

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

FEN BİLİMLERİ ANABİLİM DALI

***STEVIA REBAUDIANA* BERTONI (ASTERACEAE)'DA *IN VITRO* ÜRETİM
ÇALIŞMALARI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Zeynep DURAK

**HAZİRAN 2017
TRABZON**



KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

STEVIA REBAUDIANA BERTONI (ASTERACEAE)'DA IN VITRO ÜRETİM
ÇALIŞMALARI

Zeynep DURAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce

“YÜKSEK LİSANS (BİYOLOJİ)”

Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 31 / 05 / 2017

Tezin Savunma Tarihi : 19 / 06 / 2017

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Trabzon 2017

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**Biyoloji Ana Bilim Dalında
Zeynep DURAK Tarafından Hazırlanan**

**STEVIA REBAUDIANA BERTONI (ASTERACEAE)'DA IN VITRO ÜRETİM
ÇALIŞMALARI**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun 31 / 05 / 2017 gün ve 1704 sayılı
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Gökhan ABAY

Üye : Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

Üye : Prof. Dr. Kenan YAZICI



Prof. Dr. Sadettin KORKMAZ

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“*Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae)’ da *in vitro* üretim çalışmaları” adlı bu araştırma Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı’nda ‘Yüksek Lisans Tezi’ olarak hazırlanmıştır.

Yüksek lisan tez danışmanlığımı üstlenerek çalışmanın her aşamasında yardımlarını ve ilgisini esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Atalay SÖKMEN’e sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tezin hazırlanması ve verilerin değerlendirilmesi noktasında bilgi ve birikimlerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Ersan BEKTAŞ, Sayın Yrd. Doç. Dr. Mustafa CÜCE’ye, tezin her aşamasında benim kadar emeği olan, her türlü deneyim ve tecrübesini benimle paylaşan Tuba BEKİRCAN’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmam boyunca her türlü destekleri için Figen TOSUN, Filiz TOSUN, Elif Gökçen AVCILAR, Ömer LÜLECİ, Betül TERZİ ‘ye ve tüm öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Zeynep DURAK
Trabzon 2017

TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “*Stevia rebaudiana* Bertoni (Asteraceae)’da *in vitro* üretim çalışmaları” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Atalay SÖKMEN sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuvarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim.19/06/2017

Zeynep DURAK

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|------|
| ÖNSÖZ..... | III |
| TEZ ETİK BEYANNAMESİ..... | IV |
| İÇİNDEKİLER..... | V |
| ÖZET | VII |
| SUMMARY | VIII |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | IX |
| TABLolar DİZİNİ..... | XII |
| 1. GENEL BİLGİLER | 1 |
| 1.1. Giriş..... | 1 |
| 1.2. <i>Stevia</i> Bitkisi Hakkında Genel Bilgi | 2 |
| 1.3. <i>Stevia</i> Türlerinin Sistematikteki Yeri | 4 |
| 1.4. <i>Stevia</i> Bitkisinin Bileşenleri..... | 5 |
| 1.5. Kurutulmuş <i>Stevia</i> Yaprak Ekstrat'ın Kimyasal Bileşenleri | 6 |
| 1.6. Tatlı Bileşiklerin (Steviol Glikosid) Biyosentezi ve Kimyasal Yapıları | 6 |
| 1.7. <i>Stevia</i> Bitkisinin Yetiştirilmesi | 7 |
| 1.7.1. Yetiştirme Koşulları | 8 |
| 1.7.2. <i>Stevia</i> Bitkisinin Tohumlarının Toplanması | 9 |
| 1.8. <i>Stevia</i> Bitkisinin Üretilmesi | 10 |
| 1.8.1. Tohumdan Fide Üretimi | 10 |
| 1.8.2. Çelikten Fide Üretimi | 12 |
| 1.8.3. Doku Kültürü ile Üretimi..... | 12 |
| 1.9. Amaç | 14 |
| 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR | 15 |
| 2.1. Materyal ve Kullanılan Ekipman | 15 |
| 2.2. Yöntemler | 15 |
| 2.2.1. Bitkisel Materyaller | 15 |
| 2.2.2. Besi Ortamının Saptanması ve Hazırlanması | 16 |
| 2.2.3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Konsantrasyonları | 17 |
| 2.2.4. Bitkisel Materyalin Yüzeysel Sterilizasyonu..... | 18 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.2.5. | Kullanılan Alet ve Ekipmanın Sterilizasyonu..... | 18 |
| 2.2.6. | Materyalin Kültüre Alınması | 18 |
| 2.2.7. | Fiziksel Koşullar | 19 |
| 2.2.8. | Gelişme Süresince Yapılan Ölçüm ve Gözlemler | 19 |
| 2.2.8.1. | Kültüre Alınan Eksplantların Gelişme Durumu | 19 |
| 2.2.8.2. | Sürgünlerdeki Glikozit Miktar ve Çeşitlerinin Belirlenmesi | 20 |
| 2.2.8.3. | Kalluslardaki Fenolik Asit Tayini | 20 |
| 2.2.9. | Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi | 21 |
| 3. | BULGULAR..... | 22 |
| 3.1. | <i>Stevia rebaudiana</i> 'nın <i>in vitro</i> kallus oluşumu..... | 22 |
| 3.2. | Fenolik Asit Tayini | 23 |
| 3.3. | Steviozit Tayini..... | 24 |
| 3.4. | <i>Stevia rebaudiana</i> 'nın <i>in vitro</i> Sürgün Oluşumu..... | 24 |
| 3.5. | Stevial Glikozit İçerikleri..... | 25 |
| 4. | TARTIŞMA | 26 |
| 5. | SONUÇLAR..... | 29 |
| 6. | KAYNAKLAR | 30 |
| ÖZGEÇMİŞ | | |

Yüksek Lisans Tezi

STEVIA REBAUDIANA BERTONI (ASTERACEAE)'DA *IN VITRO* ÜRETİM
ÇALIŞMALARI

ÖZET

Zeynep DURAK

Karadeniz Teknik Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN

2017, 34 Sayfa

Bu çalışmanın amacı, *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin doku kültürü ile mikroçoğaltımıdır. Bu amaca uygun olarak yaprak ve nod eksplantları kullanılmıştır. Kallus kültürü için en iyisinin yaprak eksplantı olduğu tespit edilmiştir. Besi ortamı olarak MS kullanılmıştır. Kallus kültürlerinde 3 farklı ortam kullanılmıştır. Bunlar, 1 mg/L TDZ + 1mg/L IBA, 0.1 mg/L IBA + 5 mg/L ZEA ve 0,1mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D'dir. Bunlara ek olarak kallus gelişimini gözlemek amaçlı 5 mg/L 2iP ve 2 mg /L IBA denenmiştir. Bunlardan en iyisinin 1 mg/L TDZ + 1mg/L IBA olduğu tespit edilmiştir. Kallus kültürü için karanlık ve aydınlık ortamlar denenmiştir. Karanlık ortam beyaz renkte, aydınlık ortam yeşil renkte olduğu tespit edilmiştir. Kallus kültürlerindeki örneklerden hiç birinde stevial glikozite rastlanmamıştır. Kallus çalışmasına ek olarak sürgün denelemeri de yapılmıştır. Yapılan sürgün denemelerinde BBD içermeyen MS besi ortamı, BAP (2,5-5-7,5 mg/L) ve KİN (0,5-1-2 mg/L) kullanılmıştır. Bunlardan en etkilisinin BBD içermeyen MS ortamı olduğu tespit edilmiştir. Uygulaması yapılan BAP ve KİN konsantrasyonlarına bakıldığında ise KİN denemelerinin BAP 'tan daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Yapılan sürgün çalışmalarında bir de fenolik içeriğine bakılmıştır. Alınan sonuca göre en yüksek klorojenik miktarının 5 mg/L 2iP ve 2 mg /L IBA olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Mikroçoğaltım, *Stevia rebaudiana*, Kinetin, 2iP, IBA, KİN, BAP, ZEA, NAA, 2,4-D

Master Thesis

SUMMARY

IN VITRO PRODUCTION STUDIES OF *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI (ASTERACEAE)

Zeynep DURAK

Karadeniz Technical University
The Graduate School of Natural and Applied Sciences
Biology Graduate Program
Supervisor: Prof. Dr. Atalay SÖKMEN
2017, 34 Pages

The aim of this work was to assess the production possibilities of *Stevia rebaudiana* Bertoni via plant tissue culture techniques. Leaf and node explants were used for this purpose. Explant from leaves was found to be the best source for callus culture is leaf formation when MS is employed as basal medium supplemented with three different media plant growth regulators including 1 mg / L TDZ + 1 mg / L IBA, 0.1 mg / L IBA + 5 mg / L ZEA and 0.1 mg / L NAA + 0.5 mg / L BAP + 0.5 mg / L 2,4-D. In addition, 5 mg / L 2iP and 2 mg / L IBA were also used as monitoring callus development. In terms of callus formation, the most suitable plant growth regulator combination was 1 mg / L TDZ + 1 mg / L IBA. Dark and light illumination was also assessed and as a result, the former produced white and compact whereas the latter gave rise to green and friable calli. Stevia glucose was not found in the samples obtained from callus cultures. In addition, a shoot formation, e.g. direct organogenesis, was also studied. MS basal medium without growth regulators together with BAP (2.5-5-7.5 mg / L) and KIN (0.5-1-2 mg / L) were used for this purpose. MS without growth regulators was the most effective medium. When compared, KIN was also found to be better than BAP for healthy shoot formation. On the other hand the phenolic contents of samples were evaluated, and chlorogenic acid was found as major phenolic acid, which is especially higher in samples grown on MS media supplemented with 5 mg / L 2iP and 2 mg/L IBA.

Key Words: Micropropagation, *Stevia rebaudiana*, Kinetin, 2iP, IBA, KIN, BAP, ZEA, NAA, 2,4-D

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|-----------------|
| Şekil 1. Stevia – Şeker otu | 2 |
| Şekil 2. <i>Stevia rebaudiana</i> bitkisi..... | 4 |
| Şekil 3. Steviol Aktif Maddesi | 5 |
| Şekil 4. Steviol glikozitlerin kimyasal yapıları | 7 |
| Şekil 5. yaprak ve nod eksplantları..... | 16 |
| Şekil 6. <i>In vitro</i> 'da <i>Stevia sp.</i> kallusları..... | 19 |
| Şekil 7. Yaprak ve nod eksplantlarının besi ortamına aktarılmış şekli | 22 |

TABLolar LİSTESİ

| | <u>Sayfa No</u> |
|---|------------------------|
| Tablo 1. MS besi ortamının makro ve mikro elementleri | 17 |
| Tablo 2. Farklı ortamlarda yetiştirilen S. Rebaudiana kalluslarının klorojenik asit ve sinnamik asit miktarları..... | 23 |
| Tablo 3. G1 ortamında 4 ve 8 hafta süresince büyütölen yetiştirilen S. Rebaudiana kalluslarının klorojenik asit ve sinnamik asit miktarları | 24 |
| Tablo 4. <i>Stevia rebaudiana</i> türüne ait sürgünlerin 4 hafta sonunda farklı BAP ve KİN konsantrasyonlarındaki sürgün sayısı, sürgün boyu, nod sayısı ve yaprak sayısı değerleri | 25 |
| Tablo 5. <i>Stevia rebaudiana</i> türüne ait sürgünlerin 4 hafta sonunda farklı BAP ve KİN konsantrasyonlarındaki stevial glikozid içerikleri | 25 |

KISALTMALAR VE SEMBOLLER DİZİNİ

| | |
|------|-------------------------------------|
| 2iP | N6-[2-isopentenil]adenin |
| BAP | Benzilaminopürin |
| BBD | Bitki Büyüme Düzenleyicisi |
| DCM | Diklorometan |
| EtOH | Etanol |
| g | Gram |
| HCl | Hidroklorik Asit |
| HPLC | High liquid pressure chromatography |
| IAA | İndol-3-Asetik Asit |
| IBA | İndol-3-Bütirik Asit |
| KIN | Kinetin |
| mg | Miligram |
| mm | Milimetre |
| MS | Murashige ve Skoog besi ortamı |
| NAA | Naftalenasetik asit |
| NaOH | Sodyum hidroksit |
| TDZ | Thidiazuron |
| UV | Ultra viole |
| vd. | ve diğerleri |
| rpm | Dakikadaki devir sayısı |
| µm | Mikrometre |

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Geçmişten günümüze kadar insanlık için bitkiler hem besin hem de ilaç kaynakları olarak kullanılmışlardır. Bazı tıp çevrelerince bitkilerin tıbbi yararlarının oransal büyüklüğü reddedilse de, insanoğlunun var olduğu günden bu yana vücudunda hissettiği herhangi bir rahatsızlıktan ötürü çare aradığı kapı doğa ve özellikle de bitkilerdir. “Alternatif Tıp” veya “Tamamlayıcı Tıp” olarak adlandırılan bu çare arayışı geçtiğimiz yüz yılda dikkate değer olup bitkiler üzerinde yapılan çalışmalara hız verilmiştir (Kulkarni, 2000).

