

## BAZI DAĞ ÇAYI (*Sideritis*) TÜRLERİNİN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI

Esra UÇAR<sup>a</sup> Kenan TURGUT  
Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, 07058 Antalya

Kabul Tarihi: 28 Nisan 2009

### Özet

Bu çalışmada doku kültürü tekniğinden yararlanılarak *Sideritis perfoliata*, *Sideritis stricta* ve *Sideritis erythrantha* türlerinin *in vitro* rejenerasyon yeteneği araştırılmıştır. Rejenerasyon çalışmalarında tohum, yaprak, yaprak sapı, boğum, boğum arası ve sürgün ucu gibi değişik eksplantlar denenmiştir. Üç farklı türün tohumları chloramine-T ve sodyum hipoklorit ile sterilizasyon yapıldıktan sonra farklı dozlarda GA<sub>3</sub> içeren çimlendirme ortamlarına ekilmişlerdir. *Sideritis stricta* türünün tohumlarında hiç çimlenme görülmezken, diğer türlerin tohumlarında ise çimlenme oranı çok düşük kalmıştır. Yaprak, yaprak sapı, boğum ve boğum arası eksplantları ise farklı BAP ve NAA konsantrasyon ve kombinasyonları içeren %0.7 agar, %3 sukroz ve aktif kömür ilave edilmiş MS ortamında kültüre alınmışlardır. Kültür sırasında eksplantlardan kaynaklanan kontaminasyonlar görülürken kontaminasyon oluşmayan eksplantlarda ise karama gözlenmiştir. İlkbaharda yeni oluşan *Sideritis stricta* türüne ait bitkilerden alınan sürgün uçları farklı oranlarda TDZ içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Bu eksplantlardan sürgün oluşumu başarılıdır.

**Anahtar Kelimeler:** *Sideritis*, *in vitro*, Rejenerasyon

### *In Vitro* Propagation of Some Mountain Tea (*Sideritis*) Species

### Abstract

In this study, regeneration ability of *Sideritis perfoliata*, *Sideritis stricta*, and *Sideritis erythrantha* was investigated using tissue culture techniques. For the regeneration study, different explant such as seeds, leaves, nodes, internodes were tested. The seeds of three different species were sterilised with chloramine-T and sodium hypochloride. Then seeds were placed on germination media which contain different GA<sub>3</sub> doses. Despite no germination was observed in *Sideritis stricta*, germination ratio was very low in other species. Various explants such as leaf, node, internode were cultured on MS medium containing 3% sucrose, 0.7% agar, activated charcoal and different concentrations and combinations of NAA and BAP. No regeneration was obtained from these explants because of contaminations originated from the explants and explant browning. In the spring, shoot tips of *Sideritis stricta* were collected and cultured on MS medium containing different concentrations of TDZ. Shoots were obtained from shoot tip explants.

**Keywords:** *Sideritis*, *in vitro*, Regeneration.

### 1. Giriş

Türkiye, gerek farklı iklimlere sahip olması gerekse üç floristik bölgenin kesişme noktasında bulunması sebebiyle bitki türlerinin çokluğu bakımından dünyanın zengin ülkelerinden birisidir. Ülkemizde yaklaşık 10 bin civarında bitki türü bulunmaktadır ve bunlardan 3 bin kadarı da endemiktir. Bu bitkilerin 1000–2000 kadarının tıbbi amaçlarla kullanıldığı tahmin edilmektedir (Arslan ve ark., 2000). Türkiye, aromatik bitkiler arasında yer alan Ballıbabagiller (*Labiatae* = *Lamiaceae*)

familiyası için önemli bir gen merkezidir. Familya, Türkiye’de toplam 731 takson, 546 tür ve 45 genus ile temsil edilmektedir. Familyadaki endemizm oranı %44,2’dir (Başer, 1994).

*Sideritis* tıbbi ve aromatik bitkiler içinde önemli bir yere sahiptir. Ülkemizde, *Sideritis* cinsi 46 tür ve 53 takson ile temsil edilmektedir. *Sideritis* taksonlarının 40 tanesi endemiktir (Davis, 1982, Davis ve ark., 1988, Güner ve ark., 2000, Aytaç ve Aksoy., 2000). *Sideritis spp.* ülkemizin Batı Akdeniz Bölgesi’nde doğal olarak bulunan ve ihracatı yaygın olarak yapılan büyük öneme sahip bir

