

## **Endemik Mor Mercan (*Origanum sipyleum* L.) Bitkisinin In Vitro Çoğaltımı**

**Selay DOĞAN<sup>1\*</sup>**  **Neşe ADANACIOĞLU<sup>2</sup>**  **Erdinç OĞUR<sup>3</sup>** 

<sup>1,2,3</sup> **Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, İzmir/ TÜRKİYE**

<sup>1</sup><https://orcid.org/0000-0003-0589-3963>

<sup>2</sup><https://orcid.org/0000-0001-9009-8635>

<sup>3</sup><https://orcid.org/0000-0002-4496-2995>

\*Corresponding author (Sorumlu yazar): [selay.eldogan@tarim.orman.gov.tr](mailto:selay.eldogan@tarim.orman.gov.tr)

Received (Geliş tarihi): 25.10.2021 Accepted (Kabul tarihi): 09.06.2022

**ÖZ:** Türkiye'nin endemik bitki türlerinden biri olan "Mor Mercan" adıyla bilinen *Origanum sipyleum* L., Lamiaceae familyasından olup yüksek tıbbi ve aromatik değere sahiptir. *Origanum* türlerinin antikanserojenik, sitotoksik, antibakteriyel, antidiyabetik, antifungal, antiviral, insektisidal etkilerinin olduğunu çeşitli bilimsel çalışmalar gösterilmiştir. Bununla birlikte, genetik kaynakların korunmasında değerli ve tehlike altındaki tıbbi bitkilerin hızlı bir şekilde çoğaltımı konusunda yeni araçlar sağlayan ileri biyoteknolojik yöntemler ile *Origanum sipyleum* L. nin çoğaltımı hakkında çok az bilimsel çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışma, İzmir/Bozdağ'dan toplanan *Origanum sipyleum* L. genetik kaynak materyalinin biyoteknolojik yöntemlerden biri olan *in vitro* teknikler kullanılarak çoğaltılması amacıyla yapılmıştır. İki eksplant (nodal segment ve sürgün ucu) tipi ve dört farklı ortamın; (MS+0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA; MS+1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA; ½MS+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA; ½MS+ 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA) *Origanum sipyleum* L.'un sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna etkileri araştırılmıştır. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (5,56 adet/eksplant) 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+ 0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA içeren MS ortamında büyüyen nodal eksplantlardan elde edilmiştir. Geliştirilen bitkicikler, toprak-perlit (2:1) karışımından oluşan saksı karışımına başarıyla nakledilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Origanum sipyleum* L., *in vitro* çoğaltım, endemik tıbbi bitkiler, genetik kaynaklar.

### **In Vitro Propagation of Endemic Mor Mercan Plant (*Origanum sipyleum* L.)**

**ABSTRACT:** *Origanum sipyleum* L. known as "Mor Mercan" is one of the endemic plant species of Turkey, belonging to the Lamiaceae family, and carrying highly valuable medicinal and aromatic properties. Many scientific studies have shown that *Origanum* spp have anticarcinogenic, cytotoxic, antibacterial, antidiabetic, antifungal, antiviral, and insecticidal effects. However, there are very few scientific studies on the propagation of *Origanum sipyleum* L. using advanced biotechnological methods that provide new means for conserving genetic resources and rapid multiplication of valuable and endangered medicinal plants. Therefore, this study was conducted for propagation of plant genetic resource material of *Origanum sipyleum* L. that was collected from İzmir/Bozdağ using *in vitro* techniques which is a biotechnological method. Effects of two types of explants (nodes and shoot tips) and four different media (MS+0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA; MS+1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP+0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA; ½MS+ 0.5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA; ½MS+ 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA) on shoot number and shoot length of *Origanum sipyleum* L. were investigated. The highest shoots per explant (5.56) were obtained from nodal explants growing on MS medium containing 1.0 mg L<sup>-1</sup> BAP+ 0.1 mg L<sup>-1</sup> IAA. Developed plantlets were successfully transplanted into potting mixture of soil-perlite(2:1).

**Keywords:** *Origanum sipyleum* L., *in vitro* propagation, endemic medicinal plants, genetic sources.

## GİRİŞ

Çok eski çağlardan günümüze dek tıbbi ve aromatik bitkiler ilaç yapımında kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle sentetik veya yarı sentetik hammaddelerden üretilen modern ilaçların sebep olduğu yan etkilerden dolayı, doğal kaynaklardan elde edilen ilaçlar—tercih sebebi olmaktadır (Karaoğlan, 2011). Tıbbi bitkilerin, alternatif tıpta tamamlayıcı olarak kullanımı hızlı gelişen toplumlarda, özellikle de gelir ve eğitim seviyesi daha yüksek kişilerce oldukça fazladır (Akin, 2020). Dünya sağlık örgütüne göre; gelecek yıllarda tüm dünyada bitkilerin tedavide kullanılacağı öngörülmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkiler, “doğadan toplanan” ve “kültürü yapılan” olmak üzere iki gruba ayrılmakta, dünya genelinde ticareti yapılan bitkilerin önemli bölümü ise doğadan toplananlardan oluştuğu bilinmektedir (Arslan, 2014; Acıbuca ve Budak, 2018).

Çoğu tıbbi ve aromatik bitkiyi bünyesinde bulunduran Lamiaceae familyası dünya üzerinde 250 cins ve 7000 civarında tür ile yayılış göstermektedir (Mesquita ve ark., 2019). Ayrıca, Kapalı tohumlular (Angiospermler) arasında Asteraceae ve Fabaceae familyalarından sonra en kalabalık (8602 takson) familyadır. Ballıbabagiller olarak da bilinen Lamiaceae familyası üyeleri uçucu yağ içeriklerince zengindir; *Rosmarinus*, *Mentha*, *Origanum*, *Thymus*, *Lavandula*, *Melissa* gibi familyanın en bilinen üyeleri alternatif tıp, gıda, kozmetik alanında geniş kullanımıyla yüksek ekonomik önem taşır (Uyanık, 2017). Türkiye Lamiaceae familyası üyeleri arasında yer alan, kekik adıyla pazarlanan ve tüketilen, *Origanum* ve *Thymus* türleri dünya üretiminde ilk sıralarda yer almaktadır (Acıbuca ve Budak, 2018).

