SALVİA'LARDA *IN VİTRO* UYGULAMALAR

Esin ŞAHİN, Metin TOSUN, Kamil HALİLOĞLU, Murat AYDIN

Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü, 25240, Erzurum.

ÖZET

Günümüzde oldukça önem arz eden tıbbi ve aromatik bitkilerden birisi olan adaçayı'nın kullanımı ülkemizde de yaygınlaşmaya başlamıştır. Adaçayı Akdeniz kıyılarının yabani bitkisidir. Dünyada sıcak ve ılıman bölgelerde yetişen 450 kadar adaçayı türü vardır. Ülkemizde *Salvia* cinsine ait 90 civarında tür yabani olarak yetişmektedir. Birçok türü doğada yabani olarak bulunması yanında, bazı yörelerde, küçük alanlarda yetiştiriciliği de yapılmaktadır. Adaçayının yatıştırıcı, midevi, idrar söktürücü, ter kesici ve dezenfektan etkileri vardır. Tahıllarda ve baklagillerde *in vitro* kültürü çalışmaları yoğun olarak yapılmasına karşın, *Salvia'*larda *in vitro* kültürü çalışmalarına son yıllarda başlanmış olup, araştırmaların sayısı oldukça azdır. Bazı araştırıcılar tarafından *Salvia*'nın farklı türlerinde değişik eksplant kaynakları ve ortamlar kullanılarak *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Yapılan denemelerden elde edilen sonuçlar irdelenerek *Salvia* cinsine ait türlerde *in vitro* kültürü uygulamalarında kullanılan yöntemler, elde edilen başarılar ve gelinen son durum ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: *Salvia*, adaçayı, *in vitro*

***In Vitro* APPLICATIONS IN *Salvia* spp.**

ABSTRACT

Today, sage (Salvia spp.) is important medicinal and aromatic plant which has been widely consumed in Turkey. The genus is native to Mediterranean flora. There are about 450 sage species growing in warm and temperate regions of the world. About ninety species of Salvia are grown widely in Turkey. Furthermore, the some members of the genus are cultivated in small areas in Turkey. Sage have gastro-protective, disinfectant, quieting effects. *In vitro* culture of sage species has been initiated lately and number of research are limited. Different species of Salvia, explant source and media were studied to determine the suitable *in vitro* conditions. Methods used in vitro culture of Salvia species, achievements on the subject and the most recent conditions cited in literature were presented.

Key words: *Salvia*, sage, *in vitro*

GİRİŞ

Bitkiler sahip oldukları eşsiz içerikleri nedeni ile en büyük doğal yiyecek kaynağı, soluduğumuz hava ve birçok hastalığın tedavisinde kullanılan güçlü bir ilaçtır. Yakın bir zamandan günümüze ilacın doğal kaynağı olarak tıbbi bitkilerden yararlanma artış göstermektedir (Taha, ve ark. 2008).

Türkiye sahip olduğu zengin mikro-klima alanı ile pek çok tıbbi ve aromatik bitkinin yetiştirilmesine oldukça elverişli bir ülkedir. Özellikle günümüz dünyasında oldukça önem arz eden tıbbi ve aromatik bitkilerden olan *Salvia* cinslerinin kullanımı ülkemizde de yaygınlaşmaya başlamıştır. Özellikle *Salvia officinalis* (adaçayı)'in kullanımı oldukça yaygındır. Lamiaceae familyası içinde geniş bir alana sahip olan *Salvia* cinsi dünyada yaklaşık olarak 900 türü içermektedir (Tepe ve ark., 2006, Saeidnia ve ark. 2009 Skala ve Wysokinska, 2004). Türkiye'de tıbbi adaçayı denen bu cins yetişmemekte, ancak Güney Orta-Batı Anadolu'da doğal cinsleri yetişmektedir (Anonim, 2008). Tıbbi adaçayı (*S. officinalis*) türünün anayurdu Akdeniz havzasıdır. Türkiye'de yetişen ve adaçayı olarak kullanılan türlerin başında Anadolu adaçayı, yönlü adaçayı, misk adaçayı, yabani adaçayı, yeşil adaçayı vs. gelmektedir. Kimyasal madde içerikleri değişmekle beraber, tıbbi adaçayı gibi kullanılmaktadırlar (Anonim, 2008).

