

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



ANTALYA FLORASINA ENDEMİK OLAN *Verbascum leptocladum*'un *IN VITRO* ÇOĞALTILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Şerife ÜNNÜ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



ANTALYA FLORASINA ENDEMİK OLAN *Verbascum leptocladum*'un *IN VITRO* ÇOĞALTILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Şerife ÜNNÜ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANTALYA FLORASINA ENDEMİK OLAN *Verbascum leptocladum*'un *IN VITRO* ÇOĞALTILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Şerife ÜNNÜ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANTALYA FLORASINA ENDEMİK OLAN *Verbascum leptocladum*'un IN
VITRO ÇOĞALTILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA**

Şerife ÜNNÜ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 24/06/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kenan TURGUT (Danışman)

Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

ÖZET

ANTALYA FLORASINA ENDEMİK OLAN *Verbascum leptocladum*'un *IN VITRO* ÇOĞALTILMASI ÜZERİNE BİR ARAŞTIRMA

Şerife ÜNNÜ

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Haziran 2024; 51 sayfa

Anadolu'da "Sığırkuyruğu" olarak da tanınan *Verbascum L.* cinsi, *Scrophulariaceae* familyasının en geniş cinslerinden birisidir. Uzun yıllar boyunca geleneksel tıpta kullanılmakta olan sığırkuyruğu (*Verbascum spp.*), türlerinden biri olan *Verbascum leptocladum*, Antalya florasına endemik olup, yayılım lokalizasyonu Türkiye'de oldukça sınırlıdır. Literatürde R kategorisi olarak yer almakta ve nesli tükenme tehlikesi olan bitkilerdendir. Literatürde bu türe ait sınırlı sayıda çalışma bulunmakta olup, herhangi bir bitki doku kültürü tekniğinin uygulandığı çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu yüksek lisans tez çalışmasında, risk kategorisine giren *Verbascum leptocladum* türüne ait bitki doku kültürü protokolü geliştirilmesi ve mikroçoğaltım yöntemi ile bitkinin *in vitro* çoğaltılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda mikroçoğaltım için en yüksek sürgün sayısını elde etmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda sitokinin ve oksin içeren ortamlardan oluşan deneme oluşturulmuştur. En yüksek sürgün sayısı 2 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA içeren MS besin ortamından elde edilmiştir. Doku kültüründe köklendirilen bitkiler başarılı bir şekilde dış koşullara alıştırılarak sera koşullarında çiçeklenen bitkiler elde edilmiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Çimlendirme, Endemik Bitki, *In Vitro* Çoğaltma, *Verbascum leptocladum*

JÜRİ: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

ABSTRACT

A STUDY ON THE *IN VITRO* PROPAGATION OF *Verbascum leptocladum* ENDEMIC TO THE FLORA OF ANTALYA

Şerife ÜNNÜ

MSc Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Kenan TURGUT

June 2024; 51 pages

The genus *Verbascum* L., commonly known as "Mullein" in Anatolia, is one of the most prevalent genera in the Scrophulariaceae family. Mullein (*Verbascum* spp.), which has been used in traditional medicine for many years, includes a species called *Verbascum leptocladum*, which is endemic to the Antalya region. The distribution of *Verbascum leptocladum* in Turkey is quite limited; it is classified in the R category in the literature and is among the endangered species. There are a limited number of studies on this species in the literature, and no study has been found that applied any plant tissue culture technique. This master's thesis aims to develop a plant tissue culture protocol for the endangered species *Verbascum leptocladum* and propagate the plant in vitro using micropropagation methods. In this context, experiments were carried out in environments containing different concentrations of cytokinin and auxin to obtain the highest number of shoots in micropropagation. The highest number of shoots was obtained from the MS medium containing 2 mg/L BAP and 0.5 mg/L NAA. Plants rooted in tissue culture have been successfully acclimated to external conditions, resulting in flowering plants under greenhouse conditions.

KEYWORDS: endemic plant, germination, *in vitro* propagation, *Verbascum leptocladum*.

COMMITTEE: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS

Prof. Dr. Sebahattin ÖZCAN

ÖNSÖZ

Sığır kuyruğu olarak bilinen, *Verbascum spp.* cinsi Avrupa ülkelerinde tıbbi ve aromatik bitki olarak değerlendirilmektedir. Bu bitkinin kullanımı ve değeri, yüzyıllar boyunca Avrupa'nın farklı kültürlerinde ve tıp geleneklerinde köklü bir geçmişe sahiptir. Geleneksel tıpta öksürük, bronşit ve diğer solunum yolu rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Özellikle yaprakları ve çiçekleri, solunum yollarını rahatlatıcı özelliklere sahip olup, öksürük şurupları, tentürler ve diğer bitkisel ilaçların yapımında kullanılmaktadır. Fakat, ülkemizde *Verbascum* cinsinin gereken önemi henüz anlaşılmamıştır. Antalya florasına endemik ve çok yıllık olan *Verbascum leptocladum* türü “Tehdit Altındaki Bitki Türleri” listesinde “Tehlike Altında” (EN) olarak sınıflandırılmaktadır. Dolayısıyla diğer risk altındaki bitkilerde olduğu gibi bu türde de hızlı çoğaltım yöntemlerinin geliştirilmesi türün korunmasına önemli katkılarda bulunacaktır. Bunun için de *in vitro* çoğaltma tekniklerinin kullanılma potansiyeli yüksektir. Bu türün sınırlı yayılımı ve tehlike altındaki türler kategorisinde (R kategorisi) yer alması, koruma çabalarının aciliyetini vurgulamaktadır. Bu tez ileride *Verbascum leptocladum* ile yapılacak olan çalışmalara bir kapı aralamaktadır. Ayrıca Türkiye'nin nesli tükenme tehlikesinde olan bu bitkinin tohum çimlenmesine ve mikro-çoğaltımına katkıda bulunmayı hedeflenmektedir.

Bu süreçte bana rehberlik eden ve çok değerli bilgi birikimi ile çalışmamı yönlendiren, tezimin her aşamasında bana yol gösteren, zorlandığım her noktada bana destek olarak başka bir perspektiften bakmamı sağlayan, sebat etmeyi öğreten, ufkumu genişleten danışmanım Prof. Dr. Kenan TURGUT'a sonsuz şükranlarımı sunarım.

Bitki sistematığını ve teşhisini değerli bilgi birikimiyle yaparak büyük destek olan değerli hocam Prof. Dr. Ramazan Süleyman GÖKTÜRK'e, fakültede bilgi, donanım ve tecrübeleriyle desteklerini her zaman hissettiren çok sevgili ve değerli hocalarım; Prof. Dr. Naci ONUS ve ekibine, Doç. Dr. İlkay KUTLAR'a, Arş. Gör. Dr. Birgül GÜDEN'e, Doç. Dr. Utku YÜKSELBABA'ya, Doç. Dr. Mehmet TEKİN'e, yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesinde her türlü alt yapının kullanılmasında ve bitkilerimin aklimatizasyon aşamasının sürdürülebilirliğini sağlamada imkân sağlayan Güney Agripark Ar-Ge Merkezi yöneticilerine, lisansüstü eğitim hayatım boyunca bana maddi ve manevi destek olan Türk Üniversiteli Kadınlar Derneği Antalya Şubesi'ne ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen dostlarım Hikmet DEVECİ'ye, Nawab NASIR'a, Ayşe SAĞIR'a, Moin QURESHİ'ye, Leyla KURGAN'a, Oktay SEÇİLMİŞ'e ve listenin uzamaması adına sevgili diğer dostlarımın her birine canı gönülden teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana maddi manevi her zaman yanımda olan aileme, kedim Balçiçek'e ve her zorluk yaşadığımda, arkanda baban var diyerek beni cesaretlendirip yüreklendiren çok sevgili babam Bayram ÜNNÜ'ye teşekkürlerin en büyüğünü sunarım. İyi ki varsınız! Bu çalışmanın, doğal mirasımızın korunmasına ve bitki biyoteknolojisi alanına anlamlı katkılar sağlayacağına inanıyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1 GİRİŞ.....	1
2 KAYNAK TARAMASI.....	10
2.1. Nesli Tükenme Tehlikesi Bulunan Endemik Bitkilerde Yapılan <i>İn vitro</i> Mikroçoğaltma Çalışmalarının Bazıları	10
2.2. <i>Verbascum</i> Cinsi ile İlgili Yapılan Çalışmalar	12
2.3. Diğer Bitkilerde Mikroçoğaltma Çalışmaları.....	18
3 MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.1.1. Bitkisel Materyal	21
3.1.2. Rejenerasyon İçin Kullanılan Eksplanlar	22
3.1.2 Besin Ortamlarının Bileşimi.....	23
3.2. Metot	24
3.2.1. Sterilizasyon İşlemleri.....	24
3.2.2. Tohumların Yüzey Sterilizasyonu	25
3.2.3. Tohumların Çimlendirilmesi.....	25
3.2.4. Kallus Rejenerasyonu	26
3.2.5. Somatik Embriyo ve Sürgün Rejenerasyonu.....	27
3.2.6. Köklendirme	27
3.2.7. Aklimatizasyon	28
3.2.8. İstatistik Analizleri.....	29
4 BULGULAR VE TARTIŞMA	30

4.1.Kullanılan Bitki Materyali ve Sterilizasyonu	30
4.2.Kallus Oluşumu, Somatik Embriyo ve Sürgün Rejenerasyonu	35
4.3.Köklendirme.....	40
4.4. Bitkileri Dış Koşullara Alıştırma	42
5 SONUÇLAR	44
6 KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ	



AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Antalya Florasına Endemik Olan *Verbascum leptocladum*’un *in vitro* Çoğaltılması Üzerine Bir Araştırma” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

24/06/2024

Şerife ÜNNÜ

İmza

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C : Santigrat Derece

μ : Mikrometre

Cl : Klor

cm : Santimetre

N : Azot

O : Oksijen

α : Alfa

β : Beta

Kısaltmalar

μg/ml : Mikrogram/Mililitre

μM : Mikromolar

BA : Benzil Adenin

BAP : 6-Benzilaminopurin

GA₃ : Giberellik Asit

IAA : Indol Asetik Asit

IBA : Indol Bütirik Asit

Kin : Kinetin

LS : Linsmaier ve Skoog

mg/L : Miligram/Litre

MS : Murashige & Skoog

NAA : Naftalin Asetik Asit

NaOCl: Sodyum Hipoklorit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Verbascum leptocladum</i> 'un Türkiye'deki yayılışı (TUBIVES).....	4
Şekil 1.2. <i>Verbascum leptocladum</i> 'un genel görünümü	4
Şekil 1.3. <i>Verbascum leptocladum</i> 'un bitkisel özellikleri	5
Şekil 1.4. Antropejenik tahribat altındaki <i>Verbascum leptocladum</i> bitkisine ait farklı dönemlerdeki görüntüler (Akdeniz Üniversitesi Kampüsü)	7
Şekil 3.1. Doğal florasında <i>Verbascum leptocladum</i> bitkisi.....	21
Şekil 3.2. <i>Verbascum leptocladum</i> kapsülü ve tohumlarının Nikon SMSZ445 ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.....	22
Şekil 3.3. Yaprak eksplantları için kullanılan MS besin ortamındaki bitkicikler.....	22
Şekil 3.4. Sterilizasyon işleminin yapılması.....	24
Şekil 3.5. Steril kabinde tohum sterilizasyonu işlemi.....	25
Şekil 3.6. Tohumların yüzey sterilizasyonu	26
Şekil 3.7. <i>In vitro</i> gelişen yaprak eksplantlarının izole edilerek kültüre alınması.....	27
Şekil 3.8. Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi.....	28
Şekil 3.9. Aklimatizasyona alınmış bitkicikler (29.04.2024, Güney Agri Park).....	28
Şekil 4.1. Petri ve kavanozlardaki tohumların çimlenme durumları.....	31
Şekil 4.2. Fotoperiyotun <i>Verbascum l.</i> tohumlarının çimlenmesi üzerine etkisi.....	31
Şekil 4.3. 23.06.2023 tarihindeki Leica DM750 Işık Mikroskobu altındaki farklı ortamlara ait yaprak eksplantları görüntüler.....	37
Şekil 4.4 17.07.2023 tarihindeki Leica DM750 Işık Mikroskobu altındaki farklı ortamlara ait yaprak eksplantları görüntüler.....	38
Şekil 4.5 Kumpas yardımıyla farklı ortamlara ait bitkiciklerin ölçümü	38
Şekil 4.6 Eksplant başına elde edilen sürgün sayısına ait grafik.....	40
Şekil 4.7. Farklı ortamlara aktarılan bitkiciklerin köklenmeye karşı verdiği tepkiler....	42
Şekil 4.8. Farklı dönemlere ait aklimatizasyon işlemlerine ait görüntüler.....	43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. MS temel besi ortamının içeriği.....	23
Çizelge 3.2. Besin ortamları ve temsil ettiği kodlar.....	27
Çizelge 4.1. Tohumların yüzey sterilizasyonunda uygulanan yöntemler.....	30
Çizelge 4.2. Kullanılan ortamlardan elde edilen bulgular.....	39
Çizelge 4.3. Sürgün sayılarına ait Anova Varyans Analizi.....	40
Çizelge 4.4. Kullanılan farklı köklendirme ortamlarında kök gelişimi.....	41

1 GİRİŞ

Sekonder metabolitler, bitkilerin farklı morfolojik yapılarının birinde veya birkaçında ya da tamamında bulunan (kök, rizom, yaprak meyve ve çiçek) oldukça düşük miktarlarda sentezlenen, renk, tat ve koku gibi duyuşal özelliklerin oluşumunda büyük rol oynamasının yanında, bitkinin vektörlere karşı kendisini savunmasını da sağlayan ancak bitkinin yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için mutlak gerekli olmayan farmasötik açıdan ise oldukça önemli etkileri bulunan bileşiklerdir. Bu bileşiklere sahip olan bitkilere tıbbi ve aromatik bitkiler olarak adlandırılmaktadır.

Şifalı bitkiler olarak da bilinen tıbbi ve aromatik bitkiler, binlerce yıldır dünyanın dört bir yanındaki yerel topluluklarda şifa kaynağı olarak kullanılmıştır. Günümüzde dünya nüfusunun yaklaşık %85'i için birinci basamak sağlık hizmeti yöntemi olarak tıbbi ve aromatik bitkileri kullanılmaktadır (Shafi vd. 2021). Örneğin, halk arasında yaygın olarak "sığırkuyruğu" olarak bilinen *Verbascum* türlerinin yaprakları, çiçekleri ve tüm toprak üstü aksamaları geleneksel tıpta solunum yolu iltihaplarının tedavisinde, güçlü yara iyileştirici olarak, regl sancısı, romatizma ve kulak ağrılarını hafifletmede, hemoroid, akciğer hastalıkları ve diyabet tedavisinde, damar sertliğine karşı yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. (Baytop 1999; Başer 2015, Kahraman vd. 2010; Tuzlacı ve Küçük 1999; Küçük 2016). Tüm sentetik ilaçların %80'inin tıbbi ve aromatik bitkilerden türetildiği ve ilaçların keşfi için bir kaynak olarak çağdaş önemine devam etmektedir (Bauer ve Brönstrup 2014).

Dünya genelinde yaklaşık 400 bin bitki türü bulunmakta ve bunların 20 bini tıbbi amaçlarla kullanılmaktadır. Ülkemizde bulunan yaklaşık 2000 bitki türü tıbbi ve aromatik amaçlarla değerlendirilmekte ve bu bitkilerin 500 ile 1000'i geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Öztürk vd. 2012). Ayrıca, ülkemizdeki tıbbi ve aromatik bitkilerin neredeyse tamamı doğal ortamlarda yetişmekte olup, bunların sadece küçük bir kısmı kültüre alınmıştır. Türkiye iklimi, coğrafi konumu, bitki çeşitliliği, tarım potansiyeli ve tıbbi ve aromatik bitkiler üretimi için geniş yüzey alanı açısından büyük bir avantaja sahiptir. Üstelik Avrupa Birliği tıbbi ve aromatik bitkiler ticaretinde lider olan ülkelerin başında gelmektedir. Türkiye, üç fitocoğrafik bölgenin kesişme noktasında yer almakta olup, Güney Avrupa ile Güneybatı Asya tıbbi ve aromatik bitkiler florası arasında bir köprü konumundadır. (Pakdemirli vd. 2021). Türkiye'nin üç tarafı denizlerle çevrili olup orman, bozkır, kayalık, maki ve tuzlu bölgeler gibi farklı mikro iklim özelliklerine sahiptir. Türkiye'nin bitki zenginliği bu farklı jeolojik ve topografik özelliklerinden ve üç bölgenin kesişim noktasında olmasından kaynaklanmaktadır. Anadolu, tarihi gelişimi sürecinde göç yolları üzerinde yer almış ve pek çok uygarlığın barınağı olarak, bitki varyasyonunun artmasında ve gen kaynaklarının zenginleşmesinde önemli rol oynamıştır. Ayrıca, Anadolu dünyada kültüre alınan pek çok bitkinin de gen merkezidir. Türkiye'de bulunan yaklaşık 200 bitki türü, büyük ihracat potansiyeline sahiptir (Baytop 1999; Faydaoğlu ve Sürücüoğlu 2011).

Yunancada endomos kelimesinden gelen endemik sözcüğü, kısıtlı bir bölgede dağılım gösteren bitki gruplarını tanımlamaktadır. Endemik bitkiler kimi zaman metrekairelerle kimi zamanda kıtalara kadar uzanabildiğinden dolayı yayılış gösterdikleri alan, tam olarak kesin sınırlarla ifade edilememektedir. Uygulamada ise yalnızca belirli bir coğrafi bölge ya da daha sınırlı alanlarda yayılış gösteren bitkiler endemik olarak tanımlanmaktadır (Kaya ve Aksakal 2005). Endemik bitkiler bölgenin sınırına ve sınırlara bağlı olarak, bu türler yerel endemik, bölgesel endemik, ulusal endemik, bölgesel endemik ve kıtasal endemik olarak sınıflandırılabilir (Coelho ve Romano 2020).

Endemik türlerin dar yayılış göstermesinin iki temel sebebi vardır. Birinci sebep, jeolojik devirlerde geniş yayılışa sahip olan bitkiler çevre koşullarındaki değişimlerin sonucunda ortadan kalktığı düşünülmektedir. Konservatif endemik veya paloendemik olarak tanımlanan bu türler, hayatta kalabilmeyi özel ortam şartlarına sığınarak başarmış ve varlıklarını devam ettirebilmişlerdir. Diğer neden ise türlerin yeni oluşmasıdır; Neoendemik olarak tanımlanan bu türler henüz yayılış aşamasında oldukları için yayılış alanları kısıtlıdır. Örneğin Alp Dağları'nda *Daphne*, *Rhamnus*, *Salvia*, *Sideritis* ve *Verbascum* cinslerine ait birden fazla tür, bu tipteki endemikler arasında yer almaktadır. Neoendemikler yeni türleri ifade ederken Paloendemikler ise eski türleri ifade etmektedir (Seçmen 1996).

Türkiye florasında yetişen ve ikinci en büyük endemik türe sahip olan cins *Verbascum L.*'dir. Endemizm oranı yaklaşık olarak %80 olan *Verbascum L.* cinsinin, 255 türünün 200 tanesi endemiktir (Duman vd. 2020; Karavelioğulları vd. 2012; Güner ve Aslan 2012). Antalya florasında toplam 26 adet *Verbascum* türünün bulunmaktadır. Bu türlerden 19 tanesi Türkiye endemiği, 10 tanesinin ise Antalya iline endemik olduğu bilinmektedir (TUBİVES).

Scrophulariaceae familyasına ait olan *Verbascum L.* cinsinin (*Celsia L.* hariç) tüm dünyada yaklaşık 360 türü bulunmaktadır (Duman vd. 2020). Anadolu *Verbascum* türlerinin genel dağılım alanıdır fakat en yüksek yoğunluğa İran-Turan bölgesinde rastlanmaktadır (Ertem 2022).

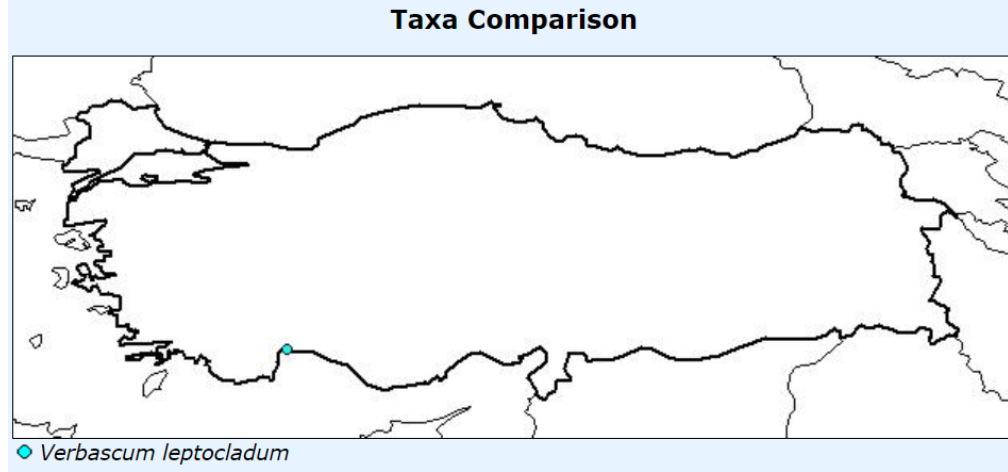
Verbascum cinsi, tohum morfolojisine ve yayılış alanlarına göre *Aulacospermae Murb.* ve *Bohtrospermae Murb.* olmak üzere iki seksiyona ayrılmıştır. Türkiye'deki tüm *Verbascum* taksonları ise *Bohtrospermae* seksiyonunda bulunmaktadır (Eyüboğlu 2022).

