

Kekik (*Thymus vulgaris* L.) Bitkisinin *In vitro* Sürgün Rejenerasyonu : Derleme

Muhammet DOĞAN*

*¹ Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman, Türkiye.

*(mtdogan1@gmail.com ORCID: 0000-0003-3138-5903)

Özet–Lamiaceae (Labiata) familyasına ait *Thymus vulgaris* L. (kekik), antik çağlardan beri tıbbi ve baharat bitkisi olarak yetiştirilen, Akdeniz bölgesi orijinli bir türdür. Kekik bitkilerinde tanımlanan biyoaktif bileşikler, antispazmodik, bakterisit, antiseptik, antioksidan gibi etkilere neden olan flavonoidler, timol, karvakrol, öjenol, fenoller, luteolin, timol, terpenoidler ile temsil edilmektedir. Doku kültürü teknikleri günümüzde kitlesel üretim için tercih edilen modern üretim tekniklerinden biridir. Kısa sürelerde, bitki parçalarından binlerce klon bitki elde edilmesine imkan tanır. Üretimler *in vitro* koşullarda gerçekleştiği için mevsimsel durumlardan etkilenmezler. Bu derleme çalışmada tıbbi ve aromatik bir bitki olan kekiğin doku kültürü ile üretimi üzerine gerçekleştirilen bazı çalışmalar sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler –Doku Kültürü, *In Vitro* Üretim, Kekik Sürgün Rejenerasyonu

I. GİRİŞ

Bitkiler insanın barınma, giyinme, beslenme, tat ve kokular başta olmak üzere ilaçlar gibi tüm ihtiyaçlarını karşılamıştır. Bitkiler, diğerleri arasında Ayurveda, Unani, Çin gibi gelişmiş geleneksel tıp sistemlerinin temelini oluşturmuştur. Bu tıp sistemleri, bugün hala kullanımda olan bazı önemli ilaçların ortaya çıkmasına neden olmuştur [1]. Bu bitkilerin *in vitro* koşullarda biyoteknolojik olarak üretilmesi önemli araştırma konuları arasında yer almaktadır ve birçok tıbbi bitkinin üretimi raporlanmıştır [2-6].

Kekik (*Thymus vulgaris* L.), Lamiaceae ailesinden çiçekli bir bitkidir. 15-30 cm boyunda ve 40 cm genişliğindedir. Fransa, İspanya, İtalya, Bulgaristan ve Portekiz Cumhuriyeti başta olmak üzere Avrupa ülkelerinin çoğunda kekik yetiştirilmektedir. Yağın verimi ve kalitesi, malzemenin genetik yapısına, mahsulün hasattaki olgunluğuna, ayar ve damıtma takiplerine göre değişir [7].

Gıda ve tıbbi amaçlı kullanılan *T. vulgaris*, p-simen, timol ve karvakrol gibi monoterpen türevleri üzerindeki bileşiminden dolayı büyük ekonomik öneme sahiptir. *T. vulgaris*'in hepatoprotektif özelliklere sahip olduğu ve balgam söktürücü, akne önleyici madde ve mantar öldürücü ve antiviral ilaç olarak etkinliği kanıtlanmıştır. Bu çok sayıda endüstriyel uygulama, kekiğin esas olarak antioksidan, antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikanser etkilerinden kaynaklanmaktadır [8].

Kekiğin antiseptik, antimikrobiyal, ilaç, büzücü, antelmintik, tıbbi ilaç, gaz giderici, dezenfektan, tıbbi ilaç ve tonik olduğu düşünülmüştür. Kekik, kancalı kurtlar, ascaridler, gram-pozitif ve gram-negatif bakteri, mantarlar ve mayaların yanı sıra *Candida albicans* gibi çeşitli bağırsak enfeksiyonları ve istila durumlarında inanılmaz derecede faydalıdır. Aktif bileşeni timol, enterobacteria ve cocci bakterilerine karşı aktiftir. Kekik ayrıca karaciğer fonksiyonlarını iyileştirebilir ve iştah açıcı görevi görebilir. Gargara olarak kullanılan kekik, larenjit ve iltihap tedavisinde

faydalıdır [7,9]. Bu çalışmada tıbbi ve aromatik bir bitki olan *T. vulgaris*'in doku kültürü koşullarında üretimleri üzerine bir derleme sunulmuştur.

