



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EKZOJEN BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN
VE FENİLALANİNİN FESLEĞEN (*Ocimum basilicum*
L.) BİTKİSİNDE SEKONDER METABOLİTLERE VE
FENİLALANİN AMONYUM LİYAZ (PAL) ENZİM
AKTİVİTESİNE ETKİSİ**

NÜLÜFER KOCA

**DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

KAHRAMANMARAŞ 2013

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**EKZOJEN BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN
VE FENİLALANİNİN FESLEĞEN (*Ocimum basilicum*
L.) BİTKİSİNDE SEKONDER METABOLİTLERE VE
FENİLALANİN AMONYUM LİYAZ (PAL) ENZİM
AKTİVİTESİNE ETKİSİ**

NÜLÜFER KOCA

**Bu tez,
Biyoloji Anabilim Dalında
DOKTORA
derecesi için hazırlanmıştır.**

KAHRAMANMARAŞ 2013

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Nülüfer Koca tarafından hazırlanan “Ekzojen bitki büyüme düzenleyicilerinin ve fenilalaninin fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinde sekonder metabolitlere ve fenilalanin amonyum liyaz (PAL) enzim aktivitesine etkisi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 27 / 09 / 2013 tarihinde oy birliği ile Biyoloji Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Şengül KARAMAN (DANIŞMAN)

Biyoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Prof. Dr. Ahmet KORKMAZ (ÜYE)

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, KSÜ

Prof. Dr. Yüksel BÖLEK (ÜYE)

Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, KSÜ

Doç. Dr. Ashabil AYGAN (ÜYE)

Biyoloji Anabilim Dalı, KSÜ

Doç. Dr. Ahmet İLÇİM (ÜYE)

Biyoloji Anabilim Dalı, MKÜ

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. M. Hakkı ALMA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

NÜLÜFER KOCA

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 111O583

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**EKZOJEN BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN VE FENİLALANİNİN
FESLEĞEN (*Ocimum basilicum* L.) BİTKİSİNDE SEKONDER METABOLİTLERE
VE FENİLALANİN AMONYUM LİYAZ (PAL) ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİSİ
(DOKTORA TEZİ)**

NÜLÜFER KOCA

ÖZ

Bu doktora tezinde sekonder madde üretimini artırmak amacı ile 0,5 mM metil jasmonat farklı konsantrasyonlarda spermin (0,1 mM; 1,0 mM), brassinosteroid (0,5 µM; 2,0 µM) ve fenilalanin (0,05 mM; 0,5 mM) öncülü ile birlikte fesleğen tohumlarına uygulanmıştır. Yetişen fesleğenler çiçeklenme öncesi biçilerek çeşitli morfolojik ve verim ile ilgili özellikleri incelenmiş, uçucu yağ oranı ve bileşenleri, toplam fenolik, toplam flavonoid miktarı, DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etkisi, PAL aktivitesi, rozmarinik asit, şikorik asit ve kafeik asit miktarları belirlenmiştir. Uygulamaların morfolojik verim özelliklerine önemli bir etkisi olmamakla birlikte, uçucu yağ oranı, toplam fenolik, toplam flavonoid miktarları ve DPPH radikal süpürme etkisi bakımından EBL+MeJA ve Spm+MeJA uygulamaları başarılı bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Ocimum basilicum*, spermin, MeJA, brassinosteroid, fenilalanin, PAL, linalool, fenol

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı, 12/2013

Danışman: Prof. Dr. Şengül KARAMAN

Sayfa sayısı: 115

**THE EFFECT OF EXOGENOUS PLANT GROWTH REGULATORS AND
PHENYLALANINE ON SECONDARY METABOLITES AND PHENYLALANINE
AMMONIA-LYASE (PAL) ACTIVITY OF SWEET BASIL (*Ocimum basilicum* L.)**

(Ph. D. THESIS)

NULUFER KOCA

ABSTRACT

In this doctoral thesis, to increase the production of secondary metabolites, seeds of *Ocimum basilicum* L. subjected to methyl jasmonate in different combinations with spermine (0,1 mM; 1,0 mM), brassinosteroid (0,5 µM; 2,0 µM), and phenylalanine (0,05 mM; 0,5 mM). Grown basil plants were harvested before the flowering period, and some morphological and yield characters, essential oil ratio and its composition, total phenolic and total flavonoid contents, the amount of rosmarinic acid, chicoric acid and caffeic acid, DPPH radical scavenging activity and PAL enzyme activity were determined. Although there were no significant differences between concentrations of applications on morphological and yield characters, considerable results for essential oils, the amount of total phenolic and total flavonoid contents and DPPH activity were obtained with EBL+MeJA and Spm+MeJA combinations.

Keywords: *Ocimum basilicum* L., spermine, MeJA, brassinosteroid, phenylalanine, PAL, linalool, phenol.

Kahramanmaraş Sutcu Imam University
Institute for Graduate Studies in Science and Technology
Department of Biology 12/2013

Supervisor: Prof. Dr. Şengül KARAMAN

Page number: 115

EKZOJEN BİTKİ BÜYÜME DÜZENLEYİCİLERİNİN VE FENİLALANİNİN FESLEĞEN (*Ocimum basilicum* L.) BİTKİSİNDE SEKONDER METABOLİTLERE VE FENİLALANİN AMONYUM LİYAZ (PAL) ENZİM AKTİVİTESİNE ETKİSİ

ÖZET

Bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitler tıp, gıda ve ziraat gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Sekonder metabolitler, fenolik bileşikler, terpenler ve azotlu bileşikler olmak üzere başlıca üç gruba ayrılırlar. Herbivor ve patojenlere karşı bitkide üretilen fenoliklerin çeşitleri olan fenolik asitler ve flavonoidler geniş antioksidan aktivite göstermeleri sebebiyle çok önemlidirler. Fenoliklerin sentezlenmesi, fenilalanin amonyum liyaz (PAL)'ın, bir esansiyel aminoasit olan fenilalaninden, amonyum molekülünü uzaklaştırması ile başlar. PAL bu reaksiyonu katalizleyen enzimdir. Yapılan çalışmalarda bitki herhangi bir strese maruz kaldığında PAL aktivitesinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

Bitkilerde sekonder metabolit üretiminin artırılması amacı ile çeşitli bitki büyüme düzenleyiciler kullanılmakta olup, son yıllarda yoğun olarak üzerinde çalışılan poliaminler, bitkilerdeki sekonder metabolit üretimini önemli oranlarda artırmıştır. Bitkilerde ekzojen olarak uygulanan metil jasmonatın (MeJA), strese benzer bir etki oluşturarak PAL aktivitesi ile birlikte fenolikler ve alkaloidlerin üretimini arttırdığı görülmüştür. Yine bitki hormonlarının yeni bir sınıfı olan ve son yıllarda üzerinde birçok çalışmalar yapılan brassinosteroidler (BRs), büyüme ve gelişmedeki temel rolünün yanında bitkinin tuzluluk, kuraklık, soğuk, sıcak ve patojenler gibi biyotik ve abiyotik streslere karşı dayanmasını sağlar. Yapılan araştırmalara göre, BRs muamelesi ile jasmonik asidinin (JA) sentezinde rol alan bir genin aktivasyonunun artması, BRs ile JA sentezi arasında bir bağlantı olduğunu göstermektedir. Bitkilerde sekonder madde üretimini artırmaya yönelik bir diğer yaklaşım ise öncül madde uygulamasıdır. Fenoliklerin sentezinde bir öncül madde olan fenilalaninin bitkiye uygulanmasıyla enzimatik yollar uyarılıp özellikle fenoliklerin üretimi arttırılabilir. Çeşitli literatürlerde bitki büyüme düzenleyiciler ile birlikte bazı öncüllerin kullanıldığı ve bu kombinasyonun sekonder madde üretimini arttırdığı saptanmıştır.

Bu doktora tez çalışmasında, sekonder madde üretimini artırmak amacı ile MeJA ile spermin, brassinosteroid ve fenilalaninin farklı kombinasyonları denenmiştir. Bitkisel materyal olarak tek yıllık önemli bir baharat ve uçucu yağ bitkisi olan ve kolayca gelişebilen fesleğen tercih edilmiştir. Denemede MeJA'nın ön çalışmalarla belirlenen 0,5 mM konsantrasyonu farklı konsantrasyonlarda spermin (0,1 mM; 1,0 mM), brassinosteroid (0,5 µM; 2,0 µM) ve fenilalanin (0,05 mM; 0,5 mM) öncülü ile birlikte fesleğen tohumlarına 24 saat uygulandıktan sonra tohumlar iklim odasında saksılarda yetiştirilmiştir. Çiçeklenme döneminden önce biçilen bitkilerin, çeşitli morfolojik ve verim ile ilgili özellikleri incelenmiş; uçucu yağ analizi GC-MS cihazı ile, toplam fenolik, toplam flavonoid miktarı ve DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etkisi spektrofotometre cihazı ile, PAL aktivitesi, rozmarinik asit, şikorik asit ve kafeik asit miktarı ise HPLC cihazı ile ölçülmüştür.

Uygulamaların fesleğenin morfolojik ve verim özellikleri üzerine, bitki başına düşen yaş ağırlık ve yaş yaprak verimi hariç etkisi olmadığı tespit edilmiştir. Bitkinin yaş ağırlığı ve yaş yaprak verimi ise kontrol grubuna göre daha düşük olarak tespit edilmiştir.

Fesleğenin kuru yapraklarından elde edilen uçucu yağlarda ana bileşen linalool olarak tespit edilmiş ayrıca 1,8-cineole ve eugenol da önemli bileşenler olarak tespit edilmiştir. Tezde kullandığımız *Ocimum basilicum* L. cv. Grand Vert çeşidinin linalool kemotipinde olduğu sonucuna varılmıştır. Uygulanan bitki büyüme düzenleyiciler ve fenilalaninin uçucu yağın kompozisyonuna önemli bir etkisi olmadığı ancak uçucu yağ oranlarının kontrol grubuna göre artış gösterdiği tespit edilmiştir. En yüksek uçucu yağ oranı 0,5 µM EBL+MeJA uygulamasında % 1,50 olarak elde edilmiştir.

En yüksek toplam fenolik ve flavonoid değerleri 1,0 mM Spm+MeJA uygulamasında sırasıyla 6,75 mg GAE/g ve 0,92 mg KE/g olarak saptanmıştır. Rozmarinik asit, şikorik asit ve kafeik asit bütün uygulamalarda tespit edilmiş olup, kontrol grubu ile kıyaslandığında rozmarinik asit ve kafeik asit miktarları uygulamalar sonucu önemli oranda artarken, şikorik asit miktarında önemli bir artış tespit edilememiştir. En yüksek rozmarinik asit miktarı 1,0 mM Spm+MeJA uygulamasında 2,70 mg/g olarak en yüksek kafeik asit miktarı ise 0,5 µM EBL+MeJA uygulamasında 0,102 mg/g olarak gerçekleşmiştir.

DPPH radikal süpürme etkisi yönünden uygulamalar arasında önemli farklar gözlenmiş olup en yüksek değer 1,0 mM Spm+MeJA uygulamasında % 85,67 olarak tespit edilmiştir. Yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriği elde edilen Spm+MeJA kombinasyonları DPPH radikal süpürücü etki bakımından da yüksek etki göstermiştir.

Uygulamaların fesleğende PAL enzim aktivitesine önemli bir etkisi gözlenmemiştir. Buna rağmen en yüksek PAL enzim aktivitesi 0,5 µM EBL+MeJA uygulamasında 0,275 µmol t-sinamat sa⁻¹ mg protein⁻¹ olarak tespit edilmiştir.

Çalışmalarımız sonucu tek başına uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerin ve öncül uygulamalarının, fesleğen bitkilerinin verim özellikleri ve sekonder metabolit içeriğine çok fazla etkisinin olmadığı, özellikle MeJA ile bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca çalışmamızda Spm+MeJA ve EBL+MeJA kombinasyonlarının, fesleğendeki uçucu yağ miktarı, toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarı ve antioksidan etki için olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

THE EFFECT OF EXOGENOUS PLANT GROWTH REGULATORS AND PHENYLALANINE ON SECONDARY METABOLITES AND PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE (PAL) ACTIVITY OF SWEET BASIL (*Ocimum basilicum* L.)

SUMMARY

Secondary metabolites produced by plants have been widely used in sectors; i.e, medicine, food and agriculture. Secondary metabolites are divided into three main groups; phenolic compounds, terpenes and nitrogen compounds. Phenolic acids and flavonoids synthesis in plants against pathogens and herbivorous are very important due to their wide antioxidant activity. The synthesizing of phenolics starts with removal of ammonium from a phenylalanine by the aid of phenylalanine ammonia lyse (PAL). PAL is the enzyme that catalyzes this reaction. According to the studies, scientist observed when the plant is exposed to any stresses, the activity of PAL is increased significantly.

For the enhancement of production of secondary metabolites in plants various plant growth regulators are used, polyamines, studied extensively in recent years, have increased the production of metabolites remarkably in the plants. MeJA exogenously applied to plants had increased the production of phenolics and alkaloids as well as PAL activity by a stress-like effect. Similarly a new class of plant hormones brassinosteroids (BRs), on which various studies have been correlated out provide a resistance to biotic and abiotic such as salinity, drought, cold, temperature and pathogens as well as its primary role in growth and development. The increasement in the activity of a gene related to jasmonic acid syntesis with the treatment of BRs showed that there is a correlation between BRs and jasmonic acid (JA). Another experimental approach to increase the production of secondary metabolites in the implementation of precursor. Phenylalanine, a precursor in the synthesis of phenolics, has increased production of plant phenolics, especially in the application of enzymatic pathways stimulated. In various literature, along with plant growth regulators, some of the precursors used, and this combination was seen to increase the production of secondary metabolites.

This doctoral thesis was performed in order to increase the production of secondary metabolites, it was tried MeJA with spermine, brassinosteroid, and phenylalanine in different combinations. As a plant material, it was preferred basil which was an annual, important culinary and essential oil plant, as well as could be easily grown. MeJA at 0,5 mM concentration, which was determined in preliminary research, along with different combinations with spermine (0,1 mM; 1,0 mM), brassinosteroid (0,5 μ M; 2,0 μ M), and phenylalanine (0,05 mM; 0,5 mM) precursor were applied to sweet basil seeds for 24 h and then planted in pots in growth room. The samples were being collected plants before the flowering stage, various morphological and yield characteristics of treated plants were examined and, the essential oil was analyzed with the device of GC-MS, total phenolic and total flavonoid contents and DPPH free radical scavenging activity were analyzed with the device of spectrophotometer, and PAL activity, the amount of rosmarinic acid, caffeic acid and chicoric acid concentrations were analyzed with the device of HPLC.

Among basil morphological and yield characteristics, except fresh weight per plant and fresh leaf yield, there is no significant differences between the treatments and control group. Plant fresh weight and fresh yield of treated plants were found lower than those of control group.

Linalool was detected as important component of the essential oil of dried sweet basil leaves, additionally 1,8-cineole and eugenol were also detected as an important components. The plant growth regulators and precursor treatments were found to have insignificant effect on the essential oil composition in sweet basil but the essential oil content significantly increased compared to the control group. The highest oil content was obtained from 0,5 μ M EBL+MeJA application, which level was 1,50 %.

The highest total phenolic and total flavonoid contents obtained from 1,0 mM Spm+MeJA application, which levels were 6,72 mg GAE/g and 0,92 mg GAE/g respectively. Rosmarinic, chicoric and caffeic acids were identified in all treated basil samples, and the plant growth regulators and precursor applications on basil resulted in a significant increase in content of rosmarinic acid and caffeic acid but no such differences observed in content of chicoric acid. The highest rosmarinic acid contents were obtained from 1,0 mM Spm+MeJA application, which was 2,70 mg/g and the highest caffeic acid concentration levels in basil obtained from 0,5 μ M+MeJA application, which was 0,102 mg/g FW.

The plant growth regulators and precursor applications on basil resulted in a significant increase in the DPPH radical scavenging activity and the highest level was determined as 85,67 % for 1,0 mM Spm+MeJA treatment. The all combinations of Spm+MeJA, which was obtained high total phenolic and flavonoid contents, showed higher DPPH scavenging activity.

There was no obtained of a significant increase in PAL activity of basil plant after treatments. However the highest PAL enzyme activity was detected from 0,5 μ M EBL+MeJA application, which was 0,275 μ mol t-cinnamate h^{-1} mg protein $^{-1}$. Our study demonstrates that the individual treatments of plant growth regulators and precursor application have no effects of yield components and secondary metabolite content, but especially the combination of MeJA with plant growth regulators shown to be more effective. In our study, it was also found that the combinations of Spm+MeJA and EBL+MeJA can give best results for the essential oil content, total phenol and total flavonoid contents, as well as antioxidant activity of basil.

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezinde bana her türlü olanağı sağlayarak yardımını esirgemeyen ve tecrübesiyle bana her zaman yol gösteren hocam Sayın Prof. Dr. Şengül KARAMAN'a en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasında fesleğenlerin yetiştirilmesi ve uygulamaların planlanması aşamasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Sayın Prof. Dr. Ahmet KORKMAZ'a, bitkilerin yetiştirildiği ve laboratuvar çalışmalarının yürütüldüğü KSÜ ÜSKİM Merkezi Müdürü Sayın Prof. Dr. Yüksel BÖLEK'e, müdür yardımcısı Sayın Doç. Dr. İsmail AKYOL'a ve ÜSKİM çalışanlarına, enzim çalışmalarında değerli bilgileriyle beni aydınlatan Sayın Doç. Dr. Ashabil AYGAN'a, HPLC ile ilgili çalışmalarda yöntem oturtulmasında yardımları nedeniyle Sayın Yrd. Doç. Dr. Şemistan KARABUĞA'ya, kimyasal hesaplamalarda yardımları nedeniyle Sayın Yrd. Doç. Dr. Serhan URUŞ'a, verilerin istatistiki olarak değerlendirilmesinde yardımları dolayısıyla Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını en büyük maddi katkıyı sağlayarak destekleyen TÜBİTAK'a ve yardımlarını esirgemeyen KSÜ Fen Edebiyat Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Metin DIĞRAK'a, çalışma ile ilgili işlemleri yürüten ve düzenli ödeme akışını sağlayan K.S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve çalışanlarına, KSÜ Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji ve Mikrobiyoloji ve Bitki Fizyolojisi Laboratuvarı çalışanlarına, fesleğenlere bitki büyüme düzenleyicilerin uygulanması ve GC-MS cihazı ile uçucu yağların analizinde yardımlarından dolayı Arş. Gör. Emel DIRAZ'a ve Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi'ndeki bütün arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan annem, babam ve kardeşlerime ve tez çalışmalarım boyunca benden hiçbir desteği esirgemeyen sevgili eşim Hakan KOCA'ya teşekkür ediyorum.

NÜLÜFER KOCA

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZ.....	i
ABSTRACT	ii
ÖZET	iii
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
EK ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Terpenler (Terpenoidler)	1
1.2. Uçucu Yağlar	3
1.3. Fenolik Bileşikler.....	5
1.3.1. Fenolik asitler.....	7
1.3.2. Flavonoidler	7
1.4. Bitki Büyüme Düzenleyiciler	8
1.4.1. Metil jasmonat (MeJA)	8
1.4.2. Poliaminler	10
1.4.3. Brassinosteroidler.....	11
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	15
3. MATERYAL ve METOD.....	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. <i>Ocimum basilicum</i> L. var. Grand Vert'in sınıflandırılması	22
3.1.2. <i>Ocimum basilicum</i> L. var. Grand Vert'in morfolojik özellikleri	22
3.1.3. Kullanılan Kimyasallar	23
3.1.4. Kullanılan Cihazlar	24

3.2. Yöntem	25
3.2.1. Ön çalışma.....	25
3.3. Toplam Fenolik İçeriğin Tespiti	27
3.3.1. Yaprakların ekstraksiyonu ve toplam fenolik miktarının tespiti.....	27
3.4. Çeşitli Bitki Büyüme Düzenleyicilerin ve Fenilalaninin MeJA ile Birlikte Fesleğin Tohumlarına Uygulanması	29
3.5. Fesleğin Bitkisinde İncelenen Özellikler	30
3.5.1. Fesleğin bitkilerine ait morfolojik ve verim özellikleri.....	30
3.5.1.1. Bitki boyu (cm).....	30
3.5.1.2. Dal sayısı	31
3.5.1.3. Boğum arası uzunluğu (cm)	31
3.5.1.4. Yaş ağırlık (g).....	31
3.5.1.5. Bitki başına taze yaprak verimi (g)	31
3.5.1.6. Bitki başına taze çiçek verimi (g)	31
3.5.1.7. Başak boyu (cm).....	31
3.5.1.8. Başak sayısı	31
3.5.1.9. Bitki yaprak alanı (cm ²).....	31
3.5.2. Fesleğin bitkilerindeki uçucu yağ oranı ve bileşenlerinin tespiti	31
3.5.2.1. Kuru bitkideki uçucu yağ oranı	31
3.5.2.2. Kuru bitkideki uçucu yağın bileşenleri.....	32
3.6. Fesleğin Bitkilerindeki Fenolik Asitlerin Tespiti.....	33
3.6.1. Kullanılan HPLC cihazı ve özellikleri	33
3.6.2. Rozmarinik Asit, Şikorik Asit ve Kafeik Asit Solüsyonlarının Hazırlanması.....	33
3.6.3. Rozmarinik Asit, Şikorik Asit ve Kafeik Asit Standartlarının HPLC’de Analizi	33
3.6.4. Rozmarinik asit standart eğrisinin oluşturulması	35
3.6.5. Şikorik asit standart eğrisinin oluşturulması	36
3.6.6. Kafeik asit standart eğrisinin oluşturulması	37
3.6.7. Fesleğin ekstraktına ait kromatogram.....	38
3.7. Toplam Flavonoid Miktarı.....	38
3.8. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini	39

3.9. Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	40
3.10. Verilerin Değerlendirilmesi	41
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	42
4.1. Ön Çalışmaya Ait Örneklerin Fenolik İçerikleri ve En Uygun MeJA Miktarının Tespiti	42
4.2. Fesleğen Bitkilerine Ait Morfolojik Bulgular	43
4.2.1. Bitki boyu (cm)	43
4.2.2. Dal sayısı	45
4.2.3. Boğum arası uzunluğu (cm)	45
4.2.4. Yaş ağırlık (g).....	47
4.2.5. Bitki başına taze yaprak verimi (g/bitki).....	50
4.2.6. Bitki başına taze çiçek verimi (g/bitki)	52
4.2.7. Başak boyu (cm).....	54
4.2.8. Başak sayısı (adet/bitki)	56
4.2.9. Bitki başına yaprak alanı (cm ²)	58
4.3. Fesleğen Bitkilerindeki Uçucu Yağ Oranı ve Bileşenlerine Ait Bulgular.....	60
4.3.1. Kuru bitkideki uçucu yağ oranı (%).....	60
4.3.2. Uçucu yağ bileşenlerinin tespiti ve ana bileşenler	62
4.3.3. Linalool miktarı (%).....	65
4.3.4. 1,8-Cineole miktarı (%).....	66
4.3.5. Eugenol miktarı (%).....	67
4.4. Toplam Fenolik Miktarı.....	68
4.5. Toplam Flavonoid Miktarı.....	71
4.6. Rozmarinik Asit Miktarı.....	73
4.7. Şikorik Asit Miktarı.....	75
4.8. Kafeik Asit Miktarı.....	76
4.9. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki	78
4.10. Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol t-sinamat sa}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$).....	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR.....	88
EKLER	109

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1.1.1. İzopren molekülü (C ₅ H ₈).....	2
Şekil 1.1.2. Terpenlerin biyosentezi	3
Şekil 1.2.1. Uçucu yağların yapısında bulunan bazı monoterpenler	4
Şekil 1.2.2. (a) Nane yaprağında uçucu yağ üretiminin yapıldığı küremsi salgı tüylerinin elektron mikrografı. (b) Salgı tüyünün boyuna kesitinin ışık mikrografı	5
Şekil 1.3.1. Fenol grubu ve pekçok fenolün türevlendiği fenilpropanoid ve fenilpropanoid-asetat iskeletleri	6
Şekil 1.3.1.1. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin iskelet yapıları ve bazı çeşitleri	7
Şekil 1.4.2.1. Poliaminlerin biyosentezi ve etilen biyosentezi ile bağlantısı.....	11
Şekil 1.4.3.1. Bitkide stres sinyal ağlarının genelleştirilmiş modeli. ABA, Absisik asit; BR'ler, Brassinosteroidler; ET, Etilen; JA, Jasmonik asit; SA, Salisilik asit; MAP, Mitojen aktivasyon proteinleri	13
Şekil 3.1.2.1. <i>Ocimum basilicum</i> L. var. Grand Vert'in morfolojik görünümü	23
Şekil 3.2.1.1. Ön çalışmada değişik konsantrasyonlarda MeJA uygulanan fesleğenlerin yetiştirilmesi, A. Tohumlara bitki büyüme düzenleyici ve öncül muamelesi, B. Tohumların viollerde çıkışı, C. Fesleğen fideleri, D-E. Fidelerin saksılara ekilmesi, F. Çiçeklenme evresindeki fesleğenler	26
Şekil 3.3.1.1. Yaprakların fenolik ekstraksiyonu, A. Kuru buz ile parçalama, B. Çözücü ilavesi C. Sıcak su banyosu D. Buzda soğutma işlemi, E. Ekstraktların süzülmesi, F. Ultrasonik banyo	28
Şekil 3.3.1.2. Gallik asit standart eğrisi	29
Şekil 3.4.1. Bitki büyüme düzenleyicilerin ve fenilalanin öncülünün tohumlara uygulanması.....	30
Şekil 3.5.2.1.1. Uçucu yağların elde edilmesinde kullanılan su buharı distilasyon cihazı..	32
Şekil 3.6.3.1. Rozmarinik asit standart kromatogramı	34
Şekil 3.6.3.2. Rozmarinik asit standart kromatogramı	34

Sayfa No

Şekil 3.6.3.3. Rozmarinik asit standart kromatogramı	35
Şekil 3.6.4.1. Rozmarinik asit standardının değişik konsantrasyonlardaki kromatogramları	35
Şekil 3.6.4.2. Rozmarinik asit standart eğrisi	36
Şekil 3.6.5.1. Şikorik asit standardının değişik konsantrasyonlardaki HPLC kromatogramı	36
Şekil 3.6.6.1. Kafeik asit standartının değişik konsantrasyonlardaki HPLC kromatogramı	37
Şekil 3.6.6.2. Kafeik asit standart eğrisi	38
Şekil 3.6.7.1. Fesleğen ekstraktına ait kromatogram.	38
Şekil 3.7.1. Kuersetin standart eğrisi	39
Şekil 3.9.1. Sinnamik asit standart eğrisi	40
Şekil 4.3.2.1. Fesleğen bitkisine ait uçucu yağın GC-MS analizi sonucu elde edilen kromatogram	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1.1.1. Terpenlerin sınıflandırılması	2
Çizelge 3.4.1. Fesleğen tohumlarına uygulanan bitki büyüme düzenleyici ve öncül kombinasyonları	30
Çizelge 4.1.1. Fesleğen bitkilerinde farklı MeJA uygulamalarından elde edilen toplam fenolik miktarları	42
Çizelge 4.2.1.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen bitki boyu değerleri	45
Çizelge 4.2.3.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen boğum arası uzunluğu değerleri	47
Çizelge 4.2.4.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen yaş ağırlık değerleri	50
Çizelge 4.2.5.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen taze yaprak verimi değerleri	52
Çizelge 4.2.6.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen taze çiçek verimi değerleri	54
Çizelge 4.2.7.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen başak boyu değerleri	56
Çizelge 4.2.8.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen başak sayısı değerleri	58
Çizelge 4.2.9.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen yaprak alanı değerleri	60
Çizelge 4.3.1.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen uçucu yağ oranları	62
Çizelge 4.3.2.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen uçucu yağın kimyasal kompozisyonu	64
Çizelge 4.3.3.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen linalool miktarları	66

Çizelge 4.3.4.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen 1,8-cineole miktarları	67
Çizelge 4.3.5.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen eugenol miktarları	68
Çizelge 4.4.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen toplam fenolik miktarları	71
Çizelge 4.5.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen toplam flavonoid miktarları.....	73
Çizelge 4.6.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen rozmarinik asit miktarları	75
Çizelge 4.7.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen şikorik asit miktarları	76
Çizelge 4.8.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen kafeik asit miktarları	78
Çizelge 4.9.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen DPPH radikal süpürücü etki değerleri	80
Çizelge 4.10.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen PAL enzim aktivitesi değerleri (ortalama $\pm$ standart hata)...	82

EK ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

EK Şekil 1. Farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin uygulanmış fesleğen tohumlarından yetişmiş fideler	109
EK Şekil 2. Kontrol A ve Kontrol B gruplarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü..	109
EK Şekil 3. Kontrol B grubu ile 0,1 mM Spm ve 0,1 mM Spm+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü	110
EK Şekil 4. Kontrol B grubu ile 1,0 mM Spm ve 1,0 mM Spm+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü	110
EK Şekil 5. Kontrol B grubu ile 0,5 µM BR (EBL) ve 0,5 µM BR (EBL)+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü	111
EK Şekil 6. Kontrol B grubu ile 2,0 µM BR (EBL) ve 2,0 µM BR (EBL)+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü	111
EK Şekil 7. Kontrol B grubuna ile 0,05 mM FA ve 0,05 mM FA+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü	112
EK Şekil 8. Kontrol B grubu ve 0,5 mM FA ve 0,5 mM FA+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü	112
EK Şekil 9. Kontrol B, 0,5 mM MeJA uygulaması ve Kontrol B grubuna ait fesleğenlerin morfolojik görünümü.....	113

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ark.	: Arkadaşları
BRs	: Brassinosteroidler
°C	: Santigrad derece
cv.	: Kültüvar
DPPH	: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EBL	: 24-Epibrassinolid
E.C.	: Enzim kodu
FA	: Fenilalanin
FID	: Flame ionization detector
GC	: Gas Chromatography
GA	: Gallik asit
GAE	: Gallik asit eşdeğeri
HCL	: Hidroklorik asit
HPLC	: High Pressure Liquid Chromatography
JA	: Jasmonik asit
KA	: Kafeik asit
KE	: Kuersetin eşdeğeri
MeJA	: Metil jasmonat
µL	: Mikrolitre
M	: Molar
mM	: Milimolar
MS	: Mass Spectrometry
n	: Örnek sayısı
PA	: Poliamin
PAL	: Fenilalanin amonyum liyaz
RA	: Rozmarinik asit
SA	: Sınnamik asit
sp.	: Tür

Spm	: Spermin
ŞA	: Şikorik asit
UV	: Ultra viyole
W	: Ağırlık

1. GİRİŞ

Bitkiler yapılarında çok fazla sayıda organik molekül üretmektedir. Bunların büyük bir bölümü büyüme ve gelişmede doğrudan yapıya katılmayıp sınırlı sayıdaki bitki grubunda ve belli familyalarda dağılım gösterirler. Sekonder metabolitler veya doğal ürünler olarak adlandırılan bu bileşiklerin çoğunun işlevi halen bilinmemekle birlikte yoğun bir şekilde araştırılmaya devam edilmektedir (Croteau ve ark., 2000).

İnsanların temel besin kaynağı olan bitkiler, içerdikleri sekonder metabolitler sayesinde kimya, ilaç, gıda, tekstil, kozmetik sanayi ve tarımsal mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz maddelerin de kaynağını oluşturmaktadır (Çetin, 2006). Kompleks ve eşsiz yapıları nedeniyle sentetik olarak sentezlenemeyen sekonder metabolitler üzerine, son zamanlarda çeşitli biyoteknolojik yöntemler ile oluşum ve üretimi artırma yolunda yoğun çalışmalar yapılmış ve başarılı olunmuştur (Rao ve Ravishangar, 2002).

Sekonder metabolitler, bitkilerin bulundukları çevreye adaptasyonunda ve bitkinin savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi önemli olaylarda bitkiye çeşitli avantajlar sağlar. Ayrıca sekonder metabolitlerin sahip olduğu çok çeşitli biyolojik aktivitelerden dolayı insanlar tarafından binlerce yıldır geleneksel tıpta kullanılmaktadır. Son araştırmalara göre farmasötik endüstrinin belkemiği olan batılı ülkelerde kullanılan moleküllerin % 25'i doğal bitki kökenlidir. Bu sebepten tıbbi ve aromatik bitkiler kültüre alınarak tarımı yapılmaktadır (Bourgau ve ark., 2001).

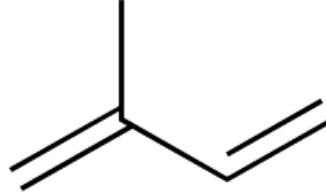
Sekonder metabolitler, yapılarına göre fenolik bileşikler, terpenler ve azotlu bileşikler olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılmaktadır.

1.1. Terpenler (Terpenoidler)

Sekonder metabolitlerin en geniş sınıfını terpenler oluşturmaktadır. Bitkilerde büyüme ve gelişmede rol oynayan giberellinler, absisik asit, steroller ve karotenoidler gibi bazı bileşikler de terpen yapıdadır fakat bunlar sekonder metabolitlerden ziyade primer metabolitler olarak değerlendirilmektedirler. Terpenler pek çok bitkide herbivorlara karşı savunma görevi yaparlar. Terpenlerin toksik olması bitki ile beslenen birçok memeli ve böcekler için caydırıcıdır. Çoğu bitkiye kendilerine özgü kokuları veren, böcekleri

uzaklaştırıcı özelliği olan uçucu ya da eterik yağlar da genellikle terpen yapıdadır (Taiz ve Zeiger, 2007).

Bütün terpenler izopren adlı beş karbonlu ünitelerin çeşitli sayılarda birleşmesi sonucu oluşmuştur (Şekil 1.1.1) (Taiz ve Zeiger, 2007).



Şekil 1.1.1. İzopren molekülü (C₅H₈)

Terpenler içerdiği izopren sayısına göre sınıflandırılmaktadır. Çizelge 1.1.1’de terpen çeşitleri ve oluşturduğu yapılar görülmektedir.

Çizelge 1.1.1. Terpenlerin sınıflandırılması (Crotau ve ark., 2000’den değiştirilerek)

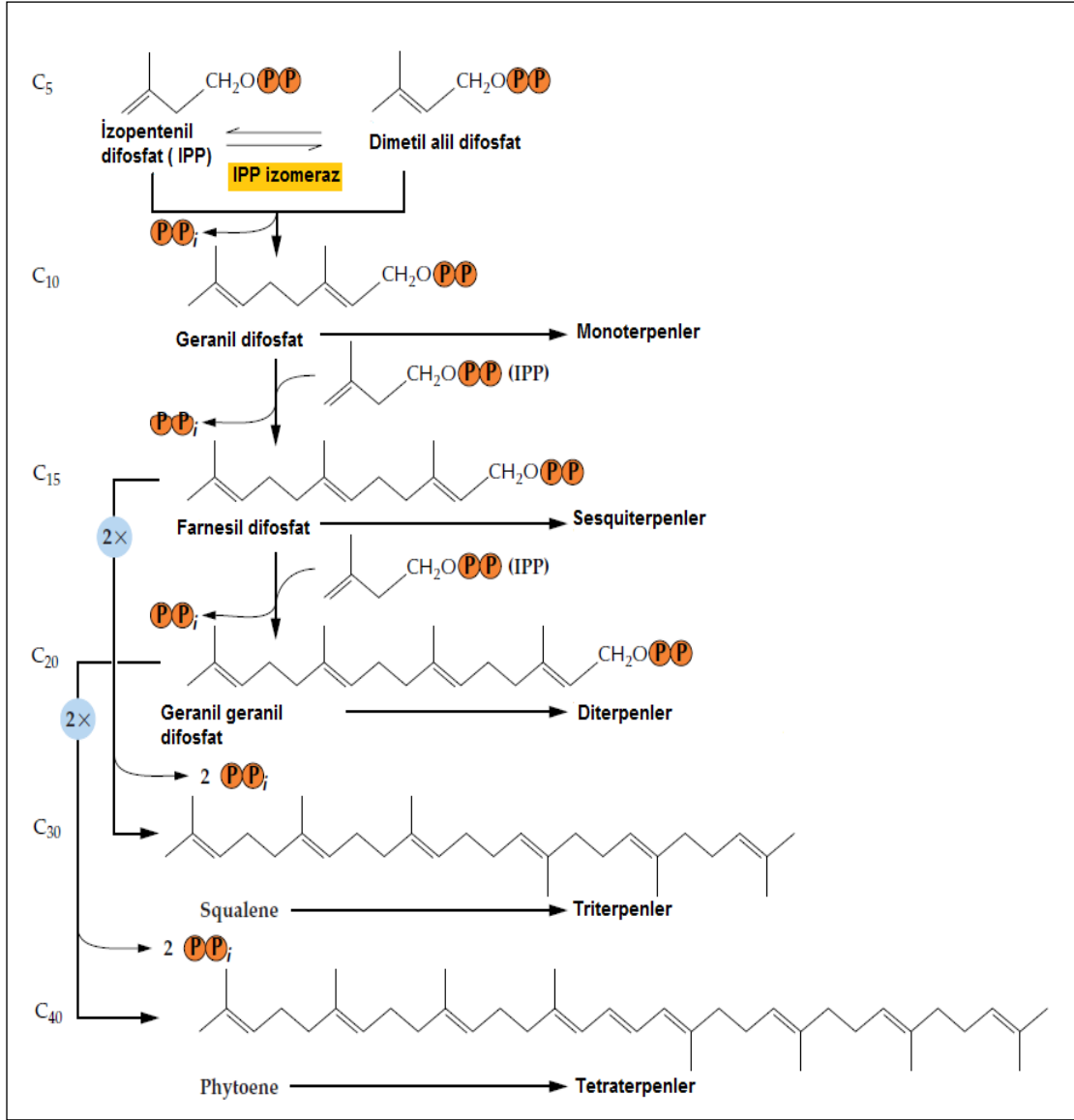
Terpenler	İzopren molekül sayısı	Karbon Sayısı	Oluşturduğu yapı
Monoterpenler	2	10	Uçucu ya da eterik yağlar örn; Limonen, mentol
Seskiterpenler	3	15	Uçucu ya da eterik yağlar, fitoaleksinler, absisik asit
Diterpenler	4	20	Reçineler, fitoaleksinler, gibberellin.
Triterpenler	6	30	Brassinosteroidler, fitoaleksinler, pek çok toksin, fitosteroller, mumlar
Tetraterpenler	8	40	Karotenoidler
Politerpenler	>8	>40	Kauçuk

Terpenler iki önemli metabolik yoldan sentezlenirler. Birinci yol piruvat molekülünden metil eritrol fosfat (MEP)’in olduğu MEP Yolu, ikinci yol ise 3 molekül asetil koA’dan mevanolik asitin olduğu mevalonik asit yoludur (Crotau ve ark., 2000).

Terpenlerin çok sayıdaki çeşidine rağmen aslında biyosentezi basitçe 4 basamakta açıklanabilir (Şekil 1.1.2).

- Temel öncül madde olan izopentenil difosfatın (IPP) oluşumu,
- IPP’ın tekrarlayan bir şekilde eklenmesiyle farklı terpen sınıfını oluşturacak şekilde IPP formlarının oluşumu,
- Birbirine bağlanmış IPP’ların terpen sınıflarının iskeletini oluşturması,

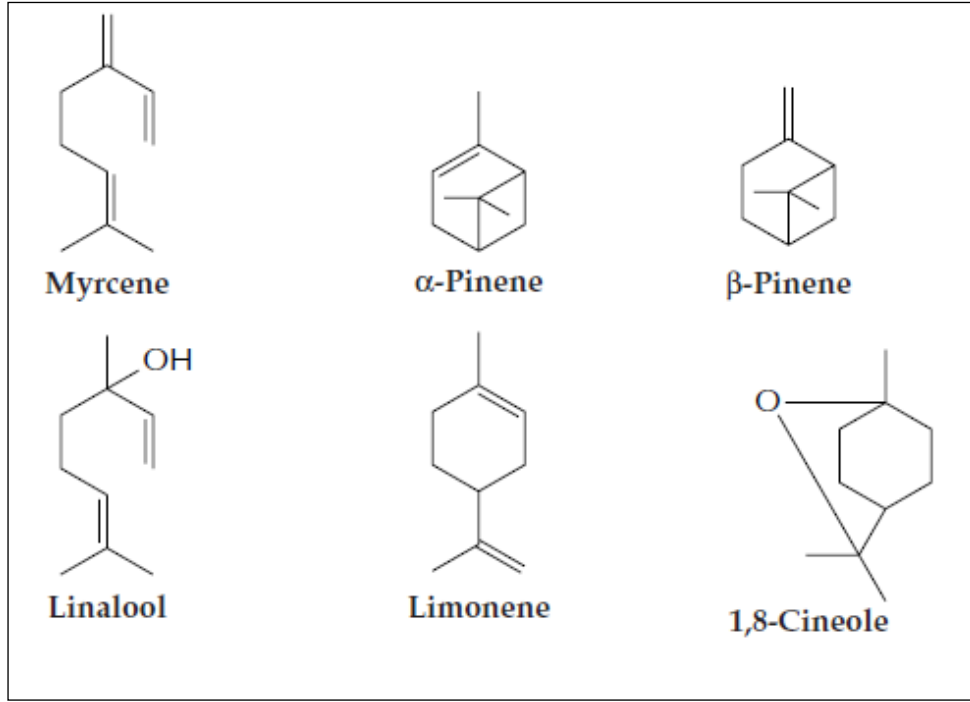
- d) Oluşan terpen iskeletlerine fonksiyonel özelliklerini ve çok çeşitli kimyasal yapısını katacak olan sekonder enzimatik modifikasyonların gerçekleşmesi (Crotau ve ark. 2000).



