

Dağ kekiği (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart)'nin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkilerinin ve kalluslarının uçucu yağ bileşenlerinin bir kıyaslaması

A. Haluk Türker^{a,*} 

Özet: Bu araştırma, *Origanum syriacum* var. *bevanii* taksonunun donör olarak kullanılan *in vivo* bitkileri ile *in vitro* koşullarda yetiştirilen rejenerant bitkileri ve kalluslarının uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi ve kıyaslanması amacıyla yürütülmüştür. Doğal ortamından alınan çeliklerle yetiştirilen donör bitkiler ve bunlardan alınan çeşitli eksplantlarla farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri ilave edilen *in vitro* ortamda yetiştirilen rejenerant bitkiler ve kallusların uçucu yağ bileşenleri GC/MS (Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi) cihazı ile belirlenmiştir. Araştırma sonucunda, donör ve rejenerant bitkiler ve kallusların uçucu yağ bileşenlerinin birbirinden oldukça farklı olduğu belirlenmiştir. Ana bileşenler olarak, donör bitkilerde %36,28 Carvacrol ve %19,76 ortho-Cymene tespit edilmişken rejenerant bitkilerde %26,49 Carbamic Acid ve %19,67 Carvacrol tespit edilmiştir. Tamamen farklı olarak, kalluslardaki ana bileşenler %64,82 Ethanol, %57,23 1,2-Propanediol, %55,11 L(+)-Lactic acid, %53,53 Methyltartronic acid, %52,16 4-Penten-2-ol ve %38,47 2-Methoxycinnamic acid olarak tespit edilmiştir. Basit fenolik bileşiklerin oluşumunda başlangıç bileşenlerinden olan 2-Methoxycinnamic acid, sap boğumu eksplantından gelişen kallusta yaprak eksplantından gelişen diğer kalluslara göre en yüksek oranda bulunmakta (%38,4) ve ana bileşeni oluşturmaktadır. Dolayısıyla analiz sonuçlarına göre sap boğumu eksplantından gelişen kallusun sekonder metabolitlerin oluşumunda ümitvar sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *Origanum syriacum* var. *bevanii*, Rejenerant bitki, Kallus, Uçucu yağ bileşenleri

A comparison of essential oil components of plants and calli grown *in vivo* and *in vitro* conditions of bible hyssop (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart)

Abstract: This research was carried out to determine and compare the essential oil components of regenerated plants and calli grown under *in vitro* conditions with *in vivo* plants of *Origanum syriacum* var. *bevanii* taxon used as donor. The essential oil components of the donor plants grown with cuttings taken from the native environment and regenerant plants and calli grown from the various explants *in vitro* supplemented with different concentrations of the plant growth regulators were determined by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). In result of the research, it was determined that the essential oil components of donor and regenerant plants and calli were quite different from each other. It was determined that was Carbamic Acid (26.49%) and Carvacrol (19.67%) in essential oil from the regenerant plants while was Carvacrol (36.28%) and ortho-Cymene (19.76%) in essential oil from the donor plants as major components. It was determined that was 64.82% Ethanol, 57.23% 1,2-Propanediol, 55.11% L(+)-Lactic acid, 53.53% Methyltartronic acid, 52.16% 4-Penten-2-ol ve 38.47% 2-Methoxycinnamic acid in essential oil from the callus as major components disparately. 2-Methoxycinnamic acid, which is one of the initial components in the formation of simple phenolic compounds, was found at the highest rate (38.4%) in the callus developed from the stem node explant, compared to the other callus developed from the leaf explant, and constitutes the main component. Therefore, according to the results of the analysis, it was determined that the callus developed from the stem node explant gave promising results in the formation of secondary metabolites.

Keywords: Bible hyssop, Regenerant plant, Callus, Essential oil components

1. Giriş

Origanum taksonları günümüzde gıda, eczacılık, kozmetik ve alkollü içki (likör) sanayinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Gaz giderici, hazmı kolaylaştırıcı, balgam ve idrar söktürücü, ishal kesici, terletici ve kadınlarda adet söktürücü özelliklere sahip olup, uçucu yağı kronik romatizma, kas kısılmalarında, diş ve kulak ağrısı, öksürük ve bronşit tedavisinde kullanılan ilaçlarda hammadde

oluşturmaktadır (Baytop, 1983; Deans vd., 1992; Kumari ve Saradhi, 1992). Bitkinin uçucu yağının içerdiği yüksek miktardaki fenol nedeni ile antibakteriyal, antispazmodik ve antiseptik etkileri bilinmektedir (Başer vd., 1993).

Tabii ve aromatik bitkilerde uçucu yağın miktar ve içeriği öncelikli olarak türe, varyeteye, agronomik koşullara, hasat zamanına ve en önemli faktörlerden olan gelişme ortamının çevresel ve ekolojik karakteristiklerine bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Cavero vd., 2005; Başer vd.,

✉ ^a Orman Genel Müdürlüğü, Türkiye

@ ^{*} **Corresponding author** (İletişim yazarı): abdulhalukturker@ogm.gov.tr

✓ **Received** (Geliş tarihi): 12.04.2023, **Accepted** (Kabul tarihi): 09.06.2023



Citation (Atıf): Türker, A.H., 2023. Dağ kekiği (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart)'nin *in vivo* ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitkilerinin ve kalluslarının uçucu yağ bileşenlerinin bir kıyaslaması. Turkish Journal of Forestry, 24(2): 45-55.
DOI: [10.18182/tjf.1281648](https://doi.org/10.18182/tjf.1281648)

2003; Guillen ve Cabo, 1996). *Origanum* taksonları yaprak üretimi için çiçeklenmeye başladığı dönemde veya uçucu yağ üretimi için tamamen çiçeklendiği dönemde hasat edilmektedirler (Özgül vd., 2006).

Origanum taksonlarının uçucu yağının ana bileşenleri, biyogenetik süreçle yakın bağlantılı olan 4 terpen olan Carvacrol, Thymol, p-Cymen ve γ -Terpinen bileşikleridir ve Carvacrol bakımından zengin uçucu yağlar, yüksek antimikrobiyal ve antifungal potansiyeli nedeniyle (Daouk vd., 1995) hayvan yemlerinde katkı maddesi olarak ve gıdaların korunmasında özel bir ticari öneme sahiptir (Baytop ve Başer, 1995).

In vitro kültür teknikleri kullanılarak bitki üretilmesi (mikroçoğaltım), birçok bitki türünde olduğu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir. Mikroçoğaltım, bir bitkinin tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip belirli kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, kök, sürgün, polen vb.) yapay besin ortamlarında ve aseptik koşullar altında *in vitro* teknikler kullanılarak fiziksel ve genetik olarak birbirine benzeyen çok sayıda bitkinin hızlı çoğaltılması amacıyla kullanılan bir doku kültürü tekniğidir (Solarova ve Pospisilova, 1997; Mansuroğlu ve Gürel, 2001; Taji vd., 2002). Bu teknik tarla ve bahçe bitkileri, peyzaj ve ormancılıkta birçok bitki türünde kullanılmakla birlikte arzu edilen özelliklere sahip genotiplerin üretilmesi açısından tıbbi ve aromatik bitkilerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir.

Ayrıca *in vitro* kültür teknikleri gıda, kozmetik ve ilaç sanayinde kullanılan ekonomik öneme sahip tıbbi ve aromatik bitkilerdeki doğal antioksidanlar gibi sekonder metabolitlerin kontrollü çevre şartlarında üretimi için tarla tarımı yanında alternatif bir üretim şekli sunmaktadır (Simon vd., 1984; Al-Sereiti vd., 1999; Grzegorzczak vd., 2005; Tisserat ve Vaughn, 2008). Sekonder metabolitler (fenolik bileşikler) bitkilerde birkaç önemli işlevi yerine getirirler. Bitkilerin değişen biyotik ve abiyotik ortamlara uyum sağlamasına ve bitki ürünlerine renk, tat, teknolojik özellikler ve sağlığı geliştirici faydalar sağlamasına olanak tanıyan bir metabolik plastisite örneğini temsil ederler (Boudet, 2007). Sekonder metabolitlerin üretimi için hücre süspansiyon kültürleri daha başarılı olmakta ve üretimin daha etkin ve yoğun bir şekilde elde edilmesi amacıyla da çeşitli biyoreaktör sistemleri geliştirilmekte ve bitki hücre kültürleri yanında birçok bileşik üretilebilmektedir (Bourgand vd., 2001).

