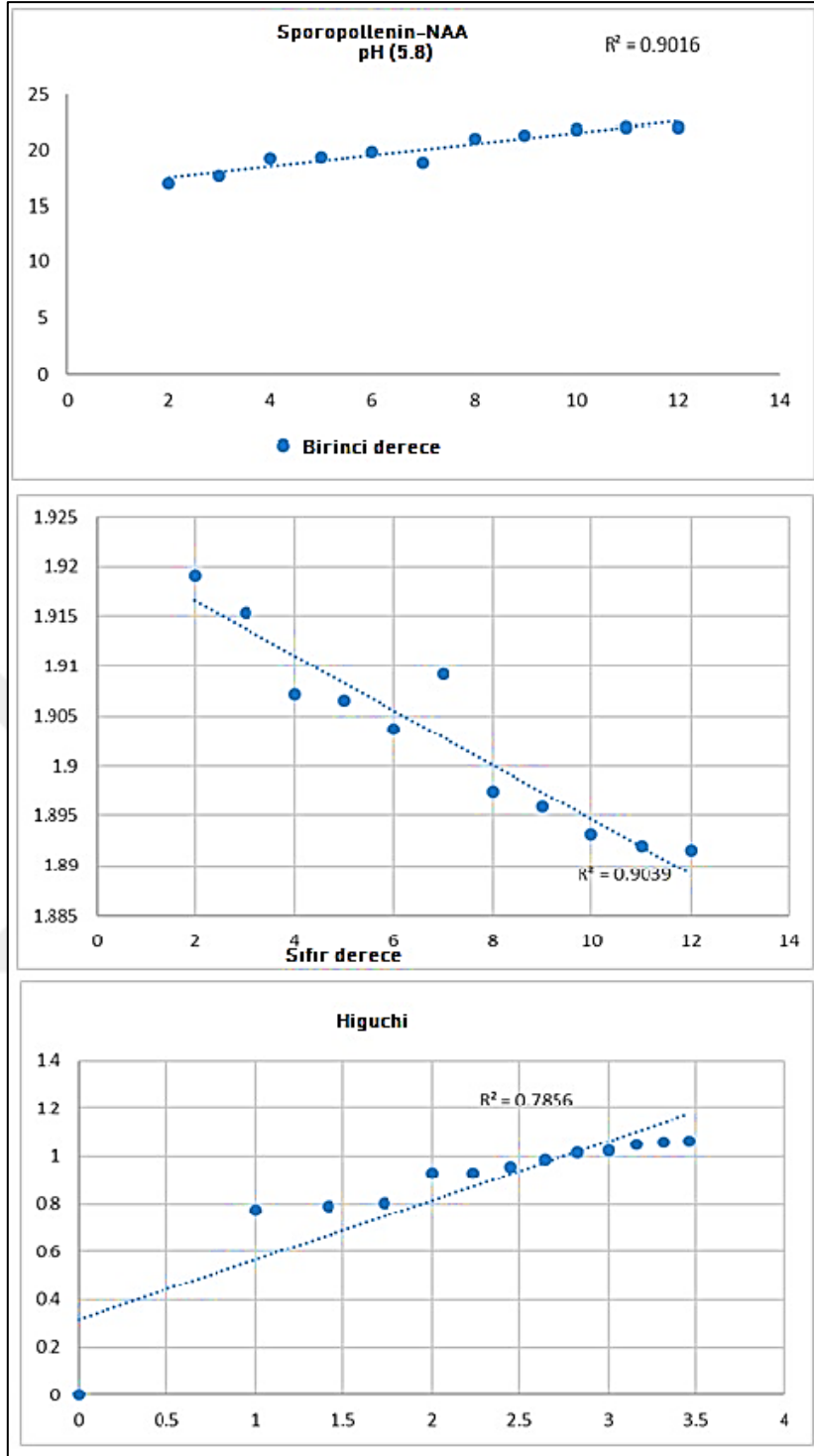
Biyosilika boncuk-BAP (pH 5.8) standart eğrileri.



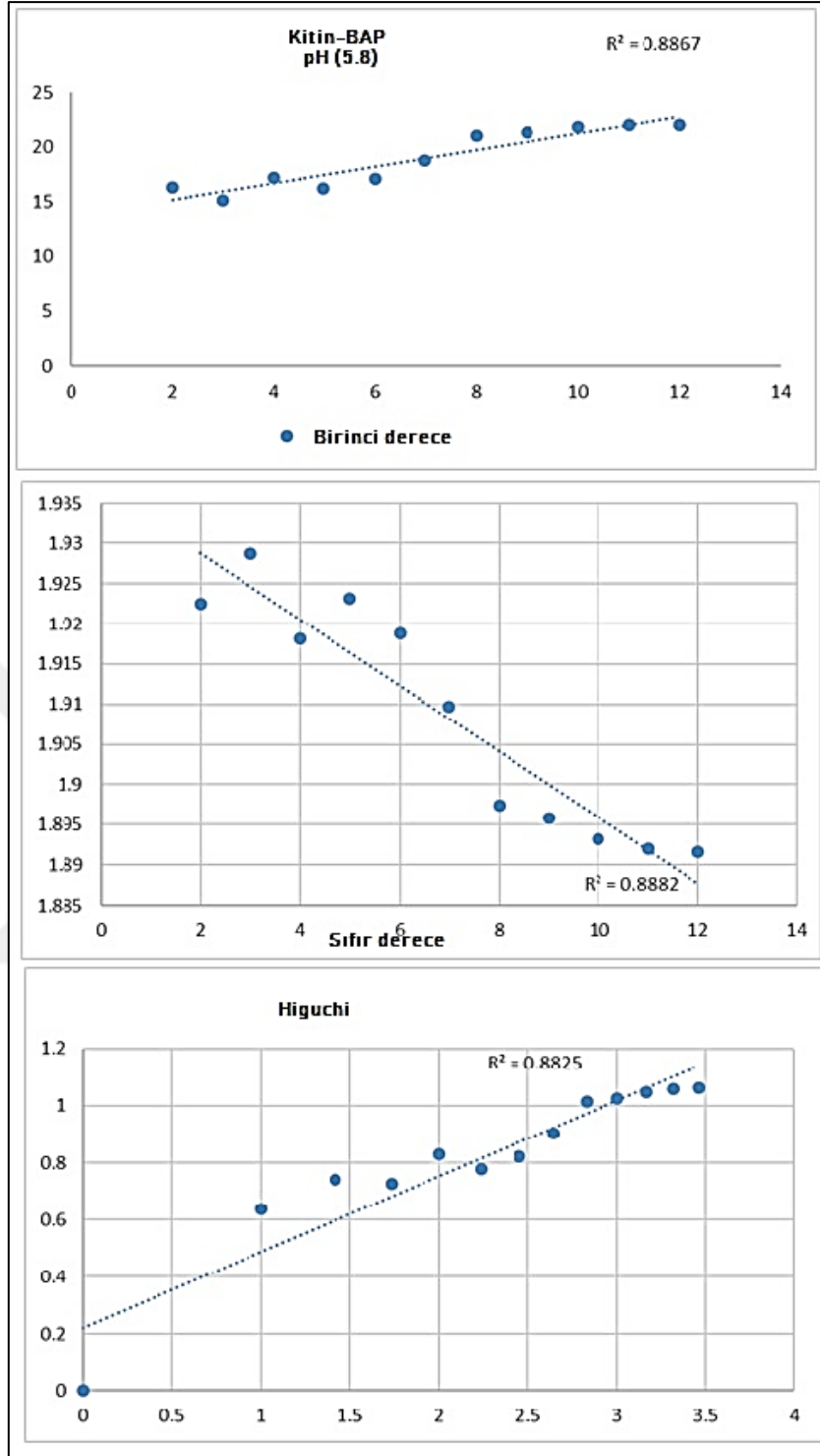
Biyosilika boncuk-NAA (pH 5.8) standart eğrileri.



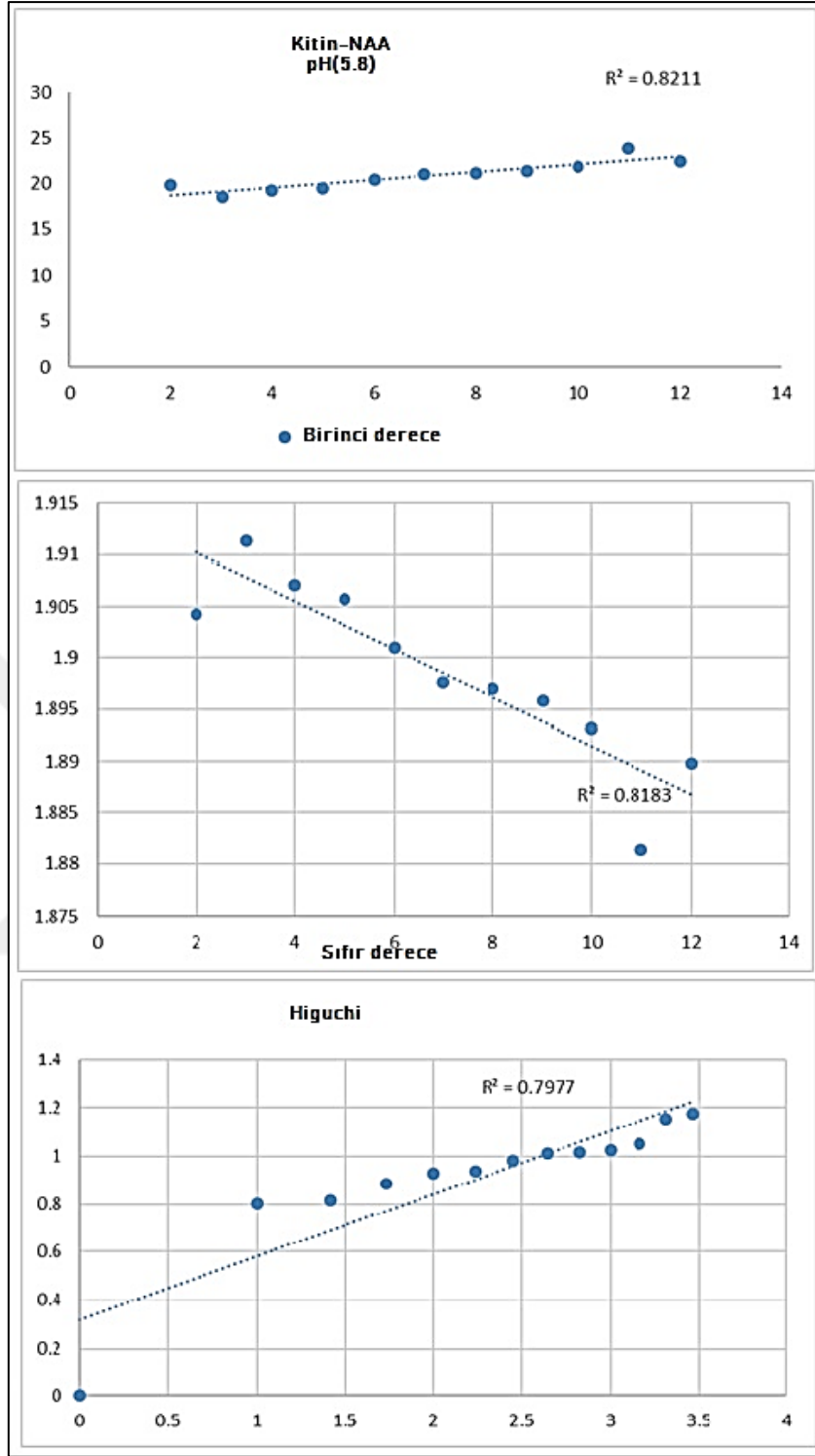
Sporopollenin-BAP (pH 5.8) standart eğrileri.



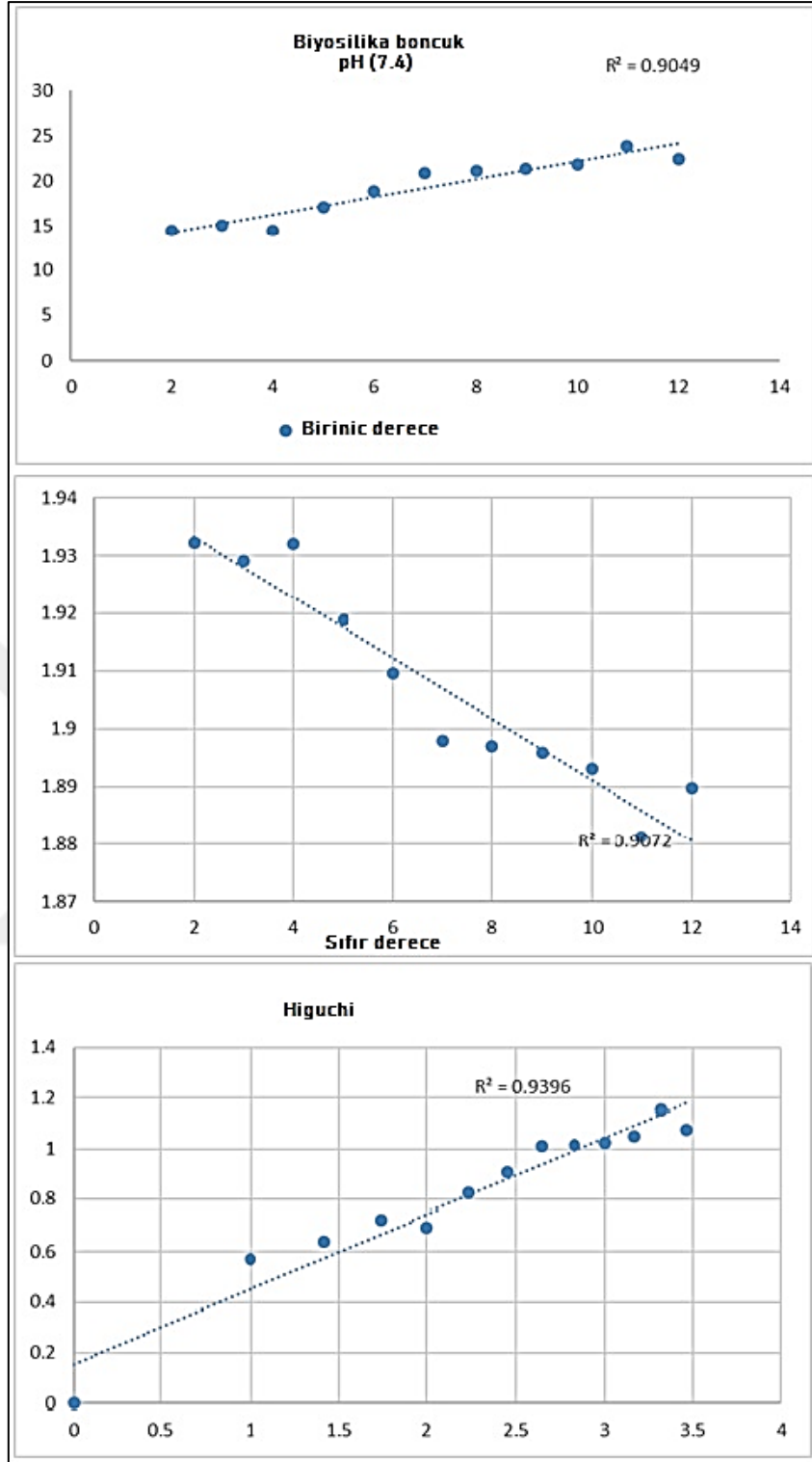
Sporopollenin-NAA (pH 5.8) standart eğrileri.



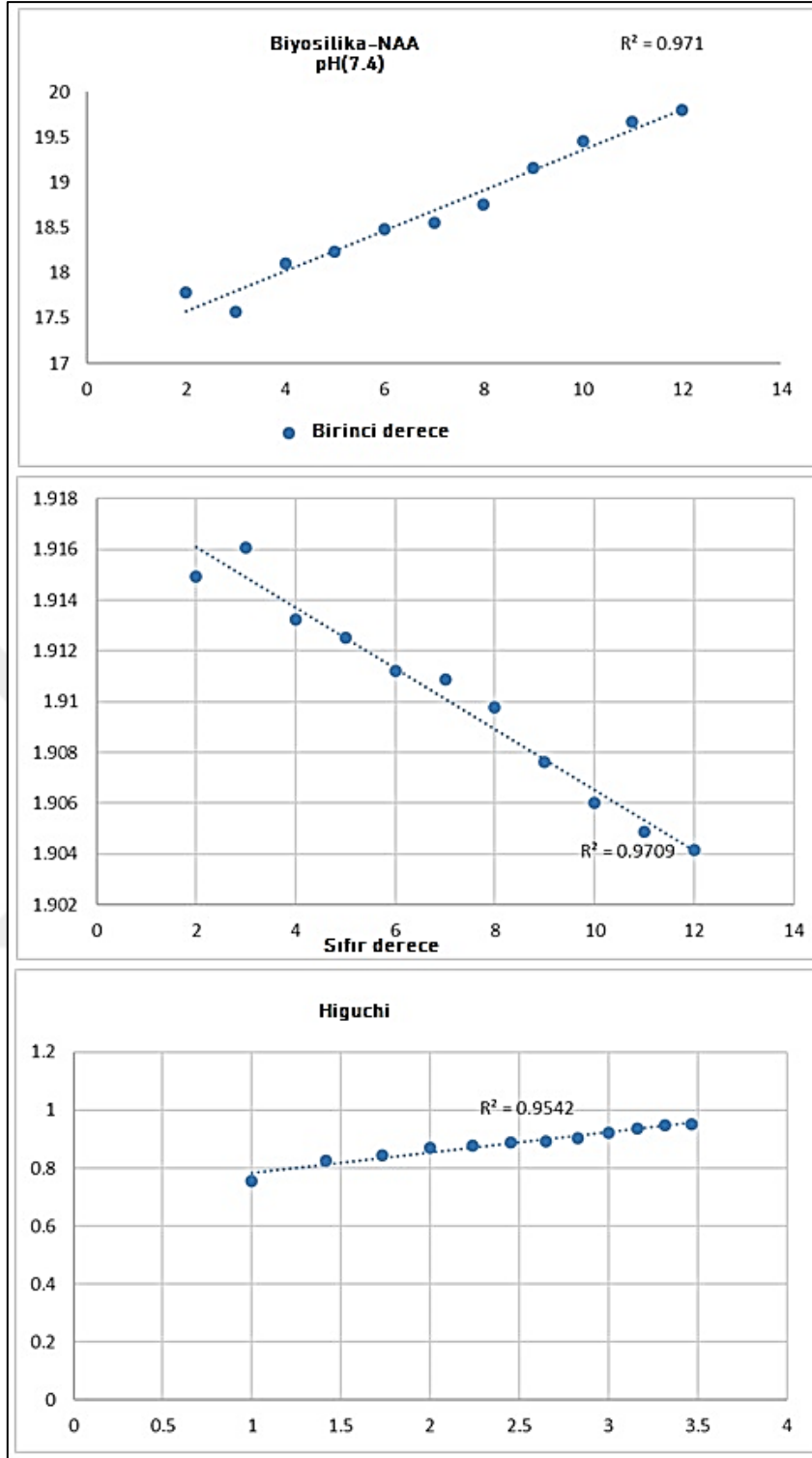
Kitin-BAP (pH 5.8) standart eğrileri.



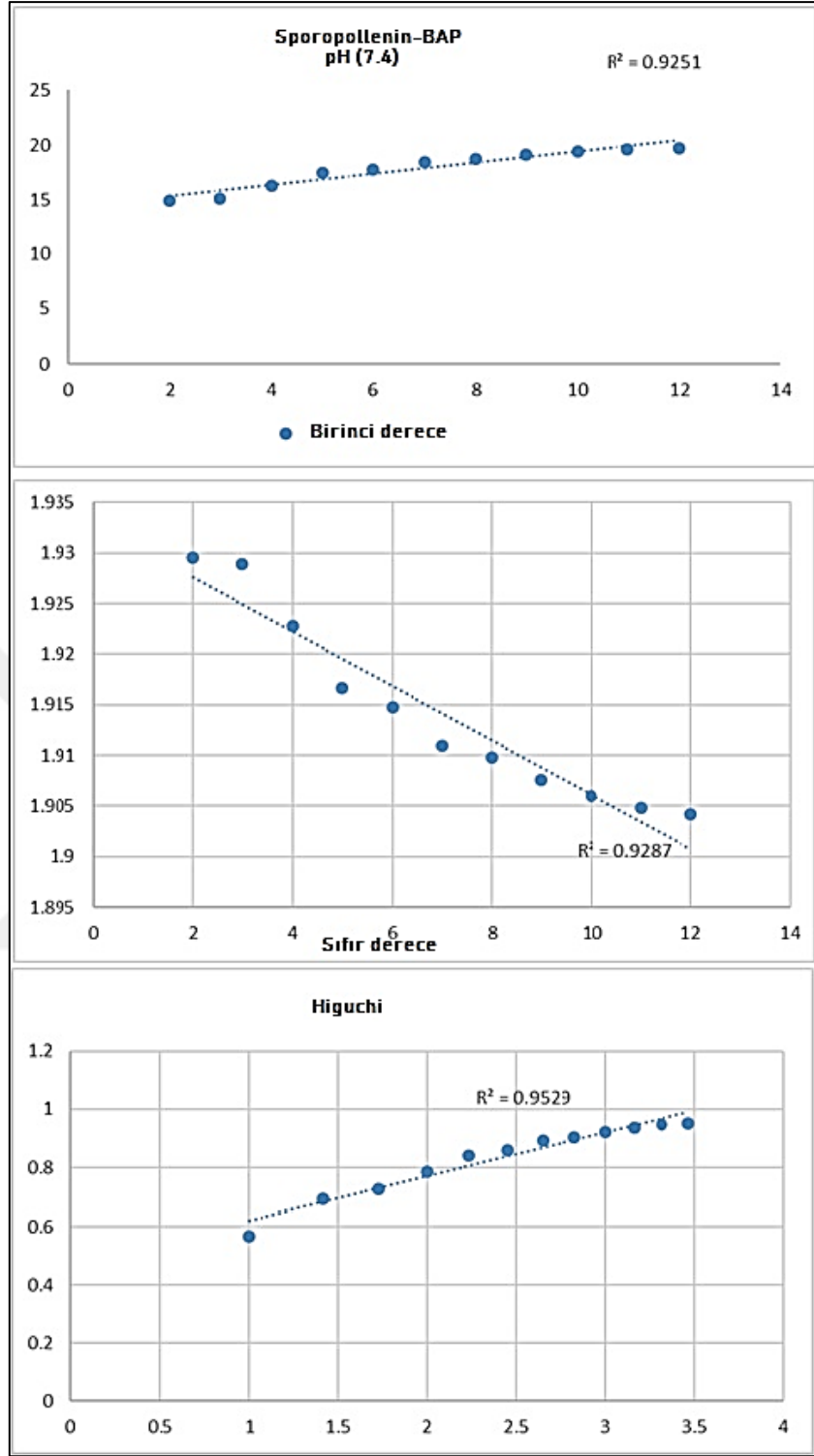
Kitin-NAA (pH 5.8) standart eğrileri.



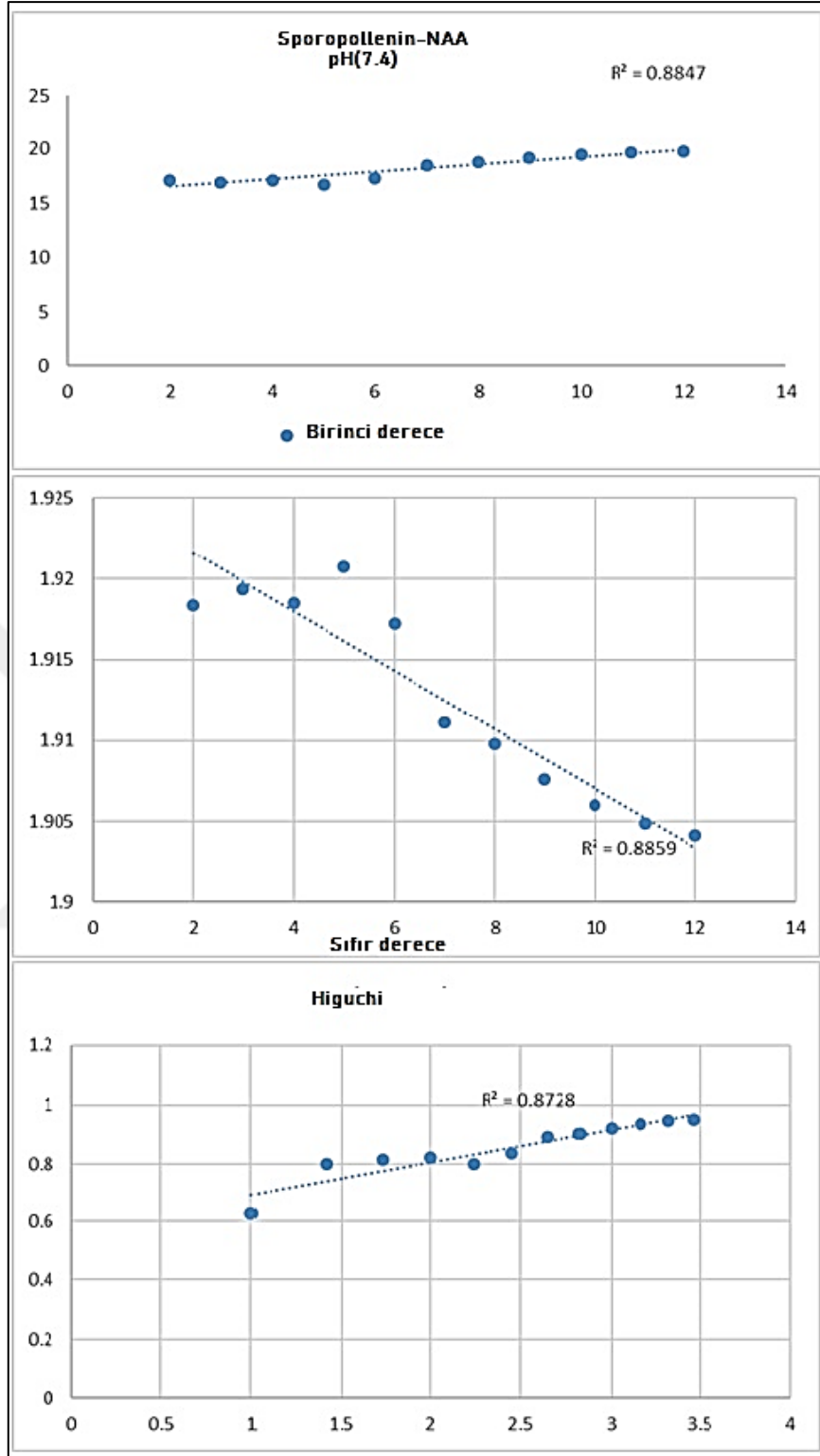
Biyosilika boncuk-BAP (pH 7.4) standart eğrileri.