Verbascum cinsinin genel özellikleri şu şekildedir; bitkiler genellikle tek yıllık, iki yıllık veya çok yıllık otsu formdadır. Nadiren çalı formunda da bulunabilirler. Gövde yaprakları genellikle alternatif, ancak bazen karşılıklı, basit veya parçalı olabilir. Taban yaprakları genellikle rozet şeklindedir. Bitkinin tüylenme özellikleri değişkenlik

gösterebilir, tüysüz veya salgı tüylü olabilirler, ayrıca basit veya dallanmış tüy örtüsüne sahip olabilirler. Çiçekler genellikle tepede rasem, spika veya panikulada dizilmiştir. Çoğunlukla kaliks eşit olarak bölünmüştür. Korolla genellikle sarı renkte olup, bazen menekşe-mor, kahverengi, sarımsı ve mavimsi yeşil renkte olabilir; aktinomorf veya kısmen zigomorf olabilir. Stamen sayısı genellikle 4 veya 5 adettir, ancak bazen 4 adet fertil stamen ile 1 tanesi steril olabilmektedir. Flamentler genellikle sarımsı veya menekşe-mor renkte, ince-uzun ve yumuşaktır; bazen salgı tüylü, hepsi eşit veya alttaki iki anter daha uzun veya daha kalın olabilmektedir. Üst kısımda olan 2 veya 3 stamenin anterleri genellikle enine ortadan bağlı olmakla birlikte reniform yapıdadırlar. Aşağıda bulunan 2 anter, benzer veya daha uzun olabilir, aşağı doğru ilerleyebilir, asimetrik bağlanmış veya kısmen oblik olabilmektedir. Stilus, genellikle tek ve ipliksi şeklindedir. Stigma genellikle yarım küresel, oval veya spatül şeklindedir. Kapsüller genellikle septisit, küresel veya dikdörtgenimsi veya silindir biçimindedir. Tohumlar küçük ve çok sayıdadır, Türkiye'deki tohumlar genellikle obkonik prizmatik ve enine çukurludur. (Huber ve Morath 1978).

Verbascum cinsinin adı, Latince'de barba, yani 'sakal' kelimesinden türediği düşünülen *barbascum*'un bozulmuş bir şeklidir; bu ismin cinsin kaba ve tüylü görünümüne ithafen verildiği düşünülmektedir (Strange 1977).

Verbascum leptocladum Boiss. & Heldr. (*Scrophulariaceae*) 30-45 cm arasında boyunda, beyazımsı veya grimsi renkte, keçemsi tüylü, Antalya florasında endemik olan çok yıllık otsu bir bitkidir (Şekil 1.2). Gövde narin, dik veya yükseltici-dik, genellikle dallanmıştır. Taban yaprakları ise darca dikdörtgenimsi, 2-10 x 0,5 cm, dişli kenarlı veya tam kenarlı, uç kısmında sivri uçlu, yaprak sapı 1-4cm boyunda; gövde yaprakları taban yapraklarına benzer ancak daha küçüktür. Çiçek durumu geniş panikula 1-2-4 çiçeklidir. Brakteeler şeritsi- dikdörtgenimsi, uzun sivri uçludur. Çiçek sapı 5mm'ye kadar çıkar; brakteoller şeritsi-dikdörtgenimsidir. Kaliks 4-7mm çapında, loblar şeritsi-dikdörtgenimsidir. Korolla açık sarı canlı renkte, 16-22 mm çapında, salgısız, dış kısmında yıldızimsi tüyler bulunmaktadır. Stamenler 5 tane, anterler böbreksi, filamentler anterlere kadar beyaz-sarı yünümsü tüylüdür (Şekil 1.3). Kapsüller yumurtamsı-dikdörtgenimsidir. Rozet verme zamanı erken dönem mart ayı olmakla birlikte, koltuk altı tomurcuklanma dönemi nisan ayı; çiçeklenme, sapa kalkma ve tomurcuklanma dönemi ise mayıs ayı, kapsüllerin olgunlaşma zamanı temmuz ayı sonu olup hasat dönemi ise ağustos ayıdır. Yetiştirme ortamı deniz seviyesinden 250m'ye kadar olan yüksekliklerdeki Kızılçam Ormanları'dır. Heldreich tarafından Antalya'dan toplanan bu tür, 1853 yılında Boissier ve Heldreich tarafından bilim dünyasına tanıtılmıştır (Huber-Morath 1978).



Şekil 1.1. *Verbascum leptocladum* 'un Türkiye'deki yayılımı (TUBİVES)eki



Şekil.1.2. *Verbascum leptocladum*'un genel görünümü (Akdeniz Üniversitesi Kampüsü)

Verbascum leptocladum Kızılcım ormanı (*Pinus Brutia*) altında, 0-250 metre arasında arasındaki yüksekliklerde varlığını sürdürmektedir. Çiçeklenme zamanı haziran ve temmuz aylarıdır. Bulunduğu element ise Doğu Akdeniz elementidir (TUBİVES).



a



b



c

Şekil 1.3. *Verbascum leptocladum*'un bitkisel özellikleri **a)** Çiçeklenme dönemi, Mayıs ilk haftası; **b)** taç yaprak ve stamenler; **c)** erken dönem rozet verme zamanı, Mart Ayı 2024 (Akdeniz Üniversitesi Kampüsü)

Verbascum, yaygın olarak bilinen adıyla sıgırkuyruğu, geleneksel tıp ve bitkisel tedavide uzun süredir çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. Bu hastalıkları şöyle sıralayabiliriz; astım, solunum yolu rahatsızlıkları, hemoroit ve saç dökülmesi gibi rahatsızlıkların yanı sıra mantar enfeksiyonları, cilt yaraları, romatizmal ağrılar, ishal, lenfositik lösemi ve A2 ve B grip virüsleri gibi hastalıklara karşı da etkili olduğu araştırmalarla belirtilmektedir. Yapılan çalışmalar, sıgırkuyruğunun güçlü bir anti-enflamatuvar etkiye sahip olduğunu ve çiçeklerinin antiviral özellikler sergilediğini göstermektedir (Sener ve Dulger 2009).

Verbascum L. türlerinin yaprak ve çiçeklerinin drog olarak kullanımı Asya, Avrupa, Afrika ve Kuzey Amerika'daki birçok toplumda belgelenmiştir. Bu türler yüzyıllardır geleneksel halk hekimliğinde bronşit, tüberküloz, astım ve farklı iltihaplar gibi çok çeşitli insan hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bazı *Verbascum* türlerinin bronşit, kuru öksürük, boğmaca, kronik öksürük, tüberküloz ve astım gibi solunum problemlerinin tedavisinde tıbbi kullanımları geleneksel olarak rapor edilmiştir. Ayrıca cilt, akciğer, uyarılmış gastrointestinal sistem, trakea, karın ve bağırsak hastalıklarını, iltihaplanmayı, migren kaynaklı baş ağrılarını tedavi etmek için de kullanılmıştır. Özellikle bazı *Verbascum* türleri olan *Verbascum phlomoides L.*, *Verbascum densiflorum Bertol.*, *Verbascum thapsus L.* ve bu türlerle aynı grupta olan diğer türler terletici, balgam atırıcı, idrar arttırıcı ve göğüs yumuşatıcı olarak kullanılmaktadır. Müsilaj, saponin, uçucu yağ, flavon glikozitler, rezin ve acı madde içermektedir. Sadece insan sağlığında değil, içerdikleri saponin bileşiğinden dolayı balık tutmak için de yararlanılmaktadır (Baytop 1999; Tatlı ve Akdemir, 2006; Selseleh vd. 2020).

Sıgırkuyruğu türleri sekonder metabolitler açısından oldukça zengindir. Bu metabolitlerden bazıları şunlardır: saponinler, iridoitler ve feniletanoid glikozitler, neolignan ve monoteren glikozitler, fenolik ve yağ asitleri, spermin alkaloidleri, steroidler ve flavanoidler gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin kaynaklarıdır. Bu alkaloidlerin içinde en çok önemli olanlar; apigenin, verbaskosit, ajugol, katalpol, ökubin, saponin A ve C'dir (Tatlı ve Akdemir 2004).

Verbascum leptocladum Boiss. & Heldr., *Verbascum davisianum* Hub.-Mor., *Verbascum mucronatum* Lam., ve *Verbascum wiedemannianum* Fisch. & Mey. türlerinin alerjilere karşı antihistaminik, mantarlara karşı antifungal, bakterilere karşı antibakteriyal ve serbest radikallere karşı antioksidan etkileri, farmakolojik çalışmalar yoluyla tanımlanmıştır (Küçük 2016).

Sığırkuyruğu preparatları, 19. yüzyılın sonlarında Avrupa, İngiltere ve Amerika'da verem hastalarına yönelik göğüs yumuşatıcı olarak kullanılmıştır. Günümüzde ise aynı amaçla sığır kuyruğu hala kullanılmaktadır. Ayrıca, kronik orta kulak iltihabı (Otitis media) ve kulak egzamasında da tercih edilmektedir. Almanya'da, E Komisyonu monografları arasında yer alır ve Alman İlaç Kodeksi'nde kayıtlıdır. Alman pediatrik tıbbında, sığırkuyruğu çiçeği çocuklarda balgamlı öksürük (üreten öksürük) tedavisinde kullanılan çayların bileşiminde bulunur (Başer 2015).

Sığırkuyruğu türü olan ve mullein olarak adlandırılan *Verbascum thapsus*, antik çağlardan beri tıbbi amaçlarla kullanılmıştır. Ancak, ticari popülaritesi ve talebi son yıllarda artmıştır. Günümüzde, ABD'deki aktarlarda bu bitkinin drogları, kapsülleri, alkol ekstraktları ve çiçeğinin yağı kolayca temin edilebilmektedir. Bitkinin yaprakları, bazen normal bir tütün piposunda sigara gibi içilerek, solunum mukozasının tahrişini hafifletmek için kullanılır ve verem hastalığının öksürüğünü kontrol altına alabilir. Yapraklarının astım ve spazmodik öksürükler için sigara yapıldığında fayda sağladığı da belirtilmiştir. Çiçeklerinin bir şişeye konması ve güneşte bırakılması, hemoroid tedavisi için değerli bir yağlı madde üretebilir. Yaprakları, uygulanan fomentasyonlar ve poultislerle hemoroid şikayetlerinde faydalı olmuştur. Ayrıca yaprakları kaynatılarak kalp uyarıcı olarak da kullanılmıştır. Avrupa'da, mullein çiçeklerinin kaba tüylerinden ayrılarak süzülen infüzyonun, hafif burun akıntıları ve kolik için evde kullanılan bir tedavi yöntemi olduğu bildirilmiştir. Çiçeklerinin zeytinyağında uzun süre güneşte bırakılması veya ateşe yakın tutularak elde edilen yağ, Almanya'nın kırsal bölgelerinde hemoroid ve diğer mukoza zarı iltihapları için kullanılmıştır, ayrıca donma ve morluklar için de etkilidir. Çiçeklerinin reçeli ayrıca mantar tedavisinde kullanılmıştır ve çiçeklerin damıtılmış suyu uzun süre yanıklar ve erizipel için bir tedavi yöntemi olduğu söylenmiştir. Köklerin kaynatılması, ateş düşürücü olarak diş ağrısını ve migren nöbetlerini hafifletmek için kullanılmıştır. Bitkinin suyu ve kurutulmuş köklerden yapılan toz, kabalaşmış sigillerin hızla kaybolmasına yardımcı olmaktadır. Bitkinin yağı, kulak ağrısı, akıntı ve dış kulak ve kanalının egzaması için önerilir. Ayrıca hastalık mikroplarını yok edici özelliklere sahip olduğu söylenmektedir. Zeytinyağında 21 gün bekletilen taze çiçeklerin etkili bir bakterisit olduğu söylenmektedir. Alkol tentürü, taze ot ile alkolün uzun süreli migren veya kulak baskısı ile baş ağrısını hafifletmede etkili olduğu kanıtlanmıştır. Nitekim tohumlarının zehirli olduğu ve bu hazırlıklarda kullanılmaması gerektiği vurgulanmıştır (Turker ve Gurel 2005).

Dünya çapında türlerin korunma durumuyla ilgili en önemli bilgi kaynağı, IUCN (Uluslararası Doğa Bitki Koruma Derneği) Kırmızı Liste'sinde yer almaktadır. Verilen son verilere göre, şimdiye kadar değerlendirilen 38,630 türün içinde, tanımlanan 422,683 türden 15,774 bitki türü tehdit altındadır. Dünya üzerinde biyolojik çeşitliliğin en yoğun olduğu, aynı zamanda en tehlikede olan alanları Küresel Biyoçeşitlilik Sıcak Noktalarını tanımlamaktadır. Bu alanlar, özellikle yüksek endemizm seviyelerine ve ekosistemlerin hızla yok olma tehditlerine sahiptir. Birçok bitki türü (%75'ten fazlası), 35 Küresel Biyoçeşitlilik Sıcak Noktasına endemiktir ve bu bölgelere yönelik koruma

çabaları, bu benzersiz türlerin kaybını önemli ölçüde azaltmaya katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Coelho ve Romano 2020)

IUCN (Uluslararası Doğa Bitki Koruma Birliği) tarafından Antalya florasında endemik ve çok yıllık olan *V. leptocladum* türü “Tehdit Altındaki Bitki Türleri” listesinde “Tehlike Altında” (EN) olarak raporlanmıştır (Ekim ve ark. 2000).

Ülkemiz bitkilerinin IUCN (Uluslararası Doğa Bitki Koruma Birliği) sınıflandırılmasını kapsayan Red Data Book 2000 yılındaki yayınlanmış raporda, bu eserde 13 kadar bitki türünün geçen yüzyıl içinde toplandıkları halde Prof.Dr. Latif KURT tarafından yapılan araştırmalarla daha sonra bulunamadıkları ve bu nedenle nesillerinin tükenmiş olduğu belirtilmiştir (Yiğit ve Kurt 2024).

Endemik bitki türleri antropojenik tehditlere ve iklimsel değişikliklere karşı daha savunmasız oldukları için daha yüksek nesli tükenme tehlikesine sahiptirler (Şekil 1.4). Böyle olmasının nedeni endemik türlerin sınırlı bir dağılıma, küçük bir popülasyona, kısa üreme kapasiteleri sahip olduklarından dolayı dengeli ve sabit habitat koşullarına ihtiyaç duymalarından ve kaynaklanmaktadır. İnsanlar tarafından aşırı ve bilinçsizce bir şekilde toplanmaları da nesli tükenme tehlikesini artırmaktadır. Bu yüzden yalnızca yerinde koruma önlemleri alınması yeterli olmamakla birlikte, dünya çapında bu türlerin korunması endişe kaynağı oluşturmaktadır. *Ex situ* korunma önlemleri, bu türlerin korunması için alınması gereken tedbirlerden bir tanesidir. Tohum bankacılığı biyolojik çeşitliliğin korunması ve bitki türlerinin sürdürülebilirliğin sağlanması açısından etkin bir yöntemdir ancak maliyeti fazladır. Biyoteknolojik araçlar bu konuda yeni alternatif yaklaşımlar ile tamamlayıcı kısa orta uzun vadeli stratejili seçenekler sunmaktadır. Son yıllarda bitki türlerinin korunmasında uygulamaları önemli ölçüde artmıştır (Coelho ve Romano 2020).



a



b

Şekil 1.4. Antropejenik tahribat altındaki *Verbascum leptocladum* bitkisine ait farklı dönemlerdeki görüntüler (Akdeniz Üniversitesi Kampüsü) **a)** 23.05.2024; **b)** 21.09.2023

Ülkelerdeki gen kaynaklarının korunabilmesi, bitkisel çeşitliliğin muhafaza edilebilmesine bağlıdır. Bu bitkisel çeşitliliğin önemli bir unsuru olan endemik türlerin muhafaza edilebilmesi içinde, mevcut gen kaynaklarının korunabilmesi gerekir. Genetik çeşitliliğin muhafazası ise, bitkinin bir parçası ya da tüm bitkinin canlı ve sağlıklı tutulması ile sağlanabilmektedir. Özellikle, vejetatif ve generatif yollarla çoğaltılamayan, genetik bakımından değerli materyaller yapay ortamlarda saklanması gerekmektedir (Şehirli 1987). Bitki doku kültürü ıslah çalışmaları, genetik araştırmalar ve biyoteknolojik uygulamalar gibi çeşitli hedefler için gereken bitkisel materyalin üretimi, koruma amaçlı en önemli tekniklerden biri olarak kabul edilir (Endress 1994).

In vitro üretim olarak da adlandırılan bitki doku kültürü tekniği, geleneksel üretim metotlarına alternatif olarak etkili bir seçenek olarak kabul edilir, çünkü kısa bir süre içinde ve sınırlı bir alanda birçok bitkinin yeniden kazanılmasına ve üreme materyalinin taşınmasının kolaylaştırılmasına, bitki materyalin değerlendirilmesi ve güvenli bir şekilde saklanmasına olanak tanımaktadır. Bu özellikle ender ve tehlikede olan türler ve geleneksel tekniklerle veya yavaş üreme oranlarıyla zor çoğaltılan bitkiler için yararlıdır. Bu tekniğin bir diğer avantajı, ana bitkiden başlangıç bitki materyalinin küçük miktarlarının yeterli olmasıdır, bu da doğal habitat alanları üzerinde az etkiyle büyük ölçekte üretme imkânı sağlamaktadır. Dış ortamda yetiştirilen bitkilerin kullanımı, tehdit altındaki türlerin veya popülasyonların soyunun tükenme riskini azaltmanın etkili bir yöntemidir. Dolayısıyla, etkili üreme protokollerinin geliştirilmesi, koruma programlarında temel bir adımdır. *In vitro* kültür, ender ve tehlikede olan bitkilerin genetik materyalinin kısa bir dönemde aktif büyümelerini ve korunmasını sağlar. Bu durum bitkilerin doğrudan üretilmesi için temel bir adım olmakla birlikte, orta- (yavaş büyüme) ve uzun dönem (kriyoprezervasyon) koruma tekniklerinin uygulanmasında da önemlidir (Engelman 2011). Mikroçoğaltım tekniği, tıbbi ve aromatik bitkilerin *in vitro* üretiminde yüksek rejenerasyon imkânı sunması nedeniyle önemli genotip ve kemotiplerin çoğaltımı için kullanılan son derece kıymetli bir tekniktir (Emek 2018).

Doğada hasara uğramış bitkilerin hasarlı dokularında yaygın olarak kallus oluşumu görülmektedir. Kallus dokusunun oluşmasının kaynağı, bitkilerin yara almış dokularında yer alan parankimatik hücrelerin düzensiz yığınlar oluşturarak çoğalma yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Bitki doku kültürü içerisinde yer alan ve popüler bir teknik olan kallus kültüründe bitkilerin bu yeteneklerinden faydalanılmaktadır. Bu yöntem, *in vitro* koşullarda bitki dokularında yaralar oluşturarak hücrelerin farklılaşmasına teşvik edilmektedir. Kallus kültürü, tıbbi öneme sahip bitki türlerinin sekonder metabolitlerinin üretiminde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca bitkilerin rejenerasyon potansiyelini araştırmak veya bitki genetiği ve biyoteknoloji çalışmalarında kullanılmaktadır (Babich vd. 2020).

Dünya biyoloji ve koruma bilimcilerinin karşı karşıya olduğu üçlü bir zorluk vardır: mevcut biyolojik çeşitliliği sınıflandırmak; ekosistem, habitat, tür ve gen kaybının hızını durdurmak ve sürekli artan insan nüfusunu beslemektir. Genellikle, şu anda korkunç bir bitki genetik çeşitliliği kaybının yaşandığı kabul edilmektedir: türler, gen kombinasyonları ve aleller sonsuza dek kaybolmakta ve bu genetik erozyon sürecinin gelecekte daha da ciddi hale gelme olasılığı bulunmaktadır. Bitki çeşitliliğinin korunması, insanlara doğrudan faydalar sağlayabilecek yeni tarımsal ve kültür bitkilerinin geliştirilmesi, tıbbi ilaçların geliştirilmesi ve doğal ekosistemlerin

işleyişinde bitkilerin oynadığı belirleyici rol nedeniyle hayati öneme sahiptir. Hızlı nüfus artışıyla birlikte kararlı bir bitki çeşitliliği kaybının ekonomik, siyasi ve sosyal sonuçları kontrol edilmezse yıkıcı olabileceği düşünülmektedir. Bu konuların insanlık için önemi, Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi'nin (UNCED 1992) amaçlarına ilişkin 1. Maddede vurgulanmaktadır: Bu sözleşmenin amaçları şunlardır; biyolojik çeşitliliğin korunması, elde edilen unsurların sürdürülebilir kullanımı ve genetik kaynakların kullanımından doğan faydaların adil ve eşit paylaşımıdır (Hawkes 1997).

Bu kapsamda, bu tezin amacı IUCN Red listesinde yer alan, nesli tükenme tehlikesi olup risk grubunda olan sadece Antalya doğal florasında yetişen *Verbascum leptocladum* için çimlendirme, sterilizasyon protokolü geliştirilerek gelecekteki fizyolojik ve biyokimyasal çalışmalar için bitki materyali sağlanacak bir *in vitro* kültür protokolü oluşturmayı hedeflemektedir. Yapılacak çalışma başarılı olursa *V. leptocladum*'un doku kültürü yöntemiyle tohumla ve zamana bağlı kalmadan, steril koşullarda, genetik yapıları korunarak daha sağlıklı ve hızlı yetiştirilmesi tıbbi ve ticari potansiyeli olan *V. leptocladum*'un üretim sürecinin hızlandırılarak ekonomiye kazandırılması, neslinin korunmasına katkı sağlanacaktır.