Bu araştırma çalışması da gelişmekte olan *in vitro* sekonder metabolit üretim çalışmaları kapsamında, *O. syriacum* var. *bevanii* taksonunun donör olarak kullanılan fidanlık koşullarındaki *in vivo* bitkileri ile *in vitro* koşullarda yetiştirilerek fidanlık koşullarına aktarılan rejenerant bitkilerinin ve kalluslarının (bitki kısımlarından gelişen hücre yığınları) uçucu yağ bileşenlerinin GC/MS (Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi) cihazı ile analiz edilerek kıyaslanması amacıyla yürütülmüştür.

2. Materyal ve yöntem

2.1. Materyal

Dağ kekiği (*O. syriacum* var. *bevanii*) taksonunun Doğu Akdeniz bölgesindeki doğal yayılış alanlarından (Tarsus-Damlama köyü-R: 480 m) çelikle alınarak çoğaltılan ve

kültüre alma çalışmalarında yüksek herba ve uçucu yağ verimine sahip olduğu tespit edilen (Güllüba ve Özkurt, 2006) 62/2 nolu ekotipin fidanlık ortamında (*in vivo*) çelikle yetiştirilen 1 yaşlı fidelerinin 10-15 cm boyundaki taze sürgünlerinden kesilerek ayrılan 4-5 mm'lik yaprak diski, sap boğumu, yan ve tepe tomurcuğu bölümleri araştırmada *in vitro* bitki ve kallus üretimi için eksplant olarak kullanılmıştır.

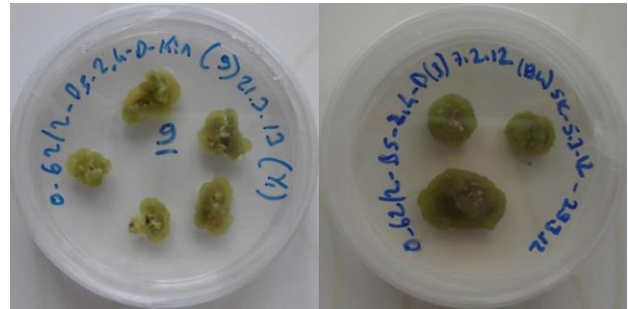
Araştırmada explant olarak kullanılan yaprak diski ve sap boğumu bölümlerinden *in vitro* ortamlarda üretilen ve bitki rejenerasyonu sağlayamayan kalluslar (Şekil 1) ve *in vitro* kültür çalışmalarında donör bitki olarak kullanılan 62/2 nolu ekotip ve bu ekotipten alınan tepe ve yan tomurcuğu eksplantlarından *in vitro* koşullarda rejeneren olan ve aynı fidanlık koşullarına aktarılan bitkiler (Şekil 2) uçucu yağ analizlerinde kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. *In vitro* kültür aşaması

Arafah vd., (2006), El-Gengaihi vd., (2006), Goleniowski vd., (2003), Leelavathi ve Kuppan (2013), Morone-Fortunato ve Avato (2008), Oana vd., (2008)'nin yaptığı araştırmalar baz alınarak yöntem bölümü kurgulanmıştır.

Araştırmada materyal olarak kullanılan fidanlık koşullardan alınan taze sürgünlerin sterilizasyonu için %70'lik etil alkol çözeltisi (5 sn), 3 damla Tween 20 ilave edilmiş %1,25'lik sodyum hipoklorit çözeltisi (15 dk) işlemi ve ayrıca %70'lik etil alkol (5 sn), %1,0'lik sodyum hipoklorit çözeltisi (5 dk), 2,5 g/l fungisit (captan) çözeltisi işlemi uygulanarak, üç kez steril distile suyla durulama yapılmıştır.



Şekil 1. Uçucu yağ analizlerinde kullanılan kalluslar



Şekil 2. *In vitro* koşullarda rejeneren olan ve fidanlık koşullarına aktarılan bitki

Araştırmada temel besi ortamı olarak *in vitro* üretimde yaygın olarak kullanılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve B₅ (Gamborg vd., 1968) kullanılmıştır. Bu temel besi ortamlarının içeriği, Çizelge 1’de verilmiştir.

İndüksiyon aşamasında; donör bitkilerden alınan yaprak diski, sap boğumu, tepe ve yan tomurcuk eksplantları, Çizelge 2’de verilen dozlarda 2,4-D (2,4-Diklorofenoksi Asetik Asit), BAP (6-Benzil Amino Pürin) veya Kinetin (Furfuryladenine) bitki büyüme düzenleyicileri ile tek başına veya birlikte kombine edilen 10 ml MS veya B₅ besi ortamı içeren 60x15 mm boyutlarındaki steril petri kaplarında *in vitro* kültüre alınmıştır. İndüksiyon aşamasında eksplantlardan bir hafta içerisinde gelişmeye başlayan kallus oluşumları gelişimlerini sağlıklı olarak devam ettirmesi amacıyla kararmış, çürümüş kallus veya eksplant parçalarından temizlenerek 4-6 hafta sonra indüksiyon ortamı ile aynı içeriğe sahip alt kültür ortamlarına aktarılmıştır. İndüksiyon ve alt kültür aşamalarında tepe ve yan tomurcuk eksplantlarından gelişen ve kardeşlenme oluşturan sürgünler tekleme yapıldıktan sonra daha fazla gelişme ve köklenme sağlanması amacıyla içerisinde büyüme düzenleyici içermeyen 15 ml ½MS besi ortamı bulunan steril cam tüplere aktarılmıştır.

Rejenerasyon aşamasında; alt kültür ortamlarında yaprak diski ve sap boğumu eksplantlarından gelişen kalluslar Çizelge 2’de verilen dozlarda 2,4-D veya NAA (Naftalen Asetik Asit) ve BAP veya Kinetin bitki büyüme düzenleyicileri ile kombine edilen 25 ml MS veya B₅ besi ortamı içeren 90x15 mm boyutlarındaki steril petri kaplarına aktarılmıştır. Kültür petrileri, 23 °C sıcaklık, %70 nem, 16 saat fotoperiyot ve 12.000 lüks ışık koşullarını sağlayan iklimlendirme kabininde toplam 14 hafta boyunca inkübe edilmişlerdir. 14 haftalık *in vitro* kültür sonunda MS + 1,50 mg/l BAP indüksiyon ortamında gelişen ve köklenmesi için ½MS ortamına aktarılan rejenerant bitkiler, fidanlık koşullarında donör bitkilerin yetiştirildiği 1/4 oranında çürütülmüş mısır sapı samanı ve 3/4 oranında briket toprağı (volkanik tüf) içeren karışım ortamlarına aktarılmıştır (Türker ve Hatipoğlu, 2018) (Şekil 2).

Araştırmada kullanılan temel besi ortamları ve büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarında üretilen Çizelge 2’de verilen rejenerant bitki ve kallus oluşumları analizler için kullanılmıştır.

2.2.2. Uçucu yağ analiz aşaması

Donör bitkilerin tomurcuk eksplantlarından *in vitro* kültür çalışmalarında indüksiyon aşamasında MS + 1,50 mg/l BAP kombinasyonunda gelişen ve köklenmesi için ½MS ortamına aktarılan ve donör bitkilerle aynı fidanlık koşullarında büyütülen rejene bitkiler ve donör bitkilerin çiçeklenme döneminde alınan yaprak örnekleri gölgede yaklaşık 8-10 gün hava kurusu haline gelinceye kadar bekletilmiştir. Daha sonra bu örnekler, etüvde 37 °C ve %40 rutubette 12 saat bekletilerek standart olarak kurutulmuştur. Kurutulan yaprak örneklerinden uçucu yağların çıkartılmasında Clevenger cihazı kullanılmıştır. Elde edilen kuru yapraklar miktarlarına göre saf su ilavesiyle üç saat süreyle distilasyon işlemine tabi tutulmuştur. Rejenerantlardan ve donör bitkilerden elde edilen uçucu yağlar ve kalluslar (Çizelge 2) Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Moleküler Genetik Laboratuvarında, GC/MS (Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi, Perkin Elmer Clarus 600 GC/MS) cihazı ile

GC: SPMEus.mth / MS: SPMEus.EXP metoduyla; Sıcaklık Programı: 35 °C 4 dk / 250 °C - 10 °C/dk, İnjesiyon: 220 °C, Hacim: 0 µL, Split oranı: 0:1, Taşıyıcı gaz: Helyum, Çözücü iptali: 0,00 dk, Transfer sıcaklığı: 200 °C, Kaynak sıcaklığı: 180 °C, Tarayıcı: 35 ila 600 Da, Kolon: 60,0 m x 250 µm koşullarında analiz edilmiştir. Analizler sonucunda, farklı alıkonma zamanlarında (RT) belirlenen ve 3 ihtimalli olarak tanımlanan (Hit) bileşikler, grubundaki en yüksek orana (Prob.) sahip bileşiğin uluslararası kimyasal veri tabanındaki kayıt numarasına (CAS no) göre CAS veri tabanında (nist, chemicalbook, lookchem, sigmaaldrich vd.) taranarak güncel bileşen isimleri belirlenmiştir.