II. BAZI *İN VİTRO* ÇOĞALTIM ÇALIŞMALARI

Kumar Pawelec ve ark. [10] bitki büyüme düzenleyicilerinin kekiğin kallus kültürü üzerindeki etkisini ve bu tür kallus kültürlerinin rosmarinik asit elde etme olasılığını araştırmayı amaçlamışlardır. Sürgün rejenerasyonunu için tohum eksplantları kullanılmıştır. Tohumlar, Murashige ve Skoog'a göre makro ve mikro element içeriğine sahip MS kültür ortamı ile ayrı ayrı test tüplerine yerleştirilmiştir. Kültürlerin başlatılması amacıyla damar demeti boyunca disseke edilen yapraklar kullanılmıştır. Yapraklar, 3 ve 5 mg/dm³ konsantrasyonunda NAA ile kombinasyon halinde BAP ilave edilerek MS ortamına yerleştirilmiştir. Kallus kültürlerinin çoğaltılması, ayrı olarak 3 mg/dm³ konsantrasyonunda ve NAA (1, 2, 3 mg.dm³) ile kombinasyon halinde kullanılan BAP ile takviye edilmiş MS ortamına yerleştirilen kallus dokusu parçalarının kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Ortak kekik kültürlerinin başlatılmasının, bitki büyüme düzenleyicileri olmadan MS ortamında yapılması gerektiği bulunmuştur. Kekikğin kallus kültürünün başlatılması amacıyla en uygun kültür ortamı 3 mg/dm³ BAP ve NAA ilaveli MS çıkmıştır. Yaşlı kekikğin kallus dokusunun çoğaltılması, 1 mg/dm³ NAA ile kombinasyon halinde kullanılan 3 mg/dm³ BAP ile desteklenmiş kültür ortamlarında yapılmalıdır. Üretilen kallus dokusunun kütesinin, NAA içeriğinin artmasıyla azaldığı gözlenmiştir.

Bu çalışmada, *T. vulgaris* 'Słoneczko' için bir mikroçoğaltma protokolü geliştirilmiş ve endüstriyel uygulamalarda gerekli uçucu yağ üretimi için mikroçoğaltılmış bitkilerin potansiyelini değerlendirilmiştir. Tohumlar 10 dakika %10 sodyum hipoklorit (NaOCl) solüsyonunda ıslatılmıştır. Daha sonra her tohum, 5 ml MS ortamı ile doldurulmuş 20 ml'lik bir test tüpüne konulmuştur. Kültürlerin yarısı 40 µEm-2s-1'de tutulan ışık yoğunluğuna tabi tutulmuş ve diğer yarısı karanlıkta kültürlenmiştir. Sürgün eksplantları, BAP, 2iP veya KIN ile takviye edilmiş MS ortamı kullanılarak *in vitro* çoğaltılmıştır. Elde

edilen sonuçlar, bitki gelişimi üzerinde çoğalma aşamasında en olumlu etkiye sahip olan sitokinin'in 5 mg dm⁻³ 2iP olduğunu göstermiştir. Bitki büyüme düzenleyicileri olmadan MS ortamında kültürlenen sürgünlerin tek düğümlü fragmanları, 0.2, 0.5, 1 ve 2 mg/dm³ konsantrasyonlarında IAA, IBA ve NAA ile desteklenmiş MS ortamına aktarılmıştır. Sürgünlerde en iyi köklenme 2 mg/dm³ IBA katkılı MS ortamında elde edilmiştir. *T. vulgaris*'in *in vitro* sürgün kültürlerinden elde edilen uçucu yağlar, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz, başlıca oksijenli monoterpenler (%56.81-57.28) ve monoterpen hidrokarbonlar (%31.90-33.72) tarafından temsil edilen 54 bileşenin varlığını ortaya çıkarmıştır. Tanımlanan bileşenler arasında en bol bulunanlar timol (%33.37-34.05), γ-terpinen (%11.62-11.91), p-simen (%9.81-10.07), karvakrol (%5.63-5.96), karvakrol metil eter (%3.86-) olmuştur [11].

