



## Development of the Aromatic Medicinal Plants, *Mentha x piperita* L. and *Mentha pulegium* L. through *in vitro* Callus Induction and Micropropagation

Emine Ayaz<sup>1,a</sup>, Abdülrezzak Memon<sup>1,b,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Faculty of Science and Arts, Usak University, 6400 Usak, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Research Article</i></p> <p>Received : 28/07/2020 Accepted : 14/12/2020</p> <p><b>Keywords:</b> <i>Mentha x piperita</i> <i>Mentha pulegium</i> Micropropagation Callus Aromatic medicinal plants</p>	<p>In this study, we evaluate the potential for <i>in vitro</i> propagation of <i>Mentha spp.</i> for mass production. The two <i>Mentha spp.</i> (<i>Mentha x piperita</i> L., <i>M. pulegium</i> L.) were propagated with four successive 60-day subcultures in MS medium supplemented with for 100µL/L NAA (Naphthylacetic Acid) and 600µL/L IBA (Indole Butyric Acid). The shoots were rooted in the same media. The rooted plantlets were finally acclimatized in a growth room. Callus induction was carried out in MS (Murashige and Skoog) media supplemented with 100µL/L NAA and 250µL/L BAP (Benzylaminopurine). Callus was successfully induced from nodes of <i>Mentha pulegium</i> L. Through micropropagation, both <i>Mentha spp.</i> increased in multiplication rates around 6-fold per month compared to the traditional propagation method. <i>Mentha x piperita</i> and <i>Mentha pulegium</i> showed the most significant potential for plantlet production through the micropropagation method.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 9(1): 159-165, 2021

## Aromatik Tıbbi Bitki olan *Mentha x piperita* L. ve *Mentha pulegium* L.'nin *in vitro* Kallus İndüksiyonu ve Mikroçoğaltım yoluyla Geliştirilmesi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Araştırma Makalesi</i></p> <p>Geliş : 28/07/2020 Kabul : 14/12/2020</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> <i>Mentha x piperita</i> <i>Mentha pulegium</i> Mikroçoğaltım Kallus Aromatik tıbbi bitkiler</p>	<p>Bu çalışmada, <i>in vitro</i> çoğaltma yöntemiyle nanelerin seri üretimi amaçlanmaktadır. İki farklı nane (<i>Mentha x piperita</i> L., <i>Mentha pulegium</i> L.) türünden eksplant örnekleri alınıp gerekli sterilizasyon işlemi yapıldıktan sonra 100 µL/L NAA (Naphthylacetic Asit) ve 600µL/L IBA (Indol Butyric Asit) seviyelerindeki hormonlarla MS (Murashige &amp; Skoog) ortamına alınmıştır ve 60 günde iki hafta arayla alt kültür yapılarak aktarma işlemi gerçekleştirilmiştir. Eksplantlardan aynı MS ortamında kök, gövde ve yaprak oluştuktan sonra naneler bitki büyütme odasında toprak ortamına alıştırmıştır. Nanelerin kallus indüksiyonu 100 µL/L NAA ve 250µL/L BAP (Benzylaminopurine) hormon seviyeleri kullanılarak MS ortamına alınmıştır. Kallus kültürü için ortama alınan eksplantlardan sadece birinde (<i>Mentha pulegium</i>) kallus hücrelerinin indüklendiği görülmüştür. Mikroçoğaltım yöntemiyle geliştirilen her iki <i>Mentha ssp</i>'de (<i>Mentha pulegium</i>, <i>Mentha x piperita</i>) türünde de doğal yolla çoğaltma yöntemine göre ayda 6 kat daha fazla büyüdüğü görülmüştür. Elde edilen verilere göre mikroçoğaltım yöntemiyle geliştirilen <i>Mentha x piperita</i> ve <i>Mentha pulegium</i> türlerinin üretim potansiyelinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.</p>

<sup>a</sup> [1843055006@ogr.usak.edu.tr](mailto:1843055006@ogr.usak.edu.tr)

<sup>ib</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3236-6587>

<sup>b</sup> [armemon@usak.edu.tr](mailto:armemon@usak.edu.tr)

<sup>ib</sup> <http://orcid.org/0000-0001-9447-6453>



## Giriş

Dünya genelinde yetişen bitkilerin yaklaşık %12,5'ini oluşturan tıbbi ve aromatik bitkiler, içerdikleri etken maddelerle başta insan sağlığı olmak üzere ilaç ve gıda sanayisinde kullanılması nedeniyle bu bitkilere olan talep her geçen gün giderek artmaktadır (Schippmann, 2002; Temel ve ark. 2018). Bu bitkiler doğrudan veya dolaylı yollarla insan beslenmesinin %80'ini karşılamakta ve özellikle içerdiği bileşenlerden dolayı geleneksel tıp ve modern tıbbın birçok alanında kullanılmaktadır. Bu kapsamda, insan sağlığı üzerinde özellikle de bağırsıklığı düşük insanlar için olumsuz etkilere neden olan kimyasal ilaçlara karşı bu bitkisel ürünler alternatif bir çözüm olarak karşımıza çıkmakta ve bunların terapötik etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır (Molsaghi, 2014; Nassiri, 2008). Sentetik ve organik kimyadaki gelişmelere rağmen modern farmakopide kullanılan ilaçların %25'inin bitkilerden elde edildiği, diğerlerinin de bitkilerden izole edilerek yapılan sentetik ilaçlar olduğu bilinmektedir.