Şekil 1.1.2. Terpenlerin biyosentezi (Crotau ve ark., 2000'den değiştirilerek).

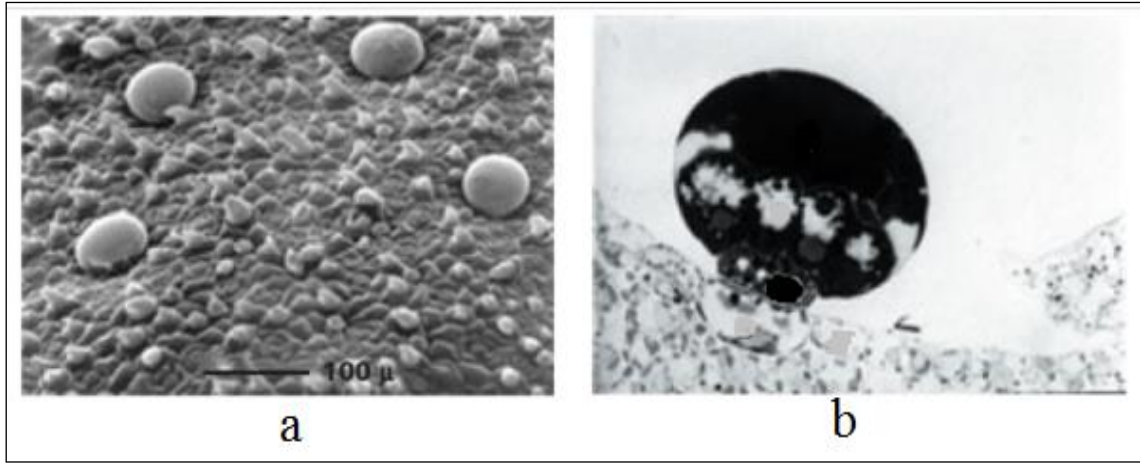
1.2. Uçucu Yağlar

Aromatik bitkilerden distilasyon veya çeşitli ekstraksiyon yöntemleriyle elde edilen uçucu yağlar, oda sıcaklığında ve hava ile temasında uçucu olduğu için bu ismi almışlardır ve halk arasında esans diye de adlandırılmaktadır. Uçucu yağlarda en çok monoterpenler (Şekil 1.2.1), seskiterpenler ve diterpenler bulunur. Bunların yanı sıra fenilpropanoidler, yağ asitleri ve esterleri, kumarinler, flaititler ve parafinler de uçucu yağların bileşimine katılabilmektedir.



Şekil 1.2.1. Uçucu yağların yapısında bulunan bazı monoterpenler (Crotau ve ark., 2000)

Uçucu yağların bol bulunduğu bitkiler aromatik bitkiler olarak adlandırılır ve genellikle sıcak iklim bölgelerinde yetişirler. Ülkemizde Kahramanmaraş'ın da dahil olduğu Akdeniz Bölgesi aromatik bitkiler bakımından oldukça zengindir. Uçucu yağların sentezlendiği kısımlar bitkinin ait olduğu familyaya göre farklılık göstermekle birlikte, uçucu yağlar genellikle salgı tüylerinde (Şekil 1.2.2), salgı ceplerinde, salgı kanallarında veya salgı hücrelerinde üretilmektedirler. Uçucu yağlar bitkinin her organında sentezlenebilir örneğin; çiçekte, yaprakta, meyvede, toprak üstü kısımlarda, kökte vb. Bitkilerden elde edilen uçucu yağ oranı bitki çeşidine göre farklılık gösterir ve bu oran % 0,1 ile % 15 arasında değişebilir (Anonim).



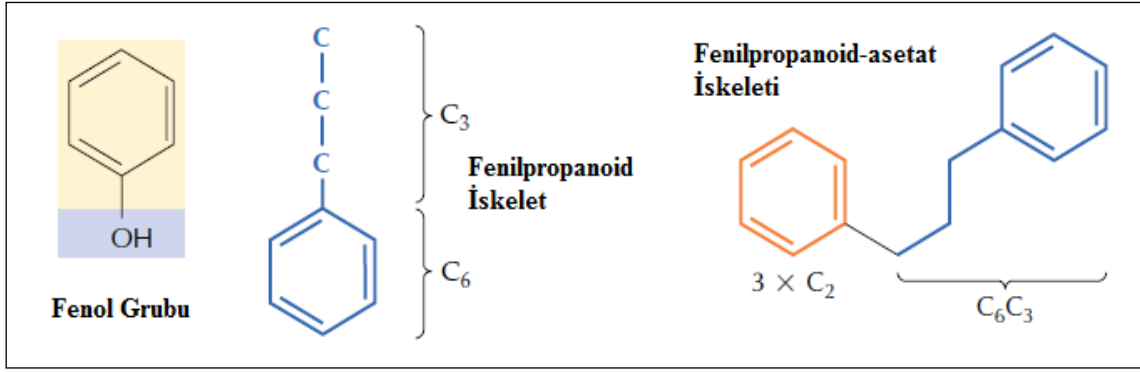
Şekil 1.2.2. (a) Nane yaprağında uçucu yağ üretiminin yapıldığı küremsi salgı tüylerinin elektron mikrografı. (b) Salgı tüyünün boyuna kesitinin ışık mikrografı (Crotau ve ark., 2000'den değiştirilerek)

1.3. Fenolik Bileşikler

Bitkilerde çok fazla miktarda bulunan fenolik bileşikler, yapısında fenol grubu (aromatik halkasında bir hidroksil grup) taşıyan, çok çeşitli bileşiğin yer aldığı kimyasal maddelerdir (Taiz ve Zeiger, 2007). Bunun önemli bir kısmını hücre duvarının yapısına katılan lignin gibi yapılar oluşturmaktaysa da bitki yapısına doğrudan katılmayan çok değişik formda fenolikler bulunmaktadır. Örneğin, bitki savunmasında, ağaçları birbirinden ayırmaya yarayan farklı odun ve kabuk yapısının oluşmasında, farklı çiçek renkleri ve bitkiye has, belirgin tat ve kokuların oluşmasında fenolikler rol almaktadır. Bitki fenolikleri tarafından sağlanan bütün bu özellikler, tıpkı bütün sekonder metabolitlerde olduğu gibi, bitkinin hayatta kalması için çok önemli ekolojik fonksiyonlardır (Crotau ve ark., 2000).

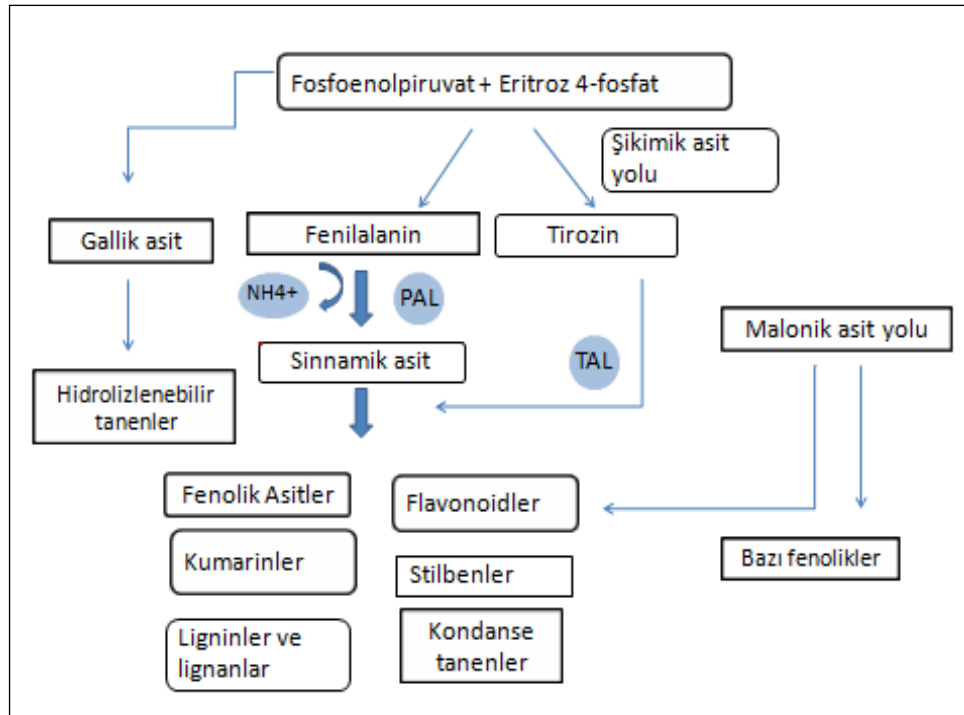
Bitkilerde fenolik bileşikler, herbivorlara ve funguslara karşı savunma öğeleri olarak önemli görevler üstlenirler. Örneğin yapısında bir furan halkası bulunduran bazı kumarinler (furokumarinler), güneş ışığının mor ötesi UV-A (320-400 nm) etkisi ile DNA'nın pirimidin bazlarına bağlanıp, hücrenin transkripsiyon ve onarım mekanizmalarını bozup hücrenin ölmesine sebep olabilir. Bunun yanında bitkiler yaprakları, kökleri ve çürümüş kısımlarından çevreye, içinde fenoliklerin de bulunduğu çok çeşitli maddeler yayar. Bu bileşikler, çevredeki diğer bitkilerin büyümesini veya çimlenmesini önleyerek bitkinin rekabetini arttırır ki bu olaya allelopati denir.

Birçok bitkisel fenolik fenilpropanoid ve fenilpropanoid-asetat iskeletinden oluşmuştur (Şekil 1.3.1) (Crotau ve ark., 2000).



Şekil 1.3.1. Fenol grubu ve pekçok fenolün türevlendiği fenilpropanoid ve fenilpropanoid-asetat iskeletleri (Crotau ve ark., 2000'den değiştirilerek)

Bitkilerde bulunan fenolik bileşikler; fenolik asitler, flavonoidler, ligninler ve lignanlar, stilbenler ve kumarinler olarak gruplandırılabilirler. Fenolikler şikimik asit ve malonik asit adlı iki ayrı biyosentetik yoldan kökenlenirler. Hidrolizlenebilir tanenler, gallik asit ve ellagic asit gibi bazıları da alternatif yollardan türevlenmektedir (Şekil 1.3.2).



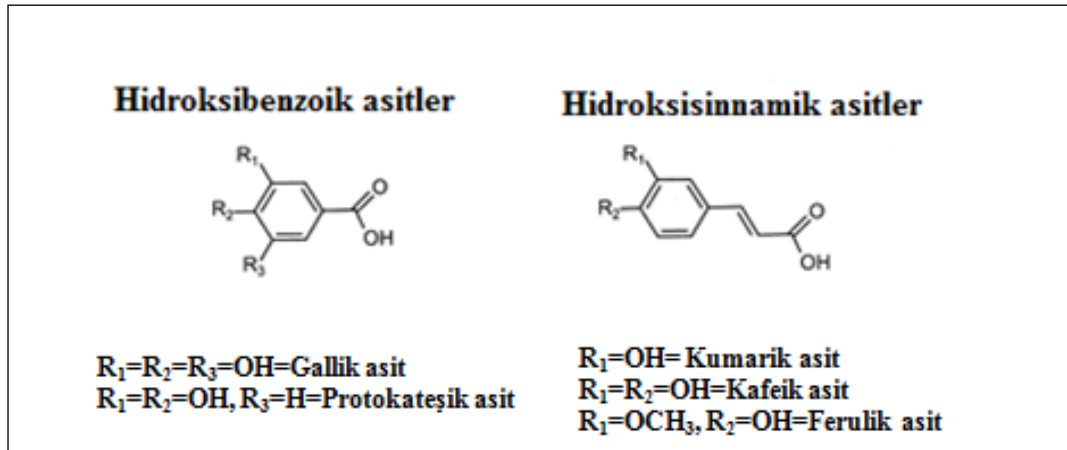
Şekil 1.3.2. Fenoliklerin biyosentetik yolları. PAL, fenilalanin amonyum liyaz; TAL, tirozin amonyum liyaz

Pek çok fenolik, bir aromatik aminoasit olan fenilalaninden bir amonyum molekülünün ayrılmasıyla oluşan sinnamik asitten türevlenmektedir. Bu tepkimeyi katalizleyen fenilalanin amonyum liyaz (PAL; EC 4.3.1.5) adlı enzimdir. PAL enzimi fenilpropanoid metabolizmada en çok çalışılan enzimdir. Bu enzimin etkinliği için

kofaktöre ihtiyacı yoktur (Crotau ve ark., 2000; Taiz ve Zeiger, 2007). PAL aktivitesi, düşük beslenme düzeyleri, ışık, fungus bulaşması gibi çeşitli biyotik ve abiyotik çevre şartlarının oluştuğu stres etmenlerin etkisiyle artış göstermektedir (Baron ve Zambryski, 1995). Bitkilere ekzojen olarak uygulanan kitosan, humuslu maddeler, β -glucan ve maya ekstraktları gibi elisitörler, bitkilerin PAL aktivitesi etkinliğini ve sekonder metabolitlerin üretimini arttırmıştır. Yapılan bazı bilimsel çalışmalar sonucu jasmonik asit, metil jasmonat ve salisilik asit gibi bitkisel hormonların bitkilere ekzojen olarak uygulanmasıyla PAL aktivitesinin arttığı tespit edilmiştir (Radman ve ark., 2003; Loivamaki ve ark., 2004; Kim ve ark., 2005; Zhao ve ark., 2005).

1.3.1. Fenolik asitler

Fenolik asitler hidroksisinnamik asitler ve hidroksibenzoik asitler olmak üzere iki kısma ayrılmaktadır (Şekil 1.3.1.1). Benzoik asitten türevlenen hidroksibenzoik asitler, bitkisel gıdalarda çok az miktarlarda bulunurlar. Hidroksisinnamik asitler hidroksibenzoik aside göre özellikle bitkisel gıdalarda daha çok yaygındır ve genellikle kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asitten oluşmaktadır. Hidroksisinnamik asitlerin çeşitleri fenilpropan halkaya eklenen hidroksil grubunun yerine ve miktarına göre değişir (Manach ve ark., 2004; Nizamoğlu ve Nas, 2010).



Şekil 1.3.1.1. Hidroksibenzoik ve hidroksisinnamik asitlerin iskelet yapıları ve bazı çeşitleri (Manach ve ark., 2004'den değiştirilerek)

1.3.2. Flavonoidler

Bitkisel fenoliklerin bir çeşidi olan flavonoidler, fenolik maddelerin en büyük sınıflarından birini oluşturur. Flavonoidler, flavonoller, flavonlar, antosiyaninler, izoflavonoidler, flavanonlar ve flavanoller olarak sınıflandırılabilirler. Çeşitli flavonoid

türleri, pigment oluşumu ve savunma da dahil bitkilerde çok farklı işlevler yerine getirirler. Örneğin flavonoidlerin bir çeşidi olan antosiyaninler, bitkilerde polen ve meyve dağılımını sağlayan canlıları çeken doğal renk maddeleri olup, bitkilerin çiçek ve meyvelerinin pembe, kırmızı, mavi ve mor renklerinden sorumludurlar (Taiz ve Zeiger, 2007).

Flavonoidlerin tıbbi açıdan en önemli özelliği, antioksidatif etkiye sahip olmaları gösterilmektedir. Kalp ve damar hastalıkları, kanser ve kronik iltihaplanma gibi hastalıkların oluşmasında en önemli etkenler olan oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun, flavonoidler tarafından lipid peroksidasyonunu başlatan radikallerin ve lipid peroksi radikallerinin oluşumunu engellediği, yapısındaki bazı grupların flavonoid radikallerinin stabilitesini ve böylece antioksidan kapasitesini artırabildiği söylenmiştir. Bunların dışında flavonoidlerin metal iyonlarını bağlayarak lipidlerin oksidasyonunu önleyebildiği ve radikallerin oluşumunda görev yapan enzim sistemlerini inhibe edebildiği belirlenmiştir (Karakaya ve El, 1997). Flavonoidlerin bir çeşidi olan izoflavonoitler baklagillerde bol bulunur ve çeşitli biyolojik aktiviteye sahiptirler. Bazıları böcek öldürücü, bazıları ise anti östrojenik etkiye sahiptir (Taiz ve Zeiger, 2007).

1.4. Bitki Büyüme Düzenleyiciler

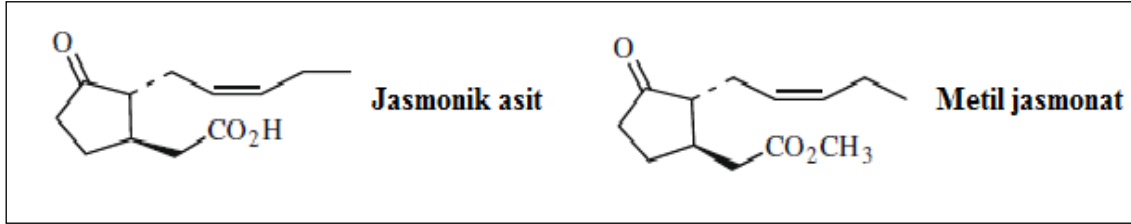
Bitki büyüme düzenleyiciler bitkinin büyümesini veya olgunlaşmasını hızlandırmak veya geciktirmek amacıyla kullanılan sentetik ya da doğal organik madde ya da madde karışımlarıdır. Eğer bitki gelişimini düzenleyen maddeler bitki içerisinde üretiliyorsa bitkisel hormon ya da fitohormon olarak adlandırılır (Leumaux, 1999). Bitki büyüme düzenleyiciler fonksiyonlarına göre genel olarak iki gruba ayrılabilir. Oksin, giberellin, sitokinin ve brassinosteroidlerin dahil olduğu birinci grup, hücre bölünmesi ve gelişmesi, çiçeklenme ve meyve gelişimi gibi büyüme düzenleyici etkilere sahiptir. Absisik asit (ABA), etilen (ET) ve jasmonatların dahil olduğu ikinci grup ise bitkinin maruz kaldığı yaralanma, biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma cevabı oluşturmada önemli rol oynar (Hoenicke ve ark., 2001; Unyayar, 2002).

1.4.1. Metil jasmonat (MeJA)

Bitkiler, polinasyonu sağlayan canlıları çekmek veya zararlı böcekleri uzaklaştırmak için çiçeklerinden, meyvelerinden ve vejetatif dokularından çok çeşitli uçucular salarak çevresiyle iletişim kurarlar (Pichersky ve Gershenzon, 2002). Bu gibi uçucuların sentezi patojen, otçul veya kötü hava şartları etkisiyle artabilmekte ve gaz halde

etrafa salınarak sinyal veren bu bileşikler sadece tehdit altındaki bitkiyi değil etrafındaki bitkileri de etkilemektedir (Pare ve Tumlinson, 1999; Arimura ve ark., 2000).

Jasmonik asit (JA)'den türevlenen ve onun uçucu bir esteri olan (Şekil 1.4.1.1) MeJA, bitkiler tarafından salınan uçucu bir fitohormondur ve bitkinin, bitki-otçul etkileşimi ve bitki-bitki etkileşiminde bir çeşit hücrel yanıt olan sinyal şeklinde görev yapmaktadır (Cheong ve Choi, 2003).



Şekil 1.4.1.1. MeJA ve JA'nın kimyasal yapıları (Cohen ve Flescher, 2009)

JA, 1960'larda yasemin ve diğer bazı bitkilerin uçucu yağının bir bileşeni olarak bilinirken ilk defa 1971'de bir mantar kültürü filtratlarından izole edilmiş, kısa bir süre sonra da pirinç, buğday ve kıvırcık fidelerinde büyüme düzenleyici olarak tanımlanmıştır. Bitki fizyologları tarafından, 1980-81 yıllarında, bitkide senesensi düzenleyici ve bitki büyümesini durdurucu bileşikler olarak tespit edilmiştir (Koetja, 2003). Pek çok çalışma göstermiştir ki ekzojen olarak uygulanan JA'lar bitkide fotosentetik proteinlerin bozulması, proteolitik ve peroksidaz aktivitelerin ve solunumun artması yolu ile yaprak senesensine sebep olur. Aslında JA'ların bitkideki en önemli görevi yaralanma durumunda, abiyotik stres veya böcek ve patojenlere karşı bitkide savunma cevabı oluşturmaktır (Ueda ve Kato, 1980; Dathe ve ark., 1981; Creelman ve Mullet, 2003). Örneğin herbivor böceklerin sebep olduğu yaralanma sonucu, jasmonat türevlerinin oluşumu ve böceklerin beslenmesini caydırıcı moleküller olan proteinaz inhibitörlerini kodlayan genlerin indüklenmesi JA tarafından kontrol edilir (Farmer ve Ryan, 1992). MeJA'nın bitkiye ekzojen olarak uygulanması ile bitkinin fenolik bileşikler, terpenler, alkaloidler ve proteinaz inhibitörlerinin üretilmesi ile sonuçlanan yaralanma ve patojen saldırısı etkilerini taklit edebildiği bulunmuştur (Farmer ve Ryan, 1990; Aerts ve ark., 1994; Doughty ve ark., 1995; Singh ve ark., 1998; Wang ve Zheng, 2005). Bununla birlikte jasmonatlar, ekonomik olarak da önemlidir. Örneğin, ekzojen olarak uygulanan jasmonatların, bazı sebze ve meyvelerde soğuktan oluşabilecek zararları azalttığı ve depolama kalitesini arttırdığı tespit edilmiştir. Jasmonatlar, anti-kanser olarak kullanılan paclitaxel üretimini, *Taxus*'un hücre kültürlerinde önemli ölçüde artırmasının yanında insanda görülen bazı kanser hücrelerinin

çoğalmasını durdurup yok etmesi de tıbbi açıdan önemini göstermektedir (Saniewski ve Horbowicz, 2010; Davies, 1995).

Jasmonatlar bitkilerde oktadekanoid yolu vasıtası ile sentezlenmektedir ve yapısı ve oluşumu memelilerdeki prostaglandinlere benzemektedir (Creelman ve Rao, 2002; Wasternack ve Hause, 2002). Jasmonatların sentezi hücre zarındaki fosfolipitlerden fosfolipazların etkisiyle α -linolenik asidin (18:3) salınmasıyla başlar. Linolenik asit oksijenlenerek 13-hidroperoksilinolenik aside dönüşür ve allen oksid sintaz ve allen oksid siklaz enzimleri aktivitesi sonucu 12-okzo-fitodienoik asit (OPDA) oluşur. Bu reaksiyonların tümü kloroplastta gerçekleşir ve olayın devamı sitoplazma ya da peroksizomda sürer. OPDA indirgenir ve 3 defa β -oksidasyona uğrayarak sonuçta JA oluşumu gerçekleşir ve JA karboksi metil transferaz enziminin aktivitesi sonucu MeJA oluşur (Song ve ark., 2000; Seo ve ark., 2001).

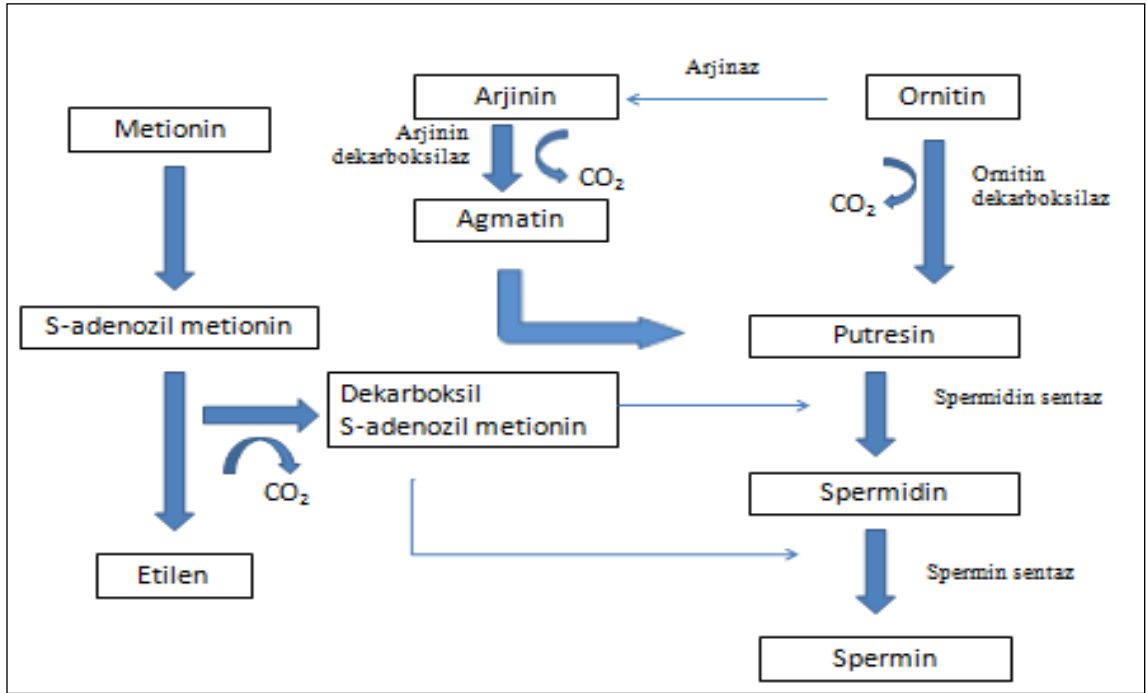
Jasmonatlar etilen, salisilik asit, oksin ve absisik asit gibi bitki büyüme düzenleyicilerle birbirinin etkisini artırmak ya da azaltmak şeklinde etkileşim içerisinde. Özellikle MeJA ve etilen kombinasyonu birbirinin etkisini artıracak şekilde bir grup savunma ile ilgili geni indüklemiştir (Creelman ve Rao, 2002; Wasternack ve Hause, 2002).

1.4.2. Poliaminler

Poliaminler (PA), spermidin ve spermin (Spm) ve onların diamin öncülü olan putresin gibi çeşitleri bulunan küçük alifatik aminlerdir (Bouchereau ve ark., 1999). Bazı arke bakteriler hariç bütün hücrelerde bulunur ve hücre içinde serbest olarak ya da fenolik asitlere, protein, nükleik asit gibi makromoleküllere veya diğer düşük molekül ağırlıklı bileşiklere bağlı olarak bulunabilirler (Evans ve Malmberg, 1989; Tassoni ve ark., 2000; Kusano ve ark., 2007). Poliaminler düşük konsantrasyonlarda hücre farklılaşması, gelişmesi ve bölünmesine etki ederler (Gallardo ve ark., 1996). Smith (1982) poliaminlerin azot kaynağı olarak iş gördüğünü, bunun ise büyümeyi düzenlediğini bildirmiştir. PA'ler çiçeklenme ve döl oluşumu ya da meyve oluşumu sırasında, patojenlere karşı 'hipersensitif etki' ve çevre kirleticiler tarafından oluşturulan stres sonucu bitkide birikirler. Hipoksi oluşturulan pekçok deneysel düzenekte (buğday ve pirinçte soğuk uygulama hariç) spermidin ve Spm oluşumunun artması stres toleransı olarak görülmüştür (Flores ve Martin-Tanguy, 1991; Bouchereau ve ark., 1999; Walters, 2000). Poliaminlerin bitkilerin herbivor ve patojenlere karşı savunma mekanizmasında etkisi çok bilinmemektedir fakat

Kusano ve ark. (2007, 2008) Spm'in patojenlere karşı sinyal oluşturduğunu bulmuş ve bu akış yolunu 'Spm-sinyal yolu' olarak adlandırmışlardır. Ekzojen olarak uygulanan Spm, arpada külleme mantarına, tütün bitkisinde ise tütün mozaik virüsüne karşı oluşturulan 'hipersensitif etki' genlerinin aktivasyonuna sebep olmuştur (Kusano ve ark., 2007; Kusano ve ark., 2008).

Poliaminlerin biyosentezi (Şekil 1.4.2.1) arjinin ya da ornitin aminoasidinden karboksil molekülünün ayrılması ile başlar. Oluşan putresine ard arda aminopropil gruplarının eklenmesiyle sırasıyla spermidin ve Spm oluşur. Bu oluşumda aminopropil kaynağı olarak metioninden türevlenen dekarboksil S-adenozil metionin kullanılır. Şekil 1.4.2.1'de görüldüğü gibi PA'lerin oluşumunda etilen sentezinde de kullanılan öncüller mevcuttur (Kaur-Sawhney ve ark., 2003).



Şekil 1.4.2.1. Poliaminlerin biyosentezi ve etilen biyosentezi ile bağlantısı (Bouchereau ve ark., 1999'dan değiştirilerek)

1.4.3. Brassinosteroidler

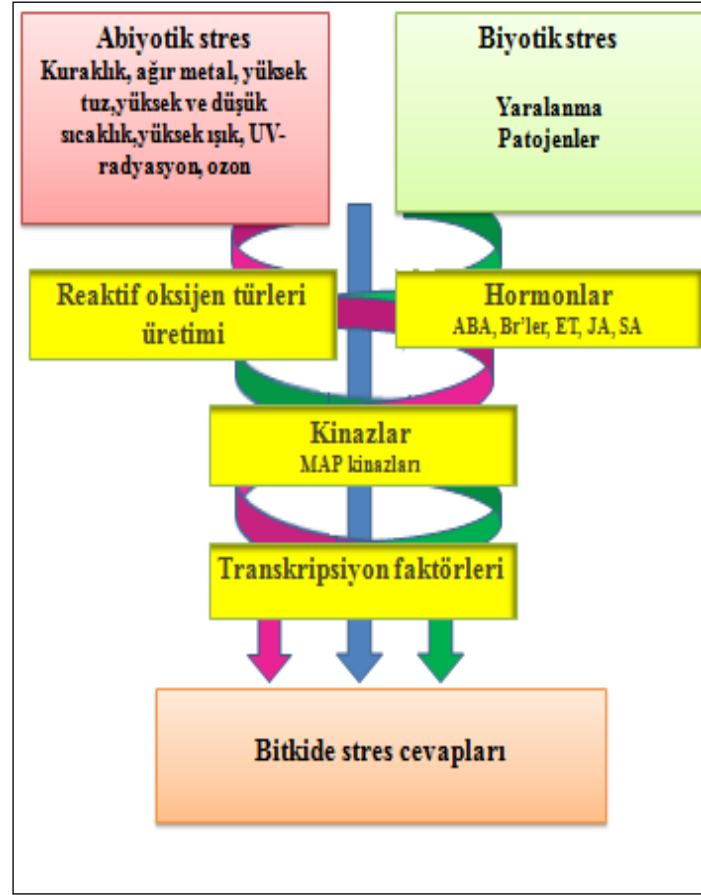
Bitkiler aleminde yaygın bir şekilde bulunan brassinosteroidler (BRs), aslında 1970'ler ve 1980'lerde hücresel düzeydeki etkileri ayrıntılı bir şekilde ortaya konmasına rağmen, bitki büyüme düzenleyici olarak adlandırılması ve bitkideki esas rolü, 1996 yılında Arabidopsis mutantları üzerine yapılan ayrıntılı moleküler klonlama ve karakterizasyon çalışmaları sonucu anlaşılmıştır (Clouse ve Sasse, 1998; Li ve Chory, 1999; Mussig ve Altman, 1999). Brassinosteroid akışyolunda üretilen moleküllerin

oluşumunu kodlayan genlerin eksik olduğu Arabidopsis mutantları (Li ve ark., 1996; Szekeres ve ark., 1996) ile yapılan çalışmalar ve bunun gibi yapılan başka mutantların bodur bitkiler olarak yetişmesi sonucu BRs üzerine yapılan çalışmalar hızla artmıştır (Krishna, 2003). Böylelikle BRs'in gövde uzaması, polen tüpünün gelişimi, ksilem farklılaşması, yaprak epinastisi, kök uzaması gibi büyüme ve gelişmedeki temel rolünün yanında, bitkinin tuzluluk, kuraklık, soğuk, sıcak ve patojenler gibi biyotik ve abiyotik streslere karşı savunma cevabı oluşturmada etkili olduğu saptanmıştır (Clouse ve Sasse, 1998; Krishna, 2003).

Günümüzde moleküler çalışmalar, strese maruz kalan bitkilerin strese cevabında BRs ile etilen, JA ve salisilik asit gibi stres hormonlarının sinyal yollarının karışması (cross-talk) yolu ile oluşan bir ağın koordinasyonunun varlığını göstermiştir (Bajguz ve Hayat, 2009) (Şekil 1.4.3.1). Bitkide stres durumunda koruma mekanizması olarak ilk önce hücrelerdeki süperoksit radikali, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi ile birlikte stres hormonlarının üretimi artmakta ve bunu takiben mitojen aktivasyon proteini (MAP) kinazları devreye girerek hücreye transkripsiyon emri verilmektedir. Bu şekilde bitkide çeşitli stres yanıtları, örneğin sekonder metabolitler oluşmaktadır. Gapper ve Dolan (2006)'ın bulgularına göre bitkiye ekzojen olarak uygulanan BRs, hücreyi oksidatif hasardan koruyan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutation peroksidaz ve askorbat peroksidaz gibi antioksidan enzimler ya da enzimsel olmayan askorbik asit, tokoferol, karotenoid gibi antioksidanların oluşumunu düzenlemiştir. Yine yapılan çalışmalar sonucu bitkideki sinyal moleküllerinden olan JA'nın sentezinde rol alan OPR3 geninin, BRs tarafından indüklenmekte olduğu saptanmıştır. Br muamelesi sonucu bu genin aktivasyonunun artması, Br ile JA sentezi arasında bir bağlantı olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle araştırmacılar tarafından BRs bitkinin strese yanıtını JA biyosentezini düzenleyerek etkileyebileceği öngörülmektedir (Schaller ve ark., 2000; Bajguz ve Hayat, 2009).

Bitki büyüme düzenleyiciler, sekonder metabolitlerin oluşumunda biyosentetik yollarının aktive edilmesi veya baskılanmasında önemli rol oynarlar. Bitkilere uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerin gerek niteliği ve miktarı, gerekse birbiriyle etkileşimi bitkinin büyümesini ve sekonder metabolit üretimini doğrudan etkilemektedir. Yapılan çalışmalar, bitkideki savunma mekanizmalarını harekete geçirerek bir takım antimikrobiyal maddelerin üretimini indükleyen kitosan, β -glukan ve maya ekstraktı gibi elisitörler ve jasmonik asit, metil jasmonat ve salisilik asit gibi bitki büyüme düzenleyicilerin

bitkilerdeki pekçok sekonder metabolitlerin üretiminin artırdığını hatta yeni bir takım bileşiklerin sentezlenebildiğini göstermektedir (Han ve ark., 2001; Radman ve ark., 2003; Loivamaki ve ark., 2004; Kim ve ark., 2005; Zhao ve ark., 2005). Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik bir başka yöntem ise sekonder metabolitlerin metabolik yolunda var olan öncüllerin bitkiye uygulanmasıdır. Bir metabolitin biyosentez metabolizmasında yer alan öncül veya ara maddeler biliniyorsa, bu maddelerin bitkiye uygulanmasıyla enzimatik yollar uyarılabilir ve bunun sonucu o metabolitin üretimi artırılabilir (Çetin, 2006).



Şekil 1.4.3.1. Bitkide stres sinyal ağlarının genelleştirilmiş modeli (Bajguz ve Hayat, 2009). ABA, Absisik asit; BR'ler, Brassinosteroidler; ET, Etilen; JA, Jasmonik asit; SA, Salisilik asit; MAP, Mitojen aktivasyon proteinleri

Bu çalışmada ilk olarak ülkemizde ve dünyada baharat olarak yaygın bir şekilde kullanılmakta olan fesleğen bitkisi örnek alınarak sekonder metabolitlerin üretimini arttırmak amaçlanmış olup, bunun için Spm, EBL gibi bitki büyüme düzenleyiciler ile fenilalanin öncül maddesi MeJA ile birlikte fesleğen tohumlarına ekzojen olarak uygulanarak, bitki verimi ve fenolik, flavonoid ve uçucu yağ üretimi yönünden yüksek verim elde edilen kombinasyonların tespiti hedeflenmiştir.

Çalışmamızda fenolik bileşiklerin üretiminde önemli bir basamağı teşkil eden PAL enziminin aktivitesinin ölçümü gerçekleştirilerek bitki büyüme düzenleyicilerin konsantrasyonlarının enzim aktivitesi üzerine etkisi araştırılmıştır. Ayrıca bu uygulamaların antioksidan aktiviteye etkisi DPPH radikal süpürme etkisi ölçülerek hesaplanmıştır.

Çalışmada örnek bitki olarak seçilen fesleğen, içerdiği uçucu yağlar ve fenolik içeriklerle, kozmetik ve farmasötik endüstri için önemli bir hammadde olup fesleğenden elde edeceğimiz kombinasyonların aynı familyadan olan nane, kekik, adaçayı ve lavanta gibi uçucu yağ bitkilerinde de uygulanabilmesi ve bu bitkilerde sekonder metabolit üretiminin arttırılabilmesi hedeflenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Farmer ve Ryan (1990) tarafından ilk defa bir sprey vasıtasıyla domates bitkisinin yapraklarına uygulanan MeJA, yapraklardaki proteinaz inhibitörlerinin sentezinin artmasına ve bitkide birikmesine sebep olmuştur. MeJA'nın sebep olduğu bu cevabın etkisinin, yaralanma gibi bir stres sonucu bitkide oluşan cevabın etkisinden daha fazla olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada MeJA uygulanmamış ancak MeJA uygulanmış bitkilerle aynı ortamda bulunan domates bitkilerinde de düşük seviyelerde proteinaz inhibitörlerinin biriktiği tespit edilmiştir. Böylelikle bir bitkinin yapraklarından salınan kimyasalların, başka bir bitkinin yapraklarındaki savunma amaçlı genleri aktive edebildiği, dolayısı ile bitkiler arası bir iletişimin varlığı ortaya çıkmıştır.

Gundlach ve ark. (1992) tarafından 36 farklı bitkinin hücre kültürlerinde kültür ortamına eklenen MeJA'nın, bitkilerdeki PAL enzim aktivitesini ve sekonder metabolit üretimini artırdığı tespit edilmiştir. Çalışmada jasmonatların, sekonder metabolitlerin üretiminde önemli bir enzim olan PAL enziminin oluşumunu indükleyen önemli bir sinyal molekülü olduğunu bildirmişlerdir.

Bais ve ark. (1999) hindiba bitkisinin saçak kök kültüründe, kültür ortamına katılan poliaminlerin, kültürlerin büyümesine ve bir sekonder metabolit olan kumarin üretimine etkisini araştırmışlardır. Uygulamanın 21. günü yapılan ölçümlerde, tek başına 1,5 mM putresin uygulanan kültürlerde, kontrol grubuna göre hücrelerin biyokütlesinde 2,3 kat büyüme sağlanmış, kumarin üretimi ise 3,4 kat arttığı saptanmıştır. Saçak kök kültüründe kumarin üretiminin, büyümeyle ilgili olduğu bulunmuştur.

Bais ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada poliaminlerin, *Beta vulgaris* ve *Tagetes patula* bitkilerinin saçak kök kültürlerinin büyümesine ve bitkilerdeki önemli sekonder metabolitlerin oluşumuna etkisini araştırmışlardır. Tek başına uygulanan putresin ve spermidin (1,5 mM), *B. vulgaris* ve *T. patula* kültürlerinin biyokütlesinde kontrol grubuna göre sırasıyla 1,42 kat ve 1,30 kat artış sağlarken, tek başına uygulanan 1,5 mM Spm, örneklerin biyokütlelerinde önemli bir artış sağlamamıştır. Kültürlere 0,75 mM putresin ve 0,75 mM spermidin birlikte uygulandığında kültürlerin büyümesi, aynı bitki büyüme düzenleyicilerin tek başına 1,5 mM konsantrasyonda uygulanmış kültürlerin büyüme miktarından daha fazla olmuştur. Kültür ortamına katılan 0,5'er mM putresin+Spm+spermidin kombinasyonu, kültürlerin biyokütlesinde önemli bir artışa sebep olmamıştır. Poliamin uygulamaları *B. vulgaris*'ten elde edilen önemli bir sekonder

metabolit olan betalaines miktarını % 58, *T. patula*'dan elde edilen thiophenes miktarını % 32 artırmıştır. Saçak kök kültürlerinde betalaines ve thiophenes üretimi, uygulamalardaki büyüme ile sıkı bir şekilde ilişkili bulunmuştur.

Javanmardi ve ark. (2002) İran'da yetiştirilmiş 23 farklı fesleğenin toplam antioksidan aktivite ve toplam fenolik içeriklerini incelemişlerdir. Fesleğen çeşitlerine ait toplam antioksidan aktivite 10,8 μ M Trolox eşdeğeri ile 35,7 μ M Trolox eşdeğeri arasında gerçekleşirken, toplam fenolik içerik ise 22,9 mg GAE kuru yaprak ile 65,5 mg GAE kuru yaprak olarak bulunmuş, toplam fenolik içerik miktarları ile antioksidan aktivite arasında pozitif doğrusal ilişki saptanmıştır.

