



## ***Dorystoechas hastata* Bitkisinde Eksplant Tipi ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerine Bağlı Kallus Gelişimi**

Bengi Erdağ<sup>2</sup>, Yelda Emek<sup>1\*</sup>, Serap Kurt Aydoğan<sup>3</sup>

<sup>2</sup> Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın, Türkiye (ORCID: 0000-0001-7042-9011)

<sup>1</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın, Türkiye (ORCID: 0000-0003-1095-3908)

<sup>3</sup>Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın, Türkiye

(İlk Geliş Tarihi 17 Nisan 2019 ve Kabul Tarihi 15 Mayıs 2019)

(DOI: 10.31590/ejosat.554947)

**ATIF/REFERENCE:** Erdağ, B., Emek, Y. & Kurt Aydoğan, S. (2019). *Dorystoechas hastata* Bitkisinde Eksplant Tipi ve Bitki Büyüme Düzenleyicilerine Bağlı Kallus Gelişimi. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (16), 367-373.

### **Öz**

Bu çalışma monotipik endemik *Dorystoechas hastata* bitkisinin kallus kültürlerinin oluşturulmasında, eksplant tipi ve bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisinin belirlenmesi amacı ile planlanmıştır. Doğal ortamından toplanmış ve *in vitro* elde edilmiş bitkilerin çeşitli kısımları tek başına BA veya 2,4-D ve bu büyüme düzenleyicilerinin kombinasyonlarını içeren 1/2 MS besi ortamlarına alınmıştır. Hiçbir bitki büyüme düzenleyici içermeyen 1/2 MS besi ortamı kontrol olarak belirlenmiştir. Doğal ortamından alınarak kültüre edilen eksplantlar ile *in vitro* fidelerden elde edilen yaprak sapı eksplantları kültüre cevap vermemiştir. *In vitro* fidelerden elde edilen yaprak eksplantları ise sadece 2 mgL<sup>-1</sup> BA içeren 1/2 MS ortamında kallus oluşturmuşlardır. *In vitro* elde edilmiş fidelerin kotiledon eksplantları kültüre farklı oranlarda kallus indüksiyon frekansı oluşturarak cevap vermişlerdir. En yüksek kallus indüksiyon frekansı 1 mgL<sup>-1</sup> BA ve 2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D içeren 1/2 MS ortamında elde edilmiştir (% 55). Denemelerin sonunda *Dorystoechas hastata* bitkisinin kallus kültürlerinin oluşturulmasında kotiledonlar en uygun eksplant olarak belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Dorystoechas hastata*, kallus, kotiledon, bitki büyüme düzenleyicisi

## **Development of Callus due to Explant Type and Plant Growth Regulators in *Dorystoechas hastata* Plant**

### **Abstract**

This study was planned to determine the effect of explant type and plant growth regulators in the formation of callus cultures of the monotypic endemic *Dorystoechas hastata* plant. Various parts of the plants collected from their natural population and obtained *in vitro* were cultured on 1/2 MS medium containing BA or 2,4-D alone and combinations of these growth regulators. 1/2 MS medium without plant growth regulators was determined as control medium. The explants collected from wild and petiol explants obtained from *in vitro* seedlings did not respond to culture. Leaf explants obtained from *in vitro* seedlings formed calli only on 1/2 MS medium with 2 mgL<sup>-1</sup> BA. Cotyledon explants obtained from *in vitro* seedlings were responded to the culture by creating callus induction frequency at different rates. The highest callus induction frequency was obtained on 1/2 MS medium with 1 mgL<sup>-1</sup> BA and 2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D (55%). At the end of the experiments, cotyledons were determined as the most suitable explants in the formation of callus cultures of *Dorystoechas hastata*.