<sup>a</sup> İletişim: E. Uçar, e-posta: esraucar@akdeniz.edu.tr

genusdur. Bunun en önemli nedeni ise Akdeniz fitocoğrafik bölgesinde yer alan Antalya ilinin gerek konumu ve gerekse jeomorfolojik yapısı itibarıyla Türkiye'nin önemli endemik merkezlerinden birisi olmasıdır (Ekim ve ark., 1989). *Sideritis* türleri tek veya çok yıllık, otsu veya küçük çalimsı bitkilerdir. Yaprakları tam kenarlı, kör dişli (crenate)-dişli(dentate) dir. Türkiye'de bazı *Sideritis* türleri; iştah açıcı, iltihap dağıtıcı, tonik, gaz söktürücü, kas gevşetici, idrar söktürücü, sindirimi kolaylaştırıcı, mide ağrılarını kesici ve soğuk algınlığını giderici olarak kullanılmaktadır. Akdeniz ve Ege Bölgeleri'nde bitkisel çay olarak çok yaygın bir şekilde tüketilmektedir

Ticareti yapılan tıbbi bitkilerin birçoğu halen doğal alanlardan toplanmaktadır. Drogların çoğunlukla doğal olarak yetişen bitkilerden karşılanması nedeniyle yeterli miktarda tıbbi bitki üretimi yapılamamaktadır. Yetiştirme tekniği ile ilgili bilgilerin yetersiz olması, drogların elde edilmesinde ihtiyaç duyulan yoğun el emeği ve işgücü gibi faktörler tarımın yaygınlaştırılmasını güçleştirmekte ve sınırlandırmaktadır. Ülkemizin bu bitkiler açısından sahip olduğu potansiyel değerlendirildiğinde; sorunların çözümüne yönelik olarak yürütülmüş olan ıslah ve agronomi ağırlıklı çalışmaların yeterli olmadığı görülmektedir. Bu bitkilerin kültüre alınarak yetiştirilmesi floranın tahrip edilmesini önleyecektir.

Günümüzde bitkisel üretimde bilinen geleneksel yöntemlerle çözülemeyen veya çözümü güç olan sorunlara çözüm getirerek, daha ekonomik, kalite ve kantite yönünden daha yüksek bitkisel üretimin gerçekleştirilmesi amacıyla biyoteknolojik yöntemler kullanılmaktadır. Doku kültüründe steril koşullarda, kontrol edilebilen iklim şartlarında daha kısa sürede, hastalısız ve daha çok bitki üretilmesinin yanında, etken maddede genetik açılma riski de bulunmamaktadır. Dolayısıyla kalitenin daima birinci planda olduğu tıbbi bitkilerde, çoğunlukla tozlanmadan kaynaklanan bu genetik heterojenlik sorunu da ortadan kalkmış olmaktadır. Küçük tohumlu bitkilerde fide ile dikim ya da çelikle üretimin olumlu özellikleri yanında *in vitro*'da klonal çoğaltıma göre daha uzun

zaman alması, daha fazla yer kaplaması, üretim materyalinin sınırlı olması, daha az bitki elde edilmesi, mevsime bağlı olması, hastalık ve zararlılarla bulaşma riskinin bulunması gibi olumsuz yanları da mevcuttur. Çelikle üretimde bir bitkiden sınırlı miktarda çelik elde edilirken, doku kültüründe böyle bir sınırlama yoktur. Bitkiden organ ve doku hatta hücre düzeyinde yararlanma gerçekleştirilebilir. Aynı zamanda bitkiler kontrollü çevre koşullarında ve steril besi ortamlarında yetiştirildiğinden ışık, su ve besin maddesi bakımından bir stres yaşamayacak ve sağlıklı bir büyüme dönemi geçireceğinden stres koşullarının neden olacağı zararlar bitkide gözlenmeyecektir (Hatipoğlu, 1995).

Bu çalışmada ülkemizde endemik olarak doğal koşullarda yetişen *Sideritis* türlerinin kültüre alınması ve ıslahı açısından önemli olabilecek doku kültürü sistemi kurulmaya çalışılmıştır. Bu bitkilerin kültüre alınması ile doğadan toplanması sonucunda meydana gelebilecek tahribat engellenebileceği gibi aynı zamanda toplama sonucu gözlenen olumsuzluklar (yabancı madde karışması, ürünün saflığının bozulması, yanlışlıkla başka bitki toplanması vb.) ortadan kalkacaktır.