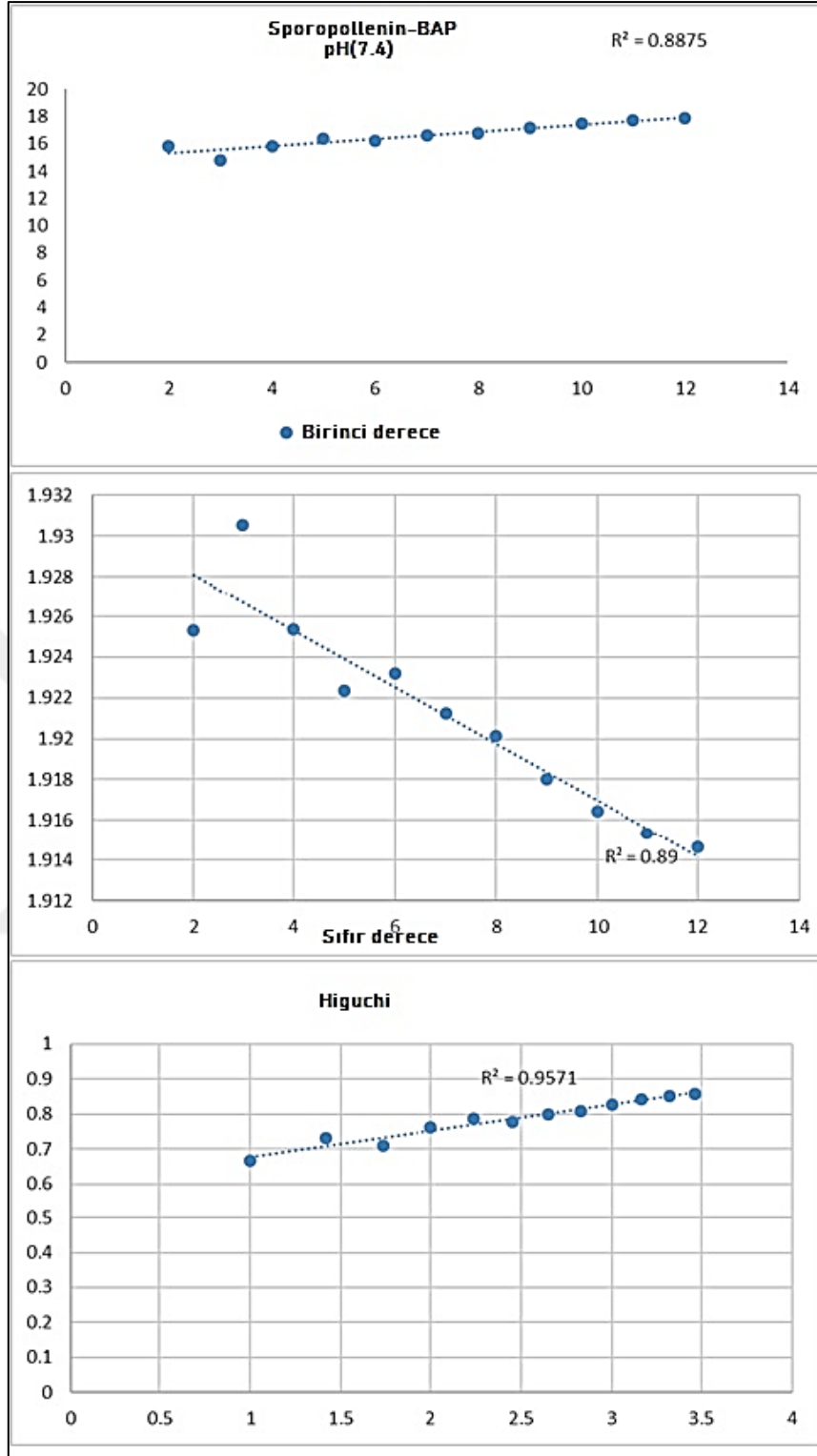
Biyosilika boncuk-NAA (pH 7.4) standart eğrileri.



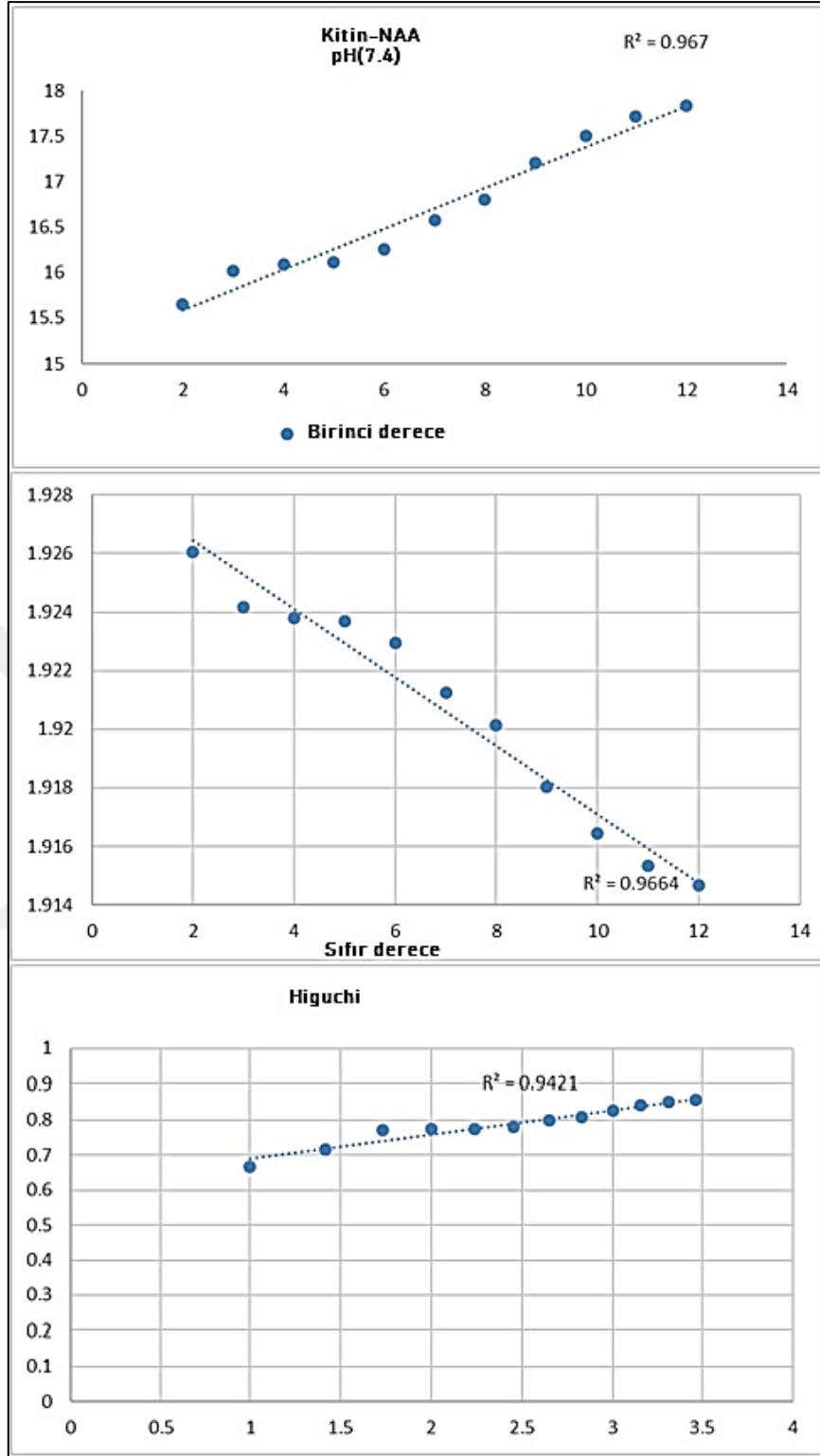
Sporopollenin-BAP (pH 7.4) standart eğrileri.



Sporopollenin-NAA (pH 7.4) standart eğrileri.

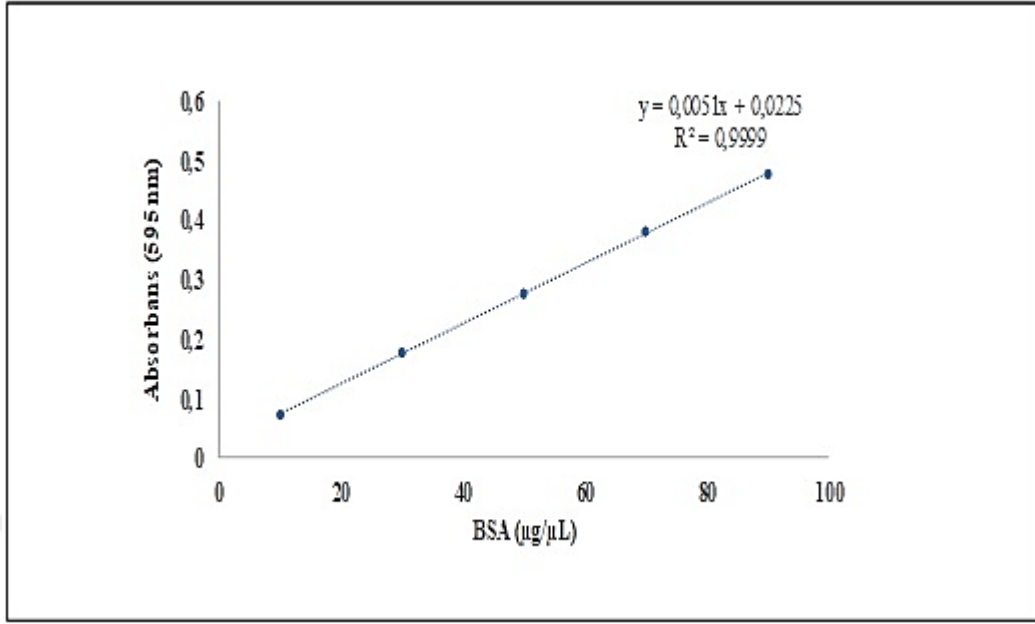


Kitin-BAP (pH 7.4) standart eğrileri.



Kitin-NAA (pH 7.4) standart eğrileri.

### EK 3: PROTEİN TAYİN STANDART EĞRİSİ



Brodforđ yöntemi ile elde edilen standart grafik eğrisi.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Muhammad Mujtaba

**Doğum Yeri:** Swabi/Pakistan

**Doğum Tarihi:** 05.03.1992

**Medeni Hali:** Bekar

**Yabancı Dili:** Peştuca, Urduca, Hintçe, Türkçe, İngilizce

### **Eğitim Durumu**

Lise: Quid-e-Azam Kolej (2008-2010)

Lisans: Swabi Üniversitesi (2011-2014)

Yüksek Lisans: Aksaray Üniversitesi (2015-2017)

Doktora: Ankara Üniversitesi (2017-2020)

### **Yayınlar ve Bildiriler**

**Mujtaba M**, Khawar KM, Camara MC, Carvalho LB, Fraceto LF, Morsi RE, et al. Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions. International Journal of Biological Macromolecules. 2020.

**Mujtaba M**, Yılmaz BA, Duman DC, Akyuz L, Yangın S, Kaya M, et al. Newly isolated sporopollenin microcages from Cedrus libani and Pinus nigra for controlled delivery of Oxaliplatin. bioRxiv. 2020.

**Mujtaba M**, Koc B, Salaberria AM, İlk S, Cansaran-Duman D, Akyuz L, et al. Production of novel chia-mucilage nanocomposite films with starch nanocrystals; An inclusive biological and physicochemical perspective. International journal of biological macromolecules. 2019; 133:663-73.

**Mujtaba M.** Akyuz L, Koc B, Kaya M, Ilk S, Cansaran-Duman D, et al. Novel, multifunctional mucilage composite films incorporated with cellulose nanofibers. Food Hydrocolloids. 2019; 89:20-8.

**Mujtaba M.** Morsi RE, Kerch G, Elsabee MZ, Kaya M, Labidi J, et al. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. International journal of biological macromolecules. 2019; 121:889-904.

**Mujtaba M.** Salaberria AM, Andres MA, Kaya M, Gunyakti A, Labidi J. Utilization of flax (*Linum usitatissimum*) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films. International journal of biological macromolecules. 2017; 104:944-52.

**Mujtaba M.** Kaya M, Akyuz L, Erdonmez D, Akyuz B, Sargin I. Detailed adsorption mechanism of plasmid DNA by newly isolated cellulose from waste flower spikes of *Thypha latifolia* using quantum chemical calculations. International journal of biological macromolecules. 2017; 102:914-23.

**Mujtaba M.** Sargin I, Akyuz L, Ceter T, Kaya M. Newly isolated sporopollenin microcages from *Platanus orientalis* pollens as a vehicle for controlled drug delivery. Materials Science and Engineering: C. 2017; 77:263-70.

**Mujtaba M.** Sargin I, Kaya M. Determination of bovine serum albumin adsorption capacity of newly obtained cellulose extracted from *Glycyrrhiza glabra* (Licorice). Advances in Polymer Technology. 2018;37(2):606-11.

**Mujtaba M.** Kaya M, Ceter T. An investigation of pollen grain thermal diversity on species level. 2018.

**Mujtaba M.** Kaya M, Ceter T. Differentiation of thermal properties of pollens on genus level. 2018.

Ali A, Khan M, Sharif R, **Mujtaba M.** Gao S-J. Sugarcane Omics: An update on the current status of research and crop improvement. Plants. 2019;8(9):344.

Mol A, Kaya M, **Mujtaba M.** Akyuz B. Extraction of high thermally stable and nanofibrous chitin from *Cicada* (Cicadoidea). Entomological Research. 2018;48(6):480-9.

Akyuz L, Kaya **M, Mujtaba M**, Ilk S, Sargin I, Salaberria AM, et al. Supplementing capsaicin with chitosan-based films enhanced the anti-quorum sensing, antimicrobial, antioxidant, transparency, elasticity and hydrophobicity. International journal of biological macromolecules. 2018; 115:438-46.

Gursoy M, Sargin I, **Mujtaba M**, Akyuz B, Ilk S, Akyuz L, et al. False flax (*Camelina sativa*) seed oil as suitable ingredient for the enhancement of physicochemical and biological properties of chitosan films. International journal of biological macromolecules. 2018; 114:1224-32.

Sharif R, **Mujtaba M**, Ur Rahman M, Shalmani A, Ahmad H, Anwar T, et al. The multifunctional role of chitosan in horticultural crops; a review. Molecules. 2018;23(4):872.

Hussain MA, Fahad S, Sharif R, Jan MF, **Mujtaba M**, Ali Q, et al. Multifunctional role of brassinosteroid and its analogues in plants. Plant Growth Regulation. 2020:1-16.

Kaya M, Bilican I, **Mujtaba M**, Sargin I, Haskoylu ME, Oner ET, et al. Sponge-derived natural bioactive glass microspheres with self-assembled surface channel arrays opening into a hollow core for bone tissue and controlled drug release applications. Chemical Engineering Journal. 2020:126667.

Wang L, Wang G, Long L, Altunok S, Feng Z, Wang D, **Mujtaba M**, et al. Understanding the role of phytohormones in cotton fiber development through omic approaches; recent advances and future directions. International Journal of Biological Macromolecules. 2020.

Kaya M, Ravikumar P, Ilk S, **Mujtaba M**, Akyuz L, Labidi J, et al. Production and characterization of chitosan based edible films from Berberis crataegina's fruit extract and seed oil. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2018; 45:287-97.

Ali SJ, **Mujtaba M**, Ahmad JS, Akbar JS, Ashiq RM, Ghafoor A, et al. Estimation of spatial genetic structure in inter-regional populations of *Trigonella foenum-graceum* L. species through phenotypic variation and seed protein profiling. Genetika. 2018;50(1):171-85.

Bilican I, Pekdemir S, Onses MS, Akyuz L, Altuner EM, Bilican BK, Zang LS, **Mujtaba M**, Mulerčikas P, Kaya M. Chitosan Loses Innate Beneficial Properties after Being Dissolved

in Acetic Acid: Supported by Detailed Molecular Modeling. ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2020, 8, 49.

Kaya M, Khadem S, Cakmak YS, **Mujtaba M**, Ilk S, Akyuz L, et al. Antioxidative and antimicrobial edible chitosan films blended with stem, leaf and seed extracts of Pistacia terebinthus for active food packaging. RSC advances. 2018;8(8):3941-50.

Kaya M, Salaberria AM, **Mujtaba M**, Labidi J, Baran T, Mulerčikas P, et al. Comparison of Natural And Synthetic Chitin Films. Smart Bio: international conference, 18-20 May 2017, Kaunas, Lithuania: abstract book Kaunas: Vytautas Magnus University, 2017; 2017.

Akyuz L, Kaya M, Koc B, **Mujtaba M**, Ilk S, Labidi J, et al. Diatomite as a novel composite ingredient for chitosan film with enhanced physicochemical properties. International journal of biological macromolecules. 2017; 105:1401-11.

Kaya M, **Mujtaba M**, Ehrlich H, Salaberria AM, Baran T, Amemiya CT, et al. On chemistry of  $\gamma$ -chitin. Carbohydrate polymers. 2017; 176:177-86.

Kaya M, Akyuz L, Sargin I, **Mujtaba M**, Salaberria AM, Labidi J, et al. Incorporation of sporopollenin enhances acid–base durability, hydrophobicity, and mechanical, antifungal and antioxidant properties of chitosan films. Journal of industrial and engineering chemistry. 2017; 47:236-45.

Kaya M, Bulut E, **Mujtaba M**, Sivickis K, Sargin I, Akyuz B, et al. Gender influences differentiation of chitin among body parts. Archives of insect biochemistry and physiology. 2016;93(2):96-109.

Kaya M, Sofi K, Sargin I, **Mujtaba M**. Changes in physicochemical properties of chitin at developmental stages (larvae, pupa and adult) of Vespa crabro (wasp). Carbohydrate polymers. 2016; 145:64-70.

Kaya M, Odabasi M, **Mujtaba M**, Sen M, Bulut E, Akyuz B. Novel three-dimensional cellulose produced from trunk of Astragalus gummifer (Fabaceae) tested for protein adsorption performance. Materials Science and Engineering: C. 2016; 62:144-51.

Kaya M, **Mujtaba M**, Bulut E, Akyuz B, Zelencova L, Sofi K. Fluctuation in physicochemical properties of chitins extracted from different body parts of honeybee. Carbohydrate Polymers. 2015; 132:9-16.

Kaya M, Bitim B, **Mujtaba M**, Koyuncu T. Surface morphology of chitin highly related with the isolated body part of butterfly (*Argynnis pandora*). International journal of biological macromolecules. 2015; 81:443-9.

#### **Uluslararası kongrelerde sunulan bildiriler:**

**Mujtaba M**, Kaya M, Bulut E, Akyuz B. Recycling and physicochemical characterization of pomegranate waste peels into a green material (cellulose). International Conference on Natural Science and Engineering (ICNASE'16). Turkey. 2016. *Bildiri Sunumu*

**Mujtaba M**, Kaya M. Exploitation of *Thypha latifolia* (broadleaf cattail) flower spikes as a resource for cellulose production. 2nd International Congress On The World Of Technology And Advanced Material. Turkey. 2016. *Bildiri Sunumu*

**Mujtaba M**, Kaya M. Ecological Applications of Chitin. ECOLOGY. Turkey. 2017. *Bildiri Sunumu*

**Mujtaba M**, Kaya M, Çeter T. Differentiation of Thermal Properties of Pollens on Family Level. 2nd Aerobiology and Palynology Symposium (APAS2018). Turkey. 2018. *Bildiri Sunumu*

Sargin İ, **Mujtaba M**, Akyuz L, Ceter T, Kaya M. Paracetamol encapsulation by Sporopollenin microcages isolated from *Platanus orientalis* pollens. 3rd Symposium On Aerobiology, Palynology, And Latest Advancements In Allergy. Turkey. 2017. *Bildiri Sunumu*

**Mujtaba M**, Kaya M, Çeter T. Thermal Stability: A Deceiving Analytical Tool in Pollen Differentiation on Specie Level. 2nd Aerobiology and Palynology Symposium (APAS2018). Turkey. 2018. *Bildiri Sunumu*

Kaya M, **Mujtaba M**, Akyuz B, Bulut E, Sofi K, Zelencova L. Extraction and characterization of chitins from cockroach Ootheca. 9th International Scientific Conference The Vital Nature Sign. Kaunas, Lithuania. 2015. *Poster Sunumu*

Kaya M, Salaberria AM, **Mujtaba M**, Labidi L, Baran T, Mulercikas P, Duman F. Comparison of natural and synthetic chitin films. Smart Bio. Kaunas, Lithuania. 2018. *Poster Sunumu*

Kaya M, Ravikumar P, İlk S, **Mujtaba M**, Akyuz L, Labidi L, Salaberria AM, Cakmak YS, Erkul SK. Production and characterization of chitosan-based edible films from Berberis crataegina's fruit extract and seed oil. Kaunas, Lithuania. 2018. *Poster Sunum*

Akyuz L, Kaya M, **Mujtaba M**, İlk S, Sargin I, Salaberria AM, Labidi J, Cakmak YS, Islek C. Production and characterization of chitosan-capsaicin burning edible films. International conference on agriculture, forestry, food sciences and Technologies. Turkey. 2017. *Poster Sunumu*

**Mujtaba M**, Kaya M. The present perspective and future of chitosan based bio-films. 5th International conference on bioplastics and 6th world congress on biopolymers. Paris. France. 2017.

### **İş Tecrübesi**

**Kurumu:** TÜBİTAK 2215

**Görevi:** Bursiyer

**Yılları:** 2015-2020

## TEZDEN ÇIKAN YAYINLAR

**Mujtaba M.** Khawar KM, Camara MC, Carvalho LB, Fraceto LF, Morsi RE, et al. Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020; 154:683-97. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.03.128>.

**Mujtaba M.** Akyuz L, Koc B, Kaya M, İlk S, Cansaran-Duman D, et al. Novel, multifunctional mucilage composite films incorporated with cellulose nanofibers. *Food Hydrocolloids*. 2019; 89:20-8. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.021>.





Contents lists available at ScienceDirect

## International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

## Review

## Chitosan-based delivery systems for plants: A brief overview of recent advances and future directions



Muhammad Mujtaba <sup>a</sup>, Khalid Mahmood Khawar <sup>b</sup>, Marcela Candido Camara <sup>c</sup>, Lucas Bragança Carvalho <sup>c</sup>, Leonardo Fernandes Fraceto <sup>c</sup>, Rania E. Morsi <sup>d,e</sup>, Maher Z. Elsabee <sup>g</sup>, Murat Kaya <sup>f</sup>, Jalel Labidi <sup>h</sup>, Hidayat Ullah <sup>i</sup>, Depeng Wang <sup>j,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biotechnology, Ankara University, Ankara 06110, Turkey

<sup>b</sup> Ankara University, Faculty of Agriculture, Department of Field Crops, 06100 Ankara, Turkey

<sup>c</sup> São Paulo State University (UNESP), Institute of Science and Technology of Sorocaba, Department of Environmental Engineering, Sorocaba, Brazil

<sup>d</sup> Egyptian Petroleum Research Institute, Nasr City, 11727 Cairo, Egypt

<sup>e</sup> EPRI-Nanotechnology Center, Egyptian Petroleum Research Institute, 11727 Cairo, Egypt

<sup>f</sup> Department of Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of Science and Letters, Aksaray University, 68100 Aksaray, Turkey

<sup>g</sup> Department of Chemistry, Faculty of Science, Cairo University, 12613 Cairo, Egypt

<sup>h</sup> Biorefinery Processes Research Group, Department of Chemical and Environmental Engineering, University of the Basque Country (UPV/EHU), Plaza Europa 1, 20018 Donostia-San Sebastian, Spain

<sup>i</sup> Department of Agriculture, The University of Swabi, Anbar, 23561 Swabi, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan

<sup>j</sup> College of Life Science, Linyi University, Linyi 276000, Shandong, China

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 19 December 2019

Received in revised form 12 March 2020

Accepted 14 March 2020

Available online 17 March 2020

## Keywords:

Chitosan nanoparticles

Slow delivery

Phytohormones

Plants

## ABSTRACT

Chitosan has been termed as the most well-known among biopolymers, receiving widespread attention from researchers in various fields mainly, agriculture, food, and health. Chitosan is a deacetylated derivative of chitin, mainly isolated from waste shells of the phylum Arthropoda after their consumption as food. Chitosan molecules can be easily modified for adsorption and slow release of plant growth regulators, herbicides, pesticides, and fertilizers, etc. Chitosan as a carrier and control release matrix that offers many benefits including: protection of biomolecules from harsh environmental conditions such as pH, light, temperatures and prolonged release of active ingredients from its matrix consequently protecting the plant's cells from the hazardous effects of burst release. In the current review, tends to discuss the recent advances in the area of chitosan application as a control release system. Also, future recommendations will be made in light of current advancements and major gaps.

© 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

|                                                       |     |
|-------------------------------------------------------|-----|
| 1. Introduction . . . . .                             | 684 |
| 2. Overview of chitosan . . . . .                     | 684 |
| 3. Chitosan as a matrix for control release . . . . . | 684 |
| 4. Production of chitosan nanocarriers . . . . .      | 685 |
| 5. Chitosan as a controlled delivery system . . . . . | 686 |
| 5.1. Delivery of plant growth promoters . . . . .     | 686 |
| 5.2. Delivery of fertilizers . . . . .                | 686 |
| 5.3. Delivery of genetic materials . . . . .          | 691 |
| 5.4. Delivery of pesticides . . . . .                 | 692 |
| 5.5. Delivery of herbicides . . . . .                 | 693 |
| 6. Challenges . . . . .                               | 694 |
| 7. Conclusions . . . . .                              | 694 |
| Acknowledgments . . . . .                             | 694 |
| References . . . . .                                  | 694 |

\* Corresponding author at: College of Life Science, Linyi University, Linyi, China.  
E-mail address: wangdepeng@lyu.edu.cn (D. Wang).