Jayasinghe ve ark. (2003) fesleğenin antioksidan aktivitesini farklı yöntemlerle inceledikleri çalışmada, fesleğenin ham metanolik ekstraktı Sephadex LH-20 kolonunda 6 farklı fraksiyona ayrılmıştır. En yüksek antioksidan aktiviteyi 4. fraksiyon gösterirken, bunu 5. ve 6. fraksiyonlar takip etmiştir. Fraksiyonların antioksidan aktiviteden sorumlu fenolik bileşenleri HPLC-MS ile karakterize edilmiştir. Rozmarinik asit, ^1H NMR ölçümü ile 5. fraksiyonun ana antioksidan bileşeni olarak tespit edilmiştir.

Suresh ve ark. (2004) kabarcıklı kolon reaktöründe yetişmiş *Beta vulgaris*'in saçak kök kültüründe, kültür ortamına eklenmiş poliamin ve MeJA'nın, köklerin içerdiği betalaine miktarına ve pigment üretimine etkisini araştırmışlardır. Birlikte uygulanan 0,75 mM spermidin ve 0,75 mM putresin, örneklerin biyokütlesinde ve betalaine miktarında kontrol grubuna kıyasla sırasıyla, 1,23 kat ve 1,27 kat artış sağlamıştır. Kültür ortamına katılan 40 μ M MeJA uygulaması sonucu köklerin içerdiği betalaine miktarı kontrol grubuna göre 1,4 kat fazla gerçekleşmiştir.

Lee ve ark. (2005) fesleğenin ve kekiğin uçucu bileşenlerinin teşhisini yaptıkları ve bunların antioksidan özelliklerini belirlediği çalışmalarında, fesleğenin ana aromatik bileşenlerini sırasıyla linalool, estragol, metil sinamat, eugenol ve 1,8-cineole olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacılar uçucu yağ bileşenlerinden 12 tanesinin antioksidan özelliklerini, α - tokoferol ve BHT standartlarıyla aldehit/karboksilik asit yöntemine göre karşılaştırdıklarında, fesleğenin eugenol ve 4-allylphenol uçucu bileşenlerinin 50 μ g/ml'sinin potansiyel antioksidan özellik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Kim ve ark. (2005) sera ortamında yetiştirdikleri fesleğen bitkisine, ekim öncesi ve şaşırtma öncesi çeşitli konsantrasyonlarda kitosan uyguladıkları çalışmada, uygulamaların bitkinin büyüme parametreleri ile birlikte fenolik bileşiklerine, terpen miktarına,

antioksidan aktivitesine ve PAL enzim aktivitesine etkisini araştırmışlardır. Bitkinin toplam fenolik bileşik ve terpen miktarı % 0,1 ve % 0,5 kitosan uygulaması sonucu artmıştır. Bitkilerin antioksidan aktivitesinde ise kontrol grubuna göre 3,5 kat artış gözlenmiştir. Yaprakların PAL enzim aktivitesi % 0,5 kitosan uygulaması sonucu kontrol grubuna göre 32 kat fazla gerçekleşmiştir.

Kim ve ark. (2006) beyaz turp (*Raphanus sativus* L.) fidelerine ekzojen olarak yapraktan MeJA uygulamış ve uygulamalar sonucu turp yapraklarının toplam fenolik ve izotiyosiyanat miktarını ve antioksidan aktivitesi ile birlikte PAL ve mirozinaz enzim aktivitelerini araştırmışlardır. Araştırma sonucu 1,0 mM MeJA uygulamasının bitkideki toplam fenolik miktarını önemli ölçüde artırdığını ve MeJA uygulamasından 24 saat sonra yapılan analizde yaprakların PAL enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre % 60 oranında arttığını tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada 1,0 mM MeJA uygulanan turp fidelerinde izotiyosiyanat miktarının ve bununla bağlantılı olarak mirozinaz enzim aktivitesinin düştüğü saptanmıştır.

Kim ve ark. (2006) fesleğen bitkisine yapraktan 0,1 ve 0,5 mM MeJA uygulamış ve uygulamaların yapıldığı örneklerin hepsinde toplam fenolik miktarının kontrol grubuna göre arttığını tespit etmişlerdir. Fesleğen yapraklarında bulunan fenolik bileşiklerden RA ve CA'nın güçlü antioksidan öğeler olarak tespit edildiği çalışmada, bu bileşiklerin MeJA uygulamalarıyla önemli bir ölçüde arttığı da tespit edilmiştir. Araştırmada fesleğen yapraklarının içerdiği eugenol ve linalool miktarı, 0,5 mM MeJA uygulaması ile kontrol grubuna göre sırasıyla % 56 ve % 43 oranında artmıştır. Araştırmada ayrıca 0,5 mM MeJA uygulanmış fesleğen ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri kontrol grubuna göre 2,3 kat daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar antioksidan aktivitedeki bu artışı güçlü DPPH serbest radikal süpürücü etkiye sahip RA, CA ve eugenolün, bitkideki üretiminin artmasından kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir. Bunun yanında 0,5 mM MeJA uygulanmış fesleğenin metanolik ekstraktının HPLC analizlerinde, bilinmeyen bir fenolik asitin miktarı kontrol grubuna göre 4,3 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Kireççi (2006) yüksek lisans tez çalışmasında, fesleğen bitkisinin tohumlarına ekim öncesi uyguladığı giberellin (GA₃), Spm, spermidin ve putresinin, bitkinin morfolojik yapısına, uçucu yağ oranına ve uçucu yağ bileşenlerinin miktarına etkisini incelemiştir. Tarla şartlarında yetiştirilen fesleğenlerin uygulamalar sonrası birçok morfolojik özelliğinde, kontrol grubuna göre yüksek verim elde edilmiştir. Farklı bitki büyüme düzenleyici gruplarının bitki morfolojisine etkileri farklı olmakla birlikte, poliaminler

GA₃'ten daha etkili bulunmuştur. Genel olarak 0,1 mM spermidin, 0,1 mM Spm, 1,0 mM putresin uygulamalarından diğer uygulamalara göre daha yüksek verim elde edilmiştir. Uygulanan bitki büyüme düzenleyicilerin fesleğenin uçucu yağ oranına önemli bir etkisinin olmadığı, ancak yağ içerisindeki ana bileşen olan linalool miktarının önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir.

Chen ve ark. (2006) domates bitkisine ekzojen olarak uyguladıkları MeJA'nın, bir çeşit sekonder metabolit olan kafeolputresinin üretimini büyük ölçüde arttırdığını gözlemlemişlerdir. MeJA (1,0 mM) uygulanmış domates yapraklarının kafeolputresin miktarı kontrol grubuna göre 100 kat fazla miktarda gerçekleşmiştir.

Nguyan ve Niemeyer (2008) yaptıkları çalışmada, fesleğen bitkisinin üç farklı çeşidine azot gübresi uygulamış ve uygulamaların, bitkinin polifenolik içeriğine ve antioksidan özelliklerine etkisini incelemişlerdir. Bitkilere en düşük konsantrasyonda (0,1 mM) azot gübresi uygulandığında, fesleğenlerin 'Dark Opal' ve 'Genovese' çeşitlerinin toplam fenolik içeriği önemli oranlarda artmıştır. Benzer şekilde diğer azot konsantrasyonları ile kıyaslandığında en düşük konsantrasyondaki (0,1 mM) azot muamelesi sonucu bitkilerin RA ve KA miktarları önemli oranlarda artmıştır. Azotla gübreleme bitkilerin antioksidan aktivitesini de önemli oranda etkilemiştir. Yüksek azot konsantrasyonu (5,0 mM) ile muamele edilen bitkilerin antioksidan aktivitesi, diğer azot konsantrasyonları ile muamele edilenlere göre düşük düzeyde kalmıştır. Ayrıca araştırmacılar uygulamaların bitkilerin antosiyanin miktarına etkilerini incelemişler ve fesleğenlerin 'Dark Opal' çeşidindeki antosiyanin miktarının azot konsantrasyonları ile değişmediğini, ancak bitkilerin yetiştirme dönemi ile antosiyanin miktarında önemli oranlarda farklılıklar olduğunu gözlemlemişlerdir. Fesleğenlerin farklı kültürlerinde, toplam fenolik içerik, RA ve KA miktarlarında ve antioksidan aktivitede istatistiki olarak önemli farklılıklar olduğu gözlemlenmiştir.

Wang ve ark. (2008) 3 çeşit böğürtlen bitkisine hasat öncesi, ekzojen olarak uyguladıkları 0,01 mM ve 0,1 mM MeJA'nın böğürtlen meyvelerinin kalitesi, flavonoid içeriği ve antioksidan aktivitesine etkisi ile birlikte bu meyvelerin insan akciğer kanseri ve lösemi hücrelerinin çoğalmasına etkisi incelenmiştir. Araştırmacılar MeJA uygulanmış böğürtlen çeşitlerinin, flavonoid içeriklerinin ve antioksidan aktivitelerinin arttığını, MeJA uygulanmış meyvelerin kanser hücrelerinin üremelerini önlemede kontrol grubuna göre daha etkili olduklarını tespit etmişlerdir.

Lee ve Scagel (2009) fesleğen bitkisinin yapraklarında ilk defa şikorik asitin varlığını tespit ettikleri çalışmada, fesleğende bulunan fenolik asitleri miktarına göre sırasıyla RA, ŞA ve kaftarik asit olarak tespit etmişlerdir. Fesleğenin polifenolik karakterizasyonunun yapıldığı çalışmada, fesleğenin ‘Genovese Italian’ ve ‘Purple Petra’ çeşitleri, arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) ile inokulasyon yapıldıktan sonra polifenolik analizi incelenmiştir. İncelemeler sonucu AMF ile inoküle edilen fesleğenlerin ne yaprak ne de gövdelerindeki polifenollerde bir değişim gözlenmemiş, ancak ‘Purple petra’ çeşidinin toplam antosiyanin miktarının arttığı bildirilmiştir.

Lagouri ve Nisteropoulou (2009) Yunanistan’da yetişmiş *Thymus vulgaris* (kekik), *Origanum onites* (güveyotu) ve *Ocimum basilicum* (fesleğen)’un toplam fenolik, rozmarinik asit miktarı ve DPPH serbest radikal süpürme etkisi ile FRAP antioksidan aktivite özelliklerini incelemişlerdir. Güveyotu ve kekiğin DPPH radikal süpürme etkisi fesleğenin değerlerinden yüksek bulunurken, FRAP antioksidan aktivitesinde güveyotu, kekik ve fesleğenden daha güçlü bir etki göstermiştir. Kekik bitkisinin zengin bir RA kaynağı olarak önerildiği çalışmada, RA miktarları kekik, güveyotu ve fesleğen için sırasıyla 4,53 mg/kg, 3,28 mg/kg, 2,37 mg/kg kuru ağırlık olarak tespit edilmiştir. Çalışmada ayrıca toplam fenolik içerik miktarları ile RA ve DPPH radikal süpürme etkisi değerleri arasında yüksek bir pozitif korelasyon saptanmıştır.

Shinde ve ark. (2009) *Psoralea corylifolia* L.’nın hücre süspansiyon kültüründe, kültür ortamına eklenmiş maya ekstraktı, kitosan, SA, FA öncülü ve poliaminlerin (putresin ve spermidin) izoflavon üretimine etkisini araştırmışlardır. Hücrelerin daidzein ve genistein birikimi 0,5 mM FA öncülü eklenmiş kültürde kontrol grubuna göre 1,3 kat artmıştır. Daidzein ve genistein miktarında en çok artışı 100 mg/L maya ekstraktı sağlarken, 1,0 mM SA izoflavon miktarını kontrol grubuna göre 2,25 kat arttırmıştır. Hücre ortamına eklenen 100 mM spermidin her iki izoflavon miktarını kontrol grubuna göre 2,2 kat arttırmıştır. Çalışmada en yüksek izoflavon miktarına uygulamanın 7. gününde ulaşılmıştır. Poliamin uygulanan örneklerin hücre büyümelerine etkisine bakıldığında, putresin ve spermidinin büyümeye herhangi bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

Ozawa ve ark. (2009) lima fasülyesi yapraklarında, otçul mayıtların doğal düşmanları olan etçil böcekleri çeken uçucu terpenlerin üretiminde poliaminlerin rolünü araştırmışlardır. Bunun için ekzojen olarak yapraklara poliaminlerden kadaverin, putresin, spermidin ve Spm uygulanmış ve uygulama sonrası yapraklardaki uçucu terpenler, H₂O₂ miktarı, içsel JA miktarı, hücresel kalsiyum ve reaktif oksijen türlerinin miktarları

incelenmiştir. Poliaminlerden Spm, uçucu terpenlerin ve içsel JA'nın miktarını en çok arttıran bitki büyüme düzenleyici olmuştur. Yapraklara ekzojen olarak Spm ve JA birlikte uygulandığında, tek başına uygulanan JA'den daha etkili olmuş, bu uygulamanın yapıldığı yapraklar Y-tüpüne yerleştirildiğinde, tek başına JA uygulanan yapraklardan daha çok avcı böcekleri çekmiştir. Spm ve JA uygulamasının bitkilerde poliamin oksidaz ve bakır amin oksidaz enzim aktivitelerine bir etkisi olmamasına rağmen, Ca girişi, reaktif oksijen türleri üretimi ile birlikte NADPH oksidaz bileşimlerinin, SOD, CAT, askorbat peroksidaz, glutation redüktaz ve glutation peroksidaz enzim aktivitelerini ve gen ifadesini arttırmıştır.

Horbowicz ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada karabuğday fidelerine MeJA ile muamele ettikten sonra serbest fenolik asitler, toplam kuersetin ve toplam fenolik miktarlarını incelemişlerdir. Fidelerin hipokotil kafeik asit değerleri 0,11 mg/g kuru ağırlık ile 0,32 mg/g kuru ağırlık arasında değişirken, kotiledonların kafeik asit miktarı 0,18 mg/g kuru ağırlık ile 0,40 mg/g kuru ağırlık değerleri arasında gerçekleşmiştir. Hipokotil ve kotiledonlara ait toplam fenolik değerleri MeJA uygulaması sonrası artmıştır. Hipokotillerin toplam fenolik değerleri 19,7 mg/g kuru ağırlık ile 25,0 mg/g kuru ağırlık arasında değişmekle birlikte en yüksek fenolik değeri 1,0 mM MeJA uygulamasından elde edilmiştir. Kotiledonların toplam fenolik değerleri 10,1 mg/g kuru ağırlık ile 19,2 mg/g kuru ağırlık arasında değişirken, en yüksek fenolik değerleri 0,01 mM MeJA uygulamasından elde edilmiştir.

Ziaei ve ark. (2012) fesleğen fidelerinde, büyüme evresinin başında, ortasında, tomurcuklanma ve çiçeklenme dönemi gibi farklı büyüme evrelerinde, PAL enziminin aktivitesi ve gen ifadesi ile bu evrelerdeki fenilpropanoid miktarındaki değişimin ilişkisini araştırdıkları çalışmada, PAL enzim aktivitesinin ve gen ifadesinin büyüme evrelerine göre değiştiği tespit edilmiştir. En yüksek enzim aktivitesi, tomurcuklanma evresinde 0,851 μmol sinnamik asit $\text{mg}^{-1} \text{dk}^{-1}$ olarak gerçekleşmiştir. Yapılan çalışmada bitkilerin methylchavicol içeriği ile PAL enzim aktivitesi ve transkripsiyonu arasında korelasyon olduğu saptanmıştır.

Benedec ve ark. (2012), Romanya'da yetiştirilen dört çeşit fesleğenin polifenolik içerikleri ve antioksidan potansiyellerini inceledikleri çalışmada, 14 çeşit fenolik bileşen tespit etmişlerdir. Toplam fenolik içerik değerleri 20,335 g GAE/100 g kuru ağırlık ile 9,120 g GAE/100 g kuru ağırlık arasında gerçekleşmiştir. Toplam flavonoid miktarları ise 1,245 g Rutin Eşdeğeri (RE)/100g kuru ağırlık ile 0,350 g RE/100g kuru ağırlık değerleri

arasında değişmiştir. Fesleğen eşitlerinin en yüksek DPPH radikal süpürme etkisi % 26,55 olurken, en düşük süpürme etkisi % 11,24 olarak tespit edilmiştir.

Mathew ve Sankar (2012), *Ocimum basilicum* L., *O. sanctum* L. ve *O. gratissimum* L.'nin hücre kültürlerinde ortama eklenen kitosan ve MeJA elisitrlerini tek tek veya birlikte uyguladıkları çalışmada, MeJA ve kitosanın tek başına uygulandığı kültürlerin hücre kütlesinde artış gözlenirken, ikisinin birlikte uygulandığı hücre kültürlerinde önemli bir kütle artışı gözlenmemiştir. İki elisitör arasında hücre kütlesini artırma yönünden MeJA daha etkili bulunmuştur.

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Materyal

Çalışmamızda tohum materyali olarak Tezier (HM-CLAUSE, Fransa) marka iri yapraklı fesleğen (*Ocimum basilicum* L. var. Grand Vert) kullanılmıştır. Tohumların satışı Türkiye’de yapılmadığı için firma distribütörü vasıtasıyla Fransa’dan getirtilmiştir.

3.1.1. *Ocimum basilicum* L. var. Grand Vert’in sınıflandırılması

Ocimum basilicum L. var. Grand Vert’in bitki sistematikteki yeri;

Bölüm (Divisio)	: Spermatophyta
Altbölüm (Subdivisio)	: Angiospermae
Sınıf (Classis)	: Dicotyledona
Altsınıf (Subclassis)	: Dialypetalae
Takım (Ordo)	: Tubiflorae
Familya (Familia)	: Labiatae (Lamiaceae)
Cins (Genus)	: <i>Ocimum</i> L.
Tür (Species)	: <i>O. basilicum</i> L. cv. Grand Vert

3.1.2. *Ocimum basilicum* L. var. Grand Vert’in morfolojik özellikleri

Bitki; tek yıllık, gövdesi genellikle dallanmamış ve karakteristik dört köşeli, 30-100 cm civarındadır. Yapraklar yumurtamsı, 7-16×3,5-12 cm, yaprak kenarları ince ve birbirinden uzak şekilde çıkıntılı, tüysüz, salgı benekli, yeşilimsi puslu, petiyolleri uzundur. Çiçek yaprakları brakte benzeri, genişçe yumurtamsı şekillidir. Çiçek kümesi 6’lı, kaliks, çiçekte 3-4 mm, meyvede 7-8 mm’dir. Korolla beyaz, 7-8 mm uzunluktadır. Çiçeklenme dönemi, tohum ekiminden 2-3 ay sonradır (Şekil 3.1.2.1).



Şekil 3.1.2.1. *Ocimum basilicum* L. var. Grand Vert'in morfolojik görünümü

3.1.3. Kullanılan Kimyasallar

- Metil jasmonat (%95) Aldrich, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Spermin ($\geq$ % 97) Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- 24-epibrassinolid ($\geq$ % 85) Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- L-fenilalanin Bioultra ($\geq$ % 99) Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Kafeik asit ($\geq$ % 98) Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Rozmarinik asit, (HWI) Analytik GmbH, Pharma solutions, Germany
- Şikorik asit, $\geq$ % 95 (HPLC), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Torf (pH 5.5-6.5) Base Substrat
- Hayvan gübresi
- Osmocote® Exact® marka gübre kullanılmış olup gübre içeriği % 15 toplam azot (N), % 9 fosfor pentoksit (P_2O_5), % 11 Potasyum oksit (K_2O), % 2 Magnezyum oksit (MgO) ve eser elementler.
- Etanol absolute CHROMASOLV® for HPLC, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

- Metanol CHROMASOLV[®], gradient grade, for HPLC, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Asetonitril CHROMASOLV[®] plus, for HPLC ($\geq$ % 99,9), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Sıvı azot, kuru buz (OKNAL)
- Trifloro asetik asit (TFA) CHROMASOLV[®] for HPLC, ($\geq$ % 99) Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Folin& Ciocalteu's phenol reagent (FCR), Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Gallik asit, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Sodyum karbonat, ACS reagent, anhydrous, ($\geq$ % 99,5), granular, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Formik asit, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl), % 95, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Alüminyum klorid, for synthesis, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Kuersetin, $\geq$ % 95, (HPLC), solid, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- BHT (Butylated hydroxytoluen), $\geq$ % 99, FCC, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
- Borik asit, molecular biology reagent, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

3.1.4. Kullanılan Cihazlar

- Sıcak su banyosu, Memmert, Schwabach FRG, GERMANY
- Ultrasonik banyo, United Jewelry Tool Supplies
- Buz makinası, Hoshizaki, Japan
- Ultrasantrifüj, Sigma 3K30, Germany
- Santrifüj, Hettich Zentrifugen Micro 220 R, Germany
- Spektrofotometre, Shimadzu UV-1800, Shimadzu Co, Japan
- Hassas terazi, Kern & Sohn GmbH, Germany
- Ultra derin dondurucu, New Brunswick Scientific U570 Premium, ENGLAND
- HPLC cihazı, Agilent, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA
- GC cihazı, GC-MS ve FID Dedektör, Agilent

3.2. Yöntem

3.2.1. Ön çalışma

Tohumlara diğer bitki büyüme düzenleyiciler ve öncülle birlikte uygulanacak olan MeJA'nın konsantrasyonuna karar verebilmek amacı ile ön çalışma yapılmıştır. Tohumlar ekilmeden önce % 1'lik sodyum hipoklorit solüsyonunda yaklaşık 2-3 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonundan sonra bol musluk suyu ile 3 kez yıkanarak sodyum hipokloritin tohum yüzeyinden uzaklaşması sağlanmıştır (De la Barrera ve Nobel, 2002). Tohumlar, 5 ml distile su ile hazırlanmış, 0,05; 0,1; 0,5; 1,0 ve 5 mM konsantrasyonlarında MeJA ile 20 °C'de 24 saat karanlıkta bekletildikten sonra akan musluk suyunda yıkanıp torf ve perlit (3:1 h/h) karışımı içeren viollere ekilmiştir (Şekil 3.2.1.1).

Ekilen bitkiler, serin florasan lamba ($100 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ile aydınlatılmış, gündüz/gece 24/21 °C sıcaklıktaki 13 saatlik fotoperiyot şartlarında, üniversitemizin ÜSKİM bünyesinde bulunan iklimlendirme odasında yetiştirilip, violler musluk suyu ile düzenli sulanmıştır. Tohumlar çıkıştan sonra 4 gerçek yaprağa sahip olunca eşit oranda karıştırılmış torf-toprak-perlit-gübre içeren 3 lt hacimli saksılara şaşırtılmıştır.

İklim odasında saksıya şaşırtılan bitkiler, tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrür ve her tekerrürde 10 bitki olacak şekilde yerleşimi yapılmıştır. Bitkiler 3 ay sonra toplam fenolik içeriği tespit edilmek üzere tepe tomurcuğunun altında kalan bölgede bulunan internodlardan yaprak örnekleri alınıp 2 g olacak şekilde tartılıp, kilitli poşetlerde hava kalmayacak şekilde pakatlendikten sonra içerisinde sıvı azot bulunan kaplarla taşınarak analiz zamanına kadar saklanmak üzere -80 °C'deki dolaba yerleştirilmiştir.



Şekil 3.2.1.1. Ön çalışmada değişik konsantrasyonlarda MeJA uygulanan fesleğenlerin yetiştirilmesi, A. Tohumlara bitki büyüme düzenleyici ve öncül muamelesi, B. Tohumların viollerde çıkışı, C. Fesleğen fideleri, D-E. Fidelerin saksılara ekilmesi, F. Çiçeklenme evresindeki fesleğenler

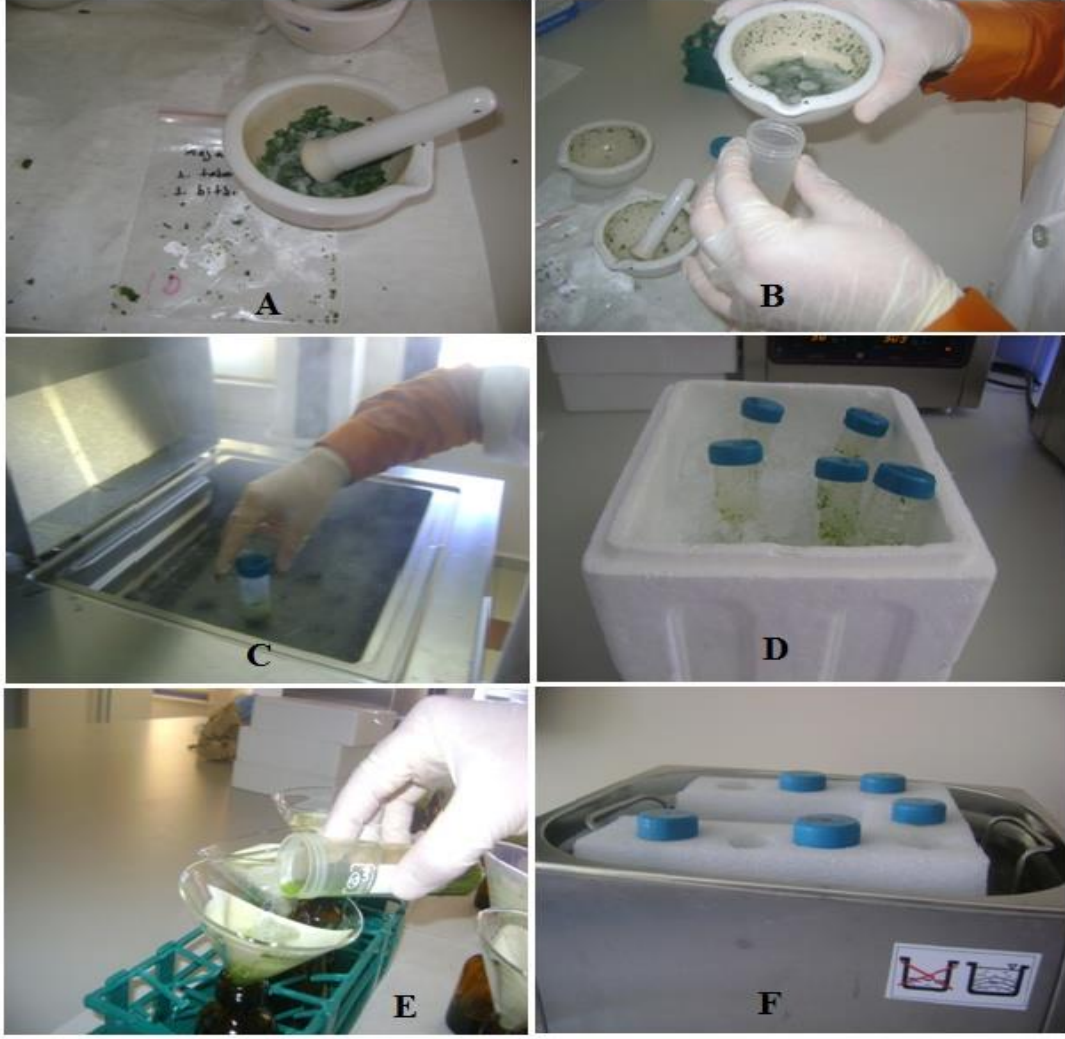
3.3. Toplam Fenolik İçeriğin Tespiti

3.3.1. Yaprakların ekstraksiyonu ve toplam fenolik miktarının tespiti

Ön çalışmadan elde edilen örneklerin toplam fenolik miktarının tayini için her uygulamadan 2 g yaprak bir miktar kuru buz ile porselen havanda ezildikten sonra, formik asitle (% 0,1) asitlendirilmiş su-metanol (20:80 h/h) karışımından 20 ml eklendikten sonra stabilizasyon işlemine tabi tutulmuştur (Lee ve Scagel, 2009). Stabilizasyon işlemi fesleğende ekstraksiyon esnasında esmerleşme ile kaybolan fenolik içeriğin kaybını en aza indirmek amacıyla yapılmıştır. Bunun için parçalanmış yaprak numunelerine metanol ilavesi yapılmış ve hızlı bir şekilde 50 ml'lik falkon tüp içerisine alınmış ve kaynar su banyosunda 5 dk bekletildikten sonra 10 dk buz içerisinde soğutulmuştur. Oluşan karışım filtre kağıdından koyu renkli şişelere süzildikten sonra geriye kalan yaprak kalıntılarına 15 ml metanol-su karışımı eklenip ultrasonik banyoda 15 dk sonikasyona tabi tutulup filtre kağıdı ile süzölmüştür. Aynı işlem taze metanolik su ile 1 defa daha tekrarlanmıştır. Süzölen sıvılar toplanıp hacim distile su ile 30 ml'ye tamamlanmıştır. Bu şekilde hazırlanan metanolik ekstrakt analizleri yapılana kadar -80 °C'de muhafaza edilmiştir (Şekil 3.3.1.1).

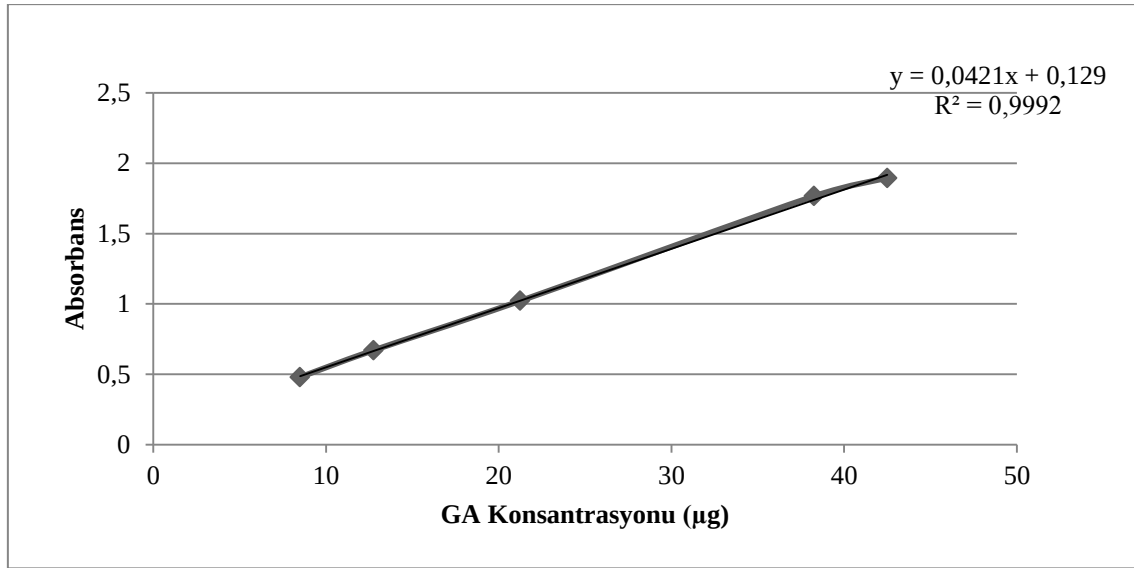
Bitkinin toplam fenolik analizi Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak Singleton ve Rossi'ye (1965) göre yapılmıştır. Metanolik ekstrakt (50 µL), 450 µL distile su ile iyice karıştırılıp, üzerine 250 µL 2 N Folin-Ciocalteu reaktifi eklenip tekrar iyice karıştırılmıştır. Bu karışıma 1,25 ml % 20'lik (a/h) sodyum karbonat (Na₂CO₃) çözeltisi eklendikten sonra 25 °C'de 1 saat inkübe edilip, 2000×g'de 15 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan süpernatant spektrofotometre cihazında 760 nm dalga boyunda ölçölmüştür. Sonuçlar mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/g yaş yaprak şeklinde ifade edilmiştir.

Gallik asitten stok çözelti oluşturulup, 10-100 ppm aralığında çözeltiler hazırlanıp toplam fenolik içeriği Singleton ve Rossi (1965) metodundaki gibi ölçölmüştür. UV spektrofotometrede 760 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerine göre grafik oluşturulmuş ve bu değerlerle bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.3.1.2). Her bir uygulamaya ait örneklerin 760 nm'deki absorbans değeri, gallik asit standart eğrisindeki formölün yerine koyulup ($y=0,0421x+0,129$), çıkan sonucun seyreltme miktarı da hesaba katılarak toplam fenolik değeri mg GAE/g yaş yaprak olarak bulunmuştur.



Şekil 3.3.1.1. Yaprakların fenolik ekstraksiyonu, A. Kuru buz ile parçalama, B. Çözücü ilavesi C. Sıcak su banyosu D. Buzda soğutma işlemi, E. Ekstraktların süzülmesi, F. Ultrasonik banyo

Uygulamalar her bir konsantrasyon için 3 tekerrürlü olarak tekrarlanmış ve sonuçlar istatistiksel analize tabi tutularak toplam fenolik miktarı yönünden en yüksek verimin elde edildiği MeJA konsantrasyonu asıl deneme için kullanılmıştır.



Şekil 3.3.1.2. Gallik asit standart eğrisi

3.4. Çeşitli Bitki Büyüme Düzenleyicilerin ve Fenilalaninin MeJA ile Birlikte Fesleğen Tohumlarına Uygulanması

Ön çalışma ile belirlenen konsantrasyondaki (0,5 mM) MeJA ile birlikte 0,1 ve 1,0 mM Spm, 0,5 ve 2,0 µM EBL (aktif ve kararlı BRs analogu, Khripach ve ark., 2000), 0,05 ve 0,5 mM fenilalanin (FA) öncülü ön çalışmada anlatıldığı şekilde tohumlara uygulanmıştır. Viollere ekilen tohumlar 4 gerçek yapraklı olunca saksıya şaşırtılmıştır. Saksıya şaşırtılan fesleğenlere şaşırtmadan 1 ay sonra ve kesimden 1 hafta önce olmak üzere iki kere 50 ml 0,5 mM MeJA topraktan uygulama yapılmıştır (Shinde ve ark, 2009; Yang ve ark., 2003). Çalışma, tesadüf blokları deneme desenine göre her tekerrürden 10 bitki olmak üzere gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.4.1). Bitkiler çiçeklenmeden hemen önce toprağın üst yüzeyinden 5 cm yukarısından biçilerek hasat edilip çeşitli analizleri yapılmıştır (Şekil 3.4.1).

Çizelge 3.4.1. Fesleğen tohumlarına uygulanan bitki büyüme düzenleyici ve öncül kombinasyonları

Tek başına uygulanan bitki büyüme düzenleyiciler ve öncül	MeJA ile kombinasyon	Kontrol Grupları
Spm (0,1 mM)	Spm (0,1 mM)+MeJA	Kontrol A
Spm (1,0 mM)	Spm (1,0 mM)+MeJA	(24 saat suda bekletilen)
FA (0,05 mM)	FA (0,05 mM)+MeJA	Kontrol B
FA (0,5 mM)	FA (0,5 mM)+MeJA	(İşlem yapılmadan ekilen)
EBL (0,5 µM)	EBL (0,5 µM)+MeJA	
EBL (2,0 µM)	EBL (2,0 µM)+MeJA	
MeJA (0,5 mM)		



Şekil 3.4.1. Bitki büyüme düzenleyicilerin ve fenilalanin öncülünün tohumlara uygulanması

3.5. Fesleğen Bitkisinde İncelenen Özellikler

3.5.1. Fesleğen bitkilerine ait morfolojik ve verim özellikleri

3.5.1.1. Bitki boyu (cm)

Bitkinin çiçeklenme zamanı öncesi biçimden hemen önce, her uygulamaya ait bitkilerin toprak yüzeyinden itibaren en uç noktasına kadar olan uzunluğu ölçülüp ortalaması alınmıştır.

3.5.1.2. Dal sayısı

Her uygulamaya ait tekerrürlerden rasgele seçilen 3 bitkinin gövde üzerinden yaptığı ana dallar sayılıp ortalaması alınmıştır.

3.5.1.3. Boğum arası uzunluğu (cm)

Her uygulamaya ait tekerrürlerden rasgele seçilen 3 bitkinin ana gövdesindeki boğum arası mesafeler ölçülüp ortalaması alınmıştır.

3.5.1.4. Yaş ağırlık (g)

Her uygulamaya ait tekerrürlerden rasgele seçilen 3 bitki biçilip ayrı ayrı tartılarak bitki başına ağırlık ortalaması alınmıştır.

3.5.1.5. Bitki başına taze yaprak verimi (g)

Yaş ağırlıkları ölçülen 3 bitkinin ayrı ayrı yaprakları tartılıp ortalaması alınmıştır.

3.5.1.6. Bitki başına taze çiçek verimi (g)

Yaş ağırlığı ölçülen 3 bitkinin ayrı ayrı çiçekleri tartılarak ortalaması alınmıştır.

3.5.1.7. Başak boyu (cm)

Her uygulamaya ait tekerrürlerden rasgele seçilen 3 bitkinin başaklarının hepsinin boyları ölçülüp ortalaması alınmıştır.

3.5.1.8. Başak sayısı

Her uygulamaya ait tekerrürlerden rasgele seçilen 3 bitkinin başakları sayılıp ortalaması alınmıştır.

3.5.1.9. Bitki yaprak alanı (cm²)

Her uygulamaya ait tekerrürlerden rasgele seçilen 3 bitkinin yaprakları yaprak alanı ölçüm cihazı ile ölçülüp ortalaması alınmıştır.

3.5.2. Fesleğen bitkilerindeki uçucu yağ oranı ve bileşenlerinin tespiti

3.5.2.1. Kuru bitkideki uçucu yağ oranı

Uçucu yağ elde etmek için distilasyon yöntemi (su buharı ile sürüklenme) uygulanmıştır (Şekil 3.5.2.1.1). Distilasyon balonuna her uygulama için 3 tekerrür olmak üzere 30 g kadar kuru bitki koyularak içine 200-250 ml su ilave edilerek distilasyon balonu mantolu ısıtıcı ile 120 °C'yi aşmayacak bir sıcaklıkta ısıtılmıştır. Yaklaşık üç saat süren

ısıtma işleminin ardından düzeneğin 5-10 dakika kadar soğuması beklenip, taksimatlı boruda su yüzeyinde toplanan uçucu yağ, taksimatlı boru yardımıyla ml cinsinden miktarı tespit edilerek, muhafaza edilmek için küçük cam şişelere alınmıştır (European Pharmacopoeia, 1975). Elde edilen yağlar analizleri yapılana kadar 4-6 °C'deki buzdolabında muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.5.2.1.1. Uçucu yağların elde edilmesinde kullanılan su buharı distilasyon cihazı

3.5.2.2. Kuru bitkideki uçucu yağın bileşenleri

Her uygulamadan rasgele alınan yaprak örnekleri kurutularak uçucu yağı çıkarıldıktan sonra GC-MS, GC-FID dedektörleri ile içerikleri belirlenmiştir. Sistem: Agilent Technologies GC 6890N Network, MS 5975C VL MSD. Kolon: HP-88 (100 m*0,25 mm id; 0,2 µM film kalınlığı) kapiler kolon. Taşıyıcı gaz Helyum, akış hızı 1,2 ml/dk. Enjeksiyon sıcaklığı 250 °C, kolon sıcaklığı 70 °C'de 1 dk, dakikada 10 °C artış ile 230 °C'ye programlanmış, 230 °C'de 25 dakika tutulmuştur. Split oranı 20:1, elektron enerjisi 70 eV, enjeksiyon miktarı 1 µl. FID dedektörü için şartlar aynı olup dedektör sıcaklığı 250 °C'ye ayarlanmıştır.

Uçucu yağ analizleri KSÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Laboratuvarında bulunan GC-MS (Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometrisi) FID dedektörü kullanılarak yapılmıştır (Nacar, 1997).

3.6. Fesleğen Bitkilerindeki Fenolik Asitlerin Tespiti

Farklı bitki büyüme düzenleyiciler ve öncül uygulanan bitkilerin içerisindeki rozmarinik asit, şikorik asit ve kafeik asit miktarı tespiti için HPLC yöntemi uygulanmıştır. Her uygulama için 9 tekrerrür olmak üzere ön çalışmada olduğu gibi fenolik ekstraksiyonu yapılan yaprak örnekleri önce 2000×g'de 15 dk santrifüj edilmiş sonra da 0,45 µl şırıngadan süzülüp HPLC'ye enjekte edilmiştir.

3.6.1. Kullanılan HPLC cihazı ve özellikleri

HPLC analizleri KSÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Laboratuvarı'nda bulunan Agilent 1100 marka, Ecom pompa (Prague,Czech Republic), Rheodyne enjektör valfi (20 µL), Hewlett-Packard UV değişken güçlü dedektör 1100 model (HP), SGX C18 (5 µm) kolon (4,6 mm×250 mm) (Prague, Czech Republic)'dan oluşmaktadır. HPLC yöntemi oturtmak amacıyla yapılan çalışmalar sonucu rozmarinik asit, şikorik asit ve kafeik asit standartlarının en uygun yöntemi şu şekilde tespit edilmiştir. Mobil fazın akış hızı dakikada 1,2 ml, A fazı suda % 0,05 TFA (h/h) ve B fazı asetronitril olarak kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı 40 °C'ye ayarlanmıştır. UV dedektör 330 nm'ye ayarlanıp rozmarinik asit, şikorik asit ve kafeik asit tespiti yapılmıştır.

3.6.2. Rozmarinik Asit, Şikorik Asit ve Kafeik Asit Solüsyonlarının Hazırlanması

Ticari olarak satın alınan standartlar % 80'lik metanol/su (20:80, h/h) ile karıştırılıp ultrasonik banyoda çözdürülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda solüsyonlar hazırlanıp HPLC cihazına enjekte edilmiş ve her biri için regresyon eğrisi hazırlanmıştır.

