



**VERMİKOMPOST UYGULAMASININ
REYHAN (*Ocimum basilicum* L.)
KEMOTİPLERİNİN FENİLPROPANOİD
METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ**

İLKER TÜRKEY

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Danışman: Prof. Dr. LOKMAN ÖZTÜRK

Eylül - 2021

T.C.
TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

VERMİKOMPOST UYGULAMASININ REYHAN (*Ocimum
basilicum* L.) KEMOTİPLERİNİN FENİLPROPANOİD
METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

İLKER TÜRKEY

TOKAT
Eylül - 2021

Her hakkı saklıdır.



Bu tez çalışması;

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2018/39 nolu proje ile desteklenmiştir.

İlker TÜRKAY tarafından hazırlanan “**Vermikompost Uygulamasının Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) Kemotiplerinin Fenilpropanoid Metabolizması zerine Etkileri**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 30 EYLÜL 2021 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliğı ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ana Bilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri yeleri

İmzası

ye (Başkan) : Prof. Dr. İsa GÖKÇE

ye : Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK

ye : Prof. Dr. Mahfuz ELMASTAş

ye : Prof. Dr. İsa TELCİ

ye : Doç. Dr. Dursun KISA

ONAY
Prof. Dr. Mehmet GüNEş
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü
__ / __ /2021

TEZ BEYANI

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını ve tezde yer verilen yapı formüllerinin tamamının tarafımca çizildiğini beyan ederim.

İLKER TÜRKEY

31 Ağustos 2021

ÖZET

DOKTORA TEZİ

VERMİKOMPOST UYGULAMASININ REYHAN (*Ocimum basilicum* L.) KEMOTİPLERİNİN FENİLPROPANOİD METABOLİZMASI ÜZERİNE ETKİLERİ

İLKER TÜRKAY

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. LOKMAN ÖZTÜRK

Bu tez çalışmasında, metilkavikol kemotipi (LR10A) ve metilöjenol kemotipi (LR25A) reyhanlara katı vermikompost (KV) ve sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının kemotiplerin genç yapraklarından izole edilen peltat salgı tüylerindeki fenilpropen birikimi ve *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade profilleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla, kemotiplerin kök bölgelerine %0, %10 ve %25 KV; yapraklarına ise püskürtme yolu ile saf su, %10 ve %25 derişiminde SV uygulamaları gerçekleştirilmiştir. KV uygulamalarının metilkavikol kemotipi reyhanlarda metilkavikol ile metilöjenol birikimini ve *EOMT* ile *CVOMT* genlerinin ifadelerini düşürdüğü, metilöjenol kemotipi reyhanlarda ise artırdığı belirlenmiştir ($P<0,05$). Metilkavikol kemotiplerine %10 SV uygulaması kavikol ve metilöjenol miktarlarını, %25 SV uygulaması ise öjenol ve metilkavikol miktarlarını artırmıştır. %10 SV uygulaması *PAL*, *EOMT* ve *CVOMT* gen ifadelerini artırırken %25 SV uygulaması gen ifadelerini genelde azaltmıştır. Metilöjenol kemotiplerine SV uygulamaları öjenol ve metilöjenol oranını düşürmüş, metilkavikol oranında ise önemli bir değişikliğe sebep olmamıştır ($P<0,05$). Metilöjenol kemotiplerine SV uygulamaları, doz artışı ile doğru orantılı olarak *PAL* geni ifadesini artırırken diğer genlerin ifadeleri üzerinde farklı etkileri olmuştur. Sonuç olarak, reyhan kemotiplerine uygulanan vermikompost formu, dozu ve reyhanların kemotipik farklılığına bağlı olarak peltat salgı tüylerindeki fenilpropen kapsamı ve gen ifade profillerinde önemli farklılıklar bulunmuştur.

2021, 133 SAYFA

ANAHTAR KELİMELE: Gen ifadesi, Fenilpropanoid metabolizması, Fenilpropen, Organik gübre, Reyhan, Vermikompost

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

THE EFFECTS OF VERMICOMPOST APPLICATION ON PHENYPROPANOID METABOLISM OF BASIL (*Ocimum basilicum* L.) CHEMOTYPES

İLKER TÜRKAY

TOKAT GAZİOSMANPAŞA UNIVERSITY
INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF BIOLOGY

SUPERVISOR: PROF. DR. LOKMAN ÖZTÜRK

In this thesis, the effects of solid vermicompost (KV) and liquid vermicompost (SV) applications on phenylpropene accumulation and expression profiles of *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* and *CVOMT* genes in peltate glandular trichomes isolated from young leaves of methylchavicol chemotype (LR10A) and methyleugenol chemotype (LR25A) basil were investigated. For this purpose, 0%, 10% and 25% KV to root regions of chemotypes; pure water, 10% and 25% concentrations of SV were applied to the leaves by spraying. It was determined that KV applications decreased the accumulation of methylchavicol and methyleugenol and the expressions of *EOMT* and *CVOMT* genes in methylchavicol chemotype basil, whereas increased them in methyleugenol chemotype basil ($p<0.05$). The application of 10% SV to methylchavicol chemotypes increased the percentage of chavicol and methyleugenol, and 25% SV application increased the percentage of eugenol and methylchavicol. The application of 10% SV increased *PAL*, *EOMT* and *CVOMT* gene expressions, whereas 25% SV application generally decreased gene expressions. SV applications to methyleugenol chemotypes decreased the ratio of eugenol and methyleugenol, but did not cause a significant change in the ratio of methylchavicol ($p<0.05$). In methyleugenol chemotype basil, SV treatments increased the *PAL* gene expression in direct proportion with the increase in dose, while it had different effects on the expressions of other genes. As a result, significant differences were found in phenylpropene content and gene expression profiles in the peltate glandular hairs, depending on the form and dose of the applied vermicompost and the chemotypic differences of basil.

2021, 133 PAGES

KEYWORDS: Basil, Gene expression, Phenylpropanoid metabolism, Phenylpropene, Vermicompost

ÖNSÖZ

İkamet adresinden farklı bir şehirdeki veya akademik personeli olunan üniversiteden farklı bir üniversitenin lisansüstü eğitim enstitüsüne kayıtlı olmak, bir doktora öğrencisi için başlı başına bir zorluktur. Bu zorluğu bilmeme rağmen tercihimdeki en büyük etken olan, aynı güzergâhı kullanmama rağmen varış yolculuğumun her seferinde dönüş yolculuğumdan daha kısa sürmesine sebep olan, en “ilginç” fikirlerimi dahi çekinmeden anlatabildiğim ve danışmanlığında başladığım lisansüstü eğitimimi bu doktora tezi ile nihayetine erdirmemi mümkün kılan danışman hocam Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK’e teşekkürlerimi sunarım. Süreç ile ilgili bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyerek kusursuz bir kılavuzluk yapan Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsünün tüm idari ve akademik personeline de ayrıca teşekkür ederim. Reyhan araştırmalarında ülkemizin en önde gelen bilim insanı olan ve bu tez çalışmasının araştırma materyali olan reyhan kemotiplerini temin eden Prof. Dr. İsa TELCİ’ye, verilerin istatistik analizlerinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Aziz ŞAHİN’e teşekkürü bir borç bilirim. Programlama ve başka birçok teknik konudaki engin bilgisi ile otomatik iklim kontrollü bir bitki büyütme odasının inşasını mümkün kılan kardeşim İlkay TÜRKAY’a, her zamanki desteği ile her şeyi kolaylaştıran anneme ve değerli eşim Şüheda’ya sonsuz şükranlarımı sunarım.

Son bir teşekkür de yaşlarından daha büyük bir sabırla bitmesini bekledikleri bu tezden, bugüne kadar yaptığım veya sahibi olduğumu sandığım her şeyden daha kıymetli olan *İpek* ve *Arda*’ya.

İlker TÜRKAY

31 Ağustos 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	13
2.1. Bitkisel Fenoliklerin Sınıflandırılması	13
2.1.1. C ₆ fenolik bileşikler	14
2.1.2. C ₆ -C _n (1≤n≤4) fenolik bileşikler	15
2.1.3. C ₆ -C _n -C ₆ (1≤n≤3 veya n=7) fenolik bileşikler.....	18
2.1.4. Fenolik dimerler ve kondensasyon ürünü oligomerler	28
2.1.5. Polimerik fenoller (C ₆) _n , (C ₆ -C ₃) _n ve (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n (n>12).....	33
2.1.6. Hibrit fenolikler	35
2.2. Fenilpropanoid Metabolik Yolağında Metilkavikol ve Metilöjenol Uçucu	
Fenilpropenlerinin Biyosentezi	38
2.3. Kaynak Özetleri	51
3. MATERYAL ve YÖNTEM	63
3.1. Materyal.....	63
3.1.1. Kullanılan cihazlar	63
3.1.2. Kullanılan kimyasallar	63
3.2. Yöntem.....	64
3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi	64
3.2.2. Peltat salgı tüylerinin yapraklardan izolasyonu	67
3.2.3. Total RNA izolasyonu	71
3.2.4. Total RNA karakterizasyonu	72

3.2.5. cDNA sentezi	72
3.2.6. Real-Time RT-PCR (Reverse Transcription PCR).....	73
3.2.7. Relatif kantitasyon hesaplaması.....	73
3.2.8. Primer seçimi	74
3.2.9. Peltat salgı tüylerinin uçucu organik bileşik kapsamının belirlenmesi.....	75
3.2.10. Verilerin analizi	75
4. BULGULAR.....	76
4.1. Vermikompostun Kimyasal Özellikleri	77
4.2. Vermikompost Uygulamalarının Reyhan Kemotiplerinden İzole Edilen Peltat Salgı Tüylerindeki <i>PAL</i>, <i>4CL</i>, <i>EGS</i>, <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> Genlerinin İfadesi ve Fenilpropenlerin Birikimi Üzerine Etkileri.....	77
4.2.1. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi reyhanlardan izole edilen peltat salgı tüylerindeki <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifadesi ve fenilpropenlerin birikimi üzerine etkileri	77
4.2.2. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi reyhanlardan izole edilen peltat salgı tüylerindeki <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifadesi ve fenilpropenlerin birikimi üzerine etkileri	80
4.2.3. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi (25A) reyhanlardan izole edilen peltat salgı tüylerindeki <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifadesi ve fenilpropenlerin birikimi üzerine etkileri	82
4.2.4. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi (25A) reyhanlardan izole edilen peltat salgı tüylerindeki <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifadesi ve fenilpropenlerin birikimi üzerine etkileri	84
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	87
6. KAYNAKLAR	93
7. EKLER	107
8. ÖZGEÇMİŞ	113

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler	Açıklama
(-)	Polarize ışığı sola çeviren izomer.
(+)	Polarize ışığı sağa çeviren izomer.
~	Yaklaşık olarak.
®	Tescilli marka.
°C	Santigrat derece.
µg	Mikrogram.
µL	Mikrolitre.
µM	Mikromolar.
cc	Kübik santimetre, santimetre küp.
cm	Santimetre.
Ct	Döngü eşiği.
Da	Dalton (atomik kütle birimi).
dS	DesiSiemens
eV	Elektronvolt.
ha	Hektar.
L	Litre.
M	Molar.
mg	Miligram.
mL	Mililitre.
mM	Milimolar.
M _r	Nispi moleküler kütle.
ng	Nanogram.
P	İstatistiksel fark önem fonksiyonu.

pH	Hidrojen potansiyeli
ppm	Milyon birimde ünite.
R ⁿ	Radikal grup.
rpm	Dakikadaki devir sayısı.
s	Saniye.
sa	Saat.
t	Ton.
TM	Ticari marka.
v	Hacim.
w	Kütle.
α	Alfa.
β	Beta.
γ	Gama.
δ	Delta (Küçük).
Δ	Delta (Büyük).

Kısaltmalar	Açıklama
4CL	<i>p</i> -Kumarat-KoA ligaz (4-Kumarat-KoA ligaz).
ABA	(+)-absisik asit.
AM	Arbusküler mikoriza.
AMF	Arbusküler mikorhizal fungus.
BA	N ⁶ -benziladenin.
BEG	Banque Européenne des Glomales, European Bank of Glomales.
C/N	Karbon/Azot oranı.
C4H	Sinamat 4-hidroksilaz.

CA	Sitrik asit.
CAAT	Koniferil alkol asetil transferaz.
CAD	Sinnamoyil alkol dehidrogenaz.
CAF	Kafeik asit.
CBG	Kannabigerol.
CCOMT	Kafeoyil-KoA O-metiltransferaz.
CCR	Sinnamoyil-KoA redüktaz.
cDNA	Tamamlayıcı DNA.
CS3'H	<i>p</i> -Kumaroyil 5- <i>O</i> -şikimat 3'-hidroksilaz.
CVOMT	Kavikol O-metiltransferaz.
DLI	Günlük ışık integrali.
EBL	Epibrassinolid.
Ec	Elektriksel iletkenlik.
EC	Enzim komisyonu numarası.
EDDHA	Etilendiamin- <i>N,N'</i> -bis(2-hidroksifenilasetik asit).
EEC	Avrupa Ekonomik Topluluğu.
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi.
EGS	Öjenol sentaz.
Ent.	Enantiyo.
EOMT	Öjenol O-metiltransferaz.
ESTs	Eksprese dizi etiketleri.
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü.
FC	Tarla kapasitesi.
FID	Alev iyonizasyon detektörü.
GAPDH	Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz.
GC-MS	Gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi.

GDO	Genetiği değiştirilmiş organizma.
GLC	Gaz sıvı kromatografisi.
GSM	Mobil iletişim için küresel sistem.
HA	Hümik asit.
HCT	Şikimat O-hidroksisinnamoyil transferaz.
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü.
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi.
HPS	Yüksek basınçlı sodyum.
IAA	İndol-3-asetik asit.
IBA	4-[3-indolil]bütirik asit.
IOMT	İzoöjenol O-metiltransferaz.
<i>İng.</i>	İngilizce.
iP	N ⁶ -[2-izopentil]adenin.
iPR	N ⁶ -izopenteniladenozin.
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.
KoA	Koenzim A.
Kültivar	Kültürvaryete.
KV	Katı vermikompost.
LC-MS	Sıvı kromatografisi kütle spektrometresi.
LED	Işık yayan diyet.
LR10A	Metilkavikol kemotipi reyhan.
LR25A	Metilöjenol kemotipi reyhan.
MeJA	Metil jasmonat.
NAA	1-naftalenasetik asit.
NADP ⁺	İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat.
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat.

<i>nor-</i>	Normal (eşlik eden hidrojen atomlarıyla birlikte bir karbon atomunun çıkarılmasıyla bir ana bileşikten türetilen yapısal bir analogu adlandırmak için kullanılan örnek).
ObEGS	<i>Ocimum basilicum</i> 'dan izole edilen öjenol sentaz enzimi.
O-	Orto pozisyon.
oxo-	Keton karbonilini gösteren örnek.
PAL	Fenilalanin amonyum liyaz.
<i>p-</i>	Para pozisyon.
qPCR	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu.
qRT-PCR	Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu.
RNaz	Ribonükleaz.
SA	Salisilik asit.
SAH	S-Adenosil-L-homosistein.
SAMe	S-Adenosil metiyonin.
SPE	Katı faz ekstraksiyonu.
Spm	Spermin.
spp.	Cinse ait tüm türler.
SV	Sıvı vermikompost.
ŞA	Şikimik asit.
TAL	Tirozin amonyum liyaz.
THC	Tetrahidrokannabinol.
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin.
UAE	Ultrason destekli ekstraksiyon.
UNIPROT	The Universal Protein Resource.
UV	Ultraviyole.
WLAN	Kablosuz yerel alan ağı.

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1. Genel fenilpropanoid biyosentez yolağı ve bu yolaktan köken alan diğer yolaklar.	2
Şekil 1.2. Sinnamik asitin <i>trans</i> ve <i>cis</i> -formundaki iki izomeri.	4
Şekil 1.3. Dört farklı reyhan hattından etil asetat ile ekstrakte edilen uçucu yağ kapsamına ait GC-MS kromatogramı (Xie ve ark., 2008'den değiştirilerek).	8
Şekil 2.1. Bazı C ₆ fenolik bileşikler.....	14
Şekil 2.2. C ₆ -C ₁ fenoliklerinin temel iskeleti ile hidroksi- ve metoksi-sübstütüsyon örnekleri.	15
Şekil 2.3. C ₆ -C _n fenolik bileşiklerin temel iskeletleri.	16
Şekil 2.4. Kafeik asidin siklitoller, hidroksil asitler ve fenil hidroksil asitler ile esterleri.....	17
Şekil 2.5. C ₆ -C _n -C ₆ fenolik bileşiklerinin temel iskeletleri.	19
Şekil 2.6. Açık köprülü flavonoidlerin temel ve ikincil kategorileri.	20
Şekil 2.7. Kalkonların, kapalı köprülü flavanoidlere biyosentetik dönüşümünü gösteren örnekleri.	21
Şekil 2.8. 5 üyeli heterosiklik halkalı flavonoidlerin iki grubu.	22
Şekil 2.9. Kromenin yapısı.	22
Şekil 2.10. 2-fenilkromen flavonoid gruplarının temel yapıları.	23
Şekil 2.11. 5,7,3',4'-tetrahidroksi sübstütüsyonlu 2-fenilkromen flavonoidlerinin yapıları ve ampirik isimleri	26
Şekil 2.12. 3-fenil-kromen flavonoid gruplarının temel yapıları.....	27
Şekil 2.13. Bilinen 4-fenil-kromen flavonodlerinin temel moleküler yapıları.	28
Şekil 2.14. Yoğunlaşma reaksiyonları ile üretilen hidroksisinnamik asit trimerleri.	29
Şekil 2.15. Bazı fenolik dimerlerin yapıları.....	30
Şekil 2.16. Biflavonoidlerin genel yapıları.	31
Şekil 2.17. Bazı fenolik dimerlerin yapıları.....	32
Şekil 2.18. Gallik asitin diğer fenolik bileşiklerin alkolik hidroksilleri ile esterleri.	32
Şekil 2.19. Tanenlerin karakteristik örnekleri.	34

Şekil 2.20. Hibrit fenolikler sınıfına dahil olan fenolik terpenler ve fenolik lipidler.	37
Şekil 2.21. Reyhanın fenilpropanoid metabolizmasında rol alan bazı enzimler ¹ ve metilöjenol ile metilkavikolün üretim yolağı.....	39
Şekil 2.22. Fenilpropen uçucu bileşiklerinin yapıları.	40
Şekil 2.23. Genel fenilpropanoid biyosentez yolağında sentezlenen bazı bileşikler ve bu bileşiklerin öncü olarak kullanıldığı yollar.	41
Şekil 2.24. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) veritabanındaki fenilpropanoid biyosentez yolağı ve <i>Ocimum</i> spp.'de fenilpropenlerin biyosentezi (Qiu, 2013'ten değiştirilerek).	50
Şekil 3.1. Çimlenmeye başlayan reyhan tohumlarının üçüncü günündeki görünüşleri.	65
Şekil 3.2. SV uygulamaları için vermikompost çayının hazırlanması.....	66
Şekil 3.3. İki cm'den küçük yaprakların pens yardımı ile toplanması.	67
Şekil 3.4. Toplanan yaprakların ve Bead Beater cihazına aktarımı.	68
Şekil 3.5. Bead Beater'dan çıkarılan salgı tüyü izolasyon tamponu ve yaprak karışımının 350 µm gözenek açıklığına sahip filtreden süzülmesi ve yaprakların uzaklaştırılması.	68
Şekil 3.6. Salgı tüyü izolasyon tamponunun sırası ile 105 µm ve 40 µm boyutlarında gözenek açıklığına sahip filtrelerden geçirilmesi ve elek üstünün pastör pipeti ile toplanması.	69
Şekil 3.7. Reyhan yapraklarından izole edilen salgı tüylerinin tüp içerisindeki ve ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.....	70
Şekil 3.8. Reyhan yapraklarından izole edilen peltat salgı tüylerini içeren tüplerin -20 °C'de muhafazası.	70
Şekil 4.1. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi reyhanın <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifadeleri üzerine etkisi.	78
Şekil 4.2. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi (10A) reyhanların fenilpropen kapsamı üzerine etkisi ($p \leq 0.05$).	79
Şekil 4.3. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi reyhanın <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> ile <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifadeleri üzerine etkisi.	80
Şekil 4.4. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi (10A) reyhanın fenilpropen kapsamı üzerine etkisi ($p \leq 0.05$).	81
Şekil 4.5. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi reyhanın <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifadeleri üzerine etkisi.	83
Şekil 4.6. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi reyhanların fenilpropen kapsamı üzerine etkisi ($p \leq 0.05$).	83

Şekil 4.7. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi reyhanın <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifadeleri üzerine etkisi.	85
Şekil 4.8. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi reyhanların fenilpropen kapsamı oranları üzerine etkisi ($p \leq 0.05$).	85
Şekil 7.1. Saksılara yerleştirilen reyhan kemotiplerinin bitki büyütme odası içerisindeki genel görünüşleri.	107
Şekil 7.2. Reyhan bireylerinin 4. haftadaki görünüşleri (30 Ekim 2019).	108
Şekil 7.3. Reyhan bireylerinin 5. haftadaki görünüşleri (8 Kasım 2019).	109
Şekil 7.4. Reyhan Bireylerinin 7. haftadaki görünüşleri (18 Kasım 2019).	110
Şekil 7.5. Reyhan bireylerinin 8. haftadaki görünüşleri (21 Kasım 2019).	111
Şekil 7.6. Reyhan bireylerinin 9. haftadaki görünüşleri (1 Aralık 2019).	112

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

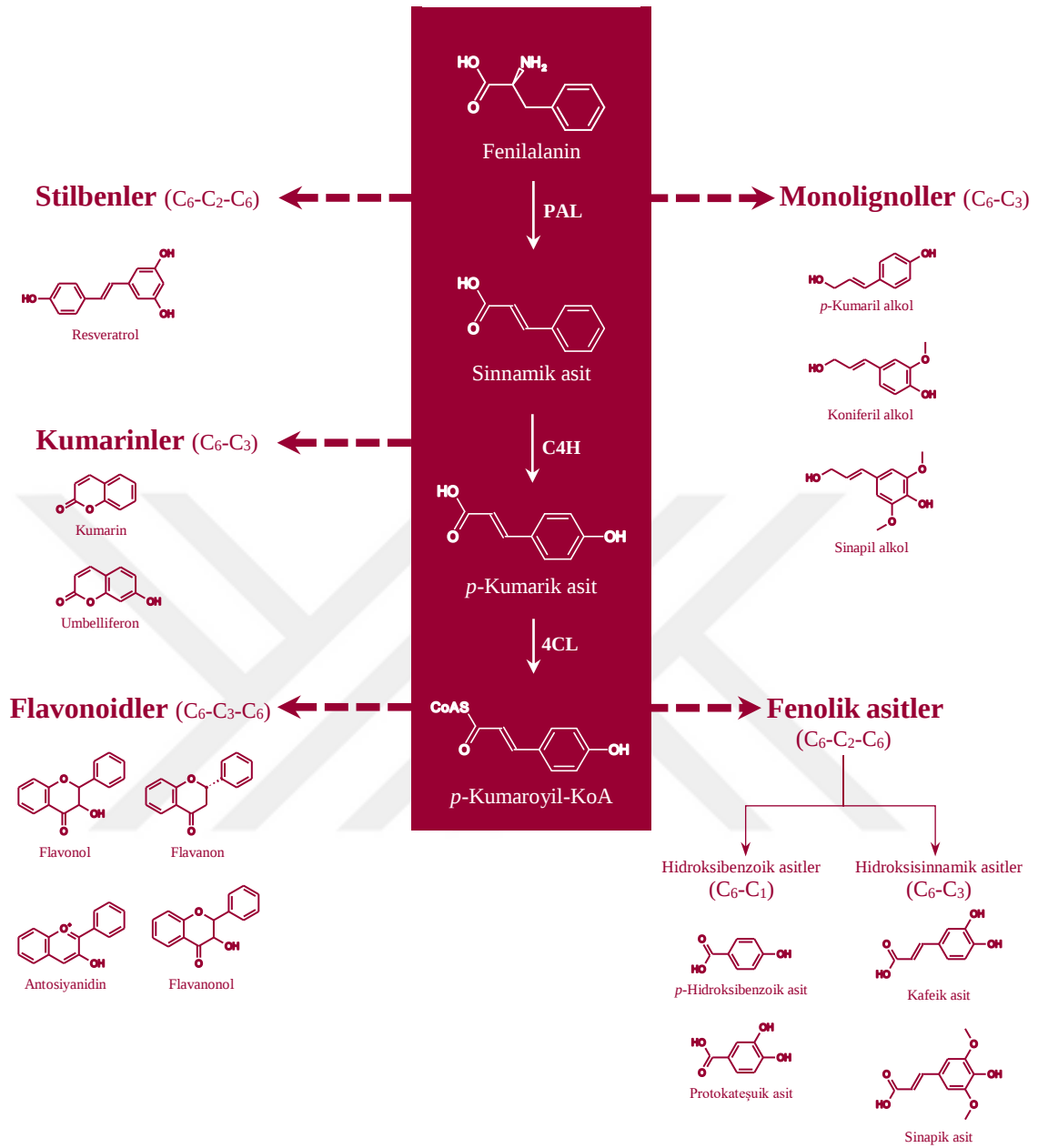
Çizelge 2.1. 5,7,3',4'-hidroksi sübstitüsyonlu 2-fenilkromen temel iskeletine sahip flavonoidler ve bulundukları bazı bitkiler (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019'dan değiştirilerek)	25
Çizelge 3.1. cDNA sentezi için gerçekleştirilen reverse transkripsiyon reaksiyonlarının çalışma koşulları.	72
Çizelge 3.2. Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bileşenleri.	73
Çizelge 3.3. qPCR çalışma koşulları.	73
Çizelge 3.4. Kullanılan primerler ve dizileri.	74
Çizelge 4.1. Reyhan kemotiplerinin peltat salgı tüylerinden izole edilen total RNA'ların konsantrasyon değerleri.	76
Çizelge 4.2. Reyhan kemotiplerine uygulanan vermikompostun genel kimyasal özellikleri.	77
Çizelge 4.3. Farklı dozlarda KV uygulamalarına bağlı olarak metilkavikol kemotipi reyhanlardaki <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> , <i>CVOMT</i> genlerinin ifade oranları ile fenilpropan birikimi arasındaki korelasyon analizinin sonuçları.	80
Çizelge 4.4. Farklı dozlarda SV uygulamalarına bağlı olarak metilkavikol kemotipi reyhanlardaki <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifade oranları ile fenilpropan birikimi arasındaki korelasyon analizi sonuçları.	82
Çizelge 4.5. Farklı dozlarda KV uygulamalarına bağlı olarak metilöjenol kemotipi reyhanlardaki <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> ve <i>CVOMT</i> genlerinin ifade oranları ile fenilpropan birikimi arasındaki korelasyon analizinin sonuçları.	84
Çizelge 4.6. Farklı dozlarda SV uygulamalarına bağlı olarak metilöjenol kemotipi reyhanlardaki <i>PAL</i> , <i>4CL</i> , <i>EGS</i> , <i>EOMT</i> , <i>CVOMT</i> genlerinin ifade oranları ile fenilpropan birikimi arasındaki korelasyon analizinin sonuçları.	86

1. GİRİŞ

Kara yaşamına uyum sağlayan ilk bitkilerin Charophyceae (Su Şamdanları) sınıfına mensup yeşil alglerden köken aldığı ve günümüzden yaklaşık 450-360 milyon yıl önce ortaya çıktıkları bilinmektedir (Waters, 2003). Bitkilerin bünyesindeki bazı bileşikler, Orta Paleozoik olarak adlandırılan bu dönemde, karasal yaşamın abiyotik faktörlerine karşı bitkilere çok önemli avantajlar sağlamıştır (Cheynier ve ark., 2013). Bitkilerde fotosentez, solunum, büyüme ve gelişme gibi primer metabolik faaliyetler için elzem olmayan ve bu nedenle “sekonder metabolitler” olarak adlandırılan bu bileşikler, bazı primer metabolizma ara ürünlerinin farklı metabolik yolların öncüsü olmaları ile başlayan birtakım reaksiyonlar neticesinde sentezlenirler.

Sekonder metabolitlerin önemli bir sınıfını teşkil eden fenolik bileşikler; bakteriler, mantarlar ve alglerde oldukça az miktarlarda bulunmaktadır. Bryofitler (Kara yosunları); polifenoller ile flavonoidler gibi fenolik bileşikler nispeten daha yüksek miktarlarda ve sürekli olarak üretmektedirler. Vasküler bitkilerde ise hidroksisinnamik asitlerin esterleri, amidleri ve glikozitleri; flavon ve flavanol gibi flavonoid glikozitleri, proantosiyanın ile türevleri; lignin, süberin ve tanenler gibi fenolik polimerler de dahil olmak üzere, büyük çeşitlilikte ve miktarlarda fenolik bileşik üretimi gerçekleşmektedir.

Fenolik bileşikler içerisinde sınıflandırılan fenilpropanoidler, aromatik bir amino asit olan fenilalaninden (bazı tek çenekli bitkilerde tirozinden) üretilen oldukça geniş bir bitkisel sekonder metabolit sınıfıdır. Farklı araştırmacılar tarafından (Evans, 1991; Vogt, 2010; Lattanzio, 2013) farklı sistemlere göre sınıflandırılmış olan fenilpropanoidleri kimyasal yapılarına göre (i) hidroksisinnamik asitler ve türevleri, (ii) sinamik aldehytler, (iii) monolignoller, (iv) fenilpropenler, (v) kumarinler, (vi) izokumarinler ve (vii) kromonlar olarak 7 gruba ayırmak mümkündür (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019). Fenilpropanoid olarak sınıflandırılan bu bileşiklerde temel olarak üç karbonlu bir zincirin bir fenil grubuna bağlı olduğu bir nüve yapısı mevcuttur. Bu C₆-C₃ şeklindeki karbon iskeleti, genel fenilpropanoid biyosentez yolağında fenilalanin (Phe) aromatik amino asitinin enzimatik olarak, sinamik asit ile sonuçlanan bir deaminasyon, reaksiyonu neticesinde elde edilir (Şekil 1.1).



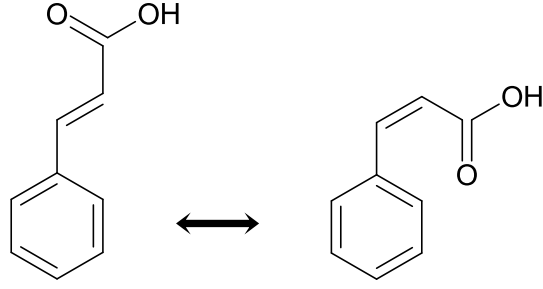
Şekil 1.1. Genel fenilpropanoid biyosentez yolağı ve bu yolaktan köken alan diğer yolaklar.

Bu yolağın son ürünlerinin yanı sıra, ara ürünleri de bitkilere özgü bazı biyokimyasal yolakların başlangıç noktasını teşkil etmektedir (Vanholme ve ark., 2012). Örneğin, feruloyl-KoA, monolignol yolağında lignin ve süberinin iki önemli yapı taşı olan koniferil alkol ve sinapil alkole dönüştürülür ve bu bileşikler apoplastta depolanır (Vishwanath ve ark., 2015; Mottiar ve ark., 2016). Diğer yandan, fenilpropanoid yolağının ara ürünlerinden olan *p*-kumaroyil-KoA, üç molekül malonil-KoA ile birleşerek flavonoidlerin temel omurgası olan kalkonları oluşturur. Kalkonların farklı seviyelerdeki

modifikasyonları neticesinde UV ışınlarına karşı koruma sağlamak, radikalleri temizlemek veya da pigmentasyonu sağlamak gibi fonksiyonları yerine getirebilen, 10 000 kadar farklı bileşik sentezlenebilmektedir (Mathesius, 2018).

Genel fenilpropanoid yolağı üzerindeki diğer dallanma noktaları, C₆-C₃ nüve yapısında birtakım değişiklikler yaparak yeni moleküler yapı birimlerinin oluşmasına ve fenilpropanoid türevi bileşiklerin moleküler çeşitliliğinin artmasına neden olmaktadır. Örneğin, fenilpropenoik asitlerin izomerizasyonu ve laktonizasyonu kumarinlerin oluşumunu sağlar. Kumarinler, kök mikrobiyomu (bitki kökleri ile ilişkili dinamik mikroorganizmalar) üzerinde etki gösterebilmenin yanı sıra alkalik topraklardan demir alımını da mümkün kılabilir (Vanholme ve ark., 2019). Fenilpropanoid metabolizmasının son ürünleri arasında yer alan öjenol ve kavikolün nematosidal ve antimikrobiyal etkilere sahip olduğu (Dixon ve Paiva, 1995; Dixon ve ark., 2002; Zhou ve ark., 2012), bunların metillenmiş formları olan metilöjenol ve metilkavikolün (estragol) ise antimikrobiyal etkinin yanı sıra tozlaştırıcıları cezbedici özellikleri olduğu da bildirilmiştir (Lewinsohn ve ark., 2000; Tan ve Nishida, 2012; Kurkin, 2013).

Canlı bir hücre, doku ya da organizmada doğrudan bir yanıtı tetikleyen küçük moleküllere biyoaktif bileşikler denir. Konsantrasyona bağlı olarak molekülün biyolojik sistem üzerine etkisi olumlu veya olumsuz olabilir. Organizmaların bünyelerinde gerçekleşen metabolik faaliyetleri primer ve sekonder metabolizma olarak sınıflandıran klasik yaklaşıma karşı kanıtlar sunan çalışmaların sayıları da giderek artmaktadır. Fenilpropanoidlerin bitki büyüme ve gelişimini yönlendirebildiğini bildiren eski ve yeni birçok araştırma vardır (Ugochukwu ve Wain, 1968; Batish ve ark., 2008; Zanardo ve ark., 2009; Salvador ve ark., 2013; Bi ve ark., 2017; el-awadi ve ark., 2017). Fenilpropanoidlerden sinamik asidin biyoaktif bir bileşik olduğuna dair oldukça açık kanıtlar mevcuttur (Wong ve ark., 2005). Sinamik asit, genel fenilpropanoid yolağının ilk ara ürünlerindendir ve bütün fenilpropenlerde olduğu gibi *trans* ve *cis* formunda iki izomeri vardır (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Sinnamik asitin *trans* ve *cis*-formundaki iki izomeri.

Fenilpropanoid yolağında üretilen bu izomerlerden *cis*-Sinamik asit, *t*-Sinamik asidin UV aracılığıyla oluşan *cis* izomerinin aynısıdır ve fenilpropanoid yolağına bu izomerlerden yalnızca *trans* formu yönlendirilir (Pfändler ve ark., 1977; Yang ve ark., 1999). *cis*-Sinamik asidin normal koşullarda bitkide hormon düzeyleri kadar eser miktarlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Buna karşın, UV ile muamele edilen bitkilerde *trans*-Sinamik asidin fenilpropanoid yolağına yönlendirilmesinin engellendiği ve *cis*-Sinamik asit miktarının yaklaşık 20 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *Arabidopsis thaliana* L. fidelerinin kök bölgelerine çok düşük (μM) konsantrasyonlarda eklenen *cis*-Sinamik asidin oksin benzeri etki göstererek primer kök gelişimini inhibe ettiği ve lateral kök üretimini artırdığı bildirilmiştir (Wong ve ark., 2005).

Lamiaceae familyası içerisinde yer alan *Ocimum* cinsinin türleri, Türkiye’de Arapça kökenli “reyhan” ve Rumca kökenli “fesleğen” isimleri ile bilinmektedir. Ülkemizde reyhan adı yalnızca mor yapraklı *Ocimum basilicum* L. çeşitleri için kullanılmaktayken, fesleğen adı yeşil küçük yapraklı *Ocimum minimum* L. türü ve bazen de büyük yeşil yapraklı *O. basilicum* çeşitleri için kullanılmaktadır. Birçok bitki türünde olduğu gibi, reyhan yapraklarının yüzeyinde de salgı tüyü adı verilen, bitkinin herbivorlar, zararlı böcekler ve mikroorganizmalara karşı korunmasını sağlayan bileşikler içeren özelleşmiş salgı bezleri mevcuttur. Reyhan salgı tüyleri; peltat (kalkansı) ve kapitat (başçıklı) olmak üzere iki tip morfolojiye sahiptir. Reyhanın kapitat salgı tüylerinin, mevalonik asit yolağından sentezlenen terpenoid bileşiklerce zengin olduğu, peltat salgı tüylerinin ise öjenol, metilöjenol, kavikol veya estragol (metilkavikol) gibi fenilpropenlerce zengin olduğu bildirilmiştir (Gang ve ark., 2001). Terpenoid bileşiklerce zengin uçucu yağ içeren bitkilerde fenilpropanoid bileşikleri yaygın olmamasına rağmen, *O. basilicum* uçucu

yağında bu bileşikler genellikle bol miktarlarda bulunmaktadır (Tavallali ve ark., 2019). Reyhan peltat salgı tüylerinin, halk arasında karanfil baharatı olarak bilinen fakat aslında Myrtaceae familyasına mensup *Syzygium aromaticum* L. (Syn: *Eugenia caryophyllata*) tomurcuklarının başlıca bileşiği olan öjenol veya anason aromalı estragol (metilkavikol) gibi fenilpropenlerce zengin olduğu tespit edilmiştir (Gang ve ark., 2001). Bu fenilpropenlerin sentezi ile sonuçlanan biyosentetik yolaktaki enzimlere yönelik analizlerde, karşılık gelen enzim aktivitelerinin neredeyse tamamen peltat salgı tüylerinde gerçekleştiği tespit edilmiş ve bu enzimlerin özellikle peltat salgı tüylerinde lokalize oldukları ileri sürülmüştür (Gang ve ark., 2002a).

Peltat salgı tüylerinden elde edilen EST'lerin (*Ing.* Expressed sequence tag) analizi sonucunda, fenilpropanoid yolağı ile ilgili olduğu bilinen genlerin, peltat salgı tüylerinde ifade edilen toplam EST'lerin %13'ü gibi oldukça yüksek bir orana tekabül ettiği görülmüştür (Gang ve ark., 2001). Bu nedenle reyhanın peltat salgı tüylerinin, fenilpropanoidlerin sentezi ve depolanması için oldukça özelleşmiş yapılar olduğu belirtilmektedir ve bu yapılar fenilpropanoid biyosentezinin araştırılması için de mükemmel bir sistem modeli olarak görünmektedir.

Fenilalaninin, PAL enzimi ile deaminasyonu neticesinde *trans*-sinnamatın sentezi ile başlayan fenilpropanoidlerin sentez yolağında PAL enzimi önemli bir rol oynamaktadır. Bu yolaktaki en önemli dallanma noktasını; 4-kumarat bileşiğinden 4CL enzimi ile 4-kumaroyil-KoA bileşiğinin sentezlendiği reaksiyon basamağı teşkil etmektedir (Rastogi ve ark., 2013). Bunun yanı sıra hem kumaril asetattan kavikol sentezini hem de koniferil asetattan öjenol sentezini gerçekleştiren öjenol sentaz enzimi fenilpropanoid metabolizması aktivitesinin belirlenmesi için ifade oranının ölçümü gerekli olan önemli bir enzimdir (Koeduka ve ark., 2006; Vassao ve ark., 2006). Öjenol *O*-metil transferaz enzimi ve kavikol *O*-metil transferaz enzimi, öjenol ve kavikolün *para*-OH gruplarının metilasyonunu gerçekleştirerek, bunların metil eter türevlerini meydana getirmektedirler (Lewinsohn ve ark., 2000).

Fenilpropanoid sınıfı savunma bileşiklerini yüksek miktarlarda içeren ve insanlar tarafından tüketimlerinin yanı sıra sahip oldukları ekonomik değerleri bakımından önemli baharatlardan olan *Ocimum* spp. uzun zamandan beri bilinen bitkilerdir. Bu bitkilerden

Lamiaceae familyasına ait olan *Ocimum* cinsi; Asya, Afrika ve Güney Afrika'nın tropikal ve subtropikal bölgelerinde dağılım gösteren yıllık veya çok yıllık, otsu bitkileri ve çalıları kapsamaktadır (Darrah, 1988). *Ocimum basilicum* L., *Ocimum* cinsine dahil olan türler arasında uçucu yağ üretimi ve ticari amaçlı olarak tarımı yapılan *Ocimum* türleri arasında en başta yer almaktadır. Reyhandan elde edilen uçucu yağ, parfümeri ve ilaç endüstrisinin yanı sıra gıda endüstrisinde tatlandırıcı olarak da kullanılmaktadır (Telci ve ark., 2006).

Fenilpropenler; karanfil baharatı (*Syzygium aromaticum*), karabiber (*Piper nigrum*), muskat cevizi (*Myristica spp.*), tarçın (*Cinnamomum verum*), yenibahar (*Pimenta dioica*), tarhun (*Artemisia dracunculus*) ve reyhan (*Ocimum spp.*) dahil olmak üzere birçok önemli bitki ve baharattaki anahtar aroma unsurları olan ve genel fenilpropanoid biyosentez yolağından türetilen küçük fenolik moleküllerdir. Fenilpropenler, hayvanlara ve mikroorganizmalara karşı bitki savunmasında rol almanın yanı sıra tozlayıcılar ve böcekleri çekmede de önemli bir rol oynar (Gang ve ark., 2002a). Fenilpropanoid biyosentez yolağından türetilen fenilpropenler, aroma, parfüm ve ilaç endüstrilerinde yaygın olarak kullanılan terpenler ile birlikte en büyük bitkisel uçucu organik bileşik sınıflarından biridir ve bu da onları ekonomik olarak önemli kılar.

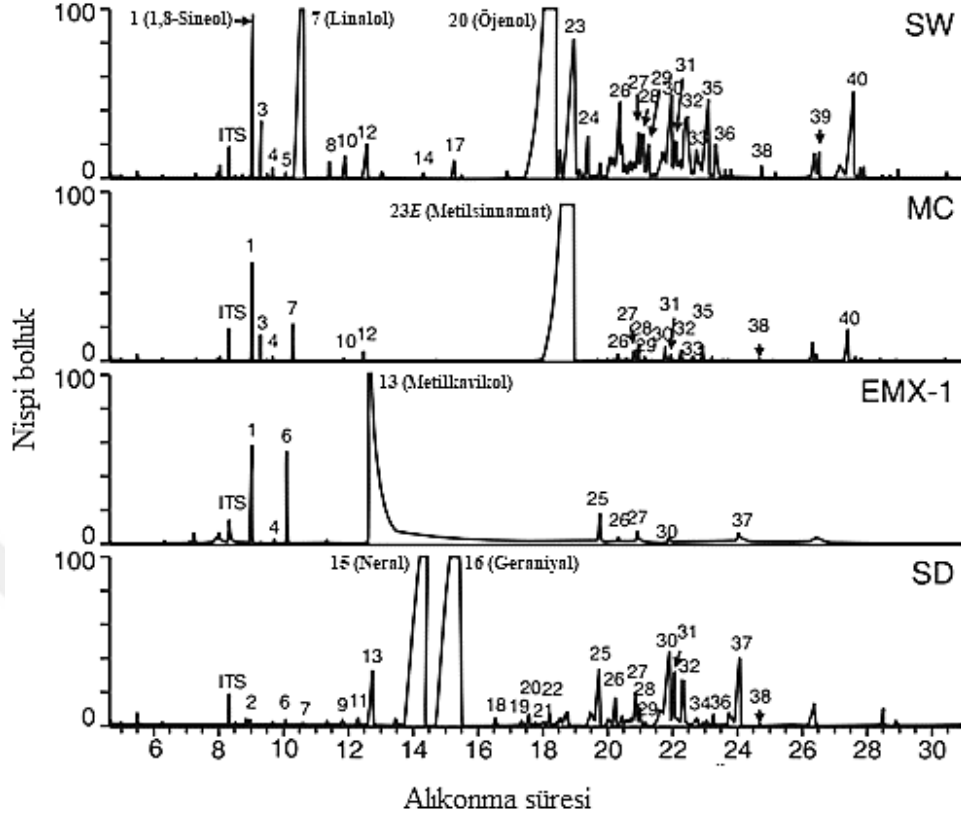
Karanfil, tarçın ve birçok reyhan varyetesinde bol miktarda bulunan öjenol, 2026 yılına kadar 754,1 milyon Amerikan doları değerinde ciroya ulaşacağı tahmin edilen bir pazarı oluşturan oldukça önemli bir ticari üründür (Anonim, 2018a). Tarhun ve reyhan uçucu yağının önemli bir bileşeni olan kavikol de uçucu organik bileşikler pazarında giderek büyüyen bir pazar payına sahiptir (Anonim, 2018b). Öjenol ve kavikol gibi fenilpropenlerin ticari ve ekolojik önemi düşünüldüğünde, bunların metabolik olarak düzenlenmesine yönelik stratejiler sağlamak için bu bileşiklerin biyosentez yollarını anlamak oldukça ilgi çekicidir.