Tıbbi ve aromatik bitkiler içerisinde yer alan Lamiaceae familyası uçucu yağ ve sekonder metabolit bakımından zengindir (Baser, 1993) ve büyük çoğunluğunun kültürü yapılmaktadır (Ellialtıoğlu ve ark. 2007). Tıbbi ve aromatik bitkiler grubunda yer alan nane Lamiaceae-Ballıbabagiller familyasına aittir. Nane çok yıllık bir bitkidir ve vejetatif yöntemle çoğaltılır (Baytop, 1992). İçerdiği yüksek oranda uçucu yağ ve sekonder metabolitlerden dolayı tıp, gıda, ilaç, kozmetik ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılmaktadır (Kitto, 2016; Phatak, 2002; Baytop, 1999). Lamiaceae familyası dünya genelinde 250 cins 4000 tür içermekte olup (Kahraman ve ark. 2009), ülkemiz genelinde 7 türü olduğu bilinmektedir (Baydar, 2005; Baytop, 1992). Bunlardan *Mentha x piperita* (İngiliz nanesi), *Mentha arvensis* L. (Japon nanesi) ve *Mentha spicata* L. (Bahçe nanesi) türlerinin kültürü yapılmaktadır. Ayrıca bu türler içerisinde bergamot veya limon nanesi (*Mentha citrata* Ehrh.), su nanesi veya kıvrıcık nane (*Mentha aquatica* L.), elma nanesi veya kırmızı nane (*Mentha gentilis*), ananas nanesi (*Mentha gentilis* L. var. *variegata*), yarpuz veya filiskin (*Mentha pulegium*) gibi türleri de bulunmaktadır (Baydar, 2005). Özellikle bu türlerden bazıları mentol, karvon, menton ve pulegon gibi majör ana bileşenleri içerir (Baydar, 2005) nedeniyle, bu türler doğal antioksidan kaynağı olarak nitelendirilmektedir (Phatak, 2002; Holozmanova, 1996). Bunun yanı sıra en başta tıp olmak üzere birçok alanda çok fazla kullanılmalarının nedenleri olarak antiseptik (Baytop, 1999), antifungal (Hmiri ve ark. 2011), antibakteriyel (Sujana, 2013) ve antimikrobiyal potansiyele sahiptir (Babaoğlu, 2002).

Bu çalışmada kullanılan türlerden biri olan *Mentha x piperita*; *M. aquatica* L. ve *M. spicata* L. türlerinin melezidir. Türkiye'de doğal ve kültür bitkisi olarak yetiştirilmektedir (Telci ve ark. 2001). *Mentha x piperita* (Peppermint), nemli ve ılıman iklimlerde iyi yetişen çok yıllık bir bitkidir ve en yaygın olarak Avrupa, Asya, Amerika Birleşik Devletleri, Hindistan ve Akdeniz ülkelerinin ılıman bölgelerinde yetiştirilir. Bununla birlikte kuraklığa karşı duyarlıdır. Bu tür en verimli ve en kaliteli uçucu yağa sahip olan ve (Baytop, 2005) ayrıca uçucu yağında %45-50 oranında mentol bulunduran önemli bir türdür (Tanker ve ark. 1998). Bitki aromatik, uyarıcı, mide,

gaz giderici ve bulantı, şişkinlik, baş ağrısı ve kusmayı hafifletmek için kullanılır. Bu cinsin üyeleri, dünyadaki ekonomik açıdan önemli olan mentol üretimi için tek kaynaktır. Bazı üyelerin farklı aromaları nedeniyle hem taze hem de kurutulmuş formda bitkisel çaylar ve çeşniler olarak kullanımları mevcuttur (Baser ve Kurkcuoğlu, 1999).

Kullanılan bir diğer tür de yine Lamiaceae familyasına ait önemli bir tıbbi bitki olan *M. pulegium* (Pennyroyal), hem dünya çapında hem de Türkiye de geniş bir yayılım alanına sahip bir bitkidir (Eryiğit, 2006). Bu türün toprak üstü kısımları tıbbi açıdan önemli etkiler sergilemekte olup, bu etkiler antioksidan, analjezik, antibakteriyel, fungusit şeklinde görülmektedir (Zargari, 2011). Özellikle uçucu yağında %80-95 oranında pulegon bileşeni içermesi nedeniyle eczacılık alanında büyük öneme sahiptir (Lawrence, 2007). Son on yılda, *M. pulegium* uçucu yağlarının güçlü pestisit ve antioksidan özellikler göstermesi pulegon ve menthon bileşenlerinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Son araştırmalar, bakterilerin, mayaların, mantarların, böceklerin, akarınların, parazitlerin ve nematodların üzerinde sergilediği abiyoetik etki nedeniyle son derece önemli olduğu vurgulanmaktadır. Ayrıca uçucu yağı, veba/haşere kontrolü için geleneksel olarak kullanımından dolayı dikkatleri üzerine çekmektedir (Domingues, 2019).

Bu çalışmada, tıbbi ve aromatik bitki kategorisinde yer alan ve birçok alanda kullanımı olan nane bitkisine yönelik talebin karşılanması için hem kalite ve verim, hem de hızlı üretimi amacıyla biyoteknolojik bir yöntem olan mikroçoğaltım kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda, nane yağının Türkiye'de alternatif tıpta kullanımının yanı sıra modern tıpta da büyük oranda kullanılması nane üzerinde yapılacak olan çalışmaları daha da ilgi çekici hale getirmekte ve aynı zamanda bu bitkinin birçok alanda uygulanması için önerilmektedir. Ancak, nanenin artan pazar payındaki talebe olan ihtiyacın doğal yollarla üretimi ile karşılanması pek mümkün olmamaktadır. Diğer yandan, çoğu tıbbi ve aromatik bitki gibi nane bitkisinin doğal yaşam alanlarının sınırlı olmasının yanı sıra belirli coğrafi ve çevresel koşullarda yetişmesi de diğer bir sınırlayıcı faktörler arasındadır. Bu sorunlar göz önünde bulundurularak, kaliteli ve verimli üretimi arttırmak amacıyla kullanılan birçok yöntem nazaran mikroçoğaltım, bu sorunların giderimi için önemli alternatif bir yöntem olarak değerlendirilmektedir. Mikroçoğaltım, direkt veya indirekt yollarla olgunlaşmamış veyahut olgunlaşmasını tamamlamış bitki kısımlarının çoğaltılması, köklendirilmesi ve daha sonra toprakta alıştırılarak büyütülmesi işlemine dayanan popüler biyoteknolojik bir yöntemdir (Babaoğlu ve ark. 2001). Bu teknik, bitkilerden hızlı çoğaltım ve yüksek kaliteli ürünlerin üretimi için yüksek potansiyele sahip özellikler sergilemektedir (Mehta, 2012). Dolayısıyla *in vitro* kültürde çevreden bağımsız olarak kontrollü ve steril koşullarda, tüketici ihtiyacı doğrultusunda istenen bileşiklerin üretimini arttırmak ve üretmek mümkündür (Bourgau, 2001). Son yıllarda tıbbi bitkilerin doku kültürü aracılığıyla hızlı ve kitlesel çoğaltımı, yıl boyunca üretimi, patojensiz üretimi, verimliliği ve verimi arttırımı, nesli tükenmekte olan türlerin korunumu ve ikincil

