



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

VERBASCUM SCAMANDRI MURB. TÜRÜNÜN KALLUS
KÜLTÜRÜ İLE SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU CAMBAZ

Tez Danışmanı
DOÇ. DR. NURŞEN ÇÖRDÜK

ÇANAKKALE – 2022



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***VERBASCUM SCAMANDRI* MURB. TÜRÜNÜN KALLUS KÜLTÜRÜ İLE
SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EBRU CAMBAZ

Tez Danışmanı
DOÇ. DR. NURŞEN ÇÖRDÜK

Bu çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: FYL-2021- 3732

ÇANAKKALE – 2022

ETİK BEYAN

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kuralları'na uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada; tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi taahhüt ve beyan ederim.

Ebru CAMBAZ

08/08/2022

TEŞEKKÜR

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim süresince bilgi birikimini, nezaketini, hoşgörüsünü, sabrını, yol göstericiliğini, manevi değerlerini ve yardımlarını benden bir an olsun esirgemeyen ve bu tezin gerçekleşmesini sağlayan saygı değer danışman hocam Doç. Dr. Nurşen ÇÖRDÜK'e yürekten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmam süresince destek olan sayın hocam Prof. Dr. Cüneyt AKI'ya teşekkürlerimi sunuyorum.

Arazi çalışmalarına katılan, *Verbascum scamandri* türüne ait bitki örneklerinin teşhisi ve toplanması konusunda yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. Ersin KARABACAK'a ve arkadaşım Saadet İŞLEK'e teşekkür ediyorum.

Tezimin laboratuvar çalışmaları sırasında yardımcı olan arkadaşlarım Dilan ÜREK ve Sinem Gül KEPENEK'e teşekkür ediyorum.

Tez süresince manevi desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Büşra DALGIÇ, Sultan SÜCÜ, Didem KURTUL ve Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Zootekni Bölümü Arş. Gör. Ayşe ŞEN'e teşekkür ediyorum.

Bu süreçte bana her zaman güvenen, yanımda olduklarını hissettiren aileme teşekkür ediyorum.

Ebru CAMBAZ

Çanakkale, Ağustos 2022

ÖZET

VERBASCUM SCAMANDRI MURB. TÜRÜNÜN KALLUS KÜLTÜRÜ İLE SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

Ebru CAMBAZ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Nurşen ÇÖRDÜK

08/08/2022, 94

Bu tez çalışmasının amacı; *Verbascum scamandri* Murb. türünde, *in vitro* kültür koşullarının optimize edilerek kallus kültürü ile verbaskozit, luteolin ve okubin sekonder metabolitlerinin üretimi ve analizinin gerçekleştirilmesidir. Bu doğrultuda, kallus indüksiyonu için yaprak eksplantları sitokinin (BA, Kin, 0, 0,5, 1, 2, 3 mg/L) ve oksin (NAA, 2,4-D, 0, 0,1, 0,5, 1 mg/L), 1 g/L PVP, %3 sükröz ve %0,7 fito agar içeren MS bazal besin ortamına alınmıştır. Kültürden 3 hafta sonra kallus indüksiyon oranı, kararırma oranı, renk ve yapı gibi özellikleri hesaplanmıştır. Gelişen kalluslar, kallus indüksiyon ortamı ile aynı oranda bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS bazal ortamında çoğaltılmıştır. Çoğaltılan kalluslardan, doğal bitki ve *in vitro* koşullarda yetiştirilen bitki örneklerinden sekonder metabolit ekstraksiyonları yapılmıştır. HPLC analizi ile örneklerin verbaskozit, luteolin ve okubin içerikleri belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, 0,5 mg/L Kin+1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L Kin+1 mg/L 2,4-D, 2 mg/L Kin+1 mg/L 2,4-D ve 3 mg/L Kin+1 mg/L 2,4-D içeren ortamların kallus indüksiyonu için BBD içermeyen ortamlara göre %100 daha etkili oldukları belirlenmiştir. Çalışmamızda 2 mg/L Kin ilave edilen ortamın verbaskozit (13,77 mg/g) eldesi için en uygun ortam olduğu belirlenmiştir. Luteolin (0,51 mg/g) üretimi için 2 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D ilave edilen MS besin ortamının en uygun olduğu bulunmuştur. 0,5 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D içeren ortamın ise okubin (9,32 mg/g) üretimi için uygun olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, *V. scamandri* türünden

verbaskozit, luteolin ve okubin sekonder metabolitlerinin üretimi için bir araç olarak kullanılabilir etkili bir kallus indüksiyon protokolü ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: endemik, *in vitro*, kallus, ikincil metabolit, sığırkuyruğu, Scrophulariaceae



ABSTRACT

SECONDARY METABOLITE PRODUCTION IN CALLUS CULTURE OF *VERBASCUM SCAMANDRI* MURB.

Ebru CAMBAZ

Çanakkale Onsekiz Mart University

School of Graduate Studies

Master of Science Thesis in Biological Science

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Nurşen ÇÖRDÜK

08/08/2022, 94

The aim of this study is to establish to an efficient callus culture for *Verbascum scamandri* and analyses of verbascoside, luteolin and aucubin. Leaf explants were cultured on MS medium supplemented with cytokinin (BA, Kin, 0, 0,5, 1, 2, 3 mg/L) and auxin (NAA, 2,4-D, 0, 0,1, 0,5, 1 mg/L), 1 g/L PVP, 3% sucrose, and 0,7% phyto agar for callus induction. Callus induction rate, colour, and texture of callus were recorded after 3 weeks in culture. The induced primary callus was proliferated on MS basal medium with 3% sucrose, 0,7% agar, and the same plant growth regulators as the callus induction medium. Verbascoside, luteolin, and aucubin were extracted from callus, plants collected from field and *in vitro* germinated plants and then quantified by using HPLC. The results showed that 0,5 mg/L Kin+1 mg/L 2,4-D, 1 mg/L Kin+1 mg/L 2,4-D, 2 mg/L Kin+1 mg/L 2,4-D, and 3 mg/L Kin+1 mg/L 2,4-D were more effective for callus induction with 100 % callus induction rate. According to the secondary metabolite analysis, MS medium with 2 mg/L Kin was found to be suitable for verbascoside production (13,77 mg/g). MS medium with 2 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D was found to be suitable for luteolin production (0,51 mg/g). MS medium with 0,5 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D was found to be suitable for aucubin production (9,32 mg/g). In conclusion, this study revealed an efficient callus induction protocol for *V. scamandri* that can be used as a tool to production of secondary metabolite of this species.

Keywords: endemic, *in vitro*, callus, secondary metabolite, mullein, Scrophulariaceae

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ETİK BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
TABLolar DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi

BİRİNCİ BÖLÜM GİRİŞ

1.1. Bitki Doku Kültürü	3
1.2. <i>Verbascum</i> L.	4
1.2.1. <i>Verbascum scamandri</i> Murb.	5
1.2.2. <i>Verbascum</i> Türlerinin Sekonder Metabolitleri ve Tıbbi Önemi	6
Verbaskozit, Luteolin ve Okubin Bileşikleri ve Önemleri	7

İKİNCİ BÖLÜM ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sekonder Metabolit Analiz Çalışmaları	9
2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	10
2.3. Antitümör ve Sitotoksik Aktivite Çalışmaları	13
2.4. Yara İyileştirme Çalışmaları	14
2.5. <i>In Vitro</i> Kültür Çalışmaları	15

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal	17
3.1.1. Bitkisel Materyal ve Toplanması	17
3.2. Yöntem	17
3.2.1. Sarf ve Kimyasal Malzemelerin Sterilizasyonu	17
3.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması	18

3.2.3. <i>In Vitro</i> Kültür Şartları	18
3.2.4. Tohum Yüzey Sterilizasyonu ve Anaç Bitki Eldesi	19
3.2.5. Kallus İndüksiyonu.....	21
3.2.6. Kallus Gelişimi ve Çoğaltılması.....	22
3.2.7. Sekonder Metabolit Ekstraksiyonu ve HPLC Analizi.....	23
3.3. İstatiksel Analiz	25

DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bitkisel Materyale Ait Bulgular	26
4.2. Tohum Yüzey Sterilizasyonu ve Anaç Bitki Eldesine Ait Bulgular	27
4.3. Kallus İndüksiyonu ile İlgili Bulgular	29
4.4. Kallus Gelişimi ve Çoğaltımı ile İlgili Bulgular	50
4.5. Sekonder Metabolit Analizi ile İlgili Bulgular	58
4.6. Tartışma	63

BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKÇA	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

2,4-D	2,4-Diklorofenoksiasetik Asit
%	Yüzde Oranı
°C	Santigrat Derece
BAP	6-Benzil Amino Pürin
BBD	Bitki Büyüme Düzenleyicileri
dH ₂ O	Distile Su
dk	Dakika
EN	Endangered / Tehlikede
EtOH	Etanol
g	Gram
g/L	Gram/Litre
GA ₃	Giberellik Asit
HCl	Hidroklorik Asit
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Kin	Kinetin
KİO	Kallus İndüksiyon Oranı
KO	Kararma Oranı
m	Metre
MeOH	Metanol

mg/g	Miligram/Gram
mg/L	Miligram/Litre
mg/mL	Miligram/Mililitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
MS	Murashige Skoog Besin Ortamı
N	Normal
NAA	Naftalen Asetik Asit
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NaOH	Sodyum Hidroksit
PVP	Polivinilpirolidon
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
v/v	Hacim/Hacim
w/v	Ağırlık/Hacim

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1	Tohumların sterilizasyon uygulamaları	20
Tablo 2	Kallus indüksiyonunda kullanılan MS besin ortamının içerdiği BBD çeşitleri, oranları ve kombinasyonları	21
Tablo 3	Bitki örneklerinin toplandığı yükseklik ve koordinatlar	26
Tablo 4	Sterilizasyon uygulamalarının kontaminasyon ve çimlenme oranları	27
Tablo 5	Kallus indüksiyon ortamlarında gelişen kallusların indüksiyon ve kararırma oranı (*Bir sütundaki farklı üst simge harfler, istatistiksel olarak anlamlı farkı belirtir ($p \leq 0.05$))	30
Tablo 6	Kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan eksplantlardan gelişen kallusların yapı ve renkleri	31
Tablo 7	Kallus çoğaltım ortamlarının içerdiği BBD'leri	51

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Şekil Adı	Sayfa No
Şekil 1.	Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması.	2
Şekil 2.	<i>Verbascum scamandri</i> türünün doğal yayılış alanındaki genel görünüşü.	6
Şekil 3.	Verbaskozit bileşiğinin kimyasal yapısı.	7
Şekil 4.	Luteolin bileşiğinin kimyasal yapısı.	8
Şekil 5.	Okubin bileşiklerinin kimyasal yapısı.	8
Şekil 6.	Kültür çalışmalarının gerçekleştirildiği laminar flow kabin.	19
Şekil 7.	a) <i>V. scamandri</i> tohumlarının stereo mikroskopta görünümü (bar = 5 mm), b) MS bazal besin ortamına ekilen tohumlar.	20
Şekil 8.	a) Kallus kültürlerinde başlangıç materyali olarak kullanılan yaprak eksplantları, b) Bitki yetiştirme odasına yerleştirilmiş kültür kapları.	22
Şekil 9.	a) Etüvde kurutulmaya bırakılmış kallus örnekleri, b) Orbital çalkalayıcıya yerleştirilmiş örnekler, c) Su banyosunda kurutulmaya bırakılmış örnekler.	23
Şekil 10.	Araziden toplanan bitki yapraklarının kurutulması.	24
Şekil 11.	<i>Verbascum scamandri</i> türünün toplandığı habitat.	26
Şekil 12.	1 mg/L GA ₃ ilaveli MS besin ortamında çimlenen bitkiler.	28
Şekil 13.	a) Çimlenen <i>V. scamandri</i> tohumları, b) 4 haftalık bitkiler, c) 8 haftalık bitkiler, d) 14 haftalık anaç bitki (bar = 5 mm).	29
Şekil 14.	BBD içermeyen MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	32
Şekil 15.	Artan NAA konsantrasyonları ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	33
Şekil 16.	Artan 2,4-D konsantrasyonları ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	34
Şekil 17.	Artan BAP konsantrasyonları ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	35
Şekil 18.	Artan Kin konsantrasyonları ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	36

Şekil 19.	Sadece BAP ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).	37
Şekil 20.	Sadece Kin ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).	38
Şekil 21.	Artan BAP konsantrasyonları ile 0,1 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	39
Şekil 22.	Artan Kin konsantrasyonları ile 0,1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	40
Şekil 23.	Artan BAP konsantrasyonları ile 0,1 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).	41
Şekil 24.	Artan Kin konsantrasyonları ile 0,1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).	42
Şekil 25.	Artan BAP konsantrasyonları ile 0,5 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	43
Şekil 26.	Artan Kin konsantrasyonları ile 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	44
Şekil 27.	Artan BAP konsantrasyonları ile 0,5 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).	45
Şekil 28.	Artan Kin konsantrasyonları ile 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kalluslar (bar = 5 mm).	46
Şekil 29.	Artan BAP konsantrasyonları ile 1 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	47
Şekil 30.	Artan Kin konsantrasyonları ile 1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.	48
Şekil 31.	Artan BAP konsantrasyonları ile 1 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).	49
Şekil 32.	Artan Kin konsantrasyonları ile 1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kalluslar (bar = 5 mm).	50
Şekil 33.	Çoğaltımı gerçekleştirilen kallusların ilk alt kültürde ve ikinci alt kültürde 0. gün ile 21. günde yapılan çap (mm) ölçümleri.	51
Şekil 34.	Çoğaltılan kallusların ilk alt kültürde ve ikinci alt kültürdeki yaş ağırlıkları ile kuru ağırlıkları.	52
Şekil 35.	Çoğaltılmış kallusların büyüme indeksleri.	52
Şekil 36.	1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk alt kültürde	53

	gelişen kallus (bar = 5mm).	
Şekil 37.	1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve ikinci alt kültürde kallusların gelişimleri.	53
Şekil 38.	2 mg/L Kin ilaveli MS bazal besin ortamında ilk alt kültürde gelişen kallus (bar = 5mm).	54
Şekil 39.	2 mg/L Kin ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve ikinci alt kültürde kallusların gelişimleri.	54
Şekil 40.	0,5 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk alt kültürde gelişen kallus (bar = 5mm).	55
Şekil 41.	0,5 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve alt kültürde gelişen kalluslar.	55
Şekil 42.	2 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal ortamında ilk alt kültürde gelişen kallus (bar = 5mm).	56
Şekil 43.	2 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve ikinci alt kültürde gelişen kalluslar.	56
Şekil 44.	3 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk alt kültürde gelişen kallus (bar = 5mm).	57
Şekil 45.	3 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve ikinci alt kültürde gelişen kalluslar.	57
Şekil 46.	Kallus, <i>in vitro</i> bitki ve doğal bitkiden elde edilen süpernatant örnekleri.	58
Şekil 47.	Verbaskozit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.	58
Şekil 48.	Luteolin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.	59
Şekil 49.	Okubin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.	59
Şekil 50.	Verbaskozit ve luteolin bileşiklerinin standart kromatogramı.	60
Şekil 51.	Okubin bileşiğinin standart kromatogramı.	60
Şekil 52.	Verbaskozit bileşiğinin kallus, doğal bitki ve <i>in vitro</i> bitki örneklerindeki miktarı.	61
Şekil 53.	Luteolin bileşiğinin kallus, doğal bitki ve <i>in vitro</i> bitki örneklerindeki miktarı.	62
Şekil 54.	Okubin bileşiğinin kallus, doğal bitki ve <i>in vitro</i> bitki örneklerindeki miktarı.	62

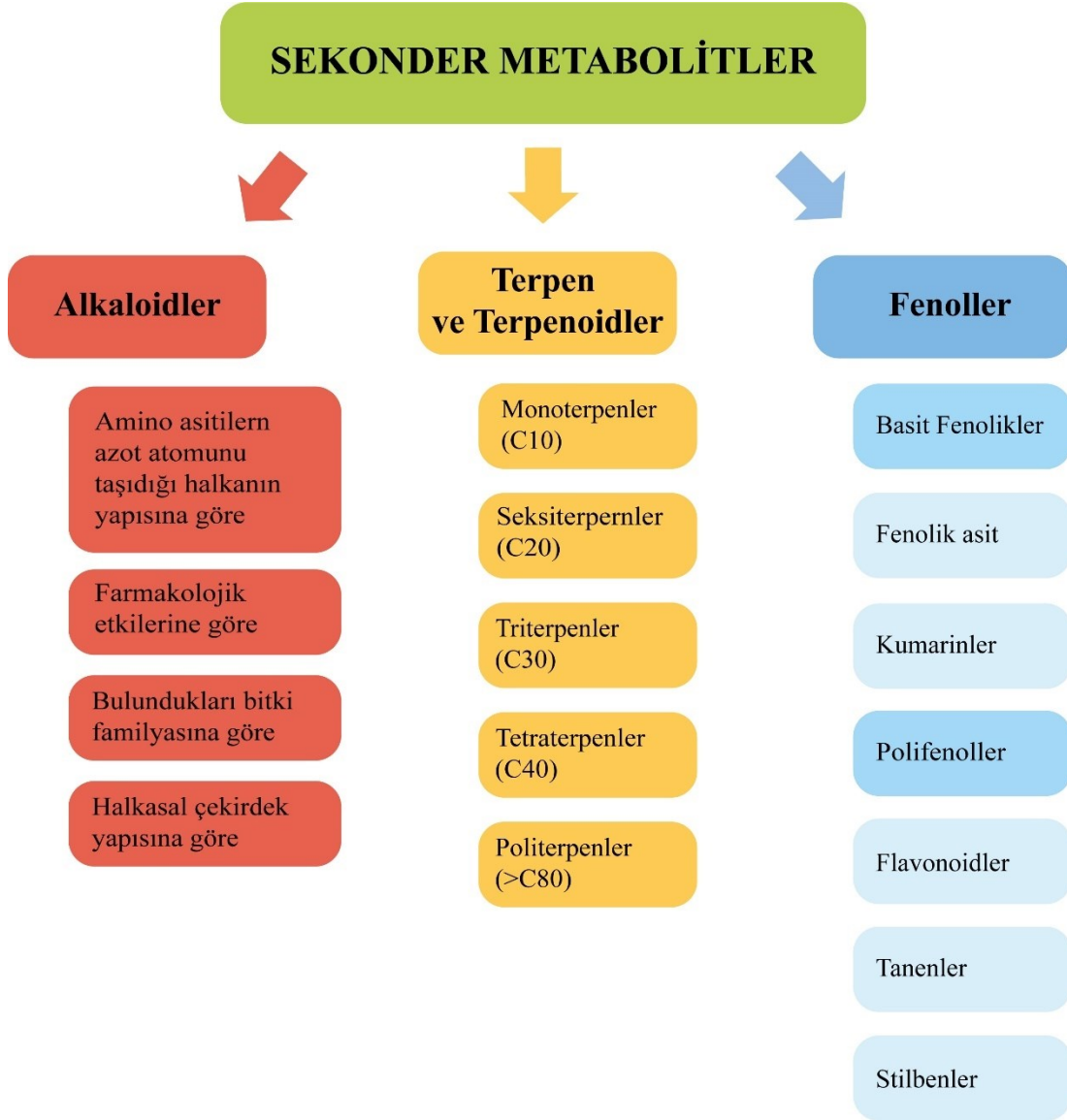
BİRİNCİ BÖLÜM

GİRİŞ

Organizmaların bünyelerine aldıkları maddeleri dönüşüme uğratarak sentezledikleri bileşikler metabolit olarak adlandırılmaktadır. Bitki metabolitleri fonksiyon ve sentezlendikleri yollara göre primer (birincil) ve sekonder (ikincil) metabolit olarak iki sınıfa ayrılmaktadır. Primer metabolitler tüm bitkilerde bulunan ve hayati öneme sahip olan lipit, karbonhidrat, mineral ve protein gibi bileşikler olup bitkilerin büyüme, gelişme, solunum ve üreme gibi işlevlerde görev almaktadırlar (Croteau vd., 2000; Mammadov, 2014). Sekonder metabolitler ise bitkilerin yaşamları için doğrudan etkili olmayıp çeşitli stres koşullarına (abiyotik ve biyotik) maruz kaldıklarında, değişen çevre koşullarına karşı geliştirdikleri yanıtlar ile primer metabolitlerden enzimatik reaksiyonlar sonucu yüksek miktarda sentezlenen bileşiklerdir (Meijer, 1989; Topcu ve Çölgeçen, 2015).

Molekül ağırlıkları düşük olan sekonder metabolitler farklı bitki türleri, cins ve familyalarda değişik oranlarda sentezlenmesinin yanı sıra organa, dokuya veya hücreye özgü olarak bitkilerin belirli gelişim aşamalarında sentezlenebilmektedir (Wink, 2008). Karmaşık yapıları ve farklı kimyasal özelliklerinin bulunması nedeniyle sekonder metabolitler genel olarak terpenoid, alkaloid ve fenol olmak üzere üç farklı grup altında sınıflandırılmaktadır (Şekil 1) (Bartwal vd., 2013; Baydar, 2013).

Bitkiler kendilerini koruma amacıyla yırtıcı ve patojenlere karşı savunma yanıtı olarak sekonder metabolitleri sentezleyebilmektedir. Savunmanın yanı sıra sekonder metabolitler diğer bitkiler için toksik ya da anti-germinatif, polinatörler için cezbedeci olması, değişen çevre koşullarına karşı bitkilere adaptasyon yeteneği kazandırması ve bitki hücrelerinin yapılarına desteklik sağlaması gibi birçok önemli rol ve işlevleri bulunmaktadır (Bourgoud vd., 2001).



Şekil 1. Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması.

Sekonder metabolitler; antioksidan (Kırca ve Arslan, 2008), antimikrobiyal (Yakoub vd., 2018), antifungal (Perczak vd., 2019), antiinflamatuvar (Yan vd., 2013), antidiabetik (Prasath ve Subramanian, 2011) ve antikanser (Jafari vd., 2014) gibi etkilere sahiptirler. Bu etkilerinin yanı sıra kardiyovasküller (Rangel-Huerta vd., 2015) ve nörodejeneratif hastalıklar (Alvi vd., 2019) gibi rahatsızlıkların tedavisinde de kullanılmaktadırlar.

1.1. Bitki Doku Kùltürü

Bitki eksplantlarının (embriyo, hücre, doku veya organ gibi) aseptik koşullar altında, bitki yapısına uygun sentetik besin ortamı içerisinde kültürlenmesi doku kùltürü yöntemleri ile yapılabilmektedir. Bunun sayesinde yeni hücreler, dokular, bitkiler ya da bitkisel ürünler elde edilebilmektedir (Babaoğlu vd., 2001). Her bir bitki hücresinin sahip olduğu totipotensi yeteneğinden dolayı, meristematik evreye dönme, belli hücre çeşidinden başka bir hücre çeşidine dönüşebilme ve bütün bir bitkiyi meydana getirebilme yetkinliği mevcuttur. Mikro ve makroelementler, çeşitli vitaminler, büyüme düzenleyicileri ve karbon kaynağı bulunan sentetik besin ortamları içerisinde *in vitro* kültürlenmiş eksplantların, somatik embriyogenesis veya organogenesis aracılığı ile bitki üretimi gerçekleştirilebilmektedir. Bitki ya da bitkisel ürünlerin üretimi, kullanılacak bitkinin türü, eksplant kaynağı olarak seçilen bitkinin genotipi, eksplant çeşidi, eksplantın fizyolojik durumu, seçilen besin ortamı, bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşit, miktar ve kombinasyonları ve çevresel kùltür şartlarının etkisiyle meydana gelmektedir. *In vitro* kùltüre alınan bitkilerin, besin ortamları içerisine dışarıdan eklenen bitki büyüme düzenleyicilerinin çeşit, miktar ve birbirleri ile kombine edilmelerinin bitki ve bitkisel ürün üretiminde önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir (Yamaguchi vd., 2003; D'onofrio ve Morini, 2006).

Bitki doku kùltürü, haploid bitki üretimi, gen aktarımı, somatik melezleme, türlerin hibridizasyonu ve somaklonal varyasyon gibi bitki ıslah uygulamaları ile sentetik tohum, hastalıksız bitki, sekonder metabolit üretimi ve mikroçoğaltım gibi birçok ıslah dışı ve ticari çalışmalarda kullanılmaktadır. Ayrıca, vejetatif ve generatif yollarla çoğaltılması zor veya mümkün olmayan, genetik olarak değerli bitki türlerinin ve doğadan yok olma riski ile karşı karşıya olan bitkisel gen kaynaklarının koruma altına alınması için kullanılmaktadır (Mikulík, 1999; Rout vd., 2000). Bitki sekonder metabolitlerinin günümüzde birçok ilacın hammaddesi olması, ticari açıdan bir hayli önemli olması ve bitki türlerinin yok olması tehlikesi nedeni ile üretimlerinin arttırılması için biyoteknolojik yöntemlerinden biri olan bitki doku kùltürü tekniği kullanılarak sekonder metabolitlerin üretimi yapılabilmektedir.

Kallus kùltürü, bitki doku kùltürü tiplerinden biridir. Doğada yaralanmış veya zarar görmüş bitkilerin dokularında kallus oluşumu yaygın görülen bir yanıttır ve bütün canlı

bitkilerde görülmektedir. *In vitro* koşullarda ise kültüre alınan bölünme yeteneğini yitirmemiş bitki eksplantlarının yüzeylerinde oluşturulan yaralanmalar neticesinde parankimatik hücrelerin düzensiz ve farklılaşmamış hücrelerden yığınlar oluşturmasının uyarılması ile kallus dokusu elde edilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001; Çalışkan vd., 2019). Kallus kültürü, tıbbi öneme sahip bitki türlerinin sekonder metabolitlerinin üretiminde yaygın şekilde kullanılmaktadır.

1.2. *Verbascum* L.

Scrophulariaceae (Yüksükotugiller) familyası, dünya genelinde 200'den fazla cins ve 3.000 kadar tür bulundurmaktadır. Bu familya Türkiye'de ise 30 cins ile birlikte 466 tür barındırmaktadır (Heywood, 1979; Seçmen vd., 1998). Yüksükotugiller familyası bitkileri bir veya çok yıllık türlerdir. Ayrıca otsu, çalı veya ağaçsı formları da bulunabilmektedir. Çoğunlukla ototrof olmalarına rağmen yarı parazit ya da nadiren tam parazit türleri de vardır (Davis, 1978; Seçmen vd., 1998).

Verbascum L. cinsi Scrophulariaceae familyasına aittir ve yaygın olarak "sığır kuyruğu, kral şamdanı" gibi halk dilinde farklı isimlerle bilinmektedir. Cinsin ismi Linnaeus tarafından verilmiştir ve tüylü yapraklarının bulunması nedeniyle Latince 'de kaba tüylü veya sakal tüylü anlamlarına gelen "barba" kelimesinden türetilerek "barbascum" sözcüğünden köken almıştır (Karavelioğulları, 2004). Cinsine ait bitki türleri iki yılda bir veya çok yıllık, nadiren tek yıllık otsu formlardır ve derin kazık köklere sahiptirler. Bitkiler yaşamlarının ilk yıllarında yoğun şekilde yaprak rozeti oluştururlar. Rozet yaprak oluşumunu sağlam ve çiçekli bir sap (0,3-2 m) büyümesi izlemektedir (Turker ve Gürel, 2005).

Verbascum cinsi ağırlıklı olarak Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'da dağılışı göstererek yaklaşık 360 tür bulundurmaktadır (Heywood vd., 1993). Türkiye florasında da 253 doğal tür ve bunlara ait 130 hibrit tür bulundurmakla birlikte 13 grup altında incelenmektedir. Cinsin ülkemizdeki endemizm oranı yaklaşık %80'dir ve 198 tür endemik olarak belirtilmiştir (Huber-Morath, 1978; Karavelioğulları, 2015a; 2015b; Çingay ve

Karavelioğulları, 2016; Duman vd., 2017; Çingay vd., 2018). Tohum morfolojisine göre *Aulacospermae* Murbeck ve *Bothrospermae* Murbeck olarak iki farklı seksiyona ayrılan *Verbascum* cinsinin Türkiye'deki taksonları *Bothrospermae* seksiyonuna ait olduğu bilinmektedir (Murbeck, 1925; 1933; Huber-Morath, 1971).

1.2.1. *Verbascum scamandri* Murb.

Ülkemizde, Kazdağı'nda yayılış gösteren ve "Kazdağı Sığırkuyruğu" olarak bilinen *Verbascum scamandri* Murb. türü iki yıllık bir bitki olup 50-80 cm boylarında, kısa ve yoğun biçimde yıldızsı tüylü (tomentoz) veya tüysüz bir bitki türüdür (Şekil 2). Gövdesi silindirik, uzun ve basittir. Bazal yaprakları üstte yeşilimsi, altta grimsi veya sarımsı tomentoz, 5-15 x 2.5-5 cm, yaprak kenarı krenat, sap 2-8 cm; kaulin benzeri ancak daha küçüktür. Çiçek durumu gevşek, basit, altta kesintili, 2-4'lü kümeler halinde çiçekler bulundurmaktadır. Brakteler ovat ila ovat-lanseolat, mukronat ila aküminat; brakteol 2 adettir. Çiçek sapı 4 mm kadardır. Kaliks 6-7 mm, loblar oblong, sivri ve mikro bezlidir. Taç yaprakları sarı, 25-30 mm çapında, pellucid bezler bulunmaz ve dışı tüylüdür. 5 adet stamen ve filamentler anterlere kadar beyazımsı sarı tüylü, önde 2.5-3 mm dik 2 adet anter bulunmaktadır. Kapsül oval-eliptik, 6 x 4 mm ve yıldızsı tomentoz özellikleri ile morfolojik olarak tanınmaktadır (Huber-Morath, 1978). *Verbascum scamandri* Murb. türü ülkemizde endemik bir türdür ve IUCN kriterlerine göre Tehlikede (EN) kategorisinde sınıflandırılmaktadır (IUCN, 2001).

Alem:	Plantae
Bölüm:	Magnoliophyta
Sınıf:	Magnoliopsida
Takım:	Scrophulariales
Familya:	Scrophulariaceae
Cins:	<i>Verbascum</i>
Tür:	<i>Verbascum scamandri</i>



Şekil 2. *Verbascum scamandri* türünün doğal yayılış alanındaki genel görünüşü.

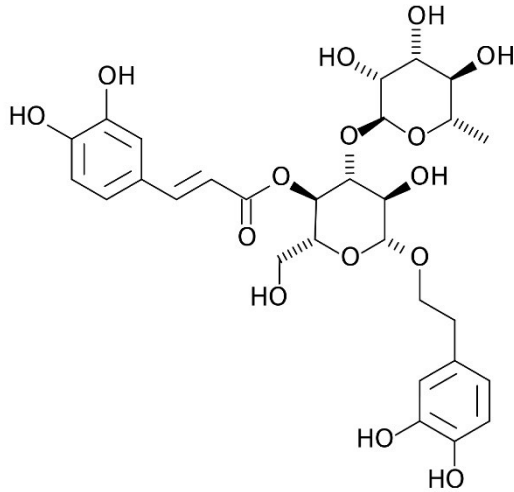
1.2.2. *Verbascum* Türlerinin Sekonder Metabolitleri ve Tıbbi Önemi

Verbascum türlerinin çoğu yaygın şekilde iridoid glikozitlerden; okubin, ajugol, harpajit, harpagozit, katalpol, feniletanoit glikozitlerden; verbaskozit, forsitozit B, lökoseptozit B, flavonoidlerden; luteolin, sinarozit, apigenin, apigetrin, kemferol, saponinlerden; Ilvensisaponin A, B ve C ve ayrıca fenolik sınıftan birçok sekonder metabolit bileşimini içerdiği bilinmektedir (Alaniya vd., 2014; Alipieva vd., 2014; Anil vd., 2014; Dalar vd., 2014; Sen vd., 2015; Boğa vd., 2016; Paun vd., 2016; Nykmukanova vd., 2017; Dimitrova vd. 2018). Ayrıca okubin, ajugol, harpajit ve katalpol gibi iridoid glikozit bileşiklerinin Scrophulariaceae familyası ve *Verbascum* türleri için marker bileşikler oldukları bilinmektedir (Tatli vd., 2008; Venditti vd., 2016).