## 1. Introduction

Advancements in the field of nanotechnology open up new doors in terms of applications for various nanomaterials in different fields including plant sciences. The application of different biomaterials as delivery systems has shown many advantages like biocompatibility, nontoxicity, and affinity for biomolecules, efficient encapsulation, prolonged-release, etc. [1,2]. Agriculture science is confronted by many challenges such as nutrient losses, pathogens, and low crop yield due to water, fertilizer (nitrogenous, phosphoric, potassic fertilizers and organometal) and pesticide mismanagement [3]. To manage such problems, farmers are using intensive amounts of pesticides and other agrochemicals (nitrogenous, phosphoric, potassic fertilizers and organometal) which are ultimately leading to environmental problems such as air pollution, soil toxicity, degradation of agro-ecosystems, residue accumulation and pesticide resistance in insects, pathogens and human health. In order to overcome the described problems due to the indiscriminate use of synthetic agrochemicals, it is important to develop new strategies for the safer and effective application of these chemicals.

It has been shown by many researchers that controlling the release of fertilizers with natural biodegradable components [4] using new smart nanomaterials can play a crucial role in the improvement of agricultural practices [3,5–9]. Considering the recent advancements in nanotechnology, encapsulation of ingredients such as pesticides, herbicides, and nutrients (fertilizers) may suggest a solution towards this end [6,10,11]. Recently the utilization of nano-carriers and nanosensors has drawn the attention of researchers from divergent fields of plant sciences and extensive research efforts are underway to enhance the synthesis of biopolymers based nanocarriers [12,13]. The researchers are very much keen and interested in understanding the characteristic of nanomaterials that makes them so effective in improving crop production. It is speculated that nanosize of the materials help in easy penetration on the plant surface membrane through the cuticles, trichomes, stomata, stigma, hydathodes, wounds and root junctions [14,15], etc. For example, the controlled release of agro-nutrients from nanocarriers enhances the efficacy of the active ingredients that may reduce the loss by decreasing the volatilization and prevents contamination risks (environmental and health). The desirable characteristics of biomaterials based nanocarriers could be the reason behind the growing interests in their diverse applications in plants [16]. A wide range of biopolymers including cellulose, chitin, chitosan, collagen, alginate, and starch have been actively applied as nanocarriers for the controlled delivery of agrochemicals [12,17]. The studies further show that the use of cellulose is not as extensive as starch or lignin derivatives [18]. Therefore, a set of criteria has been defined for the intended polymer matrix intended to be used as a microencapsulation body [19].

- i. The biopolymer must have a glass transition state, molecular weight and molecular structure suitable for the prolonged release of the load.
- ii. The surface functional groups should not react with the loaded content (agrochemicals etc.)
- iii. It should be biodegradable and non-toxic to the environment.
- iv. The polymer should have enough stability during storage, application and should be economical.

A large number of optimization studies are being carried out on the encapsulation of antimicrobial agents, pesticides, agrochemicals, and agro-nutrients to define their minimum required dosage for specific plants or crops to inhibit microbial growth, diseases or stresses. But, this does not solve the problem completely because the problem is linked to the application of synthetic agrochemicals [20]. Since the last

decade, a hunt for an alternative, natural, economical, biodegradable and nontoxic carrier for agro nutrients and agrochemicals has been underway.

Chitosan has emerged as a potentially applicable polysaccharide in agriculture, medicine, cosmetics and the biomedical industry for different applications [21,22]. In plants, chitosan is gaining attention as one of the most suitable carriers for agrochemicals, owing to their wide range of characteristics including biocompatibility, biodegradability, high permeability, cost-effectiveness, non-toxicity and excellent film-forming ability [23]. Chitosan and its derivatives, alone or in the composite form, are being used for the controlled release of pesticides, macro and micronutrients, herbicides and plant hormones [20]. An overview of current research shows that the number of articles in this area is increasing constituting a sign of growing interest in this field.

This review will discuss the current status of chitosan application as a nano-carrier in agricultural science along with the provision of a future perspective explaining the gaps in the research with possible solutions to move forward.

## 2. Overview of chitosan

Chitosan is a polycationic polymer isolated after the deacetylation of chitin. Chitin is a structural polymer of many organisms like crustaceans, insects, mollusks, fungi, and shrimps, etc. [24,25]. The detailed compilation of chitosan sources has been given in Table 1. Chitin produced by crustaceans and arthropods in their shells is a very similar polymer to plants' cellulose, produce in cells in terms of function and structural integrity (Fig. 1). Up to now, alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) and gamma ( $\gamma$ ) crystallographic forms of chitin have been reported [26]. The  $\alpha$  and  $\beta$  are the most commonly existing forms of chitin and are extracted from a large variety of organisms. However, the sources of gamma chitin are very scarce and hard to find for mass production. A single study was widely referred for describing the physicochemical characteristics of gamma chitin for >15 years [27]. A very recent report has described many ambiguities and clarified many unanswered questions in the previous report [26]. Chemically chitin is a linear polymer consisting of 2-amino-2-deoxy-D-glucose and 2-acetamido-2-deoxy-D-glucose monomers linked through 1–4 bonds. Structurally,  $\alpha$  and  $\gamma$  are similar in terms of physicochemical characteristics compared to the  $\beta$  form of chitin. Compared to chitin chitosan is more functional, thanks to its amino based functional groups stretching along the chain [21]. The molecular weight, biological and physicochemical properties and purity of the isolated chitosan are affected by the source and extraction method [28]. Also, the protonation intensity of amine groups plays a vital role in the functionality of chitosan. The major properties of chitosan include non-toxic for humans ( $LD_{50} = 16 \text{ g kg}^{-1}$  in rat) mucoadhesiveness [29], hemostatic, film-forming capability [30], excellent adsorption matrix, antiviral, antibacterial and antifungal [31], antioxidative [32] anticholesterolaemic characteristics [33] makes it very attractive component for use in number of applications. Previous studies enlist multiple works related to characterization and wide range applications of chitosan in the fields of biology, medicine, agriculture, and other vital areas [34]. All the above-mentioned characteristics of chitosan make it a suitable potential candidate for myriads of applications.

## 3. Chitosan as a matrix for control release

After World War II, the agriculture sector had mainly started relying on synthetic pesticides throughout the world. A scientific study [54] suggests that only 0.1% of the pesticides and other agrochemicals reach the target while the remaining have entered the environment through leaching or evaporation causing a large amount of contamination hazardous to all living beings including humans and animals. Control release can be defined as "the permeation-regulated transfer of an active ingredient from a reservoir to a targeted surface to maintain a predetermined concentration level for a specified period of time" [55]. A

**Table 1**  
Aquatic, terrestrial and microorganisms sources of chitin and chitosan.  
(Reprinted from [25]).

| Aquatic                               | Terrestrial                      | Microorganisms        |
|---------------------------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Crustaceans                           | Arthropods                       | Fungi (cell walls)    |
| Crab                                  | Spiders                          | Ascomyces             |
| <i>Chionoecetes opilio</i> [35]       | <i>Geolycosa vultuosa</i> [40]   | Mycelium [44]         |
| <i>Podophthalmus vigil</i> [36]       | <i>Hogna radiata</i> [40]        | Penicillium [45]      |
| <i>Paralithodes amtschaticus</i> [37] | <i>Nephila edulis</i> [41]       |                       |
| <i>Carcinus mediterraneus</i> [38]    | Scorpions                        | Yeast (b type) [46]   |
| Water lobster                         | <i>Mesobuthus gibbosus</i> [42]  | Blastomycota          |
| Crayfish [39]                         |                                  | Blastocladiaceae [47] |
| Prawn                                 | Insects                          | Chytridiomycota       |
| <i>Aristeus antennatus</i> [49]       | Ants                             | Chytridiaceae [24]    |
| Krill                                 | Beetles                          | Protista              |
| <i>Daphnia longispina</i> [50]        | <i>Bombyx mori</i> [43]          | Brown algae [48]      |
| <i>Anax imperator</i> [51]            | <i>Holotrichia parallela</i>     |                       |
| <i>Hydrophilus piceus</i> [51]        | <i>Leptinotarsa decemlineata</i> |                       |
| <i>Notonecta glauca</i> [51]          |                                  |                       |
| <i>Agabus bipustulatus</i> [51]       |                                  |                       |
| <i>Asellus aquaticus</i> [51]         |                                  |                       |
| Mollusca                              | Cockroaches                      | Planta                |
| Squid pens                            |                                  | Green algae [48]      |
| Loligo [52]                           |                                  |                       |
| <i>Todarodes pacificus</i> [53]       |                                  |                       |
| Coelenterata                          |                                  |                       |

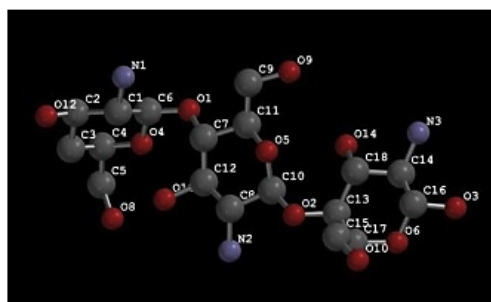
control release matrix can maintain the release of active compounds e.g., synthetic pesticides, for a longer time. Additionally, an effective release matrix can act as a reservoir for the load and protecting it from degradation mainly influenced by environmental factors like UV radiations, water, evaporation, harsh pHs, etc. [54]. The main objective of a nanocarrier for plants is the slow and prolonged release of the load, enhanced efficacy, and safety of the load with minimum contamination. The concept of microencapsulation evolved in the late 1980s as an alternative to liposomes for solving the problem of stability as liposomes were unstable in biological solutions [56]. In the following years, researchers focused their attention on exploring and designing dissimilar matrices for control release through encapsulation. Chitosan became a dream polymer for encapsulation applications due to its surface amine-based functional groups stretching across the chain.

Chitosan can form films, hydrogels, scaffolds, fibers, and micro or nanoparticles, due to deacetylated surfaces that make it easier to handle for many desired modifications [57,58]. With the increasing importance

of control release in plants, chitosan has been emerged as an ideal polymer due to its desirable physicochemical and biological properties. Since chitosan-based nanomaterials (NMs) control the release of active ingredients such as pesticides, micronutrients, and plant hormones, they have become rather popular and are being produced in great amounts and marketed around the world and are an important constituent of the defense systems against plant diseases [59–65]. Several international organizations like Codex Alimentarius, a joint body of the UN World Health Organization (WHO) and Food Agriculture Organization (FAO), the European Union (EU) and other organizations have introduced the concept of acceptable maximum residual levels of pesticides (MRLs) to confirm the acceptable levels of food quality [4]. Based on its biodegradability, chitosan-based nanomaterials are advantageous over the synthetic agrochemicals, since they can escape some stringent regulation of nanomaterials applications [66]. Also, the innate antimicrobial ability of chitosan is a plus for chitosan-based herbicides and pesticides nanoformulations. The functionality of chitosan due to the presence of hydroxyl and amin group along the chemical backbone of the chitosan molecule enables it to bind a vast array of organic and inorganic molecules for control release. Chitosan containing nanoformulations stimulate the innate immune system of the plant thanks to the stimulative activity of the chitosan. Therefore, chitosan-based nanocarriers have a bright future ahead, especially if and when control delivery of nutrients and agrochemicals is desired for obtaining the optimum yield of crop plants.

#### 4. Production of chitosan nanocarriers

Chitosan nanomaterials were prepared for the first time in 1994 by emulsification and cross-linking method as drug carriers [67]. Thereafter, other methods were developed as ionic gelation [68], reverse micellar method [69], precipitation [70], sieving [71], emulsion droplet coalescence [72] and spray drying [73]. Most of these methods have been developed for agriculture [66] (Table 2). The production methods mainly depend upon the mode of action needed, for example, the release rate of the active ingredient will depend on the size and shape of the nanoparticles, the thermomechanical behavior and the level of toxicity of the degradable residues [23,74]. Ionotropic gelation is a simple and mild protocol that uses no chemical cross-linking agents which reduces the possible toxic side effects of the procedure. The emulsion cross-linking method [20,75] provides high loading capacity, better particle size and release control. Emulsion-droplet coalescence method [72] results in small particle size with high loading capacity. Precipitation method [76] does not involve toxic solvents and leads to better control of particle size and controlled release of the active materials. Reverse micellar method [74] is generally a tedious and laborious process but it has the advantage of producing suitable particle size with a small polydispersity index. The sieving process [71] uses a nano-scaled release device, however, it produces irregular particle sizes. Spray drying method gives a powder formulation with good entrapment efficiency, prolonged active ingredient release however, a lot of parameters can influence the final product particle size [70]. The ionic gelation method which is based on the ionic interactions between the positively charged chitosan and the polyanionic negatively charged triphosphosphate (TPP) is now among the most used method for the preparation of chitosan-based nanomaterials (NMs) and is recently has been adapted for agricultural applications. Several parameters control the size of the nanoparticles and consequently affects the plant responses towards the nano-chitosan, among these parameters are the degree of deacetylation (DD), molecular weight and concentration of chitosan, chitosan: TPP mass ratio, pH, temperature and rate of mixing of TPP and chitosan [77,78] in addition to size distribution/polydispersity index (PDI), surface charge (zeta-potential) and functional/encapsulated component [77].



**Fig. 1.** Chemical structure of chitosan; showing all amino groups in blue (Reproduced from with permission from MDPI by Sharif, Mujtaba, Ur Rahman, Shalmani, Ahmad, Anwar, Tianchan and Wang [25]).

**Table 2**  
Major advances in chitosan nanoparticles production protocols and applications.

| Matrices                                             | Method                | Encapsulated ingredient                   | Application                                                                                                 | Reference |
|------------------------------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Carboxymethyl chitosan modified carbon nanoparticles | Fast oxidation        | Carbon nanoparticles                      | Controlled delivery of Emamectin Benzoate                                                                   | [79]      |
| Tebuconazole metal-organic framework/chitosan        | Coating               | Tebuconazole metal-organic framework      | Controlled release of tebuconazole                                                                          | [80]      |
| Chitosan                                             | Emulsion              | Glyphosate                                | Controlled release of glyphosate                                                                            | [81]      |
| N-deoxycholic acid-O-glycol chitosan                 | Reverse micelles      | Rotenone                                  | Encapsulation and controlled release of rotenone                                                            | [82]      |
| N-hexanoyl-O-glycol chitosan                         | Reverse micelles      | Atrazine                                  | Carrier agent for herbicide atrazine                                                                        | [83]      |
| Chitosan nanocapsules                                | Ionotropic gelation   | <i>Achillea millefolium</i> essential oil | Enhanced activity against <i>Tetranychus urticae</i>                                                        | [84]      |
| Chitosan                                             | Coating               | Pesticide/diatomite/Fe3O4                 | Improve the pesticide (glyphosate) utilization efficiency                                                   | [85]      |
| N,N-dimethylhexadecyl carboxymethyl chitosan         | Isopropanol agitation | Rotenone                                  | Slow-release of rotenone                                                                                    | [82]      |
| Chitosan                                             | Emulsion              | Imazamox                                  | Controlled-release formulations for imazamox                                                                | [86]      |
| Pectin, chitosan, and sodium tripolyphosphate        | Ionotropic gelation   | Paraquat                                  | Control release of paraquat for lowering the toxicity                                                       | [87]      |
| Chitosan nanoparticles                               | Ionic gelation        | S-nitrosoglutathione                      | Controlled release of nitrosoglutathione and prolonging its effect                                          | [88]      |
| Chitosan nanoparticles                               | Ionic gelation        | Salicylic acid                            | Bio-stimulant for promoting plant defense and growth in maize                                               | [89]      |
| Chitosan nanoparticles                               | Ionic gelation        | Hexaconazole                              | Fungicide nano delivery system for combating <i>Ganoderma</i> disease in oil palm                           | [90]      |
| Chitosan nanoparticles                               | Emulsion crosslinking | <i>Cymbopogon martinii</i> Essential Oil  | Mycobiocide formulation (chitosan nanoparticles Encapsulated With <i>cymbopogon martinii</i> essential oil) | [91]      |
| Chitosan (CS) nanoparticles                          |                       | Nitrogen, phosphorous and potassium       | Carrier for slow release of fertilizer                                                                      | [92]      |
| Chitosan (CS) nanoparticles                          | Spray drying          | Cu                                        | Boost defense responses and plant growth                                                                    | [64]      |

## 5. Chitosan as a controlled delivery system

### 5.1. Delivery of plant growth promoters

Phytohormones are molecules responsible for promoting plant growth and development [93]. They are applied to crops to improve production, visual and nutritional aspects, alleviate biotic and abiotic stresses [94], and increase product shelf life [95]. Although these molecules show the potential to be applied in many crops, a few carriers have been explored as a matrix for plant growth promoters [96,97]. Some examples of plant growth promoters coated in the chitosan matrix are described in Table 3. A carrier system composed of chitosan (CS) and  $\gamma$ -polyglutamic acid (CS/PGA) was developed for gibberellic acid ( $GA_3$ ) delivery [98]. This system presented homogeneous particle size distribution (134 nm) and the  $GA_3$  encapsulation efficiency was 61%. In another study [99], the same researchers suggested chitosan/alginate (CS/ALG) and chitosan/tripolyphosphate (CS/TPP) nanocarriers for  $GA_3$  encapsulation. The  $GA_3$  encapsulation efficiency was higher than CS/PGA, reaching 100% CS/ALG and 90% CS/TPP. For the three carriers tested it was possible to observe that the encapsulation of  $GA_3$  prevented its degradation and allowed the controlled release of the active materials when compared with the free hormone for three tested carriers. Maximum  $GA_3$  release was reached after 48 h, 17 h, and 10 h, for CS/PGA, CS/ALG, and CS/TPP, in the same order (Fig. 2). These authors also performed biological activity assays on beans to evaluate the effects of free and encapsulated  $GA_3$  on plant growth. The CS/PGA was more efficient than free  $GA_3$  in stimulating seed germination, root and shoot growth, promoting an increase of 15–45% in the shoot length of beans (Fig. 2a–c). The CS/ALG showed significant effects on beans leaf development and in carotenoids levels compared to free  $GA_3$  and CS/TPP nanoparticles (Fig. 2g). However, no differences were observed in relation to shoot growth between them.

Colorless crystalline Salicylic acid (SA) with a molecular formula of  $C_7H_6O_3$  is a lipophilic monohydroxybenzoic acid is largely used in organic synthesis may act as a plant growth regulator or phytohormone responsible for providing plant's immunity responses. Chitosan has been used as a matrix for the synthesis of SA nanoparticles to alleviate abiotic stress caused by heavy metals in *Isatis cappadocia* [100]. The CS/SA nanoparticles application could improve plant growth and

phytoremediation efficiency under metal stress by helping plant roots build efficient barriers restricting the entrance of toxic compounds into the xylem, and thus reducing its translocation into shoots [100]. SA microencapsulation using chitosan from crustaceans' residues was developed by Martin-Saldaña, Chevalier, Iglesias, Colman, Casalengué, Álvarez and Chevalier [101]. The microparticles (1.57  $\mu$ m to 2.45  $\mu$ m) were obtained through the gelation method and showed encapsulation efficiency ranging from 59 to 99%. The lowest efficiency was obtained using the highest concentration of SA, which according to the researchers, could be due to competitive interaction between TPP and SA to bond with CS. The bioassay on lettuce seedlings showed that low doses of chitosan-SA microparticles can favor the growth of lettuce root and induce immunity producing proteins. They are a promising formulation for activating the defense response of horticultural plants.

Nanoparticles with micronutrients like manganese, boron, copper, iron, zinc can be used as plant growth promoters and for soil nutrition [23]. As described by Choudhary and co-workers [102], CS nanoparticles coupled with copper show the ability to improve plant growth even under disease conditions. This is mainly correlated to the strong fungicidal activity of copper and its important role in electron transfer and redox reactions, boosting plant growth. Also, chitosan is also an inducer of defense response in plants, helping in plant protection.

The CS as micro- or nano-carrier for plant growth promoter delivery presents great potential to be used in agriculture, and thus, could be further explored. The high encapsulation efficiencies obtained for CS as micro- or nano-carrier for plant growth promoter delivery and its advantageous use over free hormone highlight its potential to be used in agriculture, and thus, could be further explored by researches and industrial sector to improve crop development and seed treatment.

### 5.2. Delivery of fertilizers

Soil fertilization is a common practice in agriculture to supply macro and micronutrients to crop plants to improve their yield and quality. However, their excessive use may result in environmental contamination, by increasing the salinity with the unbalancing of the soil pH [103]. Moreover, large amounts of nutrients may be lost before absorption by plants. Chitosan micro- or nanoparticles and hydrogels have been studied as a strategy to enhance the efficiency of fertilizers, reduce

**Table 3**  
Examples of chitosan application as a polymeric matrix for agricultural compounds delivery.

| Matrix                                                                      | Active ingredient                           | Characteristics                                            | Benefits                                                                                                                                                                                                   | References        |
|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|
| Cu-chitosan                                                                 | Copper                                      | MD: 361.3 nm<br>ZP: +22.1 mV<br>PDI: 0.20                  | Antifungal activity, induction of antioxidant and defense enzymes, and significant increasing in plant development                                                                                         | [64]              |
| Chitosan/TPP (Sodium tripolyphosphate)                                      | Salicylic acid                              | MD: 1.57–2.45 $\mu$ m<br>PDI: 0.08–0.22<br>EE: 59–99%      | Induction of lettuce plant defense response and growth                                                                                                                                                     | [101]             |
| Chitosan/TPP<br>Chitosan/alginate                                           | Salicylic acid<br>Gibberellic acid          | MS: 450 nm<br>ZP: –29<br>PDI: 0.3<br>EE: 100%              | Improve plant defense to overcome metalloid stress caused by arsenic<br>Improve the growth of bean plants and fruit growth of tomato                                                                       | [100]<br>[98,122] |
| Chitosan/TPP (sodium tripolyphosphate)                                      |                                             | MS: 195 nm<br>ZP: +27 mV<br>PDI: 0.3<br>EE: 90%            |                                                                                                                                                                                                            |                   |
| Chitosan/ $\gamma$ -polyglutamic acid                                       | Gibberellic acid                            | MS: 134 nm<br>ZP: –27.9 mV<br>PDI: 0.35<br>EE: 61%         | Enhanced seed germination, root growth and leaf area, and avoid GA <sub>3</sub> degradation                                                                                                                | [98]              |
| Chitosan                                                                    | Nitric oxide                                | MD: 38.81 nm<br>ZP: +17.7 mV<br>PDI: 0.30<br>EE: 91.07%    | Alleviate salt stress in maize plants preventing negative effects on plant growth                                                                                                                          | [123]             |
| Chitosan/TPP                                                                | Zinc                                        | MD: 250–300 nm<br>ZP: +42.34 mV<br>PDI: 0.28<br>EE: 10–40% | Overcome zinc deficiency in poor soils, prevent nutrient loss and environmental pollution                                                                                                                  | [124]             |
| Chitosan/sodium montmorillonite clay                                        | KNO <sub>3</sub>                            | EE: 40–65%                                                 | Continuous release of potassium for 60 days                                                                                                                                                                | [106]             |
| Chitosan/TPP                                                                | Urea mixture with peat, humic acid or humin | –                                                          | Controlled release of urea by humic acid substances and by pH                                                                                                                                              | [103]             |
| Chitosan/poly-methacrylic acid                                              | NPK                                         | –                                                          | Nanoformulation with the lowest concentration of NPK promoted greater wheat development                                                                                                                    | [105]             |
| Chitosan/starch                                                             | Plant growth-promoting bacteria             | MD: 2.97 nm                                                | The hydrogel structure allowed a fast and prolonged release of bacteria in soil, which has strong biotechnological potential as biofertilizer                                                              | [108]             |
| Chitosan/TPP                                                                | Thiamine                                    | MD: 596 nm<br>ZP: +37.7 mV<br>PDI: <1<br>EE: 90%           | Thiamine nanoparticles improved chickpea seed germination and seedling vigor, as well as the content of IAA and defense enzymes                                                                            | [125]             |
| Chitosan/TPP<br>Chitosan/sodium montmorillonite clay<br>Chitosan/starch/TPP | KNO <sub>3</sub>                            | EE: 92–136%                                                | The systems showed a swelling-controlled mechanism to release the fertilizer on soil                                                                                                                       | [126]             |
| Chitosan/hydroxypropyl methylcellulose                                      | KNO <sub>3</sub>                            | MD: 3.0–3.7 mm<br>EE: 36–40%                               | The cumulative release of KNO <sub>3</sub> achieved 70–80% after 14 days, which was influenced by the presence of water                                                                                    | [127]             |
| Chitosan/salicylaldehyde                                                    | Urea                                        | –                                                          | The blend increased about 50 days the residence time of the fertilizer on soil                                                                                                                             | [128]             |
| Chitosan/TPP                                                                | –                                           | MD: 259 nm<br>ZP: 40.9 mV<br>PDI: 0.281                    | The hydrogel promoted a sustained delivery of urea on soil, reaching maximum release after 35 days. Moreover, the formulation improves the water-holding capacity of the soil and stimulated tomato growth | [107]             |
| Chitosan/TPP                                                                | NPK                                         | MD: 500 nm<br>ZP: 50 mV                                    | Chitosan nanoparticles showed growth effects in wheat seeds and seedlings in low concentrations (5 $\mu$ g/mL) due to better absorption by seed surface and regulation of IAA synthesis                    | [129]             |
| Chitosan/polymethacrylic acid                                               | NPK                                         | MD: 24–87 nm<br>ZP: 10–85 mV                               | The nanoparticles showed a sustainable release of NPK during 240 h. The application of nano fertilizer in coffee seedlings enhanced NPK levels in the leaves, which improved plant development             | [104]             |
| Chitosan/polydopamine                                                       | ZnPN                                        | Film thickness: 50–70 nm<br>ZP: –42.7 mV                   | The system was toxic when applied on <i>Pisum sativum</i> in highest doses, inhibiting root growth, lateral root formation and causing cell abnormalities                                                  | [92]              |
| Chitosan/Polymethacrylic acid                                               | Potassium                                   | MD: 368 nm<br>EE: 34.98%                                   | The nanoparticles showed pH-responsive release profile, increased the nutrient utilization efficiency and improved corn seedlings growth                                                                   | [130]             |
| Chitosan/polyacrylic acid                                                   | Copper                                      | MD: 4.8–10.7 nm<br>ZP: –22.9 – +26.8 mV                    | The system showed a slow release profile fitting in the criteria for slow-release fertilizer                                                                                                               | [131]             |
| Chitosan                                                                    | Urea                                        | EE: 60–96%                                                 | The nanoparticles present antifungal and antibacterial activity and improved onion plants growth when treated with a concentration of 75 ppm                                                               | [132]             |
|                                                                             |                                             |                                                            | The hydrogel was prepared using oxidized and grafted chitosan showing a swelling degree of 1500 to 2300%, being pH-dependent. The urea release is favored in alkaline soils                                | [133]             |

(continued on next page)