metabolitlerin *in vitro* üretimi (Tripathi, 2003; Mulabagal, 2004) için mikroçoğaltım kullanılmaktadır. Ancak *Mentha x piperita* ve *M. pulegium* türlerinin mikroçoğaltım yöntemi ve doğal ortamda üretimi arasındaki farkları gözlemlenmesi amacıyla yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu bağlamda, nanenin iki türünün mikroçoğaltım ve kallus gelişimi için belirli hormon seviyeleri uygulanarak doku kültürü kapsamında üretimi değerlendirilmiştir.

## Materyal ve Yöntem

Bu çalışmada, kullanılan nane bitkisinin iki önemli türü (*Mentha x piperita*, *M. pulegium*) Ankara TİGEM (Tarım İşletmeleri Genel Müdürlüğü)'den temin edilmiştir. Bu bitkiler Uşak Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nün iklim odasında yetiştirilmiştir.

### Bitkilerin Yetiştirilmesi

İlk olarak, her iki türe ait bitkiler iklim odasında sürekli olarak yetiştirilmiştir. Daha sonra, ana materyallerden mikroçoğaltım ve kallus yöntemi için nod eksplantlarından alınıp, hazırlanan MS ortamına (Murashige ve Skoog, 1962) aktararak geliştirilmiştir. Uygulanan doku kültürü metodu aşağıda verilmiştir.

### Materyal Sterilizasyonu

Doku kültürü kabı olarak 300 ml hacmindeki otoklavlanabilir plastik petri kapları ve test cam tüpleri kullanılmıştır. Her bir kaba 20 ml besi ortamı dökülerek akabinde otoklavda (Nüve steamart OT 106) 121°C sıcaklıkta 15 dakika boyunca 1,06 atm buhar basıncında sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyon aşamaları (Bıçakçı ve Memon, 2005) metoduna göre yapılmıştır.

### Eksplant Sterilizasyonu

Mikroçoğaltım için alınan eksplantlar (nod) (Bıçakçı ve Memon, 2005) metoduna uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan metot aşağıda belirtilmiştir:

İlk olarak, eksplantlar fırça yardımı ile temizlendikten sonra antibakteriyel sıvı sabunla muamele edilerek ardında bol su ile durulanmıştır. Daha sonra, eksplantlar distile suyla (Millipore/Direct Q-3 UV) seyreltilmiş olan sodyum hipoklorit solüsyonu için %5'lik ticari çamaşır suyunda 1-2 dakika bekletilmiş ve akabinde 3-4 kez distile su ile durulanmıştır. Bu işlemler birkaç kez tekrarlandıktan sonra sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

### MS (Murashige & Skoog) Ortamının Hazırlanması

Mikroçoğaltım için bitki materyallerine uygun rejenerasyon ve köklenme besiyerleri hazırlanırken kullanılan vitaminler, bitki büyüme düzenleyiciler ve MS (Murashige ve Skoog, 1962) besiyerinde; Sukroz (Merck) 30 gr/L, A, B1, B2, C, D, E, F, G vitaminleri sırasıyla 5 ml/L, 5 ml/L, 5 ml/L, 5 ml/L, 5 ml/L, 5 ml/L, 10 µl/L, pH sı 6, hormonlar IBA (Indol Butyric Asit-Sigma) 600µL, NAA (Naphthylacetic Asit-Sigma) 100µL/L, 6gr/L agar (Sigma firması) mevcuttur. Ayrıca kallus kültürü için 100µL/L NAA ve 250 µL/L BAP (Benzylaminopurine-Sigma) hormon seviyeleri kullanılmıştır.

Mikroçoğaltım için; 4,4 gram/L MS (Sigma firması), 30 gr/L sükröz, 6 gr/L agar, 100 µL/L NAA, 600 µL/L IBA hormonları 1 L dH<sub>2</sub>O' da çözündürülerek, pH (Mettler

Tolede S20-K) 5,4-5,8 ayarlanmıştır. Otoklavlama işleminden sonra hazırlanan solüsyon cam test tüplerine ve 30 cc plastik petri kaplarına paylaştırılmıştır. Tüm aşamalar, hava akışlı steril kabinde gerçekleştirilmiştir. Mikroçoğaltım için gerekli sterilizasyon işlemi yapıldıktan sonra steril hava akışlı kabin içerisinde her iki türden de nod eksplantları belirli seviyelerdeki hormon miktarlarıyla MS ortamında cam tüplerin içinde kültüre alınmıştır. Kültür ortamına alındıktan bir hafta sonra her iki türde de kök ve gövde gelişimi gözlemlenmiştir. Bitkiler 60 gün boyunca haftada iki defa olacak şekilde alt kültür yapılarak petri kaplarında çoğaltılmıştır. İki ay sonunda toprak ortamına alıştırılmaya hazır hale getirilmeye ve iklim odasında toprak ortamına alıştırılmaya çalışılmıştır. Her iki türde bir hafta içerisinde toprak ortamına hızlı bir şekilde adapte olmuştur. Diğer bir yandan, doğal ortamdan alınan türler de iklim odasında aynı zaman diliminde 3 litrelik saksılara yerleştirilmiştir. Bitkiler her iki yöntemle ikişer saksı olacak şekilde üç tekrerrür halinde, 16 saat gündüz/ 8 saat gece periyodu, 22-25°C hava sıcaklığı, %70/85 bağıl nem oranı ve 10.000 lüks ışık yoğunluğu olan iklim odasında yetiştirilmiştir. Bitkilerin gelişebilmesi için ¼ oranında seyreltilen Hoagland (Hoagland ve Amon, 1938) besin çözeltisi (Tablo 1.) saksı başına 50 ml olacak şekilde bir ay boyunca haftada iki defa uygulanmıştır. Bir ay sonunda her iki yöntemle gelişen bitkilerin çiçeklenme öncesi yaprakları hasat edilmiş ve oda sıcaklığında kurutularak ölçümleri yapılmıştır.

