

**T.C.**  
**ISPARTA UYGULAMALI BİLİMLER ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA TEZİ**  
**TARIMSAL BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SÜTÇÜLER KEKİĞİ (*Origanum minutiflorum*)’NDE 1-DEOKSİ-D-  
KSİLÜLOZ 5 FOSFAT REDÜKTOİZOMERAZ (DXR) VE  
TERPEN SENTAZ GENLERİNİN İZOLASYONU VE  
KARAKTERİZASYONU**

**Civan ÇELİK**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Yaşar KARAKURT**

**ISPARTA - 2023**



© 2023 [Civan ÇELİK]

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                                                           | Sayfa |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| İÇİNDEKİLER .....                                                                                                         | i     |
| ÖZET.....                                                                                                                 | ii    |
| ABSTRACT.....                                                                                                             | iii   |
| TEŞEKKÜR.....                                                                                                             | iv    |
| ŞEKİLLER DİZİNİ.....                                                                                                      | v     |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                                                                   | vi    |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....                                                                                      | vii   |
| 1. GİRİŞ .....                                                                                                            | 8     |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ .....                                                                                                  | 11    |
| 2.1. Farklı <i>Origanum</i> Türlerinden Elde Edilen Uçucu Yağlar ile İlgili Yapılmış Çalışmalar .....                     | 11    |
| 2.2. Farklı <i>Origanum</i> Türlerinde Yapılmış Filogenetik Çalışmalar.....                                               | 14    |
| 2.3. Farklı Bitki Türlerinde DXR Geni Üzerine Yapılmış Çalışmalar .....                                                   | 22    |
| 2.4. Farklı Bitki Türlerinde TPS1 Geni Üzerine Yapılmış Çalışmalar .....                                                  | 26    |
| 3. MATERYAL VE YÖNTEM .....                                                                                               | 31    |
| 3.1. Materyal .....                                                                                                       | 31    |
| 3.2. Yöntem .....                                                                                                         | 33    |
| 3.2.1. RNA izolasyonu .....                                                                                               | 33    |
| 3.2.2. DNaz I uygulaması.....                                                                                             | 34    |
| 3.2.3. Toplam RNA miktar tayini .....                                                                                     | 35    |
| 3.2.4. Toplam RNA'ların formaldehitli agaroz jelde ayrıştırılması.....                                                    | 35    |
| 3.2.5. cDNA sentezi .....                                                                                                 | 36    |
| 3.2.6. 1-deoksi-D-ksilüloz fosfat redüktoizomeraz (DXR) ve terpen sentaz 1 genlerinin kısmi cDNA'larının izolasyonu ..... | 38    |
| 3.2.7. PCR ürünlerinin jelden izolasyonu .....                                                                            | 39    |
| 3.2.8. cDNA'ların bakteriye klonlanması .....                                                                             | 39    |
| 3.2.8.1. Saf cDNA'ların pMiniT 2.0 klonlama vektörüne ligasyonu.....                                                      | 39    |
| 3.2.8.2. Ligasyon ürünlerinin transformasyonu .....                                                                       | 40    |
| 3.2.9. Rekombinant plazmitlerin izolasyonu.....                                                                           | 41    |
| 3.2.10. RACE ready cDNA sentezi.....                                                                                      | 42    |
| 3.2.11. RACE için PCR kontrolü .....                                                                                      | 43    |
| 3.2.12. RACE (cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu).....                                                                   | 44    |
| 3.2.13. DNA ekstraksiyonu.....                                                                                            | 45    |
| 3.2.14. Southern Blot analizi.....                                                                                        | 45    |
| 3.2.14.1. Naylon membrana DNA aktarımı .....                                                                              | 45    |
| 3.2.14.2. DNA'nın işaretlenmesi ve hibridizasyon .....                                                                    | 46    |
| 3.2.15. Sekanslama ve sekans analizleri .....                                                                             | 47    |
| 4. BULGULAR .....                                                                                                         | 56    |
| 4.1. <i>OmDXR</i> Geninin Moleküler Karakterizasyonu .....                                                                | 56    |
| 4.2. <i>OmTPS1</i> Geninin Moleküler Karakterizasyonu.....                                                                | 65    |
| 4.3. Southern Blot Analizleri .....                                                                                       | 74    |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....                                                                                                | 76    |
| KAYNAKLAR .....                                                                                                           | 82    |
| ÖZGEÇMİŞ .....                                                                                                            | 100   |

## ÖZET

### Doktora Tezi

## SÜTÇÜLER KEKİĞİ (*Origanum minutiflorum*)’NDE 1-DEOKSİ-D-KSİLÜLOZ 5 FOSFAT REDÜKTOİZOMERAZ (DXR) VE TERPEN SENTAZ GENLERİNİN İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

Civan ÇELİK

Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

'Sütçüler kekigi' olarak bilinen *Origanum minutiflorum*, Türkiye'de Isparta ilinin Sütçüler ilçesinde yetişen endemik bir türdür. Bu çalışmada *Origanum minutiflorum* bitkisinden uçucu yağ sentezinde görev alan 1-deoksi-D-ksilüloz fosfat redüktoizomeraz (*OmDXR*) ve terpen sentaz 1 (*OmTPS1*) genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda kekik yapraklarında toplam RNA izole edilmiş ve hedef genlere özgü primerler ile genlerin moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışma sonucunda *OmDXR* genine ait tam uzunluktaki cDNA nükleotid uzunluğunun 1 700 bp ve genin 1446 bp'lik kısmının açık okuma çerçeve bölgesini içerdiği tespit edilmiştir. Genin, 138 bp'lik kısmının 5'-UTR, 116 bp'lik kısmının ise 3'-UTR bölgesini içerdiği ve genin 481 amino asit uzunluğunda bir proteini kodladığı saptanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında elde edilen nükleotid dizisinin önceki çalışmalardan elde edilen nükleotid dizileri ile %74.22-81.07, protein dizisinin ise %70.92-72.95 arasında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. *OmTPS1* genine ait tam uzunluktaki cDNA nükleotid uzunluğunun 1 836 bp olduğu ve genin 1 806 bp'lik kısmının açık okuma çerçeve bölgesini içerdiği saptanmıştır. *OmTPS1* genin kodladığı proteinin ise 601 amino asit uzunluğunda olduğu saptanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında elde edilen nükleotid dizisinin önceki çalışmalardan elde edilen nükleotid dizileri ile %75.99-89.58, protein dizisinin ise %51.66-69.88 arasında benzerlik olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca tez kapsamında *OmDXR* ve *OmTPS1* genlerinin *Origanum minutiflorum* genomunda kaç kopya ile temsil edildiğini belirlemek amacıyla 'Southern Blot' analizi yürütülmüştür. Çalışmada karakterize edilen genlerin 'Southern' Blot analizleri sonucunda her iki genin de (*OmDXR* ve *OmTPS1*) üç farklı enzimle (*EcoRI*, *BamHI* ve *HindIII*) kesimi sonucunda tek DNA bandı ürettiği ve genomda tek kopyalarının olduğu saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** DXR, Uçucu yağ, Gen izolasyonu, *Origanum minutiflorum*, Southern blot, Terpen sentaz

2023, 103 sayfa

## ABSTRACT

### Ph.D. Dissertation

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF 1-DEOXY-D-XYLULOSE 5-PHOSPHATE REDUCTOISOMERASE (DXR) AND TERPENE SYNTHASE GENES IN SÜTÇÜLER OREGANO (*Origanum minutiflorum*)

Civan ÇELİK

Isparta University of Applied Sciences  
The Institute of Graduate Education  
Department of Agricultural Biotechnology

Supervisor: Prof. Dr. Yaşar KARAKURT

*Origanum minutiflorum*, also known as 'Sütçüler Kekiği', is an endemic species that grows in the Sütçüler region of Isparta province, Turkey. The aim of this study is to isolate and characterize the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (*OmDXR*) and terpene synthase 1 (*OmTPS1*) genes involved in the synthesis of essential oil from *Origanum minutiflorum* plant. In accordance with this objective, total RNA was isolated from thyme leaves, and a series of molecular procedures were carried out using specific primers targeting the target genes. As a result of the study, it was determined that the full-length cDNA nucleotide length of the *OmDXR* gene is 1 700 bp, and it contains the open reading frame region of the gene, which is 1 446 bp. The gene was found to contain a 5'-UTR of 138 bp and a 3'-UTR of 116 bp, with the coding region encoding a protein of 481 amino acids in length. Furthermore, the nucleotide sequence obtained in this study showed a similarity of 74.22% to 81.07% with previously obtained nucleotide sequences from other studies. Similarly, the protein sequence showed a similarity of 70.92% to 72.95% with the protein sequences from those previous studies. The full-length cDNA nucleotide sequence of the *OmTPS1* gene was found to be 1 836 bp long, and 1 806 bp of the gene was identified to be the open reading frame region. The protein encoded by the *OmTPS1* gene was found to be 601 amino acids long. Additionally, in the aim of this study, it was determined that the nucleotide sequence obtained showed similarity with the sequence lengths obtained from previous studies at a range of 75.99% to 89.58%, while the protein sequence showed similarity at a range of 51.66% to 69.88%. In addition, within the scope of the thesis, a 'Southern Blot' analysis was conducted to determine the copy number of the *OmDXR* and *OmTPS1* genes in the *Origanum minutiflorum* genome. The results of the 'Southern Blot' analysis of the characterized genes revealed that both genes (*OmDXR* and *OmTPS1*), when digested with three different enzymes (*EcoRI*, *BamHI*, and *HindIII*), produced a single DNA band, indicating that they exist as single copies in the genome.

**Key Words:** DXR, Essential oil, Gene extraction, *Origanum minutiflorum*, Southern blot, Terpene synthase

2023, 103 pages

## TEŞEKKÜR

Tezimin yürütülmesinde desteğini ve emeğini hiçbir zaman esirgemeyen bilgi ve tecrübesi ile daima yanımda olan çok değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Yaşar KARAKURT'a sonsuz teşekkür ederim.

Gerek sosyal gerekse akademik hayatımda iyi bir insan, iyi bir baba, iyi bir akademisyen olarak örnek aldığım, tavsiye ve öğütleri ile bana yol gösteren, zor zamanlarımda yanımda olup maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli hocam sayın Prof. Dr. Adnan Nurhan YILDIRIM'a sonsuz teşekkür ederim.

Arazi ve laboratuvar çalışmalarımı bana yardımcı olan mesai arkadaşım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Sinan DEMİR'e teşekkür ederim.

Tezimin başarı bir şekilde sonuçlanması için bana yardımcı olan Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi idari personeline ve fakülte sekreteri sayın Mahmut BARBAROS'a teşekkür ederim.

2021-D1-0150 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

2211-A Genel Yurt İçi Doktora Burs Programı 2019/2 programı öncelikli alan kapsamında bursiyer olarak maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkür ederim.

2250-Lisansüstü Bursları Performans Programı kapsamında bursiyer olarak maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan eşim Eylem ÇELİK, annem Papatya ÇELİK, ağabeyim Selçuk ÇELİK ve dünyalar tatlısı kızlarım Masal ve Minel ÇELİK'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

**Civan ÇELİK**  
ISPARTA, 2023

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                      | Sayfa |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Şekil 1.1. Bitkide terpen biyosentezinin şematik görünümü.....                                                                                       | 19    |
| Şekil 1.2. Lamiaceae'nin peltat glandüler trikomları. ....                                                                                           | 20    |
| Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyallerin toplandığı koordinat .....                                                                    | 31    |
| Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bitkisel materyallerin toplandığı alanlar .....                                                                      | 32    |
| Şekil 3.3. Kekik yapraklarından RNA izolasyonu .....                                                                                                 | 34    |
| Şekil 3.4. RNA örneklerinin 37°C'de inkübasyonu .....                                                                                                | 34    |
| Şekil 3.5. RNA örneklerinin kalitelerinin kontrolünde kullanılan nanodrop cihazı ..                                                                  | 35    |
| Şekil 3.6. PCR işleminden sonra %1'lik agaroz jelde koşturulan örnekler .....                                                                        | 36    |
| Şekil 3.7. cDNA sentezinin şematik görünümü .....                                                                                                    | 37    |
| Şekil 3.8. pMiniT 2.0 klonlama vektörü .....                                                                                                         | 40    |
| Şekil 3.9. Transform olmuş bakteriler.....                                                                                                           | 41    |
| Şekil 3.10. Southern Blot tekniğinin şematik görünümü .....                                                                                          | 47    |
| Şekil 3.11. <i>OmDXR</i> genin BLASTn ve BLASTp analizleri .....                                                                                     | 49    |
| Şekil 3.12. <i>OmTPS1</i> genin BLASTn ve BLASTp analizleri .....                                                                                    | 50    |
| Şekil 3.13. <i>OmDXR</i> ve <i>OmTPS1</i> nükleotid dizilerinin ExPASy programı ile<br>protein dizilerine dönüştürülmesi .....                       | 51    |
| Şekil 3.14. <i>OmDXR</i> ve <i>OmTPS1</i> protein dizilerinin 3 boyutlu yapısının<br>oluşturulması.....                                              | 52    |
| Şekil 3.15. <i>OmDXR</i> nükleotid ve protein sekansının MEGAX 11 paket programı<br>ile filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi.....                  | 53    |
| Şekil 3.16. <i>OmTPS1</i> nükleotid ve protein sekansının MEGAX 11 paket programı<br>ile filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi.....                 | 54    |
| Şekil 3.17. <i>OmDXR</i> ve <i>OmTPS1</i> nükleotid dizilerinin ORF bölgelerinin<br>oluşturulması.....                                               | 55    |
| Şekil 4.1. <i>OmDXR</i> genine ait nükleotid dizisi .....                                                                                            | 57    |
| Şekil 4.2. <i>OmDXR</i> geninin nükleotid dizisinden elde edilen amino asit dizisi.....                                                              | 58    |
| Şekil 4.3. <i>OmDXR</i> nükleotid dizisinin filogenetik ilişkisi .....                                                                               | 60    |
| Şekil 4.4. <i>OmDXR</i> geninin kodladığı amino asitlerin bulunma oranı.....                                                                         | 61    |
| Şekil 4.5. <i>OmDXR</i> geninin amino asit dizisinin sekonder yapısı.....                                                                            | 62    |
| Şekil 4.6. <i>OmDXR</i> proteinin korunmuş motifleri .....                                                                                           | 63    |
| Şekil 4.7. <i>OmDXR</i> proteinlerinin varsayılan fosforilasyon bölgeleri .....                                                                      | 63    |
| Şekil 4.8. <i>OmDXR</i> proteinin 3 boyutlu yapısı.....                                                                                              | 64    |
| Şekil 4.9. <i>OmDXR</i> protein dizisinin filogenetik ilişkisi.....                                                                                  | 65    |
| Şekil 4.10. <i>OmTPS1</i> genine ait nükleotid dizisi.....                                                                                           | 66    |
| Şekil 4.11. <i>OmTPS1</i> geninin nükleotid dizisinden elde edilen amino asit dizisi.....                                                            | 67    |
| Şekil 4.12. <i>OmTPS1</i> nükleotid dizisinin filogenetik ilişkisi .....                                                                             | 69    |
| Şekil 4.13. <i>OmTPS1</i> geninin kodladığı amino asitlerin bulunma oranı.....                                                                       | 70    |
| Şekil 4.14. <i>OmTPS1</i> geninin amino asit dizisinin sekonder yapısı.....                                                                          | 71    |
| Şekil 4.15. <i>OmTPS1</i> proteinin korunmuş motifleri.....                                                                                          | 72    |
| Şekil 4.16. <i>OmTPS1</i> proteinlerinin varsayılan fosforilasyon bölgeleri .....                                                                    | 72    |
| Şekil 4.17. <i>OmTPS1</i> proteinin 3 boyutlu yapısı.....                                                                                            | 73    |
| Şekil 4.18. <i>OmDXR</i> protein dizisinin filogenetik ilişkisi.....                                                                                 | 74    |
| Şekil 4.19. <i>BamHI</i> (B), <i>EcoRI</i> (E) ve <i>HindIII</i> (H) kesilmiş ve blotlanmış olan<br><i>OmDXR</i> geninin Southern Blot analizi.....  | 75    |
| Şekil 4.20. <i>BamHI</i> (B), <i>EcoRI</i> (E) ve <i>HindIII</i> (H) kesilmiş ve blotlanmış olan<br><i>OmTPS1</i> geninin Southern Blot analizi..... | 75    |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                   | Sayfa |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| Çizelge 1.1. Türkiye'nin son 10 yıllık kekik üretimi .....                                                                                                        | 8     |
| Çizelge 1.2. Türkiye'de ticareti yapılan <i>Origanum</i> türleri.....                                                                                             | 9     |
| Çizelge 3.1. RNA örnekleri ile primer d(T) <sub>23</sub> VN'nin kullanım miktarları .....                                                                         | 36    |
| Çizelge 3.2. RNA örnekleri ile primer d(T) <sub>23</sub> VN'nin denatürasyonu sonrası eklenen bileşenler .....                                                    | 37    |
| Çizelge 3.3. cDNA örneklerinin negatif kontrolü .....                                                                                                             | 37    |
| Çizelge 3.4. cDNA kontrolü için kullanılan PCR aşamaları.....                                                                                                     | 37    |
| Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primerler.....                                                                                                                  | 38    |
| Çizelge 3.6. PCR uygulamasında kullanılan bileşenler ve kullanım miktarları .....                                                                                 | 38    |
| Çizelge 3.7. Hedef genlere özel primeler ile kısmi cDNA'nın oluşturulması için kullanılan PCR aşamaları.....                                                      | 38    |
| Çizelge 3.8. Ligasyon işleminde kullanılan bileşenler.....                                                                                                        | 40    |
| Çizelge 3.9. 5' ve 3' -RACE-Ready cDNA hazırlanmasında kullanılan bileşenler ..                                                                                   | 42    |
| Çizelge 3.10. 5'- ve 3'-RACE-Ready cDNA sentez için hazırlanmış ana karışım.....                                                                                  | 43    |
| Çizelge 3.11. 5'- ve 3'-RACE-Ready cDNA sentez için hazırlanmış Buffer Mix .....                                                                                  | 43    |
| Çizelge 3.12. RACE PCR kontrolü için kullanılacak PCR Master Mix ana karışımın içeriği.....                                                                       | 43    |
| Çizelge 3.13. Pozitif kontrol PCR denemesi için kullanılan PCR Master Mix bileşenleri ve miktarları.....                                                          | 44    |
| Çizelge 3.14. Touchdown PCR koşulları.....                                                                                                                        | 44    |
| Çizelge 3.15. Tam uzunluktaki <i>OmDXR</i> ve <i>OmTSP1</i> genlerinin elde edilmesi amacıyla yürütülen RACE analizinde kullanılan bileşenler ve miktarları ..... | 44    |
| Çizelge 3.16. Tam uzunluktaki <i>OmDXR</i> ve <i>OmTSP1</i> genlerinin elde edilmesi amacıyla yürütülen RACE analizinde kullanılan PCR döngüleri .....            | 45    |
| Çizelge 4.1. <i>OmDXR</i> geninin BLASTn analizi sonucu elde edilen gen benzerliği ...                                                                            | 59    |
| Çizelge 4.2. <i>OmDXR</i> geninin BLASTp analizi sonucu elde edilen protein benzerliği .....                                                                      | 60    |
| Çizelge 4.3. <i>OmTPS1</i> geninin BLASTn analizi sonucu elde edilen gen benzerliği ..                                                                            | 68    |
| Çizelge 4.4. <i>OmTPS1</i> geninin BLASTp analizi sonucu elde edilen protein benzerliği .....                                                                     | 69    |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

|                   |                                               |
|-------------------|-----------------------------------------------|
| BLAST             | The Basic Local Alignment Search Tool         |
| Bç                | Baz çifti                                     |
| CaCl <sub>2</sub> | Kalsiyum klorür                               |
| cDNA              | Komplementer DNA                              |
| CDS               | cDNA sentez primeri                           |
| DEPC              | Dietil pirokarbonat                           |
| DIG               | Digoksinin                                    |
| Dk                | Dakika                                        |
| DNA               | Deoksiribonükleik asit                        |
| dNTP              | Deoksiribonükleotid trifosfat                 |
| DTT               | Dithiothreitol                                |
| DXR               | 1-deoksi-D-ksilüloz 5-fosfat redüktoizomeraz  |
| EDTA              | Etilendiamin tetra asetat                     |
| EtBr              | Etidyum bromür                                |
| kDa               | Kilo Dalton                                   |
| MOPS              | 3-(N-morpholino) propansülfonik asit          |
| M                 | Molar                                         |
| Mg                | Miligram                                      |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnezyum klorür                              |
| ml                | Mililitre                                     |
| mM                | Milimolar                                     |
| NaCl              | Sodyum klorür                                 |
| NaOH              | Sodyum Hidroksit                              |
| NCBI              | National Center for Biotechnology Information |
| Ng                | Nanogram                                      |
| ORF               | Open Reading Frame                            |
| PCR               | Polimeraz Zincir Reaksiyonu                   |
| RACE              | cDNA Uçlarının Hızlı Çoğaltımı                |
| RNA               | Ribonükleik asit                              |
| Rpm               | Revolutions per minute (r/min)                |
| rRNA              | Ribozomal ribonükleik asit                    |
| SDS               | Sodyum dodesil sülfat                         |
| SSC               | Salin sodyum sitrat                           |
| Taq               | <i>Thermus aquaticus</i>                      |
| TBE               | Tris borik asit EDTA                          |
| TE                | Tris-EDTA                                     |
| TPS               | Terpen sentaz                                 |
| Tm                | Erime sıcaklığı                               |
| UPM               | Universal Primer Mix                          |
| UTR               | Un translated region                          |
| UV                | Ultraviyole                                   |
| V                 | Volt                                          |
| °C                | Santigrat                                     |
| µg                | Mikrogram                                     |
| µl                | Mikrolitre                                    |
| µM                | Mikromolar                                    |
| %                 | Yüzde                                         |

## 1. GİRİŞ

Türkiye, coğrafi konumu nedeniyle genetik çeşitlilik ve endemizm açısından zengin bir floranın yanı sıra birçok bitkinin de genetik merkezi konumundadır. Türkiye florasında 12 000'den fazla çiçekli bitki bulunmakta ve bunun %30'undan fazlasını tıbbi ve aromatik bitkiler oluşturmaktadır (Güner vd., 2012).

Tıbbi ve aromatik bitkiler çok eski zamanlardan beri kozmetik, baharat ve ilaç hammaddesi olarak kullanılmaktadır. Bu bitkilerin, Aristoteles döneminden beri, yaraları iyileştirici özelliklerinin olduğu ve tedavide kullanıldığı farklı araştırmacılar tarafından sıkça vurgulanmıştır (Thanos, 1994; Koutsoumanis vd., 1998; Skandamis ve Nychas, 2000; Tsigarida vd., 2000). Kekik, uzun bir geçmişe sahip antikçağlarda, cesaretin, zenginliğin ve asaletin simgesi olan bir bitkidir. Haçlı seferlerinde savaşa giden askerlere kekik kokulu hediyeler vermek, tapınaklarda kekik tütsülemek bu inanıştan kaynaklanmıştır (Başer vd., 1991; Bardakçı ve Yılmaz, 2007).

Dünya'da 50 kadar *Origanum* türü bulunup daha çok Akdeniz ve Balkanlarda yetiştiği bilinmektedir (Davis vd., 1982). Türkiye'de ise *Origanum*, *Thymus*, *Thymbra* ve *Saturaj* cinsleri yaygın olarak yetiştirilmekte ve ticareti yapılmaktadır. TÜİK verilerine göre 2022 yılında ülkemizde 44 358 ton kekik üretimi gerçekleşmiştir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Türkiye'nin son 10 yıllık kekik üretimi

| Yıl  | Üretim miktarı (ton) |
|------|----------------------|
| 2014 | 11 752               |
| 2015 | 12 992               |
| 2016 | 14 724               |
| 2017 | 14 477               |
| 2018 | 15 895               |
| 2019 | 17 965               |
| 2020 | 23 866               |
| 2021 | 21 174               |
| 2022 | 44 358               |

Türkiye'de kekik olarak kullanılan ve ticari öneme sahip türler Lamiaceae familyasına aittir. Türkiye'de ticareti yapılan ve uçucu yağ üretiminde kullanılan *Origanum* türleri Çizelge 1.2'de sunulmuştur;

Çizelge 1.2. Türkiye’de ticareti yapılan *Origanum* türleri

| Bilimsel adı                                                       | Halk arasında bilinen adı                                |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| <i>Origanum onites</i> L.                                          | İzmir kekiği, Türk kekiği, Bilyalı kekik                 |
| <i>Origanum minutiflorum</i> O. Schwarz et P.H. Davis              | Sütçüler kekiği, Toka kekiği, Yayla kekiği,              |
| <i>Origanum vulgare</i> L. subsp. <i>hirtum</i> (Link) Ietswaart   | Kara Kekik, İstanbul kekiği, Yunan kekiği                |
| <i>Origanum syriacum</i> L. var. <i>bevanii</i> (Holmes) Ietswaart | Suriye kekiği, Dağ kekiği, Tarsus kekiği, İsrail kekiği, |
| <i>Origanum majorana</i> L.                                        | Alanya kekiği, Beyaz kekik                               |

‘Sütçüler Kekikiği’ olarak da bilinen *O. minutiflorum* L. Türkiye'nin Doğu Akdeniz ve Güneybatı Anadolu bölgesinde özellikle de Antalya ve Isparta illerinde yetişen endemik bir türdür. Küçük, dikensi yapraklara sahip, çok yıllık bir bitkidir. Yaprakları yeşil renkte olup kenarları tüylü ve oval şekildedir. Çiçekleri ise pembe veya mor renkte olup yoğun bir şekilde küme halinde büyür. Bitki, genellikle dağlık bölgelerde ve kuru topraklarda yetişir. Uçucu yağ verimi %2-5 aralığındadır. Karvakrolce zengin uçucu yağa sahiptir. %40-80 karvakrol, %25 timol, %13-8 terpinen ve %6 p-simen içermektedir (Oke ve Aslım, 2010; Kılıçgün vd., 2014; Bozdemir, 2019). Sütçüler Kekikiği’nin toplama merkezi olan Isparta ili Sütçüler ilçesinde geçmiş yıllarda 140 tona kadar toplama yapılabilmekteydi. Ancak günümüzde bu miktar yarıya kadar düşmüştür (Baydar ve Akkurt, 2001). Türün yok olmaması adına Orman Bölge Müdürlüğü kontrollü bir şekilde belirlenen süreler içinde toplanmaya müsaade etmektedir. Müdürlük ‘Toplama Yılı’ ve ‘Ara Yılı’ şeklinde uygulamalar yaparak ara yılda toplanmayan kekiklerin tohum dökerek çoğalmalarını teşvik etmeye çalışmaktadır (Baydar ve Akkurt, 2001).

*Origanum* türlerinin uçucu yağ bileşenleri ve biyolojik etkileri üzerine bir çok çalışma yürütülmüştür. Çünkü *Origanum* türlerinden elde edilen uçucu yağların çok değerli olduğu ve antifungal, antimikrobiyal, antioksidan, antikanser ve antidiyabet özellikleri gibi birçok biyolojik ve farmakolojik özelliğe sahip olduğunu bilinmektedir (Koutsoumanis vd., 1998; Skandamis ve Nychas, 2000; Tsigarida vd., 2000; Dadaloğlu ve Evrendilek, 2004; Vardar-Ünlü vd., 2007; Bower vd., 2014; Fakir vd., 2016; Marchese vd., 2016; Soliman vd., 2016; Elmastaş vd., 2018). Uçucu yağlar aynı zamanda bitki fizyolojisi ve ekolojisinde de önemli bir yer tutmaktadır. Bitkileri patojenlere karşı korumak, bitkiden bitkiye sinyalizasyonu sağlamak, tozlayıcıları

cezbetmek, bitkilerin ısı toleransını arttırmak gibi olumlu etkileri de mevcuttur (Holopainen, 2004; Dudareva vd., 2006).

Tıbbi aromatik bitkilerde uçucu yağ ve farklı kimyasal bileşenlerin sentezinden sorumlu gen ailelerinden biri olan terpenler (terpenoidler veya izoprenoidler olarak da bilinir), yüzlerce farklı monoterpen (C<sub>10</sub>), seskiterpen (C<sub>15</sub>), diterpen (C<sub>20</sub>) ve triterpen (C<sub>30</sub>) karbon iskeletiyle 30 000'den fazla farklı yapıya sahip bileşiğin sentezine katılmaktadır (Buckingham, 1998; Degenhardt vd., 2010). Terpenlerin yapısal özellikleri ve işlevlerini anlamak amacıyla farklı bitki türlerinden izolasyonuna yönelik birçok çalışma mevcuttur (Yang vd., 2013; Din vd., 2014; Ashaari vd., 2020; Wang vd., 2020). Terpenler büyüme, gelişme, çoğalma ve savunma dahil olmak üzere temel bitki süreçlerinin tümünde önemli roller oynamaktadır (Gershenzon ve Kreis, 1999). Ancak, bu ürünlerin tıp, tarım ve sanayide bu denli önemli olmasına rağmen, çoğu terpenin doğadaki gerçek rolü hakkında yeteri kadar bilgi mevcut değildir (Gershenzon ve Dudareva, 2007).

Dolayısıyla tez çalışmasında, *O. minutiflorum*'da uçucu yağ kalitesinde rol oynayan 1-deoksi-D-ksilüloz 5-fosfat redüktoizomeraz (DXR) ve terpen sentaz 1 genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Literatürde konu ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde endemik bir tür olan *O. minutiflorum* (Sütçüler Kekiği)'da daha önce gen klonlamasına yönelik herhangi bir çalışmanın yapılmadığı tespit edilmiştir. Bu genel amaca uygun olarak,

- ✓ Farklı türlerden izole edilmiş DXR ve TPS1 genlerine ait primerler ayıklanmış ve sentezlenmiştir.
- ✓ Genlere özgü primerler ile hedef genlere ait cDNA'ların 5'- ve 3'-uçlarının hızlı çoğaltılması ve bu gen parçalarının sekanslanması sağlanmıştır.
- ✓ Gen parçalarının birleştirilmesiyle tam uzunluktaki cDNA nükleotid sekansları belirlenmiştir.
- ✓ Nükleotid ve amino asit sekansları yazılım programları ile analiz edilmiştir. Hedef genlere ait nükleotid ve amino asit sekansları, gen bankalarında mevcut homologları ile karşılaştırılarak filogenetik ve moleküler evrimsel ilişkileri analiz edilmiştir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

*Origanum* türleri, tat ve uçucu yağı nedeniyle yıllardır kullanılan önemli tıbbi ve aromatik bitkileri kapsamaktadır. *Origanum* türleri, Akdeniz, Kuzey Afrika, Avrupa-Sibirya ve İran-Sibirya bölgelerinde yayılış göstermektedirler (Bayramoğlu vd., 2008; Ali vd., 2020). Çeşitli *Origanum* türlerinden elde edilen kekik uçucu yağları üzerine çok sayıda araştırma mevcuttur ve bu yağların terapötik etkileri *in vitro* ve *in vivo* olarak gösterilmiştir. *Origanum minutiflorum* ile ilgili çalışmalar çoğunlukla verimi ve uçucu yağ bileşenleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Yürütülen çalışmalarda bitkinin uçucu yağ veriminin %1.7-4.9, uçucu yağın ana bileşeni olan karvakrol oranının ise %44-92 arasında değiştiği bildirilmiştir (Başer vd., 1991; Kırimer vd., 1995; Oflaz, 2001; Baydar, 2005; Figueredo vd., 2006). Aşağıda farklı *Origanum* türlerinden elde edilen uçucu yağ ile ilgili geçmişten günümüze yapılmış olan bazı çalışmalar sunulmuştur.

### 2.1. Farklı *Origanum* Türlerinden Elde Edilen Uçucu Yağlar ile İlgili Yapılmış Çalışmalar

Şarer vd. (1996), Akdeniz Bölgesinde endemik bir tür olan *O. minutiflorum*'dan elde ettikleri uçucu yağın içerdiği bileşenler ve antimikrobiyal etkileri üzerine çalışma yürütmüşlerdir. Farklı rakımlardan toplanan bitkilerden elde edilen iki uçucu yağ örneği analiz edilmiştir. Elde ettikleri uçucu yağın ana bileşeninin karvakrol (%90.78 ve 92.95) olduğunu, bakteri ve mantarların gelişimini önemli ölçüde engellediğini bildirmişlerdir.

Aligiannis vd. (2001), *O. vulgare* subsp. *Hirtum* ve *O. majorana* L. uçucu yağ bileşenlerini ve antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Uçucu yağları, hidrodistilasyon yöntemiyle elde etmişlerdir. GC-MS analizi kullanılarak uçucu yağların bileşenlerini belirlemişler ve antimikrobiyal aktivitelerini agar disk difüzyon yöntemiyle değerlendirmişlerdir. *O. vulgare* uçucu yağında karvakrol ve timolün ana bileşenler, *O. majorana* uçucu yağında ise terpinen-4-ol ve linaloolün ana bileşenler olduğunu tespit etmişlerdir. Antimikrobiyal aktivite testleri sonucunda her iki türün uçucu yağlarının geniş bir mikroorganizma yelpazesine karşı etkili olduğunu ve gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere, mantarlara ve mayalara karşı güçlü inhibe edici etki gösterdiğini bildirmişlerdir.

Dadaloğlu ve Erdilek (2004), *O. minutiflorum*, *Laurus nobilis*, *Lavandula stoechas* L. ve *Foeniculum vulgare* uçucu yağlarının gıda kaynaklı patojenler üzerindeki antibakteriyel etkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar tüm uçucu yağların test edilen bakterilere karşı güçlü bir antibakteriyel aktivite sergilediğini ve gaz kromatografisi-kütle spektrometri analizleri sonucunda *O. minutiflorum*'un %68.23 oranında karvakrol içerdiğini bildirmişlerdir.

Vardar-Ünlü vd. (2007), *O. minutiflorum* uçucu yağının kimyasal bileşenleri ve *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini incelemişlerdir. Araştırmacılar uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesini, 16 bakteri ve iki mayaya karşı değerlendirmişlerdir. Uçucu yağ, *Pseudomonas aeruginosa* dışındaki tüm test edilen mikroorganizmalara karşı güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca karvakrol bileşeninin gözlemlenen biyolojik aktivitelerden sorumlu ana bileşen olduğunu ve kekik yağının mayalar da dahil olmak üzere patojenite etkisine sahip tüm mikroorganizmalarda etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Aslim ve Yucel (2008), *O. minutiflorum* uçucu yağının *Campylobacter* spp.'ye karşı antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. *Campylobacter* spp. gıdalarda sıklıkla bulunan ve insan sağlığı üzerine önemli zararları olan bir patojendir. Araştırmacılar kekik bitkisinden elde edilen uçucu yağların test edilen bütün *Campylobacter* spp.'lerde güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca yapılan GC/MS analizi sonucunda *O. minutiflorum* uçucu yağının anabileşenlerinin karvakrol (%73.9) ve p-simen (%7.20) olduğunu vurgulamışlardır.

Coskun vd. (2008), *O. onites* L. türünün kökünden elde edilen uçucu yağın %63 oranında karvakrol içerdiğini tespit etmişlerdir.

Liolios vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada *O. dictamnus* L. türünden GS-MS ile uçucu yağ bileşenleri belirlenmiştir. Bu amaçla karvakrol, timol, p-simen ve c-terpinen, ana uçucu yağ bileşenleri izole edilmiştir. Yapılan analizler sonucunda uçucu yağ bileşenlerinin insanda patojenik etkiye sahip funguslarda ve bazı gram negatif ve gram pozitif bakterilerde antimikrobiyal etkilerinin olduğu bildirilmiştir.

Çetin vd. (2009), *O. minutiflorum*'un uçucu yağının akarlar üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar uçu yağın *Rhipicephalus turanicus*'a karşı %100 etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Sarı (2016), *O. minutiflorum*'dan elde edilen uçucu yağın gökkuşığı balıklarında nonspesifik immun sisteme yönelik etkisini incelemiştir. Araştırmacı bitkinin toz hali, liyofilize tozu ve uçucu yağlarını farklı konsantrasyonlarda içeren yemler ile balıkları besledikten sonra karaciğer örneklerinde süperoksit dismutaz, malondialdehit düzeyleri, katalaz, glutatyon-peroksidaz ve glutatyon S-transferaz enzim aktivitelerini incelemiştir. Araştırma sonucunda uçucu yağların liyofilize ekstraktlarının doza bağlı değişkenlik gösterdiğini, immun sisteme yönelik ve antioksidan etkinlik açısından önemli düzeyde olumlu etkisinin olduğunu bildirmiştir.