**Keywords:** *Dorystoechas hastata*, callus, cotyledon, plant growth regulators

BA- N<sup>6</sup>-Benziladenin

<sup>1</sup> Sorumlu Yazar: Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Aydın, Türkiye ORCID: 0000-0003-1095-3908, [yelda@adu.edu.tr](mailto:yelda@adu.edu.tr)

2,4-D- 2,4-diklorofenoksi asetik asit

MS –Murashige and Skoog medium

## 1. Giriş

*Lamiaceae* familyası eterik yağ üretim kapasitesi ile öne çıkmış önemli türlere sahip, kozmopolit yayılış gösteren bir familyadır. Familya üyeleri dünya üzerinde yaklaşık 256 cins ve 700'ün üzerinde tür ile (Harley ve ark., 2004) Türkiye'de ise 45 cins ve 546 tür ile temsil edilmektedir ve ülkemizdeki endemizm oranı % 42'dir (Başer, 1994).

*Lamiaceae* familyası üyelerinin çoğu uçucu yağ içermektedir ve bu özellikleri nedeni ile baharat, parfümeri eldesi ve geleneksel tıp uygulamalarında geniş ölçüde kullanım alanına sahiptir. Familyanın bir çok türünün farmakolojik özellikleri araştırılmış ve terpenoid, iridoid, flavonoid ve fenolik bileşikler bakımından zengin kimyasal içeriğe sahip oldukları rapor edilmiştir (Naghbi ve ark., 2005).

*Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldebr. Ex Benth *Lamiaceae* familyasına ait monotipik endemik bir türdür (Davis, 1982). Bitki; Antalya ve çevresinde "Çalba Çayı" olarak bilinmekte ve soğuk algınlığına karşı taze ya da kurutulmuş yaprakları lokal kullanıcılar tarafından tüketilmektedir (Erdağ ve ark., 2010). Ayrıca bitki "Devren kekiği" olarak da adlandırılmaktadır (Güner ve ark., 2012). Tür ile ilgili raporlar oldukça sınırlıdır. Venturella ve ark. (1988) tarafından bitkinin flavonoid ve terpenoidleri içerdiği rapor edilmiştir. Bir başka çalışmada bitkinin yapraklarının prolin içeriği ve antioksidan aktivitesi araştırılmış, bitkinin yüksek prolin içeriğine sahip olduğu ve antioksidanların doğal kaynağı olabileceği yönünde bilgiler verilmiştir (Karagözler ve ark., 2008). Erkan ve ark.'nın 2011 yılında yaptığı bir başka çalışmada bitkinin fenolik bileşik profili belirlenmiş ve antioksidan aktivitesi rapor edilmiştir. *D. hastata* ile ilgili *in vitro* teknikler kullanılarak yapılan tek çalışmada ise aksiller sürgün eldesi ile mikroçoğaltım protokolü tanımlanmıştır (Erdağ ve ark., 2010) Tüm bu araştırmalar ve sonuçları bitkiye olan ilgiyi her geçen gün daha da arttırmaktadır.

Doğal bitkisel biyoaktif bileşenlere artan ilgi, araştırmacıları biyoteknolojik yöntemlerle istenilen bileşiklerin elde edilmesi yönündeki çalışmalara yönlendirmiştir. Farklı *in vitro* tekniklerin doğal ürünlerin gerçek ve sürdürülebilir kaynağı olabileceği Vijaya ve ark. (2010) tarafından da rapor edilmiştir. Bu yöntemlerden biri olan kallus kültürleri ile ana bitkide bulunan biyoaktif bileşenlere denk veya daha güçlü özel tıbbi bileşenlerin etkili bir şekilde üretilebileceği pek çok çalışmada bildirilmiştir (Tan et al., 2010; Vijaya et al., 2010; Hussain et al., 2012)

Fenolik bileşiklerce zengin bitkilerin *in vitro* kültüre alınmaları sırasında bu fenolik bileşiklerin kesik yüzeylerden salınması ve bunun sonucu olarak eksplant kahverengileşmesi ve ardışık büyümenin durması bu bitkilerin *in vitro* kültürlerinin oluşturulması sırasında karşılaşılan problemlerdendir (Bhojwani ve Razdan, 1996; Aliyu, 2005; Poudyal ve ar., 2008). Fenolik bileşiklerin salınmasını engelleyecek ve/veya salınan bileşikler absorbe edecek ortam bileşenlerinin kullanılması bir çözüm olarak kullanılmasına rağmen; fenolik bileşikler ortama az salınan eksplantlar kullanılması ve bu eksplantların kallus oluşturma cevaplarına bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisinin belirlenmesi daha pratik bir yol olarak görülmektedir.