Tevfik ve Yegorova [12] *T. Vulgaris*'in *in vitro* çoğaltmanı ve *ex vitro* adaptasyon koşullarını optimize etmek için çalışma yürütmüşlerdir. Başlangıç aşamasında en uygun kültür ortamının, 1.0 mg/L Kin ve 1.0 mg/l GA₃ içeren MS ortamı olduğu ve bunun üzerinde eksplant başına ortalama 2.2 mikro sürgünün 1.9 cm uzunluğunda elde edildiği tespit edilmiştir. BAP veya TDZ ile takviye edilmiş besiyerlerinde hem mikro sürgünlerin yüksek vitrifikasyon oranı hem de küçük sürgünlerin (0.6-0.9 cm) oluşumu gözlenmiştir. Uygun çoğaltma aşamasında en etkili kültür ortamı, eksplant başına 4.6 sürgün ve 12.8 çoğalma indeksi elde edilen 1.0 mg/l Kin içeren MS'dir. 1,0 mg/l IBA veya 1,0 mg/l IAA ile desteklenmiş MS kültür ortamında mikro çoğaltmanın 3. aşamasında mikro sürgünlerin köklenmesi tavsiye edilmiştir. Turba ve perlitten (1:1) oluşan bir substrat kullanılarak, *ex vitro* adaptasyon sırasında hayatta kalma oranı %89,5 olarak belirlenmiştir.

Polietilen glikol (PEG) kaynaklı kuraklık stresi altındaki *T. vulgaris* fidelerinin morfolojik ve fizyolojik parametreleri incelenmiştir. Kuraklık stresi toleransı için *in vitro* seleksiyona başlamak ve farmasötik maddelerin üretimi için daha verimli bir

yöntem sağlamak için kallus indüksiyonu ve uçucu yağların üretimi analiz edilmiştir. Kekik tohumları, %0, 2, 4, 6 ve 8 (w/v) PEG içeren ortamda çimlenmiş; ve kallus indüksiyonu için gövde eksplantları, farklı PEG konsantrasyonları ile 1 mg/L 2,4-diklorofenoksiasetik asit ile desteklenmiş ortamda kültürlenmiştir. PEG ile indüklenen su stresinden dört hafta sonra, fide büyümesinde, klorofil ve karotenoid içeriklerinde ve kallus ağırlığında ve indüksiyonunda önemli bir azalma görülmüştür. Ancak tohumların çimlenme oranlarında önemli bir fark bulunamamıştır. Prolin ve karbonhidratlar gibi organik ozmolitler, PEG kaynaklı ozmotik stresten etkilenmiştir. İndirgen şekerler, artan PEG konsantrasyonları ile kademeli olarak artarken, prolin seviyeleri şiddetli su stresi altında büyük ölçüde azalmıştır. Ayrıca, PEG antosiyanin içeriğini azaltırken reaktif oksijen türlerini (ROS), lipid peroksidasyonunu, proteinleri ve fenolik bileşik düzeylerini yükseltmiştir. PEG ile muamele edilmiş kekik fidelerinde askorbat peroksidaz aktivitesi ile ROS oluşumu arasında pozitif ilişkiler tespit edilmiştir. Ayrıca PEG, γ -terpinen, p-cymene ve geraniol'ü önemli ölçüde artırırken timol ve karvakrolü azaltarak fideler ve nasırlardaki uçucu yağ bileşimini değiştirmiştir. Bu nedenle, hafif stres seviyeleri, *in vitro* sekonder metabolit üretimini artırabilen oksidatif hasar ve büyüme azalmasına rağmen kekikteki fenolikleri ve yağ bileşenlerini artırmıştır [13].