Yeryüzünde tüm tüketiciler yaşamlarını sürdürebilmek için ihtiyaç duydukları karbonhidrat, yağ ve proteinler gibi temel besinleri bitkilerden karşılarlar. Primer metabolitler olarak tanımlanan bu bileşikler canlılarda enerjinin açığa çıkarılması, kullanımı, nakli ve dönüşümü, sindirim, kalıtsal materyalin aktarılması ve ifadenmesi gibi yaşamsal süreçlerde işlev görürler. Bu önemli bileşiklerin dışında odun, selüloz, zambak ve lastik gibi bazı yararlı maddeler de bitkilerden elde edilir.

Bitkiler doğal yaşam ortamlarında çok çeşitli düşmanlarla kuşatılmış durumdadır. Bitkilerin, düşmanlarından kaçmak için yer değiştirmeleri söz konusu olmadığına göre, birtakım özel savunma mekanizmaları geliştirmek zorundadırlar. Bunlardan birisi de ürettikleri özel kimyasallardır. İnsanoğlu ise, bu özellikten faydalanarak, tarihin ilk yıllarından günümüze kadar çok sayıda bitkiyi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanmıştır. (Cowan, 1999).

Besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal değerler taşımalarının yanı sıra yüksek bitkiler, başta ilaç sanayi olmak üzere kimya, besin, kozmetik ve zirai mücadele alanlarında yararlanılan doğal ürünleri üretirler. Yaşamsal olarak önem taşımamakla birlikte üretildiği bitkilere bir takım uyumsal değerler ya da avantajlar sağlayan bu bileşiklere ise “sekonder metabolitler” adı verilir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Sekonder Metabolitler; bitkiler tarafından üretilen ve günümüzde birçok sektörde hammadde olarak kullanılan bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, buna karşılık en az bitkinin yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkili primer metabolitler (protein, yağ, karbonhidrat) kadar önemli olan kimyasal maddelerdir.

Genellikle ilaç endüstrisinde kullanılmakta olan sekonder metabolitler steroid ve alkaloidlerdir (URL 1).

İnsanoğlunun çeşitli hastalıkların tedavisinde bitkilerden yararlanma biçimi etken madde'den ziyade, bitkinin kendisine ya da çeşitli yollarla elde edilen özütlerine dayanır. Böyle bir bitkisel tedavi holistik'tir. Günümüzde de, özellikle gelişmekte olan ülkelerde nüfusun %80'i sağlık gereksinimlerini ilk etapta tıbbi bitkilerden sağlamaktadırlar. Dünya nüfusunun %80'inin gelişmekte olan ülkelerde yaşadığı düşünülürse, toplam dünya nüfusunun %64'ü bitkileri tedavi amaçlı olarak kullanmaktadır (Fransworth, 1990).



Şekil 1. Stevia – Şeker otu (URL 6).

1.2. Stevia Bitkisi Hakkında Genel Bilgi

Günümüzde şeker yerine kullanılan birçok tatlandırıcılar mevcuttur (Nabor, 2002). Fakat yiyecek ve içecek endüstrisi ile Gıda Mühendisleri daha güvenli ürün geliştirmek ve tüketicilerin beklentilerine cevap vermek için üretilen gıda ürünlerinin duyu kalitesini iyileştirme çalışmalarına sürekli olarak devam etmektedirler (Cardoso ve Bolini, 2007; Portmann ve Kilcast, 1998).

Bir çok tatlı ve düşük kalorili bileşikler doğada bulunmaktadır. Taumatın, glisirizin, ksilitol, filodulsin, mogrozit ve steviozit bu doğal ürünlerden bazılarıdır (Nabor ve Gelardi, 1986).

Obezite ve kilo artışı, dünyada sağlık açısından en önemli risk oluşturan etmenlerin başında gelmektedir. Bu nedenle insanların zayıflama programlarında ya da günlük yaşamlarında kalorisi düşük ancak tadı yüksek besin ve gıda arayışları çok hızlı bir şekilde

artmaktadır. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi bu kapsamda üzerinde en çok çalışılan bitkilerden birisi olup, halen birçok ülkede bu bitki kaynaklı tatlandırıcı üretimi ve kullanımını devam ettirmektedir (Lemus-Mondaca vd., 2012).

Ülkemizde şeker otu olarak bilinen *Stevia rebaudiana* Bertoni aslen Güney Amerika kökenlidir. Paraguay ve Brezilya'da uzun bir süreden beri tatlandırıcı ve tedavi edici özellikleri nedeniyle kullanılmış olup, Japonya'da da otuz yılı aşkın bir süredir milyonlarca insan tarafından tatlandırıcı, ayrıca gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır (URL 2). Ayrıca Kaliforniya ve İngiltere'de de yetiştirilmektedir. Kuzey Amerika'da tespit edilebilen 80'den fazla çeşidi, Güney Amerika'da ise 200'den fazla yerli türü olduğu tahmin edilmektedir (Nunes, vd., 2007; Tadhani, Patel, Subhash, 2007; Richard, 2009).

Türkiye'de ilk kez 2009 yılında Antalya'da üretilmeye başlanmıştır. Daha sonralar da ülkemizde Fethiye, Balıkesir ve Rize gibi yerlerde yetiştiriciliği yapılmaktadır (URL 2).

Nemli ortamları seven, 60-90 cm boyunda, ortalama 25 ° C'de ve bazı türleri 2300-2900 m yüksekliklerde yetişebilen bir bitki türüdür (Cortes, vd., 2007). Asteraceae familyasına ait bir bitkidir (İnanç ve Çınar, 2009).

Asteraceae familyasının ismi yıldız şeklinde çiçekleri bulunan bir cins olan Aster türünden gelmektedir. Genellikle otsu, çok azı çalı, ağaç ve lian şeklindedirler (odunsu sarılıcı bitkiler). Yapraklar basit veya bileşik, stipulsuz, alternat, rozet şeklindedir. Çiçekler baş veya kapitulum durumlarındadır. Bunlarda baş birçok küçük veya florat olarak adlandırılan çiçekler; konik, küresel ya da düzleşmiş bir reseptakulum veya diskten çıkarlar. Bütün kapitulum fillari olarak adlandırılan involukral brakteler tarafından sarılmıştır. Bunlar bir veya birkaç seri halinde olabilirler veya imbrikat dizilmiş olabilirler. Braktenin ikinci bir tipi de (chaffy) bulunabilir. Bu yapı genel resaptakulum üzerinde bireysel çiçeklerin tabanında bulunur. Brakteler mevcutsa, resaptakulum chaffy'dir; mevcut değilse çıplaktır. Reseptakulum (çiçek tablası) tüyler, dikenler ve oyuklar taşıyabilir. Kapitulumda bulunan çiçekler hermafrodit veya tek eşeyli, (bitkiler monoik veya dioik), aktinomorf veya zigomorf yalnız bir periyantserisi iyi gelişmiştir. Kalikspappus olarak adlandırılan tüysü şekilde ya da tamamen eksiktir. Korolla 5'li vesimpetaldır. Korolla tubular çiçeklerde aktinomorf, ligulat olanlarda zigomorftur. Androkeum 5 stamen (erkek organ) lidir, onların anter(başçık)leri birleşik, filamentleri serbesttir (singenezik). Ginekeum 2 birleşik karpelli, tek odalı, ovaryumaltdurumludur. Meyve akendir. Asteraceae, çiçekli bitkilerin en büyük familyası olarak bilinir. Dünyada

1100 cins ve 25000 civarında türle temsil edilirken, Türkiye'de 133 cins ve bunlara ait 1156'dan fazla türü bulunmaktadır (URL 3).

1.3. *Stevia rebaudiana*'nın Sistematikteki Yeri

| | |
|---------|-------------------------------------|
| Âlem | : Plantae (Bitler) |
| Bölüm | : Magnoliophyta(Kapalı tohumlular) |
| Sınıf | : Magnoliopsida (İki çenekliler) |
| Takım | : Asterales |
| Familya | : Asteraceae (Papatyagiller) |
| Oymak | : Eupatorieae |
| Cins | : <i>Stevia</i> |
| Tür | : <i>Stevia rebaudiana</i> (URL 2). |



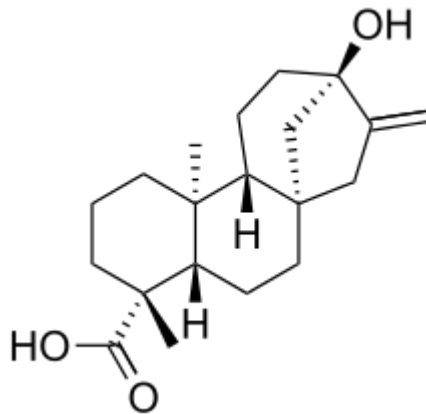
Şekil 2. *Stevia rebaudiana* bitkisi

1.4. *Stevia* Bitkisinin Bileşenleri

Stevia bitkisinin en önemli bileşenleri şekerden 260-400 kez daha tatlı olan fakat kalorisiz olan glikozitleridir. Bu bileşiklerin tamamen suda çözünür olması da yaprakların ekstraksiyonunu kolay ve doğal kılar. En önemli 2 glikozit, 200°C ısıya kadar ısınmaya dayanıklı olan Rebaudiozit A ve Steviozit'tir. Bu iki bileşenin ticari *stevia* ürünleri içindeki oranı çok önemlidir. *Stevia* bitkisinin yaprakları şeker kamışından 15-30 kez tatlıdır (URL 4).

Stevia bitkisinde tadı veren steviol glikozitleridir. Bu iki bileşenin içeriklerinin her biri eşsiz özellikler taşımaktadır. Steviozit, RebA'dan daha yüksek ısıya dayanıklıdır fakat hafif bir acılığı vardır. RebA damakta acı tat bırakmaz. *Stevia* bitkisinden ayrıca RebC Dulkozit A, Rubuzozit, Steviolbiozit ve RebB glikozitleri de mevcuttur. RebC'de ağızda acı bir tat bıraktığı için steviada %90'ın üzerinde RebA olması durumunda bu acılık hissedilmez (URL 4).

Çalışmalar göstermiştir ki bazı asitler (sitrik asit, asetik asit, laktaz, malik ve tartarik asit) de steviozitin acılığını azaltır. *Stevia* diğer tüm tatlandırıcılardan farklı, lezzetli, doğal bir şeker alternatifidir. Bu tamamen doğal tatlandırıcı yiyecek ve içeceklere lezzet katan bir bitkidir. Uzun yıllardır kullanılmasına rağmen, son yıllarda organik ürün kullanımının artması, bize ileride daha da gündemde olacağını habercisidir (URL 4).



Şekil 3. Steviol Aktif Maddesi (URL 2)

Stevia bitkisine ait steviol glikozitler tamamen doğaldır. Kalori değeri, glisemik indeksi ve karbonhidrat değerleri sıfır' dır. Saf şeker tadındadır. Diyabetikler için oldukça

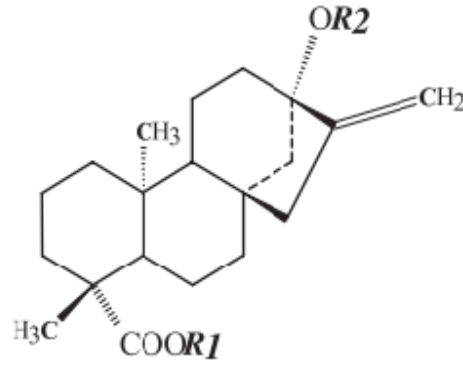
uygundur. Yüzyıllardır güvenle kullanılmaktadır. Rafine edildiğinde şeker kamışından elde edilen şekerle göre 200-280 kez daha tatlıdır. *Stevia* bitkisinin yapraklarından elde edilir. Suda tamamen erir. Isıya dayanıklıdır. 196-198°C 'ye kadar kaynatılıp, pişirilebilir. Toksik değildir. Fermente olmaz. Şekerle ve tüm kimyasal tatlandırıcılara sağlıklı bir alternatiftir (URL 4).