Toker vd. (2017), *O. minutiflorum*'un uçucu yağının distilasyon zamanına göre bileşimi ve veriminin değiştiğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar uçucu yağ bileşimi ve en yüksek karvakrol içeriğinin 60 dk'lık distilasyon süresinde alındığını tespit etmişlerdir.

Cunedioğlu ve Üremiş (2018) tarafından *in vitro* koşullarda *Rosmarinus officinalis* L. ve *O. minutiflorum*'dan elde edilen uçucu yağın bazı yabancı otların çimlenmesi üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada çimlenmeyi engelleyici özelliğinin olduğu belirlenmiştir.

Elmastaş vd. (2018), *O. minutiflorum* bitkisinde elde edilen tricosan-1-ol, (8E,16E)-tetracosa-8,16-diene-1,24-diol, azepan-2-one, 3,4-dihydroxybenzoic acid, apigenin, eriodictyol, globoidnan-A, luteolin, rosmarinic acid, apigenin-7-O-glucuronide ve vicienin-2 bileşenlerinin antioksidan etkilerini incelemişlerdir. Araştırmacılar bu bileşenlerin yüksek oranda antifungal ve anti bakteriyel aktiviteye sahip olduğunu ve doğal antioksidan besini olarak tütebileceğini bildirmişlerdir.

Sharifi-Rad vd. (2021), *O. minutiflorum* uçucu yağının proinflamatuvar sitokin ve kemokin seviyelerini azalttığını, reaktif oksijen türlerine (ROT) karşı süperoksit dismutaz ve katalaz gibi antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığını bildirmişlerdir.

Kostic vd. (2022), *O. minutiflorum* ve *Coriandrum sativum* L. uçucu yağlarının *in vitro* koşullarda kronik tonsillite üzerine etkisini incelemişlerdir. Araştırmacılar bademcik enfeksiyonuna neden olan bakterilerin özellikle kekikten elde edilen uçucu yağlar ile büyük ölçüde çoğalmasının engellendiği ve doğal biyoaktif terapötik olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Veljovic vd. (2023), *O. minutiflorum* uçucu yağının insan bronş hücrelerinde anti-enflamatuar-antioksidan etkileri ve akciğer patojenleri üzerinde antimikrobiyal aktivitesini araştırmışlardır. Çalışma sonucunda kekik uçucu yağının çeşitli kronik akciğer hastalıklarında basit ve lokal bir tedavi olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

## 2.2. Farklı *Origanum* Türlerinde Yapılmış Filogenetik Çalışmalar

*Origanum* L., Lamiaceae familyasının bir üyesidir ve *Thymus* L., *Thymbra* L., *Satureja* L. ve *Micromeria* Benth. gibi cinsler ile yakın akrabadır. Birçok taksonomik revizyonun ardından *Origanum* L.'nin şu anda dünya genelinde 45 tür (51 takson) ve 19 melezinin olduğu farklı araştırmacılar tarafından bildirmiştir (Ietswaart, 1980; Cantino vd., 1992; Dirmenci vd., 2018a,b). *Origanum* türleri eski çalışmalara göre beş bölümde gruplanmıştır ancak *Origanum* üzerine yapılan en kapsamlı ve yaygın taksonomik revizyon olarak kabul edilen ve Ietswaart (1980) tarafından yapılan revizyonda beş ek bölüm daha tanımlanmış ve toplam on bölüme ayrıldığı kabul edilmiştir. Çoğunlukla Avrupa, Kuzey Afrika ve Asya ülkelerinde dağılım gösterse de türün %75'i Doğu Akdeniz Bölgelerinde bulunmaktadır (Ietswaart, 1980). *Origanum* türlerinin taksonomik sınıflandırılması çoğunlukla morfolojik gözlemler üzerine yapılmış ancak evrimsel süreçleri anlama da morfolojik gözlemlerin yetersiz kalacağı ve moleküler teknikler ile filogenetik ilişkilerin net bir şekilde ortaya konulması gerektiği düşünülmüştür (Kokkini ve Vokou, 1993; Gobert vd., 2002; Barber vd., 2007; Azizi vd., 2009; Katsiotis vd., 2009; van Looy vd., 2009; Lukas, 2010; Tonk vd., 2010; Lukas vd., 2013a,b; İnce vd., 2014; Bariotakis vd., 2016; Aboukhalid vd., 2017; Mechergui vd., 2017; Dirmenci vd., 2018a,b; Taşcıoğlu vd., 2018). *Origanum minutiflorum* ile ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde daha çok uçucu yağ içerikleri ve uçucu yağın antimikrobiyal etkileri üzerine olduğu (Tonk vd., 2010; Özen, 2013; Anlaş vd., 2017; Avcı vd., 2018; Akarca ve Tomar, 2020; Sokmen vd., 2020; Sharifi-

Rad vd., 2021) bu tür ile ilgili moleküler çalışmanın yok denecek kadar az olduğu ve gen izolasyonu konusunda ise hiç çalışma yapılmadığı tespit edilmiştir. *Origanum* türleri ile ilgili çoğunlukla moleküler markörler ile filogenetik analizler yürütülmüştür. Aşağıda bu konu ile ilgili geçmişten günümüze yapılmış olan bazı çalışmalar sunulmuştur;

Ietswaart (1980), Türkiye'ye özgü *O. saccatum* ve *O. solymicum*'da filogenetik ilişkiyi araştırmıştır. Arıştırmacı genetik benzerlik indeksinin 0.7'ye sahip olduğunu ve incelenen diğer türler arasında en yüksek benzerliğe sahip olduğunu bildirmiştir. Yine başka çalışmada *O. bilgeri* ve *O. minutiflorum* arasında genetik benzerlik indeksinin 0.68 olduğunu tespit etmiştir.

Azizi vd. (2009), 42 farklı *Origanum* türünde AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) ve SAMPL (Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci) markörlerini kullanarak genetik ilişkinin ortaya konulmasında en uygun markör seçimini hedeflemişlerdir. Seçilen yedi AFLP primer kombinasyonunun, toplamda 596 sayılabilir fragment verdiğini ve bunların 431'inin (%71) polimorfik olduğunu saptamışlardır. SAMPL marköründe ise toplamda 558 sayılabilir bant elde ettiklerini ve bu bantların 512'sinin (%92) polimorfik olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada ortalama polimorfizm yüzdesinin %92 olduğunu ve 42 *Origanum* türünde %85-97 arasında benzerlik olduğunu bildirmişlerdir.

Katsiotis vd. (2009), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markörleri ile farklı *Origanum* türlerinin filogenetik analizi üzerine çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar türler arasında 133 polimorfik bant tespit ettiklerini ve UPGMA kümeleme analizi ile iki ana grup belirlediklerini bildirmişlerdir.

Amar ve El Wahab (2013), Mısır'da yetişen dört farklı *Origanum* (*O. syriacum* var. *sinaicum*, *O. vulgare*, *O. vulgare* subsp. *hirtum* ve *O. majorana*) türünde ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) ve SRAP (Sequence-Related Amplified Polymorphism) markörleri kullanarak türler arasındaki genetik ilişkiyi ortaya koymuşlardır. *Origanum majorana* ve *O. syriacum* var. *sinaicum* arasında yakından ilişki olduğu tespit etmişlerdir. *O. vulgare* ve *O. vulgare* subsp. *hirtum* arasında da yüksek oranda ilişkinin olduğunu saptamışlardır.

İnce vd. (2014), yeni mikrosatellit ve CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) mikrosatellitleri kullanarak *Origanum* türleri arasındaki filogenetik ilişkiyi araştırmışlardır. Araştırmacılar türler arasındaki varyasyonların tür içindekinden çok daha yüksek olduğunu ayrıca çalışmada kullanmış oldukları markörlerin *Origanum* ıslah çalışmalarında arzu edilen kemotipleri seçmede yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Mechergui vd. (2017), Tunus'ta yetiştirilen *O. vulgare* popülasyonları arasındaki genetik ilişkiyi incelemişlerdir. Araştırmacılar EST (Expressed Sequence Tag)-SSR (Simple Sequence Repeats) markörleri ile yapmış oldukları çalışmada popülasyonlar arasında %92 oranında polimorfizm olduğunu saptamışlardır.

Jedrzejczyk (2018), ISSR markör tekniği kullanarak farklı *Origanum* türleri arasındaki genetik çeşitliliği incelemiştir. Çalışmada 16 farklı ISSR primeri kullanmış ve primerlerden 7'sinin %100 polimorfizm gösterdiğini belirlemiştir. Ortalama polimorfizm yüzdesinin ise %96 olduğunu ve amplifikasyon ürünlerinin yaklaşık boyutunun 195-2 400 bp arasında olduğunu saptamıştır. Çalışma sonucunda, *Origanum* türleri arasında genom boyutu ve genetik çeşitlilik açısından farklılıklar olduğunu bildirmiştir. Polonya ve İsviçre orijinli *O. vulgare* türlerinde en yüksek benzerlik, Maceristan ve Ukrayna orijinli *O. syriacum* ve *O. vulgare* türlerinde ise en düşük benzerlik elde ettiğini bildirmiştir.

Taşcıoğlu vd. (2018), EST-SSR ve SRAP markörleri ile 22 farklı *Origanum* türü arasında genetik çeşitliliği araştırmışlardır. Araştırmacılar *Origanum* türleri ve bireyler arasında yüksek ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada türler ve bireyler arasındaki ilişkilerin ve hibridizasyon modellerinin daha derin bir şekilde anlaşılması için gen akışını da (*PhiPT* ve *Nm*) incelemişlerdir. *Origanum* türlerinin Letswaart (1980)'in önerdiği taksonomiye karşılık geldiğini, türler ve bireyler arasındaki melezlemenin farklı türler ve bireyleri yakınlaştırdığını ya da uzaklaştırdığını tespit etmişlerdir.

El-Demerdash vd. (2019), AFLP markörleri kullanarak bazı Mısır'a ait bazı *Origanum* ve *Thymus* türlerinin genetik çeşitliliğini analiz etmişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda toplamda 193 adet amplifiye bant ve bu bantların %69

oranında polimorfizm gösterdiğini belirlemişlerdir. Çalışmada farklı bölgelerden toplanan *Origanum* ve *Thymus* türlerini kendi aralarında değerlendirmişler ve bu iki tür arasında %86 genetik benzerliğin olduğunu bildirmişlerdir.

Ahmed vd. (2020), ITS (Internal Transcribed Spacer) bölgelerine dayalı bazı *Origanum* ve *Thymus* türlerinin moleküler tanımlaması ve filogenetik ilişkilerini araştırmışlardır. Çalışmada, ITS bölgelerine dayanan moleküler tanımlama ve filogenetik ilişkileri kullanarak bazı *Origanum* ve *Thymus* türlerinin moleküler tanımlamalarını yapmışlar ve bu türler arasındaki filogenetik ilişkileri ortaya koymuşlardır. Çalışma sonucunda *Origanum* ve *Thymus* türleri arasında genetik benzerliklerin ve farklılıkların bulunduğunu bildirmişlerdir.

Ayaz vd. (2020), Pakistan’da yetişen bazı Lamiaceae türleri arasındaki filogenetik ilişkiyi incelemişlerdir. Çalışmada, *rps14* genine ait nükleotid dizilerine dayalı bir filogenetik ağaç oluşturmuşlardır. Çalışma sonucunda incelediklerin türlerin farklı alt gruplara ayrıldıklarını ve türler arasında genetik benzerliklerin ve farklılıkların bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar *Phlomis cashmeriana*, *O. vulgare*, *M. spicata*, *M. longifolia* ve *M. arvensis* türleri arasında *rps14* geni temelinde yakın benzerlik olduğunu tespit etmişlerdir.

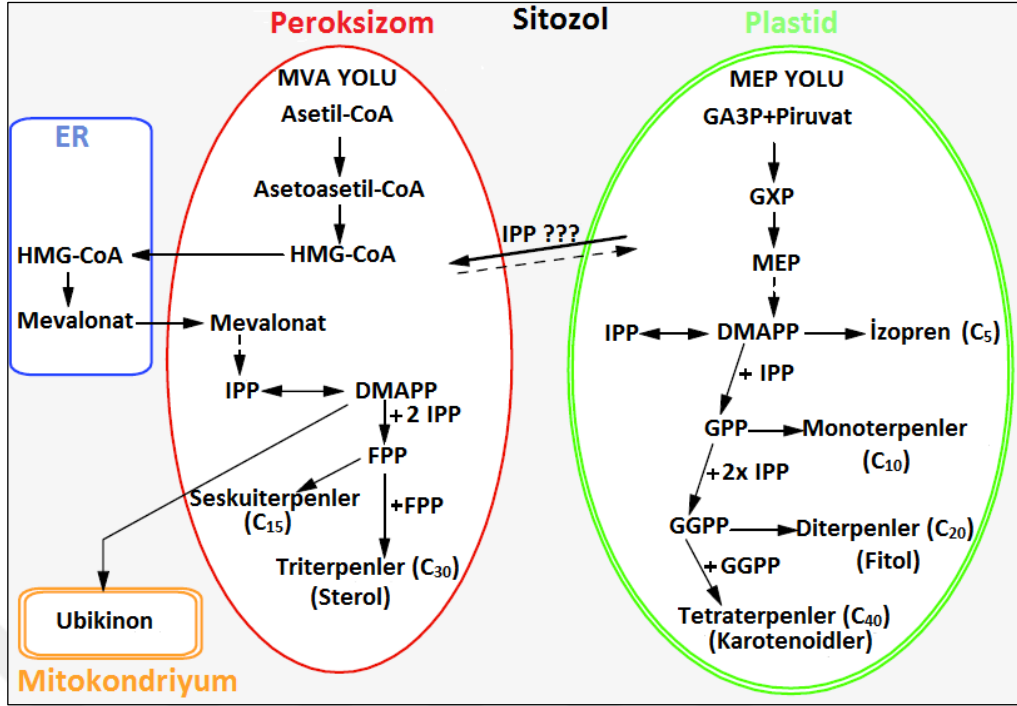
Papaioannou vd. (2020), 6 *Origanum* taksonuna (*O. dictamnus*, *O. majorana*, *O. onites*, *O. scabrum*, *O. sipyleum* ve *O. vulgare* subsp. *hirtum*) karşılık gelen 38 türde, SSR ve yüksek çözünürlüklü erime (high resolution melting (HRM)) tekniği ile türler arasındaki genetik benzerliği ortaya koymuşlardır. Araştırmacılar çalışma sonucunda tüm türlerin farklı kümelerde sınıflandığını, *O. vulgare*’nin ise göreceli çeşitlilik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Zoelfakar vd. (2020), kloroplast ribuloz 1, 5-bisfosfat karboksilaz (*rbcL*) ve maturase K (matK) barkod genlerini kullanarak *O. syriacum* ve *O. vulgare*’nin moleküler tanımlanması ve filolojik ilişkilerini araştırmışlardır. Araştırmacılar, *O. vulgare*’nin, 5 farklı *Origanum* türü ile %99.62 oranında benzerlik gösterdiğini ve Lamiaceae familyasına ait 17 farklı türden 49’u ile %96.97-99.62 oranında yakından ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Kerem (2021), Türkiye'de yetişen farklı kekik türlerinin moleküler genotiplerinin belirlenmesini amaçlamıştır. Bu amaçla 10 SSR markörü ile farklı kekik türlerinin filogenetik ilişkisini araştırmıştır. Çalışmada 10 ISSR primerinin 170 lokus ürettiğini ve bunların da 163 tanesinin polimorfik olduğunu tespit etmiştir. Çalışma sonucunda en yüksek genetik uzaklık değerinin ( $D = 0.62$ ) *T. cilicicus* ve *O. onites* türleri arasında olduğunu bildirmiştir.

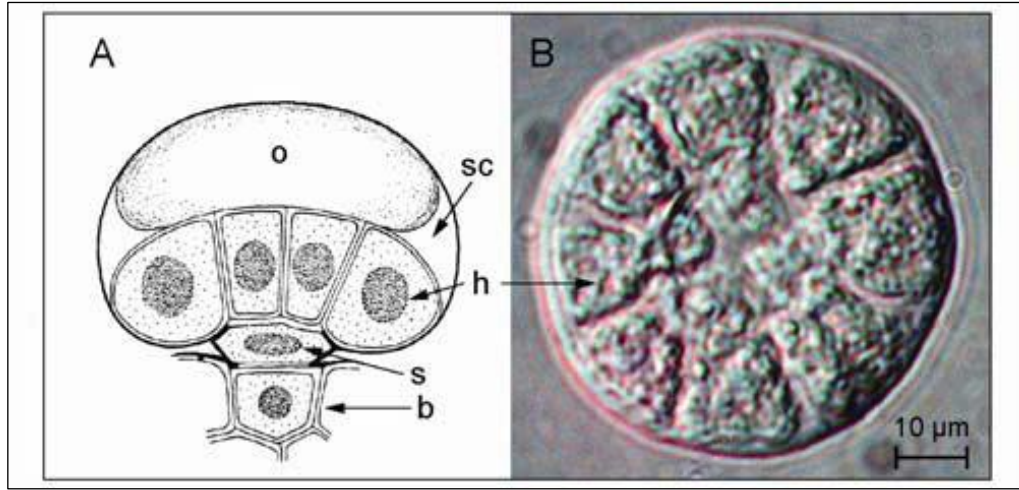
Özgen vd. (2021), *O. vulgare*'nin filogenetik analizi üzerine çalışma yürütmüşlerdir. Filogenetik analiz sonucunda, *O. vulgare* SRY61 izolatının *O. elongatum*, *O. compactum*, *O. grosii* ve *O. vulgare* ile aynı filogenetik grup içinde yer aldığını tespit etmişlerdir. Filogenetik analize göre moleküler tanımlaması yapılan *O. vulgare*'nin, gen bankasındaki diğer türlerle yakın bir ilişkide olduğunu belirlemişlerdir.

Bitkilerde terpen sentaz aktivitelerinin geniş kapsamlı araştırılması ve çeşitliliğinin ortaya konulması ilk kez Wise ve Rodney (1999) tarafından gerçekleştirilmiştir. Terpen çeşitliliği, sadece terpen sentazların sayısından değil aynı zamanda bu katalizörlerin tek bir substrattan birden fazla yan ürün oluşturma yeteneklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim Gambliel ve Croteau (1984), *in vitro* koşullarda saflaştırdıkları monoterpen ve seskiterpen sentazların neredeyse tümünün sentezledikleri ana ürünlere ek olarak yan ürünlerin oluşmasına da katkı sağladıklarını tespit edilmiştir. Terpenler, hem plastidik metileritritol yolu hem de sitosolik mevalonat yolu tarafından sentezlenen, beş karbonlu yapıya sahip izopentenil difosfat (IPP) ve izomeri olan dimetilalil difosfattan (DMAPP) oluşur (Gershenzon ve Kreis, 1999; Sapir-Mir vd., 2008; Sallaud vd., 2009). DMAPP ve IPP'nin preniltransferazlar tarafından birleştirilmesiyle, geranil difosfat (GPP, C10), DMAPP ve iki IPP'nin bir araya gelmesi ile de farnesil difosfat (FPP, C15) oluşur. Daha sonra, GPP ve FPP'nin doğrusal karbon iskeletleri, terpen sentazlar tarafından temel terpen iskeletlerine dönüştürülür (Şekil 1.1) (Tholl, 2006; Degenhardt vd., 2010).



Şekil 1.1. Bitkide terpen biyosentezinin şematik görünümü. Mevalonik asit (MVA) yolu, peroksizomlarda sitozolde ve endoplazmik retikulumda (ER) bulunur. Üç birim Asetil-CoA ile başlar ve son ürün olan farnesil pirofosfat (FPP) ile tamamlanır. Bu döngüde FPP tüm seskuiterpenler için öncü moleküldür. Metil-eritritol-fosfat (MEP) yolu plastidlerde bulunur ve ilk substratlar gliseraldehit-3-fosfat (GA<sub>3</sub>P) ve piruvattır. Geranil difosfat (GPP), tüm monoterpenlerin, geranil geranildifosfat (GGPP) ise diterpenlerin öncüsüdür

Bitkilerde terpen biyosentezi genellikle idioblastlar, kanallar veya trikomlar gibi özel morfolojik yapılarda gerçekleşmektedir (Fahn, 1988). Nane (*Mentha* sp.) ve fesleğen (*Ocimum basilicum*) gibi Lamiaceae türlerinde yapılan çalışmalarda, uçucu yağ biyosentezinin bitkilerin toprak üstü kısımlarında bulunan glandüler trikomlarda üretildiği saptanmıştır. Bu glandüler trikomlar, uçucu yağın biriktiği subkutiküler bir depolama boşluğu ile kaplanmış salgı hücreleri kümesinden oluşmaktadır (Şekil 1.2) (Gershenzon vd., 1989; Turner vd., 1999). Terpen sentaz genleri, *Mentha* cinsi dahil olmak üzere birçok Lamiaceae türünden izole edilmiş ve karakterize edilmiştir (Colby vd., 1993; Haudenschield vd., 2000). Diğer Lamiaceae türlerinde de *Salvia officinalis* (Wise vd., 1998), *S. pomifera* ve *S. fruticosa* (Kampranis vd., 2007), *Rosmarinus officinalis* (Tan vd., 2007), *Lavandula angustifolia* (Landmann vd., 2007) ve *Ocimum basilicum* (Iijima vd., 2004a,b) terpen sentaz genlerinin olduğu ve bu genlere yönelik çalışmaların devam ettiği bilinmektedir.



Şekil 1.2. Lamiaceae'nin peltat glandüler trikومları. (A) Bir sap hücreğine (s) dayalı bir bazal hücre (b) ve baş hücreleri (h) içeren bir peltat glandular trikومun şematik çizimi. Salgılanan terpenler hücre zarı altında bulunan boşlukta (sc) yağ damlası (o) olarak depolanmaktadır (Fahn, 1988). (B) Kekikten izole edilmiş glandüler trikومun baş hücrelerinin mikrofrafı. Sekiz büyük hücre, dört küçük iç hücre etrafında düzenlenmiştir

Diğer tüm terpenoidler gibi, monoterpenoidler de isopentenil difosfattan (IPP) türetilir ve IPP'nin alilik izomeri dimetilallil difosfattır (DMAPP) (Burke vd., 1999). Daha yüksek bitkilerde, izoprenoid yapı taşları, farklı sübselüler hücre bölümlerinde çalışan iki yolla oluşturulur (Rohmer vd., 1996). Sitosolik IPP ve DMAPP, mevalonat (MVA) yolu üzerinden asetil-CoA'dan yedi enzimatik adımda sentezlenir ve 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA redüktaz (HMGR) reaksiyonunun bu yolda hız sınırlayıcı olduğu kabul edilmektedir (Schaller vd., 1995). Plastidlerde, IPP ve DMAPP fosfat (MEP) yolu ile metileritritol-4- tarafından oluşturulur. Bu yolun ilk reaksiyonunda, 1-deoksi-D-ksilüloz -fosfat (DXP), piruvat ve d-gliseraldehit 3-fosfattan sentezlenir. Bu adım, 1-deoksi-D-ksilüloz -fosfat sentaz (DXS) ile katalize edilir. DXP'nin MEP'e dönüşümü, 1-deoksi-D-ksilüloz fosfat redüktoizomeraz (DXR) ile katalize edilir ve MEP yolunun ilk kararlı adımıdır (Rohmer vd., 1996). DXR, IPP ve DMAPP ara bileşenlerinin biyosentetik yollara yönlendirilmesinde kritik bir rol oynar (Carretero-Paulet vd., 2002). Bazı çalışmalar, DXR'nin MEP yoluna DXS yolundan daha fazla katkıda bulunduğunu göstermiştir (Estevez vd., 2001; Carretero-Paulet vd., 2002). Bitkilerde izoprenoid sentezinin kontrolünde DXR'nin rolü deneysel sonuçlarla da desteklenmektedir. Transgenik nanede (*Mentha x piperita*) DXR'nin aşırı ifadesi sonucu yaprak dokusunda uçucu yağ monoterpenlerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Mahmoud ve Croteau, 2001).

Monoterpenlerin biyosentezini  $\gamma$ -terpinen ara maddesi yoluyla yöneten genler bulunmaktadır ve bu genlerin keşfi şu anda aktif bir araştırma alanıdır (Mendes vd., 2014). Bu genlerden biri yukarıda da belirtmiş olduğumuz üzere DXR geni diğeri ise terpen sentaz 1 (TPS1) genidir. TPS1, terpen biyosentezinde rol alan bir gendir. TPS1 geni, bitkilerdeki terpen sentaz enzimlerini kodlar. Terpen sentazları, prenil difosfat ara ürünlerini, geranil difosfat (GPP) ve farnesil difosfat (FPP) gibi, çeşitli mono- ve seskiterpenlere dönüştürmekten sorumludur. Bu bileşikler bitki metabolizmasında önemli rol oynamakta ve çeşitli biyolojik işlevlere katkı sağlamaktadır. TPS1'in spesifik fonksiyonları ve özellikleri, bitki türüne göre değişiklik gösterebilmektedir. TPS1, bazı terpenlerin biyosentezini katalizleyebilmekte veya çeşitli terpen bileşiklerin üretimine katkıda bulunabilmektedir. TPS1 genleri, *O. vulgare* dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerinde tanımlanmış ve karakterize edilmiştir (Crocoll vd., 2010). Bu genler, *O. vulgare*'nin uçucu yağında bulunan terpenlerin biyosentezinde önemli bir rol oynamakta ve bitkinin aroma, lezzet ve potansiyel ilaç olma özelliklerine katkı sağlamaktadırlar. Benzer şekilde DXR, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP) yolu olarak da bilinen izoprenoid sentez yolunda önemli bir enzimdir. DXR, mevalonat yolu dışında bitkilerde ve bazı bakterilerde izoprenoid bileşiklerin sentezine katkıda bulunan alternatif bir yol olan MEP yolu üzerinde yer alır. DXR, 1-deoksi-D-ksilüloz-5-fosfatı 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfata dönüştürerek izoprenoid sentezine katkıda bulunur. İzoprenoid bileşikler, doğal olarak birçok farklı biyolojik fonksiyona sahip olan geniş bir bileşik ailesidir. Bunlar arasında vitaminler, hormonlar, pigmentler, kokular ve savunma bileşikleri bulunur. DXR enzimi, izoprenoid sentez yolunda yer alarak bu değerli bileşiklerin oluşumuna katkıda bulunur. DXR enzimi, izoprenoid sentezinin erken aşamalarında yer aldığı için önemli bir enzimdir. İzoprenoidler, hücrelerde birçok biyokimyasal işlevi yerine getiren ve genellikle fitokimyasallar, steroidler, karotenoidler, klorofil, sitokinler ve terpenoidler gibi çeşitli bileşikler içeren bir bileşik sınıfını ifade eder. Dolayısıyla, DXR enzimi, izoprenoid bileşiklerin hücresel düzeyde sentezinde kritik bir rol oynar. DXR enzimi, biyoteknolojik uygulamalarda da önemli bir role sahiptir. Özellikle, izoprenoid bileşiklerin ticari üretimi için DXR enziminin optimize edilmiş formları ve verimli üretim süreçleri geliştirilmeye çalışılmaktadır (Mahmoud ve Croteau, 2002). Aşağıda DXR ve TPS genleri ile ilgili farklı bitki türlerinde yapılmış bazı çalışmalar verilmiştir;

### 2.3. Farklı Bitki Türlerinde DXR Geni Üzerine Yapılmış Çalışmalar

Majdi vd. (2017) tarafından yapılan bir çalışmada *T. vulgaris*'te monoterpen biyosentezinin daha iyi anlaşılması amacıyla, timol ve karvakrol biyosenteziyle ilgili genlerin farklı dokularda ve abiyotik elisitörlere karşı ifadesi analiz edilmiştir. Bu amaçla *T. vulgare* yapraklarına, metiljasmonat (MeJA), salisilik asit (SA), trans-sinamik asit (tCA) ve UV-C ışınlaması uygulanarak DXR (erken aşama geni) ve *TvTPS1*, *CYP71D178* ve *CYP71D180* (geç aşama genleri) biyosentetik genlerinin transkript seviyeleri ölçülmüştür. Sonuçta erken ve geç aşama genlerinin farklı şekilde düzenlendiği tespit edilmiştir.

Grolle vd. (2000), izopentenil difosfat biyosentezi için 2-C-metil-D-eritritol 4 fosfat (MEP) yolunun ikinci enzimi olan 1-deoksi-D-ksilüloz -fosfat (DXP) redüktoizomerazı kodlayan geni *Zymomonas mobilis*'ten klonlayıp ve sekanslamışlardır. Araştırmacılar elde ettikleri amino asit dizisinin *Escherichia coli*'nin DXP redüktoizomeraz geni ile %48.2 oranında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Yao vd. (2003), DXR'nin rolü hakkında daha fazla bilgi edinmek için, tam uzunluktaki DXR geninin (*CaDXR*) *Camptotheca acuminata*'dan karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar *CaDXR*'nin tam uzunluktaki cDNA'sının, 472 amino asitlik bir polipeptidi kodlayan 1 416 bç'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) içeren 1 823 bç uzunluğunda olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca karşılaştırmalı ve biyoinformatik analizler sonucunda, *CaDXR*'nin diğer bitki türlerinden izole edilen DXR'ler ile kapsamlı homoloji gösterdiğini bildirmişlerdir.

Gong vd. (2005), *Ginkgo biloba*'da ginkgolid biyosentezinde görev alan DXR geninin izolasyonunu ve karakterizasyonunu hedeflemişlerdir. Araştırmacılar tam uzunluktaki DXR cDNA dizisini (GenBank erişim numarası: AY443101), cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu (RACE) tekniği kullanılarak ilk kez açık tohumlu bir bitki türü olan *Ginkgo biloba*'dan klonlanmış ve karakterize etmişlerdir. Çalışma sonucunda *GbDXR*'nin tam uzunluktaki cDNA'sının 52 kDa moleküler kütleye ve 6.58 izoelektrik noktasına sahip 477 amino asitlik bir proteini kodlayan 1 431 bç'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) içeren 1 720 bç uzunluğunda gen yapısında sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar karşılaştırmalı ve biyoinformatik analizler ile

*GbDXR*'nin diğ er bitki türlerinden izole edilen DXR'ler ile kapsamlı homoloji gösterdiğini ve plastidler için korunmuş bir geçiş peptidi, genişletilmiş bir Pro-zengin bölge ve tüm bitki DXR'lerinin sahip olduğu N-terminal bölgesinde oldukça korunmuş bir NADPH bağlama motifi içerdiğini bildirmişlerdir.

Seetang-Nun vd. (2008), *Hevea brasiliensis*'ten DXR1 ve DXR2 genlerinin moleküler klonlaması ve karakterizasyonunu hedeflemişlerdir. Bu amaçla araştırıcılar yaprak örneklerinden *HbDXR1* ve *HbDXR2* olarak adlandırılan iki genin tam uzunluktaki cDNA'larını elde etmişlerdir. Her iki cDNA'nın da moleküler kütlesi yaklaşık 51 kDa olan 471 amino asitlik bir proteini kodlayan 1 416 bç'lik bir ORF'ye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca elde edilen genlerin diğ er bitki türlerinden izole edilen DXR genleri ile %73-87 oranında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır. Araştırıcılar aynı zamanda southern blotlama ile DXR geninin genom içerisinde tek kopyasının olduğunu ve *E. coli*'den izole edilen gen ile çok benzer olduğunu bildirmişlerdir.

Chan vd. (2009), *Vanda Mimi* Palmer'dan DXR transkriptinin moleküler karakterizasyonunu hedeflemişlerdir. Araştırıcılar *VMPDXR*'yi başarıyla izole etmişler ve tam uzunluktaki cDNA'sının, bir poli-A kuyruğu içeren 15 b  5' UTR ve 230 b  3' UTR ile 473 amino asitlik bir proteini kodladığını bildirmişlerdir.

Wu vd. (2009), *S. miltiorrhiza*'da DXR geninin klonlanması ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Araştırıcılar klonlanan tam uzunluktaki cDNA'nın, 474 amino asitlik bir proteini kodlayan 1 756 bç'lik bir ORF'ye sahip olduğunu saptamışlardır. *SmDXR* olarak adlandırdıkları genin amino asit dizisinin *Mentha   piperita* ile %94, *O. sativa* ile %82 ve *Arabidopsis thaliana* ile de %80 homoloji sergilediğini bildirmişlerdir.

Yan vd. (2009), *S. miltiorrhiza*'da bulunan DXR geninin moleküler karakterizasyonunu ve gen ekspresyon seviyesini belirlemeye çalışmışlardır. Biyoinformatik analizler sonucunda, DXR'nin diğ er bitki türlerinden izole edilen DXR'lerle homoloji gösterdiğini saptamışlardır. Filogenetik analizlerin, *S. miltiorrhiza*'dan izole edilen DXR'nin *Lycopersicon esculentum*'dan izole edilen DXR ile en yakın ilişkiye sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırıcılar ekspresyon

analizi sonucunda yapraklarda güçlü bir şekilde ifade edildiğini, bunu kök ve gövdenin takip ettiğini bildirmişlerdir.

Yang vd. (2012), *Amomum villosum*'da MEP'te rol alan DXR ve DXS kodlayan genlerin karakterizasyonu ve fonksiyonel analizi üzerine çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmacılar *AvDXR*'nin 1 749 bp tam uzunluktaki cDNA'sının, 472 amino asitlik bir proteini kodladığını ve *AvDXS*'nin ise 2 347 bp'lik tam uzunluktaki cDNA'sının, 715 amino asitlik bir proteini kodladığını bildirmişlerdir. Ayrıca izole edilen *AvDXR* ve *AvDXS* genlerinin aminoasit dizilerinin diğer türlerden izole edilenler ile yüksek oranda benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Gupta vd. (2013), Hint ginsengi olan *Withania somnifera*'dan izoprenoid biyosentezi için 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfat (MEP) yolunda yer alan genlerin klonlanması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Bu amaçla ilk olarak, bu yolun kilit enzimlerini kodlayan DXS ve DXR genlerinin tam uzunluklu cDNA'larını moleküler klonlama yöntemleri kullanılarak elde etmişlerdir. Araştırmacılar *Withania somnifera* DXS (*WsDXS*) ve DXR (*WsDXR*) genlerinin tam uzunluktaki cDNA'larının sırasıyla 2 154 ve 1 428 bp uzunluğunda olduğunu ve 717 ve 475 amino asit uzunluğundaki proteinleri kodladıklarını tespit etmişlerdir.

Liu vd. (2015), *Aquilaria sinensis*'ten DXR geninin izolasyonu ve karakterizasyonunu hedeflemişlerdir. Araştırmacılar *AsDXR*'nin tam uzunluktaki cDNA'sının 1 768 bp, moleküler ağırlığının 51.859 kDa ve izoelektrik noktasının 6.29 olan 478 amino asitlik bir proteini kodlayan 1 437 bp'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Tong vd. (2015), *Tripterygium wilfordii*'de terpenoid biyosentezinde görev alan DXS ve DXR genlerinin moleküler klonlaması ve karakterizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar DXR geninin tam uzunluktaki cDNA'sının, 469 amino asitlik bir proteini kodlayan 1 410 bp'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) içeren 1 816 bp uzunluğunda olduğunu tespit etmişlerdir. Çalışmada iki farklı DXS geni klonladıklarını (DXS1 ve DXS2) ve DXS1 geninin tam uzunluktaki cDNA'sının, 717 amino asitlik bir proteini kodlayan 2 154 bp'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) içeren 2 556 bp uzunluğunda DXS2 geninin ise tam uzunluktaki cDNA'sının, 715 amino asitlik bir proteini kodlayan

2 148 bç'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) içeren 2 412 bç uzunluğunda olduğunu tespit etmişlerdir.

