

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

TÜRKİYE'DE TEHLİKE ALTINDAKİ BAZI ENDEMİK *SALVIA*
TÜRLERİNİN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI VE TARLA ŞARTLARINA
ADAPTASYONU

Mesut UYANIK

TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA
2017

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mesut UYANIK tarafından hazırlanan “Türkiye’de tehlike altındaki bazı endemik *Salvia* türlerinin *in vitro* çoğaltımı ve tarla şartlarına adaptasyonu” adlı tez çalışması 15.06.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Dilek BAŞALMA
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri

Başkan: Prof. Dr. Dilek BAŞALMA
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Hayrettin KENDİR
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Khalid Mahmood KHAWAR
Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Prof. Dr. Belgin COŞGE ŞENKAL
Bozok Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı



Üye : Doç. Dr. Sevil SAĞLAM
Ahi Evran Üniversitesi Bitkisel Biyoteknoloji Anabilim Dalı



Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Atila YETİŞEMİYEN
Enstitü Müdürü

ETİK

Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki bütün bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

15.06.2017



Mesut UYANIK

ÖZET

Doktora Tezi

TÜRKİYE'DE TEHLİKE ALTINDAKİ BAZI ENDEMİK *SALVIA* TÜRLERİNİN *IN VITRO* ÇOĞALTIMI VE TARLA ŞARTLARINA ADAPTASYONU

Mesut UYANIK

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Dilek BAŞALMA

Bu tez çalışmasında Türkiye'de değişik tehlike kategorilerinde bulunan ve klasik yollarla çoğaltımında problemler yaşanan bazı endemik *Salvia* türlerinin (*S. albimaculata* Hedge&Hub.-Mor., *S. chrysophylla* Stapf, *S. ephratica* var. *euphratica* Montbret & Aucher ve *S. nydeggeri* Hub.-Mor.) doku kültürü yöntemiyle çoğaltım olanakları araştırılmıştır. Materyal olarak kullanılan türlerin tohumlarında önemli oranda çimlenme problemi görüldüğünden, *in vivo* olarak gelişen türlerden izole edilen koltukaltı ve sürgün uçları eksplant olarak kullanılmıştır. Öncelikle, farklı besin ortamlarının (MS, B5, FN ve NN) sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi araştırılmış ve incelenen karakterler bakımından MS ortamı öne çıkmıştır. Yapılan rejenerasyon çalışmalarına göre, *S. chrysophylla* türünün rejenerasyon yeteneğinin diğer türlere göre daha iyi olduğu tespit edilmiştir. Hızlı çoğaltım çalışmalarında da durum benzerdir. Nitekim *S. chrysophylla* dışındaki türlerde hızlı çoğaltım aşamasında başarıya ulaşılamamış ve doku kültürü ile elde edilen bitkilerin devamlılığı sağlanamamıştır. Dolayısıyla, *S. chrysophylla* dışındaki türlerde köklenme çalışmaları yapılamamıştır. *S. chrysophylla* türünde elde edilen sürgünlerin köklenmesi üzerine ortama ilave edilen 2 ml/L PPM dozunun olumlu etkisi tespit edilmiştir. Dolayısıyla sürgünler 2 ml/L PPM içeren MS ortamında köklendirilmiştir. Köklenmeye alınan sürgünlerin % 51.2'si köklenmiş olup, köklenen bitkicikler 1:1 oranında torf : perlit karışımında saksıya aktarılmış ve dış koşullara kolaylıkla adapte olabilmişlerdir.

Haziran 2017, 77 sayfa

Anahtar Kelimeler: Doku kültürü, *in vitro* hızlı çoğaltım, *Salvia chrysophylla*, sürgün rejenerasyonu, tehdit altındaki bitkiler

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

IN VITRO PROPAGATION of SOME ENDEMIC *SALVIA* SPECIES WHICH ARE ENDANGERED in TURKEY AND ADAPTATION TO FIELD CONDITIONS

Mesut UYANIK

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Dilek BAŞALMA

In this thesis, propagation possibilities with tissue culture of some endemic *Salvia* species (*S. albimaculata* Hedge & Hub.-Mor., *S. chrysophylla* Stapf, *S. ephratica* var.*euphratica* Montbret & Aucher ve *S. nydeggeri* Hub.-Mor.) which are endangered in Turkey and can not be propagated using traditional method was investigated. Because of significant germination problem in seeds of that species, nodal explants and shoot tips isolated from *in vivo*-grown plants were used. First, effect of different nutrient mediums (MS, B5, FN and NN) on shoot regeneration was investigated and MS medium was superior in terms of characters examined. The regeneration studies showed edge of *S. chrysophylla* over the other species. Similar results were noted in micropropagation studies. Micropropagation couldn't be achieved in the other species, except *S. chrysophylla*. So, the rooting studies couldn't have been performed in the other species, except *S.chrysophylla*. 2 ml/L PPM had possittive effect on rooting of shoots in *S.chrysophylla*. So, the shoots were rooted on MS medium containing 2 ml/L PPM. 51.2 % of shoots were rooted. Rooted plants were transferred into pots containing 1:1 turf and perlite and acclimatized easily.

June 2017, 77 pages

Key Words: Tissue culture, *in vitro* micropropagation, *Salvia chrysophylla*, shoot regeneration, endangered plants

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Dünyada hemen her kıtada yayılış gösteren *Salvia* cinsi, 58'i endemik olmak üzere 106 taksonla ülkemizin bitki zenginliği içerisinde önemli bir yer tutmaktadır. Ancak, 42 endemik *Salvia* taksonunun değişik tehlike kategorilerinde yer alması bilim camiasına önemli sorumluluklar yüklemektedir. Nesli tehlike altındaki türlerin korunmasında kullanılan yöntemlerden biri de doku kültürüdür. Dolayısıyla, bu tez ile doğada nesilleri tehlike altında bulunan endemik dört *Salvia* türünün doku kültürü yoluyla çoğaltım olanaklarının araştırılması hedeflenmiştir. Bu tez çalışmasına konu olan türler üzerinde yapılan herhangi bir doku kültürü çalışmasının olmaması da bu çalışmanın önemini arttırmaktadır.

Tez çalışmasının konusunun belirlenmesi ve yürütülmesinde bana yardımcı olan, Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı emekli öğretim üyelerinden değerli hocam Sayın Prof. Dr. Bilal GÜRBÜZ'e ve danışmanım Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Dilek BAŞALMA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum. Yine, çalışmalarım esnasında fikirleriyle bana yol gösteren Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN, Prof. Dr. Serkan URANBEY, Prof. Dr. Khalid Mamood KHAWAR ve Prof. Dr. Mustafa YILDIZ'a çok teşekkür ederim. Laboratuvar ve tarla çalışmalarımda fikirlerini aldığım ve yardımlarını gördüğüm Dr. Emine ANAYOL, Saber DELPASAND, Murat AYCAN, Mustafa KAYAN, Deniz KÖM, Ehsan Khadem ARABBAGHII ve Araş. Gör. Yasin ÖZGEN'e teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmamın yapıldığı dönemde bölümümüzde stajını yapan ve tezimin her aşamasında önemli yardımlarını gördüğüm Sueda ORAL'a ayrıca teşekkür ederim. Yine, Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalında bulunduğum 2011 yılından beri bana her konuda destek olan Ankara Üniversitesi Tarla Bitkileri Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Nilgün BAYRAKTAR ve Prof. Dr. Saime ÜNVER İKİNCİKARAKAYA'ya da çok teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımın yoğunluğu sebebiyle kendisini sürekli ihmal etmek zorunda kaldığım; buna rağmen bana daima anlayışıyla destek olan sevgili eşim Yasemin UYANIK'a ve bu günlere gelmemde üzerimde çok emeği bulunan anne ve babama da çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Hızlı Destek Programı (1002) kapsamında 115 O 084 proje numarasıyla ve “2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı” kapsamında TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

Mesut UYANIK

Ankara, Haziran 2017



İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	
ETİK.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	8
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	15
3.1 Materyal	15
3.1.1 Bitki materyali.....	15
3.2 Yöntem	18
3.2.1 Besin ortamı ve kültür koşulları	18
3.2.2 Kullanılan eksplant tipi	19
3.2.3 Tarladan alınan yeşil materyalin sterilizasyonu	19
3.2.4 Sürgün rejenerasyonu.....	20
3.2.5 Sürgünlerin köklendirilmesi ve aklimatizasyonu.....	20
3.2.6 Bitkilerin tarlaya şaşırtılması	21
3.2.7 Verilerin Değerlendirilmesi.....	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1 Kullanılan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu	22
4.2 Sürgün Rejenerasyonu	38
4.2.1 Farklı besin ortamlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi	38
4.2.1.1 Farklı besin ortamlarının <i>S. albimaculata</i> türünde sürgün rejenerasyonuna etkisi	38
4.2.1.2 Farklı ortamların <i>S. chrysophylla</i> türünde sürgün rejenerasyonuna etkisi	39
4.2.2 BAP-Kin-NAA'nın Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi.....	41
4.2.2.1 <i>S. albimaculata</i> türünde sürgün rejenerasyonu çalışmaları.....	42
4.2.2.2 <i>S. chrysophylla</i> türünde sürgün rejenerasyonu çalışmaları	43

4.2.2.3 <i>S. euphratica</i> var. <i>euphratica</i> türünde sürgün rejenerasyonu çalışmaları ...	49
4.2.2.4 <i>S. nydeggeri</i> türünde sürgün rejenerasyonu çalışmaları	51
4.3 Türler Üzerinde Hızlı Çoğaltım Çalışmaları	54
4.4 Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Aklimatizasyonu	58
4.4.1 <i>S. chrysophylla</i> türünün köklendirilmesi	58
5. SONUÇ	66
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	74



SİMGELER DİZİNİ

HgCl ₂	Civa klorür
HCl	Hidroklorikasit
NaOH	Sodyum hidroksid

Kısaltmalar

BAP	6-benzylaminopurine
B5	Gamborg's B5 Besin Ortamı
EBSS	Eksplant Başına Sürgün Sayısı
FN	Finer ve Nagasawa Besin Ortamı
gr, mg	gram, miligram
IBA	Indol-3-bütirik asit
IUCN	International Union for Conservation of Nature
Kin	Kinetin
KOEO	Kontamine olmayan eksplant oranı
L, ml, ml	Litre, mililitre, mikrolitre
MS	Murashige ve Skoog Besin Ortamı
N	Normalite
NAA	Naftalen asetik asit
NN	Nitsch ve Nitsch Besin Ortamı
PPM	PPM (Plant Preservative Mixture)
SB	Sürgün Boyu
SD	Serbestlik Derecesi
TDZ	Thidiazuran

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Tezde materyal olarak kullanılan <i>Salvia</i> türleri	15
Şekil 3.2 <i>S. albimaculata</i> 'nın dağılış gösterdiği alanlar	16
Şekil 3.3 <i>S. chrysophylla</i> 'nın dağılış gösterdiği alanlar.....	16
Şekil 3.4 <i>S. euphratica</i> var. <i>euphratica</i> 'nın dağılış gösterdiği alanlar.....	17
Şekil 3.5 <i>S. nydeggeri</i> 'nin dağılış gösterdiği alanlar.....	17
Şekil 4.1 Değişik sürelerde farklı PPM dozları uygulanan ve PPM içermeyen MS ortamına dikilen eksplantlardaki kontaminasyon durumu.....	24
Şekil 4.2 Değişik sürelerde farklı PPM dozları uygulanan ve PPM ilave edilen MS ortamın ortamda kültüre alınan eksplantlardaki kontaminasyon durumu.....	24
Şekil 4.3 Çamaşır suyu ile farklı sürelerde muamele edilip 1. ortamda kültüre alınan eksplantlardaki kontaminasyon durumu.....	28
Şekil 4.4 Çamaşır suyu ile farklı sürelerde muamele edilip 2. ortamda kültüre alınan eksplantlardaki kontaminasyon durumu.....	28
Şekil 4.5 Çamaşır suyu ile farklı sürelerde muamele edilip 3. ortamda kültüre alınan eksplantlardaki kontaminasyon durumu.....	29
Şekil 4.6 Çamaşır suyu ile farklı sürelerde muamele edilip 4. ortamda kültüre alınan eksplantlardaki kontaminasyon durumu.....	29
Şekil 4.7 Farklı dozlarda PPM ve % 0.1 HgCl ₂ ile muamele edilen ve farklı miktarlarda PPM ilave edilen ortamda kültüre alınan <i>S. albimaculata</i> ya ait koltukaltı eksplantları.....	33
Şekil 4.8 Farklı dozlardaki HgCl ₂ ile muamele edildikten sonra PPM içermeyen MS ortamında kültüre alınan <i>S. albimaculata</i> türüne ait koltukaltı eksplantları.....	34
Şekil 4.9 Farklı oranlarda HgCl ₂ ve çamaşır suyu-PPM kombinasyonu ile muamele edilen ve 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında kültüre alınan <i>S. chrysophylla</i> türüne ait koltukaltı eksplantları.....	36
Şekil 4.10 Farklı uygulamalara tabi tutulan ve 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında kültüre alınan <i>S. euphratica</i> var. <i>euphratica</i> 'ya ait koltukaltı eksplantları.....	37
Şekil 4.11 <i>S. albimaculata</i> türüne ait sürgün ucu eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave edilen MS, B5, FN ve NN ortamlarındaki rejenerasyon durumları.....	39
Şekil 4.12 <i>S. chrysophylla</i> türüne ait koltukaltı eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave MS, B5, FN ve NN ortamlarındaki rejenerasyon durumları.....	41
Şekil 4.13 <i>S. albimaculata</i> türüne ait koltukaltı ve sürgün ucu eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonu.....	43
Şekil 4.14 <i>S. chrysophylla</i> türünde koltukaltı eksplantından 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamından elde edilen sürgünler.....	44
Şekil 4.15 <i>S. chrysophylla</i> türünden elde edilen steril sürgünlerden izole edilen koltukaltı eksplantları ile 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında yapılan hızlı çoğaltım çalışması.....	44

Şekil 4.16 Farklı BAP ve Kin dozlarının <i>S. chrysophylla</i> türünde 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	48
Şekil 4.17 Farklı BAP, Kin ve 0.5 mg/L NAA dozlarının <i>S. chrysophylla</i> türünde 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	49
Şekil 4.18 <i>S. euphratica</i> var. <i>euphratica</i> türüne ait koltukaltı ve sürgün ucu eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamındaki rejenerasyonu.....	50
Şekil 4.19 Farklı BAP dozlarının <i>S. nydeggeri</i> türü için 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonuna etkisi.....	53
Şekil 4.20 <i>S. albimaculata</i> türünde elde edilen sürgünlerden izole edilen eksplantların hızlı çoğaltım için alt kültüre alındığı 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında ölmesi.....	54
Şekil 4.21 <i>S. euphratica</i> var. <i>euphratica</i> 'ya ait koltukaltı eksplantından 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında elde edilen sürgünler.....	55
Şekil 4.22 Elde edilen sürgünlerden izole edilerek farklı dozlarda PPM içeren MS ortamında kültüre alınan <i>S. euphratica</i> var. <i>euphratica</i> 'ya ait koltukaltı eksplantları.....	56
Şekil 4.23 <i>S. chrysophylla</i> türüne ait koltukaltı eksplantından 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında elde edilen sürgünler.....	57
Şekil 4.24 Rejenerasyon çalışmalarında elde olan <i>S. chrysophylla</i> türüne ait sürgünlerden izole edilen koltukaltı eksplantların 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında hızlı çoğaltımı.....	58
Şekil 4.25 Ortama ilave edilen PPM dozlarının <i>S. chrysophylla</i> türünde köklenme üzerine dolaylı etkisi	60
Şekil 4.26 <i>S. chrysophylla</i> türüne ait köklenmiş bir sürgün.....	60
Şekil 4.27 Köklendikten sonra 1:1 torf-perlit karışımında saksıya alınıp kontrollü iklim odasına alınan <i>S. chrysophylla</i> türüne ait bitkiler.....	62
Şekil 4.28 Saksıya aktarılan ve gelişmelerine devam eden <i>S. chrysophylla</i> türüne ait bitkiler.....	63
Şekil 4.29 Büyük saksılara alınan bitkiler (<i>S. chrysophylla</i>).....	63
Şekil 4.30 <i>S. chrysophylla</i> türünün tarlaya şaşırtılması.....	64
Şekil 4.31 Tarlaya şaşırtılan <i>S. chrysophylla</i> türüne ait bitkilerden iki ay sonraki görünüm.....	64
Şekil 4.32 Kıştan zarar görmeden çıkan ve baharda uyanan <i>S. chrysophylla</i> türüne ait bitkiler.....	65

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Türkiye’de yayılış gösteren <i>Salvia</i> taksonları ve tehlike kategorileri.....	2
Çizelge 1.2 International Union for Conservation of Nature" tarafından belirlenen tehlike kategorileri	6
Çizelge 3.1 Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve çözücüleri	18
Çizelge 4.1 Çamaşır suyu ile muamele edilip kültüre alınan eksplantların PPM içermeyen MS besin ortamındaki (1. ortam) KOEO değerlerine ilişkin varyans analizi.....	25
Çizelge 4.2 Çamaşır suyu ile muamele edilip kültüre alınan eksplantların MS + 2 ml/L PPM içeren besin ortamındaki (2. ortam) KOEO değerlerine ilişkin varyans analizi.....	25
Çizelge 4.3 Çamaşır suyu ile muamele edilip kültüre alınan eksplantların MS + 3 ml/L PPM içeren besin ortamındaki (3. ortam) KOEO değerlerine ilişkin varyans analizi.....	26
Çizelge 4.4 Çamaşır suyu ile muamele edilip kültüre alınan eksplantların MS + 4 ml/L PPM içeren besin ortamındaki (4. ortam) KOEO değerlerine ilişkin varyans analizi.....	26
Çizelge 4.5 PPM içeren ve içermeyen MS besin ortamlarında belirlenen KOEO’ya ilişkin ortalama değerler ve önemlilik grupları.....	27
Çizelge 4.6 Kullanılan besin ortamlarına ilişkin varyans analiz sonuçları.....	30
Çizelge 4.7 Kullanılan ortamlara ilişkin ortalama değerler ve önemlilik grupları.....	30
Çizelge 4.8 Farklı ortamların <i>S. albimaculata</i> türünde sürgün rejenerasyonu için incelenen karakterlerine ait varyans analiz sonuçları.....	38
Çizelge 4.9 <i>S. albimaculata</i> türünde farklı ortamlarda sürgün rejenerasyonu açısından elde edilen ortalama değerler ve önemlilik grupları.....	39
Çizelge 4.10 Farklı ortamların <i>S. chrysophylla</i> türünde sürgün rejenerasyonu açısından incelenen karakterlerine ait varyans analiz sonuçları.....	40
Çizelge 4.11 <i>S. chrysophylla</i> türünde farklı ortamlarda sürgün rejenerasyonu açısından elde edilen ortalama değerler ve önemlilik grupları.....	40
Çizelge 4.12 <i>S. albimaculata</i> türünde sürgün rejenerasyonuna ait karakterlere ilişkin ortalamalar.....	42
Çizelge 4.13 Farklı BAP+Kin dozlarında kültüre alınan <i>S. chrysophylla</i> türünün sürgün rejenerasyonuna ilişkin incelenen karakterlerine ait varyans analiz sonuçları.....	45
Çizelge 4.14 Farklı BAP+Kin+NAA dozlarında kültüre alınan <i>S. chrysophylla</i> türünün sürgün rejenerasyonuna ilişkin incelenen karakterlerine ait varyans analiz sonuçları.....	46
Çizelge 4.15 Farklı BAP+Kin dozlarının <i>S. chrysophylla</i> türünde sürgün rejenerasyonuna ilişkin bazı karakterlerine ait ortalama değerler ve önemlilik grupları.....	46

Çizelge 4.16 <i>S.euphratica</i> var. <i>euphratica</i> türünün farklı eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonuna ilişkin değerleri.....	50
Çizelge 4.17 Farklı BAP dozlarının <i>S. nydeggeri</i> türünde sürgün rejenerasyonu bakımından incelenen özelliklere ait varyans analiz sonuçları.....	51
Çizelge 4.18 Farklı BAP dozlarının <i>S. nydeggeri</i> türünde sürgün rejenerasyonu bakımından incelenen özelliklere ait ortalama değerleri ve önemlilik grupları.....	52
Çizelge 4.19 <i>S. chrysophylla</i> türüne ait sürgünlerin 2 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında köklenmelerine ilişkin veriler.....	61



1. GİRİŞ

Türkiye, iklim, toprak özellikleri ve yükselti bakımından farklılıklar gösteren coğrafi bölgelere sahip olması, Asya ve Avrupa kıtalarının kesişim noktasında bulunması, üç tarafının denizlerle çevrili olması, Avrupa-Sibirya, Akdeniz ve İran-Turan gibi üç önemli fitocoğrafik bölgeyi barındırması ve dünyanın en önemli üç ekolojik bölgesine sahip olmasından dolayı bitki çeşitliliği bakımından dünyada önemli bir yere sahiptir (Demirayak 2002, Avcı 2005). Nitekim son yapılan teşhislerin de eklenmesiyle birlikte Türkiye’de 3.649’u endemik olmak üzere 11.466 bitki taksonu yayılış göstermektedir (www.bizimbitkiler.org.tr 2017a). Türkiye’nin sahip olduğu bu bitki zenginliği içerisinde tıbbi ve aromatik bitkilerin ayrı bir yeri ve önemi vardır. Angiospermiler (Kapalı Tohumlular) içerisinde en büyük familyalardan biri olan ve dünyada 245 cinse ait 8.602 takson ile temsil edilen Lamiaceae familyası, ülkemizde Asteraceae (1693 takson) ve Fabaceae (1356 takson) familyalarından sonra takson zenginliği bakımından üçüncü büyük familyadır. Nitekim son teşhislerle birlikte Türkiye’de Lamiaceae familyasına ait 46 cinse bağlı 844 takson doğal yayılış göstermektedir (www.bizimbitkiler.org.tr 2017a, www.theplantlist.org 2017b).

Ballıbabagiller olarak da bilinen Lamiaceae familyası, genellikle tıpta ve parfümeride yaygın kullanım alanı bulan uçucu yağlar bakımından zengin olan *Rosmarinus*, *Mentha*, *Origanum*, *Thymus*, *Lavandula* ve *Melissa* vb. cinslerine ait türleri kapsamı bakımından önemli bir familyadır. Bu familya içerisinde takson sayısı ve kullanım alanı bakımından en önemli cinslerden biri de *Salvia*’dır. Nitekim *Salvia*, 126 tür ve tür altı taksonu bulunan *Stachys* cinsinden sonra, 106 takson (99 türe bağlı 8 alttür ve 6 varyete) ile Lamiaceae familyasının Türkiye’deki ikinci büyük cinsidir (www.bizimbitkiler.org.tr 2017a). Türkiye’de yayılış gösteren *Salvia* taksonları ve tehlike kategorileri çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1 Türkiye’de yayılış gösteren *Salvia* taksonları ve tehlike kategorileri (www.bizimbitkiler.org.tr 2017a)

Takson Adı	Endemizm Durumu	Tehlike Kategorisi
1- <i>Salvia absconditiflora</i>	Endemik	LC
2- <i>Salvia adenocaulon</i>	Endemik	EN
3- <i>Salvia adenophylla</i>	Endemik	VU
4- <i>Salvia aethiopis</i>		-
5- <i>Salvia albimaculata*</i>	Endemik	VU
6- <i>Salvia amplexicaulis</i>		-
7- <i>Salvia anatolica</i>	Endemik	-
8- <i>Salvia aramiensis</i>		-
9- <i>Salvia argentea</i>		-
10- <i>Salvia aristata</i>		-
11- <i>Salvia atropatana</i>		-
12- <i>Salvia aucheri</i>		
<i>Salvia aucheri subsp. aucheri</i>	Endemik	VU
<i>S. aucheri subsp. canescens</i>	Endemik	-
13- <i>Salvia aytachii</i>	Endemik	-
14- <i>Salvia ballsiana</i>	Endemik	DD
15- <i>Salvia blepharochlaena</i>	Endemik	NT
16- <i>Salvia brachyantha</i>		
<i>S. brachyantha subsp. brachyantha</i>		-
<i>S. brachyantha subsp. tankutiana</i>	Endemik	-
17- <i>Salvia bracteata</i>		-
18- <i>Salvia cadmica</i>		
<i>S. cadmica var. bozkiriensis</i>	Endemik	LC
<i>S. cadmica var. cadmica</i>	Endemik	LC
19- <i>Salvia caespitosa</i>	Endemik	LC
20- <i>Salvia candidissima</i>		
<i>S. candidissima subsp. candidissima</i>		-
<i>S. candidissima subsp. occidentalis</i>		-
21- <i>Salvia cassia</i>		-
22- <i>Salvia cedronella</i>	Endemik	VU
23- <i>Salvia ceratophylla</i>		-
24- <i>Salvia cerino-pruinosa</i>	Endemik	-
25- <i>Salvia chionantha</i>	Endemik	CD
26- <i>Salvia chrysophylla*</i>	Endemik	CD
27- <i>Salvia cilicica</i>	Endemik	VU
28- <i>Salvia cyanescens</i>	Endemik	LC
29- <i>Salvia dichroantha</i>	Endemik	LC
30- <i>Salvia divaricata</i>	Endemik	LC
31- <i>Salvia ekimiana</i>	Endemik	-
32- <i>Salvia eriophora</i>	Endemik	VU
33- <i>Salvia ertekinii</i>	Endemik	-

Çizelge 1.1 Türkiye’de yayılış gösteren *Salvia* taksonları ve tehlike kategorileri
(www.bizimbitkiler.org.tr 2017a) (devam)