3. Bulgular

3.1. Donör ve rejenerant bitkilerin uçucu yağ bileşenlerine ait analiz sonuçları

In vitro kültür çalışmalarında eksplant kaynağı olarak kullanılan fidanlık koşullarında yetiştirilen donör bitkinin yapraklarından çıkartılan uçucu yağın bileşenlerine ait analiz sonucu Çizelge 3’de verilmiştir.

Analiz sonucuna göre uçucu yağın ana bileşenlerini %36,28 oranı ile Carvacrol ve %19,76 oranı ile ortho-Cymene oluşturmaktadır. Donör bitkiden elde edilen diğer minör bileşenler ve oranları da Çizelge 3’de görüldüğü gibidir. Oranı %0,1’in altında bulunan bileşenlerin toplam değeri ise %0,62 olarak bulunmaktadır.

Donör bitkinin tomurcuk eksplantlarından *in vitro* kültür çalışmalarında indüksiyon ortamında MS + 1,50 mg/l BAP kombinasyonunda gelişen ve köklenmesi için ½MS ortamına aktarılan ve donör bitkilerle aynı fidanlık koşullarında büyütülen rejenerant bitkilerin (Materyal 1; Çizelge 2) yapraklarından çıkartılan uçucu yağın analiz sonucu Çizelge 4’de verilmiştir.

Çizelge 1. Araştırmada kullanılan temel besi ortamlarının bileşimleri

Bileşik	MS (mg/l)	B ₅ (mg/l)
Makro elementler		
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	250
KH ₂ PO ₄	170	-
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	-	150
KNO ₃	1.900	2.500
NH ₄ NO ₃	1.650	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	134
Mikro elementler		
H ₃ BO ₃	6,2	3,0
MnSO ₄ .H ₂ O	15,6	10,0
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	2,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
KI	0,83	0,75
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	27,8
Na ₂ EDTA	37,3	37,3
Organik maddeler		
Sakkaroz	30.000	20.000
Thiamin.HCl	0,1	10,0
Pyridoxin.HCl	0,5	1,0
Nikotik Asit	0,5	1,0
Myo-Inositol	100	100
Glisin	2,0	-
pH	5,8	5,5
Agar	7.000	7.000

Çizelge 2. Araştırmada analiz için kullanılan rejenerant bitki ve kallus oluşumları

Materyal no	Explant ve gelişim ortamları
1	Donör bitkinin tepe ve yan tomurcuk eksplantlarından MS + 1,50 mg/l BAP indüksiyon ortamında gelişen ve daha fazla gelişme ve köklenme sağlanması amacıyla içerisinde büyüme düzenleyici içermeyen ½MS ortamına aktarılan rejenerant bitki
2	Donör bitkinin yaprak diski eksplantlarından B ₅ + 0,25 mg/l 2,4-D kombinasyonunda indüksiyon ortamında oluşan ve B ₅ + 0,10 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l Kinetin kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallus
3	Donör bitkinin yaprak diski eksplantlarından B ₅ + 0,50 mg/l 2,4-D + 1,00 mg/l Kinetin kombinasyonunda indüksiyon ortamında oluşan ve B ₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l Kinetin kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallus
4	Donör bitkinin yaprak diski eksplantlarından B ₅ + 0,50 mg/l 2,4-D + 1,00 mg/l Kinetin kombinasyonunda indüksiyon ortamında oluşan ve B ₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 1,00 mg/l Kinetin kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallus
5	Donör bitkinin sap boğumu eksplantlarından B ₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 2,00 mg/l BAP kombinasyonunda indüksiyon ortamında oluşan ve B ₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallus
6	Donör bitkinin yaprak diski eksplantlarından B ₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 2,00 mg/l BAP kombinasyonunda indüksiyon ortamında oluşan ve B ₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallus
7	Donör bitkinin yaprak diski eksplantlarından MS + 0,25 mg/l 2,4-D kombinasyonunda indüksiyon ortamında oluşan ve MS + 0,25 mg/l NAA + 1,00 mg/l Kinetin kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallus

Çizelge 3. Donör bitkinin uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonucu

RT (dk)*	Bileşen Adı	Oran (%)**
4,119	Tricyclene	1,02
4,306	α-Thujene	1,36
5,093	Camphene	0,17
5,893	β-Pinene	0,27
6,208	Sabinene	0,15
6,436	Ethylbenzene	0,67
6,996	α-Phellandrene	0,31
7,147	β-Myrcene	2,94
7,346	α-Terpinene	2,99
7,673	Limonene	1,02
7,830	β-Phellandrene	0,89
7,924	Eucalyptol (1,8-Cineol)	0,48
8,350	Psi-Limonene	0,23
8,589	γ-Terpinene	2,75
9,178	ortho-Cymene	19,76
9,272	2-Carene	5,48
10,048	2-Penten-1-ol, (Z)-	0,14
10,935	3-Hexen-1-ol	0,15
11,051	3-Octanol	3,90
11,396	Cosmene	0,10
11,822	1-Octen-3-ol	5,65
12,078	cis-β-Terpineol	1,18
13,100	Linalool	0,46
13,683	Caryophyllene	2,86
13,788	Cyclopropane, 1-cyclopropylethynyl-2-methoxy-3,3-dimethyl-	2,29
13,963	trans-Dihydrocarvone	0,12
14,576	Humulene	0,51
14,757	γ-Murolene	0,10
14,885	α-Terpineol	0,24
14,932	Borneol	0,30
15,492	β-Cadinene	0,11
17,453	Chlorothymol	0,67
18,089	Phenol	0,34
19,734	Carvacrol	36,28
20,732	3-Methylene-bicyclo[3.2.1]oct-6-en-8-ol	0,54
21,905	2-Allyl-4-methylphenol	0,10
22,967	5-Isopentyl-4-methyl-2-(methylsulfanyl)-6-((trimethylsilyloxy)pyrimidine	0,21
23,282	1-[4-Acetyl-1-(2-amino-4,5-dimethyl-phenyl)-2,5-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl]-ethanone	0,12
23,743	Oxycodone	0,13
	Diğer bileşenler (< %0,1)	0,62

*RT: Retention Time (Alikonma Zamani), **: Göreceli Dağılım

Çizelge 4. Rejenerant bitkinin uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonucu

RT (dk)	Bileşen Adı	Oran (%)
4,405	2,4,6-Octatrienal	10,81
5,099	Camphene	0,61
5,887	3-methyl-apopinene	0,71
6,208	Sabinene	0,79
6,687	7-Ethyl-1,3,5-cycloheptatriene	0,72
7,282	Urocanic acid	11,21
7,515	α -Terpinene	5,43
7,568	4,5-Dimethyl-2,6-octadiene	0,20
7,760	Limonene	1,59
7,924	β -Phellandrene	2,02
8,840	Carbamic Acid	26,49
9,266	ortho-Cymene	9,51
9,342	2-Carene	0,85
10,929	3-Hexen-1-ol	0,36
11,034	3-Octanol	0,85
11,857	1-Octen-3-ol	0,78
12,061	cis- β -Terpineol	0,16
13,094	Linalool	0,14
13,706	Caryophyllene	2,91
13,782	Cyclopropane, 1-cyclopropylethynyl-2-methoxy-3,3-dimethyl-	0,86
13,969	trans-Dihydrocarvone	0,19
14,564	Humulene	0,67
14,757	γ -Muurolene	0,11
14,891	α -Terpineol	0,85
15,498	β -Cadinene	0,20
17,447	Chlorothymol	0,15
19,734	Carvacrol	19,67
22,973	5-Isopentyl-4-methyl-2-(methylsulfanyl)-6-((trimethylsilyl)oxy)pyrimidine	0,10
	Diğer bileşenler (< %0,1)	1,05

Analiz sonucuna göre uçucu yağın ana bileşenlerini Carbamic Acid (%26,49) ve Carvacrol (%19,67) oluşturmaktadır. Oranı %0,1'in altında bulunan bileşenlerin toplam değeri ise %1,05 olarak bulunmaktadır. Donör bitki ile rejenerant bitkinin uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonuçlarına göre (Çizelge 3-4), ortak bulunan yüksek oranlı bileşenler Çizelge 5'de karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

3.2. Kallus uçucu yağ bileşenlerine ait analiz sonuçları

In vitro kültür çalışmalarında donör bitkinin yaprak diski ve sap boğumu eksplantlarından farklı besi ortamı ve farklı büyüme düzenleyicisi kombinasyonlarında gelişen ve analizler için kullanılan kalluslar Çizelge 2'de verilmiştir.