Table 3 (continued)

| Matrix                                            | Active ingredient             | Characteristics                                                                 | Benefits                                                                                                                                                                                                                                                                                | References |
|---------------------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Chitosan-complexed single-walled carbon nanotubes | Plasmid DNA                   | MD: 104–190 nm<br>ZP: 28.1–32.3 mV<br>MD: 133.7 nm<br>ZP: +48.6 mV<br>EE: 89.7% | Chloroplast transformation in <i>Eruca sativa</i> , <i>Nasturtium officinale</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , and <i>Spinacia oleracea</i> plants                                                                                                                                       | [110]      |
| Chitosan                                          | Harpin <sub>pm</sub> protein  | MD: 520 nm<br>ZP: −16 mV<br>PDI: 0.4<br>EE: 89%                                 | Tomato plants treated with Harpin nanoparticles showed resistance against fungi disease caused by <i>Rhizoctonia solani</i>                                                                                                                                                             | [134]      |
| Pectin/Chitosan/TTP                               | Paraquat                      | MD: 520 nm<br>ZP: −16 mV<br>PDI: 0.4<br>EE: 89%                                 | Trial with corn and mustard plants demonstrated improved herbicidal activity. The herbicide nanoparticles showed reduced toxicity and mutagenicity to human cells, lower absorption, and deep soil penetration.                                                                         | [87]       |
| N-octyl derivatives/chitosan                      | Atrazine                      | MD: 41–177 nm<br>EE: > 90%                                                      | 37.5% reduction in the use of organic solvents in herbicide formulations and promotes the slower release of the active.                                                                                                                                                                 | [135]      |
| Smectite/Chitosan/Fe(III)                         | Imazamox                      | –                                                                               | Assays with <i>Brassica oleracea</i> borrytis have shown herbicidal activity similar to the commercial formulation, although the release is slower. However, there was a 15% reduction in total soil leaching losses and a 40% reduction in the maximum concentration in soil leachate. | [86]       |
| Alginate/Chitosan                                 | Imazapic and imazapyr         | MD: 377 nm<br>ZP: −30 mV<br>EE: 62–71%<br>1.8 × 10 <sup>9</sup> particles/mL    | Increased herbicidal activity tested on <i>Bidens pilosa</i> . Slower release compared to isolated assets and reduced toxicity and genotoxicity.                                                                                                                                        | [136]      |
| Chitosan/TPP                                      | Imazapic and imazapyr         | MD: 478 nm<br>ZP: +15 mV<br>EE: 58–70%<br>1.2 × 10 <sup>9</sup> particles/mL    | Increased herbicidal activity tested on <i>Bidens pilosa</i> . Slower release compared to isolated assets and reduced toxicity and genotoxicity.                                                                                                                                        | [136]      |
| Chitosan/TPP                                      | Paraquat                      | MD: 282 nm<br>ZP: +5 mV<br>EE: 63%                                              | The influence of humic substances promoted a reduction in the toxicity of encapsulated Paraquat compared to commercial.                                                                                                                                                                 | [137]      |
| Carboxymethyl/chitosan                            | Diuron                        | MD: 250 nm<br>ZP: −30 mV<br>PDI: 0.16<br>EE: 78%                                | Controlled release and Glutathione-responsive for herbicide release. Efficacy in pre-emergent target species ( <i>Echinochloa crusgalli</i> ) trials and preservation of non-target species.                                                                                            | [138]      |
| Carboxymethyl chitosan/2-nitrobenzyl              | Diuron                        | MD: 140 nm<br>ZP: −30 mV<br>EE: 91%                                             | The micellar system was photoresponsive to herbicide release and kept it encapsulated in the absence of light.                                                                                                                                                                          | [139]      |
| Chitosan-Isoleucine/copolymers                    | Spinosad                      | MD: 454 nm<br>ZP: +16 mV<br>PDI: 0.2<br>EE: 30%                                 | Photodegradation rate reduction, pH-responsive, antifungal activity against pathogenic bacteria found in bananas.                                                                                                                                                                       | [112]      |
| Porphyrinic metal-organic/pectin/chitosan         | Tebuconazole                  | MD: 158 nm<br>ZP: +26 mV<br>EE: 30%                                             | The tebuconazole nanocapsules did not affect the growth of Chinese cabbage and had a dual microbicidal effect on plant pathogens, responsive to pH and pectinase action.                                                                                                                | [119]      |
| Mesoporous silica/carboxymethyl chitosan          | Azoxystrobin                  | MD: 152 nm<br>EE: 71%<br>Loading: 21%                                           | It presents pH-responsive release and improved fungicidal activity against late tomato pest, <i>Phytophthora infestans</i> .                                                                                                                                                            | [140]      |
| Mesoporous silica/chitosan                        | Prochloraz                    | MD: 340 nm<br>ZP: +35 mV<br>Loading: 25%                                        | Nanoparticles showed good properties responsive to esterase and pH, sustained antifungal efficacy against citrus pathogens and reduction of potential environmental damage.                                                                                                             | [117]      |
| Mesoporous silica/chitosan derivative             | Pyraclostrobin                | MD: 299 nm<br>Loading: 40%<br>ZP: 30 mV                                         | The coating of mesoporous silica nanoparticles increased loading from 26 to 40% and demonstrated the same half-dose fungicidal activity against <i>Phomopsis asparagi</i> .                                                                                                             | [141]      |
| Carboxymethyl chitosan/deoxycholic acid           | Rotenone                      | Spherical micelles<br>MD: 91–140 nm<br>EE: 60–98%<br>Loading: 1–6%              | Increase in the amount of water-soluble fungicide in the order of 50 times that of the isolated active, resulting in a reduction in the use of organic solvents.                                                                                                                        | [118]      |
| Poly(2-dimethylamino-ethyl methacrylate)/chitosan | Pyraclostrobin                | EE: 64%<br>Loading: 19%                                                         | The microcapsules presented pH release and responsive term. Toxicity reduction in zebrafish assays.                                                                                                                                                                                     | [142]      |
| Beta-cyclodextrin/chitosan                        | Carvacrol and linalool        | MD: 175 and 245 nm<br>ZP: +23 and +43 mV<br>PDI: 0.1 and 0.3<br>EE >90%         | Inclusion compounds between beta-cyclodextrin/chitosan essential oils and nanoparticles showed higher acaricidal activity and reduced oviposition against <i>Tetranychus urticae</i> .                                                                                                  | [120]      |
| Chitosan/alginate or carboxymethyl cellulose      | <i>Bacillus thuringiensis</i> | Bipyramidal shape<br>MD: 0.6 × 1.2 μm<br>~2 × 10 <sup>7</sup> spore/mL          | Protection of parasporal crystals from environmental stresses prolonging their activity. Toxins released at pH above 9.0 and larvicidal toxicity equivalent to unencapsulated crystal toxins.                                                                                           | [113]      |
| Modified clay/chitosan/alginate                   | Acetamiprid                   | D: 1.2–1.7 μm<br>Loading: 4–6%<br>EE: 43–90%                                    | Coating the chitosan clay increases loading and encapsulation efficiency for the slower released pesticide.                                                                                                                                                                             | [143]      |

Table 3 (continued)

| Matrix            | Active ingredient | Characteristics                                 | Benefits                                                                                                                       | References |
|-------------------|-------------------|-------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Alginate/chitosan | Acetamiprid       | D: 201 nm<br>PDI: 0.39<br>ZP: -32 mV<br>EE: 62% | The formulation acts by releasing the pesticide in a controlled manner over a wide pH range.                                   | [144]      |
| Chitosan/TPP      | Hexaconazole      | D: 100 nm<br>ZP: +35 mV<br>EE: 73%              | Effective in fungal control in alkaline soils, superior to the commercial formulation and less toxic in non-target cell lines. | [145]      |

MD: mean diameter; ZP: zeta potential; PDI: polydisperse index; EE: encapsulation efficiency; CE: crosslinking efficiency.

soil contamination and promote a sustainable release of these molecules on the soil. Nitrogen, potassium, phosphate, copper, zinc, and vitamins are the focus of many studies during the last five years (Table 3). Chitosan-urea nanoparticles were successfully synthesized and characterized by Araújo and co-workers [103]. This work describes a controlled release system for urea delivery using an interaction between humic substances and urea, loaded into chitosan nanoparticles. NPK nano fertilizers were prepared by ionic gelation method using chitosan [104]. The biological activity on coffee seedlings showed a significantly increased intake of nitrogen and potassium content in the leaves, using 30–40 ppm doses of nano fertilizer for improvement of nutrients

uptake. The nano fertilizer also enhanced the contents of chlorophyll and carotenoids using 30 ppm, the NPK-nanoparticles stimulated the growth of coffee seedling [104]. Another study has reported [105] the uptake and translocation of chitosan/NPK nanoparticles in wheat seedlings. They have reported that the nanoparticles entering in the stomata of the leaves and were translocated by the phloem system, which is the main and unique pathway for translocation of nanoparticles and in consequence, are carried out to shoots and roots, improving plant development.

Applications of the hydrogels films are another strategy adopted for fertilizer delivery. Hydrogel shows the ability to gradually release their

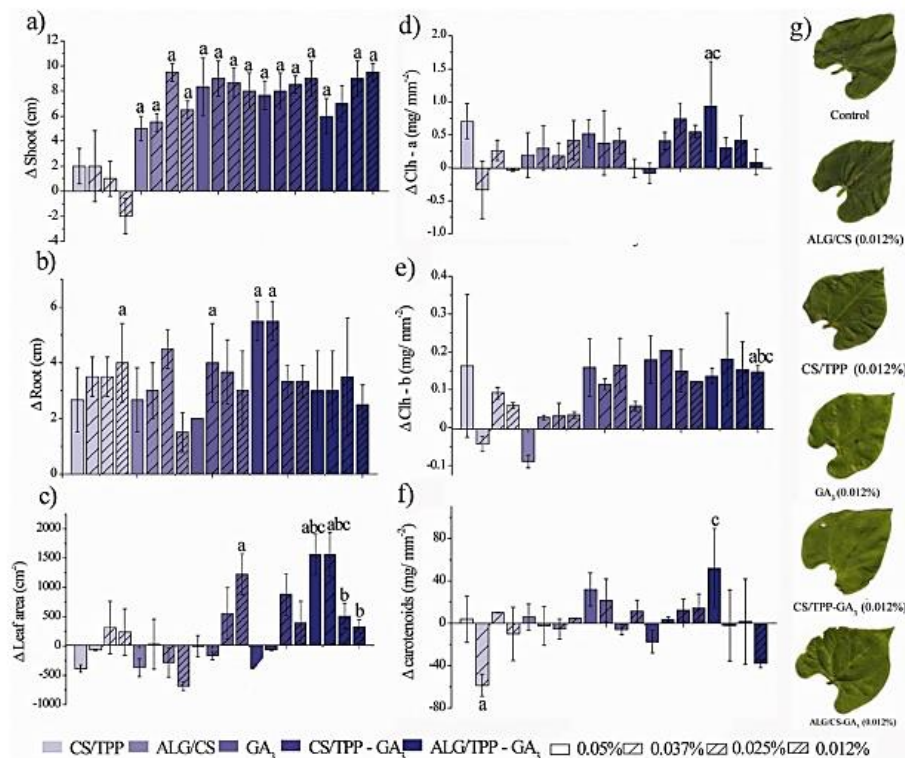


Fig. 2. Biological activities of the alginate (AL)/chitosan (CS)-GA<sub>3</sub> and CS/TPP-GA<sub>3</sub> nanoparticles towards *Phaseolus vulgaris*: a) shoot development (cm); b) root development (cm); c) leaf area development (cm<sup>2</sup>); d) chlorophyll 'a' content (mg mm<sup>-2</sup>); e) chlorophyll 'b' content (mg mm<sup>-2</sup>); f) total content of carotenoids (mg mm<sup>-2</sup>). g) Images of the leaves for the treatment at a concentration of 0.012%. Statistical analysis using one-way ANOVA. (Reproduced with permission of Elsevier from Santo Pereira, Silva, Oliveira, Oliveira and Fraceto [99]).



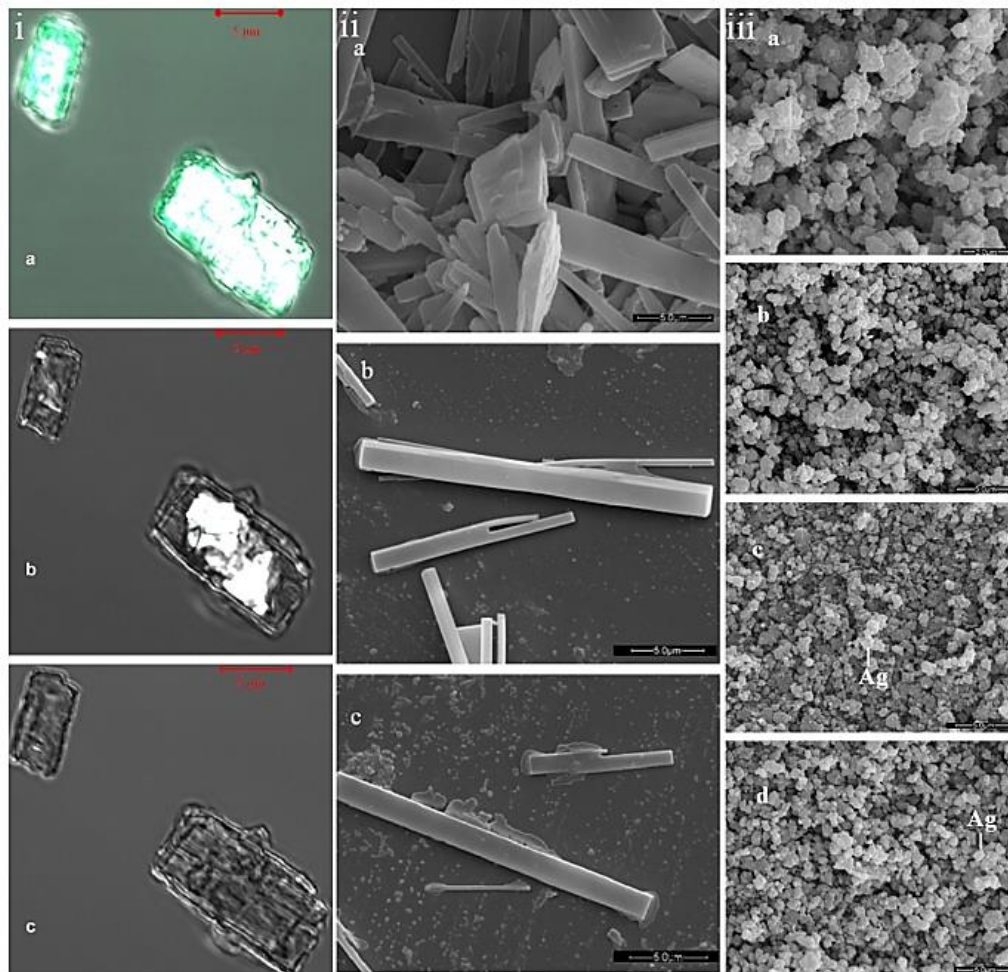
to release viable cells in a fast and prolonged manner on the non-sterile soil.

Therefore, the encapsulation of fertilizers is an alternative strategy to contribute to sustainable agriculture by providing suitable amounts of nutrients for plants, increasing absorption efficiency, and recovery of poor-quality soils. The development of a smart release system, responsive to soil pH changes could be an advantageous strategy for fertilizers release, and it is expected to gain attention soon.

### 5.3. Delivery of genetic materials

The development of nanocarriers to deliver genetic materials, such as plasmid DNA, siRNA, proteins and double-stranded RNA or DNA,

into protoplasts or plant cells, opens new opportunities in plant genetic engineering. This pioneer area still faces important challenges, including genetic insertion safety and nano-plant-gene interaction to ensure popular acceptance [109]. Chitosan is a potential carrier for gene delivery and plant transformation due to its capability to complex with negatively charged genetic material via electrostatic interactions, protecting against enzymatic degradation [110,111]. Kwak, Lew, Sweeney, Koman, Wong, Bohmert-Tatarev, Snell, Seo, Chua and Strano [110] developed a chloroplast-target transgene delivery by the complexation between plasmid-DNA with chitosan-complexed single-walled carbon nanotubes. The system was able to penetrate through the protoplast and chloroplast membranes of the arugula plants showing an estimated efficiency of pDNA delivery of 47%. The complexation with chitosan also



**Fig. 4.** i) Transmission CLSM images of the imidacloprid release process from the Chitosan/Alginate (CHI-ALG)<sub>10</sub> microcapsules. i.a) Morphologies of imidacloprid (IMI) microcrystal before dissolution; i.b) images of imidacloprid microcrystal in dissolution; i.c) images of polysaccharide capsules after removal of the crystal cores; ii) SEM images of IMI microcrystals. ii.a) uncoated; ii.b) coated with 5 layers of CHI/ALG; ii.c) coated with 10 layers of CHI-ALG; iii) SEM micrographs of photocatalysts. iii.a) TiO<sub>2</sub>; iii.b) SDS/TiO<sub>2</sub>; iii.c) Ag/TiO<sub>2</sub>; iii.d) SDS/Ag/TiO<sub>2</sub>. (Reprinted with permission of Elsevier from Guan, Chi, Yu and Li [115]).

protected pDNA from cellular degradation, and it was demonstrated that the nanoparticle-mediated delivery approach could also be applied to other plant species such as watercress, spinach, and tobacco.

Delivery of genetic materials shows a high potential for improving plant resistance against pathogens. The exploitation of this technology will surely aggregate knowledge for the specialized community and for the development of new technologies and products to overcome agriculture problems.

#### 5.4. Delivery of pesticides

The excessive use of pesticides was a traditional way of fighting pests and microbes in a trail to increase crop yields, however, the excessive use of pesticides is a major threat to the humans and animals (who consume the agricultural products), and contamination of the underground water. Control and optimization of the amount and rate of pesticide released in the agricultural industry is a big issue. Chitosan is a versatile polysaccharide that has enabled the development of intelligent systems for pesticide release in agriculture, favoring the reduction of the consumption of hazardous compounds, reducing environmental and human health impacts. The new works have produced asset release systems responsive to the environmental or intrinsic conditions of its target. Efforts are also made to increase formulation loading and the production of controlled release carriers that promote protection

against photosensitive and highly volatile compounds. Some of the relevant work in recent years (Table 3) is reported in detail below.

Chitosan-Isoleucine-based nanomicellar systems and copolymers were developed to encapsulate the spinosad fungicide, whose results indicated effective protection against photodegradation [112]. The association with nanomicella promoted an active release was faster at pH 6.4 than at pH 7.0, indicating the formulation is pH-responsive, and the activity showed higher activity against fungi treated with the encapsulated formulation compared to unencapsulated spinosad. He and co-workers coated crystals of *Bacillus thuringiensis* with chitosan and observed that chitosan improves the stability and resistance of these crystals to environmental stress and is responsive to alkaline pH, indicating its potential to fight specific insects in their larval stage as it may release the active in the environment. The midgut of these pests [113]. Paula, Sombra, de Freitas Cavalcante, Abreu and de Paula [114] synthesized chitosan/cashew tree gum microspheres loaded with *Lippia sidoides* (LS) essential oil, as a natural insecticide. A slow release of the LS was achieved only after the microspheres have been crosslinked. In this way, the loaded spheres are efficient pest control. Guan, Chi, Yu and Li [115] prepared chitosan/alginate beads loaded with imidacloprid a photodegradable insecticide (Figs. 4–5). In the study, a layer by layer self-assembly encapsulation was carried out for the production of imidacloprid (IMI) microcrystals with chitosan (CHI) and sodium alginate (ALG). Fig. 4ia–c shows the structures of individual IMI

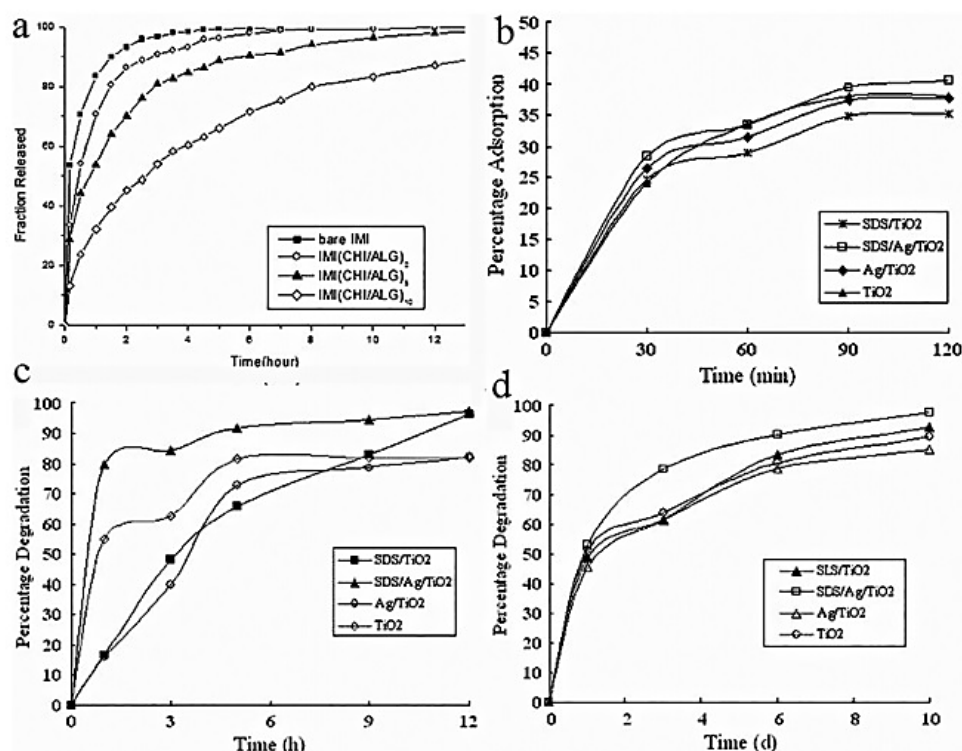


Fig. 5. a) In vitro dissolution profile of coated and uncoated imidacloprid microcrystals; b) the degradation of nano-imidacloprid on photocatalysts; c) catalyst powders under UV light; d) catalyst powders under natural light. (Reprinted with permission of Elsevier from Guan, Chi, Yu and Li [115]).

microcapsules before the adding the acetone. Results revealed well separated crystals due to the colloidal stabilization of the polyelectrolyte multilayers (PEM) coating. The uncoated microcrystals had a semi-transparent morphology but increasing the number of PEM coatings, the opacity of crystal surface was gradually increased (Fig. 4iia–c). The surface of the coated microcrystal was smoothened with PEM deposition and coating was uniform. Ag particles appeared to be in the shape of rice grains deposited on the  $\text{TiO}_2$  particles while agglomeration of SDS modified the  $\text{TiO}_2$  particles (Fig. 4iic, d). The release of IMI from the microcapsules was studied in deionized water at 25 °C and pH 7.4. The rate of the insecticide release from the beads was much slower than that of the free insecticide (Fig. 5). The rate of release was a function of alginate: chitosan ratio. As expected, the release rate of the IMI microcrystal decreased with an increase in the layer number of the microcapsules. The total release time for the corresponding microcapsules was approximately 2, 4 and 8 times longer than that of the uncoated IMI (Fig. 5a). The adsorption results revealed that SDS had higher saturated adsorption amounts and higher adsorption equilibrium constants than  $\text{TiO}_2$  (Fig. 5b). The degradation in UV-light and natural light, the order of photocatalytic activity for degradation of nano-IMI was as follows:  $\text{SDS/Ag/TiO}_2 > \text{SDS/TiO}_2 > \text{TiO}_2 > \text{Ag/TiO}_2$  (Fig. 5c–d). Chitosan derivative containing hydrophilic and hydrophobic groups was prepared and it forms spherical micelles with a size of 167.7–214.0 nm by self-assembly in aqueous solution [116]. Rotenone, a water-insoluble botanical insecticide, was loaded into the micelles solution by reverse micelle method in much higher concentration than in aqueous solution. This assembly provided a successful vehicle for the controlled release of pesticides into the soil.

Chitosan coating on mesoporous silica nanoparticles may increase loading in pesticide formulations [117,118]. A study by Liang and co-authors reached a loading value for prochloraz fungicide molecules of 25.4%. In addition to improving light stability, the study reported that acid and enzymes from infected fruits favor the release of the active ingredient present in the nanoparticles, characterizing them with this double responsiveness character [117]. The effectiveness of this system has been proven by improving antifungal activity against citrus diseases and reducing toxicity, in zebrafish assays, of six times the toxicity about the application of the isolated active. In the case of a synchronous system for encapsulating the emulsion-based azoxystrobin fungicide and modifying the surface of mesoporous silica nanoparticles, loading may be increased from 3.6% to 21% while maintaining pH-responsive release, which is controlled by the carboxymethylchitosan gatekeeper. The reported system showed a positive effect on late tomato pest, *Phytophthora infestans*, when compared to the active applied alone in the same dosages [118]. Metal-organic systems can be combined with chitosan to produce fungicidal nanocapsules, such as adsorbed charged tebuconazole and assembled by electrostatic interactions with chitosan and pectin. The study demonstrated that the release is responsive to the action of pectinase in slightly acidic medium, and the fungicide nanocapsules showed microbicidal efficacy and did not affect the growth of Chinese cabbage, providing evidence that they may be safe for application [119].

The association between chitosan and botanical compounds have also been reported in studies [120]. Plants produce compounds as defense mechanisms with the proven activity of these compounds, such as Carvacrol and Linalool which have insecticidal activity and repellents. The problem encountered with the use of botanicals in agricultural formulations is related to photosensitivity and high volatility. A study by Campos and co-workers reports the production of beta-cyclodextrin and chitosan nanoparticles for inclusion compound formation with linalool and carvacrol and suggests an improvement in the life of the compounds. The results indicate that the formulation enables a more sustained release in these actives, which were significantly more effective in terms of acaricidal activities and oviposition against *Tetranychus urticae* and enabling applications in an environmentally friendly manner by the use of natural compounds.

Recent advances, involving the release of pesticides based on systems containing chitosan, indicate that the formation of nanocapsules (associated or not with metals), copolymeric composition and nanomicellar are the most promising for the development of pesticide formulations. Most of them are smart delivery systems and also, they offer protection against environmental adversities, such as photodegradation. Also, they favor a greater loading of active ingredients and are pH-responsive and can release by enzymatic activity. In this way it promotes greater specificity in pest control and a reduction in the amount of actively employed in the field.

### 5.5. Delivery of herbicides

Herbicides are compounds traditionally used by agriculture to combat unwanted plants, classified as weeds, which cause yield losses. These compounds have their importance due to the growing demand for food, however, they pose risks to several organisms [121]. Technologies to improve the effectiveness of these molecules and reduce potential risks have been developed, such as the association of these compounds with chitosan. Important studies published in recent years (Table 3) demonstrate the potential of chitosan to be used in herbicide formulations.

