T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞEKER OTU (*Stevia rebaudiana* BERTONI) BİTKİSİNDE ÖN UYGULAMA VE FARKLI ORTAMLARIN *IN VITRO* ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Tansu USKUTOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

2016

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞEKER OTU (*Stevia rebaudiana* BERTONI) BİTKİSİNDE ÖN UYGULAMA VE FARKLI ORTAMLARIN *IN VITRO* ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Tansu USKUTOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

(Bu tez Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırmalar Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 110O938 nolu proje ile desteklenmiştir.)

2016

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞEKER OTU (*Stevia rebaudiana* BERTONI) BİTKİSİNDE ÖN UYGULAMA VE FARKLI ORTAMLARIN *IN VITRO* ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Tansu USKUTOĞLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

Bu tez 28/07/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Sadık ÇAKMAKÇI

Yrd. Doç. Dr. Cüneyt CESUR

ÖZET

ŞEKER OTU (*Stevia rebaudiana* BERTONI) BİTKİSİNDE ÖN UYGULAMA VE FARKLI ORTAMLARIN *IN VITRO* ANDROGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

TANSU USKUTOĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı
Danışman: Prof. Dr. Kenan TURGUT
Haziran 2016, 55 Sayfa

Bu tez çalışmasında, şeker otu olarak bilinen *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde, uygun tomurcuk aşamasının tespiti ve MS temel besin ortamında farklı hormon konsantrasyonları ile farklı ön uygulamaların *in vitro* androgenesis üzerine etkileri araştırılmıştır.

Çalışmada kullanılan şeker otu bitkisinin farklı büyüklükteki tomurcukları alınarak çeşitli boyama yöntemleri kullanılmış ve en başarılı boyama yöntemi ise ethidium bromide ile gerçekleşmiştir. Anter kültürü için en uygun safha olan tek çekirdekli dönem tespit edilmiştir. Tek çekirdekli dönemdeki anterlerin, tomurcuk açılma durumuna göre sınıflandırılması gerektiği tespit edilerek, tomurcuk açılma ve anterlerin gelişme dönemleri arasında ilişki kurulmuştur.

Çalışma, birinci yıl denemeleri ve ikinci yıl denemeleri olarak iki yıl boyunca yürütülmüş, birinci yıl elde edilen verilerin ışığında ikinci yıl denemelerine geçilmiştir. Bu amaçla ilk yıl denemerinde herhangi bir ön uygulama yapılmamış, uygun ortamlar tespit edilmiş ve ikinci yıl denemelerinde çalışma genişletilerek 2 ön uygulama, 1 kontrol grubu olmak üzere 3 farklı uygulama olacak şekilde yürütülmüştür.

Birinci yıl denemelerinde 11 farklı ortamda yürütülen çalışmada 3 ortamdan kallus, çubuk embriyo ve embriyojenik kalluslar elde edilmiştir. MS 2.0 NAA+0.5 BAP ortamında %13.33 oranında embriyo elde edilmiş, bunu sırasıyla %10 kallus oluşturma oranı ile MS 0.5 2,4-D+0.5 BAP ortamı ve %3.33 kallus oranı ile MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamı takip etmiştir. Birinci yıl yapılan çalışmalarda elde edilen kalluslardan herhangi bir farklılaşma meydana gelmemiştir.

İkinci yıl denemelerinde anterlere doğrudan sıcak (+35 °C) ve soğuk (+4 °C) uygulamaları yapılmış ve yapılan uygulamalar arasında farklılık gözlemlenmemiştir. İki kallustan elde edilen %37.5 embriyo oranı ile MS 2.0 NAA+0.5 Kinetin sıcak uygulaması, en başarılı ortam olarak gözlemlenmiş, bu ortamı %7.5 kallus oluşturma oranları ile MS 2.0 NAA+0.5 BAP kontrol ve soğuk uygulaması, MS 1.0 NAA+0.5 BAP kontrol grubu takip etmiştir. Sadece soğuk uygulaması sonucu elde edilen bitkilerden kallus aracılığıyla organogenesis meydana gelmiş, buradan elde edilen bitkiler çoğaltılarak bu bitkilerin stoma sayımı yapılmıştır. Yapılan sayımlarda bu

bitkilerin kontrol grubu bitkilerinden bir farkının olmadığı yani diploid karakterde olduğu gözlemlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Androgenesis**,** anter kültürü, haploidi, sıcak uygulama, soğuk uygulama, *Stevia rebaudiana*