Salvia cinsi çoğunlukla ülkemizde Akdeniz bölgesinde yoğunlaşmakta ve endemik türlerin de büyük çoğunluğu Akdeniz bölgesinde bulunmaktadır. Ancak *S. glutinosa*, *S. forskaohlei*, *S. nutans, S. amplexicaulis* gibi türler Karadeniz bölgesinde daha çok yayılış göstermektedir. Kuzeydoğu Anadoluda ise *S. rosifolia, S. huberi, S. hedgeana* gibi endemik türler bulunmaktadır. *S. cryptanta, S. multicaulis, S. aytachi, S. tchihatcheffii* gibi türler İç ve Doğu Anadolu'da, *S. pisidica, S. potentillifolia, S. albimaculata* gibi türler Akdeniz Bölgesinde, *S. fruticosa* ise Ege ve Akdeniz sahil kesimlerinde yayılış göstermektedir.

Salvia cinsleri doğal olarak dünyanın sıcak ve ılıman iklim bölgelerinde yetişmektedir. Bu türlerin bazıları tek, bir kısmı iki veya çok yılık ve çalımsı formdadır. Gevşek, kumlu, besin maddesince zengin, iyi gübrelenmiş ve hafif kireçli topraklarda iyi yetişir (Megep, 2008).

Salvia cinslerinin genel olarak insan sağlığı üzerinde antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antimutagenik etkilere sahip olduğu bilinmektedir (Skala ve Wysokinska, 2004). ayrıca adaçayı bitkilerinden elde edilen ekstraktların antioksidant özellik taşıdığı ve özellikle kozmetik ve gıda endüstrisinde yaygın olarak kullanıldığı bilinmektedir (Karousou ve ark. 2000).

Salvia cinslerine ait tohumların çimlenme yeteneği sınırlı olduğundan çoğaltımı oldukça önemlidir (Modarres ve ark. 2007). Bu nedenle kontrollü koşullarda çimlendirilmeli veya çoğaltılmalıdır. Bu kontrollü koşullardan birisi de doku kültürünün kullanımıdır. Bu amaçla *in vitro* şartlarda bitki rejenerasyonundan yararlanılmaktadır. Diğer taraftan bitki rejenerasyonu, genetik transformasyon, bitki çoğaltımı ve somaklonal varyasyon oluşturmada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

SALVİ'LARDA *IN VITRO* UYGULAMALAR

Laboratuvarda kullanılan ortamın bileşimi, hormon seviyesi ve çevresel faktörler (ışık, sıcaklık ve atmosfer) sürekli kontrol altında olduğu için *in vitro* çalışmalar yaygın bir şekilde yapılmaktadır (Santos-Gomes ve ark. 2002). Bilindiği üzere tahıllarda ve baklagillerde *in vitro* kültürü çalışmaları yoğun olarak yapılmasına karşın, *Salvia'*ların da içinde bulunduğu tıbbi bitkilerde *in vitro* kültürü çalışmalarına son yıllarda başlanmış olup, araştırmaların sayısı oldukça azdır. Bazı araştırıcılar tarafından *Salvia*'nın farklı türlerinde değişik eksplant kaynakları ve ortamlar kullanılarak *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmalarda kullanılan yöntemler ve elde edilen bulgular aşağıda kısaca özetlenmiştir.

Bunlardan *S. miltiorrhiza*'da sürgün ve yaprak sapı (Shimorura ve ark. 1991, Morimoto ve ark. 1994), *S. leucantha*'da klon (Hosoki ve Tahara, 1993), *S. canariensis'*de aksillary sürgün (Mederos ve ark., 1997), *S. officinalis'*de sürgün tomurcukları ve yaprak (Olszowska ve Furmanowa, 1990, Kintzios ve ark. 1999), *S. fruticosa*'da yaprak (Kintzios ve ark. 1999) ve *S. sclarea*'da tohum eksplantları kullanılarak rejenerasyonda başarı elde edilmiştir (Liu ve ark. 2000)..

Salvia sclarea, bitkisine ait olgunlaşmamış zigotik embriyolar kullanılarak 2 mg/l 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) içeren ortamdan kallus, 5 mg/l NAA (α-naftalinasetik asit) içeren ortamdan da somatik embriyolar elde edilmiştir. Organogenik dokular sadece 20 mg/l 2,4-D içeren ortamdan elde edilmiştir. Çeşit ve 2,4-D seviyesinin önemli derecede etki gösterdiği bildirilmiştir (Liu ve ark. 2000).