Paraquat is a potent herbicide but has considerable toxicity and potential for environmental contamination in soils and water. The encapsulation of this compound in pectin/chitosan/TTP nanoparticles demonstrated that herbicidal activity could be improved significantly with the reduction of its toxic and mutagenic effects in human cells. Pectin/Chitosan/TTP reduces the absorption and deep penetration of the herbicide in the soil, thus reducing the risks of contamination [87]. The smectite/chitosan/Fe(III) combination, promoted a slower release for the imazamox compound and maintained the herbicidal activity at commercial formulation levels, but reduced total soil leaching losses by 15% and by 40%. Percent concentration of leached herbicide, thus contributed to less soil contamination [86].

Studies involving chitosan and herbicidal molecules have also made efforts to demonstrate the advantages of this association for reducing toxicity and genotoxic effects. Alginate/chitosan and chitosan/TTP nanoparticles were employed for the formulation of slow-release nanoherbicides containing imazapic and imazapyr by Maruyama, Guilger, Pascoli, Bileshy-José, Abhilash, Fraceto and De Lima [136]. Herbicidal efficacy trials were tested against the target species *Bidens pilosa*, presenting higher efficacy than the isolated actives. For nano encapsulated herbicidal actives, cytotoxicity was reduced, less cell damage was identified in genotoxicity assays, and there was less interference in the amount and types of bacteria associated with the nitrogen cycle in the soil compared to the isolated actives [136]. Chitosan may be employed for the formulation of nanoherbicides responsive to a given stimulus [138]. Carboxymethyl/chitosan nanoparticles were glutathione-responsive for the controlled release of the diuron herbicide. The study showed that diuron release in vitro was dependent on glutathione concentration. Nanoformulation was effective in the pre-emergence treatment of target species and did not affect the development of non-target species. The use of carboxymethyl/chitosan micelles was combined with photolabile side groups of 2-nitrobenzyl and showed light irradiation sensitive herbicide release, indicating that reticulated micelles can be used as photo-controlled carrier system [144].

The use of chitosan, therefore, configures a promising alternative to produce intelligent and more efficient herbicidal formulations for use in agriculture. As evidenced in the most recent studies, the use of chitosan associated with herbicidal active ingredients is linked to the production of formulations that will reduce undesired effects on the soil and its microbiota concomitant to greater herbicidal efficiency. The systems for slow release and release controlled by light may revolutionize the management methods, offering greater safety to the farmers during the spraying stages and allowing the recognition of target tissues.

## 6. Challenges

In terms of safety, the United States Food and Drug Administration (FDA) approves the use of chitosan as a food additive, having granted GRAS (Generally Recognized as Safe) status for the compound [146], however, the use of chitosan in formulations, whether pesticides, fertilizers or growth promoters in agriculture, is still restricted. In this review, the benefits of combining compounds for application in agriculture with nanosized chitosan are evident. However, as the nanostructured systems have a high contact area, the mobility and distribution of these carriers throughout the plant's structure is not yet fully understood and could have toxic effects [146]. Also, advances in technology transfer to large producers and standardization of technology validation protocols are necessary to encourage the large production of these chitosan-based nano-formulations. These formulations must be subjected to rigorous cytotoxicity tests, assessment of dosages and mechanisms of action and application, to prove that these systems do not pose risks, to then obtain approval by the regulatory bodies. Although there are still barriers related to the absence of specific international regulations, with the definition of legal protocols for environmental impact assessment, toxicity tests, production, handling and labeling [147], important measures to increase transparency and traceability in commercial use. Inconsistent legislative structures aligned with limited regulatory guidelines and lack of public licensing are pointed out as the main reasons for the scarcity of commercial development for agriculture, therefore adequate regulatory arrangements are a priority to support the development and use of these products in agriculture [148,149].

It is also important to disclose this emerging technology to farmers, who will be the main buyers of the product. In this regard, the main restrictions on the transfer of delivery matrices based on chitosan for the controlled release of pesticides, herbicides and other genetic materials for agriculture are related to the economical techniques of nanocarrier production as the current synthesis procedures still demand time, budget and work. The implementation of nano-formulated systems based on chitosan also faces economic obstacles, because unlike the pharmaceutical industry, the profit margins of the agrochemical sector are lower. Also, as a measure of controlling the market, large agrochemical companies end up acquiring small companies or being implemented without necessarily supporting the development of nanotechnologies for the sector [149]. Concerning raw materials, the development of biological methods for extracting chitin from seafood residues makes the process more ecological and can reduce costs at the expense of chemical extraction, however, this method requires time and controlled fermentation conditions. Also, advances in extraction methods are still needed to remove residual protein and obtain chitin with a good degree of purity in a single stage of production [34], which may reduce the final cost of chitosan as a raw material for the agrochemical industry.

Finally, the transfer of new chitosan-based technologies to farmers must circumvent potential risks of rejection by adopters and end consumers and can be facilitated by the adoption of transparent and constant communication for the general public. For a product to be successfully introduced in a sector responsible for food production, public acceptance is essential and will increase with recognition of the benefits generated and guarantees of safety with this type of formulation [149].

## 7. Conclusions

Considering all of the recent advances made in the last five years in the application and production of chitosan-based nanocarriers, it can be said that a great improvement has been made in this area. However, there is a lot to achieve, advancing the techniques of production and application of chitosan-based carrier matrices. The chitosan-based nanocarriers for the application in agriculture are lacking in the market. For this reason, more detailed studies of carriers based on this polysaccharide are needed. An intensive investigation of the interaction of

chitosan with the plant's vascular system is necessary, which can help to design plant-specific or species-based chitosan nanocarriers for the application of controlled release. Furthermore, there is a strong potential for the development of chitosan-based carriers to reduce the application of synthetic agrochemicals, since systems based on this polysaccharide can be easily modified to carry out guided delivery of agrochemicals, in which they can detect the target tissues of the cells and release the load on the specific target, with better use of the product by reducing the loss rate. As for genetic materials, delivery via chitosan-based nanocarriers is still an expanding research area. Some articles have demonstrated the potential of chitosan nanocarriers for genetic materials, however, more research is needed to fully explore the hidden potential of chitosan to transport genetic materials in plants. In herbicidal formulations, the use of chitosan as a nanocarrier has demonstrated through studies that this technology improves the effectiveness of molecules and reduces potential environmental and human health risks. Existing studies with chitosan-based herbicides and insecticides are still considered excipients, however, they point to a potential application as controlled release systems that respond to specific stimuli. In conclusion, new products based on chitosan nanoparticles should be further investigated and will corroborate with a sustainable development associated with possible economic and environmental gains.

## Acknowledgments

The authors thanks São Paulo Research Foundation (FAPESP, Grant Number #2017/21004-5 and #2018/23608-8) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant Number 301466/2018-1, 405623/2018-6 and 155959/2018-2) for financial support.

## References

- [1] P. Wang, E. Lombi, F.-J. Zhao, P.M. Kopittke, Nanotechnology: a new opportunity in plant sciences, *Trends Plant Sci.* 21 (8) (2016) 699–712.
- [2] R. Raliya, J. Tarafdar, K. Gulecha, K. Choudhary, R. Rameshwar, M. Prakash, R. Saran, Scope of nanoscience and nanotechnology in agriculture, *Journal of Applied Biology and Biotechnology* 1 (3) (2013) 041–044.
- [3] L.R. Khot, S. Sankaran, J.M. Maja, R. Ehsani, E.W. Schuster, Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: a review, *Crop Prot.* 35 (2012) 64–70.
- [4] S. Kumar, M. Nehra, N. Dilbaghi, G. Marrazza, A.A. Hassan, K.-H. Kim, Nano-based smart pesticide formulations: emerging opportunities for agriculture, *J. Control. Release* 294 (2018) 131–153.
- [5] S.C.C. Arruda, A.L.D. Silva, R.M. Galazzi, R.A. Azevedo, M.A.Z. Arruda, Nanoparticles applied to plant science: a review, *Talanta* 131 (2015) 693–705.
- [6] M.R. Maghsoodi, B.A. Lajayer, M. Hatami, M.H. Mirjalili, Challenges and opportunities of nanotechnology in plant-soil mediated systems: beneficial role, phytotoxicity, and phytoextraction, *Advances in Phytonanotechnology*, Elsevier 2019, pp. 379–404.
- [7] V. Ghormade, M.V. Deshpande, K.M. Paknikar, Perspectives for nano-biotechnology enabled protection and nutrition of plants, *Biotechnol. Adv.* 29 (6) (2011) 792–803.
- [8] M. Ghosh, A. Jana, S. Sinha, M. Jothiramajayam, A. Nag, A. Chakraborty, A. Mukherjee, A. Mukherjee, Effects of ZnO nanoparticles in plants: cytotoxicity, genotoxicity, deregulation of antioxidant defenses, and cell-cycle arrest, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 807 (2016) 25–32.
- [9] M. Kah, T. Hofmann, Nanopesticide research: current trends and future priorities, *Environ. Int.* 63 (2014) 224–235.
- [10] R. Prasad, V. Kumar, K.S. Prasad, Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects, *Afr. J. Biotechnol.* 13 (6) (2014) 705–713.
- [11] A. Elizabeth, M. Babychan, A.M. Mathew, G.M. Syriac, Application of nanotechnology in agriculture, *Int. J. Pure App. Biosci* 7 (2) (2019) 131–139.
- [12] T.A. Wani, F. Masoodi, W.N. Baba, M. Ahmad, N. Rahmanian, S.M. Jafari, Nanoencapsulation of agrochemicals, fertilizers, and pesticides for improved plant production, *Advances in Phytonanotechnology*, Elsevier 2019, pp. 279–298.
- [13] S. Baker, S. Satish, N. Prasad, R.S. Chouhan, Nano-agromaterials: influence on plant growth and crop protection, *Industrial Applications of Nanomaterials*, Elsevier 2019, pp. 341–363.
- [14] R. Raliya, R. Nair, S. Chavalmane, W.-N. Wang, P. Biswas, Mechanistic evaluation of translocation and physiological impact of titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles on the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) plant, *Metallomics* 7 (12) (2015) 1584–1594.

- [15] T. Eichert, A. Kurtz, U. Steiner, H.E. Goldbach, Size exclusion limits and lateral heterogeneity of the stomatal foliar uptake pathway for aqueous solutes and water-suspended nanoparticles, *Physiol. Plant.* 134 (1) (2008) 151–160.
- [16] Y. Shang, M. Hasan, G.J. Ahmed, M. Li, H. Yin, J. Zhou, Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review, *Molecules* 24 (14) (2019) 2558.
- [17] R.C. Choudhary, S. Kumari, R. Kumaraswamy, G. Sharma, A. Kumar, S. Budhwar, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, Chitosan nanomaterials for smart delivery of bioactive compounds in agriculture, *Nanoscale Engineering in Agricultural Management* 124 (2019).
- [18] F. Sopena, C. Maqueda, E. Morillo, Controlled release formulations of herbicides based on micro-encapsulation, *Ciencia e investigación agraria* 36 (1) (2009) 27–42.
- [19] K. Tsuji, Microencapsulation of pesticides and their improved handling safety, *J. Microencapsul.* 18 (2) (2001) 137–147.
- [20] O. Cota-Arriola, M. Onofre Cortez-Rocha, A. Burgos-Hernández, J. Marina Ezquerra-Brauer, M. Plascencia-Jatomea, Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture, *J. Sci. Food Agric.* 93 (7) (2013) 1525–1536.
- [21] K. Kurita, Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans, *Mar. Biotechnol.* 8 (3) (2006) 203.
- [22] S. Senel, S.J. McClure, Potential applications of chitosan in veterinary medicine, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (10) (2004) 1467–1480.
- [23] P.L. Kashyap, X. Xiang, P. Heiden, Chitosan nanoparticle based delivery systems for sustainable agriculture, *Int. J. Biol. Macromol.* 77 (2015) 36–51.
- [24] V. Zargar, M. Asghari, H. Dashti, A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications, *ChemBioEng Reviews* 2 (3) (2015) 204–226.
- [25] R. Sharif, M. Mujtaba, M. Ur Rahman, A. Shalmani, H. Ahmad, T. Anwar, D. Tianchan, X. Wang, The multifunctional role of chitosan in horticultural crops: a review, *Molecules* 23 (4) (2018) 872.
- [26] M. Kaya, M. Mujtaba, H. Ehrlich, A.M. Salaberria, T. Baran, C.T. Amemiya, R. Galli, L. Alyuz, I. Sargin, J. Labidi, On chemistry of  $\gamma$ -chitin, *Carbohydr. Polym.* 176 (2017) 177–186.
- [27] M.K. Jang, B.G. Kong, Y.I. Jeong, C.H. Lee, J.W. Nah, Physicochemical characterization of  $\alpha$ -chitin,  $\beta$ -chitin, and  $\gamma$ -chitin separated from natural resources, *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 42 (14) (2004) 3423–3432.
- [28] P. Beaney, J. Lizardi-Mendoza, M. Healy, Comparison of chitins produced by chemical and bioprocessing methods, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology* 80 (2) (2005) 145–150.
- [29] S. Chopra, S. Mahdi, J. Kaur, Z. Iqbal, S. Talegaonkar, F.J. Ahmad, Advances and potential applications of chitosan derivatives as mucoadhesive biomaterials in modern drug delivery, *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (8) (2006) 1021–1032.
- [30] M. Mujtaba, R.E. Morsi, G. Kerch, M.Z. Elsayee, M. Kaya, J. Labidi, K.M. Khawar, Current advancements in chitosan-based film production for food technology: a review, *Int. J. Biol. Macromol.* 121 (2018) 889–904.
- [31] A.N. Hernandez-Lauzardo, S. Bautista-Baños, M.G. Velazquez-Del Valle, M. Méndez-Montealvo, M. Sánchez-Rivera, L.A. Bello-Pérez, Antifungal effects of chitosan with different molecular weights on in vitro development of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., *Carbohydr. Polym.* 73 (4) (2008) 541–547.
- [32] T. Sun, D. Zhou, J. Xie, F. Mao, Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity, *Eur. Food Res. Technol.* 225 (3–4) (2007) 451–456.
- [33] I. Aranz, M. Mengibar, R. Harris, I. Pa nos, B. Miralles, N. Acosta, et al., Functional characterization of chitin and chitosan, *Curr. Chem. Biol.* 3 (2009) 203–230.
- [34] M. Yadav, P. Goswami, K. Paritosh, M. Kumar, N. Pareek, V. Vivekanand, Seafod waste: a source for preparation of commercially employable chitin/chitosan materials, *Bioresources and Bioprocessing* 6 (1) (2019) 8.
- [35] M.P. Crespo, M.V. Martínez, J.L. Hernández, M.L. Yusty, High-performance liquid chromatographic determination of chitin in the snow crab, *Chionoecetes opilio*, *J. Chromatogr. A* 1116 (1–2) (2006) 189–192.
- [36] S. Das, E.A. Ganesh, Extraction of chitin from trash crabs (*Podophthalmus vigil*) by an eccentric method, *Curr. Res. Biol. Sci.* 2 (1) (2010) 72–75.
- [37] S.V. Sperstad, T. Haug, V. Paulsen, T.M. Rode, G. Strandkog, S.T. Solem, O.B. Styrud, K. Stensvåg, Characterization of crustins from the hemocytes of the spider crab, *Hyas araneus*, and the red king crab, *Paralithodes camtschaticus*, *Developmental & Comparative Immunology* 33 (4) (2009) 583–591.
- [38] S. Hajji, I. Younes, O. Ghorbel-Bellaa, R. Hajji, M. Rinaudo, M. Nasri, K. Jellouli, Structural differences between chitin and chitosan extracted from three different marine sources, *Int. J. Biol. Macromol.* 65 (2014) 298–306.
- [39] E.S. Abdou, K.S. Nagy, M.Z. Elsayee, Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources, *Bioresour. Technol.* 99 (5) (2008) 1359–1367.
- [40] M. Kaya, O. Seyyar, T. Baran, S. Erdoğan, M. Kar, A physicochemical characterization of fully acetylated chitin structure isolated from two spider species: with new surface morphology, *Int. J. Biol. Macromol.* 65 (2014) 553–558.
- [41] G.J. Davies, D.P. Knight, F. Vollrath, Chitin in the silk gland ducts of the spider *Nephila edulis* and the silkworm *Bombyx mori*, *PLoS One* 8 (8) (2013), e73225.
- [42] M. Kaya, M. Asan-Ozusaglam, S. Erdogan, Comparison of antimicrobial activities of newly obtained low molecular weight scorpion chitosan and medium molecular weight commercial chitosan, *J. Biosci. Bioeng.* 121 (6) (2016) 678–684.
- [43] M. Zhang, A. Haga, H. Sekiguchi, S. Hirano, Structure of insect chitin isolated from beetle larva cuticle and silkworm (*Bombyx mori*) pupa exuvia, *Int. J. Biol. Macromol.* 27 (1) (2000) 99–105.
- [44] J. Synowiecki, N.A.A.Q. Al-Khateeb, Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan, *Food Chem.* 60 (4) (1997) 605–610.
- [45] T. Yu, L. Wang, Y. Yin, Y. Wang, X. Zheng, Effect of chitin on the antagonistic activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* in pear fruit, *Int. J. Food Microbiol.* 122 (1–2) (2008) 44–48.
- [46] R. Kollár, B.B. Reinhold, E. Petršková, H.J. Yeh, G. Ashwell, J.C. Kapteyn, F.M. Klis, E. Cabib, Architecture of the yeast cell wall ( $\beta$  (1–6)-glucan interconnects mannoprotein,  $\beta$  (1–3)-glucan, and chitin, *J. Biol. Chem.* 272 (28) (1997) 17762–17775.
- [47] N.K. Mathur, C.K. Narang, Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals, *J. Chem. Educ.* 67 (11) (1990) 938.
- [48] V. Chobot, J. Kremenak, L. Opletal, Phytotherapeutic aspects of diseases of the circulatory system. 4. Chitin and chitosan, *Ceska a Slovenska farmacie, casopis Ceske farmaceuticke spolecnosti a Slovenske farmaceuticke spolecnosti* 44 (4) (1995) 190–195.
- [49] M. Mahlous, D. Tahrat, S. Benamer, A.N. Khodja, Gamma irradiation-aided chitin/chitosan extraction from prawn shells, *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res., Sect. B* 265 (1) (2007) 414–417.
- [50] M. Kaya, Y.S. Cakmak, T. Baran, M. Asan-Ozusaglam, A. Montes, K.O. Tozak, New chitin, chitosan, and O-carboxymethyl chitosan sources from resting eggs of *Daphnia longispina* (Crustacea): with physicochemical characterization, and antimicrobial and antioxidant activities, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 19 (1) (2014) 58–69.
- [51] M. Kaya, T. Baran, A. Montes, M. Asaroglu, G. Sezen, K.O. Tozak, Extraction and characterization of  $\alpha$ -chitin and chitosan from six different aquatic invertebrates, *Food biophysics* 9 (2) (2014) 145–157.
- [52] C. Chausard, A. Domard, New aspects of the extraction of chitin from squid pens, *Biomacromolecules* 5 (2) (2004) 559–564.
- [53] Y. Fan, T. Saito, A. Isogai, Preparation of chitin nanofibers from squid pen  $\beta$ -chitin by simple mechanical treatment under acid conditions, *Biomacromolecules* 9 (7) (2008) 1919–1923.
- [54] A. Roy, S.K. Singh, J. Bajpai, A.K. Bajpai, Controlled pesticide release from biodegradable polymers, *Cent. Eur. J. Chem.* 12 (4) (2014) 453–469.
- [55] A. Mihou, A. Michaelakis, F. Krokos, B. Mazomenos, E. Couladouros, Prolonged slow release of (Z)-11-hexadecenyl acetate employing polyurea microcapsules, *J. Appl. Entomol.* 131 (2) (2007) 128–133.
- [56] O. Cota-Arriola, M. Onofre Cortez-Rocha, A. Burgos-Hernández, J. Marina Ezquerra-Brauer, M. Plascencia-Jatomea, Controlled release matrices and micro/nanoparticles of chitosan with antimicrobial potential: development of new strategies for microbial control in agriculture, *J. Sci. Food Agric.* 93 (7) (2013) 1525–1536.
- [57] S. Senel, E.A. Aksoy, G. Akca, Application of chitosan based scaffolds for drug delivery and tissue engineering in dentistry, *Marine-Derived Biomaterials for Tissue Engineering Applications*, Springer (2019) 157–178.
- [58] C.-P. Gong, Y. Luo, Y.-Y. Pan, Novel synthesized zinc oxide nanoparticles loaded alginate-chitosan biofilm to enhanced wound site activity and anti-septic abilities for the management of complicated abdominal wound dehiscence, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 192 (2019) 124–130.
- [59] A. Manikandan, M. Sathiyabama, Preparation of chitosan nanoparticles and its effect on detached rice leaves infected with *Piricularia grisea*, *Int. J. Biol. Macromol.* 84 (2016) 58–61.
- [60] A. Mohammadi, M. Hashemi, S.M. Hosseini, Effect of chitosan molecular weight as micro and nanoparticles on antibacterial activity against some soft rot pathogenic bacteria, *LWT-Food Science and Technology* 71 (2016) 347–355.
- [61] V. Saharan, A. Mehrotra, R. Khatik, P. Rawal, S. Sharma, A. Pal, Synthesis of chitosan based nanoparticles and their in vitro evaluation against phytopathogenic fungi, *Int. J. Biol. Macromol.* 62 (2013) 677–683.
- [62] V. Saharan, G. Sharma, M. Yadav, M.K. Choudhary, S. Sharma, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, Synthesis and in vitro antifungal efficacy of Cu-chitosan nanoparticles against pathogenic fungi of tomato, *Int. J. Biol. Macromol.* 75 (2015) 346–353.
- [63] K. Xing, X. Shen, X. Zhu, X. Ju, X. Miao, J. Tian, Z. Feng, X. Peng, J. Jiang, S. Qin, Synthesis and in vitro antifungal efficacy of oleoyl-chitosan nanoparticles against plant pathogenic fungi, *Int. J. Biol. Macromol.* 82 (2016) 830–836.
- [64] R.C. Choudhary, R. Kumaraswamy, S. Kumari, S. Sharma, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, V. Saharan, Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.), *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 9754.
- [65] M. Sathiyabama, R.E. Charles, Fungal cell wall polymer based nanoparticles in protection of tomato plants from wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Carbohydr. Polym.* 133 (2015) 400–407.
- [66] R. Kumaraswamy, S. Kumari, R.C. Choudhary, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, V. Saharan, Engineered chitosan based nanomaterials: bioactivities, mechanisms and perspectives in plant protection and growth, *Int. J. Biol. Macromol.* 113 (2018) 494–506.
- [67] Y. Ohya, M. Shiratani, H. Kobayashi, T. Ouchi, Release behavior of 5-fluorouracil from chitosan-gel nanospheres immobilizing 5-fluorouracil coated with polysaccharides and their cell specific cytotoxicity, *Journal of Macromolecular Science—Pure and Applied Chemistry* 31 (5) (1994) 629–642.
- [68] P. Calvo, C. Remunan-Lopez, J.L. Vila-Jato, M. Alonso, Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers, *J. Appl. Polym. Sci.* 63 (1) (1997) 125–132.
- [69] S. Mitra, U. Gaur, P. Ghosh, A. Maitra, Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier, *J. Control. Release* 74 (1–3) (2001) 317–323.
- [70] S.A. Agnihotri, N.N. Mallikarjuna, T.M. Aminabhavi, Recent advances on chitosan-based micro-and nanoparticles in drug delivery, *J. Control. Release* 100 (1) (2004) 5–28.
- [71] S.A. Agnihotri, T.M. Aminabhavi, Controlled release of clozapine through chitosan microparticles prepared by a novel method, *J. Control. Release* 96 (2) (2004) 245–259.
- [72] H. Tokumitsu, H. Ichikawa, Y. Fukumori, Chitosan-gadolinium complex nanoparticles for gadolinium neutron-capture therapy of cancer: preparation by