Bu çalışma *Dorystoechas hastata* bitkisinin kallus kültürlerinin oluşturulmasında eksplant tipi ve bitki büyüme düzenleyicilerinin etkisini belirlemek amacı ile planlanmıştır ve sonuçların kallus kültürleri ile bitkinin çoğaltılması sırasında karşılaşılan problemlerin çözümüne yönelik bir katkı sağlaması hedeflenmektedir.

## 2. Materyal ve Metot

Bu çalışmada *Dorystoechas hastata* Boiss. & Heldebr. Ex Benth bitkisinin doğal ortamından toplanan yaprak ve yaprak sapları ile *in vitro* elde edilmiş fidelerin yaprak, yaprak sapı ve kotiledon eksplantları başlangıç materyali olarak kullanılmıştır.

Doğal ortamından toplanan yaprak ve yaprak sapları %70'lik Etil alkol'de 5 dakika tutulmuş daha sonra % 4.5'lik sodyum hipokloritte (NaOCl, 3 damla tween-20 ilaveli) 8 dakika süre ile steril edilmiştir. Steril edilen materyaller 5'er dakika süre ile 3 kez steril distile su ile durulanmıştır.

*In vitro* tohum sterilizasyonu ve çimlenmesi Erdağ ve ark., (2010) tarafından belirlenen protokole göre gerçekleştirilmiştir. Buna göre; 30 dakika boyunca çeşme suyu altında yıkanan tohumlar; %70'lik Etil alkolde 10 dakika tutulmuş daha sonra % 4.5'lik sodyum hipokloritte 15 dakika süre ile steril edilmiştir. Steril edilen tohumlar 5'er dakika süre ile 3 kez steril distile su ile durulanmış ve daha sonra yarı güçlü Murashige ve Skoog (1/2 MS, Murashige ve Skoog, 1962) ortamına aktarılmışlardır. Bu ortamda çimlenen fidelerin 7 günlük kotiledon parçaları ve 4 haftalık yaprak ve yaprak sapları eksplant olarak kullanılmıştır.

Tüm denemelerde ½ MS ortamına N<sup>6</sup>-Benziladenin (BA; 0.5, 1.0 ve 2 mgL<sup>-1</sup>) ve 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D; 0.2, 0.5, 1.0 ve 2 mgL<sup>-1</sup>) tek başına veya 2,4-D: BA kombinasyonu (0.2:0.5, 0.2:1.0, 0.2:2.0, 0.5:0.5, 0.5:1.0, 0.5:2.0, 1.0:0.5, 1.0:1.0, 1.0:2.0, 2.0:0.5, 2.0:1.0 ve 2.0:2.0 mgL<sup>-1</sup>) şeklinde ilave edilmiştir. Bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ortam kontrol olarak kullanılmıştır. Tüm ortamlar %3 sukroz (w/v) ve % 0.8 agar-agar (w/v) içermektedir. Ortamların pH'sı 121°C'ta 15 dakika boyunca otoklavda steril edilmeden önce 0.1 M NaOH ve 0.1 M HCl çözeltileri ile 5.8'e ayarlanmıştır.