3.6.3. Rozmarinik Asit, Şikorik Asit ve Kafeik Asit Standartlarının HPLC'de Analizi

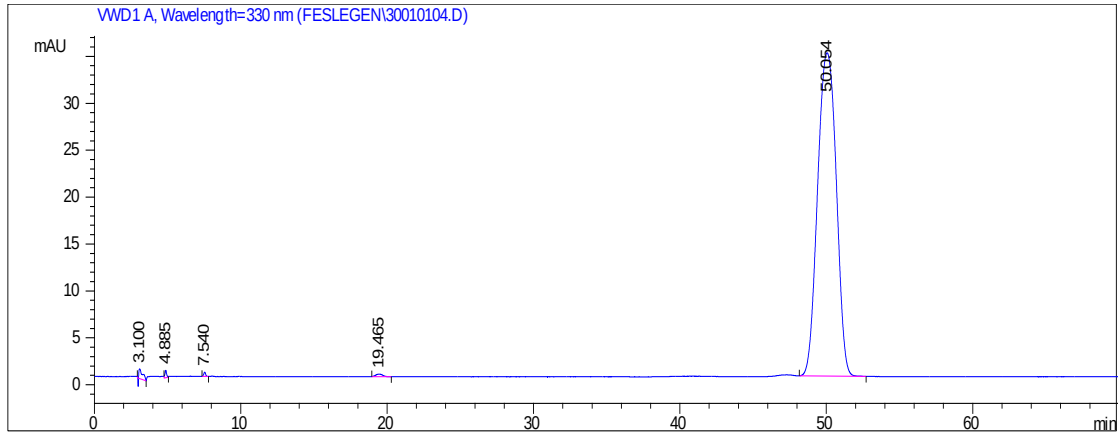
Rozmarinik asit (RA), şikorik asit (ŞA) ve kafeik asit (KA) standartlarının HPLC'de analizi yapılmıştır.

Deneme 1:

100 µl RA standardı aşağıdaki şartlarda HPLC cihazına enjekte edilmiştir.

A Fazı : % 0,05 TFA içeren ultra saf su, B Fazı: Asetonitril, A/B Oranı: 85:15,

Akış hızı: 1 ml/min,



Şekil 3.6.3.1. Rozmarinik asit standart kromatogramı

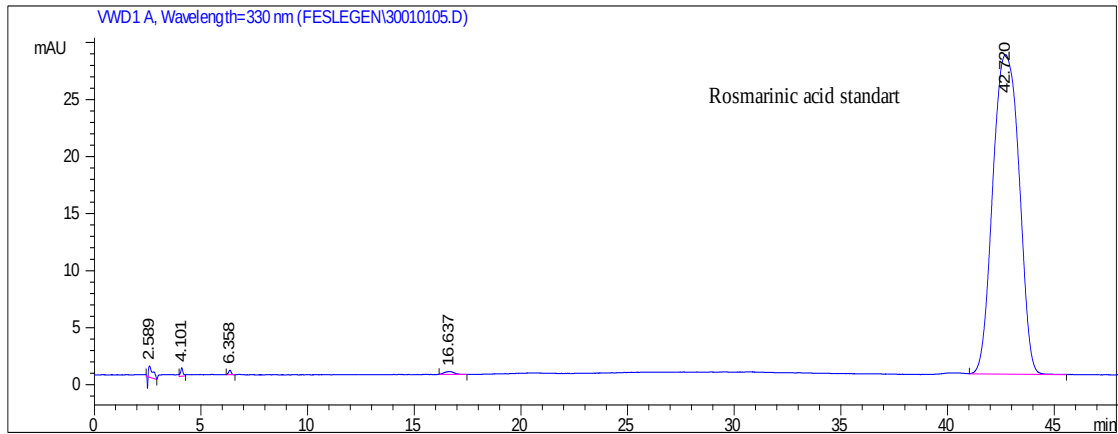
RA standardına ait pik Şekil 3.6.3.1’de görülmektedir. Pik 50. dakikada görüldüğü ve 3 dakikada tamamlandığı için akış hızı 2. denemede 1,2 ml/dk olacak şekilde değiştirilmiştir.

Deneme 2:

100 µl RA standardı akış hızı değiştirilerek enjekte edilmiştir.

A Fazı : % 0,05 TFA içeren ultra saf su, B Fazı: Acetonitril, A/B Oranı: 85:15,

Akış hızı: 1,2 ml/min,



Şekil 3.6.3.2. Rozmarinik asit standart kromatogramı

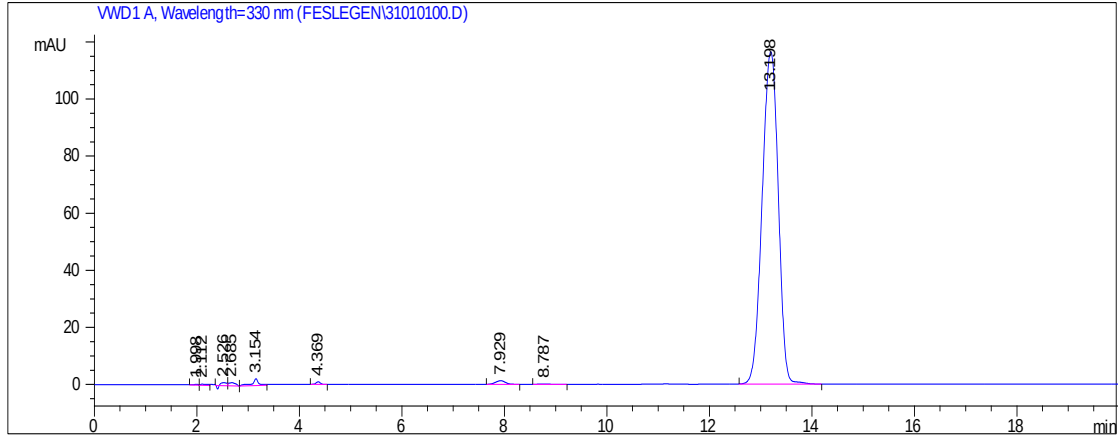
RA standardı 42. dk’da çıkmıştır (Şekil 3.6.3.2). Pik beklenenden daha geç çıkmış ve 3 dakikaya yayılmıştır. Bu yüzden 3. denemede A ve B fazının oranı 80:20 olarak değiştirilip tekrar enjeksiyon yapılmıştır.

Deneme 3:

100 µl RA standardı akış oranı değiştirilerek enjekte edildi.

A Fazı : % 0,05 TFA içeren ultra saf su, B Fazı: Acetonitril, A/B Oranı: 80:20,

Akış hızı: 1,2 ml/min

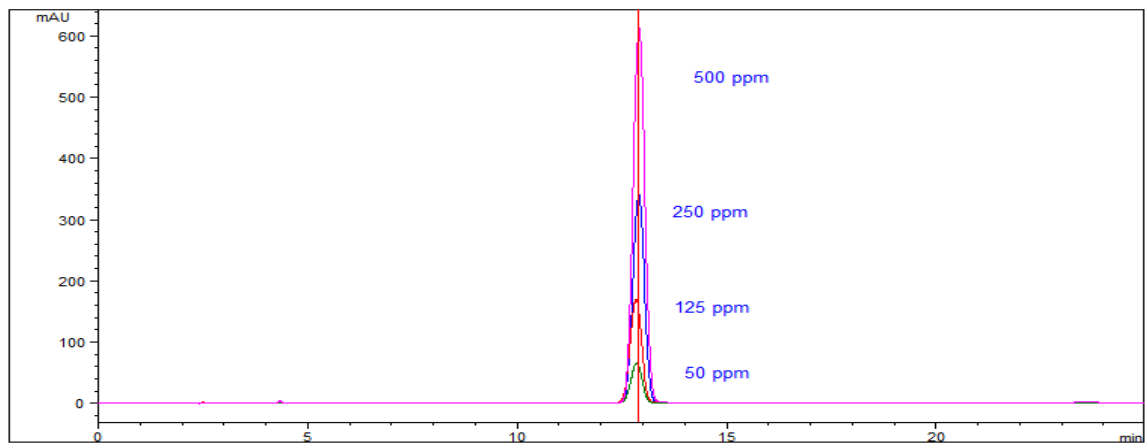


Şekil 3.6.3.3. Rozmarinik asit standart kromatogramı

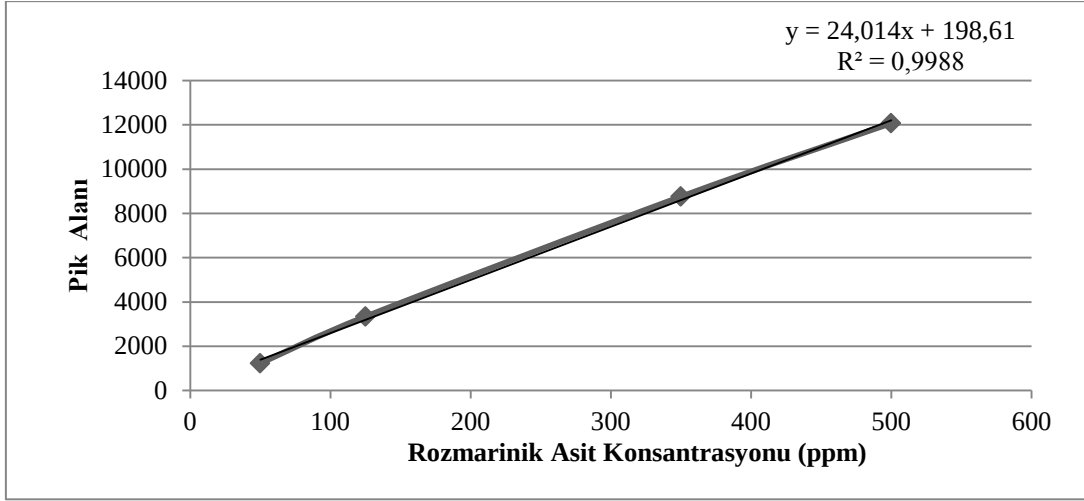
RA standardı 13. dk'da çıkmış (Şekil 3.6.3.3) ve pikin başlangıç ve bitiş süresi toplam 1 dk olmuştur.

3.6.4. Rozmarinik asit standart eğrisinin oluşturulması

RA stok çözeltisinden hazırlanan 50-500 ppm aralığındaki çözeltiler, belirlenen yöntemle HPLC cihazına enjekte edilmiştir (Şekil 3.6.4.1). Elde edilen kromatogramlardaki pik alanları ve konsantrasyon miktarıyla oluşturulan grafikten elde edilen regresyon eğrisi Şekil 3.6.4.2'de görülmektedir.



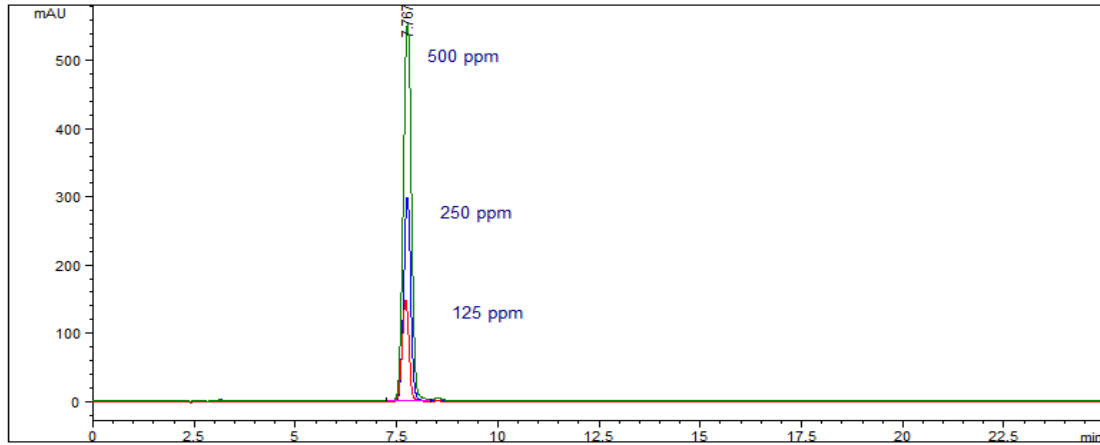
Şekil 3.6.4.1. Rozmarinik asit standardının değişik konsantrasyonlardaki kromatogramları



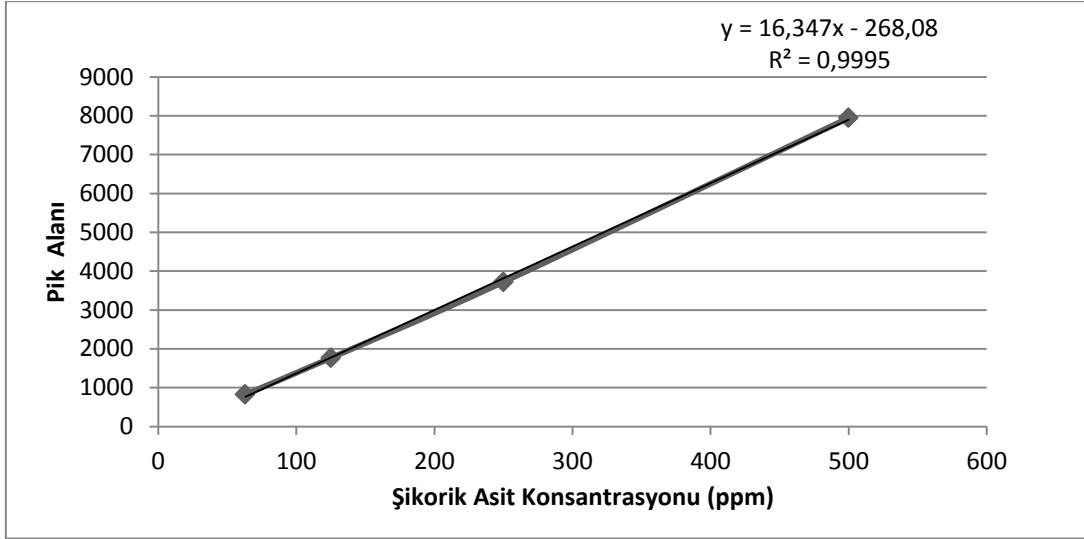
Şekil 3.6.4.2. Rozmarinik asit standart eğrisi

3.6.5. Şikorik asit standart eğrisinin oluşturulması

Şikorik asit standardı ile hazırlanan stok çözeltiden 75-500 ppm aralığında çözeltiler RA ile aynı şartlarda HPLC'ye enjekte edilmiştir (Şekil 3.6.5.1). Elde edilen kromatogramlardaki pik alanları ve konsantrasyon miktarıyla oluşturulan grafikten elde edilen regresyon eğrisi Şekil 3.6.5.2'de görülmektedir.



Şekil 3.6.5.1. Şikorik asit standardının değişik konsantrasyonlardaki HPLC kromatogramı



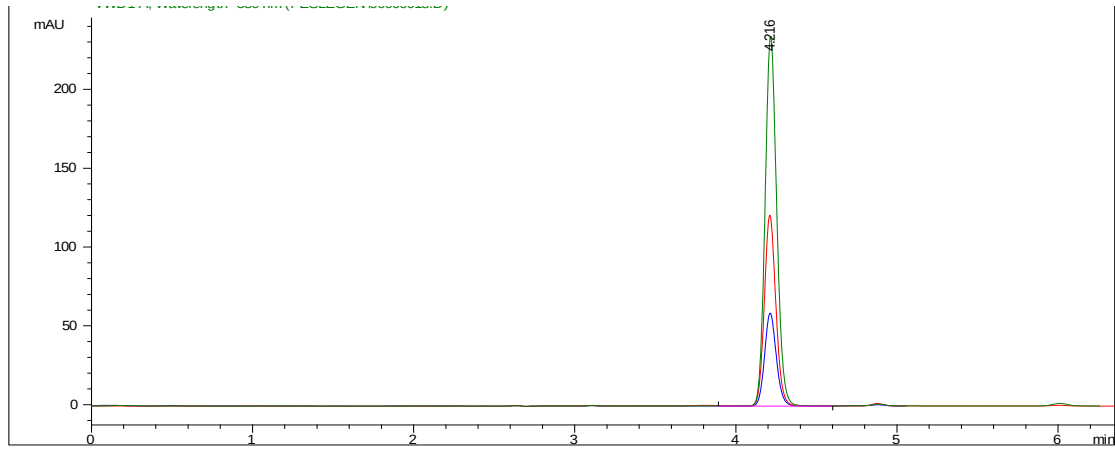
Şekil 3.6.5.2. Şikorik asit standart eğrisi

3.6.6. Kafeik asit standart eğrisinin oluşturulması

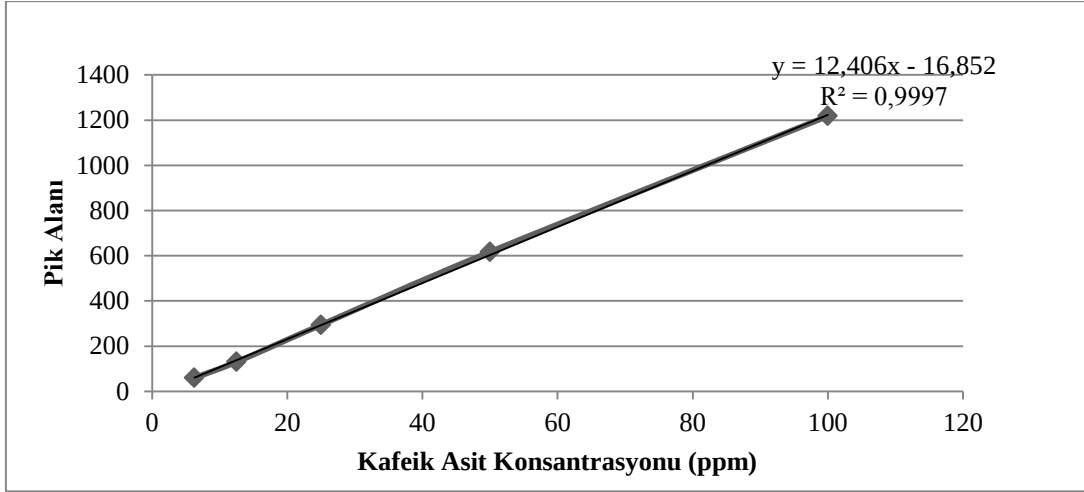
Kafeik asit standardı ile hazırlanan stok çözeltiden 5-100 ppm aralığında çözeltiler daha önceden belirlenen şartlarda HPLC'ye enjekte edilmiştir (Şekil 3.6.6.1).

A Fazı : % 0,05 TFA içeren ultra saf su, B Fazı: Acetonitril, A/B Oranı: 80:20,

Akış hızı: 1,2 ml/min.



Şekil 3.6.6.1. Kafeik asit standartının değişik konsantrasyonlardaki HPLC kromatogramı

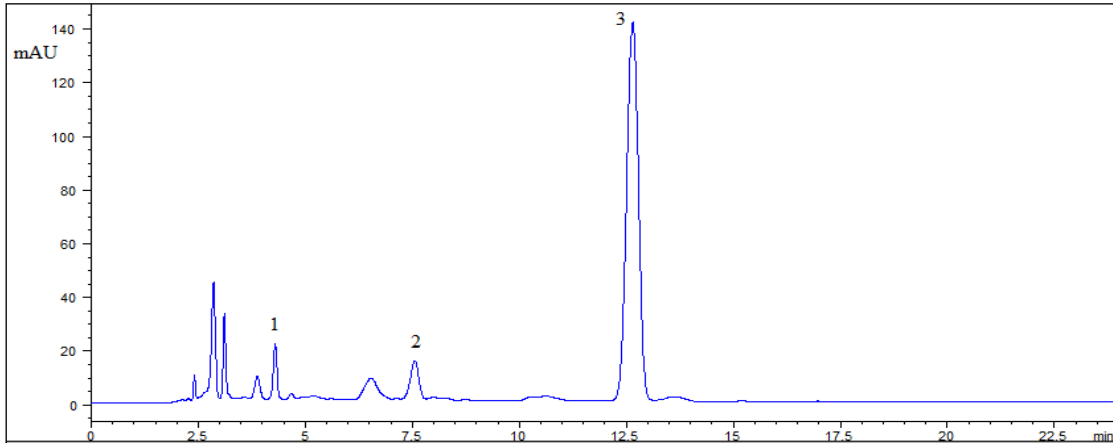


Şekil 3.6.6.2. Kafeik asit standart eğrisi

3.6.7. Fesleğen ekstraktına ait kromatogram

Kontrol grubuna ait bir bitkiden alınan yaprak örneğinin ekstraksiyonu yapıldıktan sonra daha önceden belirlenen şartlarda HPLC cihazına verilmiştir.

Fesleğenin kontrol grubuna ait kromatogram (Şekil 3.6.7.1), standartların kromatogramı ile örtüşmektedir. Böylelikle HPLC yöntemi olarak belirlenen şartların, araştırmamıza konu olan fenolik asitlerin tespiti için uygun bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

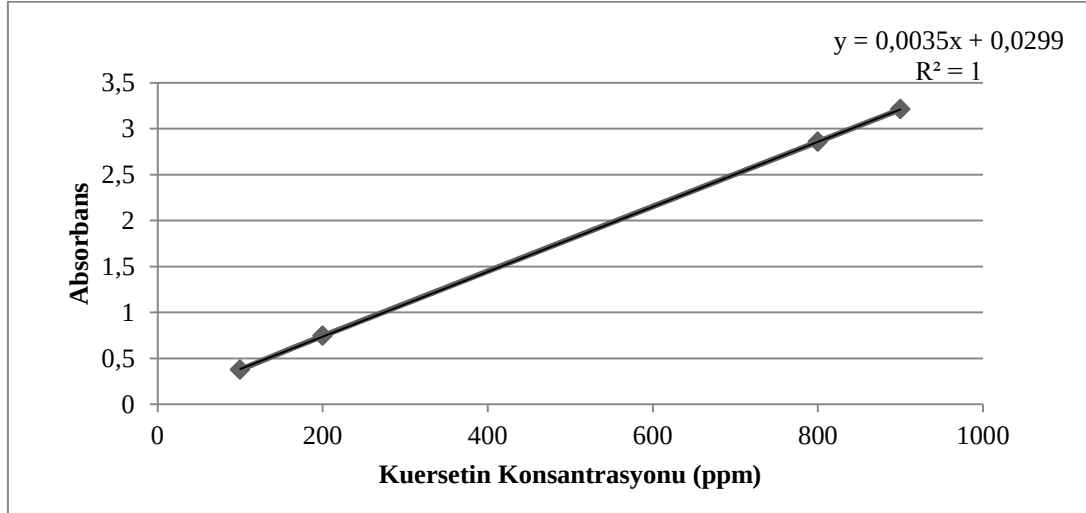


Şekil 3.6.7.1. Fesleğen ekstraktına ait kromatogram. 1. Kafeik asit, 2. Şikorik asit, 3. Rozmarinik asit

3.7. Toplam Flavonoid Miktarı

Bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarının fesleğen bitkisinin toplam flavonoid miktarına etkisi alüminyum klorür kolorimetrik metoduna göre belirlenmiştir.

Bunun için 2 g bitki materyali, fenolik bileşiklerin ekstraksiyonu yönteminde anlatıldığı şekilde ekstrakte edilmiştir. Metanolik ekstrakt (0,5 ml), 10 ml'lik test tübüne alınıp üzerine 2 ml distile edilmiş su ve 0,3 ml % 5'lik NaNO₂ ilave edilmiştir. Karışımın iyice karışması sağlandıktan sonra oda sıcaklığında 6 dk inkübasyona bırakılır, 0,3 ml % 10'luk AlCl₃ eklenip tekrar 6 dk inkübasyona bırakılmıştır. Karışıma 4 ml % 4'lük NaOH eklenip iyice karışması sağlandıktan sonra distile edilmiş suyla hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Örnekler oda sıcaklığında 10 dk bekletildikten sonra spektrofotometrede 510 nm'de okunmuştur. Toplam flavonoid miktarını hesaplamak için standart olarak kuersetin kullanılmıştır (Tolonen ve Uusitalo, 2004). Kuersetin % 100'lük metanolde, konsantrasyonları 0,4-2,0 ppm arasında olacak şekilde çözeltiler hazırlanmış ve 510 nm'de değerleri okunup, standart eğri hazırlanmıştır (Şekil 3.7.1). Regresyon denklemiyle bitki örneklerimizdeki toplam flavonoid miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.7.1. Kuersetin standart eğri

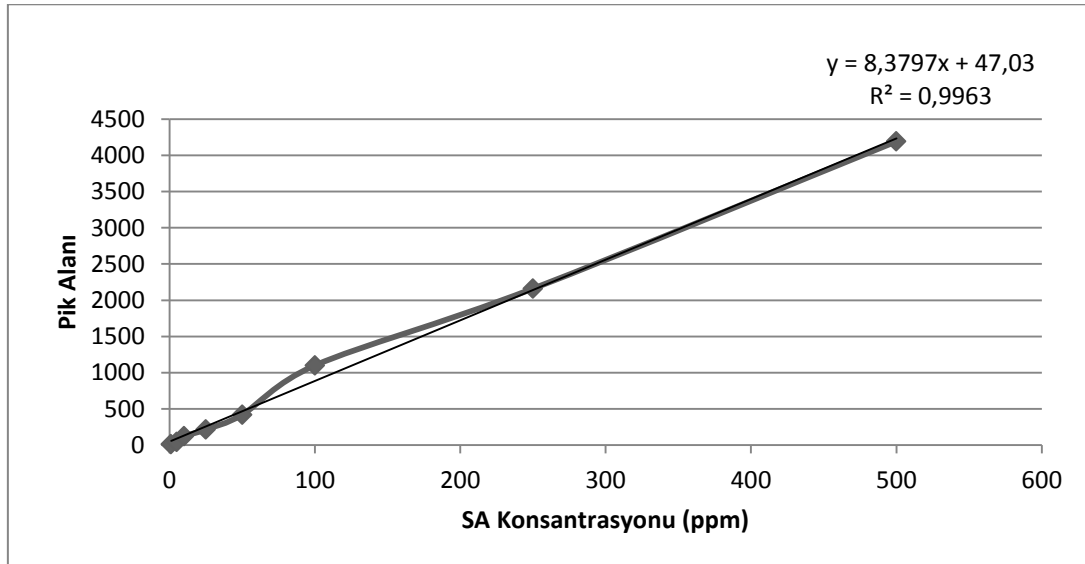
3.8. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki Tayini

Ekstrelerin 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) üzerindeki serbest radikal süpürücü etkileri Sanchez-Moreno ve ark. (1998) metodu değiştirilerek her uygulama için 3 tekerrürlü olacak şekilde çalışılmıştır. Bitki örneği (2 g) % 80'lik metanolle ekstrakte edildikten sonra 50 µl'si üzerine 0,1 mM DPPH çözeltisinden 1 ml ekleyip oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda UV spektrofotometresi'nde 517 nm'de absorbansı okunmuştur ve reaksiyon ortamında kalan DPPH miktarı ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ DPPH kalan} = (\text{DPPH})_{t=30} / (\text{DPPH})_{t=0} \times 100$$

3.9. Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Enzim Aktivitesi Ölçümü

PAL aktivitesi, hazırlanan reaksiyon karışımında, fenilalanin amonyum liyaz aktivitesi sonucu ortaya çıkan trans sinnamik asidin (t-SA), HPLC yöntemi ile ölçülmesi sonucu belirlenmiştir (Dos Santos ve ark., 2004; Kovacık ve ark., 2007). Her uygulama için 3 tekerrür olmak üzere sıvı azot içerisinde dondurulan 2 g bitki yaprağı, 4 °C 'de 5 ml 0,1 M sodyum borat tamponu (pH 8,8) içinde öğütüldükten sonra 4 °C'de 12000×g ile 15 dk santrifüj edilmiştir. Oluşan üst faz, enzim ekstraktı olarak kullanılmıştır. Enzim ekstraktı (250 µL) ve 500 µL sodyum borat tamponu (pH 8,7) içeren reaksiyon karışımı, 40 °C'de 5 dk inkübasyona bırakıldıktan sonra 300 µL 50 mM L-fenilalanin (Sigma-Aldrich) eklenip, 1 saat 40 °C'de tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre sonunda karışıma 50 µL 5 N HCL eklenerek reaksiyon durdurulmuştur. Reaksiyon karışımı, HPLC cihazına enjekte edilmeden önce oda sıcaklığında 12000×g'de 15 dk tekrar santrifüj edilip üst fazın 10 µL'si HPLC cihazına enjekte edilmiştir. Mobil faz olarak akış hızı dakikada 0,5 ml olan, % 57'lik asetonitril kullanılmıştır. PAL aktivitesi, standart olarak kullanılacak SA (t-SA Sigma-Aldrich, Germany) solüsyonunun (1 mg 100 ml⁻¹ sodyum borat tamponu pH 8,7), 275 nm'de ve tutulma zamanına göre tespit edilen pik alanından, µmol t-sinamat sa⁻¹ mg protein⁻¹ taze ağırlık olarak ifade edilmiştir. SA'ın pik alanlarından elde edilen standart eğri Şekil 3.9.1.'de görülmektedir.



Şekil 3.9.1. Sinnamik asit standart eğrisi

3.10. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma 2011-2012 yıllarında KSÜ Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi Laboratuvarı ve KSÜ ÜSKİM Araştırma Merkezi'ndeki iklimlendirme odasında ve laboratuvarlarında yürütülmüştür. Çalışma, tesadüf blokları deneme düzenine göre planlanmış olup, tüm uygulamalar üç tekerrür olarak ve her tekerrürde 10 bitki olacak şekilde yürütülmüştür (Efe ve ark., 2000). Araştırma sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 20.1 Paket Programı kullanılarak Duncan'ın Çoklu Karşılaştırma Testi'ne göre yapılmıştır.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Ön Çalışmaya Ait Örneklerin Fenolik İçerikleri ve En Uygun MeJA Miktarının Tespiti

Fesleğen tohumlarına uygulanan farklı MeJA konsantrasyonlarının fesleğenin toplam fenolik miktarına etkisi Çizelge 4.1.1’de verilmiştir. Farklı konsantrasyondaki MeJA uygulamalarının fesleğenin toplam fenolik miktarı üzerine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0,001$). Çizelge 4.1.1’de görüldüğü gibi en yüksek toplam fenolik miktarı 0,5 mM MeJA (8,35 mg GAE/g) uygulamasından elde edilmiştir. En düşük toplam fenolik miktarı ise, tohumların bir gece saf suda bekletilip ekildiği Kontrol A grubuna ait (4,74 mg GAE/g) fesleğenlerden elde edilmiştir.

Farklı dozlarda uygulanan MeJA konsantrasyonlarının tamamı bitkinin toplam fenolik miktarına etkisi bakımından olumlu sonuçlar vermiştir. Sonuçlarımız Kim ve ark. (2006)’nın *Ocimum basilicum* L. fidelerine ekzojen olarak uyguladığı 0,5 mM MeJA’nın toplam fenolik miktarının kontrol grubuna göre % 57 arttığını tespit ettiği çalışmayla ve *Lactuca sativa* L. bitkisine 0,5 mM MeJA uygulaması sonucu toplam fenolik içeriğin % 35 arttığını bildirdikleri çalışmalarla uyushmaktadır (Kim ve ark., 2007). Literatür bilgileri ile de örtüşen 0,5 mM konsantrasyondaki MeJA dozunun diğer bitki büyüme düzenleyiciler ve FA öncülü ile birlikte uygulanmasına karar verilmiştir.

Çizelge 4.1.1. Fesleğen bitkilerinde farklı MeJA uygulamalarından elde edilen toplam fenolik miktarları (ortalama $\pm$ standart hata)

Uygulamalar	Toplam Fenolik içerik (mg GAE/g yaş yaprak)
0,05 mM MeJA	6,77 $\pm$ 0,92 ^{bc}
0,1 mM MeJA	6,04 $\pm$ 0,79 ^{cd}
0,5 mM MeJA	8,35 $\pm$ 0,70 ^a
1,0 mM MeJA	7,73 $\pm$ 0,49 ^{ab}
5,0 mM MeJA	7,14 $\pm$ 0,62 ^b
Kontrol A*	4,74 $\pm$ 0,19 ^e
Kontrol B**	5,37 $\pm$ 0,49 ^{de}
P=0,0001	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolde bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

a, b, c, d, e Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak önemlidir

4.2. Fesleğen Bitkilerine Ait Morfolojik Bulgular

4.2.1. Bitki boyu (cm)

Farklı uygulamaların fesleğen bitkilerinde bitki boyu üzerine göstermiş oldukları etki Çizelge 4.2.1.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğende bitki boyu üzerine etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmakla ($P>0,05$) birlikte en yüksek bitki boyu değeri 0,5 μ M EBL+MeJA (88,0 cm) uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulamayı 1,0 mM Spm+MeJA (87,3 cm) uygulaması takip etmiştir. En düşük bitki boyu ortalama değeri ise 0,5 mM MeJA (77,7 cm) uygulamasından elde edilmiştir. Kontrol A (tohumlara ekim öncesi 24 saat %1’lik etanollü suda bekletilen) grubuna ait bitkilerden elde edilen bitki boyu değerleri (84,3 cm) ile Kontrol B (tohumlara herhangi bir işlem yapılmadan ekilen) grubuna ait bitkilerin bitki boyu değerleri (82,3 cm) arasında önemli bir fark olmamakla birlikte, Kontrol A grubuna ait bitkilerden daha yüksek bitki boyu değerleri elde edilmiştir.

Yapılan çeşitli çalışmalarda, ekzojen olarak uygulanan poliaminler, buğday, *Philadelphus*×*hybrid* ve fesleğende bitki boyunu artırmıştır (Iqbal ve Ashraf, 2006; Kireççi, 2006; Jonas ve ark., 2012). Tuzluluk, kuraklık vb. çeşitli abiyotik strese maruz bırakılan bitkilerde oluşan bitki boyundaki ve gelişimindeki azalma gibi stres etkileri, poliamin uygulamasıyla giderilmiştir. Bunun yanında fasulyede, buğdayda, kabakta, ayçiçeğinde ve çam fidelerinde, Spm stres etkilerini engellemede en etkili poliamin olarak tespit edilmiştir (Mutlu ve Bozcuk, 1998; Rajasekaran ve Blake, 1999; Velikova ve ark., 2000; Wang ve ark., 2005; Iqbal ve Ashraf, 2006). Yaptığımız uygulamalardan 1,0 mM Spm+MeJA uygulamasından en yüksek bitki boyu değeri elde edilmesi bu literatürlerle kısmen uyumaktadır.

Çalışmamızda tek başına EBL uygulanmış bitkilerde bitki boyunda önemli bir artış gerçekleşmemiştir. Bu durumun oluşmasına EBL’in tohumdan uygulanması ve konsantrasyonlarının düşük düzeyde kalmış olması sebep olmuş olabilir. Nitekim literatürlerde genel olarak Br ve analogları yapraktan uygulama ile bitkilere uygulanmıştır. Bununla birlikte Br ve analogları stres altındaki bitkilerde de, bitkilerdeki fizyolojik süreçleri etkileyerek bitkinin büyümesini, verimini ve kalitesini arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2008; Fariduddin ve ark., 2009; Hayat ve ark., 2010; Arora ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2011; Naeem ve ark., 2012). Çalışmamızda en yüksek bitki boyu ortalama değerlerini elde ettiğimiz 0,5 μ M EBL+MeJA uygulaması önceki çalışmalarla kısmen uyum içerisindedir.

FA bitkilerde birçok fenoliğin oluşumunda öncül bir aminoasittir. Tek başına 0,05 mM FA uygulanan bitkilerin bitki boyu ortalama değerleri (84,3 cm) kontrol grubu değerleri ile yakın sonuçlar vermiştir. Bu bulgular *Larrea divaricata* Cav. hücre kültüründe, kültür ortamına katılan L-FA'nın hücrelerin kütlesinde önemli bir artışa sebep olmadığını bildiren çalışma ile örtüşmektedir (Palacio ve ark., 2011). Ancak 0,5 mM FA uygulanan bitkilerin bitki boyu ortalama değerleri kontrol grubu değerlerinden düşük kalmıştır. Bu durum Edhahiro ve ark. (2005)'nın çilek hücre kültüründe 5,0 mM FA uygulamasının, yine Palacio ve ark. (2011)'nin *Larrea divaricata* Cav. hücre kültüründe 3,0 mM FA'nın hücrelerin kütlesini yarı yarıya düşürdüğünü belirten çalışmalarla kısmen uyushmaktadır. FA öncülü ve MeJA'nın birlikte uygulandığı uygulamalara ait bitkilerin bitki boyu ortalamaları kontrol grubu ortalamalarından düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Bu durum *Vitis vinifera* hücre kültüründe, hücrelerin büyüme parametrelerini en iyi artıran FA+MeJA kombinasyonu olduğunu bildiren çalışma ile uyushmamaktadır (Qu ve ark., 2006).

Çalışmamızda elde ettiğimiz en düşük bitki boyu ortalama değeri, tek başına 0,5 mM MeJA uygulanan bitkilerden elde edilmiştir. Bu durum ekzojen olarak MeJA uygulanan *Pinus pinaster*, *Pharbitis nil*, domates, tütün ve bazı konifer fidelerinde bitkinin gövde boyunun gelişimini olumsuz etkilediği tespit edilen çalışmalarla uyumludur (Barendse ve ark., 1985; Thaler, 1999; Redman ve ark., 2001; Maciejewska ve Kopcewicz, 2002; Heijari ve ark., 2005; Gould ve ark., 2009; Sampedro ve ark., 2011).

Sonuç olarak Spm+MeJA ve EBL+MeJA uygulamaları ile daha yüksek bitki boyu değerleri elde edilmiştir. Bitki tohumlarına MeJA ile birlikte uygulanan Spm ve EBL, MeJA'nın yukarıda bahsi geçen olumsuz etkisini bir miktar tolere ettiği düşünülmektedir. Denememizde bitki boyu ortalamaları tüm uygulamalarda 77-88 cm arasında değişmiş olup elde edilen bulgular fesleğen için belirtilen literatür bilgileri ile uyumlu veya üst seviyelerindedir (Javanmardi ve ark., 2002; Kireççi, 2006).

Çizelge 4.2.1.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen bitki boyu değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Bitki boyu (cm)
Spm (0,1 mM)	80,7±0,33
Spm (1,0 mM)	82,7±2,33
FA (0,05 mM)	84,3±3,93
FA (0,5 mM)	80,0±2,89
EBL (0,5 µM)	82,7±5,55
EBL (2,0 µM)	79,0±5,13
Spm (0,1 mM)+MeJA	82,0±6,11
Spm (1,0 mM)+MeJA	87,3±4,33
FA (0,05 mM)+MeJA	80,7±5,24
FA (0,5 mM)+MeJA	81,3±4,37
EBL (0,5 µM)+MeJA	88,0±6,53
EBL (2,0 µM)+MeJA	82,5±4,49
MeJA	77,7±5,21
Kontrol A*	84,3±2,96
Kontrol B**	82,3±4,48
P=0,912	

*Ekim öncesi 24 saat % 1 etanolde bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.2.2. Dal sayısı

Uygulamalara ait bütün bitkiler incelendiğinde ilk biçimlerde dallanma olmadığı tespit edilmiştir. Fesleğen bitkilerinin saksıda sınırlı alanda yetişmesinin bu duruma sebep olduğu düşünülebilir. Bitkiler boyca uzarken dallanma yönünden istenen seviyeye ulaşamamıştır.

4.2.3. Boğum arası uzunluğu (cm)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen boğum arası uzunluğu değerleri Çizelge 4.2.3.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde boğum arası uzunluğu üzerine etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur ($P>0,05$). Ancak yapılan farklı uygulamalardan en iyi sonucu 1,0 mM Spm (9,07 cm) uygulamasının verdiği, bunu 0,5 µM EBL (9,01 cm) ve 1,0 mM Spm+MeJA (9,0 cm) uygulamalarının takip ettiği görülmektedir. Kontrol gruplarının boğum arası uzunluklarının, bu uygulamalara göre daha düşük düzeyde kaldığı ve Kontrol A ve Kontrol B gruplarından sırasıyla 8,95 cm ve 8,76 cm boğum arası uzunlukları elde edildiği görülmektedir (Çizelge 4.2.3.1).

Çalışmamızda en düşük boğum arası uzunlukları 0,05 mM FA +MeJA (7,98 cm) uygulamasından ve tek başına uygulanan 0,5 mM FA (8,11 cm) uygulamalarından elde edilmiştir. Çalışmada elde edilen bu veriler, Abd El-Samad ve ark. (2010)'nın mısır ve bakla bitkisinde tuz stresi uygulanan ve uygulanmayan gruplarda FA uygulamasının bitkinin büyüme parametrelerini artırdığı çalışma ile uyuşmamaktadır. Yine elde ettiğimiz boğum arası uzunlukları Palacio ve ark. (2011)'nın *Larrea divaricata* Cav. hücre kültüründe, kültür ortamına katılan L-FA'in hücrelerin kütlesinde önemli bir artışa sebep olmadığını bildiren çalışma ile kısmen örtüşmektedir. Aynı zamanda çilek hücre kültüründe 5,0 mM FA uygulamasının, *Larrea divaricata* Cav. hücre kültüründe 3,0 mM FA'in hücrelerin kütlesini yarı yarıya düşürdüğünü belirten çalışmalarla kısmen uyuşmaktadır (Edhahiro ve ark., 2005; Palacio ve ark., 2011).