## 2. Materyal ve Metod

Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümünde 2007 yılında yapılan bu çalışmada materyal olarak yararlanılan eksplantlar; Antalya florasından 2002 yılında toplanıp halen Batı Akdeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsü (BATEM)'nde yetiştirilmekte olan *Sideritis erythrantha*, *Sideritis stricta* ve *Sideritis perfoliata* türleri ile Akdeniz Üniversitesi kampüsünde doğal olarak yetişen *Sideritis stricta* türünden temin edilmiştir. Doku kültürü çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Tarımsal Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Doku Kültürü Laboratuvarında yapılmıştır. Rejenerasyon çalışmalarında, *Sideritis erythrantha* türünde sadece tohumlar, *Sideritis perfoliata* türünde tohum, yaprak, yaprak sapı, boğum ve boğum arası, *Sideritis stricta* türünde ise bunlara ilaveten sürgün uçları eksplant olarak kullanılmıştır.

Tüm *in vitro* çalışmalarda, temel besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) ortamı kullanılmıştır. Hazırlanan ortama, %3 oranında sukroz eklenerek 1N NaOH ve HCl ile pH 5.7–5.8 olarak ayarlanmıştır. Daha sonra %0.7 oranında agar ve %0.3 aktif kömür ilave edilip 121 °C’de 1 atm basınçta 20 dk sterilizasyon yapılmıştır.

### 2.1. Tohum Çimlenmesi

Tohum çimlendirme denemeleri için, MS ortamına miliporfiltreden geçirilen GA<sub>3</sub>’ün farklı konsantrasyonları ilave edilerek MS<sub>0</sub> ( 0 hormon seviyesi), MS<sub>1</sub> (5mg/l GA<sub>3</sub>), MS<sub>2</sub> (10mg/l GA<sub>3</sub>) ve MS<sub>3</sub> (15mg/l GA<sub>3</sub>) olmak üzere 4 farklı ortam oluşturulmuştur. Daha sonra ortam iyice karıştırılıp 9 cm çapında olan petrilere dökülmüştür. Ekimi yapılacak türlerin tohumları 1 hafta boyunca +4 °C’ de bekletildikten sonra, ısıtıcı karıştırıcıda saf su içinde 1 saat boyunca karıştırılıp ardından steril kabin içerisinde %20’lik sodyum hipokloritte (Domestos®) yüzey sterilizasyonu yapılmıştır. Daha sonra, 4 farklı ortama her petriye 10’ar tohum gelecek şekilde 3 tekerrürlü olarak ekim yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra petrilerin etrafı parafilm ile sarılmıştır.

### 2.2. Rejenerasyon

*S. stricta* ve *S. perfoliata* türlerinin yaprak, yaprak sapı, boğum ve boğum arası eksplantları için hazırlanan MS ortamına; 0.5 mg/l NAA ile 1, 2, 4 mg/l BAP (MS<sub>1</sub>, MS<sub>2</sub>, MS<sub>3</sub> ) ilave edilmiştir. Kontrol olarak ise hiç büyüme düzenleyicisi içermeyen temel besi ortamı (MS<sub>0</sub>) kullanılmıştır. Hazırlanan dört farklı ortama otoklavdan sonra 400 mg/l antibiyotik (Augmentin) ilave edilmiştir. Yüzey sterilizasyonu yapılacak olan eksplantlar bir gece önceden akan su altında yıkandıktan sonra, steril kabin içerisinde %10’luk sodyum hipokloritte 20 dk bekletilerek 4 kez steril sudan geçirilip, %70’lik etil alkolde 5 sn kadar bekletildikten sonra destile suda çalkalanmıştır. Daha sonra steril petriler içindeki kurutma kağıdında fazla suyu alınmıştır. Yüzey sterilizasyonu yapılan genç yaprakların damar ve kenar

kısımları steril pens ve bistüri yardımıyla çıkarılarak temizlenmiş ve her petriye (9 cm çapında) 10’ar eksplant gelecek şekilde 3 tekerrürlü olarak ekimi yapılmıştır. Ekim yapıldıktan sonra petrilerin etrafı parafilm ile sarılmıştır. Boğum arası eksplant alımında (gövde, sap) 2. ve 3. boğum arasında kalan eksplantlar ve en alt - en üst boğum dışında kalan boğum eksplantlarının sterilizasyonu yapıldıktan sonra dış kabukları soyulmuş ve yaklaşık olarak 2 mm büyüklüğünde parçalara ayrılmıştır. Her petriye 10’ar eksplant gelecek şekilde 3 tekerrürlü olarak ekimi yapılmıştır.