Verbascum türleri içerdikleri bu sekonder metabolitleri nedeniyle geleneksel tıpta solunum yolu hastalıkları, kuru öksürük, boğmaca, tüberküloz, astım, balgam söktürücü, terletici, idrar söktürücü, büzücü, yatıştırıcı, yumuşatıcı, antiseptik, egzama, romatizma, soğuk algınlığı, migren, adet sancısı, kulak ağrısı, hemoroit, damar sertliği, iltihap, sıtma önleyici, yara iyileştirme, mantar enfeksiyonları, diyabet ve tümör tedavisi gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Dimitrova vd., 2013; Başer, 2015; Mükemre vd., 2015; Aysu vd., 2016; Küçük vd., 2016; Nofouzi vd., 2017).

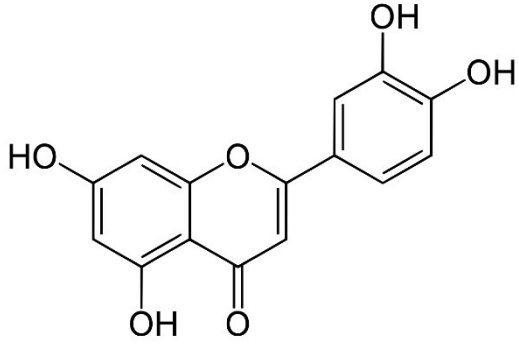
Verbaskozit, Luteolin ve Okubin Bileşikleri ve Önemleri

Fenilpropanoid sınıfında yer alan verbaskozit (Şekil 3) sekonder metabolit bileşiği, akteozit olarak da bilinmektedir. Birçok *Verbascum* türünde bulunan verbaskozit bileşiğinin ağrı kesici, antikanser, nöroprotektif, yara iyileştirici ve antihipertansif gibi etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Esposito vd., 2010; Akdemir vd., 2011; Zhao vd., 2013).



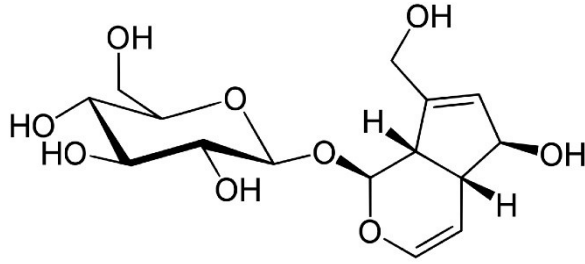
Şekil 3. Verbaskozit bileşiğinin kimyasal yapısı.

Flavonoid sınıfında bulunan bir diğer sekonder metabolit luteolin (Şekil 4), benzer şekilde *Verbascum* türlerinde yaygın bulunmaktadır. Luteolin bileşiği antioksidant, antimikrobiyal, kemopreventif, kemoterapötik, nöroprotektif ve antialerjik gibi etkiler göstermektedir (Lopez-Lazaro, 2009).



Şekil 4. Luteolin bileşiğinin kimyasal yapısı.

İridoid glikozit sınıfında bulunan okubin (Şekil 5) ise benzer şekilde antispazmodik, antimikrobiyal, cilt yaralarının iyileşmesinde, antikanser, antifibroz ve anti-fotoyaşlanma gibi etkiler gösterdiği bilinmektedir (Ho vd., 2005; Hung vd., 2008; Wu vd., 2018).



Şekil 5. Okubin bileşiklerinin kimyasal yapısı.

Bu Yüksek Lisans tez çalışmasında, Çanakkale Kazdağı endemiklerinden ve IUCN tehlike kategorilerine göre Tehlikede (EN) kategorisinde yer alan *Verbascum scamandri* Murb. türünün, ilk kez *in vitro* ortam koşullarının optimizasyonu elde edilen kalluslardan kültür oluşturularak bu kültürlerdeki verbaskozit, luteolin ve okubin sekonder metabolitlerinin üretimi ve HPLC yöntemi ile bu sekonder metabolitlerin miktarlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Bunun yanı sıra doğal ortamda yayılış gösteren ve *in vitro* olarak yetiştirilmiş bitki yapraklarının da sekonder metabolit analizi gerçekleştirilerek farklı besin ortamlarından elde edilen kallus kültürlerindeki sekonder metabolit içeriği ile karşılaştırılmıştır.

İKİNCİ BÖLÜM ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Sekonder Metabolit Analiz Çalışmaları

Verbascum marschallianum ve *Verbascum orientale* türlerinin toprak üstü kısımlarından metanol (MeOH) ekstraktı ile elde edilen etil asetat fraksiyonunun sekonder metabolit içeriği araştırılmıştır. HPLC analizi ile *V. marschallianum* türünden elde edilen altı flavonoid (kaempferit, luteolin ve türevi, kuersetin ve türevi ile izoramnetin türevi) ve *V. orientale* (kaempferit, luteolin, kuersetin ve luteolin 7-O- β -D-glukopiranozit) türünden elde edilen flavonoid bileşikleri izole edilerek spektrofotometrik ve kütle spektral verileri ve fizikokimyasal verilerin literatürle karşılaştırılmasıyla yapıları aydınlatılmıştır (Nykmanova vd., 2019).

Bir çalışmada, ilk kez *Verbascum glabratum* subsp. *bosnense* (K. Malý) Murb. türünün fenolik bileşikleri ile antioksidan ve antimikrobiyal aktivitelerinin analizi yapılmıştır. Dört farklı ekstraktın (petroleter, kloroform, etanol (EtOH) ve su) analizi sonucu türün fenolikler ve flavonoidler açısından çok zengin olduğunu ortaya çıkartmıştır. EtOH ekstraktında kuersitrin ve rosmarinik asit yoğun bulunurken 12 farklı bileşiği daha içerdiği bildirilmiştir. Su ekstraktı ise yoğun olarak 4-hidroksibenzoik asit, salisilik asit, morin ve apigenin bileşikleri açısından zengin olduğu söylenmiştir. Ayrıca tüm ekstraktlar, 0,139-0,021 mg/mL arasında değişen IC₅₀ (yarı maksimum inhibitör konsantrasyon) değerleri yüksek antioksidan potansiyeli gösterirken, EtOH ekstraktının test edilen tüm mikroorganizmalara karşı dirençli olduğu raporlanmıştır (Karaliya vd., 2020).

Verbascum bugulifolium Lam. türünün toprak üstü kısımlarından ilk kez beş iridoid glikozit (katalpol, spesiozit, ajugol, ajugozit ve 8-O-asetilharpagit), iki feniletanoid glikozit (verbaskozit ve glukopiranosil-(1→Gi-6)-martinozit), beş flavonoid (luteolin ve türevleri apigenin türevi ve kuersetin türevi) ve fitosterol (β -sitosterol) izole edilerek yapıları nükleer manyetik rezonans ve kütle spektrometresi ile aydınlatılmıştır. Ayrıca luteolin, en yüksek

antiinflamatuvar ve antioksidan aktivite sergilediği ancak tüm bileşiklerin zayıf antimikrobiyal aktivite sergilediği yapılan çalışma ile kanıtlanmıştır (Gökmen vd., 2021).

2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bir diğer çalışmada, endemik *Verbascum nobile* Velen türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen MeOH ekstraktının fitokimyasal bileşikler ile birlikte, izole edilen bu bileşiklerin konkanavalin A ile indüklenen T hücresi proliferasyonu ve Jurkat T hücre hattı ve dalak murin CD3⁺ T hücreleri üzerindeki aktivitelerine bakılmıştır. Ekstrakt ve değerlendirilen bileşiklerin (katalpol ve türevleri ile verbaskozit) hücre hattının lektin kaynaklı hücre büyümesinin inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir. Elde edilen yeni iridoid glikozit bileşiklerinin (katalpol türevleri), G1 fazında hücre döngüsü durmasına, kaspazların aracılık ettiği apoptoza veya splenik murin CD3⁺ T hücre proliferasyonunun dinamiğinde şiddetli bir değerikliğe neden olmadan S fazındaki hücrelerin frekanslarını azalttığı raporlanmıştır. Yeni bileşiklerin Concanavalin A indüklenmiş hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz fosforilasyonu üzerinde bilinen biyoaktif bileşiklerden (katalpol ve verbaskozit) daha güçlü inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca erken aktivasyon markörü CD69'un ekspresyonunu, hücre içi interferon gama seviyesi ile CD3⁺ interferon gama efektörler oluşumunu da bastırđı gösterilmiştir (Dimitrova vd., 2018).

Verbascum pterocalycinum var. *mutense* Hub.-Mor. türünün çiçeklerinden elde edilen MeOH ekstraktından saponinler (ilwensisaponin A ve C) izole edilerek, %1'lik steril solüsyonları antiinflamatuvar, antinosiseptif ve antiviral aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Her iki solüsyonun da sitotoksik (ilwensisaponin A 125 µg/mL ve ilwensisaponin C 62,5 µg/mL) etki gösterdiği ancak hiçbirinin Bovine Herpes Virüs Tip-1'e karşı antiviral aktivite göstermediği belirtilmiştir. Bununla birlikte 100 mg/kg'lık dozlarda antiinflamatuvar (ilwensisaponin A %9,6-36,6 ve ilwensisaponin C %13,5-25,5) ve antinosiseptif (ilwensisaponin A %36,8 ve ilwensisaponin C %28,6) aktivitesi gösterirken, siklooksijenaz aktivitesini azalttığı raporlanmıştır (Diker vd., 2019).

Verbascum armenum var. *armenum* türünün MeOH ve EtOH ekstraktlarının antimikrobiyal, antifungal, antioksidan gibi biyolojik aktivitesinin yanı sıra DNA ile etkileşimi de araştırılmıştır. Sonuçlara göre, her iki ekstraktın test edilen bakteriler (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*) üzerinde antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu, ancak funguslar üzerinde etki göstermediği belirtilmiştir. Ayrıca EtOH ekstraktı ile MeOH ekstraktının antioksidan etkisi (sırasıyla; IC₅₀: 58,52±0,88 µg/mL ve 50,15±308 µg/mL) saptanmıştır. Toplam fenolik içeriği her iki ekstrakt (EtOH ekstraktı 97,87±4,40 µg GAE/mg ve MeOH ekstraktı 80,75±2,64 µg GAE/mg) için ölçülmüştür. Antioksidan aktivitesinin yanında ayrıca ekstraktların pBR322 plazmid DNA'sı üzerine etkisi araştırıldığında DNA kesme aktivitesi gösterdiği ve bu nedenle *V. armenum* var. *armenum* türünün potansiyel olarak ilaç kategorisinde değerlendirilebileceği söylenmiştir (Kılıç, 2019).

Başka bir çalışmada, *Verbascum calvum* türünün çiçeklerinden elde edilen MeOH ve hidrometanol ekstraktının içeriği araştırılmıştır. Ekstraktlar genel olarak zayıf antimikrobiyal ve yüksek antioksidan aktivite sergilemiştir. MeOH ekstraktı, akciğer kanseri hücre hattına (A549) karşı önemli antiproliferatif etki gösterdiği ayrıca, her iki ekstraktın DPPH radikaline karşı doza bağımlı olarak önemli bir serbest radikal süpürme etkisi sergilediği belirtilmiştir. Orta basınçlı sıvı kromatografisi ile MeOH ekstraktından iridoid glukozit (ajugol ve okubin) izolasyonu gerçekleştirilerek okubin bileşiğinin yüksek antiinflamatuvar etkileri gözlenmiştir (Amin vd., 2020).

Verbascum exuberans türünün antiinflamatuvar aktivitesi ve antinosiseptif etkisi MeOH ekstraktı kullanılarak araştırılmıştır. Ekstraktın, merkezi spinal antinosiseptif etkisi gösterdiği, merkezi supraspinal antinosiseptif etki göstermediği ve periferik antinosiseptif etkisinin bulunduğu belirtilmiştir. Bunun yanı sıra ekstraktın ödem progresyonu ile TNF-α ve IL-1β üretimleri üzerindeki inhibisyonları ve antiinflamatuvar aktivitesi kanıtlanmıştır (Eyiiş vd., 2020).

Bir diğer çalışmada, *Verbascum letourneuxii* türünün sulu MeOH ekstraktı ve farklı fraksiyonlarının (dietyl eter, etil asetat, kloroform ve MeOH) antioksidan ve sitotoksik

aktiviteleri araştırılmıştır. DPPH analiz sonuçlarına (100 µg/mL) göre askorbik asit (%98,4) ile karşılaştırılan ekstrakt ve fraksiyonlar (MeOH %85,7, sulu MeOH %80, dietil eter %76, kloroform %64 ve etil asetat %23) önemli derecede süpürme aktivitesi göstermiştir. Sitotoksik aktivite olarak dietil eter fraksiyonu HepG2'ye karşı (IC₅₀: 52,5 µg/mL) etki gösterirken, kloroform fraksiyonu HepG2, MCF-7 ve PC3 hattına (sırasıyla IC₅₀: 70,1, 63,6 ve 73,4 µg/mL) karşı etki göstermiştir. Ayrıca bu iki fraksiyonun gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi analiz sonucu 53 kimyasal bileşik saptanmıştır ve MeOH fraksiyonunun sıvı kromatografi elektrosprey iyonizasyon tandem kütle spektrometri analizinden ise 21 bileşik tanımlanmıştır (Farid vd., 2020).

Verbascum thapsus L.'nin yapraklarından elde edilen MeOH, etil asetat, hekzan ve su ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesi sekiz farklı mikroorganizma üzerinde disk difüzyon ve kuyu difüzyon potansiyeli ile antifungal/antibakteriyal tarama için değerlendirilmiştir. Etil asetat ekstraktı 3000 µg/disk'te *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı maksimum %70 inhibisyon zonu geliştirmiş, MeOH ekstraktları *Salmonella typhi*'ye karşı %68 inhibisyon zonu, *Citrobacter freundii*'ye karşı %50 inhibisyon zonu, *Agrobacterium tumefaciens*'e karşı %54 inhibisyon zonu ve mantar türü olan *Alternaria solani*'ye karşı %50 inhibisyon zonu geliştirmiştir. Hekzan ekstraktı bakteri türleri üzerinde orta derecede etki gösterdiği ve mantar türlerine karşı ise etki göstermediği, ayrıca *Trichophyton rubrum* dirençlilik göstererek hiçbir ekstraktın etkinlik göstermediği raporlanmıştır (Khan vd., 2020).

Başka bir çalışmada, *V. thapsus* türünün su ekstraktında bulunan feniletanoid glikozitler ve toplam fenolik içeriği analiz edilmiş ve ekstraktın antiinflamatuvar ile antiosteoartritik potansiyeli murin monosit/makrofaj benzeri hücrelerde (RAW 264.7) ve insan kondrosit hücrelerinde araştırılmıştır. Altı feniletanoid glikozit tanımlanarak toplam fenolik içeriği ekstrakta 124,0±0,7 mg GAE/g olarak saptanmıştır. Bitkinin su ekstraktı hem kontrol hücreleri hem de pozitif kontrol olarak kullanılan *Harpagophytum procumbens* Burch. DC ex. Meisn ile tedavi edilen hücrelerle karşılaştırıldığında, hücresel inflamatuvar belirteçlerin çoğunu önemli ölçüde azaltabildiği gösterilmiştir (Calabrese vd., 2021).

Yapılan bir diğler çalışmada, *Verbascum pinnatifidum* ve *Verbascum antinori* türlerinin aseton, MeOH ve etil asetat ekstraktlarının antimikrobiyal ve antibiyofilm aktiviteleri 8 farklı mikroorganizma üzerinde araştırılmıştır. *V. antinori* ekstraktlarının antimikrobiyal aktivitesinin, *V. pinnatifidum* ekstraktlarına kıyasla daha fazla olduğu belirtilmiştir. Antibiyofilm aktiviteleri ise *V. pinnatifidum* ekstraktlarında %8,93 ile %92,18 arasında olurken, *V. antinori* ekstraktlarında %14,56 ile %91,19 arasında olduğu tespit edilmiştir (Göse ve Hacıoğlu, 2021).

Bir diğler çalışmada, *Verbascum arianthum* türünün fitokimyasal ve antimikrobiyal aktivitesini belirlemede 4 farklı bakteri türünde EtOH, MeOH ve distile su (dH₂O) ekstraktları çalışılmıştır. Türün flavonoid, fenol, kinon, steroid, saponin, tanen, alkaloid, kumarin gibi fitokimyasallar içerdiiğini belirlenmiştir. Antimikrobiyal aktivite sonuçlarında yaprak MeOH ekstraktının bakteri kolonileri üzerinde kök ve gövde ekstraktlarından daha iyi olduğu, antifungal aktivite sonuçlarının ise yaprak ve gövde MeOH ekstraktlarının *Aspergillus niger* türüne karşı önemli derecede aktivite sergilediği açıklanmıştır (Tariq, 2021).

2.3. Antitümör ve Sitotoksik Aktivite Çalışmaları

Verbascum alceoides türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen farklı ekstraktların (heksan, diklorometan, kloroform-metanol ve MeOH) ve MeOH ekstraktının su ile bütanol fraksiyonlarının sitotoksikite etkisi açısından değerlendirilmiştir. En güçlü sitotoksik etkileri gösteren bütanolik fraksiyonu orta performanslı sıvı kromatografisi ile fraksiyonlara ayrılarak A-E olarak adlandırılmıştır. Bu fraksiyonların insan servikal epiteloit karsinoma ve insan göbek damarı endotel hücrelerine karşı *in vitro* sitotoksikite MTT testi ile değerlendirilmiştir. Fraksiyonlardan D, E ve A hücre proliferasyonunun anlamlı ve doza bağlı inhibisyon (sırasıyla IC₅₀: 30, 39,8 ve 188,6 µg/mL) gösterdiği belirtilmiştir. Ayrıca sitotoksik etkilerin saponin ve flavonoid bileşiklerinin varlığından kaynaklanabileceği düşünölmektedir (Dinani vd., 2020).

Verbascum nigrum toprak üstü kısımlarından elde edilen MeOH ekstraktı ve fraksiyonları ölümsüzleştirilmiş insan keratinositlerinin ve epidermoid karsinom hücre hattının canlılığı üzerine etkileri araştırılmıştır. Ekstraktların hiçbirinin HaCaT hücrelerinin canlılığı üzerine etki etmediği belirtilmiştir. MeOH ekstraktı ve fraksiyon 4 (sırasıyla IC₅₀: 81,92 ve 12,27 µg/mL) epidermoid karsinom hücrelerinde sitotoksik etki göstermiştir. Metabolit profillemeye 23 bileşik tanımlanırken, MeOH ekstraktının iridoid glikozitleri (harpagosid, lateriosid, açillenmiş okubin türevleri) içerdiği ve fraksiyon 4'ün ise triterpen saponin glikozitleri (ilwensisaponinler A ve C, songarosaponinler A ve B) yüksek miktarda içerdiği raporlanmıştır (Iliescu vd., 2020).

Başka bir çalışmada, *Verbascum lasianthum* türünün MeOH ile aseton ekstraktlarının A549 hücre hattında genotoksik, sitotoksik, inflamasyon ve oksidatif stres etkileri çalışılmıştır. Analiz sonuçlarına göre *V. lasianthum* türüne ait iki ekstraktın da A549 hücrelerinde sitotoksik etki gösterdiği ve MeOH ekstraktının daha sitotoksik olduğu belirtilmiştir. Her iki ekstraktın, A549 hücre hattında inflamasyon ve oksidatif stresi azaltmıştır. Bu sebep ile de inflamasyon ve oksidatif stresin başka yollarla sitotoksikiteye neden olabileceği söylenmiştir. Ekstraktların yüksek dozları A549 hücrelerinde DNA hasarına yol açmış ve *V. lasianthum* türünün sitotoksikite/antikanserojen aktivitelerini DNA hasarı ile gösterilebileceği ifade edilmiştir (Sindarov, 2020).

2.4. Yara İyileştirme Çalışmaları

Verbascum speciosum türünden elde edilen MeOH ekstraktı *in vitro* hücre canlılığı, hücre göçü, hücre döngüsü, apoptoz, fibroblast (fare ve insan) ve endotel hücrelerinde gen ekspresyon modellerinin etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuçlara göre, ekstraktın (200 µg/mL) fibroblast hücrelerinde çoğalma ve göç etme etkisinin arttığını (yara kapanma oranları sırasıyla %20±4 ve %16±7), apoptotik gen seviyelerinin (p53 ve kaspaz-3) kontrol grubuna göre %7,25'ten %4,08'e düştüğü, kolajen tip I gen seviyesinin kontrole kıyasla daha yüksek olduğu belirtilmiştir. İnsan göbek bağı damarlarındaki endotel hücrelerinin ise tüp benzeri yapı oluşumunu arttırarak anjiyogenezi (%27±2) teşvik ettiği gösterilmiştir (Demirci vd., 2014).

Başka bir çalışmada, *V. speciosum* türünün yapraklarından elde ettikleri MeOH ekstraktı vazelin bazlı bir kreme ilave edilerek *in vivo* yaralar üzerinde test edilmiştir. Makroskobik sonuçlara göre %5 (w/v) ve %10 (w/h) MeOH ekstraktı içeren kremlerle muamele edilen grupların, negatif kontrol grubuna kıyasla daha yüksek yara iyileştirme etkisi sergilediği tespit edilmiştir (Kayır vd., 2018).

2.5. *In Vitro* Kültür Çalışmaları

Verbascum sinuatum L. türünde olgun embriyolar kullanılarak organogenez ve somatik embriyogenez yolu ile bitki rejenerasyonu sağlanmıştır. Naftalen asetik asit (NAA, 0 ile 3 mg/L) ve 6-benziladenin (BA, 0 ile 5 mg/L) ilave edilen Murashige ve Skoog (MS, 1962) ortamından embriyojenik ve embriyojenik olmayan kalluslar indüklenmiştir. Somatik embriyoidlerin çoğaltılması ve sürgün tomurcuklarının farklılaşması için gevşek ve sarı renkli kalluslar farklı besin ortamlarına aktarılmış ve gelişen sürgünler 1 mg/L BA veya kinetin (Kin) içeren MS ortamına kültürlenmiştir. Gelişen bitkilerin daha sonra toprağa aktarıldığı belirtilmiştir (Karamian ve Ghasemlou, 2014).

V. thapsus türü sürgün çoğaltımı için MS ortamında kültüre alınmıştır. Eksplantlar (yapraklar ve yaprak sapı), kallus indüksiyonu için BA ve NAA kombinasyonu ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. En iyi taze ve kuru kallus ağırlığı 0,5 mg/L BA kullanılarak elde edilmiştir. HPLC ile yapılan kantitatif analizler, kumarin, öjenol ve timol gibi fenolik bileşiklerin içeriği sırasıyla ana bitkinin yapraklarında (10, 41, 310 ppm) nispeten düşük olduğunu göstermiştir. Farklı konsantrasyonlardaki amino asitlerin (proline, glutamin, triptofan ve fenil alanin) kültür ortamına ayrı ayrı bir öncü olarak eklenmesi, kallus dokusunda fenolik bileşiklerin birikim seviyelerinin yükselmesine yol açtığı bildirilmiştir. Sonuçlara göre 150 mg/L proline kumarin üretimini %2752'ye, 50 mg/L proline öjenol birikimini %290'a ve 150 mg/L triptofan amino asitinin ise timol üretimini ana bitkiye kıyasla %390'a yükselttiği raporlanmıştır (Al-Jibouri vd., 2016).

Balkan bölgesinin endemik türlerinden biri olan *Verbascum eriophorum* Godr bitkisinin *in vitro* sürgün kültürünün yapıldığı bir çalışmada, tohumlar %70 etanol sterilize

edilmiştir. Anaç bitkilerden alınan eksplantlar, farklı konsantrasyonlarda BA (0,1 ile 1,0 mg/L arasında) ve indol-3-bütirik asit (0,1 ile 1,0 mg/L arasında) ile desteklenmiş MS ortamı içerisinde kültürlenmiştir. Tüm indol-3-bütirik asit konsantrasyonları kök oluşumunu uyarılmış, ancak sürgün gelişimini ve yaprak oluşumunu baskıladığı belirtilmiştir. Sürgün gelişimini teşvik etmede ise 0,5 mg/L BA ilaveli MS içerisinde daha etkili olduğu ve eksplantların yaklaşık %98'inin sürgün proliferasyonu (14,22±0,2) gösterdiği gözlenmiştir (Yordanova vd., 2016).

Başka bir çalışmada, *V. thapsus* türünü *in vitro* kallus kültüründe abiyotik elisitörler kullanılarak bazı fitokimyasal bileşiklerin birikimini arttırmaya yönelik bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada farklı şeker türevleri (glukoz, sükroz, fruktoz, sorbitol, mannitol ve mannoz) ile bunların farklı konsantrasyonları (30 ve 60 g/L) ve ayrıca farklı ışık spektrumları (siyah, mavi, kırmızı ve ultraviyole-C) kullanılmıştır. Üç fitokimyasalın (kumarin, öjenol ve timol) konsantrasyonundaki değişiklikler, HPLC analizi ile belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kallusların farklı şeker türevleri ve farklı konsantrasyonlarında kumarin (30 g/L sükroz ve glukoz içeren ortamlarda sırasıyla %802, %324) ve öjenol (60 g/L glukoz %437,5 ve 30 g/L fruktoz %495,6) içeriğinde artış gözlenirken, timol konsantrasyonlarında azalma gösterdiği belirtilmiştir. Benzer şekilde kallusların mavi, kırmızı ve ultraviyole -C ışık koşullarında inkübasyonu kumarin (kırmızı ışıkta %1171 ve ultraviyole-C %938) ve öjenol (mavi ışıkta %760) bileşiklerinin üretimini arttırdığı, çoğu *in vitro* uygulamanın ise anaç bitkilere kıyasla timol üretimini engellediği bildirilmiştir (Abed vd., 2020).

Başka bir çalışmada, *V. thapsus* türünün anaç bitkilerinden elde edilen yaprak eksplantları ile *in vitro* kallus ve hücre süspansiyon kültürleri oluşturulmuştur. Anaç bitki yaprakları (30 mg/g), kallus (12-45 mg/g) ve hücre süspansiyon (32 mg/g) kültürlerinden elde edilen ekstraktlarda verbaskozit seviyeleri belirlenmiştir. Bunun yanı sıra hazırlanan 5 ekstraktan verbaskozit (26,27-47,27 mg/g) ile birlikte üç farklı feniletanoit glikozit olan izoverbaskozit (29,02-49,69 mg/g), lökoseptozit A (1,55-8,90 mg/g) ve lökoseptozit B (10,05-38,24 mg/g) bileşiklerinin miktarları belirlenmiştir. Ekstraktların toplam feniletanoit glikozit miktarı ise 79-116,24 mg/g olduğu raporlanmıştır (Temporiti vd., 2020).

ÜÇÜNCÜ BÖLÜM

MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal ve Toplanması

Verbascum scamandri türüne ait bitki örnekleri, Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nden alınan araştırma izni ile 2021 yılının Ağustos ayında Çanakkale ilinin Bayramiç ilçesindeki Çırpılar köyüne yapılan arazi çalışmasından toplanmıştır. Arazi çalışmasında toplanan bitki örnekleri Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ersin KARABACAK tarafından teşhis edilmiştir. Bitki örnekleri 2 farklı yükseklikten (625 m ve 675 m) birer birey olacak şekilde toplanmış ve nemli ortamda tutularak zarar görmeleri engellenmiştir. Örneklerin toplandığı koordinatlar ve yükseklikler GPS cihazı (Garmin eTrex Venture HC) ile belirlenerek kaydedilmiştir. Ayrıca arazi çalışmasında, bitkilerin yayılış gösterdiği doğal alanlar fotoğraf makinesi (Olympus SP-800UZ) ile çekilmiştir. Türün bir örneği 2743 no ile Çanakkale Botanik Bahçesi Herbaryumuna kaydedilmiştir.

Laboratuvara getirilen bitki örneklerinin yaprakları saf su ile yıkanıp tozdan arındırılarak kurutma kağıtları üzerinde 3-4 gün kurutulmuştur ve daha sonra analizlerde kullanılmak üzere etiketlenerek uygun koşullarda muhafaza edilmiştir. Bitki tohumları ise +4°C'de saklanmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Sarf ve Kimyasal Malzemelerin Sterilizasyonu

Steril koşullarda gerçekleştirilecek olan bitki doku kültürü çalışmalarında kullanılacak sarf malzemeler, besin ortamları ve anaç bitki elde etmede kullanılacak tohumlar uygun şartlar ve yöntemler ile steril edilmiştir.

Petri kapları, tüp, pipet uçları, magenta, fayans, şişe, beher ve diğer cam malzemeler deterjan ile yıkanarak temizlenmiş ve kurutulmuştur. Daha sonra cam malzemeler ve fayans alüminyum folyo ile sarılmıştır. Besin ortamları, distile saf su, tampon çözeltiler ve stok solüsyonlar da hazırlandıktan sonra sarf malzemeler ile birlikte 1 atmosferlik basınçta 15 dakika boyunca 121°C'de otoklavda (Wiseclave) sterilizasyona tabii tutulmuştur.

Bitkisel materyallerin kültüründe kullanılacak bistüri, bistüri ucu, pens ve makaslar ise aktarım işlemlerinin her basamağında %70'lik EtOH ile alkol ocağın alevinden geçirilerek steril edilmiştir.

3.2.2. Besin Ortamının Hazırlanması

In vitro kültür ortamı olarak, MS bazal besin ortamı (4,4 g/L, Duchefa-M0222) kullanılmıştır. dH₂O içerisinde MS besin ortamı ve %3 (w/v) sükröz (Duchefa-S0809), manyetik karıştırıcıda çözdürülmüştür. Bitki büyüme düzenleyicilerinin stok solüsyonlarından belirlenen miktarlarda ortama ilave edilerek ortamın pH'ı 1 N sodyum hidroksit (NaOH) veya 1 N hidroklorik asit (HCl) eklenmesi ile 5.75'e ayarlanmıştır. Daha sonra %0,7 (w/v) fito agar (Duchefa-P1003) eklenmiş ve ortamın son hacmi dH₂O ile tamamlanmıştır. Hazırlanan besin ortamlarının tümü otoklavda steril edilmiştir. Sterilize edilen tüm besin ortamları agar içermeleri nedeniyle çok fazla soğumadan (yaklaşık 55-60°C'de) steril petrilere 20 mL olacak şekilde eşit miktarda aktarılmıştır.

3.2.3. *In Vitro* Kültür Şartları

In vitro kültür uygulamalarının tamamı steril laminar flow kabin içerisinde yapılmıştır (Şekil 6). Çalışmaya başlamadan önce kabin %70'lik EtOH ile silinmiştir. Otoklavdan çıkarılan steril malzemeler, 15 dakika sonra yüzeylerine %70'lik EtOH püskürtülerek kabine alınmıştır. Daha sonra içerisinde bitkisel materyal bulunmayan kabinin ultraviyole lambası 20 dakika süreyle açılmıştır.