EBL uygulamalarına ait boğum arası uzunlukları, 0,5 µM EBL uygulaması hariç, kontrol grupları ile aynı düzeyde ya da daha düşük düzeylerde gerçekleşmiştir. Bu durum, bitkilerde hücre bölünmesi ve uzamasında etkili olan BRs'in, bitkinin gövde uzamasında etkili olduğu belirtilen çalışma ile ve Br üretemeyen mutant bezelyelerin ekzojen Br uygulanması sonucu normal boğum arası uzunluğa eriştiği bildirilen çalışma ile uyuşmamaktadır (Nomura ve ark.,1997; Clouse ve Sasse, 1998).

Tek başına 0,5 mM MeJA uygulanmış bitkilere ait boğum arası uzunluğu değeri (8,27 cm) her iki kontrol grubuna ait boğum arası uzunluklarından düşük düzeyde gerçekleşmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuç 0,5 µM JA uygulanmış *Vitis vinifera* hücre kültüründe kontrol grubuna göre daha çok boğum sayısı ve boğum arası uzunluğu elde edildiği bildirilen çalışma ile uyuşmamaktadır (Ravnikar ve ark., 1990). Ancak bitkilerde boğum arası uzunluğunun bitki boyunu etkilediği göz önüne alındığında, çalışmamızda elde edilen daha kısa boğum arası uzunluğu MeJA'nın bitki boyu üzerine olumsuz etki ettiğini bildiren çalışmalarla kısmen uyumludur (Barendse ve ark., 1985; Thaler, 1999; Redman ve ark., 2001; Maciejewska ve Kopcewicz, 2002; Heijari ve ark., 2005; Gould ve ark., 2009; Sampedro ve ark., 2011).

Boğum arası uzunluğu yönünden uygulamaların fesleğen bitkisine etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmakla birlikte, en uzun boğum arası uzunluğunu 1,0 mM Spm uygulamasından elde ettiğimiz çalışmamız, Hanzawa ve ark. (2000)'nın PA'lerin *Arabidopsis*'te boğum arası uzunluğunu hücrelerin uzamasını sağlayarak boğum arası uzunluğuna etki ettiğini bildirdikleri çalışmalarıyla kısmen desteklenmektedir. Ayrıca çalışmamızda elde ettiğimiz boğum arası uzunlukları, bitkinin boylanmasını sağladığı için bitkinin bitki boyu verileriyle paralellik göstermiştir.

Boğum arası uzunluğu yönünden elde ettiğimiz değerler (7,98- 9,07 cm) Kireççi (2006)'nın poliaminler ve GA₃ uygulamış olduğu fesleğenlerden elde ettiği boğum arası değerlerinden (2,74- 4,94 cm) daha yüksek bulunmuştur. Bu durum denemelerde farklı fesleğen tiplerinin kullanılmasından ve denemenin tarla şartları gibi farklı bir ortamlarda yürütülmesi sonucu morfolojik farklılıkların oluşmasından kaynaklanmış olabilir.

Çizelge 4.2.3.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen boğum arası uzunluğu değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Boğum arası uzunluğu (cm)
Spm (0,1 mM)	8,32±0,33
Spm (1,0 mM)	9,07±0,37
FA (0,05 mM)	8,90±0,73
FA (0,5 mM)	8,11±0,84
EBL (0,5 µM)	9,01±0,77
EBL (2,0 µM)	8,65±0,52
Spm (0,1 mM)+MeJA	8,47±0,40
Spm (1,0 mM)+MeJA	9,00±1,02
FA (0,05 mM)+MeJA	7,98±0,44
FA (0,5 mM)+MeJA	8,13±0,50
EBL (0,5 µM)+MeJA	8,76±0,12
EBL (2,0 µM)+MeJA	8,13±0,05
MeJA	8,27±0,39
Kontrol A*	8,95±0,53
Kontrol B**	8,76±0,32
P=0,800	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.2.4. Yaş ağırlık (g)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen yaş ağırlık değerleri Çizelge 4.2.4.1'de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde bitki yaş ağırlığına etkisi istatistiki olarak önemli ($P<0,05$) bulunmuştur. En yüksek bitki ağırlık değeri, hiçbir işlem yapılmadan ekilen Kontrol B (77,4 g) uygulamasındaki fesleğenlerden elde edilmiştir. Bu uygulamayı 0,1 mM Spm+MeJA (74,9 g) ve 0,05 mM FA+MeJA (74,0 g) uygulaması takip etmiştir. Kontrol A grubuna ait bitkilerin yaş ağırlık değeri (70,0 g) ile tohumlara herhangi bir işlem yapılmadan ekilen Kontrol B grubuna ait yaş ağırlık değeri (77,4 g) arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır (Çizelge 4.2.4.1).

Çizelge 4.2.4.1’de görüldüğü gibi en düşük yaş ağırlık miktarı 0,5 mM MeJA (51,3 g) uygulamasından elde edilmekle birlikte, bu değer kontrol grubuna ait bitkilerden elde edilen yaş bitki ağırlıklarına göre % 34 daha az olarak gerçekleşmiştir. Ekzojen olarak MeJA uygulanan fesleğenlerden elde ettiğimiz düşük bitki ağırlık değerleri, havuç kültürlerinde, domates, tütün ve şeftali bitkileri ve bazı konifer fidelerinde MeJA’nın bitkinin yaş ağırlığını olumsuz etkilendiğini bildiren çalışmalar ile desteklenmektedir (Barendse ve ark., 1985; Thaler, 1999; Redman ve ark., 2001; Janoudi ve Flore; 2003; Sudha ve Ravishankar, 2003; Heijari ve ark., 2004; Gould ve ark., 2009).

Çalışmamızda tek başına uygulanan Spm konsantrasyonlarının bitkilerin yaş ağırlığına etkisi olumsuz olmuştur. Bulgularımızın tersine, poliaminlerle yapılan bazı çalışmalarda Spm’in bitki ağırlığı üzerine arttırıcı etki gösterdiği bulunmuştur (Kireççi, 2006; Hao ve ark., 2012; Jonas ve ark., 2012). Hao ve ark. (2012) *Salvia miltiorriza* kök kültürlerinde Spm’in sekonder metabolitlerle birlikte bitkinin kütle artışını da sağladığını ancak Spm’in yüksek miktarlarda kullanıldığında kütle miktarında azalmaya sebep olduğunu tespit etmişlerdir. Bunun yanında, *Sorghum* sp. fidelerinde, ayçiçeğinde, Spm hormonu üretemeyen *Arabidopsis* sp. mutantları gibi farklı bitkilerde diğer poliaminlerden farklı olarak Spm’in normal büyüme için gerekli olmadığı bildirilen çalışmalar, elde ettiğimiz sonuçları destekler mahiyettedir (Mutlu ve Bozcuk, 1998; Imai ve ark., 2004; Chai ve ark., 2010). Çalışmamızda Spm ile MeJA’nın birlikte uygulandığı her iki konsantrasyonun bitki yaş ağırlığına etkisi olumsuz olmamış, bitkilere ait yaş ağırlık değerleri Kontrol B grubu değerleriyle aynı grupta yer almıştır. Elde ettiğimiz bu durum, poliamin uygulamasıyla tuzluluk, kuraklık vb. çeşitli abiyotik strese maruz bırakılan bitkilerde oluşan bitki gelişimindeki azalma gibi stres etkilerinin giderildiğini belirten çalışmalarla birlikte, fasulyede, buğdayda, kabakta, ayçiçeğinde ve çam fidelerinde, Spm’in stres etkilerini engellemede en etkili poliamin olarak tespit edildiği çalışmalarla uyusmaktadır (Mutlu ve Bozcuk, 1998; Rajasekaran ve Blake, 1998; Velikova ve ark., 2000; Wang ve ark., 2005; Iqbal ve Ashraf, 2006).

Çalışmamızda tek başına EBL uygulanan her iki konsantrasyona ait bitkilerin yaş ağırlık değerleri de düşük düzeylerde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2.4.1). Elde ettiğimiz bulguların tersine, bazı araştırmacılar domates, *Triticum aestivum* ve çam fidelerinde, nane, bakla, *Philadelphus* sp., *Satureja khuzestanica*, *Geranium* sp. bitkisinde ve in vitro *Arachis hypogaea* L. ve *Coleus forskohlii* genotiplerinde bu bitkilerin yaş ağırlık değerlerine ve bazı gelişim parametrelerine BRs’in olumlu etkisinin çok yüksek olduğunu bildirmişlerdir

(Rajasekaran ve Blake, 1998; Shahbaz ve Ashraf, 2007; Behnamnia ve ark., 2009; Swamy ve Rao, 2009; Jonas ve ark., 2012; Naeem ve ark., 2012; Verma ve ark., 2012, Eskandari ve Eskandari, 2013). Ancak literatürlerde bitkilerin yaş ağırlık değerlerinin artmasının BRs konsantrasyonuna bağlı olduğu, çok düşük ya da çok yüksek dozlarda bitkilerin ağırlığını artırmada etkileri olmadığı bildirilmiştir (Swamy ve Rao, 2009; Naeem ve ark., 2012). Çalışmamızda tek başına yapılan EBL uygulamalarında düşük ağırlıklı bitkiler elde edilmesine, bitki büyüme düzenleyicilerin tohumdan uygulanması ve EBL konsantrasyonlarının düşük düzeyde kalmış olması sebep olmuş olabilir. Nitekim literatürlerde genel olarak BRs yaprakdan uygulama ile bitkilere uygulanmıştır. Bununla birlikte BRs stres altındaki bitkilerde de, bitkilerdeki fizyolojik süreçleri etkileyerek bitkinin büyümesini, verimini ve kalitesini arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2008; Fariduddin ve ark., 2009; Hayat ve ark., 2010; Arora ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2011; Naeem ve ark., 2012).

Çalışmamızda tek başına FA uygulanan bitkilere ait yaş ağırlık değerleri Çizelge 4.2.4.1’de görüldüğü gibi düşük düzeylerde gerçekleşmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, FA öncülü ile muamele edilen *Vitis vinifera*’nın hücre kültürlerinin kütlelerinde kontrol grubuna göre herhangi bir artış gözlemedikleri çalışma ile ve Palacio ve ark. (2011) *Larrea divaricata* Cav. hücre kültürlerinde 0,5 ve 1,0 mM FA öncülü uygulamasında kontrol grubuna göre kuru ağırlıkta kütle artışı olmadığı ancak 3,0 mM FA öncülü uygulandığında bitkinin kuru ağırlığında önemli bir düşüş olduğunu bildirdikleri çalışmalarla desteklenmektedir (Qu ve ark., 2011; Riedel ve ark., 2012).

Farklı uygulamaların bitki yaş ağırlığına etkisi incelendiğinde, MeJA da dahil tek başına uygulanan Spm, FA ve EBL’in her iki konsantrasyonlarında da düşük yaş ağırlığa sahip bitkiler elde edilmiştir (Çizelge 4.2.4.1). Ancak bitki büyüme düzenleyiciler ve FA öncülü 0,5 mM MeJA ile kombine edildiğinde bitkinin yaş ağırlığı kontrol grubu bitkilerinin yaş ağırlığı değerlerine yakın bir gelişim göstermiştir.

Çizelge 4.2.4.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen yaş ağırlık değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Bitki yaş ağırlığı (g)
Spm (0,1 mM)	53,1±11,24 ^d
Spm (1,0 mM)	59,1±6,44 ^{cd}
FA (0,05 mM)	52,2±7,48 ^d
FA (0,5 mM)	52,7±5,00 ^d
EBL (0,5 µM)	54,0±6,41 ^{cd}
EBL (2,0 µM)	54,5±4,12 ^{bcd}
Spm (0,1 mM)+MeJA	74,9±4,87 ^{ab}
Spm (1,0 mM)+MeJA	69,3±12,12 ^{ad}
FA (0,05 mM)+MeJA	74,0±3,08 ^{abc}
FA (0,5 mM)+MeJA	70,4±2,78 ^{ad}
EBL (0,5 µM)+MeJA	68,0±3,27 ^{ad}
EBL (2,0 µM)+MeJA	70,7±3,81 ^{ad}
MeJA	51,3±2,00 ^d
Kontrol A*	70,0±5,21 ^{ad}
Kontrol B**	77,4±1,33 ^a
P=0,017	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

a, b, c, d Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak önemlidir

4.2.5. Bitki başına taze yaprak verimi (g/bitki)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen taze yaprak verimi değerleri Çizelge 4.2.5.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde taze yaprak verimine etkisi istatistiki olarak önemli ($P<0,01$) bulunmuştur. Çizelge 4.2.5.1’de görüldüğü gibi bitkinin taze yaprak verimi değerleri yaş ağırlık değerlerine benzer olarak Kontrol B (56,03 g/bitki) uygulamasından ve 0,05 mM FA+MeJA (53,57 g/bitki) ve 0,1 mM Spm+MeJA (53,13 g/bitki) uygulamalarından yüksek verimler elde edilmiştir. Kontrol grubuna ait bitkilerin yaprak verimi (50,67 g/bitki), tohumlara herhangi bir işlem yapılmadan ekilen Kontrol B grubuna ait verim değerinden (56,03 g/bitki) daha düşük değerlerde gerçekleşmiştir. Tohumların 24 saat suda bırakılması fesleğenlerin taze yaprak verimini olumsuz etkilemiştir. En düşük taze yaprak ağırlık değerleri 0,05 mM FA (31,10 g/bitki) ve 0,5 mM MeJA (32,90 g/bitki) uygulamalarından elde edilmiş olmakla birlikte, bu değerler kontrol grubu değerlerinden sırasıyla % 44 ve % 41 oranında daha az olarak gerçekleşmiştir (Çizelge 4.2.5.1).

Farklı uygulamaların bitki yaş yaprak ağırlığına etkisi incelendiğinde, tek başına uygulanan Spm, FA ve EBL’in her iki konsantrasyonlarından ve 0,5 mM MeJA

uygulamalarından kontrol grubuna göre düşük verimler elde edilmiştir. Elde ettiğimiz sonuç Janoudi ve Flore (2003)'nin *Malus baccata var. mandshurica* bitkisine MeJA uygulandığında yaş yaprak ağırlığında azalma olduğunu bildirdikleri çalışma ile örtüşmektedir. Qu ve ark. (2011)'nin *Vitis vinifera* hücre kültürlerinde tek başına uyguladıkları MeJA ve FA'in hücre kütlelerinin artışına etkisinin olmadığı belirtilen çalışma da bizim bulgularımızı desteklemektedir. Kireççi (2006)'nin yaptığı çalışmada fesleğen tohumlarına uyguladığı poliaminler ve GA₃ muamelesi sonucu en düşük yaş yaprak veriminin Spm uygulamasından elde edildiğini bildirdiği çalışma da bizim çalışmamızı desteklemektedir. Ancak EBL uygulamalarından elde ettiğimiz yaş yaprak verim değerleri, daha önce birçok bitki ile yapılan BRs uygulamalarının bitkilerin yaş yaprak ağırlık değerlerinde artışa sebep olduğu bildirilen çalışmalarla uyuşmamaktadır (Rajasekaran ve Blake, 1998; Shahbaz ve Ashraf, 2007; Behnamnia ve ark., 2009; Swamy ve Rao, 2009; Jonas ve ark., 2012; Verma ve ark., 2012, Eskandari ve Eskandari, 2013). Bu durumun oluşmasında uygulamaların tohumdan yapılmış olması ve bitkilerin yetiştirme şartları etkili olmuş olabilir.

Çalışmamızda tek başına bitki büyüme düzenleyiciler ve öncülün tohumdan uygulanmasının bitkideki taze yaprak verimi üzerine olumsuz etki oluşturduğu görülürken, bu uygulamaların MeJA ile birlikte bitkiye uygulanması bitkilerden elde edilen yaş yaprak ağırlık değerlerinin artarak kontrol grubunun yaş yaprak ağırlık değerlerine yakın bir düzeye geldiği gözlenmiştir (Çizelge 4.2.4.1). Bu sonuç araştırmacıların daha önce bitki büyüme düzenleyiciler ile yaptıkları çeşitli abiyotik stres uygulamalarında bildirdikleri bitki büyüme düzenleyicilerin bitkilerdeki stres etkilerini azalttıkları yönündeki sonuçlarla uyuşmaktadır. Örneğin BRs stres altındaki çeşitli bitkilerde fizyolojik süreçleri etkileyerek bitkinin büyümesini, verimini ve kalitesini arttırdığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Zhang ve ark., 2008; Fariduddin ve ark., 2009; Hayat ve ark., 2010; Arora ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2011; Naeem ve ark., 2012).

Taze yaprak verimi yönünden tüm uygulamalardan elde ettiğimiz değerler, Kireççi (2006)'nin GA₃ ve farklı poliaminlerle yapmış olduğu tarla çalışmasında çiçeklenme dönemindeki fesleğenler için elde ettiği yaprak verimi (28,9-45,2 g/bitki) değerlerinden ve (Lee ve Scagel, 2009; Scagel ve Lee, 2012)'in farklı fesleğen çeşitlerinde bulmuş oldukları 20-22,9 g/bitki ve 28,3-29,4 g/bitki taze yaprak verimi değerlerinden daha yüksek olarak gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.2.5.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen taze yaprak verimi değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Yaş yaprak ağırlığı (g/bitki)
Spm (0,1 mM)	36,23±9,12 ^{cde}
Spm (1,0 mM)	37,77±4,87 ^{be}
FA (0,05 mM)	31,10±4,66 ^e
FA (0,5 mM)	34,90±3,58 ^d
EBL (0,5 µM)	33,13±4,08 ^e
EBL (2,0 µM)	35,80±3,58 ^d
Spm (0,1 mM)+MeJA	53,13±3,36 ^a
Spm (1,0 mM)+MeJA	48,23±7,64 ^{a-d}
FA (0,05 mM)+MeJA	53,57±1,60 ^a
FA (0,5 mM)+MeJA	51,57±1,60 ^{ab}
EBL (0,5 µM)+MeJA	49,00±1,91 ^{a-d}
EBL (2,0 µM)+MeJA	50,35±1,91 ^{abc}
MeJA	32,90±2,12 ^e
Kontrol A*	50,67±4,44 ^{abc}
Kontrol B**	56,03±1,33 ^a
P=0,001	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

a, b, c, d Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak önemlidir

4.2.6. Bitki başına taze çiçek verimi (g/bitki)

Fesleğen tohumlarına uygulanan farklı bitki büyüme düzenleyiciler ve fenilalanin öncülünün bitki taze çiçek verimine etkisinin incelendiği çalışmamızda bitkilerin çiçeklenme öncesi biçilmesi hedeflenmiş ancak bu dönemde bitkilerin büyük bir kısmında başak oluşmaya başladığı için oluşan başaklar kesilerek başak ağırlıkları, dolayısıyla bitki başına çiçek verimi hesaplanmaya çalışılmıştır.

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen taze çiçek verimi değerleri Çizelge 4.2.6.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde taze çiçek verimi üzerine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmamakla birlikte ($P>0,05$) en yüksek taze çiçek verimi 2,0 µM EBL (2,78 g/bitki) uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulamaları sırasıyla 0,1 mM Spm (2,28 g/bitki) ve 0,05 mM FA (2,26 g/bitki) takip etmiştir. Bununla birlikte en düşük çiçek verimi değerleri MeJA’nın tek başına ve diğer bitki büyüme düzenleyiciler ve öncül ile kombinasyon şeklinde uygulanan bitkilerden elde edilmiştir.

En iyi çiçek veriminin 2,0 µM EBL konsantrasyonundan elde edilmesi, ekzojen olarak uygulanan BRs’in bitkilerdeki fizyolojik süreçleri etkileyerek bitkinin pek çok

verim özelliklerini ve kalitesini artırdığı bildirilen çalışmalarla uyushmaktadır (Zhang ve ark., 2008; Fariduddin ve ark., 2009; Hayat ve ark., 2010; Arora ve ark., 2011; Sharma ve ark., 2011; Naeem ve ark., 2012).

Çalışmamızda 1,0 mM Spm ve 0,5 mM FA uygulamalarından düşük çiçek verimleri elde edilmiştir. Spm ve FA'in yüksek dozlarının çiçek verimi üzerinde olumsuz bir etki oluşturduğu düşünülebilir. Bunun yanında 0,5 mM FA+MeJA uygulamasından neredeyse hiç çiçek elde edilememiştir. Tek başına 0,5 mM MeJA uygulanan bitkilerden de düşük çiçek verimi elde etmekle birlikte, çalışmamız MeJA uygulamalarının bütün bitkisi ile yapılan çalışmalarda ve *Pharbitis nil* bitkisinde çiçek tomurcuk sayısında önemli düşüşlere sebep olduğu bildirilen çalışmalarla ve domateste olgun çiçek sayısını olumsuz etkilediği belirtilen çalışmalar ile kısmen uyumluluk göstermektedir (Barendse ve ark., 1985; Thaler, 1999; Maciejewska ve Kopcewicz, 2002). Çalışmamızda bir stres hormonu olması sebebiyle MeJA'nın büyüme gelişme üzerinde oluşabilecek olumsuz etkisini azaltabilmek amacıyla MeJA ile birlikte uyguladığımız hormon ve öncül çiçek verimi üzerinde olumlu bir etki oluşturamamıştır. Bu durum Maciejewska ve Kopcewicz (2002)'in *Pharbitis nil*'de çiçek tomurcuk sayısında önemli oranda azalmaya sebep olan MeJA'nın GA₃ ile birlikte uygulandığında oluşan bu olumsuz etkinin bir miktar tolere edildiği bildirilen çalışma ile uyumlu değildir.

Taze çiçek verimi yönünden tüm uygulamalardan elde ettiğimiz değerler Kireçci (2006)'nın GA₃ ve farklı poliaminlerle yapmış olduğu tarla çalışmasında fesleğen için elde ettiği yaş çiçek verimi değerlerinden (16,6-25,4 g/bitki) oldukça düşüktür, bunun sebebi bitkilerin çiçeklenme dönemi öncesi biçim yapmak hedeflenmişken bazı saksıların hızla gelişerek generatif evreye geçmesi ve tam çiçeklenmeden biçilmeleri olabilir. Tam çiçeklenme döneminde biçim yapılmış olsa yüksek ihtimalle daha yüksek çiçek verimi alınacakken antioksidan aktivitenin düşebileceği endişesi ile çiçeklenme öncesi biçim tercih edilmiştir. Bu sebeple çiçek verimi açısından elde bulunan bulgular sağlıklı olmayıp ön fikir niteliğindedir. Ayrıca erken çiçek oluşumu gözlenen uygulamalar bu sayede tespit edilmiştir.

Çizelge 4.2.6.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen taze çiçek verimi değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Çiçek ağırlığı (g/bitki)
Spm (0,1 mM)	2,28±1,13
Spm (1,0 mM)	0,95±0,65
FA (0,05 mM)	2,26±0,43
FA (0,5 mM)	1,22±0,81
EBL (0,5 µM)	1,53±0,55
EBL (2,0 µM)	2,78±1,59
Spm (0,1 mM)+MeJA	0,24±0,14
Spm (1,0 mM)+MeJA	0,93±0,56
FA (0,05 mM)+MeJA	1,13±0,37
FA (0,5 mM)+MeJA	0,05±0,05
EBL (0,5 µM)+MeJA	1,00±0,25
EBL (2,0 µM)+MeJA	0,31±0,31
MeJA	0,11±0,04
Kontrol A*	1,66±0,83
Kontrol B**	1,33±0,28
P=0,218	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.2.7. Başak boyu (cm)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen başak boyu değerleri Çizelge 4.2.7.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde başak boyu üzerine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmamakla birlikte ($P>0,05$) en yüksek başak boyu 0,05 mM FA (8,46 cm) ve 0,5 µM EBL (8,35 cm) uygulamalarından elde edilmiş ve bunu 0,5 µM EBL +MeJA (7,59 cm) uygulaması takip etmiştir. En düşük başak boyu değeri 0,5 mM FA+MeJA (1,00 cm) uygulanan fesleğenlerden elde edilmiştir. FA’nin yüksek (0,5 mM) konsantrasyon uygulamasının bitkinin başak boyunda % 33 azalmaya sebep olduğu gözlenmekle birlikte 0,5 mM FA+MeJA’nın birlikte uygulandığı bitkilerde neredeyse hiç başak gelişimi olmamıştır. Bu durumda stres hormonu olan MeJA ile yüksek konsantrasyondaki FA’in bitkinin çiçek gelişimi üzerine toksik etki yaptığı veya gelişimini yavaşlattığı sonucuna ulaşılabilir.

Çalışmamızda Spm ve Spm+MeJA uygulanan bitkilerde başak boyunun kontrol grubu değerlerine kıyasla düşük değerde olduğu gözlemlenmiştir. Literatür çalışmalarında PA uygulamalarının bitki gelişimine tartışmalı etkileri bildirilmekle birlikte, Spm’in bitkinin normal gelişimine olumlu bir yönde etkisi olmadığı bildirilen çalışmalar

bulgularımızı desteklemektedir (Mutlu ve Bozcuk, 1998; Imai ve ark., 2004; Chai ve ark., 2010).

EBL uygulanan bitkilerde genel olarak tek uygulanan her iki konsantrasyonda ve 0,5 mM MeJA ile kombinasyonunda da yüksek başak boyu değerleri elde edilmiştir. Bu sonuç BRs'in gövde ve kök uzaması, çiçeklenme, çiçek ve meyvenin gelişimi gibi çok çeşitli gelişimsel süreçte önemli rol oynadığını belirten çalışmalarla desteklenmektedir (Sasse, 2003; Hayat ve Ahmad, 2003).

Tek başına 0,5 mM MeJA uygulanan fesleğenlerin başak boyu değeri düşük düzeylerde kalmıştır. MeJA'nın bu olumsuz etkisi diğer bitki büyüme düzenleyici ve öncül ile birlikte uygulandığı bitkilerde oluşan başak boyu verilerinde de gözlenmiştir. Bitkilerin başak boyunda oluşan düşük değerler, bitki savunmasında stres etkileri sonucu üretilen kimyasal maddelerin bitkinin gelişimine olumsuz bir şekilde mal olacağını belirten araştırma (Feeny, 1976; Rhoades ve Cates, 1976) ile ve bitkilerin sınırlı kaynakları olduğunu ve bunları ya büyümeye ya da savunmaya harcayacağı şeklinde ortaya atılan görüşler ile desteklenebilir (Coley ve ark., 1985).

Uygulamalardan elde ettiğimiz bitkilerin başak boyu değerleri Kireççi (2006)'nın GA₃ ve farklı poliaminlerle yapmış olduğu tarla çalışmasında fesleğen için elde ettiği başak boyu değerleri (8-14,77 cm) ile kıyaslandığında düşük veya alt sınıra yakın değerlerde kaldığı gözlenmektedir. Bu durumun oluşmasında fesleğenlerin antioksidan içeriğinin düşebileceği endişesi ile çiçeklenme dönemi öncesi biçilmeleri etkili olmuş olup elde edilen başak boyu değerleri sağlıklı olmayıp ön fikir niteliği taşımaktadır.

Çizelge 4.2.7.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen başak boyu değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Başak Boyu (cm)
Spm (0,1 mM)	5,24±1,03
Spm (1,0 mM)	4,48±2,36
FA (0,05 mM)	8,46±1,25
FA (0,5 mM)	4,82±2,98
EBL (0,5 µM)	8,35±2,34
EBL (2,0 µM)	6,40±3,10
Spm (0,1 mM)+MeJA	2,44±1,00
Spm (1,0 mM)+MeJA	3,96±1,60
FA (0,05 mM)+MeJA	6,03±0,87
FA (0,5 mM)+MeJA	1,00±1,00
EBL (0,5 µM)+MeJA	7,59±4,08
EBL (2,0 µM)+MeJA	6,50±6,50
MeJA	2,53±0,75
Kontrol A*	5,88±2,94
Kontrol B**	7,22±2,77
P=0,581	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.2.8. Başak sayısı (adet/bitki)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen başak sayısı değerleri Çizelge 4.2.8.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde başak sayısına etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmakla birlikte ($P>0,05$) bitkilere ait başak sayısı en yüksek olan uygulama 0,1 mM Spm (4,83 adet/bitki) uygulaması olmuştur. En düşük başak sayısı değeri ise 2,0 µM EBL+MeJA (0,50 adet/bitki) uygulanan bitkiler ile 0,5 mM Fa+MeJA (0,33 adet/bitki) uygulanan bitkilerden elde edilmiştir.

Farklı uygulamalar içinde başak sayısı en yüksek değer 0,1 mM Spm uygulamasından elde edilmesine rağmen, 1,0 mM Spm uygulamasına ait başak sayısı değeri kontrol grubuna göre daha düşük değerde olduğu saptanmıştır. Aynı durum FA öncülü uygulanan bitkiler için de geçerlidir. Yalnız EBL uygulanan bitkilerin başak sayısı değerleri için tersi bir durum tespit edilmiştir, yüksek EBL (2,0 µM) konsantrasyonunda (3,89 adet/bitki) yüksek başak sayısı değeri gözlenmiştir. Kontrol grupları arasında bir kıyaslama yapıldığında 24 saat suda bırakılan Kontrol A (2,67 adet/bitki) grubuna ait bitkilerin başak sayısı hiçbir işlem yapılmadan ekilen Kontrol B (4,22 adet/bitki) grubunun başak sayısı değerlerinden düşük bulunmuştur.

Uygulanan bitki büyüme düzenleyiciler ve öncülün MeJA ile kombinasyonları sonucu başak sayısı değerlerinde de farklı etkiler gözlenmektedir. MeJA'ın tek başına uygulandığı bitkilerde (1,33 adet/bitki) kontrol grubuna göre düşük başak sayısı değeri elde edilmiştir. Tek başına 0,1 mM Spm uygulanan bitkilerin başak sayısı (4,83 adet/bitki) değerleri, 0,1 mM Spm+MeJA uygulanan bitkilerin başak sayısı (1,33 adet/bitki) değerlerinden % 72 daha fazla değerde gerçekleşmiştir. Aynı durum kontrol grubuna çok yakın başak sayısı değeri veren 0,05 mM FA ve 2,0 µM EBL uygulanan gruplarda da gözlenmiştir. Bu sonuçlar JA uygulanan tütün bitkisinde çiçek tumurcuğu sayısının düştüğünü tespit eden çalışma ile ve domates bitkisinde JA uygulanan örneklerde meyve sayısının düştüğünün tespit edildiği çalışmalarla örtüşmektedir (Barendse, 1985; Redman ve ark., 2001). MeJA ile kombinasyon edildiklerinde başak sayısı değerleri artan uygulamalar ise 1,0 mM Spm+MeJA (2,56 adet/bitki) ile 0,5 µM EBL+MeJA (2,75 adet/bitki) olmuştur.

Başak sayısı ile ilgili fazla literatür bilgilerine rastlanmamış olup, uygulamalardan elde ettiğimiz bitkilerin başak sayısı değerleri, Kireççi (2006)'nın GA₃ ve farklı poliaminlerle yapmış olduğu tarla çalışmasında fesleğen için elde ettiği başak sayısı değerleri (10-29,3 adet/bitki) ile kıyaslandığında düşük değerlerde kaldığı gözlenmektedir. Bu farklılığın önemli sebepleri olarak bitkilerimizin yeni generatif evreye geçtiği zaman hasat edilmesi, diğer çalışmanın tarla şartlarında yapılması ve sıcak yaz mevsiminin çiçeklenme miktarını artırabileceği gibi sebepler olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.2.8.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen başak sayısı değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Başak sayısı (adet/bitki)
Spm (0,1 mM)	4,83±1,59
Spm (1,0 mM)	1,56±1,09
FA (0,05 mM)	3,50±0,76
FA (0,5 mM)	2,28±1,26
EBL (0,5 µM)	1,89±0,48
EBL (2,0 µM)	3,89±1,64
Spm (0,1 mM)+MeJA	1,33±0,33
Spm (1,0 mM)+MeJA	2,56±0,73
FA (0,05 mM)+MeJA	3,00±1,02
FA (0,5 mM)+MeJA	0,33±0,33
EBL (0,5 µM)+MeJA	2,75±0,25
EBL (2,0 µM)+MeJA	0,50±0,50
MeJA	1,33±0,33
Kontrol A*	2,67±1,33
Kontrol B**	4,22±1,89
P=0,243	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.2.9. Bitki başına yaprak alanı (cm²)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen yaprak alanı değerleri Çizelge 4.2.9.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde yaprak alanına etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmakla birlikte ($P>0,05$), bitkilere ait yaprak alanı en yüksek olan grup Kontrol A (62,60 cm²) uygulaması olmuştur. En düşük yaprak alanı değeri ise tohumların hiçbir işlem yapılmadan yetiştirildiği Kontrol B (36,54 cm²) uygulamasından elde edilmiştir.

Farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül konsantrasyonlarının fesleğen bitkilerinin yaprak alanına etkisi bakımından, 0,1 mM Spm uygulamasına ait yaprak alanı değeri 51,02 cm² olarak gerçekleşirken, aynı konsantrasyondaki Spm’in MeJA ile kombinasyonu sonucu oluşan yaprak alanı değeri önceki değerden düşük (45,30 cm²) bir değer olarak elde edilmiştir. Yüksek konsantrasyonda (1,0 mM) Spm uygulanan fesleğenlerin yaprak alanı değeri (42,46 cm²) olarak gerçekleşirken, aynı konsantrasyondaki Spm’in MeJA ile kombinasyonu sonucu bitkilerin yaprak alanı değeri (51,22 cm²) olarak gerçekleşmiştir. Bu sonuçlara göre Spm uygulamalarının bitkilerin yaprak alanına önemli bir katkısı olmazken, Spm+MeJA kombinasyonunda yaprak alanında gerçekleşmesi beklenen artış sağlanamamıştır.

Düşük konsantrasyonda EBL (0,5 μM) uygulamasından elde edilen yaprak alanı değerleri (54,71 cm^2), 2,0 μM EBL uygulamasından elde edilen yaprak alanı değerlerinden (49,74 cm^2) daha yüksek miktarda gerçekleşmiştir. EBL+MeJA uygulamalarının bitkinin yaprak alanına etkileri farklı olmakla birlikte, 0,5 μM EBL+MeJA uygulaması sonucu 38,99 cm^2 yaprak alanı elde edilirken, 2,0 μM EBL+MeJA uygulamasından 51,57 cm^2 yaprak alanı elde edilmiştir. EBL uygulamaları sonucu elde edilen yaprak alanı değerlerinde, kontrol grubu değerlerine göre önemli bir artış gerçekleşmemiştir. Bu sonuç ekzojen olarak EBL uygulanan *Geranium graveolens* bitkisinin yaprak sayısı, yaprak ağırlığı ve toplam yaprak alanı verilerinde artış olduğu bildirilen çalışmayla uyusmamaktadır (Swamy ve Rao, 2009). Yine çalışmalarımızın sonuçları ile BRs uygulanan *Cucumis sativus* bitkisinde yaprak alanında artış olduğu bildirilen çalışma ve *Chlorella vulgaris* bitkisinde EBL uygulamasıyla arttığı bildirilen büyüme verileri ile uyusmamaktadır (Bajguz ve Czerpak, 1998; Yu ve ark., 2004).

Tek başına 0,5 mM MeJA uygulanan fesleğenlerin yaprak alanı değeri Kontrol B grubundan sonra en düşük düzeyde (38,97 cm^2) gerçekleşmiştir. MeJA uygulamalarından elde edilen yaprak alanı değerlerinin diğer uygulamalar içinde en düşük düzeyde kalması, daha önceki çalışmalarda ekzojen olarak uygulanan JA ile bitkide savunma cevabı oluşmasının bitkinin büyüme, gelişme gibi süreçlerini etkileyebileceğini söylenen çalışmalarla kısmen desteklenmektedir (Baldwin, 1998; Agrawal ve ark., 1999).

Çizelge 4.2.9.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen yaprak alanı değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Yaprak alanı (cm ²)
Spm (0,1 mM)	51,02±04,29
Spm (1,0 mM)	42,46±02,64
FA (0,05 mM)	47,97±04,90
FA (0,5 mM)	52,42±08,05
EBL (0,5 µM)	54,71±10,15
EBL (2,0 µM)	49,74±09,04
Spm (0,1 mM)+MeJA	45,30±08,38
Spm (1,0 mM)+MeJA	51,22±02,38
FA (0,05 mM)+MeJA	44,29±03,33
FA (0,5 mM)+MeJA	47,95±03,15
EBL (0,5 µM)+MeJA	38,99±02,02
EBL (2,0 µM)+MeJA	51,57±00,04
MeJA	38,97±10,08
Kontrol A*	62,60±13,64
Kontrol B**	36,54±06,87
p=0,568	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.3. Fesleğen Bitkilerindeki Uçucu Yağ Oranı ve Bileşenlerine Ait Bulgular

4.3.1. Kuru bitkideki uçucu yağ oranı (%)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen uçucu yağ oranı değerleri Çizelge 4.3.1.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde uçucu yağ verimine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0,001$). En yüksek uçucu yağ oranı 0,5 µM EBL+MeJA uygulamasından (% 1,50) elde edilmiştir ve bu değer Kontrol A (% 1,40) ve Kontrol B (% 1,30) gruplarına ait uçucu yağ oranlarından yüksek olarak gerçekleşmiştir.

Çalışmamızda Spm uygulanan bitkilerden elde edilen uçucu yağ oranları kontrol grubuna göre daha düşük değerlerde gerçekleşmiştir (Çizelge 4.3.1.1). Düşük konsantrasyonda Spm (0,1 mM) uygulanan bitkilerin uçucu yağ değerleri ile (% 1,07), aynı konsantrasyondaki (0,1 mM) Spm’in MeJA ile kombinasyon yapılması sonucu elde edilen uçucu yağ değeri arasında çok önemli bir fark oluşmamıştır. Daha yüksek konsantrasyonda Spm (1,0 mM) uygulanan fesleğenlerin uçucu yağ oranı (% 1,23) ise Spm’in düşük dozundaki uygulamasına göre bir miktar artmıştır ancak bu değer de kontrol grubunun değerinden daha yüksek olamamıştır. Spm (1,0 mM)+MeJA uygulanan bitkilerin uçucu

yağ oranı (% 1,00) ise hem tek başına 1,0 mM Spm uygulanan bitkilerden daha düşük bir değerde kalmıştır hem de kontrol grubuna göre % 23 daha düşük değer elde edilmiştir. Bu sonuçlara göre Spm uygulamalarının bitkilerin uçucu yağ değerlerine ve üretimine önemli bir katkısı olmadığı gözlenirken Spm+MeJA kombinasyonu uygulamaları ile fesleğenlerin uçucu yağ miktarında olması beklenen artış sağlanamamış aksine bitkilerin uçucu yağ oranları olumsuz etkilenmiştir.

FA öncülü uygulanan bitkilerden elde edilen uçucu yağ değerleri kontrol grubuna göre daha düşük olarak gerçekleşmiştir. FA (0,05 mM) uygulamasından % 1,23 oranında uçucu yağ elde edilirken, 0,5 mM FA uygulanan fesleğenlerin uçucu yağ oranı % 0,90 olarak gerçekleşmiştir. FA (0,05 mM)+MeJA uygulanan bitkilerin uçucu yağ oranı % 1,29 olarak gerçekleşirken bu değer tek başına 0,05 mM FA uygulanan bitkilerden daha yüksek bir değer olmuş ancak bu değer de kontrol grubundan yüksek olmamıştır. FA (0,5 mM)+MeJA uygulanan fesleğenlerin uçucu yağ oranı (% 1,29) tek başına 0,5 mM FA uygulamasından elde edilen değerden (% 0,90) daha yüksek oranda olduğu gözlenmiştir. Bu bulgular sonucu tek başına FA öncülü uygulamalarının bitkinin uçucu yağ oranını olumsuz etkilediği ancak FA öncülünün uçucu yağ oranları üzerindeki olumsuz etkisinin MeJA ile kombinasyonu sonucu ortadan kalktığı ve bir miktar tolere edildiği söylenebilir.

EBL'in tek başına uygulandığı bitkilerden elde edilen uçucu yağ değerleri kontrol grubuna göre daha düşük miktarlarda gerçekleşmiştir. Düşük konsantrasyondaki EBL (0,5 μ M) uygulaması sonucu fesleğenlerin uçucu yağ oranı % 1,08 olarak tespit edilirken, 2,0 μ M EBL uygulanan fesleğenlerden elde edilen uçucu yağ oranı % 1,20 olarak gözlenmiştir. Düşük konsantrasyonda EBL (0,5 μ M)'in MeJA ile birlikte uygulandığı fesleğenlerden elde edilen uçucu yağ miktarı % 1,50 oranında gerçekleşmiş bu ise aynı konsantrasyondaki EBL'in tek başına uygulandığı bitkilerden elde edilen uçucu yağın oranından % 28 daha yüksek bir değerdir. Diğer EBL (2,0 μ M) ve MeJA kombinasyonu uygulamasından % 1,36 oranında uçucu yağ elde edilmiştir. Bu bulgular sonucu EBL'in tek başına uygulandığında fesleğenlerin uçucu yağ oranlarına olumlu bir etkisi olmadığı, ancak aynı miktardaki EBL'in MeJA ile birlikte uygulandığında kombinasyonların bitkilerin uçucu yağ oranlarında önemli bir artışa sebep olduğu saptanmıştır.