2 KAYNAK TARAMASI

2.1. Nesli Tükenme Tehlikesi Bulunan Endemik Bitkilerde Yapılan *in vitro* Mikroçoğaltma Çalışmalarının Bazıları

Benson vd. (2000) tarafından yürütülen bir çalışmada, İskoçya'nın kuzeyinde nadir endemik ve nesli tükenme tehlikesi bulunan *Primula scotica* için basit bir mikroçoğaltma yöntemi rapor etmişlerdir. Sterilize edilmiş tohumların hormon içermeyen Murashige ve Skoog (MS) ortamında çimlendirmişlerdir. Çimlenen fideleri, mikroçoğaltma için modifiye edilmiş MS ortamına (Smith, 1992) transfer edilmiştir. Bu ortam, 0.2 mg l⁻¹ 6-benzil amino purin (BAP) ve indol asetik asit (IAA), 20 g/l sukroz ve 7 g/l agar ile desteklenmiştir. Mikroçoğaltılmış bitkiler, ventilli SunCap kapaklı cam kavanozlarında muhafaza edilmiştir. Bitkisel büyüme düzenleyicisi içeren ortamda yetiştirilen bitkiler için ortalama çoğalma oranları 4-6 olarak elde edilmiştir. Mikroçoğaltma yöntemini, *P. scotica*'nın dört farklı klonuna uygulamışlar ve klonal farklılıklar gözlemlenmiştir. Bazı bitkiler hiperhidriklik (dokuların aşırı su toplaması) göstermiş, ancak bu sorunu sık alt kültürleme aralıkları ve hormon içermeyen ortama aktarım ile çözmüşlerdir. Daha sonra kültürlerde kallus oluşmamış ve gelişim sadece sürgün ve kök üretimi yoluyla devam etmiştir. *In vitro* yetiştirilen bitkiler *ex vitro* koşullara aktarılmış ve mikroçoğaltımı yapılan *P. scotica* bitkilerinin doğal habitatlara yeniden transferi için uzun vadeli stratejiler geliştirmişlerdir. Buldukları bu basit yöntemle, diğer tehlike altındaki *Primula* türlerine de uygulanabilir potansiyele sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Rathore vd. (2004) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Balanites aegyptiaca* (*Balanitaceae*) olarak bilinen *Hingota*, *Citrus limon* (*Rutaceae*) olarak bilinen *Nimbu* ve *Syzygium cuminii* (*Myrtaceae*) olarak bilinen *Jamun* gibi olgun ağaçların klonlanması için mikroçoğaltma protokolleri geliştirilmişlerdir. Ana ağaçları kış mevsiminde budayarak duyarlı nodal eksplantlar elde etmişlerdir. Bu eksplantları, MS ortamı ve 0.45 µM BAP besin ortamında kültüre alarak aksiller meristemlerin *in vitro* olarak aktive edilmesiyle birden fazla sürgün üretmişlerdir. Daha sonra sürgünlerin kültürde çoğaltılması için çeşitli yöntemler uygulamışlardır. Elde edilen klonlar hem *in vitro* hem de *ex vitro* koşullarda köklendirmiş ve başarıyla doğal ortama aktarılmışlardır. Yürüttükleri bu çalışmayla, seçilmiş klonların kitlesel çoğaltılmasını ve bu türlerin genetik olarak iyileştirilmesini sağlamışlardır.

Almeida vd. (2005) tarafından yürütülen bir çalışmada, Güney İber Yarımadası'nda Tersiyer mirası olarak kabul edilen ve nesli tükenme tehlikesi altında olan endemik tür *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum*'un *in vitro* çoğaltılması başarıyla gerçekleştirmişlerdir. Apikal sürgünler ve nodal segmentlerden alınan eksplantlardan sürgün çoğalması üzerinde farklı sitokin: IAA oranları ve çeşitli zeatin konsantrasyonlarının etkisini incelemişlerdir. Sitokin türü ve eksplantın kökeni, sürgün çoğalması üzerinde etkili faktörler olarak belirlemişlerdir. En yüksek sürgün çoğalma oranları, zeatin ile zenginleştirilmiş ortamda tek nodal eksplantlardan elde etmişlerdir. Zeatin konsantrasyonunun artması, sürgün çoğalmasını artırmış ancak bu etki yüksek zeatin konsantrasyonlarında azalttığını gözlemlenmiştir. Sürgün büyümesi apikal sürgünlerde daha belirgin olmuş ve oksin varlığı bu büyümeyi artırmamıştır. *In vitro* köklendirme için uygun prosedürler belirlenmiş ve en iyi sonuçlar, Anderson'ın modifiye edilmiş yarım makrosalt içeren ortamda elde etmişlerdir. Sürgünlerin *ex vitro*

köklendirilmesi en yüksek köklendirme ve hayatta kalma oranlarını sağlamıştır. Sonuç olarak, bu çalışmanın mikroçoğaltmayla üretilen bitkileri, doğal habitatlarına yeniden aktarılmışlar ve bu tür için mikroçoğaltma protokolünü başarıyla geliştirmişlerdir.

Nasırcılar vd. (2011) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Hyacinthaceae* familyasına ait endemik ve nesli tükenmekte olan *Muscari mirum Speta* bitkisinin *in vitro* üreme protokolü geliştirilmişlerdir. Çeşitli eksplantları (soğan pulpu, sap, yaprak ve olgunlaşmamış embriyo) farklı besin ortamlarında yetiştirmişler ve BAP, NAA, TDZ, Pikloram, 2,4-D içeren besin ortamlarına aktararak incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuçlara göre, soğan pulpu eksplantlarının en etkili olduğunu göstermiş ve en yüksek besin ortamı veriminin Murashige ve Skoog (MS) besin ortamında 4 mg L⁻¹ BAP ve 0.25 mg L⁻¹ NAA kullanılarak elde etmişlerdir. Köklenmiş soğan fideleri uygun bir saksı karışımına aktarmışlar ve *in vitro* dan elde edilen soğan fidelerinin kromozom sayısının diploid olduğunu saptamışlardır. Elde ettikleri bulgular, *Muscari mirum Speta*'nın korunması ve üretimi için önemli bir katkı sağlamıştır.

Cristea vd. (2013) tarafından yürütülen bir çalışmada, Romanya'da endemik ve nesli tükenme tehlikesinde olan *Dianthus spiculifolius Schur* bitkisi iki farklı popülasyondan toplayarak *in vitro* kültür teknikleri kullanılarak korumaya almışlardır. Bu bağlamda bitkinin büyüme uçlarından sürgün eksplantları kullanmışlardır. *In vitro* kültür sürecinde sterilizasyon, çoğaltma ve aklimatizasyon adımları başarıyla uygulanmış ve bitkilerin sağlıklı bir şekilde yetiştirilmesi için protokoller geliştirerek bitkiyi koruma altına almışlardır.

Patel vd. (2014) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Asclepiadaceae* familyasına ait, Thar Çölü'nün aşırı kurak bölgelerinde yetişen ve antioksidanlar bakımından zengin olan nesli tükenme tehlikesi bulunan endemik *Caralluma edulis (Edgew.) Benth. & Hook.* bitkisinin çoğaltılıp ve korunması amacıyla yürütmüşlerdir. Bitkini düğüm veya tomurcuğundan alınan nodal segment eksplantları kullanmışlardır. Sürgünlerin çoğalması için en iyi sonuçlar Murashige ve Skoog (MS) ortamında 0.5 mg l⁻¹ BA + 0.5 mg l⁻¹ Kn + 0.1 mg l⁻¹ NAA ile elde etmişlerdir. Köklenmiş fideleri hem *in vitro* hem de *ex vitro* koşullarda başarıyla çoğaltmışlardır. Bu protokol, yenilebilir, endemik ve nesli tükenme tehlikesinde olan bitkinin büyük ölçekli çoğaltılması ve germplazm korunması için etkili bir yöntem olarak geliştirmişlerdir.

Çetin vd. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada, nesli kritik düzeyde tükenme tehlikesi bulunan, endemik *Erodium somanum*, bitkisinin *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım potansiyelini araştırmışlardır. Yüzey sterilizasyon protokolünde *E. somanum* tohumlarına %70 etil alkol konsantrasyonunda 3 dk, %10 ticari çamaşır suyu içerisinde 5 dk uygulanarak steril bitkileri başarıyla elde etmişlerdir. *In vitro* koşullarda çimlendirilen tohumlardan elde edilen bitkiciklerden izole edilerek alınan yaprak eksplantları sürgün rejenerasyonu geliştirmeleri için BAP ile kombine edilmiş IBA ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren 8 farklı MS besin ortamında kültüre almışlardır. Araştırmalarının sonucunda elde ettikleri verilere göre, en başarılı sürgün gelişimleri, yaprak eksplantlarında 1 mg/L BAP ile 0,1 mg/L IBA içeren MS ortamında ve sürgün ucu eksplantlarında 2 mg/L BAP- 1 mg/L IAA içeren MS besin ortamında olduğunu saptamışlardır.

Emek (2018) tarafından yürütülen çalışmada nesli kritik düzeyde tehlikede olan, tıbbi endemik *Micromeria dolichodon* P.H. Davis türünün *in vitro* koltuk altı sürgün yoluyla çoğaltma protokolünü geliştirmiştir. *In vitro* şartlar altında elde edilen bitkiciklerden alınan koltuk altı tomurcukları eksplant olarak kullanılmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyonu için; %50'lik etil alkolde 1 dakika, 3-4 damla Tween 20 ile %2,5'lik sodyum hipoklorit konsantrasyonunda 5dk muamele edilerek başarılı bir sterilizasyon protokolü geliştirilmiştir. Elde edilen eksplantları farklı tip ve konsantrasyonda sitokinin (BA, KIN veya TDZ) içeren ve kontrol olarak herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen Murashige ile Skoog (MS) besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. En yüksek sürgün gelişimi 0,1 mg/L BA (benzil adenin) ilaveli MS ortamında elde etmiştir. Daha sonra ise elde edilen sürgünleri köklenmeleri için farklı tip ve konsantrasyonda oksin (IBA veya IAA) içeren ve herhangi bir bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen ½ MS ortamına aktarmışlardır. En yüksek kök oluşumunu 0.5 mgL⁻¹ IBA içeren ½ MS ortamında elde etmiştir.

2.2. *Verbascum* Cinsi ile İlgili Yapılan Çalışmalar

Baytop (1999) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum densiflorum* ve *Verbascum thapsus* türleri ile bunlarla aynı grupta bulunan türlerin çiçek aksamlarından flos verbasci infüzyon eldesinin göğsü yumuşatıp balgam söktürücü etkisinin olduğunu saptamışlardır. Çalışmanın devamında *Verbascum* türlerinin regl sancısını, kulak ve romatizma ağrılarını giderici, hemoroide karşı, şeker ve akciğer rahatsızlıklarında, hayvan yaralarının tedavisinde ve damar sertliğinin tedavisinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Aboutabl vd. (1999) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Verbascum thapsus* yaprağından elde edilen oligosakkaridler elde ederek, kolesterol düzeyine etkisini araştırmak için fareler üzerinde deney yapmışlardır. Kolesterol düzeyinin azaltılması deneyinde elde ettikleri sonuca göre: *Verbascum thapsus*'un, hiperlipidemide kolesterol ve trigliserid etkilerini büyük ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

Turker vd. (2001) tarafından yürütülen çalışmada, *Verbascum thapsus* bitkisi için *in vitro* kültür protokolü geliştirmek amacıyla bir araştırma yapmışlardır. Çalışmada, yaprak diskleri, yaprak sapı (petiyol) ve kök gibi eksplantları kullanmışlardır. Yüzey sterilizasyonu için eksplantları 20 dakika boyunca %95'lik alkol ardından üç damla Tween 20 içeren %20 Clorox (1.05% sodyum hipoklorit) içinde 20 dakika boyunca dezenfekte etmişlerdir. Ardından benzil adenin (BA) veya kinetin ile Murashige ve Skoog (MSM0) içeren ortama aktarmışlardır. En iyi sürgün çoğalması, yaprak diskleri ve petiyol eksplantlarından 13,32 µM BA ile elde edilmiştir. Yaprak diskleri, 13,32 µM BA ile naftalen asetik asit (NAA) ya da 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren MSMO ortamında kültüre almışlardır. Elde ettikleri verilere göre 13,32 µM BA ve 5,37 µM NAA kombinasyonunun daha fazla sürgün gelişimi sağladığını saptamışlardır. Sürgünleri, farklı NAA ve 2,4-D seviyeleri içeren köklenme ortamlarına aktarmışlar ve bu sürgünlerin 5,37 µM NAA içeren ortamlarda kök oluştuğunu saptamışlardır. Son olarak, bitkileri serada aklimatizasyona almışlardır. Araştırmacılar *Verbascum thapsus*'un *in vitro* kültür protokolünü başarıyla gerçekleştirmişlerdir.

Çalış vd. (2001) tarafından yürütülen bir çalışmada, İç Anadolu'nun kuzeyinde geniş bir yayılış alanına sahip olan endemik *Verbascum wiedemannianum*'un yer altı ve yer üstü aksamalarını hasata uygun bir şekilde toplayarak diğer *Verbascum* türleriyle karşılaştırmalı bir şekilde incelemişler ve ayrıca kök aksamından yapılan metanol ekstresinde radikal süpürücü etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Karamian ve Ghasemlou (2012), tarafından yürütülen bir çalışmada Bir çalışmada, *Verbascum speciosum* Schard. Bitkisinin olgun embriyo eksplantları kullanılarak organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla bitki rejenerasyonunu geliştirmişlerdir..Bitkilerin sterilizasyonu eksplantları musluk suyu ile yıkamışlar, ardından %70'lik alkol ve %5 sodyum hipoklorit ile 15 dakika yüzey sterilizasyonu yapmışlardır. İki tür kallus (embriyogenik ve embriyogenik olmayan), Murashige ve Skoog (MS) ortamında farklı konsantrasyonlarda benzil adenin (BA) ve α -naftalen asetik asit (NAA) eklenerek indüklemişlerdir. Embriyogenik kalluslar, 0.1 mg/L 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 0.5 mg/L kömür içeren MS ortamında en iyi şekilde çoğalma göstermiştir. Somatik embriyolar, hormonsuz MS ortamında olgunlaşıp sürgün rejenerasyonu sağlamıştır. Ayrıca, embriyogenik olmayan kalluslardan sürgün ve kökler, NAA ve BA içeren veya hormonsuz MS ortamında rejenerasyon gösterdiğini bildirmişlerdir.

Karamian ve Ghasemlou (2014), tarafından yürütülen çalışmada olgun embriyo kültürü ile organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla *Verbascum sinuatum* L.'de bitki rejenerasyonu sağlayan bir protokol geliştirmeyi başarmışlardır. Olgun embriyolardan embriyojenik ve embriyojenik olmayan kalluslar, farklı benzil adenin (BA) ve naftalin asetik asit (NAA) konsantrasyonları ile Murashige ve Skoog (MS) besin ortamına aktarmışlardır. Somatik embriyoların çoğaltılması ve sürgün tomurcuklarının farklılaşması için embriyonik kalluslar, MS ortamına 30 g/l sukroz, 0,5 mg l⁻¹ kömür ve 0.1 veya 1 mg l⁻¹ 2,4 diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) veya 60 g l⁻¹ sukroz, 50 mg l⁻¹ kazein hidrolizat (KH), 0,5 mg l⁻¹ kinetin (Kin), 5 mg l⁻¹ 2,4-D ve 0.5 mg l⁻¹ aktif karbon içeren ortamlara aktarmışlardır. Sürgün çoğaltma ve bitki rejenerasyonu için sürgünleri MS ortamına 1 mg l⁻¹ BA veya Kin içeren ortama aktarmışlardır. Araştırma sonucunda, BA veya Kin içeren kültürlerin, çoklu sürgün rejenerasyonu ve bitki yenilenmesi açısından daha etkili olduklarını kanıtlamışlardır. Sonuç olarak, çalışma *Verbascum sinuatum* bitkisinin doku kültürü yöntemleriyle bitki rejenerasyonunu anlamak için önemli bir adım olmuştur.

Stanilova vd. (2015) tarafından yürütülen bir çalışmada, Bulgaristan'ın endemik ve kritik tehlike altında olan *Verbascum davidoffii* Murb. türünü korumak için *in vitro* çoğaltma ve *ex situ* koruma protokolleri geliştirilmiştir. Tohumlar, standart laboratuvar prosedürü ile dezenfekte edilip, gibberellik asit çözeltisiyle muamele etmişlerdir. Çimlenme oranı, temel MS ortamında düşük iken, gibberellik asit ve düşük sıcaklıkta stratifikasyon uygulamalarıyla artırmışlardır. *In vitro* fideleri, toprak karışımı, kum ve hindistancevizi lifi içeren substrata ekmişler ve kontrollü fitotron ortamında *ex vitro* adaptasyonunu sağlamışlardır. Bu korunma değeri yüksek türü korumak amacıyla, *in vitro* çoğaltma için spesifik bir protokol geliştirilmiştir.

Nofouzi (2015) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Verbascum speciosum*'un yer üstü aksamlarından elde edilen metanol ekstresinin antioksidan ve antifungal etkilerini belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bitki ekstresinin toplam fenol ve flavonoid

içeriği ile antioksidan aktivitesini, Folin-Ciocalteu ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürme testleri kullanılarak belirlemiştir. Yaprakların toplam fenol ve flavonoid içeriği sırasıyla $82 \pm 6,43$ mg GAE/g ekstrakt ve 30.79 ± 0.5 mg RE/g ekstrakt olarak belirlenmiştir. Ekstrakt, 32.35 µg/ml IC50 değeri ile önemli derecede radikal süpürme aktivitesi gösterdiğini saptamıştır. Metanolik ekstraktı bazı fungal suşlarına karşı antifungal aktivitesi için incelemiştir. En yüksek *in vitro* antifungal aktivitelerin *C. parapsilosis* ve *Alternaria*'ya karşı olduğunu göstermiştir. Ancak, farklı fungal türler arasında önemli farklılıklar bulunmamıştır. Bu sonuçlar, bu metanolik ekstraktın yüksek antifungal özelliklere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda *Verbascum speciosum*'un ektresinin, fungal enfeksiyonların tedavisi veya patojenik ve toksijenik mikroorganizmalara karşı gıdaların korunması için etkili bir alternatif tedavi olarak kullanılabileceğini ileri sürmüştür.

Mihailović vd. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Verbascum nigrum*, *Verbascum phlomoides* ve *Verbascum thapsus* metanol ve su ekstraktlarında, ana sekonder metabolitler olan verbaskozit, harpagosit, fenolik asitler ve flavonoidlerin içeriğini HPLC analizi ve antioksidan kapasitelerini belirleyerek *in vitro* sindirim simülasyon çalışmaları yapmışlardır. Elde ettikleri sonuçlara göre, *V. nigrum* farklı sekonder metabolit içeriğine sahip, en yüksek toplam fenolik ve fenolik asit miktarına sahip bir bitki olarak seçmişlerdir. Ayrıca, *V. nigrum* metanol ekstresi, farklı *in vitro* antioksidan yöntemlerinde en güçlü antioksidan aktiviteyi göstermiştir. Tüm türlerdeki ana sekonder metabolit verbaskozit olduğunu ve konsantrasyonun *V. nigrum* ekstresinde en yüksek seviyede olduğunu belirtmişlerdir. Yaptıkları bu çalışmayla, *Verbascum* türleri ve farmakolojik olarak önemli ikincil metabolitleri hakkında değerli bilgiler sağlamışlardır. Bunun akabinde gelecek araştırmalarda gıda ve farmasötik endüstride antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek önemli bir kaynak olarak *V. nigrum*'un potansiyelini vurgulamışlardır.

Küçük (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada Dirmil Sığır kuyruğu olarak bilinen tıbbi endemik *Verbascum Bellum* Hub. & Mor. türünün anatomik yapısını ilk kez bu çalışmayla bu türün kök, gövde ve yapraklarını anatomik yapısını ilk kez aydınlığa kavuşturmuşlardır. Çalıştıkları tür *Verbascum bellum*, üzerinde yapılmış taksonomik ve anatomik amaçlı bir çalışmanın olmayışı, yapılan araştırmayı türün sistematik yönden tanıtılması bakımından önemli kılmıştır.

Hilooğlu ve Sözen (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada, Erzincan ilinde dar yayılış alanına sahip, IUCN tarafından DD (Veri yetersiz) olarak belirlenen nadir ve endemik bitki türü olan *Verbascum alyssifolium* Boiss. Taksonunun, doğal yayılış gösterdiği toprakların fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmişlerdir. Ayrıca, bitki ve toprak örneklerinin mikro ve makro element analizleri yapılarak aralarındaki ilişkiyi de ortaya çıkarmışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda ileride *ex situ* koruma yöntemlerinde destekleyici bir çalışma olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Al-Jibouri vd. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Verbascum thapsus* bitkisinin doku kültürü yöntemleri kullanılarak fenolik bileşiklerin üretimini artırmak ve bu bileşiklerin içeriğini artırmanın koşullarını belirlemek amacıyla yürütülmüştür. Bu amaçla, bitki materyali doku kültürü ortamında çoğaltılmış ve ardından 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 etmişlerdir. HPLC ile yapılan kantitatif analizler, kumarin, öjenol ve timol gibi fenolik bileşiklerin içeriği sırasıyla ana bitkinin yapraklarında (10, 41, 310 ppm) nispeten düşük olduğunu saptamışlardır. 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 bildirmişlerdir. Elde ettikleri veriye göre 150 mg/L proline kumarin üretimini %2752'ye, 50 mg/L proline öjenol birikimini %290'a ve 150 mg/L triptofan amino asidinin ise timol üretimini ana bitkiye kıyasla %390'a yükselttiğini raporlamışlardır.

Yordanova vd. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada, Balkan bölgesinin endemik türlerinden biri olan *Verbascum eriophorum* Godr bitkisinin *in vitro* sürgün protokolünü geliştirmişlerdir. Sterilizasyon işlemi için tohumları %70 alkol içeren etanol solüsyonuyla 5 dakika süresince muamele ederek ardından %96 alkol içeren etanolde 10 saniye boyunca muamele ederek gerçekleştirilmişlerdir. 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 uyarmış, ancak sürgün gelişimini ve yaprak oluşumunu baskıladığı belirtilmiştir. Sürgün gelişimini teşvik etmede ise 0,5 mg BA ilaveli MS içerisinde daha etkili olduğunu ve eksplantların yaklaşık %98'inin sürgün proliferasyonu gösterdiğini belirtmişlerdir. Sonuç olarak endemik *Verbascum eriophorum*'un korunması için bir yaklaşım olan *in vitro* doku kültürlerinden oluşan bir koleksiyon oluşturmuşlardır.

Eyüpoğlu vd. (2020) tarafından yürütülen bir çalışmada *Verbascum exuberans* türünün metanol ekstraktı kullanılarak yapılan bir çalışmada, ekstraktın antiinflatuar aktivitesi ve antinosiseptif etkisini araştırmışlardır. Çalışma, ekstraktın merkezi spinal antinosiseptif etki gösterdiğini, ancak merkezi supraspinal antinosiseptif etkisinin olmadığını ve periferik antinosiseptif etkisinin olduğunu belirtmiştir. Ayrıca, ekstraktın ödem progresyonu ile TNF- α ve IL-1 β üretimleri üzerindeki inhibisyonları ve antiinflatuar aktivitesini kanıtlayarak raporlamışlardır.