Fan vd. (2016), *Dendrobium officinale*'de DXS ve DXR genlerinin moleküler klonlaması ve gen ifadelerini belirlemişlerdir. Çalışmada *DoDXS* ve *DoDXR* olarak adlandırılan iki tam uzunluktaki cDNA'nın, sırasıyla 727 ve 470 amino asit uzunluğundaki proteinleri kodladığını saptamışlardır. Ayrıca ilgili genlerin diğer bitki kısımlarına kıyasla köklerde ve gövdelerde daha yüksek transkript seviyesine ulaştığını bildirmişlerdir.

Ghobadi vd. (2016), *Satureja hortensis*'te timol ve karvakrol biyosentezinde rol alan DXR ve gama-terpinen sentaz (GTS) genlerinin abiyotik elisitörlere karşı göstermiş oldukları ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar salisilik asit, metil jasmonat ve UV-B ışınları gibi abiyotik elisitörlerin etkisi altında her iki genin ekspresyon seviyelerinde önemli değişiklikler olduğunu ve stres esnasında gen ekspresyon seviyelerine paralel olarak timol ve karvakrol gibi sekonder metabolitlerin üretiminin de arttırılabileceğini bildirmişlerdir.

Mashhady Malekzadeh vd. (2017), *T. vulgaris*'te timol ve karvakrol biyosentezinde rol alan DXR,  $\gamma$ -terpinen sentaz, *CYP71D178* ve *CYP71D180* genlerinin ekspresyon modellerini incelemişlerdir. Araştırmacılar yukarıda belirtilen genlerin yapraklara göre çiçeklerde daha yüksek ekspres olduğunu bu nedenle çiçeklerin daha fazla uçucu yağ içerdiğini bildirmişlerdir.

Cheng vd. (2019), *Dioscorea zingiberensis* bitkisinden DXR geninin klonlanması ve karakterizasyonunu hedeflemişlerdir. Araştırmacılar *DzDXR* geninin 470 amino asitlik bir proteini kodlayan 1 413 bç ORF'ye sahip 1 643 bç'lik tam uzunlukta bir cDNA'ya sahip olduğunu tespit etmişlerdir. NCBI'de yaptıkları BLAST analizi ile *DzDXR*'nin diğer bitki DXR'leriyle özellikle tek çeneklilerle yüksek dizi benzerliği (*Lilium longiflorum* DXR geni ile %87 benzerlik) gösterdiğini bildirmişlerdir.

Xu vd. (2019), *Populus trichocarpa*'nın DXS ve DXR genlerinin gen ekspresyon seviyelerini incelemişlerdir. Araştırmacılar yaprak ve köklerde yapmış oldukları gen ekspresyon analizinde söz konusu genlerin yapraklarda daha yüksek ifade edildiğini

tespit etmişlerdir. Ayrıca DXR geninin abiyotik ve biyotik streslere karşı bitkide toleransı geliştiren işlevsel bir proteini kodladığını, bitkide büyüme ve gelişme gibi süreçlere geniş ölçüde katkı sağladığını bildirmişlerdir.

Xie vd. (2020), *Morinda officinalis*'de DXR geninin ve promotör bölgesinin klonlanması ve analizi gerçekleştirmişlerdir. DXR geninin tam uzunlukluktaki cDNA'sını moleküler klonlama teknikleri kullanılarak elde etmişler ve 2 015 bç uzunlukta olduğunu bildirmişlerdir. Ardından, elde ettikleri cDNA dizisini, dizileme yöntemleriyle doğrulamışlardır. DXR geninin açık okuma çerçevesi (ORF) boyutu 1 425 bp uzunluğunda belirlemişler ve bu bölgenin, 474 amino asitlik bir proteini kodladığını tespit etmişlerdir. DXR geninin promotor bölgesinin 1 493 bç uzunluğunda olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar NCBI veritabanında BlastP ile yaptıkları dizi karşılaştırması ile *MoDXR*'nin *Coffea arabica* DXR (*CaDXR*) ve *Rauvolfia verticillata* DXR (*RvDXR*) gibi birçok başka DXR ile yüksek dizi benzerliği gösterdiğini saptamışlardır.

Zhang vd. (2021), *Santalum album*'de DXR geninin moleküler klonlaması ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. *SaDXR* olarak adlandırdıkları geninin tam uzunluktaki cDNA'sının, 1 416 bç'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) içeren 1 826 bç uzunluğunda bir gen yapısına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Xu vd. (2023), *Atractylodes lancea*'dan DXS ve DXR genlerini klonlamışlar ve metil jasmonat uygulaması ile ilgili genlerin gen ekspresyon profillerini incelemişlerdir. Araştırmacılar *AlDXS* ve *AlDXR* genlerinin abiyotik ve biyotik stres etkisi altında gen ekspresyon seviyelerinin yükseldiğini ve ifadenin en yüksek olduğu dokunun yaprak olduğunu bildirmişlerdir.

#### **2.4. Farklı Bitki Türlerinde TPS1 Geni Üzerine Yapılmış Çalışmalar**

Kim vd. (2008), *Panax ginseng*'ten terpen sentaz geninin izolasyonu ve karakterizasyonunu hedeflemişlerdir. *PgTPS* olarak adlandırdıkları genin cDNA'sının 1883 nükleotid uzunluğunda olduğunu ve bu genin 1707 bç'lik kısmının ORF'yi içerdiğini ve 568 aminoasitlik bir terpen sentaz proteinini kodladığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri amino asit dizisinin, *Actinidia deliciosa* (AAX16121) ile

%61, *Vitis vinifera* (AAS66357) ile %61, *Linepithema hirsutum* (AAG41891) ile %55 ve *Medicago truncatula* (AAV36464) ile de %52 benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Crocoll vd. (2010), *O. vulgare*'de terpen sentaz biyosentezinin düzenlenmesi ve biyolojik rollerini araştırmışlardır. Bu amaçla araştırmacılar kekik bitkisinden 7 farklı terpen sentaz geni (*Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps5*, *Ovtps6*, *Ovtps7*) izole etmişlerdir. Çalışma sonucunda *O. vulgare*'nin muhtemel monotermen sentaz genlerinin (*Ovtps5* hariç) diğer bitkilerde bilinen terpen sentaz genleriyle %60 amino asit dizi benzerliği gösterdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar bu genlerin 1 659 ile 1 803 bç uzunluğunda olduğunu 24 ile 35 amino asitlik proteini kodladığını bildirmişlerdir.

Li ve Fan (2011), *Hedychium coronarium*'da koku oluşumundan sorumlu *HcTPS2* genini izole etmişlerdir. Araştırmacılar söz konusu genin, 1 788 bç ORF'ye sahip olduğunu, 66.7 kDa moleküler kütleye sahip 596 amino asitlik bir protein kodladığını tespit etmişlerdir. Ayrıca elde edilen amino asit dizisinin diğer türlerde bilinen monoterpenten sentaz genleriyle %35-38 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Hsu vd. (2012), *Toona sinensis* yapraklarında koku bileşenlerinin biyosentezinden sorumlu *TsTPS1* ve *TsTPS2* terpen sentaz genlerinin izolasyonu, fonksiyonel karakterizasyonu ve regülasyonunu incelemişlerdir. Araştırmacılar *Tstps1* geninin 1 788 bç uzunluğunda, yaklaşık olarak 68.82 kDa moleküler ağırlığında, 595 amino asitlik bir proteini kodladığını saptamışlardır. *Tstps2* geninin ise 1 671 bç uzunluğunda ve yaklaşık olarak 64.77 kDa moleküler ağırlığında, 556 amino asitlik bir proteini kodladığını bildirmişlerdir.

Vezzano vd. (2012), *Olea europaea* L. meyvelerinin olgunlaşması sırasında tat gelişiminde rol alan terpen sentaz genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. RACE PCR yöntemiyle üç potansiyel tam uzunlukta TPS kodlayan gen elde ettiklerini ve sırasıyla *OeTPS1* geninin, 1 749 nükleotidlik ORF bölgesine sahip olduğunu ve 67 kDa moleküler ağırlığında, 583 amino asitlik bir proteini kodladığını, *OeTPS2* geninin, 1 644 nükleotidlik ORF bölgesine sahip

olduğunu ve 64 kDa moleküler ağırlığında, 548 amino asitlik bir proteini kodladığını, ve *OeTPS3* geninin ise 1 827 nükleotidlik ORF bölgesine sahip olduğunu ve 71 kDa moleküler ağırlığında, 609 amino asitlik bir proteini kodladığını bildirmişlerdir. Araştırmacılar *OeTPS1* geninin *Phyla dulcis* (ADK62524) ile %68 dizi benzerliği gösterdiğini, *Ocimum basilicum*'un geraniol sentaz geni ile (AAR11765) %62 ve *O. basilicum*'dan izole edilen R-linalool sentaz geni ile de (Q5SBP3) %58 yüksek benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Yang vd. (2013), *Gossypium hirsutum*'dan *GhTPS1*, *GhTPS2* ve *GhTPS3* terpen sentaz genlerinin izolasyonu ve karakterizasyonunu hedeflemişlerdir. Araştırmacılar çalışma sonucunda *GhTPS1* (KC878726), *GhTPS2* (KC878727) ve *GhTPS3* (KC878728) genlerinin sırasıyla 1 943, 1 951 ve 1 940 bp uzunluğunda olduklarını ve 545, 559 ve 595 amino asitlik protein kodladıklarını bildirmişlerdir. *GhTPS1* ve *GhTPS2* genlerinden elde edilen protein dizilerinin birbirlerine %65 benzerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Yahyaa vd. (2015), *Laurus nobilis* bitkisinde üç farklı terpen sentaz geninin (*LnTPS1*, *LnTPS2* ve *LnTPS3*) izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar *LnTPS1* geni tarafından kodlanan proteinin 582 amino asitten oluştuğunu ve 67.4 kDa moleküler ağırlıkta, *LnTPS2* geni tarafından kodlanan proteinin 551 amino asitten oluştuğunu ve 63.8 kDa moleküler ağırlıkta ve *LnTPS3* geni tarafından kodlanan proteinin ise 852 amino asitten oluştuğunu ve 97.7 kDa moleküler ağırlıkta olduğunu saptamışlardır.

Ruan vd. (2016), *Artemisia annua* bitkisinden üç yeni monoterpen sentaz geninin izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar çalışmada, *AaTPS2* (KF987082), *AaTPS5* (KF987083) ve *AaTPS6* (KF987084) olarak adlandırılan üç yeni monoterpen sentaz geni tespit etmişlerdir. Bu genlerin kodladığı proteinlerin sırasıyla 586, 602 ve 587 amino asitlik yapıya sahip olduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca bu yeni monoterpen sentazların daha önce farklı bitkilerden izole edilen *AaQH1*, *AaQH5* ve *AaQH6* genleri ile yüksek oranda benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir.

Poyraz ve Sağlam (2017), *O. onites*'te TPS-6 geninin kısmi klonlanması ve dizilenmesi amaçlanmışlardır. Bu amaçla bitkiden toplam RNA izole etmişler ve ters transkriptaz enzim aracılığıyla RNA'ları cDNA'ya dönüştürmüşlerdir. Daha sonra ilgili genin orta bölgesini bulmak adına dejenere primer tasarlamışlardır. Elde ettikleri DNA fragmentını klonlama vektörüne transfer ederek klonlamışlardır. Sekanslama sonucunda 481 nükleotid uzunluğundaki genin 160 aminoasitlik bir proteini kodladığı bildirmişlerdir.

Gao vd. (2018), *Freesia x hybrida* çiçeklerinde terpen sentaz genlerinin tanımlanması ve karakterizasyonu üzerine yaptıkları çalışmada *FhTPS1-FhTPS8* olarak adlandırılan toplam sekiz *FhTPS* geni karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar *FhTPS1-FhTPS8* ORF dizilerinin sırasıyla 592, 595, 590, 566, 607, 566, 570 ve 566 amino asitlik protein kodladığını ve diğer türlerden elde edilen TPS proteinleriyle yüksek dizi benzerliği gösterdiğini bildirmişlerdir.

Abbas vd. (2019), *Lilium 'Siberia'* çiçeklerinde koku oluşumundan sorumlu iki terpen sentaz (TPS) geninin (*LoTPS1* ve *LoTPS3*) fonksiyonel karakterizasyonu ve ifade analizlerini gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar *LoTPS1* ve *LoTPS3*'ün tam uzunluktaki cDNA'larının 1 758 ve 1 614 bp uzunluğunda olup, sırasıyla 586 ve 538 amino asitlik protein kodladığını ve moleküler ağırlıklarının sırasıyla 67.6 ve 62.69 kDa olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca *LoTPS1*'in amino asit dizisinin *P. trichocarpa*'dan izole edilen *TPS4* (%45.88) ile *LoTPS3* geninin ise *Cinnamomum osmophloeum* (S-+)-linalool sentazı ile yüksek benzerlik oranına (%40.85) sahip olduğunu bildirmişlerdir (Danner vd., 2011; Lin vd., 2014). *LoTPS1* ve *LoTPS3* genlerinin ise birbirleriyle %27.41 oranında benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

Nawade vd. (2019), *Prunus dulcis* meyvelerinden yedi farklı terpen sentaz geninin (*PdTPS1*, *PdTPS2*, *PdTPS3*, *PdTPS4*, *PdTPS5*, *PdTPS6* ve *PdTPS7*) izolasyonu ve karakterizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar *PdTPS1* geninin 1 671 bp, *PdTPS2* geninin 1 689 bp, *PdTPS3* geninin 1 662 bp, *PdTPS4* geninin 1 689 bp, *PdTPS5* geninin 1 860 bp, *PdTPS6* geninin 1 671 bp ve *PdTPS7* geninin 1 713 bp uzunluğunda olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar *PdTPS1- PdTP7*'ye kadar genlerin sırasıyla 557, 563, 554, 563, 620, 557 ve 571 amino asitlik protein

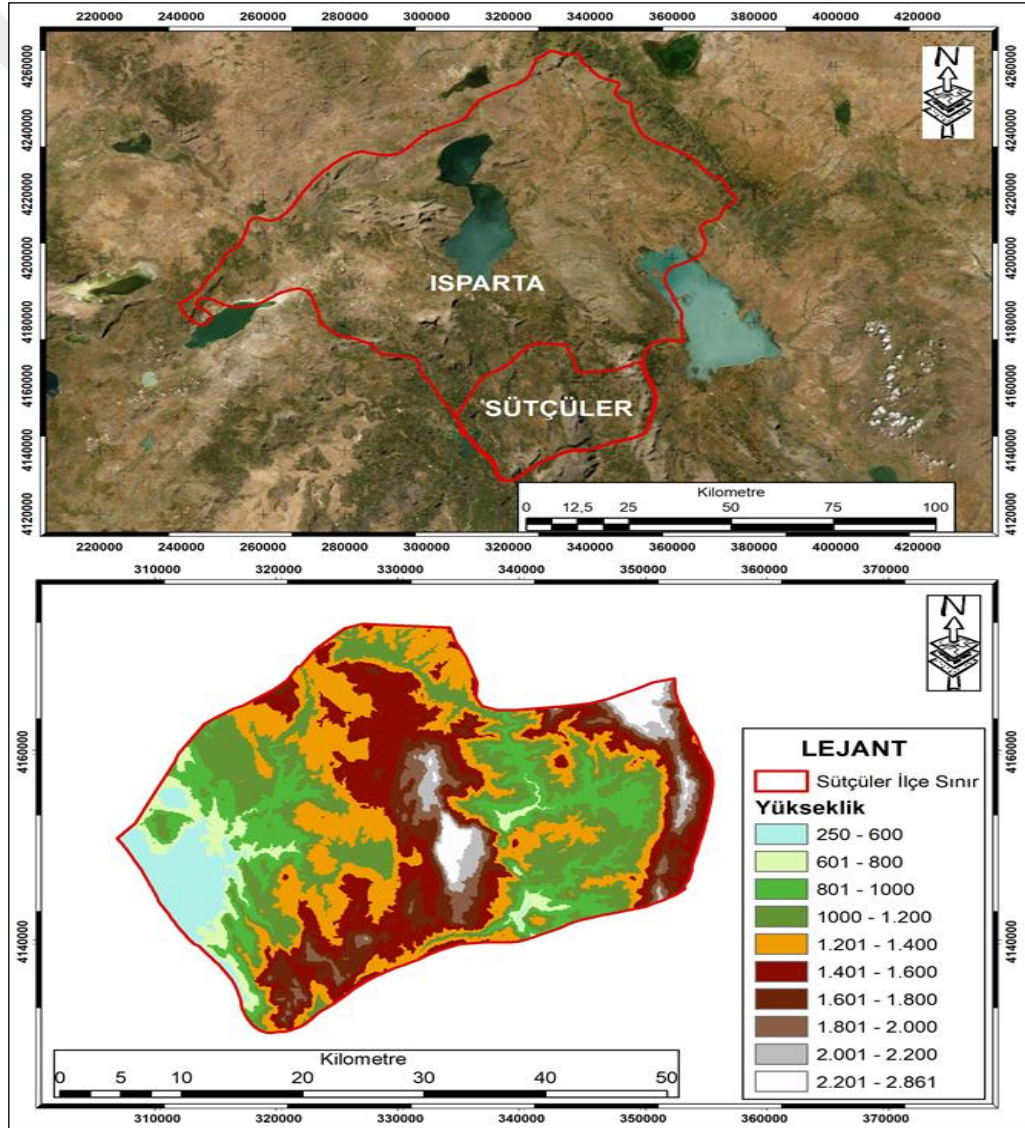
kodladığını ve moleküler ağırlıklarının 62.8-70.2 kDa arasında değiştiğini bildirmişlerdir.



### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak “Sütçüler Kekigi” bitkisinin (*O. minutiflorum*) genç yaprakları kullanılmıştır. Bitkisel materyaller Isparta ilinin Sütçüler ilçesinden toplanmış (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2) ve sıvı azot ile dondurulduktan sonra laboratuvarında -80°C’de muhafaza edilmiştir. Çalışmada kullanılan materyallerin toplanması hususunda TAGEM (Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü)’nden ve Isparta İl Tarım ve Orman Müdürlüğü’nden gereken izinler alınmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bitkisel materyallerin toplandığı koordinat



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan bitkisel materyallerin toplandığı alanlar

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. RNA izolasyonu

Toplam RNA'lar RNeasy Plant Mini Kit (Katalog no: 74904) yardımıyla üretici firmanın protokolüne göre izole edilmiştir. Bu amaçla;

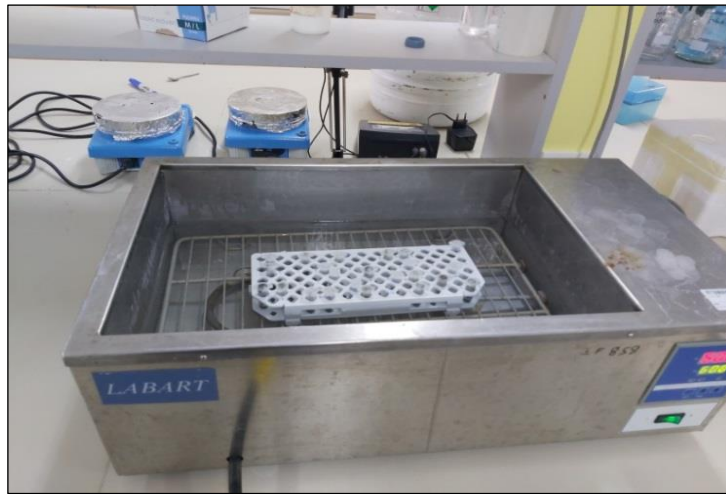
1. 100 mg kekik örneği tartılmış ve sıvı azot içerisinde öğütülmüştür (Şekil 3.3).
2. Öğütülen örnekler 2 ml steril ependorf tüplere aktarılmış ve üzerine 450 µl Buffer RLT eklenip vortekslenmiştir.
3. Elde edilen homojenat 2 ml'lik toplama tüpüne aktarılıp 2 dk 14.000 g de santrifüj edilmiştir.
4. Santrifüj sonrası sıvı kısım uzaklaştırılmış ve pelet üzerine 500 µl %96'lık EtOH eklenmiştir.
5. Elde edilen karışım RNeasy Mini spin column tüpüne aktarılıp 15 sn 8 000 g'de santrifüj edilip sıvı kısım tekrar uzaklaştırılmıştır.
6. Pelet üzerine 700 µl RW1 buffer eklenip tekrar 15 sn 8 000 g'de santrifüj edilmiştir.
7. Sıvı kısım atılıp kolonun üzerine 500 µl RPE bufferden eklenip 15 sn 8 000 g'de santrifüj edilip tekrar sıvı kısım uzaklaştırılmıştır.
8. RNA'nın tamamen diğer nükleik asitlerden temizlenmesi adına 7. adım tekrarlanmıştır.
9. RNeasy Mini spin column temiz bir ependorf tüpe aktarılmış ve maksimum hızda peletin tamamen kuruması için tekrar bir santrifüj işlemi gerçekleştirilmiştir.
10. Son aşamada pelet üzerine 50 µl RNase-free su ilave edilerek jel elektroforozinde RNA kaliteleri kontrol edilmiştir.



Şekil 3.3. Kekik yapraklarından RNA izolasyonu

### 3.2.2. DNaz I uygulaması

Muhtemel DNA kontaminasyonunu ortadan kaldırmak amacıyla, toplam RNA izolatları DNaz uygulama kiti (Ambion) (Katalog no: AM2222) ile muamele edilmiştir. Bu amaçla, kullanılan toplam RNA'nın 0.1 hacminde 10X DNaz I tampon çözeltisi (100 mM Tris, pH 7.5, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM CaCl<sub>2</sub>) ve 1.5 µL DNaz I toplam RNA'ya ilave edildikten sonra 37°C'de 30 dk bekletilmiştir (Şekil 3.4). Bu karışıma RNA'nın 0.2 hacminde DNaz inaktivasyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilmiştir. 10 000 g'de 1.5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant alınmış ve kontrol edilmek amacıyla %1.2'lik agaroz jelde yürütülmüştür.



Şekil 3.4. RNA örneklerinin 37°C'de inkübasyonu

### 3.2.3. Toplam RNA miktar tayini

RNA izolasyonu sonrası elde edilen RNA'nın kalitesini belirlemek amacıyla spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. Okuma öncesi kuvartz küvetler 0.1 M NaOH ve 1mM EDTA içeren solüsyonla temizlenmiş ve ardından DEPC'li su ile yıkanmıştır. RNA'lar DEPC'li su ile 1/1000 oranında seyreltilmiştir. RNA örneklerinin kalitesi aşağıda verilen Denklem (3.1)'e göre hesaplanmıştır. Ayrıca RNA örneklerinin kaliteleri nanodrop ile de kontrol edilmiştir (Şekil 3.5).

$$(\mu\text{g/ml}): 40 \times \text{OD}_{260} \times \text{Sulandırma faktörü} = 40 \times \text{OD}_{260} \times 1000 \quad (3.1)$$

40: RNA'nın 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon katsayısı

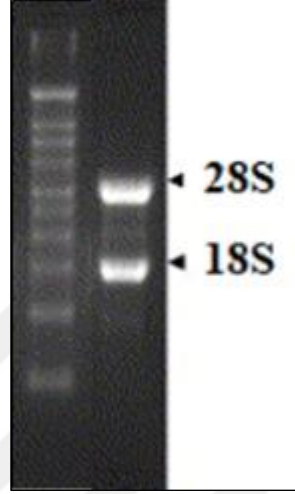


Şekil 3.5. RNA örneklerinin kalitelerinin kontrolünde kullanılan nanodrop cihazı

### 3.2.4. Toplam RNA'ların formaldehitli agaroz jelde ayrıştırılması

RNA izolasyonu sonucunda elde edilen toplam RNA'nın kalitesi formaldehit-agaroz jel elektroforezi kullanılarak incelenmiştir (Bryant ve Manning, 1998). Bu amaçla %1'lik agaroz jel (1 g agaroz 83 ml saf suda eritilmiş ve 50 °C'ye kadar soğutulmuştur) hazırlanmıştır. Daha sonra pH 7.0 olan 10 ml 10X MOPS [0.4 M MOPS (3-(N-morpholino) propanesülfonik asit)], 0.01 M EDTA, 0.1 M sodyum asetat, 7 ml %37'lik folmaldehit ve %0.1 oranında etidyum bromür (EtBr) ilave edilmiştir. 3 µg RNA ile formaldehit yükleme solüsyonu (%50 gliserol, 1mM EDTA, %0.25 bromofenol,

%0.25 xylene cyanol) 1:2 oranında karıştırıldıktan sonra 65°C’de 10 dk denatürasyona tabi tutulmuştur. Denatürasyon sonrası buza alınan örnekler kuyulara yüklenmiş ve 1X MOPS solüsyonu içerisinde jel elektroforezinde koşturulmuştur. Jel elektroforezinde 28S rRNA bandının yoğunluğu 18S rRNA’nın 2 katı olanlar tercih edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. PCR işleminden sonra %1’lik agaroz jelde koşturulan örnekler

### 3.2.5. cDNA sentezi

DNaz uygulamasından sonra, “ProtoScript II First cDNA Synthesis” (Katalog no: E6560L) kitine ait protokol kullanılarak mRNA cDNA’ya dönüştürülmüştür. cDNA sentez mekanizması Şekil 3.7’de verilmiştir. Buna göre;

1. RNA örnekleri ile primer d(T)<sub>23</sub>VN steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. RNA örnekleri ile primer d(T)<sub>23</sub>VN’nin kullanım miktarları

| Bileşen                        | Hacim       |
|--------------------------------|-------------|
| Toplam RNA                     | 1 µl (1 µg) |
| d(T) <sub>23</sub> VN          | 2 µl        |
| Nuclease-free H <sub>2</sub> O | 5 µl        |
| <b>Toplam hacim 8 µl</b>       |             |

2. Örnekler 65°C’de 5 dakika inkübe edilmiş ve denatüre edilmiştir. İnkübasyonun ardından hemen buz banyosuna aktarılmıştır.

3. Daha sonra Çizelge 3.2’de belirtilen bileşenler eklenmiştir.

Çizelge 3.2. RNA örnekleri ile primer d(T)<sub>23</sub>VN'nin denatürasyonu sonrası eklenen bileşenler

| Bileşen                          | Hacim |
|----------------------------------|-------|
| ProtoScript II Reaction Mix (2X) | 10 µl |
| ProtoScript II Enzyme Mix (10X)  | 2 µl  |

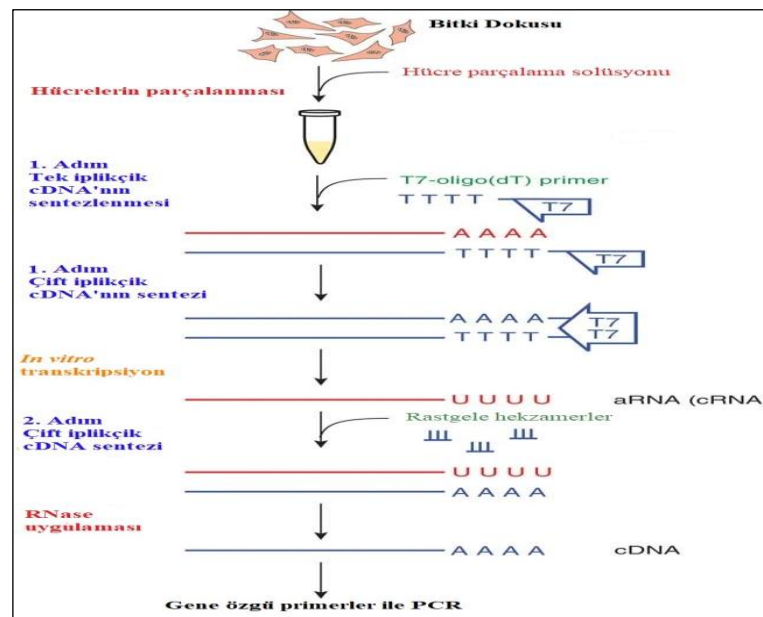
4. 20 µl cDNA sentez reaksiyonu 42°C'de bir saat boyunca inkübe edilmiş ve enzim 80°C'de 5 dakika bekletilerek inaktif hale getirilmiştir. cDNA'ların kontrolü amacıyla PCR tüpüne 1 µg RNA, 2 µl Random Primer Mix, 10 µl ProtoScript II Reaction Mix (2X) eklenmiş ve Nuclease-free H<sub>2</sub>O ile son hacim 20 µl'ye tamamlanmıştır (Çizelge 3.3). Karışım hazırlandıktan sonra Çizelge 3.4'de verilen PCR koşulları uygulanarak kontrol işlemi gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.3. cDNA örneklerinin negatif kontrolü

| Bileşen                          | Hacim              |
|----------------------------------|--------------------|
| Toplam RNA                       | 1 µg               |
| Random Primer Mix                | 2 µl               |
| ProtoScript II Reaction Mix (2X) | 10 µl              |
| Nuclease-free H <sub>2</sub> O   | Toplam hacim 20 µl |

Çizelge 3.4. cDNA kontrolü için kullanılan PCR aşamaları

| Aşama        | Süre  | Sıcaklık | Döngü |
|--------------|-------|----------|-------|
| Denatürasyon | 45 sn | 94°C     | 30    |
| Bağlanma     | 45 sn | 57°C     |       |
| Uzama        | 2 dk  | 72°C     |       |
| Son uzama    | 7 dk  | 72°C     | 1     |



Şekil 3.7. cDNA sentezinin şematik görünümü

### 3.2.6. 1-deoksi-D-ksilüloz fosfat redüktoizomeraz (DXR) ve terpen sentaz 1 genlerinin kısmi cDNA'larının izolasyonu

1-deoksi-D-ksilüloz fosfat redüktoizomeraz (DXR) ve terpen sentaz 1 genlerinin kısmi cDNA'larının izolasyonu için, yukarıda belirtildiği gibi sentezlenen kekik cDNA'sı farklı türlerde kullanılan primerlerle PCR amplifikasyonuna tabii tutulmuştur (Crocoll, 2011; Majdi vd., 2017) (Çizelge 3.5). PCR örnekleri 5 µl cDNA, 2 µl dejenere primerler, 5 µl 10X PCR tampon çözeltisi, 1 µl dNTPmix (10 µM), 1 µl Taq polimeraz' dan oluşmuş (Çizelge 3.6) ve reaksiyonun hacmi saf su ile 50 µl olacak şekilde tamamlanmıştır. PCR koşulları Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Çalışmada kullanılan primerler

| Gen Adı                                    | Primer Adı | İleri ve geri primerler               | Primer Uzunluğu | Tm (°C) | %GC |
|--------------------------------------------|------------|---------------------------------------|-----------------|---------|-----|
| Terpen Sentaz 1                            | Tps1-F1    | 5'-TTCTCAAAGACCGCGGCATCAACACTATCCT-3' | 31              | 68      | 48  |
|                                            | Tps1-R1    | 5'-CTGCAGCCCCCGCCCTTGTC-3'            | 22              | 70      | 73  |
| 1-deoksi-D-ksilüloz fosfat redüktoizomeraz | DXR-F1     | 5'-GCCTTTTGTCTCTCTTGC-3'              | 21              | 60      | 52  |
|                                            | DXR-R1     | 5'-TCCGCTCGATGCTTGTCGC-3'             | 19              | 61      | 63  |

Çizelge 3.6. PCR uygulamasında kullanılan bileşenler ve kullanım miktarları

| Bileşen                       | Hacim        |
|-------------------------------|--------------|
| cDNA (100 ng/µl)              | 4 µl         |
| 10X Taq polimeraz tamponu     | 5 µl         |
| dNTP Karışımı                 | 1 µl         |
| MgCl <sub>2</sub>             | 3 µl         |
| Primer-F (10 pmol)            | 1 µl         |
| Primer-R (10 pmol)            | 1 µl         |
| Taq DNA polimeraz (5 u/µl)    | 1 µl         |
| ddH <sub>2</sub> O            | 34 µl        |
| <b>Toplam Reaksiyon Hacmi</b> | <b>50 µl</b> |

Çizelge 3.7. Hedef genlere özel primeler ile kısmi cDNA'nın oluşturulması için kullanılan PCR aşamaları

| Basamak                     | Aşama        | Süre   | Sıcaklık | Döngü |
|-----------------------------|--------------|--------|----------|-------|
| I. Basamak                  | Denatürasyon | 1.5 dk | 95°C     | 5     |
|                             | Bağlanma     | 2 dk   | 57°C     |       |
|                             | Uzama        | 1 dk   | 72°C     |       |
| II. Basamak                 | Denatürasyon | 30 sn  | 95°C     | 15    |
|                             | Bağlanma     | 1 dk   | 57°C     |       |
|                             | Uzama        | 30 sn  | 72°C     |       |
| III. Basamak                | Denatürasyon | 30 sn  | 95°C     | 20    |
|                             | Bağlanma     | 1 dk   | 57°C     |       |
|                             | Uzama        | 2 dk   | 72°C     |       |
| 7 dakika 72°C' de son uzama |              |        |          |       |

### 3.2.7. PCR ürünlerinin jelden izolasyonu

cDNA parçaları UV ışığı altında agaroz jelden steril bir bistüri yardımıyla kesilerek alınmıştır. Bu cDNA parçaları “Nucleo Trap” jel ekstraksiyon kiti (Clontech) (Katalog no: 740584) kullanılarak jelden izole edilmiştir. Bu amaçla her 100 mg agaroz içerisine 300 µl NTP1 tampon çözeltisi ilave edilmiştir. Üzerine 10 µL olacak şekilde 4 µL NucleoTrap® süspansiyonu eklenmiş ve je tamamen çözünene kadar 50°C’de 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler 10 000 g’de 30 sn santrifüj edilmiş ve süpertanat uzaklaştırılmıştır. Santrifüjlenmiş silika matrisin üzerine 500 µL NT2 Tamponu eklenmiş ve pelletin tekrar süspansiyonu için kısa süreli olarak vortekslenmiştir. 30 sn 10 000 g’de örnekler tekrar santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır (1. Yıkama adımı). Santrifüjlenmiş silika matrisin üzerine 500 µL NT3 Tamponu eklenmiş ve tektar vortexlenip aynı koşullarda santrifüj edilip süpernatant uzaklaştırılmış (2. Yıkama adımı) ve “2. Yıkama adımı” bir kez daha tekrar edilmiştir (3. Yıkama adımı). Silika matrisi oda sıcaklığında 10-15 da kurutulduktan sonra üzerine 25–50 µL Buffer NE eklenmiş ve vortekslenildikten sonra oda sıcaklığında 10-15 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından örnekler 10 000 g’de 30 sn santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz bir tüpe aktarılmıştır. Saf olarak elde edilen DNA parçaları tekrar %2’lik agaroz jelde koşturularak ürünün boyu tespit edildikten sonra bakteriye klonlanmış ve sekanslamaya gönderilmiştir. Sekans sonuçlarında hedef genlerin doğruluğu NBCI veri bankasında kontrol edilmiş ve tam uzunluktaki nükleotid sekanların belirlenmesi amacıyla RACE analizleri yürütülmüştür.

### 3.2.8. cDNA’ların bakteriye klonlanması

Elde edilen saf DNA’lar “NEB® PCR Cloning Kit” (Katalog no: E1203S) aracılığıyla klonlanmıştır.