Fesleğenlere 0,5 mM MeJA'nın uygulanmasıyla elde edilen uçucu yağ oranı % 1,25 olarak gerçekleşmiş olup bu değer kontrol grubuna göre düşük bir değerdir. Bu durum Kim ve ark. (2006)'nın fesleğen fidelerine 0,5 mM MeJA'nın yapraktan püskürtme suretiyle uygulanması sonucu bitkideki toplam terpen miktarının arttığı bildirilen çalışmayla

uyuşmamaktadır. Şu ana kadar ki bilgilerimize göre bitkilerin uçucu yağ değerlerini artırmak amacıyla, çalışmalarımızdaki gibi bir bitki büyüme düzenleyici ve öncül kombinasyon çalışmasına rastlayamamaktayız. Ancak çalışmamız Ozawa ve ark. (2009)'nın lima fasulyesi yapraklarına otçul maytaların doğal düşmanları olan etçil böcekleri çekmeye yarayan uçucu terpenlerin üretiminde, poliaminlerin rolünü araştırdıkları çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada poliaminlerden Spm, uçucu terpenlerin ve içsel JA'in miktarını en çok arttıran bitki büyüme düzenleyici olmuştur. Yapraklara ekzojen olarak Spm ve JA birlikte uygulandığında ise tek başına uygulanan JA'den daha etkili bulunmuş olması bizim sonuçlarımızla kısmen uyuşmaktadır. Yine elde ettiğimiz sonuçlar, Kireççi (2006)'nin fesleğen bitkisine tohumdan ekzojen olarak poliamin ve giberellin uyguladığı çalışmasında elde ettiği uçucu yağ değerlerinde bir artış olmadığı yönündeki bulgularla da kısmen uyuşmaktadır.

Çizelge 4.3.1.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen uçucu yağ oranları (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Uçucu yağ oranı (%)
Spm (0,1 mM)	1,07±0,07 ^{efg}
Spm (1,0 mM)	1,23±0,02 ^{b-e}
FA (0,05 mM)	1,23±0,02 ^{b-e}
FA (0,5 mM)	0,90±0,05 ^g
EBL (0,5 µM)	1,08±0,08 ^{efg}
EBL (2,0 µM)	1,20±0,14 ^{c-f}
Spm (0,1 mM)+MeJA	1,09±0,09 ^{d-g}
Spm (1,0 mM)+MeJA	1,00±0,00 ^{fg}
FA (0,05 mM)+MeJA	1,29±0,09 ^{bcd}
FA (0,5 mM)+MeJA	1,29±0,05 ^{bcd}
EBL (0,5 µM)+MeJA	1,50±0,00 ^a
EBL (2,0 µM)+MeJA	1,36±0,00 ^{abc}
MeJA	1,25±0,05 ^{b-e}
Kontrol A*	1,40±0,01 ^{ab}
Kontrol B**	1,30±0,00 ^{abc}
P=0,0001	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

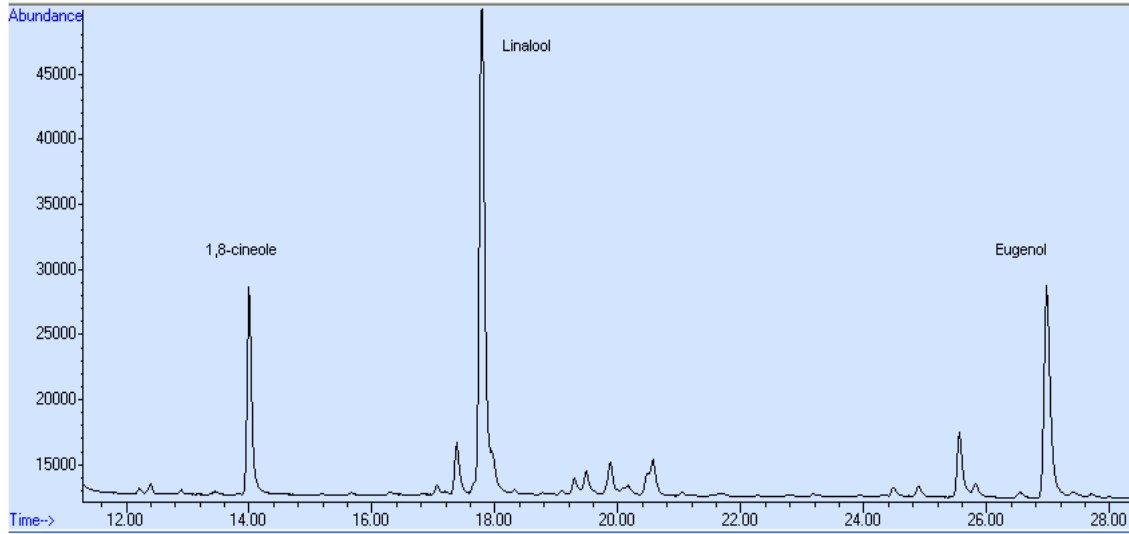
a, b, c, d, e, f, g Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak önemlidir

4.3.2. Uçucu yağ bileşenlerinin tespiti ve ana bileşenler

Uçucu yağ ve komponentlerin analizi GC-MS cihazı ile gerçekleştirilmiş olup miktar tayini GC-MS ile birleştirilmiş FID dedektörü ile yapılmıştır. Uçucu yağ bileşenlerinin tayininde MS kütüphanesinde bulunan NIST, FLAVOUR, WILEY kütüphanelerinden yararlanılmıştır. Bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamaları

sonucu yetişen fesleğen bitkilerinden elde edilen uçucu yağlardan toplam 27 bileşen aydınlatılmıştır. Uçucu yağ içerisinde ana bileşenler olarak bulunan linalool, 1,8-cineole ve eugenolün ayrıca istatistik analizi yapılmış ve değerlendirilmiştir. Farklı uygulamalar sonucu fesleğen bitkisinde elde edilen uçucu yağ bileşenleri Çizelge 4.3.2.1’de verilmiş olup GC-MS analizi sonucu elde edilen kromotogramda Şekil 4.3.2.1’ de görülmektedir.

Çalışmada kullandığımız fesleğenin Grand Vert çeşidine ait uçucu yağlar, bileşenleri yönünden ana bileşen olarak linalool içerdiği için bitkinin linalool kemotipinde olduğu söylenebilir. Linalool bir monoterpen olup kozmetik ve parfümeri sanayinde hammadde olarak kullanılmaktadır. Nakamura ve ark. (2009) linaloolün ratlarda stresi azalttığını tespit ettikleri çalışma, halk arasında migren tedavisi için kullanılan fesleğenin bu özeliğinin linaloolden kaynaklandığı ve tedavi edici etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca fesleğen uçucu yağında bulunan ve fenilpropanoid yapıda olan eugenol yüksek antioksidan etkiye sahip olup eugenolce yüksek fesleğen hatları antioksidan kaynak olarak değerlendirilmektedir.



Şekil 4.3.2.1. Fesleğen bitkisine ait uçucu yağın GC-MS analizi sonucu elde edilen kromotogram

Çizelge 4.3.2.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen uçucu yağının kimyasal kompozisyonu

Pik No	Çıkış Zamanları	Bileşenler	Spm (0,1 mM)	Spm (1,0 mM)	FA (0,05 mM)	FA (0,5 mM)	EBL (0,5 µM)	EBL (2,0 µM)	Spm (0,1 mM)+ MeJA	Spm (1,0 mM)+ MeJA	FA (0,05 mM)+ MeJA	FA (0,5 mM)+ MeJA	EBL (0,5 µM)+ MeJA	EBL (2,0 µM)+ MeJA	MeJA	KA	KB
1	12.213	β –Pinene	1.27	0.81	1.05	1.31	1.62	2.13	0.26	1.00		1.02	1.90	0.92	0.79	1.07	0.91
2	12.391	Myrcene	2.08	0.94	1.22	1.51	1.81	1.75	0.54	1.37	0.81	1.19	2.17	1.06	0.92	1.26	1.43
3	12.895	Limonene	1.39	0.34	0.41	0.59	0.58	0.61	0.20	0.41	0.40	0.37	0.60	0.41	0.31	0.40	0.41
4	13.447	Delta-3-carene	1.27	0.30	0.35	0.46	0.41	0.39	0.17	0.36	0.33	-	0.46	0.31	0.27	0.29	0.32
5	14.005	1,8-Cineole	18.55	13.77	15.12	11.44	14.72	16.94	12.57	13.19	14,29	12.42	17.42	13.40	13.85	14.58	14.67
6	16.290	α -muurolene	0.11	0.14	0.16	0.16	0.13	0.11	0.17	0.15	0.15	0.15	0.14	0.13	0.15	0.21	0.19
7	17.062	Octyl acetate	0.35	0.38	0.39	0.40	0.42	0.41	0.49	0.30	0.32	0.46	0.31	0.41	0.36	0.41	0.38
8	17.198	Linaloxide	0.16	0.13	0.18	0.19	0.13	-	0.14	0.13	0.19	0.17	0.14	0.13	0.14	0.21	0.18
9	17.376	α –bergamotone	2.54	6.26	3.86	4.93	4.10	4.07	3.45	2.59	4.24	4.40	4.14	6.72	5.55	2.59	2.66
10	17.786	Linalool	40.52	39.23	44.20	38.52	47.00	45.93	38.51	40.53	43.34	39.41	38.81	39.84	40.21	47.61	43.18
11	18.314	Caryophyllene oxide	0.18	0.18	0.22	0.18	0.18	0.19	0.22	0.24	0.22	0.21	0.25	0.21	0.20	0.26	0.25
12	18.777	β – Caryophyllene	-	-	-	0.10	0.08	-	0.11	-	-	-	-	0.18	-	-	-
13	19.074	Nerolidol (E)	0.20	0.46	0.28	0.38	0.26	0.26	0.27	0.21	0.32	0.34	0.33	0.47	0.39	0.17	0.19
14	19.294	Guaiyl acetate	0.59	1.17	0.80	-	0.98	0.733	1.28	0.87	0.32	1.12	1.188	1.11	0.90	0.82	1.08
15	19.483	Bornyl acetate	1.52	1.62	1.81	2.89	1.85	1.58	1.98	2.06	1.76	1.87	1.56	2.34	1.95	1.38	1.55
16	19.875	γ-cadinene	1.54	2.41	2.26	2.25	2.30	2.04	2.71	1.83	2.43	2.55	2.60	2.34	2.48	2.18	2.67
17	20.172	Germacrene-D	1.12	0.59	0.79	0.97	1.17	0.69	1.25	1.16	1.07	1.20	0.98	0.76	0.68	1.09	1.10
18	20.570	α-Terpineol	2.77	3.54	2.61	3.81	3.11	2.55	2.85	3.07	3.47	3.29	3.15	3.30	3.40	2.89	3.17
19	21.038	Isoborneol	0.17	0.27	0.23	0.35	0.33	0.24	0.25	0.28	0.30	0.32	0.29	0.33	0.35	0.21	0.23
20	21.709	Cis-calamenene	0.50	0.16	0.21	0.48	0.17	0.25	0.18	0.44	0.28	0.19	0.54	0.17	0.18	0.32	0.15
21	23.175	Myrcene	-	0.12	0.12	0.23	0.23	-	0.26	0.15	0.16	0.16	-	0.19	0.22	0.18	0.21
22	24.481	α -cadinol	0.42	0.54	0.57	0.62	0.56	0.39	0.59	0.48	0.59	0.55	0.40	0.45	0.53	0.52	0.57
23	24.889	Methyl eugenol	0.84	0.38	0.55	0.81	0.60	0.59	0.73	0.83	0.49	0.82	0.52	0.39	0.69	0.54	0.85
24	25.549	Epi-bicyclo sesquiphellandrene	3.41	4.38	4.12	4.70	3.87	3.26	4.97	3.34	4.25	4.40	3.81	3.89	4.53	3.98	4.46
25	25.816	Spathulenol	0.62	0.79	0.72	0.92	0.97	0.60	1.29	0.69	0.71	0.92	0.77	0.83	0.86	0.78	1.01
26	26.535	(+)-isobcyclo germacrene	0.23	0.31	0.28	0.33	0.30	0.21	0.47	0.24	0.39	0.32	0.25	0.28	0.32	0.28	0.35
27	26.968	Eugenol	13.83	18.25	14.73	17.07	11.79	11.46	17.06	17.09	15.96	18.48	13.21	16.26	18.00	14.75	15.52

4.3.3. Linalool miktarı (%)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen linalool değerleri Çizelge 4.3.3.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde linalool miktarına etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmakla birlikte ($P>0,05$), bitkilere ait linalool miktarı en yüksek olan uygulamalar Kontrol A (% 47,61) ve 0,5 μ M EBL (% 47,00) uygulamaları olmuştur. En düşük linalool miktarı ise 0,5 mM FA (% 38,51) uygulamasından elde edilmiştir.

Çalışmamızda farklı bitki büyüme düzenleyicilerin ve FA öncülünün fesleğen uçucu yağının linalool miktarında, Kontrol A grubuna ait değerlerle kıyaslandığında azalmaya sebep olduğu gözlenmiştir. Sonuçlarımız Swamy ve Rao (2009)’nun 3 μ M EBL uyguladığı *Palergonum graveolens* (L.) Herit bitkisinin uçucu yağında geraniol miktarında az bir artış elde ettiği ancak linalool ve diğer bileşenlerin içeriğinin önemli oranda düştüğünü bildirdiği çalışma ile kısmen uyuşmaktadır (Naeem ve ark., 2012). Ancak bulgularımız Kim ve ark. (2006)’nın fesleğen fidelerine 0,5 mM MeJA’nın yapraktan püskürtme suretiyle uygulanması sonucu uçucu yağ içeriğinde bulunan linalool miktarının arttığı bildirilen çalışmayla ve yine Kireççi (2006)’nin fesleğen tohumlarına farklı poliamin ve GA₃ uygulayp yüksek linalool içeriği elde ettiği çalışma ile uyuşmamaktadır.

Bunların yanı sıra fesleğenden elde edilen uçucu yağdaki linalool miktarı ile ilgili sonuçlarımız Kireççi (2006)’nin farklı poliamin ve GA₃ uygulamasından elde ettiği % 38-49 linalool miktarı ile uyumlu olup ayrıca Fleisher (1981)’in en yüksek linalool oranını % 47 olarak bildirdiği çalışmasıyla, Srivastava (1980)’nin fesleğen uçucu yağının % 43-50 linalool içerdiğini belirttiği çalışmasıyla, Akgül (1989)’ün, Erzurum yöresinde yaptığı araştırmada *O. basilicum*’dan elde ettiği uçucu yağın içerdiği bileşimlerden linalool’ün % 45-70 oranında bulunduğunu bildirdiği araştırmasıyla uyumludur. Bunun yanında Opalchenova ve Obrenskava (2002)’nin belirttikleri % 54,95 linalool oranı bizim elde ettiğimiz değerlerden bir miktar yüksektir. Aynı şekilde Menaker ve ark., (2004)’nin yaptıkları çalışmada bildirdikleri % 52 linalool oranı ile Maheshwari ve Singh (1989)’in bildirdikleri % 61,67 linalool oranları da bizim bulgularımızdan yüksektir. Bu farklılıkların oluşmasının sebebi, daha önceki çalışmalarda bildirildiği gibi *Ocimum* cinsinin uçucu yağ içeriğinin gelişimsel ve çevresel faktörlerden etkilenmesi ve farklı kemotiplere sahip olması olabilir (Sinan ve ark., 1990; Lawrence, 1998; Labra ve ark., 2004; Telci ve ark., 2006).

Çizelge 4.3.3.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen linalool miktarları (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Linalool (%)
Spm (0,1 mM)	40,52±1,33
Spm (1,0 mM)	39,24±0,69
FA (0,05 mM)	44,20±2,01
FA (0,5 mM)	38,51±2,49
EBL (0,5 µM)	47,00±0,29
EBL (2,0 µM)	45,93±4,49
Spm (0,1 mM)+MeJA	38,52±0,32
Spm (1,0 mM)+MeJA	40,53±0,91
FA (0,05 mM)+MeJA	43,34±2,75
FA (0,5 mM)+MeJA	39,41±6,51
EBL (0,5 µM)+MeJA	38,81±4,36
EBL (2,0 µM)+MeJA	39,84±1,27
MeJA	40,21±0,86
Kontrol A*	47,61±2,79
Kontrol B**	43,18±0,24
P=0,121	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.3.4. 1,8-Cineole miktarı (%)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen 1,8-cineole değerleri Çizelge 4.3.4.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde 1,8-cineole miktarına etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmakla birlikte ($P>0,05$), bitkilere ait en yüksek 1,8-cineole miktarı 0,1 mM Spm (% 18,55) uygulamasından elde edilmiş olup bunu 0,5 µM EBL+MeJA (% 17,42) ve 2,0 µM EBL (% 16,94) uygulaması takip etmiştir. En düşük 1,8-cineole miktarı ise 0,5 mM FA (% 11,44) uygulamasından elde edilmiştir.

Çalışmamızda farklı bitki büyüme düzenleyicilerin ve FA öncülünün fesleğen uçucu yağının 1,8-cineole miktarına etkileri bakımından önemli bir artış tespit edilmemekle birlikte tek başına uygulanan EBL uygulamaları hariç genel olarak her uygulamada bitki büyüme düzenleyici ve öncül konsantrasyonu arttıkça düşük 1,8-cineole değerleri elde edildiği saptanmıştır.

Bununla birlikte Karaman ve ark. (2008)’nın yapmış olduğu çalışmada spermidin uygulamasının fesleğen uçucu yağının 1,8-cineole miktarını artırdığını, ancak konsantrasyonların etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Araştırmacıların mor yapraklı fesleğen ile tarla koşullarında yaptıkları denemede elde ettikleri 1,8-cineole miktarı % 9,8-11,84

olup bu deęer arařtırmamızda elde ettięimiz miktarlardan dūřuktur. Marotti ve ark. (1996)'nın tarla kořullarında yetiřtirdikleri 10 farklı İtalyan tipi fesleęen kùltùrlerinden elde ettikleri % 0,13-12,91'lik 1,8-cineol miktarı arařtırmamızda elde ettięimiz miktarlardan dūřuktur.

Çizelge 4.3.4.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncùl uygulamalarından elde edilen 1,8-cineole miktarları (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	1,8-Cineole (%)
Spm (0,1 mM)	18,55±0,67
Spm (1,0 mM)	13,77±0,36
FA (0,05 mM)	15,12±0,13
FA (0,5 mM)	11,44±2,31
EBL (0,5 µM)	13,48±1,25
EBL (2,0 µM)	16,94±1,62
Spm (0,1 mM)+MeJA	12,58±0,07
Spm (1,0 mM)+MeJA	13,19±0,20
FA (0,05 mM)+MeJA	14,29±1,37
FA (0,5 mM)+MeJA	12,42±2,65
EBL (0,5 µM)+MeJA	17,42±1,83
EBL (2,0 µM)+MeJA	13,40±1,69
MeJA	13,85±1,63
Kontrol A*	14,58±0,17
Kontrol B**	14,67±0,07
P=0,104	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.3.5. Eugenol miktarı (%)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncùl uygulamalarından elde edilen eugenol değerleri Çizelge 4.3.5.1'de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde eugenol miktarına etkisi istatistiki olarak önemsiz bulunmakla birlikte ($P>0,05$), bitkilere ait eugenol miktarı en yüksek olan uygulama 0,5 mM FA+MeJA (% 18,49) ile 1,0 mM Spm (% 18,26) ve 0,5 mM MeJA (% 18,00) uygulanan fesleğenlerden elde edilmiştir. En düşük Eugenol miktarı ise 0,5 µM EBL (% 11,80) ve 2,0 µM EBL (% 11,46) uygulamalarından elde edilmiştir.

Fesleğen ile yapılan bazı çalışmalarda MeJA ve kitosan gibi elisitör ve UV-B işığına maruz bırakma gibi uygulamalarda fenilpropanoid yolundan türevlenen eugenol miktarında kontrol grubuna göre artış olduğu gözlemlenmiştir (Johnson ve ark., 1999; Kim ve ark., 2005; Kim ve ark., 2006). Çalışmamızda uygulamalar sonucu eugenol miktarında literatürlerde gözlemlendiği gibi bir artış elde edilememiştir. Bu durumun oluşmasında bitki

büyüme düzenleyici ve öncülün konsantrasyonları ve bitkinin büyüme şartları gibi faktörler etkili olmuş olabilir nitekim Kim ve ark. (2005)'nın belirttiği gibi kitosan uygulamalarında eugenol miktarının doza bağlı olarak arttığı düşük ve çok yüksek dozlarda eugenol miktarında önemli bir artış olmadığı söylenen çalışma bizim bulgularımızla kısmen örtüşmektedir. Araştırmamızda fesleğen uçucu yağından elde ettiğimiz % 11,46-18,49 eugenol miktarı literatürde bildirilen değerler ile uyum göstermektedir (Sifola ve Barbieri, 2006). Ancak bazı çalışmalarda farklı fesleğen çeşitleri için tespit edilen % 0,1-7,2 değerleri arasındaki eugenol miktarı da elde ettiğimiz eugenol değerlerinden düşük miktarlarda gerçekleşmiştir (Marotti ve ark., 1996; Karaman ve ark., 2008).

Çizelge 4.3.5.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen eugenol miktarları (ortalama $\pm$ standart hata)

Uygulamalar	Eugenol (%)
Spm (0,1 mM)	13,84 $\pm$ 0,65
Spm (1,0 mM)	18,26 $\pm$ 1,07
FA (0,05 mM)	14,74 $\pm$ 2,21
FA (0,5 mM)	17,07 $\pm$ 0,58
EBL (0,5 μ M)	11,80 $\pm$ 0,76
EBL (2,0 μ M)	11,46 $\pm$ 0,77
Spm (0,1 mM)+MeJA	17,07 $\pm$ 0,76
Spm (1,0 mM)+MeJA	17,10 $\pm$ 0,94
FA (0,05 mM)+MeJA	15,96 $\pm$ 1,80
FA (0,5 mM)+MeJA	18,49 $\pm$ 4,27
EBL (0,5 μ M)+MeJA	13,22 $\pm$ 0,48
EBL (2,0 μ M)+MeJA	16,26 $\pm$ 1,81
MeJA	18,00 $\pm$ 1,76
Kontrol A*	14,76 $\pm$ 4,24
Kontrol B**	15,53 $\pm$ 0,05
P=0,238	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.4. Toplam Fenolik Miktarı

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen toplam fenolik değerleri Çizelge 4.4.1'de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde toplam fenolik miktarına etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$).

Toplam fenolik miktarı en yüksek değere sahip uygulama 1,0 mM Spm+MeJA (6,75 mg GAE/g) uygulaması olmuştur. Bu uygulamaya ait bitkilerden elde edilen toplam fenolik madde değeri, kontrol grubundan elde edilen miktardan (4,83 mg GAE/g) % 40 daha fazla bulunmuştur. Bu uygulamaya yakın bir sonuç da 0,1 mM Spm+MeJA uygulamasında (6,65 mg GAE/g) gerçekleşmiştir. MeJA ile kombinasyon edildiğinde yüksek fenolik değeri elde ettiğimiz Spm, tek başına uygulandığında toplam fenol miktarı kontrol grubuna göre düşük değerlerde gerçekleşmiştir.

Yüksek fenolik madde elde edilen bir diğer bitki büyüme düzenleyici grubu ise EBL uygulamaları olmuştur. EBL (0,5 μ M)+MeJA uygulanan bitkilerden elde edilen fenolik madde miktarı 6,15 mg GAE/g olarak gerçekleşmiş, bu uygulamadan sonra en yüksek fenolik madde miktarı değeri 2,0 μ M+MeJA uygulanan bitkilerden 6,05 mg GAE/g olarak bulunmuştur. EBL'lerin tek başına uygulandığı her iki konsantrasyona ait bitkilerden elde edilen toplam fenol miktarı (5,22 ve 5,90 mg GAE/g) kontrol grubuna göre yüksek bir değerde gerçekleşmiştir ancak EBL'lerin MeJA ile kombinasyonu daha yüksek oranda fenolik madde elde etmemize sebep olmuştur.

FA öncülünün tek başına uygulanması sonucu elde edilen toplam fenolik madde miktarı, FA'in MeJA ile birlikte uygulanması ile elde edilen toplam fenolik madde miktarından daha yüksek olmuştur. Düşük konsantrasyonda (0,05 mM) FA uygulanan bitkilerin fenolik değeri (5,54 mg GAE/g) kontrol grubundan yüksek olarak elde edilmiştir. Diğer FA (0,5 mM) konsantrasyonu uygulamasının ise bitkinin fenolik madde içeriğine (4,93 mg GAE/g) önemli bir etkisi olmamıştır.

Tek başına MeJA (0,5 mM) uygulanması ile elde edilen fenolik madde içeriği (5,48 mg GAE/g) istatistiksel olarak kontrol grubu ile aynı grupta yer almıştır. Bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulanan fesleğenlerden elde edilen en düşük fenolik madde miktarı 0,5 mM FA+MeJA uygulamasında 3,43 mg GAE/g olarak gerçekleşmiştir. Bu değer kontrol grubuna göre oldukça düşüktür. Bu sonuçlardan hareketle FA'in MeJA kombinasyonunun bitkide toksik etkiye sebep olduğu söylenebilir.

Bitkilerdeki toplam fenolik miktarının stres, JA ve MeJA gibi elisitör uygulamaları ile arttığı kıvırcık, soya, domates yaprakları, *Lupinus alba* ve huş ağacında yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Graham ve Graham, 1996; Gagnon ve İbrahim, 1997; Lavola, 1998; Saltveit, 2004). Çalışmalarımız sonucu tek başına uygulanan 0,5 mM MeJA uygulanan bitkilerden elde edilen fenolik madde miktarının kontrol grubu değerlerinden

çok farklı çıkmaması, Kim ve ark. (2006)'nın 0,5 mM MeJA uygulaması ile fesleğenlerin fenolik miktarında artışa sebep olduğu bildirilen çalışma ile uyuşmamaktadır. Ancak aynı çalışmada düşük miktardaki MeJA konsantrasyonunda toplam fenolik madde miktarının kontrol grubunun değerlerinden pek fazla yüksek değerler elde edilememesi ve toplam fenolik madde miktarının uygulamanın yapıldığı 2. gün en yüksek seviyeye ulaşması ve 4. gün herhangi fazla bir artışın olmaması kısmen çalışmamızı desteklemektedir. Ayrıca araştırmacılar yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak 0,5 mM MeJA'yı fide halindeki fesleğenlere uygulaması ve uygulamanın sprey şeklinde yapraktan yapılması benzer sonuçlar elde edemememize sebep olmuş olabilir.

Çalışmamızda her iki Spm+MeJA uygulamasında yüksek fenolik değer elde edilmesi, Flores ve Galston (1984)'un poliaminlerin bitkide stres cevabı oluşmasına sebep olduğunu belirttiği çalışma ile ve de ayrıca poliaminlerle birlikte MeJA uygulanan pek çok bitkinin hücre kültürleri ve kök kültürlerinde sekonder metabolit miktarında çok önemli artışlar gözlemlendiğini bildiren çalışmalarla uyumludur (Evans ve Malmberg, 1989; Bais ve ark., 2000; Stojakowska ve ark., 2002).

Çalışmalarımız sonucu EBL+MeJA uygulamalarından kontrol grubuna göre yüksek fenolik madde değerleri elde edilmiştir. Literatürlerde böyle bir kombinasyonun sekonder metabolitler üzerine etkisi açısından bir bulguya rastlanmamıştır. Bununla birlikte bulgularımız bitkideki sinyal moleküllerinden olan JA'nın sentezinde rol alan OPR3 geninin Br tarafından indüklenmesi ve Br muamelesi sonucu bu genin aktivasyonunun arttığı ve BRs ile JA sentezi arasında bir bağlantı olduğunu ve böylelikle Br'in bitkinin strese yanıtını JA biyosentezini düzenleyerek etkilediğini söyleyen çalışmayı destekler niteliktedir (Schaller ve ark., 2000).

Toplam fenolik madde miktarı yönünden elde ettiğimiz bulgular, Kim ve ark. (2006)'nın MeJA uyguladıkları fesleğen fidelerinde ölçtükleri 2,1-3,5 mg GAE/g yaş ağırlık değerlerinden, yine Kim ve ark. (2006)'nın kitosan uyguladıkları fesleğende ölçtükleri değerden ve Lee ve Scagel (2009)'in buldukları toplam fenolik madde değerlerinden yüksek bulunmuştur. Elde ettiğimiz yüksek fenolik değerleri, fesleğen örneklerinin orjinlerinin farklı olması, ekstraksiyon ve analiz yöntemlerindeki değişiklikler ile ayrıca bitkinin yetiştirme şartlarının farklı olmasından kaynaklanmış olabilir. Bunun yanında Lagouri ve Nisteropoulou (2009)'un fesleğende bildirdiği 2,1-15,91 mg GAE/kg kuru ağırlık değerleride araştırmamızda elde ettiğimiz değerlere benzer veya yüksektir. Araştırmacıların kuru bitkide çalışmış olmaları bizim ise materyalimizin yaş bitki olması

sebebi ile farklı sonuçlar elde edilmiştir. Benedec ve ark. (2012)'nın Romanya'da ürettikleri fesleğende elde ettikleri en yüksek toplam fenol miktarı 0,20 mg GAE/g kuru bitki olup çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerden düşüktür.

Çizelge 4.4.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen toplam fenolik miktarları (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Toplam fenolik (mg GAE/g yaş ağırlık)
Spm (0,1 mM)	4,42±0,81 ^{bcd}
Spm (1,0 mM)	4,06±0,38 ^{cd}
FA (0,05 mM)	5,54±0,49 ^{a-d}
FA (0,5 mM)	4,93±1,23 ^{a-d}
EBL (0,5 µM)	5,22±0,45 ^{a-d}
EBL (2,0 µM)	5,90±0,62 ^{abc}
Spm (0,1 mM)+MeJA	6,65±0,54 ^{ab}
Spm (1,0 mM)+MeJA	6,75±0,85 ^a
FA (0,05 mM)+MeJA	4,80±0,74 ^{a-d}
FA (0,5 mM)+MeJA	3,43±0,14 ^d
EBL (0,5 µM)+MeJA	6,15±0,67 ^{abc}
EBL (2,0 µM)+MeJA	6,05±0,23 ^{abc}
MeJA	5,48±0,76 ^{a-d}
Kontrol A*	3,99±0,26 ^{cd}
Kontrol B**	4,83±0,59 ^{a-d}
p=0,04	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

a, b, c, d Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak önemlidir

4.5. Toplam Flavonoid Miktarı

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen toplam flavonoid değerleri Çizelge 4.5.1'de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde yaş yapraklarının toplam flavonoid miktarına etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Toplam flavonoid miktarı yönünden en yüksek değer 1,0 mM Spm+MeJA (0,92 mg KE/g) uygulaması olmuştur. Bu uygulamayı sırasıyla 2,0 µM EBL+MeJA ve 0,1 mM Spm+MeJA uygulamaları takip etmiştir. En düşük flavonoid miktarı 0,5 mM FA+MeJA uygulamasından elde edilmiştir.

Spm uygulamaları ile ilgili elde edilen toplam flavonoid değerleri toplam fenolik madde değerleri ile paralellik göstermiştir. Tek başına uygulanan Spm, Kontrol B grubu ile kıyaslandığında, bitkilerin toplam flavonoid içeriğini olumsuz etkilerken, Spm ve MeJA kombinasyonu sonucu yüksek miktarlarda toplam flavonoid içerik elde edilmiştir.

Yüksek flavonoid miktarı elde edilen bir diğer bitki büyüme düzenleyici grubu ise EBL uygulamaları olmuştur. EBL'lerin tek başına uygulandığı her iki konsantrasyona ait bitkilerden elde edilen toplam flavonoid miktarları her iki kontrol grubuna göre yüksek bir değerde gerçekleşmiş olup bununla birlikte EBL'lerin MeJA ile kombinasyonu daha iyi değerler elde etmemize sebep olmuştur. Düşük konsantrasyonda EBL (0,5 μ M) ile MeJA'nın birlikte uygulanması sonucu elde edilen toplam flavonoid miktarı 0,76 mg KE/g olarak gerçekleşirken, 2,0 μ M EBL+MeJA uygulanan bitkilerden elde edilen toplam flavonoid miktarı 0,85 mg KE/g olarak gerçekleşmiştir.

FA öncülünün tek başına uygulandığı her iki konsantrasyonda da bitkilerden elde edilen toplam flavonoid miktarı (0,73 ve 0,66 mg KE/g) kontrol grubuna yakın değerlerde gerçekleşirken, 0,5 mM FA'in MeJA ile birlikte uygulanan bitkilerin toplam flavonoid miktarı (0,41 mg KE/g), çalışmamızda elde ettiğimiz en düşük değer olmuştur. Sonuçlara göre yüksek konsantrasyondaki FA öncülünün MeJA ile kombinasyonu, bitkinin toplam flavonoid içeriğinde negatif bir etki oluşturmuş olup benzer sonuçların toplam fenolik madde miktarında da gözlenmesi bu kombinasyonun bitkide toksik etkiye sebep olduğu söylenebilir. Tek başına MeJA (0,5 mM) uygulanan bitkilerin toplam flavonoid içeriği olan 0,69 mg KE/g değeri kontrol grubu değerlerine (0,69 mg KE/g) yakın bir değer olarak gerçekleşmiştir.

Bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarının fesleğenin toplam flavonoid miktarı üzerine çok fazla çalışma bulunmamasına rağmen, elde ettiğimiz toplam flavonoid değerleri Benedec ve ark. (2012)'nin kuru fesleğinde bildirdikleri 0,350 ve 1,245 mg KE/g değerleri ile uyumlu bulunmuştur. Bulgularımız böğürtlen meyvesinde MeJA uygulanması ile içeriğindeki toplam fenolik, flavonoid ve antosiyanin miktarının arttığını bildiren çalışma ile uyushmaktadır (Wang ve ark., 2008). Yine MeJA uygulaması ile soya fidelerinde, şeftali fidanlarında, elma ve çilek olgunlaşmasında bir çeşit flavonoid olan antosiyanin miktarının artması bizim çalışmamızla kısmen örtüşmektedir (Franceschi ve Grimes, 1991; Perez ve ark., 1997; Saniewski ve ark., 1998; Kondo ve ark., 2001).

Li ve ark. (2007) ekzojen olarak uyguladıkları 0,5 mM MeJA'nın fesleğenin RA ve KA miktarını önemli oranda artırdığını, bununla paralel olarak, RA ve fenoliklerin oluşumunda sinamik asitten kumarik asit oluşumunu katalizleyen enzim olan cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) mRNA'larının miktarının da önemli oranda arttığını tespit etmişler ve bu sonuçlardan hareketle bitkilerin flavonoid içeriğinin de artmış olabileceğini tahmin etmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen yüksek flavonoid içeriği bu öngörüü

desteklemektedir. Uygulamalar sonucu bitkilerin flavonoid miktarı toplam fenolik madde miktarı ile paralellik göstermektedir.

Çizelge 4.5.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen toplam flavonoid miktarları (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Toplam flavonoid (mg KE/g yaş ağırlık)
Spm (0,1 mM)	0,52±0,13 ^{cde}
Spm (1,0 mM)	0,48±0,05 ^{de}
FA (0,05 mM)	0,73±0,05 ^{a-d}
FA (0,5 mM)	0,66±0,16 ^{a-d}
EBL (0,5 µM)	0,66±0,07 ^{a-e}
EBL (2,0 µM)	0,74±0,09 ^{a-d}
Spm (0,1 mM)+MeJA	0,82±0,06 ^{abc}
Spm (1,0 mM)+MeJA	0,92±0,13 ^a
FA (0,05 mM)+MeJA	0,73±0,10 ^{a-d}
FA (0,5 mM)+MeJA	0,41±0,01 ^e
EBL (0,5 µM)+MeJA	0,76±0,07 ^{a-d}
EBL (2,0 µM)+MeJA	0,85±0,07 ^{ab}
MeJA	0,69±0,09 ^{a-e}
Kontrol A*	0,52±0,03 ^{cde}
Kontrol B**	0,63±0,09 ^{a-e}
p=0,024	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

a, b, c, d Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak önemlidir

4.6. Rozmarinik Asit Miktarı

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen rozmarinik asit değerleri Çizelge 4.6.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde rozmarinik asit miktarına etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Bitkilere ait RA miktarı bakımından en yüksek değere sahip uygulama 1,0 mM Spm+MeJA (2,70 mg/g) uygulaması olmuştur. Bu uygulamayı 2,0 µM EBL+MeJA (2,42 mg/g) ve 0,5 µM EBL+MeJA (2,24 mg/g) uygulamaları takip etmektedir. En düşük RA miktarı 0,5 mM FA+MeJA uygulamasından 1,04 mg/g olarak elde edilmiştir.

Uygulamalar sonucu bitkilerin rozmarinik asit miktarı ile toplam fenolik madde miktarı paralellik göstermektedir. EBL uygulamalarından yüksek RA değerleri elde edilmiştir. Yüksek konsantrasyondaki (2,0 µM) EBL uygulamasına ait RA değeri (2,08 mg/g), daha düşük konsantrasyondaki (0,5 µM) EBL uygulamasının değerinden (1,82 mg/g) daha yüksek bulunmuştur. EBL’lerin tek başına uygulandığı her iki konsantrasyona

ait bitkilerden elde edilen fenolik madde miktarı kontrol grubuna göre yüksek bir değerde gerçekleşmiştir ancak EBL'lerin MeJA ile kombinasyonu daha iyi değerler elde etmemize sebep olmuştur.

Düşük dozda (0,05 mM) FA öncülü uygulanan bitkilerin RA miktarı (1,81 mg/g) istatistiksel olarak kontrol grubu ile aynı değerde gerçekleşmiştir. Yüksek dozda (0,5 mM) FA uygulamasına ait RA değeri ise (1,37 mg/g) kontrol grubundan elde edilen değerden (1,64 mg/g) düşük kalmıştır. Tek başına 0,5 mM MeJA uygulanan bitkilerin RA içeriği (1,81 mg/g) kontrol gruplarının değerlerinden (1,65 ve 1,30 mg/g) yüksek olarak elde edilmiştir.

Fesleğen bitkisi (*Ocimum basilicum* L.) ile yapılan pek çok çalışmada RA fenolik bileşikler içinde ana bileşen olarak tespit edilmiştir (Javanmardi ve ark., 2002; Jayasinghe ve ark., 2003; Nguyen ve Niemeyer, 2008). Adaçayı, biberiye, nane, kekik gibi Lamiacea familyasına ait bitkiler fenolik bileşik olarak RA içermektedir (Fecka ve Turek, 2008; Kivilompolo ve Hyotylainen, 2007). Çalışmamızdaki RA miktarı ve değişimi Kim ve ark. (2006)'nın, 0,5 mM MeJA uygulanan fesleğenlerin toplam fenolik miktarı ile birlikte RA miktarının da paralel bir şekilde artırdığını bildiren çalışma ile, yine fesleğende kitosan elisitörü uygulaması sonucu toplam fenolik ile birlikte RA miktarının da arttığını bildiren çalışmalarla uyummaktadır (Kim ve ark., 2005). Yine başka bir çalışmada Li ve ark. (2007) fesleğene uyguladıkları MeJA ile yaprakların toplam fenolik ve RA miktarının yüksek miktarda arttığını bildirdiği çalışma bulgularımızı desteklemektedir. Ancak çalışmamızda elde ettiğimiz RA değerleri, farklı dalga boyundaki ışığa maruz bırakılan fesleğenlerden elde edilen RA değerlerinden düşük miktarda gerçekleşmiştir (Shiga ve ark., 2009).

Bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamaları sonucu elde ettiğimiz RA değerleri Kwee ve Niemeyer (2011)'in bildirmiş olduğu 0,06–6,09 mg/g kuru ağırlık değerleri ile uyum içindedir. Çalışmamızda RA miktarı daha çok su ihtiva eden yaş bitkide incelendiği ve kuru bitkideki madde miktarının daha yüksek olduğu düşünülürse, araştırmacıların bulmuş olduğu üst sınırlarlardaki değerlere yakın RA değerleri elde ettiğimiz söylenebilir. Yine elde ettiğimiz RA değerleri, Yunanistan şartlarında yetiştirilen fesleğen çeşidinin içerdiği RA değerlerinden (0,004 mg/g kuru ağırlık) oldukça yüksek miktarda gerçekleşmiştir (Lagouri ve Nisteropoulou, 2009). Kuru fesleğen örneği üzerine yapılan bir başka çalışmada ise RA değerleri bizim değerlerimizden yüksek çıkmıştır (Zgorka ve Glowinski, 2001).

Çizelge 4.6.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen rozmarinik asit miktarları (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Rozmarinik asit (mg /g yaş ağırlık)
Spm (0,1 mM)	1,71±0,15 ^{bcd}
Spm (1,0 mM)	1,33±0,20 ^{cd}
FA (0,05 mM)	1,81±0,14 ^{a-d}
FA (0,5 mM)	1,37±0,56 ^{cd}
EBL (0,5 µM)	1,82±0,26 ^{a-d}
EBL (2,0 µM)	2,08±0,21 ^{abc}
Spm (0,1 mM)+MeJA	1,96±0,40 ^{a-d}
Spm (1,0 mM)+MeJA	2,70±0,17 ^a
FA (0,05 mM)+MeJA	1,42±0,30 ^{cd}
FA (0,5 mM)+MeJA	1,04±0,07 ^d
EBL (0,5 µM)+MeJA	2,24±0,34 ^{abc}
EBL (2,0 µM)+MeJA	2,42±0,53 ^{ab}
MeJA	1,81±0,24 ^{a-d}
Kontrol A*	1,30±0,04 ^{cd}
Kontrol B**	1,65±0,32 ^{bcd}
P=0,034	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

a, b, c, d Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak önemlidir

4.7. Şikorik Asit Miktarı

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen şikorik asit değerleri Çizelge 4.7.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde şikorik asit miktarına etkisi istatistiki olarak önemli ($P>0,05$) bulunmamakla birlikte en yüksek şikorik asit miktarı 2,0 µM EBL (0,52 mg/g) uygulamasından elde edilmiştir. En düşük şikorik asit miktarı ise 0,5 mM FA+MeJA (0,39 mg/g) uygulamasından elde edilmiştir. Yapılan bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarının fesleğenlerde şikorik asit miktarına etkileri toplam fenolik içeriğe etkilerinden farklı sonuçlar ortaya çıkarmıştır. Genel olarak uygulamaların fesleğenin şikorik asit miktarına bir etkisi olmadığı gözlenmiştir.