Kallus kültürü için her iki türden alınan nod eksplantların sterilizasyon işlemi gerçekleştirildikten sonra steril hava akışlı kabin içerisinde 100 µL/L NAA, 250 µL/L BAP hormon seviyelerinde MS ortamına alınmıştır. *Mentha x piperita* türü için kallus gelişimi gözlemlenmediğinden (50µL/L NAA- 600µL/L BAP ve 50µL/L IBA-600µL/L BAP) seviyelerinde iki defa hormon değişikliği yapılmıştır.

Tablo 1. Bitkilerdeki 1X Hoagland solüsyonunun içeriği (Hoagland ve Arnon, 1938)

Table 1. The composition of Hoagland solution (x1) given to the plants (Hoagland and Arnon, 1938)

Stok Solüsyon	Bileşenler	Son Konsantrasyon
A	KNO <sub>3</sub>	6,5 mM
	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	4,0 mM
B	NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 mM
	MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	2,0 mM
C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	4,6 µM
	MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,5 µM
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,1 µM
	ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,2 µM
D	FeCl <sub>3</sub>	45µM

## Bulgular

Bu çalışmada nane bitkisinin iki önemli türü olan *M. pulegium* ve *Mentha x piperita* mikroçoğaltım ve kallus kültürü yöntemi ile geliştirilmiştir. *M. pulegium* türünün mikroçoğaltım ve kallus kültürü için uygulanan ortam miktarları Tablo 2' de verilmiştir. Mikroçoğaltım için uygulanan 100 µl/ NAA+600 µl/L IBA ve kallus kültürü için uygulanan 100 µl/L NAA+250 µl/L BAP hormon seviyelerinde başarılı olunmuştur.

Tablo 2. Farklı hormon içeren MS besi ortamlarında *M. pulegium*'un mikroçoğaltımı ve kallus kültürü.

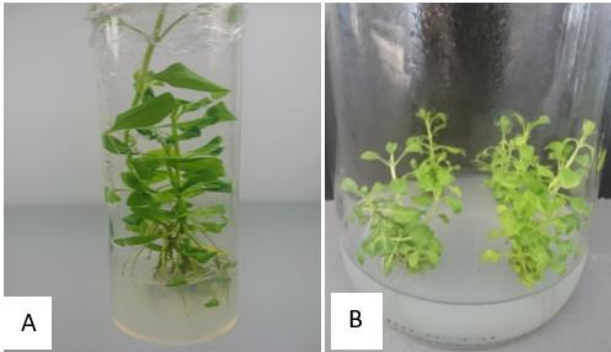
Table 2. Micropropagation and callus culture of *M. pulegium* in MS media containing different hormone concentrations

	Hormonlar	MS	Sükroz	Agar	Kök	Gövde	Kallus
Mikroçoğaltım	100 µl/L NAA+ 600 µl/L IBA	4,4 g/L	30g/L	6,8g/L	Var	Var	Yok
Kallus Kültürü	100 µl/L NAA+ 250 µl/L BAP	4,4 g/L	30g/L	6,8g/L	Yok	Yok	Var

Tablo 3. Farklı hormon içeren MS besi ortamlarında *Mentha x piperita* 'nın mikroçoğaltım ve kallus kültürü

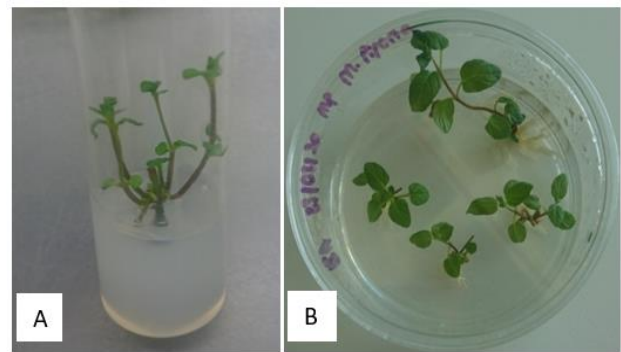
Table 3. Micropropagation and callus culture of *Mentha x piperita* in MS media containing different hormone concentrations

	Hormonlar	MS	Sükroz	Agar	Kök	Gövde	Kallus
Mikroçoğaltım	100 µl/L NAA+ 600 µl/L IBA	4,4g/L	30g/L	6,8g/L	Var	Var	Yok
Kallus Kültürü 1	100 µl/L NAA+ 250 µl/L BAP	4,4 g/L	30g/L	6,8g/L	Yok	Yok	Yok
Kallus Kültürü 2	50 µl/L NAA+ 600 µl/L BAP	4,4 g/L	30g/L	6,8g/L	Yok	Yok	Yok
Kallus Kültürü 3	50 µl/L IBA+ 600 µl/L BAP	4,4 g/L	30g/L	6,8g/L	Yok	Yok	Yok



Şekil 1. MS+ hormon ortamında *M. pulegium*'un mikroçoğaltımı. A.cam tüp, B. petri kabında yetiştirilen bitkilerin görüntüleri

Figure 1. The micropropagation of *M. pulegium* MS medium+ hormone. A. Plantlets were grown in a glass tube, B. Plantlets were grown in a petri dish



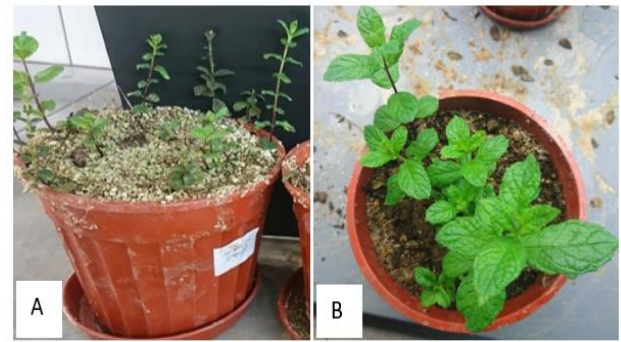
Şekil 2. *Mentha x piperita*'nın mikroçoğaltım MS+hormon ortamı. A. Cam tüp, B. petri kabında yetiştirilen bitkilerin görüntüleri

Figure 2. The micropropagation of *Mentha x piperita* MS medium+hormone. A. Plantlets were grown in a glass tube, B. Plantlets were grown in a petri dish



Şekil 3. A. *M. pulegium*'un mikroçoğaltım ve B. doğal ortamda bir ay içinde yetişen bitkilerin görüntüleri.