1.5. Kurutulmuş *Stevia* Yaprak Özütünün Kimyasal Bileşenleri

Stevia yapraklarından kurutulmuş elde edilen ekstraktlar flavonoid, alkaloid, suda çözünen klorofil ve ksantofil, hidroksisinnamik asit (klorojenik, vs), nötral suda çözünen oligosakkarit, serbest şeker, aminoasit, lipid, esansiyel yağlar ve iz elementleri (alüminyum, demir, çinko vs.) ihtiva etmektedirler (Komissarenko, vd., 1994).

1.6. Tatlı Bileşiklerin (Steviol Glikosid) Biyosentezi ve Kimyasal Yapıları

Stevia yapraklarında bulunan tatlı bileşikler diterpen glikozit (steviol glikozit) bileşiklerdir. Önemli bir bitki hormonu olan gibberellin asidin başlangıç aşamasına çok benzeyen bir oluşum mekanizması kullanılarak sentez edilirler. Steviol glikozit ve gibberellin mekanizmaları ara bileşik kauren sentezinden sonra ayrılır. *Stevia*'daki lauren steviol'a (tatlı glikozidin temel yapısı) dönüştürülür, daha sonra esas tatlandırıcıları oluşturmak için glikolize veya rhamnoz edilirler (Smith ve Vanstadin, 1992). Steviol glikozitlerin kimyasal yapıları Şekil 4'de gösterilmiştir, burada esas ana tatlandırıcı bileşik steviosit'dir, diğer tatlandırıcı bileşikler de mevcut olmakla birlikte düşük konsantrasyonlarda bulunabilir ki bitkinin yetiştirme şartları ve cinsine bağlı olarak kuru yapraklardaki ağırlıkları % 4-20 arasında değişmektedir (Geuns, 2003).



| Bileşik Adı | R₁ | R₂ |
|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|
| steviol | H | H |
| Steviolbioside | H | β-Glc- β-Glc(2→1) |
| stevioside | β-Glc | β-Glc- β-Glc(2→1) |
| Rebaudioside A | β-Glc | β-Glc- β-Glc(2→1) β-Glc(3→1) |
| Rebaudioside B | H | β-Glc- β-Glc(2→1) β-Glc(3→1) |
| Rebaudioside C (Dulcoside B) | β-Glc | β-Glc- α-Rhas(2→1) β-Glc(3→1) |
| Rebaudioside D | β-Glc- β-Glc(2→1) _c | β-Glc- β-Glc(2→1) β-Glc(3→1) |
| Rebaudioside E | β-Glc- β-Glc(2→1) | β-Glc- β-Glc(2→1) |
| Rebaudioside F | β-Glc | β-Glc- β-Xyl(2→1) β-Glc(3→1) |
| Dulcoside A | β-Glc | β-Glc- α-Rhas(2→1) |

Şekil 4. Steviol glikozitlerin kimyasal yapıları (URL 2)

1.7. *Stevia* Bitkisinin Yetiştirilmesi

Stevia bitkisi yetiştirilirken; bitkinin ekilmesi, çiçeklenmesi, tohum alınması ve hasat dönemleri bulunmaktadır.

Stevia bitkisinin çiçeklenme dönemi, ağustos ve eylül aylarıdır. Çiçeklenme dönemi, iklim ve bölge özelliklerine göre az veya çok değişiklik gösterebilir. Bitki, ağustos ayı ortasından itibaren tomurcuklar vermeye ve bu tomurcuklar üzerinde de, kısa zaman sonra minik ve beyaz renkli çiçekler açmaya başlar. Çiçeklenmeyle birlikte, bitkinin her yanı beyaz çiçeklerle dolar. Çiçekler açtıktan 10-15 gün sonra kurumaya başlar. Kuruyan çiçeklerin dip kısımlarında veya tomurcuğun çıktığı dip kesimlerde kurumuş ve büzülmüş halde tohum keseleri bulunur. Bu keselerin her birinin içerisinde, ortalama 4-6 adet olmak

üzere minicik tohumcuklar bulunur. Çiçekler kuruyup sarardığı zaman, tohum kesesi içerisindeki çok küçük tohumların toplanma zamanı gelmiş demektir. Bitkide tohumlar, tam olgun hale gelmişken koyu gri veya siyahımsı renklerde görünürler. Bu tohumların büyüklüğü genellikle iğne ucu kadardır (URL 5).

Tam olgunlaşmamış tohumlarda ise, bunlar genellikle açık yeşilimsi (taze yaprak) rengindedir. Erken toplanmış yeşilimsi tohumlar, henüz üretimde kullanılabilecek olgunluğa erişmemiş olarak kabul edilmelidir. Bu nedenle böyle tohumlar bir müddet daha bekletilip, koyu kahve ve koyu gri, siyah renge dönüşmesi yani olgunlaşması sağlanmalıdır (URL 5).

1.7.1. Yetiştirme Koşulları

Stevia bitkisinin yetiştirilmesinde, sıcaklık, güneş ışınları ve nemliliğin önemli rolü bulunur. 20 derece sıcaklık uygundur. Sıcaklığın 10-13⁰C derecenin altına düştüğü alanlarda yetiştirilmesi zordur. *Stevia* bitkisi gelişkin aşamada, güneşten çok fazla etkilenmemektedir. Ancak fide aşamasında bitki kökü ve gövdesi henüz zayıf olduğundan, daha çok gölgelik ortam ister. Bu nedenle mümkünse fidelerin tarlada gelişimi sırasında üstlerine tül gölgelik yapılması uygun olur. Fideler büyümeye başladığında, güneşli ortam, yaprakların fotosentez yapmasına ve şeker oranının artmasına katkı sağlar. *Stevia* bitkisinin tatlanmasında güneş ışınları ve sıcaklık çok önemli rol oynar. *Stevia* bitkisi, soğuk iklimleri sevmez. Subtropik ve nemli iklimler bu bitki için uygun yetişme ortamı sağlar. Bitki, asidik toprakları da sevmez, bazik toprakları sever. Örneğin ülkemizde Karadeniz Bölgesi yaz ve kış çok yağış aldığından toprakları genelde asidik özelliktedir. Buna karşılık Akdeniz Bölgesi özellikle Antalya toprakları kışın yağışlı yazın ise kurak olduğundan genelde bazik karakterlidir. Bu özellik, bitki gelişmesinde bir tercih nedenidir. Bitki toprak koşullarına karşı çok hassastır. Taban arazilerini, yani nemli, sulu, ağır topraklı arazileri sevmez. Bazı bölgelerin yer altı su seviyesi çok yüksek olduğundan taban suyu da yüksek bulunur. Sellenme ve taşkınlar bunlarda kalıcı zarar geliştirirler. Trakya bölgesi yazları uygun, ancak kışları çok ağır soğuklar ve don yaşadığından, bitkinin uzun süreli yaşamı için çok uygun görünmez. *Stevia* (şeker otu) çok yıllık bir bitkidir, ancak ilk yıldaki hasatı verimsiz ve cılız olur. Bu nedenle ilk yılda, çevre şartlarının olumsuzlukları, bakım eksiklikleri, bitki ve toprak hastalıkları vb.gibi nedenlerle kayıplar da çok olur. İlk yıldaki bu durum, üreticilerin morallerini bozmamalıdır. İkinci yıldan sonra bitki verimi

kuvvetlenir ve bitkiden daha fazla ürün alınmaya başlanır. Kırmızı renkli Akdeniz topraklarında (terra rossa) bitkinin yetiştirilmesi iyi sonuçlar vermektedir. Diğer yandan kireçli, kumlu, tınlı, havalandırılmalı topraklar, bitkinin iyi gelişmesinde önemli etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır. Azotlu gübrelerin bitki verimi üzerinde olumlu etkisinin bulunduğu gözlenmiştir. Tarlaya fide dikimi yapıldıktan sonra, bitkiye gübre ve hümik asit verilebilir. Tarlada en önemli iş, sulama ve tarladaki yabancı otlarla mücadeledir. Tarlada sulama şekli, en iyi damlama boruları ile yapılması tercih edilmelidir. Bu bitki, toprak hastalıklarına karşı da oldukça duyarlıdır. Ancak bu bitkiyi etkileyebilecek böcek zararlıları azdır. Bitki zararlıları en fazla toprak altından kaynaklanır. Toprak altında böcek, kurt, kemirgenler bitki ve gelişimine zarar verebilmektedir. Uçucu sinek ve böceklere karşı bilinen zirai ilaç yöntemleri uygulanabilir. Kararında herbisit uygulanabilir. Ayrıca bu bitkideki sinek, böcek ve hastalıklara karşı zirai ilaç kullanılmadan başka dezenfektan yöntemler de uygulanabilmektedir. Örneğin bulaşık, çamaşır deterjanları sulandırılarak veya arap sabunu – alkol karışımı fis fis içerisinde bitkiye tazyik edilerek etkin mücadele yapılabilir. Tarlada en önemli olayların başında, bitkinin dölllenmesi ve gelişmesi gelmektedir. Bunun için tarla ve yakın çevresinde dölllenmeyi sağlayacak arıların, yoğun olarak bulundurulması yararlı olur. Arıları tarlada tutabilmek için, arıların sevdiği çiçekler, lavanta gibi bitkilerin bahçe veya açık tarla ortamının bazı yerlerinde ekili olması bu işleve ek katkı sağlayacaktır (URL 5).

1.7.2. *Stevia* Bitkisinin Tohumlarının Toplanması

Stevia bitkisinde tohumların toplanması sırasında nazik işlem yapılması ve çok sabırlı olunmasını gerektirmektedir. Çünkü bitkinin tohumları çok küçük olduğundan, tohumların alınması da dikkat, titizlik ve özen gerektirmektedir. Tohumları sağlıklı ve tam olgunlaşmış olmalıdır. Bu olmazsa, dölllenme ve çimlenme hiçbir şekilde meydana gelmez. Bahçede ekili alanda, tohuma bırakılan bitkilerde, çiçek açtıktan sonra, çiçeklerin kurumaya ve kuruyan çiçekler de ise, tohum keselerinin olgunlaşmaya başladığı gözlenir. Kurumuş olgunlaşmış tohumları taşıyan ana gövde ve dallar, uygun bir makasla kesilerek bir torba veya geniş bir kap içerisinde toplanır. Uygun bir süre tohum bulunan dalların iyice kuruması beklenir. Daha sonra tohum bulunduran dallar, yere serilmiş geniş bir bez veya naylon örtü üzerine hafifçe çırpılır. Böylece tohumların örtüye dökülmesi sağlanır. Ancak bu yolla tohumların bir çoğu çarpma-çarpmadan dolayı zarar görebilmekte ve

tohumlarla birlikte diğerk yaprak ve kurumuş dalların da tohumlara karışması ihtimal dahilindedir. Diğerk bir yöntem ise, el yardımı ile *Stevia* bitkisinin tohumlarının kesede bulunan yerlerinden çekilip çıkarılması ve ayrı bir kapta toplanmasıdır. Tohumlar çok küçük olduğundan bu iş için başka yöntemler de kullanılabilir (URL 5).

Stevia bitkisinin en önemli özelliği, çiçeklenmeyi takip eden evrede çok sayıda tohum verebilmesidir. Ancak tohum toplama işi ince ve nazık bir iş olduğundan, olgun hale gelen tohumların çok geciktirilmeden toplanması gerekir. Küçük ve zayıf yapıllı minik kanatlı kese içerisinde, tohumlar korunamayabilir, uçabilir ve keseden ayrılabilir. Böylece keselerin içleri boşalabilir (URL 5).