- novel emulsion-droplet coalescence technique and characterization, *Pharm. Res.* 16 (12) (1999) 1830–1835.
- [73] S. Davis, I. Illum, Sustained release chitosan microspheres prepared by novel spray drying methods, *J. Microencapsul.* 16 (3) (1999) 343–355.
- [74] A. Grenha, Chitosan nanoparticles: a survey of preparation methods, *J. Drug Target.* 20 (4) (2012) 291–300.
- [75] N. Kildeeva, P. Perminov, L. Vladimirov, V. Novikov, S. Mikhailov, About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde, *Russian journal of bioorganic chemistry* 35 (3) (2009) 360–369.
- [76] K. Janes, P. Calvo, M. Alonso, Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (1) (2001) 83–97.
- [77] J. Antoniou, F. Liu, H. Majed, J. Qi, W. Yokoyama, F. Zhong, Physicochemical and morphological properties of size-controlled chitosan-tripolyphosphate nanoparticles, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 465 (2015) 137–146.
- [78] C.C. Sipoli, N. Santana, A.A.M. Shimojo, A. Azzoni, L.G. de la Torre, Scalable production of highly concentrated chitosan/TPP nanoparticles in different pHs and evaluation of the in vitro transfection efficiency, *Biochem. Eng. J.* 94 (2015) 65–73.
- [79] S. Song, Y. Wang, J. Xie, B. Sun, N. Zhou, H. Shen, J. Shen, Carboxymethyl chitosan modified carbon nanoparticle for controlled emamectin benzoate delivery: improved solubility, pH-responsive release, and sustainable pest control, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (37) (2019) 34258–34267.
- [80] J. Tang, G. Ding, J. Niu, W. Zhang, G. Tang, Y. Liang, C. Fan, H. Dong, J. Yang, J. Li, Y. Cao, Preparation and characterization of tebuconazole metal-organic framework-based microcapsules with dual-microbicidal activity, *Chem. Eng. J.* 359 (2019) 225–232.
- [81] P. Rychter, Chitosan/glyphosate formulation as a potential, environmental friendly herbicide with prolonged activity, *J. Environ. Sci. Health B* 54 (8) (2019) 681–692.
- [82] A. Kamari, N.F.A. Aljafree, S.N.M. Yusoff, N,N-dimethylhexadecyl carboxymethyl chitosan as a potential carrier agent for rotenone, *Int. J. Biol. Macromol.* 88 (2016) 263–272.
- [83] S. Yusoff, A. Kamari, S. Ishak, A. Halim, N-hexanoyl-O-glycol chitosan as a carrier agent for water-insoluble herbicide, *J. Phys. Conf. Ser.* (2018) 120531OP Publishing.
- [84] Z. Ahmadi, M. Saber, M. Bagheri, G.R. Mahdavinia, Achillea millefolium essential oil and chitosan nanocapsules with enhanced activity against *Tetranychus urticae*, *J. Pest. Sci.* 91 (2) (2018) 837–848.
- [85] Y. Xiang, G. Zhang, Y. Chi, D. Cai, Z. Wu, Fabrication of a controllable nanopesticide system with magnetic collectability, *Chem. Eng. J.* 328 (2017) 320–330.
- [86] A. Cabrera, R. Celis, M.C. Hermosin, Imazamox-clay complexes with chitosan-and iron (III)-modified smectites and their use in nanoformulations, *Pest Manag. Sci.* 72 (7) (2016) 1285–1294.
- [87] M. Rashidpour, A. Maleki, S. Kordi, M. Birjandi, N. Pajohi, E. Mohammadi, R. Heydari, R. Rezaee, B. Rasoulan, B. Davari, Pectin/chitosan/tripolyphosphate nanoparticles: efficient carriers for reducing soil sorption, cytotoxicity and mutagenicity of paraquat and enhancement of its herbicide activity, *J. Agric. Food Chem.* 67 (2019) 5736–5745.
- [88] N.M. Silveira, A.B. Seabra, F.C.C. Marcos, M.T. Pelegrino, E.C. Machado, R.V. Ribeiro, Encapsulation of S-nitrosoglutathione into chitosan nanoparticles improves drought tolerance of sugarcane plants, *Nitric Oxide* 84 (2019) 38–44.
- [89] R.V. Kumaraswamy, S. Kumari, R.C. Choudhary, S.S. Sharma, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, V. Saharan, Salicylic acid functionalized chitosan nanoparticle: a sustainable biostimulant for plant, *Int. J. Biol. Macromol.* 123 (2019) 59–69.
- [90] F.N. Malin, M.Z. Hussein, N.A. Yusof, S. Fakurazi, A.S. Idris, Z. Hilmi, N. Hailini, L.D. Jeffery Daim, Preparation of chitosan-hexaconazole nanoparticles as fungicide nanodelivery system for combating ganoderma disease in oil palm, *Molecules* 24 (13) (2019) 2498.
- [91] N.K. Kalagatur, N. Ghosh, O. Sivaraman, N. Sundararaj, Antifungal activity of chitosan nanoparticles encapsulated with *Cymbopogon martinii* essential oil on plant pathogenic fungi *Fusarium graminearum*, *Front. Pharmacol.* 9 (2018) 610.
- [92] N.S. Khalifa, M.N. Hasaneen, The effect of chitosan-PMMA-NPK nanofertilizer on *Pisum sativum* plants, *3 Biotech* 8 (4) (2018) 193.
- [93] S. Fahad, S. Hussain, A. Bano, S. Saud, S. Hassan, D. Shan, F.A. Khan, F. Khan, Y. Chen, C. Wu, Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (7) (2015) 4907–4921.
- [94] S.H. Wani, V. Kumar, V. Shriram, S.K. Sah, Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants, *The Crop Journal* 4 (3) (2016) 162–176.
- [95] M. Waseem, Z. Li, Overexpression of tomato SlbHLH22 transcription factor gene enhances fruit sensitivity to exogenous phytohormones and shortens fruit shelf-life, *J. Biotechnol.* 299 (2019) 50–56.
- [96] L. Fan, R. Jin, X. Le, X. Zhou, S. Chen, H. Liu, Y. Xiong, Chitosan microspheres for controlled delivery of auxins as agrochemicals, *Microchim. Acta* 176 (3–4) (2012) 381–387.
- [97] Y. Liu, Y. Sun, S. He, Y. Zhu, M. Ao, J. Li, Y. Cao, Synthesis and characterization of gibberellin-chitosan conjugate for controlled-release applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 57 (2013) 213–217.
- [98] A. Pereira, I. Sandoval-Herrera, S. Zavala-Betancourt, H. Oliveira, A. Ledezma-Pérez, J. Romero, L. Fraceto,  $\gamma$ -Polyglutamic acid/chitosan nanoparticles for the plant growth regulator gibberellic acid: characterization and evaluation of biological activity, *Carbohydr. Polym.* 157 (2017) 1862–1873.
- [99] A.E. Santo Pereira, P.M. Silva, J.L. Oliveira, H.C. Oliveira, L.F. Fraceto, Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 150 (2017) 141–152.
- [100] Z. Souni, N. Karimi, M. Sarmadi, E. Rostami, Salicylic acid nanoparticles (SANPs) improve growth and phytochemical efficiency of *Isatis cappadocica* Desv., under As stress, *Int. J. Nanobiotechnology* 11 (6) (2017) 650–655.
- [101] S. Martín-Saldaha, M.T. Chevalier, M.J. Iglesias, S.L. Colman, C.A. Casalongué, V.A. Álvarez, A.A. Chevalier, Salicylic acid loaded chitosan microparticles applied to lettuce seedlings: recycling shrimp fishing industry waste, *Carbohydr. Polym.* 200 (2018) 321–331.
- [102] R.C. Choudhary, R. Kumaraswamy, S. Kumari, S. Sharma, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, V. Saharan, Zinc encapsulated chitosan nanoparticle to promote maize crop yield, *Int. J. Biol. Macromol.* 127 (2019) 126–135.
- [103] B.R. Araújo, L.P. Romão, M.E. Doumer, A.S. Mangrich, Evaluation of the interactions between chitosan and humics in media for the controlled release of nitrogen fertilizer, *J. Environ. Manag.* 190 (2017) 122–131.
- [104] N.M.C. Ha, T.H. Nguyen, S.-L. Wang, A.D. Nguyen, Preparation of NPK nanofertilizer based on chitosan nanoparticles and its effect on biophysical characteristics and growth of coffee in green house, *Res. Chem. Intermed.* 45 (1) (2019) 51–63.
- [105] H.M. Abdel-Aziz, M.N. Hasaneen, A.M. Omer, Nano chitosan-NPK fertilizer enhances the growth and productivity of wheat plants grown in sandy soil, *Span. J. Agric. Res.* 14 (1) (2016) 902.
- [106] B.R. dos Santos, F.B. Bacalhau, T. dos Santos Pereira, C.F. Souza, R. Faez, Chitosan-montmorillonite microspheres: a sustainable fertilizer delivery system, *Carbohydr. Polym.* 127 (2015) 340–346.
- [107] M.M. Iftime, G.L. Alilesei, E. Ungureanu, L. Marin, Designing chitosan based eco-friendly multifunctional soil conditioner systems with urea controlled release and water retention, *Carbohydr. Polym.* 223 (2019), 115040.
- [108] J. Perez, N. Francois, G. Maroniche, M. Borrajo, M. Pereyra, C. Creus, A novel, green, low-cost chitosan-starch hydrogel as potential delivery system for plant growth-promoting bacteria, *Carbohydr. Polym.* 202 (2018) 409–417.
- [109] P. Wang, F.-J. Zhao, P.M. Kopittke, Engineering crops without genome integration using nanotechnology, *Trends Plant Sci.* 24 (2019) 574–577.
- [110] S.-Y. Kwak, T.T.S. Lew, C.J. Sweeney, V.B. Komar, M.H. Wong, K. Bohmert-Tatarev, K.D. Snell, J.S. Seo, N.-H. Chua, M.S. Strano, Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers, *Nat. Nanotechnol.* 14 (5) (2019) 447.
- [111] Y. Wu, J.A. Phillips, H. Liu, R. Yang, W. Tan, Carbon nanotubes protect DNA strands during cellular delivery, *ACS Nano* 2 (10) (2008) 2023–2028.
- [112] E. Dong, Z. Yang, C. Zhou, C. Wang, S. Li, Q. Ouyang, L. Kong, Z. He, J. Xie, P. Li, pH-responsive ultrasonic self-assembly spinosad-loaded nanomicelles and their antifungal activity to *Fusarium oxysporum*, *React. Funct. Polym.* 141 (2019) 123–132.
- [113] X. He, Z. Sun, K. He, S. Guo, Biopolymer microencapsulations of *Bacillus thuringiensis* crystal preparations for increased stability and resistance to environmental stress, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (7) (2017) 2779–2789.
- [114] H.C. Paula, F.M. Sombra, R. de Freitas Cavalcante, F.O. Abreu, R.C. de Paula, Preparation and characterization of chitosan/cashew gum beads loaded with *Lippia sidoides* essential oil, *Mater. Sci. Eng. C* 31 (2) (2011) 173–178.
- [115] H. Guan, D. Chi, J. Yu, X. Li, A novel photodegradable insecticide: preparation, characterization and properties evaluation of nano-imidacloprid, *Pestic. Biochem. Physiol.* 92 (2) (2008) 83–91.
- [116] S.-B. Luo, Z.-X. Zhang, H.-H. Xu, G.-R. Jiang, Novel amphiphilic chitosan derivatives: synthesis, characterization and micellar solubilization of rotenone, *Carbohydr. Polym.* 82 (4) (2010) 1136–1142.
- [117] Y. Liang, C. Fan, H. Dong, W. Zhang, G. Tang, J. Yang, N. Jiang, Y. Cao, Preparation of MSNs-chitosan@prochloraz nanoparticles for reducing toxicity and improving release properties of prochloraz, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (8) (2018) 10211–10220.
- [118] N. Aljafree, A. Kamari, Synthesis, characterisation and potential application of deoxycholic acid carboxymethyl chitosan as a carrier agent for rotenone, *J. Polym. Res.* 25 (6) (2018) 133.
- [119] J. Tang, G. Ding, J. Niu, W. Zhang, G. Tang, Y. Liang, C. Fan, H. Dong, J. Yang, J. Li, Preparation and characterization of tebuconazole metal-organic framework-based microcapsules with dual-microbicidal activity, *Chem. Eng. J.* 359 (2019) 225–232.
- [120] E.V. Campos, P.L. Proença, J.L. Oliveira, C.C. Melville, J.F. Della Vecchia, D.J. De Andrade, L.F. Fraceto, Chitosan nanoparticles functionalized with  $\beta$ -cyclodextrin: a promising carrier for botanical pesticides, *Sci. Rep.* 8 (1) (2018) 2067.
- [121] B. Strandberg, C. Boutin, S.K. Mathiasen, C. Damgaard, Y.L. Dupont, D.J. Carpenter, P. Kudsk, Effects of Herbicides on Non-target Terrestrial Plants, *Pesticide Dose: Effects on the Environment and Target and Non-Target Organisms*, ACS Publications, 2017 149–166.
- [122] A.d.E. Santo Pereira, H.C. Oliveira, L.F. Fraceto, Polymeric nanoparticles as an alternative for application of gibberellic acid in sustainable agriculture: a field study, *Sci. Rep.* 9 (1) (2019) 7135.
- [123] H.C. Oliveira, B.C. Gomes, M.T. Pelegrino, A.B. Seabra, Nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles alleviate the effects of salt stress in maize plants, *Nitric Oxide* 61 (2016) 10–19.
- [124] P. Deshpande, A. Dapkekar, M.D. Oak, K.M. Paknikar, J.M. Rajwade, Zinc complexed chitosan/TPP nanoparticles: a promising micronutrient nanocarrier suited for foliar application, *Carbohydr. Polym.* 165 (2017) 394–401.
- [125] S. Muthukrishnan, I. Murugan, M. Selvaraj, Chitosan nanoparticles loaded with thiamine stimulate growth and enhances protection against wilt disease in Chickpea, *Carbohydr. Polym.* 212 (2019) 169–177.
- [126] D. França, A.F. Medina, L.L. Messa, C.F. Souza, R. Faez, Chitosan spray-dried microcapsule and microsphere as fertilizer host for swellable—controlled release materials, *Carbohydr. Polym.* 196 (2018) 47–55.
- [127] J.J. Perez, N.J. Francois, Chitosan-starch beads prepared by ionotropic gelation as potential matrices for controlled release of fertilizers, *Carbohydr. Polym.* 148 (2016) 134–142.
- [128] M.A. Melaj, M.E. Daraio, A. Vazquez, Controlled release on sand bed columns and biodegradability in soil of chitosan: hydroxypropyl methylcellulose films, *J. Appl. Polym. Sci.* 136 (20) (2019) 47532.

- [129] V. Saharan, R. Kumaraswamy, R.C. Choudhary, S. Kumari, A. Pal, R. Raliya, P. Biswas, Cu-chitosan nanoparticle mediated sustainable approach to enhance seedling growth in maize by mobilizing reserved food, *J. Agric. Food Chem.* 64 (31) (2016) 6148–6155.
- [130] T. Li, S. Liu, J. Yan, X. Bai, C. Gao, M. Liu, An environment-friendly fertilizer prepared by layer-by-layer self-assembly for pH-responsive nutrient release, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 11 (11) (2019) 10941–10950.
- [131] D.J.M. Plofino, C.C.P. Brutas, C.G. Alfafara, M.C. Maguon-Detras, V.P. Migo, Parametric and optimization studies on the entrapment of potassium fertilizer into chitosan-poly (methacrylic acid) carrier via ionic gelation, *MATEC web of conferences*, EDP Sciences (2019) 6009.
- [132] M.A. El-Aziz, S. Morsi, D.M. Salama, M. Abdel-Aziz, M.S.A. Elwahed, E. Shaaban, A. Youssef, Preparation and characterization of chitosan/polyacrylic acid/copper nanocomposites and their impact on onion production, *Int. J. Biol. Macromol.* 123 (2019) 856–865.
- [133] O. León, A. Muñoz-Bonilla, D. Soto, J. Ramírez, Y. Marquez, M. Colina, M. Fernández-García, Preparation of oxidized and grafted chitosan superabsorbents for urea delivery, *J. Polym. Environ.* 26 (2) (2018) 728–739.
- [134] S.R. Nadendla, T.S. Rani, P.R. Vaikuntapu, R.R. Maddu, A.R. Podile, HarpinPss encapsulation in chitosan nanoparticles for improved bioavailability and disease resistance in tomato, *Carbohydr. Polym.* 199 (2018) 11–19.
- [135] A. Kamari, S.N.M. Yusoff, N-octyl chitosan derivatives as amphiphilic carrier agents for herbicide formulations, *Open Chemistry* 17 (1) (2019) 365–380.
- [136] C.R. Maruyama, M. Guilger, M. Pascoli, N. Bilesby-José, P. Abhilash, L.F. Fraceto, R. De Lima, Nanoparticles based on chitosan as carriers for the combined herbicides imazapyr and imazapyr, *Sci. Rep.* 6 (2016), 19768.
- [137] R. Grillo, Z. Clemente, J.L. de Oliveira, E.V.R. Campos, V.C. Chaluppe, C.M. Jonsson, R. de Lima, G. Sanches, C.S. Nishisaka, A.H. Rosa, Chitosan nanoparticles loaded the herbicide paraquat: the influence of the aquatic humic substances on the colloidal stability and toxicity, *J. Hazard. Mater.* 286 (2015) 562–572.
- [138] Z. Yu, X. Sun, H. Song, W. Wang, Z. Ye, L. Shi, K. Ding, Glutathione-responsive carboxymethyl chitosan nanoparticles for controlled release of herbicides, *Mater. Sci. Appl.* 6 (6) (2015) 591.
- [139] Z. Ye, J. Guo, D. Wu, M. Tan, X. Xiong, Y. Yin, G. He, Photo-responsive shell cross-linked micelles based on carboxymethyl chitosan and their application in controlled release of pesticide, *Carbohydr. Polym.* 132 (2015) 520–528.
- [140] C. Xu, L. Cao, P. Zhao, Z. Zhou, C. Cao, F. Li, Q. Huang, Emulsion-based synchronous pesticide encapsulation and surface modification of mesoporous silica nanoparticles with carboxymethyl chitosan for controlled azoxystrobin release, *Chem. Eng. J.* 348 (2018) 244–254.
- [141] L. Cao, H. Zhang, C. Cao, J. Zhang, F. Li, Q. Huang, Quaternized chitosan-capped mesoporous silica nanoparticles as nanocarriers for controlled pesticide release, *Nanomaterials* 6 (7) (2016) 126.
- [142] C. Xu, L. Cao, P. Zhao, Z. Zhou, C. Cao, F. Zhu, F. Li, Q. Huang, Synthesis and characterization of stimuli-responsive poly (2-dimethylamino-ethylmethacrylate)-grafted chitosan microcapsule for controlled pyraclostrobin release, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (3) (2018) 854.
- [143] H. Yan, X. Chen, Y. Feng, F. Xiang, J. Li, Z. Shi, X. Wang, Q. Lin, Modification of montmorillonite by ball-milling method for immobilization and delivery of acetamiprid based on alginate/exfoliated montmorillonite nanocomposite, *Polym. Bull.* 73 (4) (2016) 1185–1206.
- [144] S. Kumar, N. Chauhan, M. Gopal, R. Kumar, N. Dilbaghi, Development and evaluation of alginate-chitosan nanocapsules for controlled release of acetamiprid, *Int. J. Biol. Macromol.* 81 (2015) 631–637.
- [145] N. Chauhan, N. Dilbaghi, M. Gopal, R. Kumar, K.-H. Kim, S. Kumar, Development of chitosan nanocapsules for the controlled release of hexaconazole, *Int. J. Biol. Macromol.* 97 (2017) 616–624.
- [146] T.J. Gutiérrez, Chitosan Applications for the Food Industry, Chitosan: Derivatives, Composites and Applications, Wiley-Scrivener Publisher, 2017 185–232.
- [147] J. Jeevanandam, A. Barhoum, Y.S. Chan, A. Dufresne, M.K. Danquah, Review on nanoparticles and nanostructured materials: history, sources, toxicity and regulations, *Beilstein journal of nanotechnology* 9 (1) (2018) 1050–1074.
- [148] N. Mitter, K. Hussey, Moving policy and regulation forward for nanotechnology applications in agriculture, *Nat. Nanotechnol.* 14 (6) (2019) 508–510.
- [149] M. Kah, N. Tufenkji, J.C. White, Nano-enabled strategies to enhance crop nutrition and protection, *Nat. Nanotechnol.* 14 (6) (2019) 532–540.



## Novel, multifunctional mucilage composite films incorporated with cellulose nanofibers



Muhammad Mujtaba<sup>a,\*</sup>, Lalehan Akyuz<sup>b</sup>, Behlul Koc<sup>d</sup>, Murat Kaya<sup>d</sup>, Sedef İlk<sup>f</sup>,  
Demet Cansaran-Duman<sup>a</sup>, Asier Salaberria Martinez<sup>e</sup>, Yavuz S. Cakmak<sup>d</sup>, Jalel Labidi<sup>e</sup>,  
Sami Boufi<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biotechnology, Ankara University, Ankara, 06110, Turkey

<sup>b</sup> Aksaray University, Technical Vocational School, Department of Chemistry Technology, 68100, Aksaray, Turkey

<sup>c</sup> University of Sfax, Faculty of Science, LMSE, BP 802, 3018, Sfax, Tunisia

<sup>d</sup> Department of Biotechnology and Molecular Biology, Faculty of Science and Letters, Aksaray University, 68100, Aksaray, Turkey

<sup>e</sup> Biorefinery Processes Research Group, Department of Chemical and Environmental Engineering, University of the Basque Country (UPV/EHU), Plaza Europa 1, 20018, Donostia-San Sebastian, Spain

<sup>f</sup> Central Laboratory Research Center, Ömer Halisdemir University, 51240, Niğde, Turkey

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Mucilage film

Physicochemical characterization

Biological assay

Mechanical properties

### ABSTRACT

In the current study, mucilage composite films were produced by incorporating the cellulose nanofibrils (CNF) at different concentrations i.e., 3 and 6% to chia mucilage matrix by solution casting method. To evaluate the effect of CNF incorporation into mucilage matrix, the obtained composite films were characterized extensively using both physicochemical and biological tools. FT-IR spectra confirmed the composite formation by broader –OH bond peaks than in the spectrum of mucilage control film and shift of C=O stretching vibration peak lower wave number and widen in the mucilage films including cellulose nanofibers. Cellulose nanofibers did not reveal a significant effect on the thermal properties of the all three composite films and dynamic thermogravimetric values were recorded as  $\approx 287^\circ\text{C}$ . Atomic force microscopy revealed a homogenous distribution of cellulose nanofibers across the mucilage matrix. Dynamic mechanical analysis revealed that the inclusion of cellulose nanofibers in mucilage film led to an enhancement of the tensile modulus as well as the tensile strength, but without reducing the strain at break of the film. Cellulose nanofibers incorporation significantly enhanced the hydrophobic properties of the composite films. The cytotoxicity assay results demonstrated mucilage composite films were nontoxic and have anticancer properties; reducing the viability of cancer cell line by  $\approx 20\%$  and retaining the cell viability of epithelial cell line by  $\approx 90\%$ . Cellulose nanofibers incorporation also significantly enhanced the antioxidant and antimicrobial attributes of the mucilage composite films. Overall, the current study provided an idea regarding the biocompatible, non-toxic, highly antioxidative and antimicrobial biodegradable nature of mucilage-CNf composite films, making it a suitable candidate for food and pharmaceutical industry.

### 1. Introduction

The search for biodegradable, eco-friendly, biocompatible and nontoxic biomaterials is in its full swing due to its esteem beneficial importance for human health as the plastic based synthetic polymers are an increasing danger to our health and ecosystem. In this regard, the production of alternative non-toxic bio-based edible films gained enormous attention in order to partly or entirely substitute the synthetic polymers, which will help in plummeting the environmental pollution triggered by plastics, enhancing the shelf life of foods and the growing

demand for healthier and ecological foods. The demand for plant-origin polymeric material has been increased by food, pharmaceutical, and cosmetic industries due to its practical applications as thickeners, emulsion stabilizers, hydrophilic, coating and suspending agents, binders and packaging films (Amine, Dreher, Helgason, & Tadros, 2014; Binks & Lumsdon, 2001; Habibi, Lucia, & Rojas, 2010; Kumar, Patil, Patil, & Paschapur, 2009; Lehmann, Volkert, Fischer, Schrader, & Nerenz, 2008; Sharmin, Zafar, Akram, & Ahmad, 2013; Sievens-Figueroa et al., 2012; Spence, Venditti, Rojas, Habibi, & Pawlak, 2010; Stewart, 2008; Tsujimoto, Uyama, & Kobayashi, 2003). Several

\* Corresponding author. Institute of Biotechnology, Ankara University, Ankara, 06110, Turkey.

E-mail addresses: [muhammadmujtaba443@gmail.com](mailto:muhammadmujtaba443@gmail.com), [mujtaba@ankara.edu.tr](mailto:mujtaba@ankara.edu.tr) (M. Mujtaba).

<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.10.021>

Received 1 August 2018; Received in revised form 12 October 2018; Accepted 13 October 2018

Available online 15 October 2018

0268-005X/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

ingredients such as proteins (McHugh & Krochta, 1994), lipids (Thakur et al., 2017), resins (mostly derived from plants and animals) (Chuaynukul, Prodpran, & Benjakul, 2015; Pereda, Marcovich, & Mosiewicki, 2015) and many polysaccharides such as chitosan (Kaya et al., 2018; Rubenstheren et al., 2016; Siripatrawan & Kaewklin, 2018), gelatin (Fakhouri, Martelli, Caon, Velasco, & Mei, 2015), and alginate (Zhan et al., 2016) have been investigated for the production of edible films. In addition, some seeds (chia, *Opuntia ficus-indica*, *Salvia hispanica*) when treated in suitable aqueous media, secrete a jelly substance known as mucilage. Mucilage has a transparent and film-forming texture containing high amounts of carbohydrate, protein and small amounts of oil as well as moisture and ash (Del-Valle, Hernández-Muñoz, Guarda, & Galotto, 2005; Medina-Torres, Brito-De La Fuente, Torrestiana-Sanchez, & Kattathin, 2000). Various plants seeds have been evaluated in terms of mucilage extraction including *Opuntia ficus indica* (Del-Valle et al., 2005), *Salvia hispanica* (Marianela I Capitani, Ixtaina, Nolasco, & Tomás, 2013), quince (Hemmati & Mohammadian, 2000), *Monostroma nitidum* (Tsai, Chiou, Huang, & Pan, 2000) and Okra (Ameena et al., 2010) etc.

Chia (*Salvia hispanica* L.) generally known as chia sage, chia, and Spanish sage has a worldwide importance due to its indispensable nutritional benefits (Mohd Ali et al., 2012). In the ancient times for Columbian and Mesoamericans, the chia seeds were a vital source of food, oil, and medicine (Reyes-Caudillo, Tecante, & Valdivia-López, 2008). Xylose, glucose, and methyl glucuronic acid are the main components of chia seed gum. Chia seeds have around 5–6% mucilage (Lin, Daniel, & Whistler, 1994). However, the films produced from mucilage films are brittle and exhibit poor mechanical properties (Dick et al., 2015). The inclusion of a plasticizer was necessary to enhance the ductility and processability of mucilage films. In addition to flexibility, boosting-up of mechanical properties is also required for the films produced by mucilage. For this purpose, the incorporation of various reinforcing materials such as nano-celluloses (Azeredo et al., 2010), graphene (Vadukumpully, Paul, Mahanta, & Valiyaveetil, 2011), carbon nanotube (Xu, Thwe, Shearwood, & Liao, 2002), cellulose nano-fibrils (Lee, Chun, Kang, & Park, 2009), starch nanocrystals (Kristo & Billaderis, 2007) can be suggested as suitable reinforcing agents.

CNFs are composed of nanosized thin flexible fibrils encompassing both crystalline and amorphous domains with a typical width in the range of 5–50 nm depending on the extent of fibers disintegration and length within the micron scale (Chinga-Carrasco, 2011). They are mainly obtained through intensive mechanical disintegration actions to break down the cell wall of the fibers into nanoscale (Kalia, Boufi, Celli, & Kango, 2014; Spence et al., 2010). Given the high intrinsic mechanical properties of CNFs with modulus and strength around 50–70 and 2–4 GPa, respectively, their high aspect ratio, high crystallinity, the inclusion of CNFs into a polymer matrix is known to bring about a strong reinforcing potential both in terms of stiffness and strength at a content lower than 10 wt% (Averous & Boquillon, 2004; Baati, Mabrouk, Magnin, & Boufi, 2018).

To the best of our knowledge, up to now, no study has been reported on the effect of the inclusion of CNFs on the physicochemical and biological properties of mucilage composite films. In the present work, mucilage nanocomposite films with different content of CNFs were produced by solvent casting of a mixture of mucilage solution and CNFs suspension in water. The nanocomposite films were analyzed in terms of their structural, morphology, mechanical and thermal properties and their antiproliferative, antibacterial and antioxidant.