Temporiti vd. (2020) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Verbascum thapsus* L.'nin aksenik kültürlerinin başlatılması için etkili bir yöntem geliştirilmişlerdir. Sterilizasyon aşaması için yaprak eksplantları, 2 dakika boyunca BIALCOL® (0.1% benzoksonyum klorür) ile muamele edilmiş ve ardından 3 damla Tween 20 ile işlenmiş, sonrasında da 2 dakika boyunca %70 etanolde sterilize etmişlerdir. Eksplantlardan kalus elde etmek için MS besin ortamına aktarılmışlardır. Oluşan kaluslar, MS besin ortamını içeren 0,5 mg/mL benziladenin (BA) + 1 mg/mL naftalin asetik asit (NAA) veya 3 mg/mL BA + 1 mg/mL NAA içeren üç farklı ortama aktarılmıştır. Daha sonra hücre süspansiyon kültürü tekniği uygulanmıştır. Ardından, kalus ve hücre süspansiyonu örnekleri HPLC cihazıyla analiz edilmiştir. Iso-verbaskozit, lökoskeptozit A ve lökoskeptozit gibi feniletanoid glikozitleri yüksek miktarda tespit etmişlerdir. Elde edilen veriler, bu bileşiklerin yüksek miktarlarda geri kazanılması için bitki hücresi biyoteknolojisinin potansiyelini ortaya koymuşlar ve bunların hastalık önleme ve tedavide olası kullanımlarına vurgu yapmışlardır.

Abed vd. (2020) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Verbascum thapsus*'u *in vitro* kallus kültüründe abiyotik elisitörler yardımıyla bazı fitokimyasal bileşiklerin birikimini arttırmaya yönelik bir çalışma yürütmüştür. 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 değişiklikleri, HPLC analizi ile belirlemiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, kallusların farklı şeker türevleri ve farklı konsantrasyonlarında kumarin ve glukoz içeren ortamlarda, öjenol ve içeriğinde artış gözlemlenirken, 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 nazaran timol üretimini engellediğini ileri sürmüştür.

Ertem ve Adak (2021) tarafından yürütülen bir çalışmada, IUCN tarafından EN (tehlikede) kategorisinde yer alan ve Türkiye Tohum Gen Bankasında korunan 'Mersin Pamukluk Barajında' su altında kalma riski taşıyan endemik *Verbascum linearilobum* Hub.-Mor.'un uygun çimlenme koşulları ve canlı kalma yüzdesi belirlenerek, türün korunmasına ve fizyolojik çalışmaların yapılmasına katkı sağlanması için yürütmüşlerdir. Tohumları, 25 °C sıcaklıkta iklim odasında, iki farklı ışık koşul (aydınlık-karanlık ve karanlık) ile giberellik asit (GA3) ve potasyum nitrat (KNO3) çözeltilerini kullanarak çimlenme oranını test etmişlerdir. Çalışma sonucunda, çimlenme sorunu olan *Verbascum* türleri için 16 saat aydınlık/8 saat karanlık fotoperiyodunun yeterli olabileceği belirlenmiştir. En yüksek toplam çimlenme yüzdesi %85 ile aydınlık-karanlık ortamda 100 ppm GA3 çözeltisiyle elde edilmiştir. Aynı koşulda en yüksek fide canlılık yüzdesi ise %75 olarak tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen fideler, biyoçeşitliliğin korunması için *ex-situ* koruma kapsamında Türkiye Milli Botanik Bahçesi'ne aktarılmıştır.

Taşgın ve Asil (2021) tarafından yürütülen bir araştırmada, endemik Amanos Sığırkuyruğu (*Verbascum amanum* Boiss) ile Belen sığırkuyruğunun (*Verbascum caesareum*) uçucu bileşenleri incelemişlerdir. Bitki özütleri alınarak ultrasonik banyo ile GS-MS analizi gerçekleştirmişlerdir. Analizler sonucunda, Amanos Sığırkuyruğu'nda toplam on üç, Belen Sığırkuyruğu'nda ise toplam on dört uçucu bileşen saptamışlardır. Bu bağlamda Amanos Sığırkuyruğu'nda en yüksek pik yapan veriler sırasıyla; 11-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-, 9-Octadecenoic acid (Z)-, methyl ester, 2-Pyrrolidinone, 1-methyl-, 2-Dodecanol ve Cyclohexasiloxane, dodecamethyl'dir. Belen Sığırkuyruğu'nda ise; en yüksek pik alanları sırasıyla 8-Octadecenoic acid, methyl ester, 2-Pyrrolidinone, 1-methyl, 1-Hexadecanol, Cyclohexasiloxane, dodecamethyl ve Cyclopropane, octyl'dir. Araştırmaları neticesinde, bu iki bitkinin tıbbi özelliklere sahip olduğunu göstermişlerdir.

Akın (2021) tarafından yürütülen bir çalışmada, ağır metallere kaynaklanan çevresel etkisini azaltmak için endemik *Verbascum phrygium* bitkisinin fitoremediasyon için araç olarak kullanmıştır. Tohumların yüzey sterilizasyonu için %3 sodyum hipoklorit (NaOCl) içinde, içine birkaç damla Tween-20 eklenerek 15 dakika sterilize edilmiş, ardından üç kez ultra saf su ile durulanmıştır. Daha sonra MS ortamına dört farklı agar konsantrasyonları (0.6, 0.7, 0.75, 0.80) denenmiştir. Ortamın pH değeri ise

5.7-7.0 arasında (5.7, 5.8, 6.0, 6.5, 7.0) ayarlamıştır. Farklı agar konsantrasyonlarının ve pH seviyelerinin *in vitro* çimlenme parametreleri üzerindeki etkileri incelemiştir; ayrıca, farklı çinko konsantrasyonlarının (0, 5, 10, 30, 50, 100 ve 250 mg/L Zn) *Verbascum phrygium* bitki türünün büyüme parametreleri ve çinko birikimi üzerindeki etkileri araştırmıştır. Çalışmadan elde ettiği bulgulara göre, *V. phrygium*'un çinko birikimi yeteneği göz önüne alındığında, ağır metallerden kaynaklı kirlenmiş alanlarda kullanılabilirliği açısından önemli bir potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Küçük vd. (2021) tarafından yürütülen bir çalışmada, tıbbi endemik olan ve Anadolu'da halk ilacı olarak kullanılan “zinemit” olarak adlandırılan *Verbascum deterrentum*'yi kök gövde yapraklarından enine kesitler alarak anatomik yapısını incelemiştir. *Verbascum* cinsi içerdiği çok sayıda tür sayısı ve çok farklı fitocoğrafik bölgelerde dağılım göstermesinden dolayı genel olarak teşhis ve taksonomisinde çeşitli sorunların olduğu bilinen en büyük cinslerden biridir. Bu bağlamda cinse ait türlerin morfolojik, anatomik yapılarının aydınlatılması türün taksonomisine katkı sağlamaktadır. Endemik tür olan *V. deterrentum* üzerinde yapılmış yapısı ile ilgili bir çalışma yoktur. Yapılan bu önemli araştırmayla, türün sistematik yönden tanımlanması ve anatomik özelliklerinin teşhisine de katkıda bulunmuştur.

Zengin vd. (2023) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Verbascum cheiranthifolium* Boiss., *V. myriocarpum* Boiss. & Heldr. ve *V. pyroliforme* (Boiss. & Heldr.) Kuntze'nin yer üstü aksamalarının antioksidan ve enzim inhibisyon özelliklerini değerlendirmeyi ve kimyasal profillerini incelemeyi amaçlamışlardır. Elde ettikleri analiz sonuçlarına göre; MeOH ve hidrometanolün, en yüksek toplam polifenolik içeriği elde ettiğini göstermiştir, en yüksek içerik *V. cheiranthifolium* ve *V. myriocarpum* türlerinden elde etmişlerdir. Verbaskozidin tahmini içeriği, *V. cheiranthifolium* ve *V. myriocarpum*'da oldukça yüksekken, *V. pyroliforme*'de daha düşük çıkmıştır. Son tür, en yüksek içeriğin hidrometanolik ekstre ile kaydedildiği luteolin-7-O-glukozid ve apigenin-7-O-glukozid daha baskın çıkmıştır. *V. cheiranthifolium* ve *V. myriocarpum* ekstreleri, *V. pyroliforme*'den) daha yüksek radikal temizleme aktivitesine sahiptir. En yüksek anlamlı anti-asetilkolinesteraz aktivitesi, *V. pyroliforme* ve *V. myriocarpum*'un MeOH ekstrelerinden elde etmişlerdir. İnceledikleri üç *Verbascum* türünden elde ettikleri ekstrelerin, antioksidan ve enzim inhibisyon özelliklerine sahip biyoaktif metabolitlerin potansiyel bir kaynağı olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Kılıç ve Mungan Kılıç (2023) tarafından yürütülen çalışmada, Şanlıurfa'da endemik olan *Verbascum stepporum* ve *Verbascum tenue* türlerinin kök, gövde ve yaprak anatomik yapıları ilk kez incelenmiştir. Türlerin anatomik özellikleri, köklerden, gövdelerden ve yapraklardan alınan kesitlerle karşılaştırılmıştır. Araştırmalarının sonuçları, incelenen türlerin kök, gövde ve yaprak anatomik yapılarının literatürdeki diğer *Verbascum* türleriyle benzerlik gösterdiğini bildirmiştir.

Yücel vd. (2023) tarafından yürütülen bir çalışmada, endemik *Verbascum scamandri* bitkisinin kromozom sayısını ve nükleer DNA içeriğini belirleyerek, farklı *in vitro* koşullarda genetik stabilitesini analiz etmeyi amaçlamışlardır. Bu amaçla öncelikle tohumların sterilizasyonunu %5 konsantrasyonunda sodyum hipoklorit içerisinde 20 dakika boyunca sterilize etmişler ve ardından 4-5 kez steril distile su ile yıkamışlardır. Sterilize edilen tohumları Murashige ve Skoog bazal besin ortamına alarak, başarılı bir şekilde çimlendirmişlerdir. *In vitro* şartlarında 14 haftada sağlıklı bir şekilde

yetiştirildikten sonra yapılan analizler sonucunda mitotik kromozom sayımları ve akış sitometrisi analizleri, bu bitkinin genetik olarak stabil olduğunu ortaya koymuşlardır.

Tegegn vd. (2024) tarafından yürütülen bir çalışmada, mide ağrısı, çeşitli yaralar ve enfeksiyon gibi rahatsızlıkların tedavisinde geleneksel olarak kullanılan *Verbascum sinaiticum* bitkisi üzerinde farmakolojik bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada, bitkiden elde edilen ekstraktlar ve izole edilen bileşiklerin antimikrobiyal ve antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Ekstraktların ve izole edilen bileşiklerin radikal süpürücü aktivitesi DPPH yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. Kök ekstraktlarının silika jel kolon kromatografik ayrımı yedi bilinen bileşiği sağlamıştır: 3'-(4''-metoksi fenil)-3'- okso-propionil heksadekanoat (1), harpagosid (2), pulverulentosid I (3), skrofulozid B4 (4), skropoliosid A (5), skropoliosid-D2 (6) ve harpagid 6-O-β-glukozid (7), ki bunların tümü bu türden ilk kez rapor edilmiştir. Bileşiklerin kimyasal yapıları ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve DEPT-135 yöntemleri kullanılarak aydınlatılmış, uçucu yağlar ise hidrodamıtma yöntemiyle ekstrakte edilip GC-MS ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, belirli bileşiklerin *Staphylococcus aureus* ve *S. epidermidis*'e karşı güçlü antibakteriyel ve antioksidan etkiler gösterdiğini ortaya koymuştur. Sonuç olarak, *V. sinaiticum* kök ekstraktlarının bakteri ve serbest radikallerin neden olduğu hastalıkların tedavisinde etkili olma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymuşlardır.

2.3. Diğer Bitkilerde Mikroçoğaltma Çalışmaları

Roy ve Sarkar (1991) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Aloe vera* bitkisinin kallilerinden hızlı bir şekilde sürgünlerin rejenerasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Kallus oluşumunu, yeraltı rizomlu gövdede yetişen genç yan sürgünlerin gövde segmentlerinden elde etmişlerdir. Polivinilpirolidon (PVP) kullanımı, fenolik maddelerin salgılanmasını azaltarak kallus oluşumunu teşvik etmiştir. En etkili kallus indüksiyonu, temel MS (Murashige ve Skoog) ortamında 1 mg l⁻¹ 2,4-diklorofenoksietik asit ve 0,2 mg l⁻¹ kinetin içeren besin ortamıyla elde etmişlerdir. Sürgünler, 2,4-D konsantrasyonunun azaltıldığı ve kinetin konsantrasyonunun artırıldığı kallilerden başlatılmıştır. Araştırma sonuçlarına göre, *Aloe vera*'nın hızlı çoğaltımı için etkili bir *in vitro* mikro çoğaltma yöntemini bildirmişlerdir.

Prutpongse ve Gavinlertvatana (1992) tarafından yürütülen bir çalışmada, 67 bambu türünden 54'ünü *in vitro* ortamda başarılı bir şekilde üretmişlerdir. Hemen hemen her tür için, Murashige ve Skoog ortamında bulunan BA ile beslenen gövde nodu segmentlerindeki aksiller tomurcuklardan birden fazla sürgün elde etmişlerdir. Bambu türlerinin bazıları kallustan adventif rejenerasyonuyla yeniden üretmişlerdir. Köklendirme işlemi, NAA içeren ortamlarda 2.7 ila 5.4 µM konsantrasyonlarında gerçekleştirmişlerdir. Son olarak, başarılı çoğaltılan bitkilerin uzun süreli depolanabilirliği ve saklanması üzerinde çalışılmışlardır. Bu çalışma bambu türlerinin *in vitro* kültüründe başarılı bir çoğaltma stratejisi geliştirmişlerdir.

Nagakubo vd. (1993) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Allium sativum* L. (sarımsak) için yeni bir mikroçoğaltım yöntemi geliştirilmişlerdir. Yöntem, başlangıçta sürgün ucu kültürünü, ardından sürgün çoğaltımını ve *in vitro* soğan sarmaşığı oluşumunu içermektedir. Sarımsak sürgün uçlarından, çoğaltıcı sürgünler üretmek için

LS ortamında kültüre almışlardır. Daha sonra, bu sürgünleri modifiye LS ortamına aktararak çoklu sürgünler elde etmişlerdir. Çoklu sürgün oluşumu ve sürgünlerin vitrifikasyonunun önlenmesi için ortamdaki $\text{KNO}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ oranı ayarlamışlardır. Erken olgunlaşan çeşitlerin çoğaltıcı sürgünleri, büyüme düzenleyici içermeyen bir ortamda soğan sarmaşıkları üretmiştir. Geç olgunlaşan Howaito-roppen çeşidi ise düşük sıcaklık işleminden sonra soğan sarmaşıkları oluşturmuştur. Sonuç olarak, bu çalışma, sarımsak mikroçoğaltımı için yeni bir yöntem geliştirmiş ve farklı çeşitlerde başarıyla uygulanmıştır.

Kataria ve Shekhawat (2005) tarafından yürütülen bir çalışmada, Ayurveda'nın eski metinlerinde tanımlanan ve yıllardır çeşitli hastalıklarda kullanılan, yüksek miktarda alkaloid içeren *Rauvolfia serpentina Benth.*'in (sarpagandha) kontrolsüz toplanması nedeniyle nesli tehlike altında olan tıbbi endemik bir bitki olduğu belirtilmiştir. Bu durum, bitkinin geleneksel üreme yöntemlerinin yetersizliğiyle birleşince, çoğaltma sorununu çözmek için bir çözüm olması için *in vitro* mikro çoğaltma tekniğini kullanmışlardır. Yaptıkları çalışmada, bitkiden alınan nodal sürgün explantları kullanılarak sterilizasyon, kültüre alma ve mikro çoğaltım işlemleri gerçekleştirilmiş ve bu yöntem, bitkinin korunması ve büyük ölçekte ticari üretimi için etkili bir çözüm olarak önermişlerdir.

Ali vd. (2007) tarafından yürütülen çalışma, peyzaj bitkisi *Caladium bicolor*'un *in vitro* çoğaltım protokolünü geliştirmişlerdir. Apikal meristem içeren sürgün eksplantlarını, MS ortamında 1 mg L^{-1} BAP içeren ortam kullanılarak kültüre almışlardır. Sürgün indüksiyonu için 8 gün içinde mükemmel sonuçlar elde etmişlerdir, maksimum sürgün sayısı için $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ilavesiyle elde etmişlerdir. Köklendirme için modifiye MS ortamına sürgünleri aktarmışlardır. Bitkicikleri aklimatize ettikten sonra saksılara dikimini gerçekleştirmişlerdir. Bir apikal meristemden, 12 haftada yaklaşık 2500 *Caladium* bitkisi üretilbileceği sonucuna varmışlardır. Mikroçoğaltım tekniğinin kaliteli ve hızlı bitki materyali üretimi için başarıyla kullanılabileceği sonucuna ulaşılmışlardır.

Behera ve Sahoo (2009) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Saccharum officinarum* L. türünün genç meristemlerini eksplant olarak kullanarak *in vitro* kültür kullanarak kallus indüksiyonu ve bitki fidelerinin rejenerasyonu için protokol standartizasyonu gerçekleştirmişlerdir. Farklı konsantrasyonlarda ve büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonları kullanılarak çoklu sürgün rejenerasyonu çeşitli frekanslarda gözlemlenmiştir. En yüksek kallus indüksiyon oranı, $2,5 \text{ mg/l}$ 2,4-D ile takviye edilmiş MS ortamında gözlemlenmiştir. Çoklu sürgün indüksiyonu açısından en iyi sonuç, BAP $2,0 \text{ mg/l}$ + NAA $0,5 \text{ mg/l}$ içeren MS ortamında gözlemlenmiştir. *In vitro* sürgünler yarı güçlü MS bazal ortama $3,0 \text{ mg/l}$ NAA ilave edildiğinde, köklenme daha yoğun olmuştur. Köklenmiş sürgünleri sera ortamına alarak ve tarla koşullarında hayatta kalma oranı %90 olarak belirlemişlerdir.

Sedki vd. (2012) tarafından yürütülen bir çalışmada, Fas'ın güneyinde *Opuntia ficus-indica* (dikenli armut kaktüsü) bitkisinin *in vitro* mikroçoğaltım protokolünü geliştirmişlerdir. Bu çalışma, bitki materyalinin büyük ölçüde üretilmesini amaçlamaktadır. Genç cladode eksplanları, bir areole içeren, Murashige ve Skoog (1962) ortamında (MS) adenin sülfat (40 mg/l), sodyum fosfat (50 mg/l), sukroz (50 g/l), fitajel ($0,3\%$) ve benziladenin (BA) $22,2 \mu\text{M}$ içeren bir ortamda kültürlenmiştir. En

iyi çoğalma oranları, kinetinden daha iyi sonuçlar elde edilmiş olan 0.5 mg/l BA ile elde edilmiştir. Kök indüksiyonu için, çoğalan sürgünler yarı MS, sukroz (3%), fitajel (0.3%) ve farklı oksinlerin 0.5 mg/l içeren ortama aktarılmıştır. Bu kültür koşullarında, bitki fidelerinin %100'ü köklenmiş ve en yüksek kök sayısı sırasıyla indol-3-bütirik asit (IBA) ve indol-3-asetik asit (IAA) ile (21.05 ve 16.2) elde edilmiştir. Köklü sürgünler kolayca alıştırılmış ve toprağa transfer edilmiştir.

Panwar vd. (2012) tarafından yürütülen bir çalışmada, Hindistan'ın Aravalli Tepe'sinde endemik ve nesli tükenme tehlikesi altındaki *Eulophia nuda* Lindl. Bitkisinde *in vitro* üreme ve yumru oluşturma yöntemleri başarılı bir şekilde geliştirilmiştir. Çalışmada, 1 cm kesilmiş tuber eksplantları kullanarak sürgün tomurcuklarını kültüre almışlar ve farklı besin ortamlarında çoğaltmışlardır. Çeşitli sitokinlerin (IBA ve Kn) farklı konsantrasyonları ve kombinasyonları, sürgün çoğalmasını etkilediğini belirtmişlerdir. *In vitro* ve *ex vitro* koşullarda köklenmiş sürgünler başarıyla aklimatize etmişler ve toprak içinde de büyümüşlerdir. *E. Buda*'nın *in vitro* yumru oluşturma yeteneği, doğal koşullara göre daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir. Yürüttükleri bu çalışmayla, *E. nuda*'nın *in vitro* üreme ve yumru oluşturma yöntemlerinin ilk kez raporlayarak, bu türün germplazm korunması ve büyük ölçekli üretimi için kullanılabilecek etkili bir protokol geliştirilmiştir.

Habas ve Turker (2019) tarafından yürütülen bir çalışmada, *Solanaceae* familyası süs bitkisi *Petunia hybrida* bitkisinin çimlendirilmiş tohumları kullanılarak doku kültüründe mikroçoğaltımı için etkili bir rejenerasyon protokolu geliştirilmiştir. Çalışmalarında, eksplant kaynağı olarak sürgün ucu ve düğüm eksplantları, farklı konsantrasyonlardaki ve kombinasyonlardaki büyüme düzenleyicileri olan Benzil Amino Purin (BAP), 1-Naftalen asetik asit (NAA), İndol-3-bütirik asit (IBA) ve Gibberellik asit (GA3) içeren MS bazal besin ortamında kültüre almışlardır. Sonuçları, en yüksek sürgün uzunluğunun 1 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamından elde edildiğini göstermiştir. En yüksek sürgün sayısı ise 0,6 mg/l BAP ve 0.5 mg/l IBA içeren MS ortamından kaydedilmiştir. Rejenere olmuş sürgünlerin köklendirilmesi, farklı GA3 konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiş ve en iyi sonuç 0,2 mg/l GA3 ve 0.2 mg/l BAP içeren MS ortamından elde edilmiştir. Bitkicikler laboratuvar koşullarında %70 hayatta kalma oranıyla aklimatizasyona alınmıştır. Bu çalışmayla, *Petunia hybrida*'nın *in vitro* üretimi için etkili bir protokolü oluşturulmuş ve mikroçoğaltmayla üretimi alanında önemli bir katkı sağlamışlardır.