Bazı reyhan hatları, uçucu olarak bir ya da iki adet spesifik fenilpropen bileşimini baskın olarak içeren uçucu yağlar üretmektedir ve farklı uçucu yağ kompozisyonuna sahip çok sayıda reyhan hattı bulunmaktadır. Marotti ve ark. (1996), farklı morfolojik karakterlere sahip reyhan hatlarının uçucu yağlarını araştırdıkları çalışmanın neticesinde 'linalol', 'linalol-metilkavikol' ve 'linalol-öjenol' olmak üzere üç farklı reyhan kemotipi tespit

etmişlerdir. Benzer şekilde, Lachowicz ve ark. (1997), Avustralya'daki reyhan varyetelerinin uçucu yağ kompozisyonlarını metilkavikol, linalol, metilsinamat ve linalol/metilsinamat ile linalol/metilkavikolün karışımı olarak tanımlamışlardır.

Reyhanlar, farklı coğrafik kökenlerine göre de gruplandırılmaktadır. İtalya, Fransa, Bulgaristan, Mısır ve Güney Afrika'da yayılış gösteren ya da üretilen reyhanlar Avrupa kemotipi olarak sınıflandırılmıştır ve bunlar ana bileşen bakımından linalol ve metilkavikolce zengindirler. Hindistan, Pakistan ve Guatemala'daki reyhanlar ise Tropikal kemotip olarak sınıflandırılmıştır ve metilsinamat bakımından zengindirler. Tayland, Madagaskar ve Vietnam reyhanları ise Reunion kemotipi olup yüksek konsantrasyonlarda metilkavikol içermeleri ile karakterize edilmiştir (Vernin ve ark., 1984; Simon ve ark., 1999). Telci ve ark. (2006), Türkiye'de kültürü yapılan 18 farklı yerel reyhan çeşidinin uçucu yağ kompozisyonunu analiz ederek 7 farklı kemotipin bulunduğunu tespit etmişler ve bu kemotipleri (1) linalol, (2) metilsinamat, (3) metilsinamat/linalol, (4) metilöjenol, (5) sitral, (6) metilkavikol (estragol) ve (7) metilkavikol/sitral olarak belirlemişlerdir. Reyhanın en önemli antioksidan bileşikler ise kafeik, vanilik, rosmarinik, klorojenik ve *p*-hidroksibenzoik asitler ile kuersetin, rutin ve apigenindir (Gülçin ve ark., 2007; Genç ve ark., 2020; Shahrajabian ve ark., 2020).

Xie ve ark. (2008) tarafından dört farklı reyhan hattı (SW, MC, EMX-1, SD) ile yapılan bir çalışmanın neticesinde, bu reyhan hatlarından izole edilen peltat salgı tüylerinin uçucu yağ kapsamındaki fenilpropenler ve terpenlerin kompozisyonunda önemli farklılıklar bulunduğu bildirilmiştir. Şekil 1.3'te yer alan kromatogramda numaralandırılmış olarak belirtilen başlıca bileşikler şunlardır: 1; 1-8-Sineol, 2; limonen, 3; E- β -osimen, 4; cis- δ -terpineol, 5; α -terpinen, 6; fenşon, 7; linalol, 8; kamfor, 9; cis-verbenol, 10; borneol, 11; trans-verbenol, 12; α -terpineol, 13; metilkavikol, 14; kavikol, 15; neral, 16; geraniyal, 17; bornil asetat, 18; metil nerolat, 19; α -kubeben, 20; öjenol, 21; neril asetat, 22; kopaen, 23; metilsinamat, 24; metilöjenol, 25; β -karyofilen, 26; α -bergamoten, 27; α -humulen, 28; β -farnesen, 29; muurola-4,5-dien, 30; germakren D, 31; β -selinen, 32; α -selinen + bisiklogermakren, 33; α -bulnesen, 34; β -bisabolen, 35; γ -kadinen, 36; δ -kadinen, 37; α -bisabolen, 38; Z-nerolidol, 39; kubenol, 40; α -kadinol. Kromatogramda ITS ile gösterilen değer dahili (internal) standart olarak kullanılan 1,3,4-triklorobenzen bileşiğine aittir.



Şekil 1.3. Dört farklı reyhana hattından etil asetat ile ekstrakte edilen uçucu yağ kapsamına ait GC-MS kromatogramı (Xie ve ark., 2008’den değiştirilerek).

Biyouyarıcılar olarak adlandırılan ve bunların humik maddeler kategorisi içerisinde yer alan vermikompost kökenli humik ekstraktların, bitki büyüme ve gelişimine etkisi iyi bilinmektedir (Kauffman ve ark., 2007; du Jardin, 2015). Vermikompostların bitki büyümesini “hormon ile uyarılmış aktivite” mekanizmaları yoluyla stimüle ettiği gösterilmiştir (Arancon ve ark., 2006; Sinha ve ark., 2009). Vermikompost humik maddesinin sahip olduğu hormon benzeri aktivitenin, vermikompostun üretiminde kullanılan hammaddeden (Arthur ve ark., 2007) ya da biyokütlenin kompostlanması sırasında üretilen (*ex-novo*) hormonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Vermikompost üretim kıstaslarının, toprakta bitki gelişim düzenleyicileri üreten mikrobiyotayı etkilediği bildirilmiştir. Özellikle, yüksek sıcaklıklarda üretilen kompostlara kıyasla vermikompost üretiminin daha düşük sıcaklıkta gerçekleştirilmesi, vermikompostun daha yüksek konsantrasyonlarda oksin, giberellin ve sitokinin hormonu içermesine imkân tanımaktadır (Jayakumar ve ark., 2012).

Humik asitin hormon benzeri etkilerinin arasından oksin benzeri etkisi en iyi bilineni olup vejetatif hücrelerdeki pompaları aktive ederek kök gelişimini etkilediği tespit edilmiştir (Muscolo ve ark., 1999; Canellas ve ark., 2002; Zandonadi ve ark., 2010). Bitkiler üzerinde hümik asitin etkili olmasının en önemli sebebinin bazı araştırmacılar tarafından oksin mevcudiyetinden kaynaklandığı düşünülse de (Canellas ve ark., 2010; Schiavon ve ark., 2010; Muscolo ve ark., 2013) başka araştırmacılar tarafından oksin mevcudiyetinden bağımsız olarak da oksin benzeri etkilerin görüldüğü ve bu etkinin hormon benzeri bileşikler olarak adlandırılan spesifik organik moleküllerin mevcudiyetinden kaynaklandığı bildirilmiştir (Nardi ve ark., 2002; Trevisan ve ark., 2010; Scaglia ve ark., 2016). Karboksilik organik asitler (oksalik, tartarik ve fenolik asitler) ve amino asitlerin saf moleküller ya da organik fraksiyonun bileşenleri olarak bulunduklarında oksin benzeri etkilere sahip oldukları da bildirilmiştir (Pizzeghello ve ark., 2006; Singh ve ark., 2013; Colla ve ark., 2014).

Humik asitlerin (HA) kimyasal karmaşıklığı, biyoyarıcı etkiye sebep olan oksin benzeri moleküllerin analitik tanımlamasını zorlaştırmış ve bu durum HA içeren organik fraksiyonlardan hangisinin oksin benzeri özellikler gösterdiğini belirlemeye yönelik araştırmalara neden olmuştur (Canellas ve ark., 2010; Canellas ve ark., 2015; Scaglia ve ark., 2016). Humik asit fraksiyonlarının (i) düşük moleküler ağırlıklı, (ii) yüksek moleküler ağırlıklı ve (iii) suda çözünabilir fraksiyonlar şeklindeki sınıflandırılması, oksin benzeri etkinin moleküler ağırlık ile ilgili olmayabileceğini de işaret etmektedir (Muscolo ve ark., 1999; Quaggiotti, 2004). Bu durumun en muhtemel açıklaması ise bitki hormon reseptörlerinin hümik asidin tamamı ile etkileşime girmek yerine hümik asit içerisindeki küçük oksin benzeri moleküller ile etkileşime girmesidir (Trevisan ve ark., 2010; Canellas ve ark., 2011; Zandonadi ve ark., 2013). GC-MS yaklaşımı, hümik asit kapsamındaki spesifik moleküllerin miktarı ve mevcudiyeti hakkında önemli bilgiler sağlar ve biyoyarıcı etkinin hangi moleküllerden kaynaklandığının belirlenmesi amacıyla kullanılabilir (Scaglia ve ark., 2016).

Schiavon ve ark. (2010) tarafından yapılan bir araştırmada, vermikompost humik madde fraksiyonları içerisinde yüksek moleküler ağırlıklı olanların mısırdaki fenilpropanoid metabolizması ürünlerini artırdığı, bu yolağın öncülleri olan fenilalanin ve tirozinin sırasıyla %16 ve %22 oranında azaldığı, fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve tirozin

amonyum liyaz (TAL) ifadelerini ve enzim aktivitelerini ise arttırdığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu artışın, kısmen, humik madde içerisindeki indol asetik asitten (IAA) kaynaklanmış olabileceğini de ileri sürmüşlerdir. Olivares ve ark. (2015)'nın domateste yaptığı araştırmada, vermikomposttan ekstrakte edilmiş hümkik asitin yapraklara sprey olarak uygulanması neticesinde meyve veriminin yanı sıra PAL aktivitesinin artış gösterdiği tespit edilmiştir. Hernandez ve ark. (2014) tarafından kıvırcıkta yapılan çalışmada ise vermikomposttan ekstrakte edilen hümkik asitin yapraklara sprey olarak uygulanması neticesinde PAL aktivitesinde artış tespit edilmiştir.

Biyogübre terimi, yaşayan organizmaların kullanımını ifade eden “biyolojik” ve “gübre” terimlerinin kısaltmasından türetilmiştir. Bilimsel literatürde, bitki gelişimini ilerletici etki gösteren basit bir mikroorganizma için de genellikle biyogübre terimi kullanılmaktadır. Ancak mikroorganizmaların bitki gelişimindeki rolleri biyogübrelerden farklı terimlerle anılmasını gerektirmiştir (Tunç, 2017). Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'nün (FAO) 2006 yılında yayınladığı bir rapora göre biyogübreler, atmosferik azotu fikse eden veya toprak besleyicilerini çözündürme/harekete geçirme konusunda yardımcı olan ve büyümeyi teşvik eden maddeler salgılayan bakteriler, mantarlar, aktinomisetler ve tek veya kombinasyon halindeki algler gibi yaşayan veya uyku halindeki mikro organizmaları içeren ürünler için kullanılan, geniş kapsamlı bir terimdir (Roy ve ark., 2006; Tunç, 2017). 2006 yılında Hindistan Tarım Bakanlığı tarafından “Zorunlu Mallar Yasası” altında biyogübreleri içeren bir yönetmelik yayınlanmış, daha sonra 2009'da bu yönetmelik düzeltilmiştir. Bu tanıma göre biyogübre terimi “sıvı veya katı halde, yaşayan mikroorganizma içeren ürün” anlamına gelmektedir ve bu ürün azot fiksasyonu, fosfor çözünürlüğü veya besin alımında toprak veya ürün verimliliğini artırmalıdır (Tunç, 2017).

Vermikompost çayları büyük ölçekli tarım, bağcılık, meyve bahçeleri, bahçecilik, fidanlıklar, çimler, ticari peyzaj ve ev bahçelerinde kullanılmaktadır. Tarımsal faaliyetlerde katı vermikompost yerine vermikompost çayı kullanımının uygulama açısından önemli avantajları bulunmaktadır. Buğday üretimi gibi geniş arazilerde ve büyük ölçekli üretimde ekonomik uygulama imkânı sunması en önemli özelliğidir. Pek çok kullanıcı vermikompost çayını hem toprağa hem de yapraktan uygulamaktadır. Çay kullanımı spreyleme ve sulama suyu ile uygulama için uygun ve ekonomiktir. Uygulama

sonrasında vermikompost uygulama bölgesine milyonlarca bakteri ve mantar ekleyerek öncelikle mikroorganizma yoğunluğunu artırır. Vermikompostun aktif bileşenleri mikroorganizmalar, suda çözünen fulvik asitler (humik için yapı taşları) ve partiküler humatlar, mikroorganizmalar tarafından üretilen bitki büyüme hormonları ve mikrobelerin mevcudiyetini arttıran malzemelerden oluşmaktadır (Edwards ve ark., 2010).

Vermikompost çayı üretimi basitçe vermikompost, su ve zaman girdilerinden oluşmaktadır. Çayın biyolojik ve kimyasal özellikleri bu girdilerdeki değişikliklere bağlı olarak farklılık göstermektedir. Vermikompost çayı üretiminde kullanılacak katı vermikompost:su oranı sabitlenebilir bir değişkendir. Katı ve sıvı vermikompost %5 ve %24 arasındaki uygulama oranlarının laboratuvar ve sera denemelerinde en uygun oranlar olduğu bildirilmiştir (Edwards ve ark., 2010; Türkay ve ark., 2018; Türkay ve Öztürk, 2019).

Vermikompost çayı depolanmak yerine hemen uygulanacaksa havalandırma ile 4 saat çalkalama sonunda ekstraksiyon ile elde edilir. Ancak vermikompost çayı, yaygın olarak kullanılan melas gibi bir materyalle mayalanarak kullanılacaksa süre 24 saattir. Kullanılacak suyun oda sıcaklığında olması yeterlidir. Spesifik çalışmalarda ve uygulamalarda ihtiyaca bağlı olarak vermikompost çayı üretim oranları son uygulama ekstraktından seyreltilebilir (Edwards ve ark., 2010).

Bitki biyoyararıcı ürünleri tarım biliminde yeni geliştirilmekte olan ürünlerdir. Bunun yanı sıra, sekonder metabolitlerin sentez yollarının genetik manipülasyonunu mümkün kılabilmeleri nedeniyle, özellikle tıbbi bitkilerde çok daha etkilidirler (Rafiee ve ark., 2016). Ayrıca, biyoyararıcı pazarında hali hazırda satılmakta olan, yapraklara püskürtme yolu ile uygulanan ve hümkik madde kapsamına sahip olan Rygex® (Ryger Complex®) gibi ticari biyoyararıcı ürünler de bulunmaktadır (Sharma ve ark., 2016).

Öjenolü en fazla miktarda üreten bitki türü Myrtaceae familyasına mensup *Syzygium aromaticum* ağacından elde edilen karanfil baharatıdır. Fakat karanfil baharatını meydana getiren tomurcukların olgunlaşması uzun yıllar aldığından laboratuvar manipülasyonlarına ve biyokimyasal incelemelere uygun değildirler. Reyhan (*O.*

basilicum L.) ise, uçucu yağlarında ökaliptol, linalil asetat ve α -bergamoten gibi mono- ve seskiterpenlerin yanı sıra öjenol ve kavikol gibi yüksek seviyelerde fenilpropen üreten bir diğer çok yıllık bitki türüdür. Bu bileşikler birçok aromatik bitkinin toprak üstü kısımlarında yaygın olarak bulunan peltat salgı tüyleri adı verilen özel yapılarda üretilir. Farklı reyhan çeşitleri, uçucu allilfenol bileşiklerinin karakteristik karışımlarını üretir ve bunlar arasında öjenol ve metilkavikol, en bol miktarda bulunan allil-fenilpropenlerdir (Dhar ve ark., 2020). Reyhan ve birçok tıbbi ve aromatik bitkinin yetiştiriciliğinde doğal aroma ve uçucu yağ veriminin korunması için organik gübre uygulamaları tavsiye edilmektedir (Anwar ve ark., 2005; Khalid ve El-Gezawy, 2006; Kandil ve ark., 2009; Taie ve ark., 2010; Malik ve ark., 2011; El-Naggar ve ark., 2015; Khalid ve ark., 2016; Badalingappanavar ve ark., 2018).

Fenilpropanoid metabolizması ile ilgili olarak sadece PAL aktivitelerini ölçen çalışmaların haricinde, bir biyoyararıcı olarak sınıflandırılan vermikompostun fenilpropanoid metabolizması üzerine etkilerini kapsamlı olarak araştıran herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamaktadır. Bunun yanı sıra herhangi bir tıbbi ve aromatik bitkinin yapraklarına vermikompost çayının püskürtme yolu ile uygulanması neticesinde fenilpropanoid metabolizması üzerindeki etkilerini gen ifadesi seviyesinde inceleyen bir araştırmaya da literatürde rastlanmamıştır.

Bu çalışmada iki farklı kemotipe ait reyhan bireylerinin kök bölgelerine katı, toprak üstü kısımlarına ise sıvı vermikompost uygulamalarının reyhanın fenilpropanoid metabolizması üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, çeşitli endüstrilerde hammadde olarak kullanılan birtakım fenolik bileşiklerin önemli bir kaynağı olarak, vermikompost ile yetiştirilen reyhanın potansiyelini ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, endüstriyel hammadde eldesi amacıyla yapılan tıbbi ve aromatik bitki yetiştiriciliği faaliyetlerinin giderek arttığı günümüzde, vermikompostun da dahil olduğu çeşitli organik gübrelerin bitkisel sekonder metabolizma üzerine etkileri konusundaki perspektifimize ilk katkıların sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bitkisel Fenoliklerin Sınıflandırılması

Doğal fenolik bileşikler, araştırmacılar tarafından birkaç farklı sınıflandırma sistemine göre sınıflandırılmaktadırlar. Günümüze değin yapılan araştırmalarda çok çeşitli fenolik bileşiklerin tanımlanması neticesinde araştırmacıların çoğu, en yaygın sınıflandırma yöntemi olan temel karbon iskeletine göre sınıflandırma sistemini tercih etmiştir. Bugüne kadar yaygın olarak kullanılan bu sınıflandırma sistemi 10'dan fazla kategori içermektedir ve bu hiyerarşi içerisinde bazı fenolik bileşikler yerleştirebilmek mümkün değildir.

Tsimogiannis ve Oreopoulou (2019) tarafından daha kapsayıcı bir çerçevede yapılan bir çalışmada benimsenen yeni bir sınıflandırma sisteminde monomerik fenoller 3 ana sınıfta toplanmıştır ve hiyerarşi düzenlemesi, biyolojinin taksonomik seviye kuralları esas alınarak yapılmıştır. Bu sisteme göre fenolik bileşiklerin ilk 3 ana sınıfı; (I) tek bir benzen halkası içeren fenolik bileşikler (C_6 sınıfı), (II) 1'den 4'e kadar veya 7 tane karbon atomu içeren karbon zincirinin bağlı olduğu bir C_6 halkası içeren fenolik bileşikler (C_6-C_n sınıfı) ve (III) karbon zincirinin fazladan ikinci bir benzen halkasına bağlandığı, daha karmaşık bir karbon iskeletine sahip fenolik bileşikler ($C_6-C_n-C_6$ sınıfı) olarak belirlenmiştir. $C_6-C_n-C_6$ sınıfı; $C_6-C_1-C_6$, $C_6-C_2-C_6$, $C_6-C_3-C_6$ ve $C_6-C_7-C_6$ alt kategorilerine ayrılmıştır ve bunlardan $C_6-C_3-C_6$ kategorisi sadece flavonoid familyasını içermektedir.

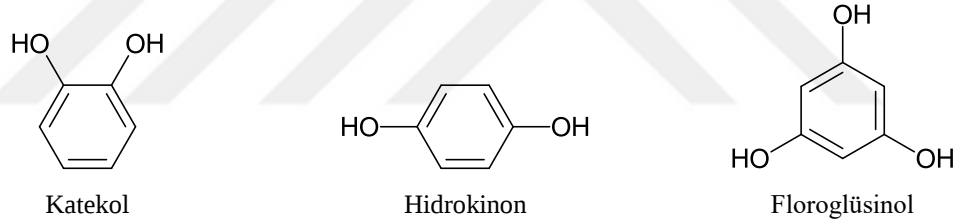
Daha karmaşık yapıdaki fenolikler ise önceki sınıflara ilaveten üç ana sınıfta gruplandırılmıştır. Bu grubun ilk sınıfı (IV) fenolik dimerler [$(C_6-C_1)_2$, $(C_6-C_3)_2$, $(C_6-C_2-C_6)_2$, $(C_6-C_3-C_6)_2$] ve yoğunlaşma tepkimelerinden elde edilen oligomerik ürünlerdir. Sonraki sınıf (V), genel formülü $(C_6)_n$, $(C_6-C_3)_n$, $(C_6-C_3-C_6)_n$ olan ve Polimerik Fenoller sınıfında yer alan polimerlerdir.

Terpenler ve lipidler gibi doğal bileşikler ile fenoliklerin hibritleri olarak bulunan bileşikler içeren son sınıf ise (VI) Hibrit Fenoliklerdir. Bitkisel fenolik bileşiklerin, Tsimogiannis ve Oreopoulou (2019) tarafından belirlenen yeni sınıflandırma sistemine göre düzenlenmiş başlıca sınıfları şu şekildedir:

- I. C₆ Fenolik Bileşikler
- II. C₆-C_n (1≤n≤4) Fenolik Bileşikler
- III. C₆-C_n-C₆ (1≤n≤3, veya n=7) Fenolik Bileşikler
 - a. Ksantonoidler, Stilbenoidler, Antrakinonlar, Antronlar ve Diaril Heptanoidler
 - b. C₆-C₃-C₆ Fenolikler: Flavonoidler
- IV. Fenolik Dimerler ve Yoğunlaşma Ürünü Oligomerler.
- V. Polimerik Fenoller (C₆)_n, (C₆-C₃)_n ve (C₆-C₃-C₆)_n (n>12)
- VI. Hibrit Fenolikler

2.1.1. C₆ fenolik bileşikler

Bu sınıfta yer alan fenolikler (Şekil 2.1), tıbbi ve aromatik bitkilerde oldukça az miktarlarda bulunan katekol, hidrokinon ve floroglüsinol (*İng.* phloroglucinol) gibi basit fenolik bileşiklerdir.



Şekil 2.1. Bazı C₆ fenolik bileşikler.

Katekol, *Gaultheria* spp.'nin (Keklik üzümü) yapraklarında bulunmaktadır. Hidrokinonun O-glikozitli bileşiği arbutin ise yaban mersini, turna yemişi, kırmızı yaban mersini gibi *Vaccinum* türlerinin ve armut (*Pyrus communis* L.) ağaçlarının yapraklarında bulunmaktadır (Lattanzio, 2013). Ayrıca, diğer bitkilere kıyasla en zengin arbutin kaynağının, bitki kuru ağırlığının %15 ile %23 arasında değişen miktarlarda olmak üzere *Bergenia crassifolia* L. (Kış ortancası) olduğu bildirilmiştir. Floroglüsinol, çeşitli turunçgillerin meyve kabuklarında glikozit formunda bulunmaktadır (Carmen ve ark., 2009; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

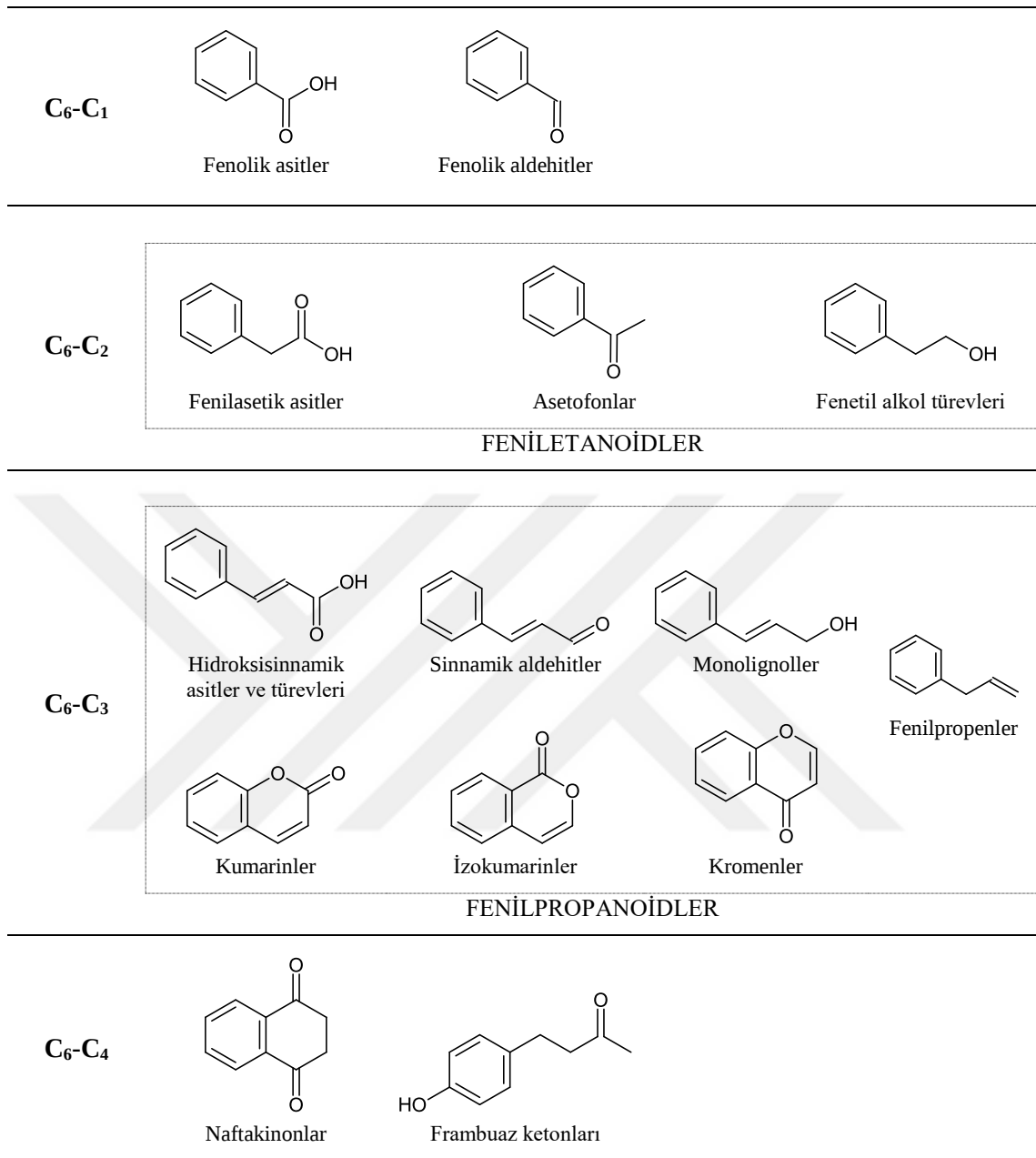
2.1.2. C₆-C_n (1≤n≤4) fenolik bileşikler

C₆-C_n sınıfı bitkisel fenolik bileşikler, bir önceki sınıfa göre daha yaygındırlar. C₆-C₁ fenolik bileşikleri kategorisinde benzoik asit ve benzaldehit türevleri bulunmaktadır. Bu grubun hidroksi ve/veya metoksi süstitüsyon modelleri Şekil 2.2’de, temel iskelet yapıları ise Şekil 2.3’te gösterilmiştir. *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik ve sirinjik asitlerin glukoz esterleri sık görülmese de hidroksibenzoik asit bileşikleri genellikle glikozit formunda bulunurlar. Meyve ve sebze türlerinin en önemlilerinde bilinen hidroksibenzoik asit bileşikleri, eser miktardaki konsantrasyonlarda bulunmaktadır (≤1 ppm). Vanilin, aroma bileşeni ve tatlandırıcı olarak yaygın kullanımı olan, muhtemelen en önemli fenolik aldehittir (Herrmann ve Nagel, 1989; Tomás-Barberán ve Clifford, 2000; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Fenolik asit	Fenolik aldehit
	H	OH	H	H	<i>p</i> -OH-benzoik asit	<i>p</i> -OH-benzaldehit
	H	H	H	OH	Salisilik asit	Salisilaldehit
	H	OMe	H	H	<i>p</i> -Anizik asit	<i>p</i> -Anizaldehit
	OH	OH	H	H	Protokatekuik asit	<i>p</i> -Protokatekualdehit
	OH	H	OH	H	Gentisik asit	Gentisalaldehit
	OMe	OH	H	H	Vanilik asit	Vanilin
	OH	OH	OH	H	Gallik asit	Gallik aldehit
	OMe	OH	OMe	H	Sirinjik asit	Siring aldehit

Şekil 2.2. C₆-C₁ fenoliklerinin temel iskeleti ile hidroksi- ve metoksi-süstitüsyon örnekleri.

C₆-C₂ kategorisi, feniletanoidler olarak adlandırılan fenilasetik asit, asetofon ve fenetil alkollerin hidroksilli ve/veya metoksi türevleri içermektedir. Şekil 2.3’te görüldüğü üzere bu familyaların temel iskeletinde süstitüsyon biçimleri 3- veya 4-monohidroksi ya da 3,4-dihidroksi şeklinde olmaktadır. Çilek nektarında tanımlanan homogentisik asit, nadir bir durum olarak 2,5-hidroksi süstitüsyonuna sahiptir. Feniletanoidlerin önemli üyeleri olan hidroksitirozol ve oleurepin zeytin yapraklarında ve yağında bulunan kuvvetli antioksidanlardır (Chimi ve ark., 1991; Cabras ve ark., 1999; Gordon ve ark., 2001; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

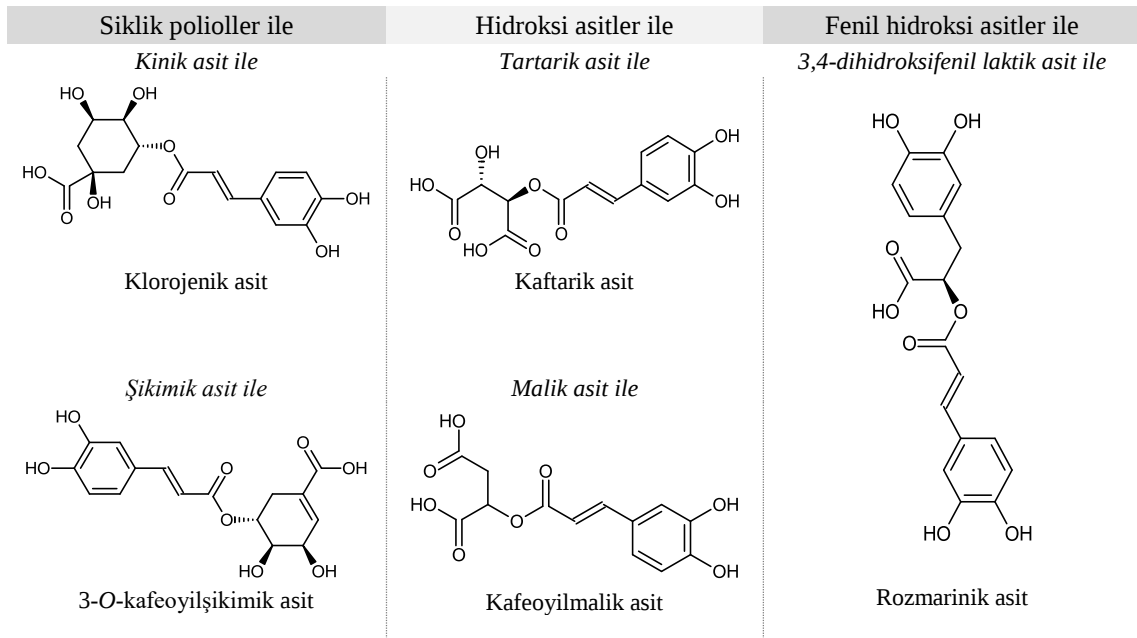


Şekil 2.3. C₆-C_n fenolik bileşiklerin temel iskeletleri.

C₆-C₃ kategorisi; hidroksisinnamik asitler, sinnamik aldehytler, monolignoller, fenilpropenler, kumarinler, izokumarinler ve kumaranları içeren fenilpropanoidlerdir. Hidroksisinnamik asitler, bitkiler aleminde oldukça yaygın bulunmalarından dolayı, hiç şüphesiz ki bu familyalar arasında en önemli olanlarıdır. En yaygın hidroksisinnamik asitler; *p*-kumarik (4-hidroksisinnamik) asit, kafeik (3,4-dihidroksisinnamik) asit ve ferulik (3-metoksi, 4-hidroksisinnamik) asittir. Buna karşın, 3,4,5-süstitüsüyonu yalnızca roybosta (*Aspalanthus linearis*) 3,4,5-trimetoksi-sinnamat şeklinde bulunmuştur (Rabe

ve ark., 1994). Hidroksisinnamik asitler bitkilerde genellikle serbest aglikonlar halinde bulunmazlar. Bunun yerine kinik asit gibi siklik polioller (siklitoller) veya tartarik asit ve 3,4-dihidroksifenil laktik asit gibi basit hidroksi asitlerle esterleşmiş halde bulunurlar. Hidroksi-süstitüe karboksilik asitlerin hidroksilleri ile kafeik asit esterleri Şekil 2.4'te yer almaktadır. Serbest veya bağ yapmış kafeik asitlerin istisnai bir kaynağı ise *Prunus virginiana*'nın meyvesi olan yabani kirazdır (*İng.* chokecherry) (Herrmann ve Nagel, 1989; El-Seedi ve ark., 2012; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

Kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenil laktik asidin esteri rozmarinik asit, Lamiaceae familyası üyelerinde oldukça yaygın bulunur. Rozmarinik asit, *Origanum vulgare* türünün temel bileşenidir ve *Origanum* türleri haricinde *Satureja thymbra*'da da oldukça yüksek miktarda bulunur (Shan ve ark., 2005). Bununla birlikte, en yüksek konsantrasyonda rozmarinik asit içeren bitki *Melissa officinalis*'tir (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019). Rosmarinik asidin, herpes virüsleri ve enterovirüs 71'e karşı virostatik olduğu kanıtlandığı için bu fenolik bileşik araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Astani ve ark., 2012; Chen ve ark., 2017).



Şekil 2.4. Kafeik asidin siklitoller, hidroksil asitler ve fenil hidroksil asitler ile esterleri.

Diğer C₆-C₃ familyaları arasında *p*-kumaroyil alkol gibi monolignoller; lignin ve lignanların biyosentezi için öncül madde olarak görev yapar (Chiang, 2006). Monomerik

kumarinler; basit kumarinler, furanokumarinler ve piranokumarinler olarak kategorize edilmişlerdir (Borges ve ark., 2005; Bourgaud ve ark., 2006). İzokumarinler, yüksek bitkilerde daha nadir bulunmalarına rağmen temel iskeletlerindeki karbon ve oksijen gruplarındaki düzenlemeler nedeniyle oldukça fazla çeşitlilik arz ederler. Bunun yanı sıra, son yapılan araştırmalara göre izokumarinler antimikrobiyal, antikanser ve anti-HIV koruyucu etkileri ile oldukça geniş bir farmakolojik etkinliğe sahiptir (Saeed, 2016; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

2.1.3. C₆-C_n-C₆ (1≤n≤3 veya n=7) fenolik bileşikler

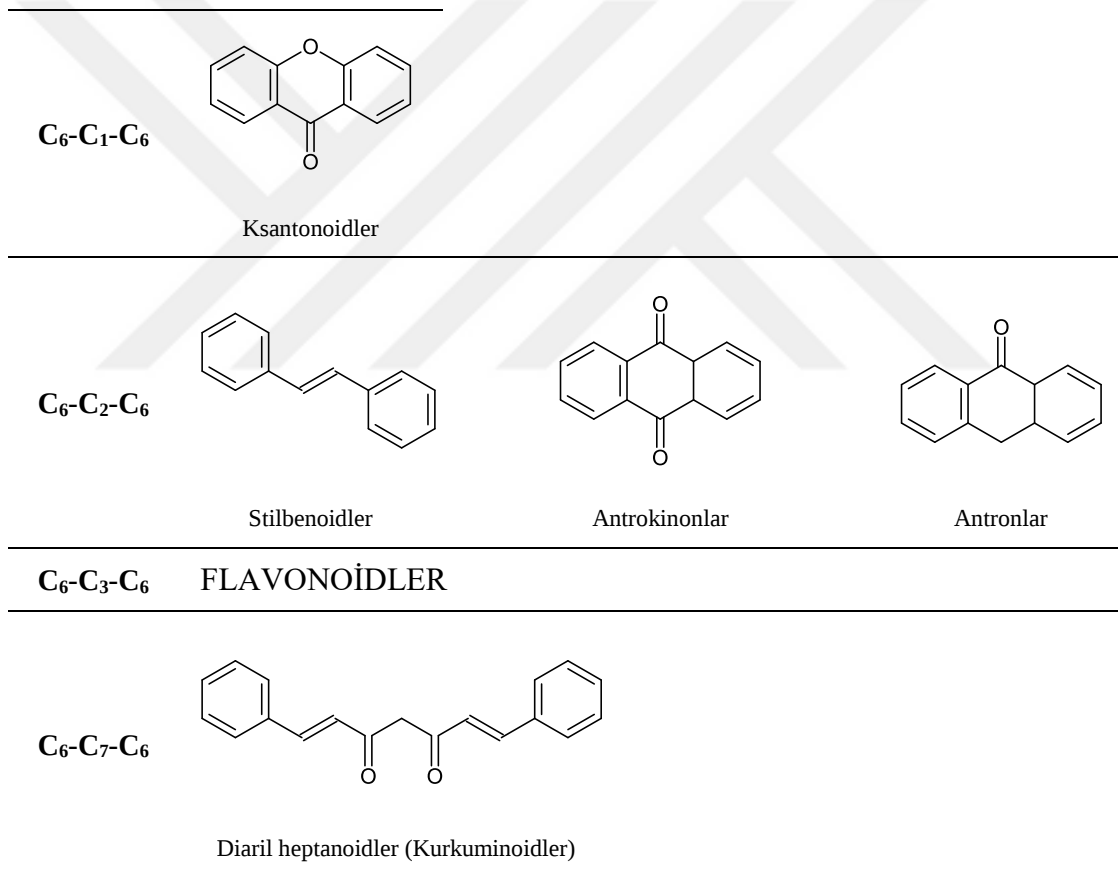
C₆-C_n-C₆ fenolik bileşikler sınıfı ksantonoidleri (C₆-C₁-C₆), stilbenoidler, antrakınonlar ve antronları (C₆-C₂-C₆), diaril heptanoidleri (C₆-C₇-C₆) ve flavonoidleri (C₆-C₃-C₆) kapsayan oldukça geniş bir sınıftır. Flavonoidler haricinde bu kategorilerin temel iskelet yapıları Şekil 2.5'te verilmiştir. Bitkiler aleminde oldukça geniş bir yayılımı olan, ayrı gruplar arasında çok çeşitli varyasyonları bulunan ve belki de en çok çalışılmış fenolikler olan flavonoidlerin sınıflandırılması ayrı bir bölüm olarak verilmiştir.

Ksantonoidler, stilbenoidler, antrakınonlar, antronlar ve diaril heptanoidler

Ksantonoidler genel olarak en çok Clusiaceae (Guttiferae), Gentianaceae, Moraceae ve Polygalaceae familyalarında bulunmaktadır. Ksantonlar ise yüksek bitkilerin 20 familyasından izole edilmişlerdir. Monomerik ksantonlar; basit ksantonlar, ksanton glikozitleri, prenillenmiş ksantonlar ve diğer ksantonlar olarak 4 ana başlık altında sınıflandırılmışlardır (Sultanbawa, 1980; Gales ve Damas, 2005; Vieira ve Kijjoa, 2005; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

Monomerik ve oligomerik stilbenoidler 33 bitki familyasında tespit edilmiştir (Shen ve ark., 2009). Stilbenoidler, odunsu metabolit olarak ve aynı zamanda temel ve etkileşimli savunma ajanları olarak görev yaparlar (Niesen ve ark., 2013). En iyi bilinen stilbenoid, kırmızı şarabın önemli bir bileşeni olan ve kardiyoprotektif özellikleri olan rezveratrol'dür. Bunun yanı sıra, yer fıstığı, böğürtlen ve bazı çalılar gibi diğer birkaç bitkide de bulunmaktadır (Sanders ve ark., 2000; Catalgol ve ark., 2012; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

Antrakinonların kimyasal yapıları C₉ ve C₁₀ pozisyonlarında iki karbonil grubu ihtiva eden bir antrasen halkası (trisiklik aromatik) ihtiva eder. Önemli miktarda antrakinon ihtiva eden bitki familyaları Rubiaceae, Rhamnaceae, Fabaceae, Polygonaceae, Bignoniaceae, Verbenaceae, Scrophulariaceae ve Liliaceae'dir (Izhaki, 2002). Bu grubun en iyi bilinen üyesi, çoklu tümör hücreleri üzerine antineoplastik etkisi kanıtlanmış olan aloe-emodindir [1,8-dihidroksi-3-(hidroksimetil)anthrakinon] (Chen ve ark., 2014; Liu ve ark., 2018). Antronlar, antrokinonların bir karbonil oksijenini yitirdiği indirgenmiş formlarıdır ve her iki kategori de bitkilerde genellikle birlikte bulunurlar (Evans ve ark., 1979; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).



Şekil 2.5. C₆-C_n-C₆ fenolik bileşiklerinin temel iskeletleri.

Diaril heptanoidler, bu kategorinin en iyi bilinen üyesi kurkumin nedeniyle kurkuminoidler olarak da adlandırılırlar. Kurkumin, Zingiberaceae familyası üyesi zerdeçalın (*Curcuma longa*) ana bileşenidir. Kan kolesterol seviyesinin düşürülmesi, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunun engellenmesi ve platelet

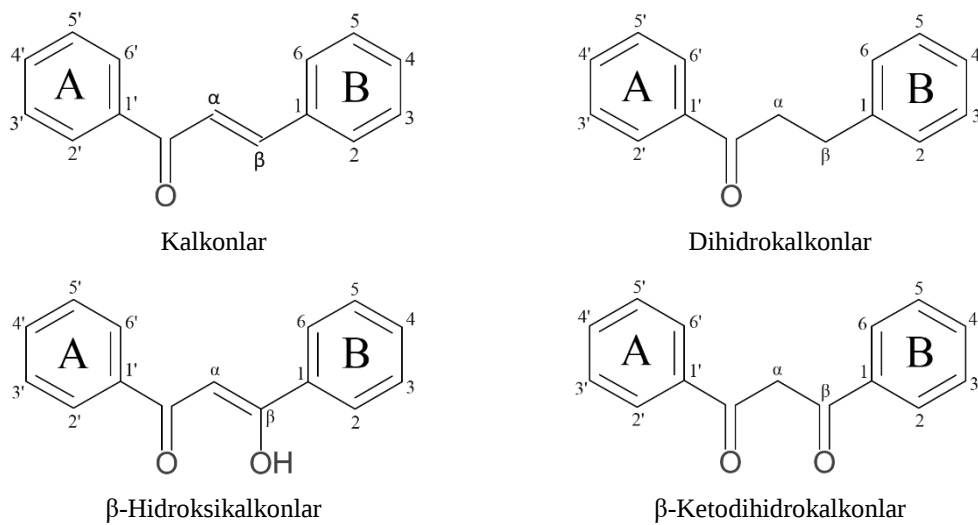
agregasyonunun engellenmesi gibi çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir (Itokawa ve ark., 2008).