Lee ve Scagel (2009) şikorik asitin fesleğende bulunan ikinci temel fenolik bileşik olduğunu tespit ettikleri çalışmada, fesleğene ait şikorik asit miktarını (0,24 mg/g yaş yaprak) elde ettiğimiz verilerden düşük belirlemiştirlerdir. Elde ettiğimiz ŞA değerleri Kwee ve Niemeyer (2011)’in 15 fesleğen kültüründe elde ettikleri değerler olan 0,03 – 2,56 mg/g kuru ağırlık değerlerine benzer veya biraz düşüktür ancak düşük olmasında analizlerin taze

yapraktan yapılmasının da etkisi bulunmaktadır. Yaş yapraklar kuru yapraklara kıyasla daha çok su içerdiğinden, ŞA konsantrasyonları yaş yapraklarda daha düşük miktarlarda belirlenmiştir.

Günümüzde en önemli şikorik asit kaynağı *Echinacea purpurea* olarak tespit edilmiştir (Nusslein ve ark., 2000), ancak yapılan çalışmalar, ŞA'in marul (*Lactuca sativa* L., Baur ve ark., 2004;), hindiba (*Cichorium intybus* L., Innocenti ve ark., 2005) ve fesleğen (Lee and Scagel, 2009) gibi bazı yiyeceklerde de bulunduğunu göstermiştir. Bunun gibi diğer besin kaynaklarında ve bitkilerde ŞA'in varlığı ve bunun tespit edilmesi önemli bulunmaktadır, çünkü bazı çalışmalarda ŞA'in RA'dan daha güçlü antioksidan aktiviteye sahip olduğu belirtilmektedir (Dalby-Brown ve ark., 2005; Jayasinghe ve ark., 2003).

Çizelge 4.7.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen şikorik asit miktarları (ortalama $\pm$ standart hata)

Uygulamalar	Şikorik asit (mg /g yaş ağırlık)
Spm (0,1 mM)	0,46 $\pm$ 0,03
Spm (1,0 mM)	0,45 $\pm$ 0,03
FA (0,05 mM)	0,45 $\pm$ 0,04
FA (0,5 mM)	0,42 $\pm$ 0,04
EBL (0,5 μ M)	0,47 $\pm$ 0,03
EBL (2,0 μ M)	0,52 $\pm$ 0,03
Spm (0,1 mM)+MeJA	0,42 $\pm$ 0,01
Spm (1,0 mM)+MeJA	0,48 $\pm$ 0,03
FA (0,05 mM)+MeJA	0,44 $\pm$ 0,05
FA (0,5 mM)+MeJA	0,39 $\pm$ 0,01
EBL (0,5 μ M)+MeJA	0,48 $\pm$ 0,00
EBL (2,0 μ M)+MeJA	0,49 $\pm$ 0,06
MeJA	0,48 $\pm$ 0,02
Kontrol A*	0,44 $\pm$ 0,02
Kontrol B*	0,44 $\pm$ 0,03
P=0,505	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

4.8. Kafeik Asit Miktarı

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen kafeik asit değerleri Çizelge 4.8.1'de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde kafeik asit miktarına etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0,05$). Kafeik asit miktarı en yüksek değere sahip uygulama 0,5 μ M

EBL+MeJA (0,102 mg/g) uygulaması olmuştur. Bu uygulamayı 2,0 µM EBL+MeJA uygulanan bitkiler (0,066 mg/g) takip etmiştir. İki farklı kontrol grubundan farklı kafeik asit değerleri elde edilmiştir. Tohumlara hiçbir işlem yapılmadan ekilen Kontrol B grubundan elde edilen kafeik asit değerleri (0,064 mg/g), tohumların 24 saat % 1 etanolde bekletilip ekilen Kontrol A grubundan (0,036 mg/g) elde edilen değere göre daha yüksek bulunmuştur. Tohumları suda bırakma işleminin, bitkilerin kafeik asit miktarını olumsuz yönde etkilediği söylenebilir. Fesleğenlerden elde edilen en düşük kafeik asit miktarı 0,5 mM FA (0,022 mg/g) uygulamasından elde edilmiştir. Fesleğen tohumlarına uygulanan FA öncülünün yüksek dozu olan 0,5 mM konsantrasyon değeri (0,022 mg/g) bitkilerin kafeik asit miktarını kontrol grubu değerlerine (0,064 mg/g) göre düşük miktarlarda gerçekleştirmiştir.

Uygulamalar sonucu bitkilerin kafeik asit miktarı ile toplam fenolik madde miktarı paralellik göstermektedir. Toplam fenolik içerik ve RA miktarı bakımından etkili olduğu tespit edilen Spm+MeJA kombinasyonları, fesleğenlerin içerdiği KA miktarını artırmaya yönelik önemli bir gelişme sağlayamamış, her iki Spm konsantrasyonunda ister tek uygulansın ister Spm ve MeJA birlikte uygulansın, fesleğenlerin KA değerleri ya kontrol grubu değerleri ile aynı ya da düşük değerde gerçekleştirmiştir.

Fenilpropanoid yolundan türevlenen kafeik asit, mercanköşk, misk otu, nane, biberiye, adaçayı ve kekik gibi bitkilerde de bulunmaktadır (Fecka ve Turek, 2008). Javanmardi ve ark. (2002) İran'ın 23 farklı bölgesinden elde ettikleri fesleğenlerin kafeik asit içeriklerinde çok büyük farklılıklar tespit etmişler ve bu çeşitliliğin farklı çevresel etkilerin, bitkide üretilen kimyasal maddelerin biyosentetik yollarında değişikliğe sebep olmasından kaynaklandığını öne sürmüşlerdir. Ayrıca elde ettiğimiz kafeik asit değerleri taze yapraklarda incelendiği için kuru örnek literatürleriyle karşılaştırıldığında farklılıklar göstermektedir.

Bu çalışmada, fesleğenden elde ettiğimiz kafeik asit değerleri, marketten satın alınan fesleğenden elde edilen (0,066 mg/g yaş ağırlık) değerler (Lee ve Scagel, 2009) ve 0,5 mM MeJA uygulanan fesleğenlerden elde edilen kafeik asit (0,2 mg/g yaş ağırlık) değerleri ile uyushmaktadır (Kim ve ark. 2006). Bununla birlikte elde ettiğimiz kafeik asit değerleri, Zgórka ve Głowniak, (2001)'ın fesleğenden elde ettiği 2,5 mg/g kuru ağırlık değerleri ile Toussaint ve ark. (2007)'nın mantarla inoküle edilen fesleğenden elde ettiği kafeik asit değerleri elde ettiğimiz kafeik asit değerlerinden yüksek düzeyde gerçekleştirmiştir. Bununla birlikte elde ettiğimiz kafeik asit miktarı Javanmardi ve ark.

(2002)'nın İran'da yetişmiş fesleğende tespit ettikleri 0,004 mg/g kuru ağırlık değerinden daha yüksek değerler olarak tespit edilmiştir. Bu farklılıkların çalışılan fesleğenlerin farklı kültürler olması, bitkinin büyüme şartları, örnek hazırlama ve analitik metodlardaki farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Çizelge 4.8.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen kafeik asit miktarları (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	Kafeik asit (mg /g yaş ağırlık)
Spm (0,1 mM)	0,060±0,018 ^{bcd}
Spm (1,0 mM)	0,036±0,004 ^{bcd}
FA (0,05 mM)	0,051±0,013 ^{bcd}
FA (0,5 mM)	0,022±0,050 ^d
EBL (0,5 µM)	0,053±0,009 ^{bcd}
EBL (2,0 µM)	0,060±0,004 ^{bcd}
Spm (0,1 mM)+MeJA	0,056±0,007 ^{bcd}
Spm (1,0 mM)+MeJA	0,061±0,002 ^{bc}
FA (0,05 mM)+MeJA	0,026±0,008 ^{cd}
FA (0,5 mM)+MeJA	0,036±0,003 ^{bcd}
EBL (0,5 µM)+MeJA	0,102±0,044 ^a
EBL (2,0 µM)+MeJA	0,066±0,017 ^b
MeJA	0,042±0,005 ^{bcd}
Kontrol A*	0,036±0,010 ^{bcd}
Kontrol B*	0,064±0,010 ^{bc}
P=0,012	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

a, b, c, d Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak önemlidir

4.9. DPPH Üzerinden Serbest Radikal Süpürücü Etki

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen DPPH süpürme etkisi Çizelge 4.9.1'de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde DPPH süpürme etkisi istatistiki olarak önemli bulunmuştur ($P<0,01$). Bitkilere ait DPPH süpürme etkisi en yüksek değere (% 85,67) sahip uygulama 1,0 mM Spm+MeJA uygulaması olmuştur. Bu uygulamaya ait bitkilerden elde edilen DPPH süpürme etkisi kontrol grubuna ait değerden (% 68,33) % 19 daha yüksek bir değer olarak tespit edilmiştir. Bu uygulamaya yakın bir sonuç da 0,1 mM Spm+MeJA uygulamasında (% 84,67) elde edilmiştir.

Spm tek başına uygulanması sonucu elde edilen DPPH süpürme etkisi, Spm+MeJA kombinasyonlarından sonra en yüksek DPPH süpürme etkisi gösteren bitki grupları olarak tespit edilmiştir. Düşük konsantrasyondaki Spm (0,1 mM) uygulamasına ait DPPH

süpürme etkisi % 78,33 olarak gerçekleşirken, 1,0 mM Spm uygulamasına ait değer % 76,67 olarak tespit edilmiştir. Spm uygulamalarından sonra en yüksek DPPH süpürme etkisi değerleri EBL uygulamalarından elde edilmiştir. Her iki EBL+MeJA uygulamalarında fesleğenlerden % 77,5 süpürücü etki tespit edilmiştir. En düşük DPPH üzerinden radikal süpürme etkisi (% 57) 0,5 mM FA+MeJA uygulamasından elde edilmiştir. FA öncülünün tek veya MeJA ile birlikte uygulandığı gruplara ait fesleğenlerden elde edilen DPPH üzerinden radikal süpürme etkisi değerleri en düşük düzeylerde kalmıştır.

Çalışmalarımız sonucunda fesleğenin radikal süpürme etkisi toplam fenolik, toplam flavonoid ve RA miktarı ile ilişkili bulunmuştur. Bu sonuçlar yüksek fenolik ve flavonoid miktarının güçlü DPPH süpürme etkisi olduğunu bildiren çalışmalar ile desteklemektedir (Lagouri ve Boskou, 1996; Kähkönen ve ark., 1999). Önceki çalışmalar Lamiacea familyasında ve fesleğende çok önemli bir bileşik olan RA'nın, yüksek DPPH temizleme potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir (Chen ve Ho, 1997; Kim ve ark., 2005). Fecka ve ark. (2002) tarafından RA'nın yapısında bulunan 4 hidroksil grubunun RA'nın güçlü antioksidan etki göstermesinde etkili olduğunu olduğu söylenmiştir.

Çalışmamızda çok yüksek miktarda toplam fenolik madde içermediği görülen Spm uygulamalarının yüksek DPPH süpürme oranına sahip olması, süpürme etkisinin sadece antioksidan içerik ile değil bitkinin içerdiği antioksidan maddelerin oranı ile ilişkili olduğunu söyleyen görüşlerle uyumludur (Milos ve ark., 2000; Zheng ve Wang, 2001). Araştırmamızda elde ettiğimiz DPPH radikal süpürücü etki Kwee ve Niemeyer (2011)'in 15 fesleğen kültüründe elde ettikleri 3,36-16,76 mmol/100 g kuru ağırlık değerlerinden yüksek olarak elde edilmiştir.

Çizelge 4.9.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen DPPH radikal süpürücü etki değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	DPPH (%)
Spm (0,1 mM)	78,33±0,33 ^{abc}
Spm (1,0 mM)	76,67±0,33 ^{abc}
FA (0,05 mM)	67,64±0,67 ^{cd}
FA (0,5 mM)	64,00±0,67 ^{cd}
EBL (0,5 µM)	75,67±1,53 ^{abc}
EBL (2,0 µM)	71,67±0,67 ^{a-d}
Spm (0,1 mM)+MeJA	84,67±0,58 ^{ab}
Spm (1,0 mM)+MeJA	85,67±0,67 ^a
FA (0,05 mM)+MeJA	58,67±1,33 ^d
FA (0,5 mM)+MeJA	57,00±2,08 ^d
EBL (0,5 µM)+MeJA	77,50±6,5 ^{abc}
EBL (2,0 µM)+MeJA	77,50±1,00 ^{abc}
MeJA	69,33±1,33 ^{a-d}
Kontrol A*	64,67±5,46 ^{cd}
Kontrol B**	68,33±4,26 ^{bcd}
P=0,001	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolda bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

a, b, c, d Aynı sütunda yer alan farklı harfler istatistiki olarak önemlidir

4.10. Fenilalanin Amonyum Liyaz (PAL) Enzim Aktivitesi (µmol t-sinamat sa⁻¹ mg protein⁻¹)

Fesleğen bitkilerine farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncül uygulamalarından elde edilen PAL enzim aktivitesi değerleri Çizelge 4.10.1’de verilmiştir. Uygulamaların fesleğen bitkisinde PAL enzim aktivitesine etkisi istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ($P>0,05$). Çizelge 4.10.1’de görüldüğü gibi uygulamalar sonucu bitkilerin PAL enzim aktivitesinde en yüksek değere sahip uygulama 0,5 µM EBL+MeJA (0,275 µmol t-sinamat sa⁻¹ mg protein⁻¹) uygulaması olmuştur. Bu uygulamayı 0,5 mM FA+MeJA uygulamasına ait değer (0,229 µmol t-sinamat sa⁻¹ mg protein⁻¹) takip etmektedir. Fenilpropanoidlerin sentezinde öncül bir aminoasit olan FA’in bütün uygulamalarından ve EBL uygulamalarından yüksek PAL enzim aktiviteleri elde edilmiştir.

PAL enzim aktivitesi ile ilgili bulmuş olduğumuz değerler Ziaei ve ark. (2012)’nin fesleğenin farklı yetiştirme dönemlerinde incelemiş olduğu PAL enzim aktivitesinde en yüksek PAL aktivitesini çiçeklenme öncesi dönemde elde etmiş olmakla birlikte elde ettiği

0,208-0,81 $\mu\text{mol t-sinamat sa}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ değerleri de elde ettiğimiz PAL aktivite değerleri ile uyumludur.

Fesleğen ile yapılan bir çalışmada toplam fenolik ve toplam terpen miktarının elisitör uygulaması ile arttığını tespit eden araştırmacılar sekonder metabolitler ile elisitör arasındaki ilişkiyi anlamak için PAL aktivitesini de incelemişler ve kontrol grubuna göre elisitör uygulanan fesleğenlerin PAL aktivitesinin 32 kat fazla değer elde etmişlerdir (Kim ve ark., 2005). Araştırmacılar RA miktarının da PAL aktivitesinin artması ile birlikte arttığını belirtmişlerdir. Buna ilaveten *Coleus blumei* ve tütün hücrelerinde ve turp fidelerinde de MeJA uygulamasını takiben PAL aktivitesinin de arttığının tespit edildiği çalışmalar göstermiştir ki, bitkiler herhangi bir strese maruz kalmadan sadece fenilpropanoid yolunun uyarılması ile sekonder metabolitlerin miktarı artabilmektedir (Sharan ve ark., 1998; Szabo ve ark., 1999; Kim ve ark., 2006). Bizim alışmamızda PAL aktivitesi açısından toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarı artışıyla paralel bir artış görülmemesine rağmen, Kim ve ark. (2005)'nın MeJA uyguladıkları turp fidelerinde, uygulamayı takiben 24 saat içinde PAL enzim aktivitesinin en yüksek değere ulaştığı ve bir sonraki 24 saat yüksek kaldıktan sonra azaldığı bildirilen çalışmayla uyum göstermektedir. Çünkü alışmamızda MeJA bir kez tohumdan uygulanmış, bitki yetiştikten sonra da iki defa daha topraktan uygulama yapılmış ve 10 gün sonra bitkiler biçilmiştir. PAL aktivitesinin bu süre içerisinde düştüğü ya da beklenen şekilde yüksek olmadığı tahmin edilmektedir.

Li ve ark. (2007) ekzojen olarak uyguladıkları 0,5 mM MeJA'nın fesleğenin RA ve KA miktarını önemli oranda artırdığını tespit etmişlerdir, bununla paralel olarak, RA ve fenoliklerin oluşumunda sinnamik asitten kumarik asit oluşumunu katalizeleyen enzim olan cinnamic acid 4-hydroxylase (C4H) mRNA'larının miktarının da önemli oranda arttığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar PAL yanında C4H gibi farklı enzimlerin de fenol oluşumunda etkin rol oynadığını göstermişlerdir.

Çizelge 4.10.1. Fesleğen bitkilerinde farklı bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamalarından elde edilen PAL enzim aktivitesi değerleri (ortalama±standart hata)

Uygulamalar	PAL Enzim Aktivitesi ($\mu\text{mol t-sinamat sa}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$)
Spm (0,1 mM)	0,030±0,011
Spm (1,0 mM)	0,056±0,037
FA (0,05 mM)	0,139±0,008
FA (0,5 mM)	0,139±0,035
EBL (0,5 μM)	0,129±0,017
EBL (2,0 μM)	0,120±0,021
Spm (0,1 mM)+MeJA	0,117±0,055
Spm (1,0 mM)+MeJA	0,092±0,033
FA (0,05 mM)+MeJA	0,101±0,008
FA (0,5 mM)+MeJA	0,229±0,139
EBL (0,5 μM)+MeJA	0,275±0,081
EBL (2,0 μM)+MeJA	0,076±0,003
MeJA	0,061±0,008
Kontrol A*	0,040±0,005
Kontrol B**	0,082±0,018
p=0,093	

*Ekim öncesi 24 saat su+etanolde bekletilen tohumlar

**Hiçbir işlem yapılmadan ekilen tohumlar

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında fesleğen (*Ocimum basilicum* cv. Grand Vert) tohumlarına ekim öncesi tek başına uygulanan Spm (0,1 ve 1,0 mM), EBL (0,5 ve 2,0 μ M) ve FA (0,05 ve 0,5 mM) ile bunların MeJA ile farklı kombinasyonlarının (0,1 mM+MeJA, 1,0 mM Spm+MeJA, 0,5 μ M EBL+MeJA, 2,0 μ M EBL+MeJA, 0,05 FA+MeJA, 0,5 mM FA+MeJA), bitkinin çeşitli morfolojik ve verim özelliklerine, uçucu yağ oranı ve bileşenlerine, toplam fenolik, toplam flavonoid miktarı, DPPH üzerinden serbest radikal süpürücü etkisi, PAL aktivitesi, RA, ŞA ve KA miktarına etkileri incelenmiş olup iklim odasında yetiştirilen ve ön çalışma ve literatür verilerine dayanılarak çiçeklenme öncesi biçimi yapılan bitkilerden alınan verim değerleri aşağıda özetlenmiştir.

Uygulamalardan elde edile morfolojik ve verim değerleri incelendiğinde bitki başına yaş ağırlık ve bitki başına yaş yaprak verimi hariç diğer uygulamalar arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. Farklı uygulamaların fesleğen bitkilerinde bitki boyuna etkisi istatistiksel olarak önemsiz olmakla birlikte yüksek bitki boyu değeri 0,5 μ M EBL+MeJA uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulamayı 1,0 mM Spm+MeJA takip etmiştir. Boğum arası uzunluğu yönünden uygulamalar arasında (cm) en yüksek değer 1,0 mM Spm uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulamaları sırasıyla 0,5 μ M EBL uygulaması ile 1,0 Spm mM+MeJA uygulamaları takip etmiştir.

Farklı uygulamalardan elde edilen yaş ağırlık (g) değerleri incelendiğinde en yüksek bitki ağırlık değeri, hiçbir işlem yapılmadan ekilen Kontrol B uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulamayı 0,1 mM Spm+MeJA ve 0,05 mM FA+MeJA uygulaması takip etmiştir. Uygulamalar sonucu elde edilen bitki başına yaş yaprak verimi değerinde de (g), bitkinin yaş ağırlıklarına benzer sonuçlar elde edilmiştir. En yüksek taze yaprak ağırlık değerleri, hiçbir işlem yapılmadan ekilen Kontrol B ile 0,05 mM FA+MeJA ve 0,1 mM Spm+MeJA uygulamalarından elde edilmiştir. Uygulamaların bitkideki ortalama yaprak alanı (cm²) değerlendirildiğinde uygulamaların aksine Kontrol A grubundan en yüksek yaprak alanı elde edilmiştir.

Tezde fesleğen bitkilerine farklı uygulamaların etkisini görebilmek amacıyla bitkilerin çiçeklenme öncesi biçilmesi tasarlanmış ancak biçim zamanı bazı saksılarda çiçeklenme olayının başladığı gözlenmiş, bu sebeple çiçek verimi, başak boyu, başak sayısı değerleri de incelenmiştir. Uygulamalar arasında yüksek taze çiçek verimi (g) 2,0 μ M EBL

uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulamaları sırasıyla 0,1 mM Spm ve 0,05 mM FA takip etmiştir. Farklı uygulamalardan elde edilen başak boyu değerleri içerisinde yüksek başak boyu (cm) 0,05 mM FA ve 0,5 µM EBL uygulamalarından elde edilmiş ve bunu 0,5 µM EBL +MeJA uygulaması takip etmiştir. Başak sayısı yönünden uygulamalar incelendiğinde 0,1 mM Spm uygulamasından yüksek başak sayısı elde edilmiştir.

Farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin öncülünün fesleğenin uçucu yağ ve antioksidan aktivitesi üzerine etkisi de incelenmiş olup sonuçlar aşağıda değerlendirilmiştir.

Kuru yapraktan elde edilen uçucu yağ oranı (%) incelendiğinde uygulamalar arasında en yüksek uçucu yağ oranı 0,5 µM EBL+MeJA uygulamasından elde edilmiştir ve bu değeri Kontrol A grubundan elde edilen değerler izlemiştir. Genel olarak EBL, MeJA ile kombine edildiğinde yüksek yağ verimi elde edilmiştir. Brassinosteroidler terpen grubundan olup uçucu yağ içerisinde terpen gruplarının artışında etkili olduğu gözlenmiştir.

Uçucu yağların içerisindeki bileşenler GC-MS cihazı tespit edilmiş, miktarı ise GC-FID dedektörü ile belirlenmiş olup yağ içerisinde ana bileşenler olarak linalool, 1,8-cineole, eugenol tespit edilmiştir. Özellikle linalool yüksek miktarda bulunduğundan denemede kullandığımız fesleğenin linalool kemotipinde olduğu sonucuna varılmıştır. Uygulanan bitki büyüme düzenleyiciler ve fenilalaninin uçucu yağın kompozisyonuna önemli bir etkisi olmamış olup farklı kemotipler elde edilememiştir.

Farklı uygulamalardan elde edilen linalool bileşeninin yüzde miktarını incelediğimizde en yüksek linalool miktarı Kontrol A ve 0,5 µM EBL uygulamalarından elde edilmiştir. Uçucu yağa benzer şekilde Kontrol A'dan ve EBL'den yüksek linalool elde edilmesi uygulamaların linalool miktarına çok da etkisinin olmadığını göstermektedir. Farklı uygulamalardan elde edilen eugenol bileşeninin miktarı en yüksek 0,5 mM FA+MeJA ile 1,0 mM Spm ve 0,5 mM MeJA uygulanan fesleğenlerden elde edilmiştir. Eugenol bir fenilpropanoid olduğu için fenilpropanoid yolunun öncülü olan fenilalaninin fesleğenlere uygulanması ile eugenol miktarında artış elde edilmiştir. Uygulamalardan elde edilen en yüksek 1,8-cineole miktarı 0,1 mM Spm uygulamasından olmuştur. Diğer uygulamalarda 1,8-cineol oranı yönünden bir artış sağlanamamıştır.

Uygulamalardan elde edilen toplam fenolik miktarı incelendiğinde en yüksek değer 1,0 mM Spm+MeJA uygulamasından elde edilmiştir. Bu uygulamaya ait bitkilerden elde

edilen fenolik madde değeri kontrol grubuna ait fenolik madde miktarından % 40 daha fazla olarak elde edilmiştir. Bu uygulamaya yakın bir sonuç da 1,0 mM Spm+MeJA uygulamasında gerçekleşmiştir. Yüksek fenolik madde elde edilen bir diğer bitki büyüme düzenleyici grubu ise EBL'ler olup 0,5 μ M EBL+MeJA uygulanan bitkilerden yüksek fenol elde edilmiştir.

Toplam flavonoid miktarı yönünden en yüksek verimler uygulamalar arasında 1,0 mM Spm+MeJA uygulamasından elde edilmiştir. Toplam fenolik verimleri ile flavonoid verimleri yönünden elde edilen sonuçlar paralellik göstermektedir. Bu sonuç bir anlamda fenol analizlerinden elde edilen sonuçların doğruluğunu göstermesinin yanında, bitki büyüme düzenleyiciler ve öncül ile birlikte uygulanan MeJA'nın fenoliklerin üretimini artırmasının yanında fenilpropanoid yolundan türevlenen ve fenoliklerin bir çeşidi olan flavonoidlerin üretimine de etki ettiğini göstermektedir.

Fesleğen bitkisinde önemli fenolik bileşikleri oluşturan rozmarinik asit, şikorik asit ve kafeik asitin miktarları da HPLC ile analizi edilmiştir. Rozmarinik asit miktarı en yüksek değere sahip uygulama 1,0 mM Spm+MeJA uygulaması olmuştur. Yüksek rozmarinik asit miktarı toplam fenol ve flavonoidlerin yüksek bulunduğu uygulamadan elde edilmiştir. Uygulamalar arasında en yüksek şikorik asit miktarı 2,0 μ M EBL uygulamasından elde edilmiştir, bunu 1,0 mM Spm+MeJA takip etmiştir. EBL'in bütün konsantrasyon ve kombinasyon uygulamalarında kontrol grubuna göre daha yüksek şikorik asit miktarları saptanmıştır. En yüksek kafeik asit miktarı tespit edilen uygulama 0,5 μ M EBL+MeJA uygulaması olmuştur. Uygulamalara ait kafeik asit miktarı ile toplam fenolik asit miktarı önemli bir korelasyon göstermemiştir.

Farklı uygulamalardan elde edilen antioksidan etkiyi ölçmek amacı ile DPPH metodu kullanılmış olup DPPH süpürme etkisi en yüksek değere sahip uygulama 0,1 mM Spm+MeJA uygulaması olmuştur. Bu uygulamaya yakın bir sonuç da 1,0 mM Spm+MeJA uygulamasında elde edilmiştir. Radikal süpürücü etki bakımından yüksek etki gösteren Spm+MeJA kombinasyonları yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriğenede sahip olup DPPH süpürücü etkinin fesleğenin antioksidan özelliklerini test etmek bakımından güvenilir bir kaynak olduğunu göstermektedir.

Tezin amaçlarından biri PAL enzim aktivitesini artırma ve dolayısı ile fenol miktarını artırmak olduğu için uygulanan uygulamaların PAL enzimi aktivitesine etkisi incelenmiş ve en yüksek enzim aktivitesi değeri 0,5 μ M EBL+MeJA uygulamasından elde

edilmiştir. Bu uygulamadan elde edilen PAL enzim aktivitesi kontrol grubundan oldukça yüksek bulunmuştur. 0,5 mM FA ve 2,0 mM EBL uygulamaları da bu uygulamayı takip etmiştir. Tek başına uygulanan FA, EBL uygulamalarından ve EBL+MeJA uygulamasından diğer uygulamalara göre yüksek PAL enzim aktivitesi elde edilmiştir. Toplam fenol miktarının yüksek olarak elde edildiği 1,0 mM Spm uygulamasından kontrole göre yüksek PAL enzim aktivitesi elde edilmiş ancak FA ve EBL uygulamalarından elde edilen değerlerden düşük değerler olarak saptanmıştır. FA öncülü ise PAL miktarını artırmış ancak fenol miktarında beklediğimiz ölçüde etkisi olmamıştır, bu durum fenol oluşum yolunda farklı enzim sistemlerinde aktif rol aldığını göstermektedir.

Öneriler

Araştırmamızda besin kaynağı olarak sofralarımızda bulunan ve aynı zamanda içerdiği önemli fitokimyasallar sayesinde değerli bir tıbbi ve aromatik bitki olan fesleğenin besinsel ve tıbbi değerini ve aynı zamanda bitkinin morfolojik ve verim özelliklerini artırmak amacıyla Spm, EBL ve FA ve bunlarla birlikte, önemli bir bitkisel hormon ve aynı zamanda bitkide yaralanma ve çeşitli stres durumunda bitkinin cevabının oluşmasında sinyal molekülü olan MeJA hormonu fesleğen tohumlarına uygulanmıştır. Çalışmalarımız sonucu tek başına bitki büyüme düzenleyici ve öncül uygulamasının çok fazla etkisinin olmadığını, özellikle MeJA ve bitki büyüme düzenleyici kombinasyonlarının daha etkili olduğu gösterilmiştir.

Fesleğendeki uçucu yağ miktarı, toplam fenolik, toplam flavonoid ve DPPH radikal süpürücü etki için Spm+MeJA ve EBL+MeJA kombinasyonları olumlu sonuç vermiştir. Çalışmamızın önemli sonuçlarından biri de bitkide yaralanma ve strese benzer tepkiye sebep olduğu söylenen MeJA'nın, Spm gibi bir poliaminle ve EBL gibi önemli bir bitki büyüme düzenleyici ile özellikle sekonder ürünlerde artış sağlamasıdır. Ancak uygulamalar sonucu bitkilerdeki sekonder metabolitlerin artması, bu bitki büyüme düzenleyicilerin ve bunların sinerjistik etkilerinin bitkinin fizyolojik, kimyasal ve moleküler süreçlerine etkilerini ve mekanizmalarını tam olarak anlamamızda yeterli değildir. Bu sebeple bu süreçleri anlamamıza yardımcı olabilecek çeşitli fizyolojik, kimyasal ve moleküler çalışmalara ihtiyaç vardır. Gelecek çalışmalarda Spm+MeJA ve EBL+MeJA uygulamalarının sekonder metabolitlerin üretimini artırmak ve farklı etkilerini görebilmek amacıyla, bu bitki büyüme düzenleyici kombinasyonları farklı konsantrasyonlarda ve farklı bitki grupları ile tarla ve sera koşullarında karşılaştırmalı olarak tekrarlanması önerilebilir.

Çalışmamızda bitkilerde fenolik madde üretimi açısından fenilpropanoid yolunda önemli bir basamağı katalizleyen PAL enzimi aktivitesi, uygulamalar sonucu önemli bir artış gözlenmemiştir. Buna göre PAL enzimi dışında farklı enzimlerinde fenol miktarının artmasında etkin rol oynayabileceği gösterilmiştir. Bu durum PAL enziminin etkisiyle oluşan sinnamik asiti, kumarik asite dönüştüren C4H enziminin rozmarinik asit ve kafeik asit oluşumunda önemli bir enzim olduğunu bildiren çalışmalar sonuçlarımızı destekler niteliktedir. C4H gibi fenilpropanoid yolunda etkin başka enzimlerin de çalışılması gerektiğini göstermektedir.

Bu çalışmada kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerin bitkinin içsel hormon düzeyine etkisi incelenememiştir, bundan sonraki çalışmalarda endojen hormon miktarındaki değişimlerin özellikle stres hormonlarındaki değişimlerin incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abd El-Samad, H. M., Shaddad, M. A. K., Barakat, N., 2011. Improvement of Plants Salt Tolerance By Exogenous Application of Amino Acids. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (24): 5692-5699.
- Aerts, R. J., Gisi, D., De Carolis, E., De Luca, V., 1994. Methyl Jasmonate Vapor Increases the Developmentally Controlled Synthesis of Alkaloids in *Catharanthus* and *Cinchona* Seedlings. *The Plant Journal*, 5: 635-643.
- Agrawal, A. A., Strauss, S. Y., Staut, M. J., 1999. Costs of Induced Responses and Tolerance to Herbivory in Male and Female Fitness Components of Wild Radish. *Evolution*, 53: 1093-1104.
- Akgül, A., 1989. Volatile Oil Composition of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) Cultivating in Turkey, Food Science Department, Faculty of Agriculture, Atatürk University, Erzurum, Turkey, 87-88.
- Arora, N., Bhardwaj, R., Sharma, P., Arora, H.K., 2011. Effects of 28-Homobrassinolide on Growth, Lipid Peroxidation and Antioxidative Enzyme Activities in Seedlings of *Zea mays* L. under Salinity Stress, *Acta Physiol. Plant.*, DOI: s11738_008_0188_9.
- Bais, H. P., Sudha, G., Ravishankar, G. A., 1999. Putrescine Influences Growth and Production of Coumarins in Hairy Root Cultures of Witloof Chicory (*Cichorium intybus* L. cv. Lucknow Local). *Journal of Plant Growth Regulation*, 18:159-165.
- Bais, H. P., Madhusudhan, R., Bhagyalakshmi, N., Rajasekaran, T., Ramesh, B. S., Ravishankar, G. A., 2000. Influence of Polyamines on Growth and Formation of Secondary Metabolites in Hairy Root Cultures of *Beta Vulgaris* and *Tagetes Patula*. *Acta Physiol Plant*, 22: 151–158.
- Bajguz, A., Czerpak, R., 1998. Physiological and Biochemical Role of Brassinosteroids and Their Structure Activity Relationship in the Green Alga *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Chlorophyceae), *Plant Growth Regul.*, 17: 131–139.

- Bajguz, A., Hayat, S., 2009. Effects of Brassinosteroids on the Plant Responses to Environmental Stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 1–8.
- Baldwin, I. T., 1999. The Jasmonate Cascade and The Complexity of The Induced Defense against Herbivore Attack. *Ann. Plant Rev.*, 3: 155–186.
- Barendse, G. W. M., Croes, A. F., Van Den Ende, G., Bosveld, M., Creemers, T., 1985. Role of Hormones on Flower Bud Formation in Thin-Layer Explants of Tobacco. *Biol Plant*, 27: 408–412.
- Barneix, A. J., Humberto, F. C., 1996. The Central Role of Amino Acids on Nitrogen Utilization and Plant Growth. *Journal of Plant Physiology*, 149, 358–362.
- Baron, C., Zambryski, P.C., 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis and woundin-variation on a common theme. *Rev. Genetics*, 29: 107.
- Bassiouny, S.S., Hassanien F. R., Ali, F.R., Kayati, S.M.E., 1990. Efficiency of Antioxidants from Natural Sources in Bakery Products. *Food Chemistry*, 37: 297-305.
- Baur, S., Klaiber, R. G., Koblo, A., Carle, R., 2004. Effect of Different Washing Procedures on Phenolic Metabolism of Shredded, Packaged Iceberg Lettuce during Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7017 – 7025.
- Behnamnia, M., Kalantari, K. M., Rezanejad. F., 2009. Exogenous Application of Brassinosteroid Alleviates Drought-Induced Oxidative Stress in *Lycopersicon Esculentum* L. *General and Applied Plant Physiology*, 35 (1–2): 22–34.
- Benedec, D., Vlase, L., Hanganu, D., Oniga, I., 2012. Antioxidant Potential and Polyphenolic Content of Romanian *Ocimum basilicum*. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 7 (3): 1263 – 1270.
- Bouchereau, A., Aziz, A., Larher, F., Martin-Tanguy, J., 1999. Polyamines and Environmental Challenges: Recent Development. *Plant Science*, 140: 103-125.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective. *Plant Science*, 839–851.

- Bradford, M. M., 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-255.
- Chai, Y. Y., Jiang, C. D., Shi, L., Shi, T. S., Gu, W. B., 2010. Brief Communication Effects of Exogenous Spermine on Sweet Sorghum during Germination under Salinity. *Biologia Plantarum*, 54 (1): 145-148.
- Chen, J. H., Ho, C. T., 1997. Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2374-2378.
- Chen, H., Jones, A. D., Howe, G. A., 2006. Constitutive Activation of the Jasmonate Signaling Pathway Enhances the Production of Secondary Metabolites in Tomato. *FEBS Letters*, 580, 2540–2546.
- Cheong, J-J., Choi, Y. D., 2003. Methyl Jasmonate As A Vital Substance in Plants. *Trends in Genetic*, 7, 409–413.
- Clouse, S. D., Sasse, J. M., 1998. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: 427–451.
- Cohen, S., Flescher, E., 2009. Methyl Jasmonate: A Plant Stress Hormone as an Anti-Cancer Drug. *Phytochemistry*, 70, 1600–1609.
- Coley, P. D., Bryant, J. P., Chapin, F. S., 1985. Resource Availability and Plant Antiherbivore Defense. *Science*, 230: 895-899.
- Creelman, R. A., Mullet, J. E., 1997. Biosynthesis and Action of Jasmonates in Plant. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 48: 355-381.
- Creelman, R. A., Rao, M. V., 2002. The Oxylin Pathway in Arabidopsis. The Arabidopsis Book (Editörler: Somerville, C. R., Meyerowitz, E. M.). American Society of Plant Biologists, USA.
- Croteau, R., Kutchan, T. M., Lewis, N. G., 2000. Biochemistry & Molecular Biology of Plants (Editörler: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R.). American Society of Plant Physiologists. Chapter 24.

- Çetin, B., 2006. *Rubia Tinctorum* Bitkisinde *Agrobacterium Rhizogenes* Aracılığıyla Transforme Saçaklı Kök Kültürlerinin Oluşturulması ve Sekonder Metabolit Üretimi. Doktora Tezi. Celal Bayar Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. 54 s.
- Dalby-Brown, L., Barsett, H., Landbo, A. K., Meyer, A. S., Molgaard, P., 2005. Synergistic Antioxidative Effects of Alkamides, Caffeic Acid Derivatives, and Polysaccharide Fractions from *Echinacea purpurea* on in Vitro Oxidation of Human Low-Density Lipoproteins. *J. Agric Food Chem.*, 53(24): 9413-23.
- Dathe, W., Ronsch, H., Preiss, A., Schade, W., Sembdner, G., Schreiber, K., 1981. Endogenous Plant Hormones of the Broad Bean, *Vicia Faba* L. (–) Jasmonic Acid, A Plant Growth Inhibitor in Pericarp. *Planta*, 153: 530-535.
- Davies, P. J., 1995. Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology (Editor: Davies. Second ed.). Kluwer, Dordrecht, Netherlands. s.1-12.
- De La Barrera, E., Nobel, P.S., 2002. Physiological Ecology of Seed Germination for the Columnar Cactus *Stenocereus queretaroensis*. *Journal of Arid Environment*, 53: 297–306.
- Deshpande, R. S., Tipnis, H. P., 1997. Insecticidal Activity of *Ocimum basilicum* L. *Pesticides*, 11: 1–12.
- Dos Santos, W. D., Ferrarese, M. L. L., Finger, A., Teixeira, A. C. N., Ferrarese-Filho, O., 2004. Lignification and Related Enzymes in *Glycine Max*. Root Growth-Inhibition by Ferulic Acid. *J. Chem. Ecol.*, 30 (6): 1203–1212.
- Doughty, K., Kiddle, G. A., Pye, B. J., Wallsgrove, R. M., Pickett, J. A., 1995. Selective Induction of Glucosinolates in Oilseed Rape Leaves by Methyl Jasmonate. *Phytochemistry*, 38: 347-350.
- Edhahiro, J-I., Nakamura, M., Seki, M., Furusaki, S., 2005. Enhanced Accumulation of Anthocyanin in Cultured Strawberry Cells by Repetitive Feeding of L-Phenylalanine into the Medium. *J. Biosci Bioeng*, 99 (1): 43–47.