Figure 3. A. *M. pulegium* plants were grown for one month in pot culture after micropropagation. B. Plants were grown for one month from natural cuttings.



Şekil 4. A. *Mentha x piperita* 'nın doğal ortamda ve B. mikroçoğaltım yöntemiyle bir ay içinde yetişen görüntüleri.

Figure 4. A. *Mentha x piperita* plants developed from natural cuttings and B. plants developed from micropropagation (plants are one month old).

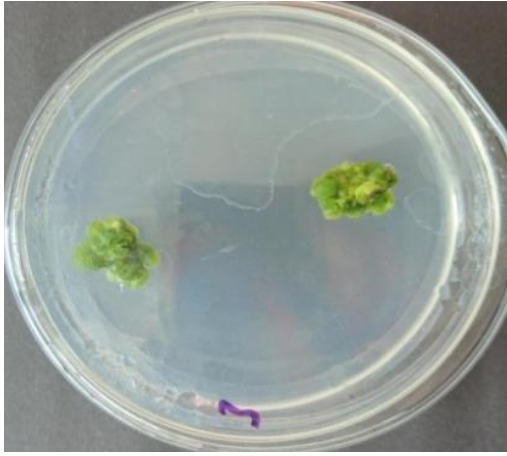
*Mentha x piperita* mikroçoğaltım için 100 µl/L NAA+600 µl/L IBA hormon seviyelerinde başarılı olunurken, 100 µl/L NAA+250 µl/L BAP hormon seviyelerinde kallus oluşumu gözlemlenmemiştir. Buna bağlı olarak, *Mentha x piperita* türünde kallus gelişimi için iki farklı hormon ve miktar değişikliği; 50 µl/L NAA+600 µl/L BAP ve 50 µl/L IBA+600 µl/L BAP uygulanmış, ancak herhangi bir başarı kaydedilmemiştir (Tablo 3.).

*M. pulegium* belirli hormon seviyelerinde MS ortamında Şekil 1' deki gibi cam test tüpünde kültüre alınmış ve bir hafta sonunda kök ve gövde oluşumu

gözlemlenmiştir. Bitkinin çoğaltılması için 60 gün boyunca iki hafta arayla alt kültür yapılarak petri kaplarına aktarılmış ve hızlı bir oranda büyüme gözlemlenmiştir.

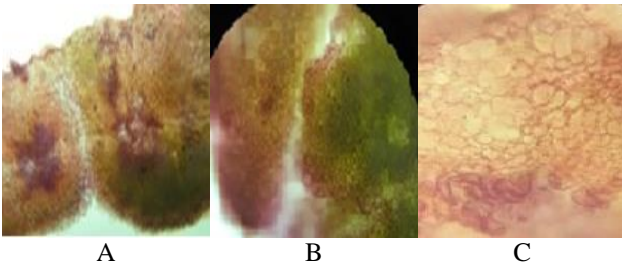
Diğer bir yandan, *Mentha x piperita* türü de ortama alındıktan bir hafta sonunda cam tüplerde kök ve gövde oluşumu gözlemlenmiştir. Bitkinin çoğaltılması için 60 gün boyunca iki hafta arayla alt kültürü yapılarak, petri kaplarında büyütülmüştür. Ayrıca *Mentha x piperita* türünde agar yerine aynı oranda fitajel kullanılmış ve kök oluşumu daha iyi gözlemlenmiştir (Şekil 2.).





Şekil 5. *M. pulegium*'un nod eksplantından kallusunun gelişmesi. *Mentha pulegium*'un NAA ve BAP hormon seviyelerinde MS ortamına alındıktan sonra kallus induksiyonu görünümü (detaylı olarak materyal metoda bakınız).

Figure 5. Callus development from nodes of *M. pulegium* explants. Callus induction was observed after the application of NAA and BAP (see details in material and method section).



Şekil 6. *M. pulegium*'un organize olmamış kallus hücrelerinin ışık mikroskopunda görüntüleri. (A: 10X, B: 40X, C: 100X).

Figure 6. Light microscopic images of the unorganized callus cells of *M. pulegium*. (A: 10X, B: 40X, C: 100X).

Tablo 4. Mikroçoğaltım yöntemi ve doğal ortamda yetişen bitkilerin yaprak kuru ağırlık oranları.

Table 4. The dry weight of the leaves of plants grown for one month in pot culture.

	MY	DY
<i>Mentha x piperita</i>	10,93±0,24	1,9±0,08
<i>Mentha pulegium</i>	10,66±0,16	1,86±0,12

MY: Mikroçoğaltım yöntemiyle geliştirilen bitkilerin kuru ağırlık oranları (g±SE), DY: Doğal ortamda yetiştirilen bitkilerin kuru ağırlık oranları (g±SE); ±: Üç tekrar halinde elde edilen standart sapmayı ifade etmektedir. g: gram

*M. pulegium* türü iki ay sonunda toprak ortamına alıştırmaya hazır hale gelmiştir. Kültür ortamından dış ortama adapte edildikten sonra üç tekerrürlü olacak şekilde, her bir tekerrür iki saksı olmak üzere toprak ortamına alıştırmıştır. Bitkinin bir hafta içerisinde ortama adapte olduğu görülmüş ve bir ay sonunda doğal ortamda yetişen bitkilere göre daha hızlı geliştiği görülmüştür. Mikroçoğaltım ile geliştirilen türün doğal ortamda yetişen türe kıyasla daha canlı ve daha fazla yaprak gelişimi gözlemlenmiştir (Şekil 3).