C₆-C₃-C₆ fenolikleri: Flavonoidler

Flavonoidlerin alt kategorilere ayırımı; C₃ köprüsünün açık olması ya da kapalı ve üçüncü bir heterosiklik halka (C halkası) oluşturmaya dayanmaktadır. Böylelikle, flavonoid familyası iki gruba ayrılır; açık köprülü ve kapalı köprülü flavonoidler. Kapalı köprülü flavonoidler de 5 veya 6 üyeli heterosiklik halkalı flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. 6 üyeli heterosiklik halkalı flavonoidler ise 2-, 3- ve 4-fenil-kromen flavonoidler olmak üzere 3 gruba ayrılır. 2-fenil-kromen flavonoidler, 9 farklı tipte fenolik bileşikler (flavanlar, flavan-3-oller, flavononlar vs.) ihtiva ederler (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019)

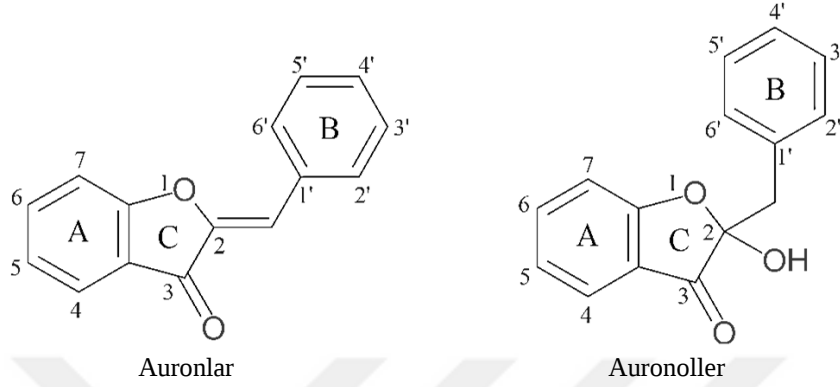
Açık köprülü flavonoidler

Bu ilk grubun üyeleri C₃ halkasında, A-halkasına bitişik bir karbonil grubunun mevcudiyeti ile karakterize edilirler. Bu kategorinin ana alt grubu ise α , β -çift bağı oluşturan “kalkonlar”dır (Şekil 2.6). Kalkonlar, kapalı köprülü flavonoid biyosentezinde öncül bileşikler teşkil ettikleri için, eser miktarlarda bile olsa birçok bitkide tespit edilmiştir (İbrahim, 2000).



Şekil 2.6. Açık köprülü flavonoidlerin temel ve ikincil kategorileri.

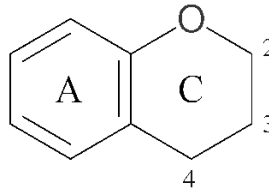
tarafından kullanılmıştır. İlk auronol ise 1960 yılında Birch tarafından tanımlanmıştır (İbrahim, 2000; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).



Şekil 2.8. 5 üyeli heterosiklik halkalı flavonoidlerin iki grubu.

6 üyeli heterosiklik halka flavonoidleri

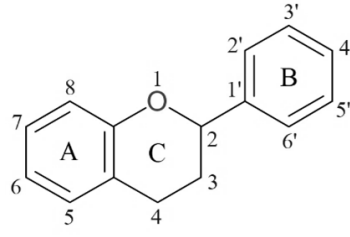
Bu alt gruba ait bileşiklerin temel iskeleti olan “kromen” halkası (benzodihidropropan) Şekil 2.9’da gösterilmiştir. Bu kategorinin alt gruplara ayrılmasının temeli, B-halkasının C-halkasına, heterosiklik halkanın 2-, 3- veya 4-karbonundan bağlanıp bağlanmaması durumuna dayanmaktadır.



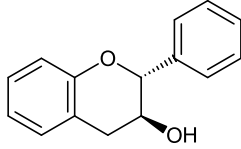
Şekil 2.9. Kromenin yapısı.

a) 2-fenil-kromen flavonoidleri

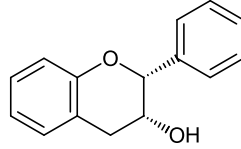
Doğada en fazla miktarda bulunan en önemli flavonoidlerdir. C-halkasındaki süstitüe elementlere göre; 4-karbonil, 3-hidroksil, 4-hidroksil, 2,3 çift bağ içeren ya da farklı kombinasyonlarda flavilum katyonlarına göre ayırt edilen tipleri mevcuttur. 2-fenil-kromen flavonoidleri, süstitüentlerin çeşit ve sayısına göre 9 tipe ayrılır. Temel yapıları Şekil 2.10’da verilmiştir.



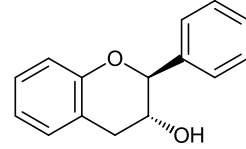
Flavanlar



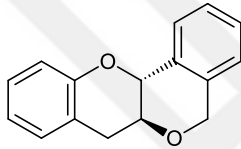
Kateşinler



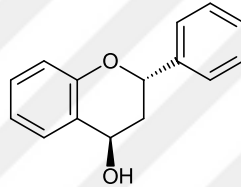
Epikateşinler



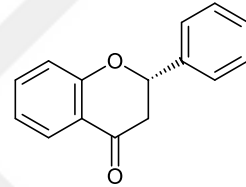
Enantiyokateşinler



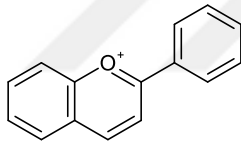
Peltoginoid flavanlar



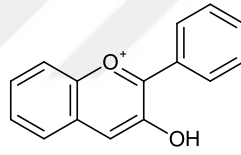
Flavan-4-oller



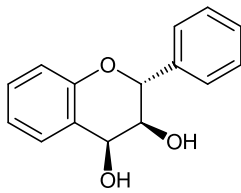
Flavononlar



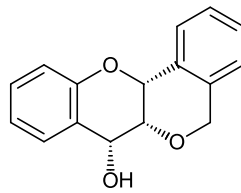
3-Deoksiantosiyanidinler



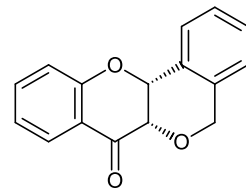
Antosiyanidinler



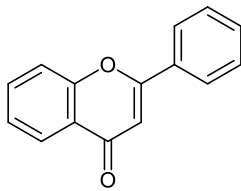
Flavan-3,4-dioller



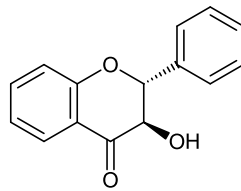
Peltoginoid flavan-4-oller



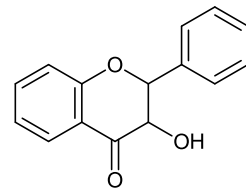
Peltoginoid flavan-4-onlar



Flavonlar



Dihidroflavonoller



Flavonoller

Şekil 2.10. 2-fenilkromen flavonoid gruplarının temel yapıları.

- i. Flavanlar: C-halkasında sübstitue element ihtiva etmezler ve bitkilerde nispeten nadir olarak bulunurlar (Harborne, 2013).
- ii. Flavan-3-oller veya Kateşinler: Flavan-3-oller ve kateşinler diastereomerlerdir ve 2,3-çift bağı bulunmamasından dolayı yalnızca 3-hidroksil ihtiva ederler. 2R, 3S konfigürasyonları temel olanıdır, 2R, 3R türevleri için “epi” öneki kullanılır. 2S konfigürasyonlu olan flavan-3-oller için “enantiyo” (ent.) öneki kullanılır. Peltoginoid flavanlardaki oksijenin 3-atomunun B-halkasındaki 6-metil sübstitenti ile eter bağı oluşturması flavan-3-oller için özel bir durumdur (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).
- iii. Flavan-4-oller: Flavan-4-ollerin spesifik türevleri C-halkasında yalnızca 4-OH ihtiva ederler.
- iv. Flavononlar: 4-Karbonil, flavonon C-halkasının yegâne sübstitüsyonudur ve C-2 üzerinde kiral merkez ihtiva ederler. Genel konfigürasyonları 2S’tir (İbrahim, 2000).
- v. Antosiyanidinler: Antosiyanidinlerin heterosiklik halkası pirilyum yapısına sahip olduğu için bazı bileşikler 2-fenilbenzopirilyum tuzları formunda bulunurlar. C-halkası genellikle ilaveten 3-OH sübstitüsyonu teşkil eder. Antosiyanin olarak adlandırılan glikozitleri de dahil olmak üzere, doğada yaklaşık 300 üyesi tanımlanmıştır. Antosiyanidinler çiçekler, yapraklar, meyveler ve hatta bitki köklerinde gözlemlenen camgöbeği (cyan), menekşe ve kırmızı renklerin oluşmasını sağlarlar (Harborne, 2013).
- vi. Flavan-3,4-dioller: C-halkasında iki hidroksil ihtiva ederler. Flavan-3,4-dioller, flavan-4-oller ile birlikte lökoantosiyanidinleri oluştururlar (Harborne, 2013). Lökoantosiyanidinler peltoginoid flavan-4 α -oller ve peltoginoid flavan-4-oller de içerirler. Peltoginoidler (veya homoflavonoidler), 3-OH ve C-2 arasında spesifik bir siklizasyon ile modifiye olan nadir bir flavonoid türü olan peltoginan iskeleti ile temsil edilen bir flavonoid türüdür (Galarraga Montes ve Amaro-Luis, 2016).
- vii. Dihidroflavonoller, Flavanonoller veya 3-Hidroksiflavononlar: Bu grubun üyelerinde 4-karbonil ve 3-hidroksilin her ikisi de bulunmaktadır. Flavonol ve antosiyanidin biyosentezinde ara üründürler (İbrahim, 2000).

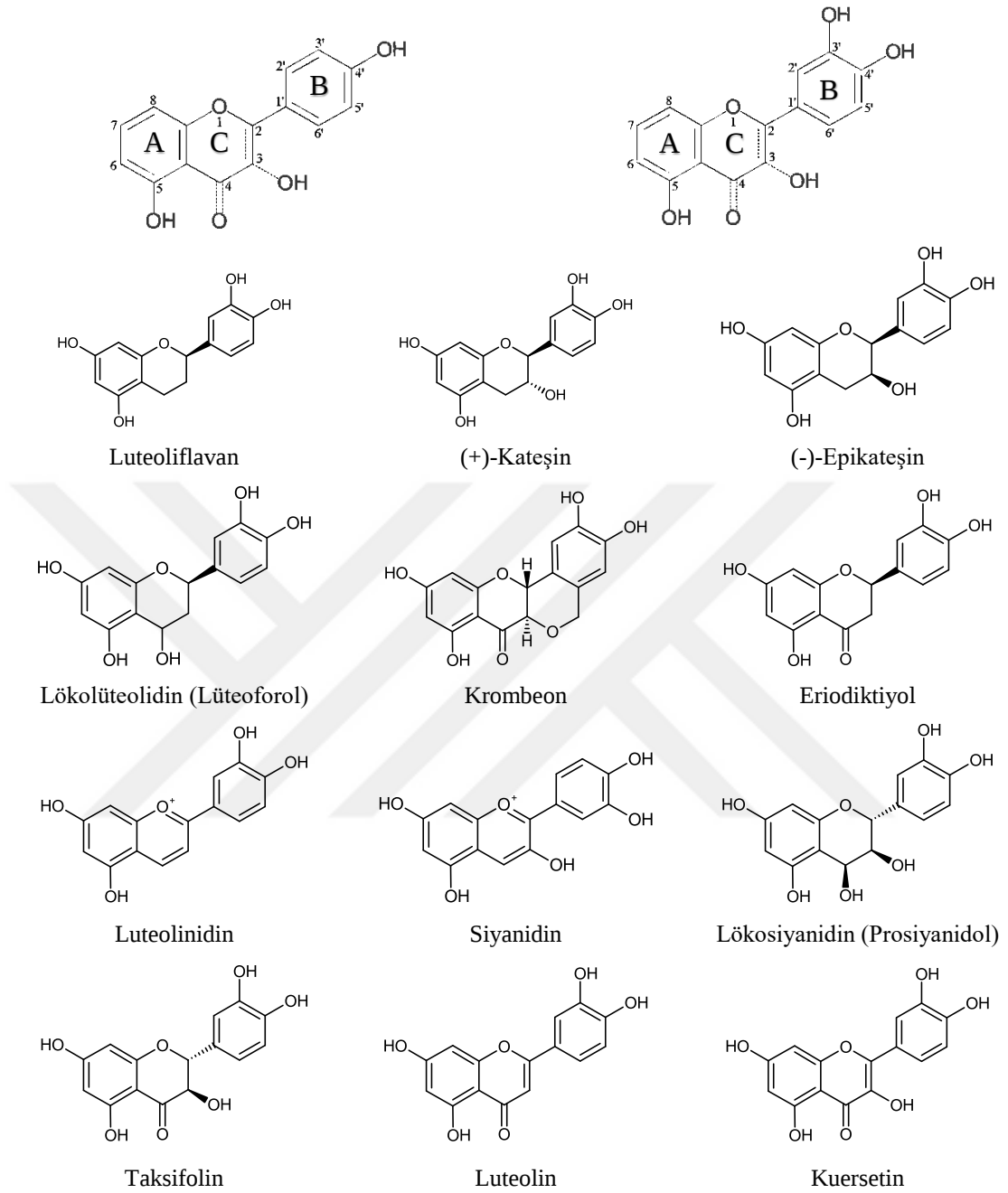
viii. Flavonlar: C-halkasında 4-karbonil ve 2,3-çift bağ olmak üzere iki süstitüent içeren flavonlar, flavonoid tipleri arasında en önemli olanlardan birisidir. Flavonlar, glikozitleri ile birlikte 2500'den fazla tanımlanmış üyeleri ile oldukça büyük bir gruptur (Harborne, 2013).

ix. Flavonoller: Flavonlar kadar büyük bir grup olan flavonoller, C-halkasında 4-karbonil, 3-hidroksil ve 2,3-çift bağ olmak 3 tane süstitüsyon elementi bulundururlar (Harborne, 2013).

5,7,3',4'-tetrahidroksi süstitüsyonlu 2-fenilkromen flavonoidlerinin genel örnekleri Şekil 2.11'de, birçok bitki familyasında bulunan bazı örnekleri ise Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1. 5,7,3',4'-hidroksi süstitüsyonlu 2-fenilkromen temel iskeletine sahip flavonoidler ve bulundukları bazı bitkiler (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019'dan değiştirilerek)

Flavonoid sınıfı	Flavonoidin ampirik adı	Bulunduğu başlıca bitki türleri
Flavan	Luteoliflavan	<i>Viscum tuberculatum</i> (Kubo ve ark., 1987) <i>Malus domestica</i> (Roemmelt ve ark., 2003)
Flavan-3-ol	(+)-Kateşin (-)-Epikateşin	<i>Lawsonia inermis</i> (Mustafa ve ark., 2010)
Peltoginoid flavan	Krombeon	<i>Acacia crombei</i> (Brandt ve ark., 1981)
Flavan-4-ol	Lökoluteolidin	<i>Sorghum vulgare</i> (Bate-Smith, 1969) <i>Fragaria spp.</i> (Bate-Smith ve Creasey, 1969)
	Lökosiyanidin	<i>Malus domestica</i> (Ju ve ark., 1997)
Flavanon	Eriyodiktiyol Homoeriyodiktiyol (3'-O-metil-eriyodiktiyol)	<i>Eriodictyon californicum</i> (Reichelt ve ark., 2010) <i>Mentha piperita</i> (Rodríguez-Solana ve ark., 2015) <i>Origanum vulgare</i> (Rodríguez-Solana ve ark., 2015) <i>Thymus vulgaris</i> (Rodríguez-Solana ve ark., 2015)
Dihidroflavonol	Taksifolin	<i>Pseudotsuga menziesii</i> (İbrahim, 2000)
Antosiyanidin	Luteolinidin	<i>Zea mays</i> (İbrahim, 2000) <i>Sorghum spp.</i> (Awika ve ark., 2005)
	Siyanidin	<i>Fragaria spp.</i> (Dzhanfezova ve ark., 2020) <i>Solanum melongena</i> (Niño-Medina ve ark., 2017)
		<i>Ribes nigrum</i> (Desjardins ve ark., 2012) <i>Sambucus nigra</i> (Kaack ve Austed, 1998)
Flavon	Luteolin	<i>Reseda luteola</i> (Cerrato ve ark., 2002)
Flavonol	Kuersetin (5,7,4'-hidroksi-süstitüsyon)	<i>Quercus tinctoria</i> (Ferreira ve ark., 2004) <i>Allium cepa</i> (Price ve Rhodes, 1997) <i>Brassica oleracea</i> (Mageney ve ark., 2017)
	Kemferol (5,7,4'-hidroksi-süstitüsyon)	<i>Phaseolus vulgaris</i> (Hu ve ark., 2006) <i>Brassica oleracea</i> (Olsen ve ark., 2009) <i>Camellia sinensis</i> (Lee ve ark., 2019) <i>Spinacia oleracea</i> (Roberts ve Moreau, 2016)
	Mirisetin (5,7,3',4',5'-hidroksi-süstitüsyon)	<i>Corylus avellana</i> (Riethmüller ve ark., 2013) <i>Camellia sinensis</i> (Lee ve ark., 2019)
		<i>Fragaria spp.</i> (Sultana ve Anwar, 2008)

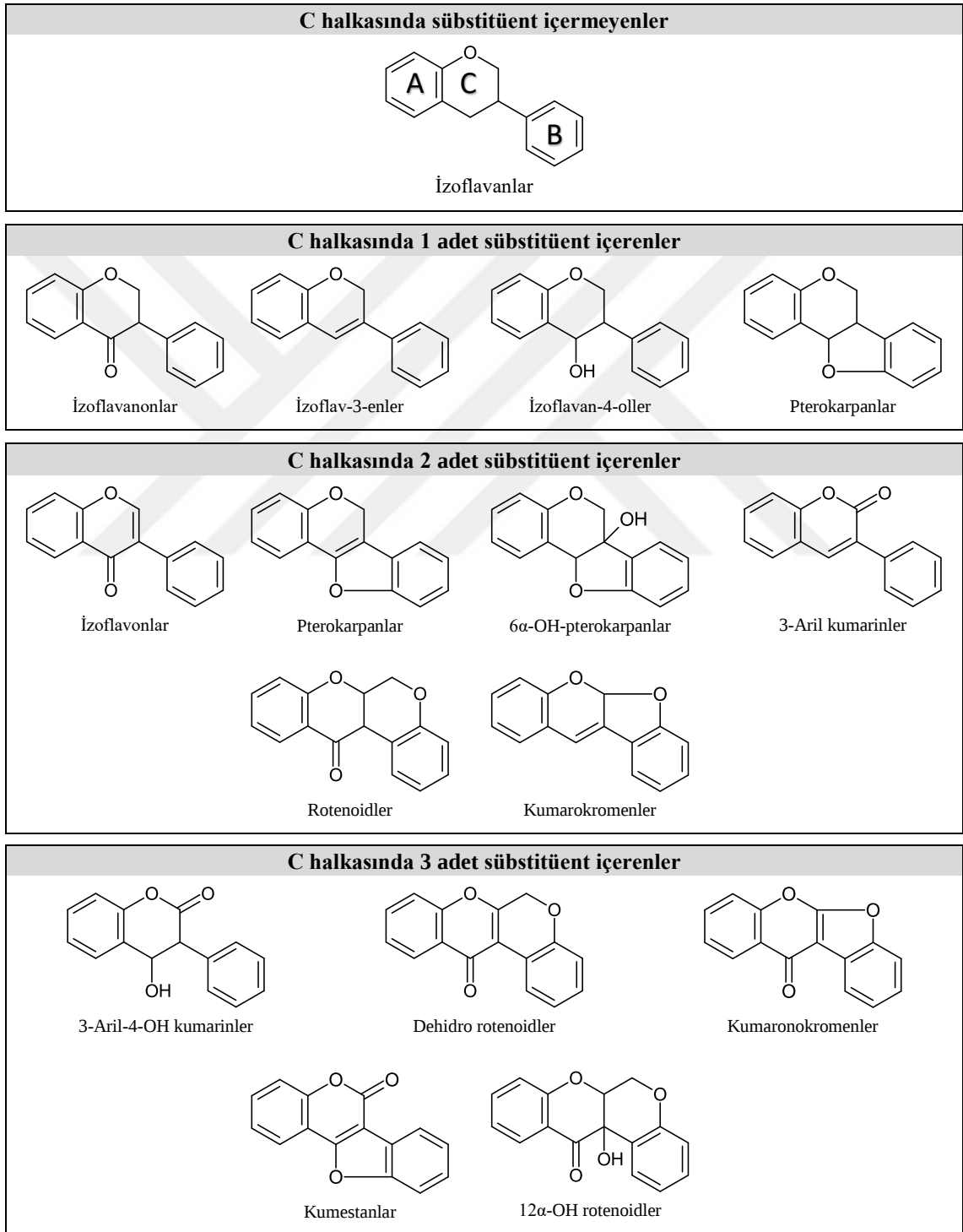


Şekil 2.11. 5,7,3',4'-tetrahidroksi sübstütüsyonlu 2-fenilkromen flavonoidlerinin yapıları ve ampirik isimleri

b) 3-fenil-kromen flavonoidleri (İzoflavonoidler)

İzoflavonoidler, bitkiler aleminde en çok ve baskın bir şekilde Fabaceae familyasının Papilionoideae alt familyası üyelerinde bulunduğu için özel bir gruptur. İzoflavonoidler aynı zamanda Iridaceae familyası üyelerinde de oldukça yaygın olarak bulunur (İbrahim, 2000). Doğada sınırlı dağılım göstermelerine rağmen, aynı zamanda tiplerinin

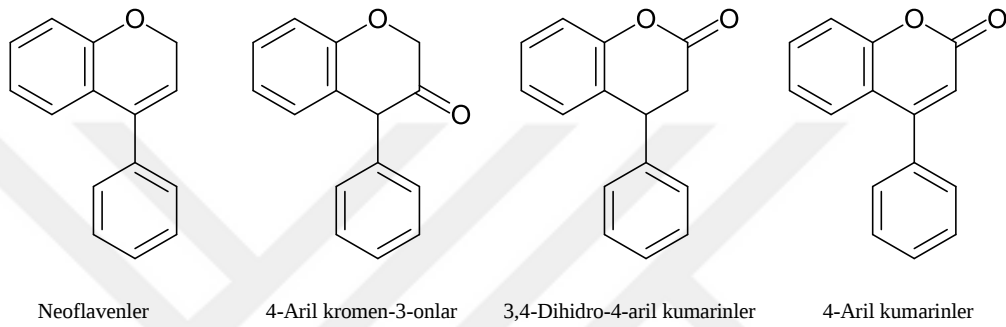
kategorizasyonunu da sağlayan C-halkasındaki yapıların çeşitliliği çok fazladır (Harborne, 2013). Şekil 2.12’de, C-halkasındaki süstitüsyonların tipi ve sayısına göre izoflavonoid türlerinin yapısı gösterilmektedir. En kalabalık izoflavonoid grubu, 360 kadar aglikon ihtiva eden izoflavonlardır.



Şekil 2.12. 3-fenil-kromen flavonoid gruplarının temel yapıları.

c) 4-fenil-kromen flavonoidleri (Neoflavonoidler)

En yeni keşfedilen flavonoid grubudur. İlk olarak 1955 yılında Judith Polonsky tarafından *Calophyllum inophyllum*'da (Guttiferae, Clusiaceae) keşfedilmiştir (Gautier ve ark., 1972). Daha sonraları Guttiferae alt familyasının diğer üyelerinin yanı sıra Fabaceae ve Rubiaceae familyalarının üyelerinde de tespit edilmişlerdir (Harborne, 2013). Neoflavonoidlerin alt grupları Şekil 2.13'te gösterilmiştir.



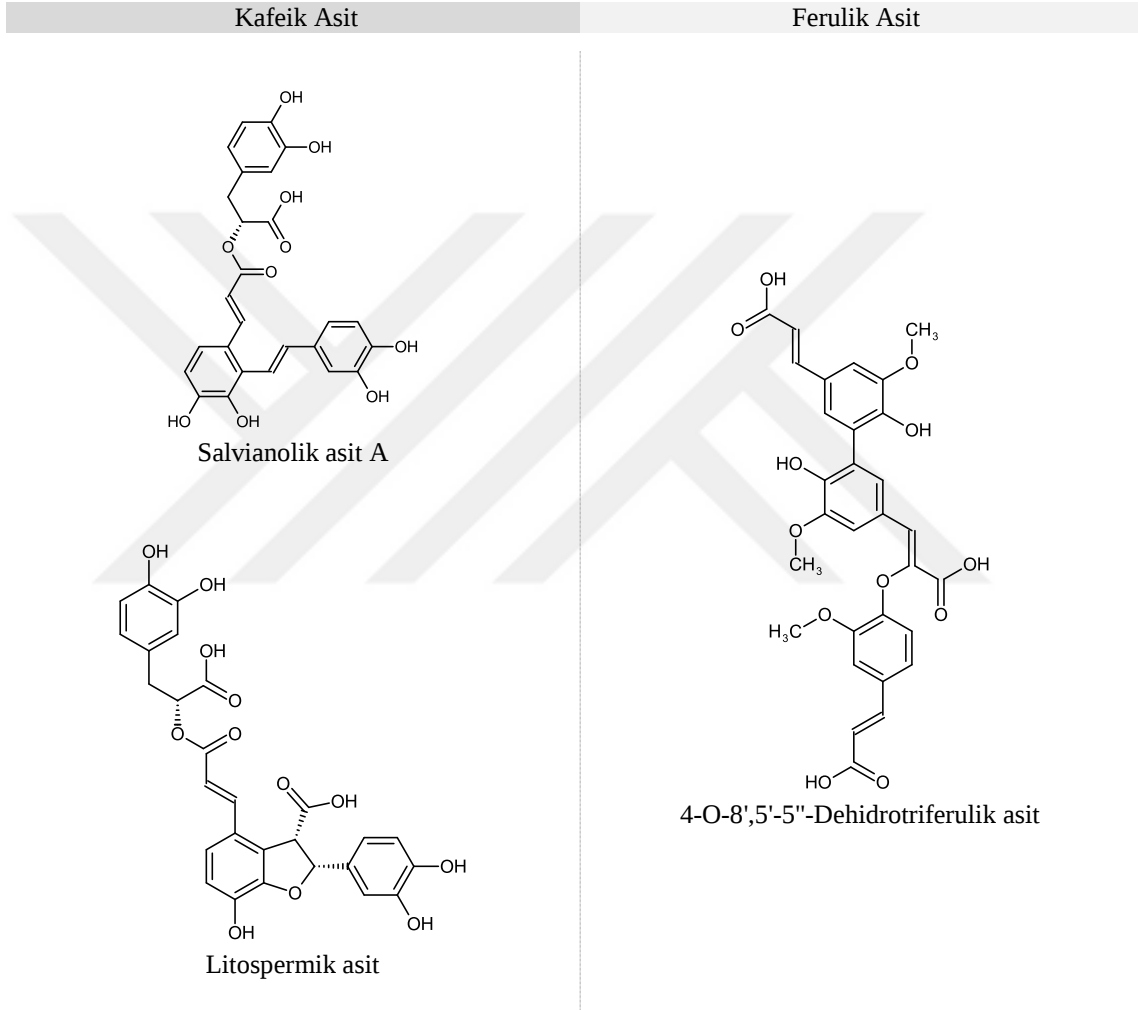
Şekil 2.13. Bilinen 4-fenil-kromen flavonodlerinin temel moleküler yapıları.

2.1.4. Fenolik dimerler ve kondensasyon ürünü oligomerler

C_6-C_n sınıfı dikkate alındığında, C_6-C_1 ve C_6-C_3 kategorilerine ait üyelerin dimerik ürünler oluşturabildiği görülmektedir. C_6-C_1 kategorisinden gallik asitin dimerizasyonu ile ellajik asit olarak adlandırılan karakteristik bir dimer $[(C_6-C_1)_2]$ meydana gelir (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019). Ellajik asit; *Rubus idaeus*, *Fragaria ananassa* ve *Rubus fruticosus* meyvelerinde bol miktarda bulunmaktadır (Tomás-Barberán ve Clifford, 2000).

C_6-C_3 kategorisinin familyaları arasında monolignoller, sinamik asitler ve kumarinler dimer oluştururlar $[(C_6-C_3)_2]$. Monolignollerin ilgili dimerleri lignanlar olarak adlandırılırlar ve besin olarak kullanılan bitkiler arasında en yüksek lignan kaynağının keten (*Linum usitatissimum*) olduğu bildirilmiştir (Touré ve Xueming, 2010). Kumarinler ve izokumarinler de doğal fenolik dimerlerdir. Hidroksisinnamik asitlerden ferulik asitin, dimerler ve oligomerler oluşturabildiği bildirilmiştir (Bunzel ve ark., 2006). Ferulik asitin dimerlerinin ve trimerlerinin iki karakteristik örneği Şekil 2.14'te gösterilmiştir.

Ferulik asitin aksine, kafeik asit dimer oluşturmaz. Bununla birlikte, kafeik asitin 3,4-dihidroksifenil laktik asit (rozmarinik asit) ile esterleri kafeik asit ile kondensasyon ürünleri oluşturur. Ürünler, kafeik asitin trimer ve tetramerlerine benzese de böyle adlandırılmaları mümkün değildir. Salvianolik asit A ve litospermik asit olarak adlandırılan iki trimer benzeri yapı Şekil 2.14’te verilmiştir.

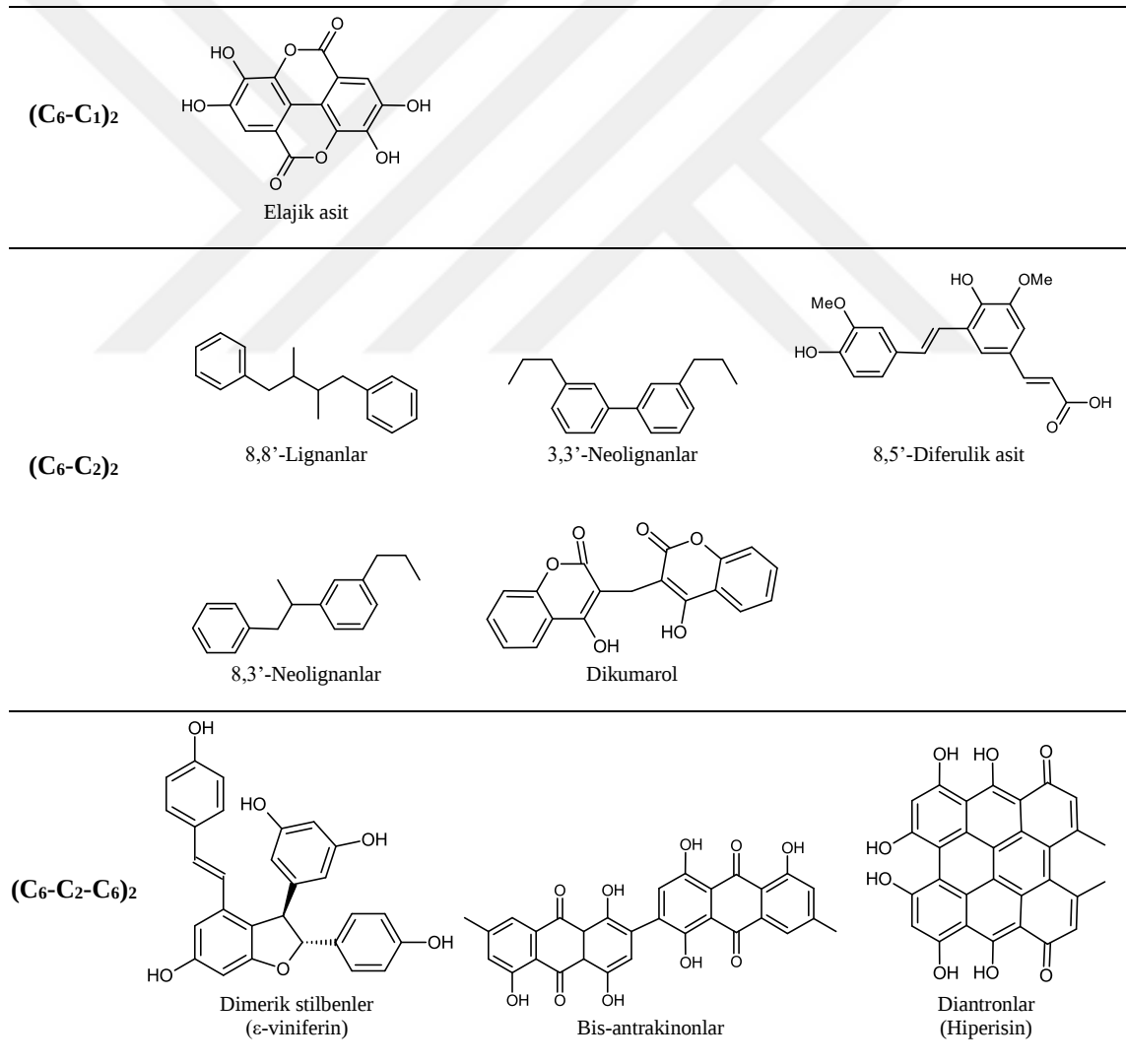


Şekil 2.14. Yoğunlaşma reaksiyonları ile üretilen hidroksisinnamik asit trimerleri.

Kafeik asit oligomerleri *Origanum vulgare* gibi Lamiaceae familyası türlerinde ve *Satureja thymbra*’da tanımlanmıştır (Grevsen ve ark., 2009; Tsimogiannis ve ark., 2017). Buna karşın, bu tür ürünler bakımından en zengin olan bitki türü *Salvia miltiorrhiza*’dır (Ho ve Hong, 2011). Temelde “trimer” ve “tetramer” olan ve salvianolik asit A, B, C, D, vs. olarak karakterize edilen birkaç benzer bileşik tanımlanmıştır. Bu bileşikler

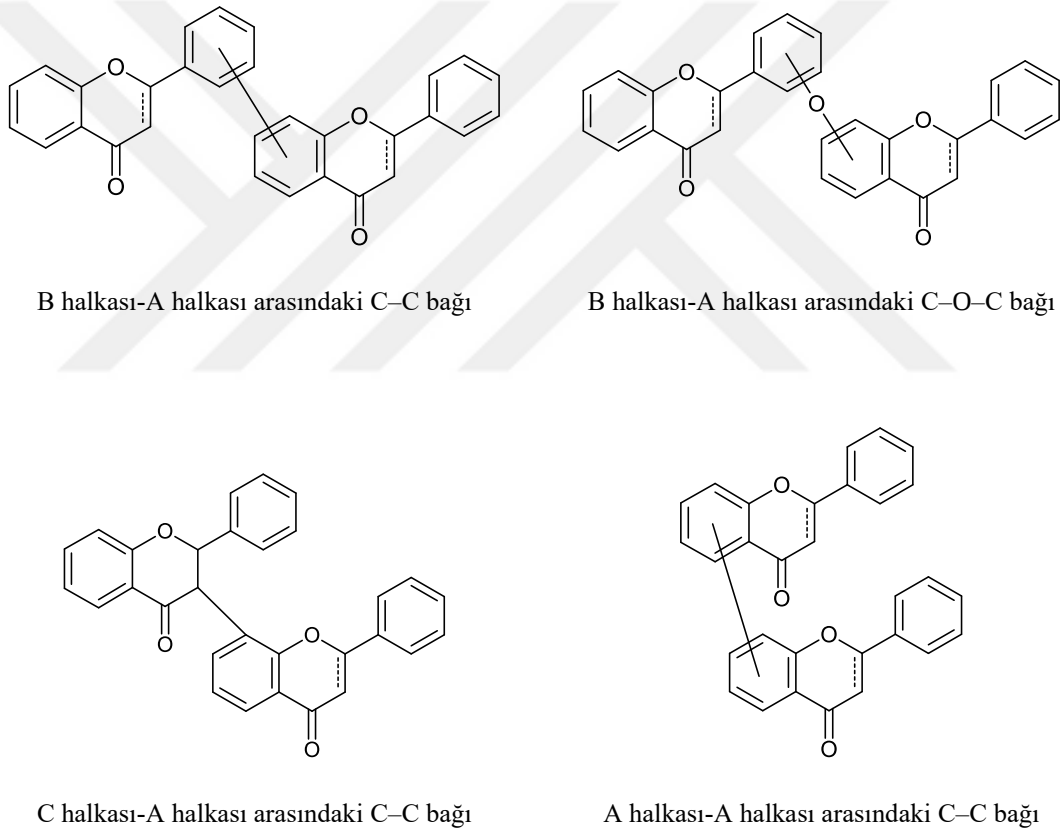
kondensasyon, tip ve monomerlerin lokasyonları bakımından farklılıklar göstermektedirler (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

Biksantonlar $(C_6-C_1-C_6)_2$ genel formülü ile karakterize edilirler. Ksantonolignoidler ise ksantonlar ve monolignollerin birleşiminden oluşan $(C_6-C_1-C_6)-(C_6-C_3)$ dimerlerinden meydana gelirler. Dimerlerin $(C_6-C_2-C_6)_2$ kategorisi, dimerik (ve oligomerik) stilbenoidler, bisantrokinonlar ve antronlar olmak üzere $C_6-C_2-C_6$ monomerik familyasının tüm bireylerini kapsamaktadır (Şekil 2.15). Di- ve oligostilbenler, homojen ve heterojen monomerik stilbenlerin birleşmesi ile meydana gelir.



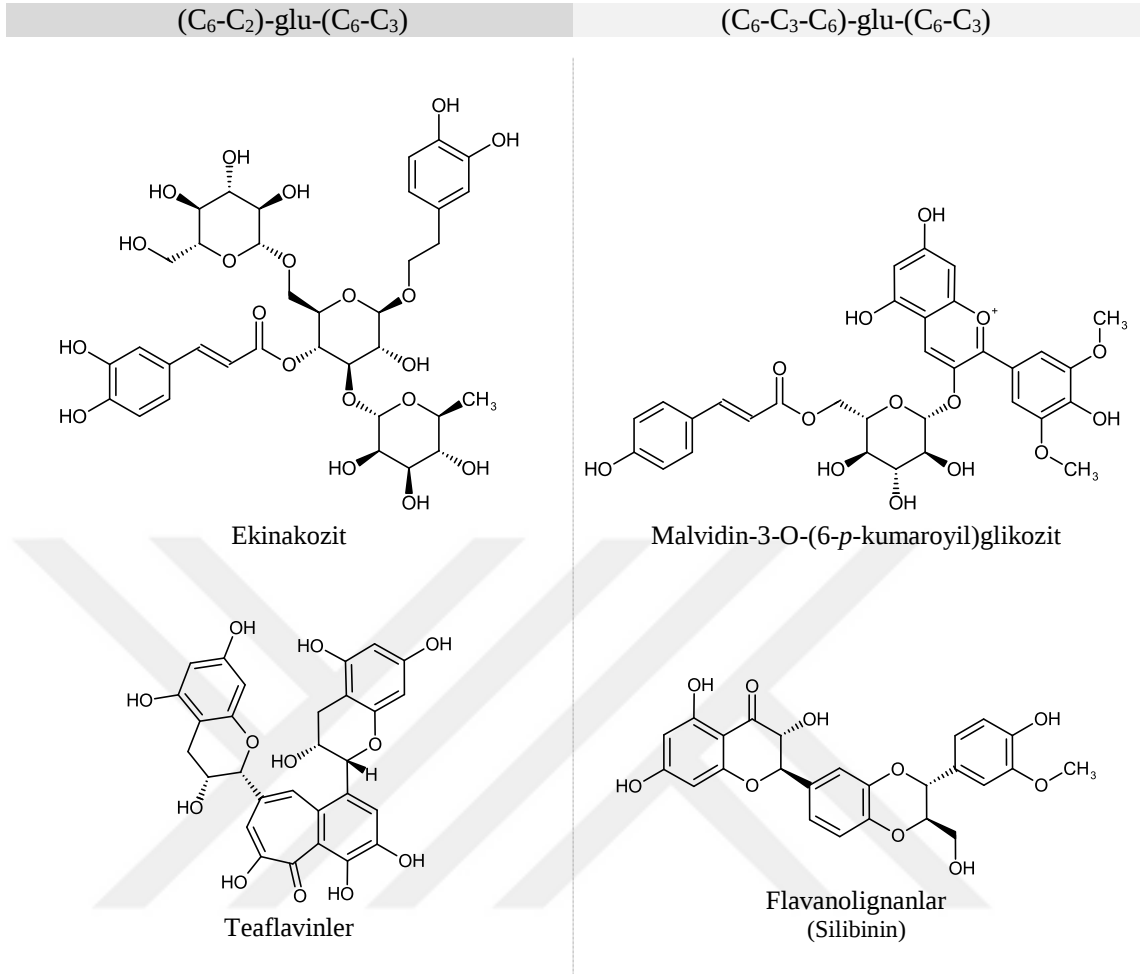
Şekil 2.15. Bazı fenolik dimerlerin yapıları.

Biflavonoidler ($C_6-C_3-C_6$)₂, flavonoid yapılarının oksidatif bağlanmaları ile meydana gelir ve bu nedenle her C-4'te bir karbonil grubu veya her yapı biriminde bunun eşdeğerini ihtiva ederler. İki birim arasındaki bağlanma A halkası-A halkası, B halkası-A halkası ve C halkası-A halkası arasında doğrudan bir C-C bağı veya B halkası-A halkası arasında meydana gelen bir eter bağına C-O-C her ikisi ile gerçekleştirilir (Şekil 2.16). C-4'te karbonil grubu bulundurmeyen biflavonoidler, 4-8 veya 4-6 bağı B tipi prosiyanidin dimerleridir (Rasmussen ve ark., 2005; Lattanzio, 2013; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

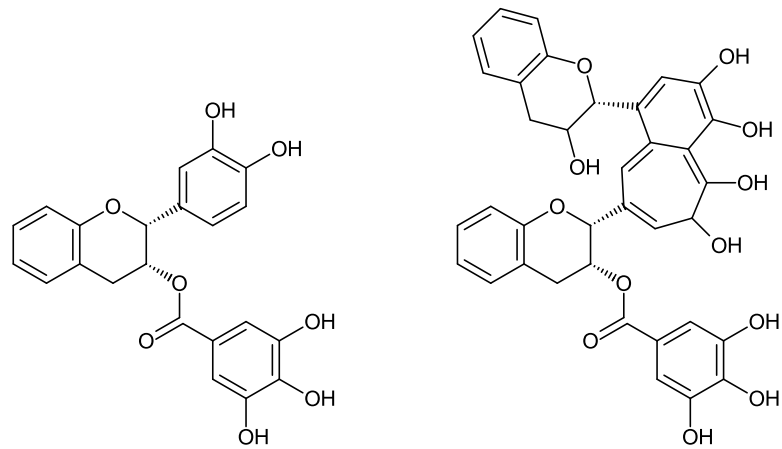


Şekil 2.16. Biflavonoidlerin genel yapıları.

Doğada, glukoz molekülünün iki monomer arasında köprü olarak görev yaptığı (C_6-C_2)-glu-(C_6-C_3) ve ($C_6-C_3-C_6$)-glu-(C_6-C_3) gibi iki farklı kategorinin birbiri ile karıştığı dimerler de meydana gelmektedir (Şekil 2.17). Bu bakış açısına göre, rozmarinik asit, (-)-epikateşin gallat, teaflavin gallat gibi (Şekil 2.18) farklı fenolikler arasındaki esterlerin karışık dimerler ve oligomerler olduğu teorisi ileri sürülebilir.



Şekil 2.17. Bazı fenolik dimerlerin yapıları.



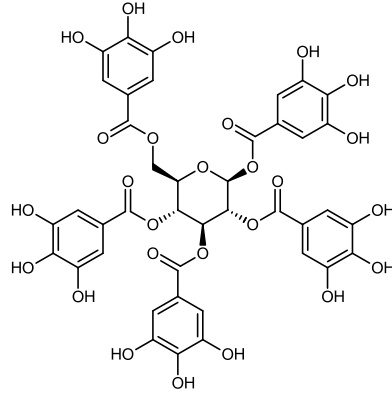
Şekil 2.18. Gallik asitin diğer fenolik bileşiklerin alkolik hidroksilleri ile esterleri.