## 2. Material methods

### 2.1. Materials

Commercial bleached Eucalyptus pulp (*Eucalyptus globulus*) in the dry form, was used as starting material for the preparation of cellulose nanofibrils. 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical (TEMPO),

sodium bromide (NaBr), sodium hypochlorite solution (NaClO), sodium chlorite (NaClO<sub>2</sub>) were purchased from Sigma-Aldrich and used as received without further purification. For mucilage production, 100 g of chia seeds, bought from a commercial market, were used. Glycerol was purchased from Sigma-Aldrich, USA which was used as a plasticizer in the composite films. Distilled water was used during all the experiments.

### 2.2. TEMPO-mediated oxidation

The TEMPO-mediated oxidation has been carried out at pH 10 following the method reported in our previous work (Besbes, Alila, & Boufi, 2011). In brief, 30 mg of TEMPO and 250 mg of NaBr were added to 2 g of pulp in water at 2% consistency. Then, 50 mL of a NaClO solution (4 wt %) was added dropwise to the suspension kept at a temperature of around 5 °C. The NaOH solution (0.1 M) was added intermittently to maintain the pH around 10. The oxidized fibers were recovered by filtration and washed with water three times. The carboxyl content of the fibers determined by conductimetric titration was around 500 µmol/g.

### 2.3. Production of CNFs via high-pressure homogenizer

The oxidized fibers were disintegrated within a high-pressure homogenizer (HPH) from GEA (NS1001L PANDA 2 K-GEA, Italy) at a pressure of 300 bar until the formation of a strong gel and pursued with additional two passes at 600 bar to further enhance the break down of the cell wall of fibers.

### 2.4. Mucilage extraction

Chia mucilage was prepared by the hydration process. Briefly, 100 g of chia seeds were washed and soaked in 500 ml distilled water-filled beaker for 24 h. During the night the seeds which released the mucilage were separated from the seeds by filtration through a cheesecloth. The obtained mucilaginous solution was stored at 4 °C until next experiments. Around 70 ml of mucilage solution is required to prepare a mucilage film around. To calculate the concentration of mucilage content in the water-rich film solution, 70 ml of mucilage solution was weighed and recorded as 67.13 g. Then this solution was oven dried at 85 °C for 48 h to remove all the water content. Then the dried sample was weighed again and recorded as 0.412 g. Finally, the mucilage concentration was determined as 0.613% using the following formula.

$$\% W = [\text{weight loss} / \text{initial weight}] \times 100$$

### 2.5. Composite film preparation

In the current experiment, three different mucilage composite films were produced. The film solution was formed by mixing 70 ml of mucilage and 50% of glycerol; added with respect to total weight of mucilage as a plasticizer. The glycerol concentration was decided by following the previous literature reports by Dick et al. (2015), where they checked three different concentrations from 25 to 75%. Each film solution was homogenized using a homogenizer (Heidolph, SilentCrusher M) for 20 min. CNFs were incorporated to mucilage matrix and percentages of CNF in the prepared blend films were calculated as 3% (2 g) and 6% (4 g). One of the three produced mucilage films was prepared as a mucilage control film without any cellulose nanofibrils (CNF). In order to obtain a homogenized film with CNF, all the film solutions were homogenized at 26,000 rpm using a homogenizer (Heidolph, SilentCrusher M) for 10 min. Mucilage mixtures were decanted into plastic Petri dishes and allowed to dry at 30 °C for 48 h. Mucilage control film without CNF was coded as mucilage-control. The blend films with 2 g and 4 g of CNF were coded as mucilage-CNF 3% and

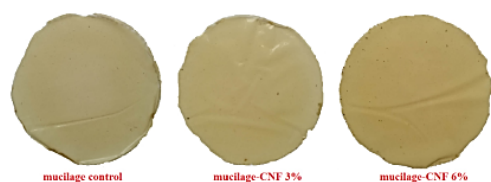


Fig. 1. Digital images of mucilage-CNF composite films.

mucilage-CNF 6%, respectively. The resulting composite films are presented in Fig. 1. The film thickness of each film was measured by a digital micrometer (Mitutoyo, China).

## 2.6. Physicochemical characterization

### 2.6.1. Attenuated total reflectance infrared spectroscopy (ATR/FT-IR)

ATR/FT-IR of mucilage control, mucilage-CNF 3% and mucilage-CNF 6% composite films were measured via Perkin-Elmer ATR FT-IR spectrometer at a resolution of  $8\text{ cm}^{-1}$  and in the range of  $600\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ .

### 2.6.2. Atomic force microscopy (AFM)

The morphology of the prepared films was evaluated through atomic force microscopy (AFM). The AFM measurements were performed in a Dimension 3100 NanoScope IV (Veeco, USA). The images were scanned in tapping mode under ambient conditions using silicon nitride cantilevers having a tip nominal radius of 10 nm.

### 2.6.3. Thermogravimetric analysis (TGA-DTG)

To evaluate the thermal stability of mucilage-CNF composite films, TGA-DTG analysis was performed according to ASTM E1131-08 (ASTM, 2008) using TGA/SDTA 851 Mettler Toledo instrument. For each analysis, 6 mg sample was used. All the film samples were heated at a constant rate of  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  from room temperature to  $900\text{ }^{\circ}\text{C}$  under a nitrogen atmosphere of  $20\text{ mL min}^{-1}$ .

### 2.6.4. Differential scanning microscopy (DSC)

The thermal properties of the mucilage composite films (mucilage-CNF 3%, mucilage-6%, and mucilage control) were determined by using Mettler Toledo DSC822e (Schwerzenbach, Switzerland). Briefly, 50 mg of each film sample was placed in the hermetic aluminum pan under  $\text{N}_2$  atmosphere and temperature range of  $-50$  to  $420\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The heating scan was performed at  $5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ .

### 2.6.5. Dynamic mechanical analysis

For the mucilage composite films (mucilage-CNF 3%, mucilage-CNF6%, and mucilage control) dynamic mechanical analysis (DMA) experiments were conducted in tension mode using a PYRIS Diamond DMA (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA). Temperature scans were run from  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  at a heating rate of  $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , a frequency of 1 Hz and an amplitude of  $10\text{ }\mu\text{m}$ . Sample dimensions were about 20 mm (length), 5 mm (width) and 40–50  $\mu\text{m}$  (thickness).

**2.6.5.1. Tensile tests.** The non-linear mechanical behavior of the films has been analyzed using an Instron testing machine in tensile mode, with a load cell of 100 N working at a strain rate of  $10\text{ mm/min}$  at  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The specimens have been obtained using a cutting device and each composition was analyzed in triplicate.

**2.6.5.2. Transparency measurement.** The transparency of mucilage composite films was measured at wavelengths from 200 to 800 nm using a UV-visible spectrometer (Lambda 35, Perkin-Elmer). The transmission spectra of the films were recorded using air as reference.

### 2.6.6. Optical properties

For mucilage-CNF composite films (mucilage-CNF 3%, mucilage-6%, and mucilage control), the light transmittance spectra were measured using a Shimadzu UV-3600 UV-VIS-NIR spectrophotometer. Spectra were recorded at room temperature in steps of 1 nm, in the 400–700 nm range.

### 2.6.7. Contact angle

This analysis gives information about the surface tension of the film. For mucilage samples (mucilage-CNF 3%, mucilage-CNF 6%, and mucilage control) the contact angle of the films was determined using Data Physics video-based contact angle measurement system OCA20.

### 2.6.8. Water solubility

A water solubility study was conducted to investigate the water solubility of film samples. For this study,  $2 \times 3\text{ cm}^2$  pieces of film samples were cut and the product was dried at  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the weight reached a constant weight. Then, 20 mL of water was added to the samples and stirred for 2 days at different time intervals. At the end of two days, the specimens were again dried to constant weight. The test was repeated three times and the % loss was determined by the following formula.

$$\% \text{ WL} = [\text{weight loss} / \text{initial weight}] \times 100$$

## 2.7. Biological characterization

### 2.7.1. MTT (3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide)-based anti-proliferative assay

**2.7.1.1. Maintenance of cell lines.** HepG2 liver cancer cell line and kidney normal Vero cell line were obtained from ATCC. Both cells were cultured in DMEM (PAA Laboratories, Austria) containing 10% FBS (Gemini Byproducts, Calabasas, CA), 2 mM L-glutamine and 1% penicillin-streptomycin and other necessary solutions. Cells were kept in a humidified incubator at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  with 5%  $\text{CO}_2$ .

**2.7.1.2. Cell viability assays.** HepG2 and Vero cells were plated into a 96-well culture plate at a density of  $1 \times 10^4$  cells per mL and incubated overnight at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . After 24 h incubation, the medium was aspirated out and the cells were treated by mucilage based CNF composite films as mucilage-CNF3% and mucilage-CNF6% at the concentration of 8 mg/mL for 24 and 48 h. DMEM was used as negative control. Cell viability was evaluated using the MTT reduction method with 20  $\mu\text{L}$  MTT reagent (the final concentration of 0.2 mg/mL) (Sigma-Aldrich) added to the cells for 4 h incubation. Insoluble formazan crystals were extracted from within the cells by 100  $\mu\text{L}$  DMSO, and the absorbance was measured using a microplate reader at 570 nm. Each experiment was performed in repeated three times with six replications at every concentration. The blank value was subtracted and the results are expressed as a percentage of the dye extracted from untreated control cells  $[(\text{OD value of treated cells}/\text{mean OD value of control cells}) - 100\%]$ .

### 2.7.2. Antimicrobial assay

**2.7.2.1. The examined microorganisms.** *Pseudomonas aeruginosa* (P. aeruginosa) ATCC 27,853, *Escherichia coli* (E. coli) ATCC 25,922, *Salmonella enterica* serotype typhimurium (S. typhimurium) SL 1344, *Staphylococcus aureus* (S. aureus) ATCC 25,923, *Streptococcus mutans* (S. mutans) ATCC 25,175, and *Bacillus thuringiensis* (B. thuringiensis) were used for the antimicrobial assay. Microorganisms were incubated on LB agar at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 24 h.

**2.7.2.2. Antimicrobial susceptibility test.** The antimicrobial test of prepared three films (mucilage-CNF 3%, mucilage-CNF 6% and mucilage control) against the above microorganisms was determined by disc-diffusion method (Kaya et al., 2018). For the assay, firstly, 0.5

McFarland was used as a reference turbidity for the concentration of bacteria culture in broth media. Then, filter discs (diameter: 6 mm) were maintained on the bacteria inoculated (100  $\mu$ L) Petri plate within Müller-Hinton agar. At the same time, the film samples were sterilized by ultraviolet light. Finally, the suspension of films was loaded on the sterile discs. Petri plates were kept at 37 °C for 24 h. The disc within the only solvent (distilled water) was used as a negative control. Gentamicin (10  $\mu$ g/disc) as the commercial antibiotic was used as positive control. Tests were done three times. The results were explained as the mean inhibition zone diameter in mm with the  $\pm$  standard deviation (mean  $\pm$  SD).

### 2.7.3. Antioxidant activity

**2.7.3.1. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) assay.** FRAP assay was applied for estimating the overall antioxidant ability of the mucilage composite films by following the method early described by Benzie and Strain (1996) after slight modifications. For the assay, TPTz, FeCl<sub>3</sub>, and buffer solutions were prepared at the following concentrations. For TPTz solution; 31.2 mg of TPTz was weighed and dissolved by adding 50  $\mu$ L of hydrochloric acid in 10 ml of distilled water. The FeCl<sub>3</sub> solution was prepared by dissolving 32 mg FeCl<sub>3</sub> in 10 ml distilled water. The buffer solution was obtained by adding 250 ml of distilled water to 4.1 ml of acetic acid (80%), followed by stirring until 0.66 g of sodium acetate was completely dissolved in this solution. Then, the solutions prepared are mixed in the ratios of 10:1:1 as a buffer, TPTz, and FeCl<sub>3</sub> respectively, to obtain a mix solution. The prepared solution was added (2 ml) to the film samples (10 mg, divided into small pieces) i.e. M-CNF 3%, M-CNF 6%, and mucilage control and incubated for 30 min at 30 °C. The absorbance was measured at 593 nm. The results are given as trolox equivalents. Different concentrations (25, 50, 75, 100, 150 and 200  $\mu$ g/ml) of the trolox solution were used as a standard and the antioxidant activities of the samples were given as Trolox Equivalent = TE by the calibration curve obtained therefrom.

**2.7.3.2. ABTS (2, 2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) assay.** ABTS assay was carried out to confirm the results of FRAP antioxidant assay. Briefly, 36 mg of ABTS and 6.62 mg of potassium magnesium sulfate were dissolved in 10 ml of water. The prepared solutions were mixed and allowed to incubate at room temperature for 12–16 h. Then this solution was diluted to have an absorbance of 1.5. Then, 1 ml of the radical solution was added to 5 mg of chitosan film samples. After 30 min at room temperature, the absorbances of the controls and composite film samples were measured at 734 nm. Results were calculated as trolox equivalents (TE  $\mu$ g/mg film).

## 3. Results and discussion

### 3.1. FT-IR

FT-IR spectra of mucilage-control film and mucilage-CNF blend films were recorded to compare the chemical changes in the film matrix and the spectra were shown in Fig. 2. The first spectrum belongs to the mucilage control film. In the previous study, de la Paz Salgado-Cruz et al. (2013) reported that chia seed oil contains hemicellulosic polysaccharides such as glucomannan, xylan, and arabinoxylan. The FT-IR analysis results of the current study supported by de la Paz Salgado-Cruz et al. (2013) results. The broad absorption peak at 3294  $\text{cm}^{-1}$  was ascribed to OH groups of hemicellulosic polysaccharides (Malekfar, Nikbakht, Abbasian, Sadeghi, & Mozaffari, 2010). C–H stretching band of polysaccharides was observed at 2924  $\text{cm}^{-1}$ . The previous study has shown that the protein content of chia seed mucilage was at about 18% (Capitani, Nolasco, & Tomás, 2016b). In the present study, the peaks recorded at 1643, 1545 and 1417  $\text{cm}^{-1}$  were in accordance with M. I. Capitani, Matus-Basto, et al. (2016a). These peaks correspond to the characteristic peaks of protein structures. The C=O stretching vibration of protein found in the mucilage film matrix was observed at

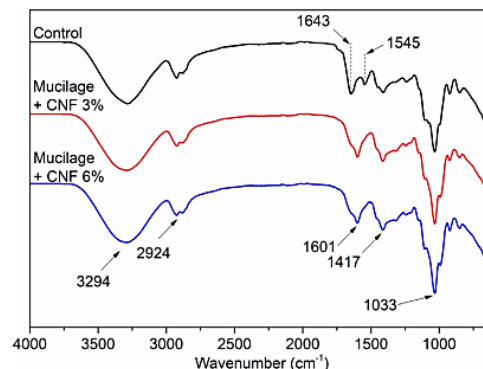


Fig. 2. FT-IR spectra of mucilage-CNF composite films.

1643  $\text{cm}^{-1}$ . Observed peaks at 1545 and 1417  $\text{cm}^{-1}$  were attributed to the bending vibration of N–H groups and the vibrations in the plane of C–N groups, respectively. The glycosidic linkage of hemicellulosic polysaccharides was recorded at 1033  $\text{cm}^{-1}$ . The second and third spectra found in Fig. 2 belong to the mucilage films containing CNF at 3% and 6% concentration respectively. As seen from the spectra, hydrogen bonds formed between mucilage compounds and CNF were resulted in broader –OH bond peak than in the spectrum of mucilage control film. Also, C=O stretching vibration peak shifted to the lower wave number and widen in the mucilage films included CNF. This may be due to the fact that, C=O groups of proteins found in the mucilage were affected by the hydrogen bonds, with the addition of the CNF into the film matrix.

### 3.2. AFM

The surface morphology of the prepared mucilage composite films incorporated with cellulose nanofibrils (mucilage-control, mucilage-CNF3%, and mucilage-CNF6%) was evaluated using atomic force microscopy (AFM) and the results are presented in Fig. 3. The mucilage-control film revealed a homogeneous surface structure indicating the homogenous distribution of mucilage fibers leading to homogeneous film formation (Fig. 3 a, d). For all the three mucilage composite films the root mean squared (RMS) roughness was evaluated over an area of 25  $\mu\text{m}^2$ . For mucilage-control films, the RMS was calculated as  $26.3 \pm 0.12$  nm. Mucilage-CNF3% film displayed an overall rough and homogenous surface along with CNF distributed across the film (Fig. 3b). The phase image also confirms the homogenous distribution

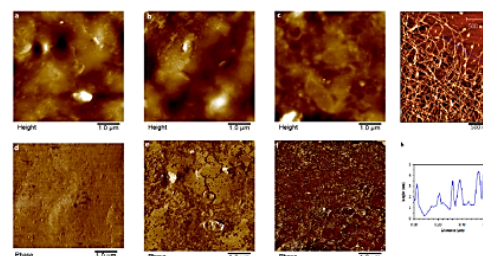


Fig. 3. Atomic force microscopy images of mucilage-CNF composite films; a, d) mucilage-control; b, e) mucilage-CNF3%; c, f) mucilage-CNF6%; g) topography images of CNFs used in the present work, h) the cross section profile analysis corresponding to the blue arrow.

of CNF across the film surface (Fig. 3e). The RMS for mucilage-CNF3% film was calculated as  $43.3 \pm 0.21$  nm, higher as compared to mucilage-control. This increase in RMS for mucilage-CNF3% can be ascribed to the incorporation of CNF into the mucilage matrix. For mucilage-CNF6%, a homogeneous surface structure was observed (Fig. 3c). The RMS value for mucilage-CNF6% was recorded as  $45.5 \pm 0.31$  nm. The phase AFM images of mucilage-CNF6% indicated the homogenous distribution of CNF across the composite film (Fig. 3f). In all the three films a few rough and rugged regions which be possibly due to the insoluble portion of the matrix (Sadeghi-Varkani, Emam-Djomeh, & Askari, 2018). Confirmation of the nanoscale of CNFs was given from AFM observation of a diluted suspension of CNFs gel, revealing long individual thin fibrils forming an entangled network. The width of CNFs estimated from the height profile was in the range of 3–4 nm and lengths in the micrometer range (Fig. 3g and h).

In some earlier studies, the Balangu seed mucilage films were also checked for its surface morphology through AFM and the authors observed comparatively smoother (RMS 8.38 nm) and homogenous film surfaces (Sadeghi-Varkani et al., 2018). The smoothness here can be ascribed to two main factors i.e., 1) the absence of any composite ingredients inside the mucilage matrix and 2) the type of mucilage (structural properties). de la Paz Salgado-Cruz et al. (2013) reported the average fiber size of chia mucilage ranging between 15 and 45 nm close to that of the cellulose. Also in the same study, the authors reported the average roughness ( $R_a$ ) for chia mucilage as  $32.42 \pm 3.4$  nm (Scan area  $2.5 \times 2.5 \mu\text{m}$ ).

### 3.3. TGA

Thermal stability of bio-based composite films is important for its use and processability whenever melt mixing is considered. The thermal stability of the mucilage composite films was evaluated using thermogravimetric analysis and the results are given in Fig. 4. The TGA thermograms of mucilage composite films (mucilage-control, mucilage-CNF3%, and mucilage-CNF6%) revealed three main degradation peaks. For mucilage-control, mucilage-CNF3% and mucilage-CNF6% films the first weight loss was observed as 5.32%, 6.49% and 6.60% at the temperature range of 43 °C, 47 °C, and 45 °C respectively. This degradation can be ascribed to the evaporation of the total absorbed moisture content from the polymeric structure (Sadeghi-Varkani et al., 2018). The second weight loss was recorded as 40.75%, 26.29%, 38.87% at the temperature range of 186 °C, 189 °C and 186 °C respectively. This second weight loss of the mucilage composite films was assigned to the evaporation of glycerol used as a plasticizer for mucilage film formation. For all the two composite films and one control, the  $dT_{G_{max}}$  was recorded at 287 °C, 287 °C, and 287 °C. These results

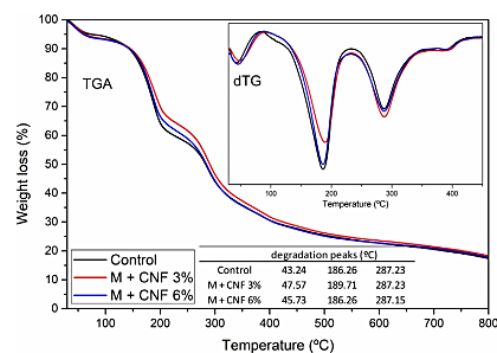


Fig. 4. TGA and dTG curves of mucilage-CNF composite films.

demonstrate that the incorporation of CNF fiber did not have any significant effect over the thermal behavior of composite chia mucilage films. Additionally, for all the film the weight residue is stabilized around 19–18%, corresponding to the ash revealed as revealed some residual mass loss at 600 °C around 19–18% corresponding to the ash content of the film. The gradual decline in the residual mass loss confirms the interaction between the CNF fibers and chia mucilage. Overall it can conclude the mucilage films revealed good thermal properties which can be helpful in its food packaging applications.

The shape, as well as the position of the different thermal decomposition temperature, are in agreement with those reported by Dick et al. (2015) i.e., the  $dT_{G_{max}}$  around 276–280 °C. M. Capitani et al., (2016a,b) also recorded the  $dT_{G_{max}}$  around 250 °C when *Salvia hispanica* L. mucilage was blended with essential oil. The results of the current study were observed in close accordance with previous literature reports.

### 3.4. DSC

The thermal behavior of the control and CNF incorporated mucilage films was investigated using DSC. The DSC thermograms of the mucilage film with different concentrations are shown in Fig. 5. Two endothermic peaks were observed for all the composite film samples. The first peak observed at nearly 80 °C was attributed to the evaporation of absorbed water and volatile compounds found in the film matrix. The second endothermic peak corresponds to the degradation of the polymeric matrix and to the evaporation of added glycerol of the films.  $T_d$  value was determined as 230.44 °C for the control film.  $T_d$  values of mucilage film including 3% and 6% CNF were lower than that of control film. Also, the degradation temperature of mucilage films was decreased with the increasing concentrations of the CNF. The decrease of

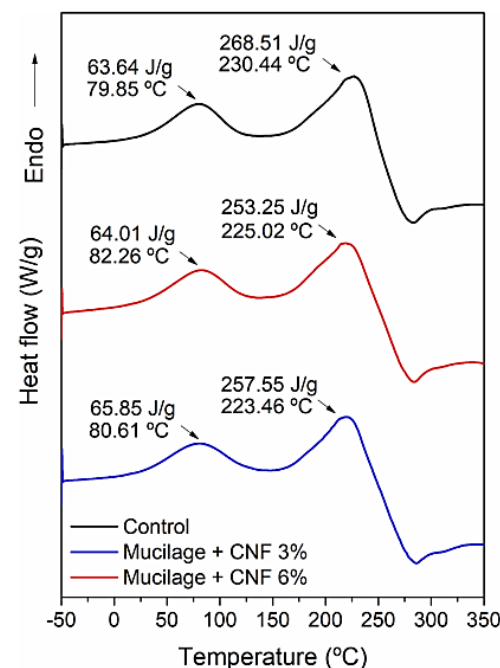


Fig. 5. DSC curves of mucilage-CNF composite films.

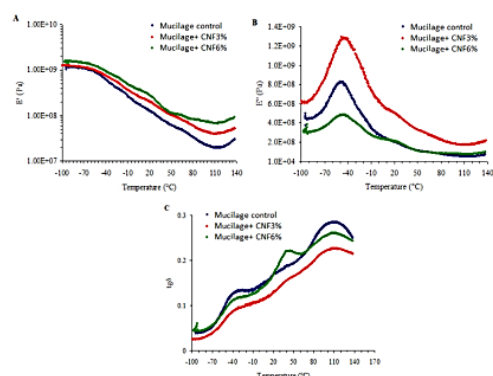


Fig. 6. DMA analysis of mucilage-CNF composite films: a) storage modulus, b) loss modulus, and c)  $\tan \delta$  versus temperature.

the  $T_d$  value can suggest that the incorporated CNF caused the re-arrangement of the polymeric chains, via the interaction between CNF and polymers found in the mucilage film. Dick et al. (2015) reported that the decomposition process of the polysaccharides occurred above 240 °C. In the present study, the DSC analysis results were in agreement with the results reported by Dick et al. (2015).

### 3.5. Mechanical properties of mucilage films

DMA analysis was also carried out to investigate the mechanical behavior of mucilage films and their microstructure. The temperature dependence of the storage tensile modulus ( $E'$ ), loss modulus ( $E''$ ) and the damping  $\tan \delta$  as a function of temperature at 1 Hz  $f$  are shown in Fig. 6. These parameters measure the stiffness of the material, the energy dissipation and the ratio of  $E''/E'$  respectively.

$E''$  showed a net maximum with a high magnitude around -40 °C and second maximum appearing as a hump around 20 °C. These transitions give rise equally to a maximum in the  $\tan \delta$  trace and were accompanied by a two-decade drop in the storage modulus. The presence of these two transitions indicates that mucilage plasticized by glycerol and water did not form a homogeneous phase and partial segregation with different composition in plasticizer occurred during the drying of the film. The first transition presumably corresponds to the relaxation of the phase rich in glycerol while the second might be attributed to the relaxation of the plasticized mucilage phase (Averous & Boquillon, 2004). Mucilage like other polysaccharides is a hard and brittle polymer and should be plasticized with glycerol or another polyol to increase its flexibility and workability in the form of edible films (Dick et al., 2015). However, the presence of two relaxations peak in  $E''$  and  $\tan \delta$  traces are indicative of a lack of total miscibility between mucilage and glycerol.

In mucilage films containing 3 and 6% of CNFs, an upward shift of  $E'$  was observed, indicating an increase in the stiffness both in the glass as well as in the rubbery domain which is consistent with the reinforcing effect of the CNFs. At 20 °C, an increment in the storage modulus about 1.8 and 2.7 with respect to the neat mucilage film was observed at a CNFs loading of 3 and 6 wt%, respectively. However, this reinforcing effect is modest for CNF in comparison with other nanocomposite based on a ductile matrix. Two possible hypotheses might explain the unusual low reinforcing effect of CNF in mucilage film; (i) the first hypothesis might be the aggregation of CNF when mixed with mucilage, and (ii) the second one could be the high level of the water content of mucilage film. The first hypothesis is ruled out considering the moderate reduction in the transparency of the film as confirmed by

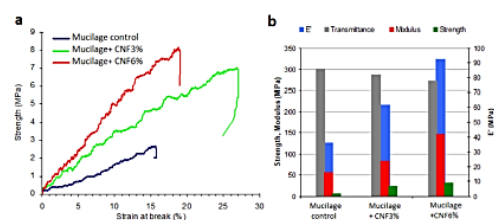


Fig. 7. a) stress-strain trace of mucilage film with different content in CNF, and b) mechanical data from a tensile test (modulus and strength) and DMA ( $E'$  and  $E''$ ) of the mucilage films.

transmittance measurement. Indeed, the transmittance of the neat matrix at 700 nm was 85% and goes to 80 and 76 for nanocomposite film with 3 and 6% CNF loading, respectively. This moderate reduction in the transmittance is within the level observed in another nanocomposite film with good dispersion of the CNF in the matrix (Boufi & Gandini, 2015). The presence of a relatively high amount of absorbed water (around 30%) in the film is a more privileged hypothesis. Indeed, if we assume that the strong reinforcing potential of CNF, when included in a ductile polymer matrix, is driven by hydrogen bonding holding the connected area of the entangled network of the CNFs, then the presence of 30% of water within the polymer matrix will inevitably reduce the strength of the hydrogen bonding by hiding the direct connection between the nanofibrils.