Sürgün ucu eksplantları için hazırlanan MS ortamına 0.5, 1, 1.5 mg/l TDZ ilave edilmiştir. Sürgün ucu eksplantlarının sterilizasyonu; %20’lik sodyum hipokloritte 25 dk bekletilerek yapılmıştır. Sterilizasyon sonunda tüm eksplantlar 4 kez steril destile su ile çalkalanarak durulanmış ve steril petriler içindeki kurutma kağıtlarında fazla suyu alınmıştır. Steril kabin içinde sterilize edilen sürgün uçlarının dış kısmındaki yapraklar steril pens ve bistüri yardımıyla alınarak her petriye 3 eksplant gelecek şekilde kültür ortamına aktarılmıştır.

### 2.3. Kültür Koşulları

Kültürler; fotoperiyodu 16 saat aydınlık/8 saat karanlık, 4000 lüks ışık şiddeti olan ve sıcaklığı 24-26 °C ve oransal nem %65-75 arasında değişen kültür odalarında gelişmeye bırakılmıştır.

## 3. Bulgular ve Tartışma

### 3.1. *Sideritis* Tohumlarının Çimlendirilmesi

Dağ çayı (*Sideritis spp.*) bitkisinin *in vitro* koşullarda rejenerasyon yeteneğinin araştırılması için; *Sideritis stricta*, *S. perfoliata* ve *S. erythraea* türlerinin tohumları MS<sub>0</sub> ve GA<sub>3</sub>’ün farklı konsantrasyonlarını (5, 10, 15 mg/l) içeren çimlendirme ortamına ekilmişlerdir. Üç hafta sonunda *S. erythraea* türüne ait 30 eksplant içinden kontrol grubu ve 5 mg/l GA<sub>3</sub> grubunda 2 tohumda çimlenme

görülürken, *S. perfoliata* türünde 30 eksplanttan 1 tohumda çimlenme görülmüştür (Çizelge 1). Arafah ve ark. (2003) ise 2.0 mg/l GA<sub>3</sub> ve 15 mg/l sukroz ilave edilmiş MS ortamında *Origanum syriacum* L.'nin tohumlarını kültüre almışlar ve %92 oranında çimlenme elde etmişlerdir.

Papafotiou ve Kalantzis (2009) tarafından, *Sideritis athena* türüne ait Ağustos ayında toplanmış olan tohumlar Kasım ayında *in vitro* ve perlit ortamında çimlendirilmişlerdir. %100 perlit veya peat-perlit ortamında 20 °C'de çimlendirilen tohumlar da %80-88 oranlarında çimlenme oranı elde edilmiştir.

Çizelge 1. Farklı Türlerde GA<sub>3</sub>'ün Farklı Konsantrasyonlarının Çimlenme Üzerine Etkileri

Türlere göre çimlenen tohum sayısı			
GA <sub>3</sub> (mg/l)	<i>S. stricta</i>	<i>S. perfoliata</i>	<i>S. erythrantha</i>
0	0	0	1
5	0	1	1
10	0	0	0
15	0	0	0

Çimlenme zamanı ve yöntemi türlere göre değişmektedir. Bazı türlerde tohum kabukları susuz ortamda kurumaya uğramadan embriyoyu canlı tutmayı sağlarken, bazen çimlenme için gerekli olan embriyo ve endospermde bulunan besinleri harekete geçirecek olan enzimleri etkin duruma getirmek için gerekli olan suyun alınımını engelleyebilmektedir. Çimlenmeye etki eden etmenler oksijen, ışık, su, sıcaklık, tohumun yaşı, tohum kabuğunun durumu gibi faktörler istenilen durumda olmadığında, diğer koşullar uygun olsa dahi çimlenme gerçekleşmez ya da çok az gerçekleşir.

Değişik bitki türleri arasında ve hatta bir türün kendi çeşitleri arasında bile görülen çimlenme farklılıklarının, tohumun yaşına, depolama koşullarına ve diğer etmenlere bağlı olduğu saptanmıştır (Kaçar, 1996). Tohum kabuğunun çok kalın olması nedeniyle suyu ve oksijeni geçirememesi, embriyonun gelişmesini tohum kabuğunun mekanik olarak önlemesi, embriyonun tam gelişmemiş olması, embriyonun dormant olması, tohumda çimlenme önleyicilerin bulunması gibi farklı etmenler çimlenmeyi

engelleyebilmektedir. Çimlenmede oksin, sitokinin ve gibberellin hormonları çimlenmeyi teşvik ederken, absisik asitin varlığı çimlenmeyi engelleyebilmektedir. Çevresel streslerden ışık ve sıcaklığın tohumlarda oluşturduğu dormansi, gibberellinler tarafından ortadan kaldırılabilmektedir (Ünal ve ark., 2004).