Çalışma esnasında eksplantların veya kallusların kültür kaplarına aktarımı sırasında kullanılacak steril pens ve bisturilerin steril kalmaları için %70'lik EtOH ile muamele edildikten sonra yüzey sterilizasyonları kabin içerisinde sürekli yanan alkol ocağı alevinde gerçekleştirilmiştir. Eksplantlar kültür kaplarına aktarıldıktan sonra kapların ağız kısımları alevden geçirilerek kapatılmıştır.



Şekil 6. Kültür çalışmalarının gerçekleştirildiği laminar flow kabin.

Hazırlanan bütün kültürler, %55-60 nem oranı, 16 saat aydınlık 8 saat karanlık fotoperiyoda, $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklığa ve $72 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ışık yoğunluğuna sahip bitki yetiştirme odasına aktarılmıştır. Kültür başlangıcından sonra eksplantlardaki değişimlerin incelenmesi stereo mikroskop ile yapılmış ve eksplantlar düzenli periyotlarda fotoğraflandırılmıştır.

3.2.4. Tohum Yüzey Sterilizasyonu ve Anaç Bitki Eldesi

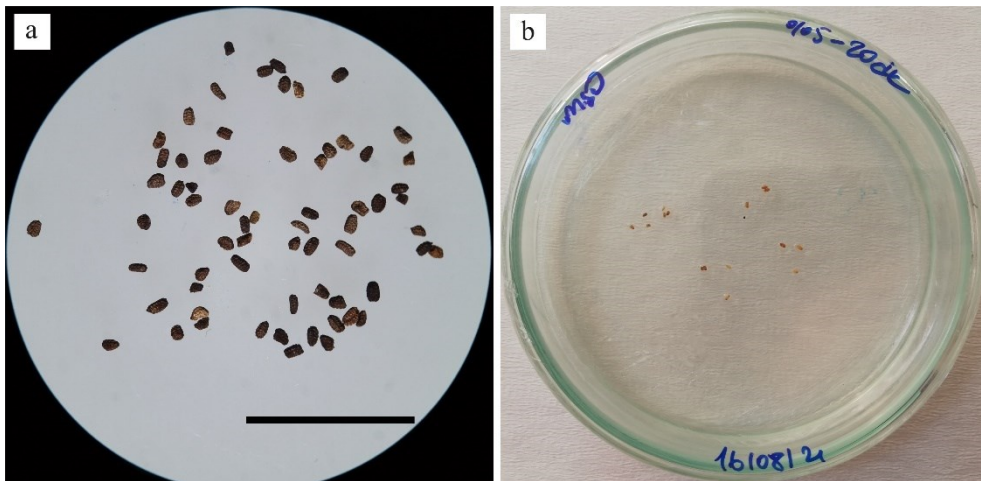
V. scamandri türünün tohumlarından (Şekil 7a) eksplant kaynağı olarak kullanılacak anaç bitkilerin aseptik koşullarda elde edilmesi ve kallus kültürlerinde kontaminasyonu en aza indirmek için dört farklı sterilizasyon uygulaması denenmiş (Tablo 1) ve her denemenin sonunda tohumlar 4-5 kez steril dH_2O ile durularak sodyum hipoklorit (NaOCl) uzaklaştırılmıştır.

Tablo 1

Tohumların sterilizasyon uygulamaları

Uygulama No	%70'lik EtOH (sn)	NaOCl (%) (dk)
1	30	%1 - 10
2	-	%1 - 20
3	-	%5 - 10
4	-	%5 - 20

Yüzey sterilizasyonu gerçekleştirilen tohumların ekimi, 1 mg/L giberellik asit (GA₃, Duchefa-G0907) ilave edilen ve edilmeyen %3 sükröz ile %0,7 (w/v) fito agar içeren MS bazal besin ortamlarına gerçekleştirilmiştir (Şekil 7b). Tohumların petri kaplarına ekimleri laminar flow kabini içerisinde steril koşullarda yapılmıştır. Çimlenen ve gelişen bitkilerin ortamdaki besinleri tüketmeleri nedeniyle her dört haftada bir içerisinde taze MS bazal besin ortamı bulunan kavanozlara aktarımı yapılmıştır. Yeterli büyüklüğe ulaşan *in vitro* anaç bitkilerin bir kısmı sekonder metabolit analizinde kullanılmak üzere kurutulurken, bir kısmı da kallus kültürlerinde eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır.



Şekil 7. a) *V. scamandri* tohumlarının stereo mikroskopta görünümü (bar = 5 mm), b) MS bazal besin ortamına ekilen tohumlar.

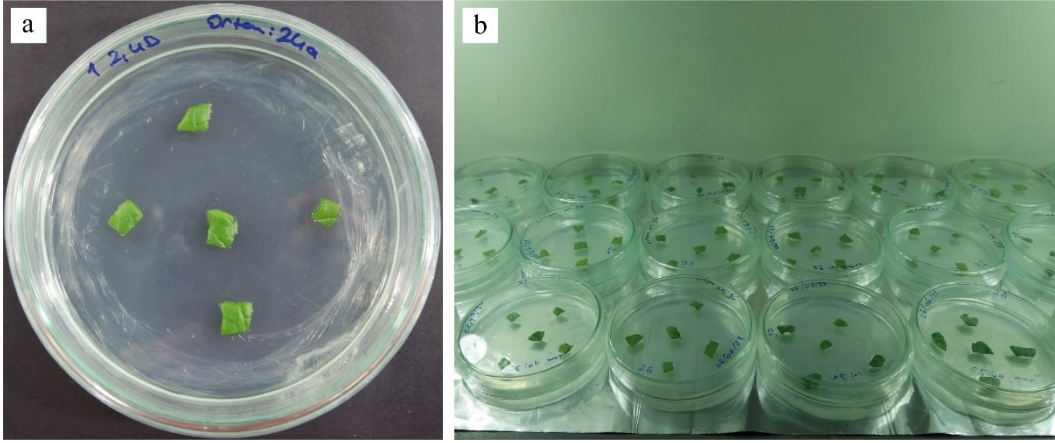
3.2.5. Kallus İndüksiyonu

14 haftalık sağlıklı ve yeterli büyüklükte olan anaç bitkiler eksplant kaynağı ve kallus indüksiyon kültüründe başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Kallus indüksiyonu için yaprak eksplantları, Tablo 2’de belirtilen 40 farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarda BBD ile %3 sükröz, 1 g/L polivinilpirolidon (PVP) ve %0,7 (w/v) fito agar içeren MS bazal besin ortamında kültüre alınmıştır. Her bir petriye yaprak eksplantından (5x5 mm) 5 adet konulmuş ve her bir deneme üç tekrarlı olacak biçimde kurulmuştur (Şekil 8a). Bütün *in vitro* kültür denemeleri bitki yetiştirme odasına aktarılmıştır (Şekil 8b).

Tablo 2

Kallus indüksiyonunda kullanılan MS besin ortamının içerdiği BBD çeşitleri, oranları ve kombinasyonları

Ortam No	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	Ortam No	Kin (mg/L)	2,4-D (mg/L)
1	-	-	21	-	-
2	-	0,1	22	-	0,1
3	-	0,5	23	-	0,5
4	-	1	24	-	1
5	0,5	-	25	0,5	-
6	1	-	26	1	-
7	2	-	27	2	-
8	3	-	28	3	-
9	0,5	0,1	29	0,5	0,1
10	1	0,1	30	1	0,1
11	2	0,1	31	2	0,1
12	3	0,1	32	3	0,1
13	0,5	0,5	33	0,5	0,5
14	1	0,5	34	1	0,5
15	2	0,5	35	2	0,5
16	3	0,5	36	3	0,5
17	0,5	1	37	0,5	1
18	1	1	38	1	1
19	2	1	39	2	1
20	3	1	40	3	1



Şekil 8. a) Kallus kültürlerinde başlangıç materyali olarak kullanılan yaprak eksplantları, b) Bitki yetiştirme odasına yerleştirilmiş kültür kapları.

Kallus indüksiyonundan 3 hafta sonra gelişen kallusların yapısı ve rengi ile ilgili veriler ile eksplant başına gelişen kallus indüksiyon oranı (KİO) ve kallus kararma oranı (KO) aşağıda verilen formüllere göre hesaplanmıştır;

$$\text{Kallus İndüksiyon Oranı (\%)} = \frac{\text{Kallus Oluşturan Eksplant Sayısı}}{\text{Toplam Eksplant Sayısı}} \times 100$$

$$\text{Kallus Kararma Oranı (\%)} = \frac{\text{Kararan Eksplant Sayısı}}{\text{Toplam Eksplant Sayısı}} \times 100$$

3.2.6. Kallus Gelişimi ve Çoğaltılması

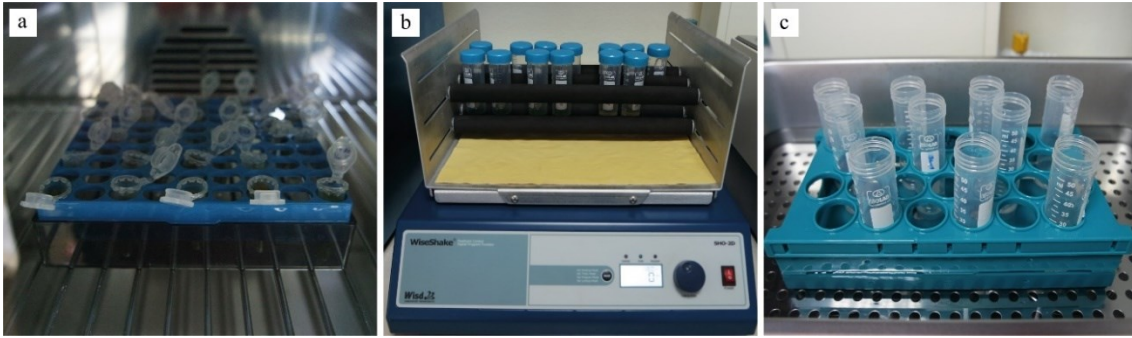
Kallus indüksiyon ortamında gelişen kallusların çoğaltılmalarında aynı oranda bitki büyüme düzenleyicileri ilaveli MS ortamlarına üç hafta sonra alt kültüre alınmışlardır. Kallusların çoğaltımı için iki kez alt kültürleme yapılmıştır. Ayrıca eksplantlarda meydana gelen morfolojik farklılaşmalar stereo mikroskop ile günlük olarak gözlemlenerek her bir besin ortamı fotoğraf makinesi ile fotoğraflandırılmıştır.

Alt kültürlemeler sırasında gelişen kallusların biyokütlesi, çapı, yapısı ve rengi ile ilgili veriler kaydedilmiştir. Belirtilen bu parametreler dikkate alınarak en iyi kallus elde edilen ortamlar belirlenmiştir. Ayrıca çoğaltılan kallusların büyüme indeksleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır;

$$\text{Kallus büyüme indeksi} = \frac{\text{Son Ağırlık} - \text{İlk Ağırlık}}{\text{İlk Ağırlık}}$$

3.2.7. Sekonder Metabolit Ekstraksiyonu ve HPLC Analizi

Kallusların sekonder metabolit ekstraksiyonu için Çölgeçen vd. (2018)'nin kullandığı yöntem değiştirilerek uygulanmıştır. Çoğaltılan kallusların yaş ağırlıkları tartıldıktan sonra 72 saat boyunca etüvde (Memmert INB 500) 37°C'de kurutulmuştur (Şekil 9a) ve kallusların kuru ağırlıkları tartılmıştır. Seçilen deneme serilerinden, kurutulmuş 0,1 g kallus alınarak sıvı azot ile muamele edilerek toz haline getirilmiştir. Daha sonra örnekler ekstraksiyon yapılmaya kadar uygun koşullarda (-20°C) saklanmıştır.



Şekil 9. a) Etüvde kurutulmaya bırakılmış kallus örnekleri, b) Orbital çalkalayıcıya yerleştirilmiş örnekler, c) Su banyosunda kurutulmaya bırakılmış örnekler.

Kurutulan kallus örnekleri, 10 mL %99'luk MeOH içerisinde 48 saat boyunca orbital çalkalayıcıda (WiseShake SHO-2D) 22±3°C'de karıştırılmıştır (Şekil 9b). Süre sonunda 20 dakika 8000 rpm'de santrifüjlenmiştir (Hettich Universal 320). Santrifüjden sonra örneklerden süpernatant kısımları alınıp, 40°C'ye ayarlı su banyosunda (Daihan Scientific

WB-11) MeOH uçuruluncaya kadar 1 gün bekletilerek kurutulmuştur (Şekil 9c). Daha sonra kurutulan örneklerin üzerine 1 mL %99'luk MeOH eklenerek vortex (Stuart SA8) ile çözdürülmüştür. Sekonder metabolit içeriklerinin karşılaştırılması için araziden toplanan ve *in vitro* olarak yetiştirilen *V. scamandri* türünün bitki örnekleri gölgede $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de kurutularak 0,1 g tartılmıştır ve aynı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir (Şekil 10).



Şekil 10. Doğal bitki yapraklarının kurutulması.

Örneklerdeki sekonder metabolit içeriklerinin HPLC ile analizi tez kapsamında hizmet alımı yoluyla Burdur Mehmet Akif Ersoy Bilimsel ve Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Analizlerin tamamı Shimadzu Prominence Marka HPLC cihazı ile Zorbax C18 (250*4,6 mm, 5 mikron) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dereceli ayırtmada %3 Formik asit (A) ve Metanol (B) mobil fazı kullanılmıştır. Program; 93% A+7% B (3 dk), 72% A+28% B (28 dk), 67% A+33% B (60 dk), 58% A+42% B (62 dk), 50% A+50% B (70 dk), 30% A+70% B (75 dk), 93% A+7% B (90 dk) olarak yapılmıştır. Standart olarak verbaskozit (Sigma Aldrich-820580), luteolin (Sigma Aldrich-72511) ve okubin (Sigma Aldrich-55561) bileşikleri kullanılmıştır. Her bir örneğin analizleri iki tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır. Örneklerin sekonder metabolit miktarları, 1 g kuru ağırlığın içerdiği mg cinsinden hesaplanmıştır.

3.3. İstatiksel Analiz

Türün kallus kültür aşamalarının optimizasyonu için her aşamada kurulan deney düzeneklerindeki tüm veriler istatistiksel olarak hesaplanıp analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Ayrıca HPLC analiz sonucu örneklerin sekonder metabolit içerikleri hesaplanmıştır. Tüm veriler, SPSS 20.0 (IBM) programında tek yön varyans analizi (ANOVA) kullanılarak analiz edilmiştir. Ayrıca denemeler arası anlamlı fark Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile ($p<0,05$) belirlenmiştir.



DÖRDÜNCÜ BÖLÜM ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Bitkisel Materyale Ait Bulgular

Çalışma kapsamında 2021 yılının Ağustos ayında Çanakkale'nin Bayramiç ilçesinde bulunan Çırpılar köyüne arazi çalışması yapılmıştır. Arazide *V. scamandri* türüne ait bitki örnekleri yayılış gösterdiği bölgede iki farklı yükseklikten toplanmıştır (Şekil 11) ve Tablo 3'te belirtilmiştir.



Şekil 11. *Verbascum scamandri* türünün toplandığı habitat.

Tablo 3

Bitki örneklerinin toplandığı yükseklik ve koordinatlar

Lokasyon No	Yükseklik (m)	Koordinat
1	625	39°47'26.4" N 26°53'48.2" E
2	675	39°47'03.2" N 26°53'57.5" E

Toplanan bitkiler laboratuvara getirildikten sonra yaprakları kesilerek akan musluk suyu altında 1 saat boyunca temizlenmiştir. Daha sonra yapraklar kurutma kağıtları üzerinde kurumaya bırakılmıştır ve analiz için kullanılmak üzere etiketlenerek 25°C’de saklanmıştır. Bitkilerden elde edilen tohumlar ise *in vitro* kültür çalışmasında kullanılmak üzere +4 °C’de muhafaza edilmiştir.

4.2. Tohum YüzeY Sterilizasyonu ve Anaç Bitki Eldesine Ait Bulgular

Arazi çalışmasıyla toplanan tohumlar kültüre edilmeden önce yüzeYlerindeki kontaminantları uzaklaştırmak amacıyla yüzeY sterilizasyonuna tabi tutulmuştur. YüzeY sterilizasyonunda kullanılan farklı uygulamalara bağılı olarak kontaminasyon ve çimlenme oranlarında değişiklik gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4).

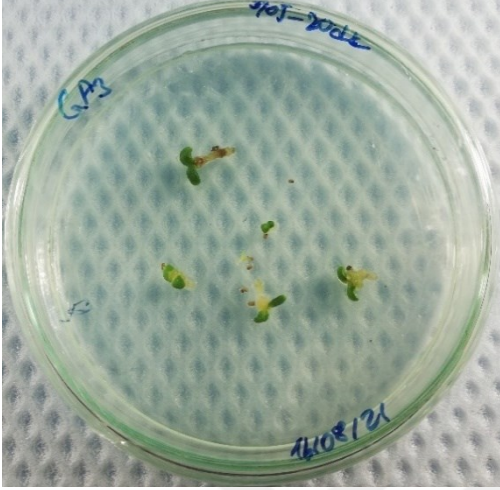
Tablo 4

Sterilizasyon uygulamalarının kontaminasyon ve çimlenme oranları

Uygulama No	EtOH (%70) (sn)	NaOCl (%) (dk)	GA ₃ (mg/L)	Kontaminasyon (%)	Çimlenme Oranı (%)
1	30	%1 - 10	-	%0	%31,25
2	-	%1 - 20	-	%11	%55,56
3	-	%5 - 10	-	%100	Gelişim yok
4	-	%5 - 10	1 mg/L	%100	Gelişim yok
5	-	%5 - 20	-	%0	%43,75
6	-	%5 - 20	1 mg/L	%0	%75

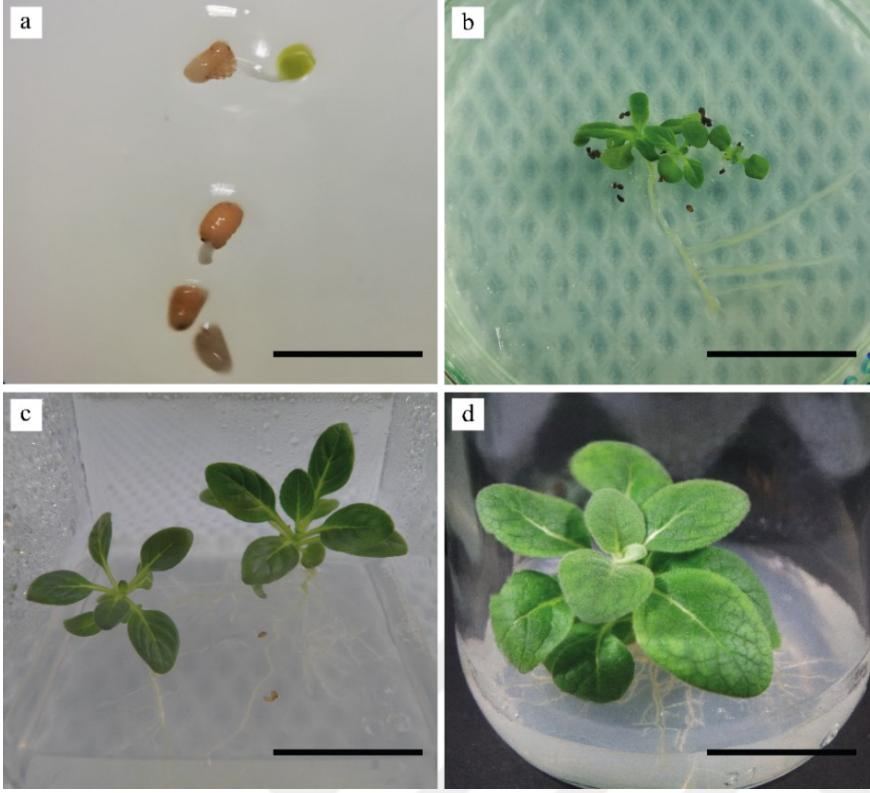
Tohumlar yüzeY sterilizasyonundan sonra BBD’siz MS bazal besin ortamı ve 1 mg/L GA₃ ilaveli MS bazal besin ortamı bulunan petrilere ekimi gerçekleştirilerek çimlendirilmiştir. *V. scamandri* tohumları için en uygun yüzeY sterilizasyonu %5’lik NaOCl ile 20 dakika muameleden sonra MS bazal besin ortamına ekilen tohumlardan elde edilmiştir. %70’lik EtOH’da 30 saniye muameleden sonra %1’lik NaOCl ile 10 dakika muamele ile yüzeY sterilizasyonu yapılan tohumların çimlenme oranında (%31,25) düşüklük gözlemlenmiştir. %5’lik NaOCl ile 20 dakika sterilizasyonu yapılan tohumların, GA₃ ilaveli

MS bazal besin ortamına kültüre alınmasından 15 gün sonra çimlenme oranı (%75) artmıştır. Ancak gelişen bitkilerin kotiledon evresinde kaldıkları, boylarının uzamadığı ve kök tüyü oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 12).



Şekil 12. 1 mg/L GA₃ ilaveli MS besin ortamında çimlenen 15 günlük bitkiler.

Farklı sterilizasyon uygulamaları sonucu tohumlardan çimlenen bitkiler (Şekil 13a), anaç bitki olarak yetiştirilmek üzere ve gelişebilmeleri için 4 haftalık periyotlarla taze MS bazal besin ortamına aktarılarak 14 hafta boyunca kültüre edilmişlerdir (Şekil 13b-c). 14. haftanın sonunda sağlıklı bitkiler kallus indüksiyonunda eksplant kaynağı olarak kullanılmıştır (Şekil 13d).



Şekil 13. a) Çimlenen *V. scamandri* tohumları, b) 4 haftalık bitkiler, c) 8 haftalık bitkiler, d) 14 haftalık anaç bitki (bar = 5 mm).

4.3. Kallus İndüksiyonu ile İlgili Bulgular

Kallus indüksiyon aşamasında, tohumlardan çimlendirilmiş 14 haftalık sağlıklı bitkilerden kesilen yaprak eksplantları, BBD'lerin farklı konsantrasyon ve kombinasyonları ilave edilen MS bazal besin ortamlarında kültüre edilmiştir. Kallus indüksiyon denemeleri, petri başına 5 eksplant olacak şekilde 3 tekrarlı kurulmuştur. Kültür başlangıcının 0. gününden itibaren eksplantların haftalık değişimleri 21 gün boyunca kaydedilmiştir. 21 gün sonunda eksplantlarda meydana gelen morfolojik farklılaşmalar incelenmiş ve her bir besin ortamı karşılaştırılmıştır. Ayrıca en uygun kallus indüksiyon ortamlarının belirlenmesi için 40 farklı ortamın kallus indüksiyon oranı (KİO), karar oranı (KO), yapı ve renk gibi verileri 3 haftalık kültür süreci sonunda 15 eksplant için belirlenerek karşılaştırılmıştır (Tablo 5 ve Tablo 6).

Tablo 5

Kallus indüksiyon ortamlarında gelişen kallusların indüksiyon ve kararma oranı (*Bir sütündeki farklı üst simge harfler, istatistiksel olarak anlamlı farkı belirtir, $p \leq 0.05$)

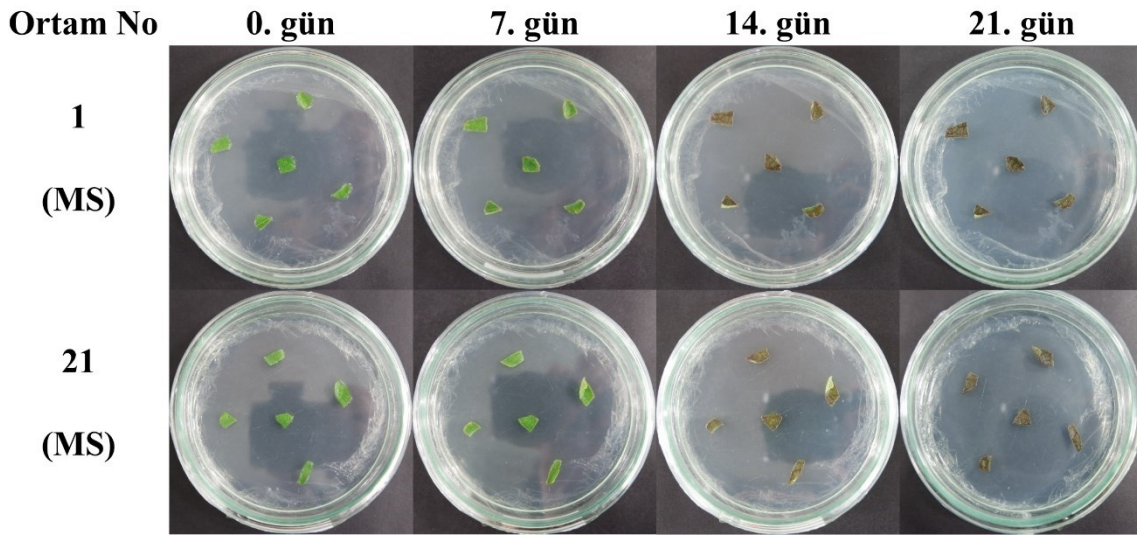
Ortam No	Kallus İndüksiyon Oranı (%)	Kararma Oranı (%)	Ortam No	Kallus İndüksiyon Oranı (%)	Kararma Oranı (%)
1	0±0,00 ^a	100	21	0±0,00 ^a	100
2	0±0,00 ^a	100	22	0±0,00 ^a	100
3	0±0,00 ^a	100	23	100±0,00 ^f	100
4	53,3±46,2 ^{bcde}	86,7	24	100±0,00 ^f	100
5	73,3±30,6 ^{cdef}	66,7	25	0±0,00 ^a	6,7
6	53,3±41,6 ^{bcde}	60	26	33,3±41,6 ^{abc}	66,7
7	46,7±41,6 ^{bcd}	46,7	27	53,3±50,3 ^{bcde}	66,7
8	53,3±23,1 ^{bcde}	33,3	28	20±34,6 ^{ab}	13,3
9	73,3±11,5 ^{cdef}	40	29	100±0,00 ^f	66,7
10	73,3±11,5 ^{cdef}	53,3	30	100±0,00 ^f	46,7
11	93,3±11,5 ^{ef}	26,7	31	80±20,0 ^{def}	6,7
12	80±20,0 ^{def}	40	32	100±0,00 ^f	13,3
13	60±34,6 ^{bcdef}	26,7	33	100±0,00 ^f	26,7
14	93,3±11,5 ^{ef}	33,3	34	100±0,00 ^f	46,7
15	73,3±30,6 ^{cdef}	6,7	35	100±0,00 ^f	66,7
16	80±20 ^{def}	60	36	100±0,00 ^f	20
17	73,3±11,5 ^{cdef}	6,7	37	100±0,00 ^f	33,3
18	60±34,6 ^{bcdef}	46,7	38	100±0,00 ^f	6,7
19	80±20,0 ^{def}	93,3	39	100±0,00 ^f	66,7
20	93,3±11,5 ^{ef}	46,7	40	100±0,00 ^f	0

Tablo 6

Kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan eksplantlardan gelişen kallusların yapı ve renkleri

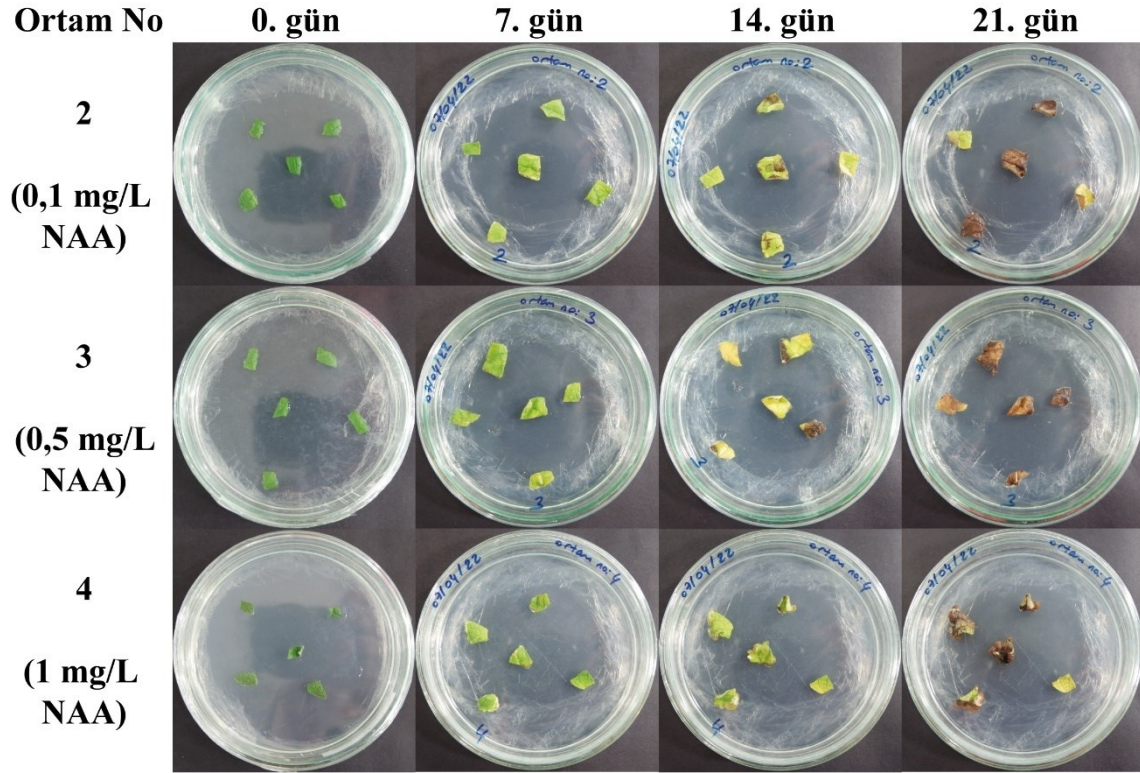
Ortam No	Kallus Yapısı	Kallus Rengi	Ortam No	Kallus Yapısı	Kallus Rengi
1	Gelişim yok	-	21	Gelişim yok	-
2	Gelişim yok	-	22	Gelişim yok	-
3	Gelişim yok	-	23	Yumuşak-Sulu	Beyaz-Kahverengi
4	Sert	Kahverengi	24	Yumuşak-Sulu	Beyaz-Kahverengi
5	Sert	Kahverengi-Yeşil	25	Sert	Yeşil
6	Sert	Kahverengi-Yeşil	26	Sert	Yeşil
7	Sert	Yeşil	27	Sert	Yeşil
8	Sert	Yeşil	28	Sert	Yeşil
9	Sert	Yeşil	29	Sert	Kahverengi-Yeşil
10	Sert	Yeşil	30	Sert	Yeşil
11	Sert	Yeşil	31	Sert	Yeşil
12	Sert	Yeşil	32	Sert	Yeşil
13	Sert	Yeşil	33	Sert	Yeşil-Sarı
14	Sert	Yeşil	34	Sert	Yeşil
15	Sert	Yeşil	35	Sert	Yeşil
16	Sert	Kahverengi-Yeşil	36	Sert	Yeşil
17	Sert	Kahverengi-Yeşil	37	Yumuşak	Yeşil-Sarı
18	Sert	Kahverengi-Yeşil	38	Yumuşak	Yeşil-Sarı
19	Sert	Kahverengi-Yeşil	39	Yumuşak	Yeşil-Sarı
20	Sert	Yeşil	40	Yumuşak	Yeşil-Sarı

Kallus indüksiyon ortamları karşılaştırıldığında, BBD içermeyen MS bazal besin ortamında kültüre alınan eksplantlarda farklılaşma gözlenmemiştir ve kallus indüksiyon oranının %0 olduğu, kararma oranının ise %100 olduğu saptanmıştır (Şekil 14). BBD içeren MS bazal besin ortamlarındaki eksplantlarda ise kültürden bir hafta sonra hacimsel artışın ve kallus oluşumunun başladığı gözlemlenmiştir. Ayrıca BBD içeren ortamlarda kallus indüksiyon oranı, kararma oranı, yapı ve renk verileri farklılık gösterdiği belirlenmiştir ve birbirleri ile karşılaştırılmıştır.