34- <i>Salvia euphratica</i>		
<i>S. euphratica</i> var. <i>euphratica</i> *	Endemik	CD
<i>S. euphratica</i> var. <i>leiocalycina</i>	Endemik	-
35- <i>Salvia forskahlei</i>		-
36- <i>Salvia freyniana</i>	Endemik	DD
37- <i>Salvia frigida</i>		-
38- <i>Salvia fruticosa</i>		-
39- <i>Salvia glutinosa</i>		-
40- <i>Salvia halophila</i>	Endemik	VU
41- <i>Salvia haussknechtii</i>	Endemik	DD
42- <i>Salvia hedgeana</i>	Endemik	-
43- <i>Salvia heldreichiana</i>	Endemik	LC
44- <i>Salvia huberi</i>	Endemik	CD
45- <i>Salvia hydrangea</i>		-
46- <i>Salvia hypargeia</i>	Endemik	LC
47- <i>Salvia indica</i>		-
48- <i>Salvia kronenburgii</i>	Endemik	VU
49- <i>Salvia kurdica</i>		-
50- <i>Salvia limbata</i>		-
51- <i>Salvia longipedicellata</i>	Endemik	-
52- <i>Salvia macrochlamys</i>		-
53- <i>Salvia macrosiphon</i>		-
54- <i>Salvia marashica</i>	Endemik	-
55- <i>Salvia microstegia</i>		-
56- <i>Salvia modesta</i>	Endemik	VU
57- <i>Salvia montbretii</i>		-
58- <i>Salvia multicaulis</i>		-
59- <i>Salvia napifolia</i>		-
60- <i>Salvia nemorosa</i>		-
61- <i>Salvia nutans</i>		-
62- <i>Salvia nydeggeri</i>*	Endemik	EN
63- <i>Salvia odontochalmys</i>	Endemik	EN
64- <i>Salvia pachystachys</i>		-
65- <i>Salvia palaestina</i>		-
66- <i>Salvia pilifera</i>	Endemik	LC
67- <i>Salvia pinnata</i>		-
68- <i>Salvia pisidica</i>	Endemik	LC
69- <i>Salvia poculata</i>		-
70- <i>Salvia pomifera</i>		-
71- <i>Salvia potentillifolia</i>	Endemik	NT
72- <i>Salvia pseudeuphratica</i>	Endemik	-
73- <i>Salvia quezelii</i>	Endemik	EN

Çizelge 1.1 Türkiye’de yayılış gösteren *Salvia* taksonları ve tehlike kategorileri (www.bizimbitkiler.org.tr 2017a) (devam)

73- <i>Salvia quezelii</i>	Endemik	EN
74- <i>Salvia recognita</i>	Endemik	LC
75- <i>Salvia reeseana</i>	Endemik	VU
76- <i>Salvia rosifolia</i>	Endemik	LC
77- <i>Salvia russellii</i>		-
78- <i>Salvia sclarea</i>		-
79- <i>Salvia sericeotomentosa</i>		
<i>S. sericeotomentosa</i> var. <i>hatayica</i>	Endemik	-
<i>S. sericeotomentosa</i> var. <i>sericeotomentosa</i>	Endemik	-
80- <i>Salvia siirtica</i>	Endemik	-
81- <i>Salvia smyrnaea</i>	Endemik	EN
82- <i>Salvia spinosa</i>		-
83- <i>Salvia staminea</i>		-
84- <i>Salvia suffruticosa</i>		-
85- <i>Salvia syriaca</i>		-
86- <i>Salvia tchihatcheffii</i>	Endemik	CD
87- <i>Salvia tigrina</i>	Endemik	EN
88- <i>Salvia tobeyi</i>	Endemik	VU
89- <i>Salvia tomentosa</i>		-
90- <i>Salvia trichoclada</i>		-
91- <i>Salvia verbenaca</i>		-
92- <i>Salvia vermifolia</i>	Endemik	VU
93- <i>Salvia verticillata</i>		-
<i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i>		-
<i>S. verticillata</i> subsp. <i>verticillata</i>		-
94- <i>Salvia virgata</i>		-
95- <i>Salvia viridis</i>		-
96- <i>Salvia viscosa</i>		-
97- <i>Salvia wiedemannii</i>	Endemik	LC
98- <i>Salvia xanthocheila</i>		-
99- <i>Salvia yosgadensis</i>	Endemik	LC

*Tezde kullanılan *Salvia* taksonları

Halk arasında “adaçayı” olarak da bilinen *Salvia* türleri antibakteriyal, antifungal, antiviral, antiseptik, analjezik (ağrı kesici), antispazmodik, karminatif, antidiyabetik gibi tıbbi özelliklerinden dolayı eski devirlerden beri halk hekimliğinde kullanılmaktadır (Baytop 1984, Gürbüz vd. 2009). Hatta *Salvia* cinsi üzerinde yapılan çalışmalar, bu türlerdeki bazı kimyasal bileşiklerin DNA sentez hızını yavaşlattığını ortaya koyarak

kanser tedavisinde önemli bir gelişme kaydedilmiştir (Nakiboğlu 1993, Kandemir 2003). Dolayısıyla, “Salvia” adının da bu tıbbi etkilerinden dolayı latince “tedavi edici”, “kurtarıcı” anlamına gelen “Salveo” kelimesinden türetildiği belirtilmektedir (Nakiboğlu 1993). Bunun yanında *Salvia* türleri, hoş kokulu uçucu yağları nedeniyle kozmetik sanayiinde de geniş kullanım alanı bulmakta ve ayrıca uçucu yağlarının antioksidan etkisi sayesinde gıdaların raf ömrünü uzatmaktadır (Sallı 1998, Fu vd. 2013).

Salvia türleri sayılan bu önemleri nedeniyle kullanımı yanında güzel görünüşleri ve hoş kokulu olmalarından dolayı süs bitkisi olarak da kullanılmaktadır. Kırmızı renkli çiçekleriyle güzel bir görünümü olan *Salvia splendens* ile büyük pembe veya beyaz çiçekleriyle güzel kokusundan dolayı misk adaçayı olarak bilinen *Salvia sclarea*, bu amaçla en çok kullanılan *Salvia* türleridir (Nakiboğlu 1993). Yine, estetik ve dekoratif değerinin yüksek olması, hoş kokulu ve yer örtücü özelliği bulunmasından dolayı *Salvia wiedemannii* Boiss. park ve bahçe düzenlemelerinde süs bitkisi olarak kullanılabilir (Yücel ve Altınöz 2001).

Türkiye’de *Salvia* cinsinin bazı türleri (*S. cryptantha*, *S. fruticosa*, *S. multicaulis*, *S. sclarea* ve *S. tomentosa*) doğadan toplanarak ihracatı yapılmak suretiyle ülkemiz için ekonomik önem taşımaktadır (Özhatay vd. 1997, İpek 2007). Türkiye’nin doğal türü olmamakla birlikte, ekolojisinde oldukça iyi gelişen *S. officinalis* Türkiye’de en çok yetiştirilen türdür. Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) kayıtlarına bakıldığında da, adaçayı tarımının son 5 yılda önemli oranda arttığı görülmektedir. Nitekim 2012 yılında ülkemizde adaçayı ekim alanı 54 dekar iken 2016 yılında bu rakam 3.6817 dekara yükselmiştir. Yine, ekim alanına paralel olarak 2012 yılındaki 7 ton olan adaçayı üretimi, 2016 yılında 411 tona ulaşmıştır. Adaçayı ekim alanı ve üretimindeki bu artışta devletin tıbbi ve aromatik bitkiler tarımına olan desteği en büyük etken olmuştur. Zira 2012 yılında sadece Karaman ilinde adaçayı tarımı yapılırken, devletin bu teşvikleriyle 2016 yılında 8 ilde (Tekirdağ, İzmir, Denizli, Muğla, Eskişehir, Karaman ve Antalya) adaçayı tarımının yapıldığı görülmektedir (www.tuik.gov.tr 2017c)).

Dünyada bulunan bitki türlerinin, özellikle dar ve sınırlı yayılışa sahip endemik türlerin korunması için son yıllarda uluslararası alanda çok ciddi çalışmalar yapılmaktadır. Dolayısıyla, türlerin öncelikle uluslararası tehlike sınıflarından hangisinde yer aldığı belirlenmekte ve baskı altında olan, neslinin tükenmesi tehdidi olanlara öncelik verilmektedir. Bu hususta "*International Union for Conservation of Nature (IUCN-Uluslararası Doğayı Koruma Birliği)*" tarafından tehlike kategorileri belirlenmiş ve her ülke sahip olduğu türlerini korumak için bu kategorilere göre sınıflandırmıştır (Çizelge 1. 2). Nitekim ülkemizde 2000 yılında "Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı" yayınlanmış ve tehdit altındaki bitkiler ve tehlike kategorileri verilmiştir (Ekim vd. 2000). Bu değerli çalışma, Cumhurbaşkanlığı tarafından 2009 yılında başlatılan ve ülkemizin bitki türü zenginliğini yeniden ele almayı hedefleyen proje kapsamında güncellenmiş olup, son rakamlara göre ülkemizde 2221 bitki taksonunun değişik tehlike kategorilerinde yer aldığı tespit edilmiştir (www.bizimbitkiler.org.tr 2017a).

Çizelge 1.2 IUCN tarafından belirlenen tehlike kategorileri (Ekim vd. 2000)

Kategori Adı	İngilizce Adı	Türkçe Adı
EX	Extinct	Nesli Tükenmiş
EW	Extinct in the wild	Doğada nesli tükenmiş
CR	Critically Endangered	Kritik
EN	Endangered	Tehlikede
VU	Vulnerable	Zarar görebilir
CD	Conservation Dependent	Koruma önlemi gerektiren
NT	Near Threatened	Tehlike altına girebilir
LC	Least Concern	Az endişe verici
DD	Data Deficient	Yetersiz Veri
NE	Not Evaluated	Değerlendirilemeyen

Çizelge 1.2’de IUCN tarafından belirlenen tehlike kategorileri verilmiştir. Buna göre, bir taksonun son bireyi de doğada yok olmuşsa o taksonun nesli tükenmiştir ve EX kategorisine alınır. Bir taksonun doğada nesli tükenmiş; fakat kültür ortamında devamı

sağlanıyorsa o takson da EW kategorisine dâhil edilir. Bir taksonun nesli tükenmemiş; ancak son 10 yıl içerisinde popülasyonunun % 80'inin yok olma riski varsa o takson CR kategorisine; son 10 yıl içinde % 50'sinin yok olma riski varsa EN kategorisine ve son 10 yıl içerisinde % 20'sinin yok olma riski varsa VU kategorisine dâhil edilmektedir. Bir takson son 5 yıl içerisinde yukarıdaki kategorilerden birine girmeye aday ise CD kategorisine alınır. Kritik, tehlikede veya duyarlı sınıflarına girmeyen; fakat bu ölçütleri karşılamaya yakın olan veya yakın gelecekte tehdit altında olarak tanımlanma olasılığı olan bir takson ise tehlide açık olarak sınıflandırılır ve NT kategorisine alınır. Bu ölçütlere göre değerlendirildiğinde kritik, tehlikede veya duyarlı sınıflarına girmeyen bir takson da düşük riskli olarak sınıflandırılır ve LC kategorisine alınırken, yeterli veri bulunamadığı için tehlike durumu belirlenemeyen taksonlar ise DD kategorisinde yer alırlar (Ekim vd. 2000).

Dolayısıyla, ülkemizde 58'i endemik olmak üzere 106 taksonu yayılış gösteren *Salvia* cinsinin tehlike kategorisine bakıldığında, 42 taksonun değişik tehlike kategorilerinde olduğu görülmektedir (Çizelge 1.1). Nitekim bu taksonlardan 6'sı EN, 12'si VU, 5'i CD, 14'ü LC, 2'si NT ve 3'ü DD kategorilerinde bulunmaktadırlar (www.bizimbitkiler.org.tr 2017a). Ayrıca, tehlike altındaki bu 42 *Salvia* taksonunun tamamının ülkemize endemik olduğu; dolayısıyla da nesillerinin tükenmesi halinde dünya üzerinde yok olacağı göz önüne alındığında, korunmaları büyük önem taşımaktadır.

Doku kültürü, çeşitli nedenlerden dolayı (dormansi, embriyonun gelişmemesi vb.) tohumla çoğaltılmasında sorunlar yaşanan bitkilerin çoğaltımı, ticari değeri yüksek olan türlerin hızlı çoğaltımı ve nesli tehlike altında bulunan türlerin çoğaltımı için başvurulan önemli bir yöntemdir. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında Türkiye'de önemli takson zenginliği ile yüksek endemizm oranına (% 54.7) sahip olan ve bundan dolayı da önemli gen kaynağı durumundaki *Salvia* cinsine ait değişik tehlike kategorilerinde (EN, VU ve CD) bulunan ve klasik yollarla (tohumla ve çelikle) çoğaltmada problemler yaşanan dört endemik *Salvia* türünün [(*S. albimaculata* (VU), *S. chrysophylla* (CD), *S. euphratica* var. *euphratica* (CD) ve *S. nydeggeri* (EN)] doku kültürü ile çoğaltım olanaklarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Pek çok alanda kullanımı ve öneminden dolayı *Salvia* cinsi üzerinde yapılan çalışmaların sayısı her geçen gün artmaktadır. Yapılan literatür taramalarında teze konu olan *Salvia* türleri üzerinde yapılmış herhangi bir doku kültürü çalışmasına rastlanamamıştır. Dolayısıyla bu bölümde, diğer *Salvia* türleri üzerinde yapılan doku kültürü çalışmaları tarih sırasına göre verilmiştir.

Hosoki ve Tahara (1993), süs amacıyla yetiştirilen *Salvia leucantha*'nın doku kültürüyle hızlı çoğaltımı üzerinde yaptıkları çalışmada, sürgün ucu ve koltuk altı eksplantını farklı N6-bensyladenine (BA) dozlarında (0, 0.1 ve 1 mg/L) kültüre almışlar ve BA dozlarının artmasına bağlı olarak sürgün sayısının da arttığını tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, BA miktarına bağlı olarak sürgün sayısının artmasının yanında, sürgün boyunun kısaldığını ve eksplantlardaki ölüm oranının da arttığını gözlemlemişlerdir. Dolayısıyla, 1 mg/L BA dozunun fazla sürgün sayısı oluşturmaya rağmen, sürgünün canlılığını etkilediği için tavsiye edilemeyeceğini rapor etmişlerdir.

Mederos-Molina vd. (1997) *Salvia canariensis* üzerinde yaptıkları çalışmada MS+825 mg/L NH₄NO₃ şeklinde modifiye edilmiş ortamda 10⁷ M BAP ve 10⁷ M NAA hormon kombinasyonunda en iyi sürgün gelişimi tespit etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, BAP ve NAA dozlarının artmasıyla sürgün oluşumunun yavaşladığını belirlemişlerdir.

Niedz ve Bausher (1998, 2002) *in vivo* gelişen materyalden izole edilen eksplantlardaki kontaminasyonun giderilmesi üzerine çalışmışlar ve besin ortamına ilave edilen Plant Preservative Mixture (PPM)'in kontaminasyonu önemli oranda önlediğini belirlemişlerdir. Özellikle besin ortamına ilave edilen 5 ml/L PPM dozunun, eksplantlardaki kontaminasyonu % 63 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Kintzios vd. (1999), *Salvia officinalis* ve *Salvia fruticosa* türleri üzerinde yaptıkları çalışmada, kallus oluşumunun genotip, büyüme düzenleyicileri ve kültür koşullarından önemli oranda etkilendiğini belirlemişlerdir. Özellikle genotipler arasında önemli

farklılıklar olduğunu ve dolayısıyla *Salvia fruticosa*'nın kallus oluşum yüzdesinin *Salvia officinalis*'e göre daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

Huang ve Staden (2002), *Salvia chamelaeagnea* türü üzerinde yaptıkları doku kültürü çalışmasında yaprak, boğum ve boğum arası eksplantlarını kullanmışlardır. Araştırmacılar, MS besin ortamına 1-2 mg/L 2,4-D ilavesiyle eksplantlardan başarılı bir şekilde kallus oluştuğunu; aynı ortama 1 mg/L BA ilave edilmesiyle de sürgün oluşumunun gözlemlendiğini rapor etmişlerdir.

Arikat vd. (2004), ülkemizde “Anadolu adaçayı” olarak bilinen *Salvia fruticosa*'nın mikroçoğaltımı üzerine farklı besin ortamı (MS, NN ve B5) ve büyüme düzenleyicilerinin (BA, Kin, TDZ) etkisini araştırmışlardır. Eksplant olarak koltuk altı ve sürgün uçlarının kullanıldığı çalışmada araştırmacılar, en fazla sürgün sayısını MS ortamında ve 0.75 µM dozunda elde etmişlerdir. Ayrıca, araştırmacılar oluşan sürgünleri köklenme açısından değişik hormonlarda (IBA, IAA ve NAA) denemişler ve 2.7 µM IBA'nın en iyi köklenmeyi sağladığını tespit etmişlerdir. Bunun yanında araştırmacılar, *in vitro* ve *in vivo* koşullardaki *Salvia fruticosa*'nın uçucu yağ bileşenlerini de incelemişler ve α-pinene, 1.8-cineole, camphor ve borneol'ün temel bileşen olduğunu; ancak bu bileşenlerin *in vitro* koşullardaki bitkilerde daha fazla oranda bulduklarını belirlemişlerdir.

Skala ve Wysokinska (2004), *Salvia nemorosa* türünden sürgün ucu ve yaprakların rejenerasyonu üzerine değişik hormonların etkisini inceledikleri çalışmalarında, sürgün ucu eksplantı için 8.9 µM BA ile 2.9 µM IAA kombinasyonunda; yaprak eksplantı için ise 0.9 µM BA ile 2.9 µM IAA kombinasyonunda iyi sürgün gelişimi görüldüğünü tespit etmişlerdir.

Mederos-Molina (2004) tarafından yapılan bir başka çalışmada, *Salvia canariensis* üzerinde petiol ve gövde eksplantları kullanılmış ve MS ile B5 ortamlarında değişik hormonların kallus oluşumuna etkisi incelenmiştir. Bu araştırmadan elde edilen sonuçlara göre ise, 8.88 µM BAP ve 21.48 µM NAA kombinasyonunda kallus oluşum frekansının en yüksek olduğu tespit edilmiş ve kallus açısından MS ortamı önerilmiştir.

Yine bir başka çalışmada **Mederos-Molina (2006)**, *Salvia broussonetii* için düşük dozlarda 6-Benzylaminopurine (BAP) hormonunun gerekliliğini vurgulamıştır. Ayrıca araştırmacı, ortama ilave ettiği 15 mM NH₄NO₃ ün eksplantlardaki ölüm oranını azalttığını da tespit etmiştir.

Mascarello vd. (2006), bazı *Salvia* türleri üzerinde yaptıkları doku kültürü çalışmasında, mikroçoğaltım için kinetinin yeterli olmadığını ve *Salvia* türlerinin düşük BA dozlarında daha iyi geliştiğini rapor etmişlerdir.

Misic vd. (2006) tarafından *Salvia brachyodon*'a ait koltukaltı eksplantları kullanılarak yapılan çalışmada BAP ve TDZ'nin sürgün rejenerasyonu üzerine etkisi incelenmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, artan BAP ve TDZ dozlarına bağlı olarak sürgün rejenerasyonunda artışlar tespit edilmiş; ancak sürgün oluşumunda BAP hormonun daha etkili olduğu ve TDZ'nin sürgün boyunu olumsuz etkilediği belirlenmiştir.

Tawfik ve Mohamed (2007), *Salvia officinalis* türünde kallustan sürgün gelişimini çalışmışlar ve en yüksek sürgün sayısını 4.4 veya 8.8 µM BA içeren ortamdan elde etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, oluşan bu sürgünlerin 4.9 µM IBA içeren ortamda köklendiğini belirlemişlerdir.

Skala vd. (2007), *Salvia przewalskii* türü üzerinde yaptıkları çalışmada BAP ve TDZ'nin yüksek dozlarında sürgün sayısının önemli oranda azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, kinetin varlığında sürgün boylarında önemli oranda uzama görüldüğünü; ancak sürgün sayısında BAP ve TDZ'ye göre azalma olduğunu rapor etmişlerdir.

Irina (2008), benzer olarak *Salvia officinalis* türü üzerinde farklı oksin (NAA ve IBA) ve sitokininlerin (BAP, KIN) sürgün rejenerasyonu üzerine olan etkisini belirlemek için yaptığı çalışmada, sürgün gelişimi için ortamda BAP hormonunun gerekli olduğunu ve en iyi sürgün gelişiminin 2.22 µM BAP dozunda gerçekleştiğini rapor etmiştir.

Bueno vd. (2010), *Salvia hispanica*'da kullanılan eksplantlar (genç yapraklar, kotiledonlar ve koltukaltı) ve büyüme düzenleyicileri arasında sürgün oluşumu açısından farklılıklar gözlemlenmiştir. Yapraklar ve kotiledonlarda rejenerasyon olmadığını; en yüksek rejenerasyon oranının ise nodal eksplantlardan elde edildiğini tespit etmişlerdir. Kullanılan hormonlar açısından ise araştırmacılar, BA'nın yüksek dozlarında sürgün oluşumunun arttığını belirlemişlerdir.

Marconi Patricia vd. (2013), *Salvia hispanica* türünde kallus üretimi amacıyla yaptıkları çalışmada, başlangıç materyali olarak tohumları kullanmışlardır. Elde edilen steril fidelerden izole edilen gövde kısımlarının kallus üretimi için en uygun eksplant olduğunu tespit eden araştırmacılar, 2.25 µM 2,4-D ilaveli MS ortamının kallus üretiminde en iyi ortam olduğunu bildirmişlerdir.

Jan ve Khatoon (2014) *Salvia santolinifolia*'nın *in vitro* çoğaltımı üzerine yaptıkları çalışmada, farklı sitokinlerin (BA, 2ip ve Kin) sürgün rejenerasyonuna etkilerini incelemişlerdir. BA dozlarında kinetin ve 2ip'e daha fazla sayıda sürgün elde edildiğini ve kinetin etkisi altında sürgün oluşumunun geciktiğini ve sürgün boylarının daha kısa olduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca araştırmacılar, IBA, NAA ve IAA hormonlarının köklenme üzerine olan etkisini de araştırmışlar ve en fazla köklenme oranını 2.5 mg/L IBA uygulamasında tespit etmişlerdir.

Lemraski vd. (2014), büyüme düzenleyicilerinin (BAP ve NAA) *Salvia officinalis*'te kallus oluşumu üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında eksplant olarak, tohumlardan gelişen kökleri kullanmışlar ve 4 mg/L BAP ve 3 mg/L NAA dozunun kallus oluşumu açısından en uygun kombinasyon olduğunu tespit etmişlerdir.

Sharma vd. (2014) tarafından *Salvia splendens* üzerinde yapılan doku kültürü çalışmasında ise nodal eksplant ile sürgün ucu eksplantı karşılaştırılmış ve bu eksplantlar değişik hormonların etkisinde incelenmiştir. Araştırma sonucuna göre ise, sürgün gelişimi bakımından nodal eksplantlar daha ön plana çıkmıştır. Ayrıca araştırmacılar, her iki eksplantta da sürgün sayısı bakımından BAP'ın kullanılan Kin, 2-ip ve TDZ'ye göre daha etkili olduğunu belirlemişlerdir.

Zayova vd. (2016) *Salvia hispanica* türü için *in vitro*, *in vivo* ve *ex vitro* bitkileri karşılaştırmışlardır. Başlangıç materyali olarak tohumların kullanıldığı çalışmada, tohumlardan elde edilen steril fidelerden sürgün ucu eksplantları izole edilip farklı BAP, Zeatin, TDZ, 2-ip dozlarında MS ortamında kültüre alınmışlardır. Ortama ilave edilen sitokininlerin sürgün oluşumunu hızlandırdığının belirlendiği bu çalışmada, 2 mg/L BAP ilaveli ortamda en fazla sürgün sayısı (2.7 adet) ve en uzun sürgün boyu (1.4 cm) tespit edilmiştir. Bunun yanında ortama TDZ ve 2-ip ilavesi bitki gelişimini olumlu etkilerken, sürgün oluşumunda önemli etki yapmamıştır. Elde edilen sürgünler ise, 0.1 mg/L IBA ilaveli ½ MS ortamında kolaylıkla köklenebilmiştir. Ayrıca araştırmacılar *ex vitro* ile *in vivo* bitkileri morfolojik özellikler bakımından karşılaştırmışlar ve incelenen karakterler (bitki boyu, dal sayısı, bitkide yaprak sayısı ve yaprak boyutu) bakımından çoğaltım metoduna göre farklılıklar belirlemişlerdir. Nitekim *ex vitro* bitkilerin *in vivo* bitkilere göre daha hızlı gelişme gösterdiğini belirlemişler ve *ex vitro* bitkilerde daha geniş yaprak ve daha kalın gövde oluştuğunu tespit edilmiştir.

Doku kültürü, endemik ve tehlike altındaki türlerin korunması ve ekonomik öneme sahip türlerin hızlı çoğaltımı açısından yaygın olarak başvurulan yöntemlerden birisidir. Dolayısıyla, diğer türler üzerinde ülkemizde bu konuda yapılmış tez çalışmaları ve projeler mevcut olup, aşağıda tarih sırasına göre verilmiştir.

Çakırlar vd. (1994), ülkemizde ticari değeri olan *Galanthus* türleri (*G. elwesii* ve *G. ikariae*)'nin doku kültürü ile çoğaltımı üzerinde çalışmışlardır. Çalışmada soğan, yaprak ve çiçek sapları eksplant olarak kullanılmış ve eksplantlar MS ve Gamborg B5 ortamında kültüre alınmıştır. Araştırmacılar, Gamborg B5 ortamının soğancık oluşumunu önemli derecede arttırdığını belirlemişlerdir.

Mirici vd. (2008), ülkemizde farklı tehlike kategorilerinde bulunan endemik bazı soğanlı türlerin [*Iris stenophylla* (CR), *Muscari mirum* (EN), *Galanthus peshmenii* (EN) ve *Bellevalia tauri* (CD)] korunmasına yönelik alternatif çoğaltma yöntemi olarak doku kültürü üzerinde çalışmışlardır. Doğadan toplanan bitkilerden izole edilen yaprak, sap, soğan ve olgunlaşmamış embriyo kısımları eksplant olarak kullanılmış olup, bu eksplantlar farklı oksin ve sitokinin içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. Soğan

ve olgunlaşmamış embriyo *Galanthus peshmenii* dışında, çalışılan diğer türlerde en iyi sonuç veren eksplant tipi olarak belirlenmiştir. *Galanthus peshmenii* bitkisinde ise yalnızca olgunlaşmamış embriyo eksplantı soğancık üretimi için uygun bulunmuştur.

Benzer olarak, **Uranbey vd. (2009)** ülkemizde tehlike altındaki endemik *Muscari azureum* ve *Muscari aucheri* türlerinin doku kültürü yoluyla çoğaltımını araştırmışlardır. Soğan pul yaprakları ve olgunlaşmamış embriyolar eksplant olarak kullanılmış ve değişik hormonlarda MS ortamında kültüre almışlardır. Araştırma sonuçlarına göre, her iki eksplant için *Muscari aucheri* türünden en fazla soğancık elde edilmiştir.

Erişen vd. (2009), bazı endemik *Astragalus* türlerinin (*A. antalyensis*, *A. cariensis*, *A. nezaketae*, *A. schizopterus*) korunması amacıyla yaptıkları doku kültürü çalışmasında *A. cariensis* türü için sürgün rejenerasyonu bakımından en iyi sonucun (23 adet/kallus) 4 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında kültüre alınan yaprak eksplantından alındığını bildirmişlerdir. *A. nezaketae*'de de yine yaprak eksplantı aynı ortamda kallus başına 6 adet sürgün ile en iyi sonucu vermiş olup, oluşan sürgünler için en ideal köklenme ortamının ise 0.5 mg/L IBA içeren MS ortamı olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında araştırmacılar, *A. schizopterus*' un rejenerasyona en az tepki veren tür olduğunu bildirmişlerdir.

Erdoğan (2010) tarafından ülkemizde endemik ve tehlike altındaki *Silene sangaria*'nın *in vitro* çoğaltımı üzerine yapılan çalışmada başlangıç materyali olarak tohumlar kullanılmış ve 3 mg/L GA₃ içeren MS ortamında en yüksek çimlenme oranı tespit edilmiştir. Elde edilen *in vitro* fidelerden alınan gövde, yaprak ve koltukaltı eksplantları değişik dozlarda (0.5, 1 ve 3 mg/L) NAA, BA ve 2,4-D içeren MS ortamlarına transfer edilmiş ve 1 mg/L NAA içeren MS besin ortamında koltukaltı ve gövde eksplantlarından en yüksek oranda (%100) kallus oluştuğu belirlenmiştir. Çalışmanın devamında, koltukaltı eksplantından elde edilen kalluslardan en yüksek oranda (% 66) sürgün oluşumu tespit edilmiş olup, 0.5 mg/L NAA içeren MS ortamında bu sürgünlerin % 100 oranında köklendikleri belirlenmiştir. Köklenen bu sürgünler de başarılı bir şekilde toprağa aktarılabilmektedir.

Ülkemizde cins bazında endemik ve tehlike altında bulunan *Neotchihatchewia isatidea*'nın *in vitro* hızlı çoğaltımı üzerinde çalışan **Gümüüşü vd. (2011)**, hipokotil, kotiledon, yaprak diskleri, kotiledon boğum, olgun ve olgunlaşmamış embriyo gibi farklı eksplantları değişik kombinasyonlarda BAP, TDZ, Kinetin ve IAA içeren MS ortamlarında kültüre almışlardır. Araştırmacılar yaptıkları bu denemelerde eksplant başına en fazla sürgün sayısının (12.0 adet) 2 mg/l BAP, 0.1 mg/l TDZ ve 0.50 mg/l IAA kombinasyonunda hipokotil eksplantlarından elde edildiğini belirlemişlerdir. Oluşan sürgünlerin 1 mg/L NAA içeren ½ MS ortamında başarıyla köklendiği de araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir.

Uçar Türker ve Birinci Yıldırım (2013), endemik bir tür olan *Convolvulus galaticus*'un doku kültürü çoğaltım potansiyelini inceledikleri çalışmalarında, eksplant olarak *in vivo* bitkilerden izole ettikleri yaprak, gövde ve kotukaltı eksplantlarını MS ortamında kültüre almışlar ve sadece koltukaltı eksplantında sürgün oluşumu tespit etmişlerdir. En fazla sürgün sayısının TDZ:IAA ve BA:IAA kombinasyonlarında oluştuğunu belirten araştırmacılar, oluşan bu sürgünlerden 1 mg/L IBA uygulamasında en fazla kök sayısı tespit etmişlerdir.

Atalay ve Erişen (2014) tarafından yapılan çalışmada, kritik endemik *Centaurea lycaonica* türünün *in vitro* çoğaltım potansiyeli araştırılmış ve yaprak eksplantları, farklı hormonlar (BAP, TDZ, Kin, NAA, Dicamba, Picloram, IBA, IAA, 2,4-D) içeren MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Yapılan denemelerde 0.5 mg/L BAP x 0.2 mg/L NAA kombinasyonunda en yüksek sürgün sayısı (32.27 adet) elde edilirken, Kin içeren ortamlarda eksplantların öldüğü gözlenmiştir. Oluşan sürgünlerden izole edilen nodal segmentler 0.5 mg/L BAP içeren MS ortamında 8.73 adet ile en yüksek sürgün sayısını vermiştir. Elde edilen sürgünlerin köklenmesi açısından ise 2.0 mg/L IAA içeren MS ortamının en uygun olduğu tespit edilmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Bitki materyali

Bu tez çalışmasında materyal olarak, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü tıbbi bitkiler çeşit bahçesinde muhafaza edilen, ülkemizde değişik tehlike kategorilerinde (EN, VU ve CD) bulunan dört endemik *Salvia* türü [(*S. albimaculata* (VU), *S. chrysophylla* (CD), *S. euphratica* var. *euphratica* (CD) ve *S. nydeggeri* (EN)] kullanılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Tezde materyal olarak kullanılan *Salvia* türleri (Orijinal)

- a. *S. albimaculata* Hedge&Hub-Mor.,
- b. *S. chrysophylla* Stapf
- c. *S. euphratica* var. *euphratica* Montbret&Aucher
- d. *S. nydeggeri* Hub-Mor.

Materyal olarak kullanılan bu türlerin endemik olarak dağılış gösterdiği alanlar şğıdaki haritalarda gösterilmiştir.



Şekil 3.2 *S. albimaculata*'nın dağılış gösterdiği alanlar



Şekil 3.3 *S. chrysophylla*'nın dağılış gösterdiği alanlar



Şekil 3.4 *S. euphratica* var. *euphratica*'nın dağılış gösterdiği alanlar



Şekil 3.5 *S. nydeggeri*'nin dağılış gösterdiği alanlar

3.2 Yöntem

Tez kapsamındaki tüm çalışmalar Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümüne ait biyoteknoloji laboratuvarı (TARBİYOTEK) ve deneme tarlalarında yürütülmüştür.

3.2.1 Besin ortamı ve kültür koşulları

Denemelerde besin ortamı olarak, % 2 sukroz içeren ve % 0.65'lik agar (Type A, Sigma) ile katılaştırılan Gamborg's B5 (Gamborg vd. 1968) ve FN (Finer ve Nagasawa, 1988) ile % 3 sukroz içeren ve % 0.65'lik agar (Type A) ile katılaştırılan MS (Murashige ve Skoog, 1962) ve NN (Nitsch ve Nitsch, 1969) besin ortamları kullanılmıştır. Yapılan tüm çalışmalarda kontaminasyonu (bakteriyel, fungal, endogen) önlemek amacıyla, kullanılan besin ortamlarına PPM ilavesi yapılmıştır.

Ortam hazırlığında distile saf su kullanılmış ve besin ortamının pH'sı 1 N NaOH ya da 1 N HCl kullanılarak 5.6-5.8'e ayarlandıktan sonra 1.2 atmosfer basınç altında ve 120 °C'de 20 dk tutularak sterilizasyon sağlanmıştır. Denemeler en az 5 tekerrürlü olarak yapılmış ve her kültür kabına 5 veya 10 eksplant yerleştirilmiştir. Tüm kültürler beyaz floresan ışığı ($35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 24 ± 1 °C'de tutulmuştur.

Denemelerde kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri 1 N NaOH ile çözülerek stok solüsyonlar hazırlanmış ve milipor filtre ile steril edilerek ortamlara belirlenen miktarlarda ilave edilmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Kullanılan bitki büyüme düzenleyicileri ve çözücüleri

Büyüme Düzenleyici	Çözücü Madde
BAP (6-benzilaminopürin)	1 N NaOH
Kin (Kinetin)	1 N NaOH
NAA (Naftaleneasetik Asit)	1 N NaOH

3.2.2 Kullanılan eksplant tipi

Teze konu olan *in vivo* olarak gelişen bitkilerden değişik eksplantlar (yaprak, koltukaltı ve sürgün ucu) izole edilmiş ve MS besin ortamında kültüre alınmışlardır. Ancak, yaprak eksplantında rejenerasyon görülmezken, rejenerasyon sağlanan sürgün ucu ve koltukaltı eksplantları ile çalışmalara devam edilmiştir. Bunun yanında, *S. nydeggeri* türünde sadece sürgün ucu eksplantında sterilizasyon sağlanabildiği için, bu türdeki tüm çalışmalarda sadece sürgün ucu eksplantı kullanılmıştır.

3.2.3 Tarladan alınan yeşil materyalin sterilizasyonu

Bu tez çalışmasında kullanılan *Salvia* türlerinin tohumlarında önemli oranda çimlenme problemi görüldüğü için başlangıç materyali olarak tohumlar yerine, tarladaki yeşil bitkilerden izole edilen eksplantlar kullanılmıştır. Dolayısıyla da, bitkinin taze kısmıyla çalışıldığı için kullanılacak dezenfektanın uygulama dozu ve süresinin bu yeşil materyale zarar vermemesi büyük önem taşımaktadır.

Teze konu olan türlerin tarlada sayıca az olmasından dolayı, çalışmanın diğer aşamalarında materyal temininde problemler yaşanmaması için sterilizasyon denemeleri, bölümümüz deneme arazisinde bol miktarda bulunan *S. officinalis* türü üzerinde yapılmıştır. Bunun için, *in vivo* bitkilerden izole edilen koltukaltı eksplantları, % 70 etanol, civa klorür ($HgCl_2$) (w/v), % 5 sodyum hipoklorit içeren ticari çamaşır suyu (NaOCl), Plant Prezervative Mixture (PPM™ - Plant Cell Technology) ve Tween 20 gibi değişik dezenfektanların farklı dozlarıyla muamele edilerek PPM™ ilave edilen ve edilmeyen MS besin ortamlarında kültüre alınmış ve 2 hafta sonra kontamine olmamış eksplant oranı (KOEO) belirlenmiştir.

Şüphesiz ki, sterilizasyon protokolü, kullanılan eksplantın tipine, üzerinde çalışılan bitki türüne ve hatta aynı tür içinde çeşitten çeşide göre değişebilmektedir. Dolayısıyla, *Salvia officinalis* üzerinde belirlenen sterilizasyon metodu bazı modifikasyonlardan sonra teze konu olan türlere uygulanmıştır.

3.2.4 Sürgün rejenerasyonu

Öncelikle teze konu olan türler için en uygun besin ortamını belirlemek için türler MS, B5, FN ve NN ortamlarında 6 hafta boyunca kültüre alınmıştır. Bu denemenin sonucunda, *in vivo* türlerden izole edilen eksplantlar, en iyi gelişim gösterdikleri MS besin ortamında, farklı 6-benzylaminopurine- BAP (0, 1 ve 2 mg/L), Kinetin (0, 1 ve 2 mg/L) ve Naphthalene acetic acid-NAA (0, 0.5 mg/L) dozlarında 6 hafta süreyle kültüre alınmıştır.

Denemeler 5 tekerrürlü yapılmış olup, her kültür kabına 5'er eksplant yerleştirilmiştir. Denemeler sonucunda rejenerasyon oranı (RO), eksplant başına sürgün sayısı (EBSS) ve sürgün boyu (SB) belirlenmiştir.

3.2.5 Sürgünlerin köklendirilmesi ve aklimatizasyonu

Rejenerasyon çalışmaları sonucunda elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi için kullanılan MS ortamına kontaminasyon riskine karşı ilave edilen PPM dozları, sürgünlerin köklenmesi üzerine dolaylı yoldan olumlu etki yapmıştır. Bu durumun tespit edilmesi üzerine sürgünler PPM ilaveli MS ortamında köklendirilmiştir. Köklenen sürgünler daha sonra 1:1 oranında perlit ve torf içeren küçük saksılara aktarılıp, henüz dış şartlara alışmamış bitkiciklerin nem kaybını önlemek amacıyla saksının üzerine şeffaf naylon poşet geçirilerek kontrollü şartlarda (16 saat aydınlık, % 65 nem, 24±1 °C sıcaklık) tutulmuştur. Poşetler üzerinde 4-5 günlük aralıklarla küçük delikler açılarak nem oranı yavaş yavaş azaltılmış ve 2. haftanın sonunda saksı üzerindeki poşet tamamen kaldırılmıştır. Daha sonra, bitkilerin saksıda gelişimleri takip edilmiş ve gerektiğinde saksı büyütülmüş ve bitkiler seraya alınıp tarlaya şaşırtılmadan önce sera koşullarında bir süre bekletilmiştir.

3.2.6 Bitkilerin tarlaya şaşırtılması

Sera koşullarında dış ortama alıştıran bitkiler ilkbaharda havaların ısınması ile birlikte 14 Mayıs 2016 tarihinde 80 x 80 sıra arası-sıra üzeri mesafe ile tarlaya şaşırtılmıştır. Sulama, çapalama gibi bakım işlemleri de gerekli zamanlarda yapılmıştır.

3.2.7 Verilerin Değerlendirilmesi

Denemelerden elde edilen veriler, MSTAT-C istatistik programı ile tesadüf parselleri deneme desenine göre varyans analizine tabi tutulmuş ve ortalamalar arasındaki farklılıkların önem kontrolü LSD testi ile yapılmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Kullanılan Eksplantların Yüzey Sterilizasyonu

Doku kültürü çalışmalarında ilk aşama, yüzey sterilizasyonudur. Dolayısıyla, bu çalışmada kullanılan eksplantın yüzey sterilizasyonu için en yüksek başarının sağlanacağı en uygun dezenfektan dozunun belirlenmesine çalışılmıştır. Ancak, teze konu olan türler sayıca az olduğundan, çalışmanın diğer aşamalarında eksplant temininde problemler yaşanma riskine karşı sterilizasyon protokolünü belirleme çalışmaları için, bölümümüz deneme tarlasında bol miktarda bulunan *Salvia officinalis* türü kullanılmıştır.

Doku kültürü çalışmalarında kullanılan sterilizasyon metodu kullanılan eksplant tipine, bitki türüne ve hatta aynı türün çeşitlerine göre değişebilmektedir. Nitekim bu çalışmada da *S. officinalis* türü için belirlenen sterilizasyon protokolü, tez çalışmasında kullanılan diğer türler için bazı modifikasyonlardan sonra uygulanmıştır.

Teze konu olan türlerin tohumlarında önemli oranda çimlenme problemi görüldüğü için başlangıç materyali olarak tohumlar yerine *in vivo* olarak gelişen bitkilerden izole edilen koltukaltı ve sürgün ucu eksplantları kullanılmıştır.

Sterilizasyon çalışmaları için öncelikle tarlada bulunan *S. officinalis* türünden yeşil materyal alınmış ve eksplant izolasyonundan önce çeşme suyunun altında 5 dk süreyle yıkanmıştır. Daha sonra bu yeşil materyalden koltukaltı eksplantları izole edilmiş ve sterilizasyondan önce çeşme suyu altında 3-5 dk süreyle tekrar yıkanmıştır.

İzole edilen bu eksplantlar Tween 20, % 5 sodyum hipoklorit içeren ticari çamaşır suyu, % 70 ethanol, PPM gibi değişik dezenfektanlarla muamele edilerek sterilizasyon protokolü oluşturulmaya çalışılmıştır. Çalışılan kısım bitkinin yeşil kısmı olduğundan, uygulanan dezenfektanın doz ve süresinin kullanılan eksplanta zarar vermemesi

gerekmektedir. Bunun için dezenfektanın düşük doz ve sürelerinde uygulanmasıyla başlanmıştır.

Öncelikle eksplantlara % 70 ethanol ile 1 dk ön muamele yapılmış; ancak tüm eksplantlarda morarma ve ölüm gözleendiği için ethanol uygulamasından vazgeçilip doğrudan çamaşır suyuyla muamele edilmiştir. Buna göre eksplantlar;

- %10 Çamaşır suyu + Tween 20 (2-3 damla) → 10 dk
- %10 Çamaşır suyu + Tween 20 (2-3 damla) → 15 dk
- %10 Çamaşır suyu + Tween 20 (2-3 damla) → 20 dk
- %10 Çamaşır suyu + Tween 20 (2-3 damla) → 25 dk

Eksplantlar çamaşır suyuyla yukarıda belirtildiği şekilde muamele edilip MS besin ortamında iki hafta kültüre alınmıştır. 20 dk uygulamasında kontaminasyon diğerlerine göre daha az olmuş; ancak çamaşır suyunun uygulama süresi uzadıkça eksplantların zarar gördüğü ve beyazlaştığı gözlenmiştir. Ayrıca, bu uygulamalar kontaminasyon problemini tamamen engelleyememiş, ikinci haftaya doğru tekrar kontaminasyonlar gözlenmiştir. Dolayısıyla, bu uygulamanın sonucunda sterilizasyonda başarılı olunamamış ve PPM kullanılmasına karar verilmiştir. Nitekim Niedz ve Bausher (1998, 2002) *in vivo* yetişen bitkilerdeki bakteriyel ve fungal bulaşıklığı gidermek için yaptıkları çalışmada, ortama PPM ilavesinin kontaminasyonu önleme açısından etkili sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Dolayısıyla, bu sonuçlar ışığında PPM kullanılarak sterilizasyon denemesi planlanmıştır. Bunun için eksplantlar

- 2 ml / L PPM → 10, 15 ve 20 dk
- 3 ml / L PPM → 10, 15 ve 20 dk
- 4 ml / L PPM → 10, 15 ve 20 dk

şeklinde PPM'li solüsyon ile belirtilen sürelerde muamele edilmiş ve belirtilen miktarlarda PPM içeren ve içermeyen MS ortamında iki hafta süreyle kültüre alınmıştır. PPM içermeyen MS ortamına dikilen eksplantlarda önemli oranda kontaminasyon görülmüştür. PPM ilave edilen ortamlarda ise kontaminasyon önemli oranda azalmış olsa da 4 ml/L PPM ilave edilen ortamda PPM'in olumsuz etkisinden dolayı

bitkiciklerde cılızlaşma görülmüştür. Bu durumlar şekil 4.1- 4.2'te açıkça görülmektedir.

		Sterilizasyon Süresi (Dakika)			Rejenerasyon Ortamı
		10	15	20	
Dezenfektan (ppm)	2 ml/L				MS
	3 ml/L				
	4 ml/L				

Şekil 4.1 Değişik sürelerde farklı PPM dozları uygulanan ve PPM içermeyen MS ortamında kültüre alınan eksplantlardaki kontaminasyon durumu

		Sterilizasyon Süresi (Dakika)			Rejenerasyon Ortamı
		10	15	20	
Dezenfektan (ppm)	2 ml/L				MS + 2 ml / L ppm
	3 ml/L				
	4 ml/L				

Şekil 4.2 Değişik sürelerde farklı PPM dozları uygulanan ve PPM ilave edilen MS ortamında kültüre alınan eksplantlardaki kontaminasyon durumu

Bu denemenin sonucunda da sterilizasyon sağlanamadığı için PPM ve çamaşır suyu birlikte uygulanmıştır. Bunun için ise, eksplantlar önce farklı çamaşır suyu dozları (% 5, 10 ve 15) ile değişik sürelerde (10, 15 ve 20 dk) muamele edilmiş ve yukarıda belirtilen miktarlarda PPM içeren ve içermeyen MS ortamlarında iki hafta süreyle kültüre alınmışlardır. Kültür sonunda elde edilen KOEO değerlerine ait varyans analiz sonuçları ve bu değerlere ait ortalamalar çizelge 4.1-4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.1 Çamaşır suyu ile muamele edilip kültüre alınan eksplantların PPM içermeyen MS besin ortamındaki (1. ortam) KOEO değerlerine ilişkin varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	Kareler Ortalaması	F
Çamaşır Suyu Dozu (A)	2	2936.111	158.54**
Sterilizasyon Süresi (B)	2	2858.333	154.34**
A X B	4	311.111	16.79**
Hata	18	18.519	
C.V. (%)		9.33	

**Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

Çizelge 4.2 Çamaşır suyu ile muamele edilip kültüre alınan eksplantların MS + 2 ml/L PPM içeren besin ortamındaki (2. ortam) KOEO değerlerine ilişkin varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	Kareler Ortalaması	F
Çamaşır Suyu Dozu (A)	2	803.704	34.72**
Sterilizasyon Süresi (B)	2	159.259	6.88**
A X B	4	103.704	4.48*
Hata	18	23.148	
C.V. (%)		5.46	

** Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

* Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 5 düzeyinde önemli fark vardır.

Çizelge 4.3 Çamaşır suyu ile muamele edilip kültüre alınan eksplantların MS + 3 ml/L PPM içeren besin ortamındaki (3. ortam) KOEO değerlerine ilişkin varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	Kareler Ortalaması	F
Çamaşır Suyu Dozu (A)	2	119.444	5,86**
Sterilizasyon Süresi (B)	2	77.778	3,81*
A X B	4	22.222	1,09
Hata	18	20.370	
C.V. (%)		4.92	

** Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

* Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 5 düzeyinde önemli fark vardır.

Çizelge 4.4 Çamaşır suyu ile muamele edilip kültüre alınan eksplantların MS + 4 ml/L PPM içeren besin ortamındaki (4. ortam) KOEO değerlerine ilişkin varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	S.D	Kareler Ortalaması	F
Çamaşır Suyu Dozu (A)	2	395.370	18,56**
Sterilizasyon Süresi (B)	2	389.815	18,30**
A X B	4	182.870	8,58**
Hata	18	21.296	
C.V. (%)		5.17	

** Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

Çizelgelerden de görüldüğü gibi, PPM ilave edilen ve edilmeyen tüm ortamlarda çamaşır suyu dozunun (A) KOEO üzerine etkisi istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli olurken, sterilizasyon süresi (B) 3. ortam dışındaki ortamlarda KOEO üzerine istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli etki yapmıştır. 3. ortamda ise B faktörünün KOEO üzerine etkisi istatistiki olarak % 5 düzeyinde olmuştur. A×B interaksiyonunun KOEO üzerine etkisi ise 3. ortamda istatistiki olarak önemli olmazken, 2. ortamda % 5 ve diğer ortamlarda % 1 düzeyinde olmuştur.

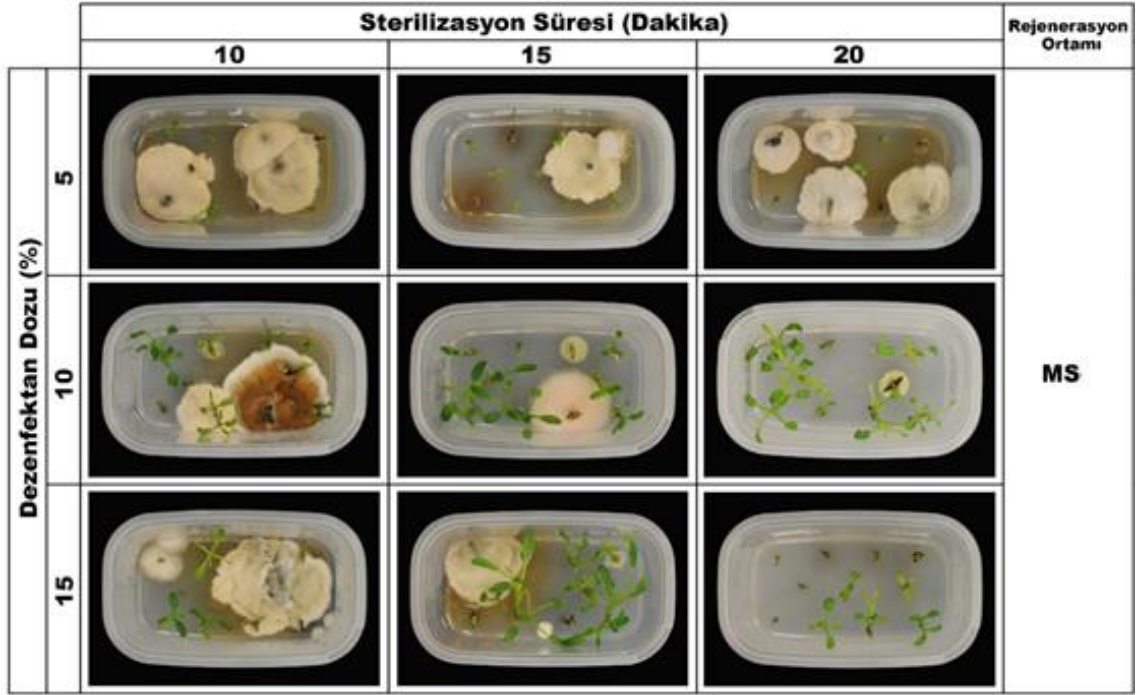
Çizelge 4.5'te ise söz konusu bu ortamlardaki KOEO'ya ilişkin ortalamalar verilmiştir. Buna göre, artan çamaşır suyu dozlarında sterilizasyon süresi uzadıkça KOEO genel olarak yükselmiştir. Bu yükseliş 1. ortamda belirgin bir şekilde görülürken, diğer ortamlarda ortalama değerler birbirine yakın seyretmiştir. Yine, A×B interaksiyonunda tüm ortamlardaki ortalama değerler % 18.33-100.00 arasında değişmiştir. Benzer

şekilde KOEO bakımından en düşük değerler 1. ortamda görülürken, diğer ortamlarda ortalama değerler yükselmiş olup, genelde birbirine yakın değerler olmuşlardır. Bu durum aşağıdaki şekillerde net bir şekilde görülmektedir (Şekil 4.3-4.6). Elde edilen rakamlar toplu halde değerlendirildiğinde, 3. ve 4. ortamda KOEO daha yüksek çıkmıştır.

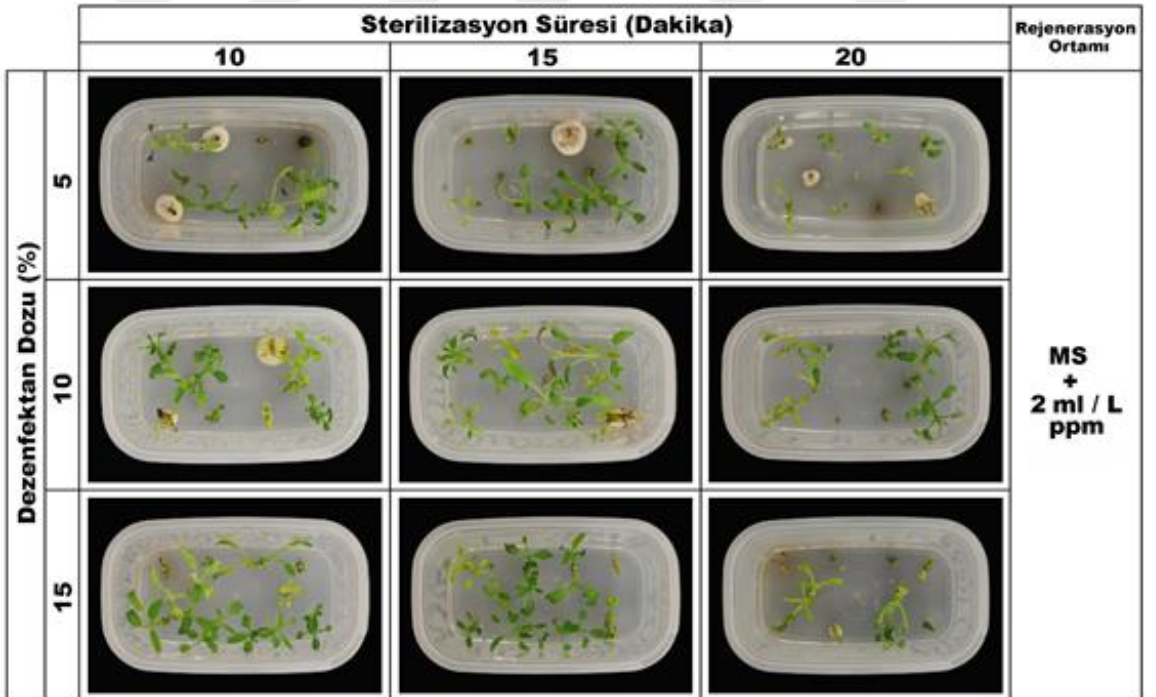
Çizelge 4.5 PPM içeren ve içermeyen MS besin ortamlarında belirlenen KOEO'ya ilişkin ortalama değerler ve önemlilik grupları

Rejenerasyon Ortamı	Çamaşır Suyu Dozu (%) / Süre (dk)	Kontamine Olmayan Eksplant Oranı (%)		
		10	15	20
MS (1. ortam)	5	18.33 ^F	26.67 ^{EF}	31.67 ^{DE}
	10	35.00 ^{DE}	46.67 ^{BC}	78.33 ^A
	15	38.33 ^{CD}	53.33 ^B	86.67 ^A
MS +2 ml/L PPM (2. ortam)	5	76.67 ^D	83.33 ^{CD}	76.67 ^D
	10	76.67 ^D	90.00 ^{BC}	96.67 ^{AB}
	15	96.67 ^{AB}	100.00 ^A	96.67 ^{AB}
MS +3 ml/L PPM (3. ortam)	5	86.67	88.33	90.00
	10	91.67	96.67	98.33
	15	90.00	86.67	96.67
MS +4 ml/L PPM (4. ortam)	5	83.33 ^B	83.33 ^B	78.33 ^B
	10	85.00 ^B	96.67 ^A	100.00 ^A
	15	76.67 ^B	100.00 ^A	100.00 ^A

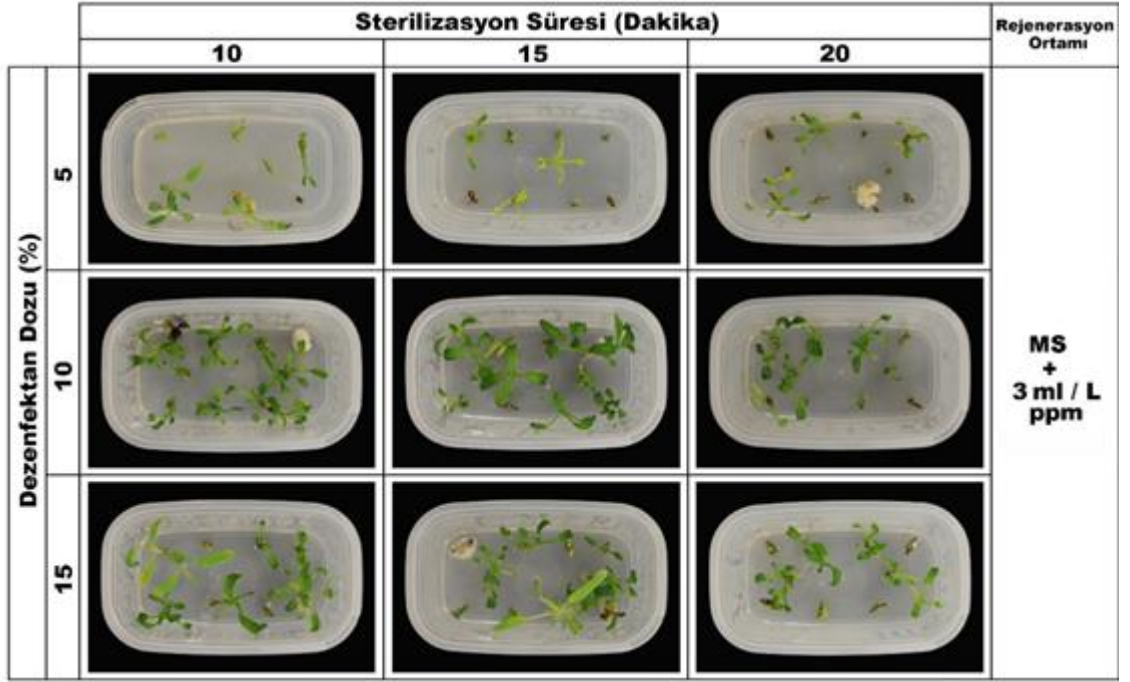
Her blokta aynı harflerle gösterilen ortlamalar arasında istatistiki olarak fark yoktur.



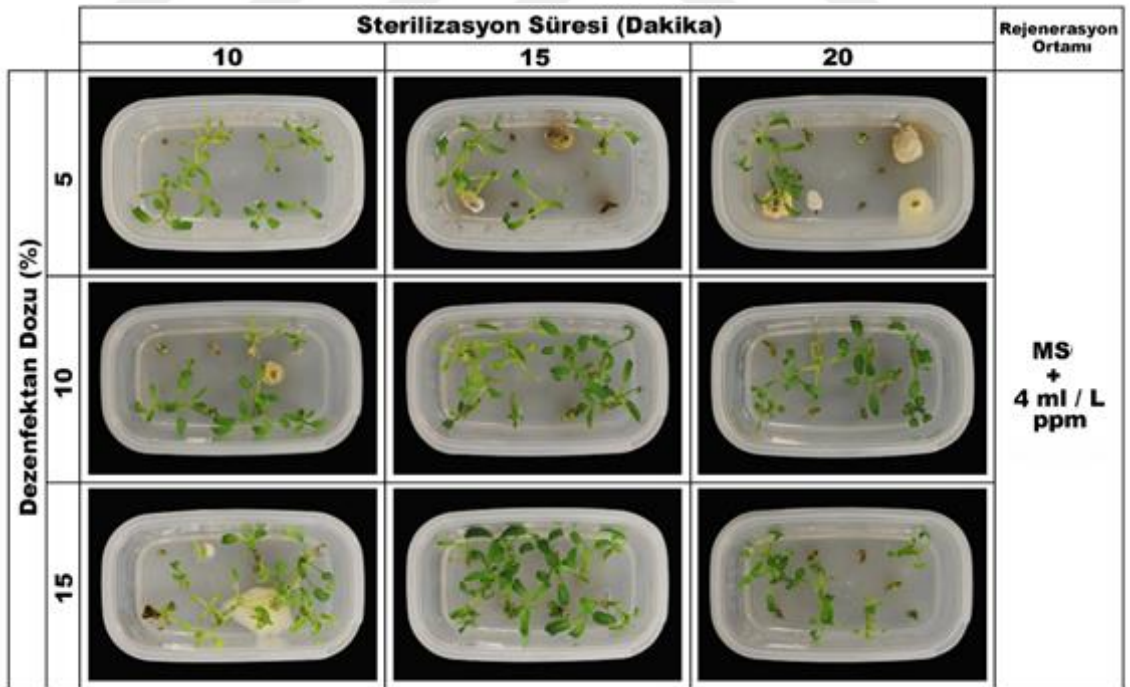
Şekil 4.3 Çamaşır suyu ile farklı sürelerde muamele edilip 1. ortamda kültüre alınan eksplantlardaki kontaminasyon durumu



Şekil 4.4 Çamaşır suyu ile farklı sürelerde muamele edilip 2. ortamda kültüre alınan eksplantlardaki kontaminasyon durumu



Şekil 4.5 Çamaşır suyu ile farklı sürelerde muamele edilip 3. ortamda kültüre alınan eksplantlardaki bulaşıklık durumu



Şekil 4.6 Çamaşır suyu ile farklı sürelerde muamele edilip 4. ortamda kültüre alınan eksplantlardaki bulaşıklık durumu

Kullanılan bu ortamlar arasında yapılan varyans analizi sonucu ve bu ortamlara ilişkin ortalama değerler izelge 4.6-4.7’te verilmiştir.

Çizelge 4.6 Kullanılan ortamlara ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S. D.	Kareler Ortalaması	F
Rejenerasyon Ortamı	3	4292.862	22.94**
Hata	32	187.078	

** Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

Çizelge 4.6’dan görüldüğü üzere, kullanılan ortamlar KOEO zerine istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli etki yapmıştır. Ortamlardaki ortalama değerlere bakıldığında ise, en düşük değer (% 46.11) 1. ortamda görülürken, 3. ortamda en yüksek değer (% 91.67) kaydedilmiştir. En yüksek değer 3. ortamdan elde edilmesine rağmen, PPM ilave edilen ortamlar arasında istatistiki olarak fark oluşmamıştır (izelge 4.7).

Çizelge 4.7 Kullanılan ortamlara ilişkin ortalama değerler ve önemlilik grupları

Rejenerasyon Ortamı	KOEO (%)
1. ortam	46.11 B
2. ortam	88.15 A
3. ortam	91.67 A
4. ortam	89.26 A

Aynı harflerle gösterilen ortlamalar arasında istatistiki olarak fark yoktur

Tüm bu sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde, kullanılan eksplantlar tarlada bulunan bitkilerden alındığından, önemli oranda kontaminasyon problemiyle karşılaşılmıştır. Bununla birlikte, çalışılan eksplant tohumdan farklı olarak bitkinin taze kısmı olduğu için, kullanılan dezenfektanın dozu ve süresi oldukça önemlidir. Dolayısıyla, bu tez çalışmasında kullanılan çamaşır suyunun yüksek dozları uzun sterilizasyon sürelerinde kullanılan eksplanta zarar vermiştir. Bunun yanında, çamaşır suyunun düşük dozları da sterilizasyon için yeterli olmamıştır. Diğer çalışmalarda

kullanılan PPM, bu çalışmada da kullanılmış ve oldukça etkili olmuştur. Dolayısıyla, kullanılan eksplantlar çamaşır suyu ve PPM ile beraber steril edildiğinde bulaşıklık tamamen olmasa da önemli oranda önlenmiştir. Ayrıca, yine bu denemelerden çıkan önemli bir sonuç da PPM'in besin ortamına da ilave edilmesi gerektiğidir. Bu sonuç, Bausher ve Niedz (1998, 2002)'in bulgularını da destekler niteliktedir. Nitekim bu araştırmacılar sera ve tarlada gelişen bitkiler üzerinde yapılan doku kültürü çalışmalarında, besin ortamına PPM ilave edilmesinin kontaminasyon problemini önemli oranda azalttığını belirtmişlerdir. Ancak PPM'in güçlü bir dezenfektan olmasından dolayı, çamaşır suyunda olduğu gibi yüksek doz ve uzun sürelerde uygulanmasının eksplant üzerine olumsuz etkilerinin de olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Sterilizasyon protokolünün belirlenmesinde çamaşır suyuna ilaveten, civa klorür ($HgCl_2$) de dezenfektan olarak kullanılmıştır. Nitekim civa klorür ($HgCl_2$) Mederos-Molina (2004, 2006) tarafından diğer *Salvia* türlerinin *in vivo* bitkilerinden izole edilen eksplantların sterilizasyonunda kullanılmıştır. Diğer taraftan aynı araştırmacılar, civa klorür ($HgCl_2$) uygulaması öncesinde bu eksplantlara 5 dk % 70 etanol uygulaması da yapmışlardır. Dolayısıyla, bizim çalışmamızda da kullanılan türler üzerinde, PPM' in yanı sıra civa klorür ve %70 etanol kullanılarak da denemeler yapılmıştır. Buna göre, *S. albimaculata*'dan izole edilen koltukaltı ve sürgün ucu eksplantları;

1. a- % 70 Ethanol ----- 30 sn
b- %0.1 $HgCl_2$ ----- 12 dk
 2. a- % 70 Ethanol ----- 1 dk
b- %0.1 $HgCl_2$ ----- 12 dk
 3. a- % 70 Ethanol ----- 2 dk
b- %0.1 $HgCl_2$ ----- 12 dk
 4. a- % 70 Ethanol ----- 4 dk
b- %0.1 $HgCl_2$ ----- 12 dk
- } MS

şeklinde muamele edilmiş ve PPM içermeyen MS ortamına dikilmişlerdir. Ancak, literatürde 5 dk'ya kadar kullanıldığı belirtilen % 70 ethanol, *S. albimaculata* türünde 30 sn'de bile ölümcül etki yaparak tüm eksplantların öldüğü görülmüştür. Dolayısıyla, bu tür için ethanol ön uygulaması yapılmadan, eksplantlara aşağıda belirtilen metodlar uygulanmış ve karşılarında belirtilen ortamlarda kültüre alınmışlardır:

1. a- 3 ml/L PPM ----- 10 dk
b- % 0.1 HgCl₂ ----- 12 dk

MS + 3 ml/L PPM

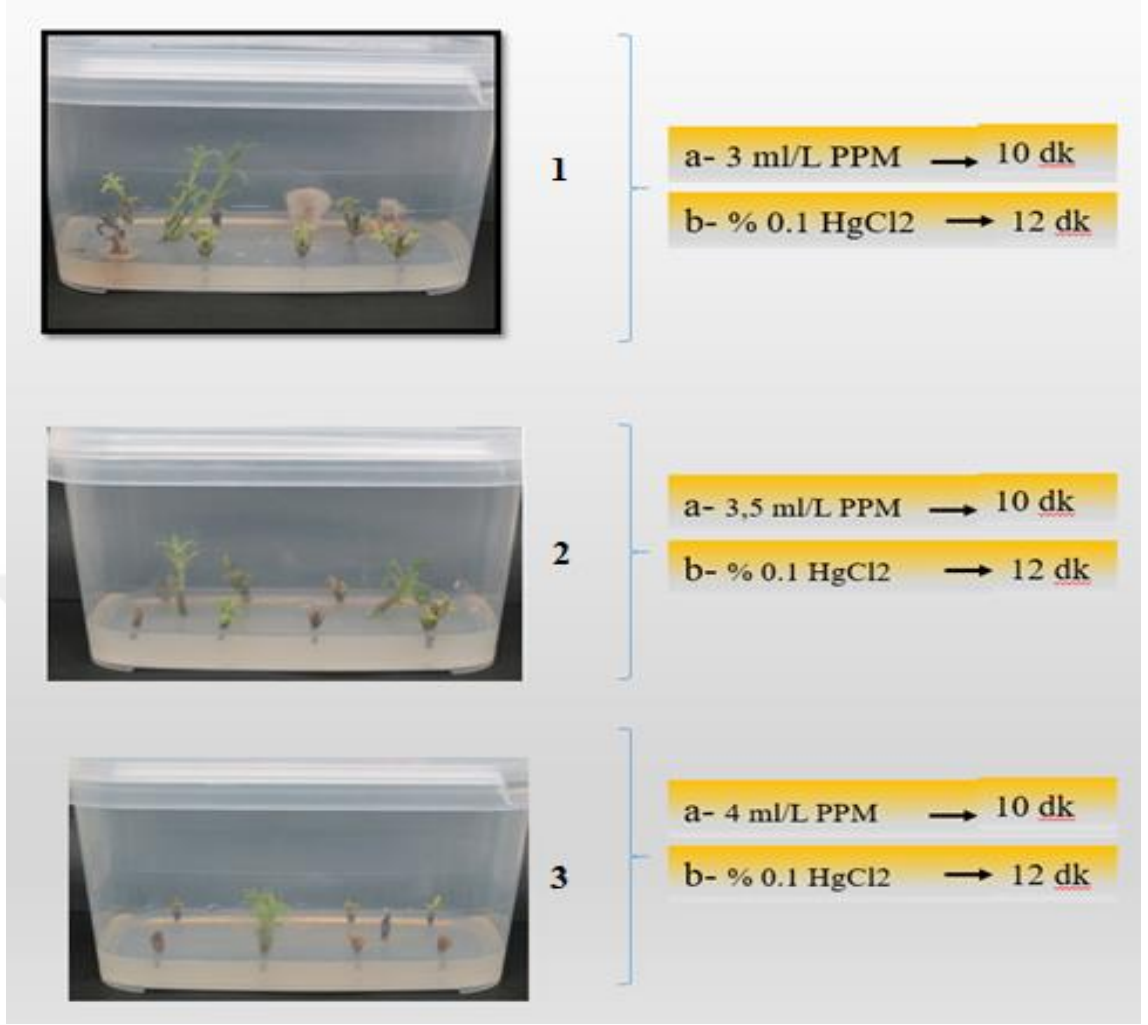
2. a- 3,5 ml/L PPM ----- 10 dk
b- % 0.1 HgCl₂ ----- 12 dk

MS + 3,5 ml/L PPM

3. a- 4 ml/L PPM ----- 10 dk
b- % 0.1 HgCl₂ ----- 12 dk

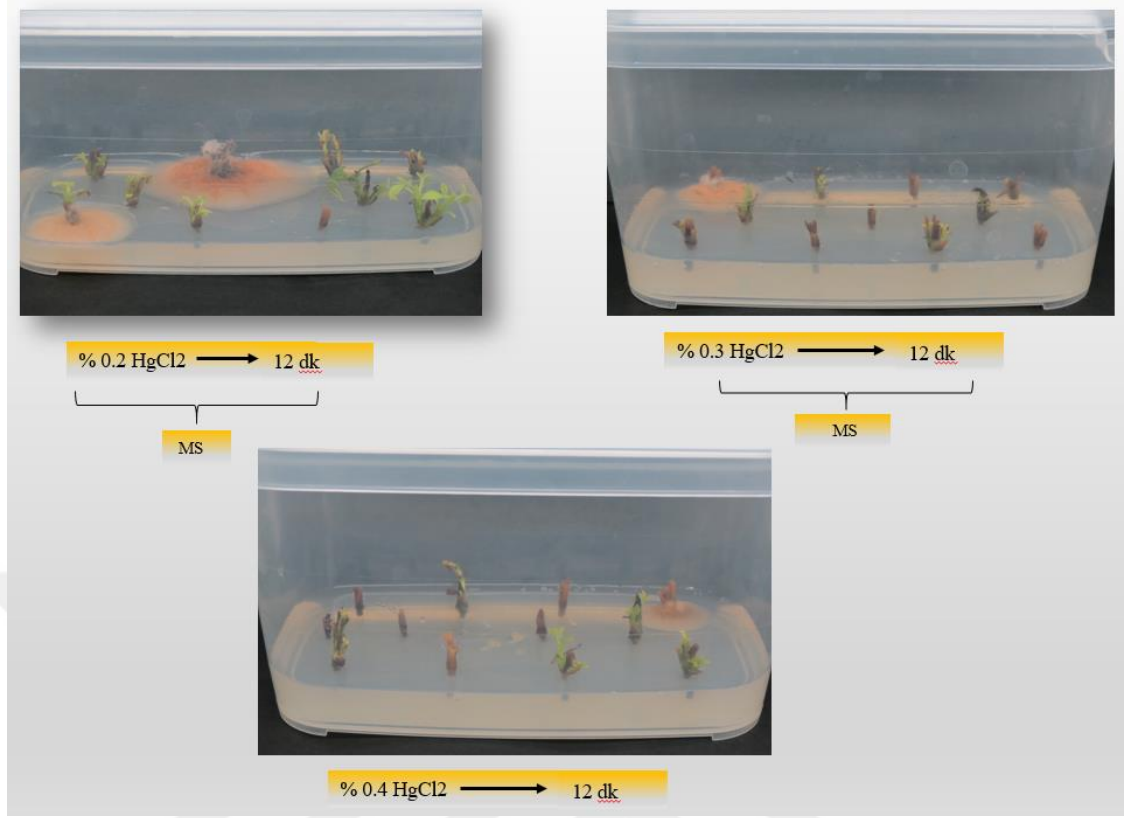
MS + 4 ml/L PPM

Bu uygulamanın sonucunda da sterilizasyon tam olarak sağlanamamıştır. Ayrıca PPM dozu arttıkça eksplantlardaki ölüm oranı da artmıştır (Şekil 4.7).



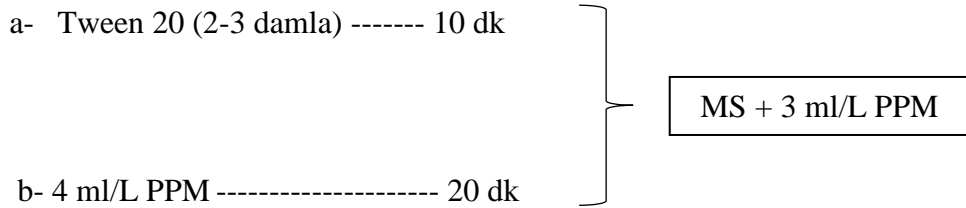
Şekil 4.7 Farklı dozlarda PPM ve % 0.1 HgCl₂ ile muamele edilen ve farklı miktarlarda PPM ilave edilen ortamda kültüre alınan *S. albimaculata* ya ait koltukaltı eksplantları

Kullanılan PPM'in etkisini gidermek için ön uygulama olarak PPM uygulaması kaldırılmış ve eksplantlar direkt olarak % 0.1, % 0.2 ve % 0.3'lük (w/v) HgCl₂ ile muamele edilmiş (12 dk) ve PPM ilave edilmeyen MS ortamında kültüre alınmışlardır. Ancak, bu uygulama sonucunda da sterilizasyon sağlanamamıştır. Bununla birlikte, HgCl₂ ile temas eden tüm eksplantlarda ölüm veya gelişememe durumu görülmüştür (Şekil 4.8).

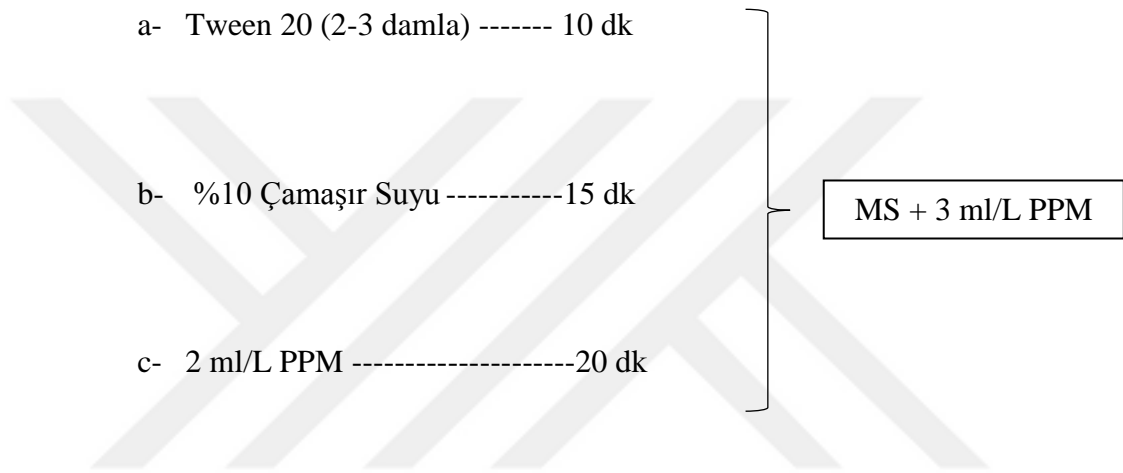


Şekil 4.8 Farklı dozlardaki HgCl₂ ile muamele edildikten sonra PPM içermeyen MS ortamında kültüre alınan *S. albimaculata* türüne ait koltukaltı eksplantları

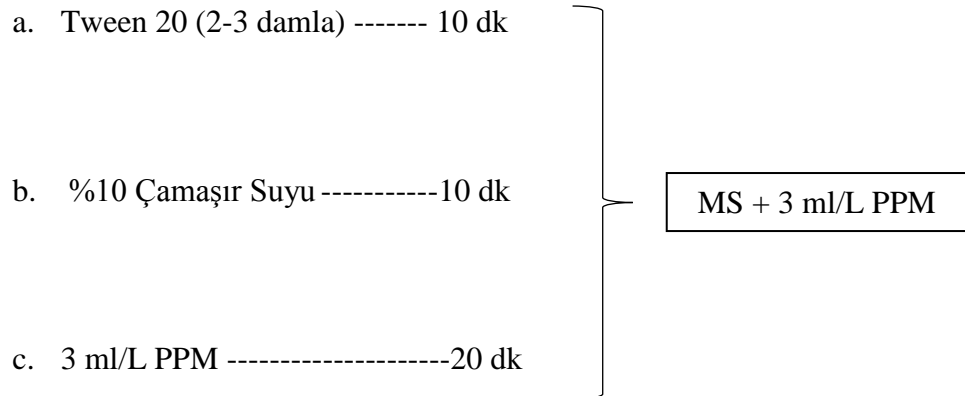
Sonuç olarak, literatürde belirtilen ethanol ve civa klorür uygulaması, teze konu olan *S.albimaculata* türü için ölümcül etki yapmıştır. Bununla birlikte, *S. albimaculata* çamaşır suyu dozlarından olumsuz etkilendiği için sadece PPM ile steril edilebilmiştir. PPM ile de tamamıyla steril olmasa da daha fazla oranda canlı bitki elde edildiği için bu metod kullanılmıştır. Sonuç olarak, *S. albimaculata* türü için uygulanan sterilizasyon metodu aşağıdaki gibidir;

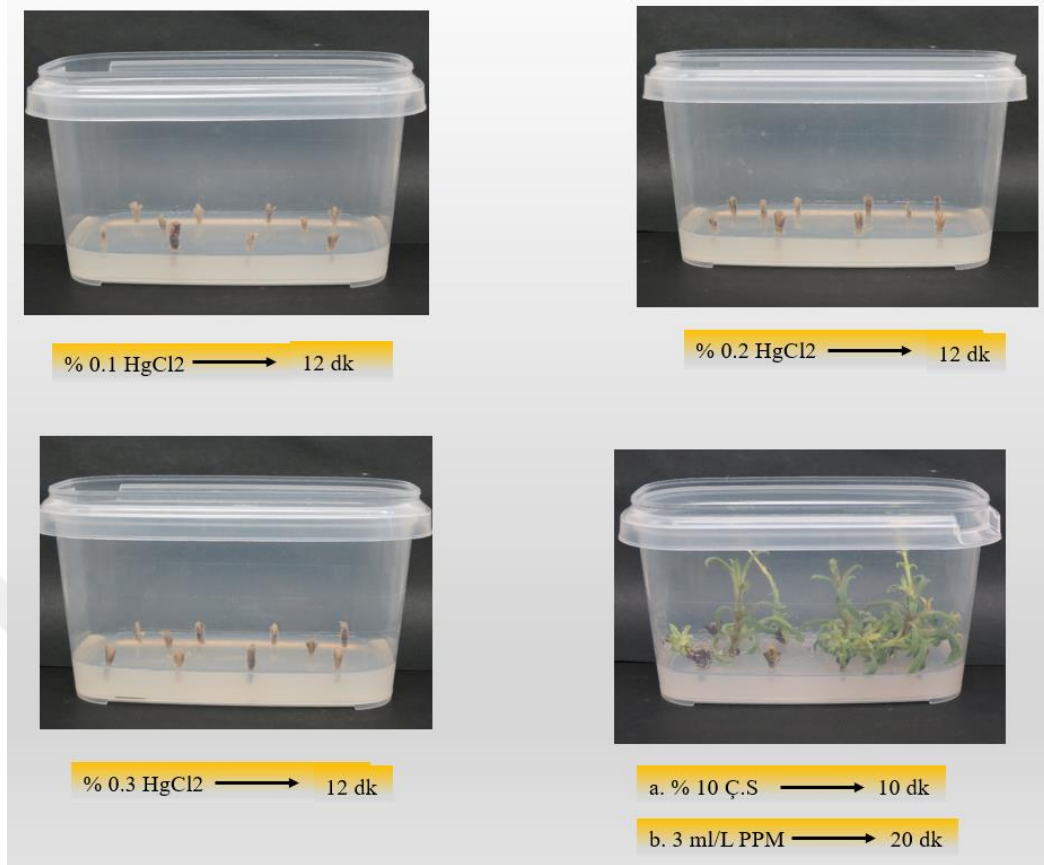


S. nydeggeri türü için de *S. albimaculata*' da olduğu gibi ön uygulama olarak % 70 ethanol ve sonrasında HgCl₂ uygulaması yapılmış ve benzer olarak ethanol ve HgCl₂' nin uygulanması sonucu tüm eksplantların öldüğü gözlenmiştir. Sonuç olarak yine, *S. officinalis* kullanılarak belirlenen metod üzerinde çalışılmıştır. Bu metodta kullanılan çamaşır suyu *S. nydeggeri* türü için önemli ölçüde etkili olurken, kullanılan PPM olumsuz etki yapmıştır. Dolayısıyla PPM dozu azaltılarak belirlenen aşağıdaki sterilizasyon protokolü kullanılmıştır:



S. chrysopylla türünün sterilizasyonu için yine Tween 20 ön uygulamasından sonra farklı oranlarda HgCl₂ uygulaması ile çamaşır suyu × PPM kombinasyonu uygulanan koltukaltı eksplantları 3 mL/L PPM içeren MS ortamında kültüre alınmışlardır. Ancak, HgCl₂ uygulanan tüm eksplantlarda yine ölüm gözlenirken, çamaşır suyu × PPM kombinasyonu en iyi sonucu vermiştir (Şekil 4.9). Sonuç olarak, sürgün rejenerasyonu için *S. chrysopylla* türünde kullanılan sterilizasyon protokolü aşağıdaki gibidir:





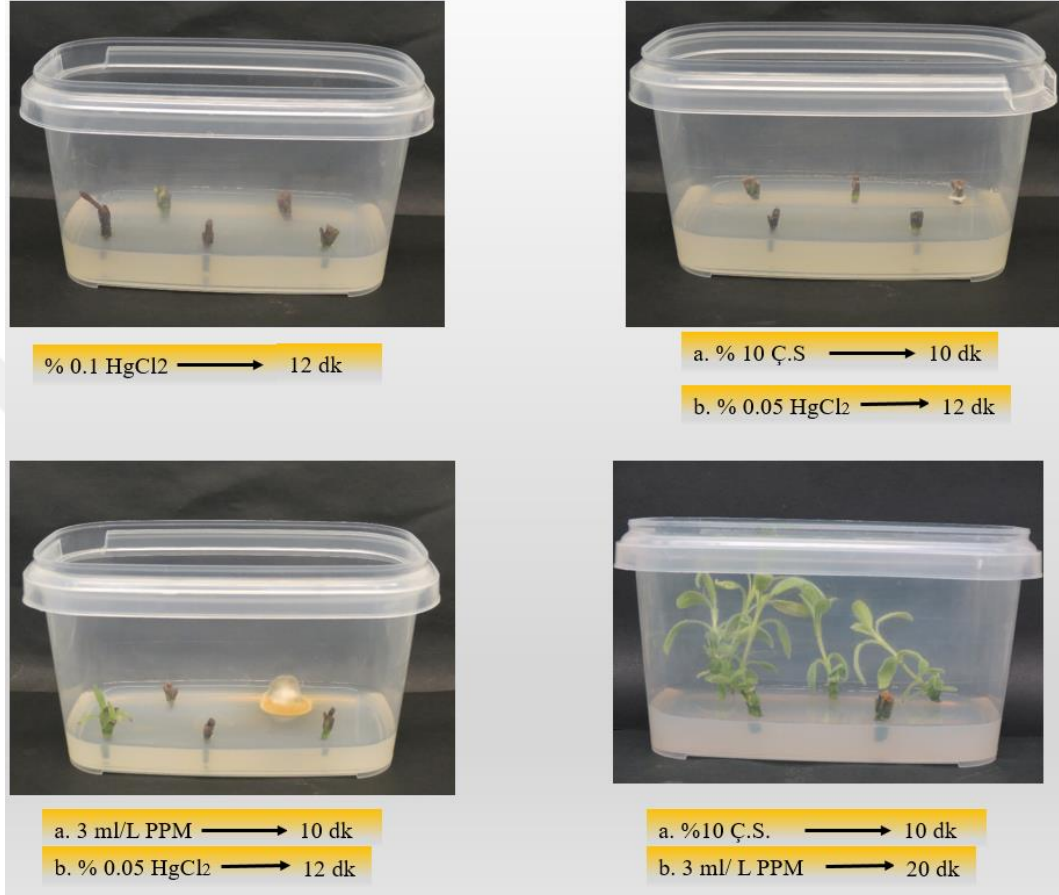
Şekil 4.9 Farklı oranlarda HgCl₂ ve çamaşır suyu-PPM kombinasyonu ile muamele edilen ve 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında kültüre alınan *S. chrysopylla* türüne ait koltukaltı eksplantları

Salvia euphratica var. *euphratica* türü için de Tween 20 ön uygulamasına takiben aşağıdaki protokoller uygulanmış ve belirtilen ortamda kültüre alınmıştır.

1. a- %0.1 HgCl₂ ----- 12 dk
2. a- %10 Çamaşır Suyu ----- 10 dk
b- %0.05 HgCl₂ ----- 12 dk
3. a- 3 ml/L PPM ----- 10 sn
b- %0.05 HgCl₂ ----- 12 dk
4. a- %10 Çamaşır Suyu ----- 10 dk
b- 3 ml/L PPM ----- 20 dk

MS + 3 ml/L PPM

Diğer türlere benzer olarak, $HgCl_2$ uygulanan tüm eksplantlarda ölüm gözlenmiş olup, sterilizasyon açısından en iyi sonuç ise, çamaşır suyu × PPM kombinasyonundan alınmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 Farklı uygulamalara tabi tutulan ve 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında kültüre alınan *S. euphratica* var. *euphratica*'ya ait koltukaltı eksplantları

Sonuç olarak, *Salvia euphratica* var. *euphratica* için kullanılan sterilizasyon protokolü aşağıdaki gibidir;

- | | | |
|-------------------------------------|---|-----------------|
| a. Tween 20 (2-3 damla) ----- 10 dk | } | MS + 3 ml/L PPM |
| b. %10 Çamaşır Suyu -----10 dk | | |
| c. 3 ml/L PPM -----20 dk | | |

4.2 Sürgün Rejenerasyonu

4.2.1 Farklı besin ortamlarının sürgün rejenerasyonuna etkisi

Öncelikle, teze konu olan türler, en iyi gelişim gösterebildikleri ortamı belirlemek için 3 ml/L PPM ilave edilen MS, Gamborg B5, FN ve NN besin ortamlarında 6 hafta süreyle kültüre alınmışlardır. Ancak, sadece *S. albimaculata* ve *S. chrysophylla* türlerinden veri elde edilebilmiştir. Diğer türlerde ise eksplantların tümünde ölüm olduğu için veri elde edilememiştir.

4.2.1.1 Farklı besin ortamlarının *S. albimaculata* türünde sürgün rejenerasyonuna etkisi

S. albimaculata türünün farklı besin ortamlarındaki sürgün rejenerasyonuna ilişkin incelenen karakterlerine ait varyans analiz sonuçları çizelge 4.8’te verilmiştir.

Çizelge 4.8 Farklı ortamların *S. albimaculata* türünde sürgün rejenerasyonu için incelenen karakterlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması			
		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	F	Sürgün Boyu (cm)	F
Ortam	3	0,800	16**	0,966	5.39**
Hata	16	0,050		0,179	
Genel	19	0,168		0,303	

** Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

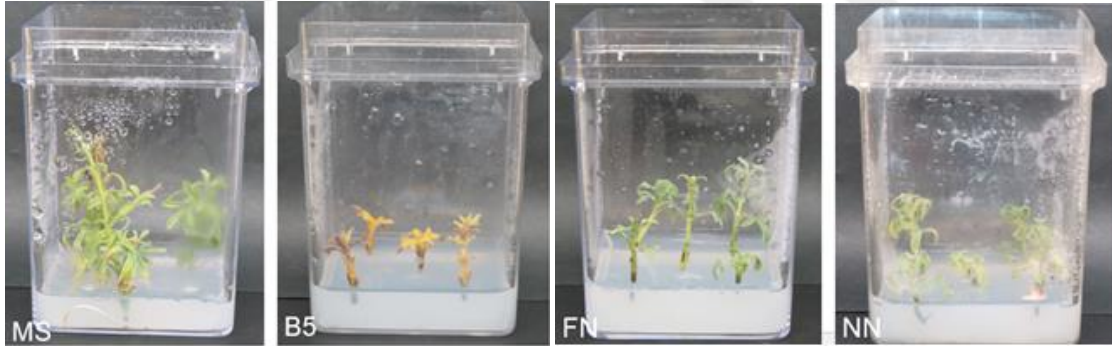
Çizelgeden de görüldüğü üzere, farklı ortamlar *S. albimaculata* türünde sürgün rejenerasyonu açısından incelenen karakterler üzerine istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli etki yapmıştır. İncelenen bu karakterlere ilişkin ortamlardan elde edilen ortalama değerler ve önemlilik grupları da çizelge 4.9’da verilmiştir.

Çizelge 4.9 *S. albimaculata* türünde farklı ortamlarda sürgün rejenerasyonu açısından elde edilen ortalama değerler ve önemlilik grupları

	Rejenerasyon Oram (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Boyu (cm)
MS	100.00	1,80 ^A	2,36 ^A
B5	100.00	1.00 ^B	1,68 ^{AB}
FN	100.00	1.00 ^B	1,72 ^{AB}
NN	100.00	1.00 ^B	1,30 ^B

Aynı harflerle gösterilen ortlamalar arasında istatistiki olarak fark yoktur

Çizelgeye göre, *S. albimaculata* türünde EBSS ve SB bakımından en yüksek değerler MS ortamından elde edilmiştir. SB bakımından MS ortamını FN ortamı takip ederken, incelenen karakterler bakımından en düşük değerler NN ortamından elde edilmiştir. *S. albimaculata* türünün farklı ortamlardaki rejenerasyonu şekil 4.11’te gösterilmiştir.



Şekil 4.11 *S. albimaculata* türüne ait sürgün ucu eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave edilen MS, B5, FN ve NN ortamlarındaki rejenerasyon durumları

4.2.1.2 Farklı ortamların *S. chrysophylla* türünde sürgün rejenerasyonuna etkisi

Farklı ortamların *S. chrysophylla*’da sürgün rejenerasyonuna ilişkin varyans analiz sonuçları ve incelenen karakterlere ilişkin ortalama değerler ile önemlilik grupları çizelge 4.10 ve 4.11’de verilmiştir. Varyans analizi sonucuna göre, ortamlar incelenen tüm karakterler üzerine istatistiki olarak % 1 düzeyinde etkili olmuştur.

Çizelge 4.10 Farklı ortamların *S. chrysophylla* türünde sürgün rejenerasyonu açısından incelenen karakterlerine ait varyans analiz sonuçları

Kareler Ortalaması					
Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	F	Sürgün Boyu (cm)	F
Ortam	3	19,128	44.48**	3,292	26.76**
Hata	16	0,430		0,123	
Genel	19	3,382		0,623	

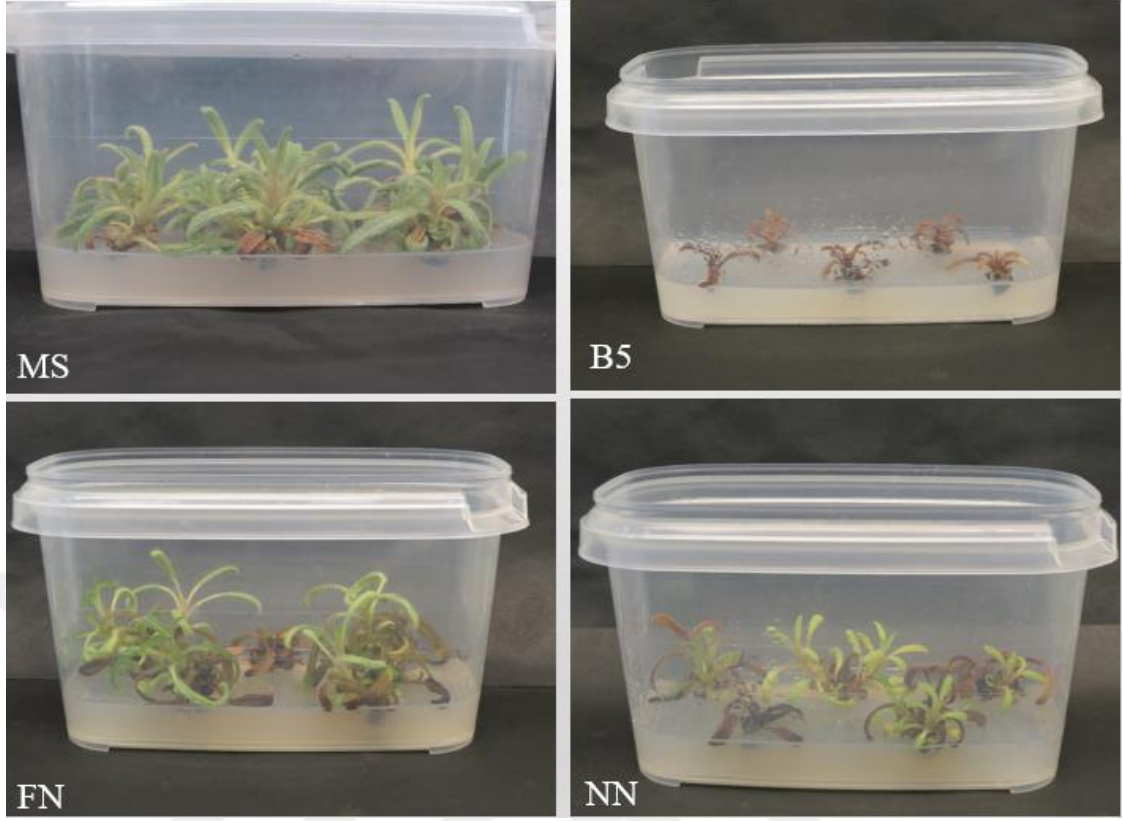
** Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

Çizelge 4.11 *S. chrysophylla* türünde farklı ortamlarda sürgün rejenerasyonu açısından elde edilen ortalama değerler ve önemlilik grupları

	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Boyu (cm)
MS	100.00	5,60 ^A	3,30 ^A
B5	100.00	1,00 ^C	1,38 ^C
FN	100.00	2,31 ^B	2,76 ^{AB}
NN	100.00	2,40 ^B	2,48 ^B

Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak fark yoktur.

Çizelge 4.11'den görüleceği üzere, EBSS 1.00-5.60 adet arasında değişirken, SB değerleri 1.38-3.30 cm arasında değişmiştir. İncelenen bu karakterler bakımından en yüksek değerler MS ortamından elde edilirken, en düşük değerler B5 ortamından alınmıştır. Ortamlar arasındaki bu farklılıklar şekil 4.12'de net bir şekilde görülmektedir.



Şekil 4.12 *S. chrysophylla* türüne ait koltukaltı eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave edilen MS, B5, FN ve NN ortamlarındaki rejenerasyon durumları

Farklı besin ortamlarının teze konu olan türlerin sürgün rejenerasyonuna etkisini belirlemek için yaptığımız bu çalışmadan elde edilen sonuçlar, önceki çalışmaların sonuçlarıyla uyum içerisindedir. Nitekim Arikat vd. (2004) *S.fruticosa* türünde farklı ortamların (MS, B5 ve NN) etkisini araştırmışlar ve en iyi sonuçların MS ortamında alındığını belirlemişlerdir. Yine bir başka çalışmada Mederos-Molina (2004) MS ile B5 ortamını kıyaslamış ve MS ortamını önermiştir. Bizim bulduğumuz sonuçlarda da MS ortamı sürgün rejenerasyonun incelenen karakterler bakımından en iyi sonucu vermiştir.

4.2.2 BAP-Kin-NAA'nın Sürgün Rejenerasyonuna Etkisi

Yapılan denemelerde teze konu olan türler için sürgün rejenerasyonu açısından MS ortamının en uygun olduğu belirlendikten sonra, rejenerasyon çalışmalarında 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamı kullanılmıştır.

Rejenerasyon çalışmaları için öncelikle, tüm türler *in vivo* bitkilerden izole edilen eksplantlarla farklı BAP (0,1 ve 2 mg/L) Kin (0, 1 ve 2 mg/L) ve NAA (0 ve 0.5 mg/L) içeren MS besin ortamlarında 5 tekerrürlü olarak, her tekerrürde 5 eksplant olacak şekilde 6 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Ancak, tüm kültürlerde eksplantların tamamına yakınında ölüm gözlemlendiği için veri alınamamıştır. Türlerin hormonlara tepkileri farklı olup, türler üzerinde yapılan rejenerasyon çalışmaları aşağıda verilmiştir.

4.2.2.1 *S. albimaculata* türünde sürgün rejenerasyonu çalışmaları

Tarlada mevcut olan (*in vivo*) bitkilerden izole edilen koltukaltı ve sürgün ucu eksplantları, önceki bölümde belirtilen protokol ile steril edildikten sonra farklı BAP (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 ve 2.0 mg/L), Kin (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 ve 2.0 mg/L) ve TDZ (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 ve 2.0 mg/L) içeren 3 ml/L PPM ilave edilen MS besin ortamlarında 6 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Ancak, yine kültürü yapılan tüm eksplantlarda ölüm görüldüğü için EBSS ve SB karakterleri incelenememiştir. Yapılan bu denemede *S. albimaculata* türünün hormon içermeyen besin ortamında daha iyi geliştiğinin tespit edilmesi üzerine, daha sonraki rejenerasyon çalışmalarında hormon kullanılmamıştır. Dolayısıyla, hormon içermeyen MS ortamında 10 tekerrürlü olarak yapılan çalışmada incelenen EBSS ve SB' ye ilişkin ortalama değerler çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12 *S. albimaculata* türünde sürgün rejenerasyonuna ait karakterlere ilişkin ortalamalar

Eksplant Tipi	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (EBSS) (Adet)	Sürgün Boyu (SB) (cm)
Koltukaltı	100.00	2,00	2,36
Sürgün ucu	100.00	1,00	2,05

Çizelgeden de görüleceği üzere, *S. albimaculata* türünde sürgün rejenerasyonu için kullanılan farklı eksplantlar arasında, incelenen karakterler bakımından önemli fark

olmasa da EBSS ve SB değerleri koltukaltı eksplantından gelişen bitkilerde daha yüksek bulunmuştur. Şekil 4.13'te *S. albimaculata* türünün 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında kültüre alınan koltukaltı ve sürgün ucu eksplantlarının rejenerasyonu gösterilmiştir.



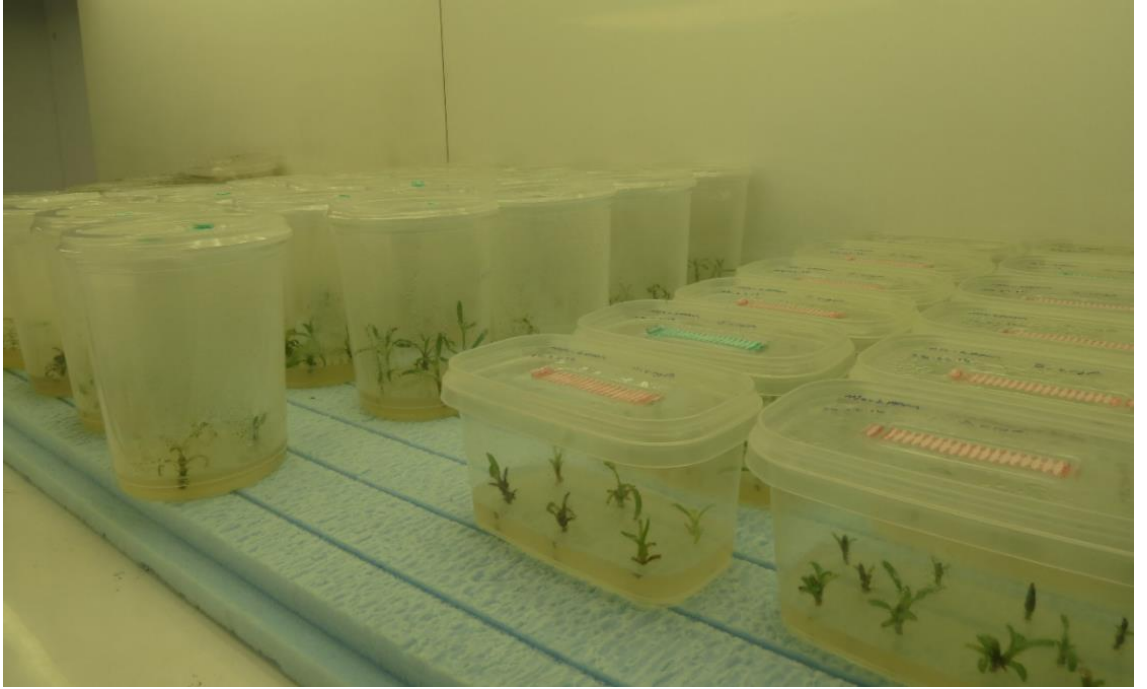
Şekil 4.13 *S. albimaculata* türüne ait koltukaltı ve sürgün ucu eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonu

4.2.2.2 *S. chrysophylla* türünde sürgün rejenerasyonu çalışmaları

Öncelikle, *in vivo* olarak gelişen *S. chrysophylla* türünden izole edilen koltukaltı eksplantları farklı BAP-Kin-NAA dozlarında 3 ml/L PPM ilave edilen MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Ancak, diğer türlere benzer olarak, eksplantların tamamına yakınında ölüm gerçekleştiği için kültüre devam edilememiştir. Eksplantların sadece hormon içermeyen ortamda gelişme gösterdiği tespit edilince, sonraki çalışmalar hormon içermeyen MS ortamında yapılmıştır. Bu şekilde yapılan kültürlerden önemli miktarda sürgün elde edilmiş ve bu sürgünlerden izole edilen eksplantlar belirli periyotlarla alt kültüre alınarak hızlı çoğaltım sağlanmıştır (Şekil 4.14 - 4.15). Böylece, çok sayıda steril sürgünler elde edilirken, çalışmanın devamı için *in vivo* bitkilere olan bağlılık da sona ermiştir.



Şekil 4.14 *S. chrysophylla* türünde koltukaltı eksplantından 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamından elde edilen sürgünler



Şekil 4.15 *S. chrysophylla* türünden elde edilen steril sürgünlerden izole edilen koltukaltı eksplantları ile 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında yapılan hızlı çoğaltım çalışması

Hızlı çoğaltım sonucunda elde edilen steril bitkilerden izole edilen koltukaltı eksplantları ile başlangıçta yapılan; ama başarılı olunamayan BAP-Kin-NAA denemesi tekrar kurulmuştur. Dolayısıyla, steril bitkilerden izole edilen eksplantlar farklı BAP

(0,1 ve 2 mg/L) Kin (0, 1 ve 2 mg/L) ve NAA (0 ve 0.5 mg/L) içeren 3 ml/L PPM ilave edilen MS besin ortamında 6 hafta süreyle tekrar kültüre alınmıştır. Kültür sonunda EBSS ve SB karakterleri incelenmiş olup, bu karakterlerin kullanılan hormonlardan önemli derecede etkilendikleri görülmektedir. BAP+Kin, ve BAP+Kin+NAA uygulamasının, incelenen bu özelliklere ait varyans analiz tablosu çizelge 4.13 ve 4.14’de verilirken, bu uygulamalara ait ortalama değerler çizelge 4.15’te verilmiştir. Varyans analiz sonuçlarına bakıldığında, BAP ve Kin dozları ile BAP×Kin interaksyonu ve BAP×Kin×NAA interaksyonunun incelenen karakterler üzerine istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli etki yaptığı görülmektedir.

Çizelge 4.13 Farklı BAP+Kin dozlarında kültüre alınan *S. chrysophylla* türünün sürgün rejenerasyonuna ilişkin incelenen karakterlerine ait varyans analiz sonuçları

Kareler Ortalaması					
Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (EBSS)	F	Sürgün Boyu (SB)	F
		(Adet)		(cm)	
BAP (A)	2	0,061	6.10**	0,103	10.30**
KİN (B)	2	4,291	429.10**	1,947	194.10**
A X B	4	9,351	935.10**	1,572	157.20**
HATA	18	0,010		0,010	
C.V. (%)		2,29		2,94	

** Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

* Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 5 düzeyinde önemli fark vardır.

Çizelge 4.14 Farklı BAP+Kin+NAA dozlarında kültüre alınan *S. chrysophylla* türünün sürgün rejenerasyonuna ilişkin incelenen karakterlerine ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S. D	Kareler Ortalaması			
		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (EBSS)	F	Sürgün Boyu (SB)	F
		(Adet)		(cm)	
BAP (A)	2	1,831	610.33**	0,561**	280.50**
KİN (B)	2	5,416	1805.33**	2,343**	1171.50**
A X B X 0.5 NAA	4	0,496	165.33**	0,413**	206.50**
HATA	18	0,003		0,002	
C.V. (%)		1,25		1,32	

** Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

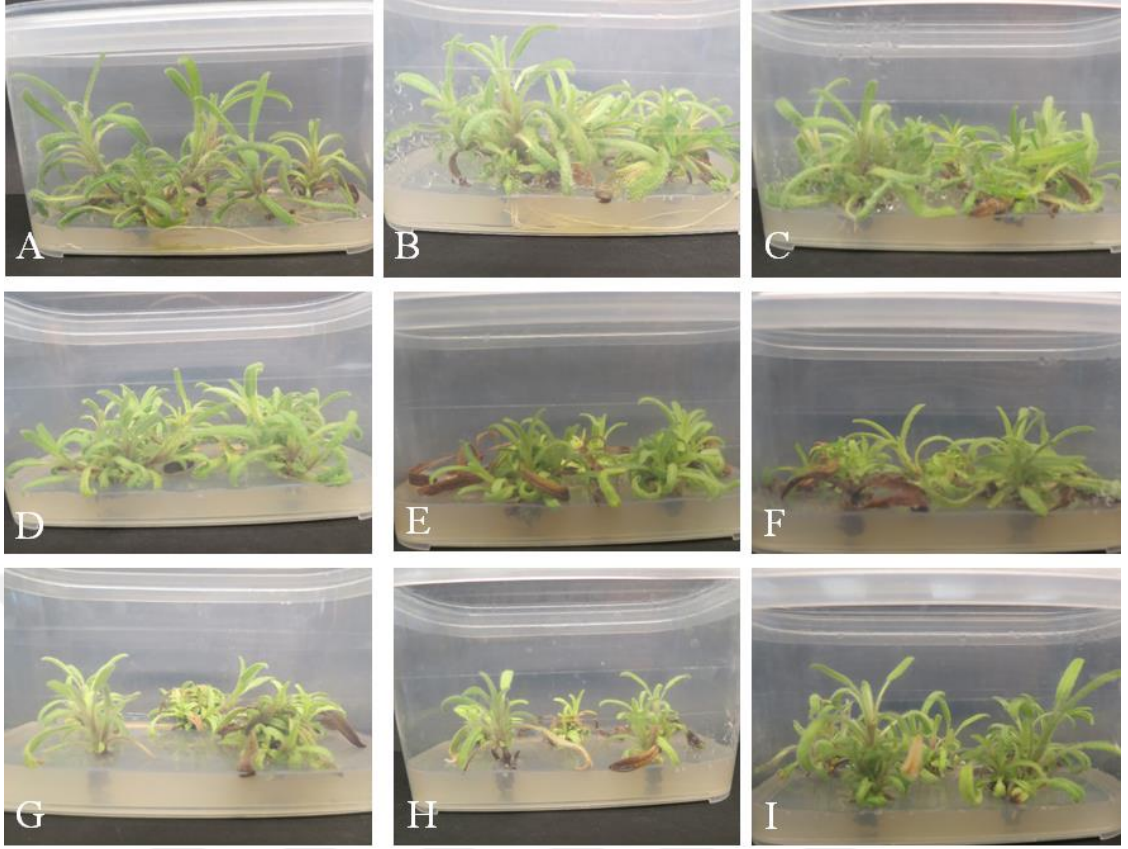
Çizelge 4.15 Farklı BAP+Kin dozlarının *S. chrysophylla* türünde sürgün rejenerasyonuna ilişkin bazı karakterlerine ait ortalama değerler ve önemlilik grupları

BAP	Kin	NAA	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Boyu (cm)
0	0	0	100.00	2,20 ^H	4,56 ^A
1	0	0	100.00	4,40 ^D	3,94 ^B
2	0	0	100.00	5,60 ^B	3,24 ^{CD}
0	1	0	100.00	5,20 ^C	3,44 ^C
1	1	0	100.00	6,25 ^A	2,86 ^E
2	1	0	100.00	4,00 ^E	2,90 ^E
0	2	0	100.00	5,40 ^{BC}	2,48 ^F
1	2	0	100.00	2,60 ^G	3,04 ^{DE}
2	2	0	100.00	3,60 ^F	3,94 ^B
0	0	0.5	100.00	1,40 ^H	2,36 ^D
1	0	0.5	100.00	1,60 ^G	1,40 ^G
2	0	0.5	100.00	1,80 ^F	1,64 ^F
0	1	0.5	100.00	2,40 ^E	2,60 ^C
1	1	0.5	100.00	3,80 ^A	2,66 ^C
2	1	0.5	100.00	2,75 ^C	3,15 ^A
0	2	0.5	100.00	2,60 ^D	2,38 ^D
1	2	0.5	100.00	3,60 ^B	2,16 ^E
2	2	0.5	100.00	2,50 ^{DE}	2,85 ^B

Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak fark yoktur.

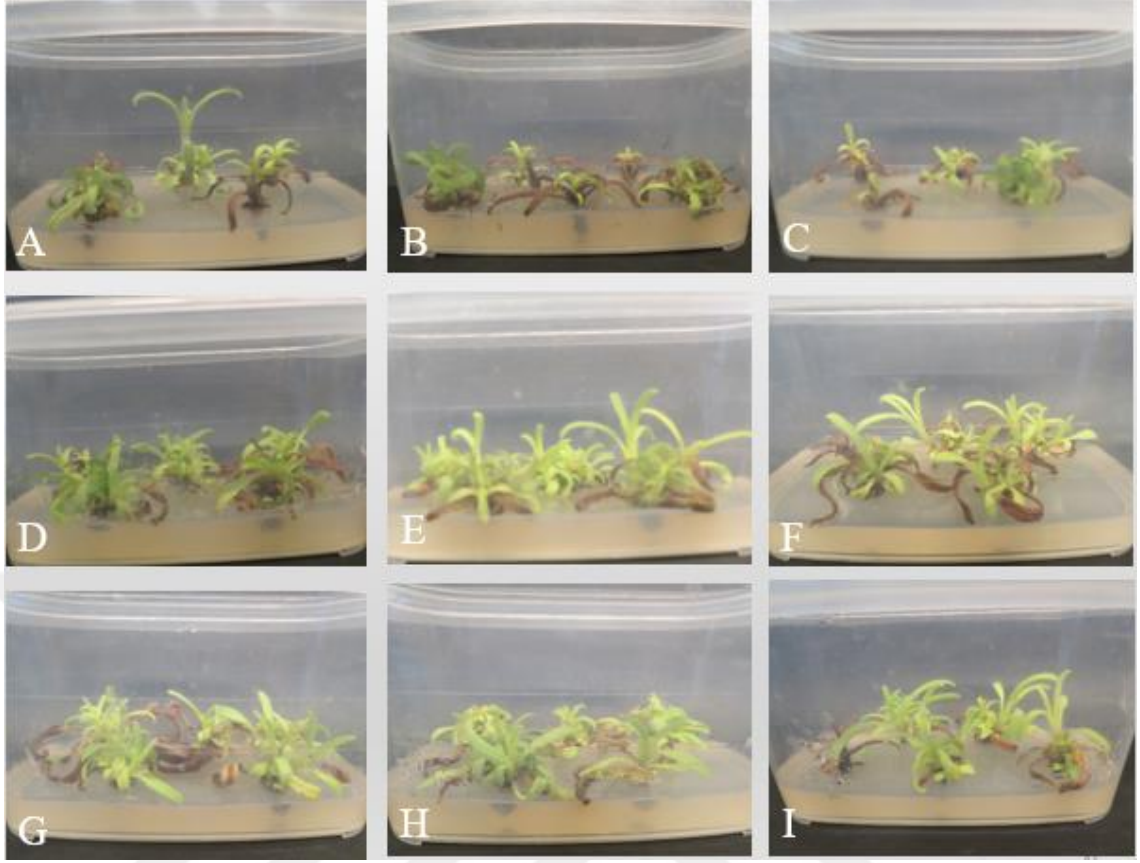
Çizelge 4.15'e bakıldığında, incelenen karakterlerin farklı hormon kombinasyonlarında önemli oranda değiştiği görülmektedir (Şekil 4.16). Genel olarak BAP ve Kin dozları arttıkça EBSS'nin arttığı; ancak bu artışın sürekli olmadığı görülmektedir. Nitekim en yüksek EBSS (6,25 adet) 1×1 BAP×Kin interaksiyonunda elde edilirken, bunu 2 mg/L BAP uygulaması takip etmiştir. Kinetin bireysel olarak uygulandığında EBSS'yi arttırırken, BAP varlığında artan Kinetin dozları EBSS'nin azalmasına neden olmuştur. Bunun yanında, artan BAP ve Kin dozlarında SB değerlerinde azalma görülmüştür. En uzun sürgün boyu (4,56 cm) BAP ve Kinetin uygulanmayan ortamdan ölçülürken, 2 mg/L Kin uygulamasından en düşük SB ölçülmüştür.

BAP+Kin+NAA uygulaması da, incelenen özellikler üzerinde önemli derecede olumsuz etki yapmıştır (Çizelge 4.15, Şekil 4.17). Nitekim NAA uygulaması olmadan yapılan kültürde, artan BAP dozlarında EBSS % 154 artarken, NAA uygulaması sonucu artan BAP dozlarında bu değer % 28 artış göstermiştir.



Şekil 4.16 Farklı BAP ve Kin dozlarının *S. chrysophylla* türünde 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonuna etkisi

- A: Kontrol
- B: 1 mg/L BAP
- C: 2 mg/ L BAP
- G: 2 mg/L Kin
- H: 1 mg/L BAP + 2 mg/L Kin
- I: 2 mg/L BAP + 2 mg/L Kin



Şekil 4.17 Farklı BAP, Kin ve 0.5 mg/L NAA dozlarının *S. chrysophylla* türünde 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonuna etkisi

- A: 0.5 mg/L NAA
 B: 1 mg/L BAP + 0.5 mg/L NAA
 C: 2 mg/ L BAP + 0.5 mg/L NAA
 G: 2 mg/L Kin + 0.5 mg/L NAA
 H: 1 mg/L BAP + 2 mg/L Kin + 0.5 mg/L NAA
 I: 2 mg/L BAP + 2 mg/L Kin + 0.5 mg/L NAA

4.2.2.3 *S. euphratica* var. *euphratica* türünde sürgün rejenerasyonu çalışmaları

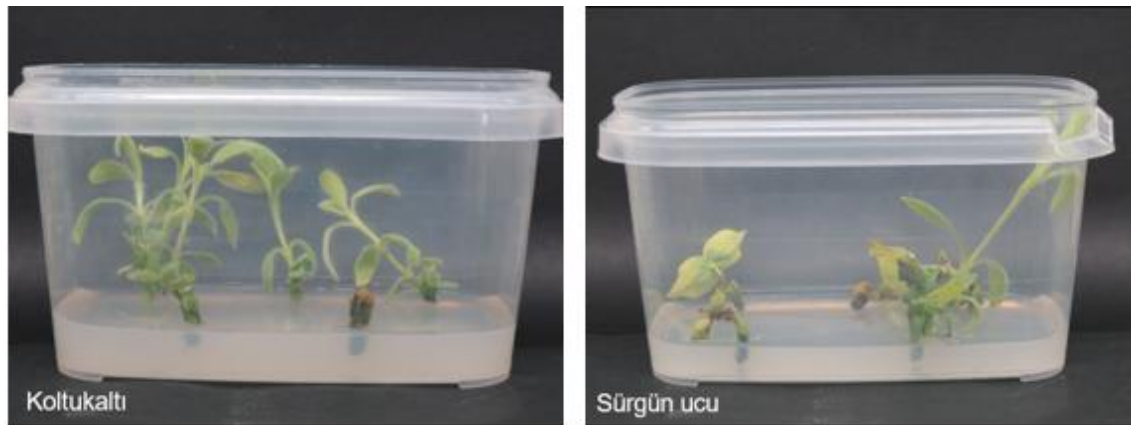
S. euphratica var. *euphratica*' da da benzer olarak, tarlada bulunan bitkilerden izole edilen koltukaltı ve sürgün ucu eksplantları öncelikle farklı BAP (0,1 ve 2 mg/L) Kin (0, 1 ve 2 mg/L) ve NAA (0 ve 0,5 mg/L) içeren 3 ml/L PPM ilave edilen MS besin ortamlarında 5 tekerrürlü olarak 6 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Ancak, *S. albimaculata* ve *S. chrysophylla*'da olduğu gibi hormon uygulanan ortamlarda tüm eksplantların öldüğü görülmüştür. Bu sebeple, denemelerde hormon uygulamasından vazgeçilip, eksplantlar 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında yine 5 tekerrürlü olarak

6 hafta süreyle kültüre alınmışlardır. Çizelge 4.16'da *S. euphratica* var. *euphratica* türünün koltukaltı ve sürgün ucu olmak üzere iki farklı eksplantının 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamındaki sürgün rejenerasyonuna ilişkin değerleri verilmektedir.

Çizelge 4.16 *S. euphratica* var. *euphratica* türünün farklı eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonuna ilişkin değerleri

Eksplant Tipi	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Boyu (cm)
Koltukaltı	100.00	1,11	3,50
Sürgün ucu	100.00	1,04	4,10

Çizelgeden de görüleceği üzere, EBSS bakımından koltukaltı eksplantı sürgün ucu eksplantına göre daha yüksek değerler vermiştir. SB bakımından ise sürgün ucu eksplantı daha yüksek değerleri vermiştir. Sürgün ucu eksplantından gelişen sürgünlerin çiçeklenme eğiliminde olması, EBSS değerlerinin sürgün ucu eksplantında daha düşük olmasının temel sebebi olabilir. Koltukaltı ve sürgün ucu eksplantı arasındaki bu farklar Şekil 4.18'de de açıkça görülebilmektedir.



Şekil 4.18 *S. euphratica* var. *euphratica* türüne ait koltukaltı ve sürgün ucu eksplantlarının 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamındaki rejenerasyonu

4.2.2.4 *S. nydeggeri* türünde sürgün rejenerasyonu çalışmaları

In vivo bitkilerden izole edilen sürgün ucu eksplantları belirtilen sterilizasyon protokolüyle steril edildikten sonra farklı BAP (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 ve 2.0 mg/L), Kin (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 ve 2.0 mg/L) ve TDZ (0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 ve 2.0 mg/L) içeren 3 ml/L PPM ilave edilen MS besin ortamında 6 hafta süreyle kültüre alınmıştır. Ancak, Kin ve TDZ uygulamalarında yine eksplantlarda sağlıklı gelişme olmamış, hatta birçoğunda ölüm görülmüştür. Dolayısıyla, Kin ve TDZ dozlarına ilişkin veriler sağlıklı olmayacağı düşüncesiyle değerlendirmeye alınmamıştır. Farklı BAP dozlarında *S. nydeggeri* türünde incelenen karakterlere ait varyans analiz sonuçları ve ortalama değerler çizelge 4.17 ve 4.18’de verilmiştir.

Çizelge 4.17 Farklı BAP dozlarının *S. nydeggeri* türünde sürgün rejenerasyonu bakımından incelenen özelliklere ait varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması			
		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	F	Sürgün Boyu (cm)	F
BAP	8	1.033	14.15**	0.272	1.74
Hata	16	0.073		0.156	
Genel	19	0.368		0.192	
C.V.(%)		11.5		17.7	

** Ortalamalar arasında istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli fark vardır.

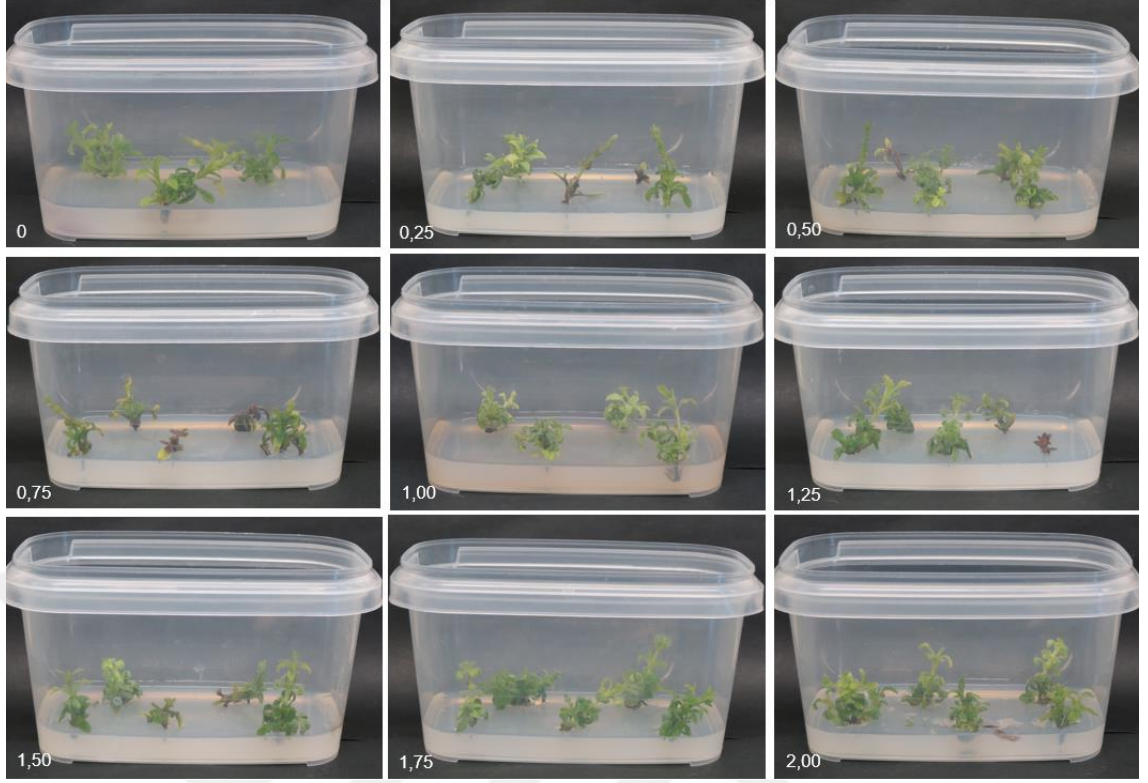
Çizelge 4.17’de görüldüğü gibi, farklı BAP dozları EBSS üzerine istatistiki olarak % 1 düzeyinde önemli etki yaparken, SB üzerine BAP dozlarının etkisi istatistiki olarak önemli olmamıştır.

Çizelge 4.18 Farklı BAP dozlarının *S. nydeggeri* türünde sürgün rejenerasyonu bakımından incelenen özelliklere ait ortalama değerleri ve önemlilik grupları

BAP Dozları (mg/L)	Rejenerasyon Oranı (%)	Eksplant Başına Sürgün Sayısı (Adet)	Sürgün Boyu (cm)
0	100.00	1.60 ^D	1.80
0.25	100.00	1.50 ^D	2.70
0.50	100.00	2.30 ^{BC}	2.50
0.75	100.00	2.00 ^C	2.10
1.00	100.00	3.40 ^A	2.00
1.25	100.00	2.30 ^{BC}	2.10
1.50	100.00	2.60 ^B	2.60
1.75	100.00	2.60 ^B	2.10
2.00	100.00	2.70 ^B	2.20

Aynı harflerle gösterilen ortalamalar arasında istatistiki olarak fark yoktur.

Çizelge 4.17'den görüleceği üzere. EBSS bakımından en yüksek değer 1.00 mg/L BAP uygulamasından elde edilmiştir. SB değerleri de farklı BAP dozlarında değişmiş; ancak bu değişim istatistiki olarak önemli olmamıştır. Bununla birlikte, düşük BAP dozlarında en uzun sürgün boyu ölçülmüştür. Farklı BAP dozlarının MS ortamında sürgün rejenerasyonuna etkisi şekil 4.19'da gösterilmiştir.



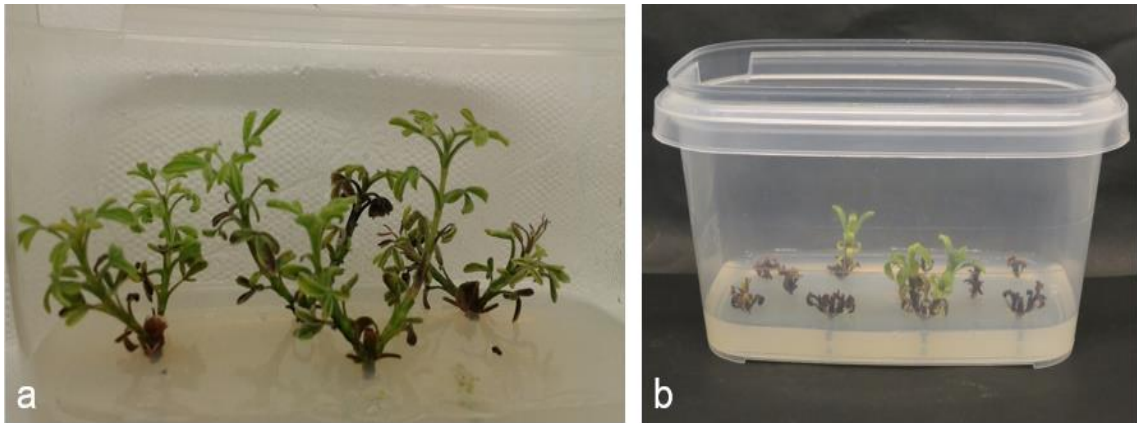
Şekil 4.19 Farklı BAP dozlarının *S.nydeggeri* türü için 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında sürgün rejenerasyonuna etkisi

Bulgular toplu halde değerlendirildiğinde, teze konu olan türlerin büyüme düzenleyicilerine tepkilerinin farklı olduğu söylenebilir. Nitekim *S. albimaculata* uygulanan BAP hormonundan olumsuz etkilenirken, BAP dozunun belli bir noktaya kadar artışı *S. chrysophylla* ve *S. nydeggeri* türlerinde EBSS'yi arttırmıştır. Bunun yanında, artan BAP dozlarında EBSS artarken, SB değerleri de genel olarak azalmaktadır. Bulduğumuz bu sonuçlar diğer *Salvia* türleri üzerinde çalışan araştırmacıların bulgularıyla örtüşmektedir. Nitekim Hosoki ve Tahara (1993) *Salvia leucantha* üzerinde yaptıkları çalışmada BAP dozlarının artmasına bağlı olarak sürgün sayısının arttığını; ancak sürgün boyunun kısaldığını tespit etmişlerdir. Yine. Misic vd. (2006) *Salvia bracyodon* türü üzerinde yaptığı çalışmada BAP hormonunun sürgün oluşumunda TDZ'ye göre daha etkili olduğunu belirlemişlerdir. *Salvia splendens* üzerinde çalışan Sharma vd. (2014) yine benzer olarak sürgün oluşumu üzerine BAP hormonunun daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir. Yine, yaptığımız çalışmalarda kullanılan BAP ve Kin hormonu yanında NAA 'nın varlığında sürgün oluşumunun yavaşladığı ve sürgün boylarının da kısaldığı belirlenmiştir. Bu sonuç yine Mederos-

Molina vd. (1997)'nin bulgularıyla desteklenmektedir. Nitekim araştırcılar BAP ve NAA dozlarının artmasıyla sürgün oluşunun gerilediğini ve oluşan sürgünlerin de kısa kaldığını tespit etmişlerdir. Artan hormon dozlarının incelenen karakterler üzerindeki bu olumsuz etkileri, hormonların yüksek dozlarda bitkiler üzerinde stres meydana getirmesiyle açıklanabilir. Bunun yanında, Skala vd. (2007) artan BAP dozlarında sürgün sayısında azalmalara neden olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla, bizim bulgularımız Skala vd. (2007)'nin bulgularıyla çelişmektedir. Araştırcıların bulguları arasındaki bu farklılıkların temel sebebi olarak üzerinde çalışılan bitki türünün farklılığı gösterilebilir.

4.3 Türler Üzerinde Hızlı Çoğaltım Çalışmaları

Sürgün rejenerasyonu sonunda elde edilen steril bitkilerden izole edilen eksplantlarla yeni steril bitkiler elde etmek doku kültürü yönteminin en önemli sonucunu oluşturur. Böylelikle sonraki doku kültürü çalışmaları için hem *in vivo* bitkilere olan bağlılık ortadan kalkacak hem de önemli bir gen kaynağının devamı sağlanacaktır. Ancak çalışmamızın bu noktasında önemli problemlerle karşılaşılmıştır. Nitekim *S. chrysophylla* dışında diğer türlerin hızlı çoğaltımında başarılı olunamamıştır. Bir diğer deyişle, rejenerasyon çalışmaları sonucunda elde edilen sürgünlerden izole edilen eksplantlar, çoğaltım için alt kültüre alınan ortamda gelişimlerine devam edememektedir. Şekil 4.20'de bu durum açıkça görölmektedir.



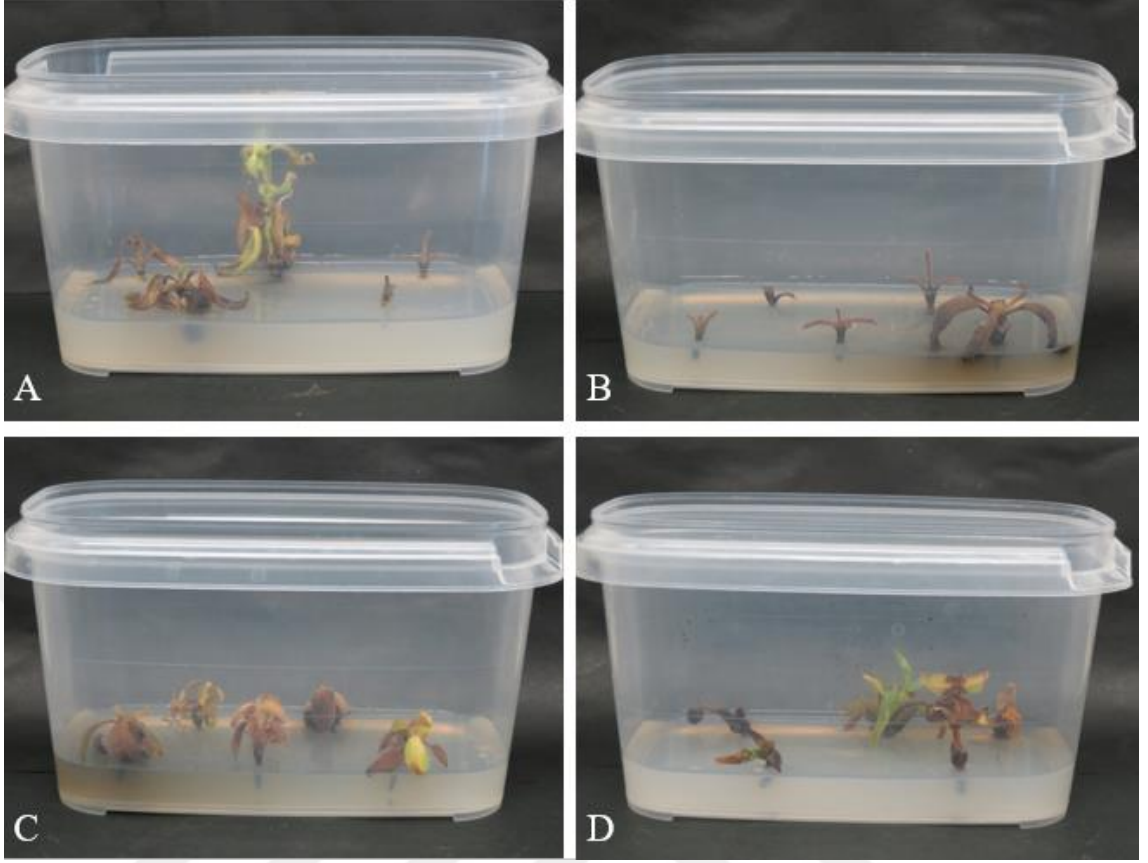
Şekil 4.20 *S. albimaculata* türünde elde edilen sürgünlerden izole edilen eksplantların hızlı çoğaltım için alt kültüre alındığı 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında ölmesi

Şekil 4.20’de görüldüğü gibi, 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında kültüre alınan *S. albimaculata*’ya ait koltukaltı eksplantından sürgünler elde edilmiştir (Şekil 4.20a). Ancak, bu steril sürgünlerin çoğaltımı için izole edilen koltukaltı eksplantları yine aynı ortamda alt kültüre alınmış; ancak kültüre alınan eksplantların tamamına yakını ölmüştür. Dolayısıyla, elde edilen steril sürgünlerden yeni sürgünler elde etmek suretiyle hızlı çoğaltım yapılamamıştır.

Benzer sonuçlar *S. euphratica* var. *euphratica*’da da görülmüştür. 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında koltukaltı eksplantından elde edilen sürgünlerden hızlı çoğaltım için izole edilen koltukaltı eksplantları, tekrar aynı ortamda kültüre alınmışlar; ancak eksplantlar bu ortamda canlılıklarını devam ettirememişlerdir. Bundan dolayı da, elde edilen steril sürgünlerin devamı sağlanamamıştır. Ortama ilave edilen PPM’den kaynaklanan stres, bu durumun sebebi olarak düşünülmüş ve PPM ortama değişik dozlarda ilave edilerek denenmiştir. Ancak, PPM ilavesi yapılmayan MS ortamında da eksplantların öldüğü görülmüştür (Şekil 4.22). Sonuç olarak, *S. euphratica* var. *euphratica* türünün de doku kültüründe devamı sağlanamamıştır.



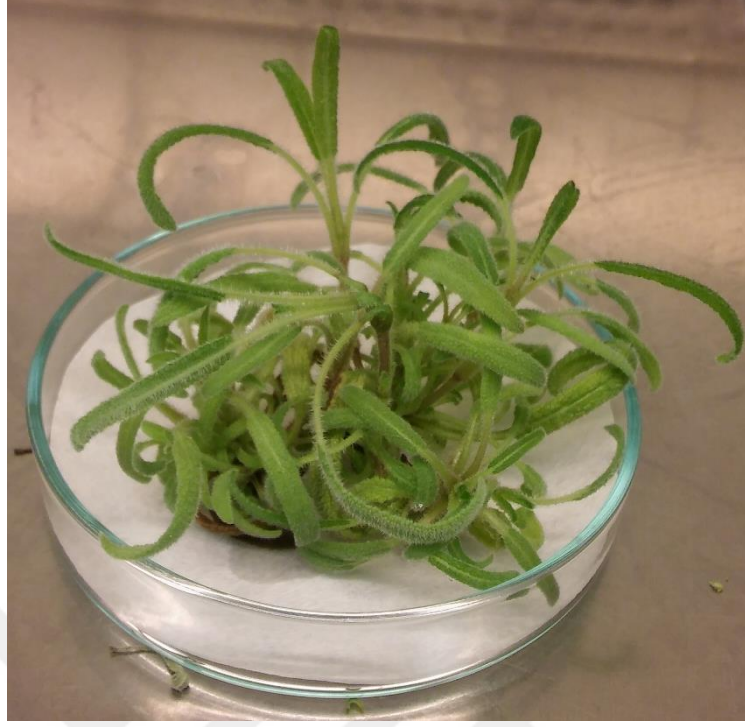
Şekil 4.21 *S. euphratica* var. *euphratica*’ya ait koltukaltı eksplantından 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında elde edilen sürgünler



Şekil 4.22 Elde edilen sürgünlerden izole edilerek farklı dozlarda PPM içeren MS ortamında kültüre alınan *S.euphratica* var. *euphratica*'ya ait koltukaltı eksplantları

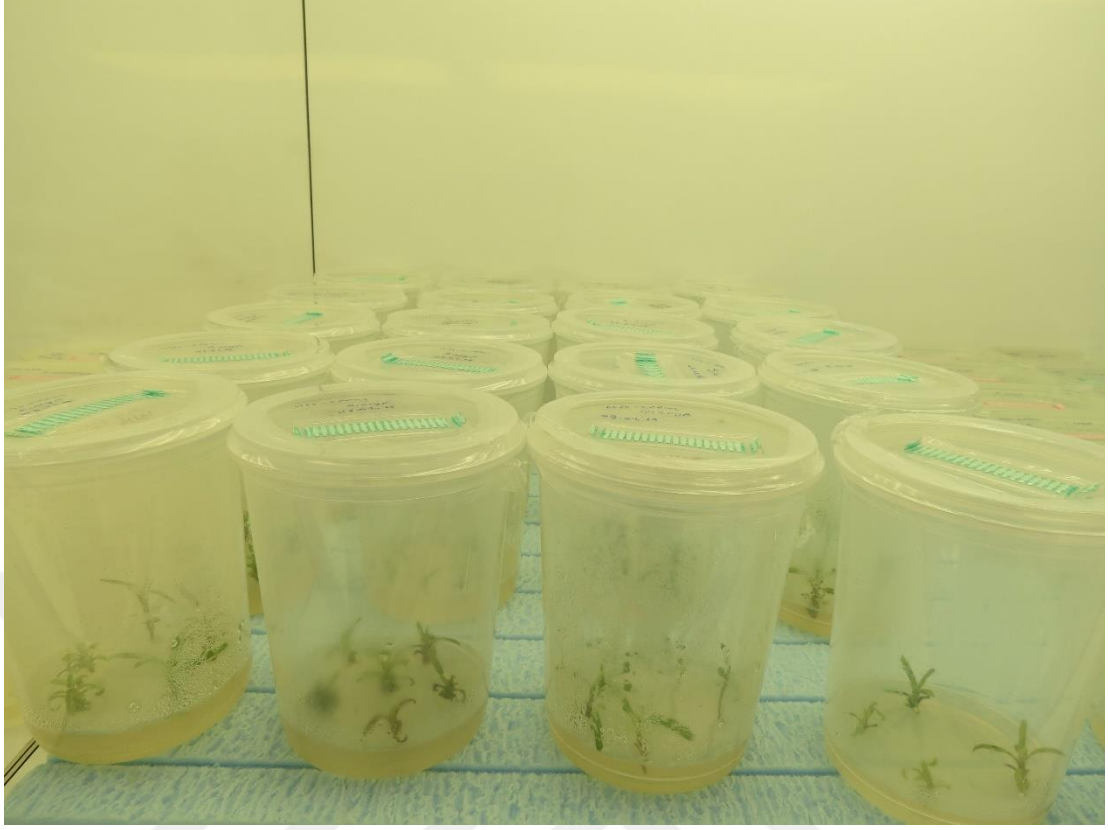
- A: PPM içermeyen MS ortamı
B: 1 ml/L PPM ilave edilen MS ortamı
C: 2 ml/L PPM ilave edilen MS ortamı
D: 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamı

Hızlı çoğaltım konusunda en başarılı sonuçlar *S. chrysophylla* türünden alınmıştır. Bir başka deyişle, rejenerasyon çalışmaları sonucu *S. chrysophylla* türünden elde edilen sürgünlerden izole edilen eksplantlar ile çok sayıda yeni steril sürgünler elde edilebilmiştir. Şekil 4.23'te *S. chrysophylla* türüne ait koltukaltı eksplantından 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamından elde edilen sürgünler gösterilmiştir. Bu steril sürgünlerden izole edilen koltukaltı eksplantlar ile hızlı çoğaltım kolaylıkla yapılabilmektedir.



Şekil 4.23 *S. chrysophylla* türüne ait koltukaltı eksplantından 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında elde edilen sürgünler

Şekil 4.24'te gelişen bu sürgünlerden izole edilen eksplantların 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında hızlı çoğaltımı gösterilmektedir. Kültüre alınan eksplantlarda yine ölüm görülse de hızlı çoğaltım başarıyla yapılabilmektedir. Dolayısıyla, 6 haftalık kültürün sonunda çok sayıda steril sürgün elde edilebilmektedir.



Şekil 4.24 Rejenerasyon çalışmalarında elde olan *S. chrysophylla* türüne ait sürgünlerden izole edilen koltukaltı eksplantların 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamında hızlı çoğaltımı

4.4 Sürgünlerin Köklendirilmesi ve Aklimatizasyonu

Doku kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi ve tarla koşullarına aktarılması, yine bitkilerin devamlılığının sağlanması için önem taşımaktadır. Bu tezde rejenerasyon çalışmaları sonucunda sadece *S. chrysophylla* türünde köklenebilecek sürgün elde edilebildiği için sadece *S. chrysophylla* türünün köklenmesi üzerinde çalışılmıştır.

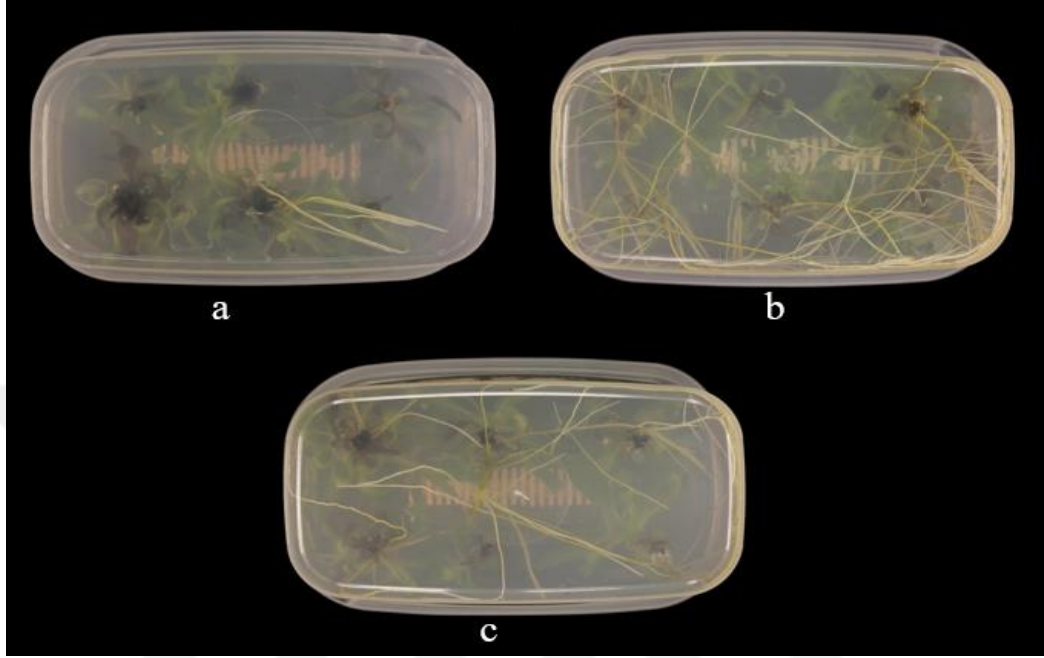
4.4.1 *S. chrysophylla* türünün köklendirilmesi

Yapılan rejenerasyon çalışmalarında sadece *S. chrysophylla* türünde köklendirme çalışmaları yapılabilmektedir. Bu türe ait elde edilen sürgünlerin oksin kullanılmayan PPM ilaveli MS ortamında köklendikleri görülmüştür. Nitekim herhangi bir kontaminasyon riskine karşı çalışmanın her aşamasında, kullanılan ortama PPM ilavesi yapılmıştır.

Bunun yanında, kontaminasyon riskine karşı kullanılan PPM'in, köklenmeye alınan sürgünler üzerinde baskı oluşturup oluşturmadığını görmek için de ayrıca ortamlara değişik dozlarda (0, 2 ve 3 ml/L) PPM ilavesi yapılmıştır. Bunun sonucunda ise, PPM ilavesi yapılmayan ortamda kontaminasyon görülmemekle birlikte, ortama ilave edilen PPM'in sürgünlerin köklenmesi üzerine olumlu etki yaptığı görülmüştür. Nitekim 2 ml/L PPM dozunun ilave edildiği ortamdaki sürgünlerin daha fazla oranda köklendikleri gözlenmiştir (Şekil 4.25). Esasında PPM, doku kültürü çalışmalarında bakteri, fungus ve endogen kaynaklı kontaminasyonu önlemek için besin ortamlarında kullanılan bir biosittir ve köklenme üzerine doğrudan bir etkisi yoktur. PPM'in bu çalışmada köklenme üzerine gösterdiği bu dolaylı etki, bitkinin bünyesinde bulunan mikroorganizmaların faaliyetini engellemesi suretiyle olabilir. Nitekim şekil 4.25a'da görüleceği üzere, PPM ilavesi yapılmayan MS ortamında yapraklarda ve sürgünlerin taban kısımlarında nekroz oluşumu görülmektedir. PPM'siz MS ortamında görülen bu nekrozlar, ortama PPM ilave edilmesiyle önemli oranda azalmıştır (Şekil 4.25b-4.25c). Bitkilerin doğal yapısında bulunan ya da ortama bulaşan mikroorganizmalar ve ortamdaki kimyasallar, oluşan bu nekrozların sebebi olabilmektedir. Dolayısıyla da, ortama PPM ilavesiyle bu sürgünlerde endogen olarak bulunan mikroorganizmaların faaliyeti engellenmiş olup, nekroz olayında önemli oranda azalma olmuştur. Sürgünlerin yaprak ve taban kısımlarında oluşan nekrozlar ise, bitkinin bünyesinde doğal olarak bulunan oksinlerin kök bölgesinde aktif olmasına engel olmaktadır. Nitekim Went and - Imann (1937) oksinlerin bitkilerde genç yapraklarında sentezlenip, iletim demetleriyle bitkinin diğer kısımlarına ve kök bölgesine taşındığını bildirmişlerdir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, MS ortamına ilave edilen PPM dozları *S. chrysophylla* türünde sürgünlerin köklenmesini dolaylı olarak etkilemiştir. Nitekim 2 ml/L PPM ilavesi yapılan MS ortamda köklenmeye alınan sürgünlerde, diğer ortamlardaki sürgünlere göre daha yoğun köklenme gerçekleşmiştir (Şekil 4.25b). Ortama 3 ml/L PPM ilave edilmesi durumunda köklenmenin azalması, PPM'in sürgünler üzerinde stres oluşturmasından kaynaklanmış olabilir ki, bu ortamdaki sürgünlerin taban kısımlarında yine nekroz olduğu görülmektedir. Zira 0.5 ve 1 ml/L PPM dozunun morfoloksik bir etkisinin olmadığı Niedz (1988) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmada da ortama ilave

edilen 2 ml/L PPM dozunun *S. chrysophylla* türü üzerinde morfoloksik etki yapmadığı görülmüştür.



Şekil 4.25 Ortama ilave edilen PPM dozlarının *S. chrysophylla* türünde köklenme üzerine dolaylı etkisi

- a. Kontrol (PPM ilavesi yapılmaya MS ortamı)
- b. 2 ml/L PPM ilave edilen MS ortamı
- c. 3 ml/L PPM ilave edilen MS ortamı



Şekil 4.26 *S. chrysophylla* türüne ait köklenmiş bir sürgün

Ortama ilave edilen 2 ml/L PPM dozunun köklenme üzerindeki bu dolaylı etkisinden sonra, *S. chrysophylla* sürgünleri 2 ml/L PPM ilaveli MS ortamında köklendirilmiştir. *S. chrysophylla* türüne ait köklenmiş bir sürgün şekil 4.26'da gösterilmiş olup, köklenmeye ilişkin veriler çizelge 4.19'da verilmiştir.

Çizelge 4.19 *S. chrysophylla* türüne ait sürgünlerin 2 ml/L PPM ilave edilen MS ortamındaki köklenmelerine ilişkin veriler

Köklenen Sürgün (%)	51.2
Köklenmeyen Sürgün (%)	17.6
Sürgünlerde Ortalama Kök Uzunluğu (cm)	13.1
Nekrotik Sürgün (%)	31.2

Çizelgeye göre, köklenmeye alınan sürgünlerin % 51.2'ü köklenmiş olup, sürgünlerdeki ortalama kök uzunluğu 13.1 cm olarak belirlenmiştir. Bunun yanında, köklenmeye alınan sürgünlerin % 31.2'sinde ölüm gözlenmiş ve % 17.6' sı köklenmemiştir.

Köklenen bu sürgünler öncelikle şekil 4.27' de görüldüğü gibi. 1:1 oranında torf-perlit karışımında saksıya alınarak sıcaklık ve nemi kontrollü iklim odasına alınmıştır. Henüz dış ortam şartlarına alışmamış bu bitkiciklerin aniden su kaybederek ölmesinin engellenmesi için saksıların üzerine şeffaf naylon poşet geçirilerek nem oranının yüksek tutulması sağlanmıştır. Saksı üzerindeki naylon poşetlerde belli aralıklarla (4-5 gün) delikler açılarak nem oranı yavaş yavaş azaltılmış ve en sonunda saksı üzerindeki naylon poşet tamamen kaldırılmıştır.



Şekil 4.27 Köklendikten sonra 1:1 torf-perlit karışımında saksıya alınıp kontrollü iklim odasına alınan *S. chrysophylla* türüne ait bitkiler

Doku kültürü çalışmalarında saksıya aktarılan bitkilerin canlılığını devam ettirmesi de önemli bir husustur. Nitekim bu çalışmada saksıya alınan bitkilerin % 54.1'i canlılığını devam ettirmiş olup, % 45.9'unda ölüm gerçekleşmiştir.

Saksıya aktarıldıktan sonra canlılığını devam ettiren ve kontrollü şartlarda iklim odasında gelişmesini sürdüren bitkiler şekil 4.28'de görülmektedir. Bitkilerin saksıda gelişmeleri devam ettikçe saksılar küçük geldiği için bitkiler daha büyük saksılara aktarılmıştır (Şekil 4.29). Bitkiler tarlaya aktarılmadan önce de dış koşullara alıştırmak için sera koşullarında 2-3 hafta süreyle bekletilmiş olup, ilkbaharda havaların ısınmasıyla uygun olan ilk zamanda (14.05.2016) 80 × 80 cm sıra sralığında tarlaya şaşırtılmışlardır (Şekil 4.30). Tarlaya şaşırtılan bitkilerin % 100'ü tutmuştur. Tarlada tutma oranının yanı sıra bitkilerin zarar görmeden kıştan çıkabilmeleri de önemli bir

durumdur. Nitekim tarlaya şaşırttığımız bu bitkiler kış şartlarından etkilenmeden baharda tekrar uyanmışlardır (Şekil 4.32).



Şekil 4.28 Saksıya aktarılan ve gelişmelerine devam eden *S. chrysophylla* türüne ait bitkiler



Şekil 4.29 Büyük saksılara alınan bitkiler (*S. chrysophylla*)



Şekil 4.30 *S. chrysophylla* türünün tarlaya şaşırtılması (14.05.2016)



Şekil 4.31 Tarlaya şaşırtılan *S. chrysophylla* türüne ait bitkilerden iki ay sonraki görünüm (15.07.2016)



Şekil 4.32 Kıştan zarar görmeden çıkan ve baharda uyanan *S. chrysophylla* türüne ait bitkiler
(02.05.2017)

5. SONUÇ

TÜBİTAK tarafından “Öncelikli Alanlar (2211-C)” kapsamında desteklenen bu tez çalışmasında ülkemizde değişik tehlike kategorilerinde bulunan ve klasik yollarla çoğaltımında problemler yaşanan endemik dört *Salvia* türünün doku kültürü yoluyla çoğaltım olanakları araştırılmıştır. Yapılan literatür taramalarında çalışılan bu türler üzerinde yapılmış herhangi bir doku kültürü çalışmasına rastlanılmamıştır. Dolayısıyla bu tez çalışması teze konu olan türler üzerinde yapılan ilk doku kültürü çalışması olma özelliği taşımaktadır. Bundan dolayı da, gerek belirlenen sterilizasyon protokolü ve gerekse rejenerasyon metodları açısından sonraki araştırmalar için temel bir çalışma olması bakımından büyük önem taşımaktadır.

Teze konu olan türlerin tohumlarında önemli oranda çimlenme problemi olduğu için başlangıç materyali olarak tohum yerine *in vivo* olarak gelişen bitkilerden izole edilen eksplantlar kullanılmıştır. Başlangıç materyali dış koşullardan getirilen bu eksplantlar olduğu için doku kültürü çalışmalarının ilk basamağı olan sterilizasyonda önemli problemlerle karşılaşmıştır. Çalışılan kısım yeşil bitki olduğundan sterilizasyonda kullanılan dezenfektanların dozu ve süresi büyük önem taşımaktadır. Dolayısıyla, bu çalışmada dezenfektan olarak % 70’lik ethanol, % 5 sodyum hipoklorit içeren ticari çamaşır suyu, Tween 20, civa klorür ve Plant Preservative Mixture (PPM) kullanılmıştır. % 70’lik ethanol ve civa klorürün en düşük dozlarının bile eksplantlarda ölümcül etki oluşturmasından dolayı bu dezenfektanlar ile başarı elde edilememiştir. Çamaşır suyu ve PPM de tek başlarına yeterli olmayıp birlikte uygulanmaları ve besin ortamına PPM ilave edilmesi gerektiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, üzerinde çalışılan türlere göre değişmekle birlikte, Tween 20 ön uygulamasına ilaveten *S. albimaculata* dışındaki türlerde çamaşır suyu ve PPM kombinasyonu ile sterilizasyon sağlanmıştır. *S. albimaculata* ise çamaşır suyu dozlarından olumsuz etkilendiği için sadece PPM uygulaması ile sterilizasyon sağlanmıştır.