Salvia greggii'de oksin ve sitokininlerin en iyi sürgün oluşumu üzerine etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada oksinler (IAA-indolasetik asit, IBA-indolbütirik asit, NAA-naftalinasetik asit) arasında fark görülmemiş, kullanılan sitokininler arasında BA (benziladenin) ve BA+Kin (benziladenin+kinetin) kullanılan ortamda en fazla sürgün oluştuğu belirlenmiştir. 2,5 mg/l BA içeren ve NAA içermeyen ortamda en iyi gelişme sağlanmıştır (Frett, 1987).

Salvia officinalis ve *salvia fruticosa*'ya ait tohumlar kullanılarak yapılan bir çalışmada 0,4-4,0 mg/l 2,4-D ile kinetin ve 2,0-4,0 mg/l NAA (1-naftalinasetik asit) ile BA (6-benziladenin) içeren ortamlardan çok sayıda somatik embriyoya sahip embriyogenik kalluslar elde edilmiştir. Aynı zamanda 1 mg/l 2,4-D ve 1 mg/l Kin içeren ortamlarda kültüre alınan tohumlardan oluşan kalluslardan en fazla (*S. officinalis*, 25,9 g/l ve *S.fruticosa* 29,0 g/l) rosmanirik asit elde edilmiştir. Yine bu çalışma kapsamında ve düşük ışık yoğunluğunun (50 µmol m^{-2} s^{-1}) kallus ve somatik embriyo gelişimini teşvik ettiği görülmüştür (Kintzios ve ark. 1999).

Salvia leriifolia'da MS (Murashige and Skoog) ortamında bitki büyüme düzenleyicilerinin farklı konsantrasyonlarının (0, 1, 1.5, 2, 2.5 ve 3 mg/l, 2,4-D ve 0, 0.1 ve 0.3 mg/l kinetin) ve kombinasyonlarının embriyo kültürü üzerine etkisini belirlemek amacıyla yapılmış olan bir çalışmada en etkin embriyo gelişimi ve bitki rejenerasyonunun 2 mg/l 2,4-D ve 0,1 mg/l Kin içeren ortamdan elde edildiği görülmüştür (Modarres ve ark. 2007).

*Salvia officinalis'*e ait sürgünler in vitro şartlarda kullanılarak üretilen fenolik antioksidan bileşimin belirlenmesi için kinetinin farklı konsantrasyonlarının (1.5, 2.0, 4,0 mg/l) denendiği bir araş-

tırmada ise en yüksek kallus oranı (%38) ise 0,05 mg/l 2,4-D + 4,0 mg/l Kin, en yüksek sürgün oranı (%75) 0,05 mg/l 2,4-D + 1,5 mg/l BA, içeren ortamlardan elde edilmiştir (Santos-Gomes ve ark. 2002). Yine *Salvia officinalis*'te kallus ve hücre süspansiyonundan üretilen fenolik antioksidan bileşiminin belirlenmesi amacıyla, yapılan başka bir araştırmada ise aseptik şartlarda yetiştirilen fidelerden elde edilen internodal segmentler 1,5 mg/l kinetin, zeatin ya da BA (benzyladenine)'nine ilaveten 0,05 mg/l 2,4-D kullanılarak kalluslar elde edilmiştir. En yüksek kallus oluşum oranının (%221) 1,5 mg/l zeatin (ZEA) varlığında elde edildiği görülmüştür (Santos-Gomes ve ark. 2003).

Salvia officinalis'te yapılan diğer bir çalışmada apikal sürgünlerin taban kısımlarından alınan eksplantlar 1.0, 3. 0 ve 5.0 mg/l TDZ içeren ortamda denenmiş ve en yüksek kallus oranı (% 78) 1 mg/l TDZ içeren ortamdan elde edilmiştir. En yüksek sayıda sürgün BA (1 yada 2 mg/l) ve 0,45 mM askorbik asit içeren ortamlardan gelişen kalluslardan elde edilmiştir. Sürgünler 1 mg/l indol-3 butirik asit içeren ortamda köklendirilmiş ve askorbik asitin köklenmeyi artırdığı görülmüştür (Tawfik ve Mohamed 2007).

Salvia nemorosa'da yaprak ve sürgün eksplantları 2 mg/l 6-benzilaminopürin (BA) ve 0,5 mg/l indol-3-asetik asit (IAA) içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Yaprak ayası ve yaprak sapı örnekleri kullanılarak yapılan çalışmada en iyi sürgün rejenerasyonu 0,2 mg/l BA ve 0,5 mg/l IAA içeren ortamdan %23 direk, %32 indirekt organogenesis olmak üzere yaprak laminalarından elde edilmiştir. Kullanılan yaprak sapı eksplantlarından ise yine bu oran direk organogenesis için %14, indirek organogenesis için ise %38 olarak bulunmuştur. Kullanılan BA (0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) ve TDZ (0.2, 0.5, 1.0 ve 2.0 mg/l) konsantrasyonları içerisinde en yüksek sürgün oranı (%97) 0,5 mg/l BA ve (%91) 0,2 mg/l TDZ içeren ortamlardan elde edilmiştir (Skala ve Wysokinska 2004).