3 MATERYAL VE METOT

Araştırma 2022-2023 yıllarında, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Tıbbi ve Aromatik Bitkiler laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitkisel Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak *Verbascum leptocladum*'un kapsülleri içerisinde yer alan tohumları kullanılmış ve bu kapsüller de Akdeniz Üniversitesi Kampüs doğal florasında bulunan, 36°54'00.4"N 30°38'22.1"E koordinatlı lokasyondan 16 Ağustos 2022 tarihinde toplanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Doğal florasında *Verbascum leptocladum* bitkisi, 23.05.2023 (Akdeniz üniversitesi kampüsü)

Bitki teşhisi Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ramazan Süleyman GÖKTÜRK, tarafından yapılmıştır. Bitki ortalama 30 cm uzunluğunda olup, tohumları içeren kapsüller koyu kahverengi renkli ve bitki gövdesine seyrek bir şekilde dizilmiştir.

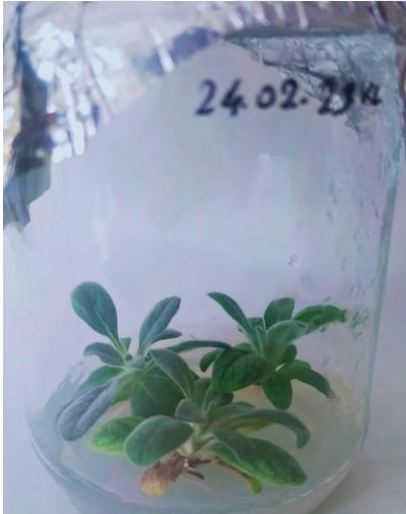
Verbascum leptocladum doğal florasında, orta derecede taşlı ve Akdeniz Bölgesi'ne özgü Terra-rosa topraklarında yaşamını sürdürmektedir. 16.08.2022 tarihinde doğal floradan toplanan kapsüller, steril laboratuvar ortamında keselenerek depolanmıştır. Kapsüllerden çıkarılan tohumlar canlılıklarını koruması için 4°C de buzdolabında muhafaza edilmiştir. Her kapsülde ortalama 30 tane tohum bulunmakla birlikte tohumlar küçük ve renkleri siyahtır. Tohumların bin dane ağırlığı ise 0,1 gr olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.2. *Verbascum leptocladum* kapsülü ve tohumlarının Nikon SMSZ445 ışık mikroskobu altındaki görüntüsü

3.1.2.Rejenerasyon İçin Kullanılan Eksplantlar

Bu tezde *in vitro* çoğaltma için *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş olan bitkiciklerin yaprakları eksplant olarak kullanılmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Yaprak eksplantları kullanılan MS besin ortamındaki bitkicikler

3.1.2 Besin Ortamlarının Bileşimi

3.1.2.1. *In Vitro* Tohum Çimlendirmesinde Kullanılan Besin Ortamı

Yapılan literatür taramaları sonucunda, Antalya Florası'nda endemik olan *Verbascum leptocladum* türüne ait tohumların, *in vitro* çimlendirilmesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle diğer *Verbascum* türlerine ait tohumların *in vitro* çimlendirilmesine yönelik gerçekleştirilen çalışmalarda, başarılı sonuç veren Murashige & Skoog (MS) besin ortamı, bu araştırmada çimlendirme ortamı olarak kullanılmıştır. 1 litre MS besin ortamı için 30 gram sükröz, 4,40 gram besin ortamı ve 7 gram agar eklenerek pH 5,7 olarak ayarlanmıştır. Hazırlanan MS besin ortamı 1,2 bar basınç ve 121 °C sıcaklığa ulaşan otoklav cihazında 20 dakika boyunca steril edilmiştir.

Çizelge 3.1. MS temel besi ortamı içeriği

Mikro Elementler	mg/l	µM
KI	0.83	5.00
FeNaEDTA	36.70	100.00
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.11
H ₃ BO ₃	6.20	100.27
MnSO ₄ .4H ₂ O	16.90	100.00
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.60	29.91
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	8.25	1.03
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.10
Makro Elementler	mg/l	µM
KNO ₃	1900.00	18.79
CaCl ₂	332.02	2.99
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61
Organik Bileşikler	mg/l	
Thiamin-HCl	0.1	
Pridoksin-HCl	0.5	
Nikotinik asit	0.5	
myo-inositol	100	
Glisin	2.0	

3.1.2.2. Rejenerasyon İçin Kullanılan Ortamlar

Başarılı bir şekilde çimlenen bitkiciklerden alınan yaprak eksplantları, kallus oluşumunu teşvik edip rejenerasyon oluşumunu sağlamak amacıyla, farklı oranlarda oksin ve sitokinin içeren MS besin ortamlarına aktarılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Sterilizasyon İşlemleri

Doku kültürü çalışmalarında, çalışma ortamının sterilizasyonu, kullanılacak besin, alet ve ekipmanın sterilizasyonu ile bitki materyalinin sterilizasyonu araştırmanın bütünlüğünü koruyarak oluşabilecek kontaminasyonları engelleyerek çalışmanın başarılı sonuçlanması için çok önemlidir.

3.2.1.1. Çalışma Ortamının Sterilizasyonu

Yürütülen bu çalışma, horizontal (karşıdan) üflemlili steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir. Her çalışmaya başlamadan önce, %70'lik alkol ile boş kabinin bütün yüzey dezenfekte edilmiş ve 20 dakika süren UV lambası açılarak kabinin sterilizasyonu yapılmıştır.

3.2.1.2. Besin Ortamı, Alet ve Ekipmanların Sterilizasyonu

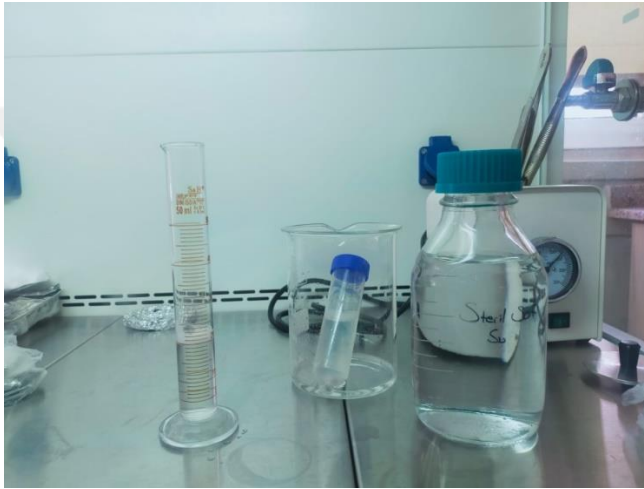
Laboratuvar şartlarında hazırlanan besin ortamlarının sterilizasyonu saf su ve diğer ekipmanlarla birlikte otoklavda (121°C'de 20 dakika) gerçekleştirilmiştir. Otoklav işleminden çıkan besin ortamları, steril hale getirilmiş kabin içerisinde petrilere ve kavanozlara dökülerek parafilm yardımıyla ağızları kapatılmıştır. Hazırlanan tüm besin ortamları, kontaminasyon olasılığını en aza indirmek için ekimden bir hafta öncesine kadar kontaminasyon olup olmadığı kontrol edilmiştir. Doku kültürü işlemlerinde kullanılan tüm malzemeler otoklava girmeden önce, sodyum hipokloritle (NaClO) yıkanarak saf sudan geçirilmiştir (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Sterilizasyon işleminin yapılması

3.2.2.Tohumların Yüzey Sterilizasyonu

Verbascum leptocladum'un tohumları oldukça küçük boyutta olduğundan yüzey sterilizasyonu oldukça güçtür. Çalışmanın sürdürülebilirliği ve başarılı bir sonuç alınabilmesi için, yüzey sterilizasyonu bu çalışmanın en önemli aşamalarından birisi olmuştur. Kimyasalların kullanma oranı ve muamele edilen süre farklılıkları denendikten sonra en başarılı yöntem seçilerek kullanılmıştır. Sterilizasyon protokolü geliştirmek amacıyla, steril kabin içerisinde tohumlar su geçirgen bir kumaşa keselenip %70'lik etil alkol içerisinde 40 saniye muamele edilerek üçer kez saf suda durulanmıştır. Ardından tohumlar, 2 damla Tween-20 içeren %15'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 20 dakika boyunca muamele edilerek ve saf su ile üçer kez durulanarak ekime hazır hale getirilmişlerdir (Şekil 3.5).



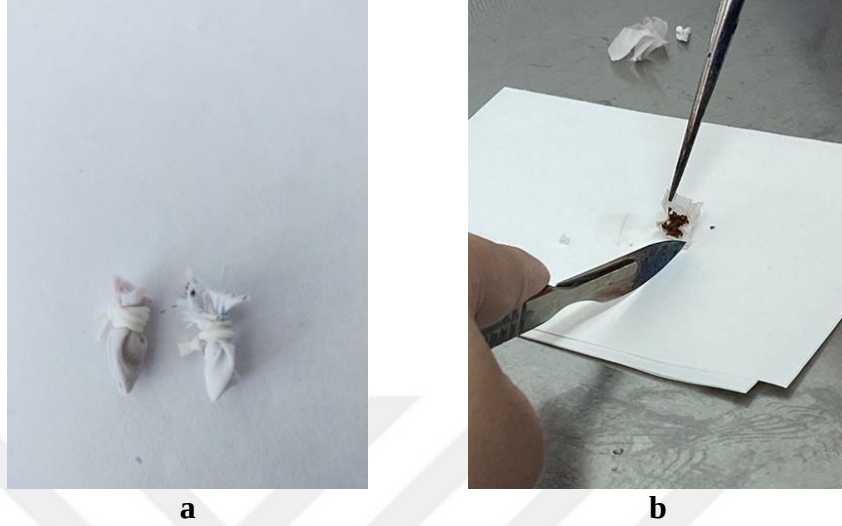
Şekil 3.5. Steril kabinde tohum sterilizasyonu işlemi

3.2.3Tohumların Çimlendirilmesi

Başarılı bir sterilizasyon protokolü aşaması tamamlandıktan sonra, *Verbascum leptocladum* tohumları, kontrollü şartlar altında en iyi çimlenme koşullarının belirlenmesi için farklı kültür kapları ile aydınlık ve karanlık koşulların etkileri araştırılmıştır. Bu kapsamda 30 ml besin ortamı bulunan kavanoz ve petri kaplarına 10 adet tohum ekilmiştir. Her kavanoz ve petri kabından aydınlık ve karanlık kültür koşulları için 5 tekerrürlü deneme kurulmuştur.

Ekim için hazır hale getirilmiş steril kabin içerisinde, tohumlar iki kese yapılarak %70 etil alkol ile 40 saniye muamele edilmiş 3 kez saf suda durulanarak, 2 damla Tween-20 içeren %15'lik sodyum hipoklorit ile 15 dakika muamele edilerek 3 kez saf suda durulanmış olup, her petri ve kavanoza 10 adet tohumun ekimi yapılmıştır (Şekil 3.6). Karanlık ortam için belirlenmiş olan petri ve kavanozlar alüminyum folyo yardımıyla ışık almayacak bir şekilde kapatılmıştır. Karanlık ve aydınlık olarak belirlenen bütün ortamlar 25°C sıcaklıkta 4000 lux ışık ve 16/8 fotoperiyot koşullarında çimlenmeleri için bırakılmışlardır. Elde edilen sağlıklı bitkiciklerin tamamı temel MS besin ortamı içeren kavanozlara üçer adet olacak şekilde steril kabinde ve steril

koşullarda dikimi yapılmış, 3 hafta boyunca 16/8 fotoperiyot 4000 lüks içeren iklimlendirme dolabında iki kez alt kültürlerle alınmıştır.



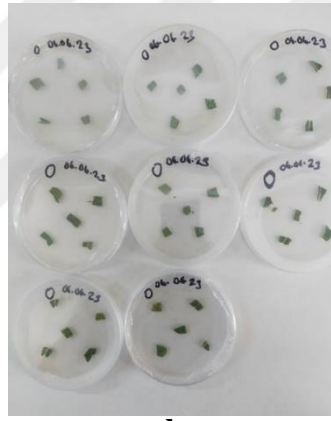
Şekil 3.6.Tohumların yüzey sterilizasyonu. **a)** Sterilizasyon işlemi için keselenmiş tohumlar; **b)** Sterilizasyon aşaması tamamlanmış ekime hazır hale getirilmiş tohumlar

3.2.4.Kallus Rejenerasyonu

In vitro koşullarda 4-6 yapraklı büyüklüğe ulaşan bitkiciklerin yapraklarından, steril kabinde steril kurutma kağıdının üzerinde yaklaşık 1 cm² boyutlarında, pens ve bistüri yardımıyla yaprak eksplantları kesilerek rejenerasyon ortamlarına alınmıştır (Şekil 3.7). İyi bir kallus yüzeyi oluşturmak için yaprak kenarları kesilerek yara dokusu oluşturulmuştur. Kültüre alınan yaprak eksplantlarından, kallus rejenerasyonu elde edilmek üzere eksplantlar çeşitli bitki büyüme düzenleyicilerin (BAP ve NAA) farklı konsantrasyon ve kombinasyonlarıyla hazırlanan MS (Murashige & Skoog) besi ortamlarında kültüre alınmıştır. Her petriye (9 cm) 5'er adet yaprak eksplantları konularak hazırlanan 7 farklı besin ortamı için 8 tekerrürlü bir deneme deseni kurulmuştur. Kullanılan besin ortamları ve ortamlara verilen kodlar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Besin ortamları ve temsil ettiği kodlar

ORTAM NO	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)
M0	0	0
M1	0.5	0.25
M2	1	0.25
M3	2	0.25
M4	0.5	0.5
M5	1	0.5
M6	2	0.5

**a****b****c**

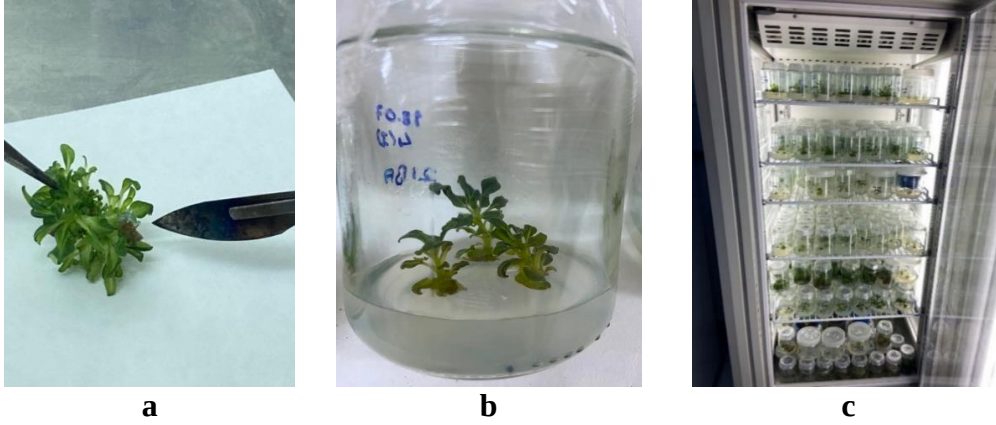
Şekil 3.7. *In vitro* gelişen bitkiciklerden yaprak eksplantlarının izole edilerek kültüre alınması. **a)** Temel MS ortamında yetiştirilmiş bitkicikten yaprak eksplantı alma; **b)** temel MS ortamına aktarılmış yaprak eksplantları; **c)** gözlem alma

3.2.5. Somatik Embriyo ve Sürgün Rejenerasyonu

Numaralandırılmış her biri farklı besin ortamlarındaki petrilere bulunan yaprak eksplantlarından oluşan kalluslar, yine aynı şekilde numaralandırılmış kavanozlara üçerli ve ikişerli ayrılarak, somatik embriyo ve sürgün rejenerasyonu için steril kabinde alt kültüre alınmıştır.

3.2.6. Köklendirme

Kalluslardan oluşan sürgünler ile somatik embriyolardan çimlenen bitkicikler, steril kabinde pens ve bistüri yardımıyla ayrılarak aktif karbon, IBA ve NAA büyüme düzenleyicilerinin farklı kombinasyonlarını içeren MS besin ortamlarında köklenmeleri amacıyla alt kültüre alınmışlardır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Elde edilen sürgünlerin köklendirilmesi **a)** Kalluslardan oluşan sürgünlerin ayrılması; **b)** IBA'lı besin ortamına aktarılmış bitkicikler; **c)** Panasonic MLR-352- PE model iklimlendirme dolabında köklenmesi için kültüre alınmış bitkicikler

3.2.7. Aklimatizasyon

Sürekli *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş ve köklenmiş olan bitkiler, plastik örtüler altında kademeli olarak dış koşullara alıştırmıştır. Öncelikle, köklenmiş bitkicikler, kavanozlardan pens yardımıyla çıkarılarak köklerdeki agar artıkları akan su altında temizlenmiştir. Agardan tamamen arındırılan bitkicikler, 2:1 oranında torf:perlit içeren saksılara dikilmiştir. Bitkiler iklim şartlarına uyum sağladıktan sonra daha büyük saksılara aktararak Güney Agripark Ar-Ge Merkezi araştırma serasına alınmıştır. Bitkiler burada çiçeklenme dönemine kadar büyümeye bırakılmıştır (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Aklimatizasyon sonrası sera koşullarına alınmış bitkicikler (29.04.2024, Güney Agripark)

3.2.8. İstatistik Analizleri

Bu tez çalışmasında tesadüf parselleri deneme deseni kullanılmıştır Elde edilen bulguların değerlendirilmesinde SAS programı (Statistical Analysis System) kullanılmıştır. ANOVA analizi, farklı uygulamaların ortalamaları arasında anlamlı fark olup olmadığını belirlemek için kullanılmıştır. ANOVA sonuçlarına göre hangi uygulamalar arasında anlamlı farklar olduğunu belirlemek içinde Fisher LSD testi kullanılmıştır



4 BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Kullanılan Bitki Materyali ve Sterilizasyonu

Bu tez çalışmasında başlangıç materyali olarak kullanılan tohumlar için en ideal yüzey sterilizasyon yöntemini belirlemek amacıyla, farklı sürelerde ve konsantrasyonlarda çeşitli uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadaki en önemli amaç aynı anda hem kontaminasyonu tamamen ortadan kaldırmak hem de tohum canlılığını da maksimum düzeyde tutmaktır. Bu kapsamda uygulanan farklı sterilizasyon yöntemlerinin tohum canlılığı ve kontaminasyon oranında önemli düzeyde değişikliklere neden olduğu tespit edilmiştir. Çizelge 4.1’de uygulanan 4 farklı sterilizasyon yöntemlerine ait konsantrasyon ve uygulama süreleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Tohumların yüzey sterilizasyonunda uygulanan yöntemler

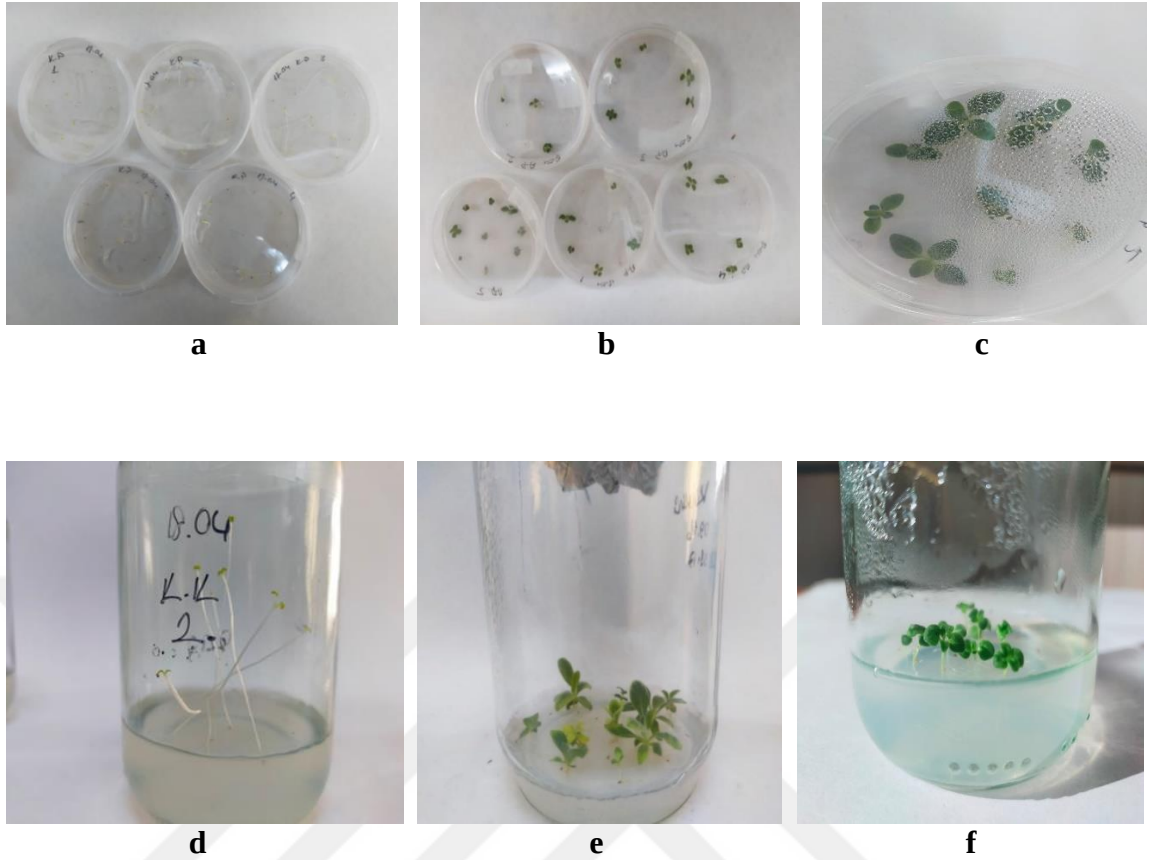
Uygulama Numarası	Etil alkol	Saniye	Tween-20	Ticari çamaşır suyu (%5)	Dakika	Çimlenme oranı
1	%100	30	2 damla	%15	15	%0
2	%70	60	2 damla	%20	20	%0
3	%70	40	2 damla	%20	20	%20
4	%70	40	2 damla	%15	15	%80