El-Banna [14] ana bitkilerden türetilen sürgün uçları eksplantları kullanılarak *T. vulgaris*'in dolaylı mikroçoğaltımı için bir protokol geliştirilmeyi amaçlamışlardır. Tek başına veya farklı sitokininlerle (BA ve Kin) kombinasyon halinde farklı oksin konsantrasyonlarına (NAA, IAA ve 2,4-D) sahip MS besin ortamı kallus oluşumunu indüklemek için kullanılmıştır. 1 mg/L'de Kin + 2 mg/L'de 2,4-D ile takviye edilmiş MS ortamı, %100'lük en yüksek kallus oluşum yüzdesini üretmiştir. En önemli sürgün sayısına (23.42 sürgün/eksplant), 2.5 mg/L'de BA ile desteklenmiş MS ortamında elde edilmiştir. Sürgünlerin köklenmesi için 30 g/L sükröz ve 1.5 mg/L'de NAA ile güçlendirilmiş 1/2 MS ortamında elde edilmiştir. Bu besiyerinde sürgünlerin %100'ü sürgün başına ortalama 19.83 kök vermiştir. İyi

gelişmiş köklere sahip sürgünler, toprak karışımı: turba yosunu (1: 1 v/v) ile doldurulmuş saksılara yerleştirilmiştir. Hayatta kalan bitkiciklerin hayatta kalma oranı %98 olmuştur.

El Ansari ve ark. [15] ilk olarak laboratuvarında bulunan ve sürgün ucu kültürü ile mikroçoğaltmadan elde edilen *T. vulgaris* eksplantlarının *in vitro* çoğalmasını gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra altı makro besinin etkisini değerlendirmişlerdir. Bundan sonra, kültür çoğalmasını ve uzamasını optimize etmek için üç farklı konsantrasyonda (0.46, 0.93, 2.32 μ M) yedi sitokinin (Kin, BAP, 2iP, DPU, Adenin, Zeatin ve TDZ) değerlendirilmiştir. Ayrıca, 0.57 μ M'de üç oksinin (IAA, IBA ve NAA) 0.46 μ M'de 4 sitokinin (Kin, BAP, DPU ve Ad.) ile birleştirilmesinin sürgün köklenmesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. Böylece, MS ortamının bitkiciklerin büyümesi için en uygun olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, belirli sitokininlerin eklenmesinin, özellikle 0.46 Kin, 0.46 ve 0.93 BAP, 0.46 2iP, 0.46 DPU, 0.46 Ad eklenmesi daha iyi çoğalmasını ve büyümesini sağlamıştır. Ek olarak, kültürlerin çoğalması ve köklenmesi, 0.46 Kin + 0.57 IAA veya NAA, 0.46 DPU + 0.57 IBA ve 0.46 Ad ilave edildikten sonra iyi bir şekilde optimize edilmiştir. Son olarak, köklü bitkicikler, *ex-vitro* koşullara başarılı bir şekilde alıştırmıştır.

Bu araştırmada, farklı konsantrasyonlarda farklı sitokinin tipi ile takviye edilmiş MS ortamında olgun bitkilerden sürgün uçları veya nodal segmentlerin *in vitro* kültürü yoluyla değerli bir aromatik ve tıbbi bitkinin (*T. vulgaris*) doğrudan bitki rejenerasyonunu geliştirmek amaçlanmıştır. 2 mg/L'de 6-benziladenin (BA) ile takviye edilmiş MS ortamında *T. vulgaris* sürgünlerinin rejenerasyonu için nodal segmentlerin sürgün uçlarından daha verimli olduğu bulunmuştur. En iyi uzama, 0,5 mg/L'de GA₃ ile kombinasyon halinde 2 mg/L'de BA ile takviye edilmiş MS ortamında elde edilmiştir. Sürgünlerin en iyi köklenmesi 1,5 mg/L'de a-naftaleneasetik asit (NAA) ile takviye edilmiş MS ortamında elde edilmiştir. Rejenere bitkiler, toprak karışımı: turba yosunu (1: 1 v/v) ile doldurulmuş saksılara başarıyla yerleştirilmiştir. *In*

vitro kekik bitkileri %100'lük bir hayatta kalma oranına sahip olmuştur [16].