The mechanical properties of the nanocomposites have been also studied under non-linear condition using tensile test. This analysis is very useful to access how the inclusion of CNFs is likely to affect the mechanical strength of the nanocomposite under the non-linear domain, which is more realistic to simulate the real condition of use of the film. The tensile-strain traces of the neat mucilage and mucilage-CNFs films and the whole mechanical data at 20 °C are shown in Fig. 7a and b. The inclusion of CNFs in mucilage film led to an enhancement of the tensile modulus as well as the tensile strength, but without reducing the strain at break of the film.

### 3.6. UV-VIS and visual transparency

The optical transmittance of mucilage-control, mucilage-CNF3%, and mucilage-CNF6% was measured at a wavelength of 400–700 nm and the results are shown in Fig. 8. For mucilage-control, the maximum transmittance ( $T_r$ ) was observed as 66%. The incorporation of CNF at different concentration decreases the overall  $T_r$  of composite films. For mucilage-CNF3% the  $T_r$  was recorded as 58% and for mucilage-CNF6%,

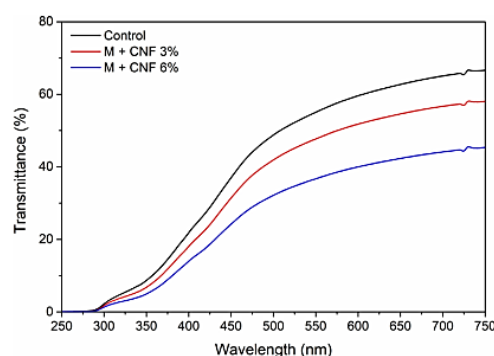


Fig. 8. UV-vis analysis of mucilage-CNF composite films.

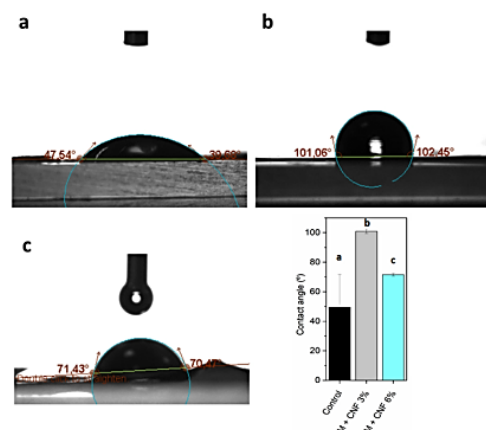


Fig. 9. Contact angle measurements of mucilage-CNF composite films; a) mucilage-control, b) mucilage-CNF3%, c) mucilage-CNF6%.

the  $T_r$  was 45%. Although a significant decrease in film's transmittance was observed in composite films, the visual aspect was still up to the acceptable level. The gradual decline in the  $T_r$  is expected in nanocomposite based on nanocellulose and was attributed to the inevitable occurrence of partial aggregation during the water removal process (Boufi, Kaddami, & Dufresne, 2014). In previous studies when cellulose (nanofiber, nanowhiskers) was composited to the bio-based films a significant decrease was recorded in  $T_r$  of the films. Li, Zhou, and Zhang (2009) recorded a 60% decrease in  $T_r$  when cellulose nanowhiskers were blended into the chitosan matrix. Hu, Wang, and Wang (2016) recorded a significant decline in  $T_r$  % for chitosan films blended with carboxymethyl cellulose. Azeredo et al. (2010) shown 80% reduction in  $T_r$  % of chitosan films incorporated with 10% bacterial cellulose. Mujtaba et al. (2017) showed a significant decrease from 87 to 14% in  $T_r$  of the chitosan composite films with cellulose nanocrystals. The results of the current research were found in accordance with the previous literature (See Fig. 9).

### 3.7. Contact angle

In order to determine the hydrophobic character of the mucilage films, contact angle values were calculated for all of the film samples. The contact angle of control films was found to be 47°. This value revealed that mucilage-control film had a hydrophilic nature. However, the contact angle value significantly increased to the 101° with the addition of CNF 3% into the mucilage film matrix. This means that the mucilage films had acquired a hydrophobic character with the addition of CNF. This could be attributed to a strong interaction between CNF and polymeric structures found in the mucilage film matrix. On the other hand, the contact angle of mucilage film containing 6% CNF was lower (71°) than the mucilage film including 3% CNF. However, at 6% CNF content, the contact angle decreased to about 71°, indicating a hydrophilic film. This evolution in the contact angle of the composite films with the inclusion of CNFs is unusual and has not been reported for other nanocomposites based on CNF and water-soluble matrix. A possible explanation of this phenomenon might be the migration to the surface of hydrophobic species already present in mucilage that are released when CNFs were added. Further, the excess of CNF reduced the interaction between polymer chains in the film matrix. Also the CNF having numerous  $-OH$  functional groups can cause the plasticizing effect in the film. A previous study reported the same phenomena that

when 15% of glycerol was added as a plasticizer into the chitosan film; firstly contact angle increased; however, with further increase in glycerol concentration the contact angle decreased due to the hydrophilic character of the plasticizer (Leceta, Guerrero, & de la Caba, 2013).

### 3.8. Water solubility

To evaluate the solubility effect of mucilage composite films in water, the films samples were kept and agitated in water for 48 h. The mass loss of the mucilage control, mucilage-CNF3% and mucilage-CNF6% of films was determined to be around 86%, 73%, and 71%, respectively. According to the results, CNFs added at different loadings reduced the water solubility of the films. This slight reduction in water solubility could be attributed to the strong interaction between CNFs and mucilage polymer as has been highlighted by FTIR analysis. These mucilage films with a high rate of solubility can be desirable for food coating applications where it can be removed from food easily after washing.

### 3.9. Film thickness

The film thickness of mucilage based CNF composite films was measured as  $40.2 \pm 3.12 \mu\text{m}$  for mucilage control,  $46.21 \pm 4.12 \mu\text{m}$  for mucilage-CNF 3% and  $51.31 \pm 3.24 \mu\text{m}$  for mucilage-CNF 6%. As it was expected, the addition of CNF gradually increases the thickness of mucilage composite films with increasing content of CNF. The present result was observed to be in accordance with previous literature reports regarding composite films (Akyuz et al., 2018; Mujtaba et al., 2017).

### 3.10. Cytotoxicity assay

#### 3.10.1. Anti-proliferative activities

MTT test was used to determine the toxicity and anti-proliferative activity of mucilage-CNF composite films on HepG2 and Vero cell lines. According to these results, after treating with mucilage-CNFs composite film samples, the overall viability of HepG2 cell lines significantly decreased by  $\approx 20\%$  ( $p < 0.05$ ) (Fig. 10). The present study showed that

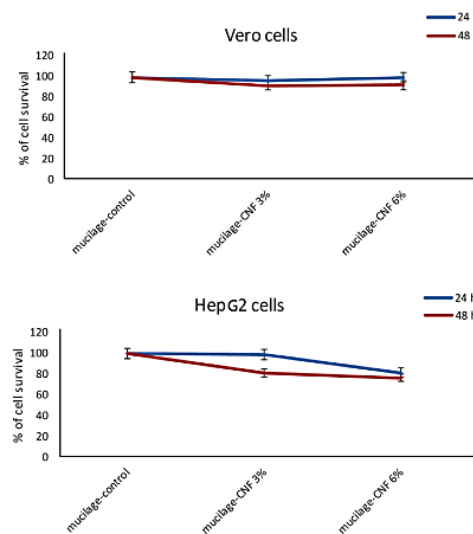


Fig. 10. MTT assay of mucilage-CNF composite films.

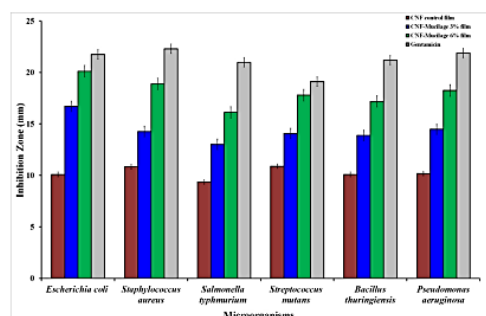


Fig. 11. Inhibition zone (mm) of disc diffusion test of mucilage-CNF composite films.

at 48 h. the mucilage-CNF6% significantly inhibited the proliferative activity of HepG2 cancer cell lines. These results revealed the anticancer properties of the mucilage composited with CNF at different concentrations. On the other hand, a small reduction ( $\approx 10\%$ ) in cell viability resulted from the application of the mucilage-CNF 3% on epithelial Vero cell line at 24 and 48 h treatments (Fig. 10). From current MTT results, it was revealed that mucilage-CNF composite films inhibited the proliferation of cancer cell (HepG2) lines but had a very little inhibiting effect on non-cancerous kidney epithelial cell line (Vero). The less toxicity towards non-cancerous epithelial cell demonstrated that mucilage-CNF composite films could be a better therapeutic advantage for control and targeted drug delivery. Previous literature reports regarding anti-proliferative assays of different mucilage revealed nearly the same results for different cell line i.e., Chatchawal, Nualkaew, Preeprame, Porasuphatana, and Priprame (2010) reported mild toxicity by *Basella* mucilage to Chang liver cell (84.4% cell viability at a concentration of 2 mg/ml).

### 3.11. Antimicrobial assay

The inhibition zone diameters for the antimicrobial activity of the tested films are presented in Fig. 11. Mucilage based CNF composite films presented enhanced antimicrobial activity with increasing content of CNF (3–6%). Mucilage films with 6% of CNF has the highest effective property against all of the examined microorganisms with the values of inhibition zones range of  $16.12 \pm 0.62$  mm (*S. typhimurium*),  $17.19 \pm 0.68$  mm (*B. thuringiensis*),  $17.79 \pm 0.56$  mm (*S. mutans*),  $18.25 \pm 0.71$  mm (*P. aeruginosa*),  $18.89 \pm 0.72$  mm (*S. aureus*) and  $20.17 \pm 0.84$  mm (*E. coli*). In all test, negative control showed no activity. Interestingly, the antimicrobial activity of mucilage-CNF6% film indicated almost near inhibition zone diameter compared to common antibiotic gentamicin (ranged from  $19.12 \pm 0.81$  to  $22.29 \pm 0.84$  mm) against all of the tested microorganisms. This might correspond to the incorporation of CNF into mucilage composite film which enhances its releasing behavior and solubility which leads improved antimicrobial activity against microorganisms.

From this result, it was obtained that mucilage-CNF composite films could be referred to as a new generation, robust and non-toxic bioactive materials. Generally, the functionality of antimicrobial film for food packaging can be estimated by the extent of microorganism growth inhibition. Given the biodegradable and non-toxicity of CNFs (Catalán & Norppa, 2017) the mucilage/CNFs composite can be a potential candidate for active food packaging. Though, more work is needed to further improve the mechanical properties and reduce water sensitivity, for the concern of food protection and environmental problems.

Table 1  
Antioxidant activities of mucilage blend films by FRAP and ABTS assays.

| Mucilage films  | FRAP<br>TE <sup>a</sup> (mg/g) | ABTS<br>TE <sup>a</sup> (μg/mg) |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Control Film    | 77.44 ± 3.49                   | 58.78 ± 4.96                    |
| Mucilage-CNF 3% | 190.61 ± 6.18                  | 204.97 ± 2.36                   |
| Mucilage-CNF 6% | 226.71 ± 5.85                  | 214.17 ± 0.56                   |

<sup>a</sup> TE = Trolox Equivalent.

### 3.12. Antioxidant activity

#### 3.12.1. FRAP assay

FRAP test was used to determine the antioxidant activity of the mucilage based composite films (mucilage-CNF 3%, mucilage-CNF 6% and mucilage control). As a result of the applied method, 77.44 mg TE/g extract activity was observed in the control film. A notable increase was observed for the mucilage films containing CNF at different concentrations i.e., 3% and 6%. This ratio is 19.61 mg TE/g extract in CNF 3% and 226.71 mg TE/g extract in CNF 6%. Considering these results it can be said that the incorporation of CNF nanofibrils to mucilage based composite films enhanced its antioxidant activity almost three-fold compared to control. Ferreira, Nunes, Castro, Ferreira, and Coimbra (2014) compared antioxidant activities of chitosan-based films by incorporating grape extracts (aqueous, wax and seed oil) at different ratios. In the FRAP test results, the authors found that the antioxidant activity in the samples except the oil samples revealed an increased compared to the control of chitosan films.

#### 3.12.2. ABTS assay

The radical removal activities of the produced films were determined by the ABTS method and the results were given in Table 1. According to the results, in the mucilage-CNF-3 and mucilage-CNF-6 films, radical removal activities increased compared to control. This increase was directly proportional to the added cellulose nano fiber. The results are also consistent with the FRAP test.

### 4. Conclusion

In the current study, we designed mucilage-CNFs composite films (mucilage-control, mucilage-CNF3%, and mucilage-CNF6%) and extensively evaluated the produced films both physicochemically and biologically. Results revealed that CNFs incorporation successfully enhances the mechanical, hydrophobic, antioxidant and antimicrobial properties of the mucilage composite films. Additionally MTT assay demonstrated the produced films as non-toxic with some additional therapeutics properties. This successfully provides a thorough insight into the mucilage film alone and its composite form with CNFs. Considering the results obtained in this study it can be stated that mucilage is a suitable matrix for the production of different kinds of composite films for a verity of applications such as medical uses. However, more work is needed to improve the mechanical properties of the film, reduced water sensitivity.

### References

- Akyuz, L., Kaya, M., Mujtaba, M., Ilk, S., Sargin, I., Salaberria, A. M., et al. (2018). Supplementing capsaicin with chitosan-based films enhanced the anti-quorum sensing, antimicrobial, antioxidant, transparency, elasticity and hydrophobicity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 115, 438–446.
- Ameena, K., Dilip, C., Saraswathi, R., Krishnan, P., Sankar, C., & Simi, S. (2010). Isolation of the mucilages from *Hibiscus rosasinensis* linn. and *Okra* (*Abelmoschus esculentus* linn.) and studies of the binding effects of the mucilages. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3(7), 539–543.
- Amine, C., Dreher, J., Helgason, T., & Tadros, T. (2014). Investigation of emulsifying properties and emulsion stability of plant and milk proteins using interfacial tension and interfacial elasticity. *Food Hydrocolloids*, 39, 180–186.
- ASTM E1131-08 (2008). *Standard test method for compositional analysis by*

- thermogravimetry. West Conshohocken, PA: ASTM International.
- Averous, L., & Boquillon, N. (2004). Biocomposites based on plasticized starch: Thermal and mechanical behaviours. *Carbohydrate Polymers*, 56(2), 111–122.
- Azaredo, H. M., Mattoso, L. H. C., Avena-Bustillos, R. J., Filho, G. C., Munford, M. L., Wood, D., et al. (2010). Nanocellulose reinforced chitosan composite films as affected by nanofiller loading and plasticizer content. *Journal of Food Science*, 75(1), N1–N7.
- Baati, R., Mabrouk, A. B., Magnin, A., & Boufi, S. (2018). CNFs from twin screw extrusion and high pressure homogenization: A comparative study. *Carbohydrate Polymers*, 195, 321–328.
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76.
- Besbes, I., Alila, S., & Boufi, S. (2011). Nanofibrillated cellulose from TEMPO-oxidized eucalyptus fibres: Effect of the carboxyl content. *Carbohydrate Polymers*, 84(3), 975–983.
- Binks, B., & Lumsdon, S. (2001). Pickering emulsions stabilized by monodisperse latex particles: Effects of particle size. *Langmuir*, 17(15), 4540–4547.
- Boufi, S., & Gandini, A. (2015). Triticale crop residue: A cheap material for high performance nanofibrillated cellulose. *RSC Advances*, 5(5), 3141–3151.
- Boufi, S., Kaddami, H., & Dufresne, A. (2014). Mechanical performance and transparency of nanocellulose reinforced polymer nanocomposites. *Macromolecular Materials and Engineering*, 299(5), 560–568.
- Capitani, M. I., Ixtaina, V. Y., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2013). Microstructure, chemical composition and mucilage exudation of chia (*Salvia hispanica* L.) nutlets from Argentina. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(15), 3856–3862.
- Capitani, M., Mattus-Basto, A., Ruiz-Ruiz, J., Santiago-García, J., Betancur-Ancona, D., Nolasco, S., et al. (2016a). Characterization of biodegradable films based on *Salvia hispanica* L. protein and mucilage. *Food and Bioprocess Technology*, 9(8), 1276–1286.
- Capitani, M. I., Nolasco, S. M., & Tomás, M. C. (2016b). Stability of oil-in-water (O/W) emulsions with chia (*Salvia hispanica* L.) mucilage. *Food Hydrocolloids*, 61, 537–546.
- Catalán, J., & Norrpa, H. (2017). Safety aspects of bio-based nanomaterials. *Bioengineering*, 4(4), 94.
- Chatchawal, C., Nualkaew, N., Preeprame, S., Porasuphatana, S., & Priprame, A. (2010). Physical and biological properties of mucilage from *Basella alba* L. stem and its gel formulation. *IJPS*, 6(3), 104–112.
- Chinga-Carrasco, G. (2011). Cellulose fibres, nanofibrils and microfibrils: The morphological sequence of MFC components from a plant physiology and fibre technology point of view. *Nanoscale research letters*, 6(1), 417.
- Chuaiyukul, K., Prodpran, T., & Benjakul, S. (2015). Properties of thermo-compression molded bovine and fish gelatin films as influenced by resin preparation condition. *International Food Research Journal*, 22(3).
- Del-Valle, V., Hernández-Muñoz, P., Guarda, A., & Galotto, M. (2005). Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. *Food Chemistry*, 91(4), 751–756.
- Dick, M., Costa, T. M. H., Gomaa, A., Subirade, M., de Oliveira Rios, A., & Flôres, S. H. (2015). Edible film production from chia seed mucilage: Effect of glycerol concentration on its physicochemical and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers*, 130, 198–205.
- Fakhouri, F. M., Martelli, S. M., Caon, T., Velasco, J. I., & Mei, L. H. I. (2015). Edible films and coatings based on starch/gelatin: Film properties and effect of coatings on quality of refrigerated Red Crimson grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 109, 57–64.
- Ferreira, A. S., Nunes, C., Castro, A., Ferreira, P., & Coimbra, M. A. (2014). Influence of grape pomace extract incorporation on chitosan films properties. *Carbohydrate Polymers*, 113, 490–499.
- Habibi, Y., Lucia, L. A., & Rojas, O. J. (2010). Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. *Chemical Reviews*, 110(6), 3479–3500.
- Hemmati, A. A., & Mohammadian, F. (2000). An investigation into the effects of mucilage of quince seeds on wound healing in rabbit. *Journal of Herbs, Spices, & Medicinal Plants*, 7(4), 41–46.
- Hu, D., Wang, H., & Wang, L. (2016). Physical properties and antibacterial activity of quaternized chitosan/carboxymethyl cellulose blend films. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 398–405.
- Kalia, S., Boufi, S., Celli, A., & Kango, S. (2014). Nanofibrillated cellulose: Surface modification and potential applications. *Colloid & Polymer Science*, 292(1), 5–31.
- Kaya, M., Ravikumar, P., Ilk, S., Mujtaba, M., Akyuz, L., Labidi, J., et al. (2018). Production and characterization of chitosan based edible films from *Berberis crataegina* fruit extract and seed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 45, 287–297.
- Kristo, E., & Billaderis, C. G. (2007). Physical properties of starch nanocrystal-reinforced pullulan films. *Carbohydrate Polymers*, 68(1), 146–158.
- Kumar, R., Patil, M., Patil, S. R., & Paschapur, M. S. (2009). Evaluation of *Abelmoschus esculentus* mucilage as suspending agent in paracetamol suspension. *International Journal of PharmTech Research*, 1(3), 658–665.
- Lee, S.-Y., Guerrero, P., & de la Caba, K. (2013). Functional properties of chitosan-based films. *Carbohydrate Polymers*, 92(1), 339–346.
- Lee, S.-Y., Chun, S.-J., Kang, I.-A., & Park, J.-Y. (2009). Preparation of cellulose nanofibrils by high-pressure homogenizer and cellulose-based composite films. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 15(1), 50–55.
- Lehmann, A., Volkert, B., Fischer, S., Schrader, A., & Nerenz, H. (2008). Starch based thickening agents for personal care and surfactant systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 331(1–2), 150–154.
- Lin, K.-Y., Daniel, J. R., & Whistler, R. L. (1994). Structure of chia seed polysaccharide exudate. *Carbohydrate Polymers*, 23(1), 13–18.
- Li, Q., Zhou, J., & Zhang, L. (2009). Structure and properties of the nanocomposite films of chitosan reinforced with cellulose whiskers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 47(11), 1069–1077.
- Malekfar, R., Nikbakht, A., Abbasian, S., Sadeghi, F., & Mozaffari, M. (2010). Evaluation of tomato juice quality using surface enhanced Raman spectroscopy. *Acta Physica Polonica A*, 117(6), 971–973.
- McHugh, T. H., & Krochta, J. M. (1994). Sorbitol-vs glycerol-plasticized whey protein edible films: Integrated oxygen permeability and tensile property evaluation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(4), 841–845.
- Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Torrestiana-Sánchez, B., & Kalthain, R. (2000). Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocolloids*, 14(5), 417–424.
- Mohd Ali, N., Yeap, S. K., Ho, W. Y., Beh, B. K., Tan, S. W., & Tan, S. G. (2012). The promising future of chia. *Salvia hispanica* L. *BioMed Research International*, 2(12), 171956.
- Mujtaba, M., Salaberria, A. M., Andres, M. A., Kaya, M., Gunyakti, A., & Labidi, J. (2017). Utilization of flax (*Linum usitatissimum*) cellulose nanocrystals as reinforcing material for chitosan films. *International Journal of Biological Macromolecules*, 104, 944–952.
- de la Paz Salgado-Cruz, M., Calderón-Domínguez, G., Chanona-Pérez, J., Ferrera-Rebollo, R. R., Méndez-Méndez, J. V., & Díaz-Ramírez, M. (2013). Chia (*Salvia hispanica* L.) seed mucilage release characterisation. A microstructural and image analysis study. *Industrial Crops and Products*, 51, 453–462.
- Pereda, M., Marcovich, N. E., & Mosiewicki, M. A. (2015). Sodium caseinate films containing linseed oil resin as oily modifier. *Food Hydrocolloids*, 44, 407–415.
- Reyes-Caudillo, E., Tecante, A., & Valdivia-López, M. (2008). Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in Mexican chia (*Salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chemistry*, 107(2), 656–663.
- Rubenthren, V., Ward, T. A., Chee, C. Y., Nair, P., Salami, E., & Fearday, C. (2016). Effects of heat treatment on chitosan nanocomposite film reinforced with nanocrystalline cellulose and tannic acid. *Carbohydrate Polymers*, 140, 202–208.
- Sadeghi-Varkani, A., Emam-Djomeh, Z., & Askari, G. (2018). Physicochemical and microstructural properties of a novel edible film synthesized from Balangu seed mucilage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108, 1110–1119.
- Sharmin, E., Zafar, F., Akram, D., & Ahmad, S. (2013). Plant oil polyol nanocomposite for antibacterial polyurethane coating. *Progress in Organic Coatings*, 76(4), 541–547.
- Sievens-Figueroa, L., Bhakay, A., Jerez-Rozo, J. I., Pandya, N., Románach, R. J., Michniak-Kohn, B., et al. (2012). Preparation and characterization of hydroxypropyl methyl cellulose films containing stable BCS Class II drug nanoparticles for pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 496–508.
- Siripatrawan, U., & Kaewklin, P. (2018). Fabrication and characterization of multi-functional active food packaging from chitosan-titanium dioxide nanocomposite as ethylene scavenging and antimicrobial film. *Food Hydrocolloids*, 9 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2012/171956>.
- Spence, K. L., Venditti, R. A., Rojas, O. J., Habibi, Y., & Pawlak, J. J. (2010). The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: Water interactions and physical properties for packaging applications. *Cellulose*, 17(4), 835–848.
- Stewart, D. (2008). Lignin as a base material for materials applications: Chemistry, application and economics. *Industrial Crops and Products*, 27(2), 202–207.
- Thakur, R., Pristijono, P., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Scarlett, C. J., Bowyer, M., et al. (2017). Amylose-lipid complex as a measure of variations in physical, mechanical and barrier attributes of rice starch-carrageenan biodegradable edible film. *Food Packaging and Shelf Life*, 14, 108–115.
- Tsai, J. S., Chiou, T. F., Huang, J. J., & Pan, B. S. (2000). Emulsifying properties of ethanol-precipitated mucilage from cellulase-hydrolyzed green algae (*monostroma nitidum*). *Journal of Food Biochemistry*, 24(2), 161–171.
- Tsujimoto, T., Uyama, H., & Kobayashi, S. (2003). Green nanocomposites from renewable resources: Biodegradable plant oil-silica hybrid coatings. *Macromolecular Rapid Communications*, 24(12), 711–714.
- Vadukumpully, S., Paul, J., Mahanta, N., & Valiyaveetil, S. (2011). Flexible conductive graphene/poly (vinyl chloride) composite thin films with high mechanical strength and thermal stability. *Carbon*, 49(1), 198–205.
- Xu, X., Thwe, M. M., Shearwood, C., & Liao, K. (2002). Mechanical properties and interfacial characteristics of carbon-nanotube-reinforced epoxy thin films. *Applied Physics Letters*, 81(15), 2833–2835.
- Zhan, X., Hu, G., Wagberg, T., Zhan, S., Xu, H., & Zhou, P. (2016). Electrochemical aptasensor for tetracycline using a screen-printed carbon electrode modified with an alginate film containing reduced graphene oxide and magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles. *Microchimica Acta*, 183(2), 723–729.