2.1.5. Polimerik fenoller (C₆)_n, (C₆-C₃)_n ve (C₆-C₃-C₆)_n (n>12)

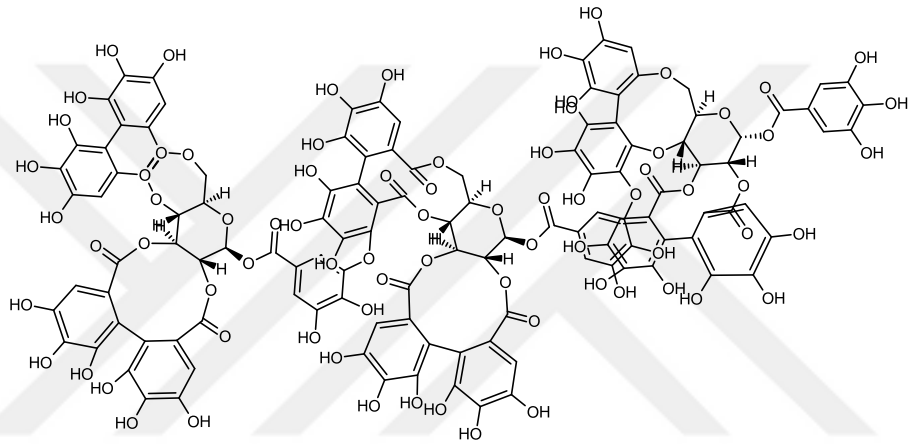
Ligninlerin kimyasal özellikleri nedeniyle polifenoller yerine polimerik fenol teriminin kullanımı daha doğru olarak kabul edilmektedir. White, Bate-Smith, Swain ve Haslam tarafından kabul edilen ve WBSSH tanımı olarak bilinen polifenol teriminin tanımına göre polifenoller (1) suda çözünebilen, (2) moleküler ağırlığı 500 – 4000 Da arasında olan, (3) nispi moleküler ağırlığı 1000’er Da olan 5 ila 7 aromatik halka üzerinde 12 ila 16 fenolik hidroksi grubu ihtiva eden ve (4) proteinler ve alkaloidler gibi diğer biyomoleküller ile çökelebilen kompleksler oluşturabilen bileşiklerdir. Bu tanım günümüzde giderek geçerliliğini yitirmektedir. Quideau ve ark. (2011)’na göre polifenoller; yalnızca şikimattan köken alan fenilpropanoid ve/veya poliketid yolağından gelen, temel yapısında herhangi bir azot-tabanlı fonksiyonel grup ihtiva etmeyen bitkisel sekonder metabolitlerdir. Bu tanım, en doğru tanım olmakla birlikte, bitkisel fenoliklerin sınıflandırılmaya çalışıldığı bu sisteme dimer ve oligomerlerin de dahil olması nedeniyle, herhangi bir yanlış anlaşılmaya mahal vermemek için, daha genel bir terim olan polimerik fenol terimi kullanılmıştır (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

Polimerik fenoller; tanenler ve ligninler olarak ikiye ayrılırlar. Tanenler, ekşimsi-buruk tat veren ve proteinlere bağlandığında çökelti oluşturan polifenollerdir. Hidrolize edilebilir tanenler, yoğun tanenler, kompleks tanenler, tearubiginler ve florotanenler (*İng.* phlorotannins) olarak gruplara ayrılırlar.

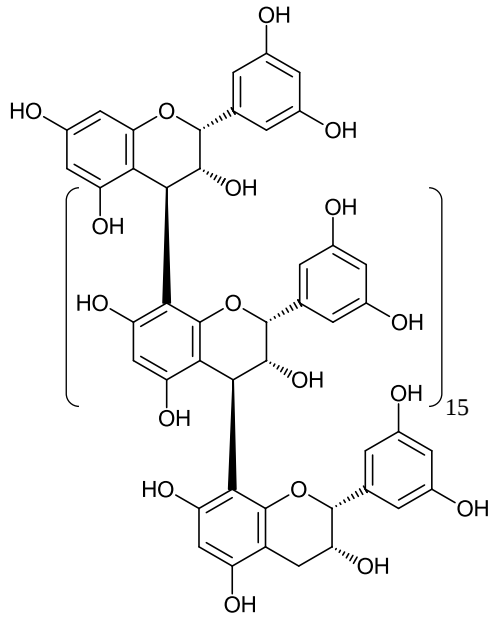
Hidrolize edilebilir tanenler nonflavonoid fenolik polimerlere dahildir ve bir molekül şekerin (glukoz ya da polisakkaridin) çok sayıdaki hidroksili ile gallik asitin esterleşmesi ile (galotanenler) veya gallik asidin dimeri olan ellajik asit ile esterleşmesi ile (ellajitanenler) meydana gelirler. Nonflavonoid hidrolize edilebilir tanenler, asidik koşullarda kolaylıkla monomerlerine ayrıştırılabilirler. Galotanenler ve elajitanenlerin karakteristik bazı örnekleri Şekil 2.19’da verilmiştir. 12 kadar esterleşmiş galoyil grupları ve merkezi glukoz ünitesi olan basit galotanenler, sumak (*Rhus spp.*) ve mazıda (*Thuja spp.*) bulunmaktadır (Hagerman, 2002). Elajitanenler ise meyveler, fındıksı meyveler, dutsu meyveler ve ahudududa (frambuaz) bol miktarda bulunmaktadır (Clifford ve Scalbert, 2000; Mullen ve ark., 2003; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).



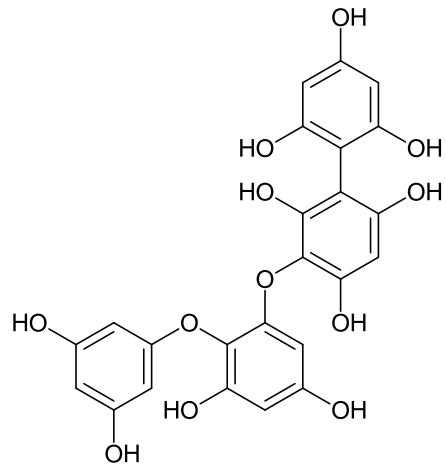
Pentagaloylglukoz



Elajitanen
(Lambertianin C)



Yoğun tanen
(Sorgum prosiyanidin)



Florotanen
(Fukodifloreto)

Şekil 2.19. Tanenlerin karakteristik örnekleri.

Flavanların ve flavan-3-ollerin oligomerleri proantosiyanidinler ya da yoğun tanenler olarak adlandırılır (Hagerman, 2002). Bu oligomerlerde yapısal birimler, prosiyanidin dimerlerinin B tipinde olduğu gibi, birbirlerini C–C bağı ile bağlanmıştır (Şekil 2.19). Yoğun tanenlerin asit ile muamelesi neticesinde flavonoidler arasındaki bağı oksidatif yıkımı gerçekleşir.

“Kompleks tanenler” ya da “flavanoelajitanenler” terimleri, yoğun tanenlerin yapısal elemanı olan kateşin monomerlerinin C–C bağı ile hidrolize edilebilir galo- veya elajitanenler ile birleşmesinden oluşan polifenol sınıfını tanımlamak için kullanılır. Bu maddelerin önemli bir kısmı, keşiflerinin hemen ertesinde tanımlanmıştır (Hagerman, 2002; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019). Florotanenler, tanenlerin doğada çok az mevcudiyeti olan bir kategorisini oluşturur. Özellikle alglerde bulunmaktadır ve kimyasal olarak floroglusinollerin oligomerleridirler (Şekil 2.19). Yüksek derecede hidrofiliklerdir ve monomerler arasındaki bağ C–C ve/veya C–O–C oksidatif bağlanma ile olur (Catarino ve ark., 2017; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019). Tearubiginler siyah çayda bulunurlar ve yeşil çayın enzimatik oksidasyonu ile oluşurlar. Yeşil çayın oksidasyonu ile oluşan benzer bileşikler olan teaflavinlerin aksine, tearubiginler polimer yapılarında polisakkaritler ve proteinler içermektedirler (Izawa ve ark., 2010; Kuhnert ve ark., 2010; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

Polimerik fenoller sınıfının ikinci kategorisini ligninler oluşturmaktadır. Lignin, bitkilerde en bol bulunan organik polimerlerden birisidir. Monolignollerin (kumaroyil, koniferil ve sinapil alkol) ve rastgele ve doğrusal olmayan bağlanmalar ile üç boyutlu bir ağ hasıl eden bir polimer olan lignanların karmaşık olarak bir araya gelmeleri ile oluşmaktadırlar (Vanholme ve ark., 2010; Chen, 2014; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

2.1.6. Hibrit fenolikler

Hibrit fenolikler sınıfı, fenolik terpenler ve fenolik lipitler olarak iki alt kategoriye ayrılmaktadır. Bu sınıf fenoliklerin hepsi nispeten nadir bileşikler olup biyolojik ve kimyasal olarak oldukça aktiftirler.

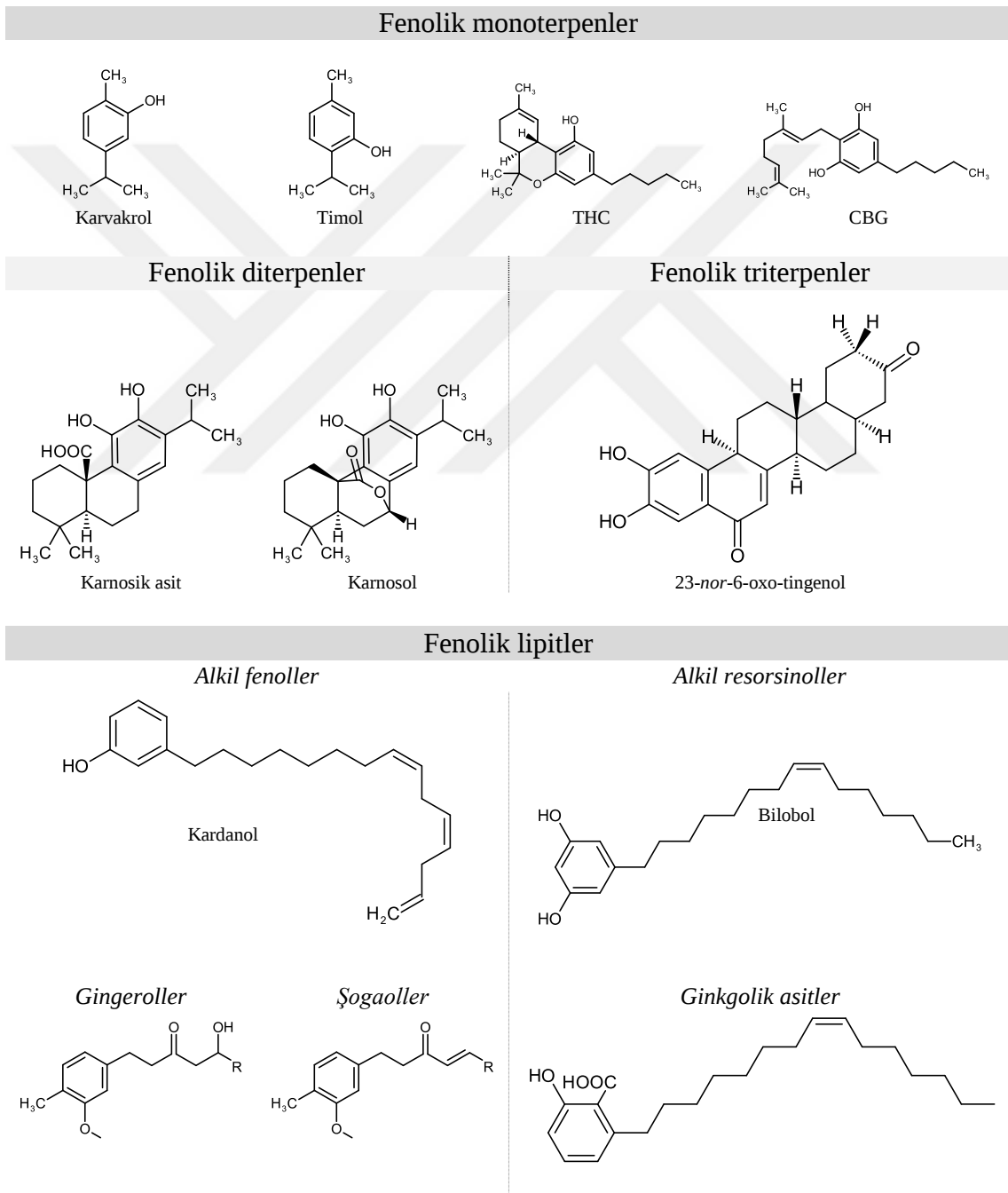
Fenolik terpenler sınıfı üç familyaya ayrılır; fenolik monoterpenler, fenolik diterpenler ve fenolik triterpenler. İzomerler olan karvakrol ve timol Lamiaceae familyasının karakteristik fenolik monoterpenleridir. Lamiaceae familyasının tüm cinslerinin uçucu yağında karvakrol bulunmakta, hatta bazı türlerde uçucu yağın %95 kadarını teşkil edebilmektedir (Baser, 2008; Pilau ve ark., 2011). Kanabinoidler de fenolik monoterpenler kategorisine dahildir. THC ve CBG, *Cannabis* cinsinde bulunan karakteristik fenolik monoterpenlerdir (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

Karnosik asit ve türevi karnosol, fenolik diterpenler kategorisine dahildir (Şekil 2.20). Karnosik asit Lamiaceae familyası cinslerinin sadece %4'ünde bulunan ve yaygın olmayan bir bileşiktir. Karnosik asidin en önemli kaynağı biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve sonrasında adaçayıdır (*Salvia officinalis*). *Origanum* ve *Thymus* cinsleri de çok düşük miktarlarda bu bileşiği ihtiva ederler. Karnosik asit ve karnosol yüksek antoksidan aktiviteye sahip oldukları için biberiye ekstraktlarının gıda katkısı olarak kullanılmasına küresel ölçekte izin verilmiştir (EFSA Panel on ANS, 2018). Bir O-difenolik olan 23-nor-6-oxo-tingenol, triterpenik yapıdaki bir fenoliktir ve Peru'nun Amazon bölgesindeki büyük bir ağaç olan *Maytenus amazonica* C. Martius (Celestraceae)'de tanımlanmıştır. *m*-alkil fenoller (kardanoller) ve alkil resorsinoller (kardoller) gibi basit fenolik lipitler doğada oldukça nadir olup esas olarak kaju ve daha sonra *Ginkgo biloba*'nın meyvesinde bulunmuştur. 5-*n*-alkilresorsinoller ve 5-*n*-alkenilresorsinoller, kardol ve bilobolün yüksek derecede homologlarıdır (Chávez ve ark., 1999; Ângelo ve ark., 2016; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

Anakardik asit olarak da bilinen ginkgolik asitler (Şekil 2.20) 6-alkilsalisilik asit yapılarına sahiptirler. Genellikle kontakt alerjik oldukları kanıtlanmıştır. *Ginkgo biloba* meyvelerinin kabuklarında 14.6 g/kg'a kadar miktarlarda bulundukları belirlenmiştir (Wang ve ark., 2016). Kardanoller, ilgili ginkgolik asitlerin ısı ile muamelesi neticesinde oluşan dekarboksilasyon ürünleridirler. Kardanolün kimyasal özelliklerinden birisi de polimerizasyon reaksiyonları olduğu için biyotabanlı polimerlerin sentezinde bu bileşikten faydalanılabilmektedir.

Gingeroller, zencefil rizomlarının acı tadını veren temel bileşiklerdir ve kimyasal olarak sübstitüe uzun alifatik zincirli β -hidroksi ketonlar içeren gayakol molekülleridirler (Şekil

2.20). Bu bileşikler sıcaklığa bağlı olarak değişkenlik gösterirler ve yüksek sıcaklıklarda dehidrasyon reaksiyonları ile şogaollere (shogaols) dönüşürler. Gingeroller ve şogaollerin her ikisinin de faydalı tıbbi özellikleri olduğu bilinmektedir. Antikanser, antioksidan, antidiabetik, antimikrobiyal, antiobezite, analjezik, antipiretik ve antienflamatuvar etkilerini gösteren araştırmaların sonuçları sunulmuştur (Semwal ve ark., 2015; Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).



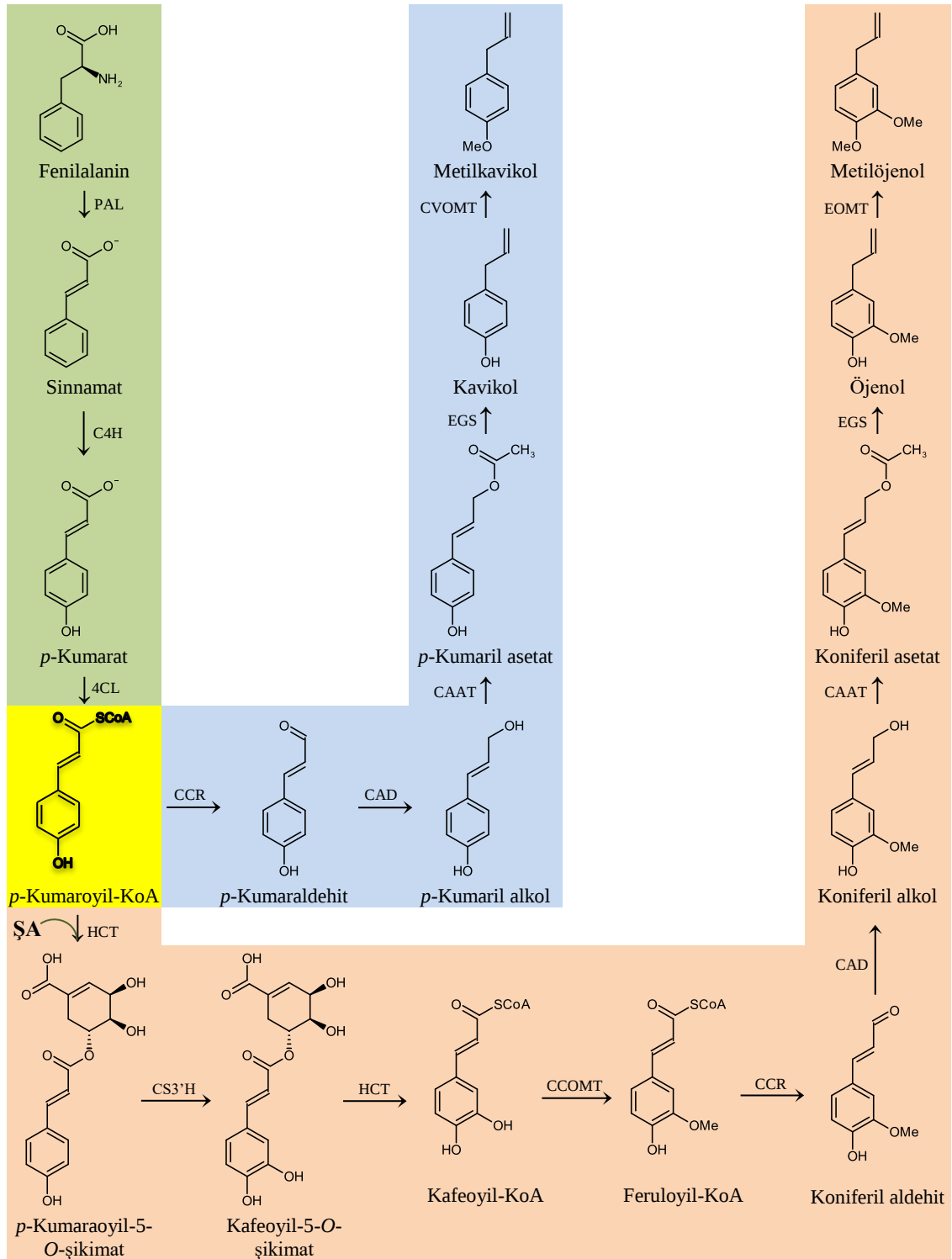
Şekil 2.20. Hibrit fenolikler sınıfına dahil olan fenolik terpenler ve fenolik lipitler.

2.2. Fenilpropanoid Metabolik Yolağında Metilkavikol ve Metilöjenol Uçucu Fenilpropenlerinin Biyosentezi

C₆-C₃ kısa formülü ile gösterilen fenilpropanoidler, birçok bitkide aromatik bir amino asit olan fenilalaninden (veya bazı tek çenekli bitkilerde tirozinden) türetilen büyük bir bitki sekonder metabolitleri sınıfıdır. Genel fenilpropanoid sentez yolağının (Şekil 2.21) ilk ürünleri olan hidroksisinnamik asitler ve türevleri ile birlikte, yolaktaki dallanma noktaları ve kaskatlarda bu ilk ürünlerin dönüşümü ile sentezlenen sinamik aldehytler, monolignoller, kumarinler, izokumarinler, kromenler ve fenilpropenler “fenilpropanoidler” olarak sınıflandırılmaktadırlar (Tsimogiannis ve Oreopoulou, 2019).

Günümüze kadar reyhan uçucu yağında 140’tan fazla bileşiğin bulunduğu tespit edilmiştir (Grayer, 2001). Reyhan kemotiplerinin aroma, yaprak ve çiçek rengi, bitki dokularının büyüme ve gelişme aşamalarındaki farklılıkları, bitkilerin coğrafi kökenleri ve yetiştirildikleri çevresel koşullara bağlı olarak uçucu yağlarının kapsamında farklılıklar bulunduğu bildirilmiştir (Telci ve ark., 2006; Ghasemi Pirbalouti ve ark., 2013; Khakdan ve ark., 2017).

O. basilicum’un uçucu yağları; öjenol, metilöjenol, kavikol, metilkavikol gibi fenilpropenler ve terpenoid bileşikler bakımından zengindir (Gang, 2005). Karanfil baharatı tomurcukları (*Syzygium aromaticum* L.), tarçın yaprakları (*Cinnamomum verum* J.Presl) ve muskat cevizinin (*Myristica fragrans* Houtt.) uçucu yağlarında ise %70-90 oranında öjenol ve kavikol bulunabilmektedir.

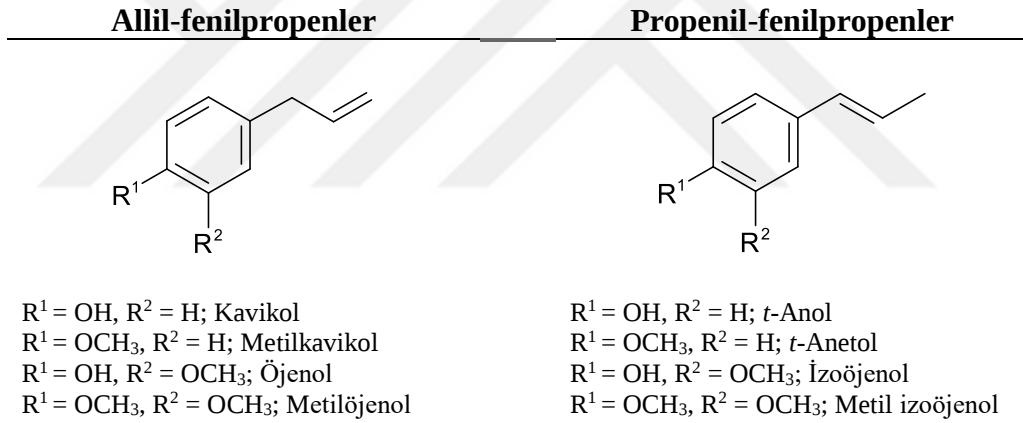


Şekil 2.21. Reyhanın fenilpropanoid metabolizmasında rol alan bazı enzimler¹ ve metilöjenol ile metilkavikolün üretim yolu.

¹ PAL, fenilalanin amonyalaz; C4H, sinnamat 4-hidroksilaz; 4CL, 4-kumarat-KoA ligaz; CCR, sinnamoyil-KoA redüktaz; CAD, sinnamoyil alkol dehidrogenaz; CAAT, koniferil alkol asetil transferaz; EGS, öjenol sentaz; CVOMT, kavikol O-metiltransferaz; HCT, şikimat O-hidroksisinnamoyil transferaz; CS3'H, p-kumaroil 5-O-şikimat 3'-hidroksilaz; CCOMT, kafeoyil-KoA O-metiltransferaz; EOMT, öjenol O-metiltransferaz; ŞA, şikimik asit.

Fenilpropenler, bir propenil yan zinciri (C₃) taşıyan modifiye edilmiş bir benzen (C₆) halkasından oluşur. Fenilpropenlerin yapısal çeşitliliği, hem propenil çift bağının konumundan hem de benzen halkası üzerindeki süstitüe grupların mevcudiyetinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2.22).

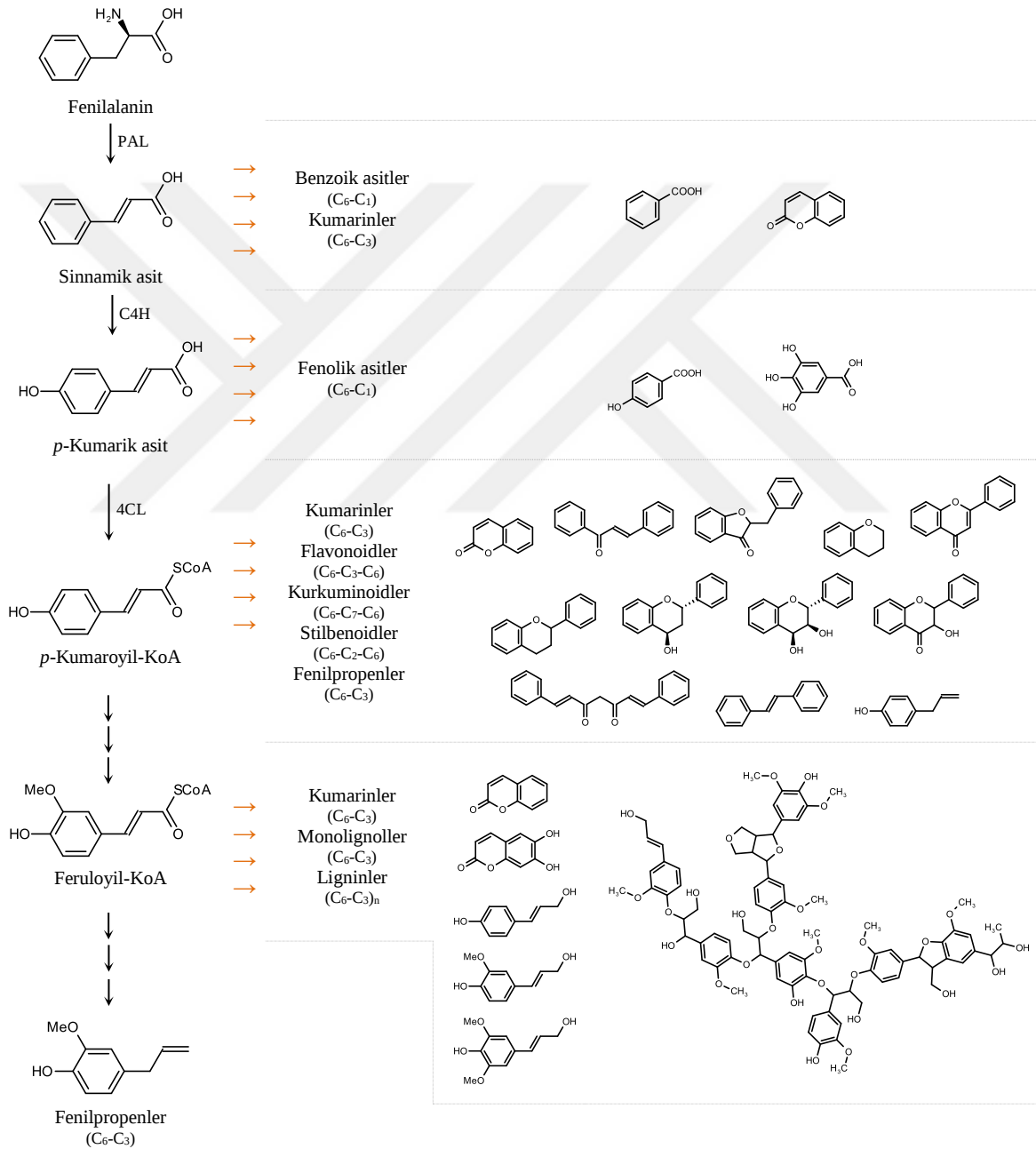
Benzen halkasına bağlı olan propenil yan zinciri, bir vinil grubuna bağlı olan bir metilen köprüsünden, yani bir allil grubundan (H₂C=CH-CH₂-R) ibaret ise bu tür fenilpropenler “allil-fenilpropenler” olarak adlandırılmaktadır. Öjenol, metilöjenol, kavikol ve metilkavikol bileşikler allil-fenilpropenlerdir. Propenil yan zincirinin vinil grubundan benzen halkasına bağlı olduğu (R-HC=CH-CH₃) bileşikler ise “propenil-fenilpropenler” olarak adlandırılmaktadır. İzoöjenol, metilizoöjenol, *t*-Anol ve *t*-Anetol bileşikler propenil-fenilpropenler sınıfına ait bileşiklerdir.



Şekil 2.22. Fenilpropen uçucu bileşiklerinin yapıları.

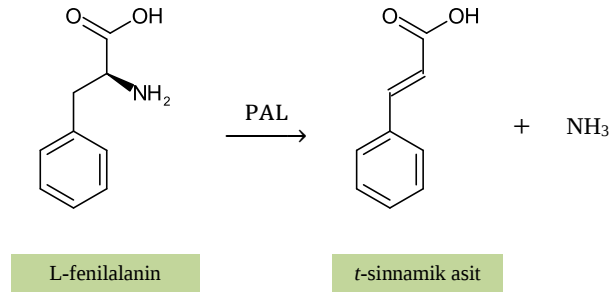
Terpenoid bileşiklerin biyosentezinde rol alan proteinlerin ve genlerin tanımlandığı çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen öjenol ve kavikol ile bunların türevlerinin sentezlendiği yolağın detayları henüz tam olarak bilinmemektedir (Withers ve Keasling, 2007; Vogt, 2010; Abdollahi Mandoulakani ve ark., 2017; Khakdan ve ark., 2017). Bununla birlikte, bugüne kadar yapılmış çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında, fenilpropanoid sınıfı bileşiklerin sentezlendiği yolak, birkaç aşama dahilinde sınıflandırılabilir. Fenilalanin veya tirozinden *p*-kumaroyil-KoA'nın sentezlendiği aşamaya kadar olan kısım “genel fenilpropanoid biyosentez yolağı” olarak tanımlanmaktadır ve bu yolak bütün bitkilerde aynıdır. Bu aşamadan itibaren, *p*-

kumaroyil-KoA'nın, yolağın farklı yöndeki dallarında öncü bileşik olarak kullanılması neticesinde metilöjenol ve metilkavikol gibi fenilpropenlerin yanı sıra flavonoidler, kurkuminoidler (diaril heptanoidler), stilbenoidler veya monolignollerin sentezi ile lignin biyosentezi de gerçekleştirilebilmektedir (Şekil 2.23) (Vogt, 2010; Koeduka, 2014; Deng ve Lu, 2017).

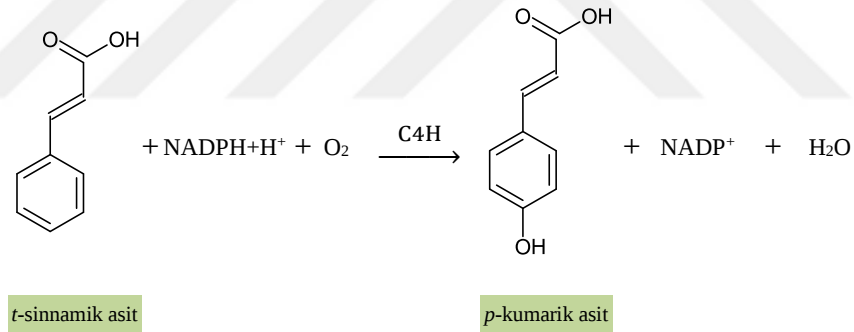


Şekil 2.23. Genel fenilpropanoid biyosentez yolağında sentezlenen bazı bileşikler ve bu bileşiklerin öncü olarak kullanıldığı yollar.

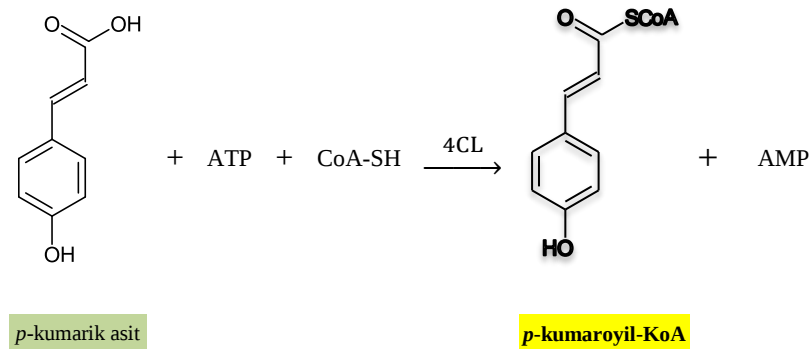
Fenilpropanoid biyosentez yolağının ilk reaksiyonu, şikimat yolağı ile sentezlenmiş olan fenilalanin aminoasitinin (Phe), fenilalanin amonyum liyaz (PAL, EC:4.3.1.24) enzimi ile *trans*-sinnamik asite dönüştürülmesidir (Gang ve ark., 2001; Dixon ve ark., 2002).



trans-sinnamat, sonraki aşamada bir sitokrom p450 monoksijenaz sınıfı enzim olan Sinnamat 4-hidroksilaz (C4H, EC:1.14.14.91) ile *p*-kumarik asite (4-kumarik asit) dönüştürülür.



p-kumarik asit bileşiği, 4-kumarat-KoA ligaz (4CL, EC:6.2.1.12) enzimi ile *p*-kumaroyil-KoA'ya dönüştürülür.



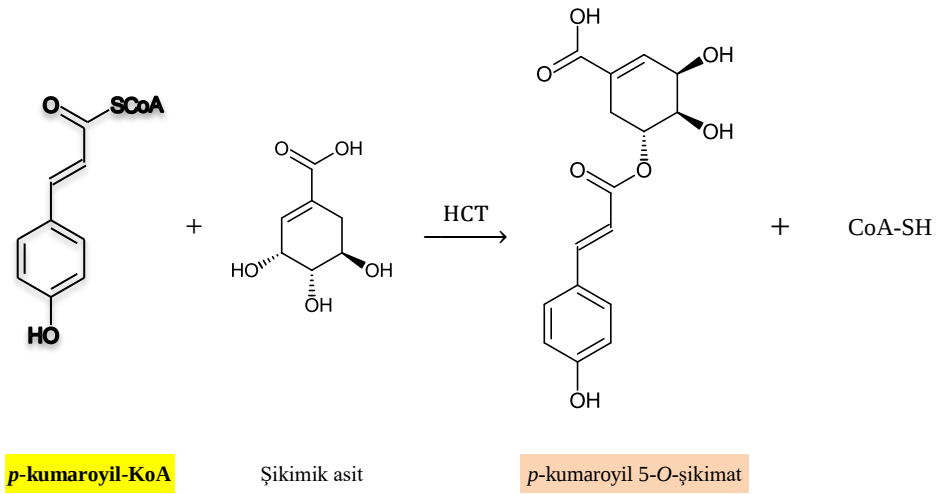
p-kumaroyil-5-*O*-şikimat bileşiğinin sentezlendiği aşama, fenilpropen biyosentezinde önemli bir dallanma noktasını teşkil etmektedir. Bu noktadan itibaren yolağın bir kolu diğer koluna göre fazladan 4 enzimatik reaksiyon içerir ve neticede öjenol ve metilöjenol allil fenilpropenlerinin biyosentezi gerçekleştirilir.

Metilöjenol biyosentez yolağında, metilkavikolün sentezlendiği diğer yolakta rol almayan 3 farklı enzim (HCT, CS3'H ve CCOMT) ile 4 farklı reaksiyon katalizlenir. Bu enzimatik reaksiyonların sonucunda sentezlenen Feruloyl-KoA bileşiğinin öncü olarak kullanıldığı reaksiyonlar, yolağın diğer kolunun başlangıç bileşiği olan *p*-kumaroyil-KoA'nın CCR enzimi ile aldehite indirgenmesi ile başlayan reaksiyonlar ile temel olarak aynıdır. Bu aşamadan itibaren her iki yolakta da öncü molekülden koenzim-A yapısının uzaklaştırılarak bir aldehit bileşiğin sentezlenmesi, aldehitin bir alkole dönüşümü, propen zincirine bir molekül asetatin transferi ve nihayetinde her iki yolağın ilk uçucu fenilpropenlerinin biyosentezini tamamen aynı enzimler (CCR, CAD, CAAT, EGS) katalizlemektedir.

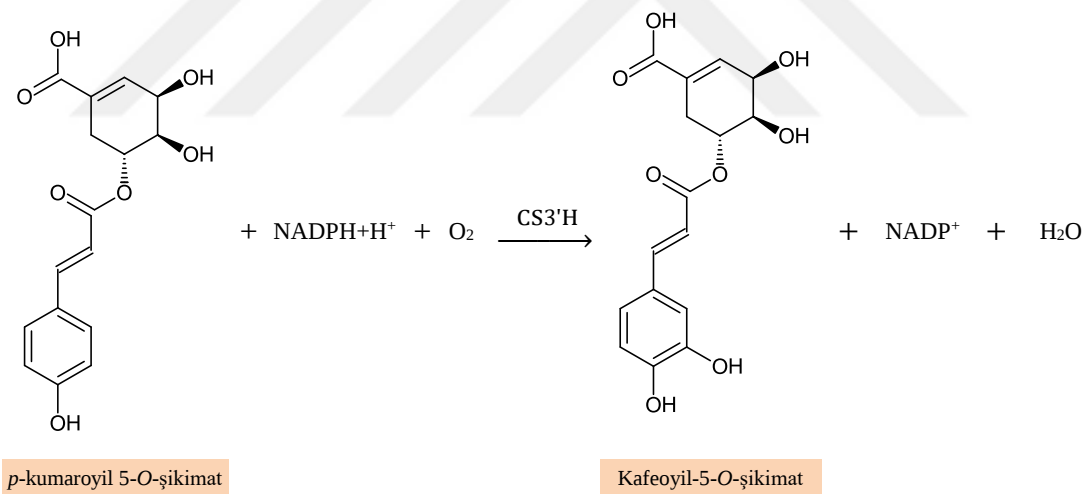
İki farklı fenilpropen biyosentez yolunun son ürünleri olan öjenol ve kavikolün sentezlenmesinden sonra gerçekleşen metilasyon reaksiyonlarını ise iki farklı enzim katalizlemektedir. Öjenolün metilasyonu EOMT enzimi ile, kavikolün metilasyonu ise CVOMT enzimi ile gerçekleştirilmektedir.

Genel fenilpropanoid biyosentez yolağında 4CL enzimi ile *p*-kumaroyil-KoA'nın sentezinden sonra metilöjenol biyosentez yolağının diğer yolakta bulunmayan enzimatik reaksiyonları gösterilecektir. Bu reaksiyonlar tamamlandıktan sonra metilkavikol ve metilöjenol biyosentez yolaklarında aynı enzimler tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar birlikte gösterilecektir.

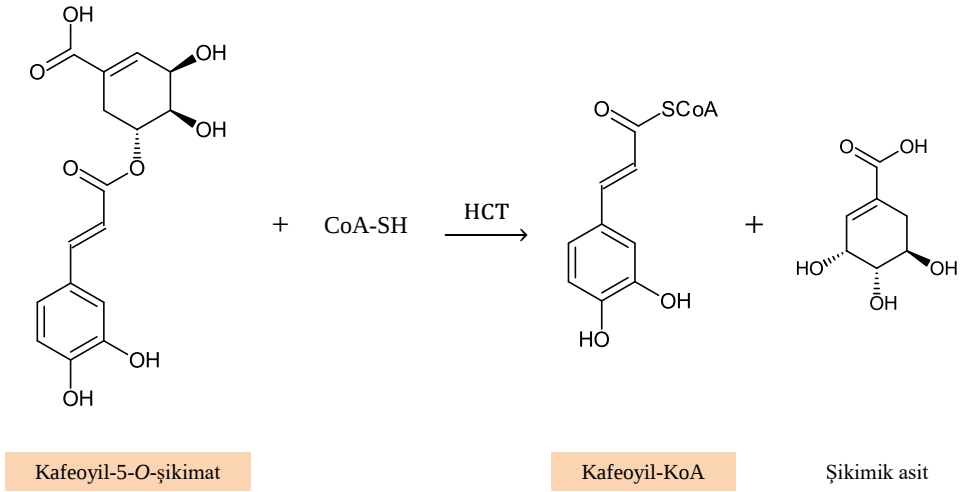
Metilöjenol biyosentez yolağındaki ilk reaksiyon, şikimat *O*-hidroksisinnamoyil transferaz (HCT, E2.3.1.133) enzimi ile *p*-kumaroyil-KoA'nın, *p*-kumaroyil 5-*O*-şikimata dönüşümüdür.



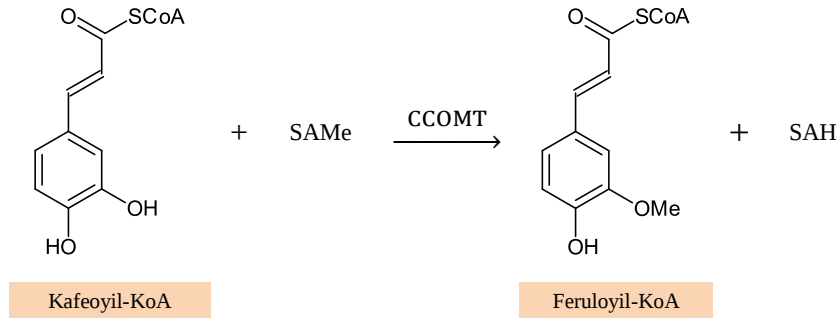
Sonraki aşamada *p*-kumaroyil 5-*O*-şikimatın, *p*-kumaroyil 5-*O*-şikimat 3'-hidroksilaz (CS3'H, EC:1.14.14.96) enzimi ile kafeoyil-5-*O*-şikimat bileşiğine dönüşümü gerçekleştirilir.



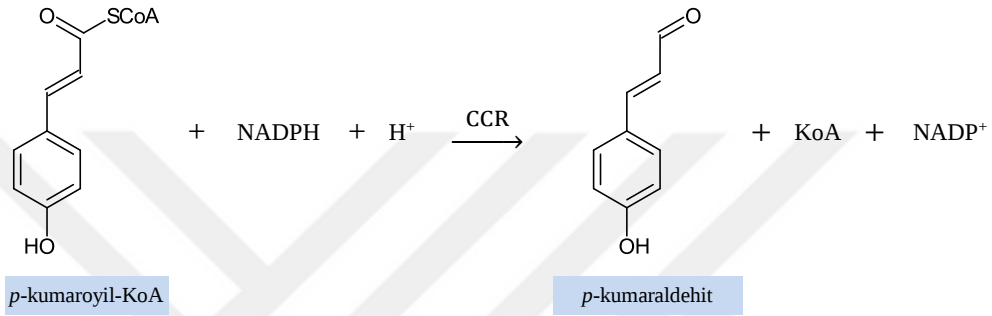
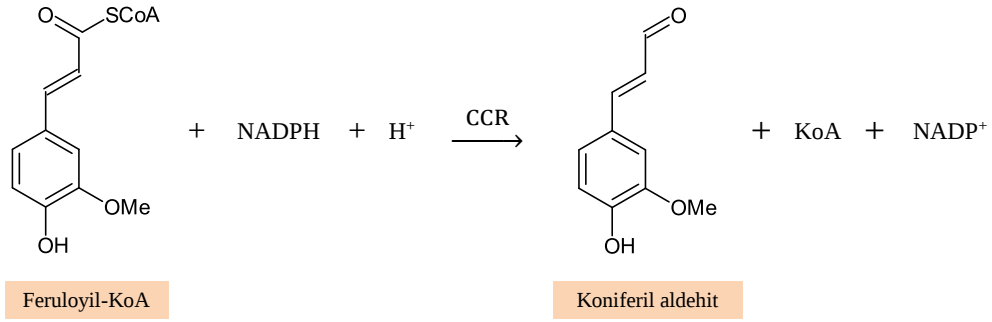
Daha sonra, kafeoyil-5-*O*-şikimat bileşiğinden, yine şikimat-*O*-hidroksisinnamoyil transferaz (HCT, E2.3.1.133) enzimi ile bir molekül şikimik asitin uzaklaştırılması ve koenzim A molekülünün yapıya katılması ile kafeoyil-KoA bileşiği sentezlenmektedir.