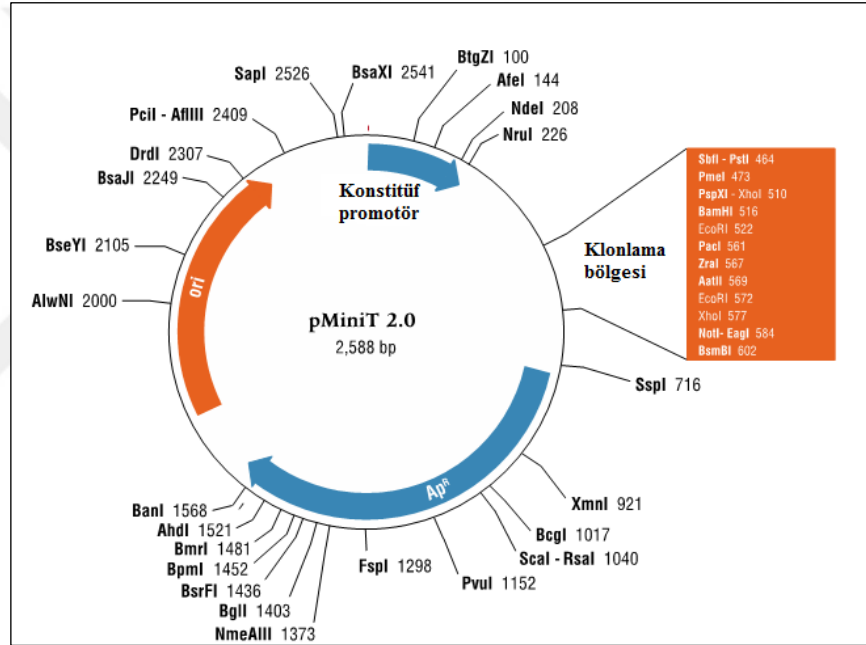
#### 3.2.8.1. Saf cDNA’ların pMiniT 2.0 klonlama vektörüne ligasyonu

PCR sonrası elde edilen cDNA’lar “NEB® PCR Cloning Kit” (Katalog no: E1203S) protokolünde belirtilen adımlar takip edilerek aracı vektöre (Şekil 3.8) aktarılmıştır. Bu amaçla Çizelge 3.8’de belirtilen oranlarda ligasyon karışımı hazırlanmış ve oda

sıcaklığında (25°C) 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından karışım hemen buz banyosuna aktarılmış ve 2 dk daha inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.8. Ligasyon işleminde kullanılan bileşenler

| Bileşen               | Ligasyon Reaksiyonu | Pozitif Kontrol |
|-----------------------|---------------------|-----------------|
|                       | Hacim               | Hacim           |
| pMiniT 2.0 Vektör     | 1 µl                | 1 µl            |
| cDNA                  | 2 µl                | -               |
| Amplifikasyon kontrol | -                   | 2 µl            |
| H <sub>2</sub> O      | 2 µl                | 2 µl            |
| Klonlama Mix 1        | 4 µl                | 4 µl            |
| Klonlama Mix 2        | 1 µl                | 1 µl            |
| <b>Toplam hacim</b>   | <b>10 µl</b>        |                 |



Şekil 3.8. pMiniT 2.0 klonlama vektörü

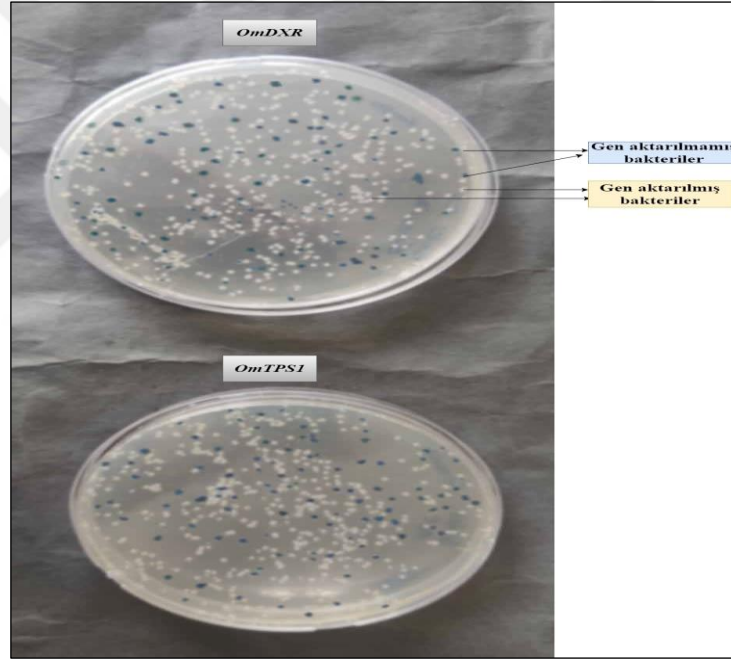
### 3.2.8.2. Ligasyon ürünlerinin transformasyonu

Ligasyon ürünlerinin transformasyonunda kit içerisinde bulunan NEB 10-beta *E. coli* hücreleri kullanılmış ve kite ait protokol takip edilmiştir. Buna göre:

1. 10 µl'lik ependorf tüpü buz üstünde soğuması için 10 dk bekletilmiştir.
2. 2 µl ligasyon reaksiyonu eklenmiş ve tüp 4-5 kez hafifçe vurarak karıştırılmıştır.
3. Buz üzerinde 20 dk inkübe edilmiştir.
4. Ardından hemen 42°C'de 30 sn şoklanmıştır.
5. Tekrar 5 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir.

6. Daha sonra 950 µl NEB 10-beta/Stable Outgrowth Medium eklenmiş ve 37°C'de 60 dakika 250 rpm'de çalkalamak suretiyle inkübasyona tabi tutulmuştur (büyüme aşaması).

İnkübasyonun ardından 50 µg/ml kanamisin içeren LB agarlı (%1 tripton, %0.5 maya ekstraktı, % 1 NaCl, %1.5 agar, pH 7.0) petrilere 40 mg/ml olacak şekilde X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indol β-D-galaktozid) ilave edilmiş ve her transformasyon kültüründen 10-50 µl arasında alınarak yayma şeklinde ekim yapılmıştır. Petri kapları ters çevrilmiş ve gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından transforme olmuş (beyaz koloniler) bakterilerden tek koloniler elde edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Transforme olmuş bakteriler

### 3.2.9. Rekombinant plazmitlerin izolasyonu

Rekombinant plazmitlerin izolasyonu “Monarch® Plasmid Miniprep” (Katalog no: T1010S) kitine ait protokol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. tek koloni yapılmış bakteriler, içerisinde sıvı LB besin ortamı bulunan 50 ml’lik steril falkon tüplere alınmış gece boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. Ardından LB ortamından 5 ml kültür, steril bir tüpe aktarılmış ve 4 000 rpm’de 10 dk süreyle santrifüj edilmiş ve bakterilerin dibe çökmesi sağlanmıştır. Daha sonra üstte kalan sıvı kısım atılmış (süpernatant) ve

pelet üzerine 200 µl “Plazmid Yeniden Süspansiyon Tamponu” eklenmiş ve pelet çözdürülmüştür. Üzerine 200 µl “Plazmid Parçalama Tamponu” eklenmiş 5-6 kez tüpler alt üst edilmiştir. Böylece bakteri hücrelerinin parçalanması sağlanmıştır. Daha sonra tüpe 400 µl “Plazmid Nötralizasyon Tamponu” eklenmiş ve hafifçe 2-3 kez alt üst edilmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında 2 dk çökelti oluşması için inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından tüpler 16 000 g'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant santrifüj tüpüne aktarılmış ve aynı şartlarda tekrar santrifüj edilmiştir. Kolon toplama tüpüne yeniden yerleştirilmiş ve üzerine 200 µl “Plazmid Yıkama Tamponu 1” eklenmiştir. Tekrar 1 dk santrifüjlenmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Pelet üzerine 400 µl “Plazmid Wash Buffer 2” eklenmiş ve 1 dk santrifüjlenmiştir. Kolonu temiz bir 1.5 ml'lik mikrofüj tüpüne aktarılmış ve aynı şartlarda tekrar santrifüj edilmiştir. Kolon tekrar temiz bir toplama tüpüne aktarılmış ve üzerine 30 µl “DNA Elüsyon Tamponu” eklenmiştir. Tekrar aynı şartlarda santrifüj işlemi gerçekleştirilmiş sıvı kısım toplanmıştır.

### 3.2.10. RACE ready cDNA sentezi

RACE Ready cDNA sentezi’nde, “SMARTer® RACE 5’3’ amplifikasyon kitine (Takara) (Katalog no: 634859) ait protokol kullanılmıştır. 5’-RACE cDNA için; 3.0 µL DNaz uygulanmış RNA örneği ve 1 µL 5’-CDS primer A ve 7.0 µL siteril H<sub>2</sub>O, 3’-RACE cDNA için; 3.0 µL RNA örneği, 1 µL 3’-CDS primer A ve 7.0 µL siteril H<sub>2</sub>O ayrı tüplerde karıştırılmıştır (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. 5’ ve 3’ -RACE-Ready cDNA hazırlanmasında kullanılan bileşenler

| 5’-RACE-Ready cDNA’nın hazırlanması |                         |
|-------------------------------------|-------------------------|
| Hacim                               | Bileşen                 |
| 3.0 µl                              | RNA                     |
| 1.0 µl                              | 5’-CDS Primer A         |
| 7.0 µl                              | Steril H <sub>2</sub> O |
| <b>Toplam hacim 11 µl</b>           |                         |
| 3’-RACE-Ready cDNA’nın hazırlanması |                         |
| Hacim                               | Bileşen                 |
| 3.0 µl                              | RNA                     |
| 1.0 µl                              | 5’-CDS Primer A         |
| 7.0 µl                              | Steril H <sub>2</sub> O |
| <b>Toplam hacim 11 µl</b>           |                         |

Tüpler 72°C'de 3 dk inkübe edilmiş ve ardından 42°C'de 2 dk soğutulmuştur. Soğuduktan sonra, 14 000 g'de 10 sn santrifüj edilmiş ve karışım tüpün dibinde toplanmıştır. 5'-RACE cDNA sentez reaksiyonuna, reaksiyon başına 1 µl SMARTer II A Oligonükleotid eklenmiştir. 5'- ve 3'-RACE-Ready cDNA sentez reaksiyonları için Çizelge 3.10 ve Çizelge 3.11'de verilen ana karışımdan 8 µl eklenmiş ve yavaşça karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 42°C'de 90 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüplere 10 µl Trisin-EDTA tampon çözeltisi eklenmiş 70°C'de 10 dk inkübe edilmiştir. Örnekler daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.10. 5'- ve 3'-RACE-Ready cDNA sentez için hazırlanmış ana karışım

| Hacim                    | Bileşen                                   |
|--------------------------|-------------------------------------------|
| 5.5 µl                   | Buffer Mix                                |
| 0.5 µl                   | RNase inhibitörü (40 U/µl)                |
| 2.0 µl                   | SMARTScribe Reverse Transcriptase (100 U) |
| <b>Toplam hacim 8 µl</b> |                                           |

Çizelge 3.11. 5'- ve 3'-RACE-Ready cDNA sentez için hazırlanmış Buffer Mix

| Hacim                      | Bileşen                |
|----------------------------|------------------------|
| 4.0 µl                     | 5X First-Strand Buffer |
| 0.5 µl                     | DTT (100mM)            |
| 1.0 µl                     | dNTPs (20 mM)          |
| <b>Toplam hacim 5.5 µl</b> |                        |

### 3.2.11. RACE için PCR kontrolü

Pozitif kontrol PCR denemesi, RACE Ready cDNA sentezi'nde, "SMARTer® RACE 5'3' amplifikasyon kitine (Takara) ait protokol kullanılmıştır. Bu amaçla öncelikle toplamda 41.5 µl olan ana karışım hazırlanmıştır (Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13).

Çizelge 3.12. RACE PCR kontrolü için kullanılacak PCR Master Mix ana karışımın içeriği

| Bileşen                                       | 5'- ya da 3' RACE örneği | Sadece UPM (– control) | Sadece GSP (– control) |
|-----------------------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
|                                               | Hacim                    | Hacim                  | Hacim                  |
| 5'- ya da 3'-RACE-Ready cDNA                  | 2.5 µl                   | 2.5 µl                 | 2.5 µl                 |
| 10X UPM                                       | 5 µl                     | 5 µl                   | —                      |
| 5' ya da 3' TFR (İnsan Transferrin Reseptörü) | 1 µl                     | —                      | 1 µl                   |
| H <sub>2</sub> O                              | —                        | 1 µl                   | 1 µl                   |
| Master Mix                                    | 41.5 µl                  | 41.5 µl                | 41.5 µl                |
| <b>Toplam hacim</b>                           | <b>50 µl</b>             | <b>50 µl</b>           | <b>50 µl</b>           |

Çizelge 3.13. Pozitif kontrol PCR denemesi için kullanılan PCR Master Mix bileşenleri ve miktarları

| Hacim                       | Bileşen                      |
|-----------------------------|------------------------------|
| 15.5 µl                     | 1 PCR-Grade H <sub>2</sub> O |
| 25.0 µl                     | 2X SeqAmp Buffer             |
| 1.0 µl                      | SeqAmp DNA Polymerase        |
| <b>Toplam hacim 41.5 µl</b> |                              |

Elde edilen karışım Çizelge 3.14’de sunulan koşullarında PCR’a tabi tutulmuş ve %1’lik agaroz jelde 90 V 45 dk koşturulmuş ve PCR ürünleri kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.14. Touchdown PCR koşulları

| Basamak                    | Aşama        | Süre  | Sıcaklık | Döngü |
|----------------------------|--------------|-------|----------|-------|
| I. Basamak                 | Denatürasyon | 30 sn | 94°C     | 5     |
|                            | Uzama        | 3 dk  | 72°C     |       |
| II. Basamak                | Denatürasyon | 30 sn | 94°C     | 5     |
|                            | Bağlanma     | 30 sn | 70°C     |       |
|                            | Uzama        | 3 dk  | 72°C     |       |
| III. Basamak               | Denatürasyon | 30 sn | 94°C     | 20    |
|                            | Bağlanma     | 30 sn | 68°C     |       |
|                            | Uzama        | 3 dk  | 72°C     |       |
| 7 dakika 72°C’de son uzama |              |       |          |       |

### 3.2.12. RACE (cDNA uçlarının hızlı amplifikasyonu)

Çalışmada elde edilen hedef genlere ait cDNA’ların tüm kodlama bölgelerinin elde edilmesi amacıyla 5’- ve 3’-RACE Ready cDNA örnekleri ve “SMARTer® RACE 5’/3” amplifikasyon kitine (Takara) ait protokol kullanılmıştır. Kite açıklanan yöntemle göre hazırlanan bileşenler Çizelge 3.15 ve Çizelge 3.16’da sunulmuştur.

Çizelge 3.15. Tam uzunluktaki *OmDXR* ve *OmTSP1* genlerinin elde edilmesi amacıyla yürütülen RACE analizinde kullanılan bileşenler ve miktarları

| Bileşen                                | 5’- ya da 3’ RACE örneği | Sadece UPM (– control) | Sadece GSP (– control) |
|----------------------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|
|                                        | Hacim                    | Hacim                  | Hacim                  |
| 5’- ya da 3’-RACE-Ready cDNA           | 2.5 µl                   | 2.5 µl                 | 2.5 µl                 |
| 10X UPM                                | 5 µl                     | 5 µl                   | —                      |
| 5’ ya da 3’ GSP (Gene spesifik primer) | 1 µl                     | —                      | 1 µl                   |
| H <sub>2</sub> O                       | —                        | 1 µl                   | 1 µl                   |
| Master Mix                             | 41.5 µl                  | 41.5 µl                | 41.5 µl                |
| <b>Toplam hacim</b>                    | <b>50 µl</b>             | <b>50 µl</b>           | <b>50 µl</b>           |

Çizelge 3.16. Tam uzunluktaki *OmDXR* ve *OmTSP1* genlerinin elde edilmesi amacıyla yürütülen RACE analizinde kullanılan PCR döngüleri

| Aşama        | Süre  | Sıcaklık | Döngü |
|--------------|-------|----------|-------|
| Denatürasyon | 30 sn | 94°C     | 25    |
| Bağlanma     | 30 sn | 68°C     |       |
| Uzama        | 3 dk  | 72°C     |       |

PCR sonrası elde edilen ürünler 0.5X TBE tampon çözeltisi içeren % 1.2' lik agaroz jelde koşturulmuştur. Daha sonra PCR ürünleri jelden izole edilerek bakteriye klonlanmış (başlık 3.2.8) ve sekanlanmıştır.

### 3.2.13. DNA ekstraksiyonu

*Origanum minutiflorum* yaprak dokularından genomik DNA'lar CTAB metodu kullanılarak izole edilmiştir. Bu amaçla, kekik yaprak örneklerinden 200 mg tartılmış ve steril havanda sıvı azot içerisinde parçalanmıştır. Parçalanmış yaprak dokusuna 1 mL CTAB tamponu eklenmiş ve homojenat 60°C'de 1 s inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler 12 000 rpm'de 5 dk santrifüj edilmiş ve süpernatanta eşit hacimde izoamilalkol:kloroform (24:1 v/v) eklenmiştir. Tüpler birkaç dakika ters-düz edilerek karıştırılmış ve tüpler 20 000 rpm'de 1 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant temiz tüpe aktarılmıştır. RNaz uygulaması sonrası izopropanol ile çöktürülen genomik DNA peleti, önce %70'lik etanol ile daha sonra %95'lik etanol ile yıkandıktan sonra oda sıcaklığında kurutulmuş ve TE tamponunda çözölmüştür. Genomik DNA'nın miktar ve kalitesi nanodrop yardımıyla ölçölmüştür.

### 3.2.14. Southern Blot analizi

Southern Blotlama analizi Sambrook vd. (1989) tarafından belirtilen yöntemle yapılmıştır. *O. minutiflorum*'dan elde edilen 30 µg genomik DNA 37°C'de bir gece boyunca *EcoRI*, *BamHI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleri ile kesilmiş ve DNA parçaları %1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmıştır.

#### 3.2.14.1. Naylon membrana DNA aktarımı

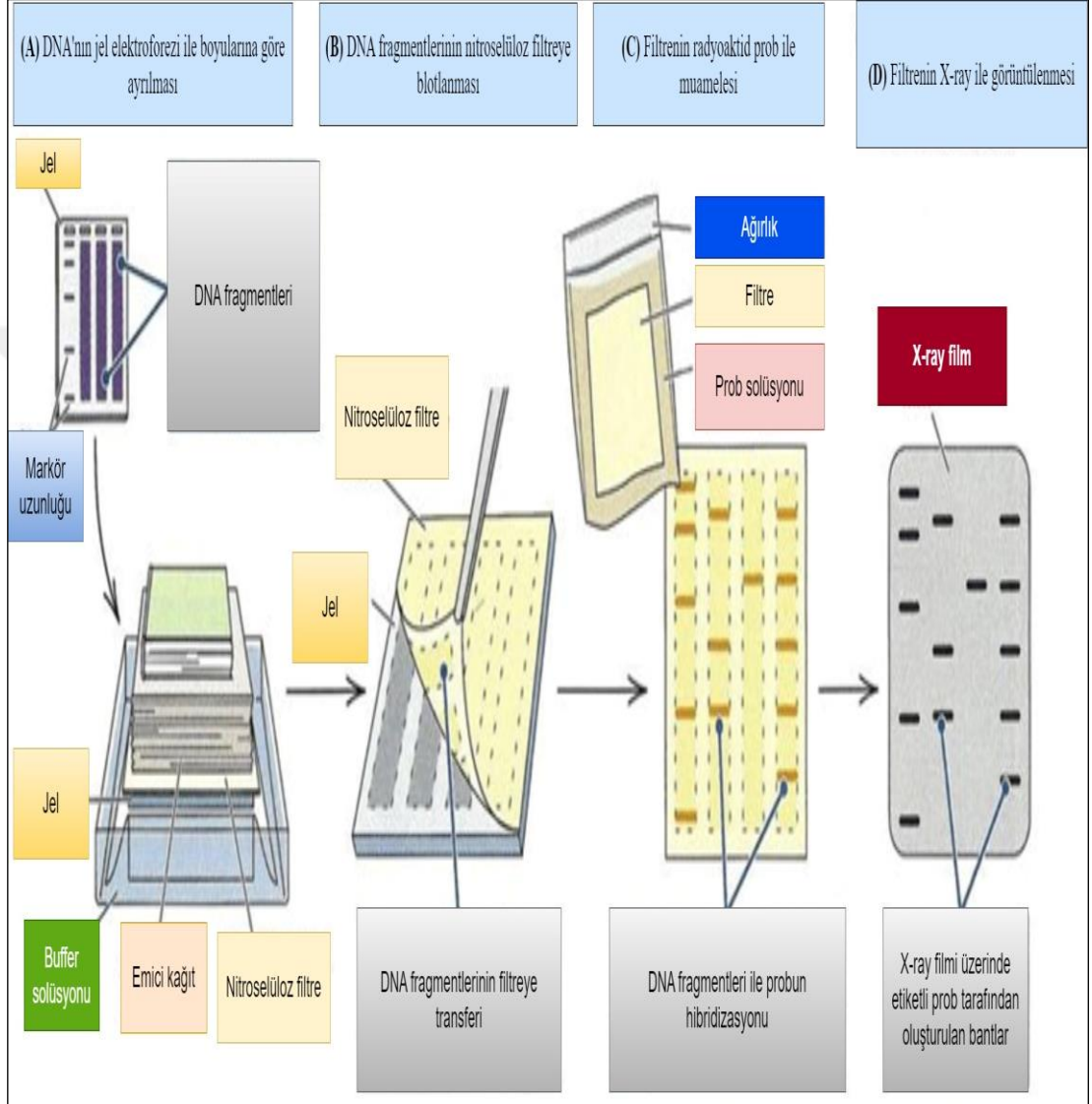
Elektroforez sonrası jel, plastik bir kabın içine yerleştirilmiş ve 0.25 N HCl içinde 15 dakika bekletilmiştir. Jel, denatürasyon çözeltisinde (0.5 M NaOH ve 1 M NaCl) 2 kez

15 dakika inkübe edilmiştir. Denatürasyon sonrası jel, 0.5 M Tris-HCl (pH 7.0) ve 3.0 M NaCl ile 2 kez 15 dakika yıkanmıştır. Jelin başlangıç kısmını belirlemek için bir köşesi işaretlenmiş ve kısa süre distile su ile yıkanmıştır. Jel, temiz bir kap içinde "sandviç sistemi" kullanılarak membrana aktarılmıştır. Transfer sonrası membran, agaroz parçalarını uzaklaştırmak için 5X SSC (Saline-Sodium Citrate) ile kısa süreli bir şekilde yıkanmıştır. DNA örnekleri, UV cross-linker cihazı kullanılarak membrana sabitlenmiştir. Bu yöntem, elektroforez sonrası DNA örneklerinin naylon membrana aktarılması adımlarını içermektedir. Naylon membran, jelde ayrıışan DNA bantlarını korumak ve daha fazla analiz etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu işlem, genellikle moleküler biyoloji ve genetik araştırmalarında DNA probu veya hibridizasyon gibi tekniklerin uygulanmasında gereklidir.

#### **3.2.14.2. DNA'nın işaretlenmesi ve hibridizasyon**

İlgili genlerden elde edilen cDNA parçaları, RT-PCR kullanılarak amplifiye edilmiş ve jel blot analizi için bir prob olarak kullanılmıştır. DNA probu, Roche tarafından sağlanan DIG DNA işaretleme kiti (Katalog no: 634858) kullanılarak işaretlenmiştir. Membran, önceden belirlenen optimal sıcaklığa (Topt) getirilmiştir. Topt sıcaklığı,  $T_m - 20 - 25^{\circ}\text{C}$  formülü ile hesaplanmıştır. Membran  $42^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılmış ve 10 ml "Hibridizasyon Tamponu" (Roche, DIG Easy Hyb) içinde 30 dakika ön melezlemeye alınmıştır. Ön melezlemenin bitimine 10 dakika kala, DIG ile işaretlenmiş olan prob, kaynar suda 5 dk denatüre edilmiş ve ardından buz dolabına alınmıştır. Prob soğuduktan sonra, önceden  $42^{\circ}\text{C}$ 'ye ısıtılan 3.5 ml Melezleme Tamponu eklenerek gece boyunca melezleme fırınında melezlemeye bırakılmıştır. Melezleme sonrasında, membran %0.1 SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) içeren 2X SSC içinde 2 kez 5 dk yıkanmıştır. Ardından, %0.1 SDS içeren 0.5X SSC içinde  $50 - 52^{\circ}\text{C}$ 'de 2 kez 15'er dk yıkanmış ve 1-5 dk boyunca "Yıkama Tamponu"nda çalkalanmıştır. Membran, 100 ml "1X Bloklama Çözeltisi" içinde hafifçe çalkalanarak 30 dakika bekletilmiştir. 20 ml antikor çözeltisinde 30 dakika boyunca çalkalanmış ve sonra 2 kez 15'er dakika 100 ml yıkama tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra, 20 ml "Belirleme Tamponu"nda 2-5 dakika dengelenmiştir. Membran, 10 ml taze hazırlanmış renk-substrat çözeltisi içinde karanlık bir ortamda renk oluşumu gözleninceye kadar (30 dk-16 s) sabit bir zemin üzerinde çalkalanmadan bekletilmiştir. Hibridizasyon sinyali kimyasal aydınlatma ile belirlenmiş ve jel görüntüleme sisteminde (Kodak GL1500) analiz edilmiştir (Şekil

3.10). Yukarıdaki yöntem, ilgili genlerden cDNA parçalarının işaretlenmesi ve jel blot analizi için kullanılması, probun melezlemesi ve son olarak sinyalin belirlenmesi adımlarını içermektedir. Bu işlem, gen ifadesi, DNA analizi ve moleküler biyolojide kullanılan bir tekniktir.



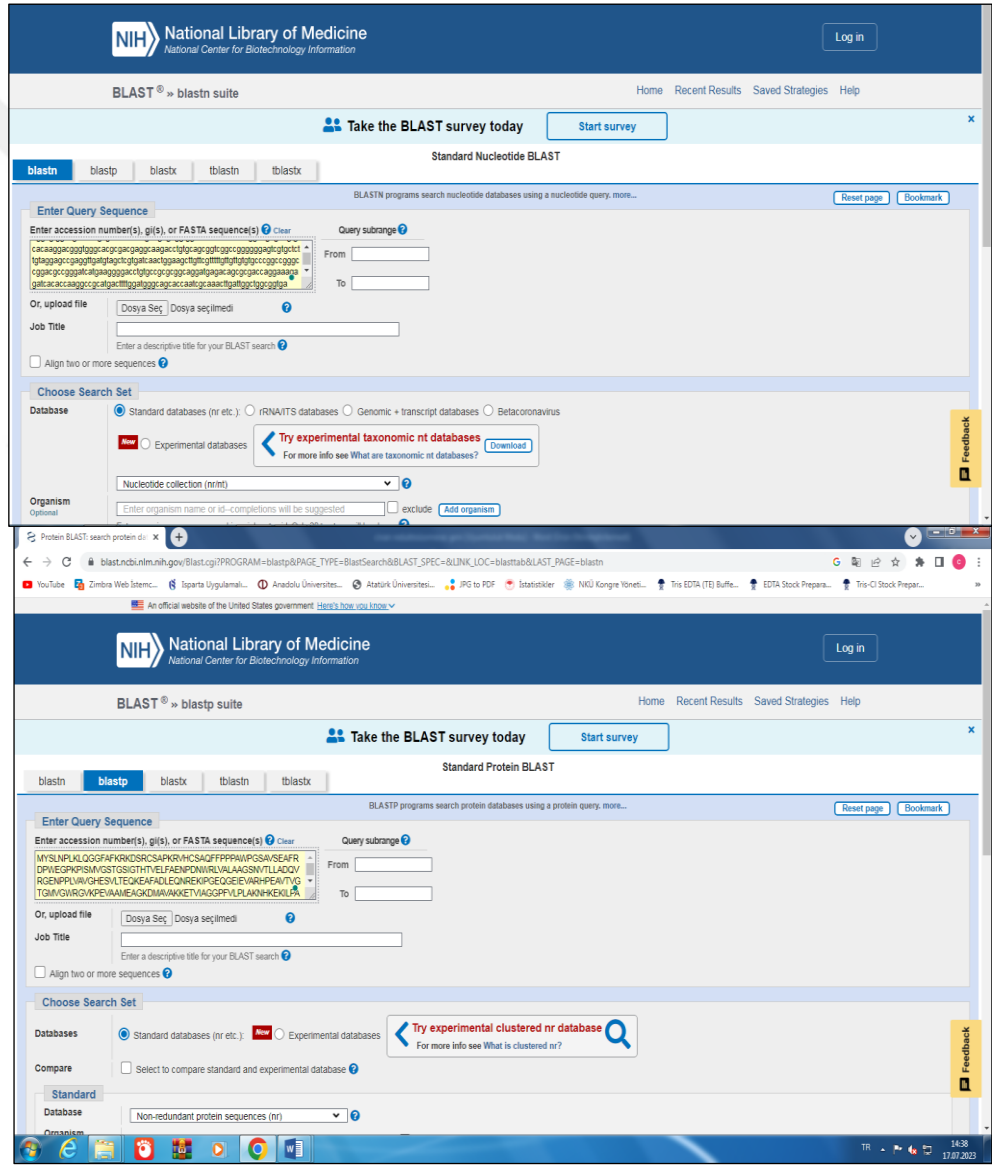
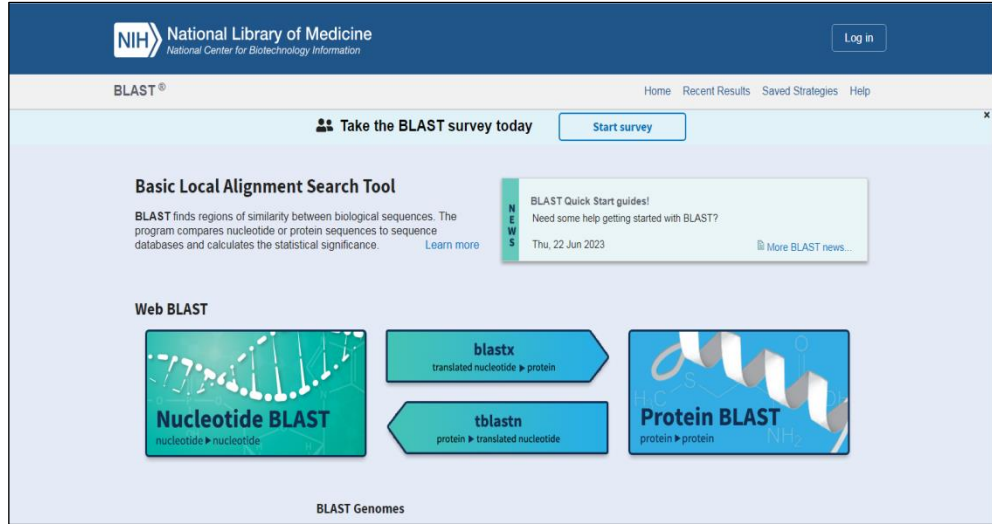
Şekil 3.10. Southern Blot tekniğinin şematik görünümü

### 3.2.15. Sekanslama ve sekans analizleri

Çalışma sonucunda elde edilen nükleik asit parçaları İontek firmasında sekanslanmıştır. Nükleotid dizilemeleri enzimatik Sanger's dideoksi yöntemi temelinde yapılmıştır. Bu sekanslar BLAST (BLASTn ve BLASTp) programları kullanılarak (Şekil 3.11 ve Şekil 3.12), NCBI veri bankasında bulunan ve diğer

türlerden elde edilen gen sekansları ile karşılaştırılmıştır (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (Altschul vd., 1997). Nükleotid dizilerin protein dizisine dönüştürülmesinde ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>) kullanılmıştır (Şekil 3.13). Dizi analizlerinde ExPASy Tools (<http://www.expasy.org/tools/>), proteinin 3 boyutlu yapısının oluşturulmasında ise 3D SWISS MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) programları kullanılmıştır (Şekil 3.14). Nükleotid ve protein dizileri ile gen bankasından önceden izole edilmiş türlerin sekans dizilerinin filogenetik ilişkileri, MEGAX 11 paket programı kullanılarak oluşturulmuştur (Şekil 3.15 ve Şekil 3.16) (Sevindik, 2019). Elde edilen genin açık okuma çerçevesi (ORF) “ORF Finder” veri tabanı kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3.17) ([https://www.bioinformatics.org/sms2/orf\\_find.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/orf_find.html)).





Şekil 3.11. *OmdXR* genin BLASTn ve BLASTp analizleri

National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

Log in

BLAST®
Home Recent Results Saved Strategies Help

Take the BLAST survey today
Start survey

### Basic Local Alignment Search Tool

BLAST finds regions of similarity between biological sequences. The program compares nucleotide or protein sequences to sequence databases and calculates the statistical significance.

[Learn more](#)

NEWS

BLAST Quick Start guides!  
Need some help getting started with BLAST?  
Thu, 22 Jun 2023

More BLAST news...