Bu çalışmada çimlenmeyi iyileştirmek için GA<sub>3</sub>'ün farklı konsantrasyonları denenmiştir. Ekim yapıldıktan sonra hem ışıktaki hemde karanlık ortamda kültüre alınmışlardır. Ancak bu uygulamalar sonucunda yine de çimlenme oranında bir artış görülmemiştir. Tohumun çimlenmesinde tohumun hasattan sonraki süresi de etkili olabilmektedir. Bazı tohumlar bir yıl bekledikten sonra daha iyi şekilde çimlenebilmektedirler. *Sideritis* tohumlarında bu isteği belirlemek amacıyla bir önceki yıl hasat edilen ve yeni hasat edilmiş olan tohumlar kültüre alınmıştır. Ancak çimlenme üzerinde bir etkisi görülmemiştir.

Ünal ve ark. (2004) yapmış oldukları bir çalışmada *Lamiaceae* familyasına ait *Origanum onites*, *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *germanicopolina* ve *Sideritis germanicopolitana* Bornm. subsp. *viridis* Hausskn ex Bornm. bitkilerinin tohumlarına çimlenme öncesi uygulanan çeşitli düşük sıcaklık uygulamalarının çimlenmeyi teşvik ettiğini saptamışlardır. Bu çalışmada, çimlenme oranı çok düşük olan *Sideritis* türlerinde böyle bir durumun olabileceği düşünülerek, çalışmada kullanılan türlerin tohumları ekimden önce +4 °C'de bekletilmiş, ancak çimlenme oranında bir artış meydana gelmemiştir.

### 3.2 Yaprak, Yaprak Sapı, Boğum ve Boğum Arası Eksplantlarının Rejenerasyonu

Rejenerasyon çalışmasında kullanılan yaprak, yaprak sapı, boğum ve boğum arası gibi eksplantlar BAP ve NAA'in değişik konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren ortamlarda kültüre alındığında, *S. stricta* türü başta olmak üzere tüm türlerin çoğu eksplantlarında kontaminasyon görülmüştür. Bunun, bitkinin çok tüylü olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Kontaminasyon olmayan eksplantlarda ise 5. günden itibaren hacimlerinde genişleme gözlenirken, bazı eksplantlarda 7. günden itibaren kararmalar meydana geldiğinden rejenerasyon sağlanamamıştır.

Sanchez-Gras ve Segura (1987), *Sideritis angustifolia* Lag. bitkisinin steril ortamda tohumlarını çimlendirerek elde ettikleri bitkilerden sağlanan steril hipokotil, kök ve kotiledon eksplantlarını 2,4-D, NAA, ya da IAA oksinleri ve BA ya da Kinetin sitokinlerinin farklı konsantrasyonları ve kombinasyonlarını içeren MS ortamında kültüre almışlardır. En iyi sürgün oluşumu hipokotil ve kök eksplantlarında, BA ya da Kinetin, IAA veya NAA içeren ortamlarda gözlemlenmiştir.

Sanchez-Gras ve Segura (1989) yaptıkları başka bir çalışmada, *Sideritis angustifolia* Lag. bitkisinin hipokotil ve tek hücrelerinden elde ettikleri bitkilerin yapraklarından alınan eksplantları kültüre aldıklarında 0.1, 1 yada 2 mg/l IAA ile 2 mg/l BA içeren ortamda sürgün rejenerasyonunun meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada da Sanchez-Gras ve Segura'nın yaptığı gibi 3 türe ait tohumlar *in vitro* koşullarda çimlendirilip, steril bitkilerden elde edilen eksplantların kullanılması planlanmıştır. Ancak tohumlardaki çimlenme probleminden dolayı steril bitki temini gerçekleştirilememiştir.

Dış koşullarda yetişen bitkilerden sağlanan eksplantlarda ise, aşırı derecede enfeksiyon problemi yaşanmıştır. Enfeksiyon görülmeyen eksplantlarda ise, bir müddet sonra kararmalar meydana gelmiş ve canlılıkları kaybolmuştur. *In vitro* koşullardaki kararma, kimyasal olarak açıklanabilen ve çoğunlukla tanenler ve okside olan polifenoller nedeniyle ortaya çıkan bir olaydır. Dokular ana bitkiden ayrılıp eksplant hazırlanması sırasında yaralanırlar; bu durum çoğunlukla hava, peroksidazlar veya polifenoloksidazlar tarafından okside edilen ve hem dokuda, hem de kültür ortamında kahverengileşme veya kararma ile sonuçlanan çeşitli bileşiklerin açığa çıkmasına neden olur.

