

***Salvia fruticosa* Mill.'da *In Vitro* Tohum Kültürü ile Aseptik Fide Üretimi**

Emel Yılmaz Gökdoğan¹ , Müge Etik² , Betül Bürün³ 

¹Milli Eğitim Bakanlığı, Menteşe İlçe Milli Eğitim Müdürlüğü, Muğla

^{2,3}Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muğla

Geliş Tarihi / Received Date: 25.11.2021

Kabul Tarihi / Accepted Date: 18.01.2022

Öz

Lamiaceae familyası üyelerinden olan *Salvia* cinsi tıbbi ve aromatik olarak önemli bir cinstir. Ülkemizde yetişen ve Anadolu adaçayı olarak isimlendirilen *Salvia fruticosa* Mill. türünün uçucu yağ içeriğinin diğer türlere göre daha yüksek olması, doğadan toplanarak ticaretinin yapılmasına ve ekonomik değerinin artmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada *Salvia fruticosa* tohumlarının 1/10 Murashige-Skoog (MS) (1962) besin ortamında çimlendirilmesi ile *in vitro* kültürlerde yararlanmak üzere aseptik fide elde edilmesi araştırılmıştır. Kültür öncesi tohumlar %70 etil alkole 2 dakika batırılmış ve takiben NaOCl (klor), H₂O₂ (oksidan) ve H₂SO₄ (asit) ile muamele edilmiştir. Bu tohumlar üç gruba ayrılmış: 1. ve 2. grup tohumlara soğuk uygulaması yapılmamış, 3. gruba soğuk uygulaması yapılmıştır. 1. grup tohumlar 1 hafta karanlığı takiben fotoperiyodik koşullara alınırken; 2. ve 3. gruptaki tohumlar fotoperiyodik koşulda tutulmuşlardır. En yüksek çimlenme %50'dir ve 3 dakika %30-31 H₂O₂ ile yüzeysel sterilizasyonu yapılmış tohumların karanlığı takiben fotoperiyodik koşuldaki kültüründen elde edilmiştir. Aynı koşuldaki tohumların filtre kâğıdı üzerindeki çimlenme testinde (kontrol) ise çimlenme %48 olmuştur. Soğuk uygulama yapılan ve fotoperiyodik koşulda tutulan tohumlarda ise enfeksiyon, düşük gözlenmiştir. Sonuç olarak, *Salvia fruticosa*'nın farklı amaca yönelik *in vitro* kültürlerinde eksplant olarak kullanılabilen steril fidelerin üretimi için en yüksek çimlenme yüzdesini (%50) veren H₂O₂'nin kullanıldığı prosedür uygulanabilir özelliktedir.

Anahtar Kelimeler: anadolu adaçayı, hidrojen peroksit, *in vitro* çimlenme, sodyum hipoklorit, sülfürik asit

Aseptic Seedling Production by *In Vitro* Seed Culture in *Salvia fruticosa* Mill.

Abstract

The genus *Salvia*, which is a member of the *Lamiaceae* family, is a medicinally and aromatically important genus. The species *Salvia fruticosa* Mill., which grows in our country and is called Anatolian sage, causes both the increase of its economic value and its trade by collecting from nature because of containing the essential oil content of this species is higher than the other species. In this study, the germination of *Salvia fruticosa* seeds in 1/10 Murashige-Skoog (MS) (1962) nutrient medium was investigated obtaining aseptic seedlings for use in *in vitro* cultures. The seeds before culture were soaked in 70% ethanol for 2 minutes and then they were applied with NaOCl (chlorine), H₂O₂ (oxidant) and H₂SO₄ (acid). These seeds were divided into three groups: no cold treatment was applied to the 1st and 2nd group seeds, cold application was made to the 3rd group. While the first group seeds were taken to photoperiodic conditions after one week of darkness, the seeds in second and third groups were kept in photoperiodic conditions. The highest germination percentage was 50%, and it was obtained from the culture of seeds superficially sterilized with 30-31% H₂O₂ for 3 minutes in photoperiodic conditions after dark. In the germination test (control) of seeds on filter paper, germination was 48% under the same condition. The infection rate under the fotoperiodic condition was observed to be low in cold applied seeds. As a result, the procedure using H₂O₂, which gives the highest germination percentage (50%), is applicable for the production of sterile seedlings that can be used as explants in *in vitro* cultures of *Salvia fruticosa* for different purposes.

Keywords: anatolian sage, hydrogen peroxide, *In vitro* germination, sodium hypochlorite, sulfuric acid

Giriş

Salvia cinsinin yer aldığı *Labiatae* (sin. *Lamiaceae*) familyası, tür sayısı bakımından en zengin familyalardan biridir. Dünyada yaklaşık 1000 türü olan *Salvia* cinsinin Türkiye’de 99 türü, 8 alttürü ve 6 varyetesi (106 takson) bulunmaktadır ve bu türlerin bir kısmı endemik olup (52 tür) endemizm oranı %52.5’tur (Yılmaz-Gökdoğan ve Bürün, 2021). *Salvia* türleri içerdikleri etken maddeler ile çeşitli ilaçların yapımında ve bazı hastalıkların tedavisinde, güzel kokulu uçucu yağları ile parfümeride ve yemek endüstrisinde, güzel görünümlü çiçekleri nedeniyle de peyzaj alanlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca ülkemizde doğal yetişen *S. fruticosa*, *S. tomentosa* türleri ve ülkemizde doğal olarak yetişmeyip kültürü yapılan *S. officinalis* L. türleri çay olarak tüketilmektedir (Özcan vd., 2014).