Sterilizasyon protokollerinin belirlenmesinden sonra öncelikle en uygun besin ortamını belirlemek için tüm türler farklı besin ortamlarında (MS, Gamborg B5, FN ve NN) kültüre alınmıştır. *S. albimaculata* ve *S. chrysophylla* dışındaki türlerde kültüre alınan

tüm eksplantlar besin ortamında öldüğü için, bu türlere ait veri alınamamıştır. *S. albimaculata* ve *S. chrysophylla* türlerinde ise MS ortamı sürgün rejenerasyonu için en uygun besin ortamı olarak belirlenmiştir. En uygun ortamın belirlenmesinden sonra sürgün rejenerasyonu çalışmalarına geçilmiştir. Bunun için, öncelikle tüm türler farklı BAP (0, 1 ve 2 mg/L), Kin (0, 1 ve 2 mg/L) ve NAA (0 ve 0.5 mg/L) dozlarında kültüre alınmış; ancak tüm eksplantlarda ölüm olduğu için veri elde edilememiştir. Bunun yanında, tüm türlerde hormon kullanılmayan ortamlarda eksplantların daha iyi geliştiği gözlenmiş ve sonraki çalışmalarda hormon kullanılmamıştır.

Rejenerasyon çalışmalarında incelenen karakterler bakımından en iyi sonuçlar *S. chrysophylla* türünden alınmıştır.

Rejenerasyon çalışmalarından elde edilen sürgünlerin hızlı çoğaltımında da önemli problemlerle karşılaşmıştır. Nitekim özellikle *S. albimaculata*, *S. euphratica* var. *euphratica* ve *S. nydeggeri* türlerinde elde edilen steril sürgünlerden izole edilen eksplantlar, hızlı çoğaltım için kültüre alındıkları yeni ortamda canlılıklarını devam ettirememişlerdir. Bundan dolayı da türlerin devamı sağlanamamıştır. Elde edilen sürgünlerden hızlı çoğaltım konusunda da *S. chrysophylla* türü en iyi sonuçları vermiştir. Nitekim bu türün steril sürgünlerinden izole edilen eksplantlarla çok sayıda steril bitki elde edilebilmiştir. Bundan dolayı da sadece *S. chrysophylla* türü üzerinde köklenmeye gidilebilmiştir. Kontaminasyon riskine karşı besin ortamına ilave edilen 2 ml/L PPM'in *S. chrysophylla* türünde köklenme üzerine olumlu etki yaptığının tespit edilmesi üzerinde, köklendirme çalışmaları 2 ml/L PPM ilave edilen MS besin ortamında yapılmıştır. Yapılan bu köklendirme çalışmalarından alınan verilere göre, sürgünlerin % 51.2'sinin köklendiği belirlenmiş ve sürgünlerde ortalama kök uzunluğu 13.1 cm olarak ölçülmüştür. Köklenen sürgünler 1:1 oranında torf-perlit karışımına aktarılmış ve başarılı bir şekilde dış koşullara adapte olabilmişlerdir. İlkbahar ayında havaların ısınmasıyla da uygun zamanda köklü bitkiler tarlaya şaşırtılmış olup, tarlaya şaşırtılan bitkilerin % 100'ü tutmuş ve zarar görmeden kıştan çıkabilmişlerdir.

Yukarıda da bahsedildiği gibi, bu çalışma ülkemize endemik ve tehlike altındaki *Salvia* türleri üzerinde yapılan ilk doku kültürü çalışması olmasından dolayı sonraki

araştırmalara yön vermesi açısından önem taşımaktadır. Bu bağlamda, bu tez çalışmasında karşılaşılan problemler özet olarak aşağıda belirtilmiş ve bazı öneriler sunulmuştur.

- Başlangıç materyali tarladan getirilen yeşil bitkilerden izole edilmiş eksplantlar olduğu için sterilizasyon aşamasında önemli problemle karşılaşmıştır. Sterilizasyon metodunun belirlenebilmesi için çok sayıda deneme yapılmış; ancak yine de % 100 oranında başarı sağlanamıştır. Üzerinde çalışılan türlerin eksplant kaynağı olarak kullanılan *in vivo* bitkilerin tarlada sayıca az olması bu konuda daha geniş ölçekli çalışmalar yapılmasını engellemiştir. Özellikle gerek sterilizasyon çalışmaları ve gerekse rejenerasyon çalışmalarında en fazla problemle karşılaşılan *S. nydeggeri* türü tarlada sadece 2 adet bitki ile temsil edilmektedir. Dolayısıyla, eksplant kaynağının azlığının tez çalışması planlanırken öngörülememiş olması daha kapsamlı çalışmalar yapılmasını engellemiştir.
- Rejenerasyon çalışmalarında *S. chrysophylla* dışındaki türlerde kültüre alınan eksplantların büyük çoğunluğunda ölüm gözlenmiştir. *S. chrysophylla* türünde de ölüm görülmüş; ancak diğer türlere göre daha az oranda olmuştur. Özellikle *in vivo* bitkilerden izole edilen eksplantların kültüre alındığı ilk ortamda eksplantlardaki bu ölüm olayı daha fazla görülmüştür. Bu sorunun çözümüne yönelik bazı çalışmalar yapılmıştır; ancak yukarıda belirtilen nedenlerden dolayı konu üzerinde kapsamlı çalışmalar yapılamamıştır. Dolayısıyla, sonraki çalışmalarda bu türler tek tek ele alınıp, daha kapsamlı çalışmalarla bu sorun giderilmeye çalışılmalıdır.
- Çalışmalar sırasında karşılaşılan önemli problemlerden biri de, elde edilen steril bitkilerin devamlılığının sağlanamamasıdır. Nitekim *S. chrysophylla* türü dışındaki türlerde elde edilen steril sürgünlerden izole edilen eksplantlar kültüre alındıkları ortamda öldükleri için hızlı çoğaltım yapılamamıştır. Çalışılan türler üzerinde hızlı çoğaltımın yapılamaması *in vivo* bitkilere bağılılığı da devam ettirmiştir. *In vivo* bitkilerin tarladaki mevcudiyetinin de az olması bu sorunun

giderilmesi için çok yönlü çalışmalar yapılmasının önündeki en büyük engel olmuştur. Ayrıca, bu problem sadece bir türde değil, hemen hemen üzerinde çalışılan türlerin tamamında görüldüğü için zaman ve imkânlar da yetersiz kalmıştır. Dolayısıyla, bu türler üzerinde yapılacak sonraki çalışmalarda türlerin bireysel olarak çalışılması türler üzerinde bu sorunlara yönelik daha kapsamlı ve uzun süreli çalışmalar yapılması bakımından önemli olacaktır.

- Yapılan çalışmalardan alınan sonuçlara göre “bir bitkinin yetiştirilmesi ya da çoğaltılması tarlada kolay ise laboratuvar koşullarında da kolay; bu durum tarla şartlarında zor ise laboratuvar koşullarında da zor olmaktadır.” denilebilir. Nitekim teze konu olan türlerden tehlike düzeyi en kritik olan (EN) *S. nydeggeri* türü tarla koşullarında çok zor gelişen ve laboratuvar çalışmalarında da en fazla problemle karşılaşılan tür olmuştur. Bunun yanında, tarla koşullarında diğerlerine göre daha iyi gelişen ve diğerlerine göre çoğaltımı daha kolay olan *S. chrysophylla* türünün tehlike kategorisi “koruma önlemi gerektiren (CD)” sınıfında olup, laboratuvar koşullarında da en başarılı olunan türdür. Bu bağlamda pratik bir öneri yapmak gerekirse, gerek *Salvia* türleri ve gerekse diğer türler için bu durum göz önüne alınmalı, yapılacak çalışmalar zaman ve imkânlar açısından bu husus dikkate alınarak planlanmalıdır. Aksi halde, öngörülemeyen pek çok problemle karşılaşılması ihtimal dâhilindedir.

KAYNAKLAR

- Anonim, 2017a. Web Sitesi: www.bizimbitkiler.org.tr/v2/index.php#, Erişim Tarihi: 21.04.2017.
- Anonim, 2017b. Web Sitesi: www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Lamiaceae, Erişim Tarihi: 21.04.2017.
- Anonim, 2017c. Web Sitesi: biruni.tuik.gov.tr/bitkiselapp/bitkisel.zul, Erişim Tarihi: 21.04.2017.
- Arikat, N. A., Jawad, F. M., Karam, N. S. and Shibli, R. A. 2004. Micropropagation and acumulation of essential oils in the wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Scientina Horticulturae, 100, 193-202.
- Avcı, M. 2005. Çeşitlilik ve endemizm açısından Türkiye'nin bitki örtüsü. Coğrafya Dergisi, Sayı 13.
- Atalay, E. ve Erişen, S. 2014. Kritik endemik *Centaurea lycaonica*'nın *ex-situ* koruma kapsamında *in vitro* hızlı çoğaltımı. TÜBİTAK Proje No: 112 O 492, Konya.
- Baytop, T. 1984. Türkiye'de Bitkilerle Tedavi. İstanbul Üniversitesi. Yayın No: 3255. Eczacılık Fakültesi No: 40, İstanbul.
- Bausher, M. G. and Niedz, R. P. 1998. A discussion of *in vitro* contamination control of explants from greenhouse and field-grown trees. Proceedings of the Florida State Horticultural Society, 111, 260-263.
- Bueno, M., Sapio, O. D., Barolo, M., Villalonga, E. M., Busilacchi, H. and Severin, C. 2010. *In vitro* response of different *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae) explants. Molecular Medicinal Chemistry, 21, 125-126.
- Çakırlar, H., Tıpırdamaz, R. ve Ellialtıoğlu, Ş. 1994. Türkiye'de ticari değeri olan *Galanthus* (*G.elwesii* Hooker Fil. ve *G. ikariae* Baker) türlerinin doku kültürü yoluyla üretimi. TÜBİTAK Proje No: TBGAG-19/A, Ankara.
- Demirayak, F. 2002. Biyolojik Çeşitlilik-Doğa koruma ve sürdürülebilir kalkınma. Tübitak Vizyon 2023 Projesi Çevre Sürdürülebilir Kalkınma Paneli.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z. ve Adıgüzel, N. 2000. Türkiye bitkileri kırmızı kitabı. Türkiye Tabiatını Koruma Derneği ve Van Yüzüncüyıl Üniversitesi Yayınları, Ankara.
- Erdoğan, U. 2010. Tehlike altındaki *Silene sangaria* Coode&Cullen'in mikroçoğaltımı. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, 80 sayfa, Edirne.
- Erişen, S., Duran, A., Martin, E., Dinç, M., Yorgancılar, M., Atalay, E. ve Babaoğlu, M. 2009. Bazı endemik *Astragalus* L. (Leguminosae) türlerinin korunması ve tarımda kullanımı amacıyla doku kültürü ve sitogenetik çalışmalar. TÜBİTAK Proje No: 106 O 136.

- Finer, J. J., and Nagasawa, A. 1988. Plant Cell. Tissue & Organ Culture, 15, 125 – 136.
- Fu, Z., Wang, H., Hu, X., Sun, Z. and Han, C. 2013. The pharmacological properties of *Salvia* essential oils. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 3 (7), 122-127.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research, 50, 151-158.
- Gümüřçü, A., Uranbey, S., Çalışkan, M. ve Arslan, N. 2011. Genus endemik ve tehlike altındaki boya çiçeği (*Neotchihatchewia isatidea* (boiss.) rauschert)'nin kùltùre alınması, *in vitro* hızlı çoğaltım ile morfolojik ve molekùler karakterizasyonu. TÜBİTAK Proje No: 107 O 792, Konya.
- Gürbüz, B., İpek, A., Bingöl, M. Ü., Geven, F. ve Akgül, G. 2009. Ekonomik önemi olan bazı adaçayı (*Salvia* spp.) türlerinin kùltùre alınması ve uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi. TÜBİTAK Proje No: 106 O 477, Ankara.
- Huang, L. D. and Staden, J. V. 2002. *Salvia chamelaeagnea* can be micropropagated and its callus induced to produce rosmarinic acid. South African Journal of Botany, 68, 177-180.
- Hosoki, T. and Tahara, Y. 1993. In vitro propagation of *Salvia leucantha* Cav. HortScience, 28 (3), 226.
- Irina, G. 2008. Effects of different plant hormones on *Salvia officinalis* cultivated in vitro. International Journal of Botany, 4 (4), 430-436.
- Jan, T. and Khatoon, K. 2014. In vitro regeneration of *Salvia santolinifolia*. Pakistan Journal of Botany, 46 (1), 325-328.
- İpek, A. 2007. Tıbbi adaçayı (*Salvia officinalis* L.) hatlarında azotlu gübrelemenin herba verimi ve bazı özellikler üzerine etkileri. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, 90 sayfa, Ankara.
- Kandemir, N. 2003. The morphological, anatomical and karyological properties of endemic *Salvia hypargeia* Fich. & Mey. (Lamiaceae) in Turkey. Pakistan Journal of Botany, 35, 219-236.
- Kintzios, S., Nikolau, A. and Skoula, M. 1999. Somatic embryogenesis and in vitro rosmarinic acid accumulation in *Salvia officinalis* and *S. fruticosa* leaf callus cultures. Plant Cell Reports, 18, 462-466.
- Lemraski, M. G., Eftekhari, M., Faraji, M. and Zarrini, S. S. 2014. Study of callus induction in common sage (*Salvia officinalis* L.). International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 7 (7), 386-389.
- Marconi Patrica, L., Lopez Maria, C., De Meester, J., Bovjin, C. and Alvarez Maria, A. 2013. In vitro establishment of *Salvia hispanica* L. plants and callus. Biotechnologia Vegetal, 13 (4), 203-207.
- Mascarello, C., Mantovani, E. and Ruffoni, B. 2006. In vitro culture of several ornamental and medicinal *Salvia* species. Acta Horticulturae, 723, 375-380.

- Mederos-Molina, S., Amaro Luis, J. M. and Luis, J. K. 1997. *In vitro* mass propagation of *Salvia canariensis* by axillary shoots. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 66, 351-354.
- Mederos-Molina, S. 2004. *In vitro* callus induction and plants from stem and petiole eksplants of *Salvia canariensis* L. Plant Tissue Culture, 14 (2), 167-172.
- Mederos-Molina, S. 2006. Micropropagation of *Salvia broussonetii* Benth.- a medicinal plant species. Plant Tissue Culture & Biotechnology, 16 (1), 19-23.
- Mirici, S., Baktır, İ., Nasırcılar, A. G., Eren, Ö. ve Karagüzel, Ö. 2008. Ekonomik potansiyele sahip bazı endemik soğanlı bitkilerin *in vitro* koşullarda hızlı çoğaltımı. TÜBİTAK Proje No: 105 O 246, Antalya.
- Misic, D., Grubisic, D. and Konjevic, R. 2006. Micropropagation of *Salvia brahyodon* through nodal explants. Biologia Plantarum, 50 (3), 473-476.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15 (3), 473-497.
- Nakiboğlu, M. 1993. Bazı adaçayı (*Salvia*) türleri ve bu türlerin ekonomik önemi. Dokuz Eylül Üniversitesi Eğitim Bilimleri Dergisi, 6, 45-58.
- Niedz, R. P. 1998. Using isothiazolone biocides to control microbial and fungal contaminants in plant tissue culture. Horttechnology, 8 (4), 599-601.
- Niedz, R. P. and Bausher, M. 2002. Control of *in vitro* contamination of explants from greenhouse and field-grown trees. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 38, 168-171.
- Nitsch, J. P. and Nitsch, C. 1969. Haploids Plants from Pgrains. Science, 163, 85- 87.
- Özhatay, N., Koyuncu, M., Atay, S. ve Byfiled, A. 1997. Türkiye'nin doğal tıbbi bitkilerinin ticareti hakkında bir çalışma. Doğal Hayatı Koruma Derneği. ISBN:975-96081-9-7, 121 sayfa, İstanbul.
- Sallı, N. 1998. Bazı *Salvia* türlerinde kuruma nedenlerinin tesbiti ve bunlarla savaşım olanakları üzerinde araştırmalar. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Ankara.
- Sharma, S., Shahzad, A., Kumar, J. and Anis, M. 2014. *In vitro* propagation and synseed production of scarlet *Salvia* (*Salvia splendens*). Rendiconti Lincei, 25, 359-368.
- Skala, E. and Wysokinska, H. 2004. *In vitro* regeneration of *Salvia nemerosa* L. from shoot tips and leaf explants. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 40, 596-602.
- Skala, E., Kalemba, D., Wajs, A., Rozalski, M., Krajewska, U., Rozalska, B., Wieckowska-Szakiel, M. and Wysokinska, H. 2007. *In vitro* propagation and chameical and biological studis of the essential oil of *Salvia przewalskii* Maxim. Z. Naturforsch, 62c, 839-848.

- Tawfik, A. A. and Mohamed, M. F. 2007. Regeneration of *Salvia* (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, 21-27.
- Uçar Türker, A. ve Birinci Yıldırım, A. 2013. Endemik bir bitki olan *Convolvulus galaticus* Rostan ex Choisy' nin doku kültürü ile çoğaltılması. antioksidant aktivitesinin değerlendirilmesi ve fenolik bileşenlerinin belirlenmesi. TÜBİTAK Proje No: 211 T 172, Bolu.
- Uranbey, S., Başalma, D., İpek, A., Çöçü, S., Çalışkan, M., Kaya, D. ve Avcı, S. 2009. Endemik ve tehlike altında bulunan *Muscari azureum* ve *Muscari aucheri*'nin kültüre alınması ve *in vitro* çoğaltımı. TÜBİTAK Proje No: 106 O 034, Ankara.
- Yücel, E. ve Altınöz, N., 2001. *Salvia wiedemannii*'nin ekolojik özellikleri. *Ekoloji-Çevre Dergisi*, 38, 9-17.
- Went, F. W. and Imann, K. V. 1937. *Phytohormones*. Macmillan Company, New York.
- Zayova, E., Nikolova, M., Dimitrova, L. and 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.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mesut UYANIK
Doğum Yeri : Emet (Kütahya)
Doğum Tarihi : 07.05.1986
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dil : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Kılıçarslan Lisesi (Kütahya), 2003
Lisans : Karadeniz Teknik Üniversitesi, Ordu Ziraat Fakültesi, Ziraat Mühendisliği, 2008
Yüksek Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı (Eylül 2011-Temmuz 2013)

Çalıştığı Kurumlar

2009-2011 Araş. Gör. Ordu Üniversitesi Ziraat Fakültesi
2011-2012 Araş. Gör. Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi
2012-2017 Araş. Gör. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

SCI (Science Citation Index) Kapsamındaki Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Koçak N., Uyanık M., Gürbüz B. ve Beyzi E. 2014. Determination of cross-pollination ratio in safflower (*Carthamus tinctorious* L.) using different experimental designs. Journal of Agricultural Sciences, 20 (2):120-125.

Uyanık M., Kara Ş. M. ve Korkmaz K. 2014. Bazı kışlık kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinin çimlenme döneminde tuz stresine tepkilerinin belirlenmesi. Tarım Bilimleri Dergisi, 20 (4): 368-375.

Ipek A., Gurbuz B., Bingol M. U., Geven F., Uyanık M., Akgül G., Afshar Pour Rezaeieh, K. ve Cosge Senkal B. 2014. Comparison of essential oil components of *Salvia forskahlei* L. collected from nature and cultivated. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17 (5): 1012-1016.

Afshar Pour Rezaeieh K., Gurbuz B., **Uyanik M.**, Rahimi A. ve Arslan N. 2015. Volatile constituents variability in *Matricaria chamomilla* L. from Ankara, Turkey. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 18 (1): 255-260.

Gürbüz B., Bahtiyarca Bağdat R., **Uyanik M.** ve Afshar Pour Rezaeieh K. 2016. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) cultivation studies under Ankara ecological conditions. Industrial Crops and Products, 88: 12-16.

Gürbüz B., Afshar Pour Rezaeieh K., **Uyanik M.** ve Bahtiyarca Bağdat R. 2017. Volatile profile of *Rosmarinus officinalis* in Mediterranean Region. Turkey. Oxidation Communications, 40 (1-I): 232-238.

Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Kara S. M. ve **Uyanik M.** 2010. A lesson for sunflower: The soybean experience of the Black Sea Region. Helia, 33 (53): 85-90.

Uyanik M., Afshar Pour Rezaeieh K., Delen Y. ve Gürbüz B. 2011. Baklagillerde bakteri aşılama ve azot fiksasyonu. Ziraat Mühendisliği Dergisi, sayı 357: 8-12.

Gürbüz B., Karakaya A., Afshar Pour Rezaeieh K., Çelik A. ve **Uyanik M.** 2012. Türkiye'de kimyon tarımı ve ekonomik önemi. Türk Tarım Dergisi, Sayı 203: 84-87.

Uyanik M., Kara Ş. M. ve Gürbüz B. 2012. Sürdürülebilir kalkınmada biyoçeşitliliğin önemi. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi, 5 (2): 125-127.

Afshar Pour Rezaeieh K., Gürbüz B. ve **Uyanik M.** 2012. Screening global challenges and prospects facing medicinal and aromatic plants. Manas Journal of Agriculture and Life Science, 13: 55-64.

Uyanik M. ve Gurbuz B. 2014. Chemical diversity in essential oil compositions of leaf, herb and flower in Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.). Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences, 1(2): 210-214.

Khadem Arabbaghi E., Gürbüz B., Afshar Pour Rezaeieh K. ve **Uyanik M.** 2014. GC-MS analysis of bioactive components of *Dracocephalum moldavica* L., treated by boric acid doses. Research Journal of Agricultural Sciences, 1 (9): 19-21.

Uyanik M. ve Gurbuz B. 2015. Effect of ontogenetic variability on essential oil content and its composition in lemon balm (*Melissa officinalis* L.). Journal of Tekirdag Agricultural Faculty, 12 (1): 91-96.

Uyanik M. ve Gürbüz B. 2015. Türkiye'de doğal olarak yetişen adaçayı (*Salvia* spp.) türleri ve tehlike kategorileri. Tarım-Türk, 55: 112-116.

Ulusal Sempozyum ve Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Kandemir K., **Uyanık M.**, Kara Ş. M. ve Özkutlu F. 2010. Farklı sıra aralığı ve azot dozlarında yetiştirilen kişniş tohumlarının mikoelement içeriği. 5. Ulusal Bitki Besleme ve Gübre Kongresi, 15-17 Eylül 2010. İzmir.

Yılmaz N., Özkorkmaz F., Açıköz A. ve **Uyanık M.** 2011. Ordu-Akkuş ekolojik koşullarında bazı kuru fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) çeşit ve ekotiplerinin verim verim özelliklerinin belirlenmesi. IX. Tarla Bitkileri Kongresi, 12-15 Eylül 2011, Bursa.

Batı E., Kara Ş. M. ve **Uyanık M.** 2011. Bazı bitkisel drogların uçucu yağ bileşenlerinin belirlenmesi. IX. Tarla Bitkileri Kongresi, 12-15 Eylül 2011, Bursa.

Kara Ş. M., Sargın O. ve **Uyanık M.** 2011. Yeni tohumculuk kanunu ve düşündürdükleri. Türkiye IV. Tohumculuk Kongresi, 14-17 Haziran, 2011. Samsun.

Uyanık M. ve Kara Ş. M. 2011. Tarımsal üretim planlamasında ihmal edilen stratejik bitkiler: Yağlı tohumlar. 1. Ulusal Ali Numan Kıraç Tarım Kongresi ve Fuarı, 27-30 Nisan 2011, Eskişehir.

Afshar Pour Rezaeieh K., Gürbüz B. ve **Uyanık M.** 2012. Biotic and abiotic stresses mediated changes in secondary metabolites induction of medicinal plants. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, 13-15 Eylül 2012, Tokat.

Uyanık M., Kara Ş. M., Gürbüz B. ve Özgen Y. 2013. Türkiye'de bitki çeşitliliği ve endemizm. Ekoloji Kongresi, 02-04 Mayıs 2013, Tekirdağ.

Uyanık M., Kara Ş. M. ve Korkmaz K. 2013. Farklı NaCl konsantrasyonlarının bazı kolza (*Brassica napus* L.) çeşitlerinde bitki gelişimine etkisi. X. Tarla Bitkileri Kongresi, 10-13 Eylül 2013, Konya.

Delen Y., **Uyanık M.**, Gürbüz B. ve Palalı S. 2013. Farklı bakteri aşılama yöntem ve dozlarının çemen (*Trigonella foenum-graecum* L.)'in verim ve bazı morfolojik özellikleri üzerine etkisi. X. Tarla Bitkileri Kongresi, 10-13 Eylül 2013, Konya.

Uyanık M. ve Gürbüz B. 2014. Oğulotu (*Melissa officinalis* L.)'nda diurnal varyabilitenin belirlenmesi üzerine bir araştırma. II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, 23-25 Eylül 2014, Yalova.

Uluslararası Sempozyum ve Kongrelerde Sunulan Bildiriler

Uyanık M., Kara S. M., Kandemir K., İpek A. ve Gürbüz B. 2010. Volatile oil and its components in coriander as affected by row spacing and nitrogen. 6th Conference on Aromatic and Medicinal Plants of Southeast European Countries (6th CMAPSEEC), 18-22 April 2010, Antalya. Turkey.

Kandemir K., Kara Ş. M. ve **Uyanık M.** 2010. The effect of different nitrogen doses and row spaces on volatile oil, seed yield and yield components in coriander. 3rd International Congress on Aromatic and Medicinal Plants, April 13-15 2011, Cagliari-Italy.

Kara Ş. M. ve **Uyanık M.** 2011. Current status and future prospects of medicinal and aromatic plants in Turkey. 3rd International Congress on Aromatic and Medicinal Plants, April 13-15 2011, Cagliari- Italy.

Uyanık M., Kara. Ş. M., Kıralan M. ve Kandemir K. 2011. Fatty acid composition of coriander as affected by row spacing and nitrogen. 3rd International Congress on Aromatic and Medicinal Plants, April 13-15 2011, Cagliari-Italy.

Afshar Pour Rezaeieh K., Gürbüz B. ve **Uyanık M.** 2012. Characterization of different cumin landraces (*Cuminum cyminum* L.) under varying Zn doses, scoping their productivity and essential oil. 5th International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants, June 18-20, 2012. Veterinarmedizinische Universitat Wien, Austria.

İpek G., Beyzi E., Gürbüz B., İpek A., **Uyanık M.** ve Özgen. Y. 2013. Current status of endemic species belonging to the family iridaceae found in Kayseri. First Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, April 17-20, 2013. Gazimagosa, The Northern Cyprus.