Bitki yaralandığında 'eksplant hazırlanmasında olduğu gibi', fenolik bileşikler, plastidlerle ve diğer organellerle

karışık bir halde vakullerin içerisinde büyük miktarlarda depolanırlar ve okside olmuş polifenollerin meydana gelmesiyle de koyu renk pigmentasyonu görülmeye başlanır. Okside olmuş bu bileşikler, enzim aktivitesini engellemekte; böylece eksplantı öldüren kararma ortaya çıkmaktadır (Ellialtıoğlu, 1999).

Kararmanın önüne geçebilmek için ortama aktif kömür ileve edilmiştir. Aktif kömürün toksik metabolitleri emerek ortama geçmesini önlediği kanıtlanmıştır (Chevre ve ark., 1983). Ancak bu çalışmada aktif kömür kullanmamıza rağmen, eksplant kararmasının önüne geçilememiştir. Ayrıca aktif kömür ortamdaki BA'yı emerek sürgün oluşumunda geriletici etkiye sahiptir (Ellialtıoğlu, 1999).

### 3.3. Sürgün Ucu Eksplantlarının Rejenerasyonu

Yaprak, yaprak sapı, boğum ve boğum arası eksplantlarında devamlı olarak meydana gelen kontaminasyon sonucunda hem TDZ hormonunun hem de sürgün ucu eksplantlarının denenmesi için ilkbaharda Akdeniz Üniversitesi kampüsünde bulunan *S. stricta* türünün sürgün ucundan alınan eksplantlar MS0 ve farklı TDZ oranlarını içeren ortamlarda kültüre alınmışlardır. Her uygulama başına 12 eksplant kullanılmıştır. Gözlemler 30 günlük kültürlerde yapılmıştır. Yapılan deneme sonucunda diğer eksplantlarda gözlenen kontaminasyon sorunu oluşmayarak, 7. günden itibaren gelişme gözlenirken 12. günden itibaren sürgün oluşmuştur. Bazı eksplantlarda %16.7 oranında kararma gözlenmiştir. Kararmalar genelde çiçeklenme başlangıcında alınan eksplantlarda görülürken, taze sürgünlerinden alınan eksplantlarda kararma gözlenmemiştir.

Muhitch ve Fletcher (1984), ana bitkinin yaşı ve eksplantın alındığı gövde yerinin, *in vitro* koşullarda dokuların ilk gelişim aşamaları üzerinde çok etkili olduğunu, fenollerin konsantrasyonunun yaşlı gövdelerde genç gövdelere göre çok daha yüksek olduğunu ve ayrıca yaşlı kısımların gençlere göre fenolik bileşiklerin çok çeşitli tiplerini içerdiğini bildirmişlerdir.

Rodriguez (1982), ceviz kotiledonlarıyla yaptığı bir çalışmada, kararmada büyüme düzenleyicilerinin miktar ve çeşidinin etkili olduğunu bildirmiştir. TDZ konsantrasyonunun azalan değerine karşılık sürgün sayısında artış gözlenmiştir.

Sürgün rejenerasyonu ve sürgün sayısı bakımından en yüksek oranlar (% 88.87 ve 4 adet) kontrol grubunda elde edilmiştir (Çizelge 2). Buna karşın, 0.5 ve 1 mg/l TDZ dozlarında ise rejenerasyon oranı (% 66.63) aynı çıkarken, sürgün sayısı 0.5 mg/l dozunda 2.33 adet, 1 mg/l dozunda ise 3 adet olarak çıkmıştır. En düşük rejenerasyon oranı (% 44.40) ve sürgün sayısı ortalaması (2 adet) ise 1.5 mg/l dozunda gerçekleşmiştir.

Çizelge 2. TDZ'nin Farklı Konsantrasyonlarının Sürgün Ucu Eksplantlarında Oluşturduğu Rejenerasyon

Bitki Büyüme Düzenleyicisi TDZ (mg/l)	Rejenerasyon (%)	Sürgün sayısı (Petri ortalaması)
0	88.87 a*	4.00 a
0.5	66.63 a	2.33 a
1	66.63 a	3.00 a
1.5	44.40 a	2.00 a
LSD 0.05	LSD 53.8	LSD 3.16

\*Sütun içerisinde aynı harfle gösterilen ortamlar arasındaki farklar önemsizdir.