Aynı hormon seviyelerinde geliştirilen *Mentha x piperita* türü de iki ay sonunda kültür ortamından toprak ortamına her bir tekerrürde iki saksı olacak şekilde üç tekerrür halinde adapte edilmiştir. Bitkinin adapte olduktan bir ay sonraki hali Şekil 4'de verilmiştir. Mikroçoğaltım ile geliştirilen bitkinin doğal ortamda yetiştirilen bitkiye göre daha hızlı büyüme gösterdiği ve yaprak miktarının daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

Her iki türün de bir ay sonunda hasat işlemleri yapılarak, kuru ağırlık miktar ölçümleri yapılmış ve mikroçoğaltım ile geliştirilen bitkilerin doğal ortamda yetiştirilen bitkilere kıyasla yaprak kuru ağırlık miktarları yaklaşık 6 kat daha fazla olduğu saptanmıştır (Tablo 4).

İki türde de kallus gelişiminin oluşması için 100µl/L NAA ve 250µl/L BAP hormon seviyelerinde MS ortamına alınmıştır. Bu hormon seviyelerinde *M. pulegium* türünde kallus oluşumu gözlemlenirken *Mentha x piperita* türünde kallus oluşumu gözlemlenmemiştir. *M. pulegium* türünden alınan nod eksplantları kültüre alındıktan bir ay sonunda kallus hücrelerinin oluşumu Şekil 5'de verilmiştir.

Kallus hücrelerinin ışık mikroskopunda 10X, 40X ve 100X objektiflerindeki görüntüleri Şekil 6'da verilmiştir. 100X objektif görüntüsünde kallus hücrelerinin bölünme yeteneklerini devam ettirdikleri detaylı bir şekilde gözlemlenmiştir.

## Tartışma

Tıbbi ve aromatik bitkiler genel anlamda belirli çevresel koşullarda yetişmektedir ve hasat edilmesi sırasında germplazmanın yok olma riskiyle karşı karşıya kalınabilir. Bu bitkilerin korunabilmesi için Hindistan da Sharma ve ark. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada mikroçoğaltım yöntemi kullanılarak tıbbi bitkilerin biyoçeşitliliği korunmuştur. Bu çalışmada mikroçoğaltım yöntemiyle belirli koşullar altında bitkiler yetiştirilerek doğadan toplanmasına gerek kalmadan her mevsim üretim sağlanmıştır. Mikroçoğaltım yöntemi kullanılarak geliştirilen tıbbi ve aromatik bitkiler aşırı hasadın verdiği bir takım zararları ortadan kaldıracaktır.

Çalışmamızdaki amaç doğrultusunda mikroçoğaltım yöntemiyle kontrollü şartlarda nanelerin içerdiği bileşenlerinin çevresel koşullardan etkilenmemesini sağlayarak daha hızlı ve fazla miktarda verim elde edilebildiği gözlemlenmiştir. Nane içerdiği bileşenlerden dolayı dünya genelinde çok büyük öneme sahiptir ve bu denli önemli olan bitkinin hızlı bir şekilde çoğaltılmasına ihtiyaç vardır. Bu ihtiyaç doğrultusunda, her iki türde de belirli hormon seviyelerinde MS ortamına alınan nod eksplantlarından bitki gelişimi başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. MS ortamına alındıktan yaklaşık bir hafta sonra bitki gelişmeye başlamış olup, iki hafta arayla alt kültür yapılarak MS ortamında çoğaltılması sağlanmış ve 6 ay sonrasında toprak ortamına alıştırmıştır. Mikroçoğaltım ile geliştirilen bitkiler doğal ortamda yetiştirilen bitkilere nazaran 6 kat daha fazla büyüme göstermiştir (Tablo 4). Bu sonuçlar, mikroçoğaltım ile hızlı bir şekilde ve çeşitliliği en az olan nanelerin üretilmesiyle beklenen talebin karşılanması dünya ekonomisine büyük oranda katkı sağlayacağını göstermektedir. Bu yöntem kullanılarak geliştirilen nanelerin firmalara tavsiye edilerek seri üretimi yapılabilir. Buna ek olarak, farklı bölgelerde yetişen naneler farklı iklim şartlarına maruz

kaldığından dolayı içerdiği bileşenlerin miktarlarında değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir (Benlarbi ve ark. 2014). Ancak doku kültürü yöntemiyle bu değişimler en aza indirilebilir ve farklı yerlerden bitki toplanmasına gerek kalmayabilir. Böylece nane mikroçoğaltım yöntemiyle tarımda kültür bitkisi olarak yetiştirilebilir.

Mikroçoğaltım yöntemiyle geliştirilen *Mentha x piperita* su kültürüne aktarılarak yetiştirilen bir çalışmada toplam fenolik ve flavanoid bileşenlerinin tarlada yetişen bitkilere nazaran daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Mallick ve ark., 2016). Bu durum kontrollü şartlarda büyüyen bitkilerin tarlada yetişen bitkilere göre çevresel koşullardan etkilenmediğinden daha fazla verim elde edildiğini göstermektedir. Çalışmamızda da mikroçoğaltım ile gelişen bitkilerin daha hızlı büyüdüğü gözlemlenmiştir (Şekil 3 ve Şekil 4). Bu sonuçlardan mikroçoğaltım yöntemiyle belli koşullar altında büyüyen bitkilerin çevresel koşullardan etkilenmediğinden daha hızlı büyüdüğü söylenebilir.

Mentol üretimi için doku kültüründe bazı başarılı girişimler yapılmıştır (Spencer, 1993; Kim, 1996; Chnag, 1998). Diğer bir çalışmada sitokin BAP hormonunun diğer sitokine göre sürgün tomurcuklarının büyümesinde daha fazla etkili olduğu görülmüştür (Phatak ve Heble, 2001; Ghanti, 2004). Bizim çalışmamızda kullanılan BAP hormonunun mikroçoğaltım ortamında bitkilerin gelişmesinde son derece başarılı bir sitokin hormonu olarak etki göstermiştir. Çalışmamızdaki bitkilerin doğal ortamda yetişen bitkilere nazaran daha hızlı büyümesi aynı zamanda bitki düzenleyici hormonların etkisinin olabileceği söylenebilir.