Mascarello ve ark. (2006), Salvia cinsine ait 19 farklı türü kullanarak yaptıkları çalışmada BA (0.3, 0.6, 0.9 mg/l) ve kinetin (0.5, 1.0, 1,5 mg/l)'in in vitro çoğaltım ve sekonder metabolit üretimi üzerine etkisi incelenmiştir. İncelenen özellik yönünden türler arasında *(S. elegans, S. sinaloensis, S. cinnabarina* ve *S. jamensis)* yüksek varyabilite olduğu görülmüştür. Düşük BA konsantrasyonunun *in vitro* çoğaltımı teşvik ettiği buna karşın kinetinin önemli bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir

S. valentina ve *S. blancoana* türlerine ait genç bitkilerden alınan apikal ve nodal segmentler kullanılarak rejenerasyon sağlanmıştır. *S. blancoana* için 1 mg/l (4,9 µM) 6-γ-γ-dimetil aminopürin ve *S. valentina* için ise 1-2 mg/l (4,6-9,3 µM) kinetin kullanılmış ve her iki türde de nodal eksplantlardan maksimum sürgün çoğaltımı sağlanmıştır. Köklendirme için bitki büyüme düzenleyicileri kullanılmamıştır. Ve genel olarak IAA (indol-3-asetik asit) ve IBA (indol-3-bütirik asit)'nın köklenme üzerine etki etmediği ve naftalin asetik asit'in ise yine kök gelişimini engellediği görülmüştür. En yüksek sürgün canlılığı (%85-100) her iki eksplant tipininde kullanıldığı *S. Blancoana*'dan elde edilmiştir (Cuenca ve Amo-Marco, 2000).

Makunga ve Staden (2008), tarafından *Salvia africana-lutea*'da yapılan bir araştırmada 1 mg/l BA, 0,5 mg/l NAA ve 1 mg/l BA, 0,5 mg/l IAA ve 2 mg/l kinetin kullanılmış ve 0,5;1,0 ve 0,5;2,0 mg/l IAA ve BA içeren ortamlardan eksplant başına ortalama 4,06-3,48 adet sürgün elde edilmiştir.

Mederos-Molina (2006), tarafından farklı ortamların (MS.1, MS.2 ve MS.3) *S. broussonetii*'de çoğaltım üzerine yapılan çalışmada en iyi sonuçlar MS.2 ortamı (1 mM askorbik asit, 2 mg/l GA_3 (gibberalik asit) ve 0,25 mg/l BAP içeren ortamdan elde edilmiştir. Aksillari nodlar kullanılarak in vitro rejenerasyon sağlanmış ve en iyi sonuç 2 mg/l GA_3, 0,6 mg/l BAP ve 0,2 mg/l IAA içeren MS.2 ortamından elde edilmiştir. Bu ortamdan elde edilen sürgün oranı %96 olarak belirlenmiştir.

Misic ve ark. (2006), tarafından *Salvia brachyodon*'a ait nodal segmentlerin kullanıldığı bir çalışmada aksillari tomurcuk oluşumunda BA'nın (6-benzilaminopürin) TDZ'ye (thidiazuron) göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Test edilen oksinlerin (IAA, NAA, IBA) köklenmeyi teşvik ettiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, *Salvia*'larda doku kültürü konusunda yapılan çalışmalar tahıllarda veya diğer bazı bitkilerde yapılan çalışmalara göre çok daha azdır. Ayrıca bu araştırmalardan elde edilen bulgular dikkate alındığında özellikle tahıllara göre başarı oranının çok düşük olduğu görülmektedir. Bu nedenle *Salvia*'larda başarı oranını yükseltmek üzere çalışmaların planlanması ve yapılması yararlı olacaktır.

KAYNAKLAR

Anonim, 2008, http://www.bitkisel-tedavi/ (15.06.2009)

Cuenca, S. and Amo-Marco, J.B., 2000. In vitro propagation of two Spanish endemic species of *Salvia through* bud proliferation. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 36:255–229.

Frett, J.F., 1987. Influence of nutrient salts, auxins and cytokinins on the in vitro growth of Salvia greggii. Plant Cell. Tissue and Organ Culture 9: 89-93.

Hosoki, T. and Tahara, Y., 1993. In vitro propagation of *Salvia leucantha* Cav. Hort Science 28 (3), 226.

Karousou, R., Hanlidou, E. and Kokkini, S. 2000. The sage plant of Greece: distribution and intraspecific variation. In: Kintzios, S. E., ed. Sage:the genus Salvia. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 27–46.

Kintzios, S., Nikolaou, 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.

Liu, W. Chilcott C. E., Reich R. C., and. Hellmann G.M. 2000. Regeneration of *Salvıa Sclarea* via organogenesis. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 36:201–206.

Makunga, N.P. and Staden, J. V., 2008. An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 92:63–72.

Mascarello, C., Mantovani, E. and Ruffoni, B., 2006. *In vitro* culture of several ornamental and medicinal *Salvia* species. I International Symposium on the Labiatae: Advances in Production, Biotechnology and Utilisation **Book Series:** Acta Horticulturae **Issue:** 723 **Pages:** 375-379

Mederos-Molina, S., Amaro, J. and Luis, J., 1997. *In vitro* mass propagation of *Salvia canariensis* L. by axillary shoots. Acta Soc. Botanic. Pol. 66 (3-4): 351-354.

Mederos-Molina, S., 2006. Micropropagation of *Salvia broussonetii* Benth.-A Medicinal Plant Species. Plant Tissue Cult. & Biotech. 16(1):19-23.

Megep (Meslekî eğitim ve öğretim sisteminin güçlendirilmesi projesi) Bahçecilik Labiatae familyası, Ankara 2008 *cygm.meb.gov.tr/modulerprogramlar/.../cabiateae_familyasi.*

Misic, D., Grubisic, D. and Konjevic, R., 2006. Micropropagation of Salvia brachyodon through nodal explants. Biologia Plantarum 50(3):473-476.

Modarres, M., Abrishamedi, P., Ejtehadi, H. and Ramezani, A., 2007. Propagation of *Salvia leriifolia* by embryo culture. Iranian Journal of Rangelands and Forests Plant Breeding and Genetics Research, Vol:15, Issue:2, Pages:129-141.

Morimoto, S., Goto, Y. and Shoyama, Y., 1994. Production of lithospermic acid B and rosmarinic acid in callus tissue and regenerated plantlets of Salvia Miltiorrhiza. Journal of Natural Products. Vol:57, No:6, pp. 817-823.

Olszowska, O. and Furmanowa, M. 1990. Micropropagation of *Salvia officinalis* by shoot buds. Planta Med volume:56, Issue:6, Pages: 637

Saeidnia, S., Sepehrizadeh, Z., Gohari, A.R., Jaberi, E., Amin, G.R. and Hadjiakhoondi, A., 2009. Determination of genetic relations among four Salvia L. species using RAPD analysis. World Applied Sciences Journal 6(2): 238-241.

Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B. and Fernandes-Ferreira, M., 2002. Phenolic antioxidant compounds produced by in vitro shoots of sage (*Salvia officinalis* L.) Plant Science 162, 981-/987.

Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade, P.B and Fernandes-Ferreira M., 2003. Determination of phenolic antioxidant compounds produced by cali and cell suspensions of sage (*Salvia officinalis* L.). Journal of Plant Physiology, volume:160, Issue:9, Pages:1025-1032

Shimomura, K. and Kitazawa, T., 1991. Tanshınone production in adventitious roots and regenerates of Salvia Miltiorrhiza. Journal of Natural Products. Vol:54, No:6, pp. 1583-1587

Skała, E., and Wysokınska, H., 2004. In vıtro regeneratıon of *Salvıa nemorosa* L. from shoot tıps and leaf explants. In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant 40:596–602

Taha, H.S., El-Bahr M.K. and Seif-El-Nasr, M.M., 2008. *In Vitro* Studies on Egyptian *Catharanthus Roseus* (L.) G. Don.: 1- Calli Production, Direct Shootlets Regeneration and Alkaloids Determination Journal of Applied Sciences Research, 4(8): 1017-1022.

Tawfik, A.A., Mohamed, M.F., 2007. Regeneration of salvia (*Salvia officinalis* L.) via induction of meristematic callus. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant 43:21-27.

Tepe, B., Sökmen, M., Askin Akpulat, H., and Sökmen A., 2006, Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. Food Chemistry 95, 200-204.