Elde edilen verilerin tesadüf parselleri deneme desenine uygun olarak istatistikî analizi yapılmıştır. Yapılan varyans analizleri sonucunda besi ortamları arasında rejenerasyon %'leri ve sürgün sayısı yönünden önemli fark ortaya çıkmamıştır. Bundan dolayı Duncan testi yapılmamıştır.

Papafotiou ve Kalantzis (2009) tarafından *Sideritis athena* türünde MS (8 g/l agar ve 20 g/l sukroz) ortamında farklı büyüme düzenleyicileri (BA, 2iP, TDZ, NAA, IBA) kullanılarak boğum kültürü yapılmış ve en yüksek sürgün sayısı (2.3-2.5 adet/eksplant) BA içeren (0.2, 0.5 or 1.0 mg/l) ortamdan elde edilmiştir. TDZ içeren MS ortamında eksplantlar yoğun olarak kallus oluşturmuş ve deformasyona uğramışlardır. IBA (2 mg/L) veya NAA (1 mg/L) içeren MS ortamında yetiştirilen mikro *in vitro* sürgünlerden en yüksek köklenme oranı (sırasıyla %46 ve %53) elde edilmiştir.

Andrade ve ark., (1999), *Lavandula vera* DC'nin boğum eksplantlarıyla yapmış oldukları çalışmalarında en yüksek çoğaltım oranının 1 mg/l TDZ ya da BA ilave edilmiş MS ortamından elde edilmiş olduğunu bildirmişlerdir.

Tawfik ve Mohamed (2006), *Salvia officinalis* bitkisinin sürgün ucu eksplantlarını hiç hormon bulunmayan kontrol grubu ve 1, 3 ve 5 mg/l TDZ içeren besi ortamında kültüre almışlardır. En iyi kallus oluşumunun 1 mg/l TDZ içeren ortamda oluştuğunu belirtmişlerdir.

Mirici (2004) geven (*Astragalus polemoniicus* Bunge) bitkisinde yaptığı bir çalışmada, TDZ'nin düşük dozlarının sürgün gelişimini olumlu yönde etkilediğini belirlemiştir.

#### 4. Sonuç

Bu çalışmada; yaprak, yaprak sapı, boğum ve boğum arasından alınan eksplantlar için MS0 kontrol grubu ve oksin olarak 0.5 mg/l NAA ile sitokinin olarak 1, 2, 4 mg/l BAP'ın farklı konsantrasyonları ve kombinasyonları kullanılmıştır. Ortamda sık sık oluşan kontaminasyonun önüne geçebilmek için antibiyotik (augmentin) kullanılmıştır. Ancak buna rağmen boğum, boğum arası ve yaprak sapı eksplantlarının bakteri ve funguslardan arındırılmasının zor olduğu görülmüştür. Yaprak eksplantlarından bazıları ise; kontamine olmadan hayatta kalmayı başarmışlardır. Ancak ortalama bir hafta sonra canlı eksplantlarda kararmalar oluşmaya başlamıştır. Kararan kısımlar, kesilerek alınmasına rağmen kararmanın önüne geçilememiştir. Kararmayı önlemek için ortama aktif kömür ilave edilmiş, ancak eksplantlarda kararmanın devam etmiştir.

Bitki tohumlarının çimlendirme çalışmasında; MS0 kontrol grubu ve 5, 10, 15 mg/l GA<sub>3</sub> ün farklı konsantrasyonları ile hazırlanmış MS temel besi ortamı kullanılmıştır. *S. perfoliata* türünden 30 tohumdan 1 tanesinde çimlenme görülürken, *S. erythrantha* türünün 30 tohumundan 2 tanesinde çimlenme görülmüştür. Çimlenme yeteneği türe göre farklılık göstermektedir.

Tohumların çimlenme oranı çok düşük kalmıştır.

*S. stricta* türüne ait sürgün ucu rejenerasyon çalışmasında; MS0 kontrol grubu da dahil olmak üzere 0.5, 1, 1.5 mg/l TDZ'nin farklı konsantrasyonlarıyla oluşturulan 4 farklı besi ortamında kültüre alınan eksplantlarda rejenerasyon sağlanmıştır. Meydana gelen sürgün oluşum oranı TDZ konsantrasyonuna bağlı kalmıştır. Yüksek TDZ konsantrasyonu içeren ortamlarda (1.5 mg/l TDZ) gelişme oranı azalırken en fazla rejenerasyon MS0'da sağlanmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edilen bilgiler ışığında hem kontaminasyonun önüne geçilebilmesi hem de kısa sürede rejenerasyon sağlamak açısından eksplant olarak sürgün uçlarının rejenerasyon yeteneğinin pratikte yararlanılabilecek düzeyde olduğu belirlenmiştir.