Ülkemizde yetişen türlerden *Salvia fruticosa* Mill. (sin. *S. triloba*-Üç loblu adaçayı) başta olmak üzere *S. cryptantha*, *S. multicaulis*, *S. sclarea* ve *S. tomentosa* türlerinin ticareti yapılmaktadır (İpek ve Gürbüz, 2010). *Salvia fruticosa* (Anadolu adaçayı) türünün uçucu yağ içeriği diğer türlere göre daha yüksek olduğundan ekonomik açıdan oldukça önemlidir (Kocabaş vd., 2007). Türkiye’de adaçayı ihracatının temelini doğadan toplanan bitkiler oluşturmaktadır. *Salvia* tarımı ve doğadan toplama ile 2015 yılındaki adaçayı üretimi 989 ton olarak gerçekleşmiştir (Bayraktar vd., 2017). Yeterli miktarda standart ve kaliteli ürün elde etmek sadece bitkilerin doğal habitatlarından toplanmasıyla mümkün olamayacağından bu bitkilerin kültüre alınarak tarımının yapılması önem arz etmektedir. Ayrıca yetiştirme, doğal vejetasyonun bozulmasını, var olan bitki türlerinin yok olmasını ve doğadan bilinçsizce toplanmasını engellemek için de önemlidir. Muğla ili adaçayı üretiminde öne çıkmasına karşın üretimine yönelik herhangi bir organik tohumluk (tohum, çelik vb.) elde edilmesine yönelik çalışma bulunmamaktadır (Bayram vd., 2010). Oysa ülkemizde 99 türü bulunan adaçayı için çeşit geliştirme ve üretim çalışmalarına önem verilerek var olan bu potansiyel değerlendirilmelidir. Ekonomik değeri olan türleri yetiştirmenin yanı sıra doku kültürü teknikleri ile tıbbi bitkilerin aktif bileşiklerini üretmek de mümkün olmaktadır. Böylece yetiştiricilikte bazı sınırlamalara sebep olan iklim, sezon, hastalık ve zararlılar gibi birtakım faktörlerin etkisi giderilebilmektedir. Ayrıca koruma çalışmaları kapsamında doku kültürü teknikleri ile istenen genotipteki bitkiler ile nadir olan, tehdit veya yok olma tehlikesi altındaki bitkiler, kısa sürede hızlı ve çok sayıda üretilebilmektedir. Çeşitli *in vitro* teknikler kullanılarak birçok *Salvia* türünde hem mikroçoğaltım hem de önemli biyoaktif bileşiklerin üretimi başarılmıştır (Arikat vd., 2004; Ghanbar vd., 2016; Ioja-Boldura vd., 2010; Petrova vd., 2015; Surgun-Acar ve Bürün, 2017; Zayova vd., 2016).

Biyçeşitliliğin korunması açısından önemli olan tohum çimlendirme çalışmalarında öncelikli olarak çalışılan türe ait tohumların çimlenme koşullarının bilinmesi gereklidir. Biyolojik çeşitliliği zengin olan ülkemizde doğal türlerin çimlenme gereksinimleri çoğunlukla bilinmemektedir ve bu nedenle tohumlarının çimlendirilmesi üzerindeki çalışmalar yetersiz kalmaktadır. Ancak son yıllarda çeşitli projeler kapsamında tohum çimlenmesinin araştırıldığı türlerin çoğu *Lamiaceae*, *Asteraceae* ve *Brassicaceae* familyalarına aittir (Surgun-Acar vd., 2017). *In vitro* kültürler için tohumlar alternatif eksplantlar olup tohum kültürleri ile elde edilen steril fidelerin çeşitli parçaları, doku kültürlerinde çeşitli amaçlar doğrultusunda aseptik eksplant kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Salvia tohumlarının sterilizasyon boyunca musilaj üretmesi nedeniyle *in vitro* koşullarda çimlenmesi zor olduğu için (Ghanbar vd., 2012) bu çalışmada Türkiye’de doğal olarak yetişen, zengin fenolik bileşikler ile değerli olan ve ticareti yapılan *S. fruticosa*’da tohum çimlenmesi ve *in vitro* kültür çalışmalarında yararlanmak üzere steril fide elde edilmesi araştırılmıştır.