JÜRİ: Prof. Dr. Kenan TURGUT (Danışman)

Prof. Dr. Sadık ÇAKMAKÇI

Yrd. Doç. Dr. Cüneyt CESUR

ABSTRACT

THE EFFECTS OF PRETREATMENT AND DIFFERENT CULTURE MEDIA *IN VITRO* ANDROGENESIS ON *Stevia rebaudiana* BERTONI

TANSU USKUTOĞLU

MSc Thesis, Departmant of Field Crops
Supervisor: Prof. Dr. Kenan TURGUT
June 2016, 55 Pages

In this study, *Stevia rebaudiana* Bertoni plant which is known as a "sweet herb", determination of the appropriate bud stage and looked *in vitro* androgenesis effects on different hormone concentrations with different pre-treatment in MS basic nutrient medium.

In the study used different size of Stevia buds which are staining with various staining methods. The most succesful staining methods is ethidium bromide and suitable bud stage (uninucleate) was determined. Anter with uninucleate stage should be classified with bud opening period and there is established a relationship between the development of anters and bud opening period.

The study was carried out for two years. First year trial was set up and second-year trial started in light of data obtained from the first year trial. For this purpose, in the first year trial, anters are taken directly to culture media (without pre-treatment). In the second year, trial was expanded and anthers were exposed to two different pre-treatment and one control groups. Totally second year trial was carried out with three different applications.

First-year trial was conducted in 11 different culture media and 3 medium gives reaction to androgenesis. In this three medium; callus, embryos and embryogenic calli was obtained. Embryos was obtained from MS 2.0 NAA+0.5 BAP medium with a rate of 13,33% and MS 0.5 2,4-D+0.5 BAP medium and MS 1.0 NAA+0.5 BAP medium has followed respectively with a rate of callus forming 10% and 3,33%.Obtained at the end of the first year of the callus did not occur any differentiation.

Second-year trial, anters directly taken to culture and exposed to hot temperature (+35 °C) and cold shock (+4 °C). There was no significant difference between the hot and cold pre-treatments. MS 2.0 NAA + 0.5 Kinetin hot application were the most successful medium with 37.5% embryos ratio obtained from two callus. MS 2.0 NAA + 0.5 BAP cold application and control group, MS 1.0 NAA+0.5 BAP medium both of them callus forming ratio is 7.5%. Only cold application results organogenesis via callus. The obtained plants were duplicated *in vitro* conditon and stoma counting was done with control plant. There is no difference has been observed in the control group and obtained plants so this plants are also diploid character.

KEYWORDS: Androgenesis, anther culture, haploidy, hot pre-treatment, cold pre-treatment, *Stevia rebaudiana*

COMMITTEE: Prof. Dr. Kenan TURGUT (Supervisor)

Prof. Dr. Sadık ÇAKMAKÇI

Assist. Prof. Dr. Cüneyt CESUR

ÖNSÖZ

Tıbbi aromatik bitkilerin dünyada 50.000 ile 70.000 arasında bitki türünün modern ve geleneksel tıpta kullanıldığı bilinmektedir. Bu endüstriye olan ilgi gün geçtikçe artmakta ve tıbbi aromatik bitkiler aralarında ormancılık, tarım, gıda, baharat, içecek, eczacılık, kozmetik ve parfüm gibi birçok sanayi dalına hammadde sağlamaktadır. Bu hammaddeler; rizom, yaprak, soğan, kök, gövde, ağaç kabukları, tohum, çiçek ve meyve gibi çeşitli bitki kısımlarından karşılanmaktadır.