#### Teşekkür

Bu çalışma Esra UÇAR'ın yüksek lisans tezinden alınmıştır. Çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

- Andrade, L.B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G.F. and Rota, L., 1999. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 56: 79-83.
- Arafeh, R., Mahmoud, M. and Shibli, R., 2003. *In vitro* seed propagation of wild Syrian marjoram (*Origanum syriacum* L.). *Adv. Hort. Sci.*, 17: 241-244.
- Arslan, N., Yılmaz, G., Akınerdem, F., Özgüven, M., Kırıcı, S., Arıoğlu, H., Gümüşçü, A. ve Telci, İ., 2000. Türkiye Ziraat Müh. 5. Teknik Kongresi, Milli Kütüphane- Ankara. 1. Cilt, S: 453-483
- Aytaç, Z. ve Aksoy, A., 2000. A new *Sideritis* species (Labiatae) from Turkey. *Flora Mediterranea* 10: 181-184.
- Başer, K.H.C., 1994. Essential oils of Labiatae from Turkey. Recent results, *Lamiales news letter*, 3: 6-11.
- Chevre, A.M., Gill, S.S., Mouras, A., and Salesses, G., 1983. *In vitro* vegetative multiplication of chestnut. *J.Hort.Sci.*, 58: 23-29.
- Davis, P.H., 1982. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh University Press, vol. 7, Edinburgh, p: 00-307.
- Davis, P.H., Mill R.R. and Tan, K., 1988. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol: 10, Edinburg Univ. Press., Edinburg, p: 203.
- Ekim, T., Koyuncu, M. Erik, S. ve İlarıslan, R., 1989. Türkiye'nin Tehlike Altındaki Nadir ve Endemik Bitkileri Türkiye Tabiatı Koruma Derneği, Yayın no: 18, Ankara, ss: 227.
- Elliialtıoğlu, Ş., 1999. Doku Kültürü Yoluyla Vegetatif Çoğaltmada Doku Kararması Sorunu, Nedenleri ve Çözüm Yolları. *Biyoteknoloji (Kükem) Dergisi*, 24 (1): 37-47.
- Güner, A., Özhatay, N., Ekim, T. ve Başer, K.H.C., 2000. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol: 11, Edinburg Univ. Pres., Edinburg, p: 201-204.
- Hatipoğlu, R., 1995. *Biyoteknolojiye Giriş*. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 129, Ders Kitabı, Adana, ss: 114.
- Kaçar, B., 1996. *Bitki Fizyolojisi Ders Kitabı*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak Bölümü. Yayın No: 1447, ss:424.
- Mirici, S., 2004. Endemik Geven (*Astragalus polemoniicus* Bunge) Bitkisinin Yaprak Sapı ve Yaprak Eksplantlarından Yüksek Oranda Adventif Sürgün Rejenerasyonu. *S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 18(34): 31-34.
- Muhitch, M.J., and Fletcher, J.S., 1984. Isolation and identification of the phenols of Paul's Scarlet rose stems derived suspension cultures. *Plant Physiol.*, 75: 572-575.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Papafotiou, M., Kalantzis, A., 2009. Seed germination and *in vitro* propagation of *Sideritis athoa*. *Acta Hort. (ISHS)* 813:471-476.
- Rodriguez, R., 1982. Callus initiation and root formation from *in vitro* culture of walnut cotyledons. *HortScience*, 17: 195-196.
- Sanchez-Gras, M.C. and Segura, J., 1987. *In vitro* propagation of *Sideritis angustifolia*. *J. Plant Physiol.*, 130: 93-99.
- Sanchez-Gras, M.C. and Segura, J., 1989. Factors Affecting Plant Regeneration from Leaf Explant of *Sideritis angustifolia* Lag. (*Labiatae*) Cultured *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft*, 54: 90-93.
- Tawfik, A.A. and Mohamed, M.F., 2006. Shoot differentiation and plant regeneration from Thidiazuron-induced callus of *Salvia officinalis*. *Proceedings of the first international symposium on the labiatae: Advances in production, biotechnology and utilisation*. *Acta Hort. (ISHS)*, 723: 309-313.
- Ünal, O., Gökçeoğlu M., ve Topcuoğlu, F., 2004. Antalya Endemiği *Origanum Türlerinin* Tohum Çimlenmesi ve Çelikle Çoğaltılması Üzerinde Araştırmalar. Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 17(2): 135-147.