1.8. *Stevia* Bitkisinin Üretilmesi

Stevia rebaudiana bitkisinin üretilmesi; tohumdan fide üretilmesi, çelikten fide üretilmesi ve doku kültürü ile üretilmesi olmak üzere 3 şekilde olmaktadır.

1.8.1. Tohumdan Fide Üretimi

Stevia (şeker otu) bitkisinin yaygın üretim şekli, genellikle tohum ile yapılmaktadır. Ancak tohum ile yapılan üretim şekli, çok zorlu bir süreç ve sabır isteyen bir konu olarak karşımıza çıkar. Bu durumu göze almak gereklidir. Çünkü bitki tohumları çok küçüktür. İğne ucu gibi minik tohumlar, olumsuz şartlara karşı hassas ve dayanıksızdır. Tohumların küçüklüğü nedeniyle, fide üretim merkezlerinde bile, otomatik tohumlama makineler ile fide üretimi yapılamamaktadır. Tohumdan üretim şekli, doğrudan insan emeğine dayanmaktadır. Üretim, iklim bölgelerine göre, biraz değişiklik göstermekle birlikte, nemli ve sıcak iklimlerde, örneğin Akdeniz Bölgesi için tohumlama dönemi, genellikle şubat ayı olmaktadır. Tohumdan fide üretiminde, sera ortamları tercih edilmelidir. Sera ortamı, tohumun çimlenmesi ve fidenin gelişmesi için en iyi sıcaklık ve nem şartlarını bitkiye sağlar. Bu nedenle tohumdan fide üretimde sera ortamı özellikle tercih edilmelidir (URL 5).

Sera içerisinde fide üretimi viyoller ve kasa içerisinde olmak üzere başlıca iki şekilde gerçekleştirilebilir;

Bitkiden ayrılarak toplanan tohumlar, yeniden *Stevia* üretiminde kullanılır. Bu iş sabır ve zaman istemektedir. Zorluğun diğer başlıca nedenleri ise, tohumların çok küçük olması, ayrıca minik keselerin içerisinde döllenmeyi sağlayacak tohumların rüzgar ve diğer etkilerle keseden ayrılması, yani keselerin içlerinin boşalabilmesidir. Küçük ve zayıf yapılı minik kanatlı tohum kesesi içerisinde, tohumlar birçok halde korunamaz, uçar, keseden bir şekilde ayrılır, düşer veya çürüyerek, kuruyarak zayı olur. Tohum kesecikleri de çok küçük olduğu için, bu durum çoğu kez göz ile açık bir şekilde seçilemez. *Stevia* bitkisinin tohumda çimlenme oranı, en fazla % 30-40 gibi bir oranda gerçekleştirilebilmektedir. Bunun nedenleri arasında tohumların zayıflığı ve uygun yapılmayan ekim hataları ile tohumların ancak % 30 'unda korunabilmiş embriyo yapısının bulunuyor olması ön sıralarda gelmektedir. Ayrıca ekim yapılan yer, çevre koşulları, sulama hataları vb. gibi bakım ile ilgili yapılan hatalar da bunun üzerine eklenince çimlenme olayı, *Stevia* üretiminde çok zor bir süreç olarak karşımıza çıkmaktadır. *Stevia* ekiminde başarısızlık oranları çok yüksektir. Bu nedenle % 20-30 çimlenme, iyi bir başarı olarak değerlendirilmelidir. Ülkemizin önemli ve büyük bir çok fide üreticileri, ilk sene başarılı olamadıklarını, ancak ikinci sene tecrübe ve bilgilerini geliştirerek tohumdan fide üretiminde başarılı olabildiklerini belirtmektedirler. Bu örnekler bile, bu işin ne kadar zor süreç olduğunu ve tecrübe gerektirdiğini yansıtmaktadır (URL 5).

Bunlara ek olarak; *Stevia* tohumu çok küçük olduğu ve çimlenme zorluğu bulunduğundan, üzerine gelecek fazla kalın üst örtü, çimlenme ve tohumun gün ışığına kolay çıkmasını engelleyebilir. Örtü kalınlığı, zayıf ve küçük tohum çıkışını engellemeyecek incelikte olmalıdır. Aksi takdirde çimlenme oranı çok düşük kalır veya hiç çıkmadığı gibi durumlarla karşılaşılabilir. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, çimlenme oluncaya kadar torfun içerisine hiçbir madde, gübre ilaç, hormon vb konulmamalıdır. Çok su verilmesi veya susuz bırakılması bitki gelişimini olumsuz etkileyebilir. Suyun kararı, birkaç günde (2-3 gün) bir vermektir. Ne zaman su ihtiyacı bulunduğu şöyle anlaşılabilir. Bitkinin çevresindeki torf, bir miktar parmak ucuyla açılır, torfun dibini nemli ise sulamaya ihtiyaç yoktur, kuruma varsa su verilmelidir. Su süzgeçli bir başlıkla verilip, narin çimlenen bitkinin gelişimine zarar verdirilmemelidir (URL 5).

1.8.2. Çelikten Fide Üretimi

Bu yöntem, tohumlamadan farklı bir *Stevia* bitkisi üretim yoludur. Bu yöntem şöyle uygulanabilir;

Stevia bitkisi üzerindeki ana gövde ve iyi gelişmiş yan dallar kesilir. Kesilen bu dallar, köklenmesi için uygun bir malzeme içerisine batırılır. Bu malzeme aynen viyol üretiminde kullanılan torf ve perlit karışımı olabilir. Uygun ışık ve ısı ortamında bu dallar kökleninceye kadar beklenir. Çabuk köklenme için, hormon kullanılabilir. Köklenen fideler kasadan tek, tek alınarak uygun pozisyonda açık tarla ortamına dikilir. Ayrıca kasa içerisinde fide devresi geçici bir devredir. Kalıcı olan tarladaki ortamıdır. Çelikleme ile fide üretiminde ortamın ısısı, güneş durumu, nemliliği ve üzerine dikim yapılacak olan torfun cinsi üretimi doğrudan etkilemektedir (URL 5).

1.8.3. Doku Kültürü ile Üretimi

Bitki doku kültürü yöntemi, temelde bir üretim yöntemidir. Bilinen diğer klasik üretim yöntemlerinden farklı olarak, bitkinin çeşitli kısımlarından alınan küçük bir doku parçası (eksplant) sterilize edildikten sonra, çeşitli besin maddelerini içeren steril besi ortamında; ışık, nem ve sıcaklık gibi uygun çevre koşullarında kültüre alınması işlemidir (Srivastava ve Steinbaver, 1981; Vidalie, 1986; Gönülşen, 1987).

Doku kültürü ile ilgili çalışmalar, 1975 yılına kadar kallus kültürü ile bitki rejenerasyonu temeline dayandırılmıştır (Chalupa, 1987). Günümüzde *in vitro* koşullarda, çeşitli bitki türlerinin doku kültürü tekniği ile üretilmesinde kallus, sürgün ucu, embriyo, hücre ve protoplast kültürleri yaygın olarak kullanılmaktadır (Srivastava ve Steinbaver, 1981; Vidalie, 1986; Ahuja, 1986).

Doku kültürü teknikleri;

- Arz-talebi karşılayacak üretim olanağı
- Genotiplerin hızlı üretimi
- *In vitro*'da erken seleksiyon
- Daha az alandan daha yüksek verim eldesi
- Hastalısız bitki eldesi (Bakteri, virüs ve mantardan ari bitki eldesi)
- Haploid ve poliploid bitkilerin üretilmesi

- Mutantların üretimi ve seçimi
- Genetik çeşitliliğin saklanması
- Somatik embriyo oluşumu, sentetik tohum üretimi
- Protoplast kültürü ile somatik hibridizasyon
- DNA teknolojisi ile gen transferleri
- Çelikle üretimi zor olan türlerin kolay üretilebilmesi

gibi avantajları bitkisel üretime sağlamaktadır (Bhojwani ve Razdan, 1983; Vidalie, 1986; Üçler, 1994; Cüce, 2016).

Diğer taraftan doku kültürü ile üretimin vejetasyon dönemine bağlı olmaması, bir klonu sınırsız bir şekilde üretme olanağı vermesi, poliploit bireyler elde edebilme ve gen bankaları kurma gibi yararlarıyla birlikte, zengin tohum yıllarının seyrek olduğu, tohumların uzun süre saklanması mümkün olmadığı veya zor olduğu ağaç türlerinin üretilmesinde de önem taşımaktadır (Vidalie, 1986).

Genetikçiler doku kültürü tekniğini, seçilmiş genotiplerin değerlendirilmesinde, hızlı büyüyen fertlerin ortaya çıkarılmasında, soğuğa, kuraklığa, hastalıklara, tuzluluğa ve herbisitlere dayanıklı bireylerin seçilmesinde etkin bir şekilde kullanırlar (Kaya, 1988). Bitki doku kültürü teknikleri ile nispeten problemsiz ve hızlı üretim ihtimali, daha ileri ilah adımlarında kullanılacak önemli avantajlar sunmaktadır (Üçler, 1994).

Stevia rebaudiana, non-toksik ve mutajenik olmayan düşük kalorili glikozitlere sahip olma özelliğinden dolayı pek çok araştırmacının dikkatini çekmektedir (Lyakhoykin, vd., 1993)

Bitkinin gördüğü ilgi son yıllarda Türkiye’de artmış ve birçok yörede adaptasyon çalışması yapılmıştır. Ancak tohumlarındaki düşük çimlenme oranı ve yabancı tozlaşma nedeni ile oluşan genetik varyasyonlar bu bitkinin ticari üretiminin önündeki en büyük engelleri oluşturmaktadır. Bu nedenle doku kültürü ile fide üretim yolları araştırılmıştır (Sairkar vd., 2009; Janarthanam vd., 2009; Preethi vd., 2011; Mathur ve Shekhawat., 2013; Gauchan., 2014).

Literatüre bakıldığında *in vitro* kültürlerde başlangıç materyali olarak *Stevia rebaudiana*’nın yaprak (Ferreira ve Handro, 1987-1988; Yang ve Chang, 1979), aksiler sürgün (Bespalhok vd., 1992), kök uçları (Tamura vd., 1998) ve anter (Flashlan vd., 1966) gibi parçaları kullanılmıştır. Bunun sebebi hedef metabolitlerin değişik kaynaktan elde edilen sürgünlerde farklı oranlarda bulunmasıdır. *Stevia* üzerinde yapılan çalışmalar sadece sürgün kültürleriyle sınırlı kalmamıştır. Stevial glikozidlerin araştırılması amacıyla kallus

ve süspansiyon kültürler de denenmiştir (Bondarev, vd., 2001). Bazı araştırmacılar (Nebeta vd., 1976; Suziki vd., 1976; Miyagawa vd., 1984) yaptıkları kallus denemelerinde stevial glikozidlere rastlamaz iken, Lee vd. (1982) tarafından yetiştirilen kallus kültürlerinde bu glikozidler saptanmıştır. (peculiarities of diterpenoid steviol). Tüm bu çalışmalara bakıldığında, *S. rebaudiana in vitro* çalışmaları sonucu elde edilen veriler farklılık arz etmektedir. Bunun sebebi başlangıç materyali olarak seçilen bitkinin genotip farkı veya yetiştirilen ortamın fiziksel koşullarının değişkenliği olabilir.

1.9. Amaç

Bu çalışmada, Rize Çaykur' da yetiştirilen *Stevia rebaudiana* bitkisinin doku kültürü yöntemleri kullanılarak etkili bir mikroçoğaltım metodunun geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bitkinin eksplantlarının *in vitro* koşullarda üretimi potansiyelleri ve bu eksplantların zamana bağlı olarak (büyümeye bağlı olarak) ne gibi değişimler göstereceği, *in vitro* koşullarda gerek besi ortamı ve gerekse çevresel faktörlerin ne gibi sonuçlar doğuracağı belirlenecektir. Bu türlerin üretim potansiyelleri belirlenerek her daim üretim yapılmasına imkan sağlayacak daha hızlı, daha seri üretim yapılması ve aynı anda aynı özelliğe sahip (klon ve çeşit) binlerce bitkinin üretilmesi, doğaya kazandırılması güncel ve teknolojik bir yaklaşımdır. Bu amaçla farklı temel besi ortamları ve farklı bitki büyüme düzenleyicilerin çeşitli konsantrasyon ve kombinasyonları *Stevia rebaudiana*'nın *in vitro* ortamlarda yetiştirilmesi üzerine denenmiş ve kallus oluşumu ve sürgün oluşumunda bu faktörlerin etkileri araştırılmıştır.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal ve Kullanılan Ekipman

Bu araştırmada, *Stevia rebaudiana*'nın doku kültürü yöntemleri ile üretimi ve değerlendirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Deneysel çalışmalarda, *Stevia* türlerinin doku kültürleri ile çoğaltımı alanında yapılan ve literatürde rastlanan çalışmalardan yararlanılmıştır.