Sterilizasyon protokolü geliştirmek amacıyla yapılan eski çalışmalar göz önünde bulundurularak, alkol ve çamaşır suyu oranlarının 4 farklı kombinasyonu denenmiştir (Çizelge 4.1). Her bir uygulama steril kabinin içerisinde ve su geçirgen bir kumaş kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca her bir uygulama sonrası da tohumlar steril suda üçer kez durulanmıştır. 1 numaralı uygulamada tohumlar su geçirgen bir kumaşa keselenip %100’lük etil alkol içerisinde 30 saniye muamele edilerek üçer kez saf suda durulanmıştır. Ardından 2 damla Tween-20 içeren %20’lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dakika boyunca muamele edilmiş ve saf su ile üçer kez durulanmış olup petri kabındaki kurutma kağıdına ekimi yapılmıştır. Fakat iki haftalık süre zarfında herhangi bir çimlenme ve kontaminasyon gözlemlenmemiştir. 2 numaralı sterilizasyon uygulamasında, etil alkolün oranı %100’den %70’ e düşürülerek muamele süresi 30 saniyeden 60 saniyeye çıkarılmıştır, %20’lik sodyum hipokloritin muamele süreside 15 dakikadan 20 dakikaya çıkarılmıştır. İki hafta içerisinde herhangi bir kontaminasyon ve çimlenmeye rastlanılmamıştır. 3 numaralı sterilizasyon uygulamasında, etil alkolün oranı aynı kalarak muamele süresi 40 saniyeye, Tween-20 ise üç damladan iki damlaya, sodyum hipoklorit de %20’den %15’e düşürülmüştür. Çimlenme üç gün sonra gerçekleşmiştir. Bir hafta içerisinde 20 adet tohumdan 4 tanesi çimlenlenmiş olup, diğer tohumlarda iki haftalık gözlem süresince herhangi bir çimlenme gelişmemiştir. 4 numaralı uygulamada ise bütün etmenlerin konsantrasyonu üzerinde bir değişikliğe

gidilmeden, sadece sodyum hipokloritin muamele süresi 20 dk'dan 15 dk'ya düşürülmüştür. İlk çimlenme 36 saat içerisinde görülmüş olup çimlenme oranının %20'den, %80'e çıktığı gözlemlenmiş ve çalışmada kullanılacak olan sterilizasyon protokolü olarak seçilmiştir (Çizelge 4.1). Turker vd. (2001) yaptıkları benzer bir çalışmada, *Verbascum thapsus* bitkisinin yüzey sterilizasyonu için sırasıyla; %95'lik etil alkol içerisinde 20 dk, %20 Cloroxw (%1,05 sodyum hipoklorür) içinde 20 dk üç damla Tween 20 kullanarak en yüksek çimlenme oranını elde etmişlerdir. Benzer bir çalışmada Yordonova vd. (2016), *Verbascum eriophorum* bitkisinin tohumlarının sterilizasyon işlemi için tohumları %70 alkol içeren etanol solüsyonuyla 5 dakika süresince muamele ederek ardından %96 alkol içeren etanolde 10 saniye boyunca muamele ederek tohumları çimlendirmeyi başarmışlardır. Çalışmamızda ise, *Verbascum leptocladum*'un yüksek etil alkol oranında tohum canlılığını kaybettiği gözlemlenmiştir. Yücel vd. (2023) yaptıkları benzer bir çalışmada, *Verbascum scamandri* Murb. bitkisinde yüzey sterilizasyonu için %70'lik alkol ve %5 oranında ticari olmayan NaOCl ile 20 dk boyunca uygulamışlardır. Elde ettikleri sonuca göre tohumlarda en yüksek çimlenmeyi elde etmişlerdir. Yine yapılan başka bir çalışmada, Karamian ve Ghasemlou (2014), *Verbascum sinuatum* bitkisinin tohumlarının yüzey sterilizasyonunu %70 etil alkol ve %5 NaOCl 20 dakika süreyle en ideal çimlenmeyi elde etmişlerdir. Kullandıkları %70'lik etil alkol oranı bulgularımızı destekler niteliktedir. Sonuç olarak yapılan diğer sterilizasyon çalışmaları da ele alındığında, sterilizasyonda kullanılan kimyasalın çeşidi, uygulama süresi ve konsantrasyonu farklı bitkilerde ve aynı cinsin farklı türlerinde de farklılık gösterebilmektedir.

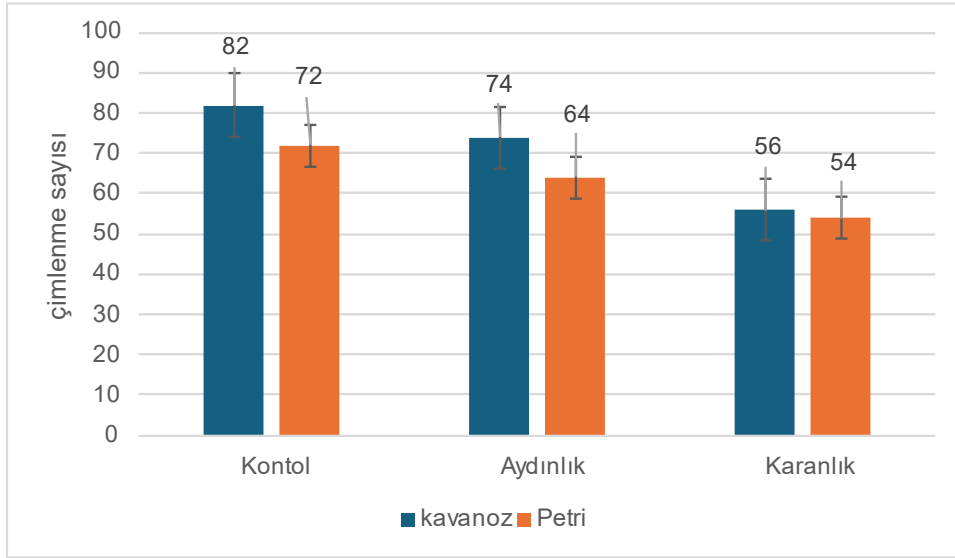
4.2. Tohum Çimlendirme Uygulamaları

Başarılı bir sterilizasyon protokolü aşaması geliştirildikten sonra, *Verbascum leptocladum* tohumları kontrollü şartlar altında en iyi çimlenme koşullarının belirlenmesi için farklı kültür kapları ile aydınlık ve karanlık koşulların etkileri araştırılmıştır (Şekil 4.1). Bu kapsamda 30 ml besin ortamı bulunan kavanoz ve petri kaplarına 10 adet tohum ekilmiştir. Her kavanoz ve petri kabından 12 h/12 h fotoperiyot, sürekli aydınlık ve sürekli karanlık kültür koşulları için 5 tekerrürlü deneme kurulmuştur. Denemede 12 h/12 h fotoperiyot uygulaması kontrol olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.1. Petri ve kavanozlardaki tohumların çimlenme durumları; **a)** karanlık ortamdaki petride çimlenen tohumlar; **b)** aydınlık ortamdaki petride çimlenen tohumlar; **c)** 12 h/12 h fotoperiyot ortamında petride çimlenen tohumlar **d)** karanlık ortamdaki kavanozda çimlenen tohumlar; **e)** aydınlık ortamdaki kavanozda çimlenen tohumlar; **f)** 12 h/12 h fotoperiyot ortamında kavanozda çimlenen tohumlar

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi yarı aydınlık/yarı karanlık koşullar altında (kontrol grubu) en yüksek çimlenme gözlemlenmiştir. Kontrol K grubu (kavanoz) %82 çimlenme ile en yüksek çimlenme oranını göstermiş, Kontrol P grubu (petri kabı) %72 ile çimlenme ile onu takip etmiştir. Bu durum, yarı aydınlık/yarı karanlık ışık koşullarının *Verbascum leptocladum* tohumlarının çimlenmesi için en ideal şartları sağladığını ortaya koymuştur. *Verbascum* türlerinin çimlenmesinin araştırıldığı Catara vd. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada özellikle 12 saat aydınlık/12 saat karanlık koşullarında en yüksek oranda çimlenmenin gerçekleştiğini ortaya koymuşlardır.



Aydınlık koşullar altında, AK (aydınlık kavanoz) grubu %74 çimlenme oranı ile yüksek bir performans sergilemiştir. AP (aydınlık petri kabı) grubu ise %64 çimlenme oranı ile benzer şekilde başarılı sonuçlar elde etmiştir. Aydınlık koşulların tohum çimlenmesi üzerinde olumlu etkisi olduğu görülmektedir. Ertem ve Adak (2021)' de yapılan benzer bir çalışmada *Verbascum* türleri için 16 saat aydınlık/ 8 saat karanlık fotoperiyot uygulamasının yeterli olabileceği sonucunu elde etmişlerdir.

Karanlık koşullar altında, KK (karanlık kavanoz) ve KP (karanlık petri kabı) grupları en düşük çimlenme oranlarına sahip olmuştur. Bu durum, karanlık koşulların tohum çimlenmesi üzerinde olumsuz etkisi olduğunu göstermektedir. Catara vd. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada *V. arcturus* ve *V. pinnatifidum* gibi bazı *Verbascum* türlerinde, değişen ışık şartlarından daha az etkilenmekte olduklarını ortaya koymuşlardır, kayalık alanlar veya kumlu düzlükler gibi daha zorlu ortamlarda, doğrudan ışığa maruz kalmadan bile çimlenebilme yeteneklerinin olduğunu açıklamışlardır. Hiloğlu ve Sözen (2017) tarafından yürütülen endemik *Verbascum alyssifolium* tohumlarının çimlendirilmesi üzerine başka bir çalışmada, 8 saat aydınlık/16 saat karanlık foto periyodunda tohumları çimlendirmişlerdir. Alabadi vd. (2004) tarafından yürütülen başka bir çalışmada karanlıkta büyüyen bitkilerin hormon düzenlerinin bozulmasından kaynaklı etiyolleşmeler meydana geleceğini ileri sürmüşlerdir. Oda ve Furuya (1976) tarafından yapılan başka bir çalışmada karanlıkta büyüttükleri mısır fidelerinin solgunlaşarak boylarının uzadığını ve etiyolleşme meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir. Gross (1985) tarafından yürütülen bir çalışmada *Verbascum thapsus* ve *Oenothera biennis* tohumlarının karanlıkta çimlenme ve ışınlanma üzerine yaptıkları bir çalışmada karanlıkta muamele edilen *Verbascum thapsus* tohumlarının çimlenmediklerini sonucunu bulmuşlardır. Baskin ve Baskin (1981) tarafından yürütülen bir çalışmada *Verbascum* tohumlarının karanlıkta çimlenme ihtiyacının mevsimsel olarak değiştiği ve çimlenmenin ışık ve sıcaklıkla bağlantılı olduğu belirtmişlerdir.

Kültür kaplarına göre değerlendirmede ise kavanoz ortamında yapılan denemelerde, yarı aydınlık/yarı karanlık koşullarda tutulan Kontrol K grubu en yüksek çimlenme oranına (%82) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra aydınlık koşullarda

tutulan AK grubu da yüksek bir çimlenme oranıyla (%72) takip etmiştir. Petri kabında yapılan denemelerde, yarı aydınlık/yarı karanlık koşullarda tutulan Kontrol P grubu %72 çimlenme oranı ile en yüksek performansı sergilemiştir. Aydınlık koşullarda tutulan AP grubu %64 çimlenme oranı ile başarılı sonuçlar elde etmiştir. Karanlık koşullarda tutulan KP grubu %54 çimlenme oranı ile en düşük çimlenme oranını göstermiştir. Hem kavanoz hem de petri kabı ortamlarında, yarı aydınlık/yarı karanlık ve aydınlık koşullar, karanlık koşullara göre daha yüksek çimlenme oranları sağlanmıştır. Nitekim kavanoz ortamlarında ise petrilere göre daha yüksek çimlenme oranları elde edildiği ve çimlenmeye olumlu bir etkisi olduğu gözlemlenmiştir.

Tokuhara vd. (2023) *Gastrochilus japonicus* gibi orkide türlerinin *in vitro* koşullarda farklı kültür kaplarında çimlendirilmesi üzerine yürüttükleri bir çalışmada, çimlenme kaplarının boyut ve şeklinin çimlenme oranı ve bitki gelişimi üzerinde önemli etkileri olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmada, petri kapları gibi geniş yüzey alanına sahip kaplar, küçük ve derin kaplara kıyasla daha yüksek çimlenme oranlarına sahip olduğunu ortaya koymuşlardır. Redhwan vd. (2023) yapılan benzer bir çalışmada *Pancremium maritimum* (kum zambağı) üzerine yapılan bir çalışmada, farklı kültür kaplarının kullanımı, bitki büyüme düzenleyicileri ile incelemişlerdir. Elde ettikleri sonuca göre cam ve plastik kapların bitki büyümesi ve çimlenme oranları üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, cam kapların daha sabit bir nem ortamı sağlayarak daha iyi çimlenme oranları sunduğunu göstermiştir.

Bu çalışma, "ışık faktörü" ve "kültür kabı" faktörlerinin çimlenme oranı üzerindeki etkilerini incelemek için ANOVA ve Fisher LSD sonrası testleri kullanılmıştır. ANOVA sonuçları, hem "ışık faktörü" hem de "çimlenme kabı" faktörlerinin çimlenme oranı üzerinde önemli ana etkiler gösterdiğini, ancak bu faktörlerin etkileşimlerinin önemli bir etkiye sahip olmadığını ortaya koymuştur.

İstatistikî yorum: ANOVA analizinde, "uygulama" ve "kültür kabı" faktörlerinin her ikisi de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Bu, her iki faktörün de çimlenme oranı üzerinde bağımsız olarak önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Ancak, iki faktörün etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$), bu da bu iki faktörün birlikte çimlenme oranı üzerinde önemli bir etkiye sahip olmadığını belirtir.

Fisher LSD testi sonuçları: Işık Faktörü: Kontrol (Ortalama = 77) ile aydınlık (Ortalama = 69) ve karanlık (Ortalama = 55) arasında anlamlı fark vardır ($p < 0.05$). Aydınlık (Ortalama = 69) ile kontrol (Ortalama = 77) ve karanlık (Ortalama = 55) arasında anlamlı fark vardır ($p < 0.05$). Karanlık (Ortalama = 55) ile kontrol (Ortalama = 77) ve aydınlık (Ortalama = 69) arasında anlamlı fark vardır ($p < 0.05$).

Özetle, LSD testine göre "ışık faktörü" üç seviyesi birbirlerinden anlamlı olarak farklı bulunmuştur. Bu sonuçlar, uygulamaların çimlenme oranı üzerinde önemli etkiler yaptığını göstermiştir.

Çimlenme Kabı Faktörü: Petri kapları (ortalama = 63.33) 'b' grubunda yer alırken, kavanozlar (ortalama = 70.66) 'a' grubunda yer almaktadır. Bu, yanıt değişkeni (çimlenme) için kavanozların, petri kaplarına göre anlamlı olarak çimlenme oranının

daha yüksek olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). Bu bulgu, kullanılan kapların çimlenme oranı üzerinde belirgin bir etkisi olduğunu göstermektedir.

Işık Faktörü ve Çimlenme Kabı Etkileşimi: "kontrol" ile "kavanozlar" ve "aydınlık" ile "kavanozlar" kombinasyonları, diğer kombinasyonlara kıyasla anlamlı olarak daha yüksek ortalama çimlenme oranları göstermektedir. Bu, bu spesifik kombinasyonlarında daha büyük etkiler olduğunu göstermektedir ($p < 0.05$). Bu bulgular, farklı uygulama ve kabı kombinasyonlarının çimlenme oranı üzerindeki etkilerini detaylandırmakta ve belirli kombinasyonların diğerlerine göre daha yüksek çimlenme oranlarına sahip olduğunu göstermektedir.

4.2. Kallus Oluşumu, Somatik Embriyo ve Sürgün Rejenerasyonu

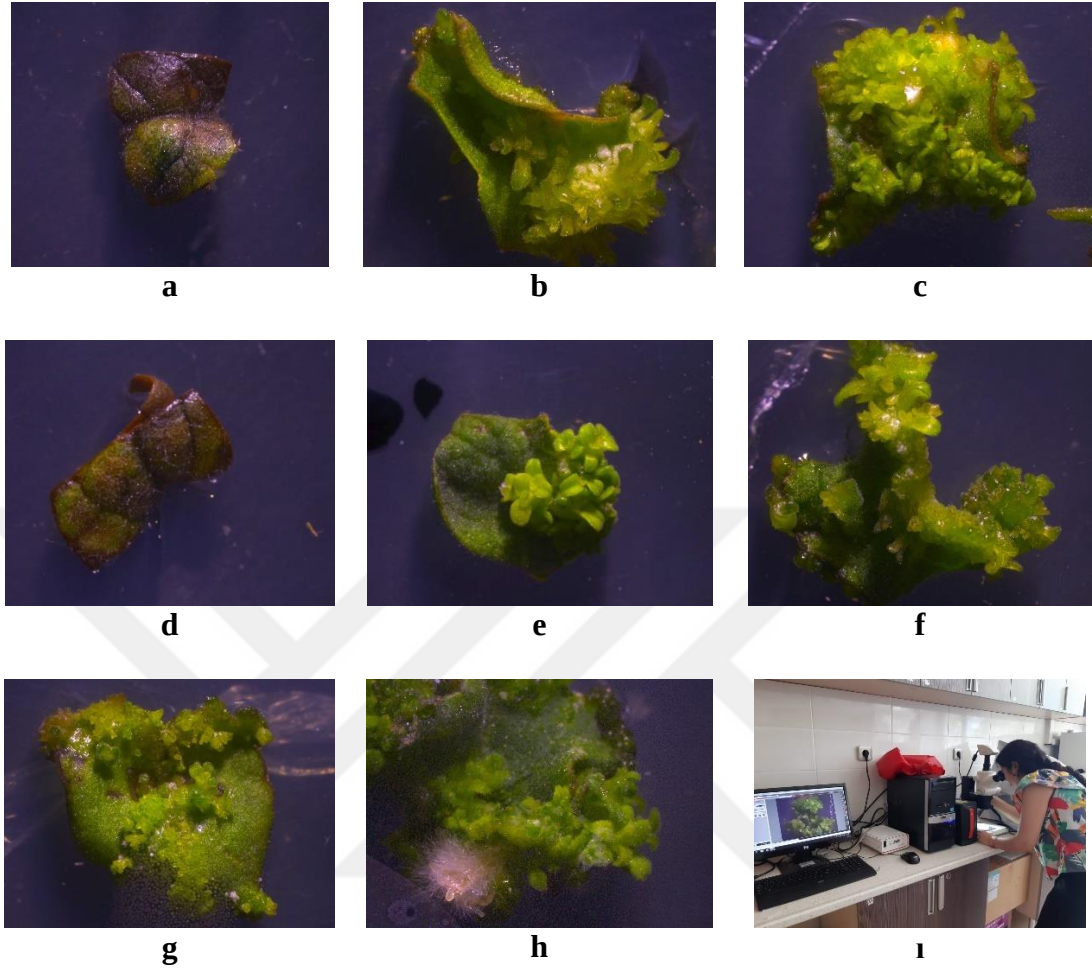
Başarılı bir şekilde MS ortamında elde edilen sağlıklı bitkiciklerin yapraklarından kallus rejenerasyonu oluşturmak amacıyla steril kabin içerisinde, yaklaşık 1 cm² boyutlarında eksplantlar alınarak farklı konsantrasyonlarda BAP ve NAA içeren ortamlara 06.06.2023 tarihinde aktarılmışlardır.

İlk kallus başlangıcı, yaprak eksplantları ortama aktarıldıktan 6 gün sonra M6 ortamında bir adet yaprak eksplantında ve M5 ortamında ise iki adet eksplantta görülmüştür. Yedinci günde ise M1, M2 ve M4 ortamlarında görülmüştür. Kontrol ortamı olan M0 ve M3 ortamlarında 41 günlük süreçte herhangi bir kallus gelişimi gözlenmemiştir. M5 ortamında bir tane eksplantta ilk kök tüyü görülmüştür. Kültür başlangıcından 9 gün sonra kallus oluşumları kesinleşmeye başlamış ve kallus başlangıcından 12 gün sonra M1 ve M2 ortamlarında ilk somatik embriyogenez benzeri yapılar oluşmaya başlamıştır (Şekil 4.3, 4.4 ve 4.5). Kültüre alındıktan iki hafta sonra ise M4, M5 ve M6 ortamlarında somatik embriyogenez benzeri yapılar oluşmaya başlamıştır. Embriyojenik kalluslardan embriyolar meydana gelmiştir. Bazı eksplantlarda ise doğrudan sürgün oluşumları gözlemlenmiştir.