Donör bitkinin yaprak diski eksplantlarından *in vitro* çalışmalarında B₅ + 0,25 mg/l 2,4-D indüksiyon ortamında elde edilen ve B₅ + 0,10 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l Kinetin kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallusun (Materyal 2) analiz sonucu Çizelge 6'da verilmiştir.

Analiz sonucuna göre uçucu yağın ana bileşenlerini donör bitki analiz sonuçlarından farklı olarak %55,11 ile L(+)-Lactic acid ve %27,58 ile Isobutylene oxide bileşenleri oluşturmaktadır. Basit fenolik bileşiklerin oluşumunda rol alan başlangıç bileşiklerinden olan (Taiz ve Zeiger, 2008) 2-Methoxycinnamic acid %3,22 oranında bulunmaktadır.

Donör ile rejenerant bitkilerin analiz sonuçları arasında bir benzerlik bulunmasına karşılık, donör bitki ile *in vitro*'da B₅ + 0,25 mg/l 2,4-D ortamında elde edilen kallusun uçucu yağ bileşenlerinin birbirlerinden tamamen farklı olduğu ve ortak bileşen bulunmadığı görülmektedir.

Donör bitkinin yaprak eksplantlarından *in vitro* çalışmalarında indüksiyon aşamasında B₅ + 0,50 mg/l 2,4-D + 1,00 mg/l Kinetin kombinasyonunda elde edilen ve B₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l Kinetin kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallusun (Materyal 3) uçucu yağının bileşenlerine ait analiz sonucu Çizelge 7'de verilmiştir.

Analiz sonucuna göre ana bileşenleri %53,53 oranı ile Methyltartronic acid, %18,82 oranı ile Hydroxyurea, %12,88 oranı ile 1,6-Heptadien-4-ol,4-methyl- oluşturmuştur. 2-Methoxycinnamic acid (%0,07) oranı %0,1'in altında bulunan bileşenler arasında yer almaktadır.

Çizelge 5. Donör ve rejenerant bitkilerin uçucu yağlarında tespit edilen ortak bileşenler ve oranları

Bileşen no	Ortak bileşen adı	Donör bitki (%)	Rejenerant bitki (%)
1	Carvacrol	36,28	19,67
2	ortho-Cymene	19,76	9,51
3	α -Terpinene	2,99	5,43
4	Caryophyllene	2,86	2,91
5	β -Phellandrene	0,89	2,02
6	Limonene	1,02	1,59
7	2-Carene	5,48	0,85
8	α -Terpineol	0,24	0,85
9	3-Octanol	3,90	0,85
10	1-Octen-3-ol	5,65	0,78
11	Humulene	0,51	0,67
12	Camphene	0,17	0,61
13	cis- β -Terpineol	1,18	0,16
14	Chlorothymol	0,67	0,15
15	Linalool	0,46	0,14

Çizelge 6. Kallusun (materyal 2) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonucu

RT (dk)	Bileşen Adı	Oran (%)
3,991	Isobutylene oxide	27,58
4,802	2-Methoxycinnamic acid	3,22
5,093	Tetraethylene glycol dimethyl ether	4,12
5,449	L(+)-Lactic acid	55,11
7,929	Thiocyanic acid, 2-(2-butoxyethoxy)ethyl ester	1,10
8,717	Propanoic acid, 2-methyl-, propyl ester	0,21
8,951	2-Ethoxyethyl methacrylate	0,51
9,196	4-O-Methyl-d-arabinose	0,19
9,785	Chroman-4-one, 2,3-dehydro-6-ethyl-7-methoxy-2-methyl-3-phenyl-	0,36
9,960	(2,3-Dimethyloxiranyl)methanol	1,59
11,110	5H-[1]Benzopyrano[3,4-d]pyrimidin-5-one, 4-amino -2-(2-hydroxyphenyl)-	0,16
11,302	Hydrazine,(2-methylpropyl)-	1,05
11,927	1,3,2-Oxathiaborinane, 4,6-dimethyl-2-(1-methylethyl)-	0,53
12,417	4,6-Di-O-methyl-alpha-d-galactose	0,15
13,660	N-formyl-beta-alanine	0,34
13,928	d-Threo-O-ethylthreonine	0,14
14,360	Dodecyl 2-methylacrylate	0,63
14,996	Octopamine triTMS	0,16
16,566	1,3-Diethoxy-2-propanol	0,60
17,867	Thiazolidine-4-carboxylic acid	0,12
19,524	Diazene, [1-(2,2-dimethylhydrazino)ethyl]ethyl-	0,11
21,269	3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecane	0,11
25,249	2-Ethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3,2]dioxaborole	0,31
Diğer bileşenler (< %0,1)		1,59

Çizelge 7. Kallusun (materyal 3) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonuçları

RT (dk)	Bileşen adı	Oran (%)
3,979	Hydroxyurea	18,82
4,837	Acetamide, N-(2-oxoethyl)-	1,54
5,099	N-t-Butyl-N'-2-[2-thiophosphatoethyl]aminoethylurea	2,27
5,467	Methyltartronic acid	53,53
6,132	1,6-Heptadien-4-ol,4-methyl-	12,88
7,964	L-Lyxose	0,21
8,968	2,2-Dimethylglutaric anhydride	0,40
9,791	1-(1-Adamantyl)-2-triisopropylsilyloxyethane	0,24
9,948	3-Methylhexanal	0,94
11,104	5H-[1]Benzopyrano[3,4-d]pyrimidin-5-one, 4-amino-2- (2-hydroxyphenyl)-	0,36
11,273	(S)-(+)-1,2-Propanediol	1,20
11,909	1,4-Dimethoxy-2-methylcyclohexane	0,64
12,312	2,3-Dihydrofuran	0,34
12,697	1,2,3-Trimethoxyhexane	0,17
13,222	DL-Ornithine	0,12
13,549	2-((6-((2,6-Dichlorobenzylidene)amino)-1,3-benzo thiazol-2-yl) thio)-N-(2,6-diethylphenyl)acetamide	0,12
13,654	Ethyl 3-hydroxybutyrate	0,13
14,021	D-Arabinitol	0,44
14,307	Propanoic acid, 2-octyl ester, (R or S)	0,21
14,996	3-tert-Butyl-5-chloro-2-hydroxybenzophenone	1,27
16,519	2-(3-Chloropropyl)-1,3-dioxolane	0,25
17,849	Phenyl isothiocyanate	1,06
18,205	15-Crown-5	0,18
19,536	Tris(2-ethylbutyric acid)1,2,3-propanetriyl ester	0,13
19,909	2-(Ethylsulfonyl)ethanol	0,12
20,294	b-D-Galactopyranoside, methyl 2,4-di-O-methyl-	0,11
20,989	4(1H)-Pyrimidinone, 2-amino-6-(methylamino)-	0,12
21,275	Bis(2-methoxyethyl)nitrosoamine	0,13
23,685	3-Methyl-5-phenyl-1,2,4-trioxolane	0,13
25,231	7-Dimethylsilyloxytridecane	0,14
Diğer bileşenler (< %0,1)		0,36

Donör bitkinin yaprak diski eksplantlarından *in vitro* çalışmalarında induksiyon aşamasında B₅ + 0,50 mg/l 2,4-D + 1,00 mg/l Kinetin kombinasyonunda elde edilen ve B₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 1,00 mg/l Kinetin kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallusun (Materyal 4) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonucu Çizelge 8'de verilmiştir. Analiz sonucuna göre ana bileşenleri %64,82 oranı ile Ethanol ve %23,73 oranı ile Acetaldehyde oluşturmaktadır. 2-Methoxycinnamic acid %0,17 ile düşük oranda bulunmaktadır.