*Origanum* spp., genellikle ılıman iklimlerde, kalkerli kayalıklarda doğal yayılış alanına sahip çalimsı bitkilerdir (Bayar ve Çınar, 2020; Anonim, 2021). Dünya’da 44 *Origanum* türü (51 takson) bulunmakla birlikte, ülkemizde *Origanum* spp. cinsi 15’i endemik olmak üzere 34 takson ile temsil edilmektedir (Dirmenci ve ark., 2018a, b; Anonim, 2021).

Türkiye’de yayılış gösteren çok sayıda farklı *Origanum* türü mevcut olup tüm *Origanum* spp. sınıflandırmasının %60’ının ülkemizde yetişmesi sebebiyle de Türkiye kekiğın anavatamı konumundadır (Kintzios, 2002; Tunca ve Yeşilyurt, 2017).

Ülkemizde ‘kekik, merzengüş, mercanköşk’ olarak bilinen *Origanum* spp.’nin antioksidan, antikanserojen, sitotoksik, antibakteriyel, antidiyabetik, antifungal, antiviral, insektisidal gibi birçok etkisinin olduğu ve eski tarihlerden beri tıpta kullanıldığı birçok bilimsel çalışmada bildirilmektedir (Nakipođlu ve ark., 2007; Karaođlan, 2011; Puškárová ve ark., 2017; Kaska, 2018; Zhou ve ark., 2021). *Origanum* türleri arasında yer alan, halk arasında “Mor mercan” ismi ile de tanınan spil kekiği *Origanum sipyleum* L., gösterişli çiçeklere sahip endemik bir türümüzdür. *Origanum sipyleum*’un çiçekleri geleneksel olarak çay yapımında, vejetatif kısmı ise yemeklerde kullanılır. Fenolik, flavonoid ve tanen bileşiklerince zengin ve doğal bir antioksidan kaynağıdır (Kaska, 2018).

Tıbbi ve aromatik özellikleri nedeniyle ülkemizde yaygın kullanıma sahip olan *Origanum* türleri doğadan toplanarak pazarlanmaktadır. Ancak, doğadan toplama, bitki türlerinin popülasyonlarını azaltmaktadır. Bu yüzden, *Origanum* genetik çeşitliliğimizin sürdürülebilirliği açısından uygun çoğaltma yöntemlerinin belirlenmesi çok önemlidir.

Bazı biyoteknolojik yöntemler, doğada yetişen bitkilerin kitlesel çoğaltılmasında değerli araçlardır. Bitki doku kültürü tekniği, biyoteknolojik yöntemlerden biri olup özellikle nadir ve endemik bitki türlerinin sürdürülebilirliğinin sağlanması amacıyla orta süreli korunması yanında geleneksel yöntemlerle üretimi zor olan bitki türlerinin çoğaltılmasında alternatif bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır (Doğan ve Çağlar, 2020). *In vitro* mikroçoğaltım çalışmaları, sınırlı zaman aralığında çok sayıda bitkicik elde edilmesinde oldukça pratik ve uygulanabilir yöntemlerden biridir (Bhojwani ve Razdan, 1996; Thomas, 2007; Doğan ve Çağlar, 2020). Doku kültürü tekniklerinden biri olan mikroçoğaltım yönteminde

tam bitki oluşturabilme potansiyeline sahip farklı bitki parçaları yapay besin ortamlarına inokule edilmekte ve steril şartlarda fenotipik ve genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitki seri şeklinde çoğaltılabilmektedir (Mansuroğlu ve Gürel, 2001). Çoğaltılması planlanan hedef bitki türlerinin gereksinim duyduğu besin ve kültürel istekleri hakkında yeterli bilgi mevcut ise mikroçoğaltım tekniği ile çoğaltım mümkündür. Ancak, süregelen biyoçeşitliliğin ürünü olan çoğu yeni bitki taksonlarının yetiştirme koşulları ve besin istekleri hakkında net bilgiler hali hazırda mevcut değildir. Bununla birlikte, farklı yayılış alanlarında yetişen aynı türe ait bitkilerin dahi besin isteklerinde görülen değişkenlik göz ardı edilemeyecek derecede önemlidir. Tüm bu sebeplerin etkileri düşünüldüğünde bitki doku kültürü çalışmalarında aynı taksonda yapılan araştırmaların sonuçları birbirinden farklılık gösterebilmektedir.

Ülkemizde, doğal yayılış alanına sahip ve endemizm oranı yüksek olan *Origanum* cinsine ait farmakolojik (Karaoğlu, 2011), moleküler (Dirmenci ve ark., 2018a, b), ıslah ön çalışmaları (Gürtunca, 2011; Bayar ve Çınar, 2020), kültüre alma çalışmaları (Mancak, 2002) ve uçucu yağ analizleri (Kaçar ve ark., 2006) gibi birçok çalışma mevcuttur.