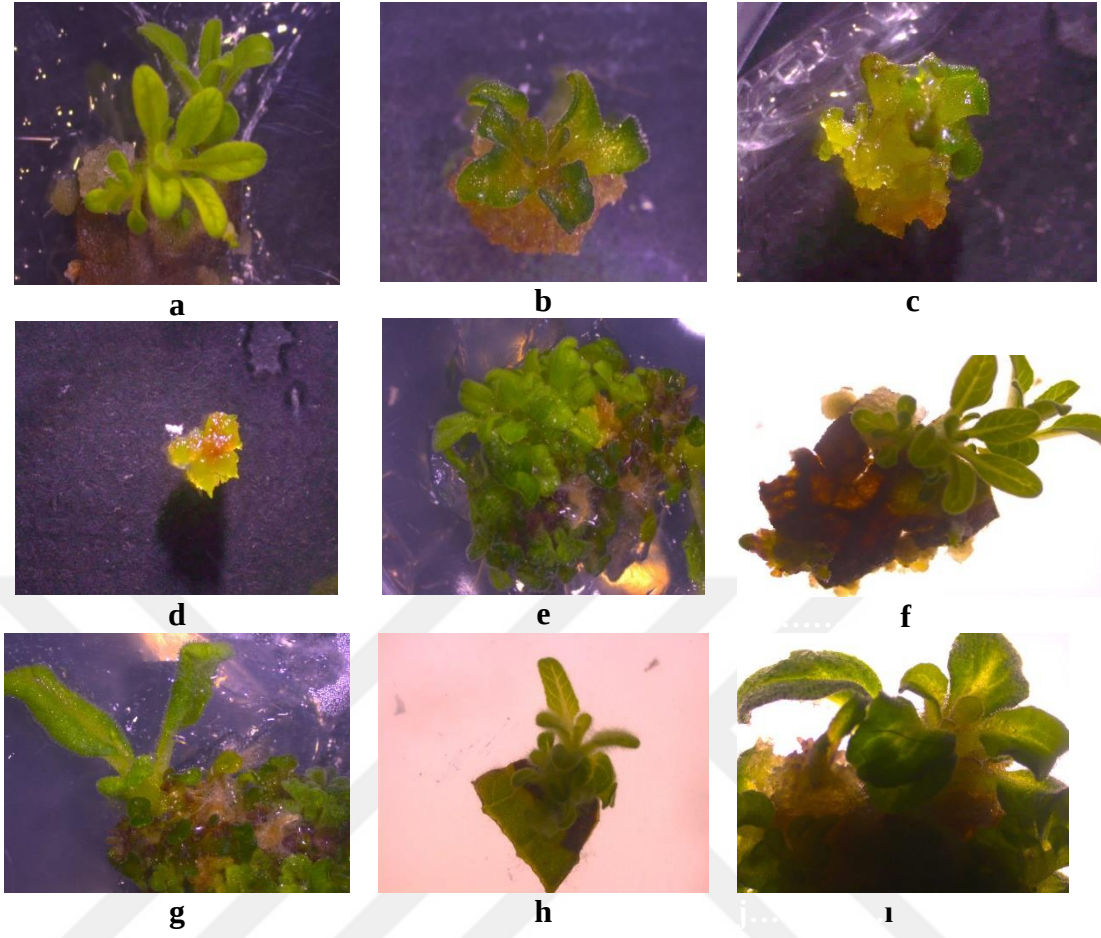
Behera ve Sahoo (2009) tarafından yürütülen benzer bir çalışmada *Saccharum officinarum* L. bitkisinin sürgün rejenerasyonunda en iyi sonucu, 2,0 mg/l BAP ve 0.5 mg/l NAA içeren MS ortamında elde etmişlerdir. Turker vd. (2001) *Verbascum thapsus* bitkisinde yapılan bir çalışmada *in vitro* kültür protokolü geliştirmek amacıyla yaprak diskleri ve petiyol eksplantlarından 13.32 µM BA (benzil adenin) kullanarak en iyi sürgün çoğalmasını elde etmişlerdir. Nasırcılar vd. (2011) tarafından yapılan çalışmada, endemik ve nesli tükenmekte olan *Muscari mirum* Speta bitkisi için *in vitro* üreme protokolü geliştirilmiştir. Çalışmada, soğan pul eksplantlarının en etkili olduğu ve en yüksek besin ortamı veriminin MS besin ortamında 4 mg/L BAP ve 0.25 mg/L NAA kullanılarak elde edildiğini ifade etmişlerdir. Patel vd. (2014) tarafından yapılan çalışmada nesli tükenme tehlikesi bulunan endemik *Caralluma edulis* (Edgew.) Benth. & Hook. bitkisinin boğum segment eksplantlarını kullanarak, sürgünlerin çoğalması için en iyi sonuçların MS ortamında 0.5 mg/L BA, 0.5 mg/L Kin ve 0.1 mg NAA ile elde edildiği belirtmişlerdir. Çetin vd. (2016) tarafından yürütülen bir çalışmada, nesli kritik düzeyde tükenme tehlikesi bulunan, endemik *Erodium somanum*, bitkisinin *in vitro*

mikroçoğaltım araştırmalarının sonucunda elde ettikleri verilere göre, en başarılı sürgün gelişimleri, yaprak eksplantlarında 1 mg/L BAP ile 0,1 mg/L IBA içeren MS ortamında ve sürgün ucu eksplantlarında 2 mg/L BAP ve 1 mg/L IAA içeren MS besin ortamında olduğunu saptamışlardır. Benzer bir çalışmada Karamian ve Ghasemlou (2012) tarafından yürütülen *Verbascum speciosum* Schard. bitkisinde 1.5 mg/l NAA konsantrasyonu en yüksek sıklıkta embriyojenik olmayan kallus rejenerasyonunu sağladığını bildirmişlerdir. BAP olmadan 1.5 mg/l NAA ile indüklenen kalluslar güçlü adventif kök geliştirmişlerdir, ancak kallusların daha fazla büyümesini teşvik etmemiştir. BAP büyüme düzenleyicisinin sürgün gelişimini olumlu etkilediğini NAA'nın ise daha çok kök oluşumunu teşvik ettiğini bildirmişlerdir. Yine Karamian ve Ghasemlou (2014) tarafından yapılan *Verbascum sinuatum* L. bitkisinde olgun embriyo kültürü ile organogenez ve somatik embriyogenez yoluyla bitki rejenerasyonu sağlayan bir protokol geliştirmişler ve embriyojenik kallusları 30 g/l sukroz, 0,5 mg/l aktif kömür, 0,1 veya 1 mg/l 2,4-D içeren MS ortamına ya da 60 g/l sukroz, 50 mg/l kazein hidrolizat, 0,5 mg/l Kin, 5 mg/l 2,4-D ve 0,5 mg/l aktif karbon içeren MS ortamına aktarmışlar; sürgün çoğaltma ve bitki rejenerasyonu için ise sürgünleri 1 mg/l BA veya Kin içeren MS ortamına aktararak BAP veya Kin içeren ortamların çoklu sürgün rejenerasyonu ve rejenerasyon açısından daha etkili olduğunu bildirmişlerdir Habas ve Turker (2019) yürütülen benzer bir mikroçoğaltım çalışmasında *Petunia hybrida* bitkisinde en yüksek sürgün uzunluğunu 1 mg/l BAP ve 1 mg/l NAA içeren MS ortamından elde etmişlerdir. Monney vd. (2016) yapılan başka bir mikroçoğaltım çalışmasında oksin türevi hormonların sürgün rejenerasyonu ve çoğaltma sürecinde çok önemli bir rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. *Cryptolepis sanguinolenta*'nın nodal segment eksplantlarının sürgün rejenerasyonu ve çoğaltılmasında BA ve IBA kombinasyonlarının, BAP ve NAA kombinasyonlarından daha etkili olduğunu belirtmişlerdir. Benziladenin (BA) ve NAA kombinasyonları, kontrol grubuna göre daha düşük oranda sürgün indüksiyonları üretmiş ve sürgün indüksiyonuna ulaşılacak ortalama gün sayısı daha uzun olduğunu ifade etmişlerdir. Huang vd. (2024) *Dendrocalamus Brandisii* bitkisinde yürütülen mikroçoğaltım çalışmasında, 3 mg/L BA ve 0.1 mg/L NAA ile desteklenen MS ortamının en yüksek çoğalma oranlarını sağladığı bildirmişlerdir. Ayrıca, sürgün çoğalması için 5 mg/L BA ve 1 mg/L NAA içeren ortamların en etkili olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, BA ve NAA büyüme düzenleyicilerinin mikroçoğaltım verimliliğinde önemli etkilere sahip olduğunu göstermiştir. Torregrosa ve Bouquet (1996), sürgün rejenerasyonunun yalnızca BAP varlığında elde edilebileceğini, ancak oksin organojenik yanıtı artırabileceğini belirtmişlerdir Yüksek frekansta adventif sürgün rejenerasyonu elde etmek için, oksin ve sitokinin konsantrasyonlarını ve kombinasyonlarını iyi ayarlamak gerektiğini dile getirmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan en yüksek BAP ile düşük NAA kombinasyonun sürgün rejenerasyonu yeteneğini artırdığı sonucuna varılmıştır.

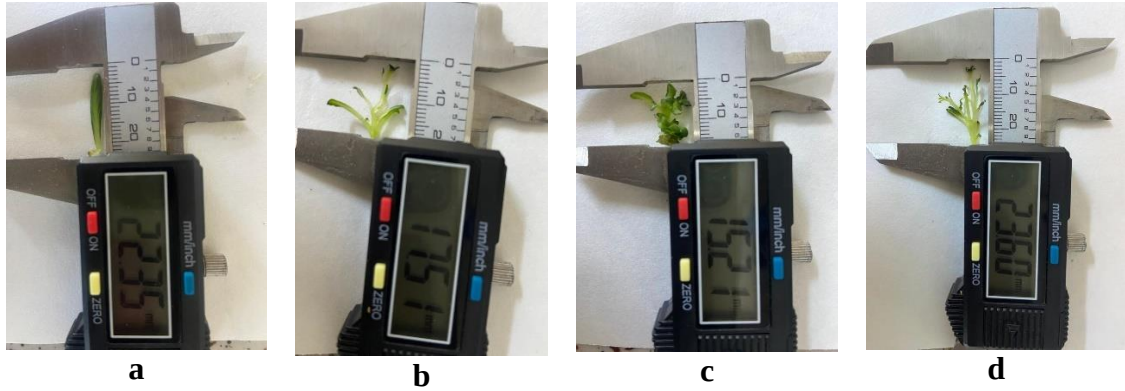
Sonuç olarak *Verbascum leptocladum* için yapılan uygulama diğer çalışmalarla kıyaslandığında BAP ve NAA hormonlarının farklı bitki türlerinde sürgün çoğalmasını teşvik ettiğini ve *Verbascum leptocladum* bitkisindeki bulgularla tutarlı olduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar, büyüme düzenleyici kombinasyonlarının bitki türüne ve eksplant tipine bağlı olarak değişkenlik gösterebileceğini, ancak genel olarak yüksek sitokinin ve düşük oksin kombinasyonlarının sürgün çoğalmasında etkili olduğunu ortaya koymaktadır.



Şekil 4.3. Işık Mikroskobu (LEICA DM750) altındaki farklı ortamlara ait rejenerasyon başlangıcı görüntüleri (Kültür başlangıcından 17 gün sonra); **a)** kontrol ortamında yaprak eksplantı; **b)** M1 ortamında somatik embriyogenez; **c)** M2 ortamında somatik embriyogenez **d)** M3 ortamında yaprak eksplantı; **e)** M4 ortamından direk sürgün oluşumu; **f)** M5 ortamında embriyojenik kallus ve embriyo oluşumu; **g)** M6 ortamında embriyojenik kallus; **h)** M4 ortamındaki kök tüyleri; **i)** mikroskopta gözlem alma



Şekil 4.4. Işık Mikroskobu altındaki farklı ortamlara ait sürgün ve embriyo rejenerasyon görüntüleri (Kültür başlangıcından 41sonra); **a)** M2 ortamına ait kallustan sürgün oluşumu; **b)** M4 ortamına ait kallustan sürgün oluşumu; **c)** M1 ortamına ait somatik embriyogenez oluşumu; **d)** M2 ortamında erken somatik embriyogenez; **e)** M5 ortamına ait doğrudan sürgün rejenerasyonu; **f)** M2 ortamına ait direkt sürgün oluşumu; **g)** M2 ortamına ait somatik embriyogenez rejenerasyonu; **h)** M4 ortamına ait direkt sürgün oluşumu ; **i)** M6 ortamında kallustan sürgün rejenerasyonu



Şekil 4.5 Kumpas yardımıyla farklı ortamlara ait bitkiciklerin ölçümü **a)** M6 ortamına ait yaprak ölçümü; **b)** M1 ortamına ait sürgün ölçümü; **c)** M5 ortamına ait sürgün ölçümü; **d)** M4 ortamına ait sürgün ölçümü

Çizelge 4.2 ve 4.3 ile Şekil 4.6’da farklı uygulamaların (M0’dan M6’ya kadar) eksplant başına sürgün sayısı üzerindeki etkisi verilmiştir. M0 ve M3 ortamları sürgün vermemiş ve istatistiki olarak aynı grupta yer almıştır. M0 ve M3 ortamları hariç bütün uygulamalarda hem kallus oluşturma hem de sürgün oluşturma oranı %100 olmuştur. M6 uygulamasında 29,40 adet ile eksplant başına en yüksek sürgün sayısı elde edilmiş ve onu sırasıyla M5 uygulaması (27,47) takip etmiştir. Ancak, istatistiki olarak aynı grupta yer almışlardır. M2 (23,25 adet) ve M4 (22,52 adet) uygulamaları eksplant başına orta düzeyde sürgün sayısına sahip oldukları tespit edilmiştir. M1 (17,77 adet) uygulaması ise, M6, M5 M4 ve M2’ye göre eksplant başına en az sürgün sayısına sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, her bir uygulamanın sürgün sayısı üzerindeki etkisinin istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur.

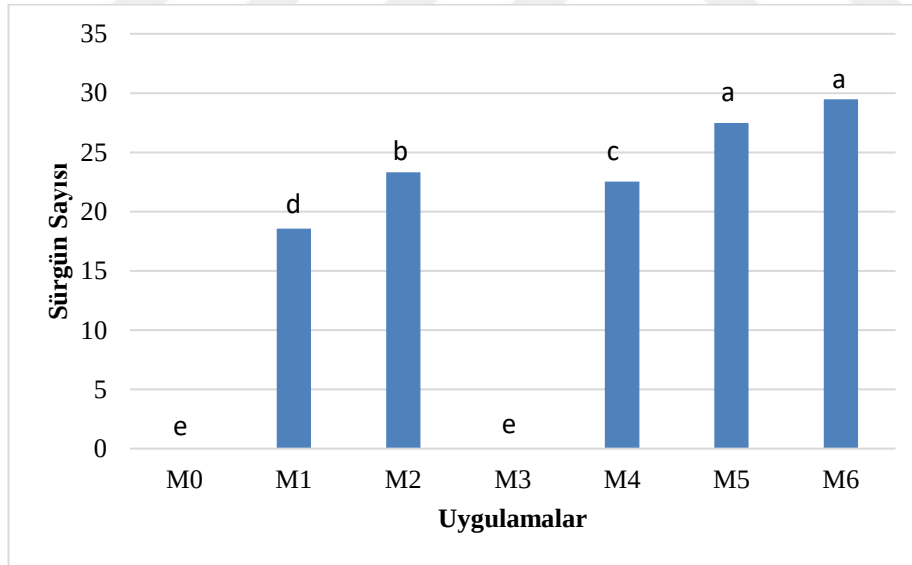
Çizelge 4.2. Sürgün sayılarına ait ANOVA Varyans Analizi

Kaynak	DF (Serbestlik Derecesi)	Kareler Toplamı	Ortalama Kareler	F Oranı	P Oranı
Uygulama	6	7311.4343	1218.57	225.8228	<0.0001*
Hata	49	264.4150	5.40		
C toplam	55	7575.9593			

Çizelge 4.3.Kullanılan ortamlardan elde edilen bulgular

Ortam No	Ortamın İçeriği	Kallus oluşturma oranı (%)	Sürgün oluşturma oranı (%)	Eksplant başına sürgün sayısı
M0	Kontrol Ortamı MS	0	0	0e
M1	0.5 BAP+0.25 NAA	100	100	17,77d
M2	1BAP +0.25 NAA	100	100	23,25b
M3	2 BAP+ 0.25 NAA	0	0	0e
M4	0.5 BAP+0.5 NAA	100	100	22,52c
M5	1 BAP+ 0.5 NAA	100	100	27,47a
M6	2 BAP+0.5NAA	100	100	29,40a

Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki fark Fisher LSD testine göre %0.05 seviyesinde önemlidir.

**Şekil 4.6.** Eksplant başına elde edilen sürgün sayısına ait grafik

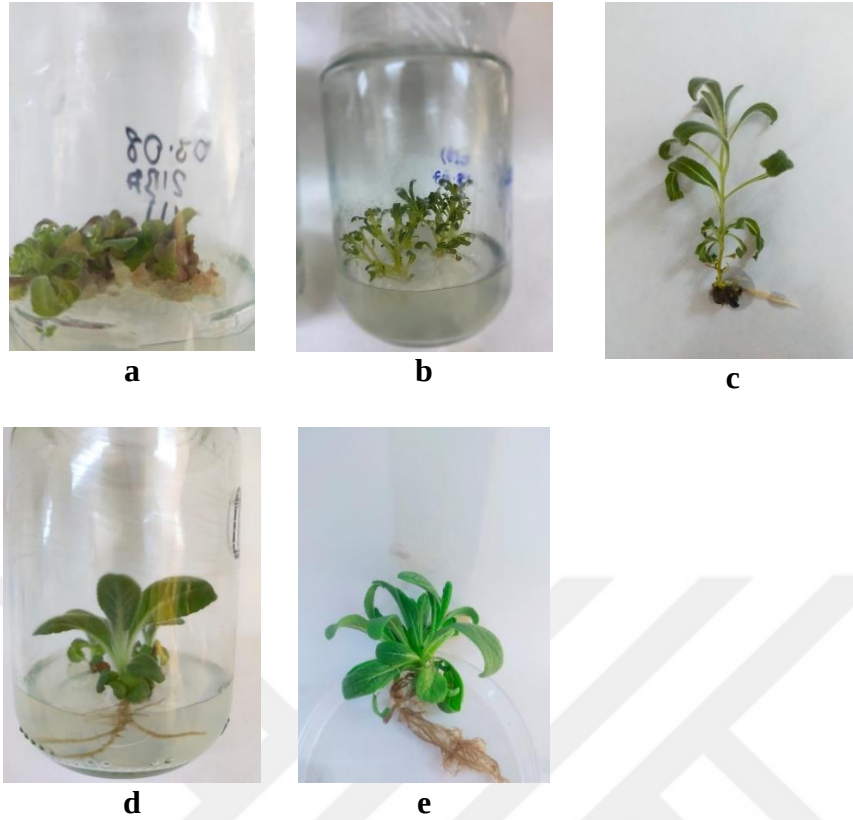
4.3. Köklendirme

Deneme ortamlarında ilk gelişen bitkicikler, köklenmeleri için öncelikle kültür başlangıcından 36 gün sonra 2 mg/L IBA içeren MS ortamına aktarılmaya başlanmıştır.

Ancak 3 hafta içerisinde sadece kallus oluşumu gözlenmiş olup herhangi bir köklenme gelişmediği için ortam değişikliğine karar verilmiştir. İkinci denemede konsantrasyon oranı yarıya düşürülerek $\frac{1}{2}$ MS ve 1mg/L IBA denenmiştir. İki hafta içerisinde, söz konusu ortama alınan bitkiciklerde sürgün gelişimi harici bir değişim gözlemlenmemiştir (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.7). Emek (2018) tarafından yürütülen çalışmada nesli kritik düzeyde tehlikede olan, tıbbi endemik *Micromeria dolichodon* P.H. Davis türünün *in vitro* şartlarda elde edilen sürgünlerin en yüksek kök oluşumunu 0.5 mgL^{-1} IBA içeren $\frac{1}{2}$ MS ortamında elde etmişlerdir. Yordanova vd. (2016) da benzer bir çalışmada *Verbascum eriophorum* bitkisinde IBA'nın (0,1, 0,5 ve 1,0 mg/L) kök oluşumunu teşvik ettiği ancak sürgün ve yaprak oluşumunu baskıladığını bildirmiştir. Ancak, bizim bulgularımız tam tersini göstermiştir; 2 mg/L IBA konsantrasyonu, kallus ve sürgün oluşumunu teşvik ederken, kök oluşumunu baskılamıştır (Çizelge 4.3 ve Şekil 4.7). Bu farklılık, kullanılan IBA konsantrasyonlarının etkilerinin bitki türüne ve spesifik kültür koşullarına bağlı olarak değişebileceğini göstermektedir. Türker vd. (2001) tarafından yürütülen benzer çalışmada, *Verbascum thapsus* bitkisi için en etkili köklenme ortamını $5,37 \mu\text{M}$ NAA içeren ortamda elde etmişlerdir. Karamian ve Ghasemlou (2014) tarafından yapılan *Verbascum sinuatum* üzerindeki bir çalışmada köklenmeyi 3 mg/L NAA ortamından elde etmişlerdir. Yine Karamian ve Ghasemlou (2012) tarafından *Verbascum speciosum* türünde yapılan benzer bir çalışmada embriyojenik olmayan kalluslardan NAA ve BA içeren veya hormonsuz MS ortamından, somatik embriyolardan ise hormonsuz MS ortamından *in vitro* köklenme başarılmıştır. Bu nedenle son olarak köklendirme için iki farklı besin ortamı daha denenmiştir. Bu kapsamda hormon içermeyen $\frac{1}{2}$ MS ile tam MS0 ortamlarına bitkiler köklenmek üzere aktarılmıştır. MS0 ortamında ilk köklenme 8 gün sonra başlamış olup %70 başarı sağlanmıştır. Buna karşın $\frac{1}{2}$ MS0 ortamında kültür süresinin 15. gününde ilk köklenme görülmüştür ve MS0'a göre köklenme oranı (%20) çok daha az gerçekleşmiştir.