Donör bitkinin sap boğumu eksplantlarından induksiyon aşamasında B₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 2,00 mg/l BAP kombinasyonunda elde edilen ve B₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktararak gelişen kallusun (Materyal 5) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonucu Çizelge 9'da verilmiştir. Analiz sonucuna göre uçucu yağın ana bileşenlerini donör bitkiden ve önceki verilen kalluslardan farklı olarak %38,47 oranı ile 2-Methoxycinnamic acid ve %34,66 oranı ile Methylhydrazine oluşturmaktadır. Sap boğumu eksplantından gelişen kallusta 2-Methoxycinnamic acid

oranı, yaprak eksplantından gelişen diğer kalluslara göre %38,47 ile en yüksek oranda bulunmakta ve ana bileşeni oluşturmaktadır.

Donör bitkinin yaprak eksplantlarından indüksiyon aşamasında B₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 2,00 mg/l BAP kombinasyonunda elde edilen ve B₅ + 0,25 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktarılarak gelişen kallusun (materyal 6) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonucu Çizelge 10'da verilmiştir. Analiz sonucuna göre uçucu yağın ana bileşenini donör bitkiden ve

önceki verilen kalluslardan farklı olarak %57,23 oranı ile 1,2-Propanediol bileşiği oluşturmaktadır. 2-Methoxycinnamic acid %2,75 oranında bulunmaktadır.

Donör bitkinin yaprak eksplantlarından indüksiyon aşamasında MS + 0,25 mg/l 2,4-D kombinasyonunda elde edilen ve MS + 0,25 mg/l NAA + 1,00 mg/l Kinetin kombinasyonu içeren rejenerasyon ortamına aktarılarak gelişen kallusun (Materyal 7) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonucu Çizelge 11'de verilmiştir.

Çizelge 8. Kallusun (materyal 4) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonuçları

RT (dk)	Bileşen adı	Oran (%)
3,985	Acetaldehyde	23,73
4,778	Cis-2,3-Epoxybutane	3,63
5,315	Ethanol	64,82
7,626	6,7-Dimethoxyisoflavone	0,87
7,912	D(+)-Xylose	0,18
8,285	Methoxymethyl isothiocyanate	0,69
8,974	1-(1-Adamantyl)-2-triisopropylsilyloxyethane	0,10
9,202	Aminocaproic acid	0,61
10,468	Trimethylene acetate	0,89
11,022	L-Lysine, ethyl ester	0,31
13,374	Citric acid	0,64
14,045	Pyronin Y	0,21
15,323	4-Methylmannitol	0,18
15,515	1-Octene, 3-(methoxymethoxy)-	0,55
16,869	5-(Phenylazo)quinoline	0,11
18,538	2-Methoxycinnamic acid	0,17
24,233	4,5-dihydro-5-thioxo-1H-1,2,4-triazole-3-propanoic acid	0,37
Diğer bileşenler (< %0,1)		1,94

Çizelge 9. Kallusun (materyal 5) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonuçları

RT (dk)	Bileşen adı	Oran (%)
4,055	2-Methoxycinnamic acid	38,47
5,286	Methylhydrazine	34,66
5,875	2,4-Dimethylbenzoic acid (2,5-dimethylphenyl) methyl ester	8,81
6,249	1-Thia-2,4,6-trisilacyclohexane, 2,2,4,4,6,6-hexamethyl	5,21
8,291	Imipramine	0,77
8,840	Methanesulfonamide,N-[(ethylamino)thioxomethyl]	0,12
8,980	6-Ethyl-7-methoxy-2-methyl-3-phenyl-4H-chromen-4-one	0,72
9,207	O-Isosamylhydroxylamine	0,81
9,406	3-Fluoro-DL-phenylalanine	0,19
10,211	5H-[1]Benzopyrano[3,4-d]pyrimidin-5-one, 4-amino-2-(2-hydroxyphenyl)-	0,13
10,497	2-(Propylamino)ethanol	0,81
10,730	Octadecanoic acid, 3-hydroxy-, methyl ester	0,68
10,952	1-Butanol, 3-(1-ethoxyethoxy)-2-methyl-	0,17
11,057	Hexanoic acid,2,2-dimethyl-	0,72
11,337	1,3-Oxathiolane, 2-methyl-	0,31
12,738	1-Propoxy-3,3-diethyltriazene 2-oxide	0,29
13,415	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid 2-trime thylsilyloxy-1-[(trimethylsilyloxy)methyl]ethyl ester	1,25
13,811	N,N-Bis[3-(methylamino)propyl]methylamine	0,50
14,033	Pyronin Y	0,88
14,261	2,4-Dimethylbenzoic acid (3,5-dimethylphenyl) methyl ester	0,21
14,564	Methyl 2-ethylhexanoate	0,22
15,883	d-Idonic acid dimethylamide	0,12
16,064	2,3,4-Trimethyl-5-hexen-3-ol	0,18
17,739	3-(1-Ethoxyethoxy)-1-butanol	0,13
18,550	Cyclobuta[b]quinoxaline-1,2-dione, 3,8-dihydro-5-nitro-	0,16
19,291	Methyl 3-methoxypropionate	0,13
20,254	Oxiranecarboxylic acid, 3-methyl-3-(1-methylethyl)-, ethyl ester, cis-	0,16
20,866	Heptaethylene Glycol	0,13
22,693	Methyl 2-O,3-O,4-O,5-O-tetramethyl- α -D-galactoseptanoside	0,27
23,708	2-Propenoic acid, 3-[4-[(2-methoxyethoxy)methoxy]phenyl]-, (E)-	0,15
24,239	1-Dimethylthexylsilyloxyheptane	0,72
Diğer bileşenler (< %0,1)		1,93

Çizelge 10. Kallusun (materyal 6) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonuçları

RT (dk)	Bileşen adı	Oran (%)
3,967	Acetaldehyde	7,98
4,387	1,4-Butanediol, 2-(1-ethoxyethoxy)-3-methyl-	3,93
5,088	2-[2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-Methoxyethoxy) ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethoxy]ethyl 2,2,3,3,3-pentafluoropropanoate	6,50
5,467	1,2-Propanediol	57,23
8,956	Butanoic acid, 1-methylhexyl ester	4,93
9,534	2H-Pyran, tetrahydro-2-(8-nonyloxy)-	0,89
9,791	Chroman-4-one, 2,3-dehydro-6-ethyl-7-methoxy-2-methyl-3-phenyl-	1,08
9,954	2-Methoxycinnamic acid	2,75
10,585	Propionaldehyde oxime	1,61
11,116	5H-[1]Benzopyrano[3,4-d]pyrimidin-5-one, 4-amino-2-(2-hydroxyphenyl)-	1,69
11,291	4-Chloro-3,5-dimethylisoxazole	2,19
13,625	6-(Heptyloxy)hexanamide	1,63
14,010	Dexpanthenol	0,57
14,348	Cyclohexanecarboxylic acid, 3-phenyl-2-propenyl ester	1,76
14,751	Citiolone	0,33
15,568	Ethyl 3-hydroxy-2,2-dimethyl-butanoate	0,45
16,239	Methyl 3-[(trifluoroacetoxy)methylthio]prop-2-enoate	0,90
16,513	Ethaneperoxoic acid, 1-cyano-4,4-dimethyl-1-phenylpentyl ester	0,60
16,887	Ethane-1,2-diimine, N,N'-diamino-	0,11
17,826	Oxime-, methoxy-phenyl-	0,14
18,217	2,5-Methylene-d,l-rhamnitol	0,11
19,530	Heptaethylene glycol	0,15
23,691	2-O,3-O,4-O,5-O-Tetraacetyl-D-arabinose 1,2-ethanediyl dithioacetal	0,18
25,255	2-Heptenoicacid, ethyl ester, (2E)-	0,54
Diğer bileşenler (< %0,1)		1,76