Materyal ve Yöntem

Materyal

Çalışmada kullanılan *Salvia fruticosa* Mill. tohumları Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü’nden (Menemen-İzmir) temin edilmiştir. Tohumların bin dane ağırlığı 6.10 g’dır. Ayrıca *S. fructicosa* tohumları Muğla ili florasında bulunan 5 farklı lokasyondan (Ortaca, Marmaris, Datça, Bodrum ve

Gökova) Haziran ayında toplanmış ve tohumların bin dane ağırlığı lokasyonlara göre 2.14-8.00 g arasında değişmiştir. Ortalama bin dane ağırlığı 4.16 g'dır.

Yöntem

Tohum Sterilizasyonu

Yüzeysel sterilizasyon için kullanılan dezenfektanlardan klorlu bileşik olarak sodyum hipoklorit (NaOCl), oksidan madde olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) ve asit olarak sülfürik asit (H₂SO₄) aşağıda belirtildiği gibi uygulanmıştır.

1. %70'lik etil alkole 2 dakika batırma, 1 damla Tween-20 eklenmiş %1.25 NaOCl (¼ sulandırılmış ticari klorak) ile 10 dakika muamele ve 3-4 kez steril distile su ile çalkalama.
2. % 70'lik etil alkole 2 dakika batırma, %30-31'lik H₂O₂ ile 3 dakika muamele etme ve 3-4 kez steril distile su ile çalkalama.
3. %70'lik etil alkole 2 dakika batırma, %70'lik H₂SO₄ ile 3 dakika muamele etme ve 3-4 kez steril distile su ile çalkalama.

Soğuk Uygulaması

Yüzeysel sterilizasyonu yapılan tohumlar üç gruba ayrılarak, 1. ve 2. gruba soğuk uygulaması yapılmamış; 3. grup tohumlar ise +4°C'de 3 gün bırakılarak soğuk uygulama yapılmıştır. Soğuk uygulamasız ve soğuk uygulamalı tohumlar 1/10 MS ortamında kültüre alınmıştır. 1. grup tohumlar 1 hafta tamamen karanlıkta bırakıldıktan sonra fotoperiyodik koşulda kültürlerine devam edilmiştir. 2. ve 3. gruptaki tohumlar fotoperiyodik koşulda tutulmuşlardır.

Besin Ortamı

Murashige-Skoog (MS) (1962) besin ortamı onda bir (1/10 MS) içerikte hazırlanarak 20 g l⁻¹ sükröz eklenmiş, pH: 7.2'ye ayarlanmış ve 7 g l⁻¹ agar ile katılaştırılmıştır. Hazırlanan besin ortamı kültür kabı olarak 2.5 cm çapında, 14 cm boyundaki deney tüplerine 25'şer ml boşaltılmıştır. 120°C'de 1 atm basınçta 20 dakika otoklavda sterilize edilmiştir. Yüzeysel sterilizasyonu yapılan soğuk uygulamasız ve uygulamalı tohumlar, her tüpe bir adet olacak şekilde aktarılmıştır. Her uygulama için toplam 100 tohum kültüre alınmıştır (Kültür, her birinde 50 tohum olmak üzere iki tekerrür olarak yapılmıştır). Kontrol grubunda, tohumlar petri kaplarında filtre kağıdı üzerinde çimlendirilmiştir (ISTA, 1993). Bir petri kabında 10 tohum olmak üzere toplam 50 tohum kültüre alınmıştır.

Kültür Koşulları

Kültür odası sıcaklığı 20±2°C'dir. 16 saat aydınlık-8 saat karanlık fotoperiyodik koşuldaki aydınlanma, 40 µE m⁻² s⁻¹ foton beyaz ışık yoğunluğundadır.

Muğla Florasından Toplanan *S. fruticosa* Tohumlarında Yapılan Uygulama ve Çalışmalar

Muğla ilinin farklı lokasyonlardan toplanan *Salvia fruticosa* tohumları, oda sıcaklığında muhafaza edilmiş ve 8 ay sonra steril fide elde etmek üzere kültüre alınmıştır. Tohumlar %70'lik etil alkole 2 dakika batırılmış, %30-31'lik H₂O₂ ile 3 dakika muamele edilmiş ve 4 kez steril distile su ile çalkalandıktan sonra 20 g l⁻¹ sükröz ilaveli pH: 7.2 olan ve 7 g l⁻¹ agar ile katılaştırılmış 1/10 MS ortamında kültüre alınmıştır. Tohumlar kültüre alındıktan sonra 1 hafta karanlık ortamda bırakıldıktan sonra 16 saat aydınlık (40 µE m⁻² s⁻¹)-8 saat karanlık fotoperiyodik koşulda, 20±2°C sıcaklıktaki kültür odasına yerleştirilmiştir. Kültüre alınan tohumların çimlenme yüzdeleri enfeksiyonlu olanlar çıkarılarak hesaplanmıştır.

İstatistiki Değerlendirme

Yüzde (%) çimlenme verilerine arcsin transformasyonu karekök yapılarak SPSS programında istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Uygulamalar arasındaki farklılıklar LCD testi kullanılarak çoklu karşılaştırma ile belirlenmiştir ve ortalamalar arasındaki anlamlı farklılık $P \leq 0.05$ düzeyindedir.

Bulgular ve Tartışma

Bazı *Salvia* türlerinde 20°C'de filtre kağıdı üzerinde veya arasında yapılan çimlenme testlerinde genel olarak 4-7 günde ilk çimlenmenin başladığı ve 21 günde tamamlandığı görülmüş olup (ISTA, 1993) bu çalışmada H₂O₂ uygulanan tohumlarda kültüre alınmalarından 4 gün sonra, petri kaplarında kültüre alınanlarda (kontrol) 6 gün sonra, H₂SO₄ uygulananlarda 10 gün sonra, NaOCl uygulananlarda ise 20 gün sonra tohum çimlenmesi başlamış ve genel olarak 40 gün devam etmiştir.

Doku kültürü çalışmalarında kontaminasyonları önlemek için birtakım kimyasallar kullanılmaktadır ve bu kimyasalların etkili, ucuz ve non-toksik olması gerekmektedir. Etkili bir kimyasal düşük dozlarda bile mikroorganizmaları engelleyecek kadar güçlü olmalı ancak eksplantlara zarar vermemelidir (Hasemi vd., 2017). Bu nedenle doku kültürlerinde uygun sterilantı, konsantrasyonunu ve maruz kalma süresini belirlemek oldukça önemlidir. Bu çalışmada tohumlar hiçbir işlem görmeden petri kaplarında filtre kağıdı üzerinde veya NaOCl, H₂O₂ ve H₂SO₄ ile muamele edildikten sonra 1/10 MS ortamında kültüre alınmıştır. H₂O₂ ile yüzeysel sterilizasyonu yapılmış tohumların karanlığı takiben fotoperiyodik koşuldaki kültürlerinde, çimlenme yüzdesi en yüksek bulunmuştur (%50) (Tablo 1).

Tohum dormansisini kırmak üzere ön üşütme veya kimyasal (KNO₃, GA₃, H₂SO₄ ve HNO₃) uygulamalar önerilmektedir (ISTA, 1993). Bu çalışmada da H₂SO₄ uygulamasından sonra tohum kültürü yapılarak hem çimlenme hem de enfeksiyon durumu araştırılmış ve H₂O₂ uygulamasına göre düşük çimlenme yüzdesi ile daha az enfeksiyon görülmüştür. Musarurwa vd. (2010) çalışmalarında %70 H₂SO₄ ile 5 dakika muamele ederek 1/10 MS ortamında kültüre aldıkları *Salvia stenophylla* tohumlarının çimlenme yüzdesinde önemli artış elde etmişlerdir. H₂SO₄ yanı sıra NaOCl ve H₂O₂'li yüzeysel sterilizasyonu sonrası yapılan soğuk uygulaması ile düşük çimlenme yüzdesine rağmen enfeksiyon, soğuk uygulamasız kültürler göre daha düşük gözlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Kontrol (Filtre Kâğıdı Üzerinde Petri Kaplarında) ve NaOCl, H₂O₂ ve H₂SO₄ ile Muamele Edilen Tohumların 1/10 MS Besin Ortamındaki *In Vitro* Kültürlerinde Tohumların Soğuk Uygulaması ve Kültür Başlangıcında Bir Hafta Karanlıkta Bırakılmaları Durumundaki Çimlenme Yüzdeleri ve Enfeksiyon Durumu

Uygulanan Kimyasal	Bir Hafta Karanlığı Takiben Fotoperiyodik Koşul		Fotoperiyodik Koşul			
	Çimlenme	Enfeksiyon	Soğuk Uygulamasız		Soğuk Uygulamalı	
			Çimlenme	Enfeksiyon	Çimlenme	Enfeksiyon
Kontrol	%48.0±0.54	0±0.00	%45.0±0.21	0±0.00	%27.0±0.15	0±0.00
NaOCl	%2.2±0.14*	%18±0.48*	0.0±0.00*	%19±0.32*	%10.0±0.09*	%7±0.06*
H ₂ O ₂	%50.0±0.28*	%16±0.21*	%25.0±0.19*	%14±0.05*	%12.8±0.15*	%9±0.12*
H ₂ SO ₄	%15.8±0.09*	%5±0.15*	%9.8±0.15*	%5±0.05*	%19.0±0.11*	%2±0.04*

* Aynı sütundaki değerler bakımından, uygulanan farklı kimyasalların kontrole göre istatistiksel farklılığını göstermektedir ($P \leq 0.05$).

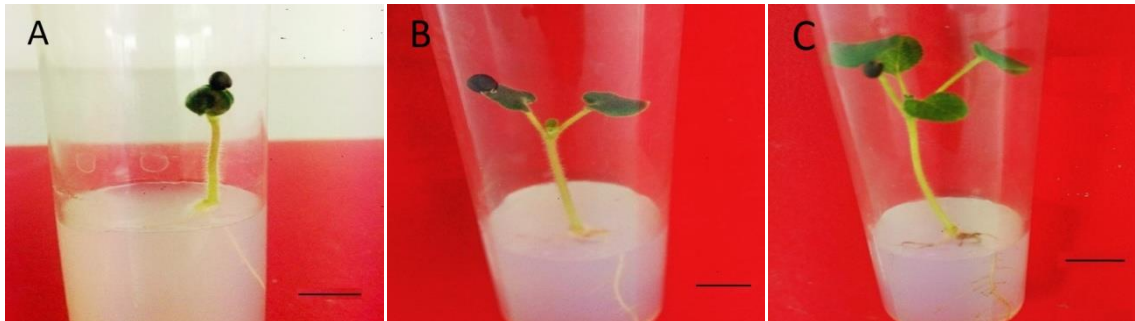
Petri kaplarında yapılan çimlenme testinde enfeksiyon (%0) gözlenmezken, tohumların 1/10 MS ortamındaki kültürlerinde en düşük enfeksiyon %2 ile yüzeysel sterilizasyonu H₂SO₄ ile yapılan soğuk uygulamalı tohumların kültüründe, en yüksek ise %19 olarak çimlenmenin gerçekleşmediği NaOCl ile sterilize edilen soğuk uygulamasız tohumların kültüründe görülmüştür (Tablo 1). %50 olarak en yüksek çimlenmenin görüldüğü H₂O₂ ile yüzeysel sterilizasyonu yapılan tohumların kültüründe ortalama %16 enfeksiyon görülmüştür. Soğuk uygulamalı tohum kültüründe enfeksiyon yüzdeleri, soğuk uygulamasız tohumların kültürlerine göre daha düşük bulunmuştur. Pamuk tohumlarında da H₂O₂ ile muamele

edilenlerin; klorin gazı, etanol (C₂H₅OH), NaOCl, HgCl₂, Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) ile muamele edilen tohumlara göre kontaminasyon düzeyleri ve çimlenme oranlarında önemli bir artış olduğu rapor edilmiştir (Bakhsh vd., 2016; Barampuram vd., 2014). Ayrıca Anadolu sığlası (*Liquidambar orientalis* Mill.) tohumlarının ½ MS ortamındaki kültürlerinde de tohumların yüzeysel sterilizasyonunda yüksek çimlenme yüzdesi ve düşük enfeksiyon ile NaOCl'ye göre H₂O₂ daha başarılı bulunmuştur (Baran-Ayaz vd., 2015).

Sönmez vd. (2019), hiçbir işlem görmemiş *S. fructicosa* tohumlarının 25°C sıcaklıkta çimlenme yüzdesini %31, Özcan vd. (2014) %22.5 bulurken bu çalışmada %48 ile daha yüksek çimlenme yüzdesi elde edilmiştir. Ancak Sönmez vd. (2019), GA₃ uygulaması ile çimlenmede %82'ye, polimer+GA₃ uygulaması ile de %85 olmak üzere daha yüksek çimlenmelere ulaşmışlardır. Ayrıca bu çalışmada Muğla florasından toplanan tohumların sterilizasyonu H₂O₂ ile yapılarak 1/10 MS ortamındaki kültürlerinde %14.30 çimlenme, %24.24 enfeksiyon görülmüş ve diğer çalışmalarda elde edilen çimlenme yüzdesine göre daha düşük bulunmuştur. Thanos ve Doussi (1995) ise Girit adasından topladıkları *S. fructicosa* tohumlarının (tohum ağırlığı 5.54 mg) karanlıkta 25°C'de %50, 20°C'de ise %80 çimlendiklerini tespit etmişlerdir.

In vitro kültürlerde eksplant sterilizasyonunda başta NaOCl veya Ca(OCl)₂ olmak üzere C₂H₅OH, HgCl₂, H₂O₂, AgNO₃ gibi maddeler de yaygın şekilde kullanılmaktadır. *Salvia* türlerinde mikroçoğaltım veya sekonder metabolit üretimi amaçlı *in vitro* kültür çalışmalarında aseptik eksplant elde etmek üzere tohum kültürlerinde öncelikle, tohumlar değişik konsantrasyon ve sürelerde etanole batırılmış sonra farklı sterilant maddelerle muamele edildikten sonra kültüre alınmıştır. *Salvia* tohumlarının *in vitro* kültürlerinde yüzeysel sterilizasyonda çoğunlukla NaOCl kullanılmıştır (Ghanbar vd., 2016; Ghanbar vd., 2012; Grzegorzczak vd., 2005; Makunga ve van Staden, 2008; Skafa ve Wysokińska, 2004; Soundararajan vd., 2013). Karam vd. (2003) ile Arıkat vd. (2004) *Salvia fructicosa* tohumlarını %0.1 Tween-20 ilaveli %2 NaOCl solüsyonunda 15 dakika muamele ederek ½ MS ortamında kültüre almışlar ve *in vitro* steril fidelerin sürgün uçlarını sekonder metabolit üretmek üzere mikroçoğaltımda kullanmışlardır. Ayrıca *Salvia* türlerinde sterilizasyonun HgCl₂ ile yapıldığı çalışmalar da vardır (Elena vd., 2019; Huii vd., 2012; Işık-Boldura vd., 2010; Wu vd., 2022). *Salvia* türlerinde H₂O₂ ile sterilizasyon uygulamasına rastlanmamış ve bu çalışmada tohum çimlenmesinde NaOCl'ye göre daha yüksek sonuç alınmıştır.