### Web BLAST

**Nucleotide BLAST**  
nucleotide → nucleotide

blastx

translated nucleotide → protein

tblastn

protein → translated nucleotide

**Protein BLAST**  
protein → protein

BLAST Genomes

National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

Log in

BLAST® » blastn suite
Home Recent Results Saved Strategies Help

Take the BLAST survey today
Start survey

blastn

blastp

blastx

tblastn

tblastx

Standard Nucleotide BLAST

BLASTn programs search nucleotide databases using a nucleotide query. more...
Reset page Bookmark

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)
Query subrange

Or, upload file
Job Title

Choose Search Set

Database
Organism

Try experimental taxonomic nt databases

National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information

Log in

BLAST® » blastp suite
Home Recent Results Saved Strategies Help

Take the BLAST survey today
Start survey

blastn

blastp

blastx

tblastn

tblastx

Standard Protein BLAST

BLASTp programs search protein databases using a protein query. more...
Reset page Bookmark

Enter Query Sequence

Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s)
Query subrange

Or, upload file
Job Title

Choose Search Set

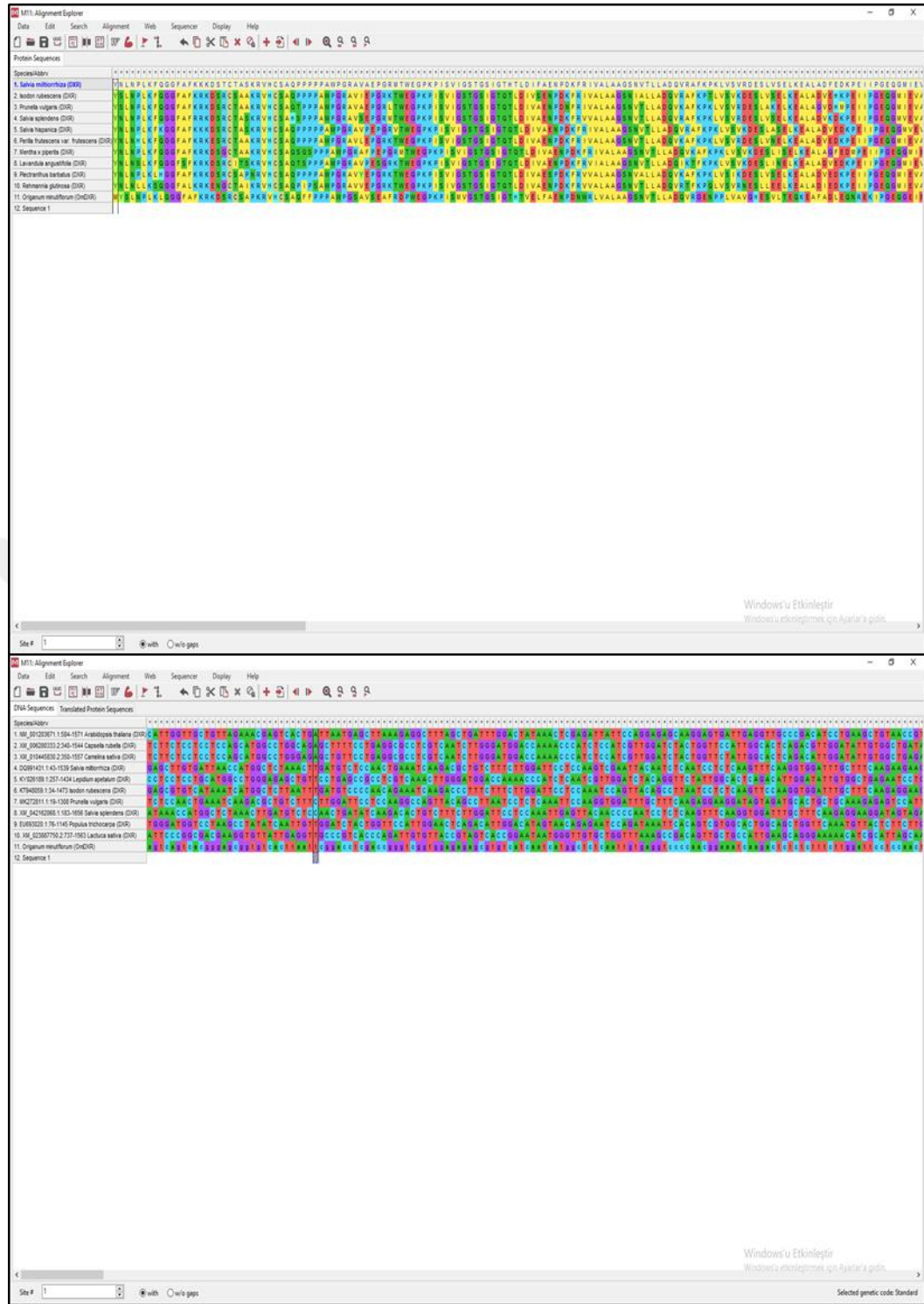
Databases
Compare

Try experimental clustered nr database

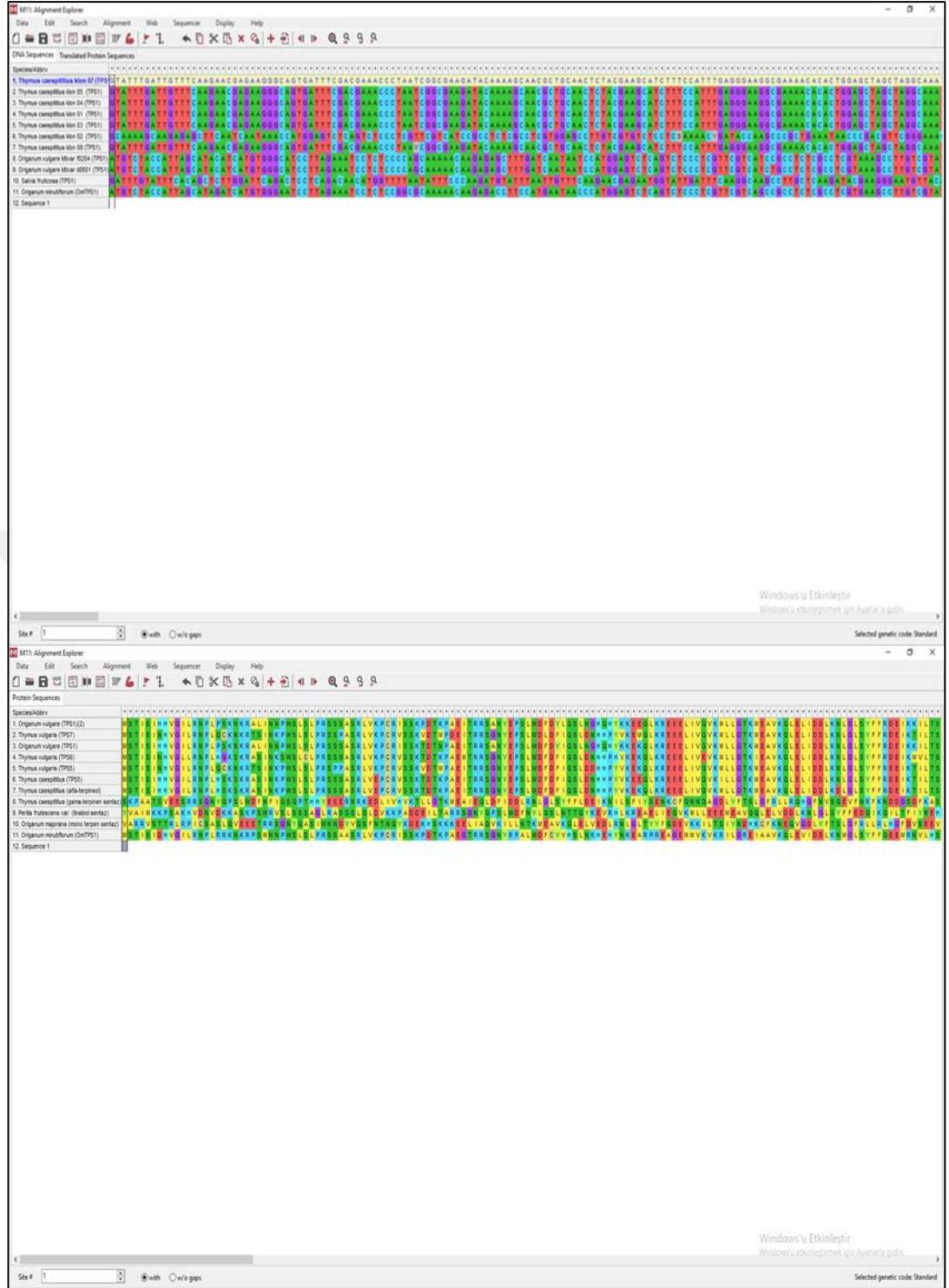
Şekil 3.12. *OmTPS1* genin BLASTn ve BLASTp analizleri



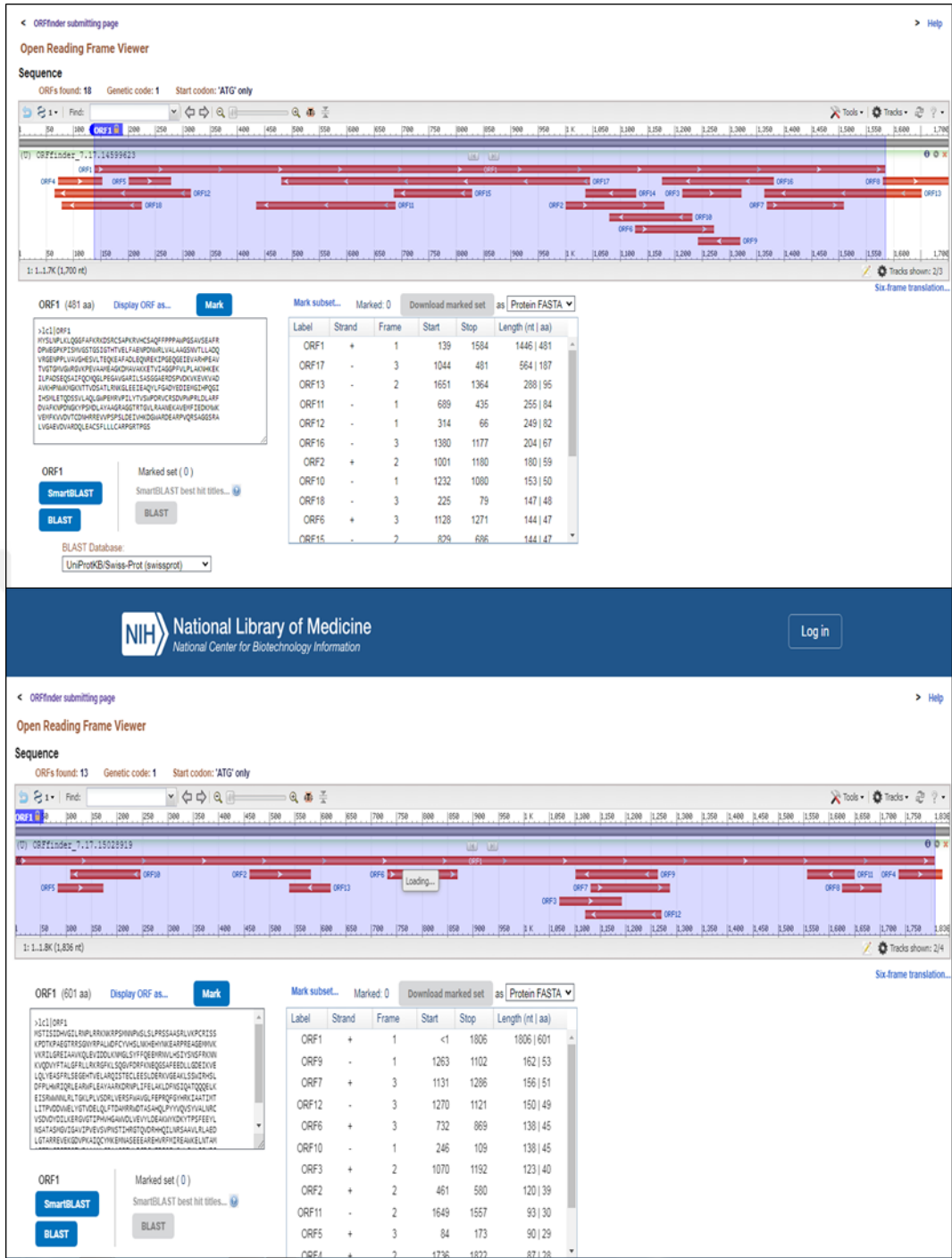




Şekil 3.15. *OmDXR* nükleotid ve protein sekansının MEGAX 11 paket programı ile filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi



Şekil 3.16. *OmTPS1* nükleotid ve protein sekansının MEGAX 11 paket programı ile filogenetik ilişkilerinin belirlenmesi



Şekil 3.17. *OmDXR* ve *OmTPS1* nükleotid dizilerinin ORF bölgelerinin oluşturulması

#### 4. BULGULAR

Çalışmada *O.minutiflorum*'da uçucu yağ sentezinden sorumlu DXR ve TPS1 genlerinin nükleotid ve aminoasit dizilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Buna ek olarak söz konusu genlerin *O. minutiflorum* genomundaki muhtemel kopya sayıları Southern Blot yöntemi ile tespit edilmiştir.

Tez kapsamında *O. minutiflorum* bitkisinden total RNA izolasyonu gerçekleştirilmiş ve DNaz I uygulaması sonrası 1.98-2.00 saflık derecesine sahip RNA'lar kullanılmıştır. Saf olarak elde edilen RNA örnekleri geriye transkriptaz enzimi aracılığıyla cDNA'ya dönüştürülmüştür. Önceki çalışmalar incelendiğinde *O. minutiflorum*'da gen klonlaması üzerine bu güne kadar hiç çalışmanın yapılmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle farklı kekik ve bitki türlerinde konu ile ilgili yapılmış olan çalışmalarda kullanılan primerler ile *O. minutiflorum* cDNA'sı PCR işlemine tabi tutulmuştur. PCR sonrası çoğaltılan fragmanlar özel bir firmada sekanslatılmıştır. Sekans analizi sonrası tam uzunluktaki cDNA klonları elde etmek amacıyla 5' ve 3' RACE analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen tam uzunluktaki cDNA'lar tekrar sekanslanmış ve sekanslama sonucu elde edilen diziler NCBI veri tabanında kontrol edilmiştir. Klonlanan genlerin doğruluğu kanıtlandıktan sonra *O. minutiflorum* DXR (*OmDXR*) ve *O. minutiflorum* TPS1 (*OmTPS1*) olarak adlandırılmıştır.

##### 4.1. *OmDXR* Geninin Moleküler Karakterizasyonu

*OmDXR* genine ait tam uzunluktaki cDNA nükleotid uzunluğunun 1 700 baz çifti (bç) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.1). Şekil 4.1'de sarı dolgu ile işaretli 'ATG' dizisi başlama kodonunu, kırmızı dolgu ile işaretli 'TGA' dizisi ise dur kodonunu ifade etmektedir. Yeşil dolgu ile işaretlenmiş bölge ise ORF yani protein kodlama bölgesidir. 1 700 bç uzunluğunda olan genin 138 bç'lik kısmı 5'-UTR, 116 bç'lik kısım ise 3'-UTR bölgesini ifade etmektedir. *OmDXR* genine ait amino asit dizisi ExpASy Tools veri tabanı kullanılarak analiz edilmiş ve Şekil 4.2'de sunulmuştur. *OmDXR* geninin ORF bölgesine ait amino asit dizi kullanılarak 481 amino asit uzunluğunda bir proteini kodladığı tespit edilmiştir.

AGTCAGTCACGGGAGCGGTGTCACTTAATTCGGACCTCGACCGGGTCG  
 GTGGAGAGAGCGTGTCAATCATGGCTCTCAATTGTGAGGTCCCCA  
 ACGGAAATCAAGACTCTCTCTTTCTTGGATTCTCCAACCTCC**ATGTACA**  
**GCCTTAATCCTCTCAAGTTGCAAGGTGGATTTGCTTTCAAGAGGAAGG**  
**ATAGTAGATGCAGTGCTCCAAAGAGAGTCCATTGCTCGGCACAGTTCT**  
**TCCCTCCTCCCGCGTGGCCGGGCAGCGCTGTGTCTGAGGCCTTTCGTGA**  
**TCCTTGGGAAGGTCCGAAACCCATCTCAATGGTTGGATCGACTGGTTC**  
**GATTGGGACTCACACTGTGGAGCTATTTGCTGAGAATCCGGACAACCTG**  
**GAGATTGGTGGCGCTCGCTGCTGGTTCGAATGTGACGCTGCTTGCTGAT**  
**CAGGTCAGGGGTGAGAACCCGCCATTGGTGGCTGTGGGACACGAGTCA**  
**GTGCTTACTGAGCAGAAAGAGGCTTTCGCTGATTTGGAGCAGAACCGC**  
**GAGAAGATTCCCGGAGAGCAAGGAGAGATTGAGGTTGCGCGACATCC**  
**GGAGGCTGTACGGTGGGGACGGGAATGGTGGGTTGGCGGGGAGTCA**  
**AGCCCGAGGTCGCTGCGATGGAAGCCGGAAAGGACATGGCTGTCGCG**  
**AAAAAAGAGACCGTCATCGCCGGGGGCCCTTTCGTGCTTCCACTTGCG**  
**AAGAACCATAAGGAGAAGATTCTTCCGGCAGATTCGGAACAATCTGCG**  
**ATATTTCAAGTGTATGCAAGGATTGCCCGAAGGCGCTGTGGGCGCGAGA**  
**ATCTTGTCTGCATCGGGAGGCGCTGAGAGGGATTTCGCCAGTGGACAAG**  
**GTCAAGGAAGTTAAAGTAGCCGATGCCGTCAAGCATCCGAACCTGGAA**  
**GATGGGAAAGAATACGACGGTGGACTCTGCGACGCTGAGAAACAAGG**  
**GTCTGGAGGAGATCGAAGCGCAGTATTTGTTTGGAGCTGACTATGAGG**  
**ATATTGAGATGGGGATTCATCCGCAAGGTATCATACTTCCATGTTGG**  
**AAACACAGGATTCATCGGTGCTGGCTCAATTGGGGTGGCCAGAGATGC**  
**GCGTACCGATTCTATACACCGTGTGATGGCCGGACAGAGTATGCAGAT**  
**CAGACGTACCGTGGCCGAGGCTGGACCTAGCGCGTTTCGACGTGGCCT**  
**TCAAGAACCCGGACAATGGGAAATACCCATCCATGGATCTGGCTTATG**  
**CTGCTGGACGAGCTGGAGGCACTAGGACAGGAGTTCTCAGAGCGGCC**  
**AATGAGAAAGCGGTTGAAATGTTCATAGAGGACAAGATGTGGAAGGT**  
**GGAGATGTTCAAGGTTGTGGACGTCACATGCGACAACCATCGAAGAGA**  
**GGTGGTCCCATCACCTCCTTGGACGAGATTGTGCACAAGGACGGGTG**  
**GGCACGCGACGAGGCAAGACCTGTGCAGCGGTCGGCCGGGGGGAGTC**  
**GTGCTCTTGTAGGAGCCGAGGTTGATGTAGCTCGTGATCAACTGGAAG**  
**CTTGTTTCGTTTTTGTGTTGTGTGCCCGGCCGGCCGGACGCCGGGATC**  
**ATGA**AGGGGACCTGTGCCGCGCGGCAGGATGAGACAGCGCGACCAGG  
 AAAGAGATCACACCAAGGCCGCATGACTTTTGGATGGGCAGCACCAAT  
 CGCAAACCTTGATTGGCTGGCGGTGA

Şekil 4.1. *OmDXR* genine ait nükleotid dizisi

|                   |                                                                                 |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Nükleotid Dizisi  | ATG TAC AGC CTT AAT CCT CTC AAG TTG CAA GGT GGA TTT GCT TTC AAG AGG AAG GAT AGT |
| Amino Asit Dizisi | M Y S L N P L K L Q G G F A F K R K D S                                         |
| Nükleotid Dizisi  | AGA TGC AGT GCT CCA AAG AGA GTC CAT TGC TCG GCA CAG TTC TTC CCT CCT CCC GCG TGG |
| Amino Asit Dizisi | R C S A P K R V H C S A Q F F P P P A W                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CCG GGC AGC GCT GTG TCT GAG GCC TTT CGT GAT CCT TGG GAA GGT CCG AAA CCC ATC TCA |
| Amino Asit Dizisi | P G S A V S E A F R D P W E G P K P I S                                         |
| Nükleotid Dizisi  | ATG GTT GGA TCG ACT GGT TCG ATT GGG ACT CAC ACT GTG GAG CTA TTT GCT GAG AAT CCG |
| Amino Asit Dizisi | M V G S T G S I G T H T V E L F A E N P                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GAC AAC TGG AGA TTG GTG GCG CTC GCT GCT GGT TCG AAT GTG ACG CTG CTT GCT GAT CAG |
| Amino Asit Dizisi | D N W R L V A L A A G S N V T L L A D Q                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GTC AGG GGT GAG AAC CCG CCA TTG GTG GCT GTG GGA CAC GAG TCA GTG CTT ACT GAG CAG |
| Amino Asit Dizisi | V R G E N P P L V A V G H E S V L T E Q                                         |
| Nükleotid Dizisi  | AAA GAG GCT TTC GCT GAT TTG GAG CAG AAC CGC GAG AAG ATT CCC GGA GAG CAA GGA GAG |
| Amino Asit Dizisi | K E A F A D L E Q N R E K I P G E Q G E                                         |
| Nükleotid Dizisi  | ATT GAG GTT GCG CGA CAT CCG GAG GCT GTC ACG GTG GGG ACG GGA ATG GTG GGT TGG CGG |
| Amino Asit Dizisi | I E V A R H P E A V T V G T G M V G W R                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GGA GTC AAG CCC GAG GTC GCT GCG ATG GAA GCC GGA AAG GAC ATG GCT GTC GCG AAA AAA |
| Amino Asit Dizisi | G V K P E V A A M E A G K D M A V A A K K                                       |
| Nükleotid Dizisi  | GAG ACC GTC ATC GCC GGG GGC CTT TTC GCG CTT CCA CTT GCG AAG AAC CAT AAG GAG AAG |
| Amino Asit Dizisi | E T V I A G G P F V L P L A K N H K E K                                         |
| Nükleotid Dizisi  | ATT CTT CCG GCA GAT TCG GAA CAA TCT GCG ATA TTT CAG TGT ATG CAA GGA TTG CCC GAA |
| Amino Asit Dizisi | I L P A D S E Q S A I F Q C M Q G L P E                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GGC GCT GTG GGC GCG AGA ATC TTG TCT GCA TCG GGA GGC GCT GAG AGG GAT TCG CCA GTG |
| Amino Asit Dizisi | G A V G A R I L S A S G G A E R D S P V                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GAC AAG GTC AAG GAA GTT AAA GTA GCC GAT GCC GTC AAG CAT CCG AAC TGG AAG ATG GGA |
| Amino Asit Dizisi | D K V K E V K V A D A V K H P N W K M G                                         |
| Nükleotid Dizisi  | AAG AAT ACG ACG GTG GAC TCT GCG ACG CTG AGA AAC AAG GGT CTG GAG GAG ATC GAA GCG |
| Amino Asit Dizisi | K N T T V D S A T L R N K G L E E I E A                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CAG TAT TTG TTT GGA GCT GAC TAT GAG GAT ATT GAG ATG GGG ATT CAT CCG CAA GGT ATC |
| Amino Asit Dizisi | Q Y L F G A D Y E D I E M G I H P Q G I                                         |
| Nükleotid Dizisi  | ATA CAT TCC ATG TTG GAA ACA CAG GAT TCA TCG GTG CTG GCT CAA TTG GGG TGG CCA GAG |
| Amino Asit Dizisi | I H S M L E T Q D S S V L A Q L G W P E                                         |
| Nükleotid Dizisi  | ATG CGC GTA CCG ATT CTA TAC ACC GTG TCA TGG CCG GAC AGA GTA TGC AGA TCA GAC GTA |
| Amino Asit Dizisi | M R V P I L Y T V S W P D R V C R S D V                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CCG TGG CCG AGG CTG GAC CTA GCG CGT TTC GAC GTG GCC TTC AAG AAC CCG GAC AAT GGG |
| Amino Asit Dizisi | P W P R L D L A R F D V A F K N P D N G                                         |
| Nükleotid Dizisi  | AAA TAC CCA TCC ATG GAT CTG GCT TAT GCT GCT GGA CGA GCT GGA GGC ACT AGG ACA GGA |
| Amino Asit Dizisi | K Y P S M D L A Y A A G R A G G T R T G                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GTT CTC AGA GCG GCC AAT GAG AAA GCG GTT GAA ATG TTC ATA GAG GAC AAG ATG TGG AAG |
| Amino Asit Dizisi | V L R A A N E K A V E M F I E D K M W K                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GTG GAG ATG TTC AAG GTT GTG GAC GTC ACA TGC GAC AAC CAT CGA AGA GAG GTG GTC CCA |
| Amino Asit Dizisi | V E M F K V V D V T C D N H R R E V V P                                         |
| Nükleotid Dizisi  | TCA CCC TCC TTG GAC GAG ATT GTG CAC AAG GAC GGG TGG GCA CGC GAC GAG GCA AGA CCT |
| Amino Asit Dizisi | S P S L D E I V H K D G W A R D E A R P                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GTG CAG CGG TCG GCC GGG GGG AGT CGT GCT CTT GTA GGA GCC GAG GTT GAT GTA GCT CGT |
| Amino Asit Dizisi | V Q R S A G G S R A L V G A E V D V A R                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GAT CAA CTG GAA GCT TGT TCG TTT TTG TTG TTG TGT GCC CGG CCG GGC CGG ACG CCG GGA |
| Amino Asit Dizisi | D Q L E A C S F L L L C A R P G R T P G                                         |
| Nükleotid Dizisi  | TCA TGA                                                                         |
| Amino Asit Dizisi | S -                                                                             |

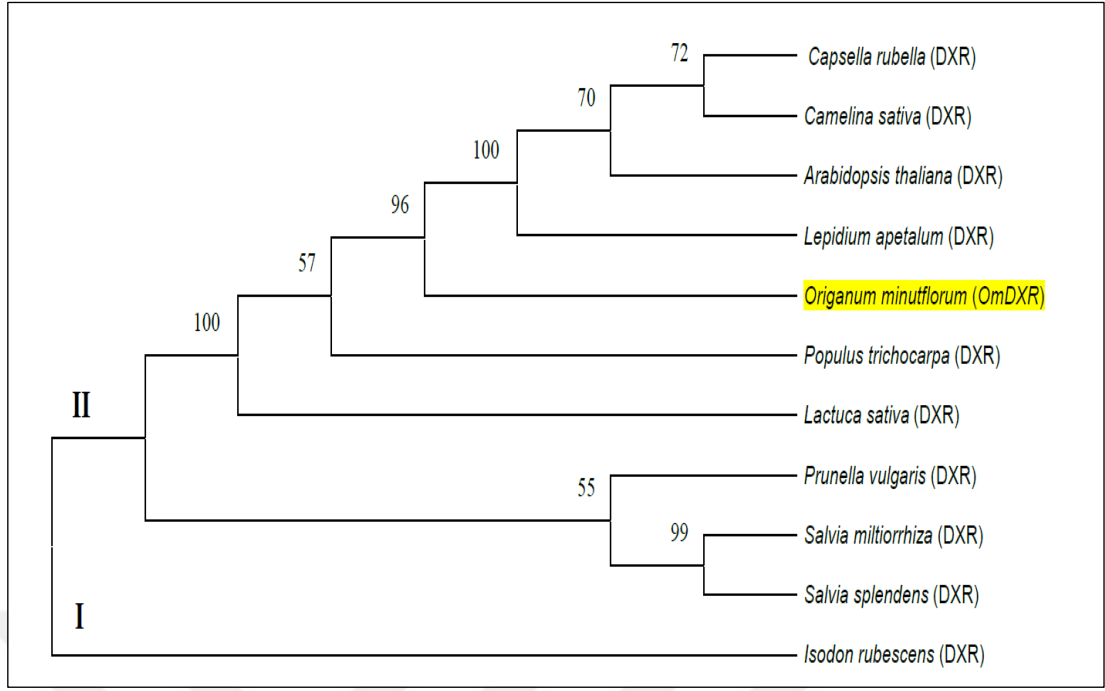
Şekil 4.2. *OmdXR* geninin nükleotid dizisinden elde edilen amino asit dizisi

*O. minutiflorum*'dan elde edilen *OmDXR* nükleotid dizi sonuçları NCBI veri tabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) taranmış ve daha önce farklı türlerde karakterize edilmiş DXR genleri ile %74.22-81.07 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3). Çizelge 4.1 incelendiğinde *OmDXR* geninin, *A. thaliana*'dan izole edilen DXR geni ile %81.07, *Capsella rubella*'dan izole edilen DXR geni ile de %79.13 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 4.1. *OmDXR* geninin BLASTn analizi sonucu elde edilen gen benzerliği

| Gen Kodu       | Gen Adı | Tür Adı                     | Benzerlik (%) | e-değeri |
|----------------|---------|-----------------------------|---------------|----------|
| NM_001203671.1 | DXR     | <i>Arabidopsis thaliana</i> | 81.07         | 0        |
| XM_006280333.2 | DXR     | <i>Capsella rubella</i>     | 79.13         | 0        |
| XM_010445830.2 | DXR     | <i>Camelina sativa</i>      | 78.83         | 0        |
| DQ991431.1     | DXR     | <i>Salvia miltiorrhiza</i>  | 77.83         | 0        |
| KY026189.1     | DXR     | <i>Lepidium apetalum</i>    | 76.77         | 0        |
| KT948059.1     | DXR     | <i>Isodon rubescens</i>     | 76.46         | 0        |
| MK272811.1     | DXR     | <i>Prunella vulgaris</i>    | 76.46         | 0        |
| XM_042162068.1 | DXR     | <i>Salvia splendens</i>     | 76.32         | 0        |
| EU693020.1     | DXR     | <i>Populus trichocarpa</i>  | 74.60         | 0        |
| XM_023887750.2 | DXR     | <i>Lactuca sativa</i>       | 74.22         | 8e-86    |

Ayrıca *OmDXR* geninden elde edilen nükleotid dizisi ile NCBI veri tabanında daha önceden belirlenen DXR geni dizileri arasındaki ilişki de araştırılmıştır (Şekil 4.3). Bu ilişkinin kurulmasında MEGAX.11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılmıştır. *OmDXR* nükleotid sekansı NCBI veri tabanında BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) yapılmak suretiyle nükleotid sekansı benzer olan 10 farklı bitki türü seçilmiş ve 'Bootstrap 1000' ile 'Neighbor-Joining' metodu kullanılarak benzerlikler ortaya konulmuştur (Saitou ve Nei, 1987) (Şekil 4.3). Oluşturulan dendrogram iki ana grupta (I ve II), ikinci ana grup (II) ise kendi arasında alt gruplara ayrılmıştır. En yüksek benzerliğin *S. miltiorrhiza* (DXR) ve *S. splendens* (DXR) arasında olduğu saptanmıştır. *OmDXR* geninin ise II. ana grupta yer aldığı saptanmıştır.



Şekil 4.3. *OmDXR* nükleotid dizisinin filogenetik ilişkisi

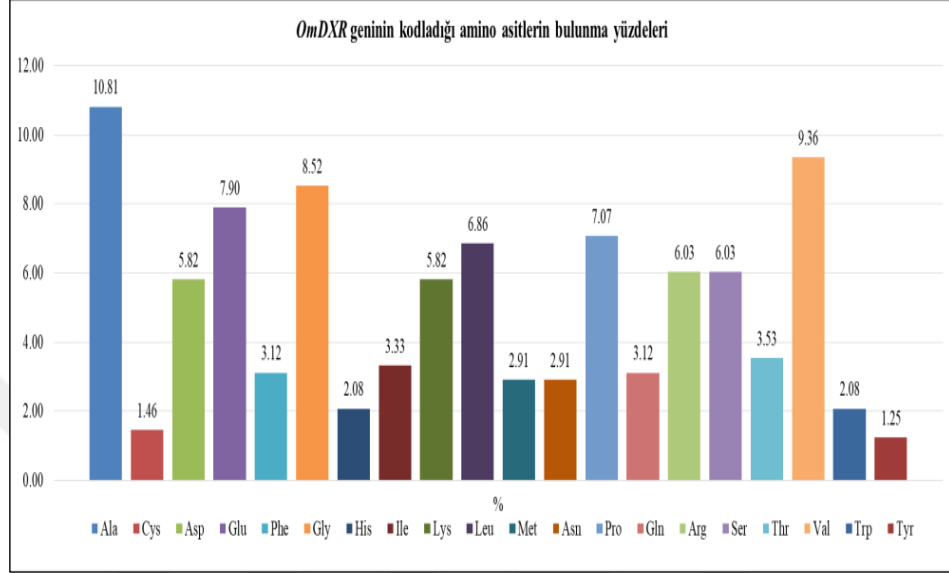
NCBI veri tabanında gerçekleştirilen BLASTp analizleri sonucunda çalışmada izole edilen *OmDXR* geni protein sekansının farklı türlerdeki DXR protein dizileri ile yüksek oranda benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (%70.92-72.95). Çizelge 4.2. incelendiğinde *OmDXR* geninin, *S. miltiorrhiza*'dan izole edilen DXR protein sekansı ile %72.95, *Isodon rubescens* ve *Prunella vulgaris*'ten izole edilen DXR protein sekansı ile de %72.73 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 4.2. *OmDXR* geninin BLASTp analizi sonucu elde edilen protein benzerliği

| Protein Kodu   | Protein Adı | Tür Adı                       | Benzerlik (%) | e-değeri |
|----------------|-------------|-------------------------------|---------------|----------|
| ABJ80680.1     | DXR         | <i>Salvia miltiorrhiza</i>    | 72.95         | 0        |
| QEV81818.1     | DXR         | <i>Prunella vulgaris</i>      | 72.73         | 0        |
| AMW77343.1     | DXR         | <i>Isodon rubescens</i>       | 72.73         | 0        |
| XP_047972741.1 | DXR         | <i>Salvia hispanica</i>       | 72.51         | 0        |
| XP_042013876.1 | DXR         | <i>Salvia splendens</i>       | 72.28         | 0        |
| KAH6798520.1   | DXR         | <i>Perilla frutescen</i>      | 71.84         | 0        |
| Q9XES0.2       | DXR         | <i>Mentha x piperita</i>      | 71.68         | 0        |
| AAR99081.1     | DXR         | <i>Plectranthus barbatus</i>  | 71.46         | 0        |
| ANW06222.1     | DXR         | <i>Rehmannia glutinosa</i>    | 71.24         | 0        |
| AGQ04155.1     | DXR         | <i>Lavandula angustifolia</i> | 70.92         | 0        |

Amino asit dizisi belirlenen *OmDXR* geninin kodladığı amino asit sayıları ve bulunma yüzdeleri Şekil 4.4'te sunulmuştur. Buna göre amino asit dizisi içerisinde %10.81

bulunma oranı ile en fazla Alanin (Ala) amino asidinin olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla %9.36 ile Valin (Val) ve %8.52 ile Glisin (Gly) amino asitleri takip etmiştir. En az bulunan amino asitler ise %1.25 ile Tirozin (Try) ve %1.46 ile Sistein (Cys) amino asitleri olmuştur.



Şekil 4.4. *OmDXR* geninin kodladığı amino asitlerin bulunma oranı. Ala: Alanin, Arg: Arjinin, Asn: Asparajin, Asp: Aspartik Asit, Cys: Sistein, Glu: Glütamik Asit, Gln: Glütamin, Gly: Glisin, His: Histidin, İle: İzolösin, Leu: Lösin, Lys: Lizin, Met: Metiyonin, Phe: Fenilalanin, Pro: Prolin, Ser: Serin, Thr: Treonin, Trp: Triptofan, Tyr: Tirozin, Val: Valin

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda *OmDXR* proteinin moleküler ağırlığı 52.36 kDa, teorik izoelektrik noktası ise (PI) ise 5.71 olarak hesaplanmıştır. *OmDXR* geni tarafından sentezlenen proteinin GRAVY (Grand average of hydropathicity index) değeri - 0.334 olarak hesaplanmıştır. Kyte ve Doolittle (1982), GRAVY değeri sıfırdan küçük olan proteinin hidrofilik karakterde olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla *OmDXR* geni tarafından sentezlenen proteinin hidrofilik karakterde olduğunu söylemek mümkündür.

Çalışmada amino asit dizisinin sekonder tahminleri 'Predict Protein' veri tabanı kullanılarak analiz edilmiştir. Karşılaştırmalı analizler sonucunda *OmDXR* geninin doğruluğu bir kez daha kanıtlanmıştır. Yapısal sınıflandırma analizlerine göre zincirin sekonder yapı kompozisyonunda heliks, düz zincir ve koil oranları sırasıyla %41.79, %10.39 ve %47.81 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.5).



Tez çalışmasında ayrıca *OmDXR* proteinin korunmuş motifleri de belirlenmiştir. Motiflerin belirlenmesinde MEME programı kullanılmıştır. *OmDXR* protein dizilerinde toplam üç korunmuş motif tespit edilmiştir (Şekil 4.6).

