

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**Kolhisin Uygulaması ile Poliploid Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni)
Bitkilerinin Elde Edilmesi**

Özlem AKBAŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KASIM 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**Kolhisin Uygulaması ile Poliploid Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni)
Bitkilerinin Elde Edilmesi**

Özlem AKBAŞ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KASIM 2022

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Kolhisin Uygulaması ile Poliploid Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni)
Bitkilerinin Elde Edilmesi**

Özlem AKBAŞ
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından FYL-2021-5518 nolu proje ile desteklenmiştir.**

KASIM 2022

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**Kolhisin Uygulaması ile Poliploid Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni)
Bitkilerinin Elde Edilmesi**

Özlem AKBAŞ
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 11/11/2022 tarihinde jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kenan TURGUT (Danışman)

Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS

Prof. Dr. İsa TELCİ

ÖZET

Kolhisin Uygulaması ile Poliploid Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Bitkilerinin Elde Edilmesi

Özlem AKBAŞ

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Kasım 2022; 34 sayfa

Bu çalışmada Latince ismi *Stevia rebaudiana* Bertoni olan şeker otu bitkisinde kolhisin uygulamalarının poliploidizasyon üzerine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada bitki materyali olarak bitki boyu ve yaprak boyu uzun, geniş ve büyük yapraklara sahip, rebaudiosit A/steviosit oranı ve rebaudiosit A içeriği yüksek olan yerli şeker otu çeşidi Levent 93'ün doku kültüründen gelen fidelerinin sürgün uçları kullanılmıştır. Mutasyon materyali olarak da güz çiğdemi (*Colchicum autumnale*) bitkisinden elde edilen bir alkaloid olan kolhisin ($C_{22}H_{25}NO_6$) kullanılmıştır. Çalışmanın temel amacı, diploid kromozom sayısını ikiye katlayarak tetraploid şeker otu bitkileri elde etmektir. Çalışmada kullanılacak olan yöntem belirlendikten sonra tek doz ve farklı uygulama sürelerinin denenmesi planlanmıştır. Bu amaçla yapılan araştırmalar incelenmiş ve kolhisin dozu olarak %0,5 konsantrasyonu belirlenmiştir. Şeker otu sürgün uçları %0,5 konsantrasyonundaki kolhisin çözeltisine 1 saat, 2 saat ve 4 saat boyunca daldırılmıştır. Çalışma sonucunda kolhisinle muamele edilmiş şeker otu bitkilerinin canlılık oranı %13,3-100, bitki boyu 20-75 cm, bitkide yaprak sayısı 16-60 adet, bitkide dal sayısı 1-11 adet ve klorofil miktarı 9,7-26,9 spad olarak belirlenmiştir. Bitkilerin ploidi seviyeleri flow sitometri analizi ile belirlenmiştir. Çalışmanın flow sitometri analizi sonuçlarına göre tetraploid bitkiler elde edilmiştir ancak söz konusu bitkiler canlılıklarını sürdürememiştir. Sonuç olarak kolhisinin şeker otunda poliploidi meydana getirdiği belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: DNA içeriği, flow sitometri, kolhisin, poliploidi, *Stevia rebaudiana* Bertoni, steviol glikozit, tetraploidi

JÜRİ: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS

Prof. Dr. İsa TELCİ

ABSTRACT

Induction of Polyploidy in Stevia Plants (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Using Colchicine

Özlem AKBAŞ

MSc Thesis in Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Kenan TURGUT

November 2022; 34 pages

In the present study, the effects of colchicine applications on polyploidization were investigated in the stevia, whose Latin name is *Stevia rebaudiana* Bertoni. In the study shoot tips of seedlings from tissue culture of the local stevia variety Levent 93, which has long plant height and leaf length, and wide and large leaves, and high rebaudiosit A/steviosit ratio and rebaudiosit A content were used as plant material. Colchicine ($C_{22}H_{25}NO_6$), which is an alkaloid obtained from the meadow saffron (*Colchicum autumnale*) was used as mutation material. The main aim of the study is to obtain tetraploidy stevia plants by doubling the diploid chromosome number. After the method to be used in the study was determined, it was planned to try a single dose and different application times. Studies conducted for this purpose were examined and 0,05% concentration of colchicine was determined. Stevia shoot tips were immersed colchicine solution for control, 1 hour, 2 hours and 4 hours. Result of the study, has been determined the viability rate (13,3-100%), the plant height (20-75 cm), the number of leaves per plant (16-60 pieces), the number of branches per plant (1-11 pieces) and the content of chlorophyll (9,7-26,9 spad) of stevia plants treated with colchicine. The ploidy levels in plants were determined by flow cytometer analysis. According to the flow cytometer analysis of the study tetraploidy plants were obtained. As a result of the evaluations, it was concluded that colchicine caused polyploidy in stevia.

KEYWORDS: DNA content, flow cytometer, colchicine, polyploidy, *Stevia rebaudiana* Bertoni, steviol glycoside, tetraploidy

COMMITTEE: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS

Prof. Dr. İsa TELCİ

ÖNSÖZ

İnsanlar hastalıkların tedavisinde geçmişten günümüze kadar bitkilerden faydalanmıştır. Günlük yaşamda artan stres koşulları, hareketsiz yaşam gibi daha birçok faktör önemli sağlık problemlerinden olan obezite ve diyabete sebep olmaktadır. Gün geçtikçe artan obezite ve diyabet birçok ülkenin sağlık problemlerinin başında gelmektedir. Türkiye Sağlık Araştırması 2019 TÜİK verilerine göre 2016 yılından 2019 yılına kadar diyabet %13 oranında, obezite ise %7,6 oranında artmıştır. Günümüzde tüketicilerin sağlıklı ve dengeli beslenme isteği, şekerli gıdaların tüketimi gibi beslenme bilincini oluşturmaya tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilgiyi giderek artırmıştır.

Şekerli beslenme denildiği zaman doğal bir tatlandırıcı olarak akla ilk gelen bitki şeker otu olmaktadır. Şeker otu bilimsel ismi *Stevia rebaudiana* olan Asteraceae familyasına ait çok yıllık otsu bir bitkidir. Orijini Paraguay olan bu bitki $2n=22$ kromozom sayısına sahip diploid bir türdür. Şeker otu tatlandırıcı olma özelliğini içerdiği steviol glikozitlerden kazanmaktadır. Steviol glikozitler sıfır kalorili ve kan şekerini artırmayan doğal tatlandırıcılardır. Yapılan bu çalışmada şeker otu bitkisinin içerdiği steviol glikozit miktarını artırmak amacıyla poliploidi ıslahı denenmiştir.

Tez konumu seçerken benim isteklerimi göz önünde bulunduran, tezimin her aşamasında benden bilgi, tecrübe ve desteklerini esirgemeyen, danışmanın olmasından her zaman onur duyduğum değerli yüksek lisans danışman hocam Prof. Dr. Kenan Turgut'a teşekkürü bir borç bilirim.

Çalışmamın yürütülmesinde bitki materyallerinin temin edilmesi ve her türlü alt yapının kullanılmasında destekleri olan Güney Agripark Ar-Ge Merkezinin (Antalya) yöneticisi Prof. Dr. Narin Ünal'a, Ziraat Mühendisleri Gürdal Koç ve Agit Akbaş olmak üzere tüm çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Flow sitometri cihazı ile aday bitkilerde ploidi analizi yapılmasını sağlayan Prof. Dr. Metin Tuna (Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi) ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Tez aşamamda benden destek ve bilgilerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Melehat Avcı Birsin'e (Ankara Üniversitesi), Prof. Dr. Mehmet Bilgen'e (Akdeniz Üniversitesi), Prof. Dr. Ahmet Naci Onus'a (Akdeniz Üniversitesi), Prof. Dr. Aynur Gürel'e (Ege Üniversitesi), Prof. Dr. Behçet Kır'a (Ege Üniversitesi) ve Prof. Dr. Emre İlker'e (Ege Üniversitesi) teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca benden desteklerini esirgemeyen değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Berk Benlioğlu'na (Ankara Üniversitesi) ve arkadaşlarım Arş. Gör. Onur Okumuş'a (Erciyes Üniversitesi), Ayşe Sağır'a ve Akif Sağır'a teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak bana her zaman güvenen, her kararında yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen değerli aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
AKADEMİK BEYAN	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	6
2.1. Şeker Otunda Kolhisin Uygulamaları	6
2.2. Diğer Bitkilerde Kolhisin Uygulamaları	8
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Materyal.....	13
3.1.1. Bitki materyali	13
3.1.2. Mutasyon materyali	13
3.2. Metot	14
3.2.1. Kolhisin çözeltisinin hazırlanması.....	14
3.2.2. Denemenin planlanması.....	14
3.2.3. Bitkilere kolhisin çözeltisinin uygulanması	14
3.2.4. Kimyasal uygulanan bitkilerde ploidi analizi	17
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	19
4.1. Bitkilerde Canlılık Oranı (Adet-%)	20
4.2. Bitki Boyu (cm)	21
4.3. Yaprak Sayısı (Adet)	21
4.4. Dal Sayısı (Adet)	22
4.5. Klorofil İçeriği (spad)	23
4.6. Ploidi Analizi	23
4.6. DNA İçerikleri	25
6. SONUÇLAR	28
7. KAYNAKLAR	30
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kolhisin Uygulaması ile Poliploid Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Bitkilerinin Elde Edilmesi” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

11/11/2022

Özlem AKBAŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

C : Karbon
H : Hidrojen
N : Azot
O : Oksijen
% : Yüzde

Kisaltmalar

Ar-Ge : Araştırma ve geliştirme
cm : Santimetre
DAPI : 4',6-Diamidino-2-fenilindol
dm³ : Desimetre küp
DNA : Deoksiribo nükleik asit
HPLC : Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
mg : Miligram
MS : Murashige Skoog

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Doku kültürü ile çoğaltılan şeker otu çeşidi Levent 93 fideleri	13
Şekil 3.2.a. Fidelerden alınan sürgün uçları; b. Sürgün uçlarının kolhisin çözeltisine daldırılması.....	15
Şekil 3.3. Köklendirme ortamına alınan şeker otu sürgün uçları	15
Şekil 3.4. Kolhisinle muamele edilmiş ve hayatta kalan bitkilerden alınan çelikler	16
Şekil 3.5. Bitkilerin saksılara aktarılması	16
Şekil 3.6. Flow sitometri analizi	17
Şekil 4.1. Flow sitometri analizi sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü	24
Şekil 4.2. Poliploid bitkiler	25
Şekil 5.1.a. Kontrol bitkilerinden bir fotoğraf; b) Poliploid olan bitkilerden bir fotoğraf	28

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1.1. Canlı bitki sayısı ve oranları	20
Çizelge 4.1.2. Yaşayan bitkilerden alınan çeliklerde canlı bitki sayısı ve oranları	20
Çizelge 4.2. Bitki boyu ortalamaları, maksimum ve minimum bitki boyları	21
Çizelge 4.3. Yaprak sayısı ortalamaları, maksimum ve minimum yaprak sayıları	22
Çizelge 4.4. Dal sayısı ortalamaları, maksimum ve minimum dal sayıları	22
Çizelge 4.5. Klorofil içeriği ortalamaları, maksimum ve minimum klorofil içerikleri ..	23
Çizelge 4.6. Şeker otu - arpa florasan yoğunlukları ve DNA içerikleri.....	26

1. GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler; yaprak, sap, kabuk, çiçek, meyve, tohum, kök, rizom, soğan ve yumru gibi organlarından birinde, birkaçında veya tamamında farmakolojik aktivitesi olan sekonder metabolitleri içeren ve bu sebeple ilaç, parfümeri, gıda gibi endüstrilerde kullanılan bitkilere denmektedir. Tıbbi ve aromatik bitkilerin kozmetik ve parfümeride, baharat üretiminde, gıda katkı maddesi olarak, bitki koruma alanında, hayvan sağlığında ve yem katkı maddesi olarak, tekstil ve halı için doğal boya elde edilmesinde ve süs bitkisi olarak kullanım alanları bulunmaktadır. Bunlara ek olarak bazı hastalıkların tedavisinde ve ilaç yapımında da kullanımı mevcuttur.

Dünya’da yaklaşık olarak 400 bin kadar bitki bulunduğu ve bunların 20 bininin tıbbi amaçlarla kullanıldığı bilinmektedir. Ülkemizde ise yayılış gösteren yaklaşık 10 bin civarında çiçekli bitki taksonu olduğu tahmin edilmektedir. Bu taksonlar farklı fitocoğrafik bölgelerde yayılış göstermektedir ve yaklaşık 3300 endemik bitkileri içermektedir. Yaklaşık 2000 bitki taksonu tıbbi ve aromatik amaçlarla değerlendirilmektedir ve yaklaşık 500-1000 bitki taksonu geleneksel tıpta kullanılmaktadır (Öztürk vd. 2012). Ayrıca ülkemizdeki tıbbi ve aromatik bitkilerin neredeyse tamamı doğal olarak yetişmekte olup çok az bir kısmı kültüre alınmıştır.

Tıbbi ve aromatik bitkiler grubu çoğunlukla sekonder metabolitler bakımından zengin olan bitkiler tarafından oluşmaktadır. Sekonder metabolitler; proteinler, karbonhidratlar ve yağlar gibi temel metabolitler dışında, bitki yaşamı bakımından mutlak gerekli olmayan, genelde düşük miktarlarda ve farklı kimyasal yapıları olan maddelerdir. Tıbbi ve aromatik bitkiler farklı organlarında farklı miktarlarda sekonder metabolit içerirler ve içerdikleri sekonder metabolitlere göre değişik amaçlarla kullanılmaktadır. Örneğin haşhaş bitkisi içerdiği morfinden dolayı cerrahi müdahalelerde uyuşturucu ve anestezi uygulamaları gibi sağlık sektöründe kullanılırken gül içerdiği uçucu yağdan dolayı parfüm ve kolonyalara koku vermesi amacıyla kozmetik sektöründe kullanılmaktadır.

İnsanlar hastalıkların tedavisinde geçmişten günümüze kadar bitkilerden faydalanmıştır. Buna ek olarak günümüzde tüketicilerin doğal ve organik ürünleri tercih etmesi, sağlıklı ve dengeli beslenme isteği, şekerli gıdaların tüketimi gibi beslenme bilincini oluşturmaları tıbbi ve aromatik bitkilere olan ilgiyi giderek artırmıştır.

Günlük yaşamda artan stres koşulları, hareketsiz yaşam gibi daha birçok faktör önemli sağlık problemlerinden olan obezite ve diyabete sebep olmaktadır. Gün geçtikçe obezite ve diyabet artmakta ve birçok ülkenin sağlık problemlerinin başında gelmektedir. Diyabet, pankreasın yeterli miktarda insülin üretmemesi ya da ürettiği insülini etkili bir şekilde kullanamaması durumunda gelişen ve ömür boyu süren bir hastalıktır. Yani kişi yediği besinlerden kana geçen şekeri kullanamaz ve kan şekeri yükselir. Sonuç olarak diyabet tedavisinde amaç kan şekeri ayarını sağlamaktır.

Uluslararası diyabet federasyonu 2021 yılında dünya genelinde 537 milyon yetişkinin diyabet hastası olduğunu bildirmektedir (Anonim 1). Ülkemizde 1998 yılında

2,5 milyon kişi diyabetken 2013 yılında bu sayı yaklaşık olarak 7 milyona yükselmiştir. Dünya sağlık örgütüne göre diyabet, 2000 yılından bu yana %70 gibi önemli bir yüzdelik artışla ilk 10 ölüm nedenleri arasına girmiştir aynı zamanda 2000 yılından bu yana %80'lik bir artışla ilk 10 ölüm nedeni arasında erkek ölümlerindeki en büyük artıştan da sorumludur (Anonim 2). Bu sebeple başta diyabet hastaları olmak üzere insanlar şekerli gıdalara yönelmiş ve böylece tatlandırıcılara olan ilgi artmıştır. Tatlandırıcı, yiyecek ve içecekler tat vermek için kullanılan doğal veya yapay maddelere denmektedir. Ancak uzun süreli tatlandırıcı tüketiminin yeme isteğini artırdığı, iştah metabolizmasını etkilediği ve insülin direncine sebep olması gibi bazı olumsuz etkileri bulunmaktadır (Eşer Durmaz ve Keser 2018). Tatlandırıcı kaliteleri ile birlikte şekerler diyabet, hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar gibi bazı kronik hastalıklar için bir risk faktörü olduğu ve obeziteye sebep olan fazla kalori alımını artırdığı bulunmuştur. Tatlandırıcı arzusu, insanların tüketicilere kalorisiz tatlılık özelliği sunmayı mümkün kılan alternatif yoğun tatlandırıcıların birçok formunun keşfedilmesine sebep olmuştur (Savita vd. 2004; Rameshsing vd. 2015). Bundan dolayı doğal tatlandırıcılara yönelim daha fazla olmaktadır. Dolayısıyla doğal tatlandırıcı denildiğinde akla ilk gelen bitki şeker otu olmaktadır.

Paraguay'da uzun yıllardır tatlandırıcı ve bitkisel ilaç olarak kullanılan şeker otundan elde edilen tatlandırıcı, şeker hastaları için yapay tatlandırıcılara alternatif olan en iyi doğal kaynaktır. Şeker otu, kalorisiz tatlandırıcı olarak sentetik tatlandırıcılara alternatiftir. Şeker otu kan şekeri seviyesini etkilemediğinden diyabet hastaları için rahatlıkla kullanılabilir bitkisel bir kaynaktır. Yapay tatlandırıcılar gibi nörolojik veya böbreklere yan etki etmemektedir. Çok yönlü kullanımına ek olarak anti-fungal ve anti-bakteriyel özelliklere sahiptir bundan dolayı şeker hastaları için bitkisel ilaçlarda, toniklerde, günlük kullanılan ağız gargaraları ve diş macunlarında güvenilir olarak kullanılabilir. Hafif şeker otu yaprağı çayı mide rahatsızlıkları için tercih edilebilir (Goyal vd. 2010).

Şeker otu, Latince ismi *Stevia rebaudiana* olup 2n kromozom sayısı 22 olan bir türdür. Tatlı ot, tatlı yaprak, bal yaprak, şeker yaprak ve bal mate olarak da bilinir (Carakostas vd. 2008; Suresh vd. 2018). Asteraceae familyasına ait, Paraguay'ın dağlık arazilerinde bulunan çok yıllık otsu bir bitkidir (Yadav vd. 2011; Azizan vd. 2021). Anavatanı Paraguay ve Güneybatı Brezilya olan bu bitki ülkemizde ilk defa Antalya'da Akdeniz Üniversitesi'nde yetiştirilerek tanıtılmıştır.

Stevia rebaudiana Japonya, Çin, Kore, Endonezya, Tanzanya, Meksika, Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada dâhil olmak üzere birçok ülkede bir numaralı bitki olarak yetiştirilir (Madan vd. 2010; Zhang vd. 2018). Şeker otunun başlıca üreticileri Japonya, Çin, Tayvan, Tayland, Kore, Brezilya, Malezya ve Paraguay'dır. Şu anda şeker otu Japonya, Brezilya, Kore, İsrail, Amerika Birleşik Devletleri, Arjantin, Çin, Kanada, Paraguay ve Endonezya'da (Crammer ve Ikan 1986; Singh ve Rao 2005; Yadav vd. 2010) tüketilmektedir ve bugüne kadar kullanımından herhangi bir olumsuz etki bildirilmemiştir (Kingham ve Soejarto 1985; Brandle ve Rosa 1992; Yadav vd. 2010). Şeker otu, gıda ve ilaç endüstrisi için ilk kez Japonya'da kullanılmış ve kullanımı

gün geçtikçe artmaktadır (Uskutoğlu vd. 2019) Kuzey ve Güney Amerika, Güney Avrupa, Kore, Tayland, Çin, Hindistan ve Bangladeş gibi birçok ülkede de doğal bir tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Dünyada en büyük şeker otu üreticisi olarak Çin, en büyük şeker otu tüketicisi olarak Amerika Birleşik Devletleri ve Kuzey Amerika nitelendirilir (Al-Taweel vd. 2021). Şeker otu içerdiği steviol glikozitlerden dolayı doğal bir tatlandırıcı olma özelliği taşımaktadır. Şeker otu yaprakları çeşitli tatlılık özelliği gösteren steviosit (%5-10), rebaudiosit-A (%2-4), rebaudiosit-B, C, D, M ve dulkosit olarak adlandırılan glikozitlerden veya sekonder metabolitlerden oluşur. En yüksek steviol glikozit içeriğine sahip olduğu için bitkinin en önemli organları yapraklarıdır. Diğer kısımları daha düşük konsantrasyonlarda steviol glikozit içerir (Azizan vd. 2021). Şeker otunda ortalama steviosit oranı %4-12, rebaudiosit-A oranı %2-4 arasında değişmektedir (Kaplan ve Turgut 2019) ve bitkinin içerdiği steviol glikozitlerin miktarı kalitesini belirlemektedir. Bunlar sıradan şeker veya sükrozla karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 300-400 kat daha fazla tatlılığa sahip yüksek etkili tatlandırıcılardır (Azizan vd. 2021). Bitkinin asıl tatlandırıcı olma özelliğini veren bu steviol glikozitlerden rebaudiosit A tat olarak pancar şekerine daha yakındır. Şeker otunun kuru yaprakları sükrozdan 20-30 kat, sıvı ekstresi 250-300 kat daha tatlıdır. Çünkü steviol glikozitler doğal oluşan bileşiklerdir, yüksek tatlandırıcı ve neredeyse hiç kalori değeriyle şekerin yerine kullanılabilecek en umut verici kaynak olarak kabul edilir. Geniş kapsamlı uygulamalara ve yüksek ekonomik değere sahiptir. (Soejarto vd. 1983; Yadav vd. 2011; Zhang vd. 2018).

Yukarıda da bahsedildiği gibi şeker otunun sahip olduğu dikkat çekici özelliklerinden dolayı bazı araştırmacılar bu özelliklerini geliştirmek amacıyla şeker otunu ıslah programlarına dâhil etmişlerdir. Başta bitkinin içerdiği steviol glikozit miktarını dolayısıyla kimyasal özelliklerini, tarımsal ve bitkisel özelliklerini geliştirmek, çimlenebilme yeteneğini artırmak gibi amaçlarla ıslah çalışmaları yapılmaktadır. Bu amaçlar kapsamında şeker otu bitkisinde poliploid bitki ıslahı çalışmaları denenmiş ve denenmeye devam etmektedir. Poliploidi, somatik hücrelerde ikiden fazla kromozom takımının bulunması durumuna denir (Şehirli ve Özgen 2013). Bitkinin kendi kromozomlarının katlanması durumuna “autopoliploidi”; farklı genom taşıyan cinslerin melezlemesiyle elde edilen bitkilerdeki kromozom sayısının katlanmasına ise “alloploiploidi” denir. Tetraploid çavdar autopoliploidiye, tritikale ise alloploiploidiye örnek olarak verilebilir.

Bitkilerde poliploidi doğal olarak meydana gelebildiği gibi antimitotik ajanlar kullanılarak mitoz bölünmenin bozulmasıyla da elde edilebilmektedir. Kolhisin, orizalin ve trifluralin poliploid bitki elde etmek için yaygın kullanılan mitotik ajanlardandır (Goluch vd. 2021). Bunlara ek olarak kloral hidrat, eter, kloroform ve fenil ürean gibi kimyasal maddeler ve ısı şokları da poliploid bitki ıslahında kullanılmaktadır (Şehirli ve Özgen 2013). Bahsi geçen bu kimyasallar içerisinde en yaygın olarak kullanılan kimyasal kolhisindir. Kolhisin güz çiğdemi (*Colchicum autumnale*) bitkisinden elde edilen doğal bir alkaloittir. Kimyasal formülü $C_{22}H_{25}NO_6$ 'dır.

Kolhisin tohum, kök ve sürgünlere uygulanabilir. Üzerinde çalışılan bitkinin türüne, kolhisin uygulanacak olan dokuya göre miktarı ve süresi değişebilmektedir.

Ayrıca bitki dokularına kolhisin damlatma, pamuk aracılığıyla bitkiye temas ettirme veya kolhisine daldırma gibi farklı uygulama yöntemleri bulunmaktadır.

Kolhisin, hücre bölünmesinde iğ ipliklerinin oluşumunu önleyerek metafaz evresinde kromozomların orta düzlemde toplanmasını engeller ve dolayısıyla normal anafaz ve telofaz evreleri meydana gelmez. Böylece normal kromozom sayısının iki katı kromozoma sahip olan poliploid hücreler oluşur (Şehirali ve Özgen 2013). Poliploidi uygulamaları, uzun zamandır ıslah programlarında tarımsal verimi artırmak için kullanılan değerli bir ıslah yöntemidir. Poliploidi, genetik farklılığı artıran önemli bir bitki ıslah aracıdır. Kromozom gruplarını ve bir hücredeki gen sayısını değiştirerek bitki özelliklerini arzu edilen veya edilmeyen yönde değiştirebilir (Madani vd. 2021). Poliploid bitkilerde çiçeklerin, yaprakların, meyvelerin ve tohumların boyutu genelde artar (Hartwell vd. 2004; Madani vd. 2021). Poliploid bitkiler genellikle daha koyu yeşil ve kalın yapraklara, daha kısa boya, daha iri çiçek, meyve ve tohuma sahip olurlar (Şehirali ve Özgen 2013). Bitkilerde çiçek boyutlarını büyütme, daha sağlam gövde oluşturmak, bitkilerin dayanıklılığını ve sağlamlığını geliştirmek ve bitkilerin renklerini yoğunlaştırmak için süs bitkilerinde poliploidi üzerine çok sayıda çalışma yürütülmüştür (Amiri et. al 2010; Azizan vd. 2020). Bu nedenle poliploidinin başta süs bitkileri olmak üzere birçok alanda kullanımı mevcuttur. Poliploidi %80'den fazla bitki türünde ve çiçekli bitkilerde türleşmenin %2-4'ünden sorumludur. Makarnalık buğday, pamuk, tütün ve patates gibi kültüre alınan bitkiler; menekşe ve inci çiçeği gibi süs bitkileri poliploid organizmalardır (Sattler vd. 2016; Madani vd. 2021). Enzim aktivitesi ve biyoaktif özelliklerden sorumlu sekonder metabolit üretimi poliploidi ile artırılabilir (De Jesus-Gonzalez ve Weathers 2003; Madani vd. 2021). Poliploidi, bitki sekonder metabolit üretimini artırmak için veya metabolit profilini geliştirmek için kullanılmıştır. Çoğu allopoliploid bitkilerin biyokimyasal analizlerinden elde edilen sonuçlar, enzimatik kapasitelerinin ebeveyn bireylerle kıyaslandığında daha yüksek olduğunu ve fenolik bileşiklerce daha zengin olduğunu desteklemektedir (Dhawan ve Lavania 1996; Madani vd. 2021). Bu sebeplerle poliploid bitki ıslahı tıbbi ve aromatik bitkiler için de oldukça önem taşımaktadır.

Bitkilerde sekonder metabolit içeriğini geliştirmede bilinen bir metot kimyasal mutasyon kullanılmasıdır. Poliploidi ajanları veya kimyasalların uygulanması poliploid bitkilerin ıslahında mutasyona uğraticı bir mekanizma olarak kullanıldığı bilinmektedir. Poliploid bitkiler, organların büyüklüğünde örneğin yaprak kalınlığı ve genişliği, bitki büyüklüğü, uzunluğunda artış ve özellikle tıbbi bitkilerde sekonder metabolit veriminde değişimler sergilerler (Ahmadi vd. 2013; Azizan vd. 2020). Poliploidinin bitkilerde tohum, meyve ve yapraklar gibi bazı organlarında ya da bitkinin tamamında irileştirmek, daha koyu ve yoğun renklere sahip olmak ve kimyasal içeriklerini artırmak gibi önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Şeker otunda da kolhisin aracılığıyla poliploidi, daha önceden başarılı olarak teşvik edilmiş ve poliploidi indüksiyonunun istenen özellikleri geliştirdiği bildirilmiştir (Valois 1992; Rameshsing vd. 2015).

Bitkilerde poliploidi morfolojik özelliklerine göre tahmin edilebilse de poliploid bitkiler mikroskop altında kromozom sayımı, stomalarda bulunan kloroplast sayımı ve

çiçektozlarının boylarının ölçülmesi ile tespit edilebilmektedir. Aynı zamanda flow sitometri cihazı kullanılarak da poliploidi belirlenebilmektedir. Flow sitometri, bir sıvı akım içerisinde hücrelerin veya diğer biyolojik partiküllerin fiziksel ya da kimyasal özelliklerinin hızlı ve güvenilir şekilde ölçüldüğü bir cihaz ve tekniktir. Bu yöntem ile hücrenin çapı, içyapısı, enzim aktiviteleri ve DNA miktarları belirlenebilmektedir (Demirel vd. 2020). Demirel vd. (2020) boyama teknikleri kullanılarak yapılan kromozom sayma çalışmalarına göre flow sitometri aracılığıyla kromozom sayma çalışmalarının daha fazla hız kazandığını ve daha çok bitkide çalışmalar yapıldığını bildirmiştir.

Şeker otu bitkisi üzerinde daha önce poliploidi çalışmaları yapılmış olsa da verim ve kalite bakımından üstün olan yerli şeker otu çeşidimiz Levent 93’de yapılan bir çalışmanın bulunmaması sebebiyle çalışmada bitki materyali olarak Levent 93 şeker otu çeşidi kullanılmıştır. Bu araştırmanın amacı, tescilli şeker otu çeşidimiz olan Levent 93 çeşidine kolhisin uygulaması ile kromozom sayısını katlayarak poliploid bitkiler elde etmek ve diploid bitkilerle karşılaştırmaktır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Şeker Otunda Kolhisin Uygulamaları

Oliveira vd. (2004) şeker otunun kromozom sayısını ve bazı morfolojik özelliklerini incelemişlerdir. Valois'in 1992 yılında yapmış olduğu bir çalışmadan türeterek şeker otu tohumlarına %0,500 ile %0,001 arasında değişen konsantrasyonlarda 18 saatlik kolhisin uygulaması yapmışlardır. Varyans analizinin sonuçlarına göre bitkiler arasında oldukça önemli farklılıklar olduğunu ve morfolojik özellikler ile ploidi seviyesi arasında pozitif bir ilişkinin olduğunu aktarmışlardır.

Yadav vd. (2013) daha geniş yaprak büyüklüğü ve yüksek steviol glikozit içeriği ile daha yüksek biokütle verimli şeker otu üretmek amacıyla yürüttükleri bir çalışmada tohumları kolhisin ile muamele etmişlerdir. Tohumlara %0,01, %0,05, %0,10, %0,20, %0,40 ve %0,60 olmak üzere farklı dozlarda daldırma yöntemini kullanarak 6, 18 ve 24 saat boyunca kolhisin uygulamışlardır. Genç fidelerin hayatta kalma oranının %50'nin altına düşürdüğünü bildirmişlerdir. Maksimum poliploid (tetraploid) sayısını 24 saatlik kolhisin uygulamalarında gözlemlemişlerdir.

Hegde vd. (2015) farklı poliploidi seviyeleri ile 9 poliploid şeker otu ve uygulama yapılmamış 1 diploid şeker otu bitkilerini içeren bir çalışma yapmışlardır. Bitkinin verimlilik yeteneği ile ilgili önemli farklılıklar gözlemlediklerini bildirmişlerdir. Yaprak kalınlığı, yaprak alanı, yaprak yaş ve kuru ağırlığı gibi verim parametrelerinin miksploidlerde maksimum olduğunu ve diploitlerle karşılaştırıldığında verimin arttığını bildirmişlerdir. Verim performansı bakımından tüm poliploid bitkilerin diploidlere göre daha iyi olduğunu; poliploidler içerisinde de miksploidlerin en iyisi olduklarını aktarmışlardır.

Rameshsing vd. (2015) yapmış oldukları bir çalışmada %0,00 (kontrol), %0,25, %0,50, %0,75 %1,00, %1,50 ve %2,50 konsantrasyonlarında kolhisin kullanarak farklı şeker otu mutantları geliştirmişler ve ploidi değişimini belirlemek amacıyla DNA içeriğini test etmişlerdir. Ploidi seviyesini flow sitometri analizi ile tanımlamışlardır. Yapraklarda bulunan steviol glikozit içeriklerini HPLC ile belirlemişlerdir. Bazı poliploidlerin steviosit ve rebaudiosit-A yüzdelерinin kontrolle kıyaslandığında 2 kat arttığını bildirmişlerdir. Böylece şeker otunda kolhisinin daha yüksek steviol glikozit içeriği ile yeni varyeteler oluşturan bir poliploidi ajanı olarak doğruladığını belirtmişlerdir.

Ghonema vd. (2015) şeker otunda yaptıkları bir çalışmada tohumlara ve tomurcuklara %0,00 (kontrol), %0,01, %0,05, %0,10, %0,25 ve %0,50 dozlarında 18'er saat kolhisin uygulamışlardır. Hem tohumlarda hem de tomurcuklarda %0,10, %0,25 ve %0,50 kolhisin dozlarının öldürücü etki yaptığını bildirmişlerdir. Yapılan çalışma sonucunda sadece tomurcuklara uygulanan %0,05 kolhisin dozunda tetraploid bitkiler elde edildiğini bildirmişlerdir.

Rameshsingh vd. (2015) poliploid şeker otu bitkisinin tarla performansını değerlendirmek ve onların in vitro çoğaltımı amacıyla yaptıkları bir çalışmada şeker otu bitkilerinin aksilar tomurcuklarına Suhad-Mahdi tarafından standartlaştırılmış protokole göre farklı dozlarda kolhisin uygulamışlardır. Diploid, triploid, tetraploid ve miksaploid ile farklı ploid seviyelerinde poliploidler gözlemlemişlerdir ve kolhisin uygulanan bitkileri özellikle çoğaltarak onların tarla performanslarını değerlendirmişlerdir.

Zhang vd. (2018) *Stevia rebaudiana*'da poliploidinin elde edilmesi için bir protokol kurmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada Zhongshan No.2 şeker otu çeşidinin çimlenmiş tohumlarına %0,05 ve %0,10'luk dozlarda 24 ve 48 saatlik kolhisin uygulamışlardır. Kolhisin konsantrasyonu ve tohumların daldırılma sürelerinin poliploidizasyonun seviyesini etkilediği bildirilmiştir. Çimlenmiş tohumlara %0,05'lik 48 saat ve %0,10'luk 24 saat kolhisin uygulamasının tetraploidi için en etkili olduğu bulunmuştur.

Mahdi vd. (2018) yapmış oldukları bir çalışmada %0,00 (kontrol), %0,25, %0,50, %0,75, %1,00, %1,50 ve %2,50 olmak üzere 7 farklı kolhisin konsantrasyonunu şeker otu bitkilerine uygulamışlardır. Bitki ağırlığı, yaprak uzunluğu, genişliği ve kalınlığı, stoma yoğunluğu ve sayısı gibi morfolojik ölçümler üzerinde çalışmışlardır. Flow sitometri analizi ile poliploidi tanımladıklarını bildirmişlerdir. Varyans analizi sonuçlarının bitkiler arasında son derece önemli farklılıklar gösterdiğini belirtmişlerdir.

Xiang vd. (2019) diploid ve tetraploid şeker otu bitkileri arasında morfolojik özellikler ve steviol glikozit içeriğindeki farklılıkları nitelendirmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada bitkilere kolhisin uygulamışlardır. %0,20'lik kolhisin çözeltisinin 12 saatlik uygulamasından sonra tetraploid bitkiler elde etmişlerdir. Tetraploid şeker otu bitkilerinin sitolojik analizleri sonucu kromozom sayısının katlandığını ve flow sitometri analizinin de DNA içeriğinin katlandığını gösterdiğini bildirmişlerdir.

Talei vd. (2020) farklı kolhisin dozlarının ve muamele sürelerinin şeker otunda morfo-fiziksel özelliklerine, sekonder metabolitlerine ve kromozomal tepkilerine etkilerini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada %0,00 (kontrol), %0,05, %0,10 ve %0,20 dozunda olmak üzere 4 farklı kolhisin çözeltisi kullanılmış olup muamele süresi olarak da 12, 24, 36 ve 48 saat belirlemişlerdir. Çalışma sonucuna göre %0,20'lik kolhisin konsantrasyonunda 24 saatlik uygulamada tetraploidinin tespit edildiğini, diğer kolhisin konsantrasyonlarında tetraploidinin tespit edilemediğini bildirmişlerdir.

Grad ve Gomaa (2020) 3 farklı şeker otu çeşidinin (Sponti, China1 ve EGY1) steviol glikozitlerini geliştirmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada %0,000 (kontrol), %0,025, %0,050, %0,100 ve %0,200 olmak üzere 5 farklı dozda pamuk aracılığıyla bitkinin aksilar tomurcuklarına kolhisin uygulamışlardır. Verilere göre tomurcukların hayatta kalma oranının %26,67-100 arasında olup en iyi Sponti çeşidinde olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar, kolhisin vasıtasıyla poliploidinin steviosit ve rebaudiosit-A yüzdelerini etkilediğini bildirmişlerdir.

Azizan vd. (2021) şeker otunda yaprak ve steviol glikozit verimini geliştirmek amacıyla kolhisinin mutajenik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada %0,00 (kontrol), %0,50, %1,00, %1,50, %2,00 ve %2,50 olmak üzere 6 farklı kolhisin konsantrasyonunu pamuk aracılığıyla 48 saat bitkilere uygulamışlardır. Sonuçları kontrol bitkileri ile kıyasladıklarında mutant bitkilerin morfolojik özelliklerinde önemli farkların olduğunu bildirmişlerdir.

2.2. Diğer Bitkilerde Kolhisin Uygulamaları

Majdi vd. (2010) *Tanacetum parthenium* bitkisinde poliploidiyi incelemek, diploid ve tetraploid bitkilerin morfolojik, fizyolojik, sitolojik ve fitokimyasal özelliklerini analiz etmek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bir haftalık *Tanacetum parthenium* fidelerine %0,05 dozunda 2, 4, 6, 8 ve 24 saat kolhisin uygulamışlardır ve 4 ay sonra tetraploid bitkiler elde etmişlerdir. Kolhisin uygulamasındaki süre arttıkça tetraploidi oranının da arttığını bildirmişlerdir.

Omidbaigi vd. (2010) diploid *Ocimum basilicum* bitkilerine kolhisin kullanarak tetraploid *Ocimum basilicum* bitkileri elde etmek; daha yüksek uçucu yağ verimi ve daha verimli çeşitler üretmek için daha fazla poliploidi elde etmek amacıyla yürüttükleri bir çalışmada %0,00, %0,05, %0,10, %0,20, %0,50 ve %0,75 olmak üzere farklı kolhisin konsantrasyonlarını bitkinin tohum, uç meristemleri ve kökleri olmak üzere farklı bölgelerine uygulamışlardır. Bitkilerin ploidi seviyelerini morfolojik olarak, polen boyutları ve stoma boyutlarının ölçümüyle, kloroplast sayımıyla ve flow sitometri aracılığıyla belirlemişlerdir. Uç meristem uygulamalarından kotiledon yaprakların oluşumu dönemindeki kolhisin uygulamalarında tetraploidinin gözlemlendiğini aktarmışlardır.

Glowacka vd. (2010) *Miscanthus* türlerinin in vitro sürgünlerinde kolhisin uygulayarak etkili bir poliploidizasyon sistemi geliştirmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada bitkilere 0 μ M, 156,5 μ M, 313 μ M, 626 μ M ve 1252 μ M dozlarında 6, 18 ve 24 saat kolhisin uygulamışlardır. Ploidi seviyesini belirlemek amacıyla yaptıkları flow sitometri analizi sonucu tetraploid bitkilerin elde edildiğini aktarmışlardır.

Xu vd. (2010) *Juncus effusus* bitkisinde in vitro kolhisin uygulayarak tetraploidi elde etmek ve diploid ile tetraploid bitkiler arasında anatomik, ultrayapısal ve fizyolojik farklılıkları araştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada Nonglin-4 çeşidine 0, 50, 100, 500 mg/dm³ dozlarında kolhisin çözeltisini 6, 12 ve 24 saat boyunca uygulamışlardır. 50 mg/dm³ kolhisin konsantrasyonunun 6 saatlik uygulamasında herhangi bir tetraploid gözlemlemediklerini bildirmişlerdir. Fakat aynı konsantrasyonun 12 ve 24 saatlik uygulamalarında tetraploid bitki sayısının arttığını bildirmişlerdir. Kolhisin konsantrasyonunun artmasıyla tetraploid bitki sayısının da arttığını bildirmişlerdir. En yüksek tetraploid bitki sayısının 500 mg/dm³ kolhisin konsantrasyonunun 12 ve 24 saatlik uygulamasında olduğunu aktarmışlardır.

Tang vd. (2010) *Paulownia tomentosa* bitkisinde yaptıkları bir çalışmada embriyonik kallusları %0,01, %0,05 ve %0,10 konsantrasyonunda kolhisin içeren sıvı MS besi ortamlarında 24, 48 ve 72 saat boyunca muamele etmişlerdir. Bitkiciklerin ploidi seviyesini morfolojik olarak, kromozom sayımı ve flow sitometri yöntemi ile belirlemişlerdir. Tetraploid bitkicik üretimi bakımından en iyi sonucu %0,05 kolhisin konsantrasyonunun 48 saatlik uygulamasında elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Kaensaksiri vd. (2011) *Centella asiatica* bitkisinde poliploidi elde etmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada bitkinin in vitroda büyütülmüş sürgün uçlarına %0,025 ile %0,400 arasında değişen konsantrasyonlarda 12-36 saat kolhisine daldırmışlardır. Flow sitometri aracılığıyla belirlenen ploidi seviyelerini kromozom sayımı ile doğrulamışlardır. %0,050-%0,200 kolhisin çözeltisinin 12-24 saatlik uygulamalarında tetraploid bitkilerin gözlemlendiğini aktarmışlardır.

Chen vd. (2011) kolhisin uygulanarak elde edilen tetraploid *Anthurium andraeanum* bitkilerinin ilk in vitro üretimini raporladıkları, tetraploid bitkiler arasındaki farklılıkları ve morfolojik özellikleri incelemiş olup tetraploid bitkilerin in vitro çoğaltımı hakkında yürüttükleri bir çalışmada materyalleri %0,1, %0,2 ve %0,3 konsantrasyonlarında 3, 5 ve 7 saat kolhisinle muamele etmişlerdir. Flow sitometri analizi sonuçlarına göre diploid bitkilerin DNA içeriğinin iki katına sahip tetraploid bitkilerin elde edildiğini bildirmişlerdir. Uygulamaların tamamında miksoyploid veya tetraploid elde edildiğinden dolayı poliploidinin elde edildiğini aktarmışlardır.

Gantait vd. (2011) *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella bitkisinde kromozom katlama aracılığıyla varyasyon oluşturmak için in vitroda yetiştirilmiş sürgünlere %0,01, %0,05, %0,10, %0,50 ve %1,00 olmak üzere farklı konsantrasyonlarda 2, 4 ve 8 saat boyunca kolhisin uygulamışlardır. Yapılan çalışmada bitkiciklerin ploidi seviyesini flow sitometri analizi ile belirlemişlerdir. Flow sitometri analizine göre kolhisinle muamele edilip yaşayan 509 materyalden 410 tane diploid ve 99 tane tetraploid elde etmişlerdir. En fazla tetraploid bitkinin %0,10 kolhisin dozunun 8 saatlik uygulamasında elde ettiklerini aktarmışlardır.

Atichart (2013) *Dendrobium chrysotoxum* L. bitkisinde poliploidi elde etmek için etkili kolhisin konsantrasyonunu ve uygun süreyi belirlemek amacıyla bu çalışmayı %0,00, %0,01, %0,02, %0,03, %0,04 ve %0,05 konsantrasyonunda kolhisin içeren yarı katı VW ortamında 1, 2, 3, 4 ve 5 gün süreyle yürütmüştür. En etkili uygulamanın %0,04 kolhisin konsantrasyonunun 1 gün uygulaması olduğunu flow sitometri aracılığıyla belirlemiştir.

Urwin (2014) “Grosso” ve “Seal” lavanta çeşitlerinde kolhisin kullanarak kromozom katlama çalışması yapmıştır. Daha yüksek verimli lavanta üretmek için bu iki çeşitte tüm bitkiye, bitkiden alınan çeliklere ve sürgünlerin doku kültürüne alınması ile kolhisin uygulamış ve poliploidi elde etmiştir. Yaptığı çalışmada flow sitometri analizi sonuçlarına göre tetraploid bitki elde ettiğini aktarmıştır.

Sinski vd. (2014) yapmış oldukları bir çalışmada asmanın çekirdeksiz çeşitlerinde in vitro autopoliploidi elde etmek amacıyla somatik embriyolara ve sürgün uçlarına 0, 12, 24, 36 ve 48 saat boyunca 0, 20, 100, 250 ve 1250 μ M kolhisin; 0, 20, 40, 60 ve 80 μ M orizalin uygulamışlardır. Daha sonra kök uçlarından kromozom sayımı yaparak ploidi seviyesini belirlemişlerdir. Bu sonuçlara göre tetraploidi tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Blasco vd. (2015) *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. bitkisinde tetraploid elde etmek için verimli bir yöntem belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada tüm bitkilere, sürgün uçlarına ve tohumlara olmak üzere 3 farklı kolhisin uygulaması denemişlerdir. In vitro koşullarda yetiştirilen fideleri %0,1 dozunda kolhisin çözeltisine 15, 30, 45 ve 60 dakika boyunca daldırmışlardır. Gelişmiş yapraklar ve aksilar tomurcukları çıkararak sürgün uçlarına birer damla %0,01 ve %0,05 konsantrasyonlarında 1, 2 ve 3 gün boyunca kolhisin çözeltisi uygulamışlardır. Son olarak da sterilize edilmiş tohumları %0,1, %0,3 ve %0,5 konsantrasyonlarında kolhisin çözeltisi ile 24 ve 48 saat boyunca muamele etmişlerdir. Sürgün uçlarında %0,05 konsantrasyonundaki kolhisin çözeltisinin 3 günlük uygulamalarında; tüm bitkide %0,1 konsantrasyonunun 30 dakikalık uygulamasında en yüksek poliploid sayısını elde ettiklerini bildirmişlerdir. Tohumlara yapılan uygulamalarda ise %0,1 konsantrasyonunun 48 saatlik kolhisin uygulamasında sadece bir tane poliploid elde ettiklerini aktarmışlardır.

Tavan vd. (2015) *Thymus persicus* bitkisinde in vitro tetraploid elde etmek için uygun bir protokol belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada bitkinin sürgün uçlarını %0,05, %0,10, %0,30 ve %0,50 konsantrasyonlarında kolhisin içeren MS ortamlarında 12-48 saat boyunca kültüre almışlardır. Bitkilerin DNA içeriklerini ve ploidi seviyelerini flow sitometri aracılığıyla belirlemişlerdir. Kromozom sayma çalışmaları ile flow sitometri sonuçlarını doğrulamışlardır. Poliploidi elde etmek için en etkili uygulama %0,30 kolhisin konsantrasyonunun 12 saatlik uygulaması olduğunu ve bunu yine aynı konsantrasyonun 24 saatlik uygulamasının takip ettiğini bildirmişlerdir.

Huang vd. (2015) *Lobularia maritima* (L.) Desv. bitkisinin çimlenmiş tohumlara ve fidelerin apikal büyüme noktalarına kolhisin uygulayarak tetraploid bitki elde etmek için etkili bir metot geliştirmek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Yaptıkları bu çalışmada çimlenmiş tohumları %0,05, %0,10 ve %0,20 konsantrasyonlarında 6, 12, 24 ve 36 saat kolhisin çözeltisine daldırmışlardır. Fidelerde ise kotiledonların oluşma aşamasında %0,05, %0,10 ve %0,20 konsantrasyonlarında 48 saat boyunca pamuk aracılığıyla kolhisin uygulamışlardır. Çimlenmiş tohumlara yapılan uygulama sonuçlarına göre en yüksek tetraploid oluşum oranı %0,20 konsantrasyonunda 12 saatlik muamele olduğunu aktarmışlardır. Fidelere yapılan uygulama sonuçlarına göre ise en yüksek tetraploid oluşum oranı %0,05 konsantrasyonundaki kolhisin uygulamasında olduğunu aktarmışlardır.

Yang vd. (2015) *Gossypium arboreum* bitkisinde tetraploid elde etmek, en iyi kolhisin konsantrasyonunu ve uygulama süresini belirleyerek ilerideki *Gossypium* çalışmaları için bir referans sağlamak amacıyla yürüttükleri bir çalışmada farklı konsantrasyonlarda kolhisin çözeltisini 24 saat boyunca uygulamışlardır. Bitki kök uçlarından kromozom sayımı ile bitkilerin ploidi seviyelerini belirlemişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre *Gossypium arboreum* bitkisinde kolhisin vasıtasıyla poliploidi elde edilmiştir.

Widoretno (2016) *Pogostemon cablin* Benth. bitkisinde kolhisinin sürgün oluşumuna etkisi, tetraploid bitki elde etme ve diploid ile tetraploid bitkileri karşılaştırmak amacıyla yürüttükleri bir çalışmada MS besi ortamını 30, 60, 120 ve 240 mg/l kolhisin çözeltisi ile 3 hafta boyunca desteklemişlerdir. Kolhisinle muamele edilmiş bitkilerden rejenere olan 21 bitki içerisinde 6 bitkinin tetraploid olduğunu kromozom sayma yöntemi ile doğrulamışlardır. *Pogostemon cablin* Benth. bitkisinde poliploid elde etmek için etkili kolhisin dozunun 60 mg/l olduğunu bildirmişlerdir.

Tuwo ve Indrianto (2016) orkide *Vanda* melezinin (*Vanda limbata* Blume X *Vanda tricolor* Lindl. var. *suavis*) kolhisin uygulamasının büyüme evresine etkilerini değerlendirmek ve poliploidi elde etmek için kesin etkili kolhisin konsantrasyonu ve süresini belirlemek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışmada %0,00, %0,01, %0,05, %0,10, %0,50 ve %1,00 konsantrasyonlarında kolhisin çözeltisini 6, 12, 18, 24 ve 96 saat boyunca uygulamışlardır. Yapılan flow sitometri analizi ile orkide *Vanda* melezinde kolhisinin poliploidi elde ettiğini aktarmışlardır.

El-Nashar ve Ammar (2016) tarla koşullarında yetiştirilen *Calendula officinalis* L. bitkisinde 6 kolhisin konsantrasyonun ve 4 daldırma süresinin bitki büyüme ve çiçek verim bileşenleri üzerindeki etkisini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Çalışmada 0, 400, 800, 1200, 1600 ve 200 ppm kolhisin konsantrasyonunu 1, 2, 3 ve 4 saat boyunca uygulamışlardır. Sonuçlar kolhisin uygulanan *Calendula officinalis* L. bitkileri arasında genetik bir varyasyonun varlığını ve çalışılan mutantların gruplandırılmasının kullanılan kolhisin konsantrasyonu ile uyumlu olduğunu göstermiştir.

Noori vd. (2017) *Trachyspermum ammi* L. bitkisinde in vitro poliploidinin bazı morfolojik özelliklerinde ve uçucu yağ bileşenlerindeki etkisini araştırmak ve elde edecekleri tetraploid bitkileri diploid bitkilerle karşılaştırmak amacıyla yaptıkları bir çalışmada çimlenmiş tohumlara %0,025, %0,050, %0,100, %0,200 ve %0,500 olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda kolhisin çözeltisini 6, 12, 24, 36 ve 48 saat boyunca uygulamışlardır. Tüm uygulamalar içerisinde 26 tetraploid bitki elde edip en yüksek tetraploidi indüksiyonunun %0,050 kolhisin konsantrasyonunun 24 saatlik uygulamasında olduğunu bildirmişlerdir.

Li ve Ruter (2017) *Hibiscus moscheutos* L. bitkisinde tetraploidi elde etmek ve steril triploid klonları daha da yükseltmek için bir protokol belirlemek amacıyla

yaptıkları çalışmada kotiledon aşamasındaki fidelere kolhisin ve orizalin uygulamışlardır. Fideleri %0,025, %0,050 ve %0,100 dozlarındaki kolhisin çözeltileriyle 6, 12 ve 24 saat; 100, 125 ve 150 mM orizalin çözeltileriyle ise 6, 12 ve 24 saat sürelerde muamele etmişlerdir. Bitkilerin ploidi analizi flow sitometri aracılığıyla yapılmıştır. *Hibiscus moscheutos* L. bitkisinde kolhisin ve orizalin uygulamalarının her ikisinde de etkili bir şekilde tetraploidinin elde edildiğini bildirmişlerdir.

Khalili vd. (2020) ticari olarak daha büyük çiçekler üretmek için in vitro poliploid indüksiyonu protokolü geliştirmek amacıyla *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Mini Red bitkisinde %0,05, %0,10, %0,20, %0,50 ve %1,00 kolhisin konsantrasyonlarında ve kontrol amacıyla saf suda 2, 4 ve 8 saat boyunca sürgünleri daldırmışlardır. %0,05 kolhisin çözeltisinin tüm dozlarında ve %0,10 kolhisin dozunun 2 ve 4 saatlik uygulamalarında hiç poliploid bitki elde edilmediğini aktarmışlardır. Genel olarak tetraploid elde etmek için daha yüksek konsantrasyon ve daha düşük uygulama sürelerinin, daha düşük kolhisin dozları ve daha yüksek uygulama sürelerinden daha verimli olduğunu bildirmişlerdir.

Mo vd. (2020) *Rhododendron fortunei* Lindl. bitkisinde poliploidi elde etmek için oldukça etkili bir yöntem oluşturmak amacıyla doku kültüründeki bitkicikleri %0,000 (kontrol), %0,024, %0,050, %0,100, %0,150, %0,200 ve %0,250 konsantrasyonlarındaki kolhisin çözeltilerine 24, 48 ve 72 saat boyunca daldırmışlardır. Ploidi seviyesini flow sitometri aracılığıyla belirlemişlerdir. Toplamda kolhisinle muamele edilmiş 540 bitkicikten 69 tetraploid ve 29 oktaploid bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Talei ve Fotokian (2020) *Melissa officinalis* L. bitkisinde poliploidinin morfo-fizyolojik cevapları üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla bir çalışma yapmışlardır. Bitkilere %0,00 (kontrol), %0,05, %0,10 ve %0,20 konsantrasyonlarında 24, 48 ve 72 saat olmak üzere kolhisin uygulamışlardır. Ploidi seviyesini flow sitometri aracılığıyla belirlemiş olup kromozom sayma tekniği ile doğrulamışlardır. %0,20 kolhisin çözeltisinin 24 saatlik uygulamasında tetraploid bitkilerin elde edildiğini diğer kolhisin uygulamalarında ise tespit edilemediğini bildirmişlerdir.

3. MATERYAL VE METOT

Çalışma 2021-2022 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü laboratuvarlarında ve Güney Agripark Ar-Ge Merkezinin (Antalya) araştırma seralarında yürütülmüştür.

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki Materyali

Çalışmada başlangıç materyali olarak şeker otu (*Stevia rebaudiana*) bitkisinin tescilli yerli çeşidi Levent 93'ün doku kültüründen gelen (*in vitro* çoğaltılan) fideleri kullanılmıştır (Şekil 3.1.). Bu çalışmada yaprak verimi, rebaudiosit A/steviosit oranı ve rebaudiosit A içeriği yüksek olan yerli Levent 93 şeker otu çeşidimiz tercih edilmiştir.



Şekil 3.1. Doku kültürü ile çoğaltılan şeker otu çeşidi Levent 93 fideleri (Orijinal)

3.1.2. Mutasyon Materyali

Çalışmada kromozom sayısını katlamak amacıyla mutagen olarak güz çiğdemi (*Colchicum autumnale*) bitkisinin köklerinden elde edilen bir alkaloid olan BioVision marka kolhisin ($C_{22}H_{25}NO_6$) kullanılmıştır. Saflığı %99'dan fazla olan kolhisin satın alındıktan sonra ağzı kapalı ve ışıktan korunaklı olarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2. Metot

3.2.1. Kolhisin Çözeltilisinin Hazırlanması

Çalışmaya öncelikle bitkilere uygulanacak olan kimyasal mutagen hazırlanarak başlanmıştır. Kimyasal mutagen olarak kolhisin çözeltisi, uygulamanın planlandığı günden bir gün önce Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü laboratuvarında hazırlanmıştır (08.11.2021). Araştırılan ve incelenen çalışmalar doğrultusunda karar verilen %0,5'lik kolhisin çözeltisi hazırlamak amacıyla 3 gram toz kolhisin tartılarak behere eklenmiştir. Üzerine 600 mililitre saf suyun önce bir kısmı eklenerek kolhisinin tamamen çözülmesi sağlanmış ve daha sonra kalan kısmı eklenmiştir. Homojen bir çözelti elde etmek amacıyla çözeltinin içerisine manyetik balık karıştırıcı eklenmiş ve herhangi bir parçacık kalmayana dek karıştırılması sağlanmıştır. Hazırlanan çözelti uygun bir şişeye alınmış ve ışıktan muhafaza etmek amacıyla alüminyum folyo ile sarılmıştır. Daha sonra mutagen uygulamasına kadar +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.2. Denemenin Planlanması

Denemede şeker otu sürgün uçlarına %0,5 konsantrasyonunda kontrol, 1 saat, 2 saat ve 4 saatlik kolhisin muamelesi ile birlikte bitkilerde mutasyon hedeflenmiş, deneme 3 tekerrür halinde ve her tekerrürde 15 bitki olacak şekilde planlanmıştır. Böylece her uygulamada 45 ve toplamda 180 sürgün ucu denemeye alınmıştır.

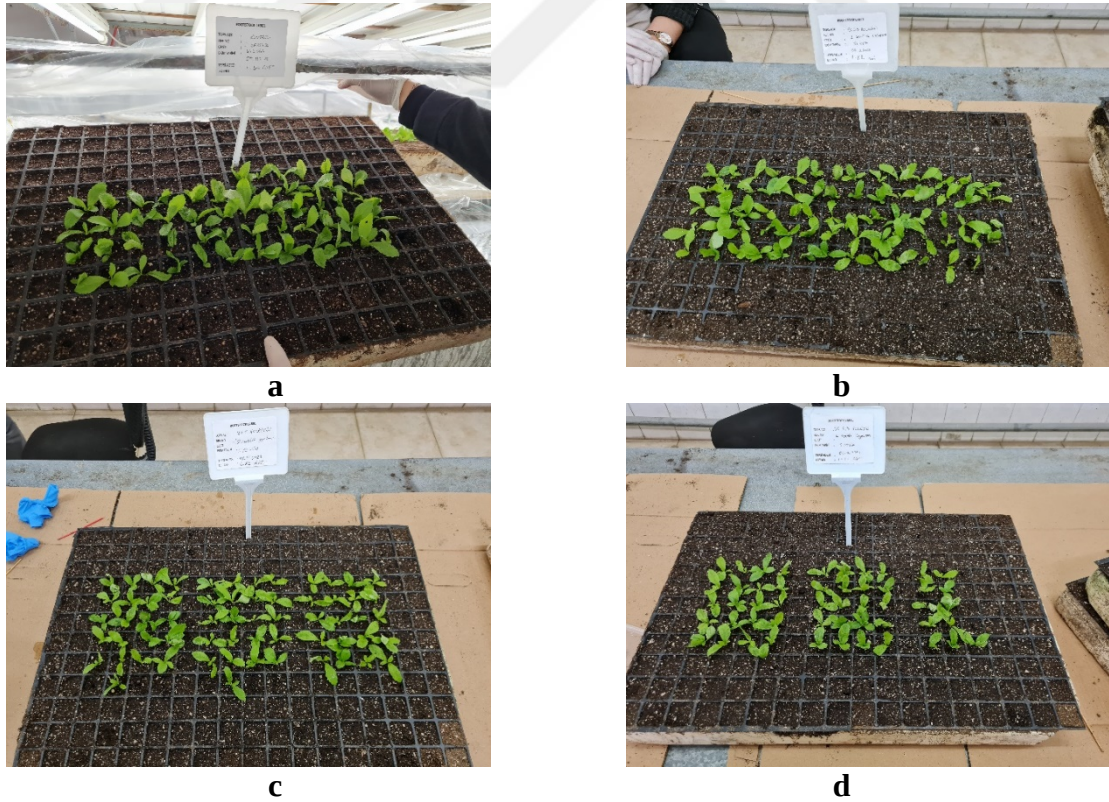
3.2.3. Bitkilere Kolhisin Çözeltilisinin Uygulanması

Kolhisin çözeltisi hazırlandıktan sonraki gün sabah saatlerinde doku kültüründen gelen şeker otu yerli çeşidimiz olan Levent 93 fidelerinin 3-4 yapraklı sürgün uçlarından yaklaşık olarak 180 adet örnek alındı (Şekil 3.2.a). Daha önce hazırlanmış olan kolhisin çözeltisi, şeker otu fidelerinin sürgün uçlarını daldırmaya uygun olan bir kaba alındı ve sürgün uçları kolhisin çözeltisine daldırıldı (Şekil 3.2.b) (09.11.2021). Yapılan araştırmalara göre kolhisinin ışık ile etkileşime girmesinden dolayı bitkilerin kolhisin çözeltisi ile muamele işlemi karanlıkta yapılmıştır.



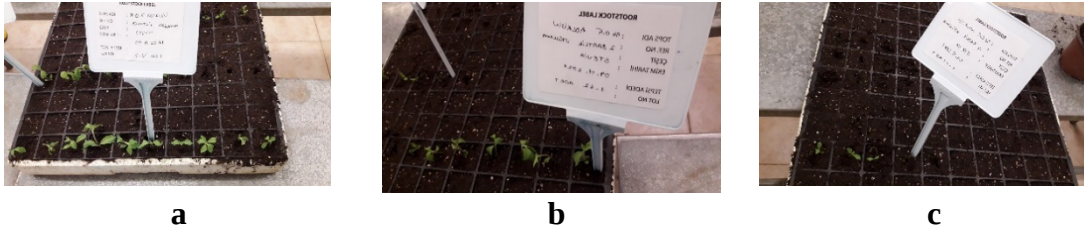
Şekil 3.2. a) Fidelerden alınan sürgün uçları; **b)** Sürgün uçlarının kolhisin çözeltisine daldırılması (Orijinal)

Daldırma işleminden sonra süre tutularak 1 saat, 2 saat ve 4 saatin sonunda sürgün uçları kolhisin çözeltisinden çıkarıldı ve saf su ile iyice yıkandı. Çalışmada 135 örnek kolhisin çözeltisine daldırılırken 45 örnek kontrol amaçlı saf suya daldırıldı. Ardından kolhisin çözeltisi ve saf su ile muamele edilen sürgün uçları %50 torf ve %50 perlit karışımı olan tepsilere dikilerek köklendirme ortamına alındı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. Köklendirme ortamına alınan şeker otu sürgün uçları; a) Kontrol; **b)** 1 Saatlik Uygulama; **c)** 2 Saatlik Uygulama; **d)** 4 Saatlik Uygulama (Orijinal)

Yaklaşık 2 ay sonra yaşayan ve köklenen örneklerin tepe sürgünlerinden çelikler alınarak %50 torf ve %50 perlit karışımı olan tepsilere aktararak %80 nem, 22°C sıcaklık, 12 saat gün uzunluğu ve 48 µm ışık yoğunluğu içeren köklendirme ortamına alınarak bitkilerin kontrollü bir şekilde gelişmesi beklenmiştir (Şekil 3.4) (11.01.2022).



Şekil 3.4. Kolhisinle muamele edilmiş ve hayatta kalan bitkilerden alınan çelikler; **a)** 1 Saatlik Uygulama; **b)** 2 Saatlik Uygulama; **c)** 4 Saatlik Uygulama (Orijinal)

Köklendirme ortamında başarılı bir şekilde gelişen bitkiler saksılara aktararak dış ortama alışması sağlanmıştır (Şekil 3.5) (30.03.2022).



Şekil 3.5. Bitkilerin saksılara aktarılması; **a)** Saksıların doldurulması; **b)** Saksılara etiket yazılması; **c)** Köklendirme ortamından gelen fideler; **d-e)** Fidelerin saksılara dikilmesi; **f)** Fidelikten saksılara aktarılan bitkiler (Orijinal)

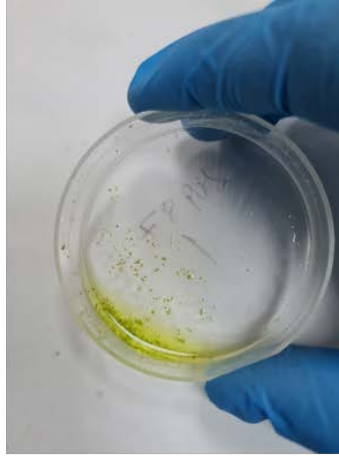
3.2.4. Kimyasal Uygulanan Bitkilerin Ploidi Analizi

Kolhisin çözeltisi ile muamele edilen bitkilerde ploidi analizi yapılmıştır. Bu amaçla flow sitometri cihazı kullanılmış olup Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Metin Tuna'dan destek alınmıştır.

Flow sitometri analizlerinde genç ve sağlıklı bitkilerden elde edilen 20-30 mg hastaliksız, temiz ve taze yaprak dokuları kullanılmaktadır. Bu nedenle ploidi analizi yapılacak olan bitkilerden sağlıklı ve taze yapraklar seçilip nemini kaybetmemesi için analizden 1 gün önce hazırlanmıştır. Petri kabının içine sığacak şekilde ikişer adet filtre kâğıdı kesilmiştir. Kâğıtlardan bir tanesi yerleştirilip ıslatılmış daha sonra bitkiden alınan sağlıklı, taze ve yaklaşık 20-30 mg olan yaprak örneği petri kabına yerleştirilmiştir. Üzerine diğer filtre kâğıdı konularak yeterli şekilde ıslatılmıştır. Petri kaplarındaki fazla su yaprakların çürümesine sebep olacağından boşaltılmıştır. Yaprak örneklerinin karışmaması için petri kaplarına etiketlerde eklenmiştir. Daha sonra petri kapları kapatılarak taşıma esnasında açılmaması için bantlanmış ve buz akülerinin bulunduğu ısı geçirmez kaplara aktararak taşınmıştır.

Şeker otu yaprak örneklerinin ploidi analizi, benzer DNA içeriklerinden dolayı arpa yaprakları standart kabul edilerek yapılmıştır. Steril bir biçimde 20 miligram şeker otu yaprağı ve 20 miligram arpa yaprağı kesilip bir kaba alınmıştır. Üzerine 400 µl parçalayıcı buffer çözeltisi ilave edilip jiletle yaprak örnekleri parçalanmıştır. Bir filtreden geçirilerek tüpe alınmıştır. Tüpün üzerine 1400 µl DAPI boya çözeltisi konularak flow sitometri analizine kadar karanlıkta bekletilmiştir. Tüm yaprak örnekleri bu şekilde hazırlandıktan sonra tüpler sırasıyla flow sitometri cihazında okutulmuş ve ploidi seviyeleri kaydedilmiştir (Şekil 3.6) (24.06.2022).

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

**d****e****f****g****h****ı**

Şekil 3.6. Flow sitometri analizi **a)** Analiz edilecek yaprak örneği; **b)** Şeker otu ve standardı olan bitkiden analiz için alınan örneğe buffer çözeltisinin ilave edilmesi; **c-d)** Örneklerin jiletle parçalanması; **e)** Parçalanan örnekler; **f)** Parçalanan örneklerin filtrelenmesi; **g)** Filtrelenmiş örneklerin tüpe alınması; **h)** Tüplere DAPI boya çözeltisinin ilave edilmesi; **ı)** Tüplerin flow sitometri cihazında okutulması (Orijinal)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Ülkemizde şeker otu olarak bilinen *Stevia rebaudiana* Bertoni $2n=22$ diploid kromozom sayısına sahip, Asteraceae familyasına ait bir türdür. Orijini Paraguay olan şeker otu bitkisi ülkemizde ilk defa 2013 yılında Akdeniz Üniversitesi'nde yetiştirilerek tanıtılmıştır. Şeker otu bitkisi yapraklarında içerdiği steviol glikozitler bakımından doğal bir tatlandırıcı olarak önem kazanmaktadır. Şeker otunun hem kalorisiz bir tatlandırıcı olması hem de kan şekeri seviyesini etkilememesi nedeniyle diyabet hastaları için dikkat çeken bir bitkidir. Paraguay'da uzun yıllardır tatlandırıcı ve bitkisel ilaç olarak kullanılan şeker otu (Goyal vd. 2010), gıda ve ilaç endüstrisi için ilk kez Japonya'da kullanılmıştır (Uskutoğlu vd. 2019). Şu anda şeker otu Japonya, Brezilya, Kore, İsrail, Amerika Birleşik Devletleri, Arjantin, Çin, Kanada, Paraguay ve Endonezya'da (Crammer ve Ikan 1986; Singh ve Rao 2005; Yadav vd. 2010) tüketilmektedir ve bugüne kadar kullanımından herhangi bir olumsuz etki bildirilmemiştir (Kingham ve Soejarto 1985; Brandle ve Rosa 1992; Yadav vd. 2010).

Şeker otu içerdiği steviol glikozitlerden dolayı doğal bir tatlandırıcı olma özelliği taşımaktadır. Şeker otu yaprakları çeşitli tatlılık özelliği gösteren steviosit, rebaudiosit-A, rebaudiosit-B, C, D, M ve dulkosit olarak adlandırılan glikozitlerden veya sekonder metabolitlerden oluşur. Şeker otunda ortalama steviosit oranı %4-12, rebaudiosit-A oranı %2-4 arasında değişmektedir (Kaplan ve Turgut 2019). En yüksek steviol glikozit içeriğine sahip olduğu için bitkinin en önemli organları yapraklarıdır.

Steviol glikozit miktarını artırmak hedefiyle bu çalışmada şeker otunda poliploidi ıslahı denenmiştir. Poliploidi, somatik hücrelerde ikiden fazla kromozom takımının bulunması durumuna denir (Şehirli ve Özgen 2013). Bitkilerde poliploidi doğal olarak meydana gelebildiği gibi antimitotik ajanlar kullanılarak mitoz bölünmenin bozulmasıyla da elde edilebilmektedir. En yaygın kullanılan kimyasal kolhisindir. Kolhisin güz çiğdemi (*Colchicum autumnale*) bitkisinden elde edilen doğal bir alkaloiddir. Kimyasal formülü $C_{22}H_{25}NO_6$ 'dır. Kolhisin tohum, kök ve sürgünlere uygulanabilir. Üzerinde çalışılan bitkinin türüne, kolhisin uygulanacak olan dokuya göre miktarı ve süresi değişebilmektedir. Ayrıca bitki dokularına kolhisin damlatma, pamuk aracılığıyla bitkiye temas ettirme veya kolhisine daldırma gibi farklı uygulama yöntemleri bulunmaktadır. Bu çalışmada doku kültüründen gelen şeker otu fidelerinin 3-4 yapraklı sürgün uçları kesilerek %0,5 konsantrasyonundaki kolhisin çözeltilerine 1 saat, 2 saat ve 4 saat boyunca daldırılmıştır. Ayrıca kontrol amacıyla bazı bitkiler saf suya daldırılmıştır.

Bu kısımda yapılan çalışma sonucunda bitkilerdeki canlılık oranı (adet ve %), bitki boyu (cm), yaprak sayısı (adet), dal sayısı (adet), klorofil miktarı (spad), ploidi analizi ve çekirdek DNA içeriği sonuçlarından elde edilen veriler verilmiş olup daha önceden şeker otu bitkisinde yapılan çalışmaların sonuçları ile değerlendirilmiştir (27.06.2022).

4.1. Bitkilerde Canlılık Oranı (Adet-%)

Yapılan bu çalışmada şeker otu fidelerinin sürgün uçları farklı sürelerdeki kolhisin çözeltilerine daldırıldıktan sonra köklenmesi sağlanmıştır. Elde edilen fidelerden çelikler alınarak tekrar köklenmesi sağlanmıştır. Bu süreçte canlı kalan bitki sayısı Çizelge 4.1.1. ve 4.1.2.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1.1. Canlı bitki sayısı ve oranları

Uygulama Süresi (Saat)	Toplam Bitki Sayısı (Adet)	Canlı Bitki Sayısı (Adet)	Canlı Bitki Oranı (%)
Kontrol	45	45	100
1 Saatlik Uygulama	45	18	40.0
2 Saatlik Uygulama	45	12	26.6
4 Saatlik Uygulama	45	6	13.3

Çizelge 4.1.2. Yaşayan bitkilerden alınan çeliklerde canlı bitki sayısı ve oranları

Uygulama Süresi (Saat)	Toplam Bitki Sayısı (Adet)	Canlı Bitki Sayısı (Adet)	Canlı Bitki Oranı (%)
Kontrol	45	45	100
1 Saatlik Uygulama	18	10	55.5
2 Saatlik Uygulama	12	7	58.3
4 Saatlik Uygulama	6	3	50.0

Çizelge 4.1.1 ve 4.1.2. incelendiğinde en yüksek canlılık oranı %100 olarak kontrol bitkilerinde, en düşük canlılık oranı ise kolhisin çözeltilisinin 4 saatlik uygulamalarında %13,3 ve %50 olarak görülmüştür. Sürgün uçlarının kolhisin çözeltilisinde bekletilme süreleri arttıkça bitkilerde canlılık oranının azaldığı görülmüştür. Bunun nedeni kolhisinin çok zehirli bir kimyasal madde olması (Elçi ve Sancak 2013) ve aşırı kolhisinin öldürücü etkisinin bulunması (Şehirli ve Özgen 2013) ile açıklanabilir.

4.2. Bitki Boyu (cm)

Bitki boyu, bitkinin toprak üstü aksamı dikkate alınarak ölçülmüş olup bu amaçla ahşap metre kullanılmıştır. Bitki boyuna ait ortalama değerleri, maksimum ve minimum bitki boyları Çizelge 4.2.'de verilmiştir. Çizelge 4.2.'ye göre maksimum bitki boyu 75 cm olarak kontrol bitkilerinde, minimum bitki boyu ise 20 cm olarak 2 saatlik kolhisin uygulamalarında görülmüştür. Bitki boyu bakımından kontrol grubu ile kolhisin uygulamaları kıyaslandığında kolhisin uygulamalarında bitki boyunun azaldığı saptanmıştır. Yadav vd. (2013) şeker otunda yapmış oldukları çalışmada kolhisin uygulamalarının bitki boyunda önemli ölçüde bir düşüş gösterdiğini aktarmışlardır.

Çizelge 4.2. Bitki boyu ortalamaları, maksimum ve minimum bitki boyları

Uygulama Süresi (Saat)	Ortalama Bitki Boyu (cm)	Maksimum Bitki Boyu (cm)	Minimum Bitki Boyu (cm)
Kontrol	62.4	75.0	45.1
1 Saatlik Uygulama	46.2	63.9	33.0
2 Saatlik Uygulama	26.8	35.4	20.0
4 Saatlik Uygulama	32.8	42.5	25.6

Şeker otunda yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde Oliveira vd. (2004) bitki boyunun 27,8 ile 96,8 arasında değiştiğini bulmuşlardır. Rameshsingh vd. (2015) en yüksek bitki boyunu triploid bitkilerde 83,44 cm olarak, en düşük bitki boyunu tetraploid bitkilerde 71,55 cm ve diploid bitkilerde ise bitki boyunu 78,88 cm olarak bulmuşlardır. Talei vd. (2020) en yüksek bitki boyunu %0,05 konsantrasyonundaki kolhisin uygulamalarında 135,44 cm olarak bulurken %0,10 ve %0,20 konsantrasyonundaki kolhisin çözeltilerinde bitki boyunun düştüğünü bildirmişlerdir. Grad ve Gomaa (2020) en yüksek bitki boyunu %0,05 konsantrasyonundaki kolhisin uygulamalarında 134,33 cm olarak bulurken en düşük bitki boyunu %0,025 konsantrasyonundaki kolhisin uygulamalarında 60 cm olarak bulmuşlardır. Azizan vd. (2021) bitki boyu ortalamasının %2 kolhisin konsantrasyonunda en yüksek, kontrollerde ise en düşük olduğunu bildirmişlerdir.

4.3. Yaprak Sayısı (Adet)

Yaprak sayısına ait ortalama değerleri, maksimum ve minimum yaprak sayıları Çizelge 4.3.'de verilmiştir. Çizelge 4.3.'e göre maksimum yaprak sayısı 60 adet olarak 1 saatlik kolhisin uygulamalarında, minimum yaprak sayısı ise 16 adet olarak kontrol uygulamalarında görülmüştür. Sürgün uçlarının kolhisin çözeltilinde bekletilme süreleri arttıkça bitkilerde yaprak sayısı ortalamalarının azaldığı görülmüştür. Oliveira vd. (2004) şeker otunda yapmış oldukları bir çalışmada diploid bitkilerle tetraploid bitkileri

kıyasladıklarında tetraploid bitkilerin daha büyük yaprakları olduğunu bildirmişlerdir. Rameshsingh vd. (2015) yapmış oldukları çalışma ile bu sonuçları desteklemişlerdir. Mahdi vd. (2018) poliploid bitkiler ile diploid bitkiler arasında yaprak uzunluk ve genişlik parametreleri bakımından önemli farklılıklar olduğunu aktarmışlardır. Azizan vd. (2021) %2 kolhisin konsantrasyonunda yaprak uzunluğu ve kalınlığının en yüksek olduğunu kontrol bitkilerinde ise en düşük olduğunu bildirmişlerdir.

Çizelge 4.3. Yaprak sayısı ortalamaları, maksimum ve minimum yaprak sayıları

Uygulama Süresi (Saat)	Ortalama Yaprak Sayısı (Adet)	Maksimum Yaprak Sayısı (Adet)	Minimum Yaprak Sayısı (Adet)
Kontrol	35.4	55	16
1 Saatlik Uygulama	35.5	60	17
2 Saatlik Uygulama	30.1	47	20
4 Saatlik Uygulama	27.3	31	24

Şeker otunda yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde Grad ve Gomaa (2020) en yüksek yaprak sayısı ortalamasını %0,1 konsantrasyonundaki kolhisin uygulamalarında 825,67 olarak bulurken en düşük yaprak sayısı ortalamasını %0,2 konsantrasyonundaki kolhisin uygulamalarında 177,67 olarak bulmuşlardır.

4.4. Dal Sayısı (Adet)

Dal sayısına ait ortalama değerleri, maksimum ve minimum dal sayıları Çizelge 4.4.'de verilmiştir. Çizelge 4.4.'e göre maksimum dal sayısı 11 adet olarak 2 saatlik kolhisin uygulamalarında, minimum dal sayısı ise 1 adet olarak kontrol uygulamalarında görülmüştür.

Çizelge 4.4. Dal sayısı ortalamaları, maksimum ve minimum dal sayıları

Uygulama Süresi (Saat)	Ortalama Dal Sayısı (Adet)	Maksimum Dal Sayısı (Adet)	Minimum Dal Sayısı (Adet)
Kontrol	3.0	5	1
1 Saatlik Uygulama	4.2	6	3
2 Saatlik Uygulama	6.2	11	2
4 Saatlik Uygulama	3.3	5	2

Şeker otunda yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde Rameshsingh vd. (2015) en yüksek dal sayısı ortalamasını 13,5 bulurken en düşük dal sayısı ortalamasını 9,11 olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Talei vd. (2020) en yüksek dal sayısı %0,05 konsantrasyonundaki kolhisin uygulamasında bulurken %0,10 ve %0,20 konsantrasyonlarının dal sayısını düşürdüğünü aktarmışlardır. Benzer şekilde Grad ve Goma (2020) yapmış oldukları bir çalışmada en yüksek dal sayısı ortalamasını %0,05 konsantrasyonundaki kolhisin uygulamalarında 21,33 olarak bulurken en düşük dal sayısı ortalamasını %0,2 konsantrasyonundaki kolhisin uygulamalarında 3,33 olarak bulmuşlardır.

4.5. Klorofil İçeriği (spad)

Bitkilerin klorofil içeriğini ölçmek için portatif klorofil ölçüm cihazı kullanılmıştır. Her bitkiden ölçüm yapmaya uygun boyutta rastgele seçilen 3 farklı yapraktan ölçüm yapılarak bunların ortalamaları kaydedilmiştir.

Klorofil içeriklerine ait ortalama, maksimum ve minimum değerleri Çizelge 4.5.'de verilmiştir. Çizelge 4.5.'e göre maksimum klorofil miktarı 26,9 olarak kontrol bitkilerinde, minimum klorofil miktarı ise 9,7 olarak 2 saatlik kolhisin uygulamalarında görülmüştür. Sürgün uçlarının kolhisin çözeltisinde bekletilme süreleri arttıkça bitkilerde klorofil içeriği ortalamalarının azaldığı görülmüştür. Yadav vd. (2013) ise tetraploid bitkilerde klorofil miktarının önemli ölçüde arttığını aktarmışlardır. Zhang vd. (2018) diploid bitkilerde klorofil içeriğinin 29,00 olduğunu tetraploid bitkilerde ise klorofil içeriğini 41,03 olduğunu bildirmişlerdir.

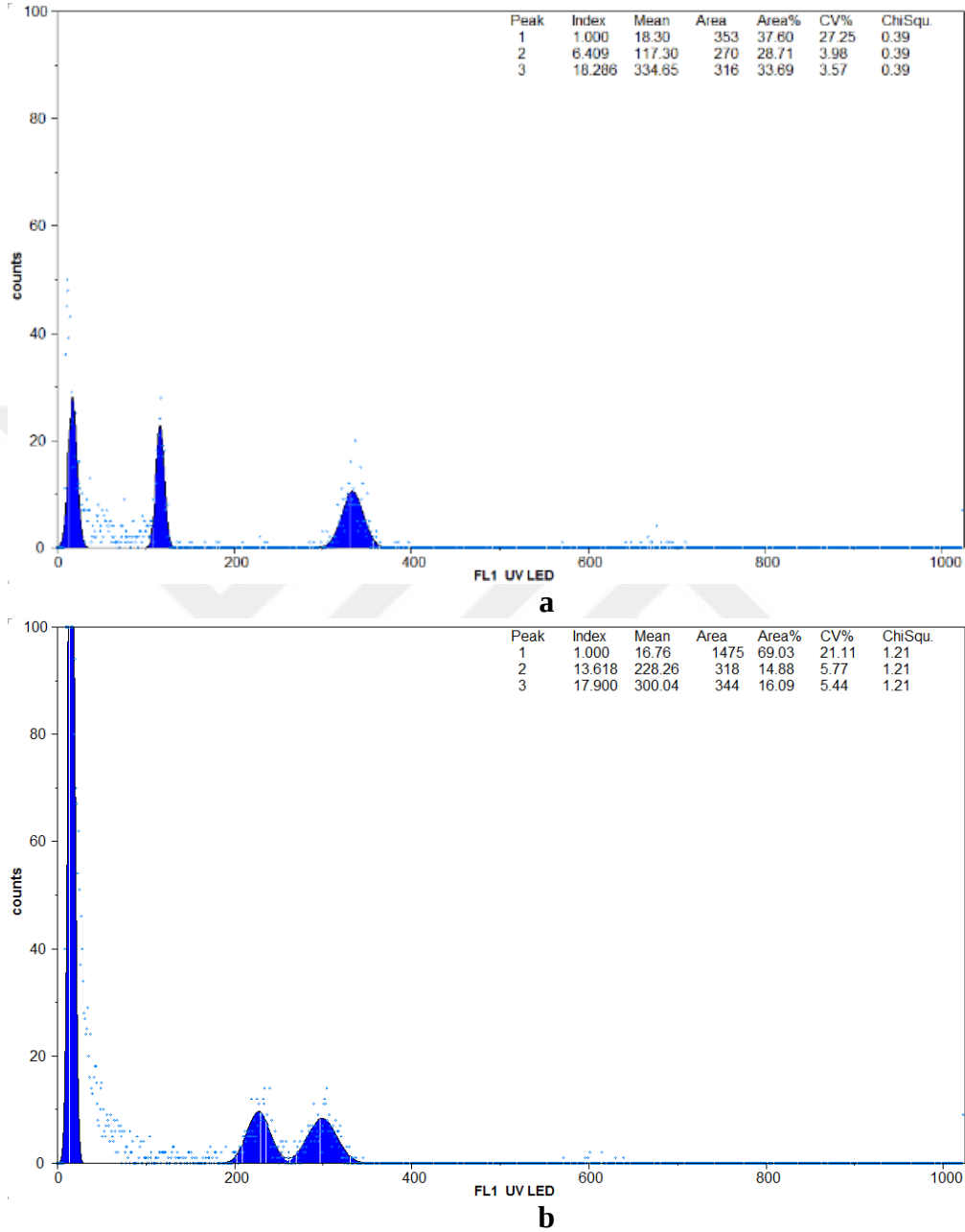
Çizelge 4.5. Klorofil içeriği ortalamaları, maksimum ve minimum klorofil içerikleri

Uygulama Süresi (Saat)	Ortalama Klorofil İçeriği (spad)	Maksimum Klorofil İçeriği (spad)	Minimum Klorofil İçeriği (spad)
Kontrol	23.9	26.9	18.2
1 Saatlik Uygulama	17.7	23.9	10.2
2 Saatlik Uygulama	14.9	26.2	9.7
4 Saatlik Uygulama	13.6	14.0	13.0

4.6. Ploidi Analizi

Kolhisin çözeltisi ile muamele edilen bitkilerde yaklaşık 8 ay sonra ploidi analizi yapılmıştır. Bu amaçla flow sitometri cihazı kullanılmıştır. Yapılan ploidi analizlerine göre kolhisinle muamele edildikten sonra canlı kalan 20 bitki içerisinde 17 bitkinin

diploid, 3 bitkinin ise tetraploid olduğu belirlenmiştir. Şekil 4.1.'de diploid ve tetraploid bitkilerde flow sitometri analizi sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.1. Flow sitometri analizi sonuçlarının bilgisayar ortamındaki görüntüsü; **a)** Diploid bir bitkiye ait görüntü; **b)** Tetraploid bir bitkiye ait görüntü

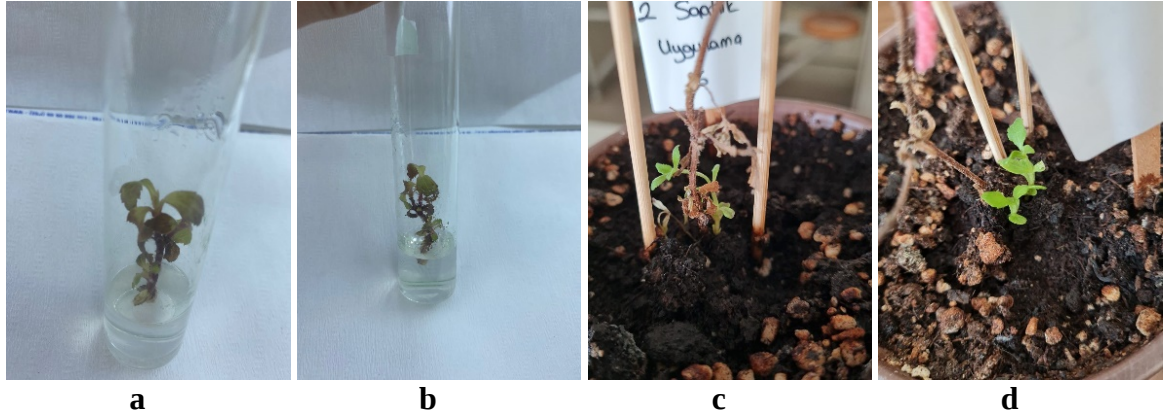
Şeker otunda yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde Yadav vd. (2013), Rameshsingh vd. (2015), Mahdi vd. (2018), Xiang vd. (2019), Talei vd. (2020) yapmış oldukları çalışmalarda poliploidi elde etmişlerdir. Ayrıca Zhang vd. (2018), Ghonema

vd. (2015) %0,05 kolhisin dozunda tetraploidi elde ederken Talei vd. (2020) %0,05 kolhisin konsantrasyonunda tetraploidi elde edememişlerdir.

Poliploidinin bitkilerde tohum, meyve ve yapraklar gibi bazı organlarında ya da bitkinin tamamında irileştirmek, daha koyu ve yoğun renklere sahip olmak ve kimyasal içeriklerini artırmak gibi önemli etkileri olduğu bilinmektedir. Şeker otunda da kolhisin aracılığıyla poliploidi, daha önceden başarılı olarak teşvik edilmiş ve poliploidi indüksiyonunun istenen özellikleri geliştirdiği bildirilmiştir (Valois 1992; Rameshsing vd. 2015). Diploid bitkilere göre poliploid bitkilerin gövde, yaprak, çiçek gibi organları daha iridir, hücreleri daha büyüktür, klorofil miktarları daha fazladır bu sebeple fotosentez potansiyelleri de daha fazladır (Tepe vd. 2002; Molin vd. 1982; İlarıslan 1990).

Yaptığımız bu çalışmada poliploid şeker otu bitkileri ne yazık ki canlılıklarını sürdürememiştir. Nitekim Şehirali ve Özgen (2013) poliploid bitkilerin diploid bitkilere göre gelişmelerinin oldukça zayıf olduğunu, osmotik basınçlarının düşük olduğunu ve hücre bölünmeleri için daha fazla zamana ihtiyaç duyduklarını aktararak bizim sonuçlarımızı desteklemiştir. Aynı zamanda poliploid bitkilerin sorunlarına ek olarak azotlu ve fosforlu gübrelelere karşı hassas olduklarını, büyüme hızlarının yavaş olduğunu ve kısırlığın ortaya çıkabileceğini de eklemiştir.

Nitekim bu çalışmada elde edilen poliploid bitkiler diğer bitkilere göre oldukça zayıf durumda ve çok az bir gelişim göstermiş olup bir süre sonra canlılıklarını da yitirmişlerdir. Poliploid bitkileri koruyabilmek ve çoğaltmak amacıyla poliploid bitkilerden gelişen sürgünlere hassasiyetle yaklaşılmış hatta bazı poliploid bitkilerden alınan eksplantlar doku kültürüne alınmış fakat yine de canlılıklarını sürdürememişlerdir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Poliploid bitkiler; **a-b)** Doku kültürüne alınan poliploid bitki sürgünleri; **c-d)** Poliploid bitkilerden gelişen sürgünler

4.7. DNA İçerikleri

Çekirdek DNA içeriği hücre içinde bulunan toplam DNA miktarına denir ve C değeri olarak ölçülür. (Şahin 2019). Bu çalışmada flow sitometri aracılığıyla şeker otu bitkilerinde DNA içeriği hesaplanmış olup Çizelge 4.6’da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Şeker Otu - Arpa Florasan Yoğunlukları ve DNA İçerikleri

Uygulama Süresi	Şeker Otu Florasan Yoğunluğu	Arpa Florasan Yoğunluğu	Arpa Çekirdek DNA İçerikleri	Şeker Otu Çekirdek DNA İçerikleri
Kontrol	116,11	299,06	10,65	4,13
1 Saatlik	113,33	308,24	10,65	3,92
1 Saatlik	118,3	293,95	10,65	4,29
1 Saatlik	109,71	280,2	10,65	4,17
1 Saatlik	115,13	259,74	10,65	4,72
1 Saatlik	117	276,22	10,65	4,51
1 Saatlik	116,26	329,18	10,65	3,76
1 Saatlik	109,35	271,45	10,65	4,29
1 Saatlik	120,64	281,53	10,65	4,56
1 Saatlik	112,37	265,72	10,65	4,50
1 Saatlik	106,99	265,97	10,65	4,28
2 Saatlik	112,12	281,54	10,65	4,24
2 Saatlik	102,84	244,85	10,65	4,47
2 Saatlik	106,55	279,79	10,65	4,06
2 Saatlik	117,3	334,65	10,65	3,73
2 Saatlik	208,71	278,77	10,65	7,97
2 Saatlik	213,5	262,19	10,65	8,67
2 Saatlik	228,26	300,04	10,65	8,10
4 Saatlik	112,62	280,52	10,65	4,28
4 Saatlik	114,61	297,13	10,65	4,11
4 Saatlik	108,11	269,13	10,65	4,28

Çekirdek DNA içeriği ile ploidi seviyesi arasında sıkı bir ilişkinin olduğunu ve ploidi seviyesi artıkça DNA içeriğinin de arttığı bildirilmiştir (Tuna 2004; Şahin 2019). Nitekim yaptığımız çalışmada bu sonuçları desteklemektedir. Şeker otunda yapılan bir çalışmada Xiang vd. (2019) tetraploid şeker otu bitkilerinin sitolojik analizleri sonucu kromozom sayısının katlandığını ve flow sitometri analizinin de DNA içeriğinin katlandığını gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yapılan diğer çalışmalar incelendiğinde Chen vd. (2011) *Anthurium andraeanum* bitkilerinde flow sitometri analizi sonuçlarına göre diploid bitkilerin DNA içeriğinin iki katına sahip tetraploid bitkilerin elde edildiğini bildirmişlerdir. Tavan vd. (2015) *Thymus persicus* bitkilerinin DNA içeriklerini ve ploidi seviyelerini flow sitometri aracılığıyla belirlemişlerdir. Kromozom sayma çalışmaları ile flow sitometri sonuçlarını doğrulamışlardır.



6. SONUÇLAR

Bu çalışmada şeker otunun %0,5 konsantrasyonundaki kolhisin çözeltilerinde kontrol, 1 saat, 2 saat ve 4 saatlik uygulamalarının bitki poliploidizasyonuna verdikleri tepkiler incelenmiştir. Çalışmanın temel amacı, diploid kromozom sayısını ikiye katlayarak tetraploid şeker otu bitkileri elde etmektir. Çalışma sonucunda kolhisinle muamele edilmiş şeker otu bitkilerinin canlılık oranı, bitki boyu, yaprak sayısı, dal sayısı, klorofil miktarı, ploidi seviyeleri ve çekirdek DNA içerikleri belirlenmiştir.

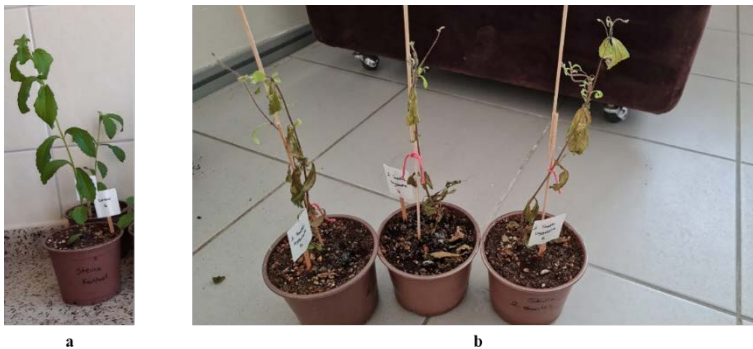
Kolhisin, bitkilerde canlılık oranı üzerinde olumsuz bir etki göstermiştir. Çalışmada şeker otu sürgün uçları kontrol, 1 saat, 2 saat ve 4 saat olmak üzere farklı sürelerde kolhisin çözeltileri ile muamele edilmiş olup ilk aşamada 180 bitki içerisinde 81 bitki, ikinci aşamada 81 bitki içerisinde 65 bitki canlı kalabilmiştir. Kolhisinle muamele edilen bitkiler içerisinde canlılık bakımından en olumsuz etkilenen bitkiler 4 saatlik uygulamaya maruz bırakılan bitkiler olup en az etkilenen bitkiler ise 1 saatlik uygulamaya maruz bırakılan bitkilerdir.

Şeker otu fidelerinin bitki boyu ortalaması bakımından 2 saatlik uygulamaya maruz bırakılan bitkilerin daha kısa boylu, kontrol bitkilerinin ise daha uzun boylu olduğu belirlenmiştir. Diploid bitkilerle tetraploid bitkiler bitki boyu ortalaması bakımından kıyaslandığında diploid bitkilerin tetraploid bitkilere göre daha büyük boy ortalamasına sahip olduğu gözlenmiştir.

Yaprak sayısı ortalaması bakımından 4 saatlik uygulamaya maruz bırakılan bitkilerin daha az, 1 saatlik uygulamalardaki bitkilerin ise daha çok olduğu belirlenmiştir. Diploid bitkilerle tetraploid bitkiler yaprak sayısı ortalaması bakımından kıyaslandığında diploid bitkilerin tetraploid bitkilere göre daha çok yaprak sayısı ortalamasına sahip olduğu gözlenmiştir.

Dal sayısı ortalaması bakımından kontrol bitkilerinin daha az, 2 saatlik uygulamalardaki bitkilerin ise daha çok olduğu belirlenmiştir. Diploid bitkilerle tetraploid bitkiler dal sayısı ortalaması bakımından kıyaslandığında tetraploid bitkilerin diploid bitkilere göre daha çok dal sayısı ortalamasına sahip olduğu gözlenmiştir.

Ploidi analizi sonuçlarına göre kolhisinle muamele edildikten sonra canlı kalan 20 bitki içerisinde 17 bitkinin diploid, 3 bitkinin ise tetraploid olduğu belirlenmiştir. Tetraploid bitkilerin tamamı 2 saatlik uygulamalarda gözlenmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. a) Kontrol bitkilerinden bir fotoğraf; b) Poliploid olan bitkilerden bir fotoğraf

Flow sitometri analizine göre çekirdek DNA içerikleri bakımından diploid bitkilerle tetraploid bitkiler kıyaslandığında tetraploid bitkilerin çekirdek DNA içerikleri diploid bitkilerin çekirdek DNA içeriklerinden yaklaşık olarak 2 katı kadar olduğu bulunmuştur.

Yürütülen bu çalışma sonucuna göre kolhisin, şeker otu bitkisinde kromozom katlamasını sağlamaktadır. Şeker otunda poliploidi elde etmek için sürgün uçlarının %0,5 kolhisin çözeltisine 2 saat daldırılması başarılı sonuçlar vermektedir. Ancak poliploid bitkilerin canlılıklarını sürdüremediklerinden dolayı diploid bitkilerle steviol glikozit miktarları bakımından kıyaslanamamıştır. Bu çalışma şeker otunda yapılacak diğer çalışmalarda poliploid bitkilerin elde edilmesi için uygun doz ve sürenin belirlenmesinde fayda sağlayacak olup daha fazla poliploid bitkilerin elde edilmesi ile diploid bitkilerle kıyaslamanın mümkün olabileceği ön görülmektedir.



7. KAYNAKLAR

- Al-Taweel, S.K., Azzam, C. R., Khaled, K. A. and Abdel-aziz, R. M. 2021. Improvement Of Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) And Steviol Glycoside Through Traditional Breeding And Biotechnological Approaches. *SABRAO Journal of Breeding and Genetics*, 53(1):88-111.
- Anonim 1: <https://idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html> (Son Erişim Tarihi: 13.05.2022).
- Anonim 2: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death> (Son Erişim Tarihi: 13.05.2022).
- Atichart, P. 2013. Polyploid Induction By Colchicine Treatments And Plant Regeneration Of *Dendrobium chrysotoxum*. *Thai Journal of Agricultural Science*, 46(1), 59-63.
- Azizan, N. I., Shamsiah, A., Hasan, N. A. and Hussein, S. 2020. Morphological Characterization Of Colchicine-Induced Mutants In *Stevia rebaudiana*. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*, 757(1):012006.
- Blasco, M., Badenes, M. L., and Naval, M. 2015. Colchicine-Induced Polyploidy In Loquat (*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120(2), 453-461.
- Chen, C., Hou, X., Zhang, H., Wang, G., and Tian, L. 2011. Induction Of *Anthurium andraeanum* “Arizona” Tetraploid By Colchicine In Vitro. *Euphytica*, 181(2), 137-145.
- Demirel, F., Eren, B., Demirel, S. ve Erol, A. 2020. Flow Sitometri Ve Bitki Islahı. *Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 34(1), 213-223.
- Elçi, Ş. Ve Sancak, C. 2013. Sitogenetikte Araştırma Yöntemleri ve Gözlemler. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 386, Ders Kitabı, Ankara, 53 s.
- El-Nashar, Y. I., and Ammar, M. H. 2016. Mutagenic Influences Of Colchicine On Phenological And Molecular Diversity Of *Calendula officinalis* L. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 1-15.
- Eşer Durmaz, S. ve Keser, A. 2018. Yapay Tatlandırıcıların Vücut Ağırlığı Ve İnsülin Direnci Üzerine Etkileri. *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(2):8-15.
- Gantait, S., Mandal, N., Bhattacharyya, S., and Das, P. K. 2011. Induction And Identification Of Tetraploids Using In Vitro Colchicine Treatment Of *Gerbera jamesonii* Bolus Cv. Sciella. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106(3), 485-493.

- Ghonema, M., Khaled, A. E., Abdelsalam, N. R. and İbrahim, N. M. 2015. Physico-Chemical Properties Of Chromatin, Proline Content; And Induction Of Polyploidy In *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Alexandria Science Exchange Journal*, 36, 147-156.
- Głowacka, K., Jeżowski, S., and Kaczmarek, Z. 2010. In Vitro Induction Of Polyploidy By Colchicine Treatment Of Shoots And Preliminary Characterisation Of Induced Polyploids In Two *Miscanthus* Species. *Industrial Crops and Products*, 32(2), 88-96.
- Goluch, A. T., Kawka-Lipińska, M., Wielgusz, K. and Praczyk, M. 2021. Polyploidy In Industrial Crops: Applications And Perspectives In Plant Breeding. *Agronomy*, 11(12), 2574.
- Goyal, S. K., Samsher and Goyal, R. K. 2010. Stevia (*Stevia rebaudiana*) A Bio-Sweetener: A Review. *International journal of food sciences and nutrition*, 61(1), 1-10.
- Grad, W. E. and Gomaa, S. E. 2020. Polyploidy And Sweetener Induction In Different *Stevia* Varieties Using Colchicine. *Egypt. Journal Of Plant Breed*, 24(3), 697–715.
- Hegde, S. N., Rameshsing, C. N. and Vasundhara, M. 2015. Impact Of *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bert.) Polyploidization On Leaf Yield And Attributes. *The Bioscan*, 10(2), 609-611.
- Huang, R., Liu, D., Zhao, M., Li, Z., Li, M., and Sui, S. 2015. Artificially Induced Polyploidization In *Lobularia maritima* (L.) Desv. And Its Effect On Morphological Traits. *HortScience*, 50(5), 636-639.
- Kaensaksiri, T., Soontornchainaksaeng, P., Soonthornchareonnon, N., and Prathanurug, S. 2011. In Vitro Induction Of Polyploidy In *Centella asiatica* (L.) Urban. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107(2), 187-194.
- Kaplan, B. and Turgut, K. 2019. Improvement Of Rebaudioside A Diterpene Glycoside Content In *Stevia rebaudiana* Bertoni Using Clone Selection. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43: 232-240.
- Khalili, S., Niazian, M., Arab, M., and Norouzi, M. 2020. In Vitro Chromosome Doubling Of African Daisy, *Gerbera jamesonii* Bolus Cv. Mini Red. *Nucleus*, 63(1), 59-65.
- Li, Z., and Ruter, J. M. 2017. Development And Evaluation Of Diploid And Polyploid *Hibiscus moscheutos*. *HortScience*, 52(5), 676-681.
- Madani, H., ESCRICH, A., Hosseini, B., Sanchez-Muñoz, R., Khojasteh, A. and Palazon, J. 2021. Effect Of Polyploidy Induction On Natural Metabolite Production In Medicinal Plants. *Biomolecules*, 11(6), 899.

- Mahdi, S. A., Meena, C. M. and Tholakabavi, A. 2018. Induction Of Genetic Variability By Colchicine Treatment In *Stevia rebaudiana* Bertoni. *AL-Qadisiyah Journal of pure Science*, 23(3), 161-173.
- Majdi, M., Karimzadeh, G., Malboobi, M. A., Omidbaigi, R., and Mirzaghaderi, G. 2010. Induction Of Tetraploidy To Feverfew (*Tanacetum parthenium* Schulz-Bip.): Morphological, Physiological, Cytological, And Phytochemical Changes. *HortScience*, 45(1), 16-21.
- Mo, L., Chen, J., Lou, X., Xu, Q., Dong, R., Tong, Z., Huang, H. and Lin, E. 2020. Colchicine Induced Polyploidy In *Rhododendron fortunei* Lindl. *Plants*, 9(4), 424.
- Noori, S. A. S., Norouzi, M., Karimzadeh, G., Shirkoool, K., and Niazian, M. 2017. Effect Of Colchicine-Induced Polyploidy On Morphological Characteristics And Essential Oil Composition Of Ajowan (*Trachyspermum ammi* L.). *Plant Cell, Tissue And Organ Culture*, 130(3), 543-551.
- Oliveira, V., Forni-Martins, E., Magalhães, P. And Alves, M. 2004. Chromosomal And Morphological Studies Of Diploid And Polyploid Cytotypes Of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae, Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology*, 27(2), 215-222.
- Omidbaigi, R., Mirzaee, M., Hassani, M. E., and Moghadam, M. S. 2010. Induction And Identification Of Polyploidy In Basil (*Ocimum basilicum* L.) Medicinal Plant By Colchicine Treatment. *International Journal Of Plant Production*, 4(2), 87-98.
- Öztürk, M., Altundağ, E. and Gücel, S. 2012. Medicinal And Aromatic Plants (Turkey). *Ethnopharmacology, Encyclopedia Of Life Support Systems*.
- Rameshsing, C. N., Hegde, S. N. and Vasundhara, M. 2015. Enhancement Of Steviol Glycosides In *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Through Induction Of Polyploidy. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9 (2) 141-146.
- Rameshsingh, C. N., Hegde, S. N. and Vasundhara, M. 2015. Evaluation Of Field Performance Of Polyploids *Stevia rebaudiana* (Bertoni) And Their In Vitro Propagation. *Research Journal of Agricultural Sciences*, 6(2), 255-258.
- Sinski, I., Bosco, D. D., Pierozzi, N. I., Maia, J. D. G., Ritschel, P. S., and Quecini, V. 2014. Improving In Vitro Induction Of Autopolyploidy In Grapevine Seedless Cultivars. *Euphytica*, 196(2), 299-311.
- Suresh, V., Fetricia, J.P., Saranya, V., Sarithra, S. and Tamilselvan, K. 2018. Uses Of *Stevia* (*Stevia rebaudiana*). *Journal of Medicinal Plants Studies*, 6(2): 247-248.
- Şahin, M. 2019. Bazı Yabani Ayçiçeği Türlerinin Çekirdek Dna İçeriklerinin Belirlenmesi. Yüksek lisans tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, 24 s.

- Şehirali, S. ve Özgen, M. 2013. Bitki Islahı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 1582, Ders Kitabı, Ankara, 140 s.
- Şehirali, S. ve Özgen, M. 2013. Bitki Islahı. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları: 269, Ders Kitabı, Ankara, 146 s.
- Talei, D. and Fotokian, M. H. 2020. Improving Growth Indices And Productivity Of Phytochemical Compounds In Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.) Through Induced Polyploidy. *BioTechnologia*, 101(3), 215-226.
- Talei, D., Nekouei, M. K., Mardi, M. and Kadkhodaei, S. 2020. Improving Productivity Of Steviol Glycosides In *Stevia rebaudiana* Via Induced Polyploidy. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 23, 301–309.
- Tang, Z. Q., Chen, D. L., Song, Z. J., He, Y. C., and Cai, D. T. 2010. In Vitro Induction And Identification Of Tetraploid Plants Of *Paulownia tomentosa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(2), 213-220.
- Tavan, M., Mirjalili, M. H., & Karimzadeh, G. (2015). In Vitro Polyploidy Induction: Changes In Morphological, Anatomical And Phytochemical Characteristics Of *Thymus persicus* (Lamiaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122(3), 573-583.
- Tepe, Ş., Ellialtıoğlu, Ş., Yenice, N. ve Tıpırdamaz, R. 2002. In Vitro Kolhisin Uygulaması İle Poliploid Nane (*Mentha longifolia* L.) Bitkilerinin Elde Edilmesi. *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15(2), 63-69.
- Tuwo, M., and Indrianto, A. 2016. Improvement Of Orchid Vanda Hybrid (*Vanda limbata* Blume x *Vanda tricolor* Lindl. Var. *Suavis*) By Colchicines Treatment In Vitro. *Modern Applied Science*, 10(11), 83-89.
- Urwin, N. A. R. 2014. Generation And Characterisation Of Colchicine-Induced Polyploid *Lavandula x intermedia*. *Euphytica*, 197, 331-339.
- Uskutoğlu, T., Uskutoğlu, D. and Turgut, K. 2019. Effects On Pre-Treatment And Different Tissue Culture Media For Androgenesis In *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech* (Nov-Dec 2019) 21(6):1016–1023.
- Widoretno, W. 2016. In Vitro Induction And Characterization Of Tetraploid Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.) *Plant. Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125(2), 261-267.
- Xiang, Z., Tang, X., Liu, W. and Song, C. 2019. A Comparative Morphological And Transcriptomic Study On Autotetraploid *Stevia rebaudiana* (Bertoni) And Its Diploid. *Plant Physiology and Biochemistry*, 143, 154–164.

- Xu, L., Najeeb, U., Naeem, M. S., Daud, M. K., Cao, J. S., Gong, H. J., Shen, W. Q. and Zhou, W. J. 2010. Induction Of Tetraploidy In *Juncus effusus* By Colchicine. *Biologia Plantarum*, 54(4), 659-663.
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D. and Ahuja, S. 2010. A Review On The Improvement Of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Science*, 91(1), 1-27.
- Yadav, A. K., Singh, S., Yadav, S. C., Dhyani, D., Bhardwaj, G., Sharma, A. and Singh, B. 2013. Induction And Morpho-Chemical Characterization Of *Stevia rebaudiana* Colchipooids. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 83(2): 159–65.
- Yang, N., Rong, E., Li, Q., Dong, J., Du, T., Zhao, X., and Wu, Y. 2015. Tetraploid Induction And Identification Of *Gossypium arboreum*. *Agricultural Sciences*, 6(04), 436.
- Zhang, H., An, S., Hu, J., Lin, Z., Liu, X., Bao, H. and Chen, R. 2018. Induction, Identification And Characterization Of Polyploidy In *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Biotechnology*, 35: 81–86.

ÖZGEÇMİŞ

ÖZLEM AKBAŞ

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi
2019-2022	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı, Antalya
Lisans	Ankara Üniversitesi
2015-2019	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Ankara

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi	Ege Üniversitesi
2022-Devam Ediyor	Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, İzmir