Çizelge 4.4. Kullanılan farklı köklendirme ortamlarında kök gelişimi

Köklendirme Ortamı	Başarı Oranı	Etkisi	İlk Köklenme
MS + 2 mg/L IBA	%0	Kallus gelişimi	Köklenme oluşmadı
$\frac{1}{2}$MS0 +1 mg/L IBA	%0	Sürgün gelişimi	Köklenme oluşmadı
$\frac{1}{2}$MS0	%20	Köklenme	19 gün sonra ilk köklenme
MS0	%70	Köklenme	8 gün sonra ilk köklenme



Şekil 4.7. Farklı ortamlarda köklendirme çalışmasına ait görüntüler; **a)** 2 mg/L IBA ortamında kallus oluşumu (Kültür başlangıcından 20 gün sonra); **b)** 1/2 MS + 1 mg/L IBA ortamında sürgün oluşumu ; **c)** 1/2 MS ortamdan alınıp MS0 köklenme ortamına aktarılan bitkicik (Kültür başlangıcından 17 gün sonra); **d)** MS0 ortamında köklenmiş bitkicik (Kültür başlangıcından 22 gün sonra) **e)** MS0 köklenme ortamından aklimatizasyona alınacak bitkicik (Kültür başlangıcından 1 ay sonra)

4.4. Bitkileri Dış Koşullara Alıştırma

Sürekli *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş ve köklenmiş olan bitkiler, plastik örtüler altında kademeli olarak dış koşullara alıştırılmıştır. Öncelikle köklenmiş bitkicikler, kavanozlardan pens yardımıyla çıkarılarak köklerdeki agar atıkları akan suyun altında temizlenmiştir. Agardan tamamen arındırılan bitkicikler, 2:1 oranında torf perlit içeren hazırlanmış saksılara dikilmiştir. Bitkiler iklim şartlarına uyum sağladıktan sonra daha büyük saksılara aktarılarak Güney Agripark Ar-Ge Merkezi araştırma serasına alınmıştır (Şekil 4.8). Bitkiler burada çiçeklenme dönemine kadar büyümeye bırakılmıştır. Dış koşullara alıştırma başarı oranı %90 olarak gerçekleşmiştir. Karamian ve Ghasemlou (2014) tarafından *Verbascum sinuatum* L. bitkisinde yürütülen benzer bir çalışmada doku kültüründen elde edilen bitkiler aklimatizasyon için perlit ile karıştırılmış steril toprağa transfer edilerek yüksek nem sağlamak amacıyla plastik torbalarla kapatılmışlardır. İki hafta sonra plastik torbalar çıkarılmış ve bitkiler dış

ortam koşullarına aktarılmıştır. Dış koşullara alıştırmamanın 3. haftasında tüm fideler hayatta kalmıştır.

**a****b****c****d****e****f**

Şekil 4.8. Farklı dönemlere ait aklimatizasyon işlemlerine ait görüntüler; **a)** *in vivo* koşullara aktarılabacak olan bitkicikler; **b)** aklimatizasyona alınmış büyütme kabinindeki bitkiler (30.10.2023); **c)** Güney Agripark'ta viyollere dikilen fideler (15.12.2023); **d)**; viyollerden saksılara aktarılmış bitkiler (29.03.2024); **e)** çiçeklenme için sapa kalkan (29.03.2024) ;**f)** çiçeklenme dönemindeki bitki (30.04.2024)

5 SONUÇLAR

Tohum sterilizasyonu bu araştırmanın önemli temel adımlarından birisi olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre: *Verbascum leptocladum* tohumları için en uygun yüzey sterilizasyon protokolü; %70 etil alkol ile 40 saniye muamele, ardından 3 damla Tween-20 içeren %15 sodyum hipoklorit çözeltisi ile 15 dakika muamele ve sonrasında üç kez saf suda durulama olarak belirlenmiştir. Bu protokol, yüksek çimlenme oranı ve kontaminasyonun minimal düzeyde tutulması açısından en etkili yöntem olarak seçilmiştir. Ayrıca, %100 oranında kullanılan etil alkolün tohumlara zarar verdiği ve çimlenmeyi engellediği sonucuna varılmıştır.

Başarılı bir sterilizasyon protokolü elde edildikten sonra tohumların ışık koşullarına ve kültür kabı farklılıklarına bağlı olarak çimlenme oranına etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre yarı aydınlık ve yarı karanlık ışık koşullarında en iyi çimlenme oranını elde edilmiştir. Aydınlık ışık koşullarındaki verilerde dikkate alınacak değerde yüksektir. Fakat karanlık ortamdaki tohumların çimlenme oranı çok daha düşük olarak saptanmıştır. Bunun nedeni ise karanlık koşullarda giberellin ve etilen gibi hormonların karanlıkta bitkinin uzamasını teşvik etmesidir. Ayrıca, bitkiler büyümek için gerekli ışığa ulaşamayınca ışık arayışına girerek boylarını uzattıklarında gövdeleri incelmektedir. (Colebrook vd.2014). *Verbascum* türlerinin çimlenmesi, fotoperiyotun varlığında (özellikle 12 saat ışık/12 saat karanlık döngüsünde) daha yüksek oranda gerçekleşmektedir. Bu bulgular, *Verbascum* türlerinin habitat tercihleri ve ekolojik rollerine dair önemli ipuçları sunmaktadır. Fotoperiyot, özellikle tohum çimlenmesinde kritik bir faktör olup, bu türlerin çimlenme başarısını ve erken dönem büyüme performansını belirleyici bir rol oynamaktadır. Bu sonuçlar *Verbascum* türlerinin çimlenmesi, fotoperiyotun önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Kültür kabı olarak ise kavanozdaki çimlenme oranı petriye göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun bazı nedenleri: Kavanozlar genellikle daha büyük bir hacme sahiptir ve bu, tohumlar için daha geniş bir büyüme alanı sağlar. Kavanozlar genellikle daha iyi bir nem kontrolü sağlayabilir. Nem, tohum çimlenmesi için kritik öneme sahiptir ve uygun nem seviyeleri çimlenmeyi teşvik edebilir. Kavanozlar genellikle petri kaplarından daha fazla ışık geçirgenliğine sahiptir.

En yüksek sürgün oluşumu 2 mg/L BAP ve 0.5 mg/L NAA'da içeren MS ortamından elde edilmiştir. Sitokinin büyüme düzenleyicisi olan BAP, sürgün oluşumunu belirgin şekilde teşvik etmektedir. Genellikle ortamlardaki BAP konsantrasyonu arttıkça sürgün sayısı da artmaktadır. Oksin türlerinden olan NAA ise kallus ve kök oluşumu için kullanılmaktadır. NAA ve BAP birlikte kullanıldığında sürgün oluşumunu teşvik etmektedir. Düşük miktarda kullanılan NAA sürgün oluşumunu baskılayabilmektedir. Orta düzeyde kullanılan NAA ise olumlu etki etmektedir. Belirli bir oranda kullanılan optimum NAA sürgün oluşumunu maksimum seviyeye çıkarmada yardımcı olmaktadır. Elde edilen veriler *Verbascum leptocladum*'un yüksek sürgün rejenerasyonuna sahip olduğunu göstermektedir. Bu doğrultuda ileride koruma amaçlı yapılacak mikroçoğaltım tekniğin başarılı sonuçlar vermesi beklenebilir. Mikro sürgünlerin *in vitro* koşullarda köklendirilmesi için sadece MS0 ortamı yeterli olmaktadır. Doku kültürü şartlarında elde edilen sağlıklı bitkilerin dış koşullara adaptasyon oranının kayda değer bir şekilde yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. *Verbascum leptocladum*'un albenili çiçeklerinin dış ortam peyzaj bitkisi

olarak değerlendirilebileceği de bir diğer etmendir. Bu oluşturulan protokoller, bitkinin büyük ölçekli çoğaltılması ve germplazmın korunması için etkili bir yöntem olarak geliştirilmiştir.



6 KAYNAKLAR

- Abed, A. S., Majeed, D. M., Mohammed, M. A., & Jasim Al-Jibouri, A. M. 2020. In vitro influences of sugar nutrition and light condition on accumulation of some phytochemicals in *Verbascum thapsus* L. culture. *Plant Archives* (09725210), 20(1).
- Aboutabl, E. A., Goneid, M. H., Soliman, S. N., & Selim, A. A. 1999. Analysis of certain plant polysaccharides and study of their antihyperlipidemic activity. *J. Pharm. Sci*, 24, 187-195.
- Akin, B. (2021). In vitro Germination and Phytoremediation Potential of Endemic Plant Species *Verbascum phrygium* Bornm. Growing under Zinc Stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 30(2).
- Alabadí, D., Gil, J., Blázquez, M. A., & García-Martínez, J. L. 2004. Gibberellins repress photomorphogenesis in darkness. *Plant physiology*, 134(3), 1050-1057.
- Ali, A. A. M. I. R., Munawar, A. S. I. F. A., & Naz, S. H. A. G. U. F. T. A. (2007). An in vitro study on micropropagation of *Caladium bicolor*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 9(5), 731-735.
- Al-Jibouri, A. M. J., Abed, A. S., Ali, A. J. A., & Majeed, D. M. (2016). Improvement of phenols production by amino acids in callus cultures of *Verbascum thapsus* L. *American Journal of Plant Sciences*, 7(1), 84-91.
- Almeida, R., Gonçalves, S., & Romano, A. 2005. In vitro micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodiversity & Conservation*, 14, 1059-1069.
- Babich, O., Sukhikh, S., Pungin, A., Ivanova, S., Asyakina, L., & Prosekov, A. (2020). Modern trends in the in vitro production and use of callus, suspension cells and root cultures of medicinal plants. *Molecules*, 25(24), 5805.
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. 1981. Seasonal changes in germination responses of buried seeds of *Verbascum thapsus* and *V. blattaria* and ecological implications. *Canadian Journal of Botany*, 59(9), 1769-1775.
- Başer K.H.C, 2015 Bağbahçe dergisi ,61, (eylül-ekim), 22-23
- Bauer, A., & Brönstrup, M. 2014. Industrial natural product chemistry for drug discovery and development. *Natural product reports*, 31(1), 35-60.
- Baytop, T. 1984. *Türkiyede bitkiler ile tedavi (geçmişte ve bugün)* (No. 3255). İstanbul
- Behera, K. K., & Sahoo, S. 2009. Rapid in vitro micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L. cv-Nayana) through callus culture. *Nature and science*, 7(4), 1-10.

- Benson, E. E., Danaher, J. E., Pimbley, I. M., Anderson, C. T., Wake, J. E., Daley, S., & Adams, L. K. (2000). In vitro micropropagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodiversity & Conservation*, 9, 711-726.
- Catara, S., Cristaudo, A., Gualtieri, A., Galesi, R., Impelluso, C., & Onofri, A. 2016. Threshold temperatures for seed germination in nine species of *Verbascum* (*Scrophulariaceae*). *Seed Science Research*, 26(1), 30-46.
- Coelho, N., Gonçalves, S., & Romano, A. (2020). Endemic plant species conservation: Biotechnological approaches. *Plants*, 9(3), 345.
- Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L., & Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of experimental biology*, 217(1), 67-75.
- Cristea, V., Palada, M. A., Jarda, L., & Butiuc-Keul, A. 2013. Ex situ *in vitro* conservation of *Dianthus spiculifolius*, endangered and endemic plant species. *Studia Universitatis Babeş-Bolyai Biologia*, 58(1), 57-69.
- Çalis, İ., Gazar, H. A., Bedir, E., & Khan, I. A. 2002. Phenylethanoid glycosides with free radical scavenging properties from *Verbascum wiedemannianum*. In *Biodiversity: Biomolecular Aspects of Biodiversity and Innovative Utilization* (pp. 257-260). Boston, MA: Springer US.
- Çetin, B., Eren, H., Oskay, D., & Akanıl Bingöl, N. 2016. Kritik tehlikedeki (CR) endemik *Erodium somanum* türünün *in vitro* mikroçoğaltımı. *CBÜ Fen Bil Derg*, 12(1), 115-120.
- Davis, P. H. 1970. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol. 3. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*. Vol. 3.
- Duman, H., Uzunhisarcıklı, M. E., & Özbek, F. 2020. A new species of *Verbascum* (*Scrophulariaceae*) from western Turkey. *Botany Letters*, 167(4), 409-416.
- Ekim, T., Koyuncu, M., Vural, M., Duman, H., Aytaç, Z., & ADIGÜZEL, N. 2000. Türkiye bitkileri kırmızı kitabı. Pakdemirli, B., Birişik, N., & Akay, M. (2021). General overview of medicinal and aromatic plants in Turkey. *Anadolu Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Dergisi*, 31(1), 126-135.
- Emek, Y. 2018. *Micromeria dolichodontha* PH Davis' nın *in vitro* aksiller sürgün yoluyla çoğaltımı. *Avrupa Bilim ve Teknoloji Dergisi*, (14), 337-342.
- Endress, R. 1994. Culturing of plant cells. In *Plant Cell Biotechnology* (pp. 46-88). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Engelmann, F. 2011. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 47, 5-16.

- Ertem, M., & Sait, A. D. A. K. 2021. Endemik *Verbascum linearilobum* türünde Gibberellik asit ve Potasyum Nitrat'ın Çimlenme ve Canlılık Üzerine Etkisi. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 36(1), 173-195.
- Eyiiiş, 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.
- Eyüboğlu, F. 2022. Türkiye'deki Bazı *Verbascum* L.(Grup J)(*Scrophulariaceae*) Türlerinin Polen Morfolojisi.
- Faydaoğlu, E., & Sürücüoğlu, M. S. 2011. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. *Kastamonu University Journal of Forestry Faculty*, 11(1), 52-67.
- Gross, K. L. (1985). Effects of irradiance and spectral quality on the germination of *Verbascum thapsus* L. and *Oenothera biennis* L. seeds. *New phytologist*, 101(3), 531-541.
- Güner, A., & Aslan, S. (Eds.). 2012. *Türkiye bitkileri listesi:(damarlı bitkiler)*. Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi Yayınları.
- Habas, R. R., Turker, M., & Ozdemir, F. A. 2019. In vitro multiple shoot regeneration from *Petunia hybrida*. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 7(10), 1554-1560.
- Hawkes, J. G. 1997. Plant genetic conservation the in situ approach.
- Hilooğlu, M., & Sözen, E. 2017. Nadir Endemik *Verbascum Alyssifolium* Boiss. Taksonunun Toprak-Bitki İlişkisi Açısından İncelenmesi.
- Huang, L., Zhang, Y., Zhou, C., Zhu, F., Lv, Z., & Wang, S. 2024. Establishment of micropropagation system of *Dendrocalamus brandisii*. *Brazilian Journal of Botany*, 47(1), 1-11.
- IUCN.The IUCN Red List of Threatened Species. Version2019-2. Availableonline: <http://www.iucnredlist.org> (Son Erişim Tarihi 20.07.2024).
- Kahraman, C., Tatlı, I. I., Orhan, I. E., & Akdemir, Z. S. 2010. Cholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Verbascum mucronatum* Lam. and its secondary metabolites. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 65(11-12), 667-674.
- Karamian, R., & 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., & Ghasemlou, F. 2014. Plant regeneration via organogenesis and somatic embryogenesis in *Verbascum sinuatum* L. *Acta Biologica Cracoviensia. Series Botanica*, 56(1).

- Kataria, V., & Shekhawat, N. S. 2005. Cloning of *Rauvolfia serpentina*-an endangered medicinal plant. *Journal of sustainable forestry*, 20(1), 53-65.
- Kaya, Y., & Aksakal, Ö. 2005. Endemik bitkilerin dünya ve Türkiye'deki dağılımı. *Erzincan Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi*, 7(1), 85-99.
- KILIÇ, F. M., & KILIÇ, M. 2023. Şanlıurfa'da yayılış gösteren endemik *Verbascum stepporum* Murb., ve *Verbascum tenue* Hub.-Mor.,(Scrophulariaceae) türleri üzerinde anatomik araştırmalar. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 16(2), 132-139.
- KÜÇÜK, S. 2017. Endemik *Verbascum bellum* Hub. and Mor.(Scrophulariaceae) türünün anatomik özellikleri. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi-C Yaşam Bilimleri ve Biyoteknoloji*, 6(1), 22-30.
- Mihailović, V., Kreft, S., Benković, E. T., Ivanović, N., & Stanković, M. S. (2016). Chemical profile, antioxidant activity and stability in stimulated gastrointestinal tract model system of three *Verbascum* species. *Industrial Crops and Products*, 89, 141-151.
- Monney, M. A. D., Amissah, N., & Blay, E. 2016. Influence of BA and IBA or NAA Combinations on Micropropagation of *Cryptolepis sanguinolenta*. *American Journal of Plant Sciences*, 7(3), 572-580.
- Nagakubo, T., Nagasawa, A., & Ohkawa, H. 1993. Micropropagation of garlic through in vitro bulblet formation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32, 175-183.
- Nasircilar, A. G., Mirici, S., KARAGÜZEL, Ü. Ö., EREN, Ö., & Baktir, I. 2011. In vitro propagation of endemic and endangered *Muscari mirum* from different explant types. *Turkish Journal of Botany*, 35(1), 37-43.
- Oda, A., & Furuya, M. 1976. Regulation of seedling growth and differentiation by the light environment: I. The action of light on the growth of etiolated maize seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 17(4), 735-742.
- Öztürk, M., Altundağ, E., & Gücel, S. 2012. Medicinal and aromatic plants (Turkey). *Ethnopharmacology, Encyclopedia of Life Support Systems*, 179-204.
- Panwar, D., Ram, K., & Shekhawat, N. S. 2012. In vitro propagation of *Eulophia nuda* Lindl., an endangered orchid. *Scientia Horticulturae*, 139, 46-52.
- Patel, A. K., Phulwaria, M., Rai, M. K., Gupta, A. K., Shekhawat, S., & Shekhawat, N. S. (2014). In vitro propagation and ex vitro rooting of *Caralluma edulis* (Edgew.) Benth. & Hook. f.: an endemic and endangered edible plant species of the Thar Desert. *Scientia Horticulturae*, 165, 175-180.
- Prutpongse, P., & Gavinlertvatana, P. 1992. In vitro micropropagation of 54 species from 15 genera of bamboo. *HortScience*, 27(5), 453-454.

- Rathore, J. S., Rathore, V., Shekhawat, N. S., Singh, R. P., Liler, G., Phulwaria, M., & Dagla, H. R. (2004). Micropropagation of woody plants. In *Plant biotechnology and molecular markers* (pp. 195-205). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Redhwan, A., Acemi, A., & Özen, F. 2023. Effects of plant growth regulators on in vitro seed germination, organ development and callogenesis in *Pancreaticum maritimum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 154(1), 97-110.
- Roy, S. C., & Sarkar, A. (1991). In vitro regeneration and micropropagation of *Aloe vera* L. *Scientia Horticulturae*, 47(1-2), 107-113.
- Seçmen, Ö. (1996). Türkiye florası. *Ege Üniversitesi. Fen Fakültesi Teksirler serisi. İzmir.*
- Sedki, M., Finti, A. E., & El Mousadik, A. Enhancing postharvest quality of *Opuntia ficus-indica* L. in southern Morocco.
- Selseleh, M., Ebrahimi, SN, Aliahmadi, A., Sonboli, A. ve Mirjalili, MH 2020. Bazı İran *Verbascum* L. türlerinin metabolik profili, antioksidan ve antibakteriyel aktivitesi. *Endüstriyel bitkiler ve ürünler*, 153, 112609.
- Sener, A., & Dulger, B. 2009. Antimicrobial activity of the leaves of *Verbascum sinuatum* L. on microorganisms isolated from urinary tract infection. *Afr J Microbiol Res*, 3(11), 778-781.
- Shafi, A., Hassan, F., Zahoor, I., Majeed, U., & Khanday, F. A. 2021. Biodiversity, management and sustainable use of medicinal and aromatic plant resources. *Medicinal and aromatic plants: healthcare and industrial applications*, 85-111.
- Stanilova, M., Stoyanov, S., Sidzhimova, B., & Traykova, 2015. B. Preservation Of The Bulgarian Endemic *Verbascum Davidoffii* (*Scrophulariaceae*) By Means Of In Vitro Propagation.
- Strange, R. (1977). A history of herbal plants. *Angus and Robertson Publisher.*
- Şehirali, S. 1987. *Bitkisel Gen Kaynakları*. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi.
- TAŞGIN, S., & Hasan, ASİL. 2021. Endemik amanos sığır kuyruğu (*Verbascum amatum* BOISS) ve Belen sığır kuyruğunun (*Verbascum caesareum*) tıbbi özellikleri. *Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 14(1), 40-44.
- Tegegn, G., Melaku, Y., Aliye, M., Abebe, A., Abdissa, N., Meresa, A., & Endale, M. (2024). In vitro antimicrobial and antioxidant activities, essential oil composition, and in silico molecular modeling analysis of secondary metabolites from roots of *Verbascum sinaiticum*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, (0).
- Temporiti, M. E. E., Frezza, C., Beccaccioli, M., Gelardi, L., Bianco, A., Bonina, F. P., & Nielsen, E. 2020. Production of verbascoside and its analogues in in vitro

- cultures of *Verbascum thapsus* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140(1), 83-93.
- Tokuhara, K., Sato, H., Abe, A., & Mii, M. 2023. In vitro optimization of seed germination and protocorm development in *Gastrochilus japonicus* (Makino) Schltr.(Orchidaceae). *Plant Growth Regulation*, 101(3), 693-702.
- Torregrosa, L., & Bouquet, A. 1996. Adventitious bud formation and shoot development from in vitro leaves of *Vitis x Muscadinia* hybrids. *Plant cell, tissue and organ culture*, 45, 245-252.
- Turker, A. U., Camper, N. D., & Gurel, E. 2001. In vitro culture of common mullein (*Verbascum thapsus* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37, 40-43.
- Tuzlacı, E., & Erol, M. K. 1999. Turkish folk medicinal plants. Part II: Eğirdir (Isparta). *Fitoterapia*, 70(6), 593-610.
- Türkiye Bitkileri Veri Servisi. 2023. Türkiye Bitkileri Veri Servisi. <https://turkiyebitkileri.com> (Son Erişim Tarihi 15.07.2024).
- Yiğit, N., & Kurt, L. (t.y.). BİY 483: Çevresel Etki Değerlendirme Ders Notları. Ankara Üniversitesi. <https://acikders.ankara.edu.tr/course/view.php?id=2027> (Son Erişim Tarihi:20.06.2024).
- Yordanova, Z. P., Rogova, M. A., & Kapchina-Toteva, V. M. 2016. In vitro propagation of the Balkan endemic species *Verbascum eriophorum* Godr. *Bulg. J. Agric. Sci*, 22, 767-771.
- Yücel, G., Cambaz, E., & Çördük, N. 2023. Determination of nuclear DNA content and chromosome number of *Verbascum scamandri* Murb.(Scrophulariaceae). *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, 38(2), 397-406.
- Zengin, G., Yagi, S., Kopjar, M., Ćorković, I., Uba, A. I., Yildiztugay, E., ... & Eid, A. H. (2023). A comparative study on chemical profiles and biological activities of different extracts of three *Verbascum* species from Turkey: in vitro, in silico and network pharmacological approaches. *Biocatalysis and agricultural biotechnology*, 52, 102834.

ÖZGEÇMİŞ

ŞERİFE ÜNNÜ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2021-2024	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2017-2021	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya