



**TIBBİ ADAÇAYI (*Salvia officinalis* L.) BİTKİSİNDE
NİTRİK OKSİT UYGULAMALARININ FENOLİK BİLEŞİKLERİN
BİYOSENTEZ YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hakan YALÇIN

Danışman

Doç. Dr. Hakan TERZİ

İkinci Danışman

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Mayıs 2024

Bu tez çalışması 22.FEN.BİL.08 numaralı proje ile Afyon Kocatepe Üniversitesi
Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ ADAÇAYI (*Salvia officinalis* L.) BİTKİSİNDE
NİTRİK OKSİT UYGULAMALARININ FENOLİK BİLEŞİKLERİN
BİYOSENTEZ YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Hakan YALÇIN

Danışman

Doç. Dr. Hakan TERZİ

İkinci Danışman

Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

Mayıs 2024

TEZ ONAY SAYFASI

Hakan YALÇIN tarafından hazırlanan “**Tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisinde nitrik oksit uygulamalarının fenolik bileşiklerin biyosentez yolları üzerine etkisi**” adlı tez çalışması lisansüstü eğitim ve öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca 24/05/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından **oy birliği** ile Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı**’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Hakan TERZİ

İkinci Danışman : Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Başkan : Prof. Dr. Gökhan ZENGİN
Selçuk Üniversitesi
Fen Fakültesi

Üye : Doç. Dr. Hakan TERZİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Tuğba DEDEBAŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Bolvadin Meslek Yüksekokulu

Afyon Kocatepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun
...../...../..... tarih ve

..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YALÇIN

Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

24 / 05 / 2024

Hakan YALÇIN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TIBBİ ADAÇAYI (*Salvia officinalis* L.) BİTKİSİNDE NİTRİK OKSİT UYGULAMALARININ FENOLİK BİLEŞİKLERİN BİYOSENTEZ YOLAKLARI ÜZERİNE ETKİSİ

Hakan YALÇIN

Afyon Kocatepe Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Hakan TERZİ

İkinci Danışman: Prof. Dr. Mustafa YILDIZ

Nitrik oksit (NO), bitkilerde büyüme, gelişme ve stres tepkileri dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçlerde rol oynayan önemli bir sinyal molekülüdür. Son yıllarda, bitkilerde, özellikle de *Salvia officinalis* gibi tıbbi bitkilerde, fenolik maddelerin birikimini ve antioksidan kapasiteyi artırmada NO'nun rolünün anlaşılmasına yönelik ilgi artmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, *S. officinalis* yapraklarında dışsal NO uygulamalarının fenolik ve flavanoid içeriği, antioksidan kapasite ve fenolik asit kompozisyonunun yanı sıra fenolik bileşiklerin sentezinde rol oynayan bazı önemli genlerin ifadesi üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. *S. officinalis* fidelerinin yapraklarına 0, 100 ve 1000 µM NO donörü dietilentriamin NONOat püskürtülmüştür. Son uygulamadan 24 saat sonra yaprak örnekleri analizler için hasat edilmiştir. Dışsal NO uygulaması, toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin artmasına neden olmuştur. Ekstraktların antioksidan kapasiteleri tamamlayıcı yöntemlerle [toplam antioksidan kapasite (TAK), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) antiradikal kapasite, bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) ve demir iyonu indirgeyici antioksidan potansiyel (FRAP)] test edilmiş ve NO uygulaması antioksidan aktiviteyi önemli ölçüde artırmıştır. HPLC analizi, ekstraktlarda ana bileşik olarak rosmarinik asidin varlığını ortaya çıkarmış ve 100 µM NO uygulaması ferulik ve rozmarinik asit içeriğini artırmıştır. Dışsal NO uygulaması hem fenilpropanoid hem de tirozin türevli yollarla

yer alan anahtar genlerin (*PAL*, *C4H*, *4CL*, *TAT*, *HPPR* ve *RAS*) ifade seviyelerinde değişikliğe neden olmuştur. Bulgularımız, NO uygulamasından sonra *S. officinalis*'in yaprak dokularında *PAL*, *TAT* ve *RAS* ifade seviyelerindeki artışın fenolik asit içeriği ve antioksidan kapasite ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

2024, xi + 61 sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan kapasite, Fenolik bileşikler, Gen ifadesi, Nitrik oksit, *Salvia officinalis*.



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

EFFECTS OF NITRIC OXIDE APPLICATIONS ON BIOSYNTHESIS PATHWAY OF PHENOLIC COMPOUNDS IN COMMON SAGE (*Salvia officinalis* L.) PLANT

Haktan YALÇIN

Afyon Kocatepe University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Hakan TERZİ

Co-Supervisor: Prof. Mustafa YILDIZ

Nitric oxide (NO) is a key signaling molecule involved in various physiological processes in plants, including growth, development, and stress responses. In recent years, there has been growing interest in understanding the role of NO in enhancing the accumulation of phenolic substances and antioxidant capacity in plants, particularly in medicinal herbs such as *Salvia officinalis*. Therefore, in this study, the effect of exogenous NO applications on phenolic and flavonoid content, antioxidant capacity and phenolic acid composition, as well as the expression of some important genes involved in the synthesis of phenolic compounds in *S. officinalis* leaves was evaluated. *S. officinalis* leaves were foliar sprayed with 0, 100, and 1000 μ M NO donor diethylenetriamine NONOate. The leaf samples were harvested after 24 hours of the last treatment for analyses. Exogenous NO treatment resulted in an increase of total phenolic and flavonoid content. The antioxidant capacities of extracts was tested through complementary methods (total antioxidant capacity (TAC), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) antiradical capacity, cupric ion reducing antioxidant capacity (CUPRAC) and ferric ion reducing antioxidant potential (FRAP)], and the application of NO considerably enhanced the antioxidant activity. HPLC analysis revealed the presence of rosmarinic acid as the main compound in the extracts, and 100 mM NO application increased the content of ferulic and rosmarinic acids. The expression levels of the key genes (*PAL*, *C4H*, *4CL*, *TAT*, *HPPR*, and *RAS*) involved in the both

phenylpropanoid and tyrosine-derived pathways were affected by exogenous NO application. Our findings show that the increase in *PAL*, *TAT* and *RAS* expression levels in leaf tissues of *S. officinalis* after NO application is associated with phenolic acid content and antioxidant capacity.

2024, xi + 61 pages

Key words: Antioxidant capacity, Gene expression, Nitric oxide, Phenolic compounds, *Salvia officinalis*.



TEŞEKKÜR

Bu araştırmanın konusunun belirlenmesi, deneysel çalışmaların yönlendirilmesi, sonuçların değerlendirilmesi ve yazımı aşamasında yapmış olduğu büyük katkılarından dolayı tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Hakan TERZİ'ye ve ikinci danışmanım Sayın Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Bu çalışmayı 22.FEN.BİL.08 nolu proje ile destekleyen Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne katkılarından dolayı en içten dileklerle teşekkür ederim.

Tez çalışmaları sırasında yardımlarını esirgemeyen doktorant Sayın Emre PEHLİVAN'a, Arş. Grv. Saliha AYDIN'a ve yüksek lisans öğrencileri Sayın Tuğçe DEMİRCİ, Nurgül SÖNMEZ, Can KOCADAĞ ve Mehmet TÜRKMEN'e teşekkür ederim.

Bu araştırma boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı özellikle sevgili aileme teşekkür ederim.

Hakan YALÇIN
Afyonkarahisar 2024

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR BİLGİLERİ	3
2.1 Tıbbi Adaçayının Sistematığı ve Morfolojisi	3
2.2 Nitrik Oksit	3
2.2.1 Nitrik Oksit Biyosentezi.....	4
2.2.2 Nitrik Oksitin Büyüme ve Gelişme Üzerine Etkisi	6
2.3 Sekonder Metabolitler.....	7
2.3.1 Fenolik Bileşikler	8
2.4 Tıbbi Adaçayının Kimyasal Bileşenleri ve Farmakolojik Özellikleri	11
2.6 Bitkilerde Elisitör Teşvikli Sekonder Metabolit Üretimi	18
3. MATERYAL ve METOT	22
3.1 Bitki Materyali ve Bitki Yetiştirme Koşulları	22
3.2 Bitki Dokularından Metanol Ekstraktlarının Hazırlanması	22
3.3 Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi	23
3.4 Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi	23
3.5 Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi	23
3.5.1 Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi	23
3.5.2 DPPH Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi.....	24
3.5.3 Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Potansiyeli (FRAP) Testi.....	24
3.5.4 Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Testi	25
3.6 Fenolik Bileşiklerin HPLC Analizleri	25
3.7 Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri.....	26
3.8 İstatistiki Analizler.....	27
4. BULGULAR	28
4.1 Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde İçeriği Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi	28

4.2 Toplam Antioksidan Kapasite Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi	29
4.3 Demir ve Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi	29
4.4 Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi.....	30
4.5 Fenolik Asit Kompozisyonu Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi.....	31
4.6 Fenolik Asit Bileşiklerinin Biyosentezinde Yer Alan Genlerin İfadesi Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi	31
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	33
6. KAYNAKLAR.....	37



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

$\cdot\text{OH}$	Hidroksil Radikali
μL	Mikrolitre
μg	Mikrogram
μM	Mikromolar
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
mM	Milimolar
ng	Nanogram

Kısaltmalar

4CL	4-kumarat-CoA ligaz
AA	Askorbik asit
AAE	Askorbik asit eşdeğeri
C4H	Sinnamik asit 4-hidroksilaz
CUPRAC	Bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
FRAP	Demir iyonu indirgeyici antioksidan potansiyel
GA	Gallik asit
GAE	Gallik asit eşdeğeri
HPPR	4-hidroksifenilpiruvat redüktaz
NO	Nitrik oksit
PAL	Fenilalanin amonyum liyaz
KE	Kersetin eşdeğeri
RAS	Rozmarinik asit sentaz
ROT	Reaktif oksijen türleri
TAK	Toplam antioksidan kapasite
TAT	Tirozin amino transferaz
TR	Troloks
TRE	Troloks eşdeğeri

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Bitkilerde NO oluşumunun indirgeyici ve oksidatif yolları.	5
Şekil 2.2 NO'nun üretildiği reaksiyonlar ve yerleri ve NO'nun bir sinyal molekülü olarak olası dahil olduğu ana reaksiyonların şematik diyagramı	6
Şekil 2.3 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.	9
Şekil 2.4 <i>Salvia officinalis</i> 'in ana fenolik bileşenlerinden bazılarının kimyasal yapıları.	14
Şekil 2.5 Sekonder metabolitlerin biyosentezi ve sınıflandırılmasına şematik genel bakış.....	15
Şekil 2.6 Fenolik asit biyosentez yolu.....	16
Şekil 2.7 Elisitörlerin sınıflandırılması	18
Şekil 2.8 Elisitörlerin genel mekanizma etkisinin şematik gösterimi.	20
Şekil 3.1 HPLC analizleri ile elde edilen standart kromatogramı.	26
Şekil 4.1 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri	28
Şekil 4.2 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında toplam antioksidan kapasite.....	29
Şekil 4.3 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında toplam demir indirgeyici antioksidan potansiyeli (FRAP) ve bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC)	30
Şekil 4.4 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında DPPH radikali indirgeme potansiyeli	30

Şekil 4.5 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında fenolik asit biyosentez yollarındaki genlerin ifade seviyeleri üzerine etkileri 32



ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1 Tıbbi adaçayının (<i>Salvia officinalis</i> L.) sistematığı	3
Çizelge 3.1 Kullanılan Shimadzu marka HPLC cihazı ile ilgili özellikler	25
Çizelge 3.2 Gen ekspresyonu analizlerinde kullanılan primer listesi	27
Çizelge 4.1 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında fenolik asit kompozisyonu.....	31



1. GİRİŞ

Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) önemli bir tıbbi ve aromatik bitkidir. Güney Avrupa ve Akdeniz bölgelerine özgü bir bitki olan *S. officinalis* yapraklarından elde edilen uçucu yağı için dünya çapında yetiştirilmektedir (Craft vd. 2017). Yaprak ve çiçekleri ilaç ve parfümeri endüstrilerinde hammadde olarak kullanılmaktadır (Rahmani Samani vd. 2021). Ayrıca adaçayı yaprakları ve çiçeklerinden elde edilen uçucu yağ, geniş spektrumlu farmakolojik aktiviteler sergiler ve potansiyel doğal ürünler olarak gıdaların korunmasında kullanılmaktadır (El Euch vd. 2019). Adaçayının anti-kanser, anti-inflamatuar, antikoagülan, antioksidan, antimikrobiyal, analjezik, hipoglisemik, hipolipidemik ve anti-mutajenik etkiler dahil olmak üzere çok çeşitli terapötik aktivitelere sahip olduğu bilinmektedir (Ghorbani ve Esmaeilzadeh 2017). *Salvia* türlerinin en önemli biyoaktif bileşikler terpenler ve fenolik bileşiklerdir (Ghorbani ve Esmaeilzadeh 2017, Xu vd. 2018). Fenolik asitlerin, özellikle de rozmarinik asit (RA)'ın, *Salvia* türlerinin terapötik etkilerinden esas olarak sorumlu olduğu bildirilmiştir (Liu vd. 2006, Dent vd. 2017).

Rozmarinik asidin hepatoprotektif (Wang vd. 2019), antiinflamatuar (Jiang vd. 2018) ve nöroprotektif aktivite (Costa vd. 2013) gibi sağlık üzerine olumlu etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca serbest radikalleri temizleme, pro-oksidan iyonları şelatlama yeteneği, lipid peroksidasyonunu önleme ve biyomakromoleküllere bağlanma özellikleri RA'nın gıda endüstrisindeki uygulamalarda değerli bir antioksidan olduğunu göstermektedir (Ferraro vd. 2015, Li vd. 2021). Bu nedenle RA'ya olan talebin artması, büyük miktarlarda üretimine yönelik farkındalığı da artırmaktadır. Ancak RA'nın bitkilerdeki içeriği nadiren kuru ağırlığın %1'inin üzerine çıkmakta (Petersen 2013) ve bitkinin fizyolojisine, büyüme ve gelişme aşamalarına, hasat öncesi ve sonrası süreçlere, ayrıca coğrafi ve çevresel faktörlere bağlıdır. Rozmarinik asit gibi fenolik asitlerin biyosentezi *Salvia* türlerinde iyi bir şekilde incelenmiştir. RA'nın biyosentezi, fenolik asit biyosentez yolunun bir parçası olarak L-fenilalanin ve L-tirozin amino asitlerini öncül olarak kullanan fenilpropanoid ve tirozin türevli yolları içermektedir (Deng vd. 2020). L-fenilalanin amino asidinin para-kumaroil-koenzim A öncüsüne dönüşümünde yer alan enzimler fenilalanin amonyum-liyaz (PAL; EC 4.3.1.24), sinamik asit 4-

hidroksilaz (C4H; EC 1.14.14.91) ve kumarik asit KoA ligazdır (4CL; EC 6.2.1.12). Tirozin türevli yolakta ise, L-tirozin ilk önce tirozin aminotransferaz (TAT; EC 2.6.1.5) tarafından 4-hidroksifenilpiruvik aside (PHPP) dönüştürülmektedir. Daha sonra hidroksifenilpiruvat redüktaz (HPPR; EC 1.1.1.237) enzimi PHPP'yi 4-hidroksifenillaktik aside (PHPL) dönüştürür. Tirozin ve fenilalanin türevi yolların iki ara ürünü olan 4-hidroksifenillaktik asit ve 4-kumaroil-KoA, rozmarinik asit sentazın (RAS, EC 2.3.1.140) ve sitokrom P450'ye bağımlı monooksijenazın (CYP98A14; EC 1.14.13.36) katalizlediği reaksiyonlar ile RA'ya dönüştürülür (Fu vd. 2020).

Bitkilerde sekonder metabolitlerin *in vitro* biyosentezinin artırılmasında kullanılan yöntemlerde biri de elisitörlerin uygulanmasıdır. Bu metodun etkinliği elisitör tipine, konsantrasyonuna, maruz kalma süresine ve bitkinin fizyolojik yaşına bağlıdır (Açıkgöz 2020). *Salvia* türlerinde fenolik asit içeriğini arttırmak için NO (Pirooz vd. 2022), metil jasmonat (Pesaraklu vd. 2021), maya özütü (Attaran Dowom vd. 2017), ağır metaller (Xing vd. 2015) ve bitki büyüme düzenleyicileri (Liang vd. 2013) gibi çeşitli elisitörler uygulanmıştır. Bununla birlikte, biyosentetik yollardaki anahtar enzimlerin gen ifadelerinin elisitörlerle uyarılması yoluyla bitkilerde fenolik asit üretimini arttırmak için bazı çalışmalar yapılmıştır (Zhang vd. 2013, Park vd. 2016, Narayani ve Srivastava 2017, Gonçalves vd. 2019, Pesaraklu vd. 2021). Çeşitli çalışmalar, NO'nun bitkilerde spesifik gen ifadesini indükleyerek sekonder metabolitlerin üretiminde bir sinyal molekülü olarak önemli bir rol oynadığını göstermiştir. Pirooz vd. (2022), *S. officinalis* yapraklarında NO uygulamasının *PAL*, *TAT* ve *RAS* genlerinin ifadesini ve *PAL* enzim aktivitesini arttırdığının ve bu durumun özellikle RA olmak üzere fenolik bileşiklerin birikimindeki artıştan sorumlu olduğunu bildirmiştir. Bu tez çalışmasında, dışsal NO uygulamalarına (0, 100 ve 1000 µM) maruz bırakılan *S. officinalis* bitkilerinin yaprak dokularında toplam fenolik ve flavonoid içeriği, farklı tamamlayıcı testler (TAK, DPPH, CUPRAC ve FRAP) kullanılarak antioksidan kapasite, fenolik asit kompozisyonlarının ve fenolik asit biyosentezinde fonksiyon gören anahtar enzimleri kodlayan genlerin (*PAL*, *4CL*, *C4H*, *TAT*, *HPPR* ve *RAS*) ifade seviyelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR BİLGİLERİ

2.1 Tıbbi Adaçayının Sistematığı ve Morfolojisi

Tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) türü, Lamiaceae familyasının en önemli *Salvia* taksonunda yer alır. Anavatanı Akdeniz olmakla birlikte dünyada yaygın olarak yetişen *Salvia* cinsi 900'e yakın tür içermektedir (Walker vd. 2004, Jakovljević vd. 2019). *S. officinalis*, 60 cm yüksekliğinde çok yıllık otsu bir bitkidir.

Çizelge 2.1 Tıbbi adaçayının (*Salvia officinalis* L.) sistematığı

Alem	Plantae
Bölüm	Tracheophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Takım	Lamiales
Familya	Lamiaceae
Cins	<i>Salvia</i> L.
Tür	<i>Salvia officinalis</i> L.

Yapraklar basit, uzun ve saplı, kenarları tırtıklı, buruşuk yüzeyli ve bazen bazal loblu olup karşılıklı çapraz olarak dizilmiştir. Yaprığın alt kısmında beyaz tüyler, üst kısmında ise yeşilimsi veya yeşilimsi gri tüyler bulunmaktadır. Gövde dik veya yatay olup koyu yeşil tüylü dallara sahiptir. Çiçekler gövdeden 2 ila 4 mm uzunluğundadır ve sahte bir bileşik salkım oluşturan 5 ila 10 morumsu-mavi çiçeklerle psödovertikilla yıldız şeklinde çiçek açarlar. Habitat ve iklim koşullarına bağlı olarak Mart'tan Temmuz'a kadar çiçek açmaktadırlar (Hedge vd. 1972).

2.2 Nitrik Oksit

Nitrik oksit (NO) bitkilerde ilk kez Klepper tarafından keşfedilmiştir (Klepper 1979). NO, çok işlevli bir molekül olarak tanımlanmıştır (Levine 2012). Nitrojen ve oksijenden oluşan diatomik bir gaz ve endojen bir sinyal molekülü olan NO biyoaktif, potansiyel olarak toksik, nispeten kararsız, renksiz, küçük, lipofilik bir serbest radikal gazdır

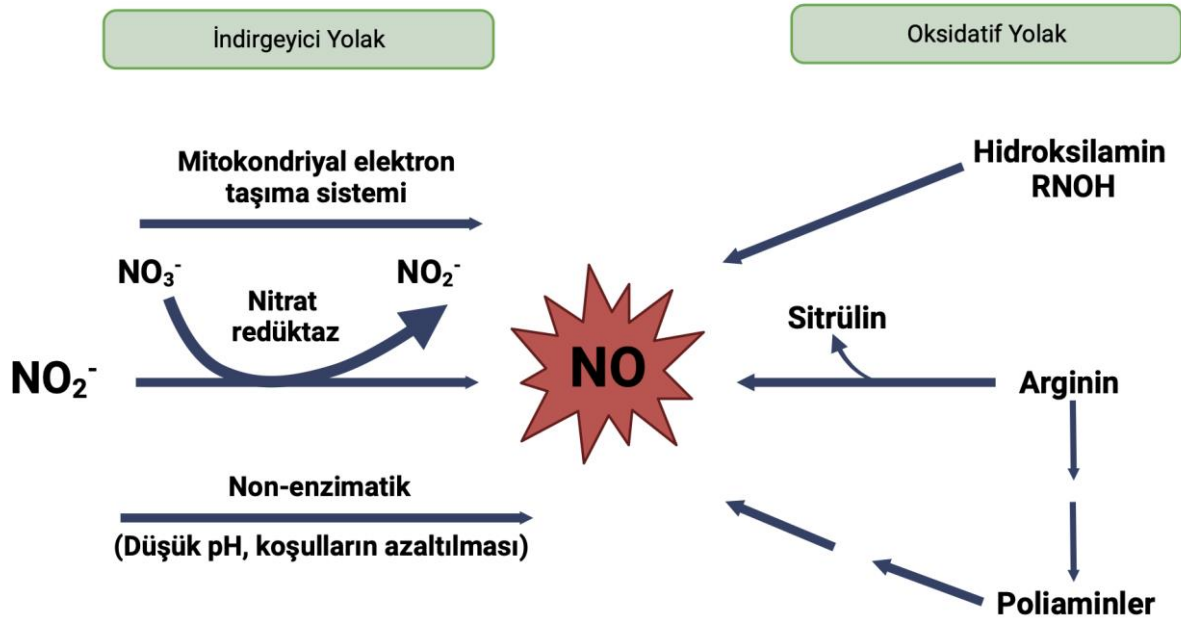
(Leshem 2000, Hancock 2020, Khan vd. 2023).

NO'nun çok işlevli rolü, yarı ömrü ile ilgilidir (Bruand ve Meilhoc 2019). Düşük konsantrasyonlarda (1 $\mu\text{mol/L}$ 'den az) NO'nun yarı ömrü dakikalar ila saatler arasında olabilir ve bu nedenle birçok hücre katmanına veya hücreler arası boşluklarda daha uzun mesafelere yayılabilir. Daha yüksek konsantrasyonlarda NO'nun yarılanma ömrü saniyeler mertebesinde çok daha kısadır (Henry vd. 1997). NO'nun yarı ömrü aynı zamanda proteinler, hemoproteinler, bağlı demir, bağlı bakır, sistein, askorbik asit, oksijen ve H_2O_2 gibi hedeflerinin lokal konsantrasyonuna da bağlıdır (Stöhr ve Ullrich 2002).

Sodyum nitroprussid (SNP) gibi farklı NO donörleri formunda bitkilere uygulanabilen NO'nun canlı organizmalarda çeşitli enzimatik ve enzimatik olmayan reaksiyonlar yoluyla üretildiği bildirilmiştir (Rolly vd. 2020). Genellikle nitratin nitrite dönüştürülmesi yoluyla nitrojen asimilasyonu ile ilişkilendirilen nitrat redüktaz (NR), nitritten NO üretimine de aracılık edebilir (Rockel vd. 2002). İndirgeme verimliliği düşüktür (NR aktivitesinin yaklaşık %1'i); oksijenin düşük olduğu ortamlarda daha belirgindir ve normalden daha yüksek nitrit seviyeleri gerektirir (Rockel vd. 2002). Enzim hem sitozolik formda hem de plazma membranına bağlı formda bulunmuştur (Stöhr 1999).

2.2.1 Nitrik Oksit Biyosentezi

İndirgeyici ve oksidatif yollar ile incelenen NO sentezinin mekanizmaları çok farklılık göstermelerine rağmen (Malia ve Moura 2015), mekanizması henüz tam olarak aydınlatılmamıştır. İndirgeyici yolk nitritlerin NO'ya indirgenmesine, oksidatif yolk ise aminasyonlu molekülün oksidasyonuna bağlıdır. İndirgeyici yolklar sitokrom-c oksidaz, nitrat redüktaz (NR), plazma membranına bağlı nitrit redüktaz, nitritlerin NO'ya indirgenmesi ve asidik koşullar altında nitritin enzimatik olmayan indirgenmesi için ksantin oksidoredüktaz (XOR) ve/veya redüktaz enzimlerini içeren yoldur. Oksidatif yolk ise L-arjinin, poliaminler (PA) ve hidroksilamin gibi aminlenmiş moleküllerin oksidasyonunu içerir (Şekil 2.1) (Moreau vd. 2010, Procházková vd. 2014).



Şekil 2.1 Bitkilerde NO oluşumunun indirgeyici ve oksidatif yolları. Nitriti (NO_2^-) NO'ya indirmek için gereken elektron, mitokondriyal elektron taşıma sistemi, nitrat redüktazdaki NAD(P)H veya asidik indirgeyici bir ortam tarafından sağlanabilir. Bitkilerde NO üretmenin oksidatif yolunda arjinin, poliaminler ve hidroksilaminler gibi çeşitli substratlar önerilmiş fakat hiçbir enzim tanımlanmamıştır (Moreau vd. 2010'dan değiştirilerek).

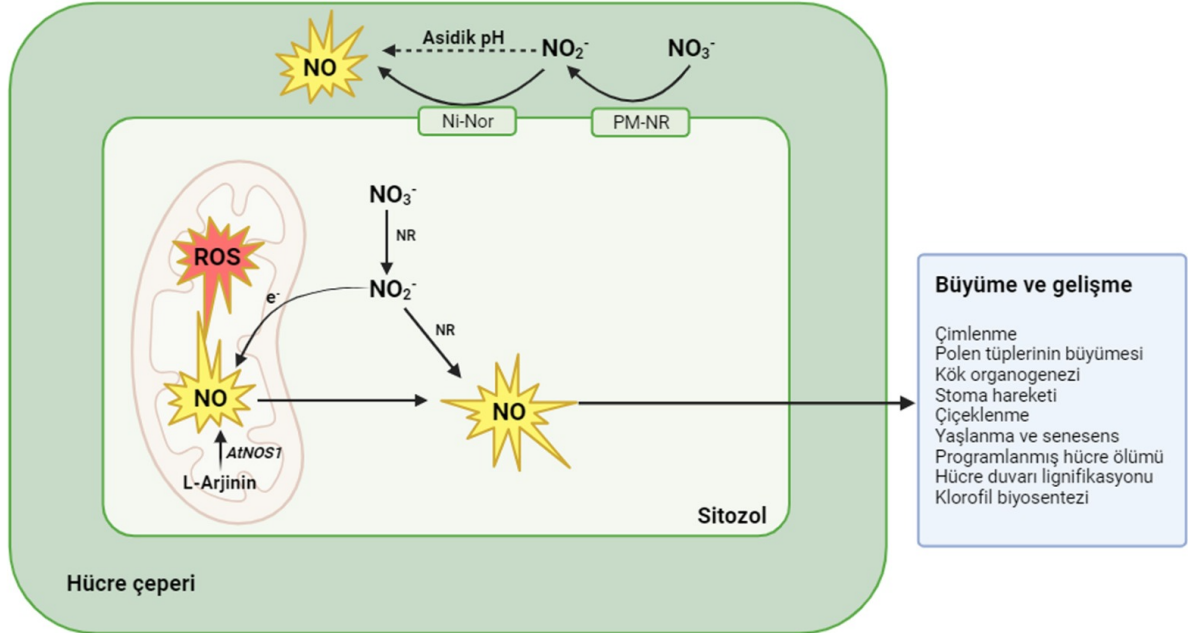
Bitkilerde azot asimilasyonunda önemli bir rol oynayan NR'nin, NO'nun çok önemli bir enzimatik kaynağı olduğu düşünülmektedir (Chamizo–Ampudia vd. 2017). Bitkilerde yaygın olarak bulunan nitrat ana substrat olarak kullanılmaktadır. NR, elektronları NAD(P)H'den nitritten NO sentezinde de yer alan molibdoenzim NO oluşturan nitrit redüktaza (NOFNiR) geçirir (Chamizo–Ampudia vd. 2016). Peroksizomlar, mitokondri, kloroplastlar ve plazma zarı gibi farklı bitki organelleri, çeşitli abiyotik stres koşulları altında olası NO üretim kaynakları olarak kabul edilmiştir (Gupta vd. 2011).

L-arjinine bağımlı yolağa nitrik oksit sentazın (NOS) enzimatik aktivitesi aracılık eder. Bu iki aşamalı işlem sırasında, L-arjinin ilk olarak moleküler oksijen ile etkileşime girerek N-hidroksi-L-arjinin oluşturur ve bu da gaz halindeki NO'nun salınmasıyla sitriline dönüştürülür. Arjininin guanidin grubu, ortaya çıkan NO molekülleri için nitrogen atomlarının kaynağıdır ve oksijen atomları, reaksiyona katılan oksijen moleküllerinden gelmektedir (Del Castello vd. 2019, Kolbert vd. 2019, Corpas vd. 2021).

2.2.2 Nitrik Oksitin Büyüme ve Gelişme Üzerine Etkisi

NO, çeşitli biyolojik fonksiyonları yerine getirmektedir (Hancock 2020). NO, hücre zarlarından kolayca yayılır ve normal ve stresli koşullar altında hem hayvanlarda hem de bitkilerde mükemmel bir hücre içi ve hücreler arası kimyasal haberci olarak görev yapmaktadır (Khan vd. 2023). Oldukça lipofilik doğası nedeniyle NO, spesifik membran taşıyıcılarının yardımı olmadan hücre membranlarından yayılabilir (Feldman vd. 1993, Rodrigo vd. 1994, Leshem 2000).

NO, çimlenme ve vejetatif büyümeden çiçeklenmeye, meyve olgunlaşması ve senesense kadar bitki gelişiminin tüm aşamalarındaki metabolik süreçlerin düzenlenmesinde yer almaktadır. NO, hücre döngüsünün düzenlenmesinde, polen tüpü farklılaşması ve büyümesinde, morfogenezde ve bitki-simbiont etkileşimlerinin kurulmasında rol oynamaktadır (Karpets ve Kolupaev 2017, Kolbert vd. 2019, Corpas vd. 2020, Khan vd. 2023).



Şekil 2.2 NO'nun üretildiği reaksiyonlar ve yerleri ve NO'nun bir sinyal molekülü olarak olası dahil olduğu ana reaksiyonların şematik diyagramı (Planchet ve Kaiser 2006'dan değiştirilerek).

NO, bitkileri yaralanma, hipoksi, patojen istilası, kuraklık stresi, tuzluluk stresi, ultraviyole (UV) radyasyon, aşırı sıcaklık ve ağır metal stresleri gibi çeşitli çevresel streslere karşı korumak için önemli bir rol üstlenmektedir (Rolly vd. 2020, Khan vd. 2021, Rahim vd. 2022).

2.3 Sekonder Metabolitler

Bitkilerde 200.000'den fazla sekonder metabolit (SM) tanımlanmıştır (Neilson vd. 2013). Biyosentez yolu ve kimyasal yapısına dayalı olarak bitki sekonder metabolitleri (BSM'ler), terpenoidler, fenolik bileşikler ve azot içeren bileşikler kapsamaktadır (Jamwal vd. 2018, Jogawat vd. 2021, Li vd. 2020, Yadav vd. 2021). Dünyada 391000'den fazla bitki türü var olduğu (Willis 2017) düşünüldüğünde SM'lerin daha fazla araştırılması için geniş imkan sunmaktadır. Bazı BSM'ler, belirli bitki taksonlarına özgüdür (van Wyk 2003). BSM'lerin konsantrasyonları, bitki ontogenezi ve doku tipine bağlı olarak popülasyonlar ve taksonlar arasında değişiklik göstermektedir (Acamovic ve Booker 2005, Ritmejeryte vd. 2020).

BSM'ler, biyolojik aktivitelere ve farklı kimyasal yapılara sahip küçük moleküllerdir. Hücre oluşumu da dahil olmak üzere temel yaşam fonksiyonlarının ana itici güçleri olan primer metabolitlerin aksine, BSM'ler primer yaşam işlevleri için gerekli değildir ve yüksek enerjili bağlara sahip değildir (Kessler ve Kalske 2018). Bununla birlikte, BSM'ler, abiyotik ve biyotik streslerle başa çıkmada bitkinin hayatta kalmasını sağlayan temel sekonder fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda rol oynarlar (Kessler ve Kalske 2018). Abiyotik stres faktörleri, kemotiplerde (sekonder metabolitlerin bileşimindeki farklılıklar veya morfoloji/anatomi üzerinde etkisi çok az ya da hiç olmayan küçük genetik ya da epigenetik değişikliklerin kimyasal fenotipte büyük değişikliklere neden olması) ve BSM üretim seviyelerinde önemli bozulmalara neden olmaktadır. Örneğin, bitkiler yüksek sıcaklıklara maruz kaldıklarında daha fazla terpenoid üretirler (Sallas vd. 2003) ve UV-B (280–315 nm) radyasyonuna maruz kalan bitki yaprakları daha fazla fenolik asit ve flavonoid üretmektedir (Julkunen-Tiitto vd. 2014, Kaling vd. 2015).

İnsan sağlığı açısından önemli olan BSM'ler, birçok farmasötik ürünün ana kaynağıdır. Mevcut ilaçların %25'inden fazlası BSM'lerden elde edilmektedir (Hamilton 2004). *Papaver somniferum*'dan morfin, *Digitalis purpurea*'dan digitoksin, *Taxus baccata*'dan taksol, *Artemisia annua*'dan artemisin ve *Cinchona officinalis*'ten kinin, *Catharanthus roseus*'tan vinblastin ve vinkristin ve *Filipendula ulmaria*'dan aspirinin ana maddesi olan salisilik asit sekonder metabolitleri izole edilmiştir. Farklı abiyotik stres koşullarına maruz kalan bitkiler, strese tolerans sağlamak için daha yüksek konsantrasyonlarda birçok BSM retmektedir (Roy ve Roy 2016, Gupta vd. 2019, Applequist vd. 2020). Bu durum, tedavi amaçlı yeni ürün geliştirmek isteyen doğal ürün araştırmacılarına ve dolayısıyla ilaç şirketlerine önemli bir fırsat sunmaktadır.

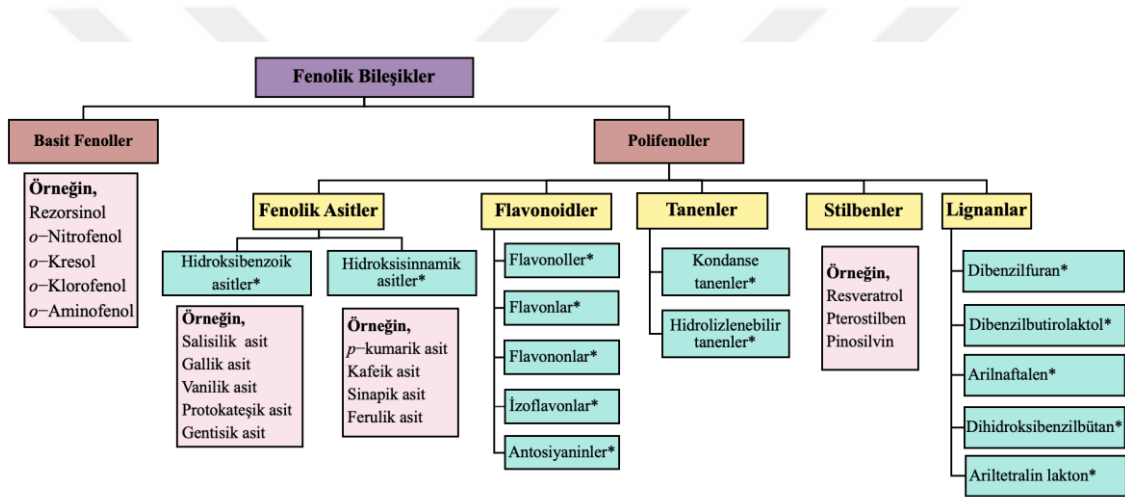
2.3.1 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bitkiler aleminde en yaygın bulunan sekonder metabolitler olup, nadiren bakteri, mantar ve alglerde de bulunmaktadır (Lattanzio 2013, Farhat vd. 2020, şamec vd. 2021). Fenolik bileşikler, bitkilerin kendilerini abiyotik ve biyotik faktörlerine karşı korumak için ürettiği stres metabolitleridir. Yapısal olarak fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubunun sahip olduğu en az bir aromatik halka ile karakterize edilen metabolitlerdir (şamec vd. 2021, Eseberri vd. 2022).

Fenolik bileşikler, kendisine bağlı bir hidroksil grubuna sahip bir fenol grubu içeren organik bileşik sınıfıdır (Xu vd. 2019). Fenolik bileşikler, bir veya daha fazla hidroksil grubuna bağlı tek veya çoklu aromatik halkalardan oluşur (Sulusoglu 2014). Fenolik bileşikler 2 temel yapıya sahiptir: Flavonoidler, bazı fenolik asitler ve yoğunlaşmış tanenler C6–C3–C6 halka yapısında iken bazı fenolik asitler ve hidrolize tanenler ise C6–C1 yapısındadır (Ringli vd. 2008).

Fenolik bileşikler, basit fenoller ve polifenoller olmak üzere iki genel gruba ayrılabilir (Sulusoglu 2014). Basit fenoller, bir hidroksil grubuna bağlı bir aromatik halkadan oluşan fenolik bileşiklerdeki en basit bileşikler olarak kabul edilir. Fenol ayrıca hidroksil grup numarasına veya aromatik halkaya bağlı amino, klor, metil ve nitro gruplarının varlığına göre rezorsinol, o-aminofenol, o-klorofenol, o-kresol, ve o-

nitrofenol gibi bazı türevlere sahiptir (Lee vd. 1998). Diğer yandan polifenollerin yapısı da fenolik asitler gibi basit fenolik bileşiklerden tanenler gibi daha karmaşık maddelere kadar farklılık göstermektedir. Bu bileşikler çeşitli konfigürasyonlarda mevcut olduğundan, fenolik bileşikler, fenol halkalarının ve bu halkaları destekleyen yapısal elemanların varlığına dayalı olarak fenolik asitler (hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit), flavonoidler (flavonoller, flavonlar, flavanonlar, izoflavonlar ve antosiyanidinler), tanenler (hidrolizlenebilir ve kondanse), stilbenler ve lignanlar şeklinde sınıflandırılırlar (Şekil 2.3) (Pietta vd. 2003, Falcao ve Araujo 2011, Alu'datt vd. 2017, Bento vd. 2017, Alara vd. 2021, Mutha vd. 2021).



Şekil 2.3 Fenolik bileşiklerin sınıflandırılması. *Polifenollerin türevlerini ifade eder (Alara vd. 2021, Zhang vd. 2022, Suliman vd. 2023'ten değiştirilerek).

Fenolik asitler, en az bir organik karboksilik asit grubu içeren fenoller olarak adlandırılır (Schieber vd. 2001, Mattila ve Hellström 2007). Hidroksibenzoik asitler ve hidroksisinnamik asitler olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.3) (Pietta vd. 2003). Hidroksibenzoik asitler, C6–C1 yapısının yedi karbon atomu çerçevesinden oluşan benzoik asidin varyasyonlarıdır. Salisilik asit, gallik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, gentisik asit, protokateşik asit ve vanilik asit ana hidroksibenzoik asitlerdir (Balupillai vd. 2015). Hidroksisinnamik asitler, C6–C3 çerçeve yapısından oluşan sinnamik asitlerin modifiye edilmiş formu olarak tanımlanmaktadır. Hidroksisinnamik asitler serbest durumda bulunmazlar, ancak sıklıkla *p*-kumarik, kafeik, ferulik ve sinapik asitler gibi esterler ve glikozitler olarak oluşurlar (Mattila ve Hellström 2007).

Flavonoidler doğal olarak oluşan fenollerin en büyük grubudur (Evans 2009). Flavonoidler ($C_6-C_3-C_6$) genellikle üç karbon atomundan oluşan bir zincirle birbirine bağlanan iki benzen halkasından (A halkası ve B halkası) oluşur ve genellikle bir piran halkaya (C halkası) yoğunlaşır. Flavonoidler yapısal formüllerine bağlı olarak flavonlar, flavonoller, dihidroflavonol, flavanonlar, flavanol, kalkonlar, dihidrokalkonlar, auronlar, antosiyanidin, izoflavonoidler gibi türevlere sahiptir (Şekil 2.3). Bununla birlikte flavonoidler, glikozit türevleri veya aglikon formu halinde bulunmaktadır (Bravo 1998, Zhang vd. 2022). Flavonoidler simbiyotik azot fiksasyonu gibi bitki-çevre etkileşiminde önemli bir rol oynamaktadır (Samanta vd. 2011, Zhang vd. 2022). Simbiyotik enfeksiyon aşamasında köklerden ve Rhizobia yardımıyla salgılanırlar (Liu ve Murray 2016). Flavononlar doymuş bir C halkasına sahiptir (Panche vd. 2016). İzoflavonlar, flavonoidlerin bir alt sınıfıdır ve östrojenlerle yapısal benzerliklere sahiptir. İzoflavonlar bazen özellikle soya fasulyesinde bol bulunan "fitoöstrojenler" olarak adlandırılır. Antosiyanidinler flavonoid pigmenti olan flavilyum iyonunun temel yapısına sahip olup, C-halkasının 4. konumunda bir keton oksijeninden yoksundur (Chun vd. 2005, Khoo vd. 2017). Bitkiler turuncu, kırmızı, mor ve mavi tonları türeten primer pigmentler olan antosiyaninler de dahil olmak üzere çeşitli flavonoidleri içermektedir (Samanta vd. 2011, Zhang vd. 2022).

Tanenler çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan bir grup fenolik bileşiktir (Smeriglio vd. 2017). Tanenler kimyasal yapılarına göre hidrolizlenebilir ve kondanse tanenler olan iki ana gruba ayrılmaktadır (Şekil 2.3) (Alara vd. 2021). Hidrolizlenebilir tanenler, gallotanninler gibi, gallik asit ile esterleştirilmiş merkezi bir glikoz çekirdeğinden oluşmaktadır (Zajacz vd. 2007). Kondanse tanenler $[(C_6-C_3-C_6)_n]$, oligomerler veya polimerler oluşturmak üzere C_4-C_8 ve C_4-C_6 'daki karbon-karbon bağları ile bağlantılı flavanoid birimleri (flavan-3-ol) içermektedir (Ismayati vd. 2017, Alara vd. 2021). Kateşin-4 α -8-kateşin, robinetinidol-(4 α -8)-kateşin ve fisetinidol-(4 α -8)-kateşin yoğunlaşmış tanen örnekleridir (Şekil 2.3) (Ohara vd. 2003).

Stilbenler ($C_6-C_2-C_6$), aglikonlar veya glikozitler olarak bulundukları diğer fenolik bileşiklere kıyasla nispeten küçük bir gruptur (Metsamuuronen ve Siren 2019). Bu

bileşikler, 2–karbon metilen köprüsü ile birbirine bağlı iki fenil bileşiği içerir (Kumar vd. 2018). Resveratrol, pterostilben ve pinosilvin stilbenlere örnek verilebilir (Şekil 2.3) (Chang vd. 2012, Reinisalo vd. 2015).

Lignanlar, iki sinnamik asit rezidüesinin dimerizasyonundan oluşan difenolik bitki bileşikleridir. Lignanlar bitki aleminde yaygın olarak dağılmıştır ve bitki köklerinde, rizomlarda, gövdelerde, yapraklarda, çiçeklerde, meyvelerde, tohumlarda, ksilemlerde ve reçinelerde bulunurlar. Lignanların primer kaynakları tahıllar, meyveler, keten tohumu ve sebzeler gibi doğal ürünlerdir. Lignanlar, sesamin, sekoizolarisiresinol diglukosit, matairesinol ve enterodiol gibi çeşitli aktif bileşiklere sahiptir (Milder vd. 2005, Webb ve McCullough 2005, Cui vd. 2020). Yapılarına göre dibenzilfuran, dibenzilbutirolaktol, dihidroksibenzilbütan, arilnaftalen ve ariltetralin lakton türevleri gibi çeşitli gruplara ayrılırlar (Şekil 2.3) (Alcorn vd. 2017). Monolignoller, sinnapik, *p*-kumarik ve ferulik asitler gibi hidroksisinnamik asitlerin dimerizasyonundan elde edilen lignanlardır. Lignanların dimerlerine neolignan denir. Bu lignanlar doğada serbest formlarında yaygın olarak bulunmaz, ancak glikozillenmiş türevler olarak diğer moleküllere bağlanırlar. Ayrıca, sadece dimerler olarak değil, dilignanlar ve seskuilignanlar gibi karmaşık oligomerler olarak da bulunmaktadır (Pilar vd. 2017).