Doku kültürü ile üretim çalışmaları, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Bitki Fizyolojisi ve Biyokimyası Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmalarda besi ortamlarının pH'sını ayarlamak için Mettler Toledo MP 220 marka pH metre, tartım işlemleri için OHAUS marka hassas terazi, çözeltilerin karıştırılması için Heidolph 1400 (Hotplate & Stirrer) marka ısıtıcılı manyetik karıştırıcı, kurutma işlemleri için Nüve FN 120 marka etüv, saf su üretilmesi için GFL 2104 marka saf su cihazı, sterilizasyon işlemleri için Ticisan (75 litre) marka otoklav, materyallerin kültüre alınma işlemi için BIOBASE marka laminar akışlı steril kabin, kültürlerin büyütülmesi için Sanyo marka iklim dolabı, sürgün boyu uzunluklarının ölçülmesi için BIS marka dijital kumpas kullanılmıştır.

2.2. Yöntemler

2.2.1. Bitkisel Materyaller

2016 yılında Rize Çaykur'dan getirilen anaç *Stevia rebaudiana* bitkisinin nod ve yaprak eksplantları başlangıç materyali olarak kullanılmıştır. Kullanılan eksplantlar kenarlarından kesilerek yüzey sterilizasyona tabi tutulmuştur.



Şekil 5. Yaprak ve nod eksplantları

2.2.2. Besi Ortamının Saptanması ve Hazırlanması

Karbon kaynağı olarak % 2 sukroz ve katılaştırıcı % 0,8 fitoagar ilave edilmiştir. Gerekli olanlara bitki büyüme düzenleyicisi ya da düzenleyicileri de eklenerek, çözeltilerin pH'ları 1 molar NaOH ve 1 normal HCl kullanılarak 5,5-5,6 aralığına Mettler Toledo MP 220 marka pH metre kullanılarak ayarlanmıştır. Sonrasında besi ortamları otoklavda (Ticisan) 1 atm basınçta 121°C'de 125 dakika süre ile steril edilmiştir. Otoklavdan çıkarılan besi ortamları hafifçe çalkalanarak agarın homojen olarak dağılması sağlanmış ve soğumaya bırakılmıştır. Yüksek sıcaklıkta etkisini kaybeden bitki büyüme düzenleyicileri 0,22µm çapındaki filtrelerle sterilize edilmiş ve otoklavdan sonra besi ortamı soğumadan ortama eklenmiştir. 40°C civarına kadar soğutulan besi ortamları, ESCO marka laminar akışlı steril kabin içerisinde kültür kaplarına aktarılmıştır.

Bitkinin gelişebilmesi için uygun besi ortamının olması gerekmektedir. *Stevia* sp. Mikroçoğaltımı için Murashige ve Skoog (MS) besi ortamı seçilmiştir. Murashige ve Skoog ortamının içeriğine bakıldığında ise makro ve mikro besinlerle birlikte vitaminler ve organik bileşikler bulunmaktadır.

Tablo 1. MS besi ortamının makro ve mikro elementleri (URL-7)

| | |
|---|---------|
| Mikro Elementler | mg/l |
| CoCl ₂ .6H ₂ O | 0.025 |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 0.025 |
| FeNaEDTA | 36.70 |
| H ₃ BO ₃ | 6.20 |
| KI | 0.83 |
| MnSO ₄ .H ₂ O | 16.90 |
| Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O | 0.25 |
| ZnSO ₄ .7H ₂ O | 8.60 |
| Makro Elementler | |
| CaCl ₂ | 332.02 |
| KH ₂ PO ₄ | 170.00 |
| KNO ₃ | 1900.00 |
| MgSO ₄ | 180.54 |
| NH ₄ NO ₃ | 1650.00 |
| Vitaminler | |
| Glycine | 2.00 |
| myo-Inositol | 100.00 |
| Nicotinic acid | 0.50 |
| Pyridoxine HCl | 0.50 |
| Thiamine HCl | 0.10 |

2.2.3. Bitki Büyüme Düzenleyicileri ve Konsantrasyonları

Kallus oluşturma denemelerinde 1 mg/L TDZ + 1mg/L IBA , 0,1 mg/L IBA+ 5 mg/L Zeatin ve 0,1 mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D içeren MS temel besi ortamları kullanılmıştır. Kallus oluşum sırasında bu bitki büyüme düzenleyicilerinin seçimi noktasında daha önce yapılan uygulamalardan ve literatür bilgisinden yararlanılmıştır. Elde edilen kallusların büyümesini gözlemek amaçlı 5 mg/L 2iP ve 2 mg/L IBA konsantrasyonlarını içeren MS ortamları denemeye tabi tutulmuştur.

Sürgün oluşturma aşamalarında farklı konsantrasyon aralıklarında BAP (2,5 mg/L, 5 mg/L, 7,5 mg/L), KİN (0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L) ve 2iP(0,5 mg/L, 1 mg/L, 2 mg/L) içeren MS besi ortamları denenmiş ve sürgün oluşum oranları sürgün boyu, sürgün sayısı, nod sayısı, yaprak sayısı ve yaş ağırlık kriterlerinde değerlendirilmiştir.

2.2.4. Bitkisel Materyalin Yüzeysel Sterilizasyonu

Mikroçoğaltımda kullanılacak eksplantlar aseptik koşullara alınmadan önce tam anlamıyla sterilize edilmelidir. Sterilizasyon yöntemleri anaç bitkinin yetiştiği ortamın özelliklerine ve eksplantın alındığı organa göre farklılık göstermektedir. Kullanılacak dezenfektan maddenin cinsi, konsantrasyonu ve uygulama süresi sterilizasyonun başarısını etkilemektedir. Ayrıca bitki dokularının zarar görmemesine dikkat edilmelidir. *Stevia rebaudiana* bitkisinden kesilerek alınan yaprak ve nod eksplantları çeşme suyu ile 15 dakika bar yardımıyla karıştırılmıştır. Çeşme suyuna tabi tutulan eksplantlar önceden hazırlanmış %20'lik çamaşır suyu ile 10 dakika bar ile karıştırılmıştır. Çamaşır suyu ile yıkanan yaprak ve nodlar ekim yapılmadan önce 1'er dakika bekletilerek saf suyla 3 kez arındırılmıştır. Ön yıkama işleminden sonra önceden hazırlanmış %70'lik etanol (EtOH) ile 30 saniye ön muamele işlemine tabi tutulmuştur. Yüzeysel sterilizasyonu işlemi eksplantların steril distile su ile her biri en az 5 dk olmak kaydı ile üç kez yıkanması ile tamamlanmıştır. Bu işlemlere, eksplantın özelliğine göre ilave uygulamalar yapılabilir ve dezenfektan maddenin derişimi ile uygulama süresi değiştirilebilir. Son iki aşamanın, steril kabin içerisinde yapılması önemlidir.

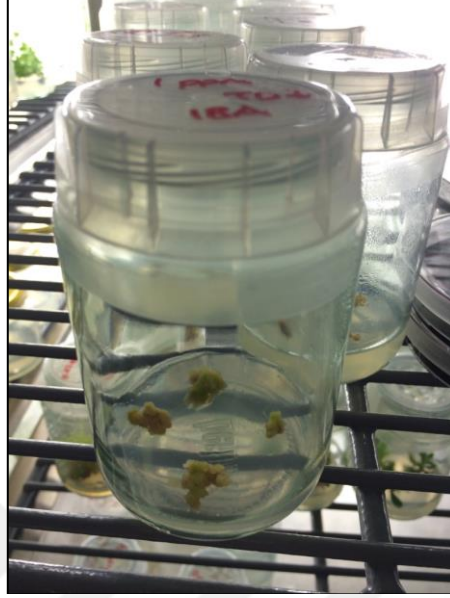
2.2.5. Kullanılan Alet ve Ekipmanın Sterilizasyonu

Steril çalışma kabini, kültür aşılama çalışmalarına başlamadan önce, 10 dakika süre ile çalıştırıldıktan sonra %70'lik EtOH ile dezenfekte edilmiştir. Kullanılan cam malzeme, otoklavda sterilizasyona tabi tutulmuştur. Çeşitli amaçlar için kullanılan tüm cam malzeme, otoklavda sterilizasyondan önce 100 °C'de, etüvde 1 saat süreyle bekletilmiştir. Eksplantları kültüre almada kullanılan pens ve bisturiler çalışmaya başlamadan önce %70'lik EtOH alkolde bekletildikten sonra ateşten geçirilerek sterilize edilmiştir.

2.2.6. Materyalin Kültüre Alınması

Sterilize edilen yaprak ve nodlar steril kabin içerisinde minimum 5 mm uzunluğunda kesilmiş ve içinde steril besi ortamı bulunan kültür kaplarına yerleştirilerek kültüre

alınmıştır. *Stevia sp.* alt kültürleri, yaşama durumlarına göre 4 ila 5 hafta aralıklarla taze besi ortamlarına aktarılmıştır.



Şekil 6. *In vitro* 'da *Stevia sp.* kallusları

2.2.7. Fiziksel Koşullar

Çalışmada kullanılan ve kültüre alma işlemi tamamlanan eksplantlar için inkübasyon ortamı olarak 24 ± 2 °C sıcaklık, 8000 lüks ışık şiddeti ($\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$), 16 saat aydınlık ve 8 saat karanlık koşulu ile %80 neme ayarlı iklim dolabı kullanılmıştır.

2.2.8. Gelişme Süresince Yapılan Ölçüm ve Gözlemler

2.2.8.1. Kültüre Alınan Eksplantların Gelişme Durumu

Stevia rebadiana bitkileri, kültüre alınmalarından itibaren gelişme durumları, renklenmeleri, canlılıkları, kallus oluşumları, sürgün oluşumları ve oluşan sürgünlerden sürgün gelişimleri belirli aralıklarla gözlemlenmiş, elde edilen veriler istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir.

Sürgün çoğaltma ortamlarında, denemelerin başlangıcından itibaren 6-8 hafta sonra; oluşan sürgün sayısı, sürgün boyu, nod sayıları ve yaş ağırlıkları ve bu sürgünlerdeki yaprak sayıları belirlenerek kaydedilmiştir.

2.2.8.2. Sürgünlerdeki Glikozit Miktar ve Çeşitlerinin Belirlenmesi

Alt kültürler sonucunda elde edilen sürgünler kurutularak glikozit içeriklerinin belirlenmesi amacıyla Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesine gönderilmiştir. Etüvde 40°C'de 24 saat süreyle kurutulan örnekler, iyice toz haline getirildikten sonra 20 mg tartılarak santrifüj tüplerine aktarılmıştır (2 mL). Daha sonra 1 mL saf su veya 70 % (v/v) metanol ilavesi ardından tüpler ultrasonik banyoda 15 dk süreyle 55°C'de özütleri çıkarılmıştır. Süre sonunda kısa süreli buz içerisinde şoklama, ardından yüksek hızlı santrifüj cihazına her bir tüp yerleştirilip oda ısısında 10 dk süreyle 12,000 rpm'de döndürülmüştür. Süpernatant kısmı temiz bir enjektör (insülin iğnesi) ile çekilip, HPLC viyollerine aktarılmıştır. Bu aşama üç bağımsız özütleme ile yapılmıştır.

Çalışmalarımızda 150 × 4,6 mm ve 5 µm partikül boyutlu inerstil ODS-3 (GL sciences Inc, Japonya) kolonu kullanılmıştır. Kolon fırını 40°C olarak ayarlanarak; izokrotik akış ile (0,8 ml/dk) ile çoklu dalga boyunda (201 ve 356 nm) tarama yapılmıştır. Örnekleme oto örnekleyici ile 10 µL enjeksiyonla yapılmış olup; hareketli faz olarak asetonitril (ACN) ve pH 2,6'da 10 mmol/L NaH₂PO₄ (32:68, v/v) kullanılmıştır. HPLC sistemi yarı ultra yüksek basınçlı kromatografik özelliklere sahiptir (Dionex marka, ABD), analiz süresi her örnek için 8 dk'dır. Çalışmalarımızda kullanmış olduğumuz standart maddeler, rebaudiosid A ve steviosid, Chromadex, ABD firmasından temin edilmiştir.

2.2.8.3. Kalluslardaki Fenolik Asit Tayini

Stevia rebaudiana yaprak ve nodlarından elde edilen kallusların fenolik asit içeriklerini belirlemek amacıyla her uygulama grubundan 0,2 gr numune alınıp Hekzan, DCM ve Metanol sırasıyla 10'ar dakika muamele edilmiştir. Daha sonra elde edilen süzöntü HPLC analizi için 0,45 µ'luk filtrelerden geçirilmiştir. Kullanılan HPLC sistemi (Shimadzu, Kyoto, Japan) CBM-20A kominikasyon modülü, LC -20AT pompa, DGU-20A5 online degazör, SIL-20A otosampler, CTO-10ASVP kolon fırını ve SPD20A

diode dizi dedektöründen oluşmaktadır. Hareketli faz (solvent A) 20mM fosfat tamponu, pH:2,5 ve asetonitril (solvent B) den oluşup akış hızı 1,5mM min⁻¹dir. Uygulanan akış programı şöyledir:

- 0-11 dakikalar arası %5'ten %8'e
- 11-15 dakikalar arası %8'den %20'ye
- 15-25 dakikalar arası %20'den %80'e kadar artan solvent B akışı sağlanmıştır.

Enjeksiyonlar arası 10 dakika sütun dengeleme süresi uygulanmıştır. Kolon fırın ısısı 40°C de iken 20 µl örnek kolono enjekte edilmiştir.

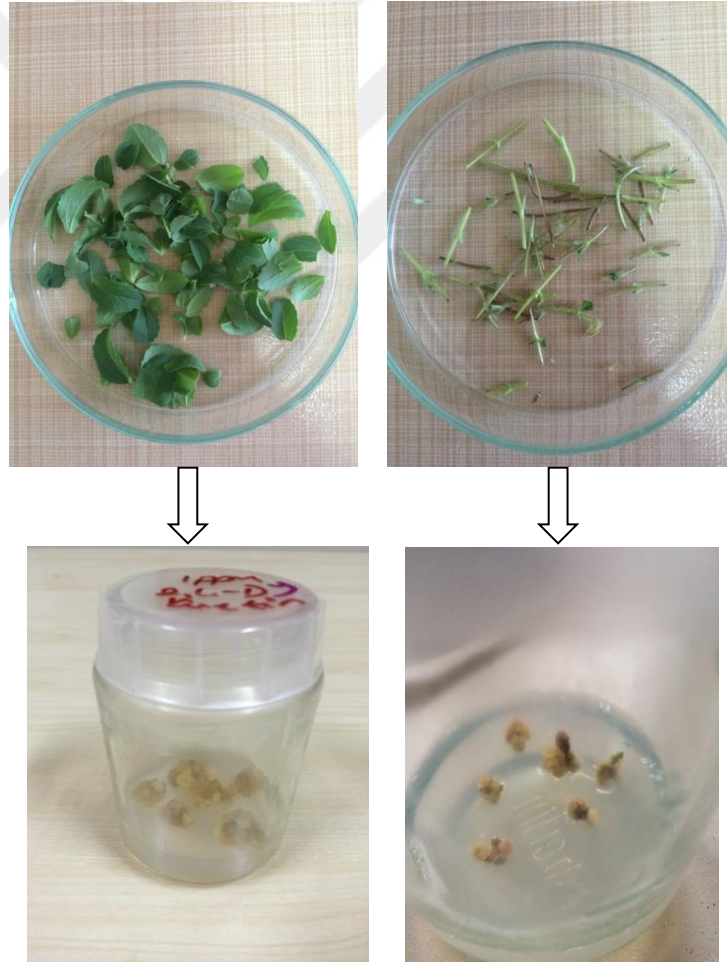
2.2.9. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Yapılan tez çalışmasında yaprak ve nod eksplantları, MS besi ortamında farklı bitki büyüme düzenleyici konsantrasyonlarında elde edilen sürgünler sürgün sayısı, sürgün boyu, nod sayısı, yaprak sayısı ve yaş ağırlık kriterlerinde değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler (çoklu veriler) varyans analizi Statistical Package for Social Sciences (SPSS 21,0) paket programı içerisinde yer alan ANOVA'nın çok yönlü Duncan testine tabi tutulmuştur. Ölçümleri yapılan değerler arasındaki istatistiksel farklar ve benzerlikler ortaya konulmuştur ($P \leq 0,05$).

3. BULGULAR

3.1. *Stevia rebaudiana*'nın *in vitro* Kallus Oluşumu

Stevia rebaudiana'dan alınan yaprak ve nodlar 1 mg/L TDZ + 1mg/L IBA (G1), 0.1 mg/L IBA + 5 mg/L ZEA (G2) ve 0,1mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D (G3) konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamında kallus oluşumu için denendi. Görüldüğü gibi noddan alınan eksplantlardan kallus oluşumunun çok sağlıklı olmadığı gözlemlendi (Şekil: 7). Öte yandan yapraktan elde edilen kallusların durumlarının daha iyi olduğu sonucuna varıldı. Yapılan nicel gözlemler sonucunda en etkili kallus ortamı G1 olarak belirlenmiştir.



Şekil 7. Yaprak ve nod eksplantlarının besi ortamına aktarılmış şekli

Elde edilen kalluslar 5 mg/L 2iP (G4) ve 2 mg /L IBA (G5) konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamlarına aktarıldı. Tahmin edilen sürgün ve kök oluşumu gözlenmezken bu ortamların kallus gelişimine katkı sağladığı gözlemlendi.

3.2. Fenolik Asit Tayini

Denenen tüm kallus gruplarından 4 hafta sonucunda elde edilen örnekler HPLC analizine tabi tutulmuştur. Alınan sonuçlara göre en yüksek klorojenik asit miktarı 0,128 mg/g kuru ağırlık değeri ile G5 ve 0,0121 mg/g kuru ağırlık değeri ile G4 gruplarında gözlenirken, en düşük klorojenik asit miktarı 0,083 mg/g kuru ağırlık ile G2 grubunda gözlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Farklı ortamlarda yetiştirilen *S. rebaudiana* kalluslarının klorojenik asit ve sinamik asit miktarları

| | Klorojenik asit(mg/g) | Sinamik asit(mg/g) |
|----|---------------------------|---------------------------|
| G1 | 0,097 ^b ± 0,06 | 0,022 ^a ±0,005 |
| G2 | 0,083 ^c ±0,02 | - |
| G3 | 0,105 ^b ±0,03 | 0,025 ^a ±0,008 |
| G4 | 0,121 ^a ±0,002 | - |
| G5 | 0,128 ^a ±0,006 | 0,028 ^a ±0,004 |

±üç tekarürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P≤0,05), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

Kallus oluşturmada nicel olarak en etkili bulunan G1 ortamında kalluslar; 4 hafta (G1a) ve 8 hafta (G1b) süresince büyütülmüştür. Bu süreler sonunda elde edilen kalluslar ayrı ayrı analize tabi tutulmuştur. 8 haftalık kalluslarda klorojenik asit miktarı 0,633mg/g kuru ağırlık olarak ölçülmüştü (Tablo 3). Kültürde geçirilen sürenin klorojenik asit miktarını ciddi bir biçimde arttırdığı gözlenirken, sinamik asit üzerinde etkili olmadığı saptanmıştır (P≤0,05).

Tablo 3. G1 ortamında 4 ve 8 hafta süresince büyütülen yetiştirilen *S. rebaudiana* kalluslarının klorojenik asit ve sinamik asit miktarları

| | Klorojenik asit(mg/g) | Sinamik asit(mg/g) |
|---|---------------------------|---------------------------|
| G1 a | 0,097 ^b ± 0,06 | 0,022 ^a ±0,005 |
| G1b | 0,633 ^a ±0,012 | 0,028 ^a ±0,004 |
| ± üç tekerürlü ortalamanın standart sapmasıdır. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P≤0,05), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi). | | |

3.3. Steviozit Tayini

G1, G2, G3, G4 ve G5 ortamlarında 4 hafta boyunca yetiştirilen *S. rebaudiana* kalluslarının içerdikleri stevial glikozitleri ölçülmüştür. Bu gruplarda yetiştirilen kallusların hiçbirinde stevial glikozitlere rastlanmamıştır. Bunun sebebi kallus yetiştirme ortamındaki ışık yetersizliği olabilir.

3.4. *Stevia rebaudiana*'nın *in vitro* Sürgün Oluşumu

Stevia rebaudiana'dan alınan yaprak ve nod eksplantları KİN, BAP ve TDZ'nin farklı konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamına ekilmiştir. Yapraktan yapılan ekimlerde sürgün elde edilememiştir. Ayrıca yapılan gözlemlerde TDZ nin sürgün oluşumu için uygun olmadığı belirlenmiştir. Nod eksplantlarının sürgün oluşumu için bu deneme gruplarında uygun olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sürgünler BAP (2,5-5-7,5 mg/L) ve KİN (0,5-1-2 mg/L) içeren MS besi ortamında 4 hafta süresince büyütülmüştür. 4 hafta sonunda sürgün boyu, sürgün sayısı, nod sayısı ve yaprak sayısı ölçümleri yapılmıştır. Tüm parametrelere bakıldığında sitokinin içermeyen temel MS besi ortamının sürgün gelişimi üzerinde en etkili deneme grubu olduğu gözlenmiştir (Tablo 4). Sürgün boyu açısından BAP ve KİN uygulamalarına bakıldığında KİN denemelerinin BAP'tan daha etkin sonuç verdiği saptanmıştır. Sürgün sayısı ele alındığında yapılan analiz sonucunda kontrol ve 2,5 mg/L BAP uygulamaları hariç diğer gruplar arası istatistiki bir fark gözlenmemiştir (P≤0,05). BAP uygulamalarında konsantrasyon artışının nod sayısı üzerinde önemli ölçüde etkisi olmadığı belirlenmiştir. Öte yandan KİN uygulamalarında artan konsantrasyonun nod sayısını olumsuz etkilediği bulunmuştur (Tablo 4). Artan BAP konsantrasyonu yaprak

sayısını olumsuz etkilemiştir. Kontrol grubu (7,01 adet) ve 0,5 mg/L KİN konsantrasyonu (6,98 adet) en yüksek yaprak sayısını veren uygulama grupları olmuştur.

Tablo 4. *Stevia rebaudiana* türüne ait sürgünlerin 4 hafta sonunda farklı BAP ve KİN konsantrasyonlarındaki sürgün sayısı, sürgün boyu, nod sayısı ve yaprak sayısı değerleri

| | mg/L | Sürgün boyu(mm) | Sürgün sayısı(adet) | Nod sayısı(adet) | Yaprak sayısı(adet) |
|---------|------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| KONTROL | | 5,61 ^a ±0,08 | 2,15 ^a ±0,06 | 6,01 ^a ±0,06 | 7,01 ^a ±0,07 |
| BAP | 2,5 | 2,83 ^d ±0,03 | 2,05 ^b ±0,02 | 3,02 ^e ±0,04 | 5,06 ^c ±0,06 |
| | 5 | 1,19 ^e ±0,03 | 2,12 ^{ab} ±0,35 | 3,06 ^e ±0,02 | 4,01 ^d ±0,06 |
| | 7,5 | 0,87 ^f ±0,06 | 2,08 ^{ab} ±0,07 | 3,05 ^e ±0,02 | 3,2 ^e ±0,05 |
| KİN | 0,5 | 4,81 ^b ±0,11 | 2,14 ^{ab} ±0,06 | 5,09 ^b ±0,04 | 6,98 ^a ±0,06 |
| | 1 | 4,78 ^b ±0,05 | 2,13 ^{ab} ±0,06 | 4,89 ^c ±0,08 | 6,05 ^b ±0,04 |
| | 2 | 3,69 ^c ±0,06 | 2,09 ^{ab} ±0,06 | 4,56 ^d ±0,08 | 6,03 ^b ±0,07 |

±üç tekrarlı ortalamasının standart sapmasıdır. Aynı harfle gösterilen değerler önemli ölçüde farklı değildir (P≤0,05), (Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi).

3.5. Stevial Glikozit İçerikleri

2,5- 5 -7,5 mg/L BAP ve 0,5-1-2 mg/L KİN içeren MS besi ortamında 4 hafta sonucunda elde edilen sürgünlerin stevial glikozit içerikleri belirlenmiştir. Yapılan analiz sonucunda konsantrasyonlar arası anlamlı bir fark gözlenmemiştir. BAP'ta yetiştirilen sürgünlerin daha çok steviol glikozit içerdiği saptanmıştır.

Tablo 5. *Stevia rebaudiana* türüne ait sürgünlerin 4 hafta sonunda farklı BAP ve KİN konsantrasyonlarındaki stevial glikozid içerikleri

| | Steviozid | Rebaudiosid A |
|-----|-----------|---------------|
| BAP | 1,29±0,02 | 0,76±0,01 |
| KİN | 0,4±0,0 | - |

4. TARTIŞMA

Son yıllarda, şekerin zararlı etkilerinden dolayı araştırmalar, sıfır kalorili tatlandırıcılar üzerinde yoğunlaşmıştır. Artan bu talep tatlandırıcıların doğal yani bitkisel kaynaklı olması durumundandır. *S. rebaudiana*, bu araştırmalarda öncül niteliktedir. *S. rebaudiana*'nın tohumdan üretiminde steviol glikozit seviyelerinde pek çok varyasyona neden olmaktadır (Tamura vd., 1984). Düşük çimlenme oranı tohumla endüstriyel düzeyde üretim durumu için ciddi bir problemdir. Son yıllarda bu dezavantajları ortadan kaldırmak için, *S. rebaudiana*'nın homojen popülasyonlarının, bitki doku kültürü ile üretimi amaçlanmıştır. Yapılan literatür çalışmalarında *Stevia*'nın üretimi, sürgün uçlarından (Tamura vd., 1984; Das vd., 2011), nodal segmentlerden (Mitra ve Pal., 2007; Singh vd., 2014), yapraktan (Sreedhar vd., 2008), hipokotilden (Ramirez- Mosqueda ve Iglesias-Anreu, 2015), çiçeklerden (Ahmad vd., 2011) kallus kültürleri (Swanson vd., 1992; Preethi vd., 2011; Manthur ve Shekhawat, 2013) gibi bölümlerden denemiştir. Yine de doku kültürlerinden sonra denenen tarla çalışmaları geniş çaplı üretimler için ciddi bir sıkıntıdır. *S. rebaudiana*'nın fotoperyot duyarlılığından dolayı hem *in vitro* hem de *ex vitro* çalışmalardan yaprak kütlelerini ve steviol glikozid içeriğinin optimizasyonunu yapmak amaçlanmıştır (Ramesh vd., 2006, Tavarini vd., 2013). Geniş çaplı bitki üretimi için, mikropropagasyon çalışmaları sayısız avantaj sağlar. Yapılan bu tez çalışmasında, *S. rebaudiana*'nın yapraktan ve noddan mikroçoğaltımı ve kallus kültürü oluşturma hedeflenmiştir.

Kallus kültürü için eksplantlar yaprak ve nod'dan alınmıştır. Sonuçta yaprak eksplantları kallus kültürü için daha verimli olduğu gözlenmiştir. Mikropropagasyon çalışmaları için nodal segmentlerin uygun olduğunu kanıtlayan pek çok çalışma mevcuttur (Sivaram ve Mukundom 2003; Thiyagarajan vd., 2012; Singh vd., 2004; Yücesan vd., 2015). Aamir vd. (2010) yılında yaptıkları çalışmada da yaprak kaynaklı kallusların nodal eksplantlardan daha etkin olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda internodal olanların etkili sonuç vermeyip kallus oluşturmadığını ortaya koymuştur. Öte yandan Din vd., (2006)'da internodal segmentleri kallus oluşumunda en iyi grup olarak belirlerken, yaprak ve nodal eksplantlardan oluşan kalluslar daha az büyüme göstermiştir.

Kallus kültürleri için denenen 3 farklı ortamdan yapılan nicel gözlemler sonucu en etkili olan 1 mg/L TDZ- 1 mg/L IBA denemesi olmuştur. Benzer olarak yapılan literatür

çalışmalarında TDZ diğer bitki büyüme düzenleyicilerine göre yüksek ve düşük konsantrasyonda kallus oluşumunu desteklediği görülmüştür (Capelle vd., 1983). Bir diğer çalışmada da TDZ'nin in vitro ortamlarda kallus oluşumunu desteklediği gözlenmiştir (Shan vd., 2000).

Yapılan bu tez çalışmasında kallus denemelerinde karanlık ve aydınlık ortamlar kullanılmıştır. Karanlık ortamdaki kallusların beyazımsı bir renk olduğu gözlenirken, aydınlık ortamdaki kallusların yeşil renkte olduğu gözlenmiştir. Buna benzer olarak Lukatkin ve Silva (2007) yaptığı çalışmada kallus ortamının ışığa karşı etkisini denemiş ve karanlık ortamın beyaz renkli kallus oluşturduğunu gözlemlerken aydınlık ortamın yeşil renkli kallus oluşturduğunu gözlemlemiştir.

Kallus çalışmalarından elde edilen hasatlar stevial glikozid içeriklerinin belirlenmesi amaçlı teste tabii tutulmuştur. Bu test sonucunda hiçbir uygulama grubunda stevial glikozide rastlanmamıştır. Bu durum daha önce yapılan kallus denemelerinde de gözlenmiştir. Benzer olarak Nabeta vd. (1976), Suzuki vd. (1976), Miyaqava vd. (1984) kallus kültürlerinde stevial glikozidlere rastlamamıştır. Fakat Lee vd., 1982, yaptığı kallus kültürlerinde stevial glikozidler belirlenmiştir.

Kallus denemelerinde ölçülen bir diğer parametre de fenolik asit içeriğidir. Klorojenik asit ve sinnamik asit içerikleri ölçülmüş ve en yüksek G5 grubunda gözlenmiştir. Etkili bulunan G1 ortamının 4 ve 8 haftalık uygulamaları da ayrı ayrı denemeye tabi tutulmuştur. Zamanla klorojenik asit içeriğinin etkin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Öte yandan sinnamik asit etkilenmemiştir.

Yapılan sürgün denemelerinde BBD içermeyen MS ortamı sürgün gelişimi için en iyi ortam olmuştur. Benzer olarak literatüre bakıldığında BBD'siz MS ortamının sürgün gelişimi için uygun olduğu belirlenmiştir (İbrahim vd., 2008, Hassanen vd., Khalil, 2013).

Öte yandan, Das vd. (2011)'de Kinetin içeren MS besi ortamının daha verimli sürgün sağladığını gözlemiştir. Bu farklılık genotip çeşidinden kaynaklı olabilir.

Uygulaması yapılan BAP ve KİN konsantrasyonlarına bakıldığında ise KİN denemeleri BAP denemelerinden daha etkili sonuç vermiştir. Das vd., 2011 yılında yaptıkları araştırmalarda da KİN uygulamalarını BAP uygulamalarından daha etkin bulmuşlardır. Artan BAP konsantrasyonunun sürgün ve yaprak sayısını olumsuz etkilediği görülmüştür. Benzer olarak Thiyagarajan ve Venkatachalam (2012) BAP'ın artan konsantrasyonunun sürgün oluşumunu ve sayısını olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir. Öte yandan Sivaram ve Mukundam 2003 yılında yaptıkları denemelerde yükselen BAP

konsantrasyonunun çoklu sürgün oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Tüm bu çalışmalara bakıldığında BBD'lerin konsantrasyonu ve kombinasyonlarının etkinlikleri, genotip, eksplant orjini ve kültür süresi ile alakalı olabilmektedir. Dahası, *S. rebaudiana*'ya ait pek çok doku kültürü protokolünde , sürgün sayısı 12'den 126'ya kadar değişkenlik göstermektedir (Aman vd 2013; Khalil vd 2014; Rathore vd 2014).



5. SONUÇLAR

Bu çalışmada, *Stevia rebaudiana*'nın doku kültürü yöntemlerinden “mikroçoğaltım” tekniği kullanılarak *in vitro* koşullarda üretimi gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen sonuçlar aşağıda maddeler halinde verilmiştir:

1. Yaprak ve noddan alınan eksplantlar kallus denemesi süresince izlenmiş ve sonuç olarak en iyi verimin yapraklardan alındığı tespit edilmiştir.
2. Karanlıkta yetişen kallusların beyazımsı, aydınlık ortamda yetiştirilen kallusların ise yeşil renkte olduğu tespit edilmiştir.
3. *Stevia rebaudiana*'dan alınan yaprak ve nodlar 1 mg/L TDZ + 1mg/L IBA (G1), 0.1 mg/L IBA + 5 mg/L ZEA (G2) ve 0,1mg/L NAA + 0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L 2,4-D (G3) konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamında kallus oluşumu için denenmiş ve en iyi ortamın G1 olduğu sonucuna varılmıştır.
4. Denenen tüm kallus gruplarından 4 hafta sonucunda elde edilen örnekler HPLC analizine tabi tutulmuş ve alınan sonuçlara göre en yüksek klorojenik asit miktarı 0,128 mg/g kuru ağırlık değeri ile G5 grubunda gözlenirken, en düşük klorojenik asit miktarının 0,083 mg/g kuru ağırlık ile G2 grubunda olduğu tespit edilmiştir.
5. G1, G2, G3, G4 ve G5 ortamlarında 4 hafta boyunca yetiştirilen *S.rebaudiana* kalluslarının içerdikleri stevial glikozitleri ölçülmüş ve bu gruplarda yetiştirilen kallusların hiçbirinde stevial glikozitlere rastlanmadığı sonucuna varılmıştır.
6. *Stevia rebaudiana*'dan alınan yaprak ve nod eksplantları KİN, BAP ve TDZ'nin farklı konsantrasyonlarını içeren MS besi ortamına ekilmiş ve yapılan gözlemlerde TDZ nin sürgün oluşumu için uygun olmadığı tespit edilmiştir.
7. Sürgün boyu, sürgün sayısı, nod sayısı ve yaprak sayısı gibi tüm parametrelere bakıldığında sitokinin içermeyen temel MS besi ortamının sürgün gelişimi üzerinde en etkili deneme grubu olduğu sonucuna varılmıştır.
8. BAP ve KİN içeren MS besi ortamındaki sürgünlerin steviozit içeriğine bakıldığında konsantrasyonlar arası çok fazla fark gözlenmezken, BAP'ta yetiştirilen sürgünlerin daha çok steviol glikozit içerdiği tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Ahmad, N., Fazal, H., Zamir, R., Khalil, S. A. ve Haider, B., 2011. Abbasi callogenesis and shoot organogenesis from flowers of *Stevia rebaudiana* (Bert.). Sugar Tech 2, 174-177.
- Ahuja, M., R., 1986. Application of Brotechnology to Forest Tree Species and Problems Involved, Holzwirtschaft, 154, 187-199.
- Alexander, S., Lukatkin, Jaime, A. ve Teixeira da S., 2007. Effects of Cultivation Parameters of *Stevia rebaudiana* Bertoni Callus Culture on Callus Proliferation, Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology.
- Aman, N., Hadi, F., Khalik, S. A., Zamir, R. ve Ahmad, N., 2013. Efficient regeneration for enhanced steviol glycosides production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). C. R. Biologies. 336, 486-492.
- Bespalhok, J. C. ve Vieira, L. G. E., vd., 1992. Fatores influenciando a micropropagação *in vitro* de gemas axilares de *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal., 4, 1, 59-61.
- Bhojwani, S. ve Razdan, M., K., 1983. Plant Tissue Culture: Theory and Practice, 502, Elsevier Science Pub. Co., Amsterdam.
- Bondarev, N., Reshetnyak, O. ve Nosov, A., 2001. Peculiarities of diterpenoid steviol glycoside production in *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* Bertoni, Plant Science, 155–163.
- Capelle, S. C., Mok, D. W. S., Kirchner, S. C. ve Mok, M. C. Effects of thidiazuron on cytokinin autonomy and the metabolism of N6-(D2-isopentenyl)[8-14C]adenosine in callus tissues of *Phaseolus lunatus* L. Plant Physiol. 73,796–802; 1983.
- Cardoso, J. M. P. ve Bolini, H. M. A., 2007. Different sweeteners in peach nectar: ideal an equivalent sweetness. Food Res Int, 40, 1249-1253.
- Chalupa, V., 1987. European Hardwoods, Cell and Tissue Culture in Forestry, 3, The Netherlands.
- Cortes, R., Hernandez-Ceruelos, A., Torres-Valencia, J. M., Gonzalez-Avila M., Arriaga-Alba, M. ve Mmadrigal, Bujaidar, E. 2007. Antimutagenicity of stevia pilosa and stevia eupatoria evaluated with the ames test. Toxicology in vitro, 21, 4, 691-697.
- Cowan, M. M., 1999. Plant Products as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews,12, 4, 564–582.
- Cüce, M. 2016. *Vaccinium myrtillus* L.ve *Vaccinium uliginosum* L. (Ericaceae) Türlerinin Mikroçoğaltımı, Doktora Tezi, KTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.