Doku kültürü tekniklerinden tohum kültürlerinde yaygın olarak MS ortamı kullanılmaktadır. Ancak tohumların MS ortamındaki yüksek tuz içeriğine duyarlılıkları nedeniyle tohum kültürlerinde tam güçlü MS yerine ½, ¼, 1/10 vb. seyrelterek kullanılmaları da tercih edilmektedir. *Salvia* türlerinde steril fide elde etmek üzere yapılan *in vitro* kültürlerde tam güçlü MS ortamı (Elena vd., 2019; Grzegorzczak vd., 2005; Huii vd., 2012; Işık-Boldura vd., 2010; Santos-Gomes vd. 2002; Skafa ve Wysokińska, 2004; Wu vd., 2020), yarı güçlü MS (½ MS) ortamı (Arıkat vd., 2004; Karam vd., 2003; Soundararajan vd., 2013) veya 1/10 MS ortamı (Makunga ve van Staden, 2008; Musarurwa vd., 2010) kullanılmıştır. Bu çalışmada da 1/10 MS kullanılmış ve *in vitro* kültürler için uygun steril fideler elde edilmiştir (Şekil 1).



Şekil 1. *Salvia fructicosa* Tohumlarının Çimlenmesi ve Steril Fide Elde Edilmesi

A: Çimlenen Tohum, B: Çimlenmeden 5 Gün, C: Çimlenmeden 10 Gün Sonraki Fideler

Adaçayının tohum ile çoğaltımında çimlenme ortamının pH'sının çok önemli olduğu ve pH'nın 5.5-6.0 arasında olması gerektiği belirtilmektedir (Kaczperski ve Carlson, 1989). *Salvia in vitro* tohum

kültürlerinin kullanıldığı pek çok çalışmada pH 5.7 ile 5.8'e ayarlanmış olmakla beraber (Hui vd., 2012; Makunga ve van Staden, 2008; Santos-Gomes vd., 2002; Soundararajan vd., 2013), *Salvia sclarea* tohumlarının çimlenmesinde MS ortamının pH'sının etkisini araştıran Ghanbar vd. (2012) en yüksek çimlenme yüzdelerini pH'sı 7-8 olan MS ortamlarında elde etmişlerdir. *S. verbenaca*'da çimlenmeyi etkileyen çevre faktörlerinin etkisini araştıran Javaid vd. (2018), en yüksek çimlenmeyi pH 7'de elde etmişler ancak pH 5 ile 10 arasında istatistiki önemli bir farklılık bulmamışlardır. Bu çalışmada da besin ortamının pH'ı 7.2 olarak ayarlanmıştır.

Steril fide elde etmek üzere yapılan kültürler genellikle fotoperiyodik koşullarda ya da kültür başlangıcında tamamen karanlıkta bırakılıp çimlenmenin başlaması ile (genellikle 1 hafta sonra) 40-60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ aydınlanmalı fotoperiyodik koşula (16 saat aydınlık-8 saat karanlık) alınmakla beraber (Arıkat vd., 2004; Ghanbar vd., 2016; Karam vd., 2003; Santos-Gomes vd., 2002) devamlı ışık altında yapılan kültürler de vardır (Grzegorzczak vd., 2005; Skafa ve Wysokińska, 2004). Çalışmamızda en yüksek çimlenme (%50), %30-31'lik H_2O_2 ile 3 dakika muamele edilerek yüzey sterilizasyonu yapılan, 1/10 MS ortamında kültüre alınan ve 1 hafta karanlığı takiben fotoperiyodik koşulda devam eden kültürlerden elde edilmiştir.

Sonuç ve Öneriler

Steril fide elde etmek amacı ile *in vitro* koşullar altında tohum çimlenme yüzdesini arttırmak, doku kültürü çalışmalarında ilk ve en kritik adımı oluşturmaktadır. Ülkemizde doğal olarak yetişen ve ekonomik değeri yüksek olan *Salvia fruticosa* türünün yetiştirilmesi önemli olup bu konuda *in vitro* kültür tekniklerinin avantajlarından yararlanılmalıdır. Bu amaçla *Salvia fruticosa*'da steril fide elde etmek üzere çimlenmenin yüksek, enfeksiyonun düşük olacağı bir yöntem belirlenmeye çalışılmıştır. *In vitro* kültürlerde yüzeysel sterilizasyon yöntemlerinde çoğunlukla NaOCl kullanılıyor olmakla beraber bu çalışmada çimlenme ve enfeksiyon dikkate alındığında H_2O_2 uygulamasından daha iyi sonuçlar alınmıştır. Yapılan soğuk uygulaması ise çimlenme yüzdesini arttırmamasına rağmen enfeksiyonu azaltıcı etki göstermiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre *Salvia fruticosa* türünde steril fide elde etmek ve daha sonra yapılacak çalışmalara devam edebilmek amacı ile H_2O_2 ile muamele edilen tohumların çimlenmesinde bir hafta karanlığı takiben fotoperiyodik koşulda yapılan *in vitro* tohum kültürleri önerilebilmektedir. Çalışmamızda tohumlar %30-31'lik H_2O_2 ile 3 dakika muamele edilmiş olup H_2O_2 'nin farklı doz ve uygulama süreleri, soğuk uygulamasının ve kültür koşullarının da etkisi araştırılarak çimlenmenin yüksek, enfeksiyonun düşük olduğu yeni protokollerin geliştirilmesi uygun olacaktır.

Yazar Katkısı

Emel Yılmaz Gökdoğan, deneysel ortamı hazırladı, makaleyi düzenledi, istatistiksel analizi gerçekleştirdi. *Müge Etik*, deneyleri yaptı. *Betül Bürün*, deneysel süreci takip edip makaleyi yazdı. Yazarlar makaleyi okudu ve onayladı.

Etik

Bu makalenin yayınlanmasıyla ilgili herhangi bir etik sorun bulunmamaktadır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması olmadığını belirtmektedir.

ORCID

Emel Yılmaz Gökdoğan  <https://orcid.org/0000-0002-8605-7301>

Müge Etik  <https://orcid.org/0000-0001-5736-0443>

Betül Bürün  <https://orcid.org/0000-0002-3758-0630>

Kaynaklar

- Arıkat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S. ve Shibli, R. A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Scientia Horticulturae*, 100, 193-202. <http://doi.org/10.1016/j.scienta.2003.07.006>
- Bakhsh, A., Anayol, E., Sancak, C. ve Özcan, S. 2016. An efficient and cost effective sterilizing method with least microbial contamination and maximum germination ratio for *in vitro* cotton (*Gossypium hirsutum* L.) culture. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 26(3), 868-873. <https://www.researchgate.net/publication/303696595>
- Barampuram, S., Allen, G. ve Krasnyanski, S. (2014). Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118, 179-185. <http://doi.org/10.1007/s11240-014-0472-x>
- Baran-Ayaz, Ö., Surgun, Y. ve Bürün, B. (2015). Endemik Anadolu sığlası (*Liquidambar orientalis* Mill.)'nda tohum sterilizasyonu ve çimlenme. *Anadolu Doğa Bilimleri Dergisi*, 6(Özel sayı 2), 82-86. <http://plant-materials.nrcs.usda.gov>
- Bayraktar, Ö. V., Öztürk, G. ve Arslan, D. (2017). Türkiye'de bazı tıbbi ve aromatik bitkilerin üretimi ve pazarlanmasındaki gelişmelerin değerlendirilmesi. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 26 (2), 216-229. <http://doi.org/10.21566/tarbitderg.369928>
- Bayram, E., Kırıcı, S., Tansı, S., Yılmaz, G., Arabacı, O., Kızıl, S. ve Telci İ. (2010, Ocak, 11-15). *Tıbbi ve aromatik bitkiler üretiminin arttırılması olanakları*. Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi, Ankara, Türkiye.
- Elena, T. M., Camen, D., Moatăr, M., Petolescu, C., Boldea, M., Iordanescu, O. ve Sala, F. (2019). Research regarding the influence of the preparing methods on seed germination on *Salvia officinalis*. *Journal of Horticulture, Forestry and Biotechnology*, 23(2), 53-57. <https://journal-hfb.usab-tm.ro>
- Ghanbar, T., Hosseini, B. ve Jabbarzadeh, Z. (2012). Improving *Salvia sclarea* L. seed germination under *in vitro* condition. *International Journal of Agriculture: Research and Review*, 2(S), 1051-1058. <http://facultystaff.urmia.ac.ir>
- Ghanbar, T., Hosseini, B., Jabbarzadeh, Z., Farokhzad, A. ve Sharafi, A. (2016). High-frequency *in vitro* direct shoots regeneration from axillary nodal and shoot tip explants of clarysage (*Salvia sclarea* L.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(1), 73-78. <https://www.researchgate.net/publication/296675191>
- Grzegorzczuk, I., Bilickowski, I., Mikiciuk-Olasik, E. ve Wysokińska, H. (2005). *In vitro* cultures of *Salvia officinalis* L. as a source of antioxidant compounds. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 74(1), 17-21. <https://doi.org/10.5586/asbp.2005.003>
- Huij, L., Guoping Z., Guozheng, S., Songlin, R. ve Qiaojuan, F. (2012). Callus induction and plant regeneration from mature seeds of *Salvia splendens*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14(3), 445-449. https://www.fspublishers.org/published_papers/73876_.pdf
- Ioja-Boldura, O.M., Radu, F., Popescu, S. ve Borozan, A. (2010). Regeneration, micropropagation, callus cultures and somatic embryogenesis of common sage (*Salvia officinalis* L.). *Bulletin UASVM Horticulture*, 67(1), 308-313. [DOI:10.15835/BUASVMCN-HORT:5732](https://doi.org/10.15835/BUASVMCN-HORT:5732)
- ISTA (1993). *International Rules For Seed Testing*, International Seed Testing Association. *Seed Sci Technol* 21, p. 289, Zürich, Switzerland.
- İpek, A. ve Gürbüz, B. (2012). Türkiye florasında bulunan *Salvia* türleri ve tehlike durumları. *Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 19(1-2), 30-35. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/118448>

- Javid, M.M., Florentine, S., Ali, H.H. ve Weller, S. (2018). Effect of environmental factors on the germination and emergence of *Salvia verbenaca* L. cultivars (verbenaca and vernalis): An invasive species in semi-arid and arid rangeland regions. *PLOS ONE*, 13(3), 1-20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194319>
- Kaczperski, M. P. ve Carlson, W.H. (1989). A Commercial Growers Guide, Producing *Salvia*. *Cooperative Extension Service*, Michigan State University, Extension Bulletin E-1663.
- Karam, N. S., Jawad, F. M., Arikat, N. A. ve Shibli, R A. (2003). Growth and rosmarinic acid accumulation in callus, cell suspension, and root cultures of wild *Salvia fruticosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 73, 117-121. <https://doi.org/10.1023/A:1022806420209>
- Kocabaş, I., Sönmez, İ., Kalkan, H. ve Kaplan, M. (2007). Farklı organik gübrelerin adaçayı (*Salvia fruticosa* Mill.)'nin uçucu yağ oranı ve bitki besin maddeleri içeriğine etkileri. *Akdeniz Üniv. Ziraat Fak. Dergisi*, 20(1), 105-110. <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/18136>
- Makunga, N. P. ve van Staden, J. (2008). An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 9, 63-72. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9305-5>
- Murashige, T. ve Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15, 473-497. <https://florestal81.webnode.com/files/200000040-03153040fe/07%20Artigo%20MS%201962.pdf>
- Musarurwa, H. T., van Staden, J. ve Makunga, N. P. (2010). *In vitro* seed germination and cultivation of the aromatic medicinal *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) provides an alternative source of α -bisabolol. *Plant Growth Regul.*, 61, 287-295. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9476-7>
- Özcan, İ.İ., Arabacı, O. ve Öğretmen, N.G. (2014). Bazı adaçayı türlerinde farklı tohum çimlendirme uygulamalarının belirlenmesi. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*, 2(5), 203-207. <http://www.agrifoodscience.com/index.php/TURJAF/article/view/58/52>
- Petrova, M., Nikolova, M., Dimitrova, L. ve Zayova, E. (2015). Micropropagation and evaluation of flavonoid content and antioxidant activity of *Salvia officinalis* L. *Genetics and Plant Physiology*, 5(1), 48-60. <https://www.researchgate.net/publication/301888959>
- Santos-Gomes, P.C., Seabra, M.R., Andrade, P.B. ve Fernandes-Ferreira, M. (2002). Phenolic antioxidant compounds produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis* L.). *Plant Science*, 162, 981-987. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00052-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00052-3)
- Skała, E. ve Wysokińska, H. (2004). *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* L. from shoot tips and leaf explants. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant*, 40, 596-602. <https://doi.org/10.1079/IVP2004580>
- Soundararajan, P., Sivanesan, I., Jo, E. H. ve Jeong, B.R. (2013). Silicon promotes shoot proliferation and shoot growth of *Salvia splendens* under salt stress *in vitro*. *Hort. Environ. Biotechnol.*, 54(4), 311-318. <https://doi.org/10.1007/s13580-013-0118-7>
- Surgun-Acar, Y. ve Bürün, B. (2017, May, 9-11). *Plant tissue culture studies in genus Salvia and its importance*. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants: "Natural and Healthy Life" (TABKON17), 09-11 May 2017, Proceedings Book, p.303-309, Konya, Türkiye.
- Surgun-Acar, Y., Yokaş, İ. ve Bürün, B. (2017, July, 5-8). *Seed germination studies in native species for conservation of biodiversity*. The 3rd International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB 2017), Abstract e-Book page:663, Minsk, Belarus.
- Thanos, C.A ve Doussi, M.A. (1995). Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of crete. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43, 227-237. <https://doi.org/10.1080/07929978.1995.10676607>

- Wu, Q., Zhang, C., Yang, H., Sun, Y., Hu, J. ve Zou, L., (2022). *In vitro* propagation via organogenesis and formation of globular bodies of *Salvia plebeia*: A valuable medicinal plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 58, 51–60. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10223-y>
- Yılmaz-Gökdoğan, E. ve Bürün, B. (2021, July, 1-3). The seed germination and *in vitro* culture studies on *Salvia* species in flora of Turkey. The 5th International Symposium on EuroAsian Biodiversity (SEAB2021), Muğla, Turkey.
- Zayova, E., Nikolova, M., Dimitrova, L. ve Petrova, M. (2016). Comparative study of *in vitro*, *ex vitro* and *in vivo* propagated *Salvia hispanica* (*Chia*) plants: Morphometric analysis and antioxidant activity. *AgroLife Scientific Journal*, 5(2), 166-173. http://agrolifejournal.usamv.ro/pdf/vol.V_2/Art27.pdf