2.4 Tıbbi Adaçayının Kimyasal Bileşenleri ve Farmakolojik Özellikleri

Fenolik asitlerin esas olarak cilt kanseri (Balupillai vd. 2015), böbrek hasarı (Yasir vd. 2018) ve alerjik hastalıkları (Kim vd. 2006) tedavi etmek için farmasötik bir ajan olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Bu bileşikler, antiinflamatuvar, antioksidan ve antikanser etkiler dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahiptir (Zhang vd. 2022). Fenolik bileşikler, nörodejeneratif bozukluklar, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve osteoporoz riskini azaltmak da dahil olmak üzere farmakolojide yaygın olarak kullanılmaktadır (Arts ve Hollman 2005, Graf vd. 2005, Blahova vd. 2021, Canadas 2021). İzoflavonların hipertansiyon (Maaliki vd. 2019) ve kanser (George vd. 2017) gibi bazı önemli hastalıkları önlemek ve bağırsak sağlığını iyileştirmek için kullanılabilecekleri bildirilmiştir (Landete vd. 2016). Antosiyaninler, miyokard enfarktüsü ve kardiyovasküler hastalık ile ilişkili mortalite riskini azaltarak

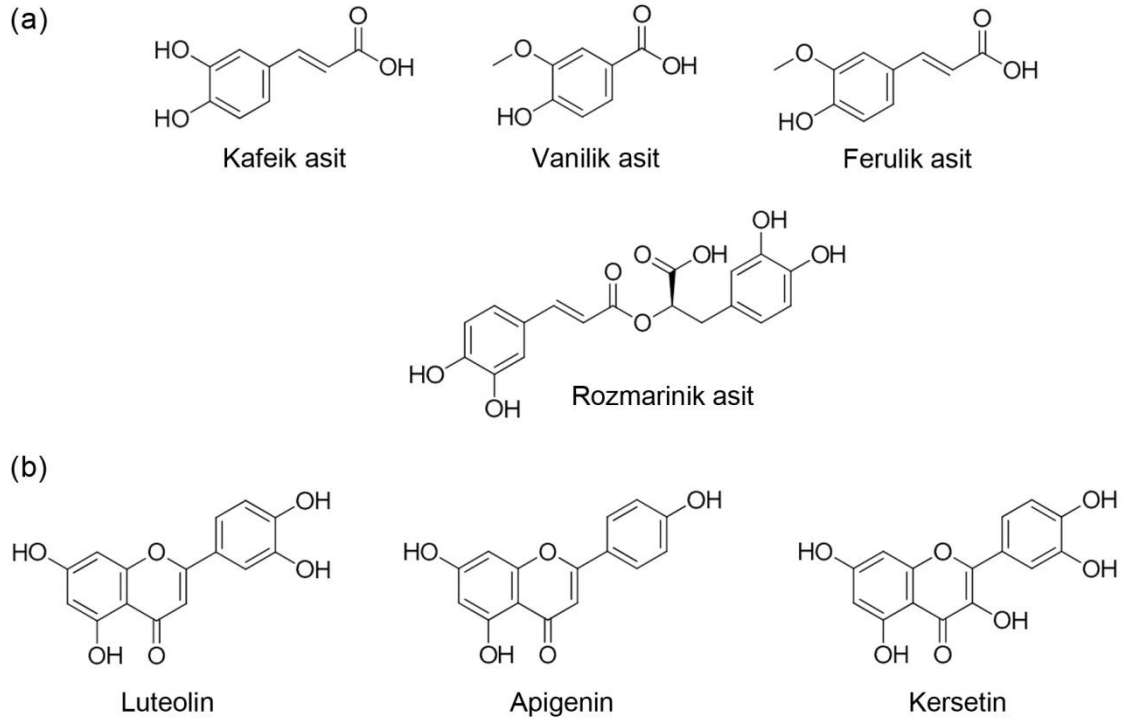
kardiyovasküler sağlığın korunmasında koruyucu etkiler göstermektedir (Krga ve Milenkovic 2019). Ayrıca, antosiyaninler, birden fazla mekanizma yoluyla antiobezite (Xie vd. 2018) ve antidiyabetik (Gowd vd. 2017) etkiler göstermektedir. Tanenler antimikrobiyal, antiparaziter, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar, immünomodülasyon vb. dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan bir grup fenolik bileşiktir (Smeriglio vd. 2017). Stilbenlerin, antienflamasyon, antikarsinojenik, antidiyabet ve antidislipidemi aktiviteleri gibi çeşitli sağlık açısından faydalı etkileri bildirilmiştir (Fraga vd. 2019). Stilbenlerin temsili bileşiği olan resveratrol, kardiyovasküler sistemde antioksidan etkiler göstermekte ve çeşitli tümör hücrelerinde çoklu ilaç direncini kemoterapötik ajanlara duyarlı hale getirerek tersine çevirmektedir (Lee vd. 2016, Mondal ve Bennett 2016, Xia vd. 2017). Lignanların antioksidan, antitümör, antienflamatuvar ve antiviral özellikler gibi biyolojik aktivitelere sahip oldukları bildirilmiştir. Bu nedenle lignanlar uzun süredir hem etnik hem de geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Pietrofesa vd. 2016). *In vitro* ve *in vivo* çalışmalarla, lignanların antioksidan, proapoptoz, antiöstrojenik ve antianjiyojenik özellikler de dahil olmak üzere çoklu mekanizmalar yoluyla antikanser özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Milder vd. 2005, Webb ve McCullough 2005).

Bazı önemli sekonder metabolitleri içermeleri nedeniyle, *Salvia* türleri antitümör (Garcia vd. 2016), antikanser (Ye vd. 2017), antioksidan (Loizzo vd. 2014), antidemans (Perry vd. 2003), antiviral (Chung vd. 2015), antidiyabetik (Leng vd. 2017), antiinflamatuvar (Ma vd. 2016) ve antimalaryal etkiler (Kamatou vd. 2005) gibi terapötik özelliklere sahiptir. *Salvia* türlerinin en önemli biyoaktif bileşikler terpenler (mono-, di- ve triterpenler) ve fenolik bileşiklerdir (fenolik asitler ve flavonoidler) (Cheng vd. 2012, Ghorbani ve Esmaeilizadeh 2017, Xu vd. 2018). Fenolik asitlerden, özellikle rosmarinik asit, kafeik asit, salvianolik asit B (Sal-B) ve salvianolik asit A (Sal-A) *Salvia* türlerinin geniş terapötik etkisinden sorumludur (Liu vd. 2006, Dent vd. 2017). Yapılan çalışmalar *Salvia* türlerinde önemli biyoaktif metabolit olan rosmarinik asitin antikanser (Sharmila ve Manoharan 2012), antioksidan (Tepe 2008), antimikrobiyal (Dent vd. 2017), antiinflamatuvar (Chu vd. 2012) ve antiiskemik (Ozturk vd. 2014) özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir. Sal-B ve Sal-A antioksidan (Du vd. 2016), antidiyabetik (Huang vd. 2015), antifibrotik (Liu vd. 2017) ve antikanser (Guo vd.

2018) etkilere sahiptir.

S. officinalis'in ana metabolitleri fenolik asitler ve flavonoidlerdir (Lu ve Foo 2000, Bettaieb vd. 2011, Vergine vd. 2019). Bu fenolik bileşikler adaçayı yapraklarındaki toplam antioksidan kapasitenin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır (Farhat vd. 2013). Adaçayı ekstraktlarında basit fenoller, *p*-kumarik asit, *o*-kumarik asit, kafeik asit, klorojenik asit, ferulik asit, rosmarinik asit, salvianolik asit A ve B, galik asit, vanilik asit, siringik asit, apigenin, luteolin, kaempferol, kersetin, oleanolik asit ve ursolik asit bulunmaktadır (Şekil 2.4) (Lu ve Foo 2000, Farhat vd. 2013, Dent vd. 2017, Jakovljević vd. 2019, Marchica vd. 2021).

Salvia officinalis ekstraktlarının farmakolojik özellikleri, terpenler, fenolik asitler, flavonoidler ve diğer çeşitli biyoaktif bileşikleri içeren karmaşık kimyasallardan kaynaklanmaktadır (Martins vd. 2014). *S. officinalis*'ten elde edilen polifenoller, tip II diyabet, amiloidoz, Alzheimer, Parkinson ve Huntington hastalıklarına karşı yüksek ilgi uyandıran nöroprotektif aktivite göstermektedir (Mannu vd. 2022). *S. officinalis*, kardiyovasküler, solunum, gastrointestinal ve zihinsel-sinir sistemi bozuklukları ile ilgili çeşitli bozuklukların tedavisinde geleneksel olarak kullanılmaktadır (Asadollahi vd. 2019). Adaçayı metanolik ekstraktının antiinflamatuvar etkisi, rosmarinik, ursolik, kafeik ve oleanolik asitler ile ilişkilendirilmiştir (Dal Prá vd. 2011). Metanolik adaçayı yaprağı ekstraktından elde edilen karnosik asitin ise, trigliserit yükselmesini önemli ölçüde inhibe ettiği, vücut ağırlığı kazanımını azalttığı ve pankreas lipaza karşı aktiviteyi inhibe ettiği bildirilmiştir (Ninomiya vd. 2004). Ayrıca adaçayı infüzyonunun sıçanlarda kolorektal kanserini önlediği bulunmuş (Pedro vd. 2010), bununla birlikte kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etkileri de gösterilmiştir (Bauer vd. 2012, Hamidpour vd. 2014). Aynı zamanda adaçayı, kanser tedavisi için kullanılan radyoterapinin olumsuz etkilerini azaltmaktadır (Osman ve Abd El-Azime 2013).

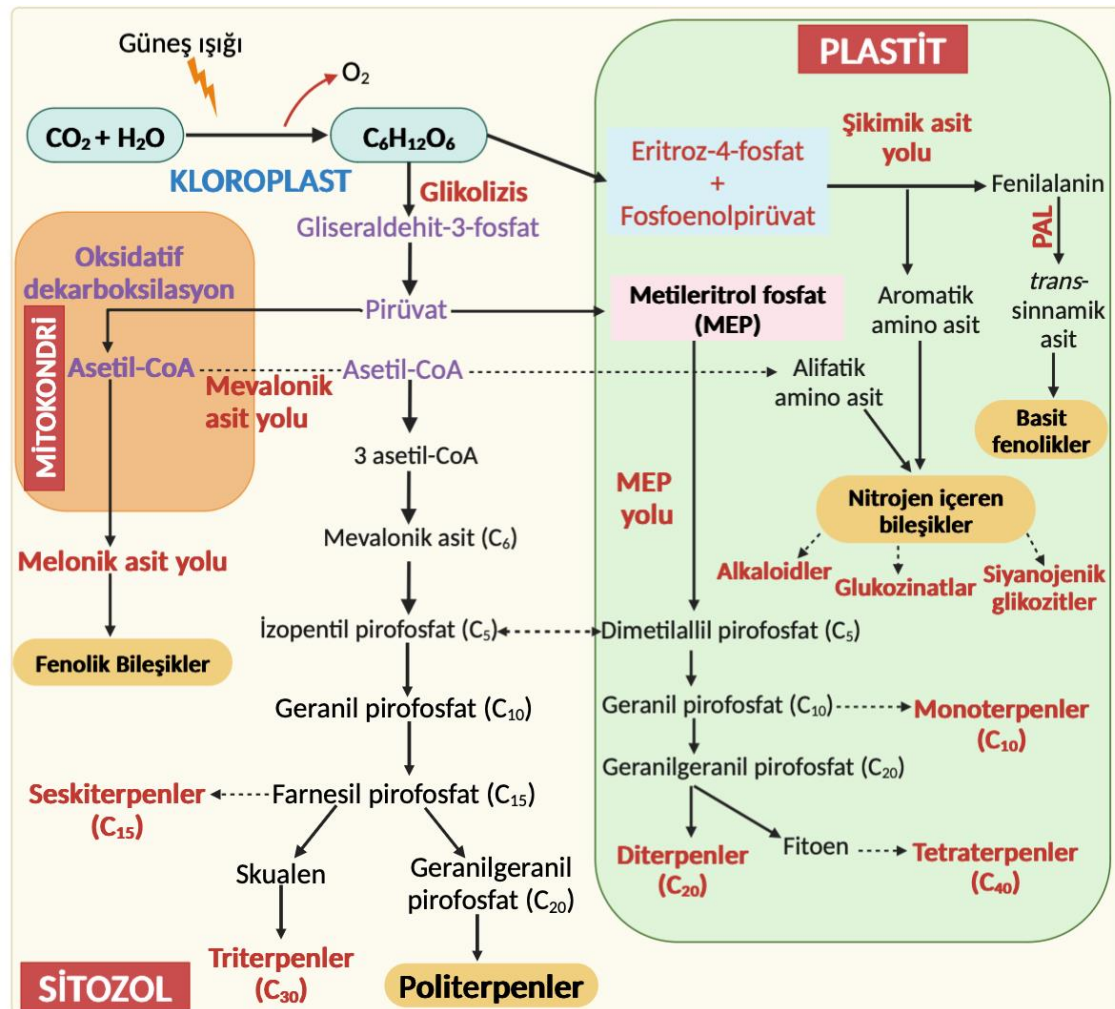


Şekil 2.4 *Salvia officinalis*'in ana fenolik bileşenlerinden bazılarının kimyasal yapıları. (a) fenolik asitler (b) flavonoidler (Jakovljević vd. 2019'dan değiştirilerek).

2.5 Fenolik Bileşiklerin Biyosentez Yolakları

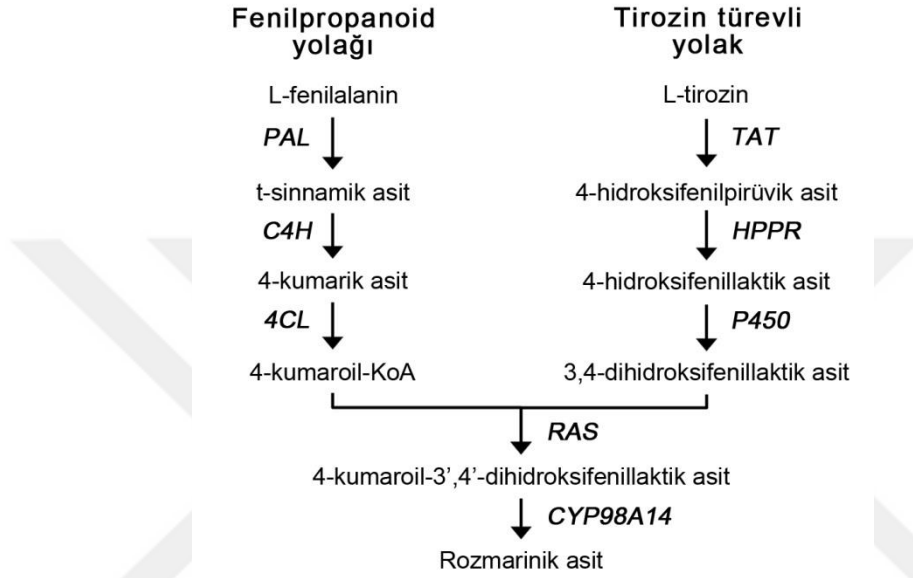
Fenolik bileşikler bitkilerde fenilpropanoid metabolizması yoluyla şikimat ve pentoz fosfatlarla oluşan sekonder metabolitlerdir (Randhir vd. 2004). Fenolik bileşiklerin sentezindeki ilk süreç, glikozun pentoz fosfat yoluna (PPP) bağlanması ve glikoz-6-fosfatın geri dönüşümsüz olarak ribuloz-5-fosfata dönüştürülmesidir. Ribuloz-5-fosfata dönüşümdeki ilk basamak, glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PDH) tarafından katalizlenmektedir. Bir yandan, ribuloz-5-fosfata dönüşüm, hücrel anabolik reaksiyonlar için nikotinamid adenin dinükleotid fosfatın (NADPH) indirgeyici eşdeğerlerini üretir. Daha sonra fenilpropanoid yolu yoluyla fenolik bileşikler üretmek için kullanılan fenilalanin üretmek için şikimat yolundan geçirilir (Vattem vd. 2005, Lin vd. 2010). Polimerik C₂ birimleri üreten poliketid yolu ve fenilpropanoid iskeletini geliştiren fenilpropanoid süreci, bitkilerde flavonoidlerin (C₆-C₃) üretildiği iki ana biyosentetik yoldur. Kalkon sentaz enzimi, flavonoidlerin biyosentezinde ilk adım olarak p-kumaroil CoA ve malonil CoA'dan 20-hidroksi kalkon iskeletini oluşturur. Daha sonra, bu iskelet, farklı enzimatik işlemler kullanılarak

Şikimik asit ve malonik asit yolakları, tüm fenolik bileşiklerin öncüllerinin biyosentezinden sorumludur. Bitki fenoliklerinin çoğu şikimik asit yolağından üretilir. Şikimik asit yolağı eritroz-4-fosfat ve fosfoenol piruvatı aromatik amino asitlere dönüştürür (Şekil 2.5) (Mahajan vd. 2020).



15

Fenolik asitlerin biyosentez süreci tam olarak karakterize edilmemiştir, ancak iki ara ürünü 3,4-dihidroksifenillaktik asit ve 4-koumaroil-CoA'yı ayrı ayrı sentezlemek için L-tirozin ve L-fenilalanininden başlar, ardından iki öncül, rosmarinik asit yolunda yer alan çeşitli enzimler yoluyla bir dizi modifikasyonla rosmarinik asit ve diğer fenolik asitleri oluşturmak üzere yoğunlaşır (Şekil 2.6) (Zhao vd. 2015).



Şekil 2.6 Fenolik asit biyosentez yolu. PAL, fenilalanin amonyum-liyaz; C4H, sinamik asit 4-hidroksilaz; 4CL, 4-kumarat-KoA ligaz; TAT, tirozin amino transferaz; HPPR, 4-hidroksifenilpiruvat redüktaz; RAS, rosmarinik asit sentaz; CYP98A14, bir sitokrom P450-bağımlı monooksijenaz (Shi vd. 2019'dan değiştirilerek).

Fenolik asitlerin biyosentez yolunda beş anahtar enzim bulunmaktadır. Fenilpropanoid yolağındaki varsayılan enzimler fenilalanin amonyak-liyaz (PAL, EC 4.3.1.5), sinamik asit 4-hidroksilaz (C4H, EC 1.14.13.11) ve 4-kumarat-CoA ligaz (4CL, EC 6.2.1.12), tirozin türetilmiş yolağının hız sınırlayıcı enzimleri ise tirozin aminotransferaz (TAT, EC 2.6.1.5) ve 4-hidroksifenilpiruvat redüktazdır (HPPR, EC 1.1.1.237). Tirozin ve fenilalanin kaynaklı yolakların iki ara maddesi olarak 4-hidroksifenillaktik asit ve 4-koumaroil-CoA, rosmarinik asit sentaz (RAS, EC 2.3.1.140) ve bir sitokrom P450-bağımlı monooksijenaz (CYP98A14, EC 1.14.13.36) etkileri yoluyla rosmarinik asite dönüşür (Şekil 2.6) (Di vd. 2013, Wang vd. 2015, Shi vd. 2019).

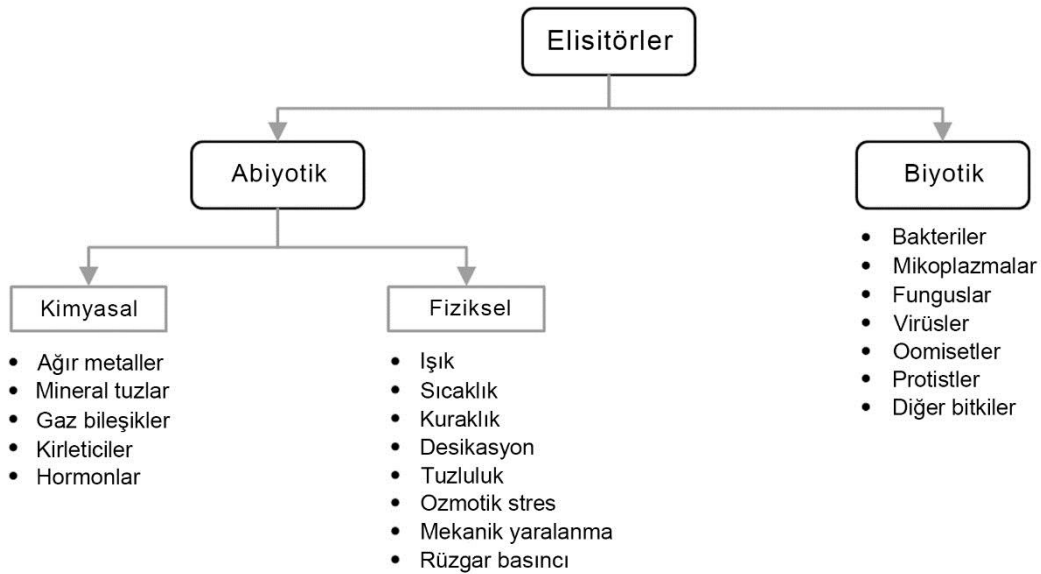
Fenilpropanoid yolağında, L-fenilalanin PAL ile sinnamik asite ve daha sonra C4H ve 4CL tarafından bir dizi kataliz ile 4-kumaroil-CoA'ya dönüştürülür. Tirozin biyosentetik yolağında ise, L-tirozin, TAT tarafından katalize edilen 4-hidroksifenilpiruvik aside metabolize edilir, daha sonra HPPR ve bilinmeyen bir sitokrom P450-bağımlı enzimle 3,4-dihidroksifenillaktik asit oluşturulur. (Di vd. 2013). İki ara madde olan 3,4-dihidroksifenillaktik asit ve 4-kumaroil-CoA, ester oluşturan enzim RAS tarafından 4-kumaroil-3',4'-dihidroksifenillaktik asit üretmek için birleştirilir. CYP98A14 enzimi tarafından rosmarinik asit oluşturmak üzere 4-kumaroil-3',4'-dihidroksifenillaktik asidin aromatik halkası içinde C-3'te bir 3-hidroksil grubu sokulur (Di vd. 2013, Zhao vd. 2015).