Çizelge 11. Kallusun (materyal 7) uçucu yağ bileşenlerinin analiz sonuçları

RT (dk)	Bileşen adı	Oran (%)
4,037	Cyclobutanol	14,85
4,813	DL-Aspartic acid	4,47
5,362	4-Penten-2-ol	52,16
6,045	8-Methylene-3-oxatricyclo[5.2.0.0(2,4)]nonane	11,54
6,605	8-Methylenebicyclo[5.1.0]octane	4,54
7,130	(E)-3-Decen-1-yne	3,51
7,982	1,3-dichloro-3-methylbutane	0,89
8,233	Dimethylphosphinacrylonitryl	1,70
8,922	1,4-Cineole	1,77
9,458	Gabaculine	0,28
10,841	Pyruvic acid	2,50
12,785	3-Hexanol,2,4-dimethyl-	0,20
12,983	(-)-1,2:5,6-Di-O-cyclohexylidene-L-inositol	0,12
13,636	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,3,3-trimethyl-	0,23
13,922	Cyclohexane,(1,1-dimethylpropyl)-	0,21
15,329	D-Ribose	0,39
Diğer bileşenler (< %0,1)		0,65

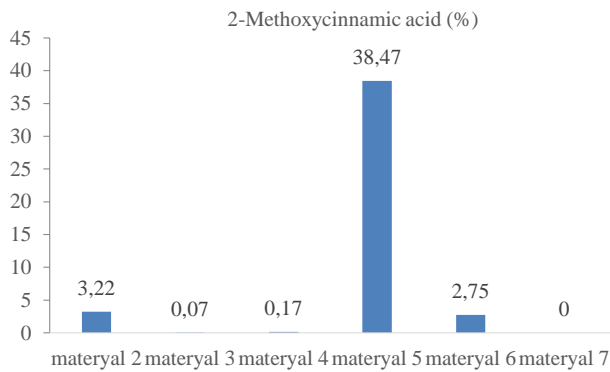
Analiz sonucuna göre uçucu yağın ana bileşenlerini donör bitkiden ve önceki verilen kalluslardan farklı olarak %52,16 oranı ile 4-Penten-2-ol, %14,85 oranı ile Cyclobutanol ve %11,54 oranı ile 8-Methylene-3-oxatricyclo [5.2.0.0(2,4)] nonane oluşturmaktadır. Önceki tüm kallus analizlerinde bulunan 2-Methoxycinnamic acid bileşiği bu kallusda bulunmamaktadır.

Tüm analiz sonuçlarıyla kıyaslandığında, diğer kalluslardan farklı olarak MS besi ortamı ve NAA + Kinetin kombinasyonunda gelişen kallusun daha farklı bileşenler oluşturduğu görülmektedir. Kallusların analiz sonuçlarında (%0,1'in altındaki bileşenler de dahil) aralarında ortak olarak bulunan bileşenler Çizelge 12'de toplu olarak gösterilmiştir.

Kallus analizlerinde en fazla görülen bileşenlerin 2-Methoxycinnamic acid, 5H-[1]Benzopyrano[3,4-d]pyrimidin-5-one, 4-amino-2-(2-hydroxyphenyl)- ve Heptaethylene glycol olduğu görülmektedir. Ana bileşenler bakımından kalluslar arasında ortak bileşen bulunmamaktadır. Çizelge 12'ye göre kallus analizlerinde en fazla görülen bileşenlerden olan 2-Methoxycinnamic acid, sadece 7 numaralı kallusda ve 5H-[1]Benzopyrano[3,4-d]pyrimidin-5-one, 4-amino-2-(2-hydroxyphenyl)- sadece 4 numaralı kallusda, Heptaethylene glycol ise 3 ve 7 numaralı kalluslarda bulunmamaktadır. 2-Methoxycinnamic acid diğer kalluslardan farklı olarak sap boğumu eksplantının kullanıldığı 5 numaralı kallusta en fazla oranda bulunmamaktadır (Şekil 3).

Çizelge 12. Kallusların uçucu yağlarında tespit edilen ortak bileşenler

Materyal no	Bileşen adı
5-6	(9Z,12Z,15Z)-9,12,15-Octadecatrienoic acid 2-trimethylsilyloxy-1-[(trimethylsilyloxy)methyl] ethyl ester
3-4	1-(1-Adamantyl)-2-triisopropylsilyloxyethane
2-7	12-Crown-4
4-5	1-Propoxy-3,3-diethyltriazene 2-oxide
3-7	2-((6-((2,6-Dichlorobenzylidene)amino)-1,3-benzothiazol-2-yl)thio)-N-(2,6-diethylphenyl) acetamide
2-4	2,4-Disilapentane
2-3-4-5-6	2-Methoxycinnamic acid
2-3	3,6,9,12,15-Pentaoxaheptadecane
2-3-5-6-7	5H-[1]Benzopyrano[3,4-d]pyrimidin-5-one, 4-amino-2-(2-hydroxyphenyl)-
4-6	Acetaldehyde
2-6	Chroman-4-one, 2,3-dehydro-6-ethyl-7-methoxy-2-methyl-3-phenyl-
2-4-5-6	Heptaethylene glycol
2-4-5	Methyl 3-methoxypropionate
3-6	Oxime-, methoxy-phenyl-
4-5	Pyronin Y



Şekil 3. Kalluslarda tespit edilen 2-Methoxycinnamic acid bileşeninin karşılaştırmalı gösterimi

4. Tartışma ve sonuç

Analiz sonuçlarına göre en önemli bileşenlerden olan Carvacrol, donör bitkide %36,28 oranı ile ana bileşeni oluşturmaktadır. *In vitro* ortamda gelişen rejenerant bitkinin uçucu yağının ana bileşenlerini donör bitkinin analiz sonuçlarından farklı olarak %26,49 oranı ile Carbamic Acid ve %19,67 oranı ile Carvacrol ve devamında %11,21 ile Urocanic acid ve %10,81 ile 2,4,6-Octatrienal bileşenleri oluşturmaktadır. Donör bitkide %19,76 oranı ile bulunan ortho-Cymene, rejenerant bitkide biraz daha düşük olarak %9,51 oranında bulunmaktadır.

Rejenerant bitkinin analiz sonucuna göre diğer önemli bileşenlerden; α -Terpinene (%5,43), β -Phellandrene (%2,02), Limonene (%1,59), α -Terpineol (%0,85), Sabinene (%0,79), Humulene (%0,67), Camphene (%0,61) ve β -Cadinene (%0,20) donör bitkiye kıyasla daha yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Bununla birlikte 2-Carene (%0,85), 3-Octanol (%0,85), 1-Octen-3-ol (%0,78), Borneol (%0,30), cis- β -Terpineol (%0,16), Chlorothymol (%0,15) ve Linalool (%0,14) bileşenleri donör bitkiye kıyasla rejenerant bitkide daha düşük oranlarda tespit edilmiştir. Donör ve rejenerant bitkilerde ortak bulunan başlıca 15 bileşenden (Çizelge 5) Carvacrol, ortho-Cymene, 2-Carene, 3-Octanol, 1-Octen-3-ol, cis- β -Terpineol, Chlorothymol ve Linalool bileşenlerinin donör bitkide ve α -Terpinene, β -Phellandrene, Limonene, α -Terpineol, Humulene ve Camphene bileşenlerinin de *in vitro*'da gelişen rejenerant bitkide daha yüksek oranlarda bulunduğu tespit edilmiştir. Caryophyllene birbirine yakın değerlerde bulunmaktadır.