Ana-Maria & Ramona [17] *T. vulgaris* türleri için bir *in vitro* çoğaltma protokolünü üzerine çalışmışlardır. Ekimden dört hafta sonra, ışıkta tutulan kültürlerde çimlenen tohumların yüzdesi %81 ve karanlıkta tutulan kültürlerde %50 olarak belirlenmiştir. En yüksek çoğalma oranı (5,3 sürgün/eksplant) ve en yüksek ortalama sürgün uzunluğu (6,5 cm) fitohormon içermeyen besin ortamında elde edilmiştir. Mineral tuzları yarıya indirilmiş, 2 mg/L IBA ile desteklenmiş MS kültür ortamının *T. vulgaris* sürgünlerinin *in vitro* köklenmesinde en etkili olduğu gösterilmiştir. Köklenen bitkiler, %96'lık bir iklimlendirme oranına ulaşarak, *ex vitro* koşullarına başarılı bir şekilde uyum sağlamıştır. *In vitro* rejenerasyon aşamaları boyunca elde edilen sonuçlar, mikroçoğaltma tekniğinin *T. vulgaris* türleri için verimli bir çoğaltma yöntemi olduğunu doğrulamıştır.

Emilia & Camen [18] *T. vulgaris* bitkisini *in vitro* kültüre almışlardır. *T. vulgaris* bitkisinin iki genotipinden alınan tohumlar, MS0 katı ortamı ve MS + GA₃ ortamı üzerinde çimlendirilmiştir. En iyi çimlenme yüzdesi 0,3 mg/l GA₃ katkılı besiyerinde *Thymus* I genotipi için elde edilmiştir. Sürgünlerin en iyi rejenerasyon oranı hormonsuz MS0 ortamında elde edilmiştir. En düşük ortalama sürgün/fide sayısı *T. vulgaris* II genotipinde elde edilmiştir. Bu iki genotip için en yüksek köklenme oranları, büyüme hormonu içermeyen kültür ortamında elde edilmiştir.

In vitro çoğaltım işlemlerinden önce *T. vulgaris* tohumları için yüzey sterilizasyonu işlemi yürütülmüştür. Tohumlar 20 dakika boyunca kloramin-T %5 solüsyonu ile dezenfekte edilmiştir. Sterilizasyon solüsyonlarının çıkarılmasından sonra (damıtılmış suda durularak), tohumlar hormonsuz Murashige-Skoog (MS) üzerine aşılanmıştır. Tohumlardan elde edilen bitkiler, sürgün apeksleri ve boğumları ile temsil edilen eksplant kaynağı (fitoinokül) olarak kullanılmış, farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda oksinler ve sitokininler kategorisinden fitohormonlarla takviye edilmiş besin ortamına yerleştirilmiştir. Bulgulara göre, en

iyi reaksiyon caulogenesis, ardından rizogenesis ve küçük bir yüzdeyle callusogenesis olmuştur. BA1 - 1mg/l BAP + 0,5 mg/l IAA ve BB2 - 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l IBA sürgünlerin rejenerasyonu için en uygun olduğu kanıtlanmıştır, ardından BA2 - 1 mg/l BAP + 0,1 mg/l IAA ve BB1- 1 mg/l BAP + 0,5 mg/l IBA sürgün olayının yoğun olduğu ancak sürgünlerin zayıf olduğu ve daha küçük yapraklara ve daha ince gövdelere sahip olduğu ortam olarak belirlenmiştir. Kekik kallus oluşumu, düşük proliferasyon ve organogenetik kapasite gösteren kallus olan orta versiyon NAA1'de kaydedilmiştir [19].

T. vulgaris'in *in vitro* olarak büyütülmüş sürgün uçları, *in vitro* sürgün çoğalmasını optimize etmek için tek başına veya oksinler, giberellik asit (GA₃) ve/veya gümüş nitrat ile kombinasyon halinde sitokininlere (6-benziladenin, kinetin ve tidiazuron) maruz bırakılmıştır. Yarı katı MS ortamı 1 mg/L kinetin ve 0,3 mg/L GA₃ ile desteklendiğinde optimum sürgün çoğalması (%97 rejenerasyon oranı, eksplant başına üretilen 8,6 sürgün ile) elde edilmiştir. Sürgünlerin köklenmesi, hormon içermeyen veya oksinlerle takviye edilmiş yarı katı MS ortamında kolayca elde edilmiştir. Bununla birlikte, en iyi kök (%92,5 köklenme oranı, sürgün başına 19 tesadüfi kök) 0,05 mg/L 2,4-diklorofenoksiasetik asit ile takviye edilmiş MS ortamında belirlenmiştir. Köklü bitkiler 250 mL'lik plastik saksılara aktarılmış ve bağıl nem kademeli olarak düşürülerek başarılı bir şekilde ortama alıştırmıştır [20].