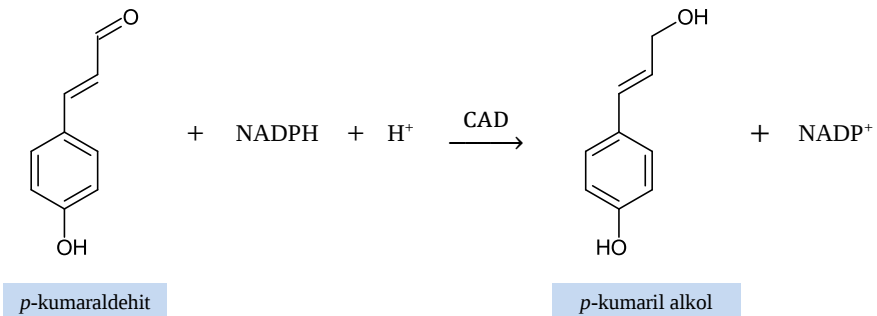
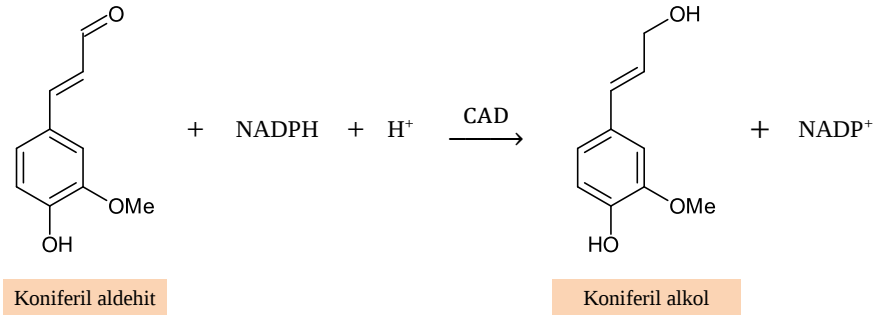
Kafeoyil-KoA molekülüne, kafeoyil-KoA-O-metiltransferaz (CCOMT, EC:2.1.1.104) enzimi ile bir molekül metilin transfer edilmesi neticesinde feruloyil-KoA bileşiği sentezlenmektedir. Bu aşamadaki metil transferi S-Adenosil metiyonin (S-AdoMet; metil grubu transferlerinde yer alan yaygın bir kosubstrat) yardımı ile gerçekleşmektedir. Bu reaksiyonun sonucunda feruloyil-KoA'nın yanı sıra S-Adenosil metiyoninin demetilasyonu sonucunda oluşan S-Adenosil-L-homosistein (SAH) de meydana gelmektedir.



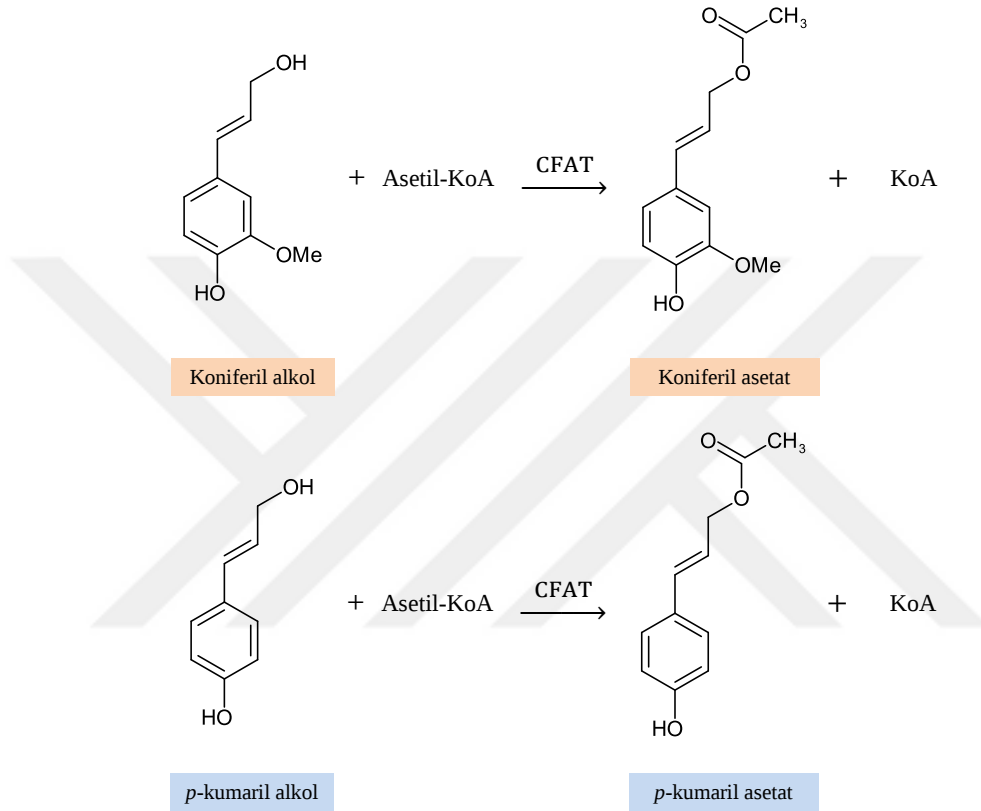
Metilöjenol biyosentez yolağında feruloyil-KoA bileşiğinin sentezlenmesinden sonraki enzimatik reaksiyonlar, metilkavikol biyosentez yolağında *p*-kumaroyil-KoA bileşiğinden sonraki reaksiyonları katalizleyen aynı enzimler ile gerçekleştirilmektedir. Bu aşamada, metilöjenol biyosentez yolağında Feruloyil-KoA'dan sinnamoyil-KoA redüktaz enzimi ile (CCR, EC:1.2.1.44) koniferil aldehit bileşiği sentezlenirken, metilkavikol biyosentez yolağında yine aynı enzim ile *p*-kumaroyil-KoA bileşiği *p*-kumaraldehite indirgenir.



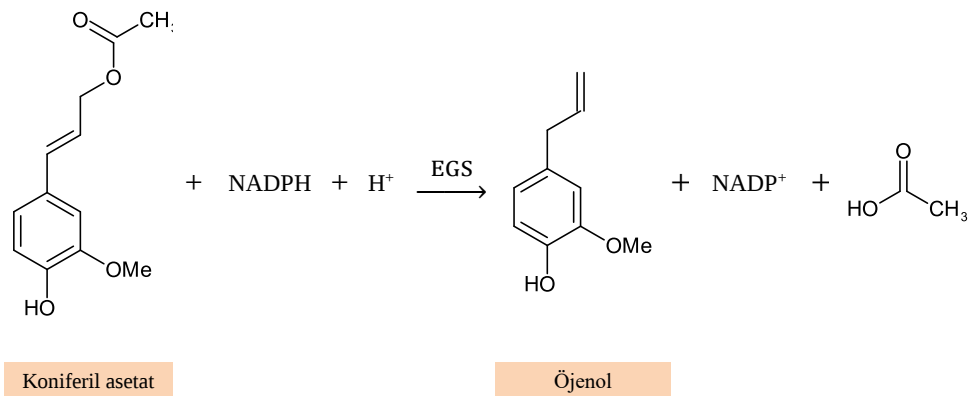
Her iki fenilpropen yolağında da ilgili aldehitlerin sentezinden sonra metilkavikol biyosentez yolağında *p*-kumaraldehit bileşiğinden *p*-kumaril alkol bileşiğinin, metilöjenol biyosentez yolağında ise koniferil aldehit bileşiğinden koniferil alkolün biyosentezi koniferil alkol dehidrogenaz (CAD, EC: 1.1.1.194) tarafından katalizlenir.

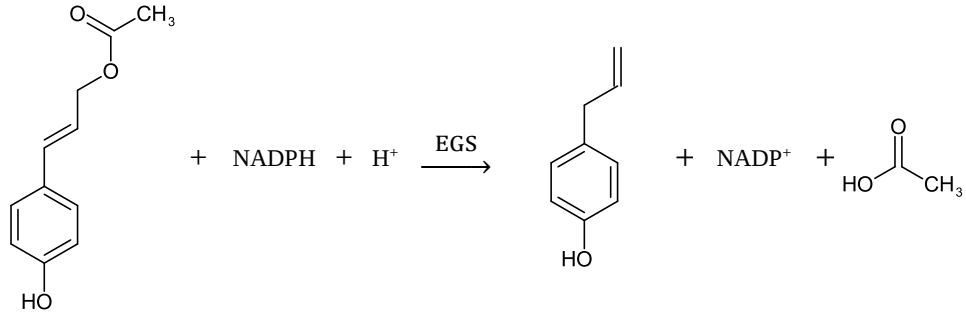


Metilkavikol biyosentez yolağında *p*-kumaril alkolün *p*-kumaril asetata, metilöjenol biyosentez yolağında ise koniferil alkolün koniferil asetata dönüşümü koniferil alkol asetil transferaz (CFAT, EC:2.3.1.-) enzimi ile katalizlenir. Bu reaksiyonlarda asetil-KoA bileşiğinden her iki alkol bileşiğinin propen zincirine bir molekül asetil grubu transfer edilir.



Bu aşamadan sonra, her iki fenilpropen biyosentez yolağının son ortak enzimi olan öjenol sentaz (EGS, EC:1.1.1.318) aktivitesi ile fenilpropanoid yolağının ilk uçucu fenilpropen bileşikleri olan öjenol ve kavikol bileşikleri sentezlenmektedir.

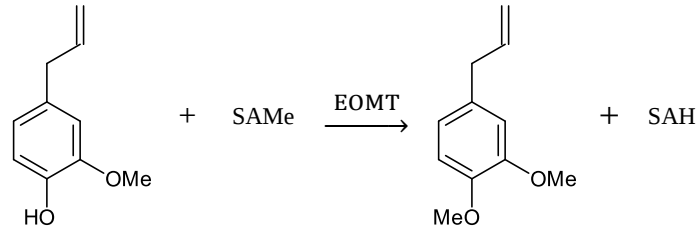




p-kumaril asetat

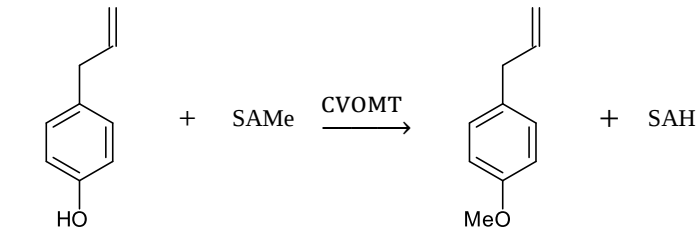
Kavikol

Öjenol ve kavikol uçucu fenilpropenlerinin biyosentezinden sonra her iki yolağın en sonunda yer alan öjenol O-metiltransferaz (EOMT, 2.1.1.146) ve kavikol O-metiltransferaz (CVOMT, 2.1.1.146) enzimleri ile sırasıyla metilöjenol ve metilkavikol (estragol) uçucu fenilpropenlerinin biyosentezi gerçekleştirilmektedir. Bu aşamadaki metil transferi S-Adenosil metiyonin (SAME) yardımı ile gerçekleşmekte ve yan ürün olarak S-Adenosil-L-homosistein (SAH) de meydana gelmektedir.



Öjenol

Metilöjenol



Kavikol

Metilkavikol

Öjenol O-metiltransferaz enzimi kavikolün, metilkavikole dönüşümünü katalizlemenin yanı sıra bazı bitkilerde bulunan bir propenil-fenilpropen olan izoöjenolün, izometilöjenole dönüşümünü de katalizleyebilmektedir. Benzer şekilde, kavikol O-metiltransferaz enzimi de öjenolün, metilöjenole dönüşümünün yanında, bazı bitkilerde bulunan bir propenil-fenilpropen olan *t*-anolün (izokavikol), anetole dönüşümünü de katalizleyebilmektedir. Bu enzimler birbirlerinin homologudur ve KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) veritabanında ortolog enzimler olarak kaydedilmişlerdir (Kanehisa ve Goto, 2000; Kanehisa, 2019; Kanehisa ve ark., 2021).

Farklı bitkisel organizmalardaki fenilpropanoid bileşiklerinin biyosentezini konu alan araştırmaların sonucunda bu yolakta yer alan birçok enzim ve bu enzimlerin katalizledikleri reaksiyonlarda öncü ve ürün olarak yer alan birçok metabolit tanımlanmıştır. KEGG veritabanına kayıtlı olan bu enzimler ve metabolitlerin yolaktaki görevleri ve aralarındaki ilişkileri gösteren fenilpropanoid biyosentez yolağının haritası Şekil 2.24'te sunulmuştur (Qiu, 2013). Bu haritada, reyhanın genel fenilpropanoid biyosentez yolağı ve sonrasındaki fenilpropen biyosentezini gerçekleştiren dallanma noktaları farklı renklerle vurgulanarak gösterilmiştir.

Fenilalanin amonyum liyaz (PAL), sinamat 4-hidroksilaz (C4H) ve 4-kumaroyil-KoA ligaz (4CL) enzimleri tarafından katalize edilen yolun ilk üç ana adımı, bu yolağın en önemli dallanma noktası olan 4-kumaroyil-KoA bileşiğinin oluşumunu sağlar. 4-kumaroyil-KoA bileşiği fenilpropen biyosentezine ek olarak lignin, flavonoidler, antosiyaninler, fenolik asitler ve stilbenler gibi birçok bileşiğin sentezinde öncü görevi görür (Weisshaar ve Jenkins, 1998; Vogt, 2010).

Fenilpropen ve lignin yolu, monolignollerin, yani kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkolün oluşumundan sonra ikiye ayrılır (Hamberger ve ark., 2007). Bu monolignoller bitkilerde fenilpropen, lignin ve lignan biyosentezi için ortak ara maddeler olarak kullanılır. Lignin oluşumu, aktive edilmiş monolignollerin eter ve karbon-karbon bağları yoluyla rastgele polimerizasyonunu içerir (Ferrer ve ark., 2008). *p*-kumaril alkol, koniferil alkol, ve sinapil alkolden polimerize edilen ligninler, sırasıyla hidroksifenil (H), guayasil (G) ve siringil (S) lignin olarak adlandırılır (Vanholme ve ark., 2010).

2.3. Kaynak Özetleri

Reyhan (*O. basilicum*) kemotiplerinde metilkavikol (estragol) ve metilöjenol biyosentezini araştıran ilk kapsamlı çalışma Lewinsohn ve ark. (2000) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada özellikle fenilpropen biyosentez yolağının son aşamasında rolü olan *O*-metiltransferaz aktivitelerinin kemotipik ve reyhan bireylerinin gelişim dönemlerine bağlı olarak değişimi araştırılmıştır. Araştırmacılar, genç reyhan yapraklarının yüksek seviyelerde kavikol *O*-metiltransferaz aktivitesi sergilediğini, ancak bu aktivitenin yaşlı yapraklarda ihmal edilebilir düzeyde olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durum kavikolün *O*-metilasyonunun öncelikle yaprak gelişiminin erken evrelerinde gerçekleştiğini göstermiştir. Çalışmada, farklı reyhan genotiplerinde saptanan *O*-metiltransferaz aktivitelerinin, metil transferi gerçekleşen substrata karşı özgülüğünün farklı olduğu ifade edilmektedir. Yüksek estragol içeren kemotipte, *O*-metiltransferaz aktivitesi kavikol için oldukça spesifik fakat bu kemotipte öjenol ise neredeyse *O*-metillenmemiştir. Bunun aksine, eşit miktarda estragol ve metilöjenol içeren kemotipte *O*-metiltransferaz hem kavikol hem de öjenolü katalizleyerek sırasıyla estragol ve metilöjenol üretimini gerçekleştirmiştir. Yüksek seviyelerde öjenol içeren, fakat estragol ve metilöjenol içermeyen kemotipin ise, allil-fenilpropen bağımlı *O*-metiltransferaz aktivitesine sahip olmadığı belirtilmiştir. Bu sonuçlar, reyhan kemotiplerinde en az iki tip allil-fenilpropen bağımlı *O*-metiltransferaz aktivitesinin varlığını göstermiştir. Araştırmacılar, bunlardan birisinin kavikol için oldukça spesifik, diğerinin ise öjenolü substrat olarak kabul edebilen farklı bir *O*-metiltransferaz olabileceğini ileri sürmüşlerdir. *O*-metiltransferaz aktivitelerinin nispi mevcudiyeti ve substrat özgülüklerinin, reyhan kemotiplerinin uçucu yağlarının kompozisyonundaki varyasyonu biyokimyasal olarak açıkladığını bildirmişlerdir.

Reyhanın peltat salgı tüylerinin izole edilerek uçucu yağ kapsamının belirlenmesini ve bu yapılarda fenilpropen biyosentez yolağı enzim aktivitelerini araştırmayı amaçlayan ilk çalışma Gang ve ark. (2001) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, reyhanın uçucu yağ bileşenlerinden öjenol ve metilkavikolün, sırasıyla, SW (uçucu yağı öjenolce zengin) ve EMX-1 (uçucu yağı metilkavikolce zengin) reyhan hatlarının peltat salgı tüylerinde biriktiğini göstermişlerdir. Bu fenilpropenlerin üretildiği biyosentetik yolakta rol aldığı

varsayılan enzim aktivitelerine yönelik çalışmalar yapılmış ve karşılık gelen enzim aktivitelerinin çoğunun neredeyse yalnızca peltat salgı tüylerinde lokalize oldukları tespit edilmiştir. Peltat salgı tüylerinde ifade edilen eksprese dizi etiketlerinin (ESTs) analizi, fenilpropanoid biyosentezinde rolü bilinen genlerin bu yapılarda çok yüksek seviyelerde ifade edildiğini ve toplam eksprese dizi etiketlerinin %13'ünü oluşturduğunu ortaya koymuşlardır. Bununla birlikte, elde edilen toplam cDNA'ların %14'ünün, substrat olarak S-adenozil-metiyonin kullanarak metilkavikol ve metilöjenol biyosentezini katalizleyen enzimleri kodladığını tespit etmişlerdir.

Gang ve ark. (2002a) bir sonraki çalışmalarında, Lewinsohn ve ark. (2000)'nın ortaya koyduğu fakat tespit edemediği, reyhan kemotiplerinde kavikol O-metiltransferaz (CVOMT) enziminden farklı bir allil-fenilpropen bağımlı O-metiltransferaz enzimi olan öjenol O-metiltransferaz (EOMT) enzimini ve bu enzimi kodlayan transkriptleri tespit etmişler ve enzimin 2002 yılında UNIPROT (The Universal Protein Resource)'a kaydını gerçekleştirmişlerdir. Söz konusu çalışmada, kavikol O-metiltransferaz (CVOMT) ve öjenol O-metiltransferaz (EOMT) enzimlerine ait cDNA'lar, biyokimyasal bir genomik yaklaşım kullanılarak EMX-1 kemotipinden izole edilmiştir. Bu cDNA'ların, *Clarkia breweri*'de (Onagraceae) 2,7,4-trihidroksiizoflavanon'un 4-O-metilasyonunu katalize eden ve birbirine %90 özdeş olan ve IOMT (izoöjenol O-metiltransferaz) gibi birkaç izoflavon O-metiltransferaza çok benzeyen proteinleri kodladığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar, CVOMT1 ve EOMT1 transkriptlerinin, genç reyhan yapraklarının yüzeyindeki peltat salgı tüylerinde yüksek oranda ifade edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, CVOMT1 ve EOMT1 cDNA'larının *Escherichia coli*'de ifadesini ve aktif proteinlerin üretimini de gerçekleştirmişlerdir. Enzim aktivite analizi sonuçlarına göre CVOMT1'in kavikolün O-metilasyonunu katalize ettiğini ve EOMT1'in ise kavikolün O-metilasyonunu CVOMT1'e eşit verimlilikle katalize ettiğini, ancak öjenolün O-metilasyonunu çok daha hızlı katalizlediğini tespit etmişlerdir. IOMT'nin kristal yapısına dayanan moleküler modelleme neticesinde, CVOMT1 ve EOMT1 arasındaki substrat özgüllüğü farkının tek bir amino asit farkından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Reyhanın peltat salgı tüylerinin izole edilerek uçucu yağ kapsamının belirlenmesini ve bu yapılarda fenilpropen biyosentez yolağı enzim aktivitelerini araştırmaya Gang ve ark. (2002b) devam etmişlerdir. Araştırmacılar, fenilpropen biyosentezinin ilk adımını

katalizleyen fenilalanin amonyum liyaz ve son adımını katalizleyen kavikol O-metiltransferaz enzim aktivitelerinin salgı tüylerinin izole edilmediği genç yapraklarda yapılan enzim aktivite analizleri ile kıyaslandığında, neredeyse sadece peltat salgı tüylerinde lokalize olduğunu bildirmişlerdir. Çok daha küçük olmakla birlikte daha fazla sayıda bulunan kapitat salgı tüylerinin bu bileşikleri depolamadığını ve oluşmaları için gerekli olan enzimatik aktiviteleri içermediğini bildirmişlerdir. Bunun aksine, peltat salgı tüylerinin ise metilkavikol biyosentezindeki ilk ve son aşamaları katalize eden enzimleri, yaprağın diğer dokularından çok daha yüksek seviyelerde içerdiğini göstermişlerdir. SW ve EMX-1 reyhan kemotipinin peltat salgı tüylerinin, salgı tüyleri izole edilmemiş yapraklara göre PAL için çok daha yüksek spesifik aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Yüksek seviyelerde metilkavikol biriktiren EMX-1 çeşidinden elde edilen peltat salgı tüylerinin yüksek seviyede CVOMT ve EOMT aktivitesine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, öjenol biriktiren ancak metilöjenol veya metilkavikol biriktirmeyen SW çeşidinin peltat salgı tüylerinden elde edilen ekstraktlarda, CVOMT ve EOMT aktivitelerinin hem salgı tüylerinde hem de salgı tüyleri izole edilmemiş yaprak ekstraktlarında büyük ölçüde azaldığını belirlemişlerdir.

Deschamps ve ark. (2006), dört farklı bitki gelişim evresinde fenilpropen biyosentezinde rol alan bazı genlerin ekspresyonu, kavikol O-metiltransferaz (CVOMT) ile öjenol O-metiltransferaz (EOMT) enzim aktivitelerini ve metilkavikol birikimi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Metilkavikol birikiminin, yapraklar olgunlaştıkça zamanla azaldığını tespit etmişlerdir. Metilkavikol birikimi ile CVOMT ve EOMT enzim aktiviteleri arasında önemli bir korelasyon bulunduğunu ve bu enzim seviyelerinin uçucu yağın içeriği ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. CVOMT ve EOMT gen ifade seviyelerinin, yaprak yaşının ilerlemesine bağlı olarak hem salgı tüyü izole edilmemiş yapraklarda hem de izole salgı tüylerinde azaldığını tespit etmişlerdir. Yaprak gelişiminin erken dönemlerinde hücre sayısı artırılırken ilerleyen dönemde hücre bölünmeleri ve hücre sayısındaki artışın durduğu bilinmektedir. Bundan sonraki yaprak büyümesi, hücre hacminin artması ve hücre uzaması ile gerçekleşmektedir. Erken dönemde birim yüzey alanda daha fazla sayıda hücre bulunmaktadır. Fakat ilerleyen yaprak yaşı ile birim alandaki hücre sayısı (peltat salgı tüyleri de dahil olmak üzere) azalmaktadır. Deschamps ve ark. (2006), Salgı tüyü izole edilmemiş olgun yapraklarda ve olgun yapraklardan izole

edilmiş peltat salgı tüylerinde enzim aktivitesi ve gen ifade profillerinin benzer olduğunu belirtmişlerdir. Reyhan yapraklarındaki *CVOMT* transkript seviyelerinin ve *CVOMT* ekspresyonundaki farklılıkların yalnızca peltat salgı tüyü yoğunluğundaki farklılıklardan kaynaklanmadığını, bu farklılığın reyhanın peltat salgı tüylerinde gelişim dönemine bağlı olarak düzenlenmesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir.

Yaprak yaşının ve pozisyonunun reyhanın uçucu yağ miktarı ve kompozisyonu üzerine etkisini araştırmayı amaçlayan bir diğer çalışma Fischer ve ark. (2011) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, ana gövde üzerinde farklı konumlarda bulunan genç ve yaşlı yapraklardaki uçucu yağ içeriğinin, bitkinin yaşam döngüsü boyunca gelişim dönemine bağlı olarak değiştiği ileri sürülmüştür. 16. haftada hasat edilen bitkilerin ana gövde ve yan sürgünlerindeki deki genç yapraklarında öjenolün daha yüksek (~%53), daha yaşlı yapraklarda ise metilöjenol seviyelerinin baskın (~%68) olduğunu bildirmişler. Fischer ve ark. (2011) gözlemledikleri bu durumun yaprak olgunlaştıkça öjenolün metilöjenole dönüştürülmesinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Fischer ve ark. (2011) bu çalışmanın sonuçlarında, yaprağın gövde üzerindeki pozisyonunun bitkinin gelişim dönemi ile ilgili olduğunu ve ilk (primordiyal) dokudan yaprak oluşumu sırasındaki bitkinin fizyolojik yaşının yaprağın uçucu yağ bileşimini etkileyen önemli bir faktör olduğunu bildirmişlerdir.

Öjenol biyosentezi ile ilgili çalışmalar genellikle bitkinin toprak üstü kısımlarında yapılmış ve bugüne kadar sadece reyhan salgı tüylerinden bir adet öjenol sentaz (*ObEGS1*) geni tanımlanmıştır. Reddy ve ark. (2021), son zamanlarda köklerde öjenol varlığını bildiren bazı çalışmaların sonuçları üzerine köklerdeki diğer *EGS* genlerini araştırmayı amaçlamışlar ve reyhan köklerinden elde ettikleri RNA-Seq verilerinde tüm PIP (Fosfatidilinositol 4-fosfat) ailesi redüktaz transkriptlerini taramışlardır. Sekans analizi sonucu belirlenen ilgili tüm genlerin *E. coli*'de *in vivo* fonksiyonel karakterizasyonu, bu genlerin öjenol üretme yetenekleri olduğunu göstermiş ve bu genleri *ObEGS2*, *ObEGS3*, *ObEGS4*, *ObEGS5*, *ObEGS6*, *ObEGS7* ve *ObEGS8* olarak adlandırmışlardır. Peltat salgı tüylerinde *ObEGS1* geninin, köklerde ise *ObEGS4* geninin en yüksek düzeyde ifade edilen genler olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, yalnızca toprakta yetiştirilen bitkilerin köklerinde öjenolün, üretildiğini, ancak doku kültürü yöntemi ile aseptik olarak yetiştirilen bitkilerin köklerinde öjenolün

üretildiğini tespit etmişlerdir. Aseptik olarak yetiştirilmiş bitki toprağa şaşırtıldığında öjenol üretiminin gerçekleşebildiğini belirlemiş ve aseptik olarak yetiştirilen bitki köklerinde öjenol üretiminin uyarılabildiğini tespit etmişlerdir.

Koca ve Karaman (2015), metil jasmonat (MeJA), spermin (Spm), epibrassinolid (EBL) bitki büyüme düzenleyicileri ve L-fenilalanin uygulamalarının reyhanda fenolik bileşikler ve fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzim aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlar ve en yüksek toplam fenolik ve toplam flavonoid içeriklerini 1,0 mM Spm + MeJA uygulamasından elde ettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar tarafından yapılan elisitör uygulamalarından sonra rozmarinik asit ve kafeik asit içeriklerinde önemli ölçüde artış tespit edilmiş ancak klorojenik asit içeriği veya PAL aktivitesinde bu tür farklılıklar gözlenmemiştir. Rozmarinik asidin, tüm uygulama gruplarında baskın fenolik bileşik olduğunu ve konsantrasyonunun yaş ağırlıkta 1,04 – 2,70 mg/g arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, Spm+MeJA ve EBL+MeJA kombinasyonlarının sekonder metabolitleri etkili bir şekilde indükleyebildiğini ve bu etkileşimlerin bitkilerde fitokimyasalların üretiminde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır.

Arbusküler mikorizal (AM) mantarlardan *Glomus mosseae* BEG 12, *Gigaspora margarita* BEG 34 ve *Gigaspora rosea* BEG 9 ile kolonizasyonun, reyhanın sürgün ve kök biyokütlesi ile yapraklardaki salgı tüyü bolluğu, uçucu yağ miktarı ve kapsamı üzerine etkileri incelenmiştir (Copetta ve ark., 2006). AM mantarları ile kolonizasyon uygulamalarının, araştırma parametrelerinde çeşitli değişimlere neden olmakla birlikte bunlardan yalnızca *G. rosea*'nın, kontrol bitkileri veya diğer mantar muamelelerine kıyasla tüm parametrelerde önemli değişimler meydana getirdiği bildirilmiştir. *G. rosea*'nın biyokütleyi, kök dallanmasını ve uzunluğunu ve toplam uçucu yağ miktarını (özellikle α -terpineol) önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. Artan yağ verimi, reyhan yapraklarının bazal ve merkezi bölgelerinde önemli ölçüde arttığı görülen peltat salgı tüyleri ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, *G. margarita* ve *G. rosea* uygulamalarının uçucu yağ kapsamında öjenol yüzdesini artırdığı ve linalol verimini düşürdüğü saptanmıştır. Sonuçlar, farklı mantarların aynı bitkide farklı etkilere neden olabileceğini ve kolonileşen AM mantarına göre uçucu yağ veriminin modüle edilebileceğini ortaya koymuştur.

Mirzajani ve ark. (2015), reyhan yapraklarına püskürtme yolu ile sitrik asit ve salisilik asit uygulamalarının uçucu yağ miktarı ve reyhanın bazı fenolojik karakterleri üzerine etkilerini araştırmışlardır. Bu çalışma kapsamında sitrik asit (CA) üç farklı konsantrasyonda (0, 4 veya 7 mM) ve salisilik asit (SA) ise (0,5 veya 1 mM) iki farklı konsantrasyonda uygulanmıştır. 1 mM konsantrasyondaki SA uygulaması neticesinde, kontrol işlemine kıyasla tekerrür gruplarında en yüksek uçucu yağ üretiminin elde edildiği bildirilmiştir.

Mikropropagasyon (*in vitro*), aklimasyon (*ex vitro*) ve tarla koşullarında yetiştirilen reyhanların uçucu yağ kapsamındaki farklılıkları araştırmayı amaçlayan Amaral-Baroli ve ark. (2016) *Ocimum basilicum*'un tepe sürgünlerinin eksplant olarak kullanılarak doku kültürü ortamında çoğaltılması için bir *in vitro* protokol geliştirmişlerdir. Bu çalışmada kapsamında *in vitro* büyüyen bitkiler sekiz ay sonra *ex vitro* koşullara alıştırılmıştır. Daha sonra, tarla koşullarında yetiştirilmiş, mikro çoğaltılmış (*in vitro*) ve iklimlendirilmiş reyhanların (*ex vitro*) üretilen uçucu yağları hidrodistilasyon ile ekstrakte edilmiştir. Uçucu GC/MS ile analizleri neticesinde tarla koşullarında yetiştirilmiş reyhanların uçucu yağındaki baskın uçucu bileşenin α -murolol (%30,62), mikroçoğaltılmış (*in vitro*) reyhanlarda metilöjenol (%27,38) ve *ex vitro* iklimlendirilmiş reyhanlarda ise ana bileşenin linalol (%23,31) olduğu bildirilmiştir.

Lung ve ark. (2016), sürekli düşük yoğunluklu mikrodalgaya maruz kalmanın, bitkiler için bir stres oluşturabileceğini, ancak bunun bitki sekonder metabolizması üzerindeki etkilerinin yeterince bilinmediğini düşünerek GSM ve WLAN frekanslı mikrodalgaların *Ocimum basilicum*'un uçucu organik bileşiklerinin miktarı ve uçucu yağ içeriği üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar, mikrodalgaya maruz kalmanın sekonder metabolizma faaliyetlerini ve stres kaynaklı sentezlenen uçucu bileşikleri artırdığını belirtmişlerdir. Kontrol bitkileriyle karşılaştırıldığında, mikrodalga radyasyonu pinen, α -felandren, bornil asetat, β -mirsen, α -karyofilen ve benzaldehit miktarının azalmasına, ancak ökaliptol, metilkavikol, karyofilen oksit ve α -bergamoten miktarını artırmıştır.

Ticari sera üretiminde ışık yayan diyotların (LED'ler) kullanımı spektral kontrol ve enerji verimliliğin sağladığından LED'lerin seralarda geleneksel ışıklandırma sistemlerine göre etkinliğini belirlemek için çalışmalara ihtiyaç olduğu belirtilmektedir. Hammock ve ark. (2018), hidroponik kültürde yetiştirilen reyhan bitkisinde dar band mavi ve kırmızı LED ışık oranlarının reyhanların uçucu bileşikleri üzerindeki etkilerini belirlemeye çalışmışlardır. Pek çok anahtar uçucu bileşiğin kontrasyonlarının gelişme sezonu ve ışık uygulamalarıyla değiştiğini gözlemlemişlerdir. Birçok önemli aroma uçucu konsantrasyonu, aydınlatma uygulamaları arasında önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Doğal fotoperiyodları desteklemek için LED'lerin kullanılmasının sekonder metabolizmayı ve uçucu bileşik kapsamını manipüle etme potansiyeline sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Zlotek ve ark. (2016) tarafından jasmonik asidin bitki verimi, reyhan uçucu yağının miktarı ve kompozisyonu üzerindeki etkisi araştırıldığı bir diğer çalışmada JA uygulamasının bitki verimini hafifçe etkilediği ve reyhan uçucu yağ miktarını önemli ölçüde artırdığı tespit edilmiştir. JA uygulanmasının, reyhan uçucu yağlarının kimyasal bileşimini de etkilediği araştırmanın sonuçlarında gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarında 100 μ M JA uygulamasının öjenol seviyesini artırdığı, 1 μ M JA uygulamasının ise metilöjenol içeriğinde en yüksek artışa neden olduğu bildirilmiştir.

Li ve ark. (2007), metil jasmonat (MeJA) uygulayarak reyhan bitkisinde biyoaktif kimyasallarının üretimi ve gen ekspresyon profili üzerine etkilerini araştırmış ve 0,5 mM MeJA uygulaması sonucunda toplam fenolik bileşik miktarının önemli ölçüde arttığını bildirmişlerdir. Fenolik bileşikler arasında özellikle rozmarinik ve kafeik asit miktarlarının sırasıyla %55 ve %300 oranında, öjenolün ise %56 oranında arttığını bildirmişlerdir.

Kahveci ve ark. (2021), NaCl'den kaynaklanan tuzluluk stresinin salisilik asit, triptofan ve β -karoten ile astarlanan tohumlarından üretilen reyhanlar üzerine etkilerini araştırmışlardır. Tohumlarına astarlama yapılmayan kontrol grubunda tuz stresinin uçucu yağ bileşenlerinden öjenol yüzdesini düşürdüğünü, ancak metilöjenol yüzdesini artırdığını tespit etmişlerdir. Astarlama uygulanan bitkilerde ise tuz stresinin öjenol yüzdesini artırırken metilöjenol yüzdesini düşürdüğü bildirilmiştir. Bununla birlikte, tuz

stresinin genel olarak toplam fenolik, flavonoid, kafeik asit, kikorik asit ve rozmarinik asit içeriğinde önemli azalmalara neden olduğunu bildirmişlerdir. Sonuç olarak, 100 mM tuz uygulamasında reyhanların verim açısından olumsuz etkilendiği, ancak özellikle 1 mM triptofan hazırlanmasının bitkileri tuzun toksik etkisinden koruyabileceği ve stres altındaki bireysel fenoliklerin miktarını artırabileceği görülmüştür.

Abdollahi Mandoulakani ve ark. (2017), kuraklık stresinin *O. basilicum*'un fenilpropanoid biyosentez yolağında yer alan beş genin (*CVOMT*; kavikol *O*-metil transferaz, *EOMT*; öjenol *O*-metil transferaz, *C4H*; sinamat 4-hidroksilaz, *4CL*; 4-kumarat-KoA ligaz, *CAD*; sinamil alkol dehidrojenaz) ekspresyon seviyeleri üzerindeki etkisini incelemek için bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar, kuraklık stresinin uçucu yağ bileşikleri üzerindeki etkisi ve incelenen genlerin ekspresyon seviyeleri ile ilişkilerini de araştırmışlardır. Sonuçlar, kuraklık stresinin metilkavikol ve metilöjenol miktarını artırdığını, bu bileşiklerin maksimum miktarının ise %50 tarla kapasitesi uygulamasında elde edildiğini göstermiştir. qRT-PCR analizi, şiddetli kuraklık stresinin *CVOMT* ve *EOMT* ekspresyon düzeyini sırasıyla yaklaşık 6,46 ve 46,33 kat artırdığını, buna karşılık *CAD* ifade seviyesinin nispeten değişmediğini, *4CL* ve *C4H* ekspresyon seviyelerinin ise kuraklık stresi koşullarında azaldığını ortaya koymuştur. Bununla birlikte, *CVOMT* ve *EOMT* ekspresyon seviyelerindeki değişikliklerin, metilkavikol ve metilöjenol içeriği ile önemli ölçüde ilişkili olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, bu sonuçlara dayanarak, kuraklık stresinin kısmen *CVOMT* ve *EOMT* ekspresyon seviyelerini artırarak uçucu yağ kompozisyonunda metilkavikol ve metilöjenol içeriğini artırdığını belirtmişlerdir.

Khakdan ve ark. (2017), farklı su stresi uygulamaları altında, çiçeklenme aşamasındaki üç İran reyhan kültüründe metilkavikol, metilöjenol birikim miktarları ve bu bileşiklerin biyosentezinde rol alan beş genin (*4CL*; 4-kumarat coA ligaz, *C3'H*; p-kumaril şikimat 3'-hidroksilaz, *COMT*; kafeik asit *O*-metiltransferaz, *CVOMT*; kavikol *O*-metiltransferaz, *EOMT*; öjenol *O*-metiltransferaz) ifade profillerini araştırmışlardır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda metilkavikol üretiminin *CVOMT* sentazların transkripsiyonel regülasyonu yoluyla kontrol edilebileceği saptanmıştır. Araştırmacılar bu verilere dayanarak, kültürler farklılığı gözetmeksizin "su stresi ne kadar büyükse, metilkavikol birikimi o kadar yüksek olur ve bunun tersi de geçerlidir" ifadesini rapor etmişlerdir. Çalışmanın sonuçları,

metilöjenol üretiminin sistemik bir ritmi takip etmediği ve sözkonusu genlerin regülasyonu ile metilkavikol ve metilöjenol üretiminin kültüvara ve kuraklık stresine bağımlı olduğunu göstermiştir.

Tavallali ve ark. (2019), farklı Fe kaynaklarının (Fe-arginin, Fe-glisin ve Fe-histidin nano kompleksleri ve Fe-EDDHA) reyhan yapraklarına püskürtme yolu ile uygulanması neticesinde reyhan uçucu yağındaki antioksidan ve antimikrobiyal aktivite değişimlerini incelemişlerdir. Uygulanan çeşitli Fe kaynaklarının reyhan uçucu yağındaki metilöjenol ve metilkavikol oranında önemli bir azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir.

Khalid ve El-Gezawy (2006), ana materyali ahır gübresi olan statik yığın kompostu ve çayı ile sıralı yığın (windrow) kompostu ve çayı uygulamalarının reyhanın büyüme ve gelişme parametrelerinin yanı sıra uçucu yağ ve toplam flavonoid miktarı üzerine etkisini incelemişlerdir. Tüm uygulama gruplarında metilkavikol oranının arttığını; en yüksek metilkavikol oranının statik kompost ile statik komposttan elde edilen çayın birlikte uygulanması neticesinde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Bączek ve ark. (2019), organik tarım esasına dayanan reyhan yetiştiriciliği için açık arazide ve alçak tünel altında olmak üzere iki yöntem uygulamıştır. Araştırmacılar, orta Avrupa iklim koşullarında, birbirini takip eden dört bitki kesimi ile hasadın gerçekleştirilebildiğini bildirmişlerdir. Hasat edilen bitkiler uçucu yağ, fenolik bileşik ve flavonoid miktarının belirlenmesi amacıyla kimyasal analizlere tabi tutulmuştur. Alçak tünel altında yetiştirilen bitkilerden toplanan örneklerin uçucu yağ, flavonoid ve fenolik asit içeriklerinin açık arazide yetiştirilen bitkilerden daha yüksek miktarlarda bulunduğunu tespit etmişlerdir.

Zhang ve ark. (2015), vermikompostun bünyesindeki sitokininlerin ve oksinlerin başarılı bir şekilde tespiti ile kantitasyonunu sağlamışlar ve vermikompost uygulamasının bitki büyümesini teşvik etmede etkinliğini açıklayan kanıtlar sunmuşlardır.

Taie ve ark. (2010), çeşitli dozlarda organik (bitkisel artıklardan windrow yöntemi ile elde edilen) kompost ve biyogübre (*Bacillus megatherium* var. *phosphaticum*, *Azospirillum lipoferum* ve *Pseudomonas fluorescences* bakteri kültürlerinin inokülasyonu)

uygulamalarıyla yetiştirilen reyhanların toplam fenolik ve flavonoid miktarları ile uçucu yağlarında meydana gelen değişimleri ve bunların antikanser aktivitelerini değerlendirmişlerdir. Bu amaçla biyogübre varlığında veya yokluğunda üç farklı dozda organik gübre (kompost) ile tohumlardan reyhan bireylerini yetiştirmişlerdir. Araştırmacılar, uygulama gruplarına ait reyhan bireylerinin yapraklarından hidrodistilasyon yöntemi ile ekstrakte edilen uçucu yağları GLC ile analiz ederek reyhan uçucu yağında bulunan on bir bileşiği tanımlamışlardır. Araştırmanın sonuçlarına göre, en yüksek antioksidan ve antikanser aktivitelerinin, biyogübre + %50 kompost ve biyogübre + %75 kompost uygulamalarında yetiştirilen reyhan bitkilerinden elde edilen ekstrakt ve uçucu yağlarda tespit edildiğini bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, reyhan ekstraktlarının fenolik, flavonoid ve reyhan uçucu yağlarının antioksidan aktivitesini artırmak için organik gübre ve biyogübre kullanımının önemini vurgulamaktadır.

Ramezani ve ark. (2013), ana materyali ahır gübresi olan vermikompostun beş farklı dozdaki (%0, %2, %4, %6, %8) uygulamalarının reyhanın yaş ağırlık, kuru ağırlık, uçucu yağ verimi ve uçucu yağ kompozisyonu üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarında, vermikompost uygulamalarının reyhan uçucu yağındaki metilkavikol ve metilöjenol oranları üzerine etkilerinin doz artışına bağlı olmaksızın değişiklik gösterdiğini fakat tespit edilen en yüksek metilkavikol ve metilöjenol oranlarının %8 vermikompost uygulama grubunda bulunduğunu bildirmişlerdir.

Shokooh ve ark. (2013) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada bazı biyouyarıcılar ve biyogübrelerin reyhanın morfolojik karakterleri ile uçucu yağ verimi ve kapsamı üzerine etkileri incelenmiştir. Araştırmacılar, Aminol Forte™, Kadostim™ ve Fosnutren™ (Inagrosa Industries Agro Biologicals, Madrid, İspanya) biyouyarıcılarını yapraklara (1,5 L.ha⁻¹) püskürtme yolu ile; Nitroxin™, Super-Nitro Plus™ ve Barvar II™ biyogübrelerini ise reyhan tohumlarına inokülasyon (0,5 L.ha⁻¹) şeklinde uygulamışlardır. Araştırmanın sonuçlarında, reyhan uçucu yağındaki en yüksek metilkavikol oranının Fosnutren™ ve Super-Nitro Plus™ ikili uygulama grubunda (%37,13) elde edildiği bildirilmiştir.