Guillen ve Cabo (1996); Başer vd., (2003); Cavero vd., (2005) ve Genena vd., (2008) tıbbi ve aromatik bitkilerdeki uçucu yağın miktar ve içeriğinin öncelikli olarak türe, varyeteye, agronomik koşullara, hasat zamanına ve en önemli faktörlerden olan gelişme ortamının çevresel ve ekolojik karakteristiklerine bağlı olarak değişiklik gösterebildiğini ve bununla birlikte Moretti vd., (1998) toprak karakteristiklerinin verim ve uçucu yağ kompozisyonları üzerinde etkili olabildiğini ve granitik siltli topraklarda yetişen türlerin kireçli topraklarda yetişenlere nazaran daha güc ve daha yoğun aromalı olabildiğini bildirmişlerdir. Lukas vd., (2009), *Origanum syriacum* taksonlarının 11 Suriye popülasyonunda uçucu yağ bileşenlerini inceledikleri araştırmada, popülasyonlar arasında ana bileşen bakımından Carvacrol ve/veya Thymol olarak büyük değişkenlik görüldüğünü ve Soliman vd., (2007)'da *Origanum syriacum* subsp. *sinaicum* taksonunun uçucu yağ bileşenlerini dört mevsim boyunca inceledikleri araştırmada, uçucu yağın bileşenlerinin mevsimlere göre değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Simon vd., (1984) ve Al-Sereiti vd., (1999), sıcaklık, solar radyasyon ve yağmur gibi mevsimsel streslerin değişiminin, tıbbi ve aromatik türlerin yetiştikleri ekolojik koşullardaki fenolik bileşiklerin düzeyini ve kalitesini belirgin bir biçimde değiştirebildiğini bildirmişlerdir. *Origanum* taksonlarında yapılan benzer uçucu yağın bileşenlerine ait analizlerde de (Alma vd., 2003; Özgüven vd., 2006; Başer vd., 2003; Sakenova 2005; Morone-Fortunato ve Avato 2008; Çakır 2011) az çok benzer yanlar bulunmakla birlikte büyük oranda farklılıkların bulunduğu görülmektedir. Düşük oranlardaki bileşiklerde bazı benzerlikler görülmekle birlikte, ana bileşenler bakımından büyük farklılıklar bulunmaktadır.

Yapılan bu araştırma çalışmasında da donör ve rejenerant bitkiler arasında tespit edilen farklılıklar rejenerant bitkinin *in vitro*'da farklı besi ortamı ve stres koşullarındaki gelişimine bağlanabilir. Diğer taraftan donör bitkinin bulunduğu değişken doğada hüküm süren stres koşullarına da bağlanabilir. Nayak vd., (2009) *in vitro* çalışmalarda kullanılan bitki büyüme düzenleyicilerinden özellikle de sitokininlerin aynı zamanda uçucu yağın miktar ve içeriğinde farklılıklara sebep olduğunu bildirmiştir. El-Gengaihi vd., (2006) da *Origanum vulgare*, *O. vulgare* var. *hirtum* ve *O. syriacum* taksonlarında donör bitkilerin ve kallusların uçucu yağ bileşenlerini inceledikleri araştırmada, *in vivo*'da tespit edilen yağın *in vitro*'da miktar ve kalite olarak değiştiğini tespit etmişlerdir.

Bu araştırmada kalluslarda tespit edilen bileşenlerin düşük oranda olanları açısından çok az benzerlik bulunmakla birlikte (Çizelge 12), kalluslarda ana bileşenlerin ve büyük çoğunlukla da diğer tüm bileşenlerin büyük oranda farklılık gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca kalluslarda tespit edilen bileşenlerin donör ve rejenerant bitkilerin bileşenlerinden çok farklılık gösterdiği ve donör ve rejenerant bitkide bulunan temel bileşenlerin ve diğer tüm bileşenlerin görülmediği ve tamamen farklı bileşenlerin bulunduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte farklı kallus oluşumları arasında ortak olarak en fazla görülen bileşenlerin 2-Methoxycinnamic acid, 5H-[1]Benzopyrano[3,4-d]pyrimidin-5-one, 4-amino-2-(2-hydroxyphenyl)- ve Hepta-ethylene glycol olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada ve benzer olarak yapılan çalışmalarda kallus analizlerinde büyük farklılıklar görülmesi de Nayak vd., (2009)'nın bildirdiği gibi farklı büyüme düzenleyicisi ve konsantrasyonlarına bağlanabilir. Aynı zamanda bu araştırmada indüksiyon aşamasında aynı B5 + 0,25 mg/l 2,4-D + 2,00 mg/l BAP kombinasyonunda oluşan ve aynı B5 + 0,25 mg/l 2,4-D + 0,50 mg/l BAP kombinasyonundaki rejenerasyon ortamında büyütülen kalluslarda (Materyal 5-6) sadece kullanılan eksplantlar (boğum ve yaprak) farklı olduğu halde uçucu yağ analizlerinde çok büyük farklılık bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 9-10). Özellikle de 2-Methoxycinnamic acid bileşeni yaprak disklerinden gelişen kalluslara kıyasla sadece sap boğumundan gelişen kallusda %38,47 oranı ile çok daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, Wu vd., (2016) ve Khan vd., (2016)'nın araştırma sonuçlarıyla da uyumluluk göstermektedir. Wu vd., (2016), *Salvia miltiorrhiza* taksonunda gövde ve yaprak eksplantından elde edilen kallus kültürlerinde gövdeden elde edilen kalluslarda rosmarinik asit ve salvianolik asit B biyosentezinin sırasıyla %1,27 ve %0,87 olduğunu, buna karşılık yaprakta elde edilen kalluslarda ise %0,28 ve %0,07 olduğunu bildirmişlerdir. Khan vd., (2016) *Fagonia indica* taksonunda gövde ve yaprak eksplantından elde edilen kallus kültürlerinde 1 mg/l TDZ uygulamasının fenolik madde ve flavonoid birikimini önemli ölçüde artırdığını ve gövdeden elde edilen kalluslarda yaprağa oranla daha fazla fenolik madde ve flavonoid birikimi olduğunu bildirmişlerdir. Dolayısıyla yapılan analizlerin sonuçlarına göre *in vitro*'da gelişen kallusun uçucu yağ bileşenlerinin gelişmesinde tür, genotip, besin ortamı-oksin-sitokinin ve ayrıca kullanılan eksplant etkenlerinin önemli bir rol oynadığı ortaya çıkmaktadır.

Taiz ve Zeiger (2008)'in bildirdiğine göre, fenolik bileşikler bitkilerde birkaç yoldan sentelenmektedir. Yüksek bitkilerde pek çok fenolik, en azından kısmen, bir shikimic acid metabolik yolu olan fenilalaninden kökenlenmektedir. Fenilalaninden amonyum molekülünün uzaklaşmasıyla cinnamic acid oluşmaktadır. Cinnamic acid ise basit fenoliklerin oluşumunda rol oynayan başlangıç bileşenlerindedir. Diğer birçok sekonder metabolitlerde olduğu gibi bitkiler basit fenolik bileşiklerin temel karbon iskeletini kullanarak daha kompleks ürünler oluşturabilmektedir.

Kallus analizlerinde B₅ + 2,4-D + BAP veya Kinetin kombinasyonlarında (Materyal 2-3-4-5-6) tespit edilen, fakat MS + NAA + Kinetin kombinasyonunda (Materyal 7) bulunmayan 2-Methoxycinnamic acid, sap boğumu eksplantından gelişen kallusta (Materyal 5), yaprak eksplantından gelişen diğer kalluslara göre en yüksek oranda bulunmakta (%38,4) ve ana bileşeni oluşturmaktadır. Yapılan

bu araştırmada sap boğumu eksplantından gelişen kallusun uçucu yağ bileşenlerinden ana bileşeni oluşturan 2-Methoxycinnamic acid (Çizelge 9), Taiz ve Zeiger (2008)'in bildirdiğine göre basit fenoliklerin oluşumunda rol oynayan başlangıç bileşenlerinden birisidir.

Bourgau vd., (2001), oksin ve sitokininlerin oranlarının dengelendiği durumlarda kallus hücrelerinin sürekli bir çoğalma eğiliminde olduğunu, fakat etken bileşiklerin donör bitkide bulunan konsantrasyonlardan çok daha düşük oranlarda bulunacağını ve sekonder metabolitlerin üretimi için hücre süspansiyon kültürlerinin daha başarılı olduğunu ve sekonder metabolit üretiminin daha etkin ve yoğun bir şekilde elde edilmesi amacıyla çeşitli biyoreaktör sistemlerinin geliştirildiğini ve bitki hücre kültürleri yanında birçok bileşiğin üretilebildiğini bildirmişlerdir.

Araştırmada uçucu yağın bileşen analizleriyle ilgili elde edilen bu sonuçlar, *O. syriacum* var. *bevanii* taksonunun *in vitro* sekonder metabolit üretiminde temel oluşturabilecek ümitvar temel bilgiler ortaya koymuştur. Bundan sonraki çalışmalara sap boğumu gibi gövde eksplantları üzerinde yoğunlaşarak devam edilmelidir.