İstenilen aromalardan üretirken bitki düzenleyici hormonlarının etkisi, nanelerin mikroçoğaltım yöntemiyle umut vaat edici olmuştur (Łyczk ve ark., 2020). Mentolün daha fazla üretilmesi ekonomi bakımından büyük önem arz etmektedir. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada hücre kültürü ortamında pulegon bileşeni kullanılarak mentol verimliliğinin arttığını gözlemlenmiştir (Chakraborty ve Chattopadhyay, 2008).

Kallus gelişimi için alınan eksplantlardan (nod, inter nod, kök ve yaprak) en iyi sonucu nod eksplantlarında görülmüştür. İki hafta içerisinde kallus hücrelerinin fazla miktarda büyüdüğü gözlemlenmiştir. *M. pulegium* türünde kallus induksiyonu gözlemlenirken, *Mentha x piperita* türünde kallus induksiyonu gözlemlenmemiştir. İlerleyen çalışmalarda 100µl/L NAA ve 250µl/L BAP hormon seviyeleri kallus üretimi için kullanılabilir. *Mentha x piperita* türünde kallus oluşumunun gözlenebilmesi için diğer hormonların denenmesi gerekmektedir. Ayrıca kallus hücrelerinin oluşmaması bitkinin metabolik özelliklerinden kaynaklanabilir.

Yapılan bir çalışmada BAP ve 2,4-D hormonları kullanılarak kallus geliştirilmesi yapılmıştır, ancak BAP büyüme düzenleyici hormonu olmayan ortamlarda daha iyi kallus gelişimi görülmüştür (Darvish ve ark., 2016). Bu çalışma bizim çalışmamız ile kıyaslandığında; çalışmamızda BAP hormonunun kallus gelişimi için daha başarılı sonuçlar ortaya koyduğu saptanmıştır. BAP ve NAA hormonu birlikte kullanıldığında daha iyi sonuç vermesi iki hormon arasında etkileşim olduğu düşünülmektedir. Fakat Darvish ve ark.'nın çalışmalarında BAP ve 2,4-D hormonu birlikte kullanıldığında 2,4-D hormonu BAP hormonunun etkisini baskıladığı düşünülmektedir. Bu nedenle kallus gelişimi olmamıştır.

Sonuç olarak; mikroçoğaltım yöntemiyle nanelerin seri üretiminin yapılması son derece elverişli bir yöntemdir. Bu yöntemle hem daha hızlı ve fazla miktarda nane üretimi yapılırken hem de çevresel koşulların verdiği olumsuz etkileri giderilebilir. Sekonder metabolitler içerisinde yer alan mentol ve pulegon bileşenlerinin hızlı ve fazla miktarda üretilmesi birçok gıda, tıp, ilaç ve kozmetik alanındaki kullanımını arttırmış olacaktır. Nane uçucu yağına olan talebin mikroçoğaltım yöntemiyle karşılanması Türkiye'nin ekonomik değerini ciddi anlamda yükseltmiş olacağı kanaatindeyiz. Ayrıca yine bu yöntemle ilerleyen çalışmalarda menthol ve pulegon gibi önemli bileşenlerin gen aktarımı yapılarak daha verimli bitkiler elde edilebileceği öngörüsündeyiz. Çalışmalarımız bu yönde devam etmektedir.

## Teşekkür

Temin edilen nane ana materyali için Ankara TİGEM'e ve Dr. Reyhan Bahtiyarca Bağdat'a teşekkür ederiz. Bu çalışma, Abdülrezzak Memon'un MF005 BAP projesi ile desteklenmiştir.

## Kaynaklar

- Babaoglu M, Yorgancılar M, Akbudak MA. 2001. Doku Kültürü, Temel Laboratuvar Teknikleri, Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü ve Uygulamaları: Ofset Hazırlık/Baskı ISBN 975-6652-04-7.
- Babaoglu M. 2002. Bitki doku kültürü teknikleri. SÜ ziraat fakültesi yayınları
- Başer KHC.1993. Essential Oils of Anatolian Labiateae: A Profile. Acta Horticulturae, 333: 217-237. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.1993.333.27>.
- Baser KHC, Kurcuoglu M. 1999. Kuzey Türkiye'den Mentha türlerinin uçucu yağları. J. Essent. Oil Res. 11: 579-588, <https://doi.org/10.1080/10412905.1999.9701218>
- Baydar H. 2005. Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Yayın: 51, s. 113-115. ISBN 9757929794, 9789757929796
- Baytop T. 1992. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu, Ankara. Öncü Basımevi ISBN 975-16-0542-3.
- Baytop T. 1999. Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi. İstanbul: Nobel Kitabevi, 302-304.ISBN 975- 42-0021-1.
- Benlarbi KH, Elmtili N, Macias FA, Galindo JCG. 2014. Influence of in vitro growth conditions in the production of defence compounds in Mentha pulegium L. Phytochemistry Letters, 8: 233-244 <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2014.03.007>
- Bıçakçı E, Memon AR. 2005. An efficient and rapid in vitro regeneration system for metal resistant cotton. Biologia Plantarum, 49: 415-417. <http://dx.doi.org/j.p hytol. 2014.03.007>
- Bourgau F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci, Vol. 161, pp. 839-851. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00490-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00490-3)
- Chakraborty A, Chattopadhyay S. 2008. Stimulation of menthol production in Mentha x piperita cell culture. In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 44, 518. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9145-y>
- Chang JH, Shin JH, Chung IS, Lee HJ. 1998. Improved menthol production from chitosan- elicited suspension culture of Mentha piperita. Biotechnol. Lett. 20: 1097- 1099; doi:10.1023/ A:1005396924568.
- Darvishi E, Kahrizi D, Bahraminejad S, Mansouri M. 2016. Pennyroyal (Mentha pulegium) (in vitro induction of  $\alpha$ -pinene, pulegon, menthol, Menton and limonene). Darvishi et al. Cell. Mol. Bio, 62 (3): 7-9 ISSN: 1165-158X doi: 10.14715/cmb/2016.62.3.2