PAL, *C4H*, *4CL* ve *HPPR* genleri rosmarinik asit birikiminin düzenlenmesinde anahtar genler olarak görev yaparken, *TAT* geni salvianolik asit B içeriğinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Song ve Li 2015). *PAL*, primer ve sekonder metabolizmaya aracılık etmede önemli bir rol oynayan fenilpropanoid yolağında yer alan ilk enzimdir. Sitokrom P450 enzimlerine ait bir oksidoredüktaz olan *C4H*'nin, t-sinamik asitten 4-kumarik aside metabolik akışı kontrol ettiği doğrulanmıştır (Petersen ve Simmonds 2003, Shi vd. 2019). *C4H* transkriptlerinin aşırı ifadesi artan fenolik bileşik üretimi ile ilişkilendirilmektedir (Chen vd. 2006). Çeşitli bitki sekonder metabolitlerinin öncüleri olan *p*-kumarat, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asidin CoA tiyoesterlerinin sentezini katalize eden ve fenilpropanoid metabolizmasındaki son enzim olan *4CL*, rosmarinik asit üretmenin öncüsü olarak 4-kumaroil-CoA oluşumunu kataliz eder (Ehlting vd. 1999, Shi vd. 2019). *4CL* genlerinin ve proteinlerinin önemi, aktifleştirilmiş 4-kumaroil CoA'nın yalnızca fenilpropanoid biyosentezinin değil aynı zamanda flavonoidler, izoflavonoidler ve stilbenler dahil olmak üzere çok çeşitli sekonder metabolitlerin metabolizmasının başlangıç noktasını temsil etmesi ile açıklanmaktadır (Vogt 2010). *PAL*, *C4H* ve *4CL* tarafından katalize edilen fenilpropanoid yolunun bu üç başlangıç adımı, sonraki tüm dalların ve sonuçta ortaya çıkan organik bileşiklerin temelini oluşturmaktadır (Nanda vd. 2016). *TAT*'ın, rosmarinik asit biyosentezinin tirozin türevli dalındaki ilk enzim olduğu bilinmektedir. Ürünü, 4-hidroksifenilpiruvik asit, plastokinonların ve tokoferollerin oluşumu için önemli olan homojentisik asit (hidroksifenilpiruvat dioksigenaz, *HPPD* ile katalize

edilir) için bir öncü (Kim vd. 2004) ve ayrıca rosmarinik asitin öncüsü olarak 4-hidroksifenilaktik asit oluşturan enzim olan hidroksifenilpiruvat redüktaz için substrat görevi görür (Petersen ve Alfermann 1988). Bu nedenle, tokoferoller gibi diğer antioksidatif bileşiklerin oluşumu için TAT aktivitesi gereklidir (Wang vd. 2019). HPPR, 4-hidroksifenilpiruvik asidin yoğunlaşmasını katalize eder ve 4-hidroksifenillaktik asit oluşturur. RAS, 3,4-dihidroksifenillaktik asit ve 4-kumaroil-CoA'nın hız sınırlayıcı bir enzim kombinasyonudur (Shi vd. 2019). Sitokrom P450'ye bağımlı bir monooksijenazı kodlayan CYP98A14, bir NADPH:sitokrom P450 redüktaz olan CPR ile birlikte rosmarinik asit oluşturmak için 4-kumaroil-3',4'-dihidroksifenillaktik asitten akışı düzenler (Di vd. 2013).

2.6 Bitkilerde Elisitör Teşvikli Sekonder Metabolit Üretimi

Elisitörler, bitkilerde stres tepkilerini uyarabilen, sekonder metabolitlerin gelişmiş sentezine ve birikmesine veya yeni sekonder metabolitlerin indüksiyonuna yol açan abiyotik veya biyotik kaynaklardan elde edilen bileşiklerdir (Naik ve Al-Khayri 2016). Elisitasyon, eser miktarda elisitör uygulamasına bağlı olarak bitkilerin olumsuz koşullarda hayatta kalmaları için istenen sekonder metabolit biyosentezinin indüklenmesi veya geliştirilmesidir (Radman vd. 2003, Thakur vd. 2019). Kaynaklarına göre elisitörler, abiyotik ve biyotik elisitörler olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.7) (Thakur vd. 2019).

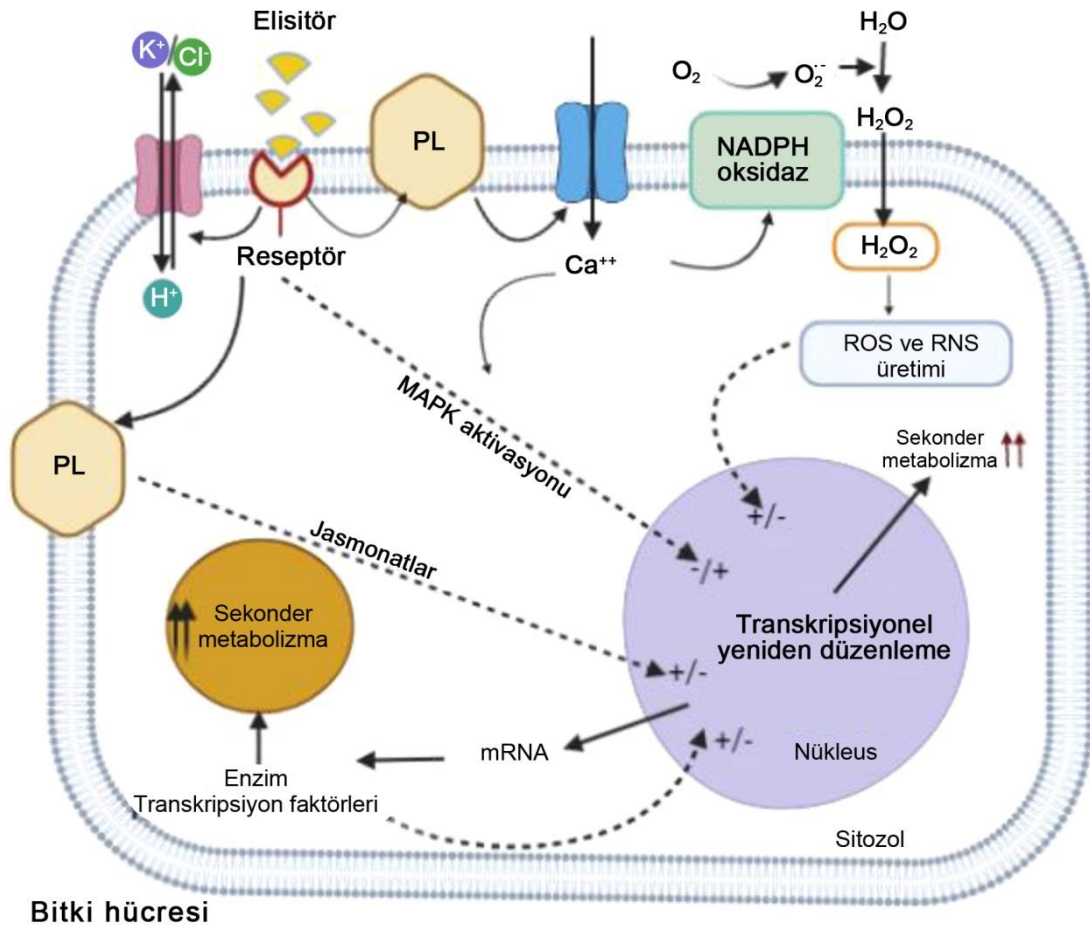


Şekil 2.7 Elisitörlerin sınıflandırılması (Kaur vd. 2021'den değiştirilerek).

Abiyotik elisitörler fiziksel, kimyasal ve hormonal faktörleri, yani UV radyasyonları, ozmotik stres, kuraklık, tuzluluk ve sıcaklık stresi; ağır metaller ve hücre içi sinyal moleküllerini (jasmonik asit, metil jasmonat, salisilik asit, brassinosteroidler, poliaminler, absisik asit ve giberellik asit ile etilen ve nitrik oksit gibi gazlı moleküller) içerir (Akula ve Ravishankar 2011, Cai vd. 2013, Hashemi ve Naghavi 2016). Biyotik elisitörler ise polisakkaritleri ve patojenleri (maya, bakteri ve mantar özleri) içeren biyolojik kökenli maddelerdir (Ahmed ve Baig 2014).

Bir elisitöre yanıt olarak bir hücrede meydana gelen çeşitli fizyolojik ve biyokimyasal süreçler Şekil 2.8’de gösterilmektedir (Humbal ve Pathak 2023). Hücre zarı üzerindeki reseptör, elisitörü tespit eder ve hücre içinde, plazma membranının ve sitozolik proteinlerin tersinir fosforilasyonu ve defosforilasyonu, sitozolik kalsiyum konsantrasyonunda bir artış, klorür ve potasyum iyonlarının akışı, bir proton akışı dahil olmak üzere bir dizi olayı tetikler, bu da hücre dışı alkalinizasyon ve sitoplazmik asitifikasyon ile sonuçlanır. Bu değişiklikler, mitojen ile aktive olan protein kinaz (MAPK) yolu gibi çeşitli sinyal yollarını aktive eder ve reaktif oksijen ve azot türleri (ROS ve RNS) üreten NADPH oksidazın aktivasyonuna yol açar. Bu süreç aynı zamanda erken savunma genlerinin ifadesini, jasmonat üretimini ve daha sonra savunma tepki genlerinin ifadesini tetikler. Son olarak, sekonder metabolitlerin birikimi, elisitöre karşı kalıcı bir savunma sağlamaktadır (Ramirez–Estrada vd. 2016).

Sekonder metabolitler bitkilerde düşük miktarlarda üretilir ve bitkilerin kuru ağırlığının %1’inden daha azını oluşturur (Fait vd. 2020). Sekonder metabolitlerin doğal üretiminin az olması büyük ölçekli üretimlerine engel teşkil etmektedir. Fenolik asit üretimini artırmak için *in vitro* kültür gibi araçlar, elisitör uygulaması, transgenik bitki, endofitik mantarlar, metabolik mühendislik gibi çeşitli biyoteknolojik uygulamalar kullanılmaktadır (Shi vd. 2019). Bitkilerde fenolik asit üretimini arttırmaya yönelik etkili yaklaşımlardan biri, biyosentetik yollardaki anahtar enzimlerin gen ifadesinin elisitörlerle uyarılmasıdır (Gonçalves vd. 2019). Sinyal bileşenlerinin elisitör olarak uygulanması, bitkilerde sekonder metabolitlerin üretimi için etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır (Ghasemi Pirbalouti vd. 2014, Bistgani vd. 2017).



Şekil 2.8 Elisitörlerin genel mekanizma etkisinin şematik gösterimi. PL, fosfolipaz; ROS, reaktif oksijen türleri; RNS, reaktif nitrojen türleri MAPK'ler, mitojenle aktifleşen protein kinazlar (Humbal ve Pathak 2023'ten değiştirilerek).

Nitrik oksit (NO), bitkilerin biyotik ve abiyotik streslere karşı tepkilerinde yer alan önemli bir sinyal molekülüdür (Siddiqui vd. 2011, Bellin vd. 2013). Nitrik oksit, bitkilerde sekonder metabolit üretimini indüklemek için doku ve hücre kültürlerinde yaygın olarak uygulanmaktadır (Zhang vd. 2012). Ayrıca NO'nun, PAL aktivitesini arttırdığı da bildirilmiştir (Durner vd. 1998). SNP, S-nitroso-N-asetilpenisilamin (SNAP) ve S-nitrosoglutasyon gibi yapay NO donörleri, bitkilerde eksojen NO kaynağı olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Kristal formdaki SNP, en uzun ölçülen yarı ömrü nedeniyle tıbbi bitkilerin doku kültürlerinde en yaygın kullanılan NO donörüdür (Floryszak-Wieczorek vd. 2006). SNP genellikle bitki biyokütlesinin birikimini teşvik etmek ve sekonder metabolit üretimini artırmak için doğrudan kültür ortamına eklenmektedir. SNP konsantrasyonu 10 μ M ile 100 mM arasında değişmektedir, bu da NO'nun etkisinin bitki türlerine bağımlı olduğunu ortaya koymaktadır (Wang vd. 2002).

SNP uygulamasının fenolik ve flavonoid içeriğini arttırdığı (Gupta ve Mandal 2016) ve hasat sonrası depolama sırasında toplam fenolik içeriğin artmasına bağlı olarak raf ömrünü arttırdığı (Barman vd. 2014) yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.

Sekonder metabolitlerin indüklenabilir sentezi ve ilişkili biyosentetik genlerin transkripsiyonu, transkripsiyon faktörleri (TF'ler) aracılığıyla transkripsiyonel düzenleme yoluyla çeşitli seviyelerde güçlü bir şekilde değiştirilir. Enzim genlerinin ifadesini düzenlemek için TF'ler iç ve dış sinyalleri entegre edebilir ve böylece sekonder metabolitlerin birikimini izleyebilir. Sekonder metabolit biyosentez yolu ile ilişkili genlerin düzenlenmesi, çeşitli seviyelerde birçok TF'nin etkisi altındadır (Yang vd. 2012). H-box ve L-box ile ilişkili diziler olarak bilinen belirli DNA dizi motifleri, fenilpropanoid yolağında yer alan *PAL* gibi genlerin promotör bölgelerinde yüksek oranda korunmuştur. *PAL* ve *4CL* genlerinde G-box, H-box, L-box ve P-box gibi bu yüksek oranda korunmuş *cis*-etkili elementler, elisitör uygulamasına yanıt olarak *Myb* ve *bHLH* (temel sarmal sarmal-döngü-shelix) gibi TF'lerle bağlanabilir (Davies ve Schwinn 2003). *Myb* ve *bHLH* genlerinin başarılı genetik manipülasyonu, bitkilerin pigmentasyonunun artmasına veya flavonoid ve antosiyaninlerin birikmesine yol açmaktadır (Mooney vd. 1995, Bradley vd. 1998, Grotewold vd. 1998). Bu durum bitki sekonder metabolizmasının düzenlenmesinde TF'lerin temel rolleri olduğunu göstermektedir (Zhao vd. 2005).

3. MATERYAL ve METOT

3.1 Bitki Materyali ve Bitki Yetiştirme Koşulları

Tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkisine ait bir yıllık fideler ticari firmadan elde edilmiştir. Fideler homojen olarak seçilmiş ve içerisinde bahçe toprağı bulunan saksılarda kontrollü iklim kabininde (23 °C sabit sıcaklık, %60 nem, 14:10 fotoperiyot, 250 $\mu\text{mol foton m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ışık şiddeti) 1 hafta süreyle uyumlanmıştır. Bu süre sonunda fideler 3 gruba ayrılmış ve yaprak yüzeylerine farklı konsantrasyonlarda (0, 100 ve 1000 μM) nitrik oksit (NO) donörü dietilentriamin NONOate (DETA-NONOate; CAS Number: 146724-94-9) spreyleneştir. Tüm uygulamalarda NO'nun yaprak dokularına girişini kolaylaştırmak için %0,1'lik Tween-80 kullanılmıştır. Kontrol (0 μM) uygulaması için %0,1'lik Tween-80 içeren dH₂O kullanılmıştır. Spreyleme işlemi gün aşırı 3 defa yapılmıştır. Son spreylemeden 24 saat sonra bitkilere ait yaprak dokuları hasat edilmiştir. Toplam fenolik madde ve flavonoid içeriğı, antioksidan kapasite ve fenolik madde kompozisyonun belirlenmesi için yapraklar laboratuvar koşullarında kurutulmuştur. Gen ifade analizleri için taze yaprak dokuları sıvı azot ile dondurulduktan sonra RNA izolasyonu yapıncaya kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2 Bitki Dokularından Metanol Ekstraktlarının Hazırlanması

Kontrol ve farklı DETA-NONOate konsantrasyonlarına (100 ve 1000 μM) maruz bırakılan *S. officinalis* yaprak dokuları laboratuvarında karanlıkta kurutulmuştur. Kurutulmuş 3'er gram yaprak dokusu porselen havanda kuru kuruya dövölerek toz haline getirilmiş, ağzı kapaklı cam şişelere alınmış ve şişelere 30 mL metanol ilave edilmiştir. Karışım 15 dakika çalkalayıcıda tutulmuştur (del Bano vd. 2003). Elde edilen karışım +4°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve filtre kağıdı kullanılarak süzülmüştür. Süzme sonrası kalan dokular tekrar cam kapaklı şişeye alınarak üzerine 30 mL metanol eklendikten sonra 30 dakika çalkalayıcıda tutulmuş ve karışım tekrar süzölerek son hacim yaklaşık 45 mL süzöntü elde edilmiştir. Elde edilen süzöntü vakumlu evaporatörde (+50°C'de) kurutulmuş ve kullanıncaya kadar +4°C'de saklanmıştır (del Bano vd. 2003).

3.3 Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir (Singleton ve Rossi 1965). Kontrol ve uygulamalara ait ekstrakt çözeltilerinden (1 mg/mL) 100 µL vidalı kapaklı cam deney tüplerine aktarılmış ve üzerine sırasıyla 2,4 mL distile su, 200 µL Folin-Ciocalteu ayracı, 600 µL sodyum karbonat (%20 Na₂CO₃) ve 700 µL distile su eklenerek vortekslenmiştir. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 saat inkübe edildikten sonra 760 nm dalga boyunda absorbands değerleri ölçülmüştür. Sonuçlar gallik asit (1, 0.5, 0.25, 0.125 ve 0.0625 mg/mL metanolde) ile elde edilen kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplanmış ve gallik asit eşdeğeri (µg GAE/mg ekstre) olarak belirtilmiştir.

3.4 Toplam Flavonoid Madde Miktarının Belirlenmesi

Toplam flavonoid madde miktarı alüminyum klorür kolorimetrik yöntemi ile belirlenmiştir (Pourmorad vd. 2006). Ekstrakt çözeltilerinden (1 mg/mL) 1000 µL ağzı vidalı kapaklı deney tüplerine alınmış ve üzerlerine sırasıyla 200 µL %10 alüminyum klorür (AlCl₃) ve 200 µL 1 M potasyum asetat (CH₃CO₂K) ilave edilmiştir. Reaksiyon karışımları oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edildikten sonra 415 nm dalga boyunda absorbands değerleri belirlenmiştir. Sonuçlar kersetin (10 – 50 µg/mL) ile elde edilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanmış ve kersetin (K) eşdeğeri olarak (µg KE/mg ekstre) belirlenmiştir.

3.5 Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

3.5.1 Toplam Antioksidan Kapasitenin Belirlenmesi

Toplam antioksidan aktivite fosfomolibdenyum yöntemi ile belirlenmiştir (Prieto vd. 1999). Ekstre çözeltileri (1 mg/mL) ve standart askorbik asit (AsA) çözeltilerinden 400 µL ağzı vidalı kapaklı cam tüplere alınmış ve üzerlerine 4 mL ayıraç çözeltisi (0.6 M sülfürik asit, 28 mM sodyum fosfat ve 4 mM amonyum molibdat) eklenerek vortekslenmiştir. Karışım 90 dakika süresince 95°C’de inkübe edilmiştir. Oluşan yeşil

renkli karışımın absorbans değeri 695 nm’de ölçülmüştür. Sonuçlar askorbik asit (AsA) ile elde edilen kalibrasyon eğrisinden hesaplanmış ve askorbik asit eşdeğeri (μg AAE/mg ekstre) olarak ifade edilmiştir.

3.5.2 DPPH Antiradikal Aktivitenin Belirlenmesi

Ekstraktların antiradikal aktivite DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemine göre belirlenmiştir (Lee vd. 1998). 80 μL ekstre çözeltileri (0,1–2 mg/mL) deney tüplerine alınmış ve üzerlerine 2000 μL DPPH çözeltisi (0.1 mM) eklenmiştir. 0.0098 g DPPH ışık geçirmeyen amber şişede 250 mL metanol kullanılarak hazırlanmış ve 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. Karışım vortekslendikten sonra oda sıcaklığında 30 dakika karanlıkta inkübe edilmiştir. Karışımların absorbans (A) değerleri 517 nm’de belirlenmiştir. Ekstrelerin serbest radikal temizleme kapasitesi DPPH absorpsiyonunun % inhibisyonu olarak aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Antiradikal aktivite (\% İnhibisyon)} = \frac{1 - A_{\text{Ekstrakt çözeltisi}}}{A_{\text{Kontrol çözeltisi}}} \times 100$$

3.5.3 Demir İyonu İndirgeyici Antioksidan Potansiyeli (FRAP) Testi

Ekstraktların demir iyonu indirgeyici antioksidan potansiyeli, [Fe (III) (TPTZ)₂]⁺³’in antioksidan tarafından [Fe (II) (TPTZ)₂]⁺²’ye indirgenmesine dayanan yöntemle yapılmıştır (Tuberoso vd. 2010). FRAP testinde oksidan olarak bir Fe (III) tuzu olan [Fe (III) (TPTZ)₂]⁺³ kullanılmıştır. 60 μL ekstrakt çözeltisi (0.5 mg/mL) 1800 μL FRAP ayırıcı ile karıştırılmış, 10 dakika 37°C’de inkübe edilmiş ve absorbansı 593 nm’de ölçülmüştür. Standart olarak kullanılan troloks (0, 50, 100, 250, 500 ve 750 μM) çözeltisi de 1800 μL FRAP ayırıcı ile karıştırılmış, 10 dakika 37°C’de inkübe edilmiş ve absorbansı 593 nm’de ölçülmüştür. Sonuçlar troloks (TR) eşdeğeri (μg TRE/mg ekstre) olarak ifade edilmiştir.

3.5.4 Bakır (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Testi

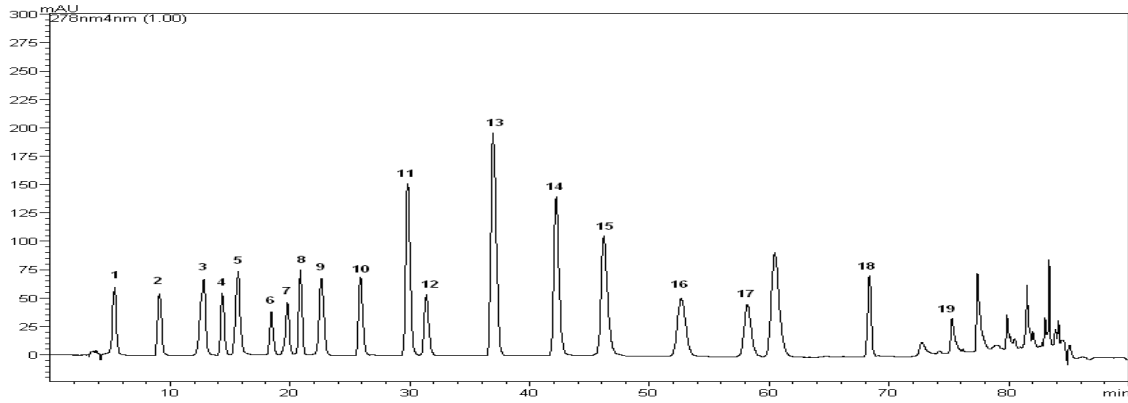
Ekstraktların bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi, Cu^{+2} indirgeme kapasitesine dayanan toplam antioksidan kapasite ölçüm yöntemine göre belirlenmiştir (Apak vd. 2006). 10 mM CuCl_2 , 7,5 mM neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) ve 1 mM amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltilerinin her birinden 1'er mL alınarak üzerine 100 μL ekstrakt çözeltisi (1 mg/mL) ve 1000 μL distile su eklenerek karıştırılmıştır. Karışım oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edildikten sonra absorbansı 450 nm'de belirlenmiştir. İşlem standart olarak kullanılan troloks (1 mM) çözeltisi için de tekrarlanmıştır. Ekstrelerin ve standardın bakır iyonu indirgeyici kapasiteleri, troloks bileşiğinin molar absorplama katsayısı ($\epsilon = 16.700 \text{ L mol}^{-1}\text{.cm}^{-1}$) kullanılarak belirlenmiş ve birimi mM TRE/mg ekstre olarak ifade edilmiştir.

3.6 Fenolik Bileşiklerin HPLC Analizleri

Ekstrelerin fenolik asit profili yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (HPLC-MS) (Shimadzu) kullanılarak belirlenmiştir. HPLC parmakizleri, C18 kolon (Agilent Eclipse XDB-C18, 250×4.60 mm, 5 μm) ve 20 μL örnek hacmi kullanılarak 30°C'de elde edilmiştir. Dalga boyu 278 nm ve akış hızı 0.8 mL/dk olarak ayarlanmıştır. HPLC cihazı ile ilgili özellikler Çizelge 3.1'de verilmiştir. Kantitatif analizde, her fenolik standart için oluşturulan kromatografik pik alanlarının entegrasyonuna dayalı olarak fenolik asitlerin miktarı hesaplanmıştır (Şekil 3.1).

Çizelge 3.1 Kullanılan Shimadzu marka HPLC cihazı ile ilgili özellikler

Parametre	Açıklama
Dedektör	SPD-M 10A vp DAD dedektör ($\lambda_{\text{max}} = 278 \text{ nm}$)
Auto sampler	SIL-10AD vp
System controller	SCL-10Avp
Pump	LC-10ADvp
Degasser	DGU- 14A
Column oven	CTO-10Avp
Kolon	Agilent Eclipse XDB-C18 (250×4,60 mm) 5 μm
Mobil faz	A: %3 asetik asit, B: Metanol
Akış Hızı	0.8 mL / dakika
Kolon sıcaklığı	30°C
Enjeksiyon hacmi	20 μL



Şekil 3.1 HPLC analizleri ile elde edilen standart kromatogramı. 1: Gallik asit, 2: protokateşik asit, 3: kateşhin, 4: *p*-hidroksi benzoik asit, 5: klorojenik asit, 6: kafeik asit, 7: epikateşhin, 8: şiringik asit, 9: vanilin, 10: *p*-kumarik asit, 11: ferulik asit, 12: sinapinik asit, 13: benzoik asit, 14: *o*-kumaric asit, 15: rutin, 16: hesperidin, 17: rozmarinik asit, 18: sinnamik asit, 19: luteolin.

3.7 Gerçek Zamanlı Kantitatif PCR Analizleri

Tıbbi adaçayı bitkilerinin taze yaprak dokularından total RNA izolasyonu, Bitki/Fungus Toplam RNA Purifikasyon Kiti (Norgen Biotek Corp., Ontario, Kanada) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Toplam RNA konsantrasyonu Qubit 2.0 florometre (Thermofisher, USA) belirlenmiştir. Saflaştırılmış total RNA'nın bütünlüğü ve boyut dağılımı %1.2'lik denatüre edici agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyama ile kontrol edilmiştir. RNA örnekleri sonraki analizlere kadar -80°C 'de saklanmıştır. Tek iplik cDNA (komplementer DNA=tamamlayıcı DNA) sentezi Xpert cDNA Synthesis Kiti (Grisp, Portekiz) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen tek iplik cDNA'lar gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonlarında (RT-QPCR veya qPCR) kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

Fenilalanin amonyum liyaz (*PAL*), 4-kumarat:KoA ligaz (*4CL*), tirozin amino-transferaz (*TAT*), sinamat 4-hidroksilaz (*C4H*), hidroksifenilpirüvat redüktaz (*HPPR*), rozmarinik asit sentaz (*RAS*) ve β -aktin genlerini kodlayan transkriptler ileri ve geri primerler kullanılarak amplifiye edilmiştir. Hedef cDNA'ların amplifikasyonu için kullanılacak primerler NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri

bankasındaki (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) tıbbi adaçayı genlerine göre tasarlanmıştır (Çizelge 3.2). Bitki hücrelerinde sürekli ifade olan β -aktin geni qPCR sonuçlarını normalize etmek için kullanılmıştır. qPCR amplifikasyonu, 95 °C’de 3 dk, sonrasında 95 °C’de 15 sn ve 60 °C’de 30 sn’lik 40 döngü olacak şekilde FastStart SYBR Green Master Mix (Roche, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kontrol bitkilerine göre NO uygulanmış fidelerde *PAL*, *4CL*, *TAT*, *C4H*, *HPPR* ve *RAS* mRNA ifadesindeki artış Livak ve Schmittgen (2001)’in standart $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile belirlenmiştir.

Çizelge 3.2 Gen ifade analizlerinde kullanılan primer listesi

Gen	Primer
<i>PAL</i>	İleri: 5'-GAAGAACACCGTGAGCCAAG-3' Geri: 5'-GCTCACACTCTTCTCCCCTT-3'
<i>4CL</i>	İleri: 5'-CCAGTTGCTTTTGTGTGAGATCG-3' Geri: 5'-CCTGATGGAGACTTGGGAATTGC-3'
<i>TAT</i>	İleri: 5'-GCACCTAAAGAAGATTGCTGAG-3' Geri: 5'-ATTGATGACCAACCAACCAAGG-3'
<i>C4H</i>	İleri: 5'-ATCTGAACCACCGCAACCTC-3' Geri: 5'-GTGAACACCATGTCCTGACC-3'
<i>HPPR</i>	İleri: 5'-GACTCCAGAAACAACCCACATT-3' Geri: 5'-CCCAGACGACCCTCCACAAGA-3'
<i>RAS</i>	İleri: 5'-ACTACTTGAGGTCGTCGCTC-3' Geri: 5'-CGGATTTGGCAGGAGATAGC-3'
<i>Actin</i>	İleri: 5'-TCTCTTGACAGAAGCCCCTCT-3' Geri: 5'-GATGGGGACTGTATGGCTGA-3'

3.8 İstatistik Analizler

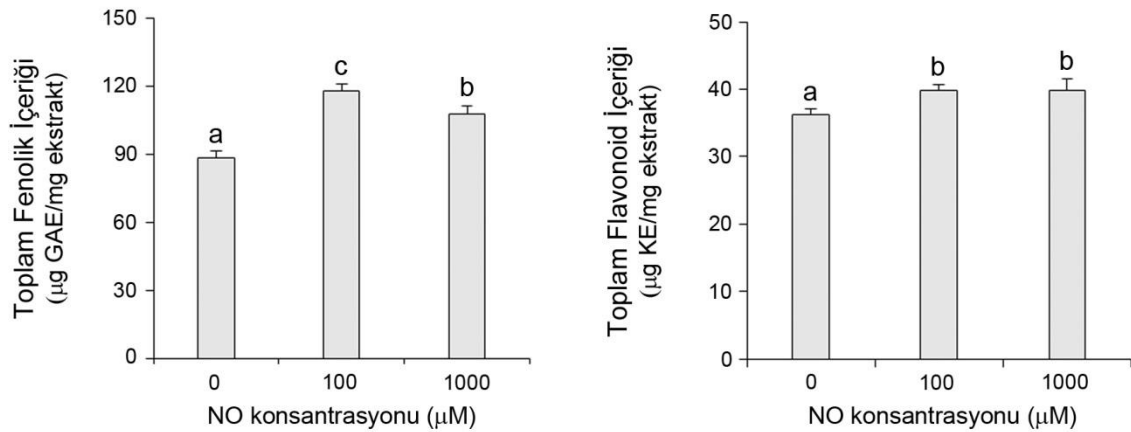
Denemeler, rastgele deneme deseninde düzenlenmiştir. Denemelerden elde edilen veriler en az üç tekrarlı olarak düzenlenmiş iki bağımsız denemeden elde edilmiştir. Analizlerden elde edilen veriler SPSS paket programı (SPSS ver. 22, Chicago, IL, USA) kullanılarak analiz edilmiştir. Analizlerden elde edilen ortalamalar arasındaki önemli farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi (DMRT) ile belirlenmiştir ($P < 0.05$).

4. BULGULAR

Kontrol ve spreyleme yoluyla yapraklarına 100 ve 1000 μM NO uygulanan tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) bitkilerinin yaprak dokularından metanol ekstraktları elde edilmiştir. Metanol ekstraktlarında toplam fenolik ve flavonoid içeriği, antioksidan kapasite ve fenolik asit kompozisyonu değerlendirilmiştir. Ayrıca yaprak dokularında hem fenilalanin hem de tirozin türevli yollarla fonksiyon gören anahtar enzimleri kodlayan genlerin ifade seviyeleri analiz edilmiştir.

4.1 Toplam Fenolik ve Flavonoid Madde İçeriği Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi

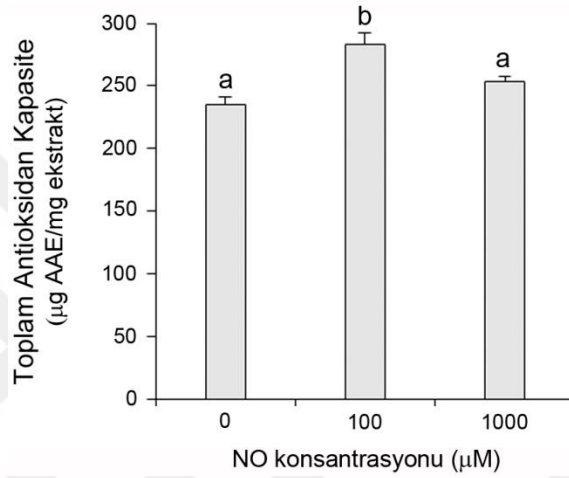
Yaprak metanol ekstraktlarının toplam fenolik ve flavonoid içerikleri belirlenmiştir (Şekil 4.1). Toplam fenolik içeriği kontrolde 88.2 μg GAE/mg ekstrakt olarak belirlenirken, bu içerik 100 ve 1000 μM NO uygulamalarında sırasıyla 117.8 μg GAE/mg ekstrakt ve 107.8 μg GAE/mg ekstrakt seviyesine çıkarak önemli düzeyde artış göstermiştir ($P<0.05$). Diğer taraftan, toplam flavonoid içeriği kontrolde 36.3 μg QE/mg ekstrakt olarak belirlenirken, her iki NO uygulamasında önemli düzeyde bir artışla 39.9 μg QE/mg ekstrakt olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında toplam fenolik ve flavonoid madde içerikleri. Farklı harfler (a–c), DMRT analizine göre ortalamalar arasındaki önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P<0.05$).

4.2 Toplam Antioksidan Kapasite Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi

Yaprak metanol ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesi Şekil 4.2'de verilmiştir. Toplam antioksidan kapasite, kontrolde 234.9 μg AAE/mg ekstrakt olarak belirlenirken, bu içerik önemli düzeyde bir artışla 100 μM NO uygulamasında 283.5 μg AAE/mg ekstrakt olarak belirlenmiştir. Diğer taraftan, kontrole göre 1000 μM NO uygulamasında toplam antioksidan kapasitedeki artış önemsiz bulunmuştur.

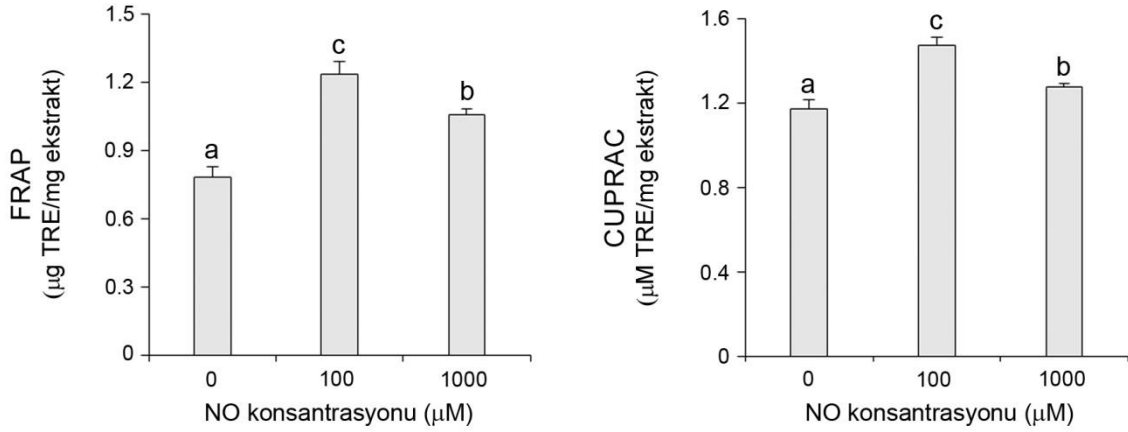


Şekil 4.2 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında toplam antioksidan kapasite. Farklı harfler (a–c), DMRT analizine göre ortalamalar arasındaki önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P<0.05$).

4.3 Demir ve Bakır İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi

Yaprak metanol ekstraktlarında demir indirgeyici antioksidan potansiyeli (FRAP) ve bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC) Şekil 4.3'de verilmiştir. FRAP değerleri kontrol bitkilerinde 0.78 μg TRE/mg ekstrakt olarak belirlenirken, bu değerler 100 ve 1000 μM NO uygulamalarında sırasıyla 1.23 μg TRE/mg ekstrakt ve 1.05 μg TRE/mg ekstrakt seviyesine çıkarak önemli düzeyde artış göstermiştir ($P<0.05$). Benzer şekilde, NO uygulamaları CUPRAC değerlerinde de kontrole göre önemli düzeyde artışa neden olmuştur. Kontrole ait ekstraktlarda CUPRAC değeri 1.17 μM TRE/mg ekstrakt olarak bulunurken, bu değerler 100 ve 1000 μM NO

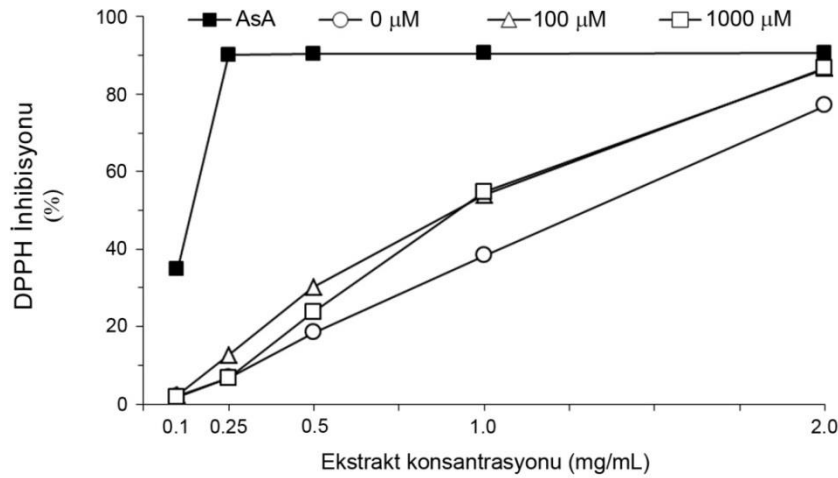
uygulamalarında sırasıyla 1.47 μM TRE/mg ekstrakt ve 1.27 μM TRE/mg ekstrakt seviyesine çıkarak önemli düzeyde artış göstermiştir



Şekil 4.3 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında toplam demir indirgeyici antioksidan potansiyeli (FRAP) ve bakır iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC). Farklı harfler (a–c), DMRT analizine göre ortalamalar arasındaki önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P < 0.05$).

4.4 Serbest Radikal Süpürücü Aktivite Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi

Yaprak metanol ekstraktlarında DPPH indirgeme potansiyelleri Şekil 4.4'de verilmiştir. Kontrole göre 100 ve 1000 μM NO uygulamaları DPPH indirgeme potansiyellerinde önemli düzeyde artışa neden olmuştur ($P < 0.05$)



Şekil 4.4 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında DPPH radikali indirgeme potansiyeli.

4.5 Fenolik Asit Kompozisyonu Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi

Yaprak metanol ekstraktlarının HPLC ile fenolik asit kompozisyonu Çizelge 4.1'de verilmiştir. Yaprak metanol ekstraktlarında baskın fenolik bileşik rozmarinik asit olarak belirlenmiş ve 100 µM NO uygulaması rozmarinik asit ve ferulik asit içeriğini kontrol bitkilerine göre önemli düzeyde artırmıştır ($P<0.05$). Diğer taraftan, 100 µM NO uygulaması kateşin konsantrasyonunu önemli düzeyde azaltırken, artan NO konsantrasyonu luteolin içeriğinde kademeli bir azalmaya neden olmuştur.

Çizelge 4.1 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında fenolik asit kompozisyonu

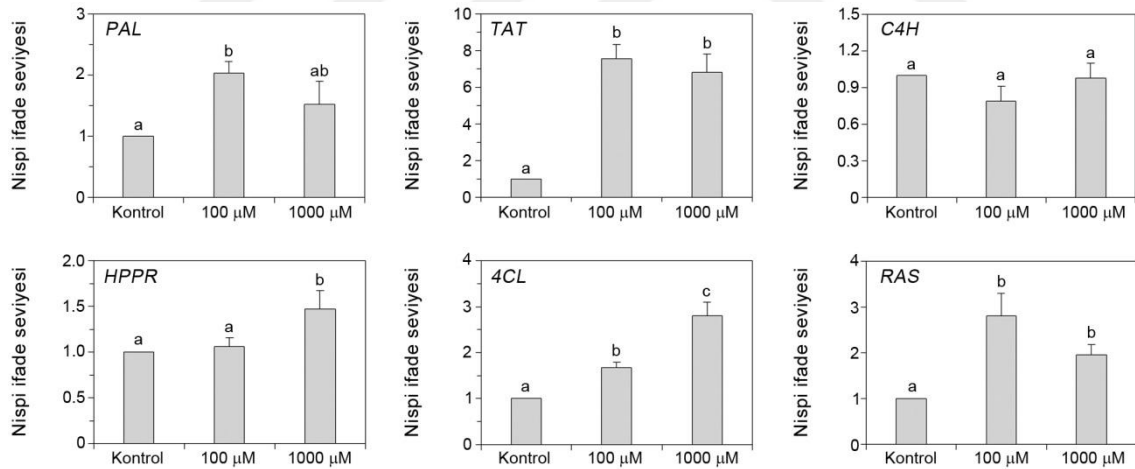
Fenolik Bileşikler	NO konsantrasyonu (µM)		
	0	100	1000
	Fenolik bileşik konsantrasyonu (µg/g)		
Ferulik asit	27.6 ± 3.82 ^{a*}	39.6 ± 1.47 ^b	30.5 ± 4.99 ^a
Kafeik asit	131.0 ± 1.91 ^a	138.0 ± 11.5 ^a	126.1 ± 19.8 ^a
Kateşin	317.7 ± 22.7 ^a	222.4 ± 15.1 ^b	256.3 ± 16.9 ^{ab}
Luteolin	89.6 ± 1.98 ^a	77.3 ± 3.54 ^b	66.6 ± 1.97 ^c
<i>p</i> -Hidroksi benzoik asit	277.4 ± 4.87 ^a	225.4 ± 17.6 ^a	270.7 ± 29.5 ^a
<i>p</i> -Kumarik asit	10.6 ± 0.48 ^a	9.23 ± 0.79 ^a	9.47 ± 1.26 ^a
Rozmarinik asit	4639.7 ± 128.7 ^a	5693.4 ± 199.0 ^b	5109.3 ± 199.6 ^{ab}
Sinamik asit	16.8 ± 0.34 ^a	16.7 ± 1.10 ^a	18.6 ± 1.42 ^a
Şiringik asit	190.2 ± 15.4 ^a	154.2 ± 22.1 ^a	171.3 ± 19.4 ^a

* Farklı harfler (a-c), DMRT analizine göre uygulamalar arasındaki önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P<0.05$).

4.6 Fenolik Asit Bileşiklerinin Biyosentezinde Yer Alan Genlerin İfadesi Üzerine Nitrik Oksidin Etkisi

Mevcut araştırmada, qRT-PCR analizleri kullanılarak fenolik bileşiklerin biyosentez yollarında fonksiyon gören fenilalanin amonyum liyaz (*PAL*), 4-kumarat:KoA ligaz (*4CL*), sinamat 4-hidroksilaz (*C4H*), tirozin amino-transferaz (*TAT*), hidroksifenilpirüvat redüktaz (*HPPR*) ve rozmarinik asit sentaz (*RAS*) olmak üzere altı

anahtar genin ifade seviyeleri değerlendirilmiştir. İstatistiksel analiz, *S. officinalis* yapraklarına spreyleme yoluyla uygulanan dışsal NO uygulamasının sonucu olarak ilgili genlerin ifade seviyelerinde önemli düzeyde ($P<0.05$) değişiklikler meydana gelmiştir (Şekil 4.5). Dışsal NO uygulaması *C4H* geni hariç, diğer genlerin transkript seviyelerinde önemli seviyede ($P<0.05$) artışa neden olmuştur. Fenilalanin türevi yolun ilk enzimi olan *PAL*'in ifade seviyesi, 100 μM NO uygulamasından sonra 2,03 kat artmıştır. Tirozin türevli yol ile ilgili olarak, *TAT* geninin ifade seviyesi 100 ve 1000 μM NO uygulamalarında sırasıyla 7,55 ve 6,83 kat artış göstermiştir. Tirozin türevli yolun diğer bir enzimi olan *HPPR*'nin maksimum transkript seviyesi, 1000 μM NO uygulamasında belirlenmiş ve kontrolden yaklaşık 1,47 kat daha yüksek seviyeye ulaşmıştır. Dışsal NO uygulaması, *4CL* transkript birikimini yapraklarda konsantrasyon artışına bağlı olarak artırmıştır. *RAS*'ın en yüksek transkript seviyesi, 100 μM NO uygulamasında belirlenirken, bu artış kontrole göre yaklaşık 2,81 kat olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5 Kontrol ve farklı NO uygulamalarına maruz bırakılan tıbbi adaçayı bitkisinin yaprak metanol ekstraktlarında fenolik asit biyosentez yollarındaki genlerin ifade seviyeleri üzerine etkileri. Farklı harfler (a–c), DMRT analizine göre ortalamalar arasındaki önemli düzeydeki farklılıkları göstermektedir ($P<0.05$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bazı değerli metabolitlerin varlığı nedeniyle *Salvia* türleri ilginç tedavi edici özelliklere sahiptir (Loizzo vd. 2014, Chung vd. 2015, Garcia vd. 2016, Ye vd. 2017). *Salvia* türlerinin en önemli biyoaktif bileşikler terpenler ve fenolik bileşikler (flavonoidler ve fenolik asitler) gibi sekonder metabolitlerdir (Ghorbani ve Esmailizadeh 2017, Xu vd. 2018). Bununla birlikte, fenolik asitlerin *Salvia* türlerinde geniş bir terapötik etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Liu vd. 2006, Dent vd. 2017). Çoğu bitkide nispeten düşük konsantrasyonlarda (%1'den az kuru ağırlık) oluşan sekonder metabolitler özel yapılarda veya organellerde birikirler ve birikimleri birçok faktöre bağlıdır (Tohidi vd. 2017, Németh-Zámoriné 2015). Bu nedenle, bu kimyasal bileşenlerin bitkilerde artırılması önemli hedeflerden biridir. İlaç ve diğer endüstrilerin bitki sekonder metabolitlerine olan yoğun talebi nedeniyle, bu bileşiklerin sentezini ve birikimini artırmak için birçok strateji uygulanmaktadır. En yaygın kullanılan yaklaşım, bitkilerin genetik potansiyelini geliştirmeye yönelik ıslah ve seleksiyon çalışmalarıdır. Bitkilerde sekonder metabolitlerin üretiminin artırılmasında kullanılan diğer bir yaklaşım ise elisitörlerin kullanılmasıdır (Isah vd. 2017, Gonçalves ve Romano 2018). Bakteri veya funguslar gibi mikroorganizmaların hücre duvarlarından kaynaklanan polisakkaritler (örneğin, kitin, pektin ve selüloz) sekonder metabolit üretimini artırmak için kullanılabilir (Narayani ve Srivastava 2017). Diğer taraftan, abiyotik elisitörler genellikle fiziksel (ışık, ozmotik, tuzluluk, kuraklık ve sıcaklık stresi), kimyasal (ağır metaller) ve hormonal (düşük konsantrasyonlarda uygulanan jasmonik asit, salisilik asit, gibberellik asit gibi) faktörler olarak gruplandırılmaktadır (Kandoudi ve Németh-Zámoriné 2022).

Nitrik oksit (NO), hem bitkilerde hem de hayvanlarda çok yönlü işlevlere sahip, lipofilik, gaz halinde bir sinyal molekülüdür (Klepper 1979). NO'nun lipofilik ve yayılabilir doğası, onu bitkilerdeki çeşitli sinyal süreçleri için mükemmel şekilde uygun hale getirir (Baudouin 2011). Aynı zamanda NO'nun posttranslasyonel protein modifikasyonları yoluyla enzimlerin ve bazı anahtar sinyal bileşenlerinin aktivitesinin değiştirilmesinde de aktif bir rol oynadığı bilinmektedir. Diğer taraftan, NO'nun bitki büyümesinde ve bitkilerdeki savunma tepkilerinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Son yıllarda NO, bitkilerde sekonder metabolit birikimini uyarmak için

elisitör olarak başarıyla kullanılmıştır (Santisree vd. 2020). Bazı araştırmalar NO uygulamalarının bitkilerde fenolik asit üretimini artırdığını göstermiştir (Li et al. 2017, Pirooz vd. 2022). Mevcut araştırmada, yapraklara NO uygulaması, *S. officinalis* bitkilerinde toplam fenolik ve flavonoid içeriğinde artışa neden olmuştur. Ayrıca yüksek NO konsantrasyonuna (1000 μ M) göre nispeten düşük NO konsantrasyonunun (100 μ M) özellikle toplam fenolik içeriğinde daha fazla artışa neden olduğu belirlenmiştir. Benzer olarak, in vitro koşullar altında *Melisa officinalis* fidelerinde NO uygulamasının fenolik ve flavonoid bileşiklerin toplam içeriğini artırdığı bildirilmiştir (Ai vd. 2009). Farklı çalışmada NO donörü SNP'nin *Calendula officinalis* bitkilerinde toplam fenolik ve flavonoid içeriğinin üretiminde ve antioksidan aktivitede önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Lone vd. 2021). Dışsal SNP uygulamasının *Catharanthus roseus* hücre kültürlerinde katarantin üretimi (Xu ve Dong 2005) ve *Hypericum perforatum*'da hiperisin üretiminde artışa neden olduğu bildirilmiştir (Xu vd. 2005). Ayrıca *Ginkgo biloba* kallus kültürlerinde tanenler, saponinler, fenoller ve toplam flavonoidler gibi sekonder metabolit üretiminin SNP uygulaması ile önemli ölçüde arttığı rapor edilmiştir (Hao vd. 2009). Bununla birlikte, hasat sonrası SNP uygulamasının elma ve şeftali meyvelerinde toplam fenolik ve flavonoid içeriğini artırdığı belirtilmiştir (Li et al. 2017, Ge vd. 2019).

Demir indirgeyici antioksidan potansiyel (FRAP) ve bakır indirgeyici antioksidan kapasitesi (CUPRAC), antioksidan özellikleri belirlemek için uygulanan önemli testlerdir. Bu testlerde antioksidanların elektron verme özelliğinden yararlanılarak demir ve bakır iyonları indirgenmektedir. İndirgeme gücü aynı zamanda antioksidan yeteneğinin de bir ölçüsü olarak kabul edilmektedir (Llorent-Martinez vd. 2017). FRAP testi ile ekstraktların antioksidan potansiyeli, TPTZ-Fe(III)'ü TPTZ-Fe(II) kompleksine indirgeme yeteneğinin ölçülmesi ile tahmin edilmektedir (Benzie ve Strain 1996). CUPRAC, Cu^{2+} 'ın Cu^{+} 'a dönüşümüne dayanan diğer bir önemli indirgeme gücü testidir. Mevcut araştırmada, dışsal NO uygulamalarına maruz kalan yapraklardan elde edilen ekstraktların FRAP ve CUPRAC değerleri kontrol ekstraktlarına göre artmıştır. Bununla birlikte, FRAP ve CUPRAC analizleriyle maksimum antioksidan aktivite, toplam fenolik ve flavonoid içeriği ile uyumlu olarak yapraklara 100 μ M NO püskürtüldüğünde belirlenmiştir. Mevcut bulgularla fenolik bileşenlerin tıbbi bitkilerin antioksidan

kapasitesine önemli ölçüde katkılar sağladığı söylenebilir. Birçok çalışmada, bu testler kullanılarak biyoaktif bileşikler ile antioksidan aktivite arasındaki korelasyon araştırılmıştır (Bajalan vd. 2017, Vosoughi vd. 2018). *Salvia* cinsinde uçucu terpenoidler ve polifenolik bileşiklerin, esas olarak bu cinsin özellikle antioksidan aktivite gibi biyolojik etkilerinden sorumlu olan iki ana ikincil metabolit grubu olduğu bildirilmiştir (Roby vd. 2013, Martins vd. 2015).

Rozmarinik asit ve türevlerinin, *S. officinalis* bitkilerinde radikal temizleme aktivitelerinden ve tedavi edici özelliklerinden sorumlu olan fenolik asitlerin önemli bir kısmını oluşturduğu bildirilmiştir (El-Feky ve Aboulthana 2016). Rozmarinik asit içeriğindeki elisitör teşvikli artışlar bazı bitki türlerinde bildirilmiştir (Krzyzanowska vd. 2012, Samadi vd. 2020, Hawrylak-Nowak vd. 2021). Mevcut çalışmada, *S. officinalis* yapraklarında en baskın fenolik asit olarak rozmarinik asit belirlenmiştir. Ayrıca kontrole göre 100 µM NO uygulaması rozmarinik asit içeriğinde önemli artışa neden olmuştur. Benzer olarak, *S. officinalis* yapraklarında 200 µM NO uygulamasının rozmarinik asit biyosentezini teşvik ettiği ve antioksidan kapasiteyi artırdığı bildirilmiştir (Pirooz vd. 2022). Farklı bir çalışmada, *in vitro* kültürde yetiştirilen *Melissa officinalis* bitkilerinde 5–20 µM SNP uygulamasının rozmarinik asit ve fenolik bileşiklerin üretimini teşvik ettiği, uçucu yağ ana bileşenlerinin çoğunu artırdığı ve antioksidan özelliklerini iyileştirdiği rapor edilmiştir (Esmaeilzadeh ve Rezaei 2018).

Rozmarinik asit, birçok bitki familyasında bulunan değerli bir sekonder metabolit olup, sağlık açısından önemli özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir (Marchev vd. 2021). *Salvia* türlerinde rozmarinik asitin biyosentezi için iki yolak bulunmaktadır. Bu iki dalın başlangıcında fenilalanin amonyum liyaz (PAL) ve tirozin aminotransferaz (TAT) ve sonunda rozmarinik asit sentaz (RAS) rozmarinik asit üretiminde önemli rol oynayan anahtar enzimlerdir. Rozmarinik asit ve diğer ikincil metabolitlerin içeriği, genetik ve çevresel koşulların etkileşimi ile güçlü bir şekilde düzenlenmektedir (Song ve Li 2015). Örneğin, fenilalanin türevli yolaktaki *PAL*, *4CL* ve *C4H* genlerinin ve tirozin türevli yolaktaki *TAT* ve *HPPR* genlerinin yanı sıra *RAS* geninin ifade seviyelerinin *S. officinalis*, *S. verticillata*, *S. miltiorrhiza* ve *S. khuzistanica* gibi farklı *Salvia* türlerinde dışsal metil jasmonat ve AgNO₃ uygulamaları ile uyarıldığı gösterilmiştir (Xing vd.

2018, Fatemi vd. 2019, Pesaraklu vd. 2021). Bitkilerde *PAL*, *C4H* ve *4CL* aktivitelerinin artmasının fenolik bileşikler, flavonoidler ve lignin birikimini etkili bir şekilde desteklediği rapor edilmiştir (Ge vd. 2017, Gómez-Plaza vd. 2017). Mevcut araştırmada, *S. officinalis* fidelerinin yaprak dokularında hem fenilalanin türevli (*PAL*, *4CL* ve *C4H*) hem de tirozin türevli (*TAT* ve *HPPR*) yolaklardaki anahtar genlerin yanı sıra *RAS* geninin ifade seviyesi NO uygulamasından önemli seviyede etkilenmiştir. Tıbbi bitkilere odaklanan bazı çalışmalarda da, elisitör uygulamalarının fenolik asit biyosentez yollarındaki önemli genlerin ifade seviyelerini değiştirdiğini göstermiştir. Pirooz vd. (2022), *S. officinalis* yapraklarında 200 µM NO uygulamasının *PAL*, *TAT* ve *RAS* genlerinin transkript seviyesini ve *PAL* aktivitesini artırdığını ve sonuç olarak fenolik ve flavonoid içeriğini artırdığını bildirmiştir. Benzer olarak, elma meyvelerinde hasat sonrası SNP uygulamasının *PAL*, *C4H* ve *4CL* enzim aktivitelerini artırarak fenolik bileşikler, flavonoidler ve ligninin birikimini teşvik ettiği gösterilmiştir (Ge vd. 2019). Bununla birlikte, 15 µM NO uygulanmış şeftali meyvelerinde *PAL*, *C4H* ve *4CL* enzimlerini kodlayan genlerin ifade seviyelerinin yanı sıra bu enzimlerin aktivitelerinin arttığı bildirilmiştir. Diğer taraftan, *S. miltiorrhiza* bitkilerinde *C4H*, *TAT* ve *HPPR* genlerinin aşırı ifadesinin tüylü köklerde rozmarinik asit içeriğini artırdığı belirtilmiştir (Xiao vd. 2011). *Prunella vulgaris* tüylü köklerinde aşırı *TAT* ifadesinin rozmarinik asit içeriğinin kontrole göre yaklaşık 2 kat artırdığı bildirilmiştir (Ru vd. 2017). Ayrıca, *RAS* ve *CYP98A14* genlerini aşırı ifade eden transgenik *S. miltiorrhiza* köklerinde rozmarinik asit içeriğinin sırasıyla 1,4 ve 1,9 kat arttığı rapor edilmiştir (Fu vd. 2020). Bu bulgular, hem fenilalanin hem de tirozin türevli yolakların, rozmarinik asitin *de novo* biyosentezini artırmak için NO tarafından uyarıldığını ileri sürebilir.

Sonuç olarak, mevcut çalışmada spreyleme yoluyla *S. officinalis* yapraklarına uygulanan NO elisitörünün fenolik asit birikimi ve antioksidan kapasiteyi teşvik ettiği ortaya konulmuştur. Fenolik asitlerin biyosentezindeki hem fenilalanin hem de tirozin türevli yolaklarda fonksiyon gören bazı anahtar genlerin (*PAL*, *TAT* ve *RAS*) Ek transkript seviyeleri NO uygulamaları ile artış göstermiştir. Mevcut araştırmanın sonuçları, dışsal NO uygulamalarının rozmarinik asit gibi flavonoidlerin ve fenoliklerin biyosentezini teşvik ederek *S. officinalis*'in tıbbi açıdan kalitesini ve sağlık açısından fonksiyonelliğini artırdığını göstermektedir.

6. KAYNAKLAR

- Acamovic T, Brooker J D, 2005, Biochemistry of Plant Secondary Metabolites and Their Effects in Animals, Proceedings of the Nutrition Society, 64, 403–412.
- Açıkgöz M A, 2020, Establishment of Cell Suspension Cultures of *Ocimum basilicum* L. and Enhanced Production of Pharmaceutical Active Ingredients, Industrial Crops and Products, 148, 112278.
- Ahmed S A, Baig M M V, 2014, Biotic Elicitor Enhanced Production of Psoralen in Suspension Cultures of *Psoralea corylifolia* L., Saudi Journal of Biological Sciences, 21, 499–504.
- Ai J, Zhou B, Jia J, 2009, The Effects of NO and AgNO₃ on Cell Growth and Salidroside Synthesis in *Rhodiola sachalinensis* A. Bor. Cell Suspension Culture, Journal of Microbial and Biochemical Technology, 1, 11–14.
- Akula R, Ravishankar G A, 2011, Influence of Abiotic Stress Signals on Secondary Metabolites in Plants, Plant Signaling and Behavior, 6, 1720–1731.
- Alara O R, Abdurahman N H, Ukaegbu C I, 2021, Extraction of Phenolic Compounds: A Review, Current Research in Food Science, 4, 200–214.
- Alcorn J, Whiting S, Viveky N, Di Y, Mansell K, Fowler S, vd., 2017, Protocol for a 24–Week Randomized Controlled Study of Once–Daily Oral Dose of Flax Lignan to Healthy Older Adults, JMIR Research Protocols, 6, e6817.
- Alu’datt M H, Rababah T, Alhamad M N, Al–Mahasneh M A, Almajwal A, Gammoh S, vd., 2017, A Review of Phenolic Compounds in Oil–Bearing Plants: Distribution, Identification and Occurrence of Phenolic Compounds, Food Chemistry, 218, 99–106.
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Esin Karademir S, Erçağ E, 2006, The Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity and Polyphenolic Content of Some Herbal Teas, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 57, 292–304.
- Applequist W L, Brinckmann J A, Cunningham A B, Hart R E, Heinrich M, Katerere D R, vd., 2020, Scientists’ Warning on Climate Change and Medicinal Plants, Planta Medica, 86, 10–18.
- Arts I C, Hollman P C, 2005, Polyphenols and Disease Risk in Epidemiologic Studies, The American Journal of Clinical Nutrition, 81, 317–325.

- Asadollahi M, Firuzi O, Jamebozorgi F H, Alizadeh M, Jassbi A R, 2019, Ethnopharmacological Studies, Chemical Composition, Antibacterial and Cytotoxic Activities of Essential Oils of Eleven *Salvia* in Iran, *Journal of Herbal Medicine*, 17, 100250.
- Attaran Dowom S, Abrishamchi P, Radjabian T, Salami S A, 2017, Enhanced Phenolic Acids Production in Regenerated Shoot Cultures of *Salvia virgata* Jacq. After Elicitation with Ag⁺ Ions, Methyl Jasmonate and Yeast Extract, *Industrial Crops and Products*, 103, 81–88.
- Bajalan I, Rouzbahani R, Pirbalouti A G, Maggi F, 2017, Antioxidant and Antibacterial Activities of the Essential Oils Obtained from Seven Iranian Populations of *Rosmarinus Officinalis*, *Industrial Crops and Products*, 107, 305–311.
- Balupillai A, Prasad R N, Ramasamy K, Muthusamy G, Shanmugham M, Govindasamy K, vd., 2015, Caffeic Acid Inhibits UVB-Induced Inflammation and Photocarcinogenesis Through Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ in Mouse Skin, *Photochemistry and Photobiology*, 91, 1458–1468.
- Barman K, Siddiqui M W, Patel V B, Prasad M, 2014, Nitric Oxide Reduces Pericarp Browning and Preserves Bioactive Antioxidants in Litchi, *Scientia Horticulturae*, 171, 71–77.
- Baudouin E, 2011, The Language of Nitric Oxide Signalling, *Plant Biology*, 13, 233–242.
- Bauer J, Kuehn S, Rollinger J M, Scherer O, Northoff H, Stuppner H, vd., 2012, Carnosol and Carnosic Acids from *Salvia officinalis* Inhibit Microsomal Prostaglandin E2 Synthase-1, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 342, 169–176.
- Bento C, Gonçalves A C, Jesus F, Simões M, Silva L R, 2017, Phenolic Compounds: Sources, Properties and Applications, Porter R, Parker N (Eds.), *Bioactive Compounds: Sources, Properties and Applications* (271–299), Nova Science Publishers, 431p, New York.
- Benzie I F, Strain J J, 1996, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Bellin D, Asai S, Delledonne M, Yoshioka H, 2013, Nitric Oxide as a Mediator for

- Defense Responses, *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 26, 271–277.
- Bettaieb I, Hamrouni–Sellami I, Bourgou S, Limam F, Marzouk B, 2011, Drought Effects on Polyphenol Composition and Antioxidant Activities in Aerial Parts of *Salvia officinalis* L., *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 1103–1111.
- Bistgani Z E, Siadat S A, Bakhshandeh A, Pirbalouti A G, Hashemi M, 2017, Interactive Effects of Drought Stress and Chitosan Application on Physiological Characteristics and Essential Oil Yield of *Thymus daenensis* Celak, *The Crop Journal*, 5, 407–415.
- Blahova J, Martiniakova M, Babikova M, Kovacova V, Mondockova V, Omelka R, 2021, Pharmaceutical Drugs and Natural Therapeutic Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus, *Pharmaceuticals*, 14, 806.
- Bradley J M, Davies K M, Deroles S C, Bloor S J, Lewis D H, 1998, The Maize Lc Regulatory Gene Up–Regulates the Flavonoid Biosynthetic Pathway of Petunia, *The Plant Journal*, 13, 381–392.
- Bravo L, 1998, Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance, *Nutrition Reviews*, 56, 317–333.
- Bruand C, Meilhoc E, 2019, Nitric Oxide in Plants: Pro–or Anti–senescence, *Journal of Experimental Botany*, 70, 4419–4427.
- Cai Z, Kastell A, Speiser C, Smetanska I, 2013, Enhanced Resveratrol Production in *Vitis vinifera* Cell Suspension Cultures by Heavy Metals without Loss of Cell Viability, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171, 330–340.
- Canadas R, González–Miquel M, González E J, Díaz I, Rodríguez M, 2021, Hydrophobic Eutectic Solvents for Extraction of Natural Phenolic Antioxidants from Winery Wastewater, *Separation and Purification Technology*, 254, 117590.
- Chamizo–Ampudia A, Sanz–Luque E, Llamas A, Galvan A, Fernandez E, 2017, Nitrate Reductase Regulates Plant Nitric Oxide Homeostasis, *Trends in Plant Science*, 22, 163–174.
- Chamizo–Ampudia A, Sanz–Luque E, Llamas Á, Ocaña–Calahorra F, Mariscal V, Carreras A, vd., 2016, A Dual System Formed by the ARC and NR Molybdoenzymes Mediates Nitrite–Dependent NO Production in *Chlamydomonas*, *Plant, Cell and Environment*, 39, 2097–2107.
- Chang J, Rimando A, Pallas M, Camins A, Porquet D, Reeves J, vd., 2012, Low–Dose

- Pterostilbene, but not Resveratrol, Is a Potent Neuromodulator in Aging and Alzheimer's Disease, *Neurobiology of Aging*, 33, 2062–2071.
- Chen F, Srinivasa Reddy M S, Temple S, Jackson L, Shadle G, Dixon R A, 2006, Multi-Site Genetic Modulation of Monolignol Biosynthesis Suggests New Routes for Formation of Syringyl Lignin and Wall-Bound Ferulic Acid in Alfalfa (*Medicago sativa* L.), *The Plant Journal*, 48, 113–124.
- Cheng H T, Li X L, Li X R, Li Y H, Wang L J, Xue M, 2012, Simultaneous Quantification of Selected Compounds from *Salvia* Herbs by HPLC Method and Their Application, *Food Chemistry*, 130, 1031–1035.
- Chu X, Ci X, He J, Jiang L, Wei M, Cao Q, vd., 2012, Effects of a Natural Prolyl Oligopeptidase Inhibitor, Rosmarinic Acid, on Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury in Mice, *Molecules*, 17, 3586–3598.
- Chun O K, Kim D O, Smith N, Schroeder D, Han J T, Lee C Y, 2005, Daily Consumption of Phenolics and Total Antioxidant Capacity from Fruit and Vegetables in the American Diet, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1715–1724.
- Chung Y C, Hsieh F C, Lin Y J, Wu T Y, Lin C W, Lin C T, vd., 2015, Magnesium Lithospermate B and Rosmarinic Acid, Two Compounds Present in *Salvia miltiorrhiza*, Have Potent Antiviral Activity Against Enterovirus 71 Infections, *European Journal of Pharmacology*, 755, 127–133.
- Corpas F J, González-Gordo S, Palma J M, 2020, Nitric Oxide: A Radical Molecule with Potential Biotechnological Applications in Fruit Ripening, *Journal of Biotechnology*, 324, 211–219.
- Corpas F J, González-Gordo S, Palma J M, 2021, Nitric Oxide (NO) Scaffolds the Peroxisomal Protein-Protein Interaction Network in Higher Plants, *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 2444.
- Costa P, Sarmiento B, Gonçalves S, Romano A, 2013, Protective Effects of *Lavandula viridis* L'Hér Extracts and Rosmarinic Acid against H₂O₂-Induced Oxidative Damage in A172 Human Astrocyte Cell Line, *Industrial Crops and Products*, 50, 361–365.
- Craft J D, Satyal P, Setzer W N, 2017, The Chemotaxonomy of Common Sage (*Salvia officinalis*) Based on the Volatile Constituents, *Medicines*, 4, 47.

- Cui Q, Du R, Liu M, Rong L, 2020, Lignans and Their Derivatives from Plants as Antivirals, *Molecules*, 25, 183.
- Dal Pra V, Bisol L B, Detoni S, Denti M, Grando J, Pollo C, vd., 2011, Anti-inflammatory Activity of Fractionated Extracts of *Salvia officinalis*, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7, 67–71.
- Davies K M, Schwinn K E, 2003, Transcriptional Regulation of Secondary Metabolism, *Functional Plant Biology*, 30, 913–925.
- Del Bano M J, Lorente J, Castillo J, Benavente–García O, Del Rio J A, Ortuño A, vd., 2003, Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution During the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*, Antioxidant Activity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4247–4253.
- Del Castello F, Nejamkin A, Cassia R, Correa–Aragunde N, Fernández B, Foresi N, vd., 2019, The Era of Nitric Oxide in Plant Biology: Twenty Years Tying up Loose Ends, *Nitric Oxide*, 85, 17–27.
- Deng C, Wang Y, Huang F, Lu S, Zhao L, Ma X, vd., 2020, SmMYB2 Promotes Salvianolic Acid Biosynthesis in the Medicinal Herb *Salvia miltiorrhiza*, *Journal of Integrative Plant Biology*, 62, 1688–1702.
- Dent M, Bursać Kovačević D, Bosiljkov T, Dragović–Uzelac V, 2017, Polyphenolic Composition and Antioxidant Capacity of Indigenous Wild Dalmatian Sage (*Salvia officinalis* L.), *Croatica Chemica Acta*, 90, 451–459.
- Di P, Zhang L, Chen J, Tan H, Xiao Y, Dong X, vd., 2013, ¹³C Tracer Reveals Phenolic Acids Biosynthesis in Hairy Root Cultures of *Salvia miltiorrhiza*, *ACS Chemical Biology*, 8, 1537–1548.
- Dias M C, Pinto D C, Silva A M, 2021, Plant Flavonoids: Chemical Characteristics and Biological Activity, *Molecules*, 26, 5377.
- Du G, Sun L, Zhao R, Du L, Song J, Zhang L, vd., 2016, Polyphenols: Potential Source of Drugs for the Treatment of Ischaemic Heart Disease, *Pharmacology and Therapeutics*, 162, 23–34.
- Durner J, Wendehenne D, Klessig D F, 1998, Defense Gene Induction in Tobacco by Nitric Oxide, Cyclic GMP, and Cyclic ADP–Ribose, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 10328–10333.

- Ehlting J, Büttner D, Wang Q, Douglas C J, Somssich I E, Kombrink E, 1999, Three 4-Coumarate: Coenzyme A Ligases in *Arabidopsis thaliana* Represent Two Evolutionarily Divergent Classes in Angiosperms, *The Plant Journal*, 19, 9–20.
- El Euch S K, Hassine D B, Cazaux S, Bouzouita N, Bouajila J, 2019, *Salvia officinalis* Essential Oil: Chemical Analysis and Evaluation of Anti-enzymatic and Antioxidant Bioactivities, *South African Journal of Botany*, 120, 253–260.
- El-Feky A M, Aboulthana W M, 2016, Phytochemical and Biochemical Studies of Sage (*Salvia officinalis* L.), *Pharmaceutical and Biosciences Journal*, 56–62.
- Eseberri I, Trepiana J, Léniz A, Gómez-García I, Carr-Ugarte H, González M, vd., 2022, Variability in the Beneficial Effects of Phenolic Compounds: A Review, *Nutrients*, 14, 1925.
- Esmailzadeh S, Rezaei A, 2018, Nitric Oxide Increased the Rosmarinic Acid and Essential Oil Production in *in vitro*-Cultured *Melissa officinalis*, *Journal of Medicinal Plants*, 17, 61–72.
- Evans W C, 2009, Trease and Evans' Pharmacognosy, Elsevier, 616p.
- Fait A, Batushansky A, Shrestha V, Yobi A, Angelovici R, 2020, Can Metabolic Tightening and Expansion of Co-expression Network Play a Role in Stress Response and Tolerance?, *Plant Science*, 293, 110409.
- Falcao L, Araujo M E M, 2011, Tannins Characterisation in New and Historic Vegetable Tanned Leathers Fibres by Spot Tests, *Journal of Cultural Heritage*, 12, 149–156.
- Farhat M B, Landoulsi A, Chaouch-Hamada R, Sotomayor J A, Jordán M J, 2013, Characterization and Quantification of Phenolic Compounds and Antioxidant Properties of *Salvia* Species Growing in Different Habitats, *Industrial Crops and Products*, 49, 904–914.
- Farhat N, Hussain S, Syed S K, Amjad M, Javed M, Iqbal M, vd., 2020, Dietary Phenolic Compounds in Plants: Their Antioxidant and Pharmacological Potential, *Postepy Biologii Komorki*, 47, 307–320.
- Fatemi F, Abdollahi M R, Mirzaieasl A, Dastan D, Garagounis C, Papadopoulou K, 2019, Identification and Expression Profiling of Rosmarinic Acid Biosynthetic Genes from *Satureja khuzistanica* under Carbon Nanotubes and Methyl Jasmonate Elicitation, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136, 561–573.

- Feldman P L, 1993, The Surprising Life of Nitric Oxide, Chemical and Engineering News, 71, 26–38.
- Ferraro V, Madureira A R, Sarmiento B, Gomes A, Pintado M E, 2015, Study of the Interactions Between Rosmarinic Acid and Bovine Milk Whey Protein α -lactalbumin, β -lactoglobulin and Lactoferrin, Food Research International, 77, 450–459.
- Floryszak-Wieczorek J, Milczarek G, Arasimowicz M, Ciszewski A, 2006, Do Nitric Oxide Donors Mimic Endogenous NO-Related Response in Plants?, Planta, 224, 1363–1372.
- Fraga C G, Croft K D, Kennedy D O, Tomás-Barberán F A, 2019, The Effects of Polyphenols and Other Bioactives on Human Health, Food and Function, 10, 514–528.
- Fu R, Shi M, Deng C, Zhang Y, Zhang X, Wang Y, vd., 2020, Improved Phenolic Acid Content and Bioactivities of *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots by Genetic Manipulation of RAS and CYP98A14, Food Chemistry, 331, 127365.
- Garcia C S, Menti C, Lambert A P F, Barcellos T, Moura S, Calloni C, vd., 2016, Pharmacological Perspectives from Brazilian *Salvia officinalis* (Lamiaceae): Antioxidant, and Antitumor in Mammalian Cells, Anais da Academia Brasileira de Ciências, 88, 281–292.
- Ge Y H, Li C Y, Lv J Y, Zhu D S, 2017, Effects of Thiamine on *Trichothecium* and *Alternaria* Rots of Muskmelon Fruit and the Possible Mechanisms Involved, Journal of Integrative Agriculture, 16, 2623–2631.
- Ge Y, Chen Y, Li C, Zhao J, Wei M, Li X, vd., 2019, Effect of Sodium Nitroprusside Treatment on Shikimate and Phenylpropanoid Pathways of Apple Fruit, Food Chemistry, 290, 263–269.
- George V C, Dellaire G, Rupasinghe H V, 2017, Plant Flavonoids in Cancer Chemoprevention: Role in Genome Stability, The Journal of Nutritional Biochemistry, 45, 1–14.
- Ghorbani A, Esmaeilizadeh M, 2017, Pharmacological Properties of *Salvia officinalis* and Its Components, Journal of Traditional and Complementary Medicine, 7, 433–440.
- Ghasemi Pirbalouti A, Rahmani Samani M, Hashemi M, Zeinali H, 2014, Salicylic Acid

- Affects Growth, Essential Oil and Chemical Compositions of Thyme (*Thymus daenensis* Celak.) under Reduced Irrigation, *Plant Growth Regulation*, 72, 289–301.
- Gonçalves S, Romano A, 2018, Production of Plant Secondary Metabolites by Using Biotechnological Tools, Vijayakumar R, Raja S S S (Eds.), *Secondary Metabolites–Sources and Applications* (81–99), Books on Demand, 148p.
- Gonçalves S, Mansinhos I, Rodríguez–Solana R, Pérez–Santín E, Coelho N, Romano A, 2019, Elicitation Improves Rosmarinic Acid Content and Antioxidant Activity in *Thymus lotocephalus* Shoot Cultures, *Industrial Crops and Products*, 137, 214–220.
- Gowd V, Jia Z, Chen W, 2017, Anthocyanins as Promising Molecules and Dietary Bioactive Components Against Diabetes–A Review of Recent Advances, *Trends in Food Science and Technology*, 68, 1–13.
- Gómez–Plaza E, Bautista–Ortín A B, Ruiz–García Y, Fernández–Fernández J I, Gil–Muñoz R, 2017, Effect of Elicitors on the Evolution of Grape Phenolic Compounds During the Ripening Period, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 977–983.
- Graf B A, Milbury P E, Blumberg J B, 2005, Flavonols, Flavones, Flavanones, and Human Health: Epidemiological Evidence, *Journal of Medicinal Food*, 8, 281–290.
- Grotewold E, Chamberlin M, Snook M, Siame B, Butler L, Swenson J, vd., 1998, Engineering Secondary Metabolism in Maize Cells by Ectopic Expression of Transcription Factors, *The Plant Cell*, 10, 721–740.
- Guo P, Wang J, Gao W, Liu X, Wu S, Wan B, vd., 2018, Salvianolic Acid B Reverses Multidrug Resistance in Nude Mice Bearing Human Colon Cancer Stem Cells, *Molecular Medicine Reports*, 18, 1323–1334.
- Gupta K J, Fernie A R, Kaiser W M, van Dongen J T, 2011, On the Origins of Nitric Oxide, *Trends in Plant Science*, 16, 160–168.
- Gupta S K, Mandal P, 2016, Assessment of the Effect of Nitric Oxide and Calcium Ion on the Therapeutic Potential and Oxidative Stress Status of Fenugreek Sprouts, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9, 271–277.
- Gupta A, Singh P P, Singh P, Singh K, Singh A V, Singh S K, vd., 2019, Medicinal

- Plants under Climate Change: Impacts on Pharmaceutical Properties of Plants, Choudhary K K, Kumar A, Singh A K (Eds.), Climate Change and Agricultural Ecosystems Current Challenges and Adaptation (181–209), Woodhead Publishing, 466p.
- Hamidpour M, Hamidpour R, Hamidpour S, Shahlari M, 2014, Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer, Journal of Traditional and Complementary Medicine, 4, 82–88.
- Hamilton A C, 2004, Medicinal Plants, Conservation and Livelihoods, Biodiversity and Conservation, 13, 1477–1517.
- Hancock J T, 2020, Nitric Oxide Signaling in Plants, Plants, 9, 1550.
- Hao G, Du X, Zhao F, Shi R, Wang J, 2009, Role of Nitric Oxide in UV–B–Induced Activation of PAL and Stimulation of Flavonoid Biosynthesis in *Ginkgo biloba* Callus, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 97, 175–185.
- Hashemi S M, Naghavi M R, 2016, Production and Gene Expression of Morphinan Alkaloids in Hairy Root Culture of *Papaver orientale* L. Using Abiotic Elicitors, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 125, 31–41.
- Hawrylak–Nowak B, Dresler S, Stasińska–Jakubas M, Wójciak M, Sowa I, Matraszek–Gawron R, 2021, NaCl–Induced Elicitation Alters Physiology and Increases Accumulation of Phenolic Compounds in *Melissa officinalis* L., International Journal of Molecular Sciences, 22, 6844.
- Hedge I C, Salvia L, 1972, Flora Europae, Tutin T G, Heywood V H, Burges N A, Moore D M, Valentine D H, Walters S M, Webb D A (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, 188p.
- Henry Y A, Ducastel B, Guissani A, 1997, Basic Chemistry of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides, Henry Y A, Guissani A, Ducastel B (Eds.), Nitric Oxide Research from Chemistry to Biology: EPR Spectroscopy of Nitrosylated Compounds (15–46), Springer, 331p, New York.
- Huang M, Wang P, Xu S, Xu W, Xu W, Chu K, vd., 2015, Biological Activities of Salvianolic Acid B from *Salvia miltiorrhiza* on Type 2 Diabetes Induced by High–Fat Diet and Streptozotocin, Pharmaceutical Biology, 53, 1058–1065.

- Humbal A, Pathak B, 2023, Influence of Exogenous Elicitors on the Production of Secondary Metabolite in Plants: A review ("VSI: Secondary Metabolites"), Plant Stress, 100166.
- Isah T, Umar S, Mujib A, Sharma M P, Rajasekharan P E, Zafar N, vd., 2018, Secondary Metabolism of Pharmaceuticals in the Plant *in vitro* Cultures: Strategies, Approaches, and Limitations to Achieving Higher Yield, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 132, 239–265.
- Ismayati M, Nakagawa–Izumi A, Ohi H, 2017, Structural Elucidation of Condensed Tannin from the Bark Waste of *Acacia crassicarpa* Plantation Wood in Indonesia, Journal of Wood Science, 63, 350–359.
- Jakovljević M, Jokić S, Molnar M, Jasić M, Babić J, Jukić H, vd., 2019, Bioactive Profile of Various *Salvia officinalis* L. Preparations, Plants, 8, 55.
- Jamwal K, Bhattacharya S, Puri S, 2018, Plant Growth Regulator Mediated Consequences of Secondary Metabolites in Medicinal Plants, Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 9, 26–38.
- Jiang K, Ma X, Guo S, Zhang T, Zhao G, Wu H, vd., 2018, Anti-inflammatory Effects of Rosmarinic Acid in Lipopolysaccharide-induced Mastitis in Mice, Inflammation, 41, 437–448.
- Jogawat A, Yadav B, Chhaya Lakra N, Singh A K, Narayan O P, 2021, Crosstalk Between Phytohormones and Secondary Metabolites in the Drought Stress Tolerance of Crop Plants: A Review, Physiologia Plantarum, 172, 1106–1132.
- Julkunen–Tiitto R, Nenadis N, Neugart S, Robson M, Agati G, Vepsäläinen J, vd., 2015, Assessing the Response of Plant Flavonoids to UV Radiation: An Overview of Appropriate Techniques, Phytochemistry Reviews, 14, 273–297.
- Kaling M, Kanawati B, Ghirardo A, Albert A, Winkler J B, Heller W, vd., 2015, UV–B Mediated Metabolic Rearrangements in Poplar Revealed by non-Targeted Metabolomics, Plant, Cell and Environment, 38, 892–904.
- Kamatou G P P, Viljoen A M, Gono–Bwalya A B, van Zyl R L, Van Vuuren S F, Lourens A C U, vd., 2005, The *in vitro* Pharmacological Activities and a Chemical Investigation of Three South African *Salvia* Species, Journal of Ethnopharmacology, 102, 382–390.
- Kandoudi W, Németh–Zámboriné É, 2022, Stimulating Secondary Compound

- Accumulation by Elicitation: Is It a Realistic Tool in Medicinal Plants *in vivo*?, *Phytochemistry Reviews*, 21, 2007–2025.
- Karpets Y V, Kolupaev Y E, 2017, Functional Interaction of Nitric Oxide with Reactive Oxygen Species and Calcium Ions at Development of Plants Adaptive Responses, *Journal of Karazin Kharkiv National University Series Biology*, 2, 6–31.
- Kaur G, Prakash P, Srivastava R, Verma P C, 2021, Enhanced Secondary Metabolite Production in Hairy Root Cultures Through Biotic and Abiotic Elicitors, Ramawat K G, Ekiert H M, Goyal S (Eds.), *Plant Cell and Tissue Differentiation and Secondary Metabolites Fundamentals and Applications* (625–660), Springer, 981p, Switzerland.
- Kessler A, Kalske A, 2018, Plant Secondary Metabolite Diversity and Species Interactions, *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 49, 115–138.
- Khan M, Al Azawi T N I, Pande A, Mun B G, Lee D S, Hussain A, vd., 2021, The Role of Nitric Oxide–Induced *ATILL6* in Growth and Disease Resistance in *Arabidopsis thaliana*, *Frontiers in Plant Science*, 12, 685156.
- Khan M, Ali S, Al Azzawi T N I, Saqib S, Ullah F, Ayaz A, vd., 2023, The Key Roles of ROS and RNS as a Signaling Molecule in Plant–Microbe Interactions, *Antioxidants*, 12, 268.
- Khoo H E, Azlan A, Tang S T, Lim S M, 2017, Anthocyanidins and Anthocyanins: Colored Pigments as Food, Pharmaceutical Ingredients, and the Potential Health Benefits, *Food and Nutrition Research*, 61, 1361779.
- Kim K H, Janiak V, Petersen M, 2004, Purification, Cloning and Functional Expression of Hydroxyphenylpyruvate Reductase Involved in Rosmarinic Acid Biosynthesis in Cell Cultures of *Coleus blumei*, *Plant Molecular Biology*, 54, 311–323.
- Kim S H, Jun C D, Suk K, Choi B J, Lim H, Park S, vd., 2006, Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro–Inflammatory Cytokine Production in Mast Cells, *Toxicological Sciences*, 91, 123–131.
- Klepper L, 1979, Nitric Oxide (NO) and Nitrogen Dioxide (NO₂) Emissions from Herbicide–Treated Soybean Plants, *Atmospheric Environment*, 13, 537–542.
- Kolbert Z S, Barroso J B, Brouquisse R, Corpas F J, Gupta K J, Lindermayr C, vd.,

- 2019, A Forty Year Journey: The Generation and Roles of NO in Plants, Nitric Oxide, 93, 53–70.
- Krga I, Milenkovic D, 2019, Anthocyanins: From Sources and Bioavailability to Cardiovascular–Health Benefits and Molecular Mechanisms of Action, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67, 1771–1783.
- Krzyzanowska J, Czubacka A, Pecio L, Przybys M, Doroszevska T, Stochmal A, vd., 2012, The Effects of Jasmonic Acid and Methyl Jasmonate on Rosmarinic Acid Production in *Mentha × piperita* Cell Suspension Cultures, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 108, 73–81.
- Kumar A, Mosa K A, Ji L, Kage U, Dhokane D, Karre S, vd., 2018, Metabolomics–Assisted Biotechnological Interventions for Developing Plant–Based Functional Foods and Nutraceuticals, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 58, 1791–1807.
- Landete J M, Arqués J, Medina M, Gaya P, de Las Rivas B, Muñoz R, 2016, Bioactivation of Phytoestrogens: Intestinal Bacteria and Health, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 56, 1826–1843.
- Lattanzio V, 2013, Phenolic Compounds: Introduction, Ramawat K G, Mérillon J M (Eds.), Natural Products (1543–1580), Springer, 4242p, Berlin/Heidelberg.
- Lee S C, Lee S W, Kim K S, Lee T J, Kim D H, Kim J C, 1998, O–Alkylation of Phenol Derivatives over Basic Zeolites, Catalysis Today, 44, 253–258.
- Lee Y J, Lee G J, Yi S S, Heo S H, Park C R, Nam H S, vd., 2016, Cisplatin and Resveratrol Induce Apoptosis and Autophagy Following Oxidative Stress in Malignant Mesothelioma Cells, Food and Chemical Toxicology, 97, 96–107.
- Leng J, Chen M H, Zhou Z H, Lu Y W, Wen X D, Yang J, 2017, Triterpenoids–Enriched Extract from the Aerial Parts of *Salvia miltiorrhiza* Regulates Macrophage Polarization and Ameliorates Insulin Resistance in High–Fat Fed Mice, Phytotherapy Research, 31, 100–107.
- Leshem Y A, 2000, The Biological Conquest of Nitric Oxide, Nitric Oxide in Plants Occurrence, Function and Use (3–23), Springer, 154p, Dordrecht.
- Levine A B, Punihale D, Levine T B, 2012, Characterization of the Role of Nitric Oxide and Its Clinical Applications, Cardiology, 122, 55–68.
- Li G, Zhu S, Wu W, Zhang C, Peng Y, Wang Q, vd., 2017, Exogenous Nitric Oxide

- Induces Disease Resistance Against *Monilinia fructicola* Through Activating the Phenylpropanoid Pathway in Peach Fruit, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 3030–3038.
- Li Y, Kong D, Fu Y, Sussman M R, Wu H, 2020, The Effect of Developmental and Environmental Factors on Secondary Metabolites in Medicinal Plants, *Plant Physiology and Biochemistry*, 148, 80–89.
- Li P, Yang X, Lee W J, Huang F, Wang Y, Li Y, 2021, Comparison Between Synthetic and Rosemary–Based Antioxidants for the Deep Frying of French Fries in Refined Soybean Oils Evaluated by Chemical and non–Destructive Rapid Methods, *Food Chemistry*, 335, 127638.
- Liang Z, Ma Y, Xu T, Cui B, Liu Y, Guo Z, vd., 2013, Effects of Absciscic Acid, Gibberellin, Ethylene and Their Interactions on Production of Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza* Bunge Hairy Roots, *PloS One*, 8, e72806.
- Lin D, Hu L, You H, Sarkar D, Xing B, Shetty K, 2010, Initial Screening Studies on Potential of High Phenolic–Linked Plant Clonal Systems for Nitrate Removal in Cold Latitudes, *Journal of Soils and Sediments*, 10, 923–932.
- Liu A H, Li L, Xu M, Lin Y H, Guo H Z, Guo D A, 2006, Simultaneous Quantification of Six Major Phenolic Acids in the Roots of *Salvia miltiorrhiza* and Four Related Traditional Chinese Medicinal Preparations by HPLC–DAD Method, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 48–56.
- Liu C W, Murray J D, 2016, The Role of Flavonoids in Nodulation Host–Range Specificity: An Update, *Plants*, 5, 33.
- Liu Y, Hu Y E Q, Zuo J, Yang L, Liu W, 2017, Salvianolic Acid B Inhibits Mitochondrial Dysfunction by up–Regulating Mortalin, *Scientific Reports*, 7, 43097.
- Llorent–Martínez E J, Ortega–Barrales P, Zengin G, Mocan A, Simirgiotis M J, Ceylan R, vd., 2017, Evaluation of Antioxidant Potential, Enzyme Inhibition Activity and Phenolic Profile of *Lathyrus cicera* and *Lathyrus digitatus*: Potential Sources of Bioactive Compounds for the Food Industry, *Food and Chemical Toxicology*, 107, 609–619.
- Loizzo M R, Abouali M, Salehi P, Sonboli A, Kanani M, Menichini F, vd., 2014, *In Vitro* Antioxidant and Antiproliferative Activities of Nine *Salvia* Species,

- Natural Product Research, 28, 2278–2285.
- Lone M L, Haq A U, Farooq S, Altaf F, Tahir I, 2021, Nitric Oxide Effectively Curtails Neck Bending and Mitigates Senescence in Isolated Flowers of *Calendula officinalis* L, Physiology and Molecular Biology of Plants, 27, 835–845.
- Lu Y, Foo L Y, 2000, Flavonoid and Phenolic Glycosides from *Salvia officinalis*, Phytochemistry, 55, 263–267.
- Ma S, Zhang D, Lou H, Sun L, Ji J, 2016, Evaluation of the Anti-inflammatory Activities of Tanshinones Isolated from *Salvia miltiorrhiza* var. *alba* Roots in THP-1 Macrophages, Journal of Ethnopharmacology, 188, 193–199.
- Maaliki D, Shaito A A, Pintus G, El-Yazbi A, Eid A H, 2019, Flavonoids in Hypertension: A Brief Review of the Underlying Mechanisms, Current Opinion in Pharmacology, 45, 57–65.
- Mahajan M, Kuiry R, Pal P K, 2020, Understanding the Consequence of Environmental Stress for Accumulation of Secondary Metabolites in Medicinal and Aromatic Plants, Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 18, 100255.
- Maia L B, Moura J J, 2015, Nitrite Reduction by Molybdoenzymes: A New Class of Nitric Oxide-Forming Nitrite Reductases, Journal of Biological Inorganic Chemistry, 20, 403–433.
- Mannu A, Melito S, Petretto G L, Manconi P, Pintore G M, Chessa M, 2022, Geographical Variation of the Chemical Composition in Essential Oils Extracted from Sardinian *Salvia verbenaca*, Natural Product Research, 36, 367–370.
- Marchev A S, Vasileva L V, Amirova K M, Savova M S, Koycheva I K, Balcheva-Sivenova Z P, vd., 2021, Rosmarinic Acid—from Bench to Valuable Applications in Food Industry, Trends in Food Science and Technology, 117, 182–193.
- Marchica A, Ascrizzi R, Flamini G, Cotrozzi L, Tonelli M, Lorenzini G, vd., 2021, Ozone as Eustress for Enhancing Secondary Metabolites and Bioactive Properties in *Salvia officinalis*, Industrial Crops and Products, 170, 113730.
- Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Henriques M, Silva S, Ferreira I C, 2015, Evaluation of Bioactive Properties and Phenolic Compounds in Different Extracts Prepared from *Salvia officinalis* L., Food Chemistry, 170, 378–385.