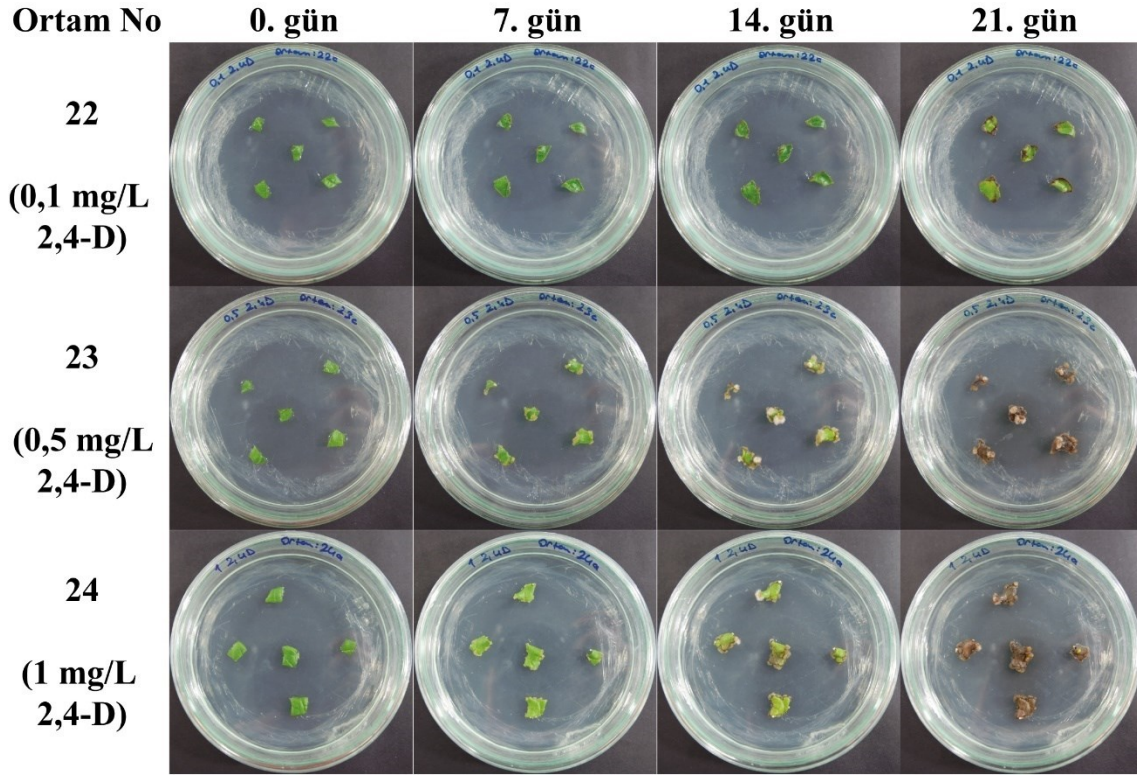


Şekil 14. BBD içermeyen MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.

Sitokinin içermeyen sadece NAA ya da 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında kültüre edilmiş eksplantlar değerlendirildiğinde, artan NAA konsantrasyonlarını içeren ortamlardan sadece, yüksek konsantrasyonda (1 mg/L) NAA ilaveli bazal besin ortamında kallus indüksiyonu gözlemlenirken (KİO %53,3±46,2), artan 2,4-D konsantrasyonlarını içeren ortamlarda ise 0,5 ile 1 mg/L 2,4-D ilaveli ortamlarda kallus indüksiyonu gözlenmiştir (her iki ortamın KİO'su %100±0,00). Ayrıca her iki oksinin artan konsantrasyonlarında eksplantlarda kararma meydana geldiği gözlenmiştir ve 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarında (0,5 ile 1 mg/L) kararan eksplantların yara bölgelerinden beyaz-kahverengi renkte ve yumuşak-sulu yapıda kallusların geliştiği gözlemlenmiştir (Şekil 15, Şekil 16).

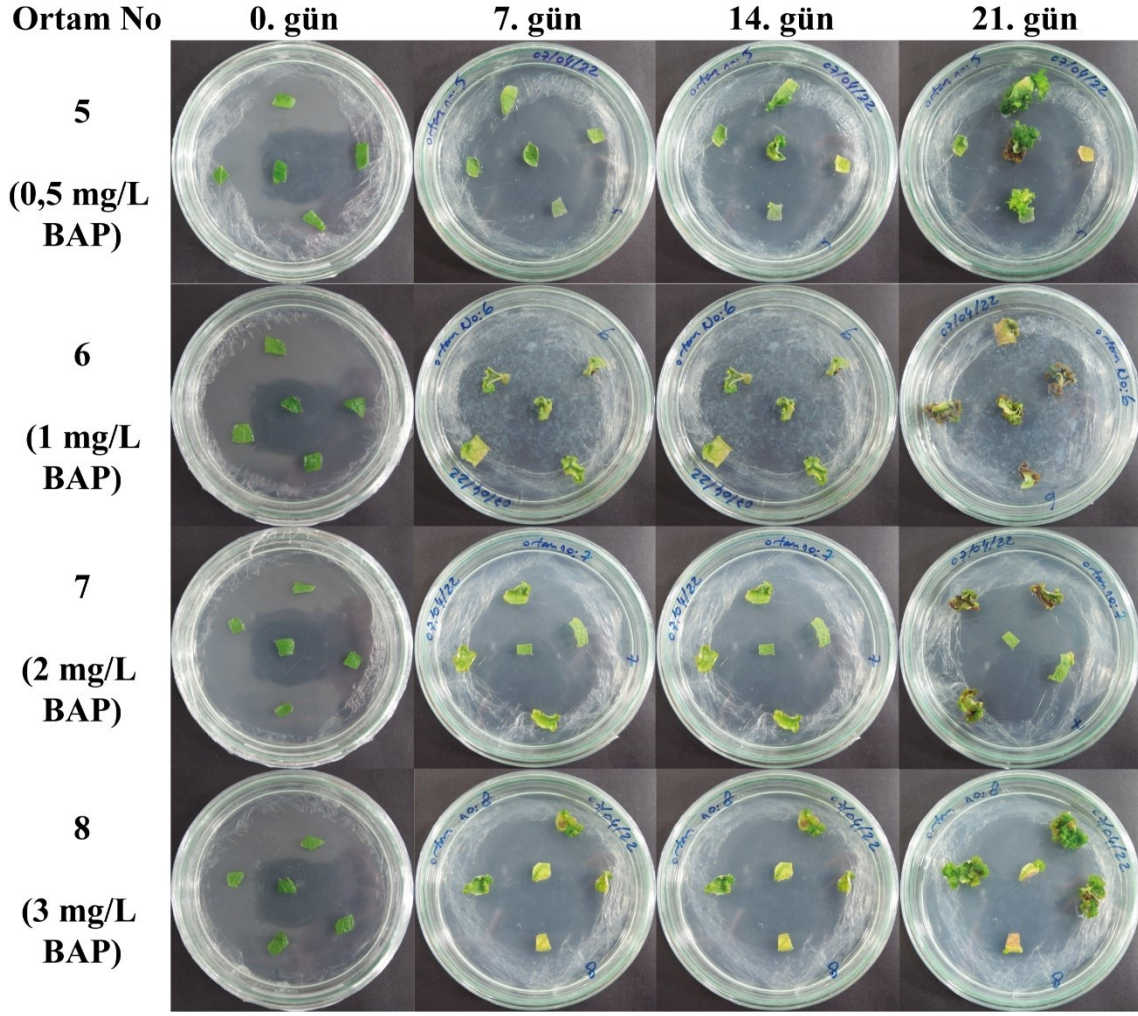


Şekil 15. Artan NAA konsantrasyonları ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.

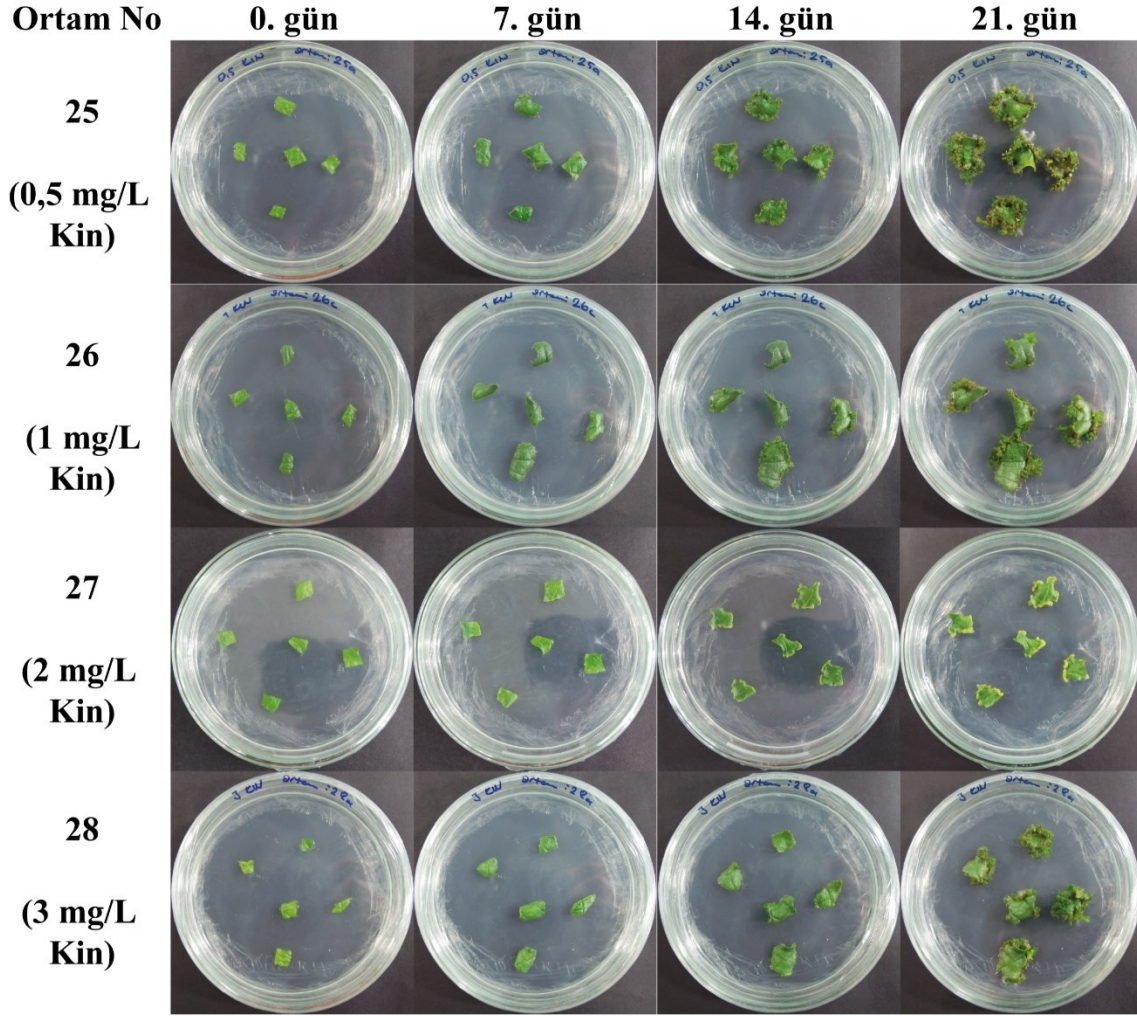


Şekil 16. Artan 2,4-D konsantrasyonları ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.

Sadece BAP ya da Kin'in artan konsantrasyonlarını içeren ortamlar karşılaştırıldığında, her iki sitokin de kallus oluşumunu ve sürgün oluşumu indüklediği belirlenmiştir. BAP'nın artan konsantrasyonlarında kültür başlangıcından bir hafta sonra eksplantlarda hacimsel artış meydana gelmiştir. Eksplantların kesik bölgelerinde yeşil renkli kallus oluşumu ve sonrasında sürgün oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 17). Kin'in artan konsantrasyonlarını içeren MS bazal besin ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda BAP içeren ortamdaki eksplantlara göre daha fazla hacimsel artış ve direkt sürgün oluşumu gözlemlenmiştir (Şekil 18).

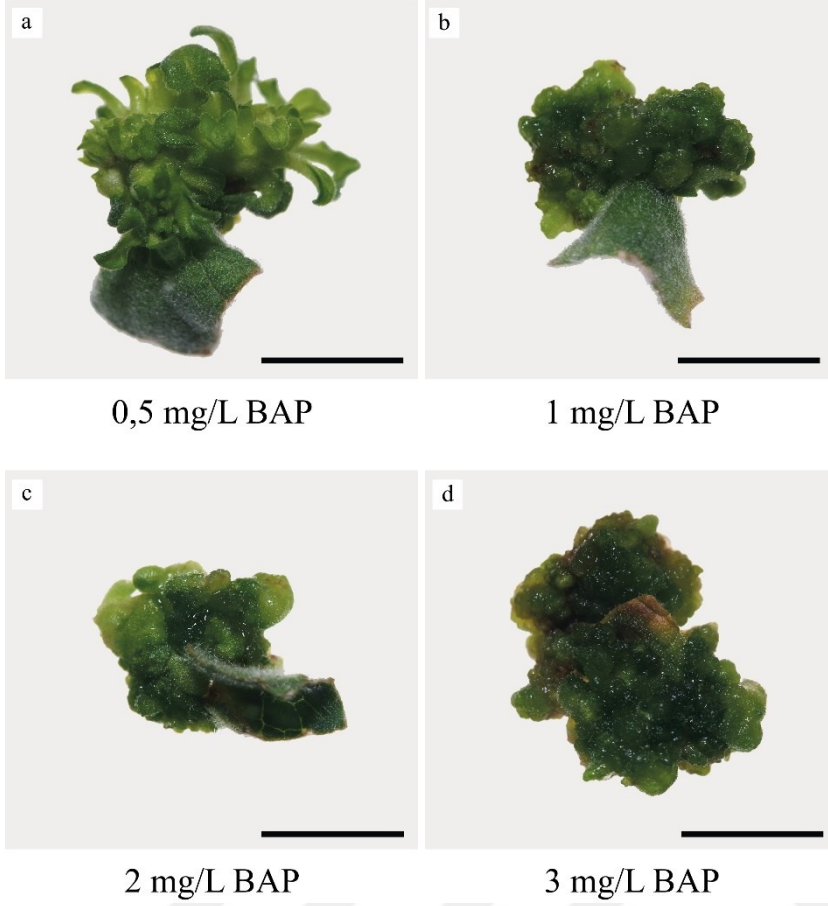


Şekil 17. Artan BAP konsantrasyonları ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.



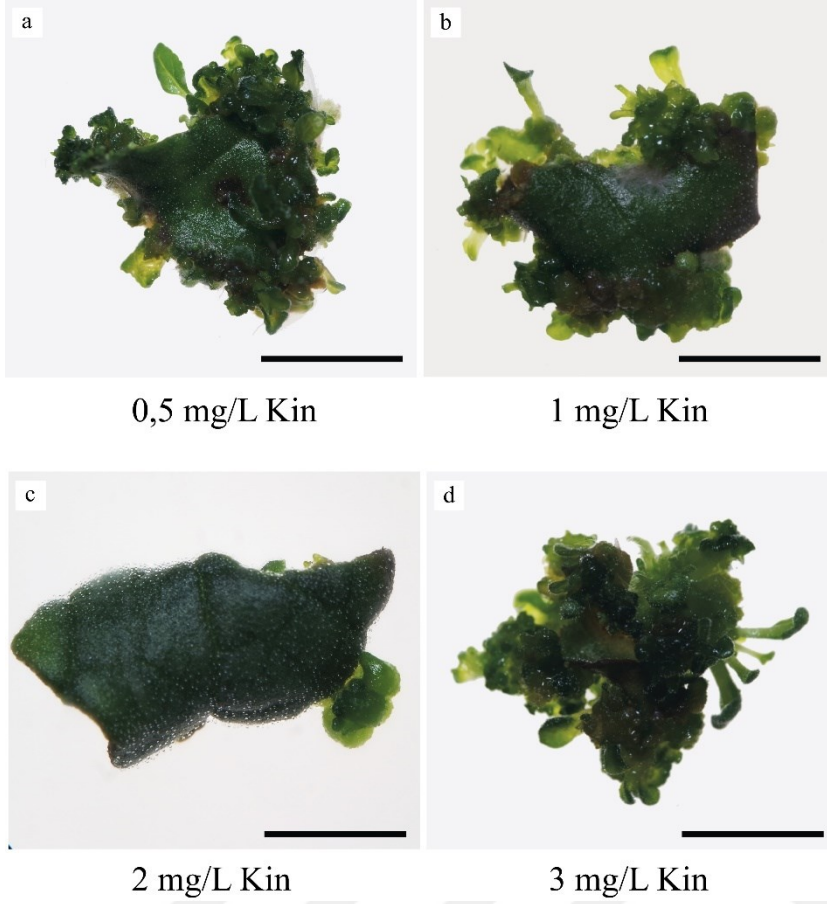
Şekil 18. Artan Kin konsantrasyonları ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.

BAP'nın tek başına ve artan konsantrasyonları karşılaştırıldığında, 0,5 mg/L BAP içeren MS bazal besin ortamında sürgün gelişiminin meydana geldiği ve oluşan sürgün sayısının fazla olduğu görülmüştür. 0,5, 1, 2 ve 3 mg/L BAP içeren MS bazal besin ortamlarında kültüre alınan eksplantların kesik bölgelerinde kahverengi-yeşil veya sadece yeşil renkli ve kompakt yapıda kallus indüksiyonu (sırasıyla KİO %73,3±30,6, %53,3±41,6, %46,7±41,6 ve %53,3±23,1) görülmüştür. Bu kallusların bazı bölgelerinde meristemoidlerin oluştuğu ancak kararına dolayısıyla sürgüne gelişimleri gözlemlenmemiştir (Şekil 19).



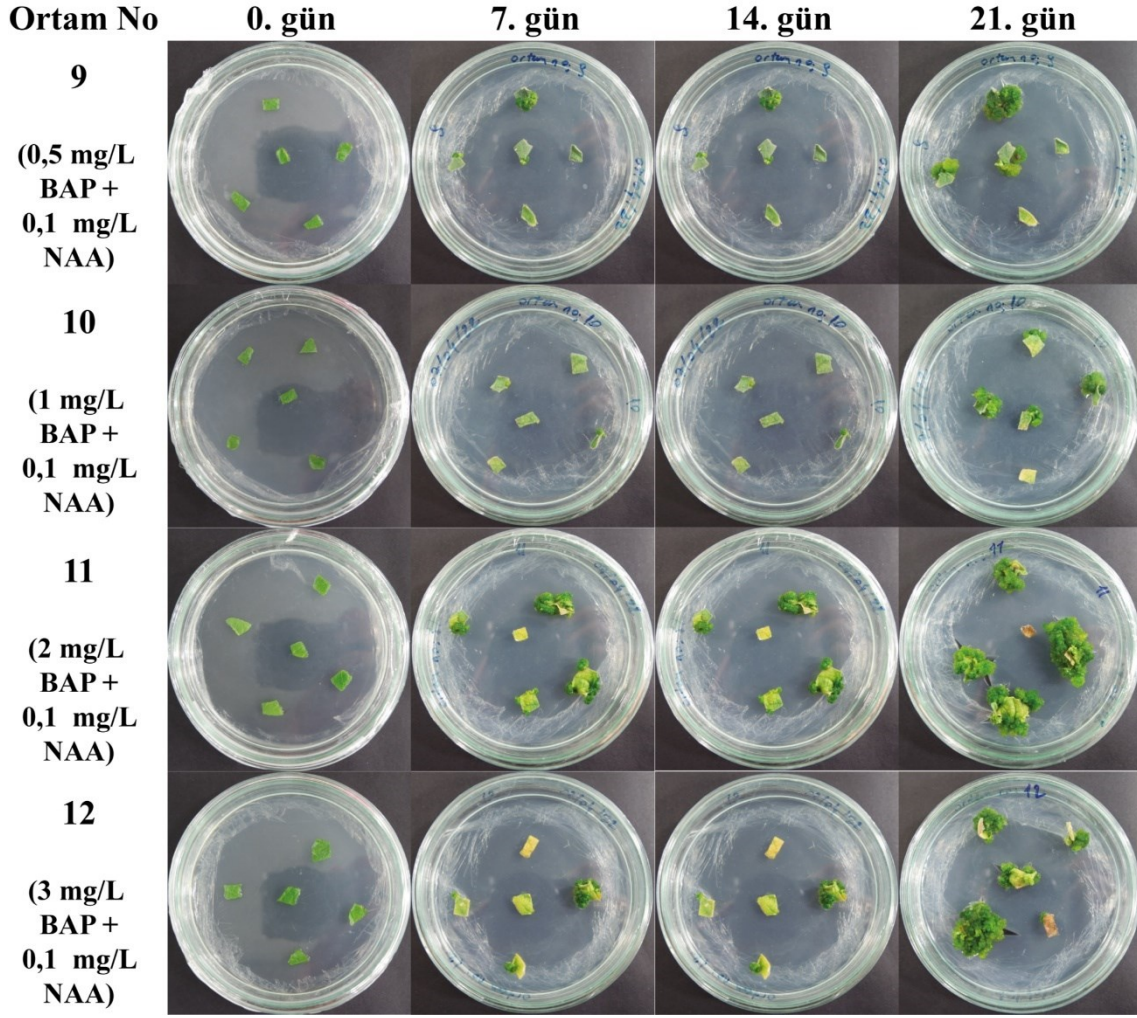
Şekil 19. Sadece BAP ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).

Tek başına Kin içeren besin ortamları karşılaştırıldığında, 0,5, 1 ve 3 mg/L Kin (sırasıyla; KİO %0±0,00, %33,3±41,6 ve %20±34,6) ilaveli ortamlardaki eksplantlarda kallus indüksiyonunun yanında direkt sürgün gelişimi de gözlemlenirken, sadece 2 mg/L Kin içeren ortamda yeşil ve sert yapı kallus indüksiyonu gözlemlenmiştir (KİO %553,3±50,3). Ayrıca sürgün indüksiyonunun, düşük konsantrasyonda Kin ilaveli ortamda daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 20).

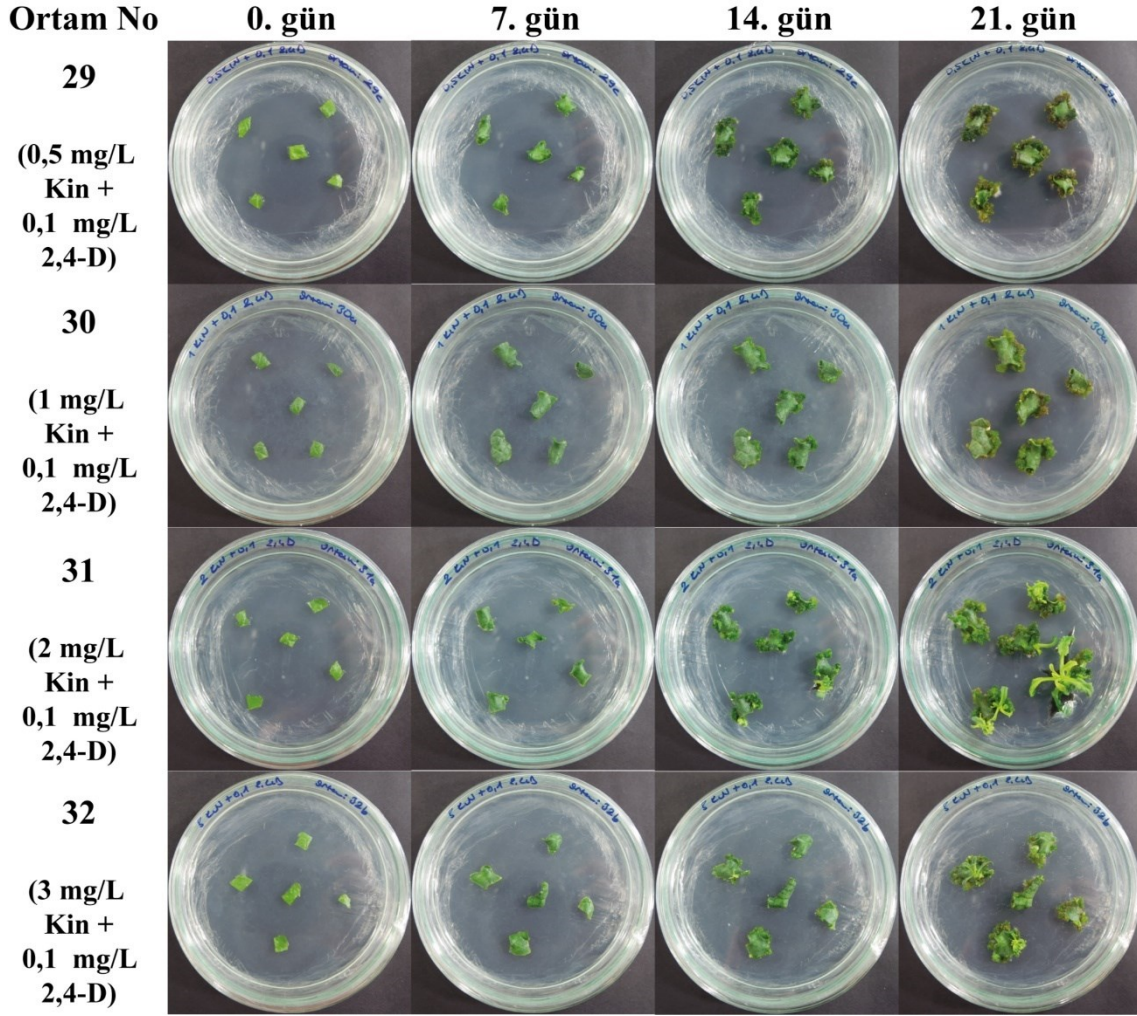


Şekil 20. Sadece Kin ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).

BAP'nın artan konsantrasyonları ile 0,1 mg/L NAA, Kin'in artan konsantrasyonları ile 0,1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamları değerlendirildiğinde, eksplantlarda kallus ve sürgün gelişimi gözlenmiştir. Ayrıca BAP ve Kin sitokinlerinin artan konsantrasyonlarında kallus ve sürgün oluşumunun arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 21, Şekil 22). Artan BAP konsantrasyonları ile 0,1 mg/L NAA ve artan Kin konsantrasyonları ile 0,1 mg/L 2,4-D kombinasyonlarının kallus indüksiyonu üzerine etkileri karşılaştırıldığında, artan BAP konsantrasyonları ile 0,1 mg/L NAA içeren ortamlarda kallus oluşumunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir.

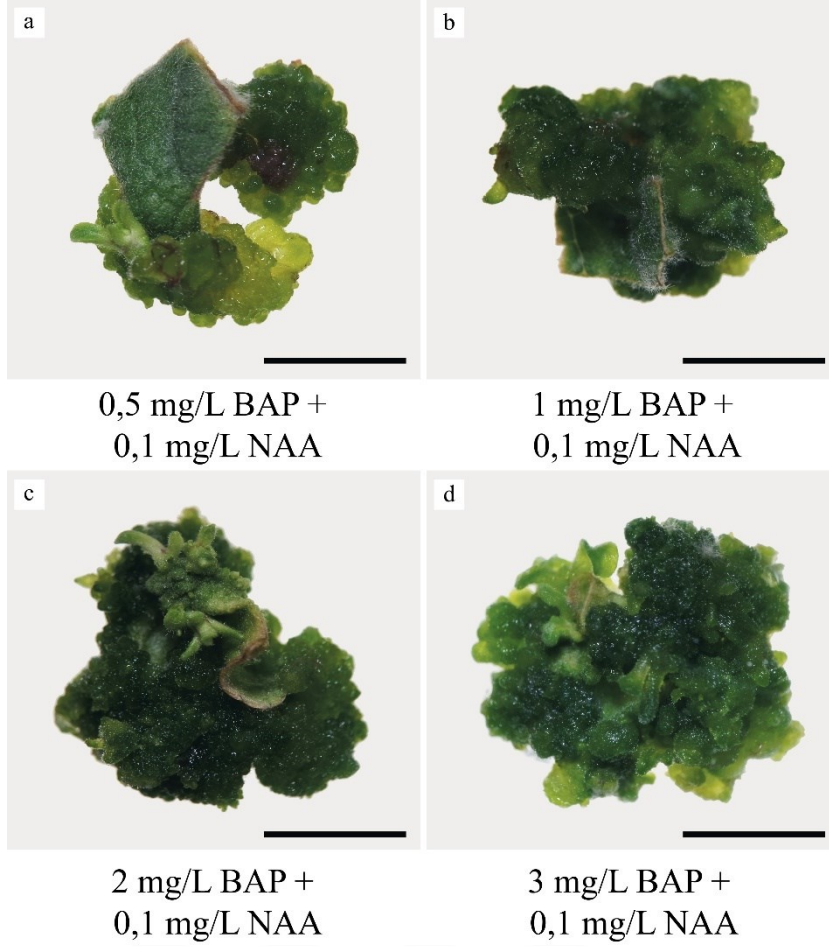


Şekil 21. Artan BAP konsantrasyonları ile 0,1 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.



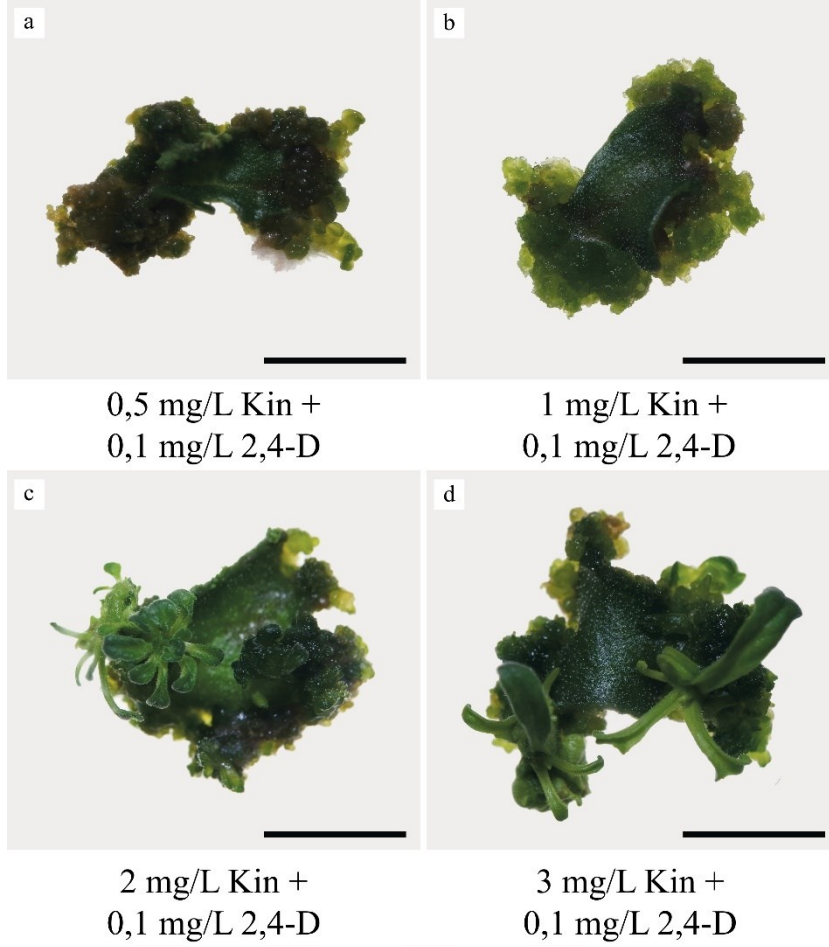
Şekil 22. Artan Kin konsantrasyonları ile 0,1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.