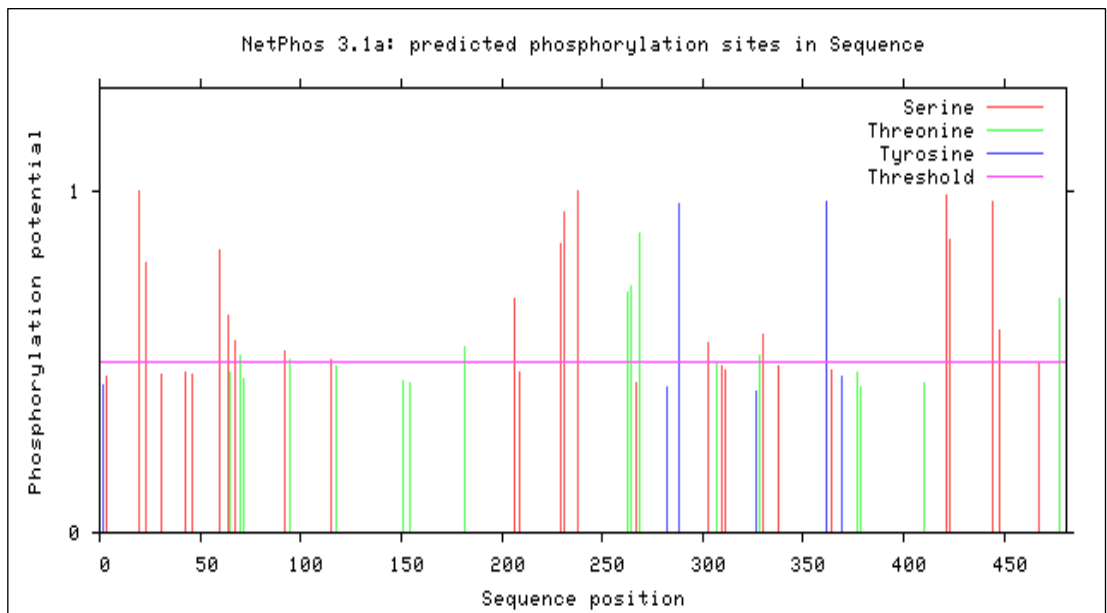
| Name                   | p-value   | Motif Locations |
|------------------------|-----------|-----------------|
| Salvia miltiorrhiza    | 1.41e-174 |                 |
| Isodon rubescens       | 2.78e-177 |                 |
| Prunella vulgaris      | 6.76e-176 |                 |
| Perilla frutescens     | 1.33e-176 |                 |
| Mentha x piperita      | 6.86e-176 |                 |
| Lavandula angustifolia | 3.62e-175 |                 |
| Plectranthus barbatus  | 8.02e-175 |                 |
| Rehmannia glutinosa    | 3.26e-175 |                 |
| Origanum minutiflorum  | 4.52e-137 |                 |

| Motif | Symbol | Motif Consensus                                     |
|-------|--------|-----------------------------------------------------|
| 1.    |        | IHPQSI IHSMVETQDSSVLAQLGWPDMLPILYTLSPDRVYCSEITWPR   |
| 2.    |        | KEVKVADALKHPNWNMGKKITVDSATLFNKGLEVIEAHYLFGA EYDDIEI |
| 3.    |        | GKDIALANKETLIAGGPFVLPLAHKHNVKILPADSEHSAIFQCIQGLPEG  |

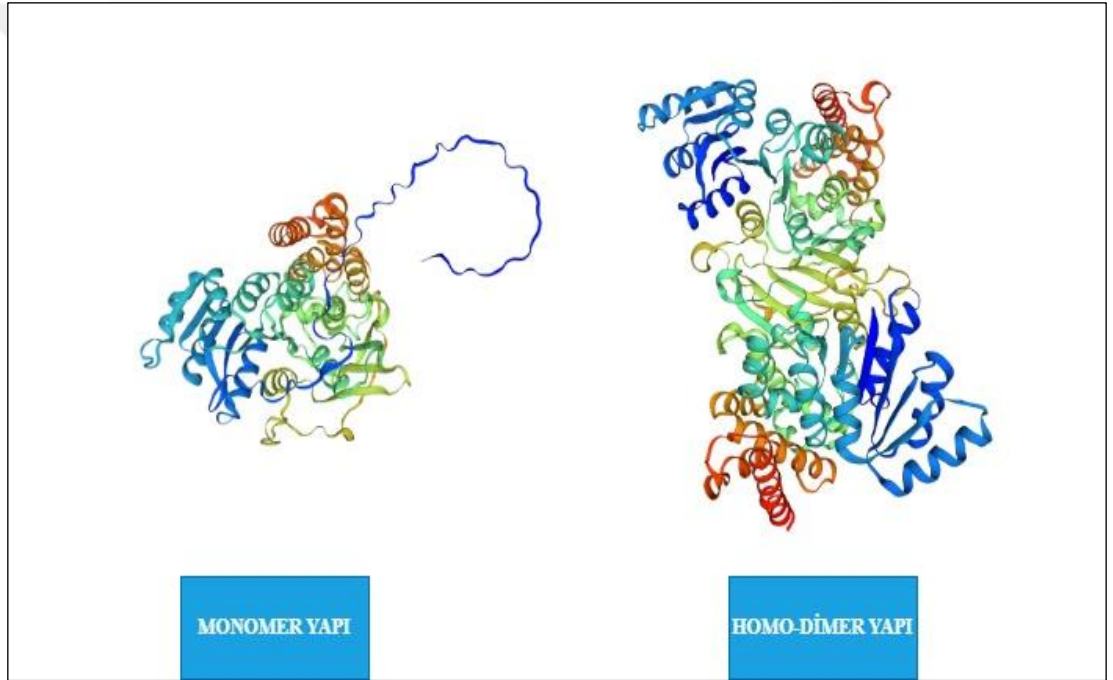
Şekil 4.6. *OmDXR* proteinin korunmuş motifleri

Tez çalışmasında ayrıca *OmDXR* proteinlerinin varsayılan fosforilasyon bölgeleri, 0,8'in üzerindeki bir puana dayalı olarak NetPhos 3.1 programları kullanılarak belirlenmiş ve en bol fosforilasyon bölgesinin Serin kalıntıları içerdiği saptanmıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. *OmDXR* proteinlerinin varsayılan fosforilasyon bölgeleri

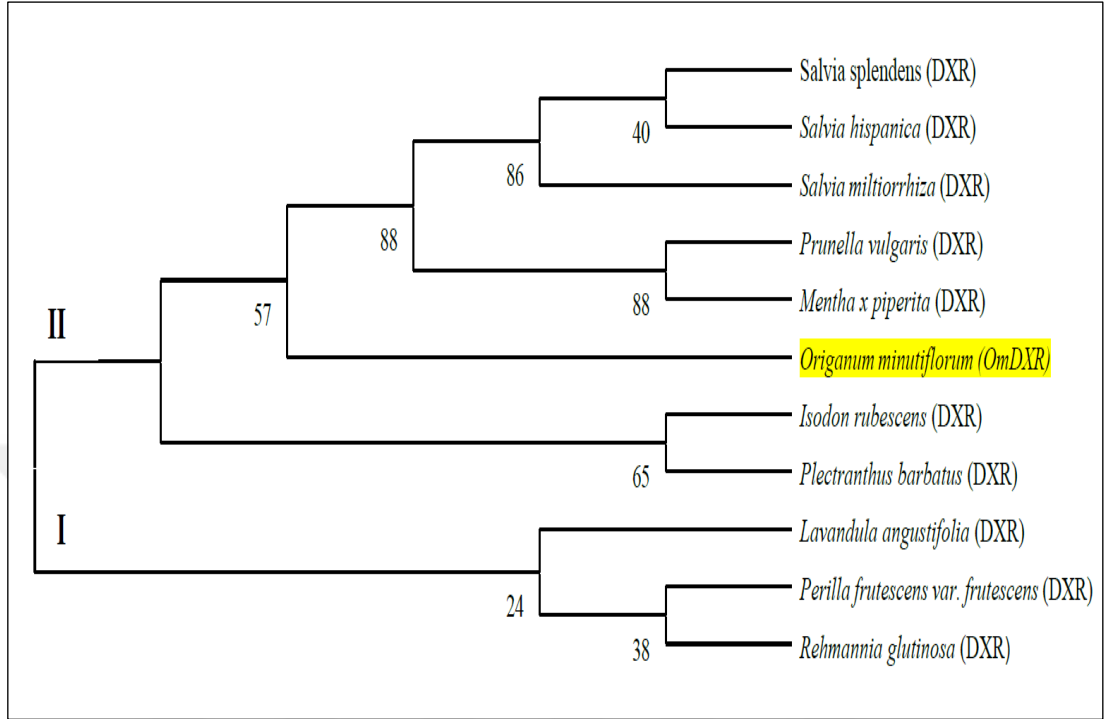
Heliks: Proteinin birincil yapısında bulunan bir dizi amino asidin belirli bir düzen içinde yan yana oluşturduğu yapılardır. Alfa-heliks ve beta-heliks gibi farklı tipleri bulunur. Alfa-heliks, polipeptid zincirinin spiral şeklinde kıvrıldığı bir yapıdır. Düz Zincir: Proteinin birincil yapısında ardışık olarak birbirine bağlanmış amino asitlerin düz bir çizgide sıralandığı bölümdür. Bu bölümde belirli bir yapısal kıvrılma olmaz. Koil: Proteinin ikincil yapısında bulunan bir bölümdür. Düz zincirin gevşek bir şekilde kıvrıldığı ve polipeptid zincirinin daha kompakt bir şekilde üç boyutlu yapıya katlanmış olduğu bir bölümdür (Zhu vd., 1993). Dolayısıyla SWISS-MODEL arayüzü ile oluşturulan *OmDXR* proteinin tahmini 3 boyutlu yapısının alfa-heliks yapıda olduğunu söylemek mümkündür (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. *OmDXR* proteinin 3 boyutlu yapısı

Ayrıca *OmDXR* geninden elde edilen protein dizisi ile NCBI veri tabanında daha önceden belirlenen DXR proteini dizileri arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Bu ilişkinin kurulmasında MEGAX.11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) programı kullanılmıştır. *OmDXR* protein sekansı NCBI veri tabanında BLASTp yapılmak suretiyle protein sekansı benzer olan 10 farklı bitki türü seçilmiş ve 'Bootstrap 1000' ile 'Neighbor-Joining' metodu kullanılarak benzerlikler ortaya konulmuştur (Şekil 4.9). Oluşturulan dendrogram iki ana grupta (I ve II), ana gruplar ise kendi aralarında alt gruplara ayrılmıştır. En yüksek benzerliğin *M. piperita* ile *Prunella vulgaris* arasında olduğu saptanmıştır. *OmDXR* geninin ise II. ana grupta yer

aldığı ve benzerlik gösteren türlerin (*R. glutinosa* hariç (Orobanchaceae familyasına ait) hepsinin Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait olduğu dikkati çekmiştir.



Şekil 4.9. *OmDXR* protein dizisinin filogenetik ilişkisi

#### 4.2. *OmTPS1* Geninin Moleküler Karakterizasyonu

*OmTPS1* genine ait tam uzunluktaki cDNA nükleotid uzunluğunun 1 836 baz çifti uzunluğunda (bç) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.10). Şekil 4.10’da sarı dolgu ile işaretli ‘ATG’ dizisi başlama kodonunu, kırmızı dolgu ile işaretli ‘TGA’ dizisi ise dur kodonunu ifade etmektedir. Yeşil dolgu ile işaretlenmiş bölge ise ORF yani protein kodlama bölgesidir. 1 836 bç uzunluğunda olan genin 1 806 bç kısmı genin ORF bölgesini oluşturmaktadır. Genin 7 bç kısmı ise (mavi dolgu ile işaretlenmiş kısım) poli (A) kuyruğundan oluşmaktadır. *OmTPS1* genine ait amino asit dizisi ExPASy Tools veri tabanı kullanılarak analiz edilmiş ve Şekil 4.11’de sunulmuştur. *OmTPS1* geninin ORF bölgesine ait amino asit dizi kullanılarak 601 amino asit uzunluğunda bir proteini kodladığı tespit edilmiştir (Şekil 4.11).

ATGTCTACCATTAGCATAGATCATGTGGGAATCCTTAGAAATCCTCTCC  
GGCGCAAAAACAAGAGACCTTCCATGAATAACCCATGGAGTCTCAGTC  
TCCCTCGTTCGTCAGCCGCCTCTCGCCTCGTGAAGCCTTGTCGTATCTCC  
TCGAAACCCGATACCAAGCCCGCTGAAGGAACCCGGCGTTCCGGGAAC  
TACCGGCCTGCCCTGTGGGATTTCTGTTACGTCCACTCTCTCAACAAGC  
ATGAGCACTATAACAAGGAGGCACGGCCGCGGGAGGCGGGAGAGATG  
ATGGTGAAGGTGAAGAGGATCCTAGGGCGAGAAATCGCGGCGGTCAA  
GCAGTTGGAGGTGATAGATGACTTGAAGAATATGGGCTTGTCTTATTTC  
TTTCAAGAGGAGATGAGGAACGTGTTACATTCTATATACAGCAATTTCG  
TTCCGAAAGAATAATAAAGTACAAGATGTGTATTTACAGCTCTTGGA  
TTCAGACTCCTCAGGAAGCGCGGTTTCAAGCTTTCACAAGGAGTATTTG  
ATCGTTTCAAGAACGAGCAGGGAAGTGCGTTTCAAGAAGACCTGCTAG  
GAGACGAGATAAAGGTAGAGTTGCAACTCTACGAAGCATCCTTCCGAT  
TGAGCGAAGGTGAGCACACAGTGGAGCTAGCTAGGCAAATTTCCACCG  
AATGTCTTGAGGAAAGTCTTGATGAACGAAAAGTAGGTGAGGCCAAGC  
TATCATCATGGATTTCGCCATTCGTTGGACTTCCCGCTTCACTGGAGGAT  
CCAGAGGCTGGAGGCGAGATGGTTCTTAGAGGCTTACGCGGCCAGGAA  
AGACAGGAATCCACTTATATTCGAGCTCGCCAACTCGACTTCAATAG  
TATCCAAGCAACGCAACAACAAGAACTGAAAGAAATCTCCAGGTGGTG  
GAACAATTTACGCCTAACCGGAAAACCTCCCTTTGGTGAGCGATAGGCT  
AGTGAGCGCTCCTTTTGGGCAGTTGGGCTGTTTCGAGCCTCGGCAATTT  
GGATATCACAGAAAAATTGCTGCCACCATCATGACGCTAATTACTCCT  
GTGGACGATGTTTGGGAGCTCTACGGTACAGTGGACGAACTACAACCTC  
TTCACCGACGCTATGCGAAGATGGGATACCGCATCGGCACACCAACTT  
CCGTACTACGTGCAAGTGTCTTATGTGCGCTGAACAGATGTGTGTCCG  
ACGTGGATTACGATATTCTGAAAGAGAGAGGTGTGCGGCACAATCCCAC  
ATGTACATGGAGCATGGGTGGATTTGGTTGAAGTATATTTAGACGAGG  
CGAAGTGGTACAAAGATAAGTATACACCAAGCTTCGAGGAATATCTTA  
ACAGCGCCACGGCTTCAATGGGCGTTATCGGAGCAGTGATACCGGTCG  
AAGTATCCGTACCAAACCTCGACGATTCATCGCGGCACCCAGGTTCGATC  
GTCACCACCAAATACTGAACCGGTCTGCCGCGGTTTTGAGGCTTGCTGA  
GGATCTTGGAACAGCCAGGAGAGAGGTGGAGAAGGGAGACGTGCCGA  
AAGCAATCCAGTGTTACATGAAGGAGATGAATGCGTCGGAGGAGGAG  
GCACGGGAGCACGTGAGGTTTATGATCAGGGAGGCATGGAAGGAGCT  
GAACACGGCCATGGCGGAGACCGACAATTGTCCGTTACGGAACAAAC  
GGTGGAGGCTGCAGCTAATCTCGGAAGAGCAGCACAGTTTATTTATCT  
AGATGGAGATGGTCATGAAGATTTCCAAATCCATCAACACCTGGAAAA  
GTTGTTCTTCCACCCATGCGTATGAGGGCGCTGTGGAATAGAGAGAGG  
AAAAAAA

Şekil 4.10. *OmTPS1* genine ait nükleotid dizisi

|                   |                                                                                 |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Nükleotid Dizisi  | ATG TCT ACC ATT AGC ATA GAT CAT GTG GGA ATC CTT AGA AAT CCT CTC CGG CGC AAA AAC |
| Amino Asit Dizisi | M S T I S I D H V G I L R N P L R R K N                                         |
| Nükleotid Dizisi  | AAG AGA CCT TCC ATG AAT AAC CCA TGG AGT CTC AGT CTC CCT CGT TCG TCA GCC GCC TCT |
| Amino Asit Dizisi | K R P S S M N N P W S L S L P R S S A A S                                       |
| Nükleotid Dizisi  | CGC CTC GTG AAG CCT TGT CGT ATC TCC TCG AAA CCC GAT ACC AAG CCC GCT GAA GGA ACC |
| Amino Asit Dizisi | R L V K P C R I S S K P D T K P A E G T                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CGG CGT TCC GGG AAC TAC CGG CCT GCC CTG TGG GAT TTC TGT TAC GTC CAC TCT CTC AAC |
| Amino Asit Dizisi | R R S G N Y R P A L W D F C Y V H S L N                                         |
| Nükleotid Dizisi  | AAG CAT GAG CAC TAT AAC AAG GAG GCA CGG CCG CGG GAG GCG GGA GAG ATG ATG GTG AAG |
| Amino Asit Dizisi | K H E H Y N K E A R P R E A G E M M V K                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GTG AAG AGG ATC CTA GGG CGA GAA ATC GCG GCG GTC AAG CAG TTG GAG GTG ATA GAT GAC |
| Amino Asit Dizisi | V K R I L G R A E I A A V K Q L E V I D D                                       |
| Nükleotid Dizisi  | TTG AAG AAT ATG GGC TTG TCT TAT TTC TTT CAA GAG GAG ATG AGG AAC GTG TTA CAT TCT |
| Amino Asit Dizisi | L K N M G L S Y F F Q E E M R N V L H S                                         |
| Nükleotid Dizisi  | ATA TAC AGC AAT TCG TTC CGA AAG AAT AAT AAA GTA CAA GAT GTG TAT TTC ACA GCT CTT |
| Amino Asit Dizisi | I Y S N S F R K N N K V Q D Y V F T A L                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GGA TTC AGA CTC CTC AGG AAG CGC GGT TTC AAG CTT TCA CAA GGA GTA TTT GAT CGT TTC |
| Amino Asit Dizisi | G F R L L R K R G F K L S Q G V F D R F                                         |
| Nükleotid Dizisi  | AAG AAC GAG CAG GGA AGT GCG TTC GAA GAA GAC CTG CTA GGA GAC GAG ATA AAG GTA GAG |
| Amino Asit Dizisi | K N E Q G S C F E E D L L G D E I K V E                                         |
| Nükleotid Dizisi  | TTG CAA CTC TAC GAA GCA TCC TTC CGA TTG AGC GAA GGT GAG CAC ACA GTG GAG CTA GCT |
| Amino Asit Dizisi | L Q L Y E A S F R L S E G E H T V E L A                                         |
| Nükleotid Dizisi  | AGG CAA ATT TCC ACC GAA TGT CTT GAG GAA AGT CTT GAT GAA CGA AAA GTA GGT GAG GCC |
| Amino Asit Dizisi | R Q I S R T E C L E E S L D E R K V G E A                                       |
| Nükleotid Dizisi  | AAG CTA TCA TCA TGG ATT CGC CAT TCG TTG GAC TTC CCG CTT CAC TGG AGG ATC CAG AGG |
| Amino Asit Dizisi | K L S S W I R H S L D F P L H W R I Q R                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CTG GAG GCG AGA TGG TTC TTA GAG GCT TAC GCG GCC AGG AAA GAC AGG AAT CCA CTT ATA |
| Amino Asit Dizisi | L E A R W F L E A Y A A R K D R N P L I                                         |
| Nükleotid Dizisi  | TTC GAG CTC GCC AAA CTC GAC TTC AAT AGT ATC CAA GCA ACG CAA CAA CAA GAA CTG AAA |
| Amino Asit Dizisi | F E L A K L D F N S I Q A T Q Q Q E L K                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GAA ATC TCC AGG TGG TGG AAC AAT TTA CGC CTA ACC GGA AAA CTC CCT TTG GTG AGC GAT |
| Amino Asit Dizisi | E I S R W W N N L R L T L G K L P L V S D                                       |
| Nükleotid Dizisi  | AGG CTA GTG GAG CGC TCC TTT TGG GCA GTT GGG CTG TTC GAG CCT CGG CAA TTT GGA TAT |
| Amino Asit Dizisi | R L V E R S F W A V G L F E P R Q F G Y                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CAC AGA AAA ATT GCT GCC ACC ATC ATG ACG CTA ATT ACT CCT GTG GAC GAT GTT TGG GAG |
| Amino Asit Dizisi | H R K I A A T I M T L I T P V D D V W E                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CTC TAC GGT ACA GTG GAC GAA CTA CAA CTC TTC ACC GAC GCT ATG CGA AGA TGG GAT ACC |
| Amino Asit Dizisi | L Y G T V D E L Q L F T D A M R R W D T                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GCA TCG GCA CAC CAA CTT CCG TAC TAC GTG CAA GTG TCT TAT GTC GCG CTG AAC AGA TGT |
| Amino Asit Dizisi | A S A H Q L P Y Y V Q V S Y V A L N R C                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GTG TCC GAC GTG GAT TAC GAT ATT CTG AAA GAG AGA GGT GTC GGC ACA ATC CCA CAT GTA |
| Amino Asit Dizisi | V S D V D Y D I L K E R G V G T I P H V                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CAT GGA GCA TGG GTG GAT TTG GTT GAA GTA TAT TTA GAC GAG GCG AAG TGG TAC AAA GAT |
| Amino Asit Dizisi | H G A W V D L V E V Y L D E A K W Y K D                                         |
| Nükleotid Dizisi  | AAG TAT ACA CCA AGC TTC GAG GAA TAT CTT AAC AGC GCC ACG GCT TCA ATG GGC GTT ATC |
| Amino Asit Dizisi | K Y T P S F E E Y L N S A T A S M G V I                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GGA GCA GTG ATA CCG GTC GAA GTA TCC GTA CCA AAC TCG ACG ATT CAT CGC GGC ACC CAG |
| Amino Asit Dizisi | G A V I P V E V S V P N S T I H R G T Q                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GTC GAT CGT CAC CAC CAA ATA CTG AAC CGG TCT GCC GCG GTT TTG AGG CTT GCT GAG GAT |
| Amino Asit Dizisi | V D R H H Q I L N R S A A V L R L A E D                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CTT GGA ACA GCC AGG AGA GAG GTG GAG AAG GGA GAC GTG CCG AAA GCA ATC CAG TGT TAC |
| Amino Asit Dizisi | L G T A R R E V E K G D V P K A I Q C Y                                         |
| Nükleotid Dizisi  | ATG AAG GAG ATG AAT GCG TCG GAG GAG GAG GCA CGG GAG CAC GTG AGG TTT ATG ATC AGG |
| Amino Asit Dizisi | M K E M N A S E E E A R E H V R F M I R                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GAG GCA TGG AAG GAG CTG AAC ACG GCC ATG GCG GAG ACC GAC AAT TGT CCG TTC ACG GAA |
| Amino Asit Dizisi | E A W K E L N T A M A E T D N C P F T E                                         |
| Nükleotid Dizisi  | CAA ACG GTG GAG GCT GCA GCT AAT CTC GGA AGA GCA GCA CAG TTT ATT TAT CTA GAT GGA |
| Amino Asit Dizisi | Q T V E A A A N L G R A A Q F I Y L D G                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GAT GGT CAT GAA GAT TTC CAA ATC CAT CAA CAC CTG GAA AAG TTG TTC TTC CAC CCA TGC |
| Amino Asit Dizisi | D G H E D F Q I H Q H L E K L F F H P C                                         |
| Nükleotid Dizisi  | GTA TGA                                                                         |
| Amino Asit Dizisi | V -                                                                             |

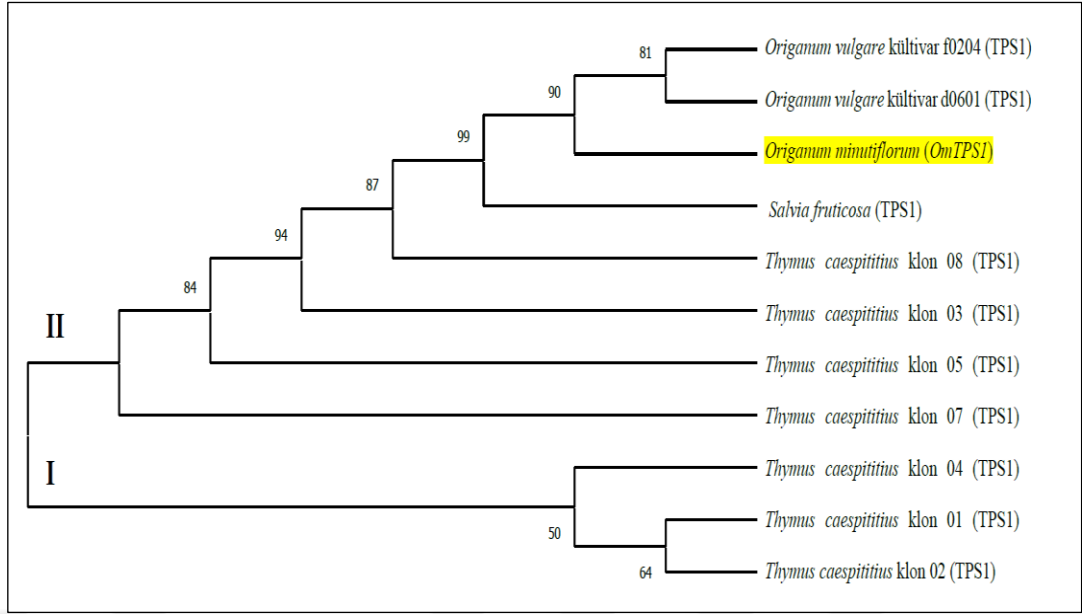
Şekil 4.11. *OmTPS1* geninin nükleotid dizisinden elde edilen amino asit dizisi

*Origanum minutiflorum*'dan elde edilen *OmTPS1* dizi sonuçları NCBI veri tabanında (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) taranmış ve daha önce farklı türlerden izole edilmiş TPS1 genleri ile %75.99-89.58 oranında benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.12). Çizelge 4.3 incelendiğinde *OmTPS1* geninin, *T. caespititius* klonlarından izole edilen TPS1 geni ile %89.58, *O. vulgare*'den izole edilen TPS1geni ile de %81.31 oranında benzerlik gösterdiği saptanmıştır.

Çizelge 4.3. *OmTPS1* geninin BLASTn analizi sonucu elde edilen gen benzerliği

| Gen Kodu   | Gen Adı | Tür Adı                              | Benzerlik (%) | e-değeri |
|------------|---------|--------------------------------------|---------------|----------|
| HQ834494.1 | TPS1    | <i>Thymus caespititius</i> klon 07   | 89.58         | 9e-96    |
| HQ834492.1 | TPS1    | <i>Thymus caespititius</i> klon 05   | 89.58         | 9e-96    |
| HQ834491.1 | TPS1    | <i>Thymus caespititius</i> klon 04   | 89.58         | 9e-96    |
| HQ834488.1 | TPS1    | <i>Thymus caespititius</i> klon 01   | 89.58         | 9e-96    |
| HQ834490.1 | TPS1    | <i>Thymus caespititius</i> klon 03   | 88.54         | 5e-93    |
| HQ834489.1 | TPS1    | <i>Thymus caespititius</i> klon 02   | 88.54         | 2e-91    |
| HQ834495.1 | TPS1    | <i>Thymus caespititius</i> klon 08   | 88.19         | 2e-91    |
| GU385979.1 | TPS1    | <i>Origanum vulgare</i> kültür f0204 | 81.31         | 0        |
| GU385980.1 | TPS1    | <i>Origanum vulgare</i> kültür d0601 | 79.55         | 0        |
| MN513165.1 | TPS1    | <i>Salvia fruticosa</i>              | 75.99         | 7e-72    |

Ayrıca *OmTPS1* geninden elde edilen nükleotid dizisi ile NCBI veri tabanında daha önceden belirlenen TPS1 geni dizileri arasındaki ilişki de araştırılmıştır (Şekil 4.12). Bu ilişkinin kurulmasında MEGAX.11 programı kullanılmıştır. *OmTPS1* nükleotid sekansı NCBI veri tabanında BLASTn yapılmak suretiyle nükleotid sekansı benzer olan 10 farklı bitki türü seçilmiş ve 'Bootstrap 1000' ile 'Neighbor-Joining' metodu kullanılarak benzerlikler ortaya konulmuştur (Şekil 4.12). Oluşturulan dendrogram iki ana grupta (I ve II), ikinci ana grup (II) ise kendi arasında alt gruplara ayrılmıştır. En yüksek benzerliğin *O. vulgare* kültür f0204-*O. vulgare* kültür d0601 ve *T. caespititius* klon 01-*T. caespititius* klon 02 türlerinde elde edilmiştir. *OmTPS1* nükleotid dizisinin *O. vulgare* türünden izole edilen TPS1 nükleotid dizisi ile yüksek benzerlik gösterdiği ve aynı ana grubun aynı alt dalında yer aldığı saptanmıştır.



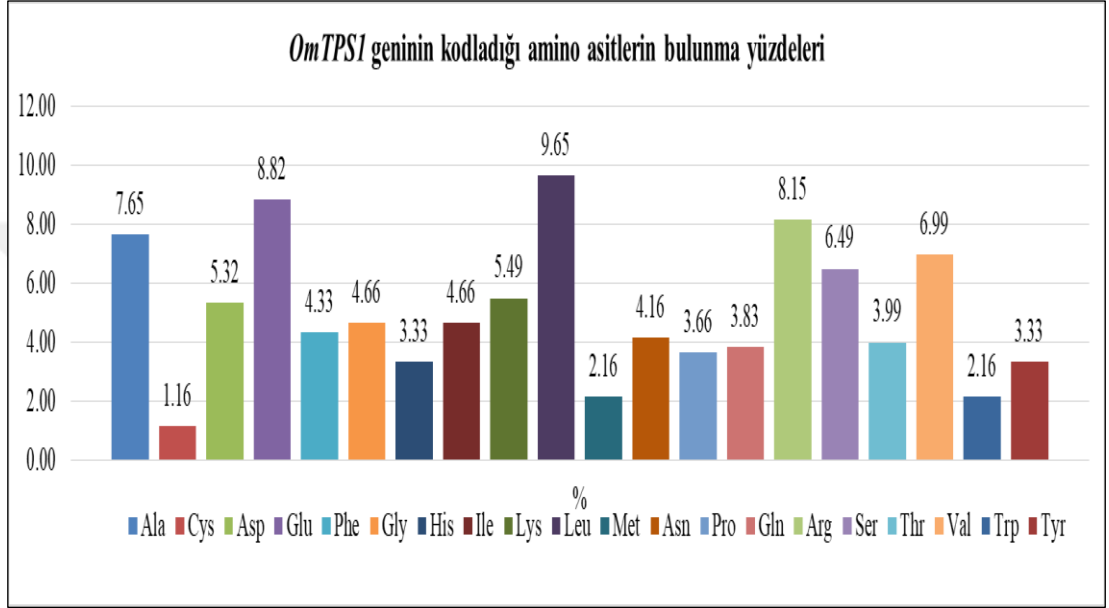
Şekil 4.12. *OmTPS1* nükleotid dizisinin filogenetik ilişkisi

NCBI veri tabanında gerçekleştirilen BLASTp analizleri sonucunda çalışmada izole edilen *OmTPS1* geni protein sekansının farklı türlerdeki protein dizileri ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.4). Çizelge 4.4 incelendiğinde *OmTPS1* protein dizisinin, *O. vulgare*'den elde edilen TPS1 protein sekansı ile %69.88-67.55 ve *T. vulgaris*'ten elde edilen TPS7 protein sekansı ile %69.55 benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca izole ettiğimiz *OmTPS1* geninden elde ettiğimiz protein sekansının terpen sentaz gen ailesine ait olan, *T. caespititius*'te alfa-terpineol, *P. frutescens*'te linalool sentaz ve *O. majorana*'da ise mono terpen sentaz protein dizilerine de benzediği saptanmıştır.

Çizelge 4.4. *OmTPS1* geninin BLASTp analizi sonucu elde edilen protein benzerliği

| Protein Kodu | Protein Adı          | Tür Adı                                          | Benzerlik (%) | e-değeri |
|--------------|----------------------|--------------------------------------------------|---------------|----------|
| E2E2P1.1     | TPS1                 | <i>Origanum vulgare</i>                          | 69.88         | 0        |
| L0HB77.1     | TPS7                 | <i>Thymus vulgaris</i>                           | 69.55         | 0        |
| E2E2P2.1     | TPS1                 | <i>Origanum vulgare</i>                          | 67.55         | 0        |
| L0HAM7.1     | TPS6                 | <i>Thymus vulgaris</i>                           | 66.50         | 0        |
| AGS42398.1   | TPS5                 | <i>Thymus vulgaris</i>                           | 65.72         | 0        |
| R4JQS2.2     | TPS5                 | <i>Thymus caespititius</i>                       | 64.95         | 0        |
| AGK88257.1   | alfa-terpineol       | <i>Thymus caespititius</i>                       | 64.29         | 0        |
| AID51201.1   | gama-terpinen sentaz | <i>Thymus caespititius</i>                       | 56.52         | 0        |
| AAL38029.1   | linalool sentaz      | <i>Perilla frutescens</i> var. <i>frutescens</i> | 52.94         | 0        |
| AGZ58667.1   | mono terpen sentaz   | <i>Origanum majorana</i>                         | 51.66         | 0        |

Amino asit dizisi belirlenen *OmTPS1* geninin kodladığı amino asit sayıları ve bulunma yüzdeleri Şekil 4.13’de verilmiştir. Buna göre amino asit dizisi içerisinde %9.65 bulunma oranı ile en fazla Lösin (Leu) amino asidinin olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla %8.82 ile Glutamin ve %8.15 ile Arjinin (Arg) amino asitleri takip etmiştir. En az bulunan amino asitler ise %1.16 ile Sistein (Cys) ve %2.16 Triptofan (Trp) ve Metiyonin (Met) ile amino asitleri olmuştur.



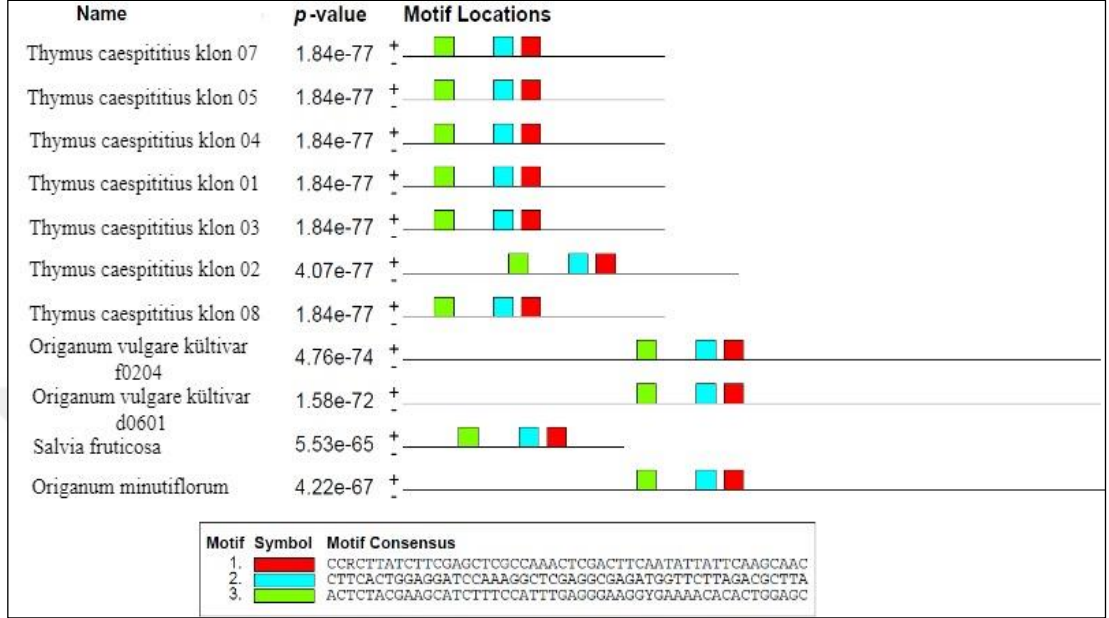
Şekil 4.13. *OmTPS1* geninin kodladığı amino asitlerin bulunma oranı. Ala: Alanin, Arg: Arjinin, Asn: Asparajin, Asp: Aspartik Asit, Cys: Sistein, Glu: Glütamik Asit, Gln: Glütamin, Gly: Glisin, His: Histidin, Ile: İzölösin, Leu: Lösin, Lys: Lizin, Met: Metiyonin, Phe: Fenilalanin, Pro: Prolin, Ser: Serin, Thr: Treonin, Trp: Triptofan, Tyr: Tirozin, Val: Valin

Yapılan biyoinformatik analizler sonucunda *OmTPS1* proteinin moleküler ağırlığı 69.64 kDa, teorik izoelektrik noktası ise (PI) ise 6.72 olarak hesaplanmıştır. *OmTPS1* geni tarafından sentezlenen proteinin GRAVY (Grand average of hydropathicity index) değeri -0.482 olarak hesaplanmıştır. *OmTPS1* geni tarafından sentezlenen proteinin de *OmDXR* proteini gibi hidrofilik karakterde olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmada *OmTPS1* amino asit dizisinin sekonder tahminleri ‘Predict Protein’ veri tabanı kullanılarak analiz edilmiştir. *OmTPS1* geninin yapısal sınıflandırma analizlerine göre zincirin sekonder yapı kompozisyonunda heliks, düz zincir ve koil oranları sırasıyla %65.56, %0.33 ve %34.61 olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.14).

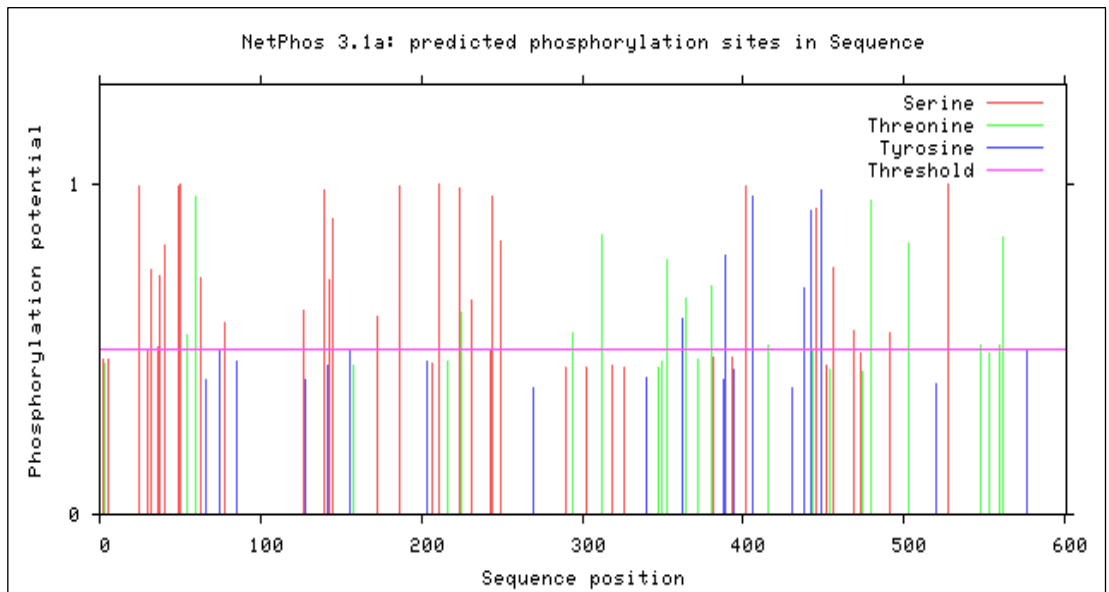


Tez çalışmasında ayrıca *OmTPS1* proteinin korunmuş motifleri de belirlenmiştir. Motiflerin belirlenmesinde MEME programı kullanılmıştır. *OmTPS1* protein dizilerinde toplam üç korunmuş motif tespit edilmiştir (Şekil 4.15).