Açıklama

Bu makale; Orman Genel Müdürlüğü, Doğu Akdeniz Ormanlık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğüne yürütülen 20.7705 proje numaralı ve "Biberiye (*Rosmarinus officinalis* L.) ve Dağ kekiğinin (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart) *in vitro* rejenerasyon olanaklarının ve uçucu yağ bileşenlerinin araştırılması" isimli araştırma projesi kapsamında hazırlanmıştır. Uçucu yağ analizleri için Prof. Dr. Ebru KAFKAS'a ve katkılarından dolayı Prof. Dr. Rüştü HATİPOĞLU'na teşekkür ederim.

Kaynaklar

- Alma, M.H., Mavi, A., Yıldırım, A., Digrak, M., Hira, T., 2003. Screening chemical composition and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biol. Pharm. Bull.* 26(12): 1725-1729.
- Al-Sereiti, M.R., Abu-Amer, K.M., Sen, P., 1999. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37: 124-130.
- Arafah, R.M., Shibli, R.A., Al-Mahmoud, M., Shatnawi, M.A., 2006. Callusing, cell suspension culture and secondary metabolites production in persian oregano (*Origanum vulgare* L.) and arabian oregano (*O. syriacum* L.). *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 2(3): 274-282.
- Başer, K.H.C., Özek, T., Tümen, G., Sezik, E., 1993. Composition of the essential oils of Turkish *Origanum* species with commercial importance. *J. Essent. Res.*, 5: 619-623.
- Başer, K.H.C., Kürkçüoğlu, M., Demirci, B., Özek T., 2003. The essential oil of *Origanum syriacum* L. var. *sinaicum* (Boiss.) Ietswaart. *Flavour and Fragrance Journal*, 18(2): 98-99.
- Baytop, A., 1983. *Farmasötik Botanik*. İstanbul Üniv. Eczacılık Fak. Yayınları, 36: 282-285.
- Baytop, T., Başer, K.H.C., 1995. On essential oils and aromatic waters used as medicine in Istanbul between 17th and 19th centuries. (Ed., Baser, K.H.C.), *Proceedings of the 13th International Congress of Flavours, Fragrances and Essential Oils*, AREP Publishers, Istanbul, 2: 99-107.
- Boudet, A.M., 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68: 22-24.
- Bourgau, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161: 839-851.

- Cavero, S., Jaime, L., Martin-Alvarez, P.J., Senorans, F.J., Reglero, G., Ibanez, E., 2005. *In vitro* antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Eur. Food Res. Technol., 221: 478-486.
- Çakır, A., 2011. Batı anadolu endemiği *Origanum sipyleum* L. (kekik) bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltımı ve mikro bitkilerde uçucu yağ içeriğinin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- Daouk, R.K., Dagher, S.M., Sattout, E.J., 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. J. Food Prot., 58(10): 1147-1149.
- Deans, S.G., Svoboda, K.P., Gundidza, M., Brechany, E.Y., 1992. Essential oil profiles of severe temperate and tropical aromatic plants: their antimicrobial and antioxidant activities. Acta Horticulture, 306: 229-232.
- El-Gengaihi, S., Taha, H.S., Kamel, A.M., 2006. *In vivo* and *in vitro* comparative studies of *Origanum* species. Journal of Food, Agriculture & Environment, 4(3&4): 127-134.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. 1968. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cultures. Experimental Cell Research, 50: 151-158.
- Genena, A.K., Hense, H., Junior, A.S., Souza, S.M., 2008. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*): a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. Cienc. Technol. Aliment., Campinas, 28(2): 463-469.
- Goleniowski, M.E., Flamarique, C., Bima, P., 2003. Micropropagation of oregano (*Origanum vulgare* x *applii*) from meristem tips. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 39: 125-128.
- Grzegorzczak, I., Bilichowsky, I., Mikiciuk-Olasik, E., Wysokinska, H., 2005. *In vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 74(1): 17-21.
- Guillen, M.D., Cabo, N., 1996. Characterization of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. J.Sci. Food Agric, 70: 359-363.
- Güllüba, A.G., Özkurt, N., 2006. Doğu Akdeniz Bölgesi Kekiklerinin (*Origanum* sp.) Kültüre Alınması ve Islahı. Doğu Akdeniz Ormanlık Araştırma Müdürlüğü Yayınları, Teknik Bülten No: 24, Tarsus.
- Khan, T., Abbasi, B.H., Khan, M.A., Shinwari, Z.K., 2016. Differential effects of thidiazuron on production of anticancer phenolic compounds in callus cultures of *Fagonia indica*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 179(1): 46-58.
- Kumari, N., Saradhi, P.P., 1992. Regeneration of plants from callus cultures of *Origanum vulgare* L. Plant Cell Reports, 11: 476-479.
- Leelavathi, D., Kuppan, N., 2013. Callus induction and regeneration of multiple shoots from *in vitro* apical bud explant of *Origanum vulgare*. An important medicinal plant. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry, 3(4): 898-903.
- Lukas, B., Schmiederer, C., Franz, C., Novak, J., 2009. Composition of essential oil compounds from different Syrian populations of *Origanum syriacum* L. (Lamiaceae). J. Agric. Food Chem., 57(4): 1362-1365.
- Mansuroğlu, S., Gürel, E., 2001. Mikroçoğaltım. Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. (Ed., Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.), Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya, s: 262-281.
- Moretti, M.D.L., Peana, A.T., Passino, G.S., Solinas, V., 1998. Effects of soil properties on yield and composition of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil. Journal of Essential Oil Research, 10:3, 261-267.
- Morone-Fortunato, I., Avato, P., 2008. Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. Plant Cell Tiss. Organ Cult., 93: 139-149.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473-497.
- Nayak, S., Kuanar, A., Mohanty, S., Panda, M.K., 2009. Essential oils from leaves of micropropagated Turmeric. Current Science, 96(9): 1166-1167.
- Oana, C.T., Marcela, F., Maria, P., 2008. Considerations regarding the effects of growth regulators over the “*in vitro*” morphogenetic reaction at *Origanum vulgare* L. J. Plant Develop., 15: 133-138.
- Özgülven, M., Ayanoglu, F., Özel, A., 2006. Effects of nitrogen rates and cutting times on the essential oil yield and components of *Origanum syriacum* L. var. *bevanii*. Journal of Agronomy, 5(1): 101-105.
- Sakenova, G., 2005. Türkiye’de kültüre alınmış *Origanum* türlerinin uçucu yağları yönünden araştırılması. Doktora Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir.
- Simon, J.E., Chadwick, A.F., Craker, L.E., 1984. Herbs, An Indexed Bibliography, 1971-1980. Elsevier Science Publishing, Amsterdam.
- Solarova, J., Pospisilova, J., 1997. Effect of carbon dioxide enrichment during *in vitro* cultivation and acclimation to *ex vitro* condition. Biologia Plantarum, 39(1): 23-30.
- Soliman, F.M., Yousif, M.F., Zaghoul, S.S., Okba, M.M., El-Sayed, E.M., El-Sayed, E.M., 2007. Seasonal variation in the essential oil composition of *Origanum syriacum* L. subsp. *sinaicum* greuter and burdet; evaluation of its tocolytic activity. Egyptian Journal of Biomedical Sciences, 23(1): 121-134.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2008. Bitki Fizyolojisi. (Ed., Türkan, İ.), Palme Yayınları: 455: 290-291.
- Taji, A., Kumar, P.P., Lakshmanan, P., 2002. *In vitro* plant breeding. Food Products Press, Crop Science, Chapter 1, Binghamton.
- Tisserat, B., Vaughn, S.F., 2008. Growth, morphogenesis and essential oil production in *Mentha spicata* L. plantlets *in vitro*. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 44: 40-50.
- Türker, A.H., Hatipoğlu, R., 2018. Dağ kekiği (*Origanum syriacum* L. var. *bevanii* (Holmes) Ietswaart)’nin mikroçoğaltımı. Ormanlık Araştırma Dergisi, Turkish Journal of Forestry Research, 5:2: 97-111.
- Wu, C.F., Karioti, A., Rohr, D., Bilia, A.R., Efferth, T., 2016. Production of rosmarinic acid and salvianolic acid B from callus culture of *Salvia miltiorrhiza* with cytotoxicity towards acute lymphoblastic leukemia cells. Food chemistry, 201: 292-297.