Singh ve ark. (2013), *Ocimum basilicum* var. CIM-Saumya tohumlarına biyogübreler ile (*Pseudomonas monteilii* – suşu CRC1, *Cronobacter dublinensis* – suşu CRC3 ve *Bacillus*

spp. – AZHGF1 suşu) inokülasyon uygulamasının uçucu yağın kapsamındaki metilkavikol miktarı üzerine önem arz eden bir etkisinin bulunmadığını bildirmiştir.

Klimánková ve ark. (2008), geleneksel tarım yöntemi veya Avrupa Birliği'nin belirlediği organik tarım düzenlemelerine göre (EEC Regülasyon No. 2092/91, 1991) yetiştirdikleri beş reyhan kültürünün uçucu yağ profillerindeki değişimleri araştırmışlardır. Bu çalışma kapsamında, geleneksel tarım grubundaki reyhan kültürlerine mineral gübre ve herbisit uygulamaları yapılmış, organik (ekolojik) tarım grubundaki bireylere ise sadece organik gübre uygulamaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarında reyhanların uçucu yağ profilinin geleneksel yöntem veya organik tarım yöntemi ile yetiştirilmelerine göre değiştiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, aynı ekolojik koşullarda (geleneksel tarım veya organik tarım) yetiştirilen farklı kültürlerin uçucu yağındaki değişimlerin de farklı olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Geleneksel tarımla yetiştirilen reyhanların uçucu yağ kapsamı ile karşılaştırıldığında organik tarıma dayalı yöntemle yetiştirilen reyhanların uçucu yağındaki metilkavikol oranının Kültivar 1, Kültivar 3 ve Kültivar 5'te arttığı fakat Kültivar 4'te ise azaldığı bildirilmiştir. Öjenolün ise Kültivar 1'de artış gösterdiği fakat Kültivar 2, Kültivar 4 ve Kültivar 5'te azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışmayla aynı ekolojik şartlarda yetiştirilen reyhanların da kültür farklılığı (kematipik farklılıklar) nedeniyle sekonder metabolizmalarının farklı yönlerde regüle edilebileceği belirtilmektedir.

Verma ve ark. (2016) tarafından toprak verimliliğini artırmanın alternatif bir yöntemi araştırıldığı bir çalışma kapsamında farklı kombinasyonlarda vermikompost ile verimli bazı biyogübrelerin (nitrojen fiksatorü *Bacillus* sp., fosfat çözücü *Bacillus megaterium*, bitki büyüme destekleyici *Pseudomonas monteilii*, arbusküler mikorhizal fungus (AMF) *Glomus intraradices*) *Ocimum basilicum* L. üzerine etkileri araştırılmıştır. Reyhanın uçucu yağındaki metilkavikolün vermikompost + *Bacillus* sp., vermikompost + *P. monteilii* ve vermikompost + *G. intraradices* ikili uygulama gruplarında önemli ölçüde artış gösterdiği bildirilmiştir.

Reyhanın fenilpropanoid biyosentez yolağının bir diğer kolunun son ürünlerinden olan allil-fenilpropenler, birçok endüstride hammadde olarak kullanılabilen önemli ticari bileşiklerdir. Abiyotik stres faktörleri, çeşitli elisitörler, biyoyararicılar ve biyogübre

uygulamaları neticesinde allil-fenilpropenlerin reyhan uçucu yağındaki miktarları üzerine etkilerini bildiren bu tür çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Önemli bir biyoyuvarıcı ve organik gübre olan vermikompostun sıvı ve katı haldeki iki farklı formda reyhan kemotiplerine uygulanması neticesinde allil-fenilpropenlerin kapsamı ve yolaktaki belli başlı genlerin ifadeleri üzerine etkileri ilk kez bu tez çalışması kapsamında araştırılmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan cihazlar

“Thermo Scientific™ ISQ™ Series Single Quadrupole GC-MS Systems” Gaz kromatografisi ve kütle spektrometresi cihazı.

“Bead Beater” cihazı (Sinbo SHB-3150 Smothie Blender’ın modifiyesi ile yapıldı).

“Biotium AccuLite™ Mini Fluorometer” RNA kantitasyon cihazı.

“Life Technologies QuantStudio 3D Digital PCR System” Gerçek zamanlı polimeraz zincirleme reaksiyon cihazı.

“Biologix” Santrifüj cihazı.

“Regal” Derin donduruculu buzdolabı.

“Velp Scientifica” Vorteks cihazı

“Velp Scientifica” Manyetik karıştırıcı

“ISOLAB” Terazî

Klimatik Kontrollü Bitki Büyütme Odası

3.1.2. Kullanılan kimyasallar

“EURX® GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit” RNA saflaştırma kiti

“GeneAll® Ribosaver™” RNA stabilizasyon solüsyonu

“EURX® NG dART RT” cDNA sentez kiti.

“GeneAll RealAmp™ SYBR qPCR Master Mix” RT-PCR kiti

Tris-HCl “Sigma”

D-Sorbitol “Sigma”

Sükroz “Sigma”

β-merkaptetoetanol “Sigma”

KCl “Sigma”

MgCl₂ “Sigma”

K₂PO₄ “Sigma”

Süksinik asit “Sigma”

EGTA (Egtazik asit) “Sigma”

Metilselüloz “Sigma”

Polivinilpirolidon (360.000 Mr) “Sigma”

Etil asetat “Sigma”

PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) “NZYTech”

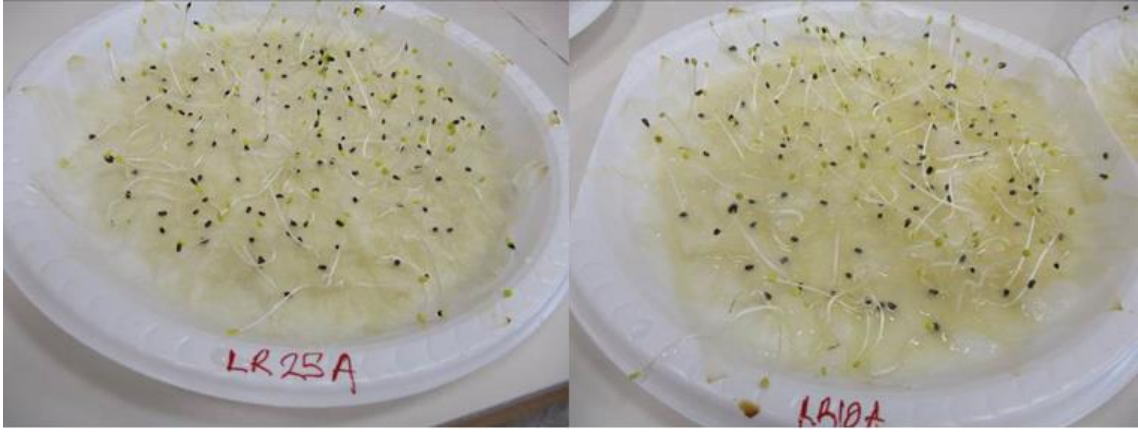
Tween® 80 “Merck”

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitkilerin yetiştirilmesi

Bu çalışmanın araştırma materyali olan reyhan kemotipleri, Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. İsa TELCİ’den temin edilmiştir. Bitkilerin yetiştirilmesi, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Laboratuvarında bu çalışma için inşa edilmiş olan otomatik iklim kontrollü bitki büyütme odasında gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla, LR10A (metilkavikol) ve LR25A (Metilöjenol) reyhan kemotiplerinden yaklaşık üç yüzer adet tohum çimlendirilmek için seçilmiştir. Tohumların en az 3-4 yıllık olması nedeniyle çimlenme yüzdelerinin düşük olabileceği varsayılmış ve çimlendirme başarısını artırmak için su yerine %20’lik vermikompost çayı kullanılmıştır (Şekil 3.1). Tohumların çimlendirilmesi işlemi inkübatörde 35 °C sabit sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir (Zhou ve Welbaum, 2012; Zhou ve ark., 2016).



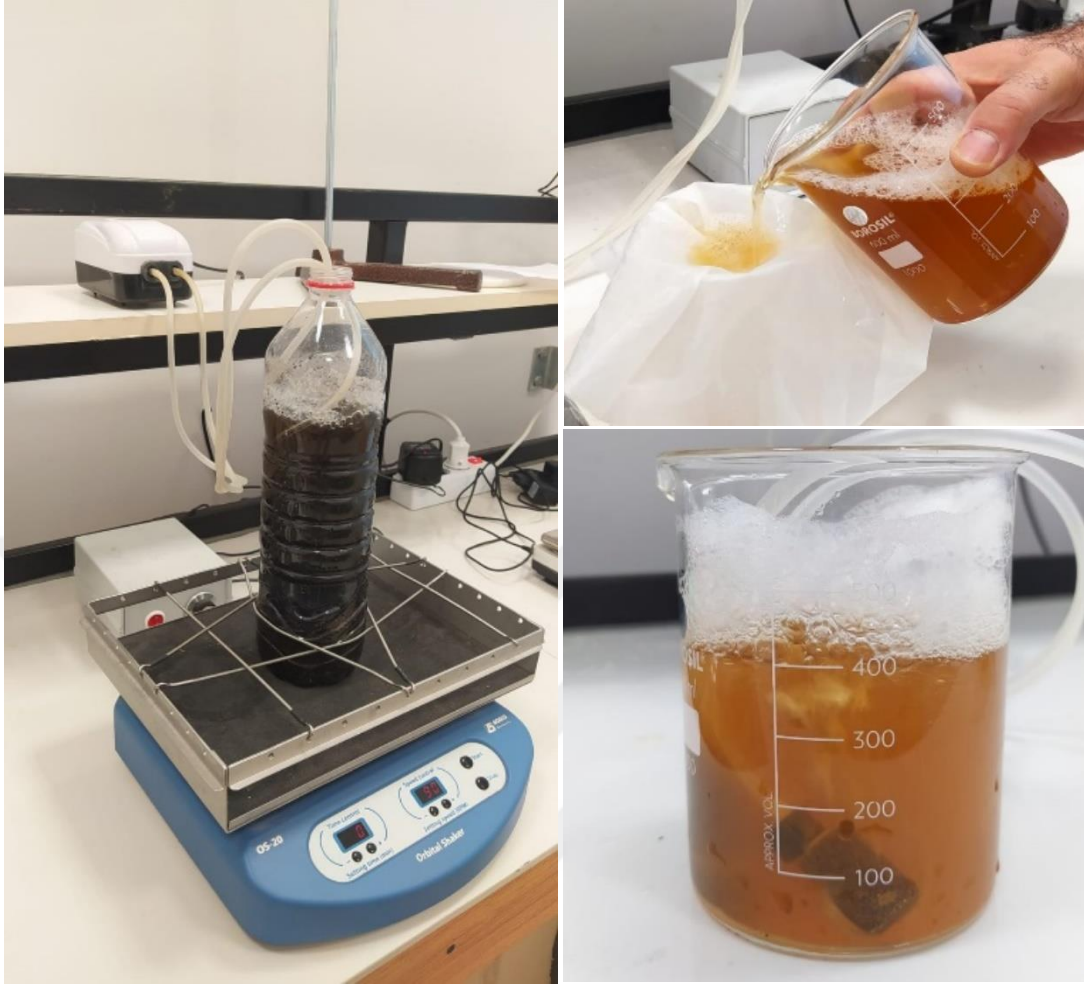
Şekil 3.1. Çimlenmeye başlayan reyhan tohumlarının üçüncü günündeki görünüşleri.

İnkübatörde geçen 3 günün sonunda, her iki kemotipin tohumlarında %100'e yakın çimlenme başarıları elde edilmiştir. Çimlenmiş tohumlar torf, toprak ve vermikülit (2:1:1) içeren 1000 cc hacmindeki saksılara aktarılmıştır. Katı vermikompost (KV) uygulama gruplarının yetiştirme ortamına, saksıya koyulan torf ve toprak toplam hacminin %10'u ve %25'i kadar vermikompost ilave edilmiştir.

%10 KV uygulama gruplarının saksılarına 75 cc vermikompost, 225 cc toprak ve 450 cc torf; %25 KV uygulama gruplarının saksılarına ise 185 cc vermikompost, 185 cc toprak ve 380 cc torf koyulmuştur. Çimlenen reyhan bireyleri, her saksıya ikişer adet olarak yerleştirilmiştir.

Sıvı vermikompost (SV) uygulama gruplarına, haftada bir kez olmak üzere, %10 veya %25 konsantrasyonlarında vermikompost çayı uygulanmıştır. %25 konsantrasyonundaki sıvı vermikompost çayı, uygulama gününden bir önceki günde hazırlanmaya başlanmıştır. 1 L saf suya 250 g vermikompost eklenmesi ile hazırlanan, 1:4 (w/v) oranında hazırlanan katı vermikompost:saf su karışımı akvaryum tipi bir havalandırma motorundan üretilen havanın yardımı ile 24 saat süreyle havalandırılmış ve çalkalayıcı ile karıştırılmıştır (Edwards ve ark., 2010).

Elde edilen karışım, 40 µm gözenek açıklığına sahip bir filtreden 5 kez geçirilerek süzölmüştür. Filtreden geçen solüsyona bir damla Tween® 80 eklenerek kullanıma hazır hale getirilmiştir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. SV uygulamaları için vermikompost çayının hazırlanması.

%10 konsantrasyonundaki SV uygulaması için gerekli solüsyon, %25 derişimdeki SV çözeltisinden alınan yeterli hacimdeki örneğin 1:2,5 oranında sulandırılması ile elde edilmiştir. Bu metot ile elde edilmiş olan SV çözeltileri spreyleme ile haftada bir kez yapraklara uygulanmıştır. SV uygulamaları esnasında yaprak yüzeylerinin tamamen ıslandığının kontrolü sağlanmıştır. Yaprak yüzeyinin kaplayan SV'un toprağa damlayarak kök bölgesine ulaşmasını engellemek için yeterli miktarda kullanılmasına dikkat edilmiştir. Kontrol grubundaki bireylerin yapraklarına ise SV uygulanan gruplarda tüketilen solüsyon miktarı kadar distile su püskürtülmüştür. Araştırmada kullanılan vermikompostun ham materyali ahır gübresi olup Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tarımsal Uygulama ve Araştırma Merkezi tarafından desteklenen Vermikültür Üretim Projesi kapsamında üretilmiş olan vermikomposttan temin edilmiştir. Otomatik iklim kontrollü bitki büyütme odasında 16 saat ışıklanma, %50-%60 nem, 25-18 °C sıcaklık

koşullarında yetiştirilen ve gelişim aşamaları Şekil 7.1 – 7.6’da gösterilen reyhan kemotipleri 1-4 Aralık 2019 tarihleri hasat edilmişlerdir.

3.2.2. Peltat salgı tüylerinin yapraklardan izolasyonu

Çimlenmeyi takiben 10. haftada yapraklardan salgı tüylerinin izolasyonu için aşağıda basamakları açıklanan Glass Bead Abrazyon protokolü uygulanmıştır (Gang ve ark., 2001). Bu metoda göre 2 cm uzunluktan küçük genç yapraklar pens ile kesilerek 15 g yaprak örneği toplandı (Şekil 3.9). Toplanan materyal buz içerisine oturtulmuş olan 300 mL’lik behere aktarıldı. Behere buz sıcaklığındaki saf su koyuldu ve 30-60 dakika su içerisinde bekletilerek yaprakların şişmeleri sağlandı. Su boşaltıldıktan sonra yapraklar Bead Beater cihazının 300 ml hacimli bir haznesine aktarıldı. Hazneye 40-50 g kadar 0,5 mm çapındaki cam boncuklar ve ardından 250 ml hacminde buz sıcaklığındaki salgı tüyü izolasyon tamponu (50 mM Tris-HCl, 200 mM d-Sorbitol, 20 mM Sükroz, 14 mM β -merkaptöetanol, 10 mM KCl, 5 mM $MgCl_2$, 0.5 mM K_2PO_4 , 5 mM Süksinik asit, 1 mM EGTA, %0.6 (w/v) Metilselüloz, %1 (w/v) Polivinilpirolidon (360 000 M_r) eklendi. Bead Beater cihazı çalıştırılarak dakikada yaklaşık 4200 devirde birer dakikalık fasılalar ile 3 kez 1 dakikalık karıştırma işlemi gerçekleştirildi (Şekil 3.10).



Şekil 3.3. İki cm'den küçük yaprakların pens yardımı ile toplanması.



Şekil 3.4. Toplanan yaprakların ve Bead Beater cihazına aktarımı.

Karıştırma işleminden sonra haznedeki karışımın tamamı 350 μ m gözenek açıklığına sahip süzgeçten geçirilerek yapraklar ayıklandı. Daha sonra karışımdan yaprak kalıntılarını uzaklaştırmak amacı ile 105 μ m gözenek açıklığındaki süzgeçten geçirildi. Süzgeçlerden akışı sağlamak ve tüyleri yıkamak amacı ile yaklaşık 300 ml kadar buz sıcaklığındaki metilselüloz ve polivinilpirolidon içermeyen depo salgı tüyü izolasyon tamponu kullanıldı (Şekil 3.11).

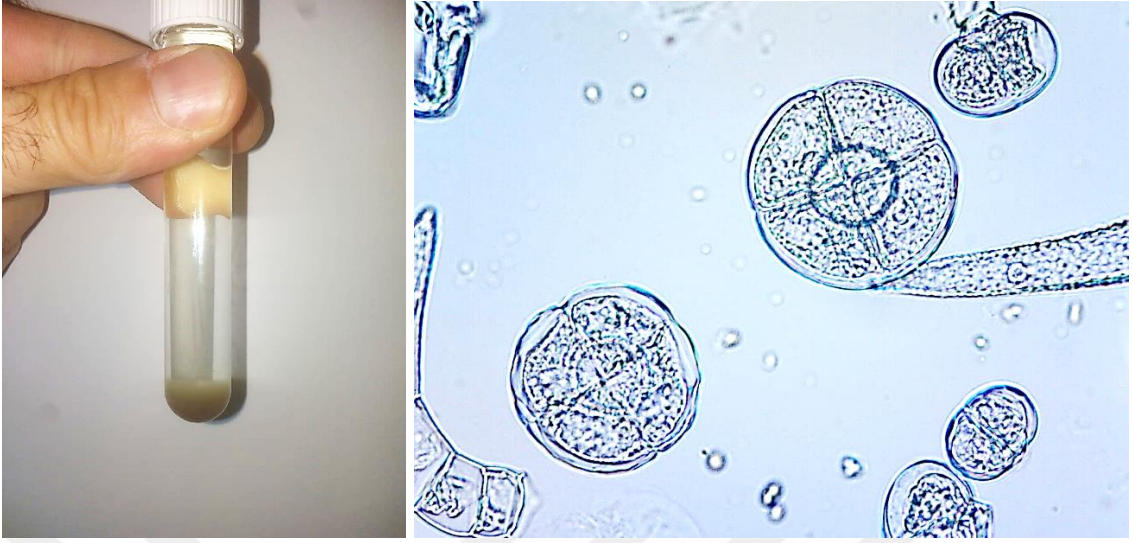


Şekil 3.5. Bead Beater'dan çıkarılan salgı tüyü izolasyon tamponu ve yaprak karışımının 350 μ m gözenek açıklığına sahip filtreden süzülmesi ve yaprakların uzaklaştırılması.



Şekil 3.6. Salgı tüyü izolasyon tamponunun sırası ile 105 μm ve 40 μm boyutlarında gözenek açıklığına sahip filtrelerden geçirilmesi ve elek üstünün pastör pipeti ile toplanması.

Ortalama çapı 80 μm olan peltat tüyler, süzme ve yıkama işlemlerinin neticesinde 40 μm 'lik gözenek açıklığına sahip süzgecin yüzeyinde biriktirilerek elde edildi (Şekil 3.12). Toplanan tüyler, 40 μm 'lik süzgeç üzerinde depo salgı tüyü tamponu ile en az 8 kez yıkandı ve 5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldıktan sonra buzdolabına yerleştirildi. Elde edilen salgı tüylerinin tamamının süspansiyonun içerisinde çökmesi (6-8 saat kadar) beklendi (Şekil 3.13). Bu metotla 15 g yaprak örneğinden yoğunlaşmış olarak yaklaşık 300 mikrolitre peltat salgı tüyü içeren stoklar elde edildi. Bekleme süresi sonunda tüpün dibine çökelen salgı tüylerinin üzerindeki salgı tüyü izolasyon tamponu pipetlenerek uzaklaştırıldıktan sonra salgı tüyü hacminin 10 katı kadar RNA stabilizasyon solüsyonu (RNAsaver, GeneAII) ilave edildi. GC-MS ile fenilpropenlerin analizi için ayrılan tüplerin salgı tüyü izolasyon tamponu da uzaklaştırıldıktan sonra tüpler -20 $^{\circ}\text{C}$ 'ye ayarlı dondurucuya yerleştirildi (Şekil 3.14).



Şekil 3.7. Reyhan yapraklarından izole edilen salgı tüylerinin tüp içerisindeki ve ışık mikroskobu altındaki görüntüleri.



Şekil 3.8. Reyhan yapraklarından izole edilen peltat salgı tüylerini içeren tüplerin -20 °C'de muhafazası.

3.2.3. Total RNA izolasyonu

Reyhan kemotiplerinin yapraklarından izole edilen peltat salgı tüylerinden total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu işlem EUR_x[®] GeneMATRIX Universal RNA Purification Kit'in bitkisel dokulardan RNA izolasyonu protokolüne göre yapılmıştır. Salgı tüyü stoklarının muhafaza edildiği tüplerdeki süpernatant (GeneAll[®] Ribosaver[™] RNA stabilizasyon solüsyonu) pipetlenerek uzaklaştırıldı. Doku içeriğine nüfuz etmiş olan RNA stabilizasyon solüsyonunu uzaklaştırmak için öncelikle her tüpe RNaz içermeyen su ile hazırlanmış 5 mL PBS (fosfat tamponlu tuz çözeltisi) eklenerek 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüjden sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve tekrar 5 mL PBS solüsyonu eklenerek 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında süpernatant uzaklaştırıldı.

50 mg peltat salgı tüyü materyali RNaz içermeyen 2 mL hacmindeki Eppendorf tüpe yerleştirildi. Bitki dokusuna 200 µL LG tamponu ve 100 µL RL tamponu eklendi. kuvvetlice vorteksenerek iyice karıştırıldı (Uygulama öncesinde RL ve LG tamponlarının 1 mL'sine 10 µL olmak üzere [1M] β-merkaptoetanol (β-ME) eklenerek tamponlar uygulamaya hazır hale getirildi). Örnekler 4 dakika 15 000 rpm'de (en yüksek hızda) santrifüj edildi. Süpernatant, RNaz içermeyen yeni Eppendorf tüpüne aktarıldı ve 200 µL RL tamponu eklendi. Pipetleme yaparak iyice karıştırıldı. Süpernatant, 2 mL hacimli toplayıcı tüp içerisindeki homojenizasyon spin kolonuna dikkatlice aktarıldı. 15 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek homojenizasyon spin kolonunda santrifügasyon lizatı filtre edildi ve böylelikle DNA uzaklaştırıldı. Kolondan akan kısma 300 µL etanol (%96) eklendi ve pipetlenerek iyice karıştırıldı. Örnek, 2 mL hacimli alıcı tüp içerisindeki RNA bağlayıcı spin kolonuna yüklendi, 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı ve santrifüj sonrasında alıcı tüp içine akan kısım atıldı, 400 µL Wash DN1 tamponu eklendi ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı.

Spin kolonu alıcı tüp içinden çıkartıldı, süpernatant döküldü ve alıcı tüp içerisine tekrar yerleştirildi. 650 µL Wash RBW eklendi ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Spin kolonu alıcı tüp içinden çıkartıldı, süpernatantı döküldü ve alıcı tüp içerisine tekrar yerleştirildi. 350 µL Wash RBW eklendi ve 12 000 rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Spin kolonu yeni bir alıcı tüpe yerleştirildi (2 mL hacminde) ve direkt olarak membranın

üstüne doğru 40-60 µL RNaz içermeyen su ilave edildi. 1 dakika 12 000 rpm’de santrifüj yapıldı. Spin kolonu çıkartıldıktan analize hazır RNA örnekleri, içinde bulundukları tüpün kapağı kapatılarak -80 °C’de cDNA aşamasına kadar muhafaza edildi.

3.2.4. Total RNA karakterizasyonu

Reyhan kemotiplerinin kontrol ve uygulama gruplarından izole edilen RNA’ların miktar tayinleri Biotium AccuLite™ Mini Fluorometer ile yapılmıştır. İzole edilmiş olan total RNA’ların konsantrasyon tayininde kullanılan Biotium AccuLite™ Mini Fluorometer cihazında kullanılan sarf malzemeleri RNA ipliği için oldukça yüksek özgüllük göstermektedir. Bu nedenle tuzlar, çözücüler, serbest nükleotidler, deterjanlar, DNA ve protein kirliliğinin ölçüm sonuçlarını etkilemesi pek olası değildir. Biotium AccuLite™ Mini Fluorometer ile RNA konsantrasyon ölçümleri %2 daha küçük hata payı ile gerçekleştirebilmektedir.

3.2.5. cDNA sentezi

mRNA izolasyonu sonrasında cDNA sentezi aşamasına geçilmiştir. cDNA sentezi için E0801-01 katalog numaralı EUR_X® NG dART RT kit kullanılmıştır. Sentez reaksiyonları için 0.2 mL hacmindeki RNaz içermeyen PCR tüplerine 4 µL 5X NG cDNA Buffer, 1 µL 50 µM Oligo(dT)₂₀, 1 µL NG dART RT mix ve 14 µL RNA örneği eklenmiştir. cDNA sentezi için mastermix hazırlandıktan sonra reverse transkripsiyon reaksiyonuna geçilmiştir. cDNA sentezi için kullanılan reverse transkripsiyon reaksiyonunun koşulları Çizelge 3.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.1. cDNA sentezi için gerçekleştirilen reverse transkripsiyon reaksiyonlarının çalışma koşulları.

Parametre	Adım 1	Adım 2
Sıcaklık (°C)	55	85
Süre	60 dk.	5 dk.

Elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR aşamasına kadar -20 °C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir.

3.2.6. Real-Time RT-PCR (Reverse Transcription PCR)

cDNA elde edildikten sonra Real-Time qPCR aşamasına geçilmiştir. Real-Time qPCR aşamasında 801-051 katalog numaralı GeneAll RealAmp™ SYBR qPCR Master Mix kullanılmıştır. Ekspresyon analizi için kullanılan master mix bileşenleri Çizelge 3.2’de belirtilmiştir.

Çizelge 3.2. Real-Time qPCR için kullanılan mastermix bileşenleri.

MasterMix Bileşenleri	Hacim
2X MasterMix (with SYBR-Green)	10 µL
ROX Dye	1 µL
Forward Primer (10 µM)	1 µL
Reverse Primer (10 µM)	1 µL
cDNA Template	4 µL
RNase-Free Distilled Water	3 µL
TOPLAM	20 µL

Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time qPCR reaksiyonuna geçilmiştir. Real-Time qPCR için kullanılan reaksiyon koşulları Çizelge 3.3’te belirtilmiştir. Real-Time qPCR reaksiyonu Applied Biosystems™ 7500 Fast Real-Time PCR cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. qPCR çalışma koşulları.

PCR Step	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Başlangıç Denatürasyonu	95 °C	300 s	1
Denatürasyon	95 °C	15 s	40
Primer Bağlanması	55 – 68 °C	60 s	
Erime Eğrisi	65 – 95 °C	2 - 5 s/step	1

3.2.7. Relatif kantitasyon hesaplaması

mRNA ekspresyonları kantitasyonu *GAPDH* transkripti referans olarak kullanılıp kontrol grubuna göre normalize edilmiştir. Relatif kantifikasyon hesaplamasında “ $\Delta\Delta C_t$ Yöntemi” kullanılmıştır. Bu amaçla hem hedef grupta hem de referans grupta her bir örneğin hem hedef mRNA hem de referans mRNA için Real-Time PCR sonucunda C_t

değerleri elde edilmiştir. İki tekrarlı çalışmada Ct değerlerinin ortalaması alınarak hesaplamaya devam edilmiştir. Hedef grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak hedef grup ΔCt değerleri elde edilmiştir. Referans grupta hedef mRNA Ct değerinden referans RNA Ct değeri çıkarılarak referans grup ΔCt değerleri elde edilmiştir. Hedef grup ΔCt değerlerinden referans grup ΔCt değerleri çıkarılarak $\Delta\Delta Ct$ değerleri elde edilmiştir. $\Delta\Delta Ct$ değerleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ şeklinde işleme alınarak kat değişimi (Fold Change) hesaplanması yapılmıştır. Fold Change değeri 1'in üzerinde çıkması durumunda hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak artış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır. Fold Change değeri 1'in altında çıkması durumunda ise hedef grubu mRNA ekspresyonunun referans grubun mRNA ekspresyonuna göre relatif olarak azalış gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

3.2.8. Primer seçimi

Reyhan (*Ocimum basilicum* L.) kemotiplerinin fenilalanin amonyum liyaz (PAL), 4-Kumarat-KoA ligaz (4CL), öjenol sentaz (EGS), öjenol O-metiltransferaz (EOMT) ve kavikol O-metiltransferaz (CVOMT) genlerine ve housekeeping olarak kullanılan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) genine özgü primerlerin dizileri ve alındıkları çalışmalar Çizelge 3.4'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Kullanılan primerler ve dizileri.

Primer Adı	Primer Dizisi	Referans
PAL	Düz GGCTACTCCGGCATAAGATTC	(Ziaei ve ark., 2012)
	Ters GTACGAGCTTCCGTCGAGGATG	(Ziaei ve ark., 2012)
4CL	Düz AAGGCTGCTTGGATTTCTCG	(Khakdan ve ark., 2017)
	Ters TTTTCACCGTCGACTTGCTG	(Khakdan ve ark., 2017)
EGS	Düz ATGGAGGAAAAAGGGTCGAAAAGC	(Anand ve ark., 2016)
	Ters TTATGCTGCTGAAGCAGGCGC	(Anand ve ark., 2016)
EOMT	Düz TGAGGCAGCAAACGGATG	(Khakdan ve ark., 2017)
	Ters CCATCGTTCCATTACCACCAC	(Khakdan ve ark., 2017)
CVOMT	Düz ACGCCACCCAGTTTGAGG	(Khakdan ve ark., 2017)
	Ters CCATTACCACCCCAACATC	(Khakdan ve ark., 2017)
GAPDH	Düz AACATTATCCCCAGCAGCAC	(Kwon ve ark., 2017)
	Ters TAGGAACTCGGAATGCCATC	(Kwon ve ark., 2017)

3.2.9. Peltat salgı tüylerinin uçucu organik bileşik kapsamının belirlenmesi

Reyhan kemotiplerinin vermikompost uygulama gruplarına ait peltat salgı tüyü stoklarından ellışer mikrolitre (50 µL) alındı ve 100 µL etil asetat ile iki kez ekstrakte edildi. Ekstraktın son hacmi 20 µL olana kadar 50 °C sıcaklıktaki su banyosunda yaklaşık 1 saat konsantre edildi. Konsantre edildikten sonra ekstrakt 80 µL etil asetat ile tekrar çözüldü ve GC-MS analizi için hazır hale getirildi (Gang ve ark., 2001).

Ekstraktın kapsamındaki uçucu bileşikler, bir ISQ Qd Kütle Spektrometresine bağı olan ve bir TG-5 MS kapiler kolonu (30m x 0.25mm, film kalınlığı 0.25µm; Thermo Scientific) ile donatılmış bir Thermo Scientific TRACE 1300 Gaz Kromatografi üzerinde analiz edildi. Taşıyıcı gaz olarak 1 mL/dk akış hızında helyum kullanılmıştır. Fırın sıcaklığı 2 dakika süreyle 60°C'de programlandı, ardından 5°C/dk'da 160 °C'ye yükseltildi ve 2 dakika tutuldu, ardından 20°C/dk'da 260°C'ye yükseltildi ve 20 dakika süreyle muhafaza edildi. Enjektör ve MS transfer hattının sıcaklığı 280 °C'ye ayarlandı; iyon kaynağının sıcaklığı 320 °C olarak ayarlandı. Kütle spektrumları, 70 eV'de elektron iyonizasyonu ile kaydedildi. Tarama aralığı 35 ila 550 m/z arasındaydı. Ekstrakttaki uçucu bileşiklerin tanımlanması, tutunma endekslerinin Wiley 9 kütle spektral kitaplığının arama sonuçları ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır.

3.2.10. Verilerin analizi

PCR sonuçlarına ait nispi gen ifade verileri $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak belirlenmiştir (Livak ve Schmittgen, 2001). Tüm verilerin varyans analizleri SPSS 15 paket programının genel doğrusal model prosedürü kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Alt grup ortalamalarının karşılaştırılmasında Duncan ve T testi kullanılmıştır (Eymen, 2007).

4. BULGULAR

Kontrol ve vermikompost uygulama gruplarına ait reyhan kemotiplerinin 2 cm'den küçük yapraklarından izole edilen peltat salgı tüylerinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen RNA'ların konsantrasyon değerleri Biotium AccuLite™ Mini Fluorometer cihazında ölçülmüş ve ölçülen sonuçlar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Reyhan kemotiplerinin peltat salgı tüylerinden izole edilen total RNA'ların konsantrasyon değerleri.

No	Kemotip	Uygulama Grupları		RNA (ng/μL)
1	Metilkavikol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	Kontrol.1	221.672
2	Metilkavikol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	Kontrol.2	244.299
3	Metilkavikol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	%10.1	285.076
5	Metilkavikol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	%25.1	234.619
6	Metilkavikol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	%25.2	259.182
7	Metilkavikol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	Kontrol.1	247.929
8	Metilkavikol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	Kontrol.2	246.114
9	Metilkavikol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	%10.1	255.312
10	Metilkavikol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	%10.2	194.205
11	Metilkavikol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	%25.1	253.132
12	Metilkavikol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	%25.2	249.865
13	Metilöjenol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	Kontrol.1	254.826
14	Metilöjenol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	Kontrol.2	268.983
15	Metilöjenol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	%10.1	273.218
16	Metilöjenol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	%10.2	202.554
17	Metilöjenol	Katı Vermikompost (KV) Uygulaması	%25.1	188.518
18	Metilöjenol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	%25.2	266.079
19	Metilöjenol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	Kontrol.1	229.295
20	Metilöjenol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	Kontrol.2	249.865
21	Metilöjenol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	%10.1	247.808
22	Metilöjenol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	%10.2	197.956
23	Metilöjenol	Sıvı Vermikompost (SV) Uygulaması	%25.1	243.573
24	Metilöjenol	Sıvı Vermikompost (KV) Uygulaması	%25.2	252.164

4.1. Vermikompostun Kimyasal Özellikleri

Bu çalışma kapsamında reyhanlara uygulanan vermikompost, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Vermikültür Üretim Tesisinden temin edilmiştir. Ziraat Fakültesinin Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü Laboratuvarında elde edilen analiz değerleri Çizelge 4.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Reyhan kemotiplerine uygulanan vermikompostun genel kimyasal özellikleri.

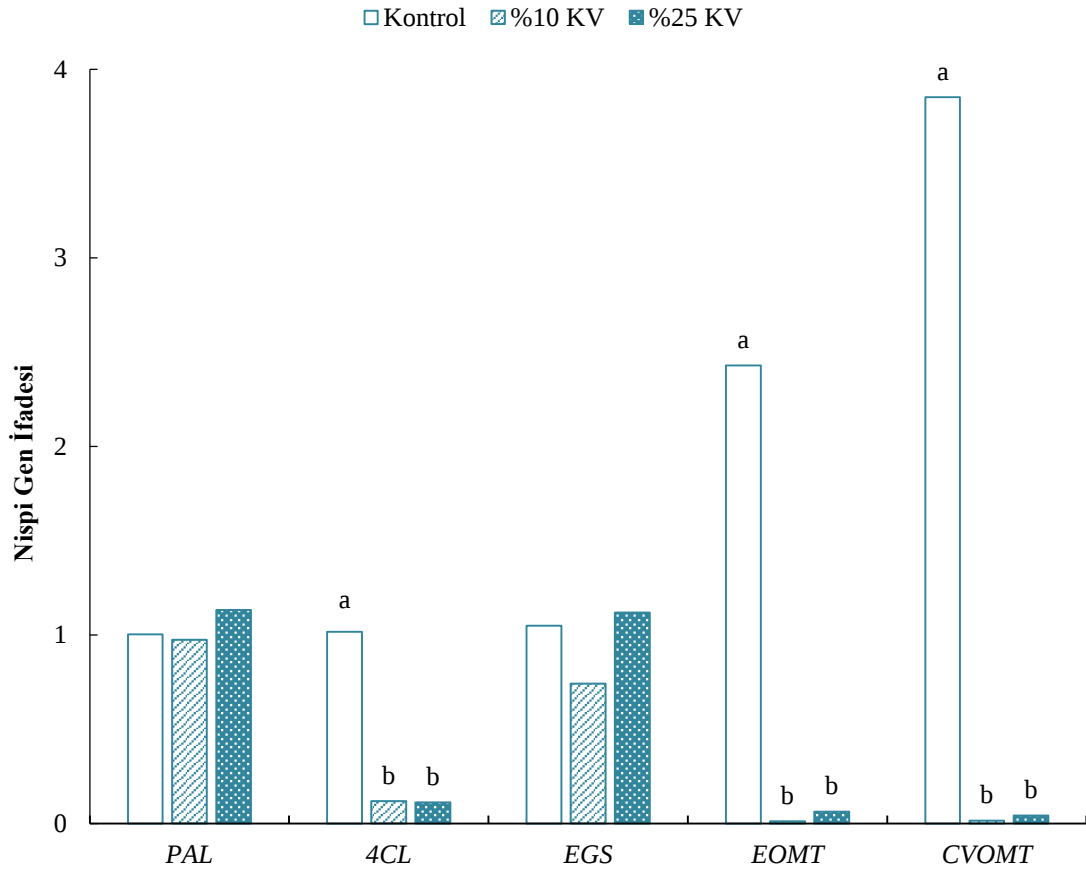
ANALİZ	DEĞER
pH	7.00
Ec (dS/m)	0.05
Organik Madde (%)	33-35
Toplam Azot (%)	1.5-1.75
C/N	9-11
Nem	25-30
Ağır Metal Kontaminasyonu	Yoktur
Patojen Mikroorganizma	Yoktur

4.2. Vermikompost Uygulamalarının Reyhan Kemotiplerinden İzole Edilen Peltat Salgı Tüylerindeki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* Genlerinin İfadesi ve Fenilpropenlerin Birikimi Üzerine Etkileri

Metilkavikol ve metilöjenol kemotipi reyhan bireylerinin kök bölgelerine %10 ve %25 dozlarında uygulanan katı vermikompostun ve toprak üstü kısımlarına püskürtme yolu ile %10 ve %25 konsantrasyonlarında uygulanan sıvı vermikompostun, reyhan fenilpropanoid metabolizmasında rol alan *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadeleri üzerine etkileri belirlenmiştir. Vermikompost uygulama metoduna ve dozuna bağlı olarak gen ifadelerinde değişimler gözlenmiştir.

4.2.1. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi reyhanlardan izole edilen peltat salgı tüylerindeki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadesi ve fenilpropenlerin birikimi üzerine etkileri

Metilkavikol kemotipi reyhan bireylerinin kök bölgelerine %0, %10 ve %25 oranlarında eklenmiş olan vermikompostun, reyhanın *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları üzerine etkileri Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

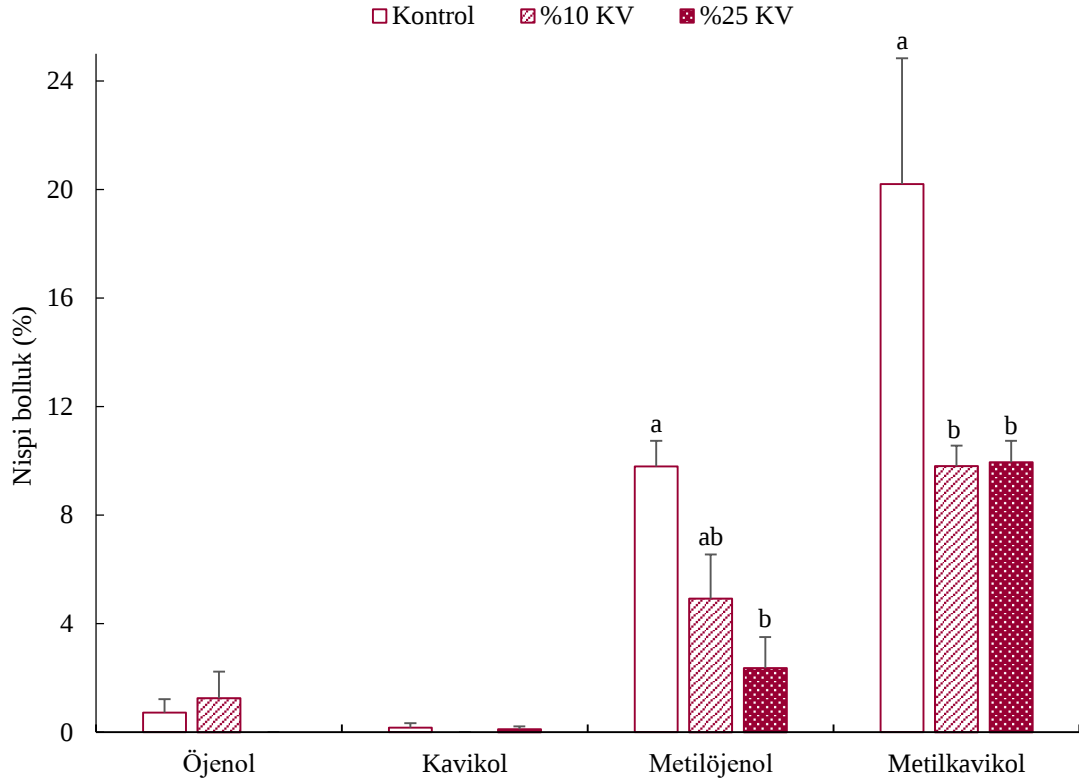


Şekil 4.1. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi reyhanın *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadeleri üzerine etkisi.

Metilkavikol kemotipi reyhan bireylerinin kök bölgelerine vermikompost eklenmesi ile *PAL* ve *EGS* genlerinin ifade oranlarında doz artışına bağlı olarak önemli değişiklikler gözlenmemiştir. Buna karşın, doz artışından bağımsız olarak, katı vermikompost uygulanması *4CL*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadelerinde büyük bir azalmaya yol açmıştır.

Metilkavikol kemotipi reyhanın kök bölgesine %10 KV uygulamalarının öjenol miktarını kısmi olarak artırdığı fakat kavikol birikimi üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı belirlenmiştir ($p \leq 0.05$). Buna karşın, kök bölgesine %10 ve %25 KV uygulanması neticesinde metilöjenol birikiminin sırasıyla yaklaşık %50 ve %76 azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.2). Bu sonuçlar, KV doz artışı ile metilöjenol birikimi arasında ters orantılı bir ilişki bulunduğunu göstermektedir ($p \leq 0.05$). Peltat salgı tüylerinin uçucu

yağındaki metilkavikol profili ise KV uygulama dozlarının her ikisinde de kontrol grubuna kıyasla benzer bir azalma oranı (%51) sergilemiştir.



Şekil 4.2. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi (10A) reyhanların fenilpropen kapsamı üzerine etkisi ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.3'te, artan KV dozlarına bağlı olarak *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları ve uçucu yağın kapsamındaki fenilpropenlerin bolluk yüzdeleri arasındaki korelasyon analizinin sonuçları yer almaktadır. Analiz sonuçlarına göre, en kuvvetli ve pozitif yöndeki korelasyon ilişkisi *CVOMT* gen ifadesi ile metilkavikol birikimi arasında bulunmaktadır ($p \leq 0.01$). Ayrıca, fenilpropanoid biyosentez yolağının en önemli dallanma noktasında yer alan *4CL* geninin ifade oranı ile peltat salgı tüylerinde metilöjenol ve metilkavikol üretimi arasında pozitif yönlü bir korelasyon tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). Bununla birlikte, peltat salgı tüylerinde metilöjenol birikimi ile *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin her ikisinin ifadeleri arasında da pozitif bir korelasyon bulunmuştur.