- Eskandari, M., Eskandari, A., 2013. Effects of 28-homobrassinolide on Growth, Photosynthesis and Essential Oil of *Satureja khuzestanica*. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 5(3): 36-41.
- Evans, P. T., Malmberg, R. L., 1989. Do Polyamines Have Roles in Plant Development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 40: 235-269.
- Fariduddin, Q., Khanam, S., Hasan, S. A., Ali, B., Hayat, S., Ahmad, A., 2009. Effect of 28-Homobrassinolide on the Drought Stress Induced Changes in Photosynthesis and Antioxidant System of *Brassica juncea* L., *Acta Physiol Plant.*, 31, 889–897.
- Farmer, E. E., Ryan, C. A., 1990. Interplant Communication, Airborne Methyl Jasmonate Induces Synthesis of Proteinase Inhibitors in Plant Leaves. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 7713-7716.
- Farmer, E. E., Ryan, C.A., 1992. Octadecanoid Precursors of Jasmonic Acid Activate the Synthesis of Wound-Inducible Proteinase Inhibitors. *Plant Cell*, 4: 129-134.
- Fecka, I., Turek, S., 2008. Determination of Polyphenolic Compounds in Commercial Herbal Drugs and Spices from Lamiaceae: Thyme, Wild Thyme and Sweet Marjoram by Chromatographic Techniques. *Food Chemistry*, 108: 1039–1053.
- Feeny, P., 1976. Plant Apparency and Chemical Defense. *Recent Advances in Phytochemistry*, 10, 1-40.
- Ferrarese, M. L. L., Rodrigues, J. D., Ferrarese-Filho, O., 2000. Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity in Soybean Roots Extract Measured by Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Plant Biology*, 2, 152-153.
- Fleisher, A., 1981. Essential Oils from two Varieties of *Ocimum basilicum* L. Grown in Israel. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 32: 1119-1122.
- Flores, H. E., Galston, A. W., 1984. Osmotic Stress-Induced Polyamine Accumulation in Cereal Leaves. I. Physiological Parameters of the Response. *Plant Physiol.*, 75: 102-109.

- Flores, H. E., Martin-Tanguy, J., 1991. Polyamines and Plant Secondary Metabolites. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants* (Editörler: Slocum, R. D., Flores, H. E.). CRC Press, Boca Raton, Florida, s. 57-76.
- Franceschi, V. R., Grimes, H. D., 1991. Induction of Soybean Vegetative Storage Proteins and Anthocyanins by Low-Level Atmospheric Methyl Jasmonate. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, 88: 6745–6749.
- Gagnon, H., Ibrahim, R. K., 1997. Effects of Various Elicitors on the Accumulation and Secretion of Isoflavonoids in White Lupin. *Phytochemistry*, 44(8): 1463-1467.
- Gallardo, M., Matilla, A., Muñoz de Rueda, P., Sánchez-Calle, I. M., 1996. Role of Polyamines in Growth and Development. *Ars. Pharm.*, 37 (1): 17-27.
- Gapper, C., Dolan, L., 2006. Control of Plant Development by Reactive Oxygen Species. *Plant Physiology*, 141: 341–345.
- Gould, N., Reglinski, T., Northcott, G. L., Spiers, M., Taylor, J. T., 2009. Physiological and Biochemical Responses in *Pinus Radiata* Seedlings Associated with Methyl Jasmonate-Induced Resistance to *Diplodia pinea*. *Physiological and Molecular. Plant Pathology*, 74: 121–128.
- Graham, T. L., Graham, M. Y., 1996. Signaling in Soybean Phenylpropanoid Responses. Dissection of Primary, Secondary, and Conditioning Effects of Light, Wounding, and Elicitor Treatments. *Plant Physiology*, 110: 1123-1133.
- Gundlach H., Muller M. J., Kutchan T. M. , Zenk M. H., 1992. Jasmonic Acid is A Signal Transducer in Elicitor-Induced Plant Cell Cultures. *Plant Biology*, 89 (3): 2389-2393.
- Han, Y. S., Heijden, V., Verpoorte, R., 2001. Biosynthesis of Antraquinones in Cell Cultures of the Rubiaceae. *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 67: 201-220.
- Hanzawa, Y., Takahashi, T., Michael, A. J., Burtin, D., Long, D., Pineiro, M., Coupland, G., Komeda, Y., 2000. ACAULIS5, an Arabidopsis Gene Required for Stem Elongation, Encodes A Spermine Synthase. *EMBO J.*, 19: 4248–4256.

- Hao, G., Ji, H., Li, Y., Shi, R., Wang, J., Feng, L., Huang, L., 2012. Exogenous ABA and Polyamines Enhanced Salicylic Acids Contents in Hairy Root Cultures of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. alba. *Plant Omics Journal*, 5(5):446-452.
- Hayat, S., Ahmad, A., 2003. *Brassinosteroids: Bioactivity and Crop Productivity*. (Editörler: Hayat, S., Ahmad, A.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Hayat, S., Mori, M., Fariduddin, Q., Bajguz, A., and Ahmad, A., 2010. Physiological Role of Brassinosteroids: An Update. *Indian J. Plant Physiol.*, 15: 99–109.
- Heijari, J., Nerg, A-M, Kainulainen, P., Viiri, H., Vuorinen, M., Holopainen, J. K., 2005. Application of Methyl Jasmonate Reduces Growth, but Increases Chemical Defence and Resistance against *Hylobius abietis* in Scots Pine Seedlings. *Entomol. Exp. Appl.*, 115: 117-124.
- Heredia, J. B., Cisneros-Zevallos, L., 2009. The Effect of Exogenous Ethylene and Methyl Jasmonate on PAL Activity, Phenolic Profiles and Antioxidant Capacity of Carrots (*Daucus carota*) under Different Wounding Intensities. *Postharvest Biology And Technology*, 51, 242–249.
- Hoenicke, K., Simat, T. J., Steinhart, H., Kohler, H. J., Schwab, A., 2001. Determination of Free and Conjugated Indole-3-Acetic Acid, Tryptophan and Tryptophan Metabolites in Grape Must and Wine. *J Agric. Food Chem.*, 49: 5494–5501.
- Horbowicz, M., Chrzanowski, G., Koczkodaj, D., Mitrus, J., 2011. The Effect of Methyl Jasmonate Vapors on Content of Phenolic Compounds in Seedlings of Common Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 80 (1): 5-9.
- Imai, A., Matsuyama, T., Hanzawa, Y., Akiyama, T., Tamaoki, M., Saji, H., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., Komeda, Y., Takahashi, T., 2004. Spermidine Synthase Genes Are Essential for Survival of Arabidopsis, *Plant Physiol.*, 135, 1565–1573.

- Innocenti, M., Gallori, S., Giaccherini, C., Ieri, F., Vincieri, F. F., Mulinacci, N., 2005. Evaluation of the Phenolic Content in the Aerial Parts of Different Varieties of *Cichorium intybus* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6497–6502.
- Iqbal, M., Ashraf, M., 2006. Wheat Seed Priming In Relation To Salt Tolerance: Growth Yield And Levels Of Free Salicylic Acid And Polyamines. *Ann. Bot. Fennici*, 250-259.
- Janoudi, A., Flore, J. A., 2003. Effects of Multiple Applications of Methyl Jasmonate on Fruit Ripening, Leaf Gas Exchange and Vegetative Growth in Fruit Trees. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.*, 78: 793-797.
- Javanmardi, J., Khalighi, A., Kashi, A., Bais, H. P., Vivanco, J. M., 2002. Chemical Characterization of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Found in Local Accessions and Used in Traditional Medicines in Iran. *J. Agric. Food Chem.*, 50 (21): 5878-5883.
- Jayasinghe, C., Gotoh, N., Aoki, T., Wada, S., 2003. Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric Food Chem.*, 51(15): 4442-4449.
- Johnson, C. B., Kirby, J., Naxakis, G., Pearson, S., 1999. Substantial UV-B- mediated Induction of Essential Oils in Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Phytochemistry*, 51: 507-510.
- Jonaš, M., Salaš, P., Baltazar, T., 2012. Effect of Exogenously Application Selected Phytohormonal Substances on the Physiological and Morphological Indicators of Philadelphus X Hybrid in Containers. *Acta Univ. Agric. Et Silv. Mendel. Brun.*, 60: (8), 109–118.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M., 1999. Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *J. Agric. Food Chem.*, 47: 3954-3962.
- Karakaya, S., El, S. N., 1997. Flavonoidler ve Sağlık. *Beslenme ve Diyet Dergisi*, 26 (2): 54-60.

- Karaman, Ş., İlçim, A., Kireççi, O. A., 2008. Influence of Polyamines (Spermine, Spermidine and Putrescine) on the Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal Of Essential Oil Research*, 20 (4): 288-292.
- Kaur-Sawhney, R., Tiburcio, A. F., Altabella, T., Galston, A. W., 2003. Polyamines in Plants: An Overview. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 2: 1-12.
- Khripach, V., Zhabinskii, V., De Groot, A., 2000. Twenty Years of Brassinosteroids: Steroidal Plant Hormones Warrant Better Crops for the XXI Century. *Annals of Botany*, 86: 441-447.
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X., Rajapakse, N. C., 2005. Effect of Chitosan on the Biological Properties of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 53: 3696-3701.
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X., Choi, J-H., 2006. Effect of Methyl Jasmonate on Phenolics, Isothiocyanate, and Metabolic Enzymes in Radish Sprout (*Raphanus Sativus* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 54: 7263-7269.
- Kim, H. J., Chen, F., Wang, X., Rajapakse, N. C., 2006. Effect of Methyl Jasmonate on Secondary Metabolites of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 54: 2327-2332.
- Kim, H-J., Fonseca, J. M., Choi, J-H., Chieri Kubota, C., 2007. Effect of Methyl Jasmonate on Phenolic Compounds and Carotenoids of Romaine Lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 55 (25): 10366–10372.
- Kireççi, O. A., 2006. Bazı Sentetik Hormonların (Giberellik Asit, Spermin, Spermidin, Putresin) Fesleğen Bitkisinde (*Ocimum Basilicum* L.) Morfolojik Yapı ve Uçucu Yağ Kalitesine Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kahramanmaraş. 68 s.
- Kivilompolo, M., Hyotylainen, T., 2007. Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography in Analysis of Lamiaceae Herbs: Characterization and Quantification of Antioxidant Phenolic Acids. *Journal of Chromatography A*, 1145: 155–164.

- Koetje, D. S., 2003. Jasmonates. *Encyclopedia of Hormones*. (Editörler: Henry, H. L. ve Norman, A. W.) Academic Press, San Diego, CA, vol: 2, s. 523-528.
- Kondo, S., Tsukada, N., Niimi, Y., & Seto, H., 2001. Interactions between Jasmonates and Absciscic Acid in Apple Fruit, and Stimulative Effect of Jasmonates on Anthocyanin Accumulation. *Journal of Japan Society for Horticultural Science*, 70: 546–552.
- Kovacık, J., Klejdus, B., Backor, M., Repcak, M., 2007. Phenylalanine Ammonia-Lyase Activity and Phenolic Compounds Accumulation in Nitrogen-Deficient *Matricaria Chamomilla* Leaf Rosettes. *Plant Sci.*, 172: 393–399.
- Krishna, P., 2003. Brassinosteroid-Mediated Stress Responses. *J. Plant Growth Regul.*, 22: 289–297.
- Kusano, T., Yamaguchi, K., Berberich, T., Takahashi, Y., 2007. Advances in Polyamine Research in 2007. *J. Plant Res.*, 120: 345 – 350.
- Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., Takahashi, Y., 2008. Polyamines: Essential Factors for Growth and Survival. *Planta*, 228,: 367 – 381.
- Kwee, E. M., Niemeyer, E. D., 2011. Variations in Phenolic Composition and Antioxidant Properties among Fifteen Basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chem.* 128:1044–1050.
- Labra, M., Miele, M., Ledda, B., Grassi, F., Mazzei, M., Sala, F., 2004. Morphological Characterization, Essential Oil Composition and DNA Genotyping of *Ocimum basilicum* L. Cultivars. *Plant Sci.*, 167: 725–731.
- Lagouri, V., Boskou, D., 1996. Nutrient Antioxidants in Oregano. *International J. Food Science*, 47: 439-497.
- Lagouri, V., Nisteropoulou, E., 2009. Antioxidant properties of *O. onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. *Journal of Food Lipids*, 16: 484–498.
- Lavola, A., 1998. Accumulation of Flavonoids and Related Compounds in Birch Induced by UV-B Irradiance. *Tree Physiol.*, 18: 53-58.

- Lawrence, B. M., 1998. Progress in Essential Oils. *Perfum. Flavor.*, 23 (6): 35–48.
- Lee, J., Scagel, C. F., 2009. Chicoric Acid Found in Basil (*Ocimum Basilicum* L.) Leaves. *Food Chemistry*, 115: 650 – 656.
- Lee, J., Scagel, C. F., 2010. Chicoric Acid Levels in Commercial Basil (*Ocimum basilicum*) and *Echinacea purpurea* Products. *Journal of Functional Food*, 2: 77 – 84.
- Lee, S. J., Umamo, K., Shibamoto, T., Lee, K. G., 2005. Identification of Volatile Components in Basil (*Ocimum basilicum* L.) and Thyme Leaves (*Thymus Vulgaris* L.) and Their Antioxidant Properties. *Food Chemistry*, 91: 131–137.
- Leumaux, P. G., 1999. Plant growth Regulators and Biotechnology. URL (erişim tarihi: 15.12.2013) <http://ucbiotech.org/resources/biotech/talks/misc/regulat.html>
- Lewinsohn, E., Ziv-Raz, I., Dudai, N., Tadmor, Y., Lastochkin, E., Larkov, O., Chaimovitsh, D., Ravid, U., Putievsky, E., Pichersky, E., Shoham, Y., 2000. Biosynthesis of Estragole and Methyl-Eugenol in Sweet Basil (*Ocimum Basilicum* L): Developmental and Chemotypic Association of Allylphenol O-Methyltransferase Activities. *Plant Sci.*, 160, 27–35.
- Li, J., Chory, J., 1999. Brassinosteroid Actions in Plants. *J. Exp. Bot.*, 332:275–282.
- Li, J., Nagpal, P., Vitart, V., Mcmorris, T. C., Chory, J., 1996. A Role for Brassinosteroids in Light Dependent Development of Arabidopsis. *Science*, 272: 398–401.
- Li, Z., Wang, X., Chen, F., Kim, H. J., 2007. Chemical Changes and Overexpressed Genes in Sweet Basil (*Ocimum Basilicum* L.) upon Methyl Jasmonate Treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 55: 706-713.
- Loivamaki, M., Holopainen, J. K., Nerg, A. M., 2004. Chemical Changes Induced by Methyl Jasmonate in Oilseed Rape Grown in the Laboratory and in the Field. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 7607-7613.
- Maciejewska, B., Kopcewicz, J., 2002. Inhibitory Effect of Methyl Jasmonate on Flowering and Elongation Growth in *Pharbitis nil*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21, 216-223.

- Maheshwari, M. L., Singh, B. M., 1989. Introduction of European Basils (*Ocimum basilicum* L.) in India. *Indian Perfumer*, 33(3): 211-214.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Jimenez, L., 2004. Polyphenols: Food Sources and Bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79: 727-747.
- Marotti, M., Piccaglia, R., Giovanelli, E., 1996. Differences in Essential Oil Composition of Basil (*Ocimum basilicum* L.) Italian Cultivars Related to Morphological Characteristics. *J. Agric. Food Chem.*, 44: 3926-3929.
- Mathew, R., Sankar, P. D., 2012. Effect of Methyl Jasmonate and Chitosan on Growth Characteristics of *Ocimum basilicum* L., *Ocimum sanctum* L. and *Ocimum gratissimum* L. Cell Suspension Cultures. *African Journal of Biotechnology*, 11 (21): 4759-4766.
- Menaker, A., Kravets, M., Koel, M., Orav, A., 2004. Identification and Characterization of Supercritical Fluid Extracts from Herbs. *Comptes Rendus Chimie*, 7 (6-7): 629-633.
- Milos, M., Mastelic, J., Jerkovic, I., 2000. Chemical Composition and Antioxidant Effect of Glycosidically Bound Volatile Compounds from Oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chem.*, 71: 79-83.
- Mussig, C., Altmann, T., 1999. Physiology and Molecular Mode of Action of Brassinosteroids. *Plant Physiol. Biochem.*, 37: 163– 372.
- Mutlu, F., Bozcuk, S., 2000. Effects of Exogenous Spermine on Seed Germination and Early Growth of Sunflower Seeds under Salinity Stress. *Turkish Journal of Biology*, 24(3): 635-643.
- Nacar, Ş., 1997. Farklı Yörelere Sağlanan Fesleğin (*Ocimum basilicum* L.) Bitkilerinde Değişik Ekim Sıklığının Verim ve Kaliteye Etkisi. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.
- Naeem, M., Idrees, M., Alam, M. M., Aftab, T., Khan, M. M. A., Moinuddin., 2012. Brassinosteroid Mediated Enrichment in Yield Attributes, Active Constituents and Essential Oil Production in *Mentha arvensis* L. *Russian Agricultural Sciences*, 38: 106–113.

- Nakamura, A., Fujiwara, S., Matsumoto, I., Abe, K., 2009. Stress Repression in Restrained Rats by (R)-(-)-Linalool Inhalation and Gene Expression Profiling of Their Whole Blood Cells. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (12): 5480-5485.
- Nguyen, P. M., Niemeyer, E. D., 2008. Effects of Nitrogen Fertilization on the Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Basil (*Ocimum basilicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 8685–8691.
- Nomura, T., Nakayama, N., Reid, J. B., Takeuchi, Y., Yokota, T., 1997. Blockage of Brassinosteroid Biosynthesis and Sensitivity Cause Dwarfism in *Pisum sativum*. *Plant Physiol.*, 113: 31-37.
- Nonotny, L., Vachalkova, A., Biggs, D., 2001. Ursolic Acid: Anti-Tumorigenic and Chemopreventive Activity. *Neoplasma*, 48: 241–246.
- Nusslein, B., Kurzmann, M., Bauer, R., Kreis, W., 2000. Enzymatic Degradation of Chicoric Acid in *Echinacea Purpurea* Preparations. *Journal of Natural Products*, 63, 1615–1618.
- Opalchenova, G., Obrenskova, D., 2002. Comparative Studies on the Activity of Basil and Essential Oil from *Ocimum Basilicum* L. against Multidrug Resistant of the Genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by Using Different Test Methods. *Journal of Microbiological Methods*, 54: 105-110.
- Ozawa, R., Berteau, C. M., Foti, M., Narayana, R., Arimura, G., Muroi, A., Horiuchi, J., Nishioka, T., Maffei, M. E., Takabayashi, J., 2009. Exogenous Polyamines Elicit Herbivore-Induced Volatiles in Lima Bean Leaves: Involvement of Calcium, H₂O₂ and Jasmonic Acid. *Plant Cell Physiol.*, 50 (12): 2183–2199.
- Özcan, M., Chalchat, J. C., 2002. Essential Oil Composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum minumum* L. in Turkey. *Czechoslovak Journal of Food Science*, 20 (6): 223-228.
- Padilla, I. M. G., Encina, C. L., 2002. In Vitro Germination of Cherimoya (*Annona Cherimola* Mill.) Seeds. *Scientia Horticulturae*, 97: 219-227.

- Palacioa, L., Canteroa, J. J., Cusidob, R., Goleniowski, M., 2011. Phenolic Compound Production by *Larrea divaricata* Cav. Plant Cell Cultures and Effect of Precursor Feeding. *Process Biochemistry*, 46: 418–422.
- Pare, P. W., Tumlinson, J. H., 1999. Plant Volatiles As a Defense Against Insect Herbivores. *Plant Physiology*, 121: 325–331.
- Perez, A. G., Sanz, C., Olias, R., Olias, J. M., 1997. Effect of Methyl Jasmonate on in Vitro Strawberry Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3733–3737.
- Pichersky, E., Gershenzon, J., 2002. The Formation and Function of Plant Volatiles: Perfumes for Pollinator Attraction and Defense. *Curr. Opin Plant Biol.*, 5: 237–243.
- Qu, J-G., Zhang, W., Jin, M-F., Yu, X-J., 2006. Effect of Homogeneity on Cell Growth and Anthocyanin Biosynthesis in Suspension Cultures of *Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22 (5): 805–810.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavarz, T., 2003. Elicitation of Plants and Microbial Cell Systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 37: 91-102.
- Rajasekaran, L. R., Blake, T. J., 1999. New Plant Growth Regulators Protect Photosynthesis and Enhance Growth under Drought of Jack Pine Seedlings. *J. Plant Growth Regul.*, 18:175–181.
- Ramesh, B. S., Ravishankar, G. A., 2000. Influence of Polyamines on Growth and Formation of Secondary Metabolites in Hairy Root Cultures of *Beta vulgaris* and *Tagetes patula*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 22 (2): 151-158.
- Rao, R. S., Ravishankar, G. A., 2002. Plant Cell Cultures: Chemical Factories of Secondary Metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 101-153.
- Ravnikar, M., Rode, J., Gogala, N., Benedicic, D., 1990. Regulation of Organogenesis with Jasmonic Acid. *Acta Horti.*, 280: 169-172.
- Redman, A. M., Cipollini, D. F., Schultz, J. C., 2001. Fitness Costs of Jasmonic Acid-Induced Defense in Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Oecologia*, 126: 380–385.

- Rhoades, D. F., Cates, R. G., 1976. Towards a General Theory of Plant Antiherbivore Chemistry. *Recent Adv. Phytochem.*, 10: 168-213.
- Riedel, H., Akumo, D. N., Saw, N. M. M. T., Kütük, O., Neubauer, P., Smetanska, I., 2012. Elicitation and Precursor Feeding Influence Phenolic Acids Composition in *Vitis Vinifera* Suspension Culture. *African Journal of Biotechnology*, 11(12): 3000-3008.
- Ryu, S. Y., Lee, C. K., Lee, C. O., Kim, H. S., Zee, O. P., 1992. Antiviral Triterpenes from *Prunella vulgaris*. *Arch. Pharm. Res.*, 15: 242–245.
- Saltveit, M. E., 2004. Effect of 1-Methylcyclopropene on Phenylpropanoid Metabolism, The Accumulation Of Phenolic Compounds, and Browning of Whole and Fresh-Cut ‘Iceberg’ Lettuce. *Postharvest Biol. Technol.*, 34: 75-80.
- Sampedro, L., Moreira, X., Zas, R., 2011. Resistance and Response of *Pinus pinaster* Seedlings to *Hylobius abietis* after Induction with Methyl Jasmonate. *Plant Ecology*, 212: 397-401.
- Sanchez-Moreno, C., Larraur, J., Saura-Calxto, F., 1998. A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 76 (2): 270-276.
- Saniewski, M., Czapski, J., 1983. The Effect of Methyl Jasmonate on Lycopene and B-Carotene Accumulation in Ripening Red Tomatoes. *Experientia*, 39: 1373–1374.
- Saniewski, M., Miyamoto, K., Ueda, J., 1998. Methyl Jasmonate Induces Gums and Stimulates Anthocyanin Accumulation in Peach Shoots. *Journal of Plant Growth Regulation*, 17: 121–124.
- Saniewski, M., Horbowicz, M., Kanlayanarat, S., 2010. Possibilities of Practical Use of Jasmonates in Production of Fruits and Vegetables. *Acta Horticulturae*, 875: 37-48.
- Sasse, J.M., 2003. Physiological Actions of Brassinosteroids: An Update. *J. Plant Growth Regul.*, 22: 276–288.
- Scagel, C. F., Lee, J., 2012. Phenolic Composition of Basil Plants is Differentially Altered by Plant Nutrient Status and Inoculation with Mycorrhizal Fungi. *Hortscience*, 47: 660-671.

- Schaller, F., Biesgen, C., Mussig, C., Altmann, T., Weiler, E.W., 2000. 12-Oxophytodienoate Reductase 3 (OPR 3) is the Isoenzyme Involved in Jasmonate Biosynthesis. *Planta*, 210: 979–984.
- Seo, H. S., Song, J. T., Cheong, J. J., Lee, Y. H., Lee, Y. W., Hwang, I., Lee, J. S., Choi, Y. D., 2001. Jasmonic Acid Carboxyl Methyltransferase: A Key Enzyme for Jasmonate-Regulated Plant Responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 4788–4793.
- Shahbaz, M., Ashraf, M., 2007. Influence of Exogenous Application of Brassinosteroid on Growth and Mineral Nutrients of Wheat (*Triticum aestivum* L.) under Saline Conditions. *Pak. J. Bot.*, 39 (2): 513-522.
- Sharan, M., Taguchi, G., Gonda, K., Jouke, T., Shimosaka, M., Hayashida, N., Okazaki, M., 1998. Effects of Methyl Jasmonate and Elicitor on the Activation of Phenylalanine Ammonia-Lyase and the Accumulation of Scopoletin and Scopolin in Tobacco Cell Cultures. *Plant Science*, 132: 13-19.
- Sharma, I., Pati, P.K., Bhardwaj, R., 2011. Effect of 28-Homobrassinolide on Antioxidant Defence System in *Raphanus sativus* L. under Chromium Toxicity, *Ecotoxicol.*, DOI 10.1007/s10646_011_0650_0.
- Shiga, T., Shoji, K., Shimada, H., Hashida, S-N., Goto, F., Yoshihara, T., 2009. Effect of Light Quality on Rosmarinic Acid Content and Antioxidant Activity of Sweet Basil *Ocimum basilicum* L. *Plant Biotechnology*, 26: 255–259.
- Shinde, A. N., Malpathak, N., Fulzele, D. P., 2009. Optimized Production of Isoflavones in Cell Cultures of *Psoralea corylifolia* L., Using Elicitation and Precursor Feeding. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 14: 612-618.
- Sifola, M. I., Barbieri, G., 2006. Growth, Yield and Essential Oil Content of Three Cultivars of Basil Grown under Different Levels of Nitrogen in the Field. *Scientia Horticulturae*, 108: 408-413.
- Simon, J. E., Quinn, J., Murray, R. G., 1990. Advances in New Crops. Basil A Source of Essential Oils. (Editörler: Janick, J., Simon, J. E.) Timber press, Portland, OR. s. 484–489.

- Simon, J. E., Morales, M. R., Phippen, W. B., Vieira R. F., Hao, Z., 1999. Basil: A Source of Aroma Compounds and A Popular Culinary and Ornamental Herb. Perspectives on New Crops and New Uses (Editör: Janick, J.). ASHS Press, Alexandria, V.A. s. 499-505.
- Singh, G., Gavrieli, J., Oakey, J. S., Curtis, W. R., 1998. Interaction of Methyl Jasmonate, Wounding and Fungal Elicitation during Sesquiterpene Induction in *Hyoscyamus muticus* in Root Cultures. *Plant Cell Rep.*, 17: 391-395.
- Singleton, V. L., Rossi, J. R., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolibdic-Phosphothungstic Acid. *Amer. J. Enol. Vitic.*, 16: 144-158.
- Slocum, R. D., Galston, A. W., 1985. Changes in Polyamine Biosynthesis Associated with Post Fertilization Growth and Development in Tobacco Ovary Tissues. *Plant Physiol.*, 79: 336–343.
- Smith, T. A., 1982. The Function and Metabolism of Polyamines in Higher Plants. Plant Growth Substances 1982 (Editör: Wareng, P. F.) Academic Press, s.463-472.
- Song, J. T., Seo, H. S., Song, S. I., Lee, J. S., Choi, Y. D., 2000. NTR1 Encodes A Floral Nectar-Specific Gene in *Brassica Campestris* L. ssp. *pekinensis*. *Plant Mol. Biol.*, 42: 647–655.
- Srivastava, A. K., 1980. French Basil and It's Cultivation in India. Farm Bulletin, Central Institute of Medicinal And Aromatic Plants, India. 16: 1-15.
- Stojakowska, A., Malarz, J., Kisiel, W., 2002. Salicylate and Methyl Jasmonate Differentially Influence Diacetylene Accumulation Pattern in Transformed Roots of Feverfew. *Plant Science*, 163:1147–1152.
- Sudha, G., Ravishankar, G. A., 2003. Elicitation of Anthocyanin Production in Callus Cultures of *Daucus carota* and the Involvement of Methyl Jasmonate and Salicylic Acid. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25: 249-256.
- Suresh, B., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Ravishankar, G.A., 2004. Polyamine and Methyl Jasmonate-Influenced Enhancement of Betalaine Production in Hairy Root

Cultures of *Beta vulgaris* Grown in A Bubble Column Reactor and Studies on Efflux of Pigments. *Process Biochemistry*, 39: 2091–2096.

Suzuki, H., Reddy, M. S. S., Naoumkina, M., Aziz, N., May, G. D., Huhman, D. V., Sumner, L. W., Blount, J. W., Mendes, P., Dixon, R. A., 2005. Methyl Jasmonate and Yeast Elicitor Induce Differential Transcriptional and Metabolic Reprogramming in Cell Suspension Cultures of the Model Legume *Medicago truncatula*. *Planta*, 220: 696-707.

Swamy, K. N., Rao, S. S. R., 2009. Effect of 24-Epibrassinolide on Growth, Photosynthesis, and Essential Oil Content of *Pelargonium graveolens* (L.) Herit. *Russian Journal of Plant Physiology*, 56 (5): 612-620.

Szabo, E., Thelen, A., Petersen, M. 1999. Fungal Elicitor Preparations and Methyl Jasmonate Enhance Rosmarinic Acid Accumulation in Suspension Cultures of *Coleus blumei*. *Plant Cell Reports*, 18: 485-489.

Szekeres, M., Nemeth, K., Koncz–Kalman, Z., Mathur, J., Kausch-Mann, A., Altmann, T., Redei, G. P., Nagy, F., Schell, J., Koncz, C., 1996. Brassinosteroids Rescue the Deficiency of CYP90, A Cytochrome P450, Controlling Cell Elongation and De-etiolation in Arabidopsis. *Cell*, 85: 171–182.

Taiz, L., Zeiger, E., 2007. Sekonder Metabolitler ve Bitkisel Savunma. Bitki Fizyolojisi. (Editör: Türkan, İ.). Palme Yayınevi, Ankara. 690s.

Talaat, N. B., Abdallah, A. M., 2010. Effect of 28-homobrassinolide and 24-epibrassinolide on the Growth, Productivity and Nutritional Value of Two Faba Bean (*Vicia faba* L.) Cultivars. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 56: 649-669.

Tansı, S., 1991. Karabaşkekik (*Tymra Spicata*)’da Drog Verimi ile Ekolojik Ontogenetik ve Morfogenetik Varyabilitenin Araştırılması. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Adana.

Tassoni, A., Buuren, M., Franceschetti, M., Fornalè, S., Bagni, N., 2000. Polyamine Content and Metabolism in *Arabidopsis thaliana* and Effect of Spermidine on Plant Development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38 (5): 383-393.

- Telci, İ., Bayram, E., Yılmaz, Avcı, G., 2006. Variability in Essential Oil Composition of Turkish Basils (*Ocimum basilicum* L.) *Biochem. Syst. Ecol.*, 34: 489–497.
- Thaler J. S., 1999. Induced Resistance in Agricultural Crops: Effects of Jasmonic Acid on Herbivory and Yield in Tomato Plants. *Environ. Entomol.*, 28 (1): 30–37.
- Tolonen, A., Uusitalo, J., 2004. Fast Screening Method for the Analysis of Total Flavonoid Content in Plants and Foodstuffs by High-Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry with Polarity Switching. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 18: 3113 – 3122.
- Toussaint, J. P., Smith, F. A., Smith, S. E., 2007. Arbuscular Mycorrhizal Fungi can Induce The Production of Phytochemicals In Sweet Basil Irrespective of Phosphorus Nutrition. *Mycorrhiza*, 17: 291-297.
- Tumova, L., Gallova, K., Rimakova, J., 2004. [*Silybum marianum* in vitro]. *Ceska Slov. Farm*, 53: 135-140.
- Ueda, J., Kato, J., 1980. Isolation and Identification of A Senescence-Promoting Substance from Wormwood (*Artemisia absinthium* L.). *Plant Physiol.*, 66: 246-249.
- Unyayar S., 2002. Changes in Absciscic Acid and Indole-3-Acetic Acid Concentrations in *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singer and *Phanerochaete chrysosporium* Burds. ME446 Subjected to Salt Stress. *Turk J. Bot.*, 26: 1–4.
- Velicova, V., Yordanov, I., Edreva, A., 2000. Oxidative Stress and Some Antioxidant Systems in Acid Rain-Treated Bean Plants: Protective Role of Exogenous Polyamines. *Plant Sci.* 151: 59-66.
- Verma, A., Malik, C.P., Gupta, V.K., 2012. In Vitro Effects of Brassinosteroids on the Growth and Antioxidant Enzyme Activities in Groundnut. *International Scholarly Research Network ISRN Agronomy*, 2012: 1-8.
- Walters, D. R., 2000. Polyamines in Plant Microbe Interactions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 57: 137-146.
- Wang, H. F., Provan, G. J., Helliwell K., 2004. Determination of Rosmarinic Acid and Caffeic Acid in Aromatic Herbs by HPLC. *Food Chem.*, 86: 307-311.

- Wang, S. Y., Zheng, W., 2005. Preharvest Application of Methyl Jasmonate Increases Fruit Quality and Antioxidant Capacity in Raspberries. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 40: 187-195.
- Wang, T., Li, J., Guo, S. R., Gao, H. B., Wang, S. P., 2005. Effects of Exogenous Polyamines on The Growth and Activities of H⁺-Atpase and H⁺-Ppase in Cucumber Seedling Roots under Hypoxia Stress. *Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao.*, 31(6): 637-642.
- Wang, S. Y., Bowman L., Ding, M., 2008. Methyl Jasmonate Enhances Antioxidant Activity and Flavonoid Content in Blackberries (*Rubus* Sp.) and Promotes Antiproliferation of Human Cancer Cells. *Food Chemistry*, 107: 1261–1269.
- Wasternack, C., Hause, B., 2002. Jasmonates and Octadecanoids: Signals in Plant Stress Responses and Plant Development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 72: 165–221.
- Xu, H. X., Zeng, F. Q., Wan, M., Sim, K. Y., 1996. Anti-HIV Triterpene Acids from *Geum japonicum*. *J. Nat. Prod.*, 59: 643–645.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., Wu., J. Y., 2006. Elicitor-Induced Rosmarinic Acid Accumulation and Secondary Metabolism Enzyme Activities in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots. *Plant Science*, 170: 853-858.
- Yang, Y., Huang, J., Ding, J., 2003. Interaction Between Exogenous Brassinolide, IAA and BAP in Secondary Metabolism of Cultured *Onosma paniculatum* Cells. *Plant Growth Regulation*, 39: 253 – 261.
- Yu, J. Q., Huang, L. F., Hu, W. H., Zohn, Y. H., Mao, W. H., Ye, S. F., Nogues, S., 2004. A Role for Brassinosteroids in the Regulation of Photosynthesis in *Cucumis sativus*. *J. Exp. Bot.*, 55: 1135–1143.
- Zgórká, G., Główniak, K., 2001. Variation of Free Phenolic Acids in Medicinal Plants Belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 79 – 87.

- Zhang, M., Zhai, Z., Tian, X., Duan, L., Li, Z., 2008. Brassinolide Alleviated the Adverse Effect of Water Deficits on Photosynthesis and the Antioxidant of Soybean (*Glycine max* L.). *Plant Growth Regul.*, 56: 257–263.
- Zhao, J., Davis, L. C., Verpoorte, R., 2005. Elicitor Signal Transduction Leading to Production of Plant Secondary Metabolites. *Biotechnol Adv.*, 23: 283-333.
- Zheng, W., Wang, S. Y., 2001. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agricul. Food Chem.*, 49 (11): 5165–5170.
- Zhigang, L. I., Wang, F. C., Hyun-Jin, K., 2007. Chemical Changes and Overexpressed Genes in Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.) upon Methyl Jasmonate Treatment. *J. Agric. Food Chem.* 55: 706-713.
- Ziaei, M., Sharifi, M., Behmanesh, M., Razavi, K., 2012. Gene Expression and Activity of Phenylalanine Ammonia-lyase and Essential Oil Composition of *Ocimum Basilicum* L. at Different Growth Stages. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10 (1): 32-39.
- Zollo, P. H. A., Biyiti, L., Tchoumboungang, F., Menut, C., Lamaty, G., Bouchet, P., 1998. Aromatic Plants of Tropical Central Africa, Part XXXII. Chemical Composition And Antifungal Activity of Thirteen Essential Oils from Aromatic Plants of Cameroon. *Flavour and Fragrance Journal*, 13: 107–114.

EKLER



EK Şekil 1. Farklı bitki büyüme düzenleyici ve fenilalanin uygulanmış fesleğen tohumlarından yetişmiş fideler



EK Şekil 2. Kontrol A ve Kontrol B gruplarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü



EK Şekil 3. Kontrol B grubu ile 0,1 mM Spm ve 0,1 mM Spm+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü



EK Şekil 4. Kontrol B grubu ile 1,0 mM Spm ve 1,0 mM Spm+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü



EK Şekil 5. Kontrol B grubu ile 0,5 μ M BR (EBL) ve 0,5 μ M BR (EBL)+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü



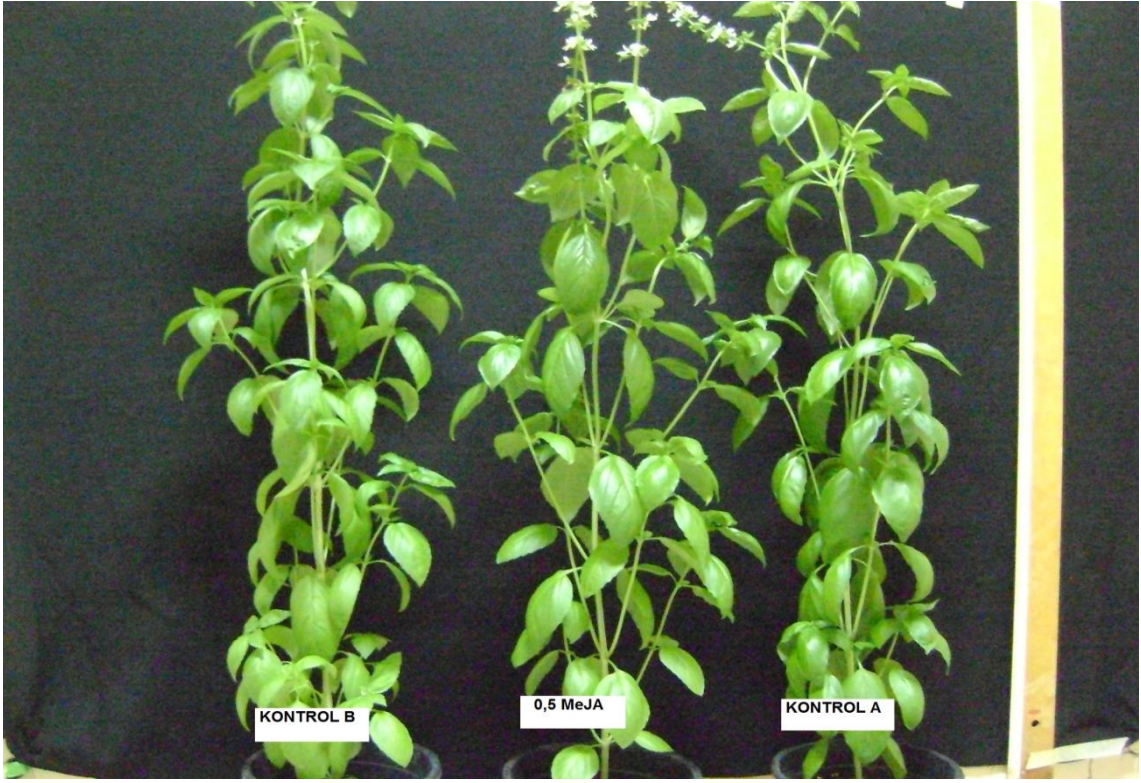
EK Şekil 6. Kontrol B grubu ile 2,0 μ M BR (EBL) ve 2,0 μ M BR (EBL)+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü



EK Şekil 7. Kontrol B grubuna ile 0,05 mM FA ve 0,05 mM FA+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü



EK Şekil 8. Kontrol B grubu ve 0,5 mM FA ve 0,5 mM FA+MeJA uygulamalarına ait fesleğenlerin morfolojik görünümü



EK Şekil 9. Kontrol B, 0,5 mM MeJA uygulaması ve Kontrol B grubuna ait fesleğenlerin morfolojik görünümü

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı, soyadı : Nülüfer KOCA
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 20.08.1977, KEŞAP
Medeni hali : Evli, 2 çocuklu
Telefon : 0 344 618 20 15
Faks : 0 344 618 20 15
e-posta : niluferkoca@ksu.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	KSÜ/ Biyoloji ABD	2013
Yüksek lisans	Marmara Üniversitesi/ Biyoloji ABD	2003
Lisans	Abant İzzet Baysal Üniversitesi/ Biyoloji	1999
Lise	Fatih Kız Lisesi	1994

İş Denevimi

Yıl	Yer	Görev
2012-	KSÜ Türkoğlu MYO	Öğretim Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

1. C. Yarcı, M. Serin, V. Altay, N. Şahin, E. Osma, P. Mutlu, B. Eskin, “OBSERVATIONS ON THE URBAN FLORA OF ISTANBUL (TURKEY)”, International Conference on Environment: Survival and Sustainability. Near East University, Nicosia-Northern Cyprus. February 2007.

2. E. Diraz, Ş. Karaman, N. Koca, “FATTY ACID AND ESSENTIAL OIL COMPOSITION OF *Echinacea purpurea* (L.) Moench, GROWING IN KAHRAMANMARAŞ - TURKEY” International conference ‘Medicinal and aromatic plants in generating new values in 21st century’., Sarajevo, Bosna and Herzegovina. November 2011.

3. Alıntı yapılan yayınlar

Urban ecological characteristics and vascular wall flora on the Anatolian side of Istanbul, Turkey, 27/11/2010. / Cited to: Eminönü ve Fatih İlçeleri’nin (İstanbul) kentsel ekolojik özellikleri (Urban ecological characteristics of Eminönü and Fatih Towns - Istanbul) /MSc Thesis, N.Şahin.