- Domingues PM, Santos L. 2019. Pennyroyal essential oil (Mentha pulegium): to pesticides composition and applications as an alternative-new trends Industrial Crops and Products, 139, 111534. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2019.111534>
- Ellialtıoğlu Ő, Sevenger S, Sezik E.2007. Őanlıurfa'da Nane tarımının geliştirilmesi üzerinde alışmalar, Őanlıurfa GAP GİDEM Bilgilendirme Toplantısı, 8-9 Nisan, 1-16.
- Eryiğit, F. 2006. Mentha pulegium L. ve Salvia tomentosa Miller bitkilerinin metanol ztlerinin in vitro antioksidan aktivitesinin belirlenmesi. Yksek lisans tezi, Kimya Anabilim Dalı. 2s, Isparta.
- Ghanti K, Kaviraj CP, Venugopal RB, Jabeen FTZ, Rao S. 2004. Rapid regeneration of Mentha piperita L. from shoot tip and nodal explants. 594-598, ISSN 0975-0967.
- Hmiri S, Amrani N, Rahouti M. 2011. In vitro determination of antifungal activity of eugenol and essential oils of Mentha pulegium L. and Tanacetum annuum L. against three fungi causing postharvest rot of apples. Acta Botanica Gallica, 158:609-616. <https://doi.org/10.1080/12538078.2011.10516298>
- Hoagland DR, Arnon DI. 1938 "The water culture method for growing plants without soil", Cal. Agri. Exp. Station Circular, 347: 1-39.
- Holzmanova V. 1996. Rosmarinic acid and its biological activity. Chem Listy Journal, 90, 486-496.
- Kahraman A, Celep F, Dođan M. 2009. Morphology, Anatomy and Palynology of Salvia indica L. (Labiatae), World Applied Sciences Journal, 6: 2, 289-296.
- Kahrizi D, Arminian A, Masumi Asl A. 2011. In vitro Plant Breeding. Razi University. Press.
- Kim T, Kim TY, Bae GW, Lee HJ, Chae YA, Chung IS. 1996. Improved production of essential oils by two-phase culture of Mentha piperita cells. Plant Tissue Cult. Lett. 13: 189-192
- Kitto S. 2016. Micro-reproduction of mint. In: Beyl CA,Trigiano RN (eds) plant propagation, Concepts and laboratory studies, second edn. CRC Press, Boca Raton, FL. Blm 32, s 385-393.
- Lawrance BM. 2007. Mint:The Genus Mentha. CRC Press Taylor & Francis Group. ISBN- 13: 978-0-8493-0779-9.
- Łyczko J, Piotrowski K, Kolasa K, Galek R, Szumny A. 2020. Mentha piperita L. Volatile organic compound composition of Micropropagation and plant growth regulators Potential impact on you. Molecules, 25(11), 26. doi:10.3390/molecules25112652
- Mallick B, Sinha S, Roy D. 2016. Mentha piperita L., grown in the field and obtained by tissue culture evaluation of the antioxidant potential of plants. Int. J. Curr.Microbiol. Uygulama.Sci, 5(3) 382- 391.DOI:<https://dx.org/10.20546/ijcmas.2016.503.045>
- Molsaghi M, Moieni A, Kahrizi, D. 2014. Effective for rapid micro-spread of Aloe vera, Protocol. Pharm Biol, Vol. 52(6), pp.735-739<https://doi.org/10.3109/13880209.2013.868494>
- Mulabagal V, Tsay H S. 2004. Plant cell cultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. Int. J Appl Sci Eng, Vol .2, pp. 29- 48. ISSN 1727-2394
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plantarum, 15: 473-97.
- Nassiri Asl M, Hosseinzadeh H. 2008. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds. Phytother Res, Vol. 22, pp. 709-724. <https://doi.org/10.1002/ptr.2362>
- Phatak VS, Heble MR. 2002. Mentha arvensis'te oraganogenez ve terpenoid sentezi.Fitoterapia. 73: 32-39; doi:10.1016/S0367-326X(01)00347-1
- Schippmann U, Leaman DJ, Cunnningham AB. 2002. The impact of growing and harvesting medicinal plants on biodiversity: global trends and challenges. In: biodiversity and Ecosystem Approach in Agriculture, Forestry and Fisheries. FAO, Roma, İtalya, s. 1-21.
- Sharma S, Rathi N, Kamal B, Pundir D, Kaur B, Arya S. 2010. Conservation of the biodiversity of India's very important medicinal plants through tissue culture technology - a review. Kuzey Amerika Tarım ve Biyoloji Dergisi , 1 (5), 827-833. doi:10.5251/abjna.2010.1.5.827.833
- Spencer A, Hamill J D, Rhodes M J C. 1993. In vitro biosynthesis of monoterpenes by Agrobacterium transformed shoot cultures of two Mentha species.Phytochemistry 32: 911-919;doi:10.1016/0031-9422(93)85228-J.
- Sujana P, Sridhar T, Josthna P, Najdu C.2013. Antibacterial activity and phytochemical analysis of Mentha piperita L (mint) - an important multipurpose Medicinal Plant, American Journal of Plant Sciences, Cilt 4, No 1, s. 77-83. Doi: 10.4236/aips.2013.4101
- Tanker N, Koyuncu M, Cořkun M. 1998. Farmasötik Botanik, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 78, 341.
- Telci İ. 2001.Farklı Nane (Mentha spp.) klonlarının bazı morfolojik tarımsal ve teknolojik özelliklerinin belirlenmesi üzerinde bir araştırma. Doktora Tezi, Gazi Osman Pařa Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat,Türkiye.
- Temel M, Tınmaz AB, ztrk M, Gündüz O. 2018. Dünyada ve Türkiye'de Tıbbi-Aromatik Bitkilerin retimi ve Ticareti. KS Tarım ve Dođa Dergisi, 21 : 198-214. DOI : 10.18016/ksutarimdoga.vi.473036
- Topçu Ő, lgeen H. 2015. Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde retilmesi. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 8 (2): 09-29. ISSN: 1308-0040, E-ISSN: 2146-0132.
- Tripathi L, Tripathi JN.2003. Role of biotechnology in medicinal plants. Trop. J Pharm Res, Vol. 2, pp. 243-253.
- Zargari A. 2011. Medecinal Plant, Tehran University, Press.