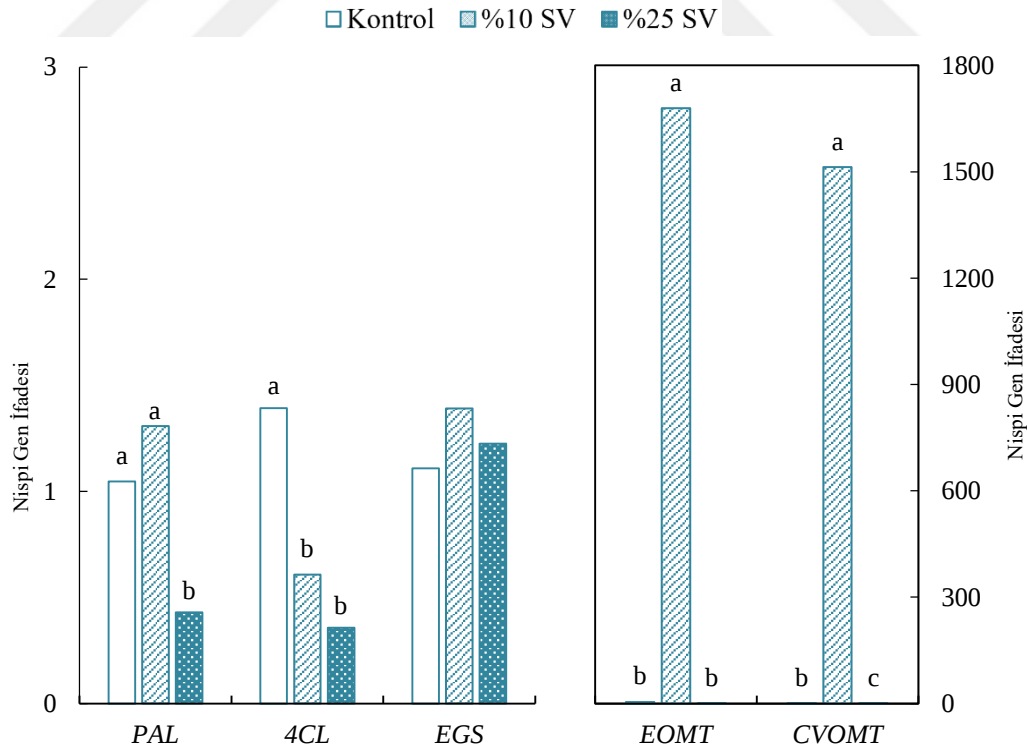
Çizelge 4.3. Farklı dozlarda KV uygulamalarına bağlı olarak metilkavikol kemotipi reyhanlardaki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT*, *CVOMT* genlerinin ifade oranları ile fenilpropen birikimi arasındaki korelasyon analizinin sonuçları.

Korelasyon	<i>PAL</i>	<i>4CL</i>	<i>EGS</i>	<i>EOMT</i>	<i>CVOMT</i>
Öjenol	-0.242	-0.018	-0.268	-0.120	0.199
Kavikol	0.152	0.515	0.230	0.681	0.049
Metilöjenol	-0.282	0.873*	0.029	0.838*	0.710*
Metilkavikol	0.082	0.738*	0.496	0.549	0.993**

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$

4.2.2. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi reyhanlardan izole edilen peltat salgı tüylerindeki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadesi ve fenilpropenlerin birikimi üzerine etkileri

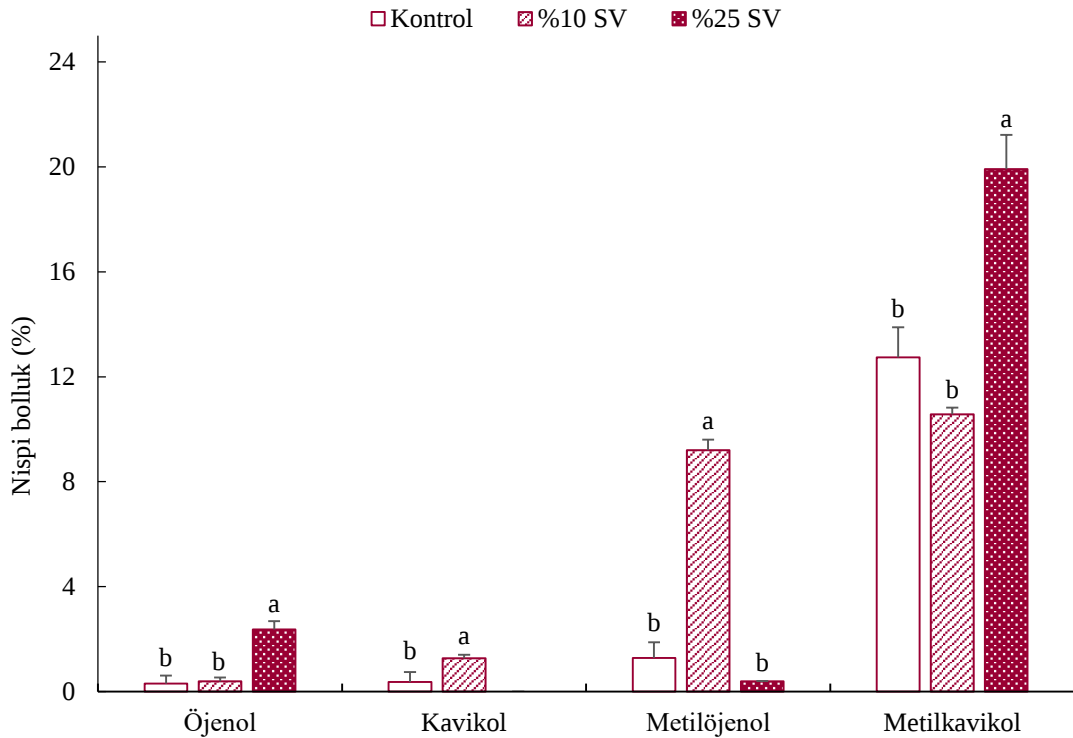
Metilkavikol kemotipi reyhan bireylerinin yapraklarına sıvı vermikompost (SV) uygulamasının gen ifade oranlarına etkisi Şekil 4.3'te gösterilmiştir. %10 oranında sıvı vermikompost (SV) uygulaması neticesinde *PAL* enzimini kodlayan gen ifadesinin %25 oranında arttığı, *4CL* gen ifadesinin %56 azaldığı, *EGS* gen ifadesinin ise %25 arttığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi reyhanın *PAL*, *4CL*, *EGS* ile *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadeleri üzerine etkisi.

%10 SV uygulaması neticesinde EOMT ve CVOMT enzimlerini kodlayan genlerin ifade oranlarında ise (sırasıyla yaklaşık 400 kat ve 1150 kat kadar) çok büyük artışların gerçekleştiği tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). %25 SV uygulama grubunda ise *EGS* haricinde, diğer genlerin ifadelerinde önemli düşüşler olduğu Şekil 4.3'te yer alan veri tablosu ve diyagramda gösterilmiştir.

Metilkavikol kemotipi reyhanların yapraklarına püskürtme yolu ile uygulanan %10 SV'nin kavikolün birikimini yaklaşık 2.5 kat (%243), metilöjenolün birikimini ise yaklaşık 6 kat (%613) artırdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.4). %25 SV uygulama grubunda ise öjenol oranının kontrol grubuna kıyasla yaklaşık 6.5 kat, metilkavikolün ise %56 oranında arttığı tespit edilmiştir. Aynı grupta metilöjenol oldukça düşük bir oranda (0.39) tespit edilmiş, kavikol ise hiç tespit edilememiştir.



Şekil 4.4. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilkavikol kemotipi (10A) reyhanın fenilpropan kapsamı üzerine etkisi ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.4'te SV uygulamalarına bağlı olarak metilkavikol kemotipi reyhanların peltat salgı tüylerindeki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları ile fenilpropan birikimi arasındaki korelasyon analizi sonuçlarına yer verilmiştir. Analiz

sonuçlarına göre peltat salgı tüylerinin uçucu yağ kapsamında metilöjenolün birikimi ile *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları arasında pozitif yönlü bir korelasyon tespit edilmiştir.

Bu genlerin ifade ürünleri olan *EOMT* ve *CVOMT* enzimlerinin (afiniteleri farklı olsa da) öjenol bileşiğini metilöjenole dönüştürebilme kabiliyeti vardır (Gang ve ark., 2002a). Ayrıca kavikol ve metilöjenol ile *EOMT* ve *CVOMT* gen ifadeleri arasında da pozitif yönlü bir korelasyon tespit edilmiştir.

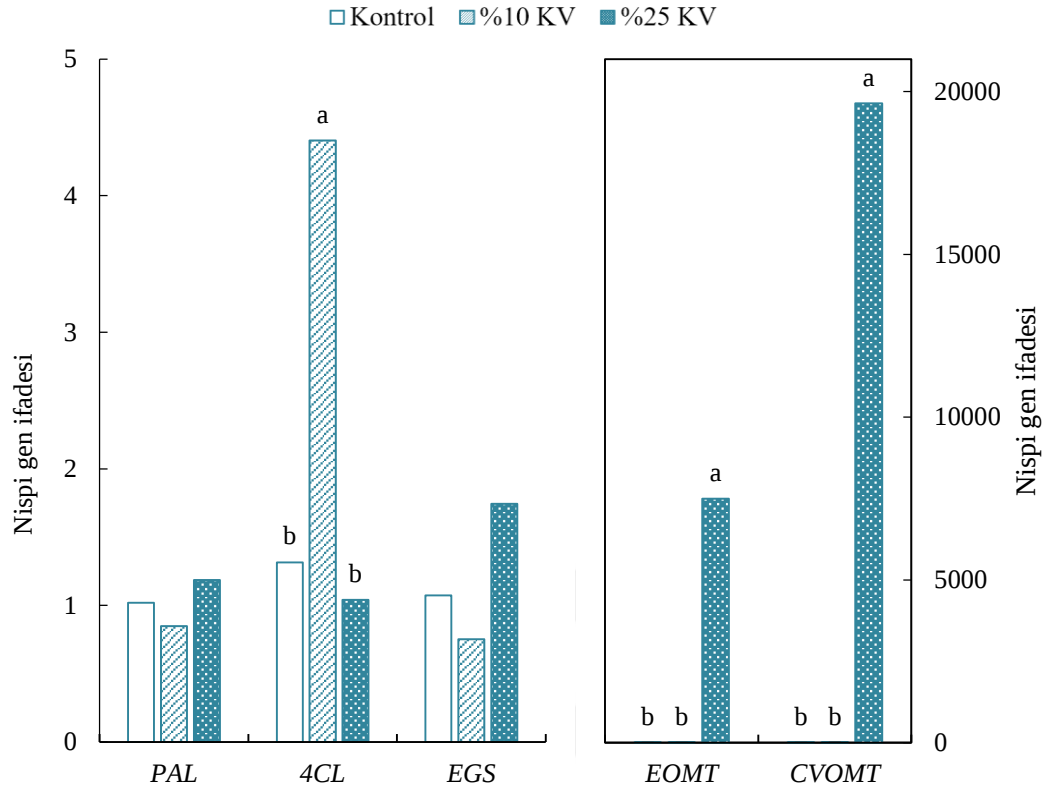
Çizelge 4.4. Farklı dozlarda SV uygulamalarına bağlı olarak metilkavikol kemotipi reyhanlardaki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları ile fenilpropen birikimi arasındaki korelasyon analizi sonuçları.

Korelasyon	<i>PAL</i>	<i>4CL</i>	<i>EGS</i>	<i>EOMT</i>	<i>CVOMT</i>
Öjenol	0.321	-0.520	0.077	-0.244	0.253
Kavikol	0.274	-0.245	0.592	0.699*	0.711*
Metilöjenol	0.377	-0.169	0.407	0.716*	0.733*
Metilkavikol	-0.396	-0.402	-0.043	-0.421	-0.433

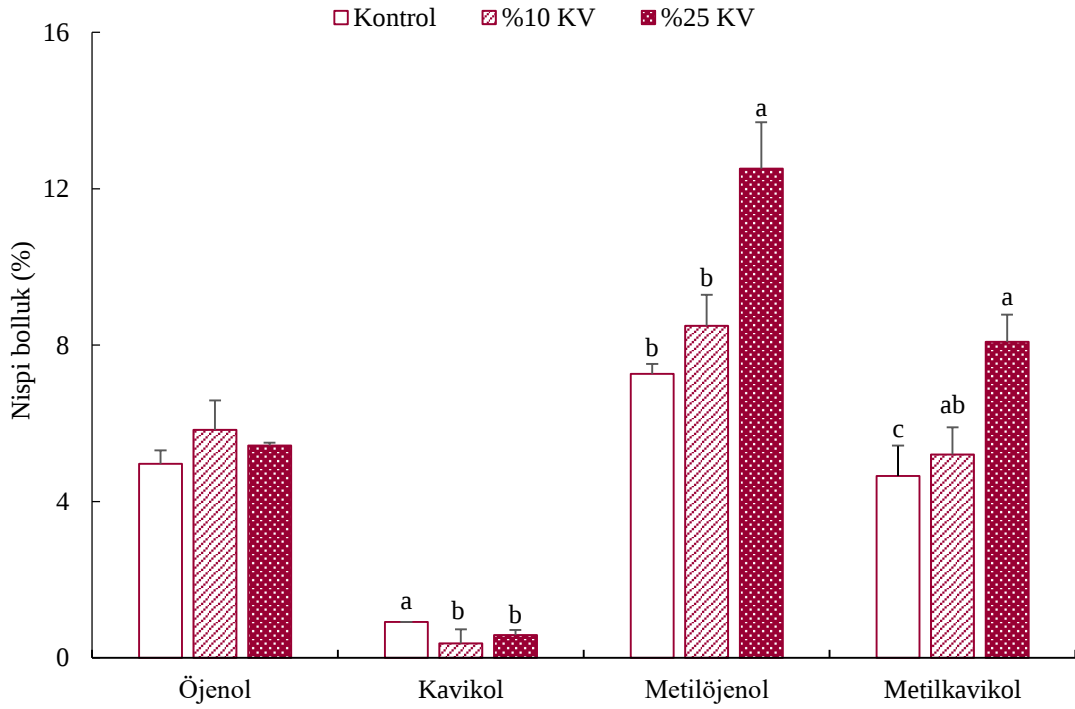
* $p \leq 0.05$

4.2.3. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi (25A) reyhanlardan izole edilen peltat salgı tüylerindeki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadesi ve fenilpropenlerin birikimi üzerine etkileri

Metilöjenol kemotipi reyhan bireylerinin kök bölgelerine %0, %10 ve %25 oranlarında eklenmiş olan vermikompostun, reyhanın peltat salgı tüylerindeki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları üzerine etkileri Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Metilöjenol kemotipi reyhanlara %10 KV uygulaması neticesinde KV kontrol grubuna göre *4CL* ifadesinin yaklaşık 2.5 kat, *EOMT* ifadesinin yaklaşık %50, *CVOMT* ifadesinin ise yaklaşık %77 artış gösterdiği tespit edilmiştir. %25 KV uygulama grubundaki reyhanların yapraklarından izole edilen peltat salgı tüylerinde ise *EGS* ifadesinin %62 oranında artış gösterdiği, *O*-metiltransferaz aktivitesi gösteren enzimleri kodlayan *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadelerinin ise sırasıyla 6632 kat ve 14 bin 443 kat artış gösterdiği görülmektedir.



Şekil 4.5. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi reynhanın *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadeleri üzerine etkisi.



Şekil 4.6. Katı vermikompost (KV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi reynhanların fenilpropan kapsamı üzerine etkisi ($p \leq 0.05$).

Metilöjenol kemotiplerine farklı dozlardaki (%10 ve %25) KV uygulamalarının öjenol birikimi üzerine önemli bir etkisinin bulunmadığı ($p \leq 0.05$) tespit edilmiştir (Şekil 4.6). Buna karşın, %10 KV ve %25 KV uygulamalarının reyhan yapraklarından izole edilen peltat salgı tüylerinde kavikol biyosentezini baskıladığı görülmektedir. %10 KV uygulamasının metilkavikol birikimini %12 kadar artırdığı tespit edilmiştir. Katı vermikompost uygulamaları doza bağlı olarak metilöjenol ve metilkavikol birikimini artırmıştır. Bu artış %25’lik KV uygulamasında istatistiki açıdan önemlidir ($p \leq 0.05$).

Çizelge 4.5’te, artan KV dozlarına bağlı olarak peltat salgı tüylerindeki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları ve fenilpropenlerin bolluk yüzdeleri arasındaki korelasyon analizi sonuçları yer almaktadır. Analiz sonuçlarına göre, artan dozlarda KV uygulamaları neticesinde *CVOMT* ifadesi ile metilöjenol ve metilkavikol fenilpropenlerinin peltat salgı tüylerindeki birikim oranları arasında pozitif yönlü bir korelasyon tespit edilmiştir.

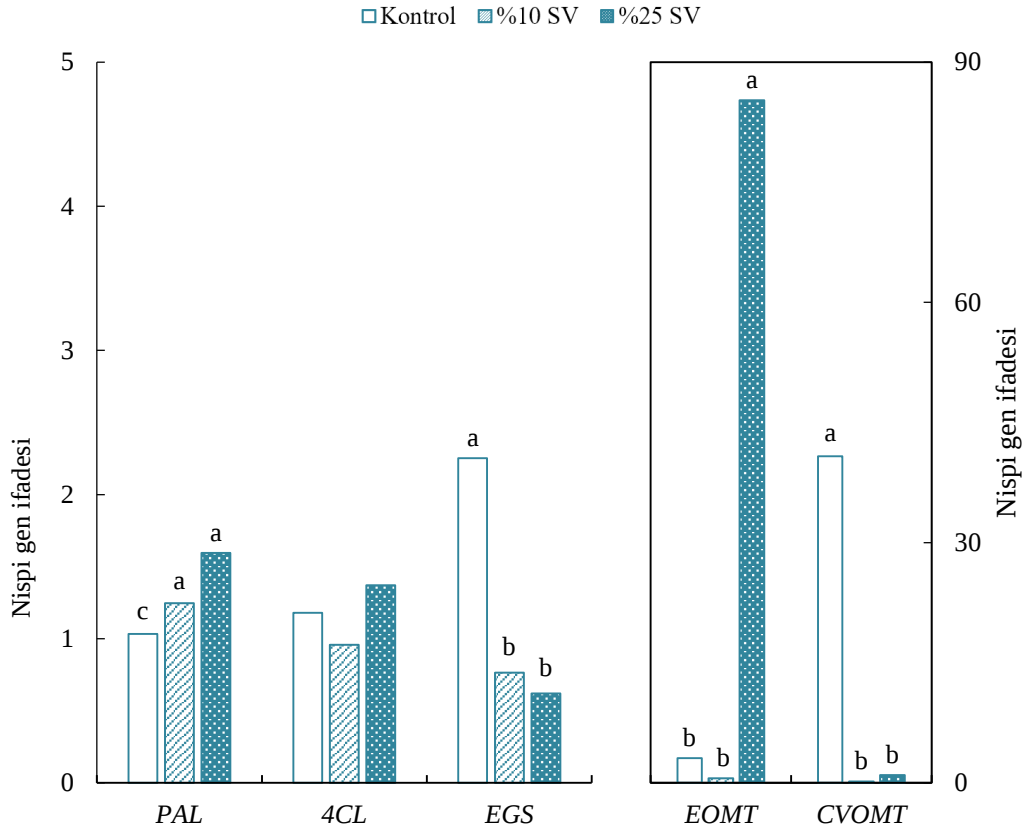
Çizelge 4.5. Farklı dozlarda KV uygulamalarına bağlı olarak metilöjenol kemotipi reyhanlardaki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları ile fenilpropen birikimi arasındaki korelasyon analizinin sonuçları.

Korelasyon	<i>PAL</i>	<i>4CL</i>	<i>EGS</i>	<i>EOMT</i>	<i>CVOMT</i>
Öjenol	0.466	-0.320	0.274	0.062	-0.033
Kavikol	-0.380	0.151	-0.108	0.077	-0.223
Metilöjenol	0.277	-0.347	0.555	0.539	0.827*
Metilkavikol	0.010	0.006	0.357	0.551	0.797*

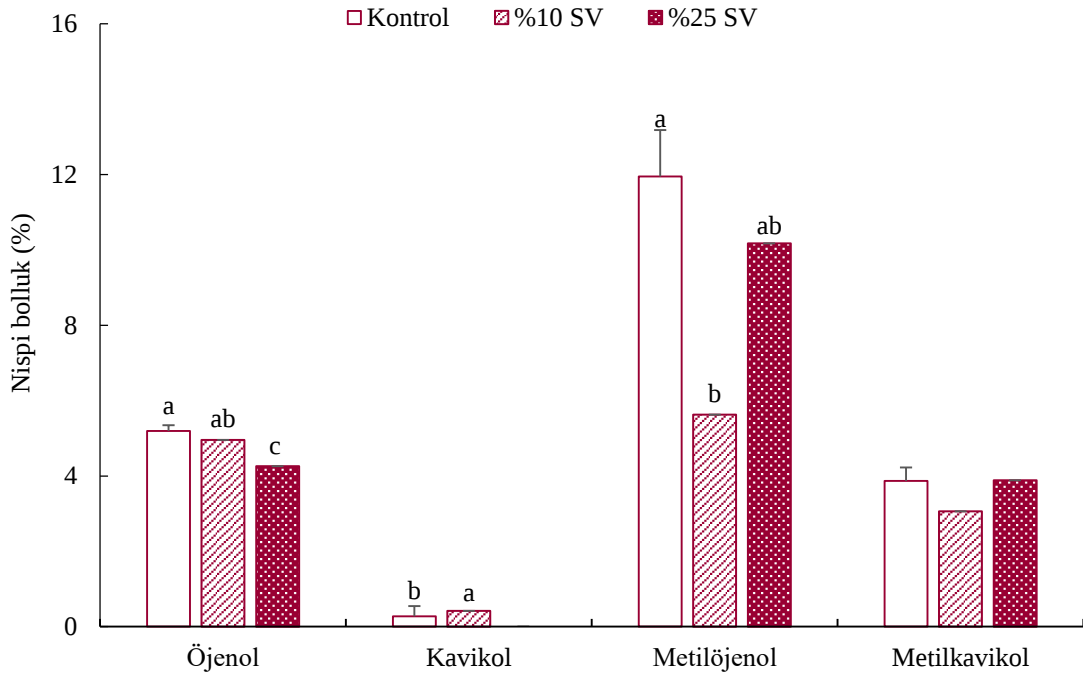
* $p \leq 0.05$

4.2.4. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilöjenol kemotipi (25A) reyhanlardan izole edilen peltat salgı tüylerindeki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadesi ve fenilpropenlerin birikimi üzerine etkileri

Metilöjenol kemotipi reyhan bireylerine %25 SV uygulaması neticesinde *PAL*, *4CL* ve *EOMT* gen ifadeleri artmış, *EGS* ve *CVOMT* gen ifadeleri ise azalmıştır (Şekil 4.7). %10 SV uygulama grubunda ise *PAL* geni ifadesi artarken diğer genlerin ifade oranları azalmıştır.



Şekil 4.7. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilöjenol kemitipi reyhanın *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadeleri üzerine etkisi.



Şekil 4.8. Sıvı vermikompost (SV) uygulamalarının metilöjenol kemitipi reyhanların fenilpropan kapsamı oranları üzerine etkisi ($p \leq 0.05$).

Metilöjenol kemotipi reyhan bireylerine SV uygulamalarının peltat salgı tüylerindeki öjenol ve metilöjenol miktarlarını nispeten azalttığı görülmektedir (Şekil 4.8). Özellikle %10 SV uygulama grubundaki metilöjenol miktarının SV Kontrol grubuna kıyasla %53 azaldığı tespit edilmiştir. Metilkavikol kemotipi reyhanlara SV uygulamalarının metilkavikol kapsamı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.6’da artan SV dozlarına bağlı olarak *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları ve uçucu yağın kapsamındaki fenilpropenlerin bolluk yüzdeleri arasındaki korelasyon analizi sonuçları yer almaktadır. Analiz sonuçlarına göre, SV uygulamalarına bağlı olarak *PAL* ifadesi ile öjenol birikimi arasında negatif bir korelasyon bulunduğu tespit edilmiştir ($p \leq 0.01$). Buna karşın *EGS* ifadesi ile kavikol kapsamı arasında ve *CVOMT* ifadesi ile metilkavikol kapsamı arasında pozitif yönde bir korelasyonun bulunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.6. Farklı dozlarda SV uygulamalarına bağlı olarak metilöjenol kemotipi reyhanlardaki *PAL*, *4CL*, *EGS*, *EOMT*, *CVOMT* genlerinin ifade oranları ile fenilpropen birikimi arasındaki korelasyon analizinin sonuçları.

Korelasyon	<i>PAL</i>	<i>4CL</i>	<i>EGS</i>	<i>EOMT</i>	<i>CVOMT</i>
Öjenol	-0.901**	-0.315	0.242	-0.594	0.247
Kavikol	-0.366	0.170	0.654*	-0.421	0.598
Metilöjenol	-0.159	0.055	0.157	0.156	0.242
Metilkavikol	0.220	0.487	0.591	0.310	0.643*

* $p \leq 0.05$

** $p \leq 0.01$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tarımsal faaliyetlerde ürün verimini artırmak amacıyla hibrit ve GDO'lu tohumluklar, pestisitler ve kimyevi gübrelerin yoğun ve yanlış kullanımı çevre ve insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. İhtiyacından fazla veya uzun süreli kimyevi gübre kullanımı nedeniyle topraklarda besin maddesi dengesizliği, mikroorganizma etkinliğinin azalması, tuzlanma meydana gelmektedir. Bu toprakların yıkanması sonucunda nitrat ve fosfat gibi tuzların akarsu, göl ve denizlere taşınması neticesinde ötrofikasyon gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır (Tunç, 2017). Ülkemizde Nisan 2021'den itibaren Marmara Denizi'nde ortaya çıkan müsilaj sorunu ötrofikasyona bir örnektir. Marmara Deniz'indeki müsilaj tek hücreli bir fitoplankton olan *Gonyaulax fragilis* isimli dinflagellat başta olmak üzere çeşitli fitoplanktonik türlerin aşırı çoğalması ve ortamda vuku bulan bazı şartlara tepki olarak bıraktıkları salgıdan kaynaklanmaktadır (Escalera ve ark., 2019; Kurt ve ark., 2020). Sera etkisinin deniz suyu sıcaklığını yükseltmesi ve bilinçsiz kimyevi gübre kullanımının su kaynaklarında ve denizlerde sebep olduğu nitrat kirliliğinin de önemli etkisinin olduğu müsilaj sorunu, tarımsal faaliyetlerde organik gübre kullanımının önemini ortaya koymaktadır (Anonim, 2021).

Bitki biyoyarıcıları, besin içeriklerinden bağımsız olarak beslenme etkinliğini, abiyotik stres toleransını ve/veya ürünlerin kalite özelliklerini geliştirmek amacıyla bitkilere uygulanan herhangi bir madde veya mikroorganizmalardır (du Jardin, 2015). Biyoyarıcıların humik maddeler kategorisi içerisinde sınıflandırılan vermikompost kökenli humik ekstraktların, bitki büyüme ve gelişimini bünyesindeki bitkisel hormonlar ve hormon benzeri moleküller ile uyardığı birçok çalışmanın sonuçlarında bildirilmiştir (Arancon ve ark., 2006; Arthur ve ark., 2007; Kauffman ve ark., 2007; Sinha ve ark., 2009; Scaglia ve ark., 2016). Biyoyarıcıların çeşitli konsantrasyonlarda bitkilere uygulanması ve bunların etki mekanizmalarına bağlı olarak tıbbi ve aromatik bitkilerin sekonder metabolit kapsamı üzerinde çok farklı etkilere sebep olduğu bildirilmektedir (Rafiee ve ark., 2016).

Reyhan uçucu yağlarının ekonomik değeri, içeriğindeki öjenol, kavikol ve bunların türevleri olan fenilpropanoidler ve terpenoidlerin mevcudiyetinden kaynaklanmaktadır. Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesi, esas olarak serbest radikalleri absorbe etme ve

nötralle etmede, singlet ve triplet oksijeni söndürmede veya peroksitleri parçalamada önemli bir rol oynayabilen redoks özelliklerinden kaynaklanmaktadır.(Elmastas ve ark., 2004; Kısa ve ark., 2016). Bu fitokimyasalların birçoğu, kanser insidansını ve ölüm oranlarını düşürebilen önemli antioksidan kapasitelere sahiptir ve organik tarım koşullarında yetiştirilen reyhanlarda bu özelliklere sahip fenolik bileşiklerin artış gösterdiği bildirilmiştir (Taie ve ark., 2010).

Bu çalışma kapsamında metilkavikol kemotipi reyhanların kök bölgesine %10 ve %25 oranında uygulanan katı vermikompost uygulamasının, reyhan bireylerinin yapraklarından izole edilen peltat salgı tüylerindeki fenilpropen bileşiklerinin kapsamını düşüren bir etkisi olduğu tespit edilmiştir. %10 ve %25 KV uygulama gruplarının her ikisindeki metilkavikol kapsamı, kontrol grubuna göre yaklaşık %50 oranında azalmıştır. GC-MS analiz sonuçlarına göre elde edilen bu veriler, Taie ve ark. (2010)'un bitkisel atıklardan üretilen kompost ve kompost+biyogübre uyguladığı reyhanlarda metilkavikolün azalması ile uyumludur. Singh ve ark. (2014) ise ahır gübresi ve kimyevi gübrenin birlikte uygulandığı reyhanların metilkavikol kapsamında bir değişiklik gerçekleşmediğini bildirmişlerdir. Metilkavikol kemotipinde metilöjenolün ise KV doz artışı ile ters orantılı biçimde giderek azaldığı tespit edilmiştir. Fenilpropanoid metabolizmasında önemli bir dallanma noktasında bulunan 4CL enzimini kodlayan genin ifadesi ile bu yolağın son ürünleri olan metillenmiş fenilpropenleri kodlayan *CVOMT* ve *EOMT* genlerinin ifadelerinin ise KV uygulamaları ile oldukça azaldığı belirlenmiştir. Böylelikle GC-MS ve qRT-PCR analizlerinin sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu görülmüştür. KV uygulamaları neticesinde peltat salgı tüylerinin kapsamındaki metilkavikol ve metilöjenol fenilpropenleri ile *4CL*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifade oranları arasında görülen pozitif yönlü ilişki, korelasyon analizi ile de doğrulanmıştır.

Metilkavikol kemotipi reyhan bireylerinin yapraklarına püskürtme yolu ile uygulanan sıvı vermikompostun metilkavikol kapsamı üzerine etkisinin en fazla %25 SV uygulanan grupta gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu grupta metilkavikol oranının kontrole kıyasla %56 oranında arttığı belirlenmiştir. %10 SV uygulama grubunda ise metilöjenol oranının kontrole kıyasla yaklaşık 6 kat, kavikolün ise yaklaşık 2.5 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Metilkavikol kemotipine %25 SV uygulaması öjenol oranını kontrole göre yaklaşık 6.5 kat artırırken metilöjenol oranını %70 oranında azalttığı belirlenmiştir. SV

uygulamaları neticesinde gen ifade profilindeki en büyük değişim %10 SV uygulama grubunda gerçekleşmiştir. Bu grupta *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadeleri kontrole kıyasla sırasıyla yaklaşık 390 kat ve 1150 kat artmıştır. %10 SV uygulama grubunda metilkavikol oranında önemli bir değişim olmamış fakat metilöjenol oranında yaklaşık 6 katlık bir artış tespit edilmiştir. Metilöjenol oranındaki bu artışa *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadelerindeki bu büyük artışın sebep olduğu düşünölmektedir. *EOMT* enziminin öjenole olan yüksek afinitesinin yanında, nispeten düşük de olsa, kavikole de afinitesinin bulunduğu Gang ve ark. (2002a) tarafından bildirilmiştir.

SV uygulamalarına bağlı olarak metilkavikol kemotipi reyhanların peltat salgı tüylerinde fenilpropen birikimi ve gen ifadelerinin değerlendirildiği korelasyon analizi neticesinde de metilöjenol oranı ile *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadeleri arasında pozitif yönlü bir ilişki bulunduğu tespit edilmiştir.

Metilkavikol kemotipi reyhanlara %10 ve %25 KV uygulamalarının peltat salgı tüylerindeki metillenmiş fenilpropenlerin yüzdesini ve ilgili *O*-metiltransferaz genlerinin (*EOMT* ve *CVOMT*) ifade oranlarını düşürdüğü görölmektedir. Buna karşın, bu kemotipin yapraklarına püskürtme yolu ile farklı dozlarda SV uygulanması neticesinde fenilpropenler ve bunların metillenmiş formlarının yanı sıra *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin ifadelerinde de artışlar olduğu görölmektedir. Aynı materyalin iki farklı yöntem ile uygulanmasının fenilpropen biyosentezi üzerine farklı etkiler göstermesi öngörölebilir bir sonuçtur. Vermikompost, bileşimindeki hümit maddenin yanı sıra sahip olduğu zengin mikrobiyota nedeniyle bir biyoyararıcı olarak sınıflandırılmıştır (du Jardin, 2015). Metilkavikol kemotipine SV uygulamaları neticesinde bitki dokularına vermikompost içeriğindeki mikroorganizmaların da nüfuz etme potansiyelleri vardır. Bu yüzden kontrol grubuna kıyasla metillenmiş fenilpropenlerde görölen artışın vermikompostun bünyesindeki zengin mikrobiyotadan kaynaklandığı düşünölmektedir. Pauli ve Kubeczka (2010) metillenmiş fenilpropenlerin daha yüksek antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ve biyotik stres sırasında daha fazla sentezlendiklerini ifade etmektedir. Pauli ve Kubeczka (2010)'nın çalışmasında öjenol ve kavikol fenilpropen bileşiklerinin metillenmiş formlarının metillenmemiş formlarına kıyasla antimikrobiyal etkinliklerinin çok daha yüksek (metilöjenol > metilkavikol > öjenol > kavikol) olduğu bildirilmiştir. Metilkavikol kemotipi reyhanlara %10 SV uygulaması sonrası uçucu yağ kapsamındaki

EOMT geni ifadesi ve metilöjenol oranındaki artışın, yapraklara uygulanan vermikompostun bünyesindeki mikroorganizmalara karşı daha etkili bir savunma amacıyla gerçekleşmiş olması muhtemeldir. Daha yüksek konsantrasyonda gerçekleşen %25 SV uygulama grubunda ise metilkavikol birikiminin en yüksek orana ulaşması (her ne kadar *EGS* haricindeki genlerin ifade oranları düşmüş olsa da) biyotik strese karşı verilen bir cevabın devamlılığını göstermektedir.

Metilöjenol kemotipi reyhan bireylerine %10 KV uygulamaları neticesinde metillenmiş fenilpropenlerin birikiminde ve *4CL*, *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin nispi ifadelerinde artışlar olduğu görülmekte fakat *EOMT* ve *CVOMT* ifadelerindeki en yüksek artışın %25 KV grubunda gerçekleştiği dikkat çekmektedir. Metilöjenol kemotipi reyhanlara %10 ve %25 KV uygulamaları neticesinde, peltat salgı tüylerinin uçucu yağ kapsamındaki öjenol oranının anlamlı derecede değişmediği, kavikol oranının azaldığı fakat metilöjenol ve metilkavikol oranlarının arttığı görülmektedir. Reyhan kemotiplerine katı vermikompost uygulamalarının metilkavikol ve metilöjenol fenilpropenleri üzerine etkileri farklılık arz etmektedir. Metillenmiş fenilpropenler metilkavikol kemotipinde azalırken metilöjenol kemotipinde artış göstermiştir. Bu durumun kemotipik farklılıktan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. KV uygulamalarına bağlı olarak metilöjenol kemotipi reyhanların peltat salgı tüylerindeki fenilpropen kapsamı ve gen ifadeleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği korelasyon analizi neticesinde de *CVOMT* gen ifadesi ile metilöjenol ve metilkavikol kapsamı arasında pozitif yönlü bir ilişki bulunduğu tespit edilmiştir.

Metilöjenol kemotipi reyhan bireylerine SV uygulamalarının metilkavikol kapsamında önemli bir değişikliğe neden olmadığı görülmüştür. Buna karşın, öjenol ve metilöjenolün ise azaldığı görülmüştür. SV uygulamaları neticesinde fenilpropenler arasında en büyük dalgalanma metilöjenol kapsamında gerçekleşmiştir. %10 SV uygulama grubunda yaklaşık %50 oranında azalan metilöjenol, %25 SV uygulama grubunda, %10 SV uygulama grubuna kıyasla yaklaşık %80 artış göstermektedir.

SV uygulamaları neticesinde peltat salgı tüylerinin uçucu yağ kapsamındaki metilöjenol oranının dalgalanması ile *EOMT* ifade oranındaki değişimler de paralellik göstermektedir. *EOMT* ifadesi %10 SV uygulama grubunda kontrol grubundaki ifade oranına kıyasla %80 azalırken, %25 SV uygulama grubunda ise %10 SV uygulama

grubundaki ifadesine kıyasla yaklaşık 140 kat artmıştır. SV uygulamalarına bağlı olarak metilöjenol kemotipi reyhanların peltat salgı tüylerindeki fenilpropen kapsamı ve gen ifadeleri arasındaki ilişkinin değerlendirildiği korelasyon analizi neticesinde öjenol birikimi ile *PAL* ifadesi arasında negatif yönlü, kavikol birikimi ile *EGS* ve metilkavikol birikimi ile *CVOMT* gen ifadeleri arasında pozitif yönlü bir ilişki bulunduğu tespit edilmiştir.

Genel olarak reyhanla yapılan çalışmalar incelendiğinde; Khakdan ve ark. (2017), farklı reyhan kültürlerini kuraklık stresine maruz bırakarak bazı fenilpropanoid metabolizması enzimlerini kodlayan genlerin ifade oranlarındaki değişimleri araştırmış ve gen ifade düzeyinde strese verilen cevabın kültüvara göre farklılık gösterdiğini bildirmiştir. Klimánková ve ark. (2008) ile Burducea ve ark. (2018), organik gübreleme ile yetiştirilen reyhan kültürlerinin uçucu yağ kapsamındaki fenilpropenlerin, kültürlerimize göre değiştiğini bildirmişlerdir. Yukarıdaki çalışmalar dikkate alındığında bizim çalışmamızdaki sonuçlarla uyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Çünkü bu çalışmada kemotipe bağlı olarak fenilpropen bileşiklerinin temel olarak değiştiğini görmekteyiz.

Bu çalışmanın sonuçlarına göre, reyhanların peltat salgı tüylerinde *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin çok büyük oranlarda ifade edilebildiğinin tespiti, reyhan peltat salgı tüylerinin fenilpropanoid metabolizması araştırmaları için ne denli önemli bir araştırma materyali olduğunu bir kez daha kanıtlamaktadır. Metilkavikol ve metilöjenol kemotipi reyhanların yaprakları ve yapraklardan izole edilen peltat salgı tüylerinden elde edilen protein ekstraktlarında *PAL*, *EOMT* ve *CVOMT* enzim aktiviteleri çalışılmış ve peltat salgı tüylerinde özellikle *EOMT* ve *CVOMT* enzim yüksek bulunmuştur (Gang ve ark., 2002b). Bu çalışmada da peltat salgı tüylerinde *EOMT* ve *CVOMT* genlerinin diğer genlere oranla daha fazla ifade edildiği belirlenmiştir.

Fenilpropanoid biyosentez yolağının birçok noktasındaki ara ürünlerin öncül molekül olarak kullanılabilmesi ile lignin sentezinden flavonoidlere, stilbenoidlerden diarilheptanoidler ve gingerollere kadar çok çeşitli fenolik moleküllerin biyosentezine doğru metabolik regülasyonlar gerçekleşebilmektedir (Şekil 2.24). Fenilpropanoid biyosentez yolağındaki bu muazzam dallanma ve son ürün çeşitliliği birçok araştırmacıyı cezbetmekte fakat aynı zamanda da yolağın dinamiklerinin keşfinde birçok zorluk

ıkartmaktadır. Ortaya çıkan bu zorluğu aşabilmek için fenilpropanoid metabolizmasını konu edinen araştırmaların çok yönlü olarak planlanması gerekmektedir. Yolağın bir ucundaki son ürünler olan fenilpropenlerin biyosentezini araştırmayı amaçlayan gelecekteki çalışmaların, önemli bir biyokütle kazanım göstergesi olan lignin biyosentezini ve/veya çeşitli stres faktörlerine cevap olarak sentezlenen flavonoidlerin biyosentezini de konu edinmesinin gerekli olduğu dşnlmektedir.



6. KAYNAKLAR

- Abdollahi Mandoulakani, B., Eyvazpour, E. ve Ghadimzadeh, M. 2017. The effect of drought stress on the expression of key genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids and essential oil components in basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry*, 139, 1-7.
- Amaral-Baroli, A., Lago, J. H. G., De Almeida, C. V., De Almeida, M., Scotti, M. T., Leone, G. F., Soares, M. G., Cavalari, A. A. ve Sartorelli, P. 2016. Variability in essential oil composition produced by micropropagated (in vitro), acclimated (ex vitro) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Industrial Crops and Products*, 86, 180-185.
- Anand, A., Jayaramaiah, R. H., Beedkar, S. D., Singh, P. A., Joshi, R. S., Mulani, F. A., Dholakia, B. B., Puneekar, S. A., Gade, W. N., Thulasiram, H. V. ve Giri, A. P. 2016. Comparative functional characterization of eugenol synthase from four different *Ocimum* species: Implications on eugenol accumulation. *Biochim Biophys Acta*, 1864, 1539-47.
- Ângelo, L., Fernanda, D. ve Ana Paula, D. 2016. Biological Properties of Plant-Derived Alkylresorcinols: Mini-Review. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16, 851-854.
- Anonim, 2018a. Anti-Microbial Properties of Eugenol to drive the Global Eugenol Market to Reach US\$ 754.1 million revenue by 2026 end. <https://www.globenewswire.com/news-release/2018/03/07/1417672/0/en/Anti-Microbial-Properties-of-Eugenol-to-drive-the-Global-Eugenol-Market-to-Rreach-US-754-1-million-revenue-by-2026-end.html> (02.03.2021).
- Anonim, 2018b. Estragole Market Forecast, Trend Analysis & Competition Tracking - Global Market Insights 2018 to 2027. Fact.MR <https://www.factmr.com/report/3024/estragole-market> (02.03.2021).
- Anonim, 2021. Marmara Denizi'nde 'ekolojik yıkım': Müsilaj (deniz salyası) nedir? Çözüm için ne planlanıyor? : <https://tr.euronews.com/2021/06/05/marmara-denizi-nde-ekolojik-y-k-m-musilaj-nedir-cozum-icin-ne-planlan-yor> (05.06.2021).
- Anwar, M., Patra, D. D., Chand, S., Alpesh, K., Naqvi, A. A. ve Khanuja, S. P. S. 2005. Effect of Organic Manures and Inorganic Fertilizer on Growth, Herb and Oil Yield, Nutrient Accumulation, and Oil Quality of French Basil. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 36, 1737-1746.
- Arancon, N. Q., Edwards, C. A., Lee, S. ve Byrne, R. 2006. Effects of humic acids from vermicomposts on plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 42, S65-S69.
- Arthur, G. D., Stirk, W. A., Novák, O., Hekera, P. ve Van Staden, J. 2007. Occurrence of nutrients and plant hormones (cytokinins and IAA) in the water fern *Salvinia molesta* during growth and composting. *Environmental and Experimental Botany*, 61, 137-144.
- Astani, A., Reichling, J. ve Schnitzler, P. 2012. *Melissa officinalis* Extract Inhibits Attachment of Herpes Simplex Virus in vitro. *Chemotherapy*, 58, 70-77.
- Awika, J. M., Rooney, L. W. ve Waniska, R. D. 2005. Anthocyanins from black sorghum and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 90, 293-301.
- Bączek, K., Kosakowska, O., Gniewosz, M., Gientka, I. ve Węglarz, Z. 2019. Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Productivity and Raw Material Quality from Organic Cultivation. *Agronomy*, 9, 279.