Kültürler 2 haftalık aralıklarla alt kültür edilmiştir. Kallus indüksiyon frekansı (K<sub>if</sub>), kültür başlangıcından 6 hafta sonra aşağıda yer alan formül kullanılarak hesaplanmıştır:

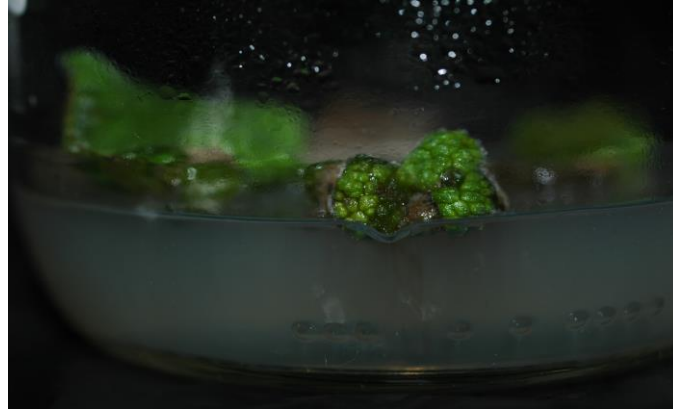
$$K_{if} = \frac{\text{Kallus oluşturan eksplant sayısı}}{\text{Kullanılan toplam eksplant sayısı}} \times 100$$

Tüm kültürler 24±2°C'de 16 saat fotoperiyot koşullarında tutulmuştur. Denemeler bir kavanoza 4 eksplant gelecek şekilde 5 tekrarludur ve tüm denemeler 2 kez tekrar edilmiştir.

### 3. Araştırma Bulguları ve Tartışma

*Dorystoechas hastata* bitkisinin doğal ortamından toplanan yaprak ve yaprak sapları için uygulanan sterilizasyon uygun sonuç vermiştir ancak ortamlara aktarılan steril eksplantlar kısa sürede kararma göstermiş ve canlılıklarını yitirmişlerdir. *D. hastata* bitkisinin doğal ortamından toplanmış yaprak ve yaprak sapları *in vitro* kültüre cevap vermede başarısız olmuştur.

*In vitro* çimlenmiş steril bitkiciklerin yaprak sapı eksplantları da kültüre cevap vermemiştir. *In vitro* çimlenmiş bitkiciklerin yaprak ve kotiledon gibi kısımları ise kültüre kallus oluşumu şeklinde cevap vermişlerdir. Yaprakların eksplant olarak kullanıldığı denemelerde ortamlara aktarılan eksplantların hemen hepsi başlangıçta şişme göstermiş (Şekil 1), ancak bir süre sonra canlılıklarını yitirmişlerdir. Sadece 2 mgL<sup>-1</sup> BA içeren ortamlara aktarılan eksplantlar kallus oluşturmuşlardır (Şekil 2). Oluşan kalluslar alt kültür edilmiş ve kallus biyoması belirli bir dereceye kadar artmıştır. Kalluslar kahverengi ve kompakt görünümlüdür (Şekil 3). Bu durum olasılıkla eksplant kaynaklı oksidatif stres tepkisinden çok, sekonder metabolizmaya ilişkin olaylardan kaynaklanmaktadır ve sık altkültürleme (yaklaşık 2 haftada bir) ile bu sorun aşılanamıştır.



Şekil 1. 2 mgL<sup>-1</sup> BA içeren ½ MS ortamında şişme gösteren yaprak eksplantları



Şekil 2. 2 mgL<sup>-1</sup> BA içeren ½ MS ortamında yaprak eksplantlarından gelişen kalluslar