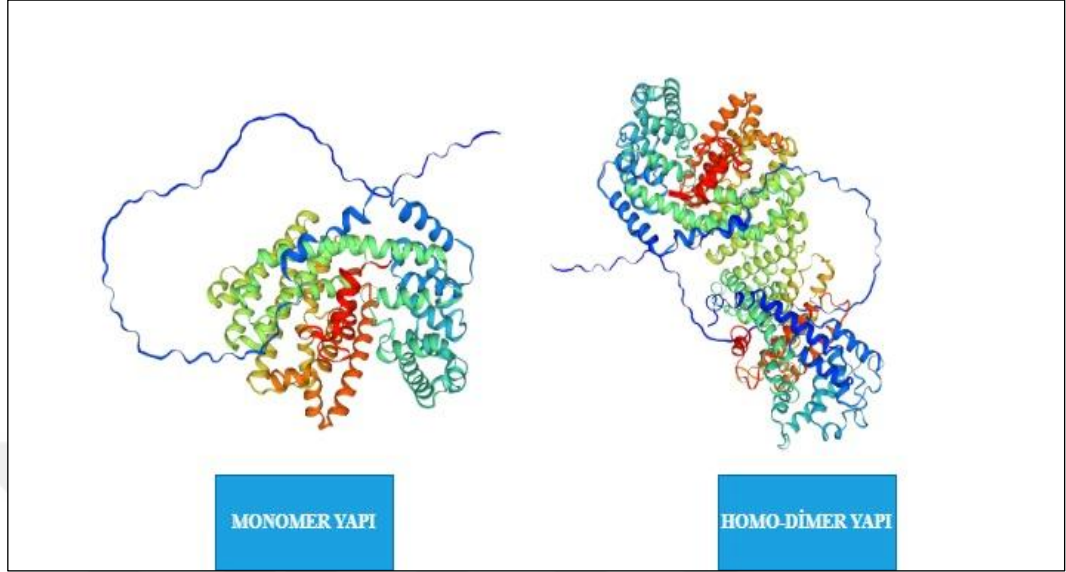
Şekil 4.15. *OmTPS1* proteinin korunmuş motifleri

Tez çalışmasında ayrıca *OmTPS1* proteinlerinin varsayılan fosforilasyon bölgeleri, 0.8'in üzerindeki bir puana dayalı olarak NetPhos 3.1 programları kullanılarak belirlenmiş ve en bol fosforilasyon bölgesinin Serin kalıntıları içerdiği saptanmıştır (Şekil 4.16).



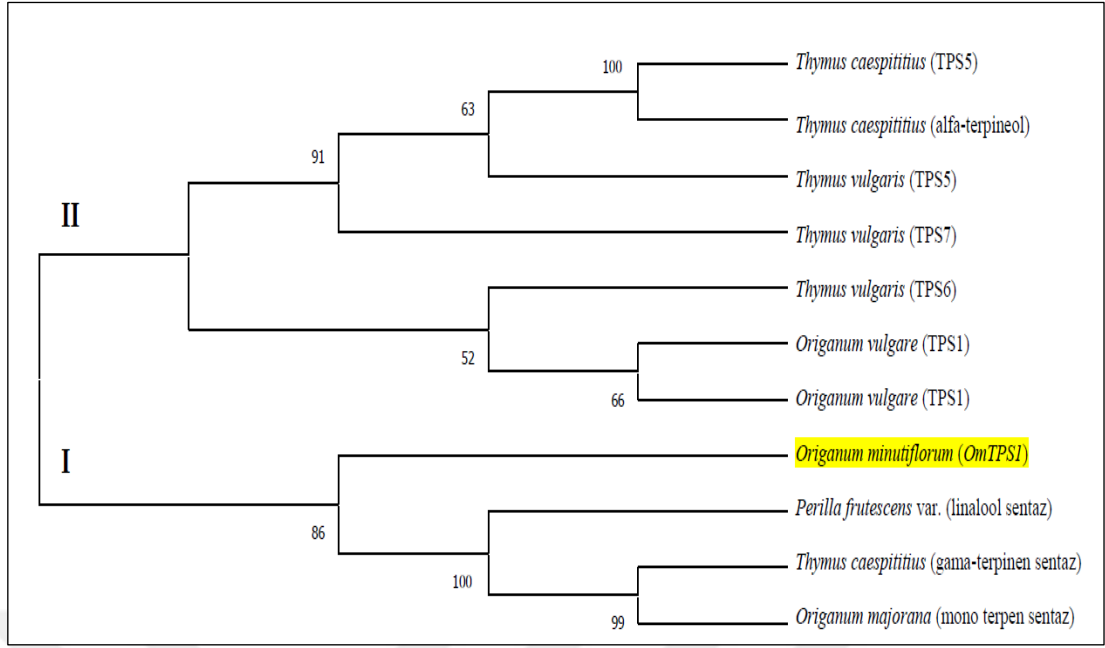
Şekil 4.16. *OmTPS1* proteinlerinin varsayılan fosforilasyon bölgeleri

SWISS-MODEL arayüzü ile oluşturulan *OmTPS1* proteinin tahmini 3 boyutlu yapısının ise alfa-heliks yapıda olduğunu tespit edilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. *OmTPS1* proteinin 3 boyutlu yapısı

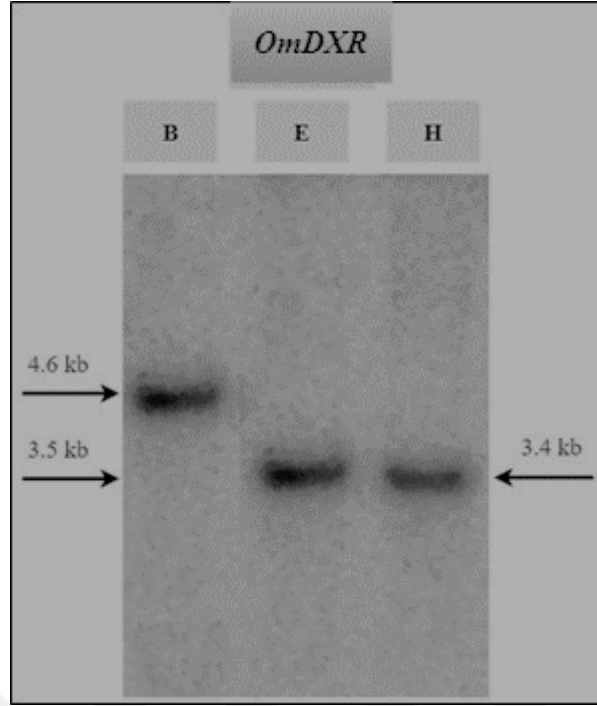
Ayrıca *OmTPS1* geninden elde edilen protein dizisi ile NCBI veri tabanında daha önceden belirlenen TPS1 proteini dizileri arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Bu ilişkinin kurulmasında MEGAX.11 programı kullanılmıştır. *OmTPS1* protein sekansı NCBI veri tabanında BLASTp yapılmak suretiyle protein sekansı benzer olan 10 farklı bitki türü seçilmiş ve 'Bootstrap 1000' ile 'Neighbor-Joining' metodu kullanılarak benzerlikler ortaya konulmuştur (Şekil 4.18). Oluşturulan dendrogram iki ana grupta (I ve II), ana gruplar ise kendi aralarında alt gruplara ayrılmıştır. En yüksek benzerliğin *T. caespititius*-*T. caespititius*, *O. vulgare*-*O. vulgare* ve *T. caespititius*-*O. majorana* türleri arasında olduğu saptanmıştır. *OmTPS1* proteinin ise I. ana grupta yer aldığı ve benzerlik gösteren türlerin *P. frutescens* var. *frutescens*, *T. caespititius* ve *O. majorana* olduğu tespit edilmiştir.



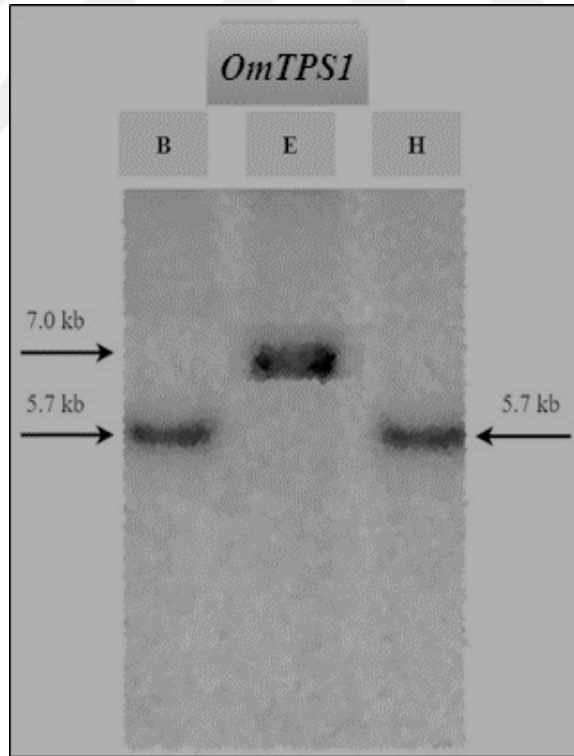
Şekil 4.18. *OmDXR* protein dizisinin filogenetik ilişkisi

#### 4.3. Southern Blot Analizleri

Çalışma kapsamında karakterizasyonu gerçekleştirilmiş olan *OmDXR* ve *OmTPS1* genlerinin *O. minutiflorum* genomunda kaç kopya ile temsil edildiğini belirlemek amacıyla Southern Blot analizi yapılmıştır. Bu amaçla, *O. minutiflorum* yapraklarından genomik DNA izolasyonu yapılmış ve nanodropta kalitesi ölçülmüştür. Southern Blot analizi için 50 µg genomik DNA *EcoRI*, *BamHI* ve *HindIII* enzimleri ile ayrı reaksiyonlarda kesilmiş ve DNA parçaları %1'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmıştır. Hedef genler “Protescript II First Strand CDNA Synthesis Kit” ile çoğaltılmış ve prob olarak kullanılmıştır. Elde edilen DNA probu DIG DNA işaretleme kiti ile işaretlenmiş ve hibridizasyon sinyali jel görüntüleme sisteminde (Kodak GL1500) görüntülenmiştir. Çalışmada karakterize edilen genlerin Southern Blot analizleri sonuçları Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de verilmiştir. Her iki genin de (*OmDXR* ve *OmTPS1*) üç farklı enzimle kesimi sonucunda tek DNA bandı ürettiği ve genomda tek kopyalarının olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.19. *Bam*HI (B), *Eco*RI (E) ve *Hind*III (H) kesilmiş ve blotlanmış olan *OmDXR* geninin Southern Blot analizi



Şekil 4.20. *Bam*HI (B), *Eco*RI (E) ve *Hind*III (H) kesilmiş ve blotlanmış olan *OmTPS1* geninin Southern Blot analizi

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

*Origanum* türleri, başta Türkiye olmak üzere birçok ülkede tıbbi amaçlı, gıda, baharat ve çay olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (Başer, 2002). 'Sütçüler Kekiği' olarak bilinen *O. minutiflorum*, Türkiye'de Isparta ilinin Sütçüler ilçesinde yetişen ve halk tarafından toplanan endemik bir türdür (Başer, 2002). Fenolik (rosmarinik asit, kafeik asit ve türevleri), flavonoid (apigenin, luteolin ve türevleri) ve lignan (globoidnan A) bileşikleri bakımından zengindir (Elmastaş vd., 2018; Erenler vd., 2018; Karaoğlu vd., 2020). *Origanum minutiflorum* bitkisinden elde edilen ekstraktların antimikrobiyal ve antifungal etkilerinin bilinmesine karşın bu tür ile ilgili yeterli araştırmanın yapılmadığı dikkati çekmektedir (Başer, 2002; Oke ve Aslim, 2010; Şenol vd., 2016; Elmastaş vd., 2018; Albayrak ve Aksoy, 2019).

Aromatik bitkilerdeki terpen sentaz genleri, bitki uçucu yağlarının sentezinde görevli enzimleri kodlamaktadır (Bayrak, 2006). Bu nedenle terpen sentazlar, uçucu yağların sentezinde önemli bir role sahiptir (Tholl, 2006). Terpen sentazlar bazı sınıflara ayrılmaktadır. Bunlardan biri olan 1. sınıf terpen sentazlar geranil difosfat, farnesil difosfat ve geranilgeranil difosfat substratlarına göre mono-, seski- ve diterpen sentazlar olarak sınıflandırılır. Terpen sentaz 1 (TPS1) de bir tür seski terpendir ve bitkide terpen sentezinde görev alan enzimlerden biridir (Schnee vd., 2002). İzoprenoid sentezine katkıda bulunan enzimlerden biri de 1-deoksi-D-ksilüloz-5-fosfat redüktoizomeraz (DXR)'dır ve 1-deoksi-D-ksilüloz-5-fosfatı 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfata dönüştürmektedir. DXR genleri *E. coli* (Takahashi vd., 1998; Kuzuyama vd., 2000; Radykewicz vd., 2000), *Eubacterium* (Jomaa vd., 1999; Grolle vd., 2000) ve birkaç bitki türünde (Lange ve Croteau, 1999; Schwender vd., 1999; Veau vd., 2000; Rodriguez-Concepcion vd., 2001; Kim vd., 2006) daha önce izole edilip karakterize edilmiştir. Ancak *O. minutiflorum* türünde DXR geninin izolasyonu konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu bilgiler ışığında daha önce farklı bitki türlerinden karakterize edilen DXR ve TPS1 genlerinin homologları *O. minutiflorum*'da klonlanmış ve tam uzunluktaki DNA sekansları belirlenmiştir. Ayrıca bu karakterize edilen genler literatürdeki homologları ile karşılaştırılmıştır.

Yao vd. (2008), *Camptotheca acuminata*'dan izole ettikleri *CaDXR*'nin tam uzunluktaki cDNA'sının, 472 amino asitlik bir polipeptidi kodlayan 1 416 bç'lik bir açık okuma çerçevesi (ORF) içeren 1 823 bç uzunluğunda olduğunu, Gong vd. (2005), *G. biloba*'dan izole ettikleri *GbDXR*'nin tam uzunluktaki cDNA'sının 1 720 bç uzunluğunda gen yapısına sahip olduğunu ve 1 431 bç'lik bir ORF bölgesine sahip olduğunu ve tam uzunluktaki cDNA'sının 52 kDa moleküler kütle ve 6.58 izoelektrik noktasına sahip 477 amino asitlik bir proteini kodladığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Engprasert vd. (2005), *Coleus forskohlii* bitkisinden izole ettikleri DXR geninin tam uzunluktaki cDNA dizisinin, tahmini moleküler kütlelerinin 50.8 kDa olan 469 amino asitlik bir peptidi kodlayan 1407 nükleotidlik ORF bölgesine sahip olduğunu yine Wu vd. (2009), *Salvia miltiorrhiza*'dan izole ettikleri *SmDXR* geninin 1 756 bç'lik uzunluğa sahip olduğunu ve 474 amino asitlik bir proteini kodladığını, Gupta vd. (2013), *Withania somnifera*'dan izole ettikleri *WsDXR* geninin 1 428 bç uzunluğunda ve 475 amino asitlik bir proteini kodladığını Liu vd. (2015), *Aquilaria sinensis*'ten izole ettikleri *AsDXR*'nin tam uzunluktaki sekansının 1 768 bç, ORF bölgesinin 1 437 bç'den oluştuğunu ve 478 aminoasitlik bir proteini kodladığını genin 51.859 kDa moleküler ağırlığında olduğunu bildirmişlerdir. Tong vd. (2015), *Tripterygium wilfordii*'den izole ettikleri DXR geninin tam uzunluktaki sekansının 1 816 bç'inden oluştuğunu ve 1 410 bç'lik ORF bölgesinin 496 aminoasitlik bir proteini kodladığını bildirmişlerdir. Cheng vd. (2019), *Dioscorea zingiberensis*'ten izole ettikleri *DzDXR* geninin 470 amino asitlik bir proteini kodlayan 1 413 bç ORF'ye sahip 1 643 bç'lik tam uzunlukta bir cDNA'ya sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda *OmDXR* genine ait tam uzunluktaki cDNA nükleotid uzunluğunun 1 700 bç olduğu ve genin 138 bç'lik kısmının 5'-UTR, 116 bç'lik kısmının ise 3'-UTR bölgesini içerdiği ayrıca genin 1 446 bç'lik kısmının ORF bölgesini içerdiği ve 481 amino asit uzunluğunda bir proteini kodladığı saptanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında elde edilen nükleotid dizisi de önceki çalışmalardan elde edilen nükleotid dizileri ile karşılaştırılmış ve %74.22-81.07, protein dizisinde ise %70.92-72.95 arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir. Elde ettiğimiz sekans uzunlukları ve filogenetik benzerlikler göz önünde bulundurulduğunda çalışmamızın konu ile ilgili yapılmış çalışmalar ile paralellik gösterdiği görülmektedir.

Kwon vd. (2003), *Zygosaccharomyces rouxii*'den izole ettikleri *ZrTPS1* geninin tam uzunluktaki cDNA'sının, 56 kDa moleküler kütle ve 492 amino asitlik bir

proteini kodlayan 1 476 nükleotidden oluştuğunu. *ZrTPS2* geninin ise 104 kDa moleküler kütleye sahip 900 amino asitlik bir polipeptidi kodlayan, 2700 bç ORF bölgesine sahip 2 843 nükleotidden oluştuğunu bildirmişlerdir. Kim vd. (2008), *Panax ginseng*'ten izole ettikleri *PgTPS* geninin cDNA'sının 1 883 bç uzunluğunda olduğunu 1 707 bç'lik kısmının ORF bölgesini içerdiği ve 568 aminoasitlik bir proteini kodladığını bildirmişlerdir. Crocoll vd. (2010), *O. vulgare*'den izole ettikleri *Ovtps1*, *Ovtps2*, *Ovtps3*, *Ovtps4*, *Ovtps5*, *Ovtps6*, *Ovtps7* genlerinin 1 659 ile 1 803 bç uzunluğunda olduğunu, Li ve Fan (2011), *Hedychium coronarium*'dan izole ettikleri *HcTPS2* geninin 1 788 bç'lik bir ORF'ye sahip olduğunu ve 596 amino asitlik bir protein kodladığını ve genin 66.7 kDa moleküler ağırlığında olduğunu, Hsu vd. (2012), *Toona sinensis*'ten izole ettikleri *TsTPS1* ve *TsTPS2* genlerinin sırasıyla 1 788 ve 1 671 bç uzunluklarında olduğunu ve bu genlerin 595 ve 556 aminoasit uzunluğunda proteinler kodladıklarını tespit etmişlerdir. Vezzaro vd. (2012), *Olea europaea*'dan izole ettikleri *OeTPS1* 1 749 nükleotidlik ORF bölgesine sahip olduğunu ve 583 amino asitlik bir proteini kodladığını ayrıca genin 67 kDa moleküler ağırlığında olduğunu saptamışlardır. Lima vd. (2013), *T. caespititius*'ten izole ettikleri *TcTPS2* geninin tam uzunluktaki cDNA'sının 2 308 bç uzunluğunda olduğunu ve 1 794 nükleotidlik ORF bölgesine sahip olduğunu ve 598 amino asitlik bir proteini kodladığını, *TcTPS5* geninin ise tam uzunluktaki cDNA'sının 2 507 bç uzunluğunda olduğunu ve 1 806 nükleotidlik ORF bölgesine sahip olduğunu ve 602 amino asitlik bir proteini kodladığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar söz konusu iki genin amino asit sekansının %74, diğer Lamiaceae türlerinden izole edilen terpen sentaz genleri ile de %42-94 oranında benzerlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Yang vd. (2013), *G. hirsutum*'dan *GhTPS1* geninin 1 943 bç uzunluğunda olduğunu ve 545 amino asitlik protein kodladığını, Abbas vd. (2019), *Lilium* 'Siberia'dan izole ettikleri *LoTPS1* geninin 67.6 kDa moleküler ağırlığında 1 758 bç uzunluğunda ve 568 aminoasitlik bir proteini kodladığını tespit etmişlerdir. Nawade vd. (2019), *Prunus dulcis* meyvelerinden izole ettikleri *PdTPS1* geninin 1 671 bç uzunluğunda 557 aminoasitlik bir proteini kodladığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda da *OmTPS1* genine ait tam uzunluktaki cDNA nükleotid uzunluğunun 1 836 bç olduğu ve genin 1 806 bç'lik kısmının OFR bölgesini içerdiği belirlenmiştir. *OmTPS1* genin kodladığı proteinin ise 601 amino asit uzunluğunda olduğu önceki çalışmalardan elde edilen sekans uzunlukları ile benzerlik gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca çalışma kapsamında elde edilen nükleotid dizisi de

önceki çalışmalardan elde edilen nükleotid dizileri ile karşılaştırılmış ve %75.99-89.58, protein dizisinde ise %51.66-69.88 arasında benzerlik olduğu belirlenmiştir.

Hsieh ve Googman (2006), *Arabidopsis* bitkisinde DXR geninin genom içerisinde kaç kopyasının olduğunu belirlemek amacıyla Southern Blot analizi yapmışlar ve çalışma sonucunda genin genom içerisinde tek kopya ile temsil edildiğini tespit etmişlerdir. Aksine Liu vd. (2015), *Aquilaria sinensis*'de *DraI*, *HindIII* ve *SspI* kesim enzimleri ile yapmış oldukları Southern Blot analizinde genom içerisinde en az iki kopyasının olduğunu bildirmişlerdir. Odom ve Van Voorhis (2010), *Plasmodium falciparum*'da DXR geninin işlevsel ve genetik analizini yürütmüşlerdir. Araştırmacılar Southern Blot analizi sonucunda DXR geninin genom içerisinde 4 Kb boyutunda tek kopyasının olduğunu bildirmişlerdir. Miller vd. (2000), *Synechococcus leopoliensis*'te *EcoRI*, *HindIII* ve *Sall* kesim enzimleri kullanarak yapmış oldukları Southern Blot analizi sonucunda DXR geninin bakteri içerisinde tek kopya halinde temsil edildiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde Hasunuma vd. (2008), DXR geninin plastid içerisinde tek kopyasının olduğunu bildirmişlerdir. Chang vd. (2000), *Artemisia annua*'da yapmış oldukları Southern Blot analizi sonucunda *Amorpha-4, 11-dien* terpen sentaz geninin tek kopyasının olduğunu saptamışlardır. Han vd. (2005), transgenik tütünde yapmış oldukları Southern Blot analizi sonucunda TPS1 geninin tek kopyasının olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Jia vd. (2005), 'Rio Red' çeşidi greyfurt meyvesinde *EcoRI*, *BamHI* ve *HindIII* kesim enzimleri aracılığıyla yapmış oldukları Southern Blot analizi sonucunda *Grtps* geninin genom içerisinde bir kopya ile temsil edildiğini bildirmişlerdir. Shimada vd. (2012), *Citrus unshiu* genomunda *CuSTS1* terpen sentaz geninin tek kopyasının olduğunu tespit etmişlerdir.

DXR, izoprenoid bileşiklerin (terpenoidler) biosentezinde kilit bir enzimdir. Bu enzim, 2-C-metil-D-eritritol 4-fosfat (MEP) yolu olarak bilinen alternatif bir izoprenoid sentez yolunun ilk adımını katalizler. DXR, izopentenil difosfat (IPP) ve dimetilalil difosfat (DMAPP) gibi önemli izoprenoid bileşiklerin sentezini sağlar. DXR enzimi, bitkiler, bakteriler ve bazı mikroorganizmalarda bulunur, özellikle bitkilerde ve mikroorganizmalarda izoprenoid bileşiklerin üretiminde önemli bir rol oynar. İzoprenoidler, bitkilerde ve mikroorganizmalarda birçok biyolojik süreçte görev alır ve farklı biyolojik aktivitelere sahiptir. Bazı izoprenoidler, bitkilerde antioksidan, antimikrobiyal ve antitümör etkiler gibi biyolojik aktiviteler sergiler. İzoprenoid

bileşikler, kloroplastlar ve mitokondriler gibi hücresel organellerde bulunan önemli moleküllerdir ve klorofil, karotenoidler, sitokinler ve terpenoidler gibi çeşitli biyolojik öneme sahip bileşiklerin sentezinde rol oynarlar. Bu nedenle, DXR enzimi, bitkilerin fotosentez, stres tepkisi ve savunma mekanizmalarında önemli bir yer tutar. Ayrıca, DXR enzimi, antibiyotikler ve diğer biyoaktif bileşiklerin sentezi için hedeflenen bir enzim olabilir. İzoprenoid sentez yolunun birçok adımı, patojenlerin hayatta kalması ve çoğalması için önemli olduğundan, DXR enzimi hedef alınarak patojenlerin kontrol altına alınması ve hastalıklara karşı mücadelede yeni terapötik ajanlar geliştirilmesi için potansiyel bir strateji olabilir. Bu nedenlerle, DXR geninin önemi, bitkilerin ve mikroorganizmaların izoprenoid bileşiklerin üretiminde ve biyolojik fonksiyonlarında oynadığı kritik rolle ilişkilidir. Aynı zamanda, bu enzimin farmakolojik ve biyoteknolojik uygulamalar için de potansiyel bir hedef olması önemlidir. Terpen sentazlar, izoprenoid bileşiklerin sentezinde hayati öneme sahip enzimlerdir. Bu enzimler, izoprenoidlerin yapı taşları olan izopentenil difosfat (IPP) ve dimetilalil difosfat (DMAPP) gibi bileşikleri birleştirerek çeşitli terpenoidlerin sentezini katalizlerler. Terpenoidler, bitkiler, bakteriler, funguslar ve diğer organizmalar için önemli biyolojik moleküllerdir ve çeşitli biyolojik işlevlere sahiptirler. Terpenoidlerin bir alt sınıfı olan terpenler, çeşitli bitkisel uçucu yağlarında ve reçinelerde bulunur. Bitkisel uçucu yağlar, bitkilerin kokularını, tatlarını ve savunma mekanizmalarını belirler. Aynı zamanda, bu uçucu yağların böcekler ve diğer zararlı organizmalar üzerinde doğal pestisit özelliği bulunmaktadır. Terpenoidler ayrıca, bitkilerin stres tepkilerinde ve savunma mekanizmalarında da önemli rol oynarlar. Bitkiler zararlı organizmalar veya çevresel stres faktörleriyle karşılaştıklarında, terpenoidlerin sentezi artar ve böylece bitkilerin kendilerini savunmalarına yardımcı olur. Ayrıca, terpenoidlerin insan sağlığı üzerinde de önemli etkileri bulunmaktadır. Birçok terpenoid, tıbbi bitkilerde bulunan biyoaktif bileşiklerdir ve antiviral, antibakteriyel, antioksidan ve antitümör gibi çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olabilirler. Terpen sentazların önemi, doğal ürün kimyası ve biyoteknoloji alanında da önemlidir. Bu enzimler, izoprenoid sentezini kontrol ederek ve yönlendirerek, terpenoidlerin ve diğer doğal ürünlerin biyosentezini optimize etmek için kullanılabilirler. Aynı zamanda, terpen sentazlarının gen mühendisliği yoluyla değiştirilmesi, yeni ve özelleştirilmiş terpenoid bileşiklerin sentezine olanak sağlar. Dolayısıyla, terpen sentazlar, izoprenoidlerin ve terpenoidlerin sentezinde önemli yer tutmaktadır ve bu konuda

alışılması, bitkilerin biyolojik fonksiyonlarını, doğal ürünlerin sentezini ve insan sağlığı için potansiyel yeni ilaçların geliştirilmesini anlamak için önemlidir.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, endemik bir tür olan *O. minutiflorum* bitkisinde uçucu yağ sentezinde görev alan *OmDXR* ve *OmTPS1* genlerinin nükleotid sekansları başarılı bir şekilde karakterize edilmiş ve homologları ile karşılaştırılmıştır. Özellikle alışma kapsamında incelenen DXR geninin uçucu yağ oluşumunda kritik öneme sahip olması ve daha önce *O. minutiflorum*'da incelenmemiş olması araştırmamızı önemli kılmıştır. Dolayısıyla doğadan toplayıcılık ile hasat edilen bu türün ilerde kültüre alınması ve daha profesyonel bir yetiştiricilik yapılması durumunda kalite arttırmaya yönelik yapılacak çalışmalarda bu çalışma sonucunda elde ettiğimiz bilgilerin yararlı olacağı kanaatindeyiz.

## KAYNAKLAR

- Abbas, F., Ke, Y., Yu, R., & Fan, Y. (2019). Functional characterization and expression analysis of two terpene synthases involved in floral scent formation in *Lilium* 'Siberia'. *Planta*, 249, 71-93. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3006-7>.
- Aboukhalid, K., Machon, N., Lambourdière, J., Abdelkrim, J., Bakha, M., Douaik, A., & Al Faiz, C. (2017). Analysis of genetic diversity and population structure of the endangered *Origanum compactum* from Morocco, using SSR markers: Implication for conservation. *Biological Conservation*, 212, 172-182. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2017.05.030>.
- Ahmed, M. Z. S., El-Demerdash, E. S. S., & Ibrahim, S. D. (2020). Molecular identification and phylogenetic relationship of some *Origanum* and *Thymus* species based on ITS regions. *Journal of Biotechnology and Biochemistry*, 6(6), 12-23. <https://doi.org/10.9790/264X-0606031223>.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168-4170. <https://doi.org/10.1021/jf001494m>.
- Akarca, G., & Tomar, O. (2020). The Antibacterial effects of the different extracts of *Oenothera biennis* and *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. PH davis on food-borne pathogenic bacteria. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*, 34(1), 78-83. <https://doi.org/10.15316/SJAFS.2020.198>.
- Albayrak, S., & Aksoy, A. (2019). Phenolic contents and biological activity of endemic *Origanum minutiflorum* grown in Turkey. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 53(1). <https://doi.org/10.5530/ijper.53.1.21>.
- Ali, H., Al-Khalifa, A. R., Aouf, A., Boukhebt, H., & Farouk, A. (2020). Effect of nanoencapsulation on volatile constituents, and antioxidant and anticancer activities of Algerian *Origanum glandulosum* Desf. essential oil. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Amar, M. H., & El Wahab, M. A. (2013). Comparative genetic study among *Origanum* L. plants grown in Egypt. *Journal of Biological & Environmental Sciences*, 3, 208-222.
- Anlaş, C., Alkan, F. Ü., Sarı, A. B., Üstüner, O., & Bakırel, T. (2017). *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et. PH Davis' in terapötik potansiyelinin değerlendirilmesi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 31(1), 27-32.

- Ashaari, N. S., Ab. Rahim, M. H., Sabri, S., Lai, K. S., Song, A. A. L., Abdul Rahim, R., & Ong Abdullah, J. (2020). Functional characterization of a new terpene synthase from *Plectranthus amboinicus*. *PLoS One*, 15(7), e0235416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0235416>.
- Aslim, B., & Yucel, N. (2008). In vitro antimicrobial activity of essential oil from endemic *Origanum minutiflorum* on ciprofloxacin-resistant *Campylobacter* spp. *Food Chemistry*, 107(2), 602-606. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.048>.
- Avcı, H., Ghorbanpoor, H., & Nurbas, M. (2018). Preparation of *Origanum minutiflorum* oil-loaded core-shell structured chitosan nanofibers with tunable properties. *Polymer Bulletin*, 75, 4129-4144. <https://doi.org/10.1007/s00289-017-2257-y>.
- Ayaz, A., Zaman, W., Saqib, S., Ullah, F., & Mahmood, T. (2020). Phylogeny and diversity of Lamiaceae based on *rps14* gene in Pakistan. *Genetika*, 52(2), 435-452. <https://doi.org/10.2298/GENSR2002435A>.
- Azizi, A., Wagner, C., Honermeier, B., & Friedt, W. (2009). Intraspecific diversity and relationship between subspecies of *Origanum vulgare* revealed by comparative AFLP and SAMPL marker analysis. *Plant Systematics and Evolution*, 281, 151-160. <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0197-1>.
- Barber, J. C., Finch, C. C., Francisco-Ortega, J., Santos-Guerra, A., & Jansen, R. K. (2007). Hybridization in Macaronesian *Sideritis* (Lamiaceae): evidence from incongruence of multiple independent nuclear and chloroplast sequence datasets. *Taxon*, 56(1), 74-88. <https://doi.org/10.2307/25065737>.
- Bardakçı, B., & Yılmaz, M. (2007). Isparta, Sütçüler bölgesi kekik yağının kimyasal yapısının incelenmesi. *Süleyman Demirel University Faculty of Arts and Science Journal of Science*, 2(1), 77-82.
- Bariotakis, M., Koutroumpa, K., Karousou, R., & Pirintsos, S. A. (2016). Environmental (in) dependence of a hybrid zone: Insights from molecular markers and ecological niche modeling in a hybrid zone of *Origanum* (Lamiaceae) on the island of Crete. *Ecology and Evolution*, 6(24), 8727-8739. <https://doi.org/10.1002/ece3.2560>.
- Başer, K. H. C., Tümen, G., & Sezik, E. (1991). The essential oil of *Origanum minutiflorum* O. Schwarz and PH Davis. *Journal of Essential Oil Research*, 3(6), 445-446. <https://doi.org/10.1080/10412905.1991.9697982>.
- Başer, K. H. C. (2002). Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. *Pure and Applied Chemistry*, 74(4), 527-545. <https://doi.org/10.1351/pac200274040527>

- Baydar, H. (2005). Yayla kekiği (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz et P.H. Davis)'nde farklı toplama zamanlarının uçucu yağ içeriği ve uçucu yağ bileşenleri üzerine etkisi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(2), 175-178.
- Baydar, N. G., & Akkurt, M. (2001). Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 25(3), 163-168.
- Bayrak, A. (2006). *Gıda Aromaları*. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları.
- Bayramoğlu, B., Sahin, S., & Sumnu, G. (2008). Solvent-free microwave extraction of essential oil from oregano. *Journal of food Engineering*, 88(4), 535-540. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.03.015>.
- Bower, A. M., Real Hernandez, L. M., Berhow, M. A., & De Mejia, E. G. (2014). Bioactive compounds from culinary herbs inhibit a molecular target for type 2 diabetes management, dipeptidyl peptidase IV. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), 6147-6158. <https://doi.org/10.1021/jf500639f>.
- Bozdemir, Ç. (2019). Türkiye'de yetişen kekik türleri, ekonomik önemi ve kullanım alanları. *Yüzüncü Yıl University Journal of Agricultural Sciences*, 29(3), 583-594. <https://doi.org/10.29133/yyutbd.511777>.
- Bryant, S., & Manning, D. L. (1998). Formaldehyde gel electrophoresis of total RNA. In *RNA Isolation and Characterization Protocols*. (pp. 69-72)
- Buckingham, J. (1998). *Dictionary of Natural Products*. Chapman and Hall, London
- Burke, C. C., Wildung, M. R., & Croteau, R. (1999). Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(23), 13062-13067.
- Cantino, P., Harley, R. M., & Wagstaff, S. J. (1992). Genera of Labiatae: status and classification. *Advances in Labiate Science*, 11, 511-522.
- Carretero-Paulet, L., Ahumada, I., Cunillera, N., Rodriguez-Concepción, M., Ferrer, A., Boronat, A., & Campos, N. (2002). Expression and molecular analysis of the Arabidopsis DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiology*, 129(4), 1581-1591. <https://doi.org/10.1104/pp.003798>.
- Chang, Y. J., Song, S. H., Park, S. H., & Kim, S. U. (2000). *Amorpha-4, 11-diene synthase* of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 383(2), 178-184. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2061>.