0,1 mg/L NAA ile artan BAP konsantrasyonlarını içeren MS bazal besin ortamları karşılaştırıldığında, yüksek oranda BAP (2 ve 3 mg/L) içeren ortamlarda kallus indüksiyonunun (sırasıyla KİO %93,3±11,5 ve %80±20,0) 0,5 ve 1 mg/L BAP içeren ortamlara (her ikisi için de KİO %73,3±11,5) kıyasla daha da arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 23). Gelişen kallusların yeşil ve sert yapıda oldukları belirlenmiştir. Bununla birlikte tüm ortamlarda sürgün gelişiminin gözlemlendiği ancak BAP konsantrasyonu arttıkça eksplant başına düşen sürgün sayısının arttığı görülmüştür (Şekil 23c-d). 0,1 mg/L NAA ile artan BAP konsantrasyonlarını içeren MS bazal besin ortamlardaki eksplantlar ile sadece BAP içeren bazal besin ortamlarındaki eksplantlar karşılaştırıldığında, 0,1 mg/L NAA ile artan BAP konsantrasyonlarını içeren MS bazal besin ortamında kallus oluşumunun arttığı ancak eksplant başına düşen sürgün sayısında ciddi bir azalma meydana geldiği görülmüştür.



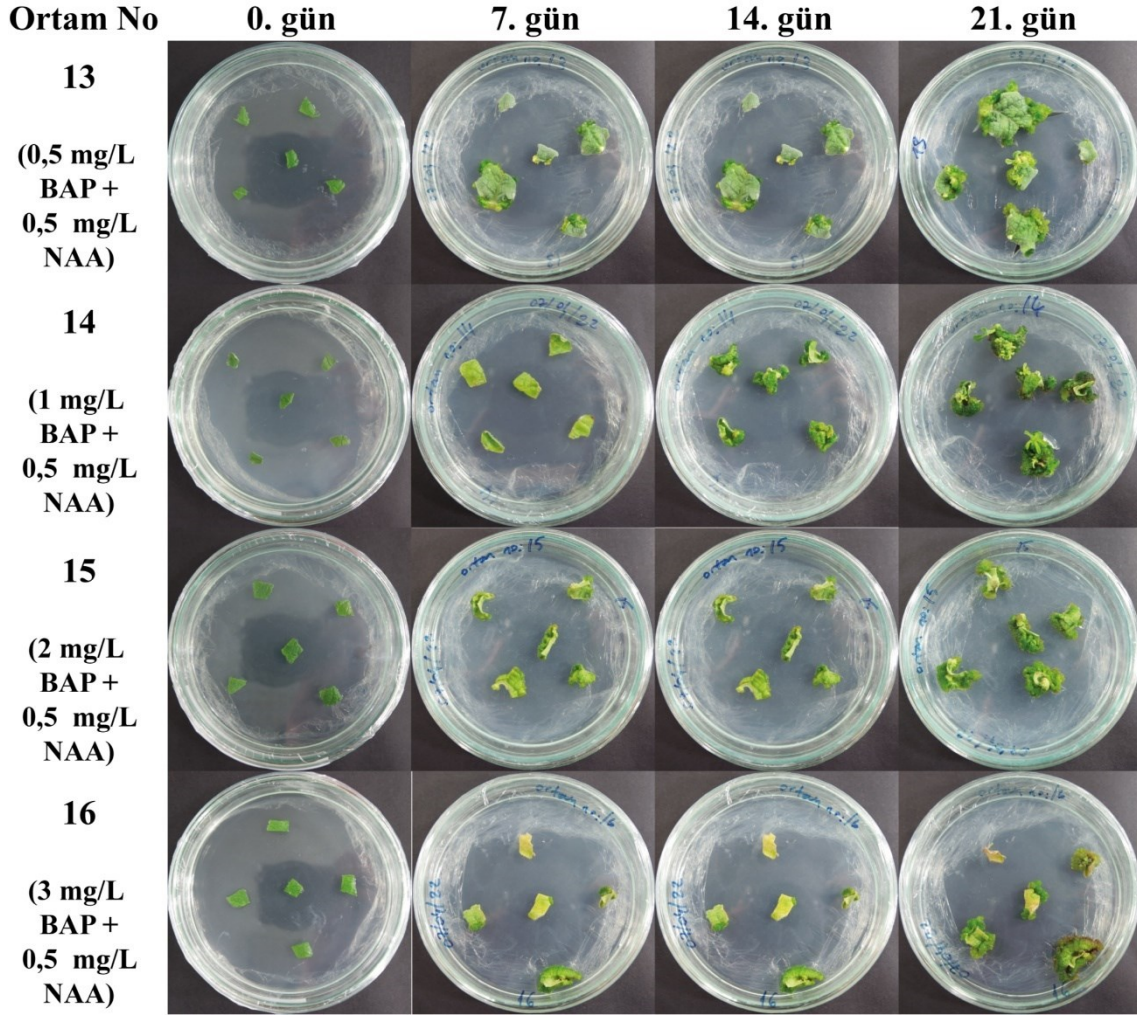
Şekil 23. Artan BAP konsantrasyonları ile 0,1 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).

0,1 mg/L 2,4-D ile artan Kin konsantrasyonlarını içeren MS bazal besin ortamları değerlendirildiğinde ise, Kin'in 0,5, 1 ve 3 mg/L konsantrasyonlarını (KİO %100±0,00) içeren ortamlarda kallus indüksiyonu artış gösterirken, 2 mg/L Kin içeren ortamda kallus indüksiyonunda (KİO %80±20,0) azalma gözlemlenmiştir. Ayrıca yüksek Kin konsantrasyonlarının (2 ve 3 mg/L) kallus indüksiyonu ile birlikte sürgün gelişimini de teşvik ettiği gözlemlenmiştir. Gelişen kallusların yeşil ve sert yapıda oldukları gözlemlenmiştir (Şekil 24).

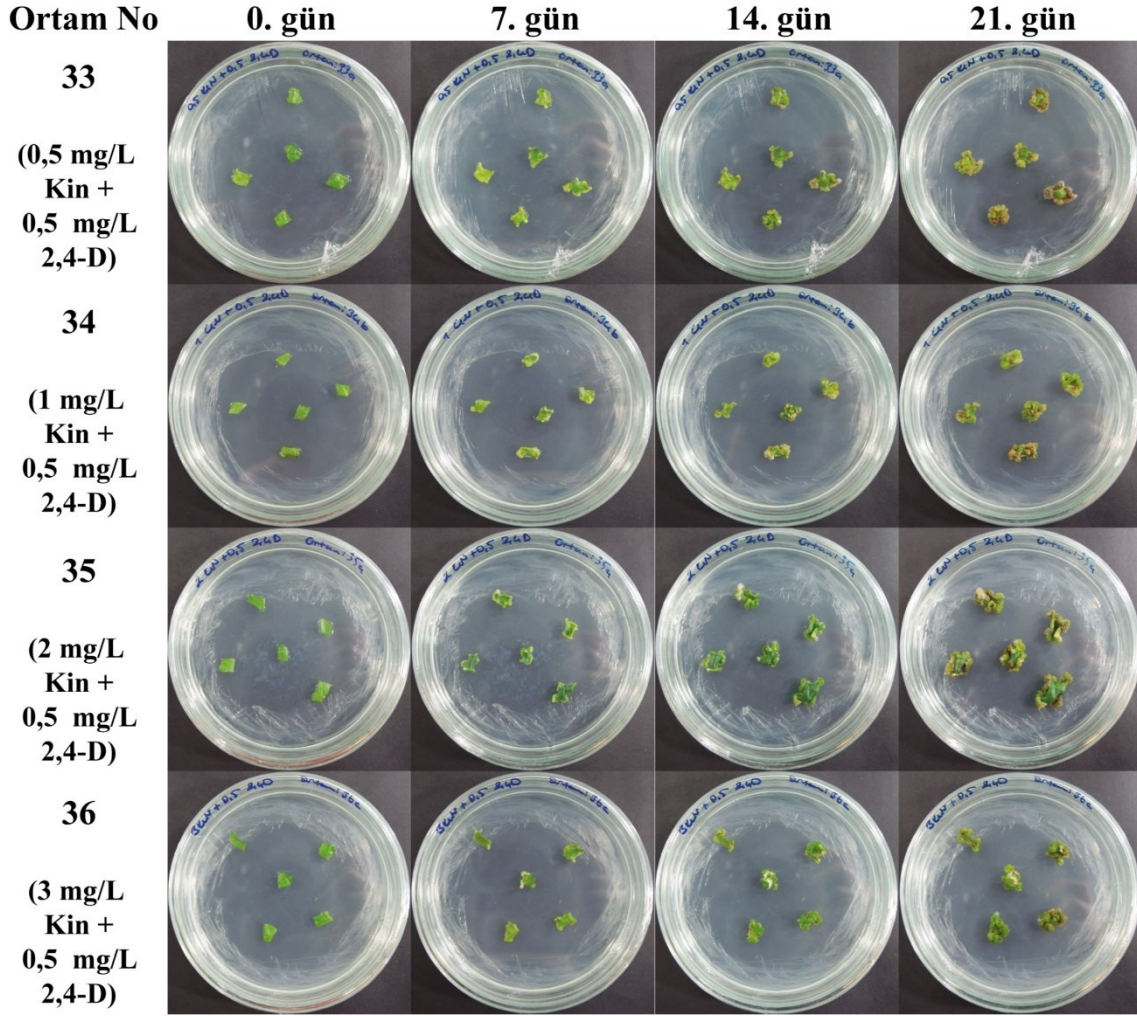


Şekil 24. Artan Kin konsantrasyonları ile 0,1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).

BAP'nın artan konsantrasyonları ile 0,5 mg/L NAA, Kin'in artan konsantrasyonları ile 0,5 mg/L 2,4-D içeren MS bazal besin ortamları değerlendirildiğinde, BAP ilaveli ortamlarda kallus ve sürgün indüksiyonu gözlemlenirken, Kin ilaveli ortamlarda sadece kallus indüksiyonu gözlemlenmiştir (Şekil 25, Şekil 26). Ayrıca bu ortamlar, BAP'nın artan konsantrasyonları ile 0,1 mg/L NAA, Kin'in artan konsantrasyonları ile 0,1 mg/L 2,4-D içeren MS bazal besin ortamları karşılaştırıldığında, kallusların hacimsel olarak azaldığı gözlemlenmiştir. Artan BAP konsantrasyonları ile 0,5 mg/L NAA ve Kin'in konsantrasyonları ile 0,5 mg/L 2,4-D içeren ortamların kallus indüksiyonu üzerine etkileri karşılaştırıldığında, artan Kin konsantrasyonları ile 0,5 mg/L 2,4-D içeren MS bazal besin ortamlarında daha fazla kallus oluşumu gözlemlenmiştir.

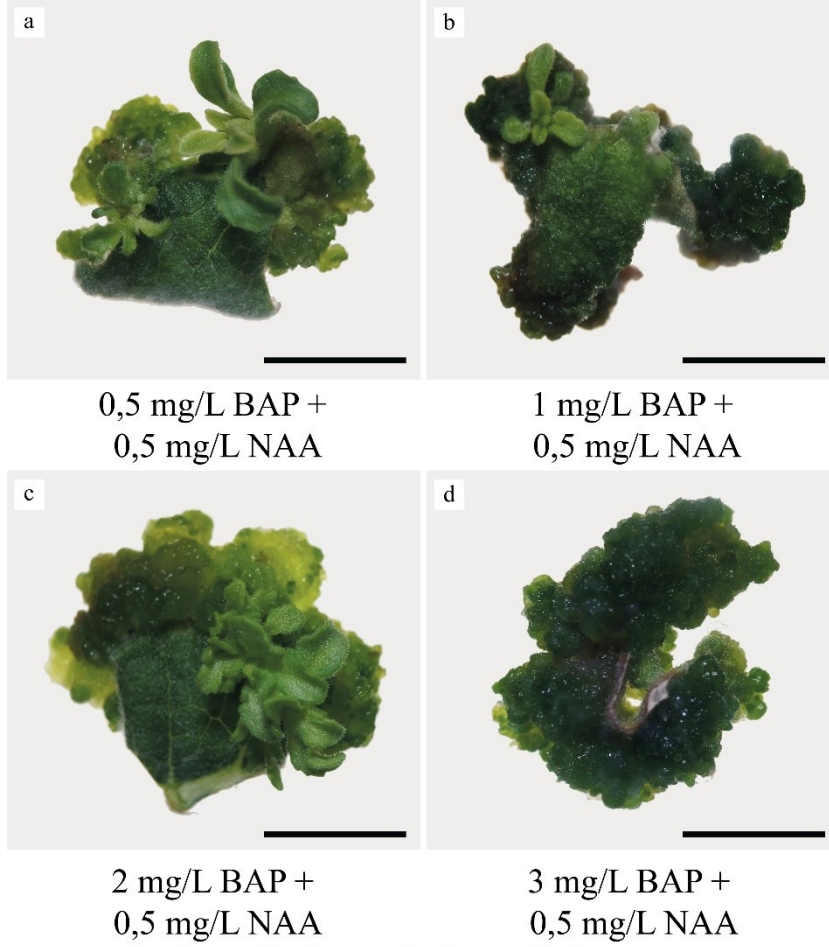


Şekil 25. Artan BAP konsantrasyonları ile 0,5 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.



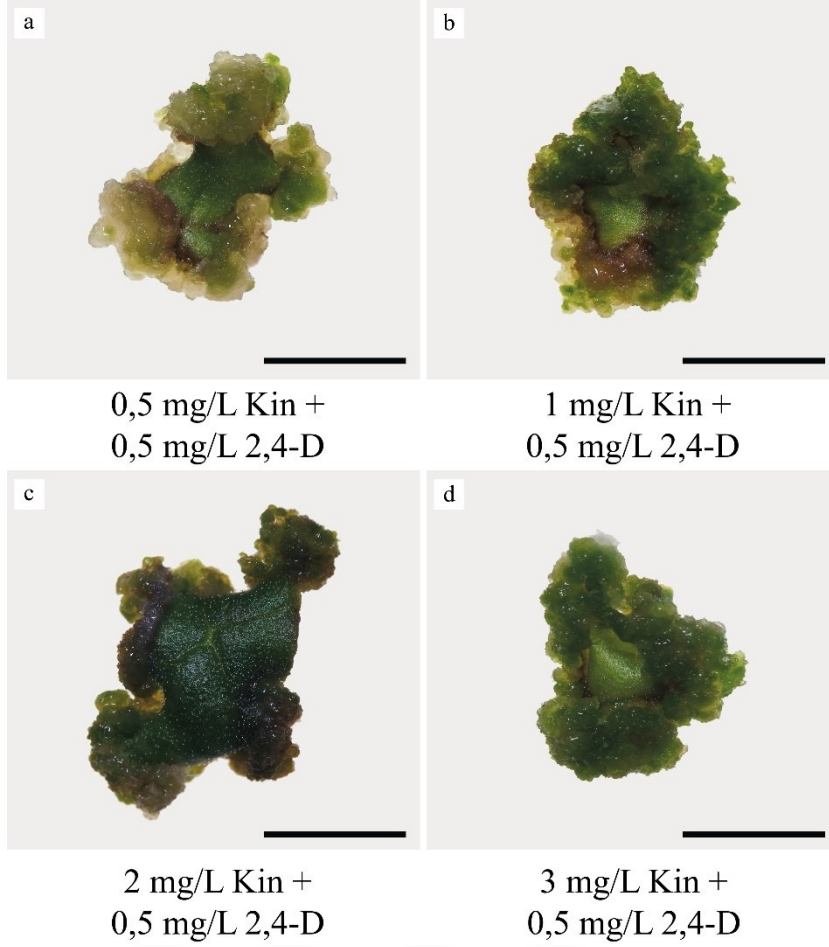
Şekil 26. Artan Kin konsantrasyonları ile 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.

BAP'nın artan konsantrasyonları (0,5, 1, 2 ve 3 mg/L) ile 0,5 mg/L NAA ilave edildiği MS bazal besin ortamları karşılaştırıldığında, bütün BAP konsantrasyonlarını içeren ortamlarda kallus indüksiyonu (sırasıyla KİO %60±34,6, %93,3±11,5, %73,3±30,6 ve %80±20) ile birlikte sürgün gelişiminin olduğu gözlemlenmiştir. Ancak, 3 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA içeren MS bazal besin ortamındaki eksplantlardan kallus ve sürgün gelişiminin diğer ortamlara göre daha yavaş olduğu görülmüştür (Şekil 27). Ayrıca gelişen kallusların genellikle yeşil renkte (3 mg/L BAP + 0,5 mg/L NAA içeren ortamda kahverengi-yeşil) ve sert yapıda olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 27. Artan BAP konsantrasyonları ile 0,5 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).

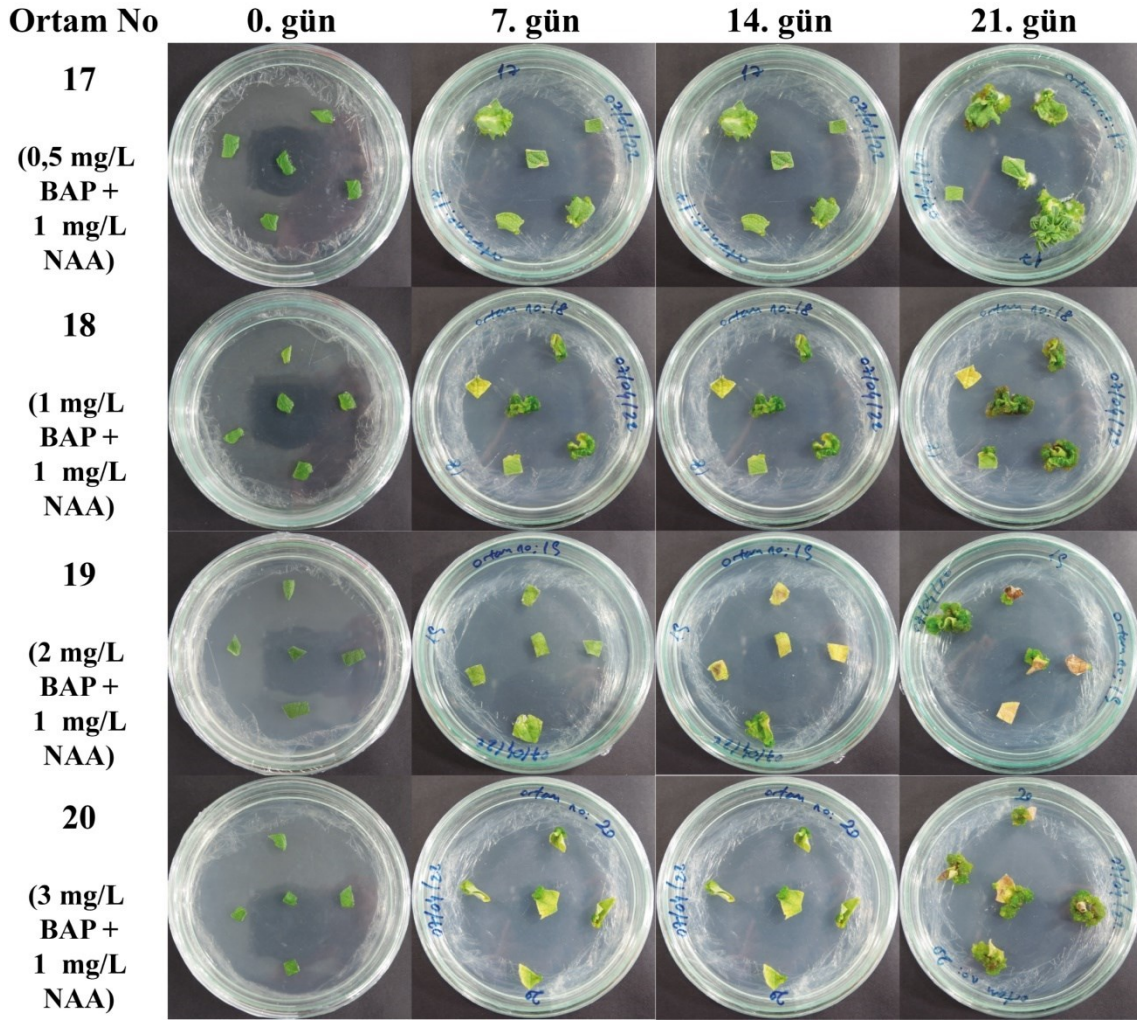
Kin'in farklı konsantrasyonlarının 0,5 mg/L 2,4-D ile kombinasyonunu içeren MS bazal besin ortamları değerlendirildiğinde, bütün ortamlarda kallus indüksiyonunun (KİO %100±0,00) gerçekleştiği belirlenmiştir. Ayrıca bazı kalluslarda meristemoid benzeri yapıların da geliştiği görülmüştür ancak sürgüne gelişmedikleri gözlenmiştir (Şekil 28). Gelişen bütün ortamlardaki kallusların hacimsel artışının birbirleri ile yakın olduğu gözlemlenmiştir. 0,5 mg/L Kin ile 0,5 mg/L 2,4-D ilave edilmiş MS bazal besin ortamında indüklenen kallusların diğer ortamlara göre daha yeşil-sarı ve sert yapıda olduğu görülmüştür. 1 ve 3 mg/L Kin ile 0,5 mg/L 2,4-D içeren ortamlardaki kallusların yeşil renkte ve 2 mg/L Kin ile 0,5 mg/L 2,4-D içeren ortamdaki kallusların ise kahverengi-yeşil renkte ve sert yapıda oldukları gözlemlenmiştir.



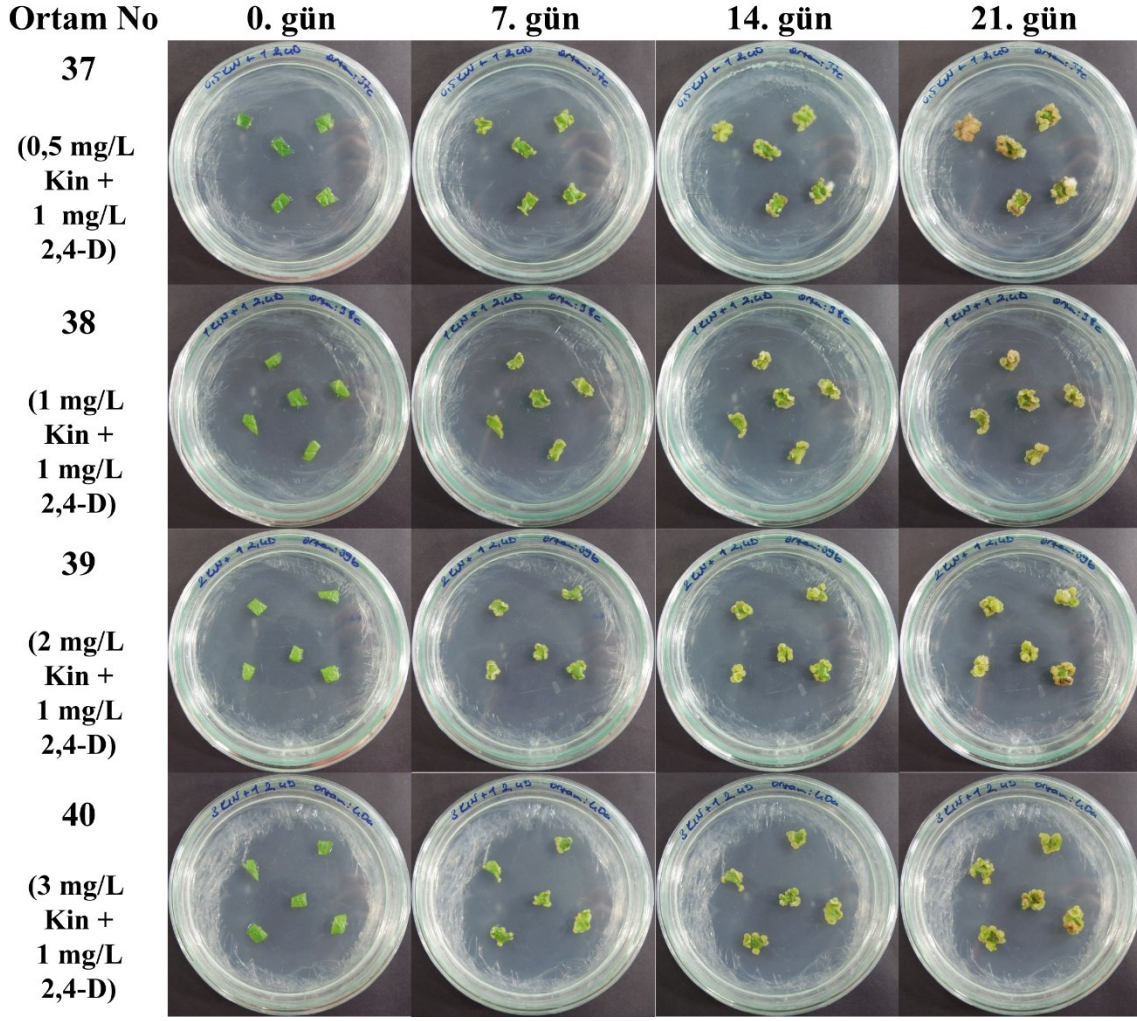
Şekil 28. Artan Kin konsantrasyonları ile 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kalluslar (bar = 5 mm).

BAP'nın artan konsantrasyonları ile 1 mg/L NAA, Kin'in artan konsantrasyonları ile 1 mg/L 2,4-D içeren MS bazal besin ortamları değerlendirildiğinde, BAP ilaveli ortamlarda kallus indüksiyonunun yanı sıra sürgün gelişimi de gözlemlenmiştir (Şekil 29). Kin'in artan konsantrasyonlarını içeren ortamlarda ise sadece kallus indüksiyonu gözlemlenmiştir (Şekil 30). Ayrıca bu ortamlar, BAP'nın artan konsantrasyonları ile NAA (0, 0,1, 0,5 mg/L), Kin'in artan konsantrasyonları ile 2,4-D (0, 0,1, 0,5 mg/L) içeren MS bazal besin ortamları karşılaştırıldığında, 0,5 mg/L BAP+1 mg/L NAA içeren ortam hariç indüklenen kallusların hacmi ve eksplant başına düşen sürgün sayısının azaldığı görülmüştür. Sitokinlerin artan konsantrasyonları ile 1 mg/L oksin içeren ortamların kallus indüksiyonu üzerine etkileri

karşılaştırıldığında, artan Kin konsantrasyonları ile 1 mg/L 2,4-D ilaveli ortamlarda daha fazla kallus oluşumu gözlemlenmiştir.

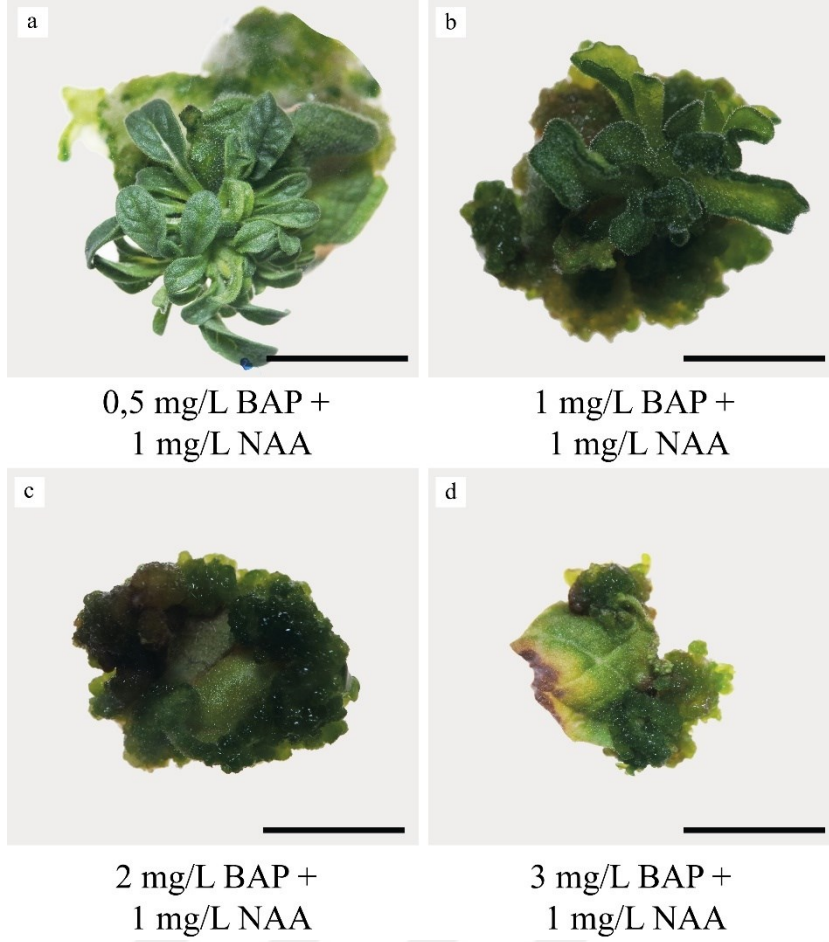


Şekil 29. Artan BAP konsantrasyonları ile 1 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.



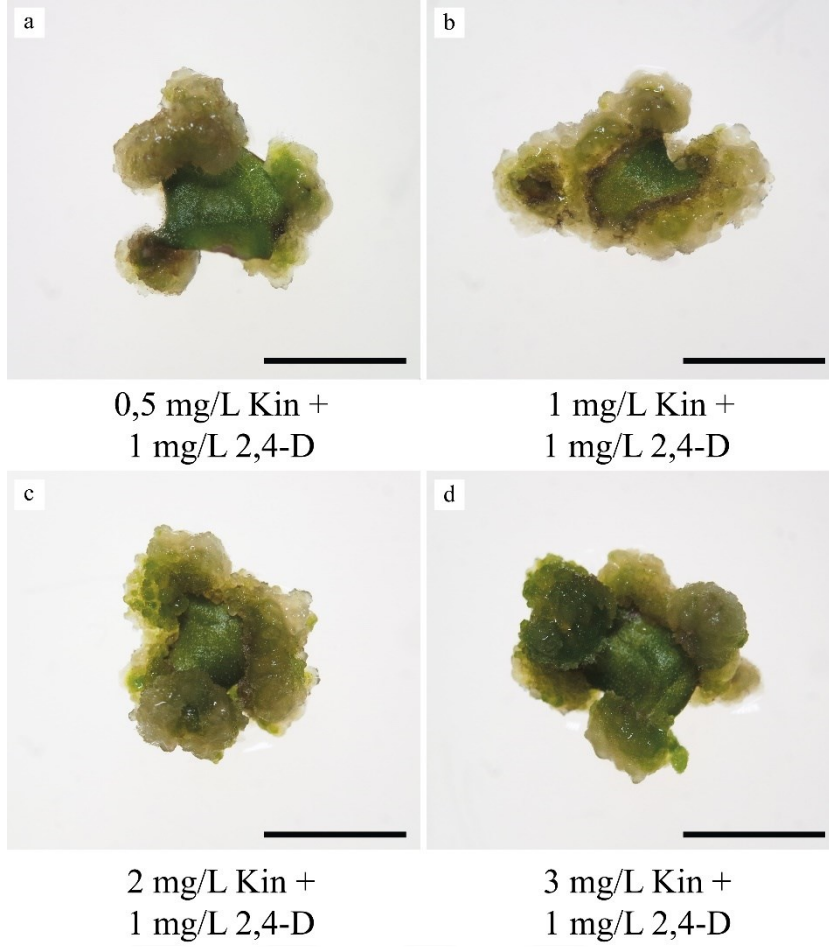
Şekil 30. Artan Kin konsantrasyonları ile 1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamındaki eksplantların 21 günlük değişimi.

Artan BAP oranları ile 1 mg/L NAA içeren ortamlar karşılaştırıldığında, 0,5, 2 ve 3 mg/L BAP ile 1 mg/L NAA ilaveli ortamlarda kallus indüksiyonunun (sırasıyla KİO % $73,3 \pm 11,5$, $80 \pm 20,0$ ve $93,3 \pm 11,5$), 1 mg/L BAP (KİO % $60 \pm 34,6$) ilaveli ortama kıyasla arttığı gözlemlenmiştir. Ayrıca düşük BAP (0,5 mg/L) konsantrasyonu içeren ortamda sürgün gelişiminin yüksek BAP (1, 2 ve 3 mg/L) konsantrasyonlarına kıyasla daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 31). Gelişen kalluslar kahverengi-yeşil renkte ve sert yapıda oldukları gözlemlenmiştir.



Şekil 31. Artan BAP konsantrasyonları ile 1 mg/L NAA ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kallus ve sürgünler (bar = 5 mm).

1 mg/L 2,4-D ile artan Kin konsantrasyonları karşılaştırıldığında, artan Kin konsantrasyonlarının kallus indüksiyonunu (bütün ortamlarda $100 \pm 0,00$), aynı oranlarda BAP ile NAA kombinasyonuna göre arttırdığı belirlenmiştir. Artan Kin konsantrasyonları (0,5, 1, 2 ve 3 mg/L) ile 1 mg/L 2,4-D içeren MS bazal besin ortamlarında kallus indüksiyon oranının benzer olduğu ve sürgün gelişiminin oluşmadığı belirlenmiştir (Şekil 32). Yapı ve renk bakımından incelendiğinde ise bütün ortamlardaki kallusların yeşil-sarı renkte ve yumuşak yapıda oldukları gözlemlenmiştir.



Şekil 32. Artan Kin konsantrasyonları ile 1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında 3. haftada gelişen kalluslar (bar = 5 mm).

4.4. Kallus Gelişimi ve Çoğaltımı ile İlgili Bulgular

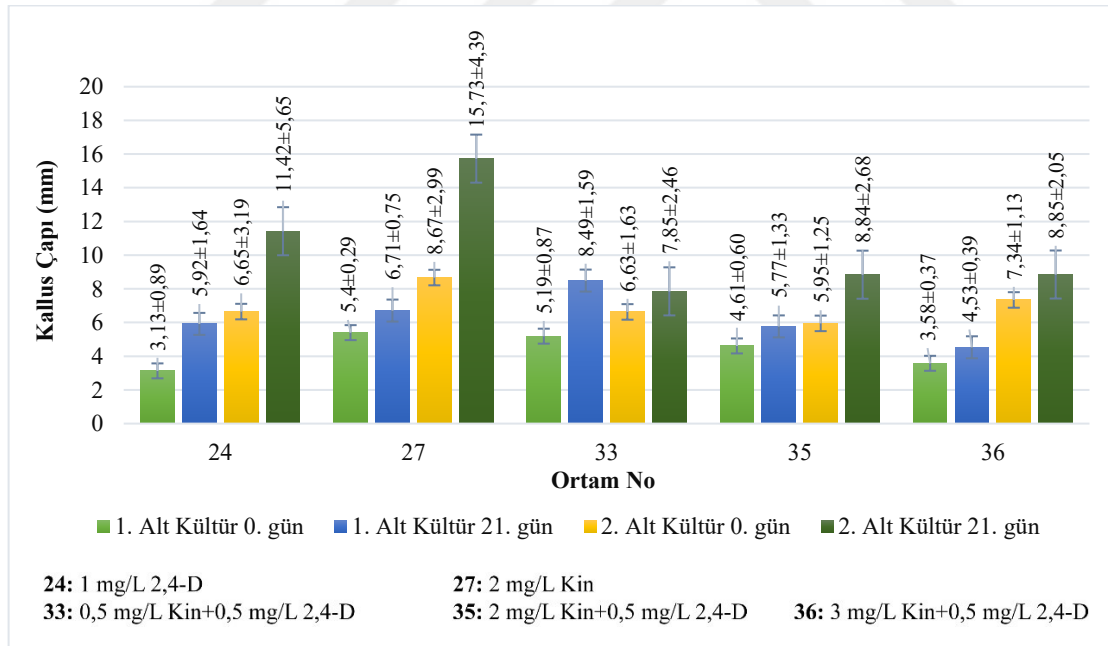
Kallus indüksiyon ortamlarında kültüre alınan yaprak eksplantlarından gelişen kararmamış, sürgün gelişimi görülmeyen, renk ve yapı bakımından uygun kallusların çoğaltımı yapılmıştır. Kallus indüksiyonunda elde edilen kalluslar aynı konsantrasyon ve kombinasyonda BBD içeren (1 mg/L 2,4-D, 2 mg/L Kin, 0,5 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D, 2 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ve 3 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D) MS bazal besin ortamlarında 3 hafta olacak şekilde 2 kez alt kültüre alınmıştır (Tablo 7).

Tablo 7

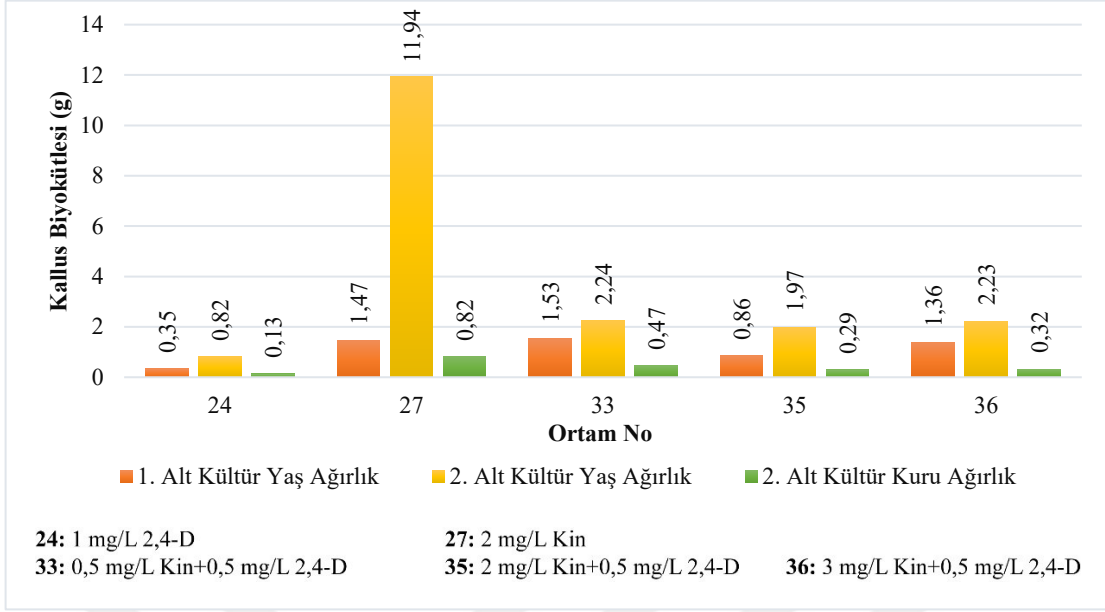
Kallus çoğaltım ortamlarının içerdiği BBD'leri

Ortam No	BBD İçeriği (mg/L)
24	1 mg/L 2,4-D
27	2 mg/L Kin
33	0,5 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D
35	2 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D
36	3 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D

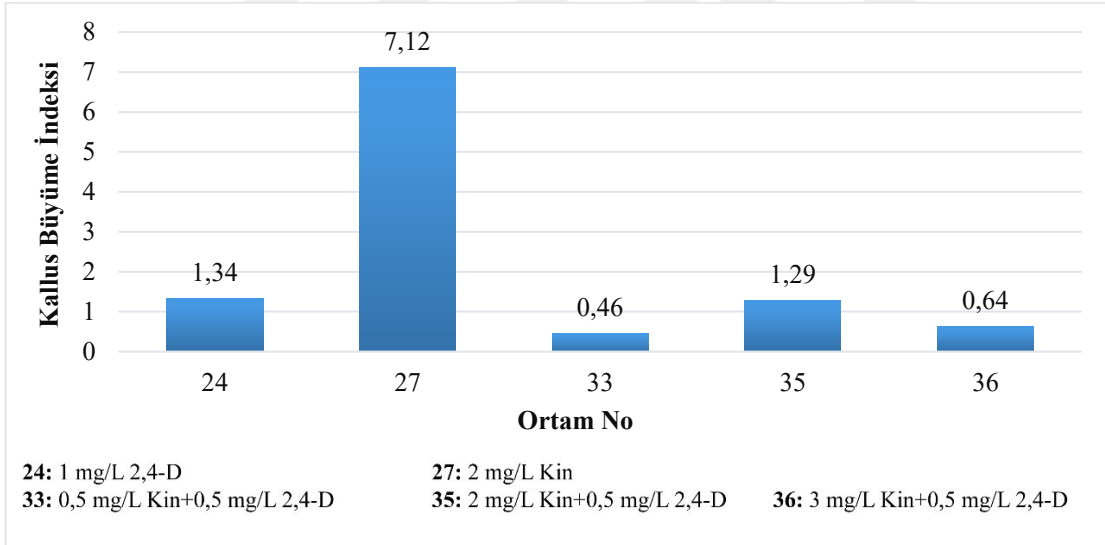
Alt kültüre alınan ortamların kallus çoğaltımı için kurulan denemelerde ilk alt kültür ve ikinci alt kültürde çoğaltılan kallusların çapları ölçülmüştür (Şekil 33) ve yaş ağırlıkları tartılarak kallus büyüme indeksi hesaplanmıştır (Şekil 34 ve Şekil 35). Ayrıca sekonder metabolit analizinde kullanılmak üzere etüvde 37°C'de 72 saat boyunca kurutulan kallusların kuru ağırlıkları tartılmıştır (Şekil 34).



Şekil 33. Çoğaltımı gerçekleştirilen kallusların ilk alt kültürde ve ikinci alt kültürde 0. gün ile 21. günde yapılan çap (mm) ölçümleri.



Şekil 34. Çoğaltılan kallusların ilk alt kültürde ve ikinci alt kültürdeki yaş ağırlıkları ile kuru ağırlıkları.

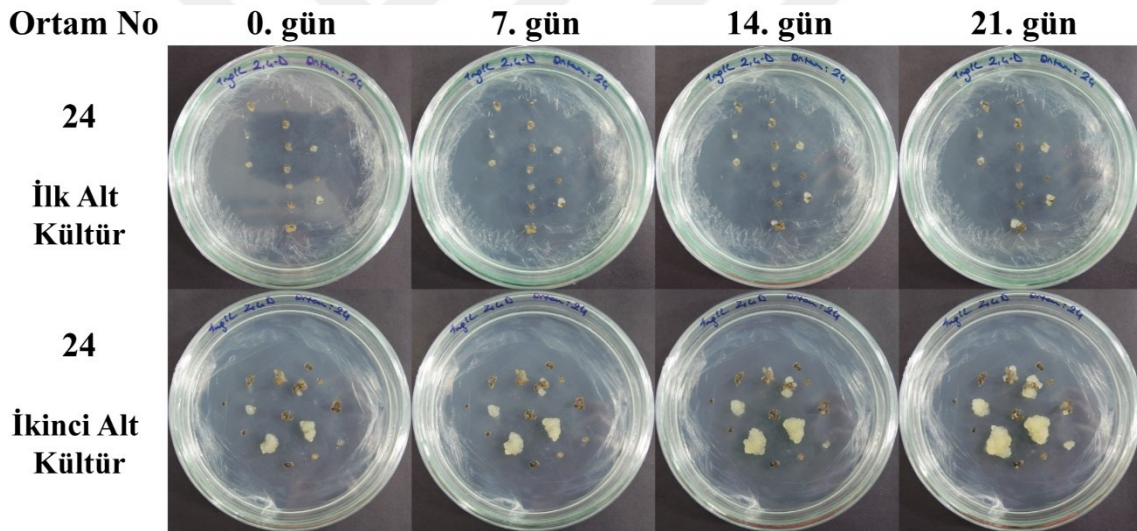


Şekil 35. Çoğaltılmış kallusların büyüme indeksleri.

Çoğaltılan kalluslar değerlendirildiğinde, sadece 1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında (24) yumuşak-sulu yapıda ve beyaz renkte kallusların (Şekil 36) gelişmeye devam ettiği ve ilk alt kültürde yaş ağırlık 0,35 g iken ikinci alt kültürde 0,82 g olarak kallus büyüme indeksinin arttığı (1,34) gözlemlenmiştir (Şekil 37).

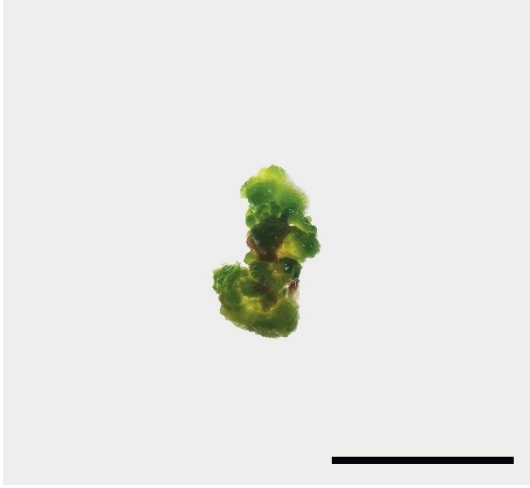


Şekil 36. 1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk alt kültürde gelişen kallus (bar = 5mm).

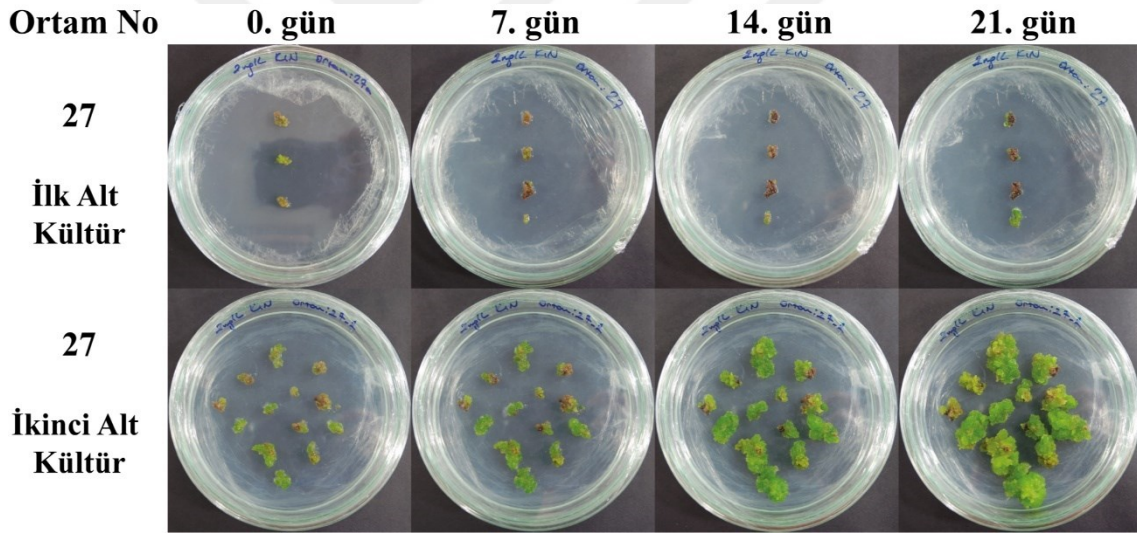


Şekil 37. 1 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve ikinci alt kültürde kallusların gelişimleri.

Sadece 2 mg/L Kin ilaveli MS bazal besin ortamında (27) alt kültüre alınan kallusların yeşil ve sert yapıda gelişmeye devam ettiği gözlemlenmiştir (Şekil 38). İkinci alt kültürde 11,94 g yaş ağırlık ile en fazla kallus büyüme indeksi (7,12) gösteren MS bazal besin ortamı olmuştur (Şekil 39).

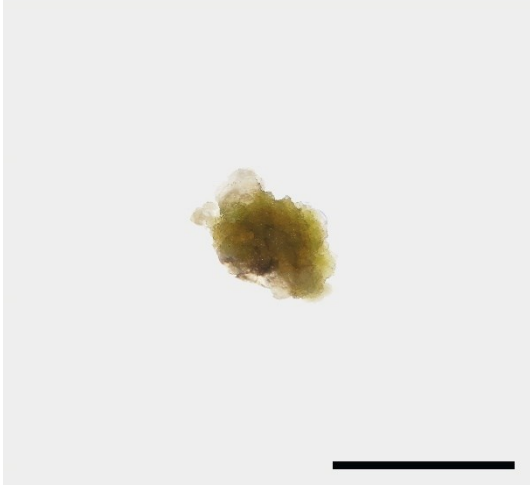


Şekil 38. 2 mg/L Kin ilaveli MS bazal besin ortamında ilk alt kültürde gelişen kallus (bar = 5mm).

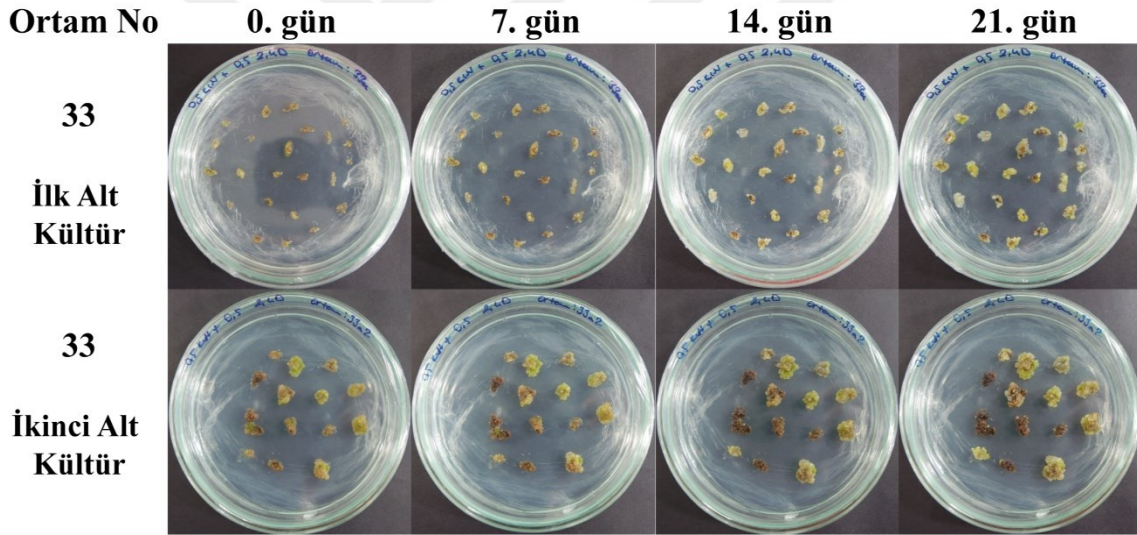


Şekil 39. 2 mg/L Kin ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve ikinci alt kültürde kallusların gelişimleri.

Eşit konsantrasyonlardaki Kin (0,5 mg/L) ve 2,4-D (0,5 mg/L) ilaveli MS bazal besin ortamında (33) ise sarı-beyaz renkte ve yumuşak-sert yapıda kallus (Şekil 40) gelişimi gözlemlenmiştir. İlk alt kültürde 1,53 g yaş ağırlık var iken ikinci alt kültürde (2,24 g) artış göstererek kallus büyüme indeksi 0,46 olmuştur (Şekil 41). Diğer BBD içeren ortamlara göre en düşük kallus büyüme indeksine sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 40. 0,5 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk alt kültürde gelişen kallus (bar = 5mm).

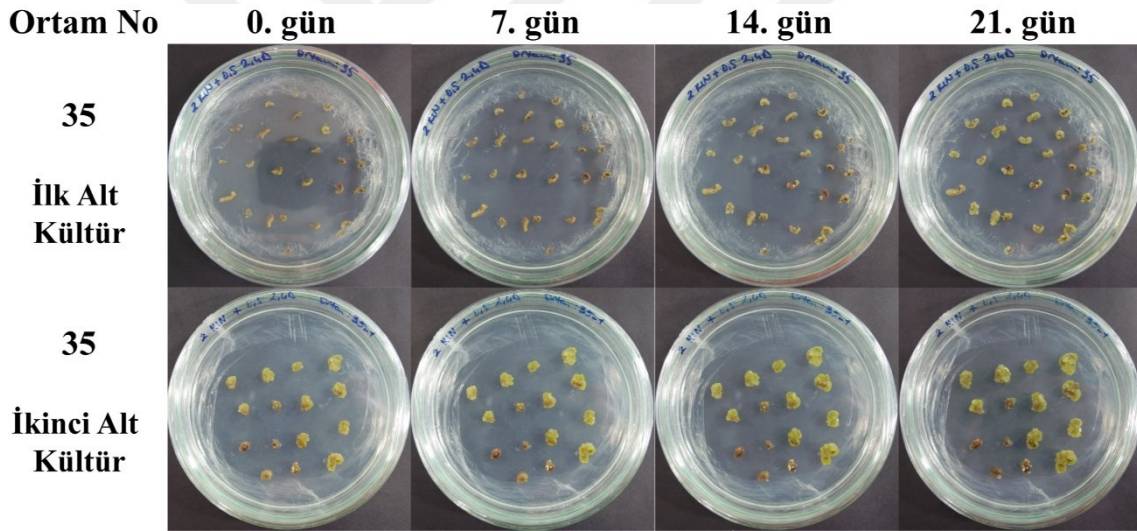


Şekil 41. 0,5 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve alt kültürde gelişen kalluslar.

2 mg/L Kin ile 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunu içeren MS bazal besin ortamındaki (35) kalluslar değerlendirildiğinde, sarı ve sert yapıda kallus gelişimi (Şekil 42) gözlemlenmiştir. İkinci alt kültürde yaş ağırlık 1,97 g olarak belirlenmiştir ve kallus büyüme indeksi 1,29 olarak tespit edilmiştir (Şekil 43).



Şekil 42. 2 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal ortamında ilk alt kültürde gelişen kallus (bar = 5mm).

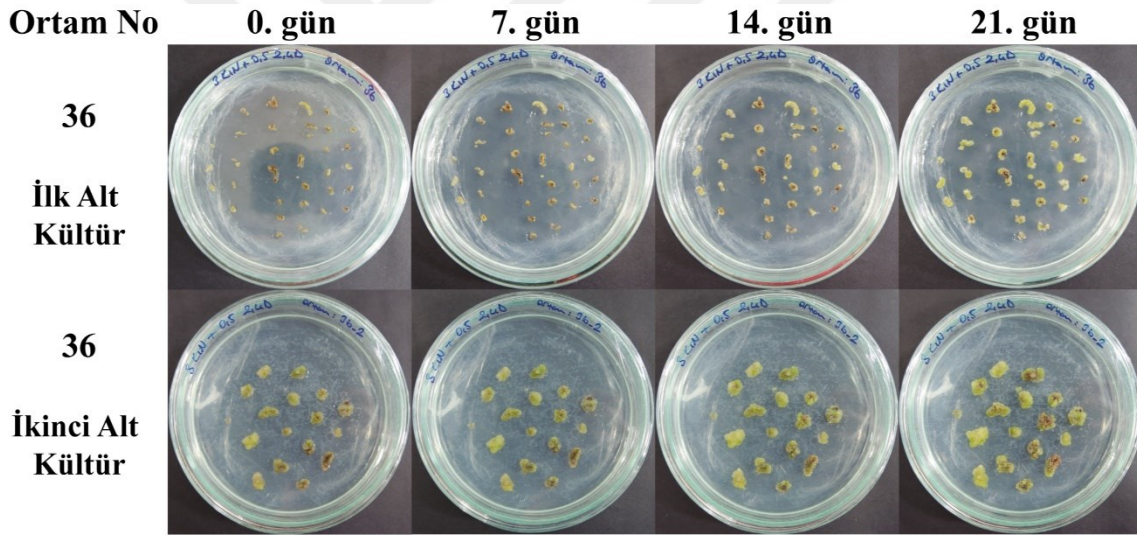


Şekil 43. 2 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve ikinci alt kültürde gelişen kalluslar.

Yüksek Kin konsantrasyonu (3 mg/L) ile 0,5 mg/L 2,4-D kombinasyonunu içeren MS bazal besin ortamındaki (36) kallusların ise sarı renkte ve yumuşak-sert yapıda (Şekil 44) geliştiği gözlemlenmiştir. İlk alt kültürde 1,36 g tartılan yaş ağırlık, ikinci alt kültürde 2,23 g olarak tespit edilmiştir. Kallus büyüme indeksi ise 0,64 olarak saptanmıştır (Şekil 45).



Şekil 44. 3 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk alt kültürde gelişen kallus (bar = 5mm).

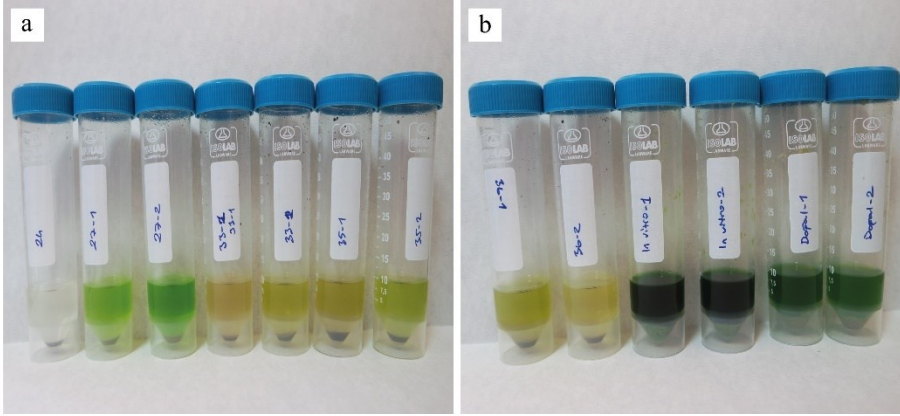


Şekil 45. 3 mg/L Kin + 0,5 mg/L 2,4-D ilaveli MS bazal besin ortamında ilk ve ikinci alt kültürde gelişen kalluslar.

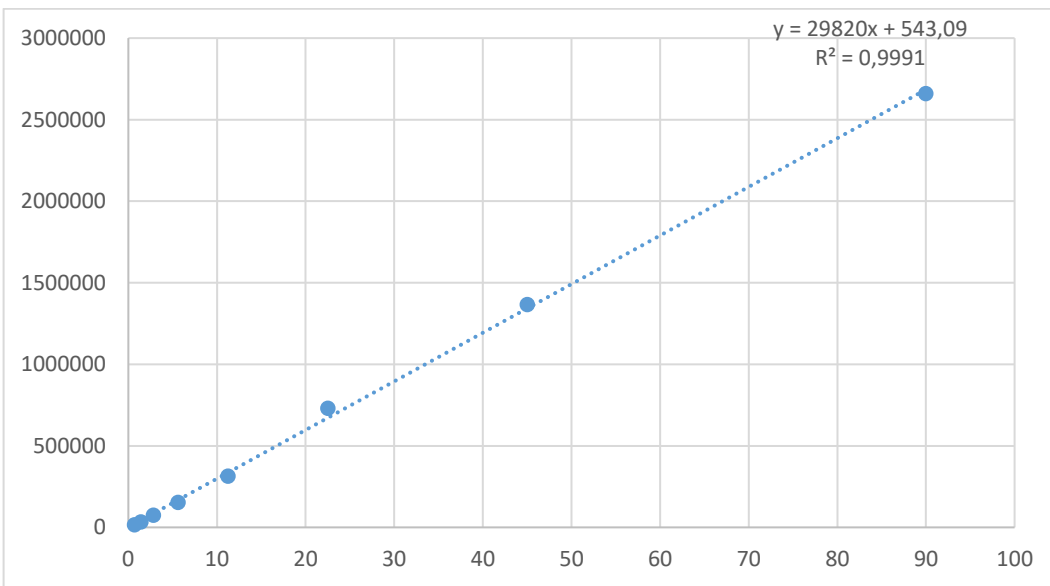
Farklı BBD'ler içeren MS bazal besin ortamları kuru ağırlık bakımından değerlendirildiğinde, en düşük kuru ağırlık sadece 0,5 mg/L 2,4-D (0,13 g) ilaveli ortamda görülürken, en yüksek kuru ağırlık ise sadece 2 mg/L Kin (0,82 g) ilaveli MS bazal besin ortamında belirlenmiştir.

4.5. Sekonder Metabolit Analizi ile İlgili Bulgular

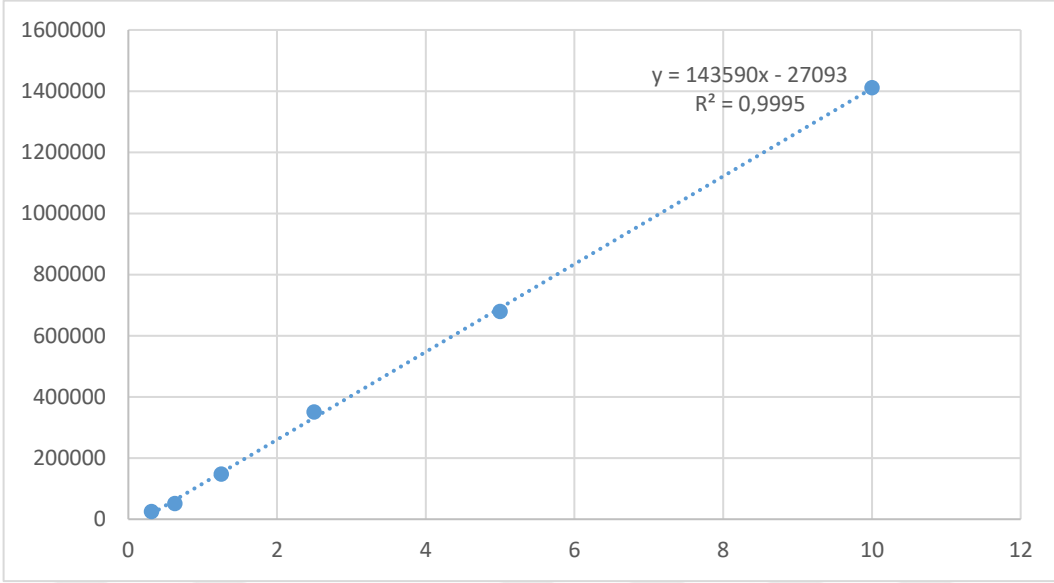
Kallus çoğaltım aşamasından 1 mg/L 2,4-D (24), 2 mg/L Kin (27), 0,5 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D (33), 2 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D (35) ve 3 mg/L+0,5 mg/L 2,4-D (36) ilaveli ortamlardaki kalluslar ile *V. scamandri* türünün doğal bitki ve *in vitro* yetiştirilen bitki örneklerinden sekonder metabolit analizinde kullanılmak üzere ekstraksiyon yapılmıştır (Şekil 46). Daha sonra hazırlanan örneklerden verbaskozit, luteolin ve okubin içeriklerinin belirlenmesi ve tayini için HPLC analizi yapılmıştır. HPLC analizinde standartlara ait kalibrasyon grafikleri ve kromatogramlar alınmıştır (Şekil 47-51).



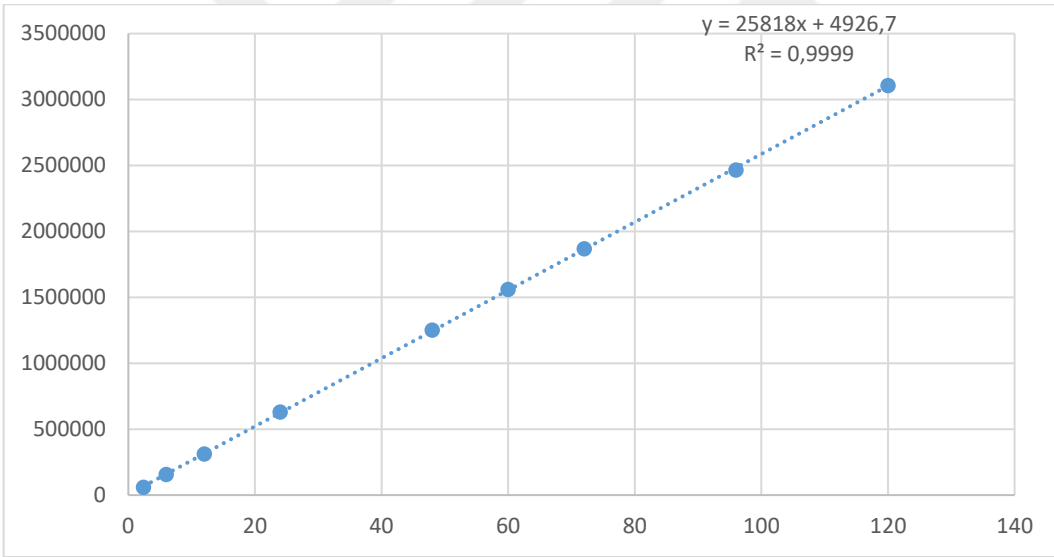
Şekil 46. Kallus, *in vitro* bitki ve doğal bitkiden elde edilen süpernatant örnekleri.



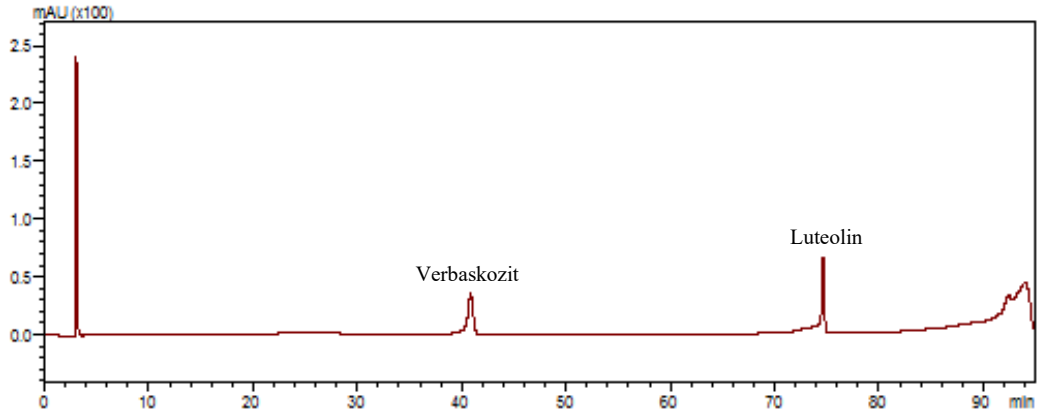
Şekil 47. Verbaskozit bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



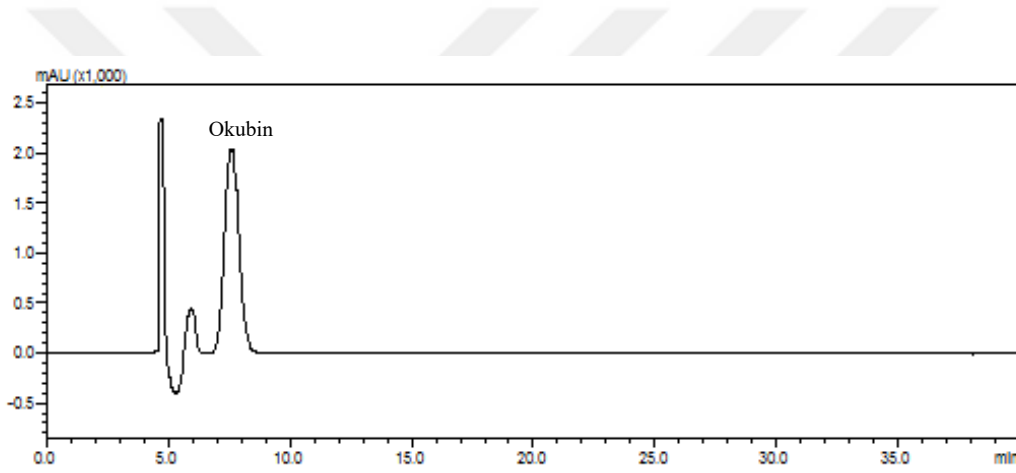
Şekil 48. Luteolin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



Şekil 49. Okubin bileşiğine ait kalibrasyon grafiği.



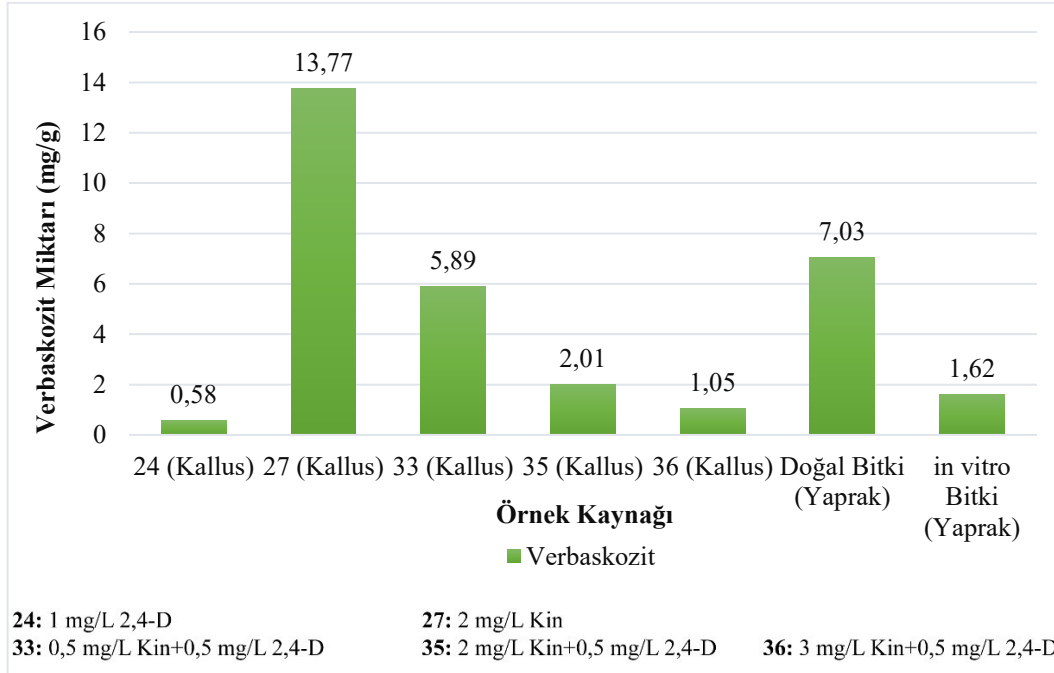
Şekil 50. Verbaskozit ve luteolin bileşiklerinin standart kromatogramı.



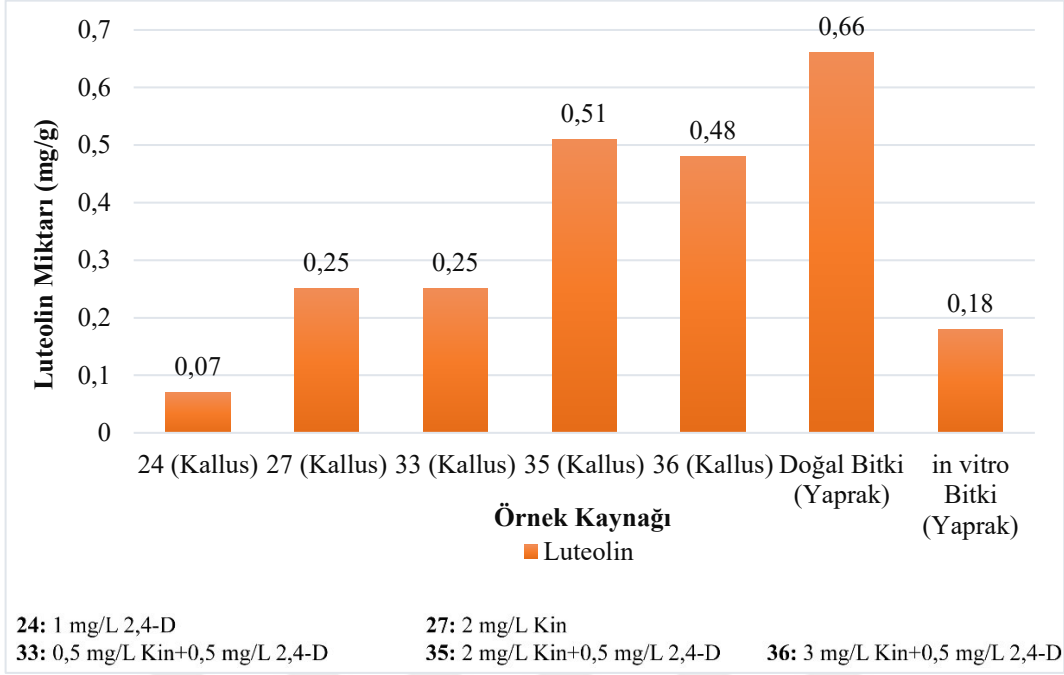
Şekil 51. Okubin bileşiğinin standart kromatogramı.

Örneklerin içerdikleri verbaskozit, luteolin ve okubin miktarları, 1 g kuru ağırlığın içerdiği mg cinsinden Şekil 52, Şekil 53 ve Şekil 54'te verilmiştir. Doğal bitkide 7,03 mg/g verbaskozit, 0,66 mg/g luteolin ve 2,99 mg/g okubin bulunmuştur. *In vitro* bitkide 1,62 mg/g verbaskozit, 0,18 mg/g luteolin ve 1,32 mg/g okubin saptanmıştır. Kallus örneklerinin tümünde verbaskozit, luteolin ve okubine rastlanmıştır. HPLC sonuçlarına göre tüm örneklerde luteolin miktarları okubin ve verbaskozite göre daha düşük bulunmuştur. 2 mg/L Kin ilave edilen besin ortamında (27) gelişen kalluslarda verbaskozit (13,77 mg/g) içeriğinin diğer kalluslara göre fazla olduğu tespit edilmiştir. Kalluslar luteolin içeriği bakımından karşılaştırıldığında 2 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D içeren ortamlarda (35) gelişen kalluslarda 0,51 mg/g olduğu ve diğer ortamlara göre daha yüksek bulunmuştur. Okubin metaboliti en yüksek 0,5 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D içeren ortamlarda (33) gelişen kalluslarda (9,32 mg/g)

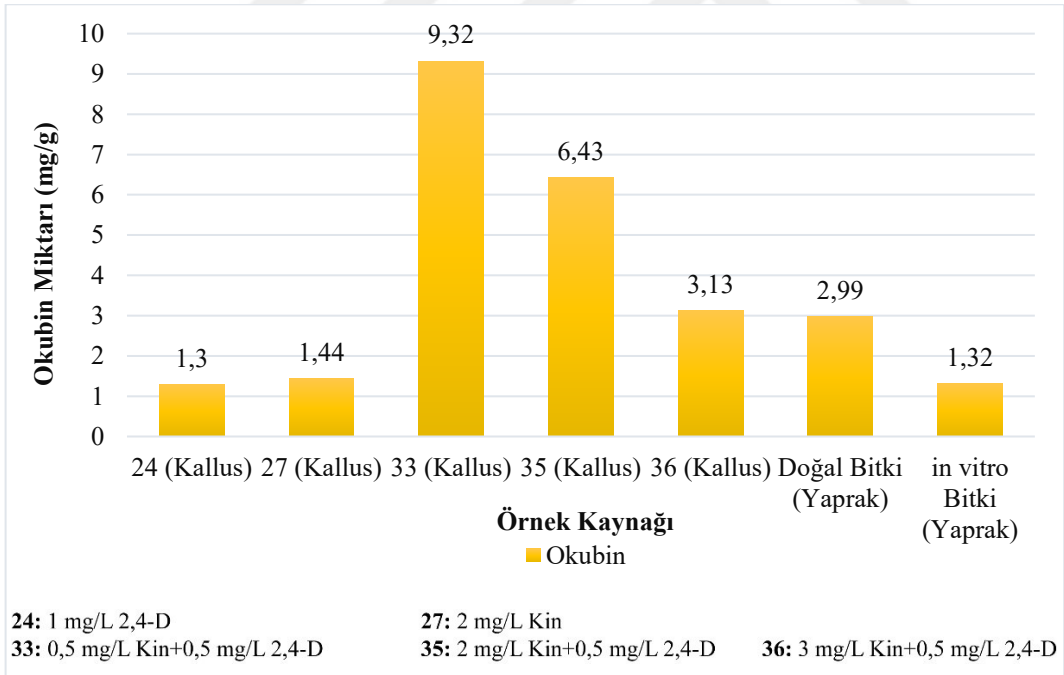
saptanmıştır. Ayrıca bu kallusların doğal bitkilerden daha yüksek oranda okubin içerdikleri belirlenmiştir. Doğal bitki örneklerinde luteolin içeriğinin ise en yüksek miktarda olduğu bulunmuştur. Metabolitler bakımından bitki örnekleri değerlendirildiğinde, *in vitro* çimlendirilen bitki örneklerinde diğer örneklere göre okubin ve verbaskozit içeriği düşük bulunmuştur.



Şekil 52. Verbaskozit bileşiğinin kallus, doğal bitki ve *in vitro* bitki örneklerindeki miktarı.



Şekil 53. Luteolin bileşiğinin kallus, doğal bitki ve *in vitro* bitki örneklerindeki miktarı.



Şekil 54. Okubin bileşiğinin kallus, doğal bitki ve *in vitro* bitki örneklerindeki miktarı.

4.6. Tartışma

Bu tez çalışmasında *Verbascum scamandri* türünün kallus kültürünün kurulması ve verbaskozit, luteolin ve okubin sekonder metabolitlerinin üretimi üzerine BBD'lerin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarının etkileri araştırılmıştır.

Verbascum scamandri türünün *in vitro* kültür koşullarının optimize edilmesi, en etkili kallus indüksiyon ortamının kurulması ve sekonder metabolit üretiminin gerçekleştirilmesi için eksplant kaynağı olarak bitkinin rozet yaprakları kullanılmıştır. Bitki doku kültürlerinden kallus üretilmesi için seçilen eksplantın türü, yaşı, genotipi, kullanılacak BBD'lerin çeşidi, konsantrasyonu ve kombinasyonunun önemli rol oynadığı bilinmektedir (Shirin vd., 2007; Adil vd., 2018). Daha önce yapılmış çalışmalar sonucunda, yaprak eksplantlarının *in vitro* koşullara uyum sağlamasının fazla olduğu ve hücre bölünmeleri ile üretilen yeni hücrelerin genetik yapılarında farklılık gözlenmediği belirtilmiştir (Byamukama vd., 2009; Ling vd., 2013).

Çalışmamızda BBD içermeyen MS besin ortamlarında kültüre alınan eksplantlarda kallus indüksiyonu gözlenmemiştir. Bu ortamlardaki eksplantların endojen BBD oranlarının farklılaşmaya yetecek seviyede olmamasından dolayı kallus indüksiyonunun gerçekleşmediği düşünülmektedir. Bu yüzden bu türün *in vitro* kültüründe BBD içermeyen ortamların kullanılmayacağı belirlenmiştir. Benzer duruma farklı bitki türlerinin *in vitro* kültürlerinde de karşılaşıldığı bildirilmiştir (Ray vd., 2011; Mathur ve Shekhawat, 2013; Karamian ve Ghasemlou, 2014; Farid vd., 2020). Diğer taraftan *Verbascum thapsus* ile yapılan bir çalışmada BBD içermeyen besin ortamında kallus indüksiyonunun gerçekleştiği rapor edilmiştir (Temporiti vd., 2020).

Bitki doku kültüründe başlıca role sahip olan BBD'lerin konsantrasyon ve kombinasyonlarının bitkilerde organogenez ve morfogenezi kontrol ettiği yapılan bir çalışma ile rapor edilmiştir (Khanam vd., 2000). *In vitro* kültürlerde özellikle ortama ilave edilen oksin ve sitokinin oranı önemli görülmektedir (Christianson ve Warnick, 1983). Bu iki bitki büyüme düzenleyicilerinin konsantrasyonları değerlendirildiğinde, düşük sitokinin

yüksek oksin genellikle kök gelişimini uyarırken, yüksek sitokinin düşük oksin sürgün gelişimini uymaktadır. Ayrıca besin ortamına aynı konsantrasyonlarda ilave edilen oksin ve sitokinin kallus oluşumunu teşvik ettiği bilinmektedir (Yamaguchi vd., 2003; Ikeuchi vd., 2013; Firoozi vd., 2019). Ancak morfogenez farklılaşmada endojen BBD konsantrasyonu etkilidir ve ekzojen BBD'lerin konsantrasyonlarıyla birlikte değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda, BBD'lerin farklı konsantrasyonlarını ve kombinasyonlarını içeren 40 farklı besin ortamı ile deneme düzeneği kurulmuştur. Bu çalışmada yaprak eksplantları BAP, Kin, NAA ve 2,4-D'nin farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarını içeren MS bazal besin ortamına alınarak kallus indüksiyonu üzerine etkileri araştırılmıştır.

Besin ortamına tek başına oksin veya sitokinin ilavesinin *V. scamandri* türünün kallus indüksiyonu için çok fazla yeterli olmadığı görülmüştür. Tek başına NAA'nın kullanımı eksplantlar üzerinde neredeyse hiç etki etmediği tespit edilmiştir. Benzer şekilde NAA'nın kallus indüksiyonunda etkili olmadığı *V. thapsus* türünde ve *Verbascum sinuatum* türünde yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (Karamian ve Ghasemlou, 2014; Al-Jibouri vd., 2016). 2,4-D'nin yüksek konsantrasyonlarında (0,5 ve 1 mg/L) ise kallus indüksiyonu gözlenmiştir. Hücrelerin uzaması ve bölünmesine sebep olması dolayısıyla 2,4-D kallus indüksiyonu için geniş kullanıma sahip oksinlerden biridir (Venkov vd., 2000; Bhuvanewari vd., 2012). Farklı bitki türlerinde yapılan çalışmalara göre 2,4-D'nin tek başına kullanılmasının kallus indüksiyonunu teşvik ettiği belirtilmiştir (Samanta vd., 2019; Klimek-Chodacka vd., 2020; Srinivasan vd., 2021). Benzer şekilde, Al-Jibouri vd. (2016)'nin *V. thapsus* türünde yaptıkları çalışmaya göre 2,4-D'nin tek başına kullanımının kallus indüksiyonu üzerine etkisinin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada ise her iki oksinin de tek başına kullanılması *Naregamia alata* türünde düşük oranda kallus indüksiyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (Raja vd., 2022). Çalışmamızda ayrıca, her iki oksin türünün tek başına kullanıldığı ortamlarda kültüre alınan eksplantların karardığı saptanmasına rağmen 2,4-D içeren ortamlarda kallus indüksiyonunun gözlenmesinin bu ortamlardaki hücre canlılığının NAA'ya kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde, *Melia azedarach* L. türünde yapılan bir çalışmada NAA içeren ortamlardaki eksplantlarda kararmanın 2,4-D'ye kıyasla daha fazla olduğu raporlanmıştır (Ahmadpoor vd., 2022). Çalışmamızda 0,5 mg/L BAP'ın

eksplantlarda sürgün gelişimini de teşvik ettiği belirlenmiştir. Benzer şekilde *Verbascum eriophorum* türünde yapılan çalışmada tek başına 0,5 mg/L BA'nın kullanımı sürgün indüksiyonunu teşvik ettiği belirtilmiştir (Yordanova vd., 2016). Diğer taraftan *V. thapsus* türünde yapılan çalışmada tek başına 0,5 mg/L BAP sitokininin kullanımı en yüksek kallus indüksiyonunu verdiği raporlanmıştır (Al-Jibour vd., 2016). Farklı bitki türleri ile yapılan çalışmalara bakıldığında ise BAP'ın morfogenez yol açtığı ve sürgün indüksiyonunda yaygın şekilde kullanıldığı bildirilmiştir (Mozafari vd., 2015; Agustina vd., 2020). *Verbascum speciosum* Schard. ve *V. thapsus* türlerinde yapılan iki ayrı çalışmada ise tek başına Kin içeren ortamlardaki eksplantların BAP'a kıyasla daha fazla sürgün çoğaltımına neden olduğu sonuçlarımız ile benzerlik göstermektedir (Turker vd., 2001; Karamian ve Ghasemlou, 2012).

Oksin ve sitokini birlikte içeren besin ortamlarının *V. scamandri* türünün kallus indüksiyonu için daha etkili olduğu görülmüştür. Bu durum oksin ve sitokininlerin birlikte hücre bölünmesini uyarmasından ve düzenlemesinden kaynaklanmaktadır. Sitokinin ve oksinlerin birlikte kullanımının tek başlarına kullanımına göre daha etkili olduğu daha önce yapılmış çalışmalar ile raporlanmıştır (Yasmin vd., 2003; Shirin vd., 2007). Buna artan ekzojen oksin oranı ile endojen oksin ve sitokinin oranlarındaki değişkenliğin, hücrelerin morfogenezine yol açtığı düşünülmektedir.

BAP+NAA ve Kin+2,4-D kombinasyonlarının *Verbascum scamandri* türünün kallus indüksiyonu üzerine etkileri incelendiğinde, özellikle artan BAP konsantrasyonları (0,5-3 mg/L) ile artan NAA konsantrasyonlarının (0,1-1 mg/L) birlikte kullanımı yeşil ve sert kallusların indüksiyonunu arttırmış olsa da sürgün gelişimine de yol açtığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, Kin+2,4-D kombinasyonunun daha fazla kallus oluşumunu indüklediği belirlenmiştir. Bu durum BAP+NAA kombinasyonunda oluşan kallusların sürgüne farklılaşmasına olanak sağlamasından kaynaklanmaktadır. Ancak çalışmamızda Kin+2,4-D içeren ortamlarda yüksek sitokinin ile düşük oksin konsantrasyonlarının (2 veya 3 mg/L Kin ile 0,1 mg/L 2,4-D) kullanımının da sürgün indüksiyonunun yol açtığı belirlenmiştir. Kin+2,4-D kombinasyonlu ortamlarda oksin oranının arttırılması ise tam tersi kallus indüksiyonunu teşvik etmiştir (0,5-3 mg/L Kin ile 1 mg/L 2,4-D) ve gelişen kallusların sürgün primordiyumlarına farklılaşmadığı saptanmıştır. Kallus indüksiyonunun eşit ekzojen

ve endojen bitki büyüme düzenleyicilerinin sonucunda gerçekleştiği göz önüne alınarak artan Kin konsantrasyonları ile 1 mg/L 2,4-D ilaveli ortamlardaki eksplantların oksin ve sitokinin oranlarının eşit seviyede olduğu düşünülmektedir. *Withania coagulans* türünde yapılan bir çalışmada en iyi kallus indüksiyonunun Kin ve 2,4-D destekli ortamlardan elde edildiği bildirilmiştir (Valizadeh ve Valizadeh, 2009). Benzer şekilde, farklı *Citrus* türlerinde yapılan çalışmada 2,4-D (2 veya 3 mg/L) ile Kin (3 veya 6 mg/L) konsantrasyonlarının birlikte kullanımında en yüksek kallus indüksiyon oranlarını elde etmişlerdir (Hosseini vd., 2015).

Kallus indüksiyon oranı, renk, yapı ve sürgün gelişimi gibi verilerden elde edilen sonuçlara göre *V. scamandri* türünün kallus indüksiyonu için en uygun ortamların, artan Kin konsantrasyonları (0,5, 1, 2 ve 3 mg/L) ile 1 mg/L 2,4-D'nin birlikte kullanıldığı ortamlar olduğu tespit edilmiştir. Bu ortamlarda elde edilen kallusların renkleri yeşil-sarı ve yapı olarak yumuşak oldukları gözlemlenmiştir. Ortamda oksin konsantrasyonunun yükseltilmesi kallus yapısı ve rengine etki etmiştir. Daha önceki çalışmalarda da 2,4-D'nin farklı oranlarda ortama ilave edilmesi ile yumuşak, yeşilimsi veya sarımsı kallus oluşturduğu bildirilmiştir ve sonuçlarımızla benzerlik göstermektedir (Thiruvengadam vd., 2010; Zhang vd., 2011; Najhah vd., 2021).

Fenoliklerin oksidasyonundan kaynaklanan kararmayı engellemek için çalışmamızda 1 g/L PVP'nin MS bazal besin ortamına bitki büyüme düzenleyicileri ile birlikte ilave edilmiştir. Ancak *V. scamandri* türü için fenolikleri baskılamada yeterli olmadığı ve bu nedenle kallus ve eksplant kayıplarının çok fazla yaşandığı çalışmamızda gözlenmiştir. Benzer şekilde *Citrus grandis* türünün kallus kültüründe PVP'nin kararmada etkili olmadığı raporlanmıştır (Wang vd., 2020). Başka bir çalışmada, askorbik asit ile sitrik asitin ortama eklenmesi sonucu *Sideritis trojana* türünde kalluslardaki kararmayı engelledikleri belirtilmiştir (Çördük ve Aki, 2011).

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarımıza göre kallus indüksiyonunda elde edilen kallusların biyokütlesel olarak yeterli olmadığı belirlenmiş ve alt kültürlemeler ile kallusların çoğaltımları gerçekleştirilmiştir. Kallus indüksiyon ortamları ile aynı konsantrasyon ve

kombinasyonlarda BBD'leri içeren MS bazal besin ortamlarının kallus çoğaltımı için uygun olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda alt kültürleme iki kez gerçekleştirilmiştir. Kallus biyokütlesinin arttığı gözlemlenmiştir ve alt kültürlemenin, kallus çoğaltımında önemli olduğu tespit edilmiştir. *Catharanthus roseus* ile yapılan bir çalışmada, alt kültürlemeler ile kallus biyokütlesinin %139 ile %168 arasında arttığı belirtilmiştir (Kaya ve Aki, 2013). Benzer şekilde *Chlorophytum borivilianum* türünde yapılan bir çalışmada alt kültürlemenin kallus çoğaltımında etkili olduğu belirtilmiştir (Nakasha vd., 2016).

Çalışmamızda araziden toplanan doğal bitki örneklerinin yaprakları, *in vitro* çimlendirilen bitkilerin yaprakları ve farklı bitki büyüme düzenleyicileri içeren ortamlarda gelişen kallusların verbaskozit, luteolin ve okubin içeriği belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. Seçilen ekstraksiyon yönteminin her üç metabolitin analizi için uygun olduğu belirlenmiştir. HPLC sonuçlarına göre kallusların verbaskozit, luteolin ve okubin içeriğinin doğal bitkiyle karşılaştırıldığında bütün kallus örneklerinin her üç metaboliti de içerdikleri belirlenmiştir. Doğal bitkiye kıyasla verbaskozit içeriğinin %196, luteolin %77 ve okubin miktarının ise kallus kültüründe %312 oranında arttığı saptanmıştır. *In vitro* bitki örneklerinde ise bileşik miktarlarının doğal bitki ve kallus örneklerine kıyasla daha düşük olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda 2 mg/L Kin ilave edilen MS besin ortamının (27) verbaskozit eldesi için en uygun ortam olduğu belirlenmiştir. Luteolin üretimi için 2 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D ilave edilen MS besin ortamının (35) en uygun olduğu belirlenmiştir. 0,5 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D içeren MS besin ortamının (33) ise okubin üretimi için uygun olduğu belirlenmiştir. Kallus örneklerinin farklı miktarda sekonder metabolit içermesinde besin ortamına ilave edilen Kinetin ve 2,4-D konsantrasyonlarının etkili olduğu düşünülmektedir. Sekonder metabolitlerin, BBD'lere bağlı olarak kallusların farklılaşma süreçleriyle ilişkili olduğu söylenmiştir (Smetanska, 2008). Bu nedenle sekonder metabolitlerin eldesi için çalışmamızda belirlenen kallus kültürünün kullanılabilir olduğu belirlenmiş ve ayrıca bu ortamlarda beyaz, yeşil, sarı-beyaz, sarı renkte ve yumuşak-sulu, yumuşak-sert, ve sert yapıda gelişen kallusların yapı ve renk olarak da sekonder metabolit birikimi üzerine etkisinin olduğu düşünülmektedir. Kallus kültürlerinden sekonder metabolit üretimi üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında, *V. thapsus* türünün kallus ekstraktlarından elde edilen verbaskozit miktarının 26,27-47,27 mg/g olduğu belirlenmiştir (Temporiti vd., 2020). *Verbena officinalis* türünde yapılan bir çalışmada ise farklı ışık spektrumlarındaki kallusların

verbaskozit içeriğinin 2277 ile 6716 mg/100g kuru ağırlık arasında arttığı belirtilmiştir (Kubica vd., 2020). *Capsicum chinense* türünde yapılan bir çalışmada, elde edilen kalluslarda luteolin içeriğinin 2,65 µg/g kuru ağırlıkta olduğu belirlenmiştir (Sherova vd., 2019). Başka bir çalışmada ise *Cynara cardunculus* subsp. *scolymus* türünün kallus kültür ortamına elisitör olarak 50 µM metil jasmonatın ortama eklenmesi sonucu 1,08 mg/g kuru ağırlık oranında luteolin elde edildiği bildirilmiştir (Abbas vd., 2021). Bir diğer çalışmada *Globularia trichosantha* subsp. *trichosantha* türünden elde edilen kallus ekstraktlarında okubinin 1,538-3,061 mg/kg ve verbaskozitin 0,018-0,742 mg/kg arasında olduğu tespit edilmiştir (Çölgeçen vd., 2018).



BEŞİNCİ BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Verbascum türlerinin içerdiği saponinler, iridoidler, feniletanoid glikozitler, terpenler ve flavonoidler gibi sekonder metabolitler birçok hastalığın tedavisinde hem alternatif tıp hem de günümüz ilaç, kozmetik vb. gibi endüstriyel alanlarda etken madde ve ham madde kaynağı olarak kullanıldığı bilinmektedir. Bitkisel sekonder metabolitlerin tıbbi ve ekonomik önemleri nedeniyle doğal kaynakları olan bitkilerden elde edilmeleri biyoçeşitliliği ve gen kaynaklarını tehlikeye atmaktadır. Bu nedenle bitki türlerine zarar vermeden, biyoteknolojik yöntemler ile sekonder metabolitlerin üretimi önem kazanmaktadır. Bitki doku kültürünün, değerli bitkisel gen kaynaklarının koruma altına alınmasına yardımcı olduğu gibi bitkisel ürünlerin üretilmesine de olanak sağlayan bir tekniktir. Bitki doku kültüründen yararlanarak bitkisel ürünlerin elde edilmesi ve sürdürülebilirliği; iklim değişikliklerinden ve toprak koşullarından etkilenmemesi, aseptik koşullar altında üretim yapılarak bakteri ve virüs gibi organizmaları bulundurmaması, hücrelerin yıl boyunca kolayca çoğaltılabilmesi, tek tip ham madde kaynağı sağlaması ve doğal yayılış gösteren bitkilere göre sekonder metabolitlerin daha kolay izole edilerek bitki popülasyonlarına zarar verilmemesi gibi birçok avantaja sahip olduğu bilinmektedir.

Yapılan bu tez çalışmasında, Çanakkale ilinin endemik bitki türlerinden ve tehlike altında bulunan *Verbascum scamandri* türünün ilk kez *in vitro* kültür koşulları optimize edilerek kallus kültürü ile verbaskozit, luteolin ve okubin sekonder metabolitlerinin üretimi ve analizi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda, 2 mg/L Kin ilaveli besin ortamının verbaskozit, 2 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D içeren ortamın luteolin ve 0,5 mg/L Kin+0,5 mg/L 2,4-D içeren ortamın ise okubin üretimi için uygun oldukları belirlenmiştir. Bu ortamların kallus kültüründen sekonder metabolit eldesi için etkili ortamlar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca optimize edilen kallus kültür koşulları bu türün süspansiyon kültürünü oluşturmak için kullanılabilir. Bitki doku kültüründe üretilen sekonder metabolit miktarının artırılması için hücreler çeşitli biyotik (fitokimyasallar, bakteri saldırıları, kitosan, metil jasmonat gibi) ya da abiyotik (inorganik tuzlar, ağır metaller, yüksek ya da düşük ozmolarite, aşırı sıcaklık gibi) strese maruz bırakılmaktadır. Bir bileşiğin sentezlenmesini uyaran elisitörler ticari öneme sahip sekonder metabolitlerin

sentezlenmesinde önemli rol oynayarak üretimlerinin artırılmasında kullanılmaktadır. *Verbascum scamandri* türünün *in vitro* sekonder metabolit içeriğinin artırılmasında etkili olacak metil jasmonat, salisilik asit gibi elisitörlerin seçilen bu besin ortamına ilavesi önerilmektedir. Ayrıca, fenoliklerin ortamda birikmesi sonucu eksplant ve kallusların kararmasını engelleyici farklı kimyasalların denenerek kararma sorununun önüne geçilmesinin gerekli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca kallus biyokütlesini daha fazla arttırmak için alt kültürleme sayısının da artırılmasının etkili olabileceği düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında elde edilen veriler, *Verbascum scamandri* türü ile ileride yapılacak *in vitro* çalışmalar için önemli bir kaynak niteliğindedir. Bu veriler doğrultusunda bu türün hücre süspansiyon kültürü, sekonder metabolit üretiminin artırılması ve gen ifade çalışmaları ele alınabilecektir.

KAYNAKÇA

- Abbas, G. M., Abdel Bar, F. M., Sallam, A., Elgamal, R. M., Lahloub, M. F. I. and Gohar, A. A. (2021). “*In vitro* callus culture of *Cynara cardunculus* subsp. *scolymus*: a biosystem for production of caffeoylquinic acid derivatives, sesquiterpene lactones, and flavonoids”. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 1-10.
- Abed, A. S., Majeed, D. M., Mohammed, M. A. and Al-Jibouri, A. M. J. (2020). “*In vitro* influences of sugar nutrition and light condition on accumulation of some phytochemicals in *Verbascum thapsus* L. culture”. *Plant Archives*, 20(1), 1126-1130.
- Adil, M., Ren, X., Kang, D. I. and Jeong, B. R. (2018). “Effect of explant type and plant growth regulators on callus induction, growth and secondary metabolites production in *Cnidium officinale* Makino”. *Molecular Biology Reports*, 45(6), 1919-1927.
- Agustina, M., Maisura, M. and Handayani, R. S. (2020). “The Effect of different seed cutting treatments and concentrations of BAP for the successful *in vitro* micrografting of mangosteen (*Garcinia mangostana* L.)”. *Journal of Tropical Horticulture*, 3(1), 1-5.
- Ahmadpoor, F., Zare, N., Asghari, R. and Sheikhzadeh, P. (2022). “Sterilization protocols and the effect of plant growth regulators on callus induction and secondary metabolites production in *in vitro* cultures *Melia azedarach* L.”. *AMB Express*, 12(1), 1-12.
- Akdemir, Z., Kahraman, Ç., Tatlı, I. I., Akkol, E. K., Süntar, I. and Keles, H. (2011). “Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory, antinociceptive and wound healer glycosides from the flowers of *Verbascum mucronatum* Lam.”. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(3), 436-443.
- Alaniya, M. D., Sutiashvili, M. G., Shalashvili, K. G., Skhirtladze, A. V., Mshvildadze, V. D. and Pichette, A. (2014).” Iridoid glycosides from roots of *Verbascum laxum*”. *Chemistry of Natural Compounds*, 50(5), 842-845.
- Alipieva, K. I., Orhan, I. E., Cankaya, I., Kostadinova, E. P. and Georgiev, M. I. (2014). “Treasure from garden: chemical profiling, pharmacology and biotechnology of mulleins”. *Phytochemistry Reviews*, 13(2), 417-444.

- Al-Jibouri, A. M. S., Abed, A., Abass Ali, A. J. and Majeed, D. M. (2016). "Improvement of phenols production by amino acids in callus cultures of *Verbascum thapsus* L.". *American Journal of Plant Sciences*, 07(01), 84-91.
- Alvi S. S., Ahmad P., Ishrat M., Iqbal D. and Khan M. S. (2019) "Secondary Metabolites from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Structure, Biochemistry and Therapeutic Implications Against Neurodegenerative Diseases". Swamy, M., Akhtar, M. (eds.) in: *Natural Bio-active Compounds*. (pp. 1-24). Springe: Singapore.
- Amin, H. I. M., Hussain, F. H. S., Gilardoni, G., Thu, Z. M., Clericuzio, M. and Vidari, G. (2020). "Phytochemistry of *Verbascum* species growing in Iraqi Kurdistan and bioactive iridoids from the flowers of *Verbascum calvum*". *Plants*, 9(9), 1066.
- Anil, S., Dosler, S. and Mericli, A. H. (2016). "Chemical composition and antimicrobial activity of *Verbascum caesareum*". *Chemistry of Natural Compounds*, 52(1), 125-126.
- Aysu, T. and Durak, H. (2016). "Pyrolysis of giant mullein (*Verbascum thapsus* L.) in a fixed-bed reactor: Effects of pyrolysis parameters on product yields and character". *Energy Sources Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, 38(5), 661-669.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M. A. (2001). "Doku Kültürü Temel Laboratuvar Teknikleri". M. Babaoğlu, E. Gürel, ve S. Özcan (Ed.). içinde *Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü Uygulamaları* (s. 1-35). S.Ü. Vakfı Yayınları: Konya.
- Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K. and Arora, S. (2013). "Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses". *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 216-232.
- Başer, K. H. C. (2015). "Sığırkuyruğu (*Verbascum* sp.)". *BagBahce*, 61, 22-23.
- Baydar, H. (2013). *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi* (Genişletilmiş 4. Baskı). Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın No: 51. SDÜ Basımevi: Isparta.
- Bhuvanewari Ch., Rao, K., Gandi, S. and Giri, A. (2012). "Abiotic elicitation of gymnemic acid in the suspension cultures of *Gymnema sylvestre*". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(2), 741-747.

- Boğa, M., Ertaş, A., Haşimi, N., Demirci, S., Yılmaz, M. A., Temel, H. and Kolak, U. (2016).” Phenolic profile, fatty acid and essential oil composition analysis and antioxidant, antialzheimer and antibacterial activities of *Verbascum flavidum* extracts”. *Chiang Mai Journal of Science*, 43(5), 1090-1101.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. and Gontier, E. (2001). “Production of Plant Secondary Metabolites: A Historical Perspective”. *Plant Science*, 161(5), 839-851.
- Byamukama, R., Namukobe, J. and Kiremire, B. (2009). “Anthocyanins from leaf stalks of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)”. *African Journal of Pure and Applied Chemistry*, 3(2), 020-025.
- Calabrese, G., Zappalà, A., Dolcimascolo, A., Acquaviva, R., Parenti, R. and Malfa, G. A. (2021). “Phytochemical analysis and anti-inflammatory and anti-osteoarthritic bioactive potential of *Verbascum thapsus* L. (Scrophulariaceae) leaf extract evaluated in two *in vitro* models of inflammation and osteoarthritis”. *Molecules*, 26(17), 5392.
- Christianson, M. and Warnick, D. A. (1983). “Competence and determination in the process of *in vitro* shoot organogenesis”. *Developmental Biology*, 95(2), 288-293.
- Croteau, R., Kutchan, T. M. and Lewis, N. G. (2000). “Natural products (secondary metabolites)”. B. Buchanan, W. Gruissem, and R. Jones (eds.). in: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (pp. 1250-1318), American Society of Plant Physiologists: Rockville.
- Çalışkan, T., Hatipoğlu, R. and Kırıcı, S. (2019). “Production of plant secondary metabolites from cell and organ cultures under *in vitro* conditions”. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(7), 971-980.
- Çingay, B. and Karavelioğulları, F.A. (2016). “A new species of *Verbascum*, *V. nihatgoekyigitii* (Scrophulariaceae), from southeastern Anatolia, Turkey”. *Phytotaxa*, 269(4), 287-293.
- Çingay, B., Demir, O. and Cabi, E. (2018). “*Verbascum faik-karaveliogullarii* (Scrophulariaceae), a new species from southeastern Anatolia, Turkey”. *Phytotaxa*, 372(4), 263–272.

- Çölgeçen, H., Atar, H., Toker, G. and Akgül, G. (2018). "Callus production and analysis of some secondary metabolites in *Globularia trichosantha* subsp. *trichosantha*". *Turkish Journal Of Botany*, 42(5), 559-567.
- Çördük, N. and Aki, C. (2011). "Inhibition of browning problem during micropropagation of *Sideritis trojana* Bornm., an endemic medicinal herb of Turkey". *Romanian Biotechnological Letters*, 16(6), 6760-6765.
- D'Onofrio, C. and Morini, S. (2006). "Somatic embryo, adventitious root and shoot regeneration in *in vitro* grown quince leaves as influenced by treatments of different length with growth regulators". *Scientia Horticulturae*, 107(2), 194-199.
- Dalar, A., Guo, Y. and Koneczak, I. (2014)." Phenolic composition and potential anti-inflammatory properties of *Verbascum cheiranthifolium* var. *cheiranthifolium* leaf". *Journal of Herbal Medicine*, 4(4), 195-200.
- Davis, P. H. (Ed.). (1978). *Flora of Turkey and East Aegean Islands* (Vol. 6, pp. 461-603). Edinburgh University Press: Edinburgh.
- Demirci, S., Doğan, A., Demirci, Y. and Şahin, F. (2014). "In vitro wound healing activity of methanol extract of *Verbascum speciosum*". *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 7(3), 37-44.
- Diker, N. Y., Kahraman, C., Kupeli Akkol, E., Karaoglu, M. T., Comoglu, T., Akdemir, Z. S. and Tatli Cankaya, I. I. (2019). "The evaluation of sterile solutions of Ilwensisaponin A and C from *Verbascum pterocalycinum* var. *mutense* Hub.-Mor. On antiviral, antinociceptive and anti-inflammatory activities". *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(3), 432-436.
- Dimitrova, P., Alipieva, K., Grozdanova, T., Simova, S., Bankova, V., Georgiev, M. I. and Popova, M. P. (2018). "New iridoids from *Verbascum nobile* and their effect on lectin-induced T cell activation and proliferation". *Food and Chemical Toxicology*, 111, 605-615.
- Dimitrova, P., Georgiev, M., Khan, M. and Ivanovska, N. (2013). "Evaluation of *Verbascum* species and harpagoside in models of acute and chronic inflammation". *Open Life Sciences*, 8(2), 186-194.

- Dinani, M. S., Malakooti, S. and Akbari, V. (2020). “*In vitro* cytotoxic activity of *Verbascum alceoides* against cervix carcinoma cells”. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 19.
- Duman, H., Uzunhisarcıklı, M. E. and Tan, K. (2017). “*Verbascum mughlaeum* (Scrophulariaceae), a new species from SW Anatolia, Turkey”. *Phytotaxa*, 291(3), 231-236.
- Esposito, E., Dal Toso, R., Pressi, G. Bramanti, P., Meli, R., and Cuzzocrea, S. (2010). “Protective effect of verbascoside in activated C6 glioma cells: possible molecular mechanisms”. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 381, 93-105
- Eyüþ, E., Kaygısız, B., Kılıç, F. S. and Ayhancı, A. (2020). “The *in vivo* antinociceptive and antiinflammatory effects of *Verbascum exuberans* Hub.-Mor.”. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 17(6), 586-592.
- Farid, M. M., Ragheb, A. Y., El-Shabrawy, M., Marzouk, M. M., Hussein, S. R., Soliman, A. A., Taha, H. and Kawashty, S. A. (2020). “GC-MS and LC-ESI-MS analysis of biologically active fractions from *Verbascum letourneuxii*; efficient protocol for *in vitro* propagation”. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 29, 101817.
- Firoozi, B., Zare, N., Sofalian, O. and Sheikhzade-Mosadegh, P. (2019). “*In vitro* indirect somatic embryogenesis and secondary metabolites production in the saffron: emphasis on ultrasound and plant growth regulators”. *Journal of Agricultural Sciences*, 25(1), 1-10.
- Gökmen, A., Kúsz, N., Karaca, N., Demirci, F., Hohmann, J. and Kırmızıbekmez, H. (2021). “Secondary metabolites from *Verbascum bugulifolium* Lam. and their bioactivities”. *Natural Product Research*, 35(23), 5294-5298.
- Göse, M. and Hacıoğlu, N. (2021). “Bioactive Compounds, Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Two *Verbascum* Species”. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 24(3), 479-487.
- Heywood, V. H. (1979). *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press: UK.
- Heywood, V. H. (1993). *Flowering Plants of the World*. Oxford University Press: UK.

- Ho, J. N., Lee, Y. H., Park, J. S., Jun, W. J., Kim, H. K., Hong, B. S., Shin, D. H. and Cho, H. Y. (2005). "Protective effects of aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts". *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28(7), 1244-1248.
- Hosseini, S. Z., Jelodar, N. B., Rahimian, H. and Ranjbar, G. (2015). "Effect of different concentrations of kinetin and 2, 4, D on callus induction of citrus rootstock (*Citrus sp.*)". *Research Trend*, 7(2), 1045-1050.
- Huber-Morath, A. (1971). *Die Türkischen Verbasceen* (pp. 8-35). Kommissionsverlag von Gebrüder Fretz AG: Zürich.
- Huber-Morath, A. (1978). "*Verbascum* L." P.H. Davis (ed.). in: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, (Vol. 6, 461-603). Edinburgh University Press: Edinburgh.
- Hung, J. Y., Yang, C. J., Tsai, Y. M., Huang, H. W. and Huang, M. S. (2008). "Antiproliferative activity of aucubin is through cell cycle arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer A549 cells". *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 35(9), 995-1001.
- Ikeuchi, M., Sugimoto, K. and Iwase, A. (2013). "Plant callus: mechanisms of induction and repression". *The Plant Cell*, 25(9), 3159-3173.
- Iliescu, I. A., Peter, S., Albert, I., Skalicka-Woźniak, K., Miron, A., Luca, S. V. and Wolfram, E. (2020). "*Verbascum nigrum*: cytotoxicity evaluation in A431 epidermoid carcinoma cells and untargeted LC-HR-MS/MS metabolite profiling". *Chemistry and Biodiversity*, 17(12).
- IUCN. (2001). *IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1*. IUCN Species Survival Commission. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.
- Jafari, S., Saeidnia, S. and Abdollahi, M. (2014). "Role of natural phenolic compounds in cancer chemoprevention via regulation of the cell cycle". *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 15(4), 409-421.
- Karalija, E., Parić, A., Dahija, S., Bešta-Gajević, R. and Ćavar Zeljković, S. (2020). "Phenolic compounds and bioactive properties of *Verbascum glabratum* subsp. *Bosnense* (K. Malý) Murb., an endemic plant species". *Natural Product Research*, 34(16), 2407-2411.

- Karamian, R. and Ghasemlou, F. (2012). "Plant regeneration via somatic embryogenesis and organogenesis in *Verbascum speciosum* Schard". *Journal of Cell and Molecular Research*, 4(2), 81-88.
- Karamian, R. and Ghasemlou, F. (2014). "Plant Regeneration via Organogenesis and Somatic Embryogenesis in *Verbascum sinuatum* L.". *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 56, 97-103.
- Karavelioğulları, F. A. (2004) Türkiye *Verbascum*'ları (A Grubu) Revizyonu. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Karavelioğulları, F. A. (2015a). "*Verbascum ibrahim-belenlii* (Scrophulariaceae), a new species from East Anatolia, Turkey". *Phytotaxa*, 212(3), 246-248.
- Karavelioğulları, F. A. (2015b). "*Verbascum misirdalianum* (Scrophulariaceae), a new species from central Anatolia, Turkey". *Phytotaxa*, 217(1), 96-99.
- Kaya, N. and Aki, C. (2013). "Effect of plant growth regulators on *in vitro* biomass changing in *Catharanthus roseus* (L) G Don". *Annals of Biological Research*, 4(4), 164-168.
- Kayır, S., Demirci, Y., Demirci, S., Ertürk, E., Ayaz, E., Doğan, A. and Şahin, F. (2018). "The *in vivo* effects of *Verbascum speciosum* on wound healing". *South African Journal of Botany*, 119, 226-229.
- Khan, W., Ullah, R., Wahab, Z. and Uddin, M. N. (2020). "Antimicrobial effects of *Verbascum thapsus* L. leaf extracts". *Bangladesh Journal of Botany*, 49(4), 1119-1125.
- Khanam, N., Khoo, C. A. G. K. and Khan, A. G. (2000). "Effects of cytokinin/auxin combinations on organogenesis, shoot regeneration and tropane alkaloid production in *Duboisia myoporoides*". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62(2), 125-133.
- Kılıç, Ö. (2019). *Verbascum armenum* Boiss. et Kotschy var. *armenum* Boiss. et Kotschy Bitkisinin Biyolojik Aktivitesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kırca, A. and Arslan, E. (2008). "Antioxidant capacity and total phenolic content of selected plants from Turkey". *International Journal of Food Science and Technology*, 43(11), 2038-2046.

- Klimek-Chodacka, M., Kadluczka, D., Lukasiewicz, A., Malec-Pala, A., Baranski, R. and Grzebelus, E. (2020). “Effective callus induction and plant regeneration in callus and protoplast cultures of *Nigella damascena* L.”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 143(3), 693-707.
- Kubica, P., Szopa, A., Prokopiuk, B., Komsta, Ł., Pawłowska, B. and Ekiert, H. (2020). “The influence of light quality on the production of bioactive metabolites—verbascoside, isoverbascoside and phenolic acids and the content of photosynthetic pigments in biomass of *Verbena officinalis* L. cultured *in vitro*”. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 203, 111768.
- Küçük, S., Özdemir, F., İşcan, G. and İncesu, Z. (2016). “Determination of cytotoxic and anticandidal activities of three *Verbascum* L. Species from Turkey: *V. cheiranthifolium* Boiss. var. *asperulum* (Boiss.) Murb. Monorg., *V. pycnostachyum* Boiss. & Heldr and *V. orgyale* Boiss. & Heldr”. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(3), 318-322.
- Ling, A. P. K., Tan, K. P. and Hussein, S. (2013). “Comparative effects of plant growth regulators on leaf and stem explants of *Labisia pumila* var. *alata*”. *Journal of Zhejiang University Science B*, 14(7), 621-631.
- Lopez-Lazaro, M. (2009). “Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin”. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 9, 31-59.
- Mammadov, R. (2014). *Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler*. Nobel Akademik Yayıncılık: Ankara.
- Mathur, S. and Shekhawat, G. S. (2013). “Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an *in vitro* approach for production of stevioside”. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3), 931-939.
- Meijer, J. J. (1989). Effects of hydrodynamic and chemical/osmotic stress on plant cells in a stirred bioreactor. Ph.D. thesis, Technical University Delft, The Netherlands.
- Mikulík, J. (1999). “Propagation of endangered plant species by tissue cultures”. *Acta Universitatis Palackianae Olomucensis, Biologica*, 37, 27-33.

- Mozafari, A. A., Vafaei, Y. and Karami, E. (2015). “*In vitro* propagation and conservation of *Satureja avromanica* Maroofi—an indigenous threatened medicinal plant of Iran”. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 21(3), 433-439.
- Murashige, T. and Skoog F. (1962). “A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture “. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Murbeck, S. (1925). *Monographie der Gattung Celsia*. Acta Universitatis Lundensis, 22(1), 1-20.
- Murbeck, S. (1933). *Monographie der Gattung Verbascum*. Acta Universitatis Lundensis, 29(2), 1-630.
- Mükemre, M., Behçet, L. and Çakılcıoğlu, U. (2015). “Ethnobotanical study on medicinal plants in villages of Çatak (Van-Turkey)”. *Journal of Ethnopharmacology*, 166, 361-374.
- Najhah, M. Y., Jaafar, H. Z., Nakasha, J. J. and Hakimian, M. (2021). “Shoot multiplication and callus induction of *Labisia pumila* var. *alata* as influenced by different plant growth regulators treatments and its polyphenolic activities compared with the wild plant”. *Molecules*, 26(11), 3229.
- Nakasha, J. J., Sinniah, U. R., Kemat, N. and Mallappa, K. S. (2016). “Induction, subculture cycle, and regeneration of callus in safed musli (*Chlorophytum borivilianum*) using different types of phytohormones”. *Pharmacognosy Magazine*, 12(47), 460-464.
- Nofouzi, K., Aghapour, M., Ezazi, A., Sheikhzadeh, N., Tukmechi, A., Khordadmehr, M., Akbari, M., Tahapour, K. and Mousavi, M. (2017). “Effects of *Verbascum speciosum* on growth performance, intestinal histology, immune system and biochemical parameters in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17(1), 145-152.
- Nykmukanova, M., Mukazhanova, Z. B., Kabdysalym, K., Eskalieva, B. and Beyatli, A. (2019). “Flavonoids from *Verbascum marschallianum* and *V. orientale*”. *Chemistry of Natural Compounds*, 55(5), 937-938.
- Paun, G., Neagu, E., Albu, C. and Radu, G. L. (2016). “*Verbascum phlomoides* and *Solidago virgaureae* herbs as natural source for preventing neurodegenerative diseases”. *Journal of Herbal Medicine*, 6(4), 180-186.

- Perczak, A., Gwiazdowska, D., Marchwińska, K., Juś, K., Gwiazdowski, R. and Waśkiewicz, A. (2019). “Antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* and their secondary metabolites in wheat seeds”. *Archives of Microbiology*, 201(8), 1085-1097.
- Prasath, G. S. and Subramanian, S. P. (2011). “Modulatory effects of fisetin, a bioflavonoid, on hyperglycemia by attenuating the key enzymes of carbohydrate metabolism in hepatic and renal tissues in streptozotocin-induced diabetic rats”. *European Journal of Pharmacology*, 668(3), 492-496.
- Raja, H. D., Srinivasan, P. and Tamilvanan, R. (2022). “Effect of purified vermicast extract with plant growth regulators on indirect regeneration of *Naregamia alata* Wight & Arn from leaf explants and genetic fidelity analysis of regenerants”. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1-12.
- Rangel-Huerta, O. D., Pastor-Villaescusa, B., Aguilera, C. M. and Gil, A. (2015). “A Systematic Review of the Efficacy of Bioactive Compounds in Cardiovascular Disease: Phenolic Compounds”. *Nutrients*, 7(7), 5177-5216.
- Ray, B. P., Hassan, L. and Nasiruddin, K. M. (2011). “*In vitro* regeneration of brinjal (*Solanum melongena* L.)”. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 36(3), 397-406.
- Rout, G. R., Samantaray, S. and Das, P. (2000). “*In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants”. *Biotechnology Advances*, 18(2), 91-120.
- Samanta, D., Mallick, B. and Roy, D. (2019). “*In vitro* clonal propagation, organogenesis and somatic embryogenesis in *Bacopa monnieri* (L.) Wettst”. *Plant Science Today*, 6(4), 442-449.
- Seçmen, Ö., Gemici, Y., Görk, G., Bekat, L. and Leblebici, E. (1998). *Tohumlu Bitkiler Sitematiği* (s. 236-240). Ege Üniversitesi Yayınları: İzmir.
- Sen, B., Dosler, S. and Mericli, A. H. (2015). “Chemical constituents and antimicrobial activity of *Verbascum lagurus*”. *Chemistry of Natural Compounds*, 51(1), 139-140.
- Sherova, G., Pavlov, A. and Georgiev, V. (2019). “Polyphenols profiles and antioxidant activities of extracts from *Capsicum chinense* *in vitro* plants and callus cultures”. *Food Science and Applied Biotechnology*, 2(1), 30-37.

- Shirin, F., Hossain, M., Kabir, M. F., Roy, M. and Sarker, S. R. (2007). "Callus induction and plant regeneration from internodal and leaf explants of four potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivars". *World Journal of Agricultural Sciences*, 3(1), 01-06.
- Sindarov, B. (2020). *Verbascum lasianthum* Boiss. ex. Benth türünün akciğer kanseri (A549) hücrelerine etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Smetanska, I. (2008). "Production of secondary metabolites using plant cell cultures". *Food Biotechnology*, 187-228.
- Sökmen, A., ve Gürel, E. (2001). "Sekonder Metabolit Üretimi". M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan (Ed.). içinde *Bitki Biyoteknolojisi I, Doku Kültürü Uygulamaları* (s. 211-261). Selçuk Üniversitesi Basımevi: Konya.
- Srinivasan, P., Raja, H. D. and Tamilvanan, R. (2021). "Efficient *in vitro* plant regeneration from leaf-derived callus and genetic fidelity assessment of an endemic medicinal plant *Ranunculus wallichianus* Wight & Arn by using RAPD and ISSR markers". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 147(2), 413-420.
- Tariq, A., Shah, G. M., Ahmad Zada, A. A., Shah, A. Z. and Fatima, I. (2021). "Phytochemical analysis and in-vitro anti-bacterial and anti-fungal activity of *Verbascum arianthum* (Benth)". *Pure and Applied Biology*, 10(3), 797-806.
- Tatli, I., Schuhly, W., Kunert, O., Bedir, E. and Akdemir, Z. S. (2008). "Secondary metabolites from the aerial parts of *Verbascum dudleyanum* and their biological activities". *Chemistry of Natural Compounds*, 44(3), 292-295.
- Temporiti, M. E. E., Frezza, C., Beccaccioli, M., Gelardi, L., Bianco, A., Bonina, F. P. and Nielsen, E. (2020). "Production of verbascoside and its analogues in *in vitro* cultures of *Verbascum thapsus* L.". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 140(1), 83-93.
- Thiruvengadam, M., Rekha, K. T., Yang, C. H., Jayabalan, N. and Chung, I. M. (2010). "High-frequency shoot regeneration from leaf explants through organogenesis in bitter melon (*Momordica charantia* L.)". *Plant Biotechnology Reports*, 4(4), 321-328.
- Topcu, Ş. ve Çölgeçen, H. (2015). "Bitki Sekonder Metabolitlerinin Biyoreaktörlerde Üretilmesi". *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 8(2), 09-29.

- Turker, A. U. and Gurel, E. (2005). "Common mullein (*Verbascum thapsus* L.): Recent advances in research". *Phytotherapy Research*, 19(9), 733-739.
- Turker, A. U., Camper, N. D. and Gurel, E. (2001). "In vitro culture of common mullein (*Verbascum thapsus* L.)". *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 37(1), 40-43.
- Valizadeh, J. and Valizadeh, M. (2009). "In vitro callus induction and plant regeneration from *Withania coagulans*: a valuable medicinal plant". *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(21), 1415-1419.
- Venditti, A., Frezza, C., Riccardelli, M., Foddai, S., Nicoletti, M., Serafini, M. and Bianco, A. (2016). "Secondary metabolites from *Scrophularia canina* L.". *Natural Product Research*, 30(14), 1665-1669.
- Venkov, P., Topashka-Ancheva, M., Georgieva, M., Alexieva, V. and Karanov, E. (2000). "Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids". *Archives of Toxicology*, 74(9), 560-566.
- Wang, Y., He, W., Xie, R., Chen, Q., Yang, S. and Wang, X. (2020). "Study on induction and culture of callus of *Citrus grandis* cv. 'Hongmianmiyou'". in: *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 446(3), 032096.
- Wink, M. (2008). "Evolution of secondary plant metabolism". in: *Encyclopedia of Life Sciences*. Wiley: Chichester.
- Wu, Q.Q., Xiao, Y., Duan, M.X., Yuan, Y., Jiang, X.H., Yang, Z., Liao, H.H., Deng, W. and Tang, Q.Z. (2018). "Aucubin protects against pressure overload-induced cardiac remodelling via the β 3-adrenoceptor–neuronal NOS cascades". *British Journal of Pharmacology*, 175(9), 1548-1566.
- Yakoub, A. R. B., Abdehedi, O., Jridi, M., Elfalleh, W., Nasri, M. and Ferchichi, A. (2018). "Flavonoids, phenols, antioxidant, and antimicrobial activities in various extracts from Tossa jute leave (*Corchorus olitorus* L.)". *Industrial Crops and Products*, 118, 206-213.
- Yamaguchi, M., Kato, H., Yoshida, S., Yamamura, S., Uchimiya, H. and Umeda, M. (2003). "Control of *in vitro* organogenesis by cyclin-dependent kinase activities in plants". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(13), 8019-8023.

- Yan, M., Zhu, Y., Zhang, H. J., Jiao, W. H., Han, B. N., Liu, Z.X., Qiu, F., Chen, W.S. and Lin, H.W. (2013). "Anti-inflammatory secondary metabolites from the leaves of *Rosa laevigata*". *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(11), 3290-3297.
- Yasmin, S., Nasiruddin, K. M., Begum, R. and Talukder, S. K. (2003). "Regeneration and establishment of potato plantlets through callus formation with BAP and NAA". *Asian Journal of Plant Sciences*, 2(12),936-940.
- Yordanova, Z. P., Rogova, M. A. and Kapchina-Toteva, V. M. (2016). "*In vitro* propagation of the Balkan endemic species *Verbascum eriophorum* Godr.". *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(5), 767-771.
- Zhang, S., Liu, N., Sheng, A., Ma, G. and Wu, G. (2011). "*In vitro* plant regeneration from organogenic callus of *Curcuma kwangsiensis* Lindl (Zingiberaceae)". *Plant Growth Regulation*, 64(2), 141-145.
- Zhao, X. H., Yue, H. L., Li, P., Zeng, X. and Zhang, G. (2013). "Evaluation of the antitumor activity by CdTe QDs with verbascoside". *Nano*, 8(03), 1350031.