- Badalingappanavar, R., Hanumanthappa, M., Veeranna, H., Kolakar, S. ve Khidrapure, G. 2018. Organic fertilizer management in cultivation of medicinal and aromatic crops: a review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7, 126-129.
- Baser, K. H. C. 2008. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design*, 14, 3106-3119.
- Bate-Smith, E. C. 1969. Luteoforol (3',4',5,7-pentahydroxyflavan) in *Sorghum vulgare* L. *Phytochemistry*, 8, 1803-1810.
- Bate-Smith, E. C. ve Creasey, L. L. 1969. Luteoforol in strawberry leaves. *Phytochemistry*, 8, 1811-1812.
- Batish, D. R., Singh, H. P., Kaur, S., Kohli, R. K. ve Yadav, S. S. 2008. Caffeic acid affects early growth, and morphogenetic response of hypocotyl cuttings of mung bean (*Phaseolus aureus*). *Journal of Plant Physiology*, 165, 297-305.
- Bi, B., Tang, J., Han, S., Guo, J. ve Miao, Y. 2017. Sinapic acid or its derivatives interfere with abscisic acid homeostasis during *Arabidopsis thaliana* seed germination. *BMC Plant Biology*, 17.
- Borges, F., Roleira, F., Milhazes, N., Santana, L. ve Uriarte, E. 2005. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 887-916.
- Bourgaud, F., Hehn, A., Labat, R., Doerper, S., Gontier, E., Kellner, S. ve Matern, U. 2006. Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. *Phytochemistry Reviews*, 5, 293-308.
- Brandt, E. V., Ferreira, D. ve Roux, D. G. 1981. Metabolites from the purple heartwood of mimosoideae. Part 3. *Acacia crombei* C. T. White: structure and partial synthesis of crombenin, a natural spiropeltogynoid. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, 1879-1883.
- Bunzel, M., Ralph, J., Brüning, P. ve Steinhart, H. 2006. Structural Identification of Dehydrotriferulic and Dehydrotetraferulic Acids Isolated from Insoluble Maize Bran Fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6409-6418.
- Burducea, M., Zheljaskov, V. D., Dincheva, I., Lobiuc, A., Teliban, G.-C., Stoleru, V. ve Zamfirache, M.-M. 2018. Fertilization modifies the essential oil and physiology of basil varieties. *Industrial Crops and Products*, 121, 282-293.
- Cabras, P., Angioni, A., Tuberoso, C., Floris, I., Reniero, F., Guillou, C. ve Ghelli, S. 1999. Homogentisic Acid: A Phenolic Acid as a Marker of Strawberry-Tree (*Arbutus unedo*) Honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4064-4067.
- Canellas, L. P., Dantas, D. J., Aguiar, N. O., Peres, L. E. P., Zsögön, A., Olivares, F. L., Dobbss, L. B., Façanha, A. R., Nebbioso, A. ve Piccolo, A. 2011. Probing the hormonal activity of fractionated molecular humic components in tomato auxin mutants. *Annals of Applied Biology*, 159, 202-211.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Jones, D. L., Nebbioso, A., Mazzei, P. ve Piccolo, A. 2015. Humic and fulvic acids as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 15-27.
- Canellas, L. P., Olivares, F. L., Okorokova-Facanha, A. L. ve Facanha, A. R. 2002. Humic acids isolated from earthworm compost enhance root elongation, lateral root emergence, and plasma membrane H⁺-ATPase activity in maize roots. *Plant Physiol*, 130, 1951-7.
- Canellas, L. P., Piccolo, A., Dobbss, L. B., Spaccini, R., Olivares, F. L., Zandonadi, D. B. ve Facanha, A. R. 2010. Chemical composition and bioactivity properties of

- size-fractions separated from a vermicompost humic acid. *Chemosphere*, 78, 457-66.
- Carmen, P., Vlase, L. ve Tamas, M. 2009. Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37, 129-132.
- Catalgol, B., Batirel, S., Taga, Y. ve Ozer, N. K. 2012. Resveratrol: French paradox revisited. *Front Pharmacol*, 3, 141.
- Catarino, M. D., Silva, A. M. S. ve Cardoso, S. M. 2017. Fucaceae: A Source of Bioactive Phlorotannins. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1327.
- Cerrato, A., De Santis, D. ve Moresi, M. 2002. Production of luteolin extracts from *Reseda luteola* and assessment of their dyeing properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1189-1199.
- Chávez, H., Estévez-Braun, A., Ravelo, A. G. ve González, A. G. 1999. New Phenolic and Quinone–Methide Triterpenes from *Maytenus amazonica*. *Journal of Natural Products*, 62, 434-436.
- Chen, H. 2014. *Biotechnology of lignocellulose. Theory and Practice*. China: Chemical Industry Press and Springer.
- Chen, R., Zhang, J., Hu, Y., Wang, S., Chen, M. ve Wang, Y. 2014. Potential Antineoplastic Effects of Aloe-emodin: A Comprehensive Review. *The American Journal of Chinese Medicine*, 42, 275-288.
- Chen, S.-G., Leu, Y.-L., Cheng, M.-L., Ting, S. C., Liu, C.-C., Wang, S.-D., Yang, C.-H., Hung, C.-Y., Sakurai, H., Chen, K.-H. ve Ho, H.-Y. 2017. Anti-enterovirus 71 activities of *Melissa officinalis* extract and its biologically active constituent rosmarinic acid. *Scientific Reports*, 7.
- Cheynier, V., Comte, G., Davies, K. M., Lattanzio, V. ve Martens, S. 2013. Plant phenolics: recent advances on their biosynthesis, genetics, and ecophysiology. *Plant Physiol Biochem*, 72, 1-20.
- Chiang, V. L. 2006. Monolignol biosynthesis and genetic engineering of lignin in trees, a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4, 143-146.
- Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P. ve Rahmani, M. 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68, 307-312.
- Clifford, M. N. ve Scalbert, A. 2000. Ellagitannins – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1118-1125.
- Colla, G., Roupael, Y., Canaguier, R., Svecova, E. ve Cardarelli, M. 2014. Biostimulant action of a plant-derived protein hydrolysate produced through enzymatic hydrolysis. *Front Plant Sci*, 5, 448.
- Copetta, A., Lingua, G. ve Berta, G. 2006. Effects of three AM fungi on growth, distribution of glandular hairs, and essential oil production in *Ocimum basilicum* L. var. Genovese. *Mycorrhiza*, 16, 485-494.
- Council Regulation (Eec) No. 2092/91 1991. Council Regulation (EEC) No. 2092/91 of 24 June 1991 on organic production of agricultural products and indications referring thereto on agricultural products and foodstuffs. *Official Journal L*.
- Darrah, H. H. 1988. *The cultivated basil*. Buckeye Printing Company, Independence, MO.
- Deng, Y. ve Lu, S. 2017. Biosynthesis and Regulation of Phenylpropanoids in Plants (review). *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36, 257-290.

- Deschamps, C., Gang, D., Dudareva, N. ve Simon, J. E. 2006. Developmental Regulation of Phenylpropanoid Biosynthesis in Leaves and Glandular Trichomes of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *International Journal of Plant Sciences*, 167, 447-454.
- Desjardins, J., Tanabe, S., Bergeron, C., Gafner, S. ve Grenier, D. 2012. Anthocyanin-rich black currant extract and cyanidin-3-O-glucoside have cytoprotective and anti-inflammatory properties. *J Med Food*, 15, 1045-50.
- Dhar, N., Sarangapani, S., Reddy, V. A., Kumar, N., Panicker, D., Jin, J., Chua, N.-H. ve Sarojam, R. 2020. Characterization of a sweet basil acyltransferase involved in eugenol biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 71, 3638-3652.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M. S. S. ve Wang, L. 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence-a genomics perspective (review). *Molecular Plant Pathology*, 3, 371-390.
- Dixon, R. A. ve Paiva, N. L. 1995. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. review. *The Plant Cell*, 7, 1085-1097.
- Du Jardin, P. 2015. Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae*, 196, 3-14.
- Dzhanfezova, T., Barba-Espín, G., Müller, R., Joernsgaard, B., Hegelund, J. N., Madsen, B., Larsen, D. H., Martínez Vega, M. ve Toldam-Andersen, T. B. 2020. Anthocyanin profile, antioxidant activity and total phenolic content of a strawberry (*Fragaria* × *ananassa* Duch) genetic resource collection. *Food Bioscience*, 36, 100620.
- Edwards, C. A., Arancon, N. Q. ve Sherman, R. L. 2010. *Vermiculture Technology: Earthworms, Organic Wastes, and Environmental Management*, CRC Press.
- Efsa Panel on Food Additives and Nutrient Sources Added to Food (Efsa Ans Panel), Younes, M., Aggett, P., Aguilar, F., Crebelli, R., Dusemund, B., Filipič, M., Frutos, M. J., Galtier, P. ve Gott, D. 2018. Refined exposure assessment of extracts of rosemary (E 392) from its use as food additive. *EFSA Journal*, 16, e05373.
- El-Awadi, M., Dawood, M., Abdel-Baky, Y. R. ve El-Rokiek, K. G. 2017. Investigations of growth promoting activity of some phenolic acids. *Agricultural Engineering International: CIGR Journal*, 2017, 53-60.
- El-Naggar, A., Hassan, M., Shaban, E. ve Mohamed, M. Effect of Organic and Biofertilizers on Growth, Oil Yield and Chemical Composition of the Essential Oil of *Ocimum basilicum* L. *Plants*. 2015.
- El-Seedi, H. R., El-Said, A. M. A., Khalifa, S. a. M., Göransson, U., Bohlin, L., Borg-Karlson, A.-K. ve Verpoorte, R. 2012. Biosynthesis, Natural Sources, Dietary Intake, Pharmacokinetic Properties, and Biological Activities of Hydroxycinnamic Acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10877-10895.
- Elmastas, M., Ozturk, L., Gokce, I., Erenler, R. ve Aboul-Enein, H. Y. 2004. Determination of Antioxidant Activity of Marshmallow Flower (*Althaea officinalis* L.). *Analytical Letters*, 37, 1859-1869.
- Escalera, L., Italiano, A., Pistocchi, R., Montresor, M. ve Zingone, A. 2019. *Gonyaulax hyalina* and *Gonyaulax fragilis* (Dinoflagellata), two names associated with 'mare sporco', indicate the same species. *Phycologia*, 57, 453-464.
- Evans, C. S. 1991. J. B. Harborne (ED.) *Methods in plant biochemistry: 1. plant phenolics*. Academic Press, New York and London, 1990. £65. *Phytochemical Analysis*, 2, 48-48.

- Evans, F. J., Lee, M. G. ve Games, D. E. 1979. Electron impact, chemical ionization and field desorption mass spectra of some anthraquinone and anthrone derivatives of plant origin. *Biomedical Mass Spectrometry*, 6, 374-380.
- Eymen, U. E. 2007. SPSS 15.0 veri analiz yöntemleri. İstatistik Merkezi Yayın, 1, 167.
- Ferreira, E. S. B., Hulme, A. N., McNab, H. ve Quye, A. 2004. The natural constituents of historical textile dyes. *Chemical Society Reviews*, 33, 329-336.
- Ferrer, J.-L., Austin, M. B., Stewart, C. ve Noel, J. P. 2008. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids (review). *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 356-370.
- Fischer, R., Nitzan, N., Chaimovitch, D., Rubin, B. ve Dudai, N. 2011. Variation in essential oil composition within individual leaves of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) is more affected by leaf position than by leaf age. *J Agric Food Chem*, 59, 4913-22.
- Galarraja Montes, E. ve Amaro-Luis, J. M. 2016. Icosandrin, a novel peltogynoid from the fruits of *Phytolacca icosandra* (Phytolaccaceae). *Natural Product Research*, 30, 89-94.
- Gales, L. ve Damas, A. M. 2005. Xanthones-A Structural Perspective. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2499-2515.
- Gang, D. R. 2005. Evolution of flavors and scents. *Annu Rev Plant Biol*, 56, 301-25.
- Gang, D. R., Lavid, N., Zubietta, C., Chen, F., Beuerle, T., Lewinsohn, E., Noel, J. P. ve Pichersky, E. 2002a. Characterization of phenylpropene O-methyltransferases from sweet basil: facile change of substrate specificity and convergent evolution within a plant O-methyltransferase family. *Plant Cell*, 14, 505-19.
- Gang, D. R., Simon, J., Lewinsohn, E. ve Pichersky, E. 2002b. Peltate Glandular Trichomes of *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil) Contain High Levels of Enzymes Involved in the Biosynthesis of Phenylpropenes. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 9, 189-195.
- Gang, D. R., Wang, J., Dudareva, N., Nam, K. H., Simon, J. E., Lewinsohn, E. ve Pichersky, E. 2001. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. *Plant Physiol*, 125, 539-55.
- Gautier, J., Kunesch, G. ve Polonsky, J. 1972. Structure of calophynic acid, A novel constituent of *calophyllum inophyllum*. *Tetrahedron Letters*, 13, 2715-2718.
- Genç, N., Elmastaş, M., Telci, İ. S. ve Erenler, R. 2020. Quantitative analysis of phenolic compounds of commercial basil cultivars (*Ocimum basilicum* L.) by LC-TOF-MS and their antioxidant effects. *International Journal of Chemistry and Technology*, 4, 179-184.
- Ghasemi Pirbalouti, A., Mahdad, E. ve Craker, L. 2013. Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. *Food Chem*, 141, 2440-9.
- Gordon, M. H., Paiva-Martins, F. ve Almeida, M. 2001. Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol Acetate Compared with That of Other Olive Oil Polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2480-2485.
- Grayer, R. 2001. Basil. The genus *Ocimum*: R. Hiltunen and Y. Holm (Eds.). Harwood Academic Publishers, Amsterdam, 1999. 182 pp., ISBN 90-5702-432-2, EUR 66, £49 or \$80. *Phytochemistry*, 58, 533.
- Grevsen, K., Fretté, X. C. ve Christensen, L. P. 2009. Content and composition of volatile terpenes, flavonoids and phenolic acids in Greek Oregano (*Origanum vulgare* L.

- ssp. *hirtum*) at different development stages during cultivation in cool temperate climate. *European Journal of Horticultural Science*, 74, 193-203.
- Gülçin, İ., Elmastaş, M. ve Aboul-Enein, H. Y. 2007. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of Basil (*Ocimum basilicum* L. Family Lamiaceae) assayed by different methodologies. *Phytotherapy Research*, 21, 354-361.
- Hagerman, A. 2002. Tannin handbook. <http://www.users.muohio.edu/hagermae/>.
- Hamberger, B., Ellis, M., Friedmann, M., Souza, C. a. S. D. A., Barbazuk, B. ve Douglas, C. J. D. J. 2007. Genome-wide analyses of phenylpropanoid-related genes in *Populus trichocarpa*, *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*: the *Populus* lignin toolbox and conservation and diversification of angiosperm gene families This article is one of a selection of papers published in the Special Issue on Poplar Research in Canada. *Canadian Journal of Botany*, 85, 1182-1201.
- Hammock, H. A., Sams, C. E. ve Kopsell, D. A. Daily Light Integral Supplements Alter Key Flavor Volatiles in Hydroponically Grown Basil. 2018 ASHS Annual Conference, 2018. ASHS.
- Harborne, J. B. 2013. The flavonoids: advances in research since 1980.
- Hernandez, O. L., Calderín, A., Huelva, R., Martínez-Balmori, D., Guridi, F., Aguiar, N. O., Olivares, F. L. ve Canellas, L. P. 2014. Humic substances from vermicompost enhance urban lettuce production. *Agronomy for Sustainable Development*, 35, 225-232.
- Herrmann, K. ve Nagel, C. W. 1989. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 315-347.
- Ho, J. H.-C. ve Hong, C.-Y. 2011. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *Journal of Biomedical Science*, 18, 30.
- Hu, Y., Cheng, Z., Heller, L. I., Krasnoff, S. B., Glahn, R. P. ve Welch, R. M. 2006. Kaempferol in red and pinto bean seed (*Phaseolus vulgaris* L.) coats inhibits iron bioavailability using an in vitro digestion/human Caco-2 cell model. *J Agric Food Chem*, 54, 9254-61.
- Ibrahim, R. K. 2000. Introduction to Flavonoids. Volume 2. Chemistry and Bio-chemistry of Organic Natural Products By Bruce A. Bohm (University of British Columbia). Harwood Academic Publishers: Amsterdam. 1998. 503 pp. \$145.00. ISBN 90-5702-353-9. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 3565-3566.
- Itokawa, H., Shi, Q., Akiyama, T., Morris-Natschke, S. L. ve Lee, K.-H. 2008. Recent advances in the investigation of curcuminoids. *Chinese Medicine*, 3, 11.
- Izawa, K., Amino, Y., Kohmura, M., Ueda, Y. ve Kuroda, M. 2010. 4.16 - Human–Environment Interactions – Taste. In: Liu, H.-W. ve Mander, L. (eds.) *Comprehensive Natural Products II*. Oxford: Elsevier.
- Izhaki, I. 2002. Emodin - a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*, 155, 205-217.
- Jayakumar, P., Pathma, J. ve Sakthivel, N. 2012. Microbial diversity of vermicompost bacteria that exhibit useful agricultural traits and waste management potential. - 1.
- Ju, Z., Yuan, Y., Liu, C., Wang, Y. ve Tian, X. 1997. Dihydroflavonol reductase activity and anthocyanin accumulation in ‘Delicious’, ‘Golden Delicious’ and ‘Indo’ apples. *Scientia Horticulturae*, 70, 31-43.
- Kaack, K. ve Austed, T. 1998. Plant Foods for Human Nutrition, 52, 187-198.

- Kahveci, H., Bilginer, N., Diraz-Yildirim, E., Kulak, M., Yazar, E., Kocacinar, F. ve Karaman, S. 2021. Priming with salicylic acid, β -carotene and tryptophan modulates growth, phenolics and essential oil components of *Ocimum basilicum* L. grown under salinity. *Scientia Horticulturae*, 281, 109964.
- Kandil, M. a. M., Khatab, M. E., Ahmed, S. S. ve Schnug, E. 2009. Herbal and essential oil yield of Genovese basil (*Ocimum basilicum* L.) grown with mineral and organic fertilizer sources in Egypt. *Journal für Kulturpflanzen*, 61, 443-449.
- Kanehisa, M. 2019. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms. *Protein Sci*, 28, 1947-1951.
- Kanehisa, M., Furumichi, M., Sato, Y., Ishiguro-Watanabe, M. ve Tanabe, M. 2021. KEGG: integrating viruses and cellular organisms. *Nucleic Acids Res*, 49, D545-d551.
- Kanehisa, M. ve Goto, S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res*, 28, 27-30.
- Kauffman, G. L., Iii, Kneivel, D. P. ve Watschke, T. L. 2007. Effects of a biostimulant on the heat tolerance associated with photosynthetic capacity, membrane thermostability, and polyphenol production of perennial ryegrass. *Crop Science*, 261.
- Khakdan, F., Nasiri, J., Ranjbar, M. ve Alizadeh, H. 2017. Water deficit stress fluctuates expression profiles of 4Cl, C3H, COMT, CVOMT and EOMT genes involved in the biosynthetic pathway of volatile phenylpropanoids alongside accumulation of methylchavicol and methyleugenol in different Iranian cultivars of basil. *J Plant Physiol*, 218, 74-83.
- Khalid, A. ve El-Gezawy, E. *Ocimum basilicum* L. Production under Organic Farming. 2006.
- Khalid, K. A., Mohamed, M. A., Ibrahim, M. E. ve Wahba, H. E. 2016. Yield and Essential Oil of Sweet Basil Affected by Chemical and Biological Fertilizers. *Research Journal of Medicinal Plants*, 10, 246-253.
- Kısa, D., Elmastaş, M., Öztürk, L. ve Kayır, Ö. 2016. Responses of the phenolic compounds of *Zea mays* under heavy metal stress. *Applied Biological Chemistry*, 59, 813-820.
- Klimánková, E., Holadová, K., Hajšlová, J., Čajka, T., Poustka, J. ve Koudela, M. 2008. Aroma profiles of five basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars grown under conventional and organic conditions. *Food Chemistry*, 107, 464-472.
- Koca, N. ve Karaman, S. 2015. The effects of plant growth regulators and L-phenylalanine on phenolic compounds of sweet basil. *Food Chem*, 166, 515-521.
- Koeduka, T. 2014. The phenylpropene synthase pathway and its applications in the engineering of volatile phenylpropanoids in plants_review. *Plant Biotechnology*, 31, 401-407.
- Koeduka, T., Fridman, E., Gang, D. R., Vassao, D. G., Jackson, B. L., Kish, C. M., Orlova, I., Spassova, S. M., Lewis, N. G., Noel, J. P., Baiga, T. J., Dudareva, N. ve Pichersky, E. 2006. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 10128-33.
- Kubo, I., Kim, M. ve Naoki, H. 1987. New insect growth inhibitory flavan glycosides from *viscum tuberculatum*. *Tetrahedron Letters*, 28, 921-924.

- Kuhnert, N., Clifford, M. N. ve Müller, A. 2010. Oxidative cascade reactions yielding polyhydroxy-theaflavins and theacitrins in the formation of black tea thearubigins: Evidence by tandem LC-MS. *Food & Function*, 1, 180-199.
- Kurkin, V. A. 2013. Phenylpropanoids as the biologically active compounds of the medicinal plants and phytopharmaceuticals (review). *Advances in Biological Chemistry*, 03, 26-28.
- Kurt, T. T., Polat, S., Uysal, Z. ve Yeşim, A. 2020. Türk Boğazlar Sistemi'nde Mesozooplankton Biyokütlesinin İlkbahar ve Sonbahar Mevsimlerindeki Alansal ve Vertikal Dağılımı. *Acta Aquatica Turcica*, 16, 189-201.
- Kwon, D. Y., Li, X., Kim, J. K. ve Park, S. U. 2017. Molecular cloning and characterization of rosmarinic acid biosynthetic genes and rosmarinic acid accumulation in *Ocimum basilicum* L. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
- Lachowicz, K. J., Jones, G. P., Briggs, D. R., Bienvenu, F. E., Palmer, M. V., Mishra, V. ve Hunter, M. M. 1997. Characteristics of Plants and Plant Extracts from Five Varieties of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Grown in Australia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2660-2665.
- Lattanzio, V. 2013. Phenolic Compounds: Introduction. *Natural Products*.
- Lee, M.-K., Kim, H.-W., Lee, S.-H., Kim, Y. J., Asamenew, G., Choi, J., Lee, J.-W., Jung, H.-A., Yoo, S. M. ve Kim, J.-B. 2019. Characterization of catechins, theaflavins, and flavonols by leaf processing step in green and black teas (*Camellia sinensis*) using UPLC-DAD-QToF/MS. *European Food Research and Technology*, 245, 997-1010.
- Lewinsohn, E., Ziv-Raz, I., Dudai, N., Tadmor, Y., Lastochkin, E., Larkov, O., Chaimovitch, D., Ravid, U., Putievsky, E., Pichersky, E. ve Shoham, Y. 2000. Biosynthesis of estragole and methyl-eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L). Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities (review, phenylpropanoid). *Plant Science*, 160, 27-35.
- Li, Z., Wang, X., Chen, F. ve Kim, H. J. 2007. Chemical changes and overexpressed genes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) upon methyl jasmonate treatment. *J Agric Food Chem*, 55, 706-13.
- Liu, Y.-Q., Meng, P.-S., Zhang, H.-C., Liu, X., Wang, M.-X., Cao, W.-W., Hu, Z. ve Zhang, Z.-G. 2018. Inhibitory effect of aloe emodin mediated photodynamic therapy on human oral mucosa carcinoma in vitro and in vivo. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 97, 697-707.
- Livak, K. J. ve Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lung, I., Soran, M. L., Opris, O., Trusca, M. R. C., Niinemets, U. ve Copolovici, L. 2016. Induction of stress volatiles and changes in essential oil content and composition upon microwave exposure in the aromatic plant *Ocimum basilicum*. *Sci Total Environ*, 569-570, 489-495.
- Mageney, V., Neugart, S. ve Albach, D. C. 2017. A Guide to the Variability of Flavonoids in *Brassica oleracea*. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22, 252.
- Malik, A. A., Suryapani, S. ve Ahmad, J. 2011. Chemical vs organic cultivation of medicinal and aromatic plants: the choice is clear. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 1, 5-13.
- Marotti, M., Piccaglia, R. ve Giovanelli, E. 1996. Differences in essential oil composition of basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian cultivars related to morphological characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3926-3929.

- Mathesius, U. 2018. Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms. *Plants*, 7, 30.
- Mirzajani, Z., Hadavi, E. ve Kashi, A. 2015. Changes in the essential oil content and selected traits of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) as induced by foliar sprays of citric acid and salicylic acid. *Industrial Crops and Products*, 76, 269-274.
- Mottiar, Y., Vanholme, R., Boerjan, W., Ralph, J. ve Mansfield, S. D. 2016. Designer lignins: harnessing the plasticity of lignification. *Current Opinion in Biotechnology*, 37, 190-200.
- Mullen, W., Yokota, T., Lean, M. E. J. ve Crozier, A. 2003. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSn. *Phytochemistry*, 64, 617-624.
- Muscolo, A., Bovalo, F., Gionfriddo, F. ve Nardi, S. 1999. Earthworm humic matter produces auxin-like effects on *Daucus carota* cell growth and nitrate metabolism. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1303-1311.
- Muscolo, A., Sidari, M. ve Nardi, S. 2013. Humic substance: Relationship between structure and activity. Deeper information suggests univocal findings. *Journal of Geochemical Exploration*, 129, 57-63.
- Mustafa, R. A., Hamid, A. A., Mohamed, S. ve Bakar, F. A. 2010. Total Phenolic Compounds, Flavonoids, and Radical Scavenging Activity of 21 Selected Tropical Plants. *Journal of Food Science*, 75, C28-C35.
- Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. ve Vianello, A. 2002. Review: Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1527-1536.
- Niesen, D. B., Hessler, C. ve Seeram, N. P. 2013. Beyond resveratrol: A review of natural stilbenoids identified from 2009–2013. *Journal of Berry Research*, 3, 181-196.
- Niño-Medina, G., Urias-Orona, V., Muy-Rangel, M. D. ve Heredia, J. B. 2017. Structure and content of phenolics in eggplant (*Solanum melongena*) - a review. *South African Journal of Botany*, 111, 161-169.
- Olivares, F. L., Aguiar, N. O., Rosa, R. C. C. ve Canellas, L. P. 2015. Substrate biofortification in combination with foliar sprays of plant growth promoting bacteria and humic substances boosts production of organic tomatoes. *Scientia Horticulturae*, 183, 100-108.
- Olsen, H., Aaby, K. ve Borge, G. I. 2009. Characterization and quantification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in curly kale (*Brassica oleracea* L. Convar. *acephala* Var. *sabellica*) by HPLC-DAD-ESI-MSn. *J Agric Food Chem*, 57, 2816-25.
- Pauli, A. ve Kubeczka, K.-H. 2010. Antimicrobial Properties of Volatile Phenylpropanes. *Natural Product Communications*, 5, 1934578X1000500.
- Pfändler, R., Scheel, D., Sandermann, H., Jr. ve Grisebach, H. 1977. Stereospecificity of plant microsomal cinnamic acid 4-hydroxylase. *Arch Biochem Biophys*, 178, 315-6.
- Pilau, M. R., Alves, S. H., Weiblen, R., Arenhart, S., Cueto, A. P. ve Lovato, L. T. 2011. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42, 1616-1624.
- Pizzeghello, D., Zanella, A., Carletti, P. ve Nardi, S. 2006. Chemical and biological characterization of dissolved organic matter from silver fir and beech forest soils. *Chemosphere*, 65, 190-200.

- Price, K. R. ve Rhodes, M. J. C. 1997. Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74, 331-339.
- Qiu, Y.-Q. 2013. KEGG Pathway Database. In: Dubitzky, W., Wolkenhauer, O., Cho, K.-H. ve Yokota, H. (eds.) *Encyclopedia of Systems Biology*. New York, NY: Springer New York.
- Quaggiotti, S. 2004. Effect of low molecular size humic substances on nitrate uptake and expression of genes involved in nitrate transport in maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany*, 55, 803-813.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C. ve Pouységu, L. 2011. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 586-621.
- Rabe, C., Steenkamp, J. A., Joubert, E., Burger, J. F. W. ve Ferreira, D. 1994. Phenolic metabolites from rooibos tea (*Aspalathus linearis*). *Phytochemistry*, 35, 1559-1565.
- Rafiee, H., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A., Qaderi, A., Zarinpanjeh, N., Sekara, A. ve Zand, E. 2016. Application of Plant Biostimulants as New Approach to Improve the Biological Responses of Medicinal Plants- A Critical Review. *Journal of Medicinal Plants*, 3, 6-39.
- Ramezani, N., Sharafzadeh, S. ve Alizadeh, O. 2013. Influence of Vermicompost Rates on Growth and Volatile Oils of Sweet Basil. *J. Appl. Sci. & Agric.*, 8(6), 810-813.
- Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Struntze Krogholm, K. ve Poulsen, L. 2005. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition & Food Research*, 49, 159-174.
- Rastogi, S., Kumar, R., Chanotiya, C. S., Shanker, K., Gupta, M. M., Nagegowda, D. A. ve Shasany, A. K. 2013. 4-coumarate: CoA ligase partitions metabolites for eugenol biosynthesis. *Plant Cell Physiol*, 54, 1238-52.
- Reddy, V. A., Li, C., Nadimuthu, K., Tjhang, J. G., Jang, I. C. ve Rajani, S. 2021. Sweet Basil Has Distinct Synthases for Eugenol Biosynthesis in Glandular Trichomes and Roots with Different Regulatory Mechanisms. *Int J Mol Sci*, 22.
- Reichelt, K. V., Hartmann, B., Weber, B., Ley, J. P., Krammer, G. E. ve Engel, K.-H. 2010. Identification of Bisprenylated Benzoic Acid Derivatives from Yerba Santa (*Eriodictyon* ssp.) Using Sensory-Guided Fractionation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 1850-1859.
- Riethmüller, E., Alberti, Á., Tóth, G., Béni, S., Ortolano, F. ve Kéry, Á. 2013. Characterisation of Diarylheptanoid-and Flavonoid-type Phenolics in *Corylus avellana* L. Leaves and Bark by HPLC/DAD–ESI/MS. *Phytochemical Analysis*, 24, 493-503.
- Roberts, J. L. ve Moreau, R. 2016. Functional properties of spinach (*Spinacia oleracea* L.) phytochemicals and bioactives. *Food & function*, 7, 3337-3353.
- Rodríguez-Solana, R., Salgado, J. M., Domínguez, J. M. ve Cortés-Diéguez, S. 2015. Comparison of Soxhlet, Accelerated Solvent and Supercritical Fluid Extraction Techniques for Volatile (GC–MS and GC/FID) and Phenolic Compounds (HPLC–ESI/MS/MS) from Lamiaceae Species. *Phytochemical Analysis*, 26, 61-71.

- Roemmelt, S., Zimmermann, N., Rademacher, W. ve Treutter, D. 2003. Formation of novel flavonoids in apple (*Malus domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry*, 64, 709-716.
- Roy, R. N., Finck, A., Blair, G. ve Tandon, H. 2006. Plant nutrition for food security. A guide for integrated nutrient management. *FAO Fertilizer and Plant Nutrition Bulletin*, 16, 368.
- Saeed, A. 2016. Isocoumarins, miraculous natural products blessed with diverse pharmacological activities. *Eur J Med Chem*, 116, 290-317.
- Salvador, V. H., Lima, R. B., Dos Santos, W. D., Soares, A. R., Böhm, P. a. F., Marchiosi, R., Ferrarese, M. D. L. L. ve Ferrarese-Filho, O. 2013. Cinnamic Acid Increases Lignin Production and Inhibits Soybean Root Growth. *PLoS One*, 8, e69105.
- Sanders, T. H., Mcmichael, R. W. ve Hendrix, K. W. 2000. Occurrence of Resveratrol in Edible Peanuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1243-1246.
- Scaglia, B., Nunes, R. R., Rezende, M. O. O., Tambone, F. ve Adani, F. 2016. Investigating organic molecules responsible of auxin-like activity of humic acid fraction extracted from vermicompost. *Sci Total Environ*, 562, 289-295.
- Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O. ve Nardi, S. 2010. High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *J Chem Ecol*, 36, 662-9.
- Semwal, R. B., Semwal, D. K., Combrinck, S. ve Viljoen, A. M. 2015. Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. *Phytochemistry*, 117, 554-568.
- Shahrajabian, M. H., Sun, W. ve Cheng, Q. 2020. Chemical components and pharmacological benefits of Basil (*Ocimum basilicum*): a review. *International Journal of Food Properties*, 23, 1961-1970.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M. ve Corke, H. 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 7749-7759.
- Sharma, H. S. S., Selby, C., Carmichael, E., Mcroberts, C., Rao, J. R., Ambrosino, P., Chiurazzi, M., Pucci, M. ve Martin, T. 2016. Physicochemical analyses of plant biostimulant formulations and characterisation of commercial products by instrumental techniques. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 3.
- Shen, T., Wang, X. N. ve Lou, H. X. 2009. Natural stilbenes: an overview. *Nat Prod Rep*, 26, 916-35.
- Shokooh, R., Mr, D.-M., Naghdi Badi, H., Mehrafarin, A. ve Khalighi, F. 2013. Changes in Essential Oil Composition and Leaf traits of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Affected by Bio-stimulators / fertilizers Application.
- Simon, J., Morales, M., Phippen, W. B., Vieira, R. F. ve Hao, Z. Basil: A Source of Aroma Compounds and a Popular Culinary and Ornamental Herb*. 1999.
- Singh, K., Chand, S. ve Yaseen, M. 2014. Integrated nutrient management in Indian basil (*Ocimum basilicum*). *Industrial Crops and Products*, 55, 225-229.
- Singh, R., Soni, S. K., Patel, R. P. ve Kalra, A. 2013. Technology for improving essential oil yield of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) by application of bioinoculant colonized seeds under organic field conditions. *Industrial Crops and Products*, 45, 335-342.
- Sinha, R. K., Herat, S., Chauhan, K. ve Valani, D. 2009. Earthworms vermicompost: a powerful crop nutrient over the conventional compost & protective soil conditioner against the destructive chemical fertilizers for food safety and

- security. American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science, 5, 14-22.
- Sultana, B. ve Anwar, F. 2008. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. Food Chemistry, 108, 879-884.
- Sultanbawa, M. 1980. Xanthonoids of tropical plants. Tetrahedron, 36, 1465-1506.
- Taie, H., Salama, D. Z. ve Samir, R. 2010. Potential Activity of Basil Plants as a Source of Antioxidants and Anticancer Agents as Affected by Organic and Bio-organic Fertilization. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, 38, 119-127.
- Tan, K. H. ve Nishida, R. 2012. Methyl Eugenol: Its Occurrence, Distribution, and Role in Nature, Especially in Relation to Insect Behavior and Pollination (phenylpropanoid, review). Journal of Insect Science, 12, 1-60.
- Tavallali, V., Kiani, M. ve Hojati, S. 2019. Iron nano-complexes and iron chelate improve biological activities of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Plant Physiol Biochem, 144, 445-454.
- Telci, I., Bayram, E., Yılmaz, G. ve Avcı, B. 2006. Variability in essential oil composition of Turkish basils (*Ocimum basilicum* L.). Biochemical Systematics and Ecology, 34, 489-497.
- Tomás-Barberán, F. A. ve Clifford, M. N. 2000. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 1024-1032.
- Touré, A. ve Xueming, X. 2010. Flaxseed Lignans: Source, Biosynthesis, Metabolism, Antioxidant Activity, Bio-Active Components, and Health Benefits. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9, 261-269.
- Townsend, J. A. 2011. Chemistry Add-In for Word.
- Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S. ve Nardi, S. 2010. Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. Plant Signal Behav, 5, 635-43.
- Tsimogiannis, D., Choulitoudi, E., Bimpilas, A., Mitropoulou, G., Kourkoutas, Y. ve Oreopoulou, V. 2017. Exploitation of the biological potential of *Satureja thymbra* essential oil and distillation by-products. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 4, 12-20.
- Tsimogiannis, D. ve Oreopoulou, V. 2019. Classification of Phenolic Compounds in Plants. In: Watson, R. R. (ed.) Polyphenols in Plants (Second Edition). Academic Press.
- Tunç, N. 2017. Avrupa Birliği'nde Kullanılan Biyolojik Gübreler ve Biyolojik Gübre Kullanım Potansiyelinin Belirlenmesi. (AB Uzmanlık Tezi), T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Avrupa Birliği ve Dış İlişkiler Genel Müdürlüğü. Ankara
- Türkay, İ. ve Öztürk, L. Addition of Vermicompost to Soil Influences Total Phenolic Content of Sweet Basil. In: Namli, A., Turgay, O. C. ve Akça, M. O., eds. 10th International Soil Congress. Successful Transformation toward Land Degradation Neutrality: Future Perspective, 17-19 June 2019 2019, Ankara.
- Türkay, İ., Öztürk, L. ve Hepşen Türkay, F. Ş. The Effects Of Various Doses of Vermicompost Solid and Tea Applications on Total Phenolic Content and Some Phenological Parameters Of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). In: Gökdoğan, O. ve Bağdatlı, M. C., eds. International Congress of Agriculture and Animal Science (ICAGAS-2018), 7-9 November 2018 2018, Alanya, TURKEY. 709-716.

- Ugochukwu, E. N. ve Wain, R. L. 1968. Studies on plant growth-regulating substances. XXV. The plant growth-regulating activity of cinnamic acids. *Ann Appl Biol*, 61, 121-30.
- Vanholme, B., El Houari, I. ve Boerjan, W. 2019. Bioactivity: phenylpropanoids' best kept secret (review). *Curr Opin Biotechnol*, 56, 156-162.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J. ve Boerjan, W. 2010. Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*, 153, 895-905.
- Vassao, D. G., Gang, D. R., Koeduka, T., Jackson, B., Pichersky, E., Davin, L. B. ve Lewis, N. G. 2006. Chavicol formation in sweet basil (*Ocimum basilicum*): cleavage of an esterified C9 hydroxyl group with NAD(P)H-dependent reduction. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4, 2733-2744.
- Vernin, G., Metzger, J. ve Fraisse, D. 1984. Analysis of basil oils by GC-MS data bank. *Perfumer and flavorist*, 9, 71-86.
- Vieira, L. M. M. ve Kijjoo, A. 2005. Naturally-Occurring Xanthenes: Recent Developments. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 2413-2446.
- Vishwanath, S. J., Delude, C., Domergue, F. ve Rowland, O. 2015. Suberin: biosynthesis, regulation, and polymer assembly of a protective extracellular barrier. *Plant Cell Rep*, 34, 573-86.
- Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis (review). *Mol Plant*, 3, 2-20.
- Wang, M., Carrell, E. J., Chittiboyina, A. G., Avula, B., Wang, Y.-H., Zhao, J., Parcher, J. F. ve Khan, I. A. 2016. Concurrent supercritical fluid chromatographic analysis of terpene lactones and ginkgolic acids in Ginkgo biloba extracts and dietary supplements. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408, 4649-4660.
- Waters, E. 2003. Molecular adaptation and the origin of land plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29, 456-463.
- Weisshaar, B. ve Jenkins, G. I. 1998. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol*, 1, 251-7.
- Withers, S. T. ve Keasling, J. D. 2007. Biosynthesis and engineering of isoprenoid small molecules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 980-990.
- Wong, W. S., Guo, D., Wang, X. L., Yin, Z. Q., Xia, B. ve Li, N. 2005. Study of cis-cinnamic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 929-937.
- Xie, Z., Kapteyn, J. ve Gang, D. R. 2008. A systems biology investigation of the MEP/terpenoid and shikimate/phenylpropanoid pathways points to multiple levels of metabolic control in sweet basil glandular trichomes. *Plant J*, 54, 349-61.
- Yang, X. X., Choi, H. W., Yang, S. F. ve Li, N. 1999. A UV-light activated cinnamic acid isomer regulates plant growth and gravitropism via an ethylene receptor-independent pathway. *Aust J Plant Physiol*, 26, 325-35.
- Zanardo, D. I. L., Lima, R. B., Ferrarese, M. D. L. L., Bubna, G. A. ve Ferrarese-Filho, O. 2009. Soybean root growth inhibition and lignification induced by p-coumaric acid. *Environmental and Experimental Botany*, 66, 25-30.
- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Busato, J. G., Peres, L. E. P. ve Façanha, A. R. 2013. Plant physiology as affected by humified organic matter. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 25, 13-25.
- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Dobbss, L. B., Olivares, F. L., Canellas, L. P., Binzel, M. L., Okorokova-Facanha, A. L. ve Facanha, A. R. 2010. Nitric oxide mediates humic acids-induced root development and plasma membrane H⁺-ATPase activation. *Planta*, 231, 1025-36.

- Zhang, H., Tan, S. N., Teo, C. H., Yew, Y. R., Ge, L., Chen, X. ve Yong, J. W. 2015. Analysis of phytohormones in vermicompost using a novel combinative sample preparation strategy of ultrasound-assisted extraction and solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 139, 189-97.
- Zhou, D., Barney, J., Ponder, M. A. ve Welbaum, G. E. 2016. Germination response of six sweet basil (*Ocimum basilicum*) cultivars to temperature. *Seed Technology*, 43-51.
- Zhou, D. A. ve Welbaum, G. Seed Germination Performance of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Over a Broad Range of Temperatures. ASA, CSSA and SSSA Annual Meetings, 21-24 October, 2012, Duke Energy Convention Center, Cincinnati, OH.
- Zhou, L., Wang, J., Wang, K., Xu, J., Zhao, J., Shan, T. ve Luo, C. 2012. Secondary Metabolites with Antinematodal Activity from Higher Plants (review, phenylpropanoid). *Studies in Natural Products Chemistry Volume 37*. Elsevier.
- Ziaei, M., Sharifi, M., Behmanesh, M. ve Razavi, K. 2012. Gene expression and activity of phenyl alanine ammonia- lyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stages. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10, 32-39.
- Zlotek, U., Michalak-Majewska, M. ve Szymanowska, U. 2016. Effect of jasmonic acid elicitation on the yield, chemical composition, and antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oil of lettuce leaf basil (*Ocimum basilicum* L.). *Food Chem*, 213, 1-7.

7. EKLER

Ek 1. Otomatik iklim kontrollü bitki büyütmeye odasında yetiştirilen reyhan kemotiplerinin gelişim dönemlerine ait görseller.



Şekil 7.1. Saksılara yerleştirilen reyhan kemotiplerinin bitki büyütmeye odası içerisindeki genel görünüşleri.

Ek 1 (Devam). Otomatik iklim kontrollü bitki büyütme odasında yetiştirilen reyhan kemotiplerinin gelişim dönemlerine ait görseller.



Şekil 7.2. Reyhan bireylerinin 4. haftadaki görünüşleri (30 Ekim 2019).

Ek 1 (Devam). Otomatik iklim kontrollü bitki büyütme odasında yetiştirilen reyhan kemotiplerinin gelişim dönemlerine ait görseller.



Şekil 7.3. Reyhan bireylerinin 5. haftadaki görünüşleri (8 Kasım 2019).

Ek 1 (Devam). Otomatik iklim kontrollü bitki büyütme odasında yetiştirilen reyhan kemotiplerinin gelişim dönemlerine ait görseller.



Şekil 7.4. Reyhan Bireylerinin 7. haftadaki görünüşleri (18 Kasım 2019).

Ek 1 (Devam). Otomatik iklim kontrollü bitki büyütme odasında yetiştirilen reyhan kemotiplerinin gelişim dönemlerine ait görseller.



Şekil 7.5. Reyhan bireylerinin 8. haftadaki görünüşleri (21 Kasım 2019).

Ek 1 (Devam). Otomatik iklim kontrollü bitki büyütme odasında yetiştirilen reyhan kemotiplerinin gelişim dönemlerine ait görseller.



Şekil 7.6. Reyhan bireylerinin 9. haftadaki görünüşleri (1 Aralık 2019).

8. ÖZGEÇMİŞ