- Chan, W. S., Abdullah, J. O., Namasivayam, P., & Mahmood, M. (2009). Molecular characterization of a new 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) transcript from *Vanda Mimi* Palmer. *Scientia Horticulturae*, 121(3), 378-382. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.02.015>.
- Cheng, Z., Wang, R., Shen, J., Yang, Z., & Chen, Y. (2019). Cloning, characterization, and expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene from *Dioscorea zingiberensis*. *Biologia Plantarum*, 63(1), 262-267. <https://doi.org/10.32615/bp.2019.030>.
- Colby, S. M., Alonso, W. R., Katahira, E. J., McGarvey, D. J., & Croteau, R. (1993). 4S-limonene synthase from the oil glands of spearmint (*Mentha spicata*). cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the catalytically active monoterpene cyclase. *Journal of Biological Chemistry*, 268(31), 23016-23024. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)49419-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49419-2).
- Crocoll, C., Asbach, J., Novak, J., Gershenzon, J., & Degenhardt, J. (2010). Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology*, 73, 587-603. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9636-1>.
- Crocoll, C. (2011). *Biosynthesis of the Phenolic Monoterpenes, Thymol and Carvacrol, by Terpene Synthases and Cytochrome P450s in Oregano and Thyme*. (Doctoral Dissertation, Jena, Friedrich-Schiller-Universität Jena).
- Coskun, S., Girisgin, O., Kürkeüoğlu, M., Malyer, H., Girisgin, A. O., Kırimer, N., & Baser, K. H. (2008). Acaricidal efficacy of *Origanum onites* L. essential oil against *Rhipicephalus turanicus* (Ixodidae). *Parasitology Research*, 103, 259-261. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0956-x>.
- Cunedioğlu, T., & Üremiş, İ. (2018). Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ve sütçüler kekiği (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & PH Davis) uçucu yağlarının bazı yabancı ot tohumlarının çimlenmelerine etkileri. *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23(1), 24-32.
- Çetin, H., Cilek, J. E., Aydın, L., & Yanikoglu, A. (2009). Acaricidal effects of the essential oil of *Origanum minutiflorum* (Lamiaceae) against *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 160(3-4), 359-361. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.11.009>.
- Dadaloğlu, I., & Evrendilek, G. A. (2004). Chemical compositions and antibacterial effects of essential oils of Turkish oregano (*Origanum minutiflorum*), bay laurel (*Laurus nobilis*), Spanish lavender (*Lavandula stoechas* L.), and fennel (*Foeniculum vulgare*) on common foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8255-8260. <https://doi.org/10.1021/jf049033e>.
- Danner, H., Boeckler, G. A., Irmisch, S., Yuan, J. S., Chen, F., Gershenzon, J., & Köllner, T. G. (2011). Four terpene synthases produce major compounds of the

gypsy moth feeding-induced volatile blend of *Populus trichocarpa*. *Phytochemistry*, 72(9), 897-908.

Davis, P. H., Mill, R. R., & Tan, K. (1982). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Edinburgh University Press.

Degenhardt, J., Köllner, T. G., & Gershenzon, J. (2010). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, 70(15-16), 1621-1637. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.030>.

Din, M., & Barozai, M. Y. K. (2014). Profiling microRNAs and their targets in an important fleshy fruit: Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Gene*, 535(2), 198-203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.034>.

Dirmenci, T., Özcan, T., Yazici, T., Arabaci, T., & Martin, E. (2018a). Morphological, cytological, palynological and molecular evidence on two new hybrids from Turkey: an example of homoploid hybridization in *Origanum* (Lamiaceae). *Phytotaxa*, 371(3), 145-167. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.371.3.1>.

Dirmenci, T., Yazici, T., Özcan, T., Celenk, S., & Martin, E. (2018b). A new species and a new natural hybrid of *Origanum* L. (Lamiaceae) from the west of Turkey. *Turkish Journal of Botany*, 42(1), 73-90. <https://doi.org/10.3906/bot-1704-1735>.

Dudareva, N., Negre, F., Nagegowda, D. A., & Orlova, I. (2006). Plant volatiles: recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 25(5), 417-440. <https://doi.org/10.1080/07352680600899973>.

El-Demerdash, E. S. S., Elsherbeny, E. A., Salama, Y. A. M., & Ahmed, M. Z. (2019). Genetic diversity analysis of some Egyptian *Origanum* and *Thymus* species using AFLP markers. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 17, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0012-5>.

Elmastaş, M., Celik, S. M., Genc, N., Aksit, H., Erenler, R., & Gulcin, İ. (2018). Antioxidant activity of an Anatolian herbal tea *Origanum minutiflorum*: isolation and characterization of its secondary metabolites. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 374-384. <https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1416399>.

Engprasert, S., Taura, F., & Shoyama, Y. (2005). Molecular cloning, expression and characterization of recombinant 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Coleus forskohlii* Briq. *Plant Science*, 169(2), 287-294. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.07.017>.

Erenler, R., Demirtas, I., Karan, T., Gul, F., Kayir, O., & Karakoc, O. C. (2018). Chemical constituents, quantitative analysis and insecticidal activities of plant extract and essential oil from *Origanum onites* L. *Trends in Phytochemical Research*, 2(2), 91-96.

- Estevez, J. M., Cantero, A., Reindl, A., Reichler, S., & León, P. (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22901-22909. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100854200>.
- Fahn, A. (1988). Secretory tissues in vascular plants. *New Phytologist*, 108(3), 229-257. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1988.tb04159.x>.
- Fakir, H., Korkmaz, M., & Icel, B. (2016). Medicinal plants traditionally used for pain alleviation in Antalya province, Turkey. *Studies on Ethno-Medicine*, 10(3), 314-324. <https://doi.org/10.1080/09735070.2016.11905503>.
- Fan, H., Wu, Q., Wang, X., Wu, L., Cai, Y., & Lin, Y. (2016). Molecular cloning and expression of 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate synthase and 1-deoxy-d-xylulose-5-phosphate reductoisomerase in *Dendrobium officinale*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125, 381-385. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0945-1>.
- Figueredo, G., Cabassu, P., Chalchat, J. C., & Pasquier, B. (2006). Studies of Mediterranean *Oregano* populations. VII: chemical composition of essential oils of carvacrol-rich oregano of various origins. *Journal of Essential Oil Research*, 18(3), 244-249. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699077>.
- Gambliel, H., & Croteau, R. (1984). Pinene cyclases I and II. Two enzymes from sage (*Salvia officinalis*) which catalyze stereospecific cyclizations of geranyl pyrophosphate to monoterpene olefins of opposite configuration. *Journal of Biological Chemistry*, 259(2), 740-748.
- Gao, F., Liu, B., Li, M., Gao, X., Fang, Q., Liu, C., & Gao, X. (2018). Identification and characterization of terpene synthase genes accounting for volatile terpene emissions in flowers of *Freesia x hybrida*. *Journal of Experimental Botany*, 69(18), 4249-4265. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery224>.
- Gershenzon, J., & Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 408-414.
- Gershenzon, J., & Kreis, W. (1999). Biochemistry of terpenoids: monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes, sterols, cardiac glycosides and steroid saponins. *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, 2, 222-299.
- Gershenzon, J., Maffei, M., & Croteau, R. (1989). Biochemical and histochemical localization of monoterpene biosynthesis in the glandular trichomes of spearmint (*Mentha spicata*). *Plant Physiology*, 89(4), 1351-1357. <https://doi.org/10.1104/pp.89.4.1351>.
- Ghobadi, S., Marouf, I. A., & Majd, M. (2016). Differential expression of the key genes involved in the biosynthesis of monoterpenes in different tissues and in response to abiotic elicitors in Summer savory (*Satureja hortensis*). *Cell and Tissue Journal*, 7(3), 275-291. <https://doi.org/10.52547/JCT.7.3.275>.

- Gobert, V., Moja, S., Colson, M., & Taberlet, P. (2002). Hybridization in the section *Mentha* (Lamiaceae) inferred from AFLP markers. *American Journal of Botany*, 89(12), 2017-2023. <https://doi.org/10.3732/ajb.89.12.2017>.
- Gong, Y., Liao, Z., Chen, M., Zuo, K., Guo, L., Tan, Q., Huang, Z., Kai, G., Sun, X., Tan, F., & Tang, K. (2005). Molecular cloning and characterization of a 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene from *Ginkgo biloba*. *DNA Sequence*, 16(2), 111-120. <https://doi.org/10.1080/10425170500058869>.
- Grolle, S., Bringer-Meyer, S., & Sahm, H. (2000). Isolation of the dxr gene of *Zymomonas mobilis* and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase. *FEMS Microbiology Letters*, 191(1), 131-137. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09329.x>.
- Gupta, P., Agarwal, A. V., Akhtar, N., Sangwan, R. S., Singh, S. P., & Trivedi, P. K. (2013). Cloning and characterization of 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway genes for isoprenoid biosynthesis from Indian ginseng, *Withania somnifera*. *Protoplasma*, 250, 285-295. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0410-x>.
- Güner, A., Aslan, S., Ekim, T., Vural, M., & Babaç, M. T. (2012). *Türkiye Bitkileri Listesi Damarlı Bitkiler*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmalı Derneği Yayınları.
- Han, S. E., Park, S. R., Kwon, H. B., Yi, B. Y., Lee, G. B., & Byun, M. O. (2005). Genetic engineering of drought-resistant tobacco plants by introducing the trehalose phosphorylase (TP) gene from *Pleurotus sajor-caju*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 151-158. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-8124-1>.
- Hasunuma, T., Takeno, S., Hayashi, S., Sendai, M., Bamba, T., Yoshimura, S., & Miyake, C. (2008). Overexpression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase gene in chloroplast contributes to increment of isoprenoid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(5), 518-526. <https://doi.org/10.1263/jbb.105.518>.
- Haudenschild, C., Schalk, M., Karp, F., & Croteau, R. (2000). Functional expression of regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from mint (*Mentha* spp.) in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 379(1), 127-136. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1864>.
- Holopainen, J. K. (2004). Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science*, 9(11), 529-533.
- Hsieh, M. H., & Goodman, H. M. (2006). Functional evidence for the involvement of *Arabidopsis* *IspF* homolog in the nonmevalonate pathway of plastid isoprenoid biosynthesis. *Planta*, 223, 779-784. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0140-9>.

- Hsu, C. Y., Huang, P. L., Chen, C. M., Mao, C. T., & Chaw, S. M. (2012). Tangy scent in *Toona sinensis* (Meliaceae) leaflets: isolation, functional characterization, and regulation of *TsTPS1* and *TsTPS2*, two key terpene synthase genes in the biosynthesis of the scent compound. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 13(15), 2721-2732. <https://doi.org/10.2174/138920112804724864>.
- Ietswaart, J. H. (1980). A taxonomic revision of the genus *Origanum* (Labiatae). *Leiden Botanical Series*, 4(1), 1-153.
- Iijima, Y., Davidovich-Rikanati, R., Fridman, E., Gang, D. R., Bar, E., Lewinsohn, E., & Pichersky, E. (2004a). The biochemical and molecular basis for the divergent patterns in the biosynthesis of terpenes and phenylpropenes in the peltate glands of three cultivars of basil. *Plant Physiology*, 136(3), 3724-3736. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051318>.
- Iijima, Y., Gang, D. R., Fridman, E., Lewinsohn, E., & Pichersky, E. (2004b). Characterization of geraniol synthase from the peltate glands of sweet basil. *Plant Physiology*, 134(1), 370-379. <https://doi.org/10.1104/pp.103.032946>.
- İnce, A. G., Karaca, M., & Elmasulu, S. Y. (2014). New microsatellite and CAPS-microsatellite markers for clarifying taxonomic and phylogenetic relationships within *Origanum* L. *Molecular Breeding*, 34, 643-654. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0064-9>.
- Jedrzejczyk, I. (2018). Study on genetic diversity between *Origanum* L. species based on genome size and ISSR markers. *Industrial Crops and Products*, 126, 201-207. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.10.010>.
- Jia, Y., Xia, D., & Louzada, E. S. (2005). Molecular cloning and expression analysis of a putative terpene synthase gene from Citrus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 130(3), 454-458. <https://doi.org/10.21273/JASHS.130.3.454>.
- Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., & Beck, E. (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science*, 285(5433), 1573-1576. <https://doi.org/10.1126/science.285.5433.1573>.
- Kampranis, S. C., Ioannidis, D., Purvis, A., Mahrez, W., Ninga, E., Katerelos, N. A., & Johnson, C. B. (2007). Rational conversion of substrate and product specificity in a *Salvia* monoterpene synthase: structural insights into the evolution of terpene synthase function. *The Plant Cell*, 19(6), 1994-2005. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047779>.
- Karaoğlu, E. S., Özgen, U., Calis, I., & Kazaz, C. (2020). Isolation of major compounds of *Origanum micranthum* and *Origanum minutiflorum*. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(2), 135-143.

- Katsiotis, A., Nikoloudakis, N., Linos, A., Drossou, A., & Constantinidis, T. (2009). Phylogenetic relationships in *Origanum* spp. based on rDNA sequences and intra-genetic variation of Greek *O. vulgare* subsp. *hirtum* revealed by RAPD. *Scientia Horticulturae*, 121(1), 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2009.01.015>.
- Kerem, S. (2021). *Türkiye'de Yetişen Farklı Kekik Türlerinin Antimikrobiyal Aktivitelerinin ve Moleküler Genotiplerinin Belirlenmesi*. (Yüksek Lisans Tezi, Hitit Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü)
- Kılıçgün, H., Korkmaz, M., & Kılıçgün, H. (2014). Hepatoprotective and antidiabetic activity of *Origanum minutiflorum* grown wild in Turkey. *Bothalia Journal*, 44(3), 260-267.
- Kırimer, N., Başer, K. H. C., & Tümen, G. (1995). Carvacrol-rich plants in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, 31(1), 37-41.
- Kim, S. M., Kuzuyama, T., Chang, Y. J., Song, K. S., & Kim, S. U. (2006). Identification of class 2 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase genes from *Ginkgo biloba* and their transcription in embryo culture with respect to ginkgolide biosynthesis. *Planta Medica*, 72(03), 234-240. <https://doi.org/10.1055/s-2005-916180>.
- Kim, Y. J., Ham, A. R., Shim, J. S., Lee, J. H., Jung, D. Y., In, J. G., & Yang, D. C. (2008). Isolation and characterization of terpene synthase gene from *Panax ginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 32(2), 114-119.
- Kokkini, S., & Vokou, D. (1993). The hybrid *Origanum* × *intercedens* from the island of Nisyros (SE Greece) and its parental taxa; comparative study of essential oils and distribution. *Biochemical Systematics and Ecology*, 21(3), 397-403. [https://doi.org/10.1016/0305-1978\(93\)90031-L](https://doi.org/10.1016/0305-1978(93)90031-L).
- Kostic, M., Ivanov, M., Markovic, T., Sanković Babić, S., Barros, L., Calhelha, R., & Ciric, A. (2022). An in vitro study of the *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & PH Davis and *Coriandrum sativum* L. essential oils as chronic tonsillitis therapeutics: antibacterial, antibiofilm, antioxidant, and cytotoxic activities. *Journal of Essential Oil Research*, 34(6), 533-543. <https://doi.org/10.1080/10412905.2022.2107103>.
- Koutsoumanis, K., Tassou, C. C., Taoukis, P. S., & Nychas, G. J. E. (1998). Modelling the effectiveness of a natural antimicrobial on *Salmonella enteritidis* as a function of concentration, temperature and pH, using conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 981-987. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00433.x>.
- Kuzuyama, T., Takahashi, S., Takagi, M., & Seto, H. (2000). Characterization of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, an enzyme involved in isopentenyl diphosphate biosynthesis, and identification of its catalytic amino

- acid residues. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19928-19932. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001820200>.
- Kwon, H. B., Yeo, E. T., Hahn, S. E., Bae, S. C., Kim, D. Y., & Byun, M. O. (2003). Cloning and characterization of genes encoding trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) and trehalose-6-phosphate phosphatase (TPS2) from *Zygosaccharomyces rouxii*. *FEMS Yeast Research*, 3(4), 433-440. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00035-7](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00035-7).
- Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of Molecular Biology*, 157(1), 105-132. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(82\)90515-0](https://doi.org/10.1016/0022-2836(82)90515-0).
- Landmann, C., Fink, B., Festner, M., Dregus, M., Engel, K. H., & Schwab, W. (2007). Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 465(2), 417-429. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.06.011>.
- Lange, B. M., & Croteau, R. (1999). Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway in plants: cloning and heterologous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 365(1), 170-174. <https://doi.org/10.1006/abbi.1999.1168>.
- Li, R., & Fan, Y. (2011). Molecular cloning and expression analysis of a terpene synthase gene, *HcTPS2*, in *Hedychium coronarium*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 35-42. <https://doi.org/10.1007/s11105-010-0205-1>.
- Lima, A. S., Schimmel, J., Lukas, B., Novak, J., Barroso, J. G., Figueiredo, A. C., & Trindade, H. (2013). Genomic characterization, molecular cloning and expression analysis of two terpene synthases from *Thymus caespititius* (Lamiaceae). *Planta*, 238, 191-204. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1884-2>.
- Lin, Y. L., Lee, Y. R., Huang, W. K., Chang, S. T., & Chu, F. H. (2014). Characterization of S-(+)-linalool synthase from several provenances of *Cinnamomum osmophloeum*. *Tree Genetics & Genomes*, 10, 75-86. <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0665-1>.
- Liu, J., Xu, Y., Liang, L., & Wei, J. (2015). Molecular cloning, characterization and expression analysis of the gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. *Journal of Genetics*, 94, 239-249.
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., & Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112(1), 77-83. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.060>.

- Lukas, B., Schmiderer, C., Mitteregger, U., & Novak, J. (2010). Arbutin in marjoram and oregano. *Food Chemistry*, 121(1), 185-190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.028>.
- Lukas, B., & Novak, J. (2013a). The complete chloroplast genome of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). *Gene*, 528(2), 163-169. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.07.026>.
- Lukas, B., Samuel, R., Mader, E., Başer, K. H. C., Duman, H., & Novak, J. (2013b). Complex evolutionary relationships in *Origanum* section *Majorana* (Lamiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(4), 667-686. <https://doi.org/10.1111/boj.12022>.
- Mahmoud, S. S., & Croteau, R. B. (2001). Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(15), 8915-8920.
- Mahmoud, S. S., & Croteau, R. B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7(8), 366-373. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02303-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02303-8).
- Majdi, M., Malekzadeh-Mashhady, A., Maroufi, A., & Crocoll, C. (2017). Tissue-specific gene-expression patterns of genes associated with thymol/carvacrol biosynthesis in thyme (*Thymus vulgaris* L.) and their differential changes upon treatment with abiotic elicitors. *Plant Physiology and Biochemistry*, 115, 152-162. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.016>.
- Marchese, A., Orhan, I. E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S. F., & Nabavi, S. M. (2016). Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chemistry*, 210, 402-414. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>.
- Mashhady Malekzadeh, A., Majdi, M., & Maroufi, A. (2017). Expression analysis of biosynthetic genes of thymol and carvacrol in different tissues of thyme (*Thymus vulgaris*). *Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetic Research*, 25(1), 160-171. <https://doi.org/10.22092/IJRFPBGR.2017.109829>.
- Mechergui, K., Jaouadi, W., Bekele, W. A., Khouja, M. L., & Friedt, W. (2017). Genetic structure and differentiation among oregano [*Origanum vulgare* subsp. *glandulosum* (Desf.) Ietswaart] provenances from North Africa: bioinformatic approaches cause systematic bias. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 64, 717-732. <https://doi.org/10.1007/s10722-016-0395-y>.
- Mendes, M. D., Barroso, J. G., Oliveira, M. M., & Trindade, H. (2014). Identification and characterization of a second isogene encoding  $\gamma$ -terpinene synthase in *Thymus caespitius*. *Journal of Plant Physiology*, 171(12), 1017-1027. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.04.001>.

- Miller, B., Heuser, T., & Zimmer, W. (2000). Functional involvement of a deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene harboring locus of *Synechococcus leopoliensis* in isoprenoid biosynthesis. *FEBS Letters*, 481(3), 221-226. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)02014-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)02014-7).
- Nawade, B., Yahyaa, M., Reuveny, H., Shaltiel-Harpaz, L., Eisenbach, O., Faigenboim, A., & Ibdah, M. (2019). Profiling of volatile terpenes from almond (*Prunus dulcis*) young fruits and characterization of seven terpene synthase genes. *Plant Science*, 287, 110187. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110187>.
- Odom, A. R., & Van Voorhis, W. C. (2010). Functional genetic analysis of the *Plasmodium falciparum* deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 170(2), 108-111. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.12.001>.
- Oflaz, S. (2001). *Ticari Origanum Türlerinin Farmakognozik Araştırmaları*. (Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
- Oke, F., & Aslim, B. (2010). Biological potentials and cytotoxicity of various extracts from endemic *Origanum minutiflorum* O. Schwarz & PH Davis. *Food And Chemical Toxicology*, 48(6), 1728-1733. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.03.053>.
- Özen, F. (2013). *Origanum minutiflorum as A Potential Therapy for The Eradication of Helicobacter pylori*. (Yüksek Lisans Tezi, Yeditepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü)
- Özgen, A., Erkoç, N. T., Taştan, Ö. F., & Pehlevan, F. (2021). Phylogenetic analysis of *Origanum vulgare* and its antioxidant and antimicrobial activity. *Gazi University Journal of Science*, 34(2), 311-325. <https://doi.org/10.35378/gujs.751660>.
- Papaioannou, C., Zeliou, K., Trigas, P., & Papasotiropoulos, V. (2020). High resolution melting (HRM) genotyping in the genus *Origanum*: molecular identification and discrimination for authentication purposes. *Biochemical Genetics*, 58(5), 725-737. <https://doi.org/10.1007/s10528-020-09970-1>.
- Poyraz, İ., & Sağlam, M. (2017). Partial cloning and identification of terpene synthase-6 gene (TPS-6) in an aromatic plant *Origanum onites* L. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 18(2), 137-142. <https://doi.org/10.23902/trkjnat.291972>.
- Radykewicz, T., Rohdich, F., Wungsintaweekul, J., Herz, S., Kis, K., Eisenreich, W., & Arigoni, D. (2000). Biosynthesis of terpenoids: 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from *Escherichia coli* is a class B dehydrogenase. *FEBS Letters*, 465(2-3), 157-160. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01743-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01743-3).

- Rodriguez-Concepción, M., Ahumada, I., Diez-Juez, E., Sauret-Güeto, S., Lois, L. M., Gallego, F., & Boronat, A. (2001). 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase and plastid isoprenoid biosynthesis during tomato fruit ripening. *The Plant Journal*, 27(3), 213-222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2001.01089.x>.
- Rohmer, M., Seemann, M., Horbach, S., Bringer-Meyer, S., & Sahm, H. (1996). Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 118(11), 2564-2566. <https://doi.org/10.1021/ja9538344>.
- Ruan, J. X., Li, J. X., Fang, X., Wang, L. J., Hu, W. L., Chen, X. Y., & Yang, C. Q. (2016). Isolation and characterization of three new monoterpene synthases from *Artemisia annua*. *Frontiers in Plant Science*, 7, 638. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00638>.
- Sallaud, C., Rontein, D., Onillon, S., Jabes, F., Duffe, P., Giacalone, C., & Tissier, A. (2009). A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. *The Plant Cell*, 21(1), 301-317. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.057885>.
- Sambruck, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, S. T. (1989). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Sapir-Mir, M., Mett, A., Belausov, E., Tal-Meshulam, S., Frydman, A., Gidoni, D., & Eyal, Y. (2008). Peroxisomal localization of Arabidopsis isopentenyl diphosphate isomerases suggests that part of the plant isoprenoid mevalonic acid pathway is compartmentalized to peroxisomes. *Plant Physiology*, 148(3), 1219-1228. <https://doi.org/10.1104/pp.108.127951>.
- Sarı, A. B. (2016). *Gökkuşluğu Alabalıklarında Origanum minutiflorum O.Schwarz ET P.H. davis Bitkisinin Antioksidan ve Nonspesifik İmmün Sistem Üzerine Etkileri*. (Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü)
- Schaller, H., Grausem, B., Benveniste, P., Chye, M. L., Tan, C. T., Song, Y. H., & Chua, N. H. (1995). Expression of the *Hevea brasiliensis* (HBK) Mull. Arg. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase 1 in tobacco results in sterol overproduction. *Plant Physiology*, 109(3), 761-770. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.761>.
- Schnee, C., Köllner, T. G., Gershenzon, J., & Degenhardt, J. (2002). The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)- $\beta$ -farnesene, (E)-nerolidol, and (E, E)-farnesol after herbivore damage. *Plant Physiology*, 130(4), 2049-2060. <https://doi.org/10.1104/pp.008326>.

- Schwender, J., Müller, C., Zeidler, J., & Lichtenthaler, H. K. (1999). Cloning and heterologous expression of a cDNA encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase of *Arabidopsis thaliana* 1. *FEBS Letters*, 455(1-2), 140-144. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00849-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00849-2).
- Seetang-Nun, Y., Sharkey, T. D., & Suvachittanont, W. (2008). Molecular cloning and characterization of two cDNAs encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Hevea brasiliensis*. *Journal of Plant Physiology*, 165(9), 991-1002. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.014>.
- Sevindik, E. (2019). Comparative bioinformatics analysis of some *Vitis* species stilbene synthase proteins. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(2A), 1531-1536.
- Sharifi-Rad, M., Berkay Yılmaz, Y., Antika, G., Salehi, B., Tumer, T. B., Kulandaisamy Venil, C., & Sharifi-Rad, J. (2021). Phytochemical constituents, biological activities, and health-promoting effects of the genus *Origanum*. *Phytotherapy Research*, 35(1), 95-121. <https://doi.org/10.1002/ptr.6785>.
- Shimada, T., Endo, T., Rodríguez, A., Fujii, H., Nakano, M., Sugiyama, A., ... & Omura, M. (2012). Isolation and characterization of germacrene A synthases gene in *Citrus unshiu* Marc. *Scientia Horticulturae*, 145, 102-108. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.08.001>.
- Skandamis, P. N., & Nychas, G. J. E. (2000). Development and evaluation of a model predicting the survival of *Escherichia coli* O157: H7 NCTC 12900 in homemade eggplant salad at various temperatures, pHs, and oregano essential oil concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(4), 1646-1653. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.4.1646-1653.2000>.
- Sokmen, A., Abdel-Baki, A. A. S., Al-Malki, E. S., Al-Quraishy, S., & Abdel-Haleem, H. M. (2020). Constituents of essential oil of *Origanum minutiflorum* and its in vitro antioxidant, scolicidal and anticancer activities. *Journal of King Saud University-Science*, 32(4), 2377-2382. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.03.018>.
- Soliman, A. M., Desouky, S., Marzouk, M., & Sayed, A. A. (2016). *Origanum majorana* attenuates nephrotoxicity of cisplatin anticancer drug through ameliorating oxidative stress. *Nutrients*, 8(5), 264. <https://doi.org/10.3390/nu8050264>.
- Şarer, E., Pançalı, S., & Yıldız, S. (1996). *Origanum minutiflorum* O. Schwarz et PH Davis uçucu yağının bileşimi ve antimikrobiyal aktivitesi. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 25(1), 29- 38.
- Şenol, F. S., Orhan, I. E., Ozgen, U., Renda, G., Bulut, G., Guven, L., & Sekeroglu, N. (2016). Memory-vitalizing effect of twenty-five medicinal and edible plants and their isolated compounds. *South African Journal of Botany*, 102, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.07.011>.

- Takahashi, S., Kuzuyama, T., Watanabe, H., & Seto, H. (1998). A 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase catalyzing the formation of 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate in an alternative nonmevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(17), 9879-9884. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.17.9879>.
- Tan, S., Hu, Y., & Lin, Z. (2007). Cloning and functional expression of bornyl synthase from. In *Rosmarinus Officinalis*. (pp. 12-18)
- Taşcıoğlu, T., Sadıkoğlu, N., Doğanlar, S., & Frary, A. (2018). Molecular genetic diversity in the *Origanum* genus: EST-SSR and SRAP marker analyses of the 22 species in eight sections that naturally occur in Turkey. *Industrial Crops and Products*, 123, 746-761. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.027>.
- Thanos, C. A. (1994). Aristotle and Theophrastus on plant-animal interactions. In *Plant-Animal Interactions in Mediterranean-Type Ecosystems*. (pp. 3-11)
- Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.03.014>.
- Toker, R., Gölükcü, M., & Tokgöz, H. (2017). Effects of distillation times on essential oil compositions of *Origanum minutiflorum* O. Schwarz Et. PH Davis. *Journal of Essential Oil Research*, 29(4), 330-335. <https://doi.org/10.1080/10412905.2016.1276026>.
- Tong, Y., Su, P., Zhao, Y., Zhang, M., Wang, X., Liu, Y., & Huang, L. (2015). Molecular cloning and characterization of DXS and DXR genes in the terpenoid biosynthetic pathway of *Tripterygium wilfordii*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25516-25535. <https://doi.org/10.3390/ijms161025516>.
- Tonk, F. A., Yüce, S., Bayram, E., Akçali Giachino, R. R., Sönmez, Ç., Telci, I., & Furan, M. A. (2010). Chemical and genetic variability of selected Turkish oregano (*Origanum onites* L.) clones. *Plant Systematics and Evolution*, 288, 157-165. <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0320-3>.
- Tsigarida, E., Skandamis, P., & Nychas, G. J. (2000). Behaviour of *Listeria monocytogenes* and autochthonous flora on meat stored under aerobic, vacuum and modified atmosphere packaging conditions with or without the presence of oregano essential oil at 5°C. *Journal of Applied Microbiology*, 89(6), 901-909. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01170.x>.
- Turner, G., Gershenzon, J., Nielson, E. E., Froehlich, J. E., & Croteau, R. (1999). Limonene synthase, the enzyme responsible for monoterpene biosynthesis in peppermint, is localized to leucoplasts of oil gland secretory cells. *Plant Physiology*, 120(3), 879-886. <https://doi.org/10.1104/pp.120.3.879>.

- TÜİK (2022). Türkiye İstatistik Kurumu. <https://data.tuik.gov.tr/Kategori/GetKategori?p=tarim-111&dil=1>. (Son erişim tarihi: 11 Temmuz 2023)
- Van Looy, K., Jacquemyn, H., Breyne, P., & Honnay, O. (2009). Effects of flood events on the genetic structure of riparian populations of the grassland plant *Origanum vulgare*. *Biological Conservation*, 142(4), 870-878. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.12.006>.
- Vardar-Ünlü, G., Ünlü, M., Dönmez, E., & Vural, N. (2007). Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oil of *Origanum minutiflorum* O Schwarz & PH Davis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87(2), 255-259. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2708>.
- Veau, B., Courtois, M., Oudin, A., Chénieux, J. C., Rideau, M., & Clastre, M. (2000). Cloning and expression of cDNAs encoding two enzymes of the MEP pathway in *Catharanthus roseus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1517(1), 159-163. [https://doi.org/10.1016/S0167-4781\(00\)00240-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4781(00)00240-2).
- Veljovic, K., Tesevic, V., Mitrovic, H., & Stankovic, M. (2023). Essential oil of *Origanum minutiflorum* exhibits anti-inflammatory and antioxidative effects in human bronchial cells and antimicrobial activity on lung pathogens. *Journal of Herbal Medicine*, 39, 100651. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2023.100651>.
- Vezzaro, A., Krause, S. T., Nonis, A., Ramina, A., Degenhardt, J., & Ruperti, B. (2012). Isolation and characterization of terpene synthases potentially involved in flavor development of ripening olive (*Olea europaea*) fruits. *Journal of Plant Physiology*, 169(9), 908-914. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.01.021>.
- Vickers, N. J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. *Current Biology*, 27(14), 713-715.
- Wang, P. Y., Ni, R., Zhu, T. T., Sun, C. J., Lou, H. X., Zhang, X., & Cheng, A. X. (2020). Isolation and functional characterization of four microbial type terpene synthases from ferns. *Plant Physiology and Biochemistry*, 155, 716-724. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.08.037>.
- Wise, M. L., Savage, T. J., Katahira, E., & Croteau, R. (1998). Monoterpene synthases from common sage (*Salvia officinalis*)\*: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (+)-sabinene synthase, 1, 8-cineole synthase, and (+)-bornyl diphosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 273(24), 14891-14899. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.14891>.
- Wise, M. L., & Rodney, C. (1999). *Comprehensive Natural Products Chemistry: Isoprenoids Including Carotenoids and Steroids*. Elsevier.
- Wu, S. J., Shi, M., & Wu, J. Y. (2009). Cloning and characterization of the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase gene for diterpenoid tanshinone

- biosynthesis in *Salvia miltiorrhiza* (Chinese sage) hairy roots. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 52(1), 89-95. <https://doi.org/10.1042/BA20080004>.
- Xie, D. J., Ye, Y. J., Yang, D. M., Zhang, Y. X., He, T. Y., Chen, L. G., & Zheng, Y. S. (2020). Cloning and analysis of the DXR gene and its promoter in *Morinda officinalis*. *Acta Pharmaceutica Sinica*, (12), 335-344. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2019-0707>.
- Xu, R., Wu, J., Zhang, Y., Jiang, L., Yao, J., Zha, L., & Xie, J. (2023). Isolation, characterisation, and expression profiling of DXS and DXR genes in *Atractylodes lancea*. *Genome*, 66(6), 150-164. <https://doi.org/10.1139/gen-2022-0084>.
- Xu, C., Wei, H., Movahedi, A., Sun, W., Ma, X., Li, D., ... & Zhuge, Q. (2019). Evaluation, characterization, expression profiling, and functional analysis of DXS and DXR genes of *Populus trichocarpa*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 142, 94-105. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2019-0707>.
- Yahyaa, M., Matsuba, Y., Brandt, W., Doron-Faigenboim, A., Bar, E., McClain, A., & Ibdah, M. (2015). Identification, functional characterization, and evolution of terpene synthases from a basal dicot. *Plant Physiology*, 169(3), 1683-1697. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00930>.
- Yan, X., Zhang, L., Wang, J., Liao, P., Zhang, Y., Zhang, R., & Kai, G. (2009). Molecular characterization and expression of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene from *Salvia miltiorrhiza*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31, 1015-1022. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0320-5>.
- Yang, J., Adhikari, M. N., Liu, H., Xu, H., He, G., Zhan, R., & Chen, W. (2012). Characterization and functional analysis of the genes encoding 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase and 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, the two enzymes in the MEP pathway, from *Amomum villosum* Lour. *Molecular Biology Reports*, 39, 8287-8296. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-1676-y>.
- Yang, C. Q., Wu, X. M., Ruan, J. X., Hu, W. L., Mao, Y. B., Chen, X. Y., & Wang, L. J. (2013). Isolation and characterization of terpene synthases in cotton (*Gossypium hirsutum*). *Phytochemistry*, 96, 46-56. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.09.009>.
- Yao, H., Gong, Y., Zuo, K., Ling, H., Qiu, C., Zhang, F., & Tang, K. (2008). Molecular cloning, expression profiling and functional analysis of a DXR gene encoding 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Camptotheca acuminata*. *Journal of Plant Physiology*, 165(2), 203-213. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.12.001>.
- Zhang, Y., Yan, H., Li, Y., Xiong, Y., Niu, M., Zhang, X., & Ma, G. (2021). Molecular cloning and functional analysis of 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase from *Santalum album*. *Genes*, 12(5), 626. <https://doi.org/10.3390/genes12050626>

Zhu, B. Y., Zhou, M. E., Kay, C. M., & Hodges, R. S. (1993). Packing and hydrophobicity effects on protein folding and stability: Effects of  $\beta$ -branched amino acids, valine and isoleucine, on the formation and stability of two-stranded  $\alpha$ -helical coiled coils/leucine zippers. *Protein Science*, 2(3), 383-394. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020310>.

Zoelfakar, M., Ahmed, S., El-Demerdash, E. S. S., & Ibrahim, S. D. (2020). Molecular identification and phylogenetic relationships of *Origanum syriacum* L. and *Origanum vulgare* L. using chloroplast *rbcL* and *matK* barcodes genes. *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 49(2), 191-211.



## ÖZGEÇMİŞ