- Das, A., Gantait, S. ve Mandal, N., 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. Int J. Agric. Res. 6, 40-48.
- Din, M. S. U., Chowdhury, M. S., Khan, M. M. H., Din, M. B.U., Ahmed, R. ve Baten, M. A. 2006. *In vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* Bert in Bangladesh. Afri J. Of Biotech., 5, 1238-1240.
- Ferrerira, C. M. ve Handro, W., 1987. Some morphogenetic responses of leaf explants of *Stevia rebaudiana* cultured *in vitro*. Revista Brasileira de Botanica,10:112-116.
- Ferrerira, C. M. ve Handro, W., 1988. Production, maintenance and plant regeneration from cell Suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. Plant Cell Reports, 7, 123-126.
- Flachsland, E. ve Mroginski, L., vd., 1996. Regeneration of plants from anthers of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae) cultivated *in vitro*. Biocell, 20, 87-90.
- Gauchan, D.P., Dhakal, A., Sharma, N., Bhandari, S., Maskey, E., Shrestha, N., Gautam R., Giri, S. ve Gurung, S., 2014. Regenerative callus induction and biochemical
- Geuns, J. M. C., 2003. Stevioside. Phytochemistry, 64, 913-921.
- Gönülşen, N., 1987. Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları, T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın No:78, Menemen-İzmir.
- Hassanen, S. A. ve Khalil, R. M. A., 2013. Biotechnological Studies for Improving of *Stevia (Stevia rebaudiana* Bertoni) *in vitro* Plantlets. Middle- East Journal of Scientific Research 14, 93-106.
- İbrahim, A. I., Nasar, M. I., Mohammed, B. R. ve Zefzafi, M. E., 2008. Plant growth regulators affecting *in vitro* cultivation of *Stevia rebaudiana*. Sugar Technol. M 10, 254-259.
- İnanç, L. ve Çınar İ., 2009. Alternatif Doğal Tatlandırıcı: *Stevia*. GIDA 34 ,6, 411-415
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M., Lakshmi Sai, G. ve Sekar, T., 2009. Plant Regeneration from leaf Derived Callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Plant Tissue Cult. Biotech. 19, 2, 133-141.
- Kaya, Z., 1988. Doku Kültürünün Orman Ağaçları Islah Çalışmalarındaki Yeri, Orman Müh. Dergisi, 25, 5, 12-19.
- Khail, S. A., Zamir, R. ve Ahmad, N., 2014. Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). Saudi J Biol Sci 21, 566-573.
- Komissarenko, N. F., Derkach, A. I., Kovalyov, I. P. ve Bublik, N. P., 1994. Diterpene glycosides and phenylpropanoids of *stevia rebaudiana* bertoni, Rast Res. 1, 2, 53-64.

- Kulkarni, A. A., 2000. Mikropropagation and Secondary Metabolite Study in *Taxus* spp. and *Withania Somnifera* (L) Dunal, DSc Thesis, National Chemical Laboratory, Pune.
- Lee, J. I., Park, J.R., Choi, B.S., Han, J.S., Oh Sang, L. ve Yamada, Y., 1982. Studies on the callus culture of stevia as a new sweetening source and formation of stevioside, Hanguk Sikp'um Kwahakhoe Chi Korean 14, 179–183.
- Lemus-Mondaca, R. Vega-Gálvez, A., Zura-Bravo, L. ve Ah-Hen, K., 2012. *Stevia rebaudiana* Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects. Food Chemistry 132, 1121–1132.
- Lyakhovkin, A. G., Long, T.D., Titov, D.A. ve Anh, M.P., 1993. “In: Cultivation and utilization of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni)”, Agricultural Publishing House, Hanoi, pp. 1–44.
- Mathur, S. ve Shekhawat, G. S., 2012. Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: An *in vitro* approach for production of stevioside, Acta Physiol Plant, 35, 931-939.
- Mathur, S. ve Shekhawat G. S., 2013. Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an *in vitro* approach for production of stevioside. Acta Physiol Plant, 35, 931–939.
- Mitra, A. ve Pal, A., 2007. *In vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the nodal explants. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 16, 1, 59-62.
- Miyagawa, H., Fujita, Y., Fujioka, N., Kohda, H. ve Yamasaki, K., 1984. Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and its components, Shoyakugaku Zasshi 38, 12–18.
- Nabeta, K. ve Kasai, T. ve Sugisawa, H., 1976. Phytosterol from the callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni, Agric. Biol. Chem. 40, 2103–2104.
- Nabor, L. O. ve Gelardi, R. C., 1986. Alternative sweeteners. Marcel Dekker, New York.
- Nabor, L. O., 2002. Sweet choices: sugar replacements for foods and beverages. Food Tech, 56, 7, 28-35.
- Nunes, A. P. M., Ferreira-Machado, S. C., Nunes, R. M., Nantas, F. J. S., de Mattas, J. C. P. ve Caldeira-de-Araujo, A., 2007. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. Food and Chem Toxicol, 45, 662-666.
- Portmann, M. O. ve Kilcast, D., 1998. Descriptive profiles of synergistic mixture of bulk and intense sweeteners. Food Quality and Preference, 9, 4, 221-229.
- Preetthi, D., Sridhar, T. M. ve Naidu, C. V., 2011. Efficient Protocol for indirect shoot regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* (Bert.) –An important calorie free biosweetener. J. Phytol 3, 5, 56-60.

- Ramesh, K., Singh, V. ve Megeji, N. W., 2006. Cultivation of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A comprehensive review. Adv Agron 89, 137-177.
- Ramirez –Mosqueda, M. A. ve Iglesias-Andreu, L.G., 2015. Direct organogenesis of *Stevia rebaudiana* Bertoni using thin cell layer (TCL) method. Sugar Tech DOI, 10.1007/s12355-015-0391-0.
- Richard, D., Questions and answers about stevia [www.stevia.com/Stevia Article.asp.Id=2269](http://www.stevia.com/SteviaArticle.asp.Id=2269), 25.01.2009.
- Sairkar, P., Chandravanshi, M. K., Shukla, N. P. ve Mehrotra, N. N., 2009. Mass production of an economically important medicinal plant *Stevia rebaudiana* using in vitro propagation techniques. Journal of Medicinal Plants Research 3,4, 266-270.
- Singh, P., Dwivedi, P. ve Atri, N., 2014. *In vitro* shoot multiplication of *Stevia* and assessment of stevioside content and genetic Fidelity of the regenerants. Ind Crop Prod 16, 4, 430-439.
- Sivaram, L. ve Mukundam, U., 2003. *In vitro* culture studies on *Stevia rebaudiana*, In vitro Cell Dev Biol Plant 39, 520-523.
- Smith, J. ve Vanstadin, H., 1992. Subcellular pathway for glycoside synthesis. South Afr J Sci, 88, 206.
- Sökmen, A. ve Gürel, E., 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. Bitki Biyoteknolojisi, 1: Bitki Doku Kùltürleri 211-267 (Ed. M. Babaođlu, E. Gürel, S. Özcan). Selçuk Üniversitesi Vakfı Yayınları, Konya.
- Sreedhar, R. V. venkatachalam, L., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., Narayan, M. S. ve Ravishankar, G. A., 2008. Direct organogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* and cultivation in bioreactor. Biol Plant, 52, 355-360.
- Srivastava, P. S. ve Steinbaver, A., 1981. Regeneration Of Birch Plants Catkin Tissue Cultures, Plant Science Letters, 22.
- Suzuki, H., Ikeda, T., Matsumoto, T. ve Noguchi, M., 1976. Isolation and identification of rutin from cultured cells of *Stevia rebaudiana* Bertoni, Agric. Biol. Chem. 40, 1976 819–820.
- Swanson, S. M., Mahady, G. B. ve Beecher, C. W. W., 1992. Stevioside biosynthesis by callus, root, shoot an rooted-shoot cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult 28, 151-157.
- Tadhani, M. B., Patel, V. H. ve Subhash, R., 2007. In vitro antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* leaves and callus. J Food Compos Anal, 20, 2007, 323-329.
- Tamura, Y. ve Nakamura, S., vd., 1998. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. Plant Cell Reports, 3, 183-185.
- Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H. ve Tabata, M., 1984. Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem tip culture. Plant Cell Rep 3, 5, 183-185.

- Tavarini, S. ve Angelini, L. G., 2013. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. J Sci Food Agric 93, 9, 2121-2129.
- Thiyagarajan, M. ve Venkatachalam, P., 2012. Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana* (Bert) for commercial application: Pharmaceutically important and antidiabetic medicinal herb. Ind Crop Prod. 37, 111-117.
- URL1, <http://www.bilgiustam.com/sekonder-metabolitler-ve-insan-sagligi-acısından-onemi/08.12.2016>
- URL 2, <https://tr.wikipedia.org/wiki/Stevia> 15.12.2016
- URL 3, <http://kognozi.blogspot.com/2012/07/papatyagiller-asteraceae-hakkında.html> 15.12.2016.
- URL 4, <http://www.stesweettr.com/stevia-hakkında.html>, 15.04.2017.
- URL 5, <http://stevia.com.tr/kullanımı.php>, 15.04.2017.
- URL 6, <http://www.organikgunler.com/asrin-bitkisi-stevia-seker-otu/> 18.05.2017.
- URL 7, <https://www.duchefa-biochemie.com/product/details/number/M0222/name/murashige-skoog-medium-including-vitamins>, 10.03.2017.
- Üçler, A., Ö., 1994. Titrek Kavak (*Populus tremula* L.) ve Kafkas İhlamuru (*Tilia rubra* DC.)'nun Doku Kültürü Teknikleri ile Üretilmesi, Doktora Tezi, K.T.Ü., Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
- Vidalie, H., 1986. *In Vitro* Culture and Its Applications In Horticulture, Economic Botany, 51, 1, 92-93.
- Yang, Y. W. ve Chang, C. W., 1979. *In vitro* plant regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. Z.Pflanzenphysiologie, 93, 337-343.
- Yücesan, B. B., Mohammed, A., Arslan, M. ve Gürel, E., 2015. Clonal propagation and synthetic seed production from nodal segments of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), a tropical fruit plant, Turk J Agric For, 39, 797-806.
- Yücesan, B., Mohammed, A., Büyükgöçmen, R., Cevher, A., Özge, K., Songül, G. ve Gürel, E., 2016. In vitro and ex vitro propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni with high rebaudioside-a content –commercial scale application Sci. Hort., 203, 20-28.

ÖZGEÇMİŞ

1990 Yılında Trabzon'da doğdu. İlköğretimini Mehmet Akif Ersoy İlköğretim Okulunda tamamladı. Orta öğretimini Trabzon Lisesinde tamamladı. 2012 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2014 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Botanik Anabilim dalında Tezli Yüksek Lisans eğitimine başladı, halen daha tezli yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.