Son yıllarda dünyada ve ülkemizde *Origanum* cinsinin doku kültürü teknikleriyle *in vitro* çoğaltımına yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Bu çalışmalarda *O. vulgare* L. (Shetty ve ark., 1995), *O. syriacum* L. (Arafeh ve ark., 2003), *O. minutiflorum* L. (Özkum, 2007), *O. bastetatum* (Socorro ve ark., 1998) türleri ele alınmış ve sürgün ucu, boğum araları, nodal segmentler gibi farklı eksplant kaynakları kullanılmıştır (Sevindik ve ark., 2017). Bunları takiben, Atar ve Çölgeçen (2019) *Origanum onites* türü ile yapmış oldukları çalışmada ekplant kaynağı olarak kotiledon, hipokotil, epikotil, genç primer yaprakları, apikal meristem kullandığı çalışmasında MS ortamında farklı kinetin konsantrasyonlarında gelişimi kıyaslamıştır. Türker ve Hatipoğlu (2018) ise *Origanum syriacum* L. var. *bevanii* ile yapmış oldukları çalışmalarında, yaprak diski, sap boğumu, tepe ve yan tomurcuk eksplantlarını MS ortamı içerisine ilave edilen farklı konsantrasyon ve kombinasyon-

larındaki bitki büyüme düzenleyicilerinde kültüre alma çalışması yürütmüşlerdir. Bununla birlikte, Oluk ve Çakır (2009) Manisa - Spil Dağından toplanan *Origanum sipyleum* L. bitkisini 1 mg/l BAP içeren modifiye edilmiş MS ortamında sürgün ucu ekplantlarını; Sevindik ve ark. (2017) ise Bursa Uludağ'dan toplanan *Origanum sipyleum* 'un nodal eksplantlarını farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyici içeren MS ortamında kültüre almışlardır.

Yukarıda özetlendiği gibi ülkemizde henüz ticari boyutta üretime alınmadığı için sadece sezonunda doğadan toplanarak değerlendirilebilen; ülkemizin endemik tıbbi ve aromatik bitkilerinden *Origanum sipyleum* L.'nin *in vitro* şartlarda çoğaltımına yönelik oldukça sınırlı sayıda bilimsel çalışma (Oluk ve Çakır, 2009; Sevindik ve ark., 2017) bulunmaktadır. *Origanum sipyleum* L. genetik kaynaklarının korunarak sürdürülebilir kullanımının sağlanması açısından hızlı çoğaltım çalışmalarının artırılmasına ihtiyaç vardır.

Bu sebeplerle, sunulan bu çalışmada *Origanum sipyleum* L. bitkisinin hızlı çoğaltım tekniklerinden biri olan doku kültürü teknikleriyle çoğaltım amaçlanmıştır.

*Origanum sipyleum*'un nodal segment ve sürgün ucu olmak üzere iki farklı eksplantı 6-Benzil Amino Pürin (BAP) ve İndol Asetik Asit (IAA) içeren Murashige and Skoog (MS) ve ½MS bazal ortamlarında kültüre alınmıştır. Yapılan bu çalışmada, *in vitro* şartlarda besin ortamı ve eksplant tiplerinin sürgün sayısı ve sürgün uzunluğu üzerindeki etkisi incelenmiştir.

## MATERYAL ve METOT

### Bitkisel materyal ve sterilizasyonu

*Origanum sipyleum*'a ait vejetatif bitki materyali, İzmir/Bozdağ'dan, 2018 yılı Eylül ayında toplanmıştır. Doğadaki popülasyonlarına zarar vermemek amacıyla sınırlı miktarda toplanan *Origanum sipyleum* bitkisini çoğaltmak üzere öncelikle stok kültür oluşturulmuştur. Bu amaçla toplanan bitki materyali Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü, Bitki Doku Kültürü Merkez Laboratuvarı'na getirilerek sterilizasyon işlemleri uygulanmıştır.

Bitki materyalleri toprak ve tozdan arındırılması amacıyla, çeşme suyu altında 30 dakika süre ile yıkanmıştır. Ardından yüzey sterilizasyonu için, %0,2'lik fungusit çözeltisi içerisinde 20 dakika süre ile karıştırıcıda çalkalanmıştır. Beher içerisindeki fungusit süzülerek eksplantlar saf su ile 2-3 defa yıkanmış, sonraki işlemler steril kabin içerisinde %70'lik etil alkolde 1 dakika süre ile bekletilerek devam etmiştir. Saf su ile alkolden arındırılan eksplantlar, 15 dakika süre ile içerisinde 2 damla Tween 20 eklenen %20'lik çamaşır suyu (%5 NaOCl) solüsyonunda bekletilmiş, ardından steril saf su ile 3 defa yıkanarak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır. Yüzeyi NaOCl'den arındırılmış olan eksplantlar bir pens yardımı ile whatman filtre kağıdı üzerine alınarak kurutulmuştur.

Yüzey sterilizasyonu yapılmış vejetatif bitki materyallerinin sürgün uçları steril kabin içerisinde pens ve bistüri yardımıyla kesilmiş ve 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP içeren MS besin ortamlarında kültüre alınmıştır.

*In vitro* çoğaltım çalışmalarında kullanılan stok kültür ortamlarının içerdiği bitki büyüme düzenleyici (0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP), bazı tıbbi ve aromatik bitkilerde (*Mentha rotundifolia*, *Lavandula dentata*) yapılan *in vitro* çalışmalar (Benahmed ve ark., 2018; Echeverrigaray ve ark., 2005) göz önünde bulundurularak belirlenmiştir.

Denemede eksplant kaynağı olarak, 6 haftalık stok kültürden dikkatlice ve rastgele seçilen *in vitro* bitkicikler kullanılmıştır.

#### ***In vitro* çoğaltım için kültüre alma**

*In vitro* çoğaltım çalışmalarında, 4 farklı besin ortamı (MS+0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA; MS+1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA; ½MS+ 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA; ½MS+ 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA) kullanılmıştır. Kontrol ortamına ise bitki büyüme düzenleyici (BBD) ilavesi yapılmamıştır.

Denemelerde kullanılan besin ortamlarının tümü MS (Murashige ve Skoog, 1962 ) tuzları, %3 sukroz (w/v) ve ortamları katılaştırmak amacıyla 7 gL<sup>-1</sup> agar içermiştir. İçerisine bitki büyüme

düzenleyicilerin eklendiği besin ortamlarının pH'ı 5,8'e ayarlandıktan sonra, 121 °C'de 20 dakika süre ile otoklavda sterilize edilmiştir. Mikroçoğaltım denemesinde içerisine 15 mL besin ortamı dökülerek hazırlanan deney tüpleri (15 cm, Sigma Aldrich) kullanılmıştır.

Tüm uygulamalarda kültüre alma işlemleri steril şartlarda, laminar kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Steril filtre kağıdı üzerinde 2 farklı eksplant kesiti (nodal segment ve sürgün ucu) alınarak hazırlanan besin ortamlarında kültüre alınmıştır.

#### **Kültür şartları**

Uygulamalarda kullanılan eksplantlar, beyaz florasan ışık (3000 lüks) ile aydınlatılan (16/8 saat aydınlık/karanlık) 24±1 °C iklim odalarında kültüre alınmıştır. Kültürler, her 6 haftanın sonunda aynı içeriğe sahip yeni besin ortamlarına aktarılarak alt kültüre alınmıştır. Bitkiciklerin sürgün oluşumu ve sürgün uzunluğu 2 alt kültür sonunda gözlemlenmiştir.

#### **Aklimatizasyon**

Denemelerde, 2 alt kültür sonunda gelişimleri devam eden ve sağlıklı köklenen bitkicikler deney tüplerinden dikkatli bir şekilde çıkartılmış, besin ortamından arındırılmak üzere çeşme suyu ile yıkanmıştır. Bitkicikler, otoklav edilmiş toprak: perlit karışımı (2:1 v/v) ile doldurulan plastik pet bardaklar içerisine, her bir bardağa 1 bitkicik olacak şekilde dikkatlice aktarılmıştır. Bitkiciklerin nem kaybını engellemek amacıyla bardakların üzeri şeffaf plastik pet bardaklar ile kapatılmış, yapraklar aralıklı olarak spreyle sulandırılmıştır. Sıcaklık (25 °C), oransal nem (%85-90) ve ışık şiddeti (7000 lüks) olan sera şartlarında, 3 hafta süre ile bekletilen bitkiciklerin canlılık oranları yüzde (%) olarak belirlenmiştir.

#### **İstatistiksel analiz**

Stok kültürde gelişen bitkiciklerin gelişimlerinde sürgün ucu ya da sürgün sayısı gözlemi yapılmamış olup, istatistik değerlendirmelere tabi tutulmamıştır. *In vitro* çoğaltım çalışmalarının tüm denemeleri Tesadüf Parselleri Deneme Desenine (TPDD) göre düzenlenmiştir. Deneme, 3 tekerrürlü, her tekerrürde 10 deney tüpü ve her tüp içerisinde

1 eksplant olacak şekilde kurulmuştur. Çalışmada, elde edilen gözlem ve ölçüm sonuçlarına ilişkin verilerin değerlendirilmesi amacıyla, MS Excel programı kullanılmıştır. *In vitro* çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin analizleri IBM SPSS Statistlik paket programı ile yapılmıştır. Bu çalışmada 4 farklı çoğaltım ortamı ve iki farklı eksplant tipinin, kardeş sayısı ve sürgün uzunluğu üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla iki yönlü varyans analizi yapılarak LSD testi uygulanmıştır (Steel ve Torrie, 1980; Yurtsever, 1984; Çimen, 2015).

## BULGULAR ve TARTIŞMA

### *In vitro* çoğaltım bulguları

Farklı besin ortamlarının sürgün sayısı ve sürgün uzunluğuna etkisini gösteren deneme sonuçları Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelge 1'de görüldüğü gibi en iyi sürgün oluşumu 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA (2 nolu ortamda) içeren MS besin ortamından, eksplant başına düşen sürgün sayısı ortalama 5,12 (adet/eksplant) olarak, nodal tip eksplantlarda gözlenmiştir.

Yapılan *in vitro* çoğaltım çalışmasında kontrol grubunda gelişen bitkilerde sürgün sayısı 3,17 (adet/eksplant) ile en düşük değer elde edilmiştir.

Şekil 1'de *Origanum sipyleum* bitkisinin *in vitro* koşullardaki gelişimi görülmektedir. Bitki büyüme

düzenleyicilerden olan sitokininler, çeşitli bitki eksplant tipleri üzerinde, sürgün rejenerasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Farklı *Origanum* spp. türlerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda kullanılan kotiledon, apikal meristem, yaprak diski, sap boğumu, tepe ve yan tomurcuk gibi kullanılan farklı eksplant tiplerinin çoğaltımlarında da sitokinin grubu bitki büyüme düzenleyicilerin tercih edildiği ve olumlu sonuçları bilinmektedir (Atar ve Çölgeçen, 2019; Türker ve Hatipoğlu, 2018). BAP, sitokinin grubu bir bitki büyüme düzenleyicisi olup, yaygın olarak organogenesisi teşvik etmek amacıyla kullanılmaktadır (Kancherla ve Bhalla, 2003; Te-chato ve ark., 2008). Farklı besin ortamı uygulamalarından elde edilen veriler istatistiki olarak değerlendirildiğinde, besin ortamının sürgün sayısı üzerinde etkisinin önemli olduğu ( $p \leq 0,05$ ) tespit edilmiştir. Besin ortamlarının sürgün uzunluğuna etkisi ise istatistiksel açıdan ( $p > 0,05$ ) önemli bulunmamıştır.

Özkum (2007) endemik bir tür olan *Origanum minutiflorum* bitkisine ait farklı eksplant tiplerini (yaprak, hipokotil, tek nodal segment ve sürgün ucu) MS ve Gamborg (B5) ortamlarına ilave edilen BAP-NAA konsantrasyonlarının olduğu besiyerlerinde kültüre aldığı, en iyi sürgün çoğaltımının çalışmamıza benzer şekilde kullanılan nodal segment eksplantlarından MS ortamında elde edildiğini bildirmiştir.

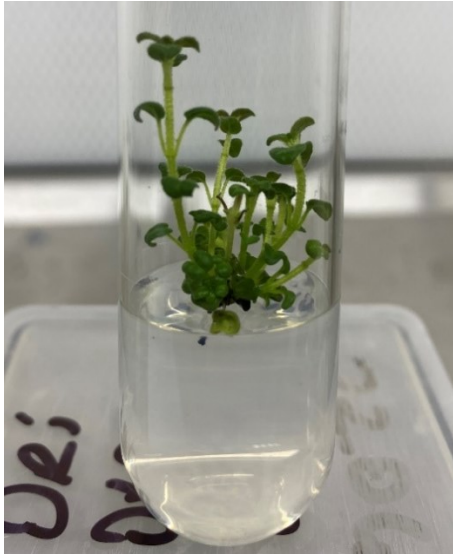
Çizelge 1. Besin ortamlarının sürgün sayısı (adet/eksplant) ve sürgün uzunluğuna (cm) etkisi.  
Table 1. Effect of nutrient media on shoots numbers (number/explant) and shoot length (cm).

Ortam No Medium No.	Ortam Medium	Sürgün sayısı (adet/eksplant) Shoot number (number/explant)	Standart sapma (Standard deviation)	Sürgün uzunluğu (cm) Shoot length (cm)	Standart Sapma Standard deviation
1	MS 0,5 mgL <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL <sup>-1</sup> IAA	3,25 c*	0,68337	2,03 <sup>bd</sup>	0,05164
2	MS 1,0 mgL <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL <sup>-1</sup> IAA	5,12 a	0,83187	2,02	0,21370
3	½ MS 0,5 mgL <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL <sup>-1</sup> IAA	3,70 bc	0,80747	1,92	0,04082
4	½ MS 1,0 mgL <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL <sup>-1</sup> IAA	4,57 ab	0,46762	2,12	2,05759
5	Kontrol / Control	3,17 c	0,95747	1,64	0,49535

\*Farklı harfler uygulamalar arasındaki istatistiksel farklılığı ifade etmektedir  $p \leq 0,05$

\*Different letters indicate statistical differences between treatments at  $p \leq 0,05$

öd: önemli değil (ns: not significant).



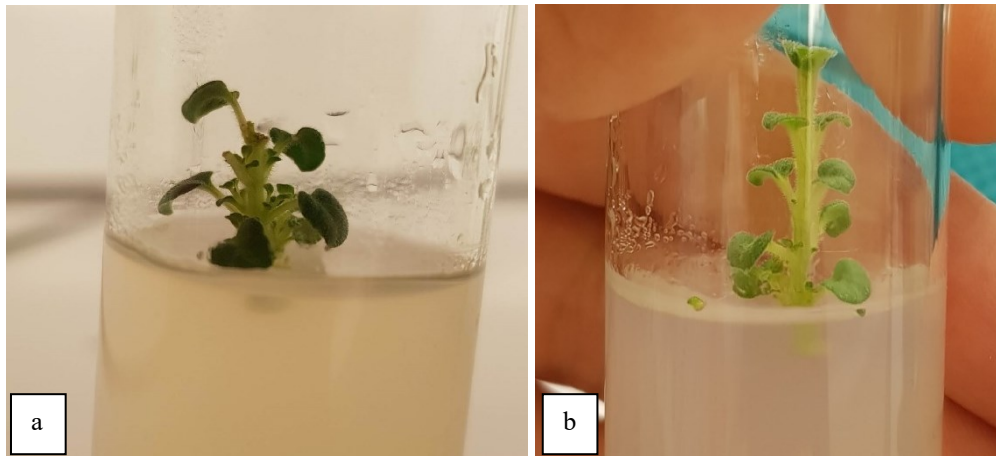
Şekil 1. *Origanum sympleum* bitkisinin *in vitro* koşullardaki gelişimi.  
Figure 1. Development of *Origanum sympleum* on *in vitro* conditions.

El Beyrouthy ve ark. (2015) iki farklı *Origanum* spp. türünün (*Origanum syriacum* ve *Origanum ehrenbergii*) *in vitro* çoğaltımında nodal eksplantları kullanmış olup eksplantların alındığı 4 alt kültür sonunda en iyi sürgün oluşum oranlarının  $1,5 \text{ mgL}^{-1}$  BAP içeren MS ortamında eksplant başına 2,0 ile 3,7 adet sürgün sayısı olduğunu, türler arasında da bu oranlarda farklılık gözlediklerini belirtmişlerdir. Çalışmamızda, daha düşük oranlarda kullanılan BAP, düşük konsantrasyonlarda kullanılan IAA ile kombine edildiğinde eksplant

başına düşen sürgün sayısının El Beyrouthy ve ark. (2015)'e göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Türler hatta popülasyonlar arasında farklılıkların görülebileceği *in vitro* çoğaltım çalışmalarında, bitki büyüme düzenleyicilerin kombinasyon ve konsantrasyonlarının kullanımı da bu tür farklılıkların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir.

Oluk ve Çakır (2009) Manisa/Spil'den toplanan *Origanum sipyleum* L. ile yapmış oldukları *in vitro* çoğaltım çalışmasında,  $\text{CaCl}_2$  ile modifiye edilen MS ortamına ilave edilen  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  BAP içeren ortamlarda apikal tip eksplantları kültüre almışlardır. Araştırmacılar, ilk alt kültür (5 hafta) sonunda en iyi sürgün çoğaltımını 3,7 (adet/eksplant); ikinci alt kültür (3 hafta) sonrasında ise eksplant başına düşen en yüksek sürgün sayısını 7,8 (adet/eksplant) olarak kaydettiklerini bildirmişlerdir. Aynı zamanda ikinci alt kültür sonunda bitkiciklerde hiperhidrisite gibi bazı fizyolojik olayların da gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışmada Çizelge 2'de verildiği gibi, besin ortamı x eksplant tipi interaksiyonunun sürgün sayısı üzerinde önemli ( $p>0,05$ ) bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bununla birlikte en yüksek sürgün sayısı  $5,56$  (adet/eksplant) ile  $1,0 \text{ mgL}^{-1}$  BAP+ $0,1 \text{ mgL}^{-1}$  IAA içeren besin ortamında kültüre alınan nodal eksplantlardan elde edilmiştir. Şekil 2 incelendiğinde; 4 haftalık kültürde gelişen nodal eksplantların (a), yan sürgünlerinin aynı sürede gelişen sürgün ucu (b) eksplantlarına kıyasla daha fazla miktarda olduğu görülmektedir.



Şekil 2. *Origanum sipyleum*'un nodal segment (a) ve sürgün ucu (b) eksplantlarının *in vitro* şartlarda gelişimi.  
Figure 2. Development of nodal (a) and shoot tip (b) explants of *Origanum sipyleum* on *in vitro* conditions.

Çalışmada elde edilen ortalama sürgün sayıları 2,4 ile 5,56 (adet/eksplant) arasında değişmiştir. El-Beyrouthy ve ark. (2015) tarafından *Origanum* spp. ile yapılan çalışmada elde edilen en yüksek sürgün sayısı değerleri (2,0 ile 3,7 (adet/eksplant)) ile çalışmamız uyumlu olmakla birlikte, sürgün sayısı bulguları bakımından daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

Sürgün uzunluğu bakımından değerlendirildiğinde Oluk ve Çakır (2009) tarafından yapılan çalışmada, modifiye edilen MS ortamına ilave edilen 1,0 mgL<sup>-1</sup> BAP içeren ortamlarda apikal tip eksplantlardan elde edilen en yüksek sürgün uzunluğu ilk alt kültürde 1,8 cm olarak ölçülmüş olup ikinci alt kültürde 1,2 cm olarak kaydedilmiştir. Çalışmamızda ise kullanılan farklı içerikteki ortamların sürgün uzunluğuna etkisi p>0,05 seviyesine göre önemsiz olmakla birlikte, en iyi sürgün gelişim ortamında (2 no'lu; 1,0 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL<sup>-1</sup> IAA) gelişen bitkiciklere ait sürgün uzunluğu 2,02 cm olarak kaydedilmiştir.

Goleniowski ve ark. (2003) *Origanum vulgare* bitkisine ait meristem eksplantlarıyla yapmış oldukları çalışmada köklenmenin kendiliğinden gerçekleştiğini, Yıldırım (2013) ise çoğaltım amacıyla kullanılan sitokin ve oksin kombinasyonlarında, varolan oksinlerin köklenmeye etki ettiğini bildirilmiştir. Bu çalışmada, sürgün oluşturan bitkiciklerin, eksplant tipi gözetmeksizin, sürgün geliştirme ortamlarında spontan olarak sağlıklı şekilde köklendikleri, bununla birlikte 2 no'lu ortamda (MS 1,0 mgL<sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL<sup>-1</sup>

IAA) köklenmenin en yüksek oranlarda (%80) olduğu gözlenmiştir.

Sevindik ve ark. (2017) Bursa/Uludağ'dan toplanan *Origanum sipyleum* L. bitkisine ait apikal uçları içeren 2 cm uzunluğundaki sürgünleri *in vitro* kültüre almışlardır. En iyi sürgün çoğaltımını 4,42 ve 4,22 (adet/eksplant) olarak, 0,5 mg L<sup>-1</sup> BAP+0,2 mg L<sup>-1</sup> GA<sup>3</sup> ve 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+0,1 mg L<sup>-1</sup> GA<sup>3</sup> içeren MS ortamlarında elde ettiklerini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da eksplant olarak kullanılan sürgün ucu eksplantlardan elde edilen en iyi sürgün oluşumu 4,67 ve 4,6 (adet/eksplant) ile 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA ve ½ MS 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA içeren besin ortamlarında elde edilen bulgular birbirleriyle uyumludur. Bunun yanında Çizelge 2'de verildiği üzere, eksplant tipi olarak nodal kesitlerde nispeten daha iyi sürgün oluşumu gözlenmiştir. Nodal kesitlerde, en iyi sürgün oluşumu 5.12 ve 4,57 (adet/eksplant) ile 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA ve ½ MS 1,0 mg L<sup>-1</sup> BAP+0,1 mg L<sup>-1</sup> IAA içeren besin ortamlarında elde edilmiştir.

### Aklimatizasyon bulguları

Çalışmada, köklenmeleri spontan şekilde gerçekleşen bitkiciklerin, sera şartlarında aklimatizasyonu sağlanmış olup, bitkiciklerin %45 oranında dış ortama uyum sağladıkları gözlenmiştir. Şekil 3'te *in vitro* şartlardan sera koşullarına aktararak sağlıklı bir şekilde gelişimlerine devam eden *Origanum sipyleum* bitkicikleri görülmektedir.

Çizelge 2. Besin ortamı x eksplant tipi interaksyonunun sürgün sayısına (adet/eksplant) etkisi.

Table 2. Effect of culture medium x explant type (number/explant) interaction on shoot number (number/explant).

Ortam no Medium no.	Ortam Medium	Eksplantlardaki ortalama sürgün sayısı Mean number of shoots per explant			
		Sürgün ucu (adet/eksplant) Shoot tips, (number/explant)	Standart sapma (Standard deviation)	Nodal kesit (adet/eksplant) Nodal explant, (number/explant)	Standart sapma (Standard deviation)
1	MS 0,5 mgL <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL <sup>-1</sup> IAA	3,53 <sup>bd</sup>	0,47	2,97 <sup>bd</sup>	0,84
2	MS 1,0 mgL <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL <sup>-1</sup> IAA	4,67	0,42	5,56	1,11
3	½ MS 0,5 mgL <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL <sup>-1</sup> IAA	3,4	0,62	4	0,98
4	½ MS 1,0 mgL <sup>-1</sup> BAP + 0,1 mgL <sup>-1</sup> IAA	4,6	0,35	4,53	0,65
5	Kontrol / Control	3,94	0,00	2,4	0,72

öd: Ortalamalar arasında p>0,05 seviyesinde farklılık bulunmamaktadır, ns: The mean difference was not significant at p>0.05.





Şekil 3. *Origanum sympleum*'un akklimatizasyonu.  
Figure 3. Acclimatization of *Origanum sipyleum*.

## SONUÇ

Çalışmada, İzmir/Bozdağ'dan toplanan ülkemize endemik kekik türlerinden, *Origanum sipyleum* L. genetik materyalinin *in vitro* teknikleri ile çoğaltımı ele alınmıştır.

Tıbbi ve aromatik özelliği olan *Origanum sipyleum* bitkisinin ülkemizde yaygın bir şekilde henüz kültüre alınmayışı bu bitkinin doğadan toplanarak tüketilmesine neden olmakta bunun sonucunda doğal popülasyonları zarar görmektedir. Hızlı

çoğaltım tekniklerinden biri olan *in vitro* çoğaltım tekniği ile *Origanum sipyleum*'un başarılı bir şekilde kültüre alınması, yüksek ekonomik değer taşıyan bu bitkinin yıl boyu üretimine imkân yaratacak ve böylece doğal popülasyonları korunabilecektir.

Çalışma sonuçları *Origanum sipyleum*'un çeşitliliğinin *in vitro* şartlarda korunması, çoğaltımı ve sürdürülebilir kullanımına önemli katkılar sunacaktır.

## LİTERATÜR LİSTESİ

- Acıbuca, V. ve B. D. Budak. 2018. Dünya'da ve Türkiye'de tıbbi ve aromatik bitkilerin yeri ve önemi. Çukurova J. Agric. Food Sci. 33(1): 37-44.
- Akın, B. 2020. Tissue culture techniques of medicinal and aromatic plants: history, cultivation and micropropagation. Journal of Scientific Reports 45: 253-266.
- Anonim. 2021. <https://bizimbitkiler.org.tr/yeni/demos/technical/>. 2021.
- Arafeh, R. M, S. M. Mahmoud, and A. R. Shibli. 2003."In vitro seed propagation of wild Syrian marjoram (*Origanum syriacum*)," Adv. Hort. Sci., 17 (4): 241-244.
- Arslan, N. 2014. Endemik tıbbi bitkilerimiz. II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu. 23-25 Eylül 2014. Yalova. s. 9-21.
- Atar, H. ve H. Çölgeçen. 2019. Regeneration in *Origanum onites* L. by plant tissue culture. Karaelmas Science and Engineering Journal (Karaelmas Fen ve Müh. Derg.) 9(2):177-180.
- Bayar, F. U. ve O. Çınar. 2020. Kültür koşullarında yetiştirilen farklı *Origanum* spp. türlerinin bazı verim ve kalite parametreleri. Derim 37(1):10-17.
- Benahmed, A., B. Harfi, I. Benbelkacem, A. Daas, H. Laouer, and A. Belkhiri. 2018. *In vitro* propagated *Mentha rotundifolia* (L.) buds and antioxidant activity of its essential oil. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences 31(4): 204-208.
- Bhojwani, S. S., and M. K. Razdan. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice A Revised Edition. Elsevier Science. Amsterdam.
- Çimen, M. 2015. Fen ve Sağlık Bilimleri Alanlarında SPSS Uygulamalı Veri Analizi. Palme Yayıncılık. Yayın No: 905. Ankara.
- Dirmenci, T., T. Yazıcı, T. Özcan, Ç. Çelenk, and E. Martin. 2018a. A new species and a new natural hybrid of *Origanum* L. (Lamiaceae) from the West of Turkey. Turkish Journal of Botany 42: 73-90.
- Dirmenci, T., T. Özcan, T. Yazıcı, T. Arabacı, and E. Martin. 2018b. Morphological, cytological, palynological and molecular evidence on two new hybrids from Turkey: an example of homoploid hybridization in *Origanum* (Lamiaceae). Phytotaxa 371(3): 145-167.
- Doğan, S. ve G. Çağlar. 2020. *Iris sari* SCHOTT ex BAKER'in *In vitro* Çoğaltım ve Köklendirme Çalışmaları. Anadolu J. of AARI 30 (1): 33-45.
- Echeverrigaray, S., R. Basso, and L.B. Andrade. 2005. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. Biol. Plantarum 49 (3): 439-442.



- El Beyrouthy, M., G. Elian, C. Abou Jaoudeh, and L. Chalak 2015. In vitro propagation of *Origanum Syriacum* and *Origanum Ehrenbergii*. Acta Horticulture 1083: 169–172.
- Goleniowski, M. E., C. Flamarique, and P. Bima. 2003. Micropropagation of Oregano (*Origanum vulgare* × *apalii*) from meristem tips. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 39: 125- 128.
- Gürtunca, R. 2011. Trakya koşullarında bazı kekik (*Origanum* spp.) genotip ve çeşitlerinin verim ve bazı kalite unsurlarının belirlenmesi. Yüksek lisans tezi. Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tekirdağ.
- Kaçar, O., E. Göksu, ve N. Azkan. 2006. İzmir kekiğinde (*Origanum onites* L.) farklı sıklıkların bazı agronomik ve kalite özellikleri üzerine etkisinin belirlenmesi. Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi 21 (2):51-60.
- Kancherla, L., ve P. Bhalla. 2003. Plant regeneration of the Australian native ornamental genus, Pandorea. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78 (2): 148-153.
- Karaoğlan, E.S. 2011. Bazı *Origanum* türleri üzerinde farmakognozik çalışmalar. Doktora tezi. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık-Farmakognozik Anabilim Dalı Erzurum.
- Kaska, A. 2018. The phenolic content, antioxidant and cytotoxic activities of *Origanum sipyleum* from Turkey. International Journal of Secondary Metabolite 5 (4): 343-352.
- Kintzios, S. E. 2002. Profile of the multifaceted prince of the herbs. pp 236–242. In: S. E. Kintzios (Ed.) Oregano : The Genera Origanum and Lippia. Medicinal and Aromatic Plants Industrial Profiles 25. Taylor and Francis/ CRC Press USA.
- Mancak, R. 2002. Endemik *Origanum micranthum* vogel. türünün kültüre alınma olanakları. Yüksek lisans tezi. Çukurova Üniversitesi Adana.
- Mansuroğlu, S. ve E. Gürel. 2001. Mikroçoğaltım (Micropropagation). s. 262- 281. M. Babaoğlu, E. Gürel ve S. Özcan (Eds), Bitki Biyoteknolojisi: Doku Kültürü ve Uygulamaları (Plant Biotechnology: Tissue Culture and plications). Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları. Konya.
- Mesquita, L.S.S., R.S.A. Tássio Luz, J.W.C. Mesquita, D.F. Coutinho, F.M.M. Amaral, M.N.S. Ribeiro, and S. Malik. 2019. Exploring the anticancer properties of essential oils from family Lamiaceae. Food Reviews International 35 (2):105-131.
- Murashige, T., and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- Nakipoğlu, M., R.O. Urek, H.A. Kayalı, and L. Tarhan 2007. Antioxidant capacities of endemic *Sideritis sipylea* and *Origanum sipyleum* from Turkey. Food Chemistry 104 (2): 630-635.
- Oluk, E. A. ve A. Çakır.2009. Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. African Journal of Biotechnology 8: 5769-5772.
- Özkum, D. 2007. In vitro shoot regeneration of Oregano (*Origanum minutiflorum* O. Schwarz & Davis). Hacettepe J. Biol. Chem. 35 (2): 97-100.
- Pušárová A., M. Buckova, L. Krakova, D. Pangallo, and K. Kozics. 2017. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. Sci Rep. 7(1):8211.
- Sevindik, B., T. İzgü, Ö. Şimşek, M. Tütüncü, P. Çürük, Ö. Yılmaz, G. Kaynak, A.Y. Kaçar, J. A. Teixeira da Silva, and Y.Y. Mendi. 2017. In vitro culture of Turkish *Origanum sipyleum* L. American Journal of Plant Biology 2 (5-1): 32-36.
- Shetty, K., O. F. Curtis, R. E. Levin, R. Witkowsky, W. Ang. 1995. Prevention of vitrification associated with in vitro shoot culture of Oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* spp. J. Plant Physiol. 147 (3): 447-451.
- Socorro, O., I. Tarrega, and F. Rivas 1998. Essential oils from wild and micropropagated plants of *Origanum bastetanum*, Phytochemistry 48 (8): 1347-1349.
- Stee, R. G. D., and J. H. Torrie. 1980. Principles and Procedures of Statistics. Mc Graw Hill Book Company Inc. New-York.
- Te-chato, S., A. Hilae, and K. In-peuy, 2008. Effects of cytokinin types and concentrations on growth and development of cell suspension culture of oil palm. Journal of Agricultural Technology 4 (2): 157-163.
- Thomas, T. D. 2007. High-frequency, direct bulblet induction from rhizome explants of *Curculigo orchoides* Gaertn., an endangered medicinal herb. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 43: 442-448.
- Tunca, H. ve M. E. Yeşilyurt. 2017. Türkiye ve Dünya’da kekik, DTB Raporu. Denizli.
- Türker. A.H. ve R. Hatipoğlu. 2018. Dağ kekiği (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart)’nin mikroçoğaltımı. Ormancılık Araştırma Dergisi (Turkish Journal of Forestry Research) 5 (2): 97-111.
- Uyanık, M. 2017. Türkiye’de tehlike altındaki bazı endemik *Salvia* türlerinin in vitro çoğaltımı ve tarla şartlarına adaptasyonu. Doktora tezi. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ankara.
- Yıldırım, M. U. 2013. Micropropagation of *Origanum acutidens* (HAND.-MAZZ.) IETSWAART using stem node explants. Scientific World J. 2013:1-3.
- Yurtsever, N. 1984. Deneysel İstatistik Metotları. Köy Hizmetleri Toprak ve Gübre Arş. Enst. Müdürlüğü Yayınları. Yayın No. 121. Ankara.
- Zhou, L., F.Z.K.K. Attia, L. Meng, S. Chen, Z. Liu, C. Ma, L. Liu, and W. Kang. 2021. Chemical components and biological effects of Genus *Origanum*. Journal of Food Quality 2021(1):1-1