- Mattila P, Hellström J, 2007, Phenolic Acids in Potatoes, Vegetables, and Some of Their Products, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 152–160.
- Metsamuuronen S, Siren H, 2019, Bioactive Phenolic Compounds, Metabolism and Properties: A Review on Valuable Chemical Compounds in Scots Pine and Norway Spruce, *Phytochemistry Reviews*, 18, 623–664.
- Milder I E, Arts I C, van de Putte B, Venema D P, Hollman P C, 2005, Lignan Contents of Dutch Plant Foods: A Database Including Lariciresinol, Pinoresinol, Secoisolariciresinol and Matairesinol, *British Journal of Nutrition*, 93, 393–402.
- Mondal A, Bennett L L, 2016, Resveratrol Enhances the Efficacy of Sorafenib Mediated Apoptosis in Human Breast Cancer MCF7 Cells Through ROS, Cell Cycle Inhibition, Caspase 3 and PARP Cleavage, *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 1906–1914.
- Mooney M, Desnos T, Harrison K, Jones J, Carpenter R, Coen E, 1995, Altered Regulation of Tomato and Tobacco Pigmentation Genes Caused by the *Delila* Gene of *Antirrhinum*, *The Plant Journal*, 7, 333–339.
- Moreau M, Lindermayr C, Durner J, Klessig D F, 2010, NO Synthesis and Signaling in Plants—Where Do We Stand?, *Physiologia Plantarum*, 138, 372–383.
- Mutha R E, Tatiya A U, Surana S J, 2021, Flavonoids as Natural Phenolic Compounds and Their Role in Therapeutics: An Overview, *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 1–13.
- Naik P M, Al-Khayri J M, 2016, Abiotic and Biotic Elicitors—Role in Secondary Metabolites Production Through *in Vitro* Culture of Medicinal Plants, Shanker A, Shanker C (Eds.), *Abiotic and Biotic Stress in Plants: Recent Advances and Future Perspectives* (247–277), Books on Demand, 768p.
- Nanda S, Mohanty J N, Mishra R, Joshi R K, 2016, Metabolic Engineering of Phenyl Propanoids in Plants, Jha S (Ed.), *Transgenesis and Secondary Metabolism* (485–510), Springer, 649p, New York.
- Narayani M, Srivastava S, 2017, Elicitation: A Stimulation of Stress in *in vitro* Plant Cell/Tissue Cultures for Enhancement of Secondary Metabolite Production, *Phytochemistry Reviews*, 16, 1227–1252.
- Neilson E H, Goodger J Q, Woodrow I E, Møller B L, 2013, Plant Chemical Defense: At What Cost?, *Trends in Plant Science*, 18, 250–258.

- Németh–Zámboriné E, 2015, Natural Variability of Essential Oil Components, Baser K H C, Buchbauer G (Eds.), Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications (87–125), Taylor and Francis Group, 1128p, USA.
- Ninomiya K, Matsuda H, Shimoda H, Nishida N, Kasajima N, Yoshino T, vd., 2004, Carnosic Acid, a New Class of Lipid Absorption Inhibitor from Sage, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 14, 1943–1946.
- Ohara S, Yasuta Y, Ohi H, 2003, Structure Elucidation of Condensed Tannins from Barks by Pyrolysis/Gas Chromatography, Holzforschung, 57, 145–149.
- Osman N N, Abd El-Azime A S, 2013, *Salvia officinalis* L. (Sage) Ameliorates Radiation–Induced Oxidative Brain Damage in Rats, Arab Journal of Nuclear Sciences and Applications, 46, 297–304.
- Ozturk H, Terzi E H, Ozgen U, Duran A, Uygun I, 2014, Protective Effects of Rosmarinic Acid Against Renal Ischaemia/Reperfusion Injury in Rats, Journal of Pakistan Medical Association, 64, 260–265.
- Panche A N, Diwan A D, Chandra S R, 2016, Flavonoids: An Overview, Journal of Nutritional Science, 5, e47.
- Park W T, Arasu M V, Al–Dhabi N A, Yeo S K, Jeon J, Park J S, vd., 2016, Yeast Extract and Silver Nitrate Induce the Expression of Phenylpropanoid Biosynthetic Genes and Induce the Accumulation of Rosmarinic Acid in *Agastache rugosa* Cell Culture, Molecules, 21, 426.
- Pedro D, Ramos A, Lima C, Baltazar F, Pereira–Wilson C, 2010, Modulation of DNA Damage Prevention and Signaling Pathways in Diet Induced Colon Cancer Prevention, BMC Proceedings, 4, 53.
- Perry N S, Bollen C, Perry E K, Ballard C, 2003, *Salvia* for Dementia Therapy: Review of Pharmacological Activity and Pilot Tolerability Clinical Trial, Pharmacology Biochemistry and Behavior, 75, 651–659.
- Pesaraklu A, Radjabian T, Salami S A, 2021, Methyl Jasmonate and Ag⁺ as Effective Elicitors for Enhancement of Phenolic Acids Contents in *Salvia officinalis* and *Salvia verticillata*, as Two Traditional Medicinal Plants, South African Journal of Botany, 141, 105–115.
- Petersen M, Alfermann A W, 1988, Two New Enzymes of Rosmarinic Acid Biosynthesis from Cell Cultures of *Coleus blumei*: Hydroxyphenylpyruvate

- Reductase and Rosmarinic Acid Synthase, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 43, 501–504.
- Petersen M, Simmonds M S, 2003, Rosmarinic Acid, *Phytochemistry*, 62, 121–125.
- Petersen M, 2013, Rosmarinic Acid: New Aspects, *Phytochemistry Reviews*, 12, 207–227.
- Pietrofesa R A, Velalopoulou A, Arguri E, Menges C W, Testa J R, Hwang W T, vd., 2016, Flaxseed Lignans Enriched in Secoisolariciresinol Diglucoside Prevent Acute Asbestos–Induced Peritoneal Inflammation in Mice, *Carcinogenesis*, 37, 177–187.
- Pietta P, Minoggio M, Bramati L, 2003, Plant Polyphenols: Structure, Occurrence and Bioactivity, *Studies in Natural Products Chemistry*, 28, 257–312.
- Pilar B, Güllich A, Oliveira P, Ströher D, Piccoli J, Manfredini V, 2017, Protective Role of Flaxseed Oil and Flaxseed Lignan Secoisolariciresinol Diglucoside Against Oxidative Stress in Rats with Metabolic Syndrome, *Journal of Food Science*, 82, 3029–3036.
- Pirooz P, Amooaghaie R, Ahadi A, Sharififar F, Torkzadeh–Mahani M, 2022, Silicon and Nitric Oxide Synergistically Modulate the Production of Essential Oil and Rosmarinic Acid in *Salvia officinalis* under Cu Stress, *Protoplasma*, 259, 905–916.
- Planchet E, Kaiser W M, 2006, Nitric Oxide Production in Plants: Facts and Fictions, *Plant Signaling and Behavior*, 1, 46–51.
- Pourmorad F, Hosseinimehr S J, Shahabimajd N, 2006, Antioxidant Activity, Phenol and Flavonoid Contents of Some Selected Iranian Medicinal Plants, *African Journal of Biotechnology*, 5, 1142–1145.
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M, 1999, Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity Through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E, *Analytical Biochemistry*, 269, 337–341.
- Prochazkova D, Haisel D, Pavlikova D, 2014, Nitric Oxide Biosynthesis in Plants–The Short Overview, *Plant, Soil and Environment*, 60, 129–134.
- Radman R, Saez T, Bucke C, Keshavarz T, 2003, Elicitation of Plants and Microbial Cell Systems, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37, 91–102.

- Rahim W, Khan M, Al Azzawi T N I, Pande A, Methela N J, Ali S, vd., 2022, Exogenously Applied Sodium Nitroprusside Mitigates Lead Toxicity in Rice by Regulating Antioxidants and Metal Stress–Related Transcripts, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 9729.
- Rahmani Samani M, D’Urso G, Montoro P, Ghasemi Pirbalouti A, Piacente S, 2021, Effects of Bio–Fertilizers on the Production of Specialized Metabolites in *Salvia officinalis* L. Leaves: An Analytical Approach Based on LC–ESI/LTQ–Orbitrap/MS and Multivariate Data Analysis, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 197, 113951.
- Ramirez–Estrada K, Vidal–Limon H, Hidalgo D, Moyano E, Golenioswki M, Cusidó R M, vd., 2016, Elicitation, an Effective Strategy for the Biotechnological Production of Bioactive High–Added Value Compounds in Plant Cell Factories, *Molecules*, 21, 182.
- Randhir R, Lin Y T, Shetty K, 2004, Stimulation of Phenolics, Antioxidant and Antimicrobial Activities in Dark Germinated Mung Bean Sprouts in Response to Peptide and Phytochemical Elicitors, *Process Biochemistry*, 39, 637–646.
- Reinisalo M, Kårlund A, Koskela A, Kaarniranta K, Karjalainen R O, 2015, Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence Against Oxidative Stress and Aging–Related diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
- Ringli C, Bigler L, Kuhn B M, Leiber R M, Diet A, Santelia D, vd., 2008, The Modified Flavonol Glycosylation Profile in the *Arabidopsis rol1* Mutants Results in Alterations in Plant Growth and Cell Shape Formation, *The Plant Cell*, 20, 1470–1481.
- Ritmejerite E, Boughton B A, Bayly M J, Miller R E, 2020, Unique and Highly Specific Cyanogenic Glycoside Localization in Stigmatic Cells and Pollen in the Genus *Lomatia* (Proteaceae), *Annals of Botany*, 126, 387–400.
- Roby M H H, Sarhan M A, Selim K A H, Khalel K I, 2013, Evaluation of Antioxidant Activity, Total Phenols and Phenolic Compounds in Thyme (*Thymus vulgaris* L.), Sage (*Salvia officinalis* L.), and Marjoram (*Origanum majorana* L.) Extracts, *Industrial Crops and Products*, 43, 827–831.
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser W M, 2002, Regulation of Nitric Oxide (NO) Production by Plant Nitrate Reductase *in vivo* and *in vitro*, *Journal of*

- Experimental Botany, 53, 103–110.
- Rodrigo J, Springall D R, Uttenthal O, Bentura M L, Abadia–Molina F, Riveros–Moreno V, vd., 1994, Localization of Nitric Oxide Synthase in the Adult Rat Brain, Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences, 345, 175–221.
- Rolly N K, Imran Q M, Shahid M, Imran M, Khan M, Lee S U, vd., 2020, Drought–induced *AtbZIP62* Transcription Factor Regulates Drought Stress Response in Arabidopsis, Plant Physiology and Biochemistry, 156, 384–395.
- Roy S K, Roy D K, 2016, Use of Medicinal Plant and Its Vulnerability Due to Climate Change in Northern Part of Bangladesh, American Journal of Plant Sciences, 7, 1782.
- Ru M, Wang K, Bai Z, Peng L, He S, Wang Y, vd., 2017, A Tyrosine Aminotransferase Involved in Rosmarinic Acid Biosynthesis in *Prunella vulgaris* L, Scientific Reports, 7, 4892.
- Sallas L, Luomala E M, Utriainen J, Kainulainen P, Holopainen J K, 2003, Contrasting Effects of Elevated Carbon Dioxide Concentration and Temperature on Rubisco Activity, Chlorophyll Fluorescence, Needle Ultrastructure and Secondary Metabolites in Conifer Seedlings, Tree Physiology, 23, 97–108.
- Samadi S, Saharkhiz M J, Azizi M, Samiei L, Ghorbanpour M, 2020, Multi–Walled Carbon Nanotubes Stimulate Growth, Redox Reactions and Biosynthesis of Antioxidant Metabolites in *Thymus daenensis* celak. *in vitro*, Chemosphere, 249, 126069.
- Samanta A, Das G, Das S K, 2011, Roles of Flavonoids in Plants, International Journal of Pharmaceutical Sciences, 6, 12–35.
- Šamec D, Karalija E, Šola I, Vujčić Bok V, Salopek–Sondi B, 2021, The Role of Polyphenols in Abiotic Stress Response: The Influence of Molecular Structure, Plants, 10, 118.
- Santisree P, Sanivarapu H, Gundavarapu S, Sharma K K, Bhatnagar–Mathur P, 2020, Nitric Oxide as a Signal in Inducing Secondary Metabolites During Plant Stress, Mérillon J M, Ramawat K G (Eds.), Co–Evolution of Secondary Metabolites (593–621), Springer, 973p, Switzerland.
- Schieber A, Keller P, Carle R, 2001, Determination of Phenolic Acids and Flavonoids

- of Apple and Pear by High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography A*, 910, 265–273.
- Sharmila R, Manoharan S, 2012, Anti-tumor Activity of Rosmarinic Acid in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) Induced Skin Carcinogenesis in Swiss Albino Mice, *Indian Journal of Experimental Biology*, 50 187–194.
- Shi M, Huang F, Deng C, Wang Y, Kai G, 2019, Bioactivities, Biosynthesis and Biotechnological Production of Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza*, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 953–964.
- Siddiqui M H, Al-Whaibi M H, Basalah M O, 2011, Role of Nitric Oxide in Tolerance of Plants to Abiotic Stress, *Protoplasma*, 248, 447–455.
- Singleton V L, Rossi J A, 1965, Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Smeriglio A, Barreca D, Bellocchio E, Trombetta D, 2017, Proanthocyanidins and Hydrolysable Tannins: Occurrence, Dietary Intake and Pharmacological Effects, *British Journal of Pharmacology*, 174, 1244–1262.
- Song Z, Li X, 2015, Expression Profiles of Rosmarinic Acid Biosynthesis Genes in Two *Salvia miltiorrhiza* Lines with Differing Water-Soluble Phenolic Contents, *Industrial Crops and Products*, 71, 24–30.
- Stöhr C, 1999, Relationship of Nitrate Supply with Growth Rate, Plasma Membrane-Bound and Cytosolic Nitrate Reductase, and Tissue Nitrate Content in Tobacco Plants, *Plant, Cell and Environment*, 22, 169–177.
- Stöhr C, Ullrich W R, 2002, Generation and Possible Roles of NO in Plant Roots and Their Apoplastic Space, *Journal of Experimental Botany*, 53, 2293–2303.
- Suliman S S, Othman N, Noah N F M, Kahar I N S, 2023, Separation of Phenolic Compounds from Fruit Processing Wastewater Using Liquid Membrane Technology: A Short Review, *Biochemical Engineering Journal*, 109096.
- Sulusoglu M, 2014, Phenolic Compounds and Uses in Fruit Growing, *Türk Tarım ve Doğa Bilimleri Dergisi*, 1, 947–956.
- Tepe B, 2008, Antioxidant Potentials and Rosmarinic Acid Levels of the Methanolic Extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey, *Bioresource Technology*, 99,

1584–1588.

- Thakur M, Bhattacharya S, Khosla P K, Puri S, 2019, Improving Production of Plant Secondary Metabolites Through Biotic and Abiotic Elicitation, *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 12, 1–12.
- Tohidi B, Rahimmalek M, Arzani A, 2017, Essential Oil Composition, Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of *Thymus* Species Collected from Different Regions of Iran, *Food Chemistry*, 220, 153–161.
- Tuberoso C I G, Rosa A, Bifulco E, Melis M P, Atzeri A, Pirisi F M, vd., 2010, Chemical Composition and Antioxidant Activities of *Myrtus communis* L. Berries Extracts, *Food Chemistry*, 123, 1242–1251.
- Van Wyk B E, 2003, The Value of Chemosystematics in Clarifying Relationships in the Genistoid Tribes of Papilionoid Legumes, *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 875–884.
- Vattem D A, Randhir R, Shetty K, 2005, Cranberry Phenolics–Mediated Antioxidant Enzyme Response in Oxidatively Stressed Porcine Muscle, *Process Biochemistry*, 40, 2225–2238.
- Vergine M, Nicolì F, Negro C, Luvisi A, Nutricati E, Accogli R A, vd., 2019, Phytochemical Profiles and Antioxidant Activity of *Salvia* Species from Southern Italy, *Records of Natural Products*, 13, 215.
- Vogt T, 2010, Phenylpropanoid Biosynthesis, *Molecular Plant*, 3, 2–20.
- Vosoughi N, Gomarian M, Pirbalouti A G, Khaghani S, Malekpoor F, 2018, Essential Oil Composition and Total Phenolic, Flavonoid Contents, and Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extract under Chitosan Application and Irrigation Frequencies, *Industrial Crops and Products*, 117, 366–374.
- Walker J B, Sytsma K J, Treutlein J, Wink M, 2004, *Salvia* (Lamiaceae) Is not Monophyletic: Implications for the Systematics, Radiation, and Ecological Specializations of *Salvia* and Tribe Mentheae, *American Journal of Botany*, 91, 1115–1125.
- Wang P G, Xian M, Tang X, Wu X, Wen Z, Cai T, vd., 2002, Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications, *Chemical Reviews*, 102, 1091–1134.
- Wang B, Sun W, Li Q, Li Y, Luo H, Song J, vd., 2015, Genome–Wide Identification of

- Phenolic Acid Biosynthetic Genes in *Salvia miltiorrhiza*, *Planta*, 241, 711–725.
- Wang S J, Chen Q, Liu M Y, Yu H Y, Xu J Q, Wu J Q, vd., 2019a, Regulation Effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) on Hepatic Lipid Metabolism in OA Induced NAFLD Rats, *Food and Function*, 10, 7356–7365.
- Wang M, Toda K, Block A, Maeda H A, 2019b, TAT1 and TAT2 Tyrosine Aminotransferases Have both Distinct and Shared Functions in Tyrosine Metabolism and Degradation in *Arabidopsis thaliana*, *Journal of Biological Chemistry*, 294, 3563–3576.
- Webb A L, McCullough M L, 2005, Dietary Lignans: Potential Role in Cancer Prevention, *Nutrition and Cancer*, 51, 117–131
- Willis K, 2017, *State of the World's Plants 2017*, Royal Botanic Gardens Kew, London.
- Xia N, Daiber A, Förstermann U, Li H, 2017, Antioxidant Effects of Resveratrol in the Cardiovascular System, *British Journal of Pharmacology*, 174, 1633–1646.
- Xiao Y, Zhang L, Gao S, Saechao S, Di P, Chen J, vd., 2011, The *c4h*, *tat*, *hppr* and *hppd* Genes Prompted Engineering of Rosmarinic Acid Biosynthetic Pathway in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Cultures, *PLoS One*, 6, e29713.
- Xie L, Su H, Sun C, Zheng X, Chen W, 2018, Recent Advances in Understanding the Anti-obesity Activity of Anthocyanins and Their Biosynthesis in Microorganisms, *Trends in Food Science and Technology*, 72, 13–24.
- Xing B, Yang D, Guo W, Liang Z, Yan X, Zhu Y, vd., 2015, Ag⁺ as a More Effective Elicitor for Production of Tanshinones than Phenolic Acids in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots, *Molecules*, 20, 309–324.
- Xing B, Yang D, Liu L, Han R, Sun Y, Liang Z, 2018, Phenolic Acid Production is More Effectively Enhanced than Tanshinone Production by Methyl Jasmonate in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134, 119–129.
- Xu M, Dong J, 2005, Elicitor-Induced Nitric Oxide Burst is Essential for Triggering Catharanthine Synthesis in *Catharanthus roseus* Suspension Cells, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67, 40–44.
- Xu M J, Dong J F, Zhu M Y, 2005, Nitric Oxide Mediates the Fungal Elicitor-Induced Hypericin Production of *Hypericum perforatum* Cell Suspension Cultures

- Through a Jasmonic–Acid–Dependent Signal Pathway, *Plant Physiology*, 139, 991–998.
- Xu J, Wei K, Zhang G, Lei L, Yang D, Wang W, vd., 2018, Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacology of Chinese *Salvia* Species: A Review, *Journal of Ethnopharmacology*, 225, 18–30.
- Xu J, Wang W, Li Y, 2019, Dough Properties, Bread Quality, and Associated Interactions with Added Phenolic Compounds: A Review, *Journal of Functional Foods*, 52, 629–639.
- Yadav B, Jogawat A, Rahman M S, Narayan O P, 2021, Secondary Metabolites in the Drought Stress Tolerance of Crop Plants: A Review, *Gene Reports*, 23, 101040.
- Yang C Q, Fang X, Wu X M, Mao Y B, Wang L J, Chen X Y, 2012, Transcriptional Regulation of Plant Secondary Metabolism, *Journal of Integrative Plant Biology*, 54, 703–712.
- Yasir F, Wahab A T, Choudhary M I, 2018, Protective Effect of Dietary Polyphenol Caffeic Acid on Ethylene Glycol–Induced Kidney Stones in Rats, *Urolithiasis*, 46, 157–166.
- Ye Y T, Zhong W, Sun P, Wang D, Wang C, Hu L M, vd., 2017, Apoptosis Induced by the Methanol Extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in non–Small Cell Lung Cancer Through PTEN–Mediated Inhibition of PI3K/Akt Pathway, *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 107–116.
- Zajacz Á, Gyémánt G, Vittori N, Kandra L, 2007, Aleppo Tannin: Structural Analysis and Salivary Amylase Inhibition, *Carbohydrate Research*, 342, 717–723.
- Zhang B, Zheng L P, Wang J W, 2012, Nitric Oxide Elicitation for Secondary Metabolite Production in Cultured Plant Cells, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 93, 455–466.
- Zhang S, Yan Y, Wang B, Liang Z, Liu Y, Liu F, vd., 2013, Selective Responses of Enzymes in the Two Parallel Pathways of Rosmarinic Acid Biosynthetic Pathway to Elicitors in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Root Cultures, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 645–651.
- Zhang Y, Cai P, Cheng, G, Zhang Y, 2022, A Brief Review of Phenolic Compounds Identified from Plants: Their Extraction, Analysis, and Biological Activity, *Natural Product Communications*, 17, 1934578–211069721.

- Zhang Z, Li X, Sang S, McClements D J, Chen L, Long J, vd., 2022, Polyphenols as Plant-Based Nutraceuticals: Health Effects, Encapsulation, Nano-Delivery, and Application, *Foods*, 11, 2189.
- Zhao J, Davis L C, Verpoorte R, 2005, Elicitor Signal Transduction Leading to Production of Plant Secondary Metabolites, *Biotechnology Advances*, 23, 283–333.
- Zhao S, Zhang J, Tan R, Yang L, Zheng X, 2015, Enhancing Diterpenoid Concentration in *Salvia miltiorrhiza* Hairy Roots Through Pathway Engineering with Maize C1 Transcription Factor, *Journal of Experimental Botany*, 66, 7211–7226.