Sekonder metabolizmanın büyüme düzenleyicilerine bağlı farklılaşma süreci ile yakın ilişkili olduğu kabul edilmektedir (Barz ve ark., 1990; Fowler, 1981; Lindsey ve Yeoman, 1983; Rhodes ve ark., 1986). Örneğin, *Digitalis lanata*'nın hücre kültürleri morfolojik olarak farklılaşmadıkları zaman farmasötik değeri olan glikozidleri üretme yeteneğinde değildir ve kültürlerde bu maddeler ancak organogenezin induksiyonundan sonra tekrar belirlenebilmektedir (Luckner, 1982). Ancak tersi durumlar da literatürde mevcuttur. *Azadirachta indica* kallus kültürlerinde azadirahtin üretimi ile ilgili olarak yapılan bir araştırmada (Wewetzer, 1998), azadirahtin üretimi için morfolojik farklılaşmanın önkoşul olmadığı ve farklılaşmamış hücrelerde yüksek azadirahtin konsantrasyonuna rastlanıldığı sonucu verilmiştir. Aynı çalışmada, alt kültür sayısının (kallus yaşı) bu maddenin ekspresyonunda önemli bir role sahip olabileceği de rapor edilmiştir.

Denemelerimizde yaprak eksplantlarından elde edilen kallusların alt kültürleme ile biyomasının artarken, belli bir süre sonra karararak kendine toksik etki yapması olasılıkla artmış sekonder metabolit içeriği ile ilişkili olabilir. Fenolik oksidasyona bağlı, doku kahverengileşmesi ve ölümü pek çok bitkinin *in vitro* kültür çalışmalarında temel problemlerden biridir. Bu işlem, fenolik bileşiklerin oksidasyonu nedeniyle bitki dokularının yüzeyinin esmerleşmesiyle başlar, bu da bitki dokusunda oldukça reaktif ve toksik olan kinonların oluşumuna yol açar (Taji ve Williams, 1996). Bizim denemelerimizde fenoliklerin artışı kallus biyomas artışı ile paralel gerçekleşmiş görülmektedir. Ancak konu ile ilgili ileri denemelere ihtiyaç vardır.



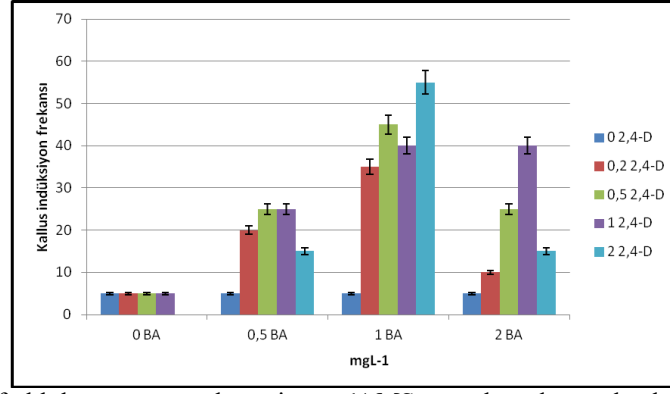
Şekil 3. 2 mgL<sup>-1</sup> BA içeren ½ MS ortamında 2 altkültür sonrası kahverengi kompakt kalluslar

Yaklaşık 7 günlük kotiledon eksplantlarının kullanıldığı denemelerimizde eksplantlar herhangi bir kahverengileşme göstermemiştir. Fenolik içerik konsantrasyonlarının çimlenmenin farklı evrelerinde azalmış ya da artmış olabileceği Thomas ve Ravindra (1999) tarafından da rapor edilmiştir. Özyiğit ve arkadaşlarının (2007) pamuk bitkisinin fenolik madde içeriği üzerine yaptıkları bir araştırmada çimlenmenin ilk 7 gününde total fenolik madde içeriğinin en düşük olduğu sonucuna varılmıştır. Bizim denemelerimizde yaprak ve kotiledon eksplantlarının gelişim evresine bağlı olarak fenolik içerik farklılığı *in vitro* kültüre cevabı etkilemiş olabilir.

Kotiledon eksplantlarının kullanıldığı denemelerde 2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D'nin tek başına kullanıldığı ortam hariç tüm ortamlarda (bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen kontrol grubu da buna dahildir) kallus oluşumu gözlenmiştir. Denemelerde uygulanan bitki büyüme düzenleyici tip ve konsantrasyonuna göre kallus indüksiyon frekansı değişiklik göstermektedir. Eksplant doğasına ilave olarak hormonal diyetin kallogenezi etkilediği pek çok araştırmada da rapor edilmiştir (Hamid ve ark., 2012).

Tek başına BA ve 2,4- D kallus oluşumunu teşvik etmiştir. Ancak düşük oranlarda kallus oluşumu gerçekleşmiştir. Her iki bitki büyüme düzenleyicisinin kombinasyonu ile kallus indüksiyon frekansı artmıştır. En yüksek kallus indüksiyon frekansı 1 mgL<sup>-1</sup> BA ve 2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D içeren ½ MS ortamında elde edilmiştir (% 55). Bu ortamı sırasıyla 1 mgL<sup>-1</sup> BA + 0.5 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D (%45) ve 1 mgL<sup>-1</sup> BA + 1 mgL<sup>-1</sup> 2,4- D ve 2 mgL<sup>-1</sup> BA + 1 mgL<sup>-1</sup> 2,4- D (%40) ilaveli ortamlar izlemiştir (Şekil 4).

*D. hastata* monotipik bir bitki olduğu için aynı cinsten türler ile karşılaştırma yapmak mümkün değildir. Bu nedenle aynı familya üyelerine ait veriler bulguları değerlendirmek için irdelenmiştir.

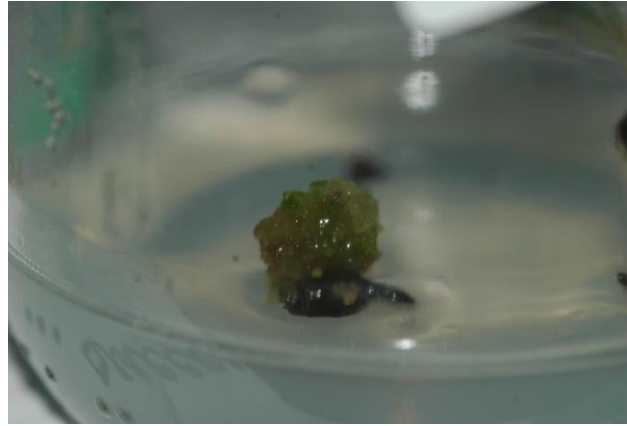


Şekil 4. BA ve 2,4- D'nin farklı konsantrasyonlarını içeren ½ MS ortamlarında görülen kallus indüksiyon frekansları.

2,4- D kallus indüksiyonunu teşvik etmek için tek başına veya sitokininlerle (özellikle benzil amino pürin) kombine edilerek yaygın olarak kullanılmaktadır (Loredo-Carrillo ve ark., 2013). Oksinin yüksek konsantrasyonu ile ona göre düşük sitokinin konsantrasyonunun kallus indüksiyonu için daha etkili olduğu *Salvia canariensis* (Molina, 2004) ve *Tribulus terrestris* (Sharifi ve ark., 2012) ile yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir. Bizim denemelerimizde bu durum sadece tek bir kombinasyonda belirlenmiş (1 mgL<sup>-1</sup> BA ve 2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D içeren ½ MS ortamı) ve bu ortamda en yüksek kallus indüksiyon frekansı elde edilmiştir.

Kotiledonlardan gelen kalluslar kırılğan ve sarımsı- yeşil renktedir (Şekil 5). Kırılğanlık ve renk iyi kallogenizin göstergesidir (Karim ve ar., 2005; Abeda, 2015). Kırılğan kallus terapatik kullanım için sekonder metabolitlerin geniş ölçüde kaynağı olan hücre süspansiyon kültürlerini üretmek için kullanılmaktadır (Boix ve ark., 2013).

Boix ve arkadaşlarının (2013) bir *Lamiaceae* familyası üyesi olan *Rosmarinus officinalis* 'in yaprak eksplantları ile yaptıkları bir araştırmada 2,4-D (0.5 ve 2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D) kullanımı ile kırılğan kalluslar elde edilmiştir. Ancak bu kalluslar rejeneratif kapasiteye sahip değildir. Benzer sonuçlar *Cymbopogen martini* (Patnaik ve ark., 1997), *Origanum vulgare* ve *Origanum syriacum* (Arafeh ve ark., 2006) gibi diğer *Lamiaceae* üyelerinde de rapor edilmiştir. Bizim denemelerimizde de kalluslar rejeneratif kapasiteye sahip değildir. Sadece 0.5 mgL<sup>-1</sup> BA ilaveli ½ MS ortamına aktarılan kotiledon eksplantları direkt rejenerasyon göstermiş, ancak elde edilen sürgünlerin bodur ve hemen hepsinin hiperhidrik olduğu görülmüştür (Şekil 6).



Şekil 5. 1 mgL<sup>-1</sup> BA ve 2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D içeren ½ MS ortamına aktarılan kotiledon eksplantlarından elde edilen sarımsı- yeşil, kırılğan kalluslar.



Şekil 6. 0.5 mgL<sup>-1</sup> BA ilaveli ½ MS ortamında doğrudan oluşan hiperhidrik sürgünler.

#### 4. Sonuç

Bitki doku kültürlerinde tıbbi önemi olan biyoaktif bileşikler üretmek için mikroçoğaltım, organogenezis ve hücre süspansiyon kültürü gibi farklı prosedürler kullanılmaktadır. Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında kallusların yapısı önem taşımaktadır. Kırılgan kallus tipi hücre süspansiyon kültürlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tip kallus eldesi içinde uygun eksplant tipi ve bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonunun belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada monotipik endemik *D. hastata* bitkisinin kallus kültürlerinin oluşturulmasında uygun eksplant tipi ve büyüme düzenleyici konsantrasyonu belirlenmiştir. Sonuçların kallus kültürleri ile bitkinin çoğaltılması sırasında karşılaşılan problemlerin çözümüne yönelik bir katkı sağlaması hedeflenmiştir.

#### Teşekkür

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesi için tohum temin eden Doç. Dr. Özkan Eren'e ve finansal destek sağlayan Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje no: FEF-06014) teşekkür ederiz. Bu çalışmanın bir kısmı, 23-27 Haziran 2008 tarihleri arasında Trabzon-Türkiye de düzenlenen 19. Ulusal Biyoloji Kongresi'nde poster (PB 284) olarak sunulmuştur.

#### Kaynaklar

- Abeda, Z.H.J. 2015. Optimisation de la production d'anthocyanes par culture cellulaire d'oseille de Guinée [*Hibiscus sabdariffa* var *sabdariffa* L. (*Malvaceae*)], isolement et étude de quelques activités biologiques. Thèse de Doctorat, Université Nangui Abrogoua.
- Aliyu, O.M. 2005. Application of tissue culture to cashew (*Anacardium occidentale*) breeding: an appraisal. African J Biotech 4(13), 1485-1489.
- 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 J Agric Sci 2, 247-281.
- Başer, K.H.C. 1994. Essential oil of *Labiatae* from Turkey-Recent, Lamiales Newsletter 3, 6-11.
- Baytop T. 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. Nobel yayınları, İstanbul.
- Bhojwani, S.S. Razdan, M.K. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, a Revised Edition. Studies in Plant Science , 483-536, Elsevier.
- Boix, Y.F., Arruda, R.C.O, Defaveri, A.C.A., Sato, A., Lage, C.L.S., Victo'rio, C.P. 2013. Callus in *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae): A morphoanatomical, histochemical and volatile analysis, Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology: Official Journal of the Societa Botanica Italiana, 147 (3), 751-757.
- Erdag, B., Emek, Y., Kurt, S. 2010. Clonal propagation of *Dorystoechas hastata* via axillary shoot proliferation. Turkish Journal of Botany 34, 233-240.
- Güner, A., Akyıldırım, B., Alkayış, M.F., Çıngay, B., Kanoğlu, S.S., Özkan, A. M., Öztekin, M., Tuğ, G.N. 2012. Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M., Babaç M.T, (eds). Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). İstanbul: Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını. İstanbul.
- Hamid, B., Ouïam, C., Dambier, D., Froelicher, Y. 2012. Mise au point des conditions de calogénèse, caulogénèse et rhizogénèse chez les porte-greffes d'agrumes à partir d'épicotyle: cas du citrange Troyer. J Appl Biosci 60, 4375-4387.
- Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev A.L., P.D., Conn, B.J., Grayer, R., Harley, M.M. 2004. "Labiatae," in Flowering Plants. Dicotyledons: Lamiales (except *Acanthacea* including *Avicenniaceae*), Kadereit, J.W. (eds), 167-275, Springer, Berlin, Germany.

- Hussain, S.M., Fareed, S., Ansari, S., Akhlaquer, R.M., Ahmad, Z.I., Saeed, M. 2012. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci* 4(1), 10-20.
- Karim, R., Chlyah, H., Badoc, A., Douira, A. 2005. Obtention de pieds néoformés suite à l'induction de calcs embryogènes d'embryons zygotiques de blés par le borate de sodium et un extrait de *Fusarium graminearum*. *Bull Soc Pharm Bord* 144, 195-210.
- Loredo-Carrillo, S.E., Santos-Díaz, M.L., Leyva, E., Santos-Díaz, M.S. 2013. Establishment of callus from *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers and effect of abiotic stress on flavonoids and sterols accumulation. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 22(3), 312-318.
- Molina, S.M. 2004. *In vitro* callus induction and plants from stem and petiole explants of *Salvia canariensis* L. *Plant Tiss Cult* 14, 167-172.
- Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* 15, 473-497.
- Naghibi, F., Mosaddegh, M., Motamed, S.M., Ghorbani, A. 2005. Labiatae family in folk medicine in Iran: from ethnobotany to pharmacology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2, 63-79.
- Özyiğit, I.I., Kahraman, M.V. Ercan, O. 2007. Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* 6(1), 3-8.
- Patnaik, J., Sahoo, S., Debata, B.K. 1997. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from cell suspension cultures of palmarosa grass (*Cymbopogon martini*). *Plant Cell Rep* 16, 430-434.
- Poudyal, B.K. Di, G., Zhang Y., Liu, J., Shi, Q. 2008. Studies on browning problem and phenols content on shoots of Yali, Aikansui and Abbe Fetel pears for *in vitro* culture. *Front Agric China* 2(3), 321-330.
- Sharifi, S., Sattari, T.N, Zebarjadi, A., Majd, A., Ghasempour, H.R. 2012. Enhanced callus induction and high-efficiency plant regeneration in *Tribulus terrestris* L., an important medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research* 6 (27), 4401-4408.
- Taji, A.M., Williams, R.R. 1996. Overview of Plant Tissue Culture. In: *Tissue Culture of Australian Plants: Past, Present and Future*. Armidale, Australia, Taji, A.M. and Williams, R.R. (eds.), 1-15. University of New England Press.
- Tan, S.H., Musa, R., Ariff, A., Maziah, M. 2010. Effect of plant growth regulators on a callus, cell suspension and cell line selection for flavonoid production from pegaga (*Centella asiatica* L. urban). *Am J Biochem Biotechnol* 6, 284-299.
- Thomas, P., Ravindra, M.B. 1999. Shoot tip culture in mango: Influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *J Horticultural Sci* 72(5), 713-722.
- Venturella, P., Venturella, G., Marino, M. L., Mericli, A. H., Çubukcu, B. 1988. Phytochemical investigation of the Labiatea *Dorystoechas hastata*. *Giornale Botanico Italiano* 122, 291-294.
- Vijaya, S.N., Udayasri, P.V., Aswani, K.Y., Ravi, B.B., Phani, K.Y., Vijay, V.M. 2010. Advancements in the production of secondary metabolites. *J Nat Prod* 3, 112-123.s