Karalija ve Paric [21] BA ve IBA'nın farklı konsantrasyonlarının *in vitro* üretilen kekik sürgünlerinde sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkileri araştırılmışlardır. Klorofil *a*, klorofil *b* ve karotenoid içeriğindeki kantitatif değişiklikler, ortamdaki değişen büyüme düzenleyici konsantrasyonlarının etkisine yanıt olarak kaydedilmiştir. Ayrıca ortama bitki büyüme düzenleyicileri (0,5 mg/L BA + 0,1 mg/L IBA) ilave edildikten sonra bitkiciklerde fenolik bileşiklerin açığa çıktığı kaydedilmiştir. Buna karşılık, aynı muamelede yetiştirilen bitkicikler, monomerik antosiyaninlerde bir azalma göstermiştir.

Dolatabadi ve ark. [22] *Mentha piperita* ve *T. vulgaris* ile çalışmalar yürütmüşlerdir. İki farklı deney yapılmıştır. İlki farklı oksin düzeylerinin *M. piperita* ve *T. vulgaris* büyümesi üzerindeki etkisini değerlendirirken, ikincisi iki mantar olan *Piriformospora indica* ve *Sebacina vermifera*'nın bitki boyu, kök uzunluğu, sürgünler ve kök ağırlığı üzerindeki etkisini incelemek olmuştur. İlk deney, *M. piperita* büyümesi için en etkili hormon dozunun 1 mg/L IBA ve *T. vulgaris*'te 1 mg/L IAA olduğunu göstermiştir. Hormon dozlarının artması büyümenin azalmasına neden olmuştur. İkinci deney, mantarlarla aşılana bitkilerin büyümesinin önemli ölçüde arttığını göstermiştir. Veriler, *S. vermifera* ile aşılana bitkilerin maksimum boyda olduğunu ve *P. indica* ile aşılana bitkilerin de maksimum ağırlığa sahip olduğunu göstermiştir.

III. SONUÇ

Kekiğin toprak üstü kısımları ve uçucu bileşenleri yaygın olarak şifalı bitki olarak kullanılmaktadır. *Thymus* türleri yaygın olarak bitki çayı, tatlandırıcı maddeler (çeşniler ve baharatlar) olarak ve tıbbi amaçlar için kullanılmaktadır. Bu derleme çalışmada in vitro koşullara kekik bitkisinin üretimleri ele alınmış olup, bazı önemli üretim teknikleri sunulmuştur. Kekiğin tıbbi ve ekonomik öneme sahip olması nedeniyle, bu bitkinin doku kültürü koşullarında üretilmesini ile ilgili çok çalışma yapılmıştır. Günümüzde de kekik bitkisi ile in vitro üretim çalışmaları devam etmektedir. Genellikle in vitro üretim ile birlikte biyolojik aktivitesine de bakılan çalışmalar hız kazanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27(1), 1-93.
- [2] Pathak, P., Kumari, A., Chandler, B. D., & Zettler, L. W. (2023). In vitro propagation and phytochemical analysis of *Vanda cristata* Wall. ex Lindl: An endangered medicinal orchid of biopharmaceutical importance. *South African Journal of Botany*, 153, 109-123.
- [3] Dogan, M., Karatas, M., & Aasim, M. (2016). In vitro shoot regeneration from shoot tip and nodal segment explants of *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze, a multipurpose ornamental aquatic plant. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(11), 4777-4782.
- [4] Lee, J. W., Kwon, N., Kim, J. U., Bang, K. H., Jung, S. M., Lee, S. W., ... & Park, Y. D. (2023). In vitro micropropagation of commercial ginseng cultivars (*Panax ginseng* Meyer) via somatic embryogenesis compared to traditional seed production. *Horticulturae*, 9(4), 435.
- [5] Dogan, M., & Emsen, B. (2018). Anti-cytotoxic-genotoxic influences of in vitro propagated *Bacopa monnieri* L. Pennell in cultured human lymphocytes. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 1(2), 48-53.
- [6] Kose, M. S. H., Dogan, M., & Sadi, G. (2021). Enhanced in vitro shoot proliferation through nodal explants of *Staurogyne repens* (Nees) Kuntze. *Biologia*, 76(3), 1053-1061.
- [7] Prasanth Reddy, V., Ravi Vital, K., Varsha, P. V., & Satyam, S. (2014). Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med Aromat Plants*, 3(164), 2167-0412.
- [8] Silva, A. S., Tewari, D., Sureda, A., Suntar, I., Belwal, T., Battino, M., ... & Nabavi, S. F. (2021). The evidence of health benefits and food applications of *Thymus vulgaris* L. *Trends in Food Science & Technology*, 117, 218-227.
- [9] Dauqan, E. M., & Abdullah, A. (2017). Medicinal and functional values of thyme (*Thymus vulgaris* L.) herb. *Journal of applied biology and biotechnology*, 5(2), 017-022.
- [10] Pawelec, K., Kulpa, D., & Siwek, H. (2017). Callus Culture of common thyme (*Thymus vulgaris* L.). *World Scientific News*, (74), 94-105.
- [11] Kulpa, D., Wesołowska, A., & Jadcak, P. (2018). Micropropagation and composition of essential oils in garden thyme (*Thymus vulgaris* L.). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 525-532.
- [12] Tefvik, A. S., & Yegorova, N. A. (2020). Clonal micropropagation of *Thymus vulgaris* L. In *E3S Web of Conferences* (Vol. 224, p. 04001). EDP Sciences.
- [13] Razavizadeh, R., Farahzadianpoor, F., Adabavazeh, F., & Komatsu, S. (2019). Physiological and morphological analyses of *Thymus vulgaris* L. in vitro cultures under polyethylene glycol (PEG)-induced osmotic stress. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55, 342-357.
- [14] El-Banna, H. Y. (2017). Indirect Micropropagation of *Thymus vulgaris* Plant. *Journal of Plant Production*, 8(11), 1241-1246.
- [15] El Ansari, Z. N., El Mihyaoui, A., Boussaoudi, I., Benkaddour, R., Hamdoun, O., Tahiri, H., ... & Lamarti, A. (2019). Effect of macronutrients, cytokinins and auxins, on in vitro organogenesis of *Thymus vulgaris* L. *American Journal of Plant Sciences*, 10(09), 1482.
- [16] El-Banna, H. Y. (2017). Micropropagation of thyme plant (*Thymus vulgaris*). *Journal of Plant Production*, 8(11), 1221-1227.
- [17] Ana-Maria, R., & Ramona, S. (2020). Micropropagation of *Thymus vulgaris* L., an important medicinal and aromatic plant. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 24(1), 6-12.
- [18] Emilia, P., & Camen, D. D. (2021). Research on the "in vitro" cultivation of two genotypes of *Thymus vulgaris* L. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 25(1), 74-79.

- [19] Nicuță, D., & Bădăluță, N. (2016). Observations On The Morphogenetic Reaction Of Thymus Vulgaris Explants Cultivated In Vitro. *Scientific Studies & Research. Series Biology/Studii si Cercetari Stiintifice. Seria Biologie*, 25(1).
- [20] Ozudogru, E. A., Kaya, E., Kirdok, E., & Issever-Ozturk, S. (2011). In vitro propagation from young and mature explants of thyme (Thymus vulgaris and T. longicaulis) resulting in genetically stable shoots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47, 309-320.
- [21] Karalija, E., & Paric, A. (2011). The effect of BA and IBA on the secondary metabolite production by shoot culture of Thymus vulgaris L. *Biol Nyssana*, 2(1), 29-35.
- [22] Dolatabadi, H. K., Goltapeh, E. M., Moieni, A., & Varma, A. (2012). Evaluation of different densities of auxin and endophytic fungi (Piriformospora indica and Sebacina vermifera) on Mentha piperita and Thymus vulgaris growth. *African Journal of Biotechnology*, 11(7), 1644-1650.