Asteraceae familyası üyesi olan stevia yaprakları sakkarozdan daha tatlı olan steviosid, rebaudiosid A, B, C, D, E ve dulcosid-A glikozitlerini içermektedir. Bu glikozitlerden Steviosid ve Rebaudiosid A özellikle tatlandırıcı olarak önem arz etmekte ve bu glikozitlerin miktarlarının fazla olması istenmektedir. Bitkinin kuru yaprakları şekerden 15-20 kat, toz ekstresi ise 300 kat daha tatlı olup, kalorisizdir. Stevia tatlandırıcısı geniş oranda diyabetliler ya da diyet yapan kişiler tarafından tüketilmektedir. 2025 yılında 57 milyon kişinin diyabetli olacağı ön görülmektedir. Bunun yanında Stevia ekstraktının olumsuz etkisini gösteren bir raporda bulunmamakta ve bu özelliği ile de Stevia diğer sentetik tatlandırıcılara alternatif olarak kullanılabilmektedir. Stevia bitkisi yabancı döllenen bir bitki olduğu için nesiller boyunca açılma göstermekte ve bu nedenle homojenliğini kaybetmektedir. Bitkide istenilen karakterlerin korunması ve bu karakterlerin sonraki generasyonlarda ortaya çıkarılması son derece önemlidir. Bunun için kullanılabilecek en etkili metotlardan biri de *in vitro* uygulamalardır. Yabancı döllenen bitkilerde 8-10 generasyon süren kendileme çalışmaları, haploidi tekniğinin kullanılmasıyla bir kaç yılda tamamlanabileceği gibi, yine bu yöntemle %100 homozigot saf hatlar elde etmek mümkün hale gelmiştir. Uygulama kolaylığı nedeniyle haploidi çalışmalarının, tartışmasız akla gelen ilk yöntemi "Anter Kültürü" tekniğidir.

Bu çalışmada; şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bitkisinde ön uygulama ve farklı ortamların *in vitro* androgenesis üzerine etkileri araştırılmıştır.

Başta tez çalışması konumun belirlenmesi olmak üzere, beni doku kültürü alanına yönlendiren, çalışmam boyunca değerli fikirlerini benimle paylaşan, tez çalışmama yön veren, bir an olsun ilgi ve alakasını esirgemeyen saygıdeğer tez hocam Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. Kenan TURGUT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında, sitoloji alanındaki değerli tecrübelerini benimle paylaşan ve bölüm laboratuvarlarını kullanımımıza açan Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyesi Prof. Dr. A. Naci ONUS'a çok değerli katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar ve arazi çalışmalarımda bana destek ve yardımcı olan, yüksek lisansım boyunca desteğini esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Araştırma Görevlisi Begüm TÜTÜNCÜ'ye, Bahçe Bitkileri Bölümü laboratuvarının kullanımı esnasında her türlü kolaylığı sağlayan ve yardımcı olan Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Araştırma Görevlisi

Tuğçe ÖZSAN'a, hayatımda ve çalışmalarımda elinden gelen tüm yardımları sunan Duygu AĞAR'a içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm yaşamımda olduğu gibi yüksek lisansım boyunca da sonsuz anlayışlarını ve maddi manevi desteklerini her zaman hissettiğim sevgili aileme sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET i
ABSTRACT iii
ÖNSÖZ v
İÇİNDEKİLER vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ ix
ŞEKİLLER DİZİNİ x
ÇİZELGELER DİZİNİ xii
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI 4
2.1. Şeker Otunun (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Keşfedilmesi ve Tarihsel Gelişimi 4
2.2. Stevia Bitkisinin Morfolojik Özellikleri 5
2.3. Haploidinin Kısa Tarihçesi 6
2.4. Anter Kültürü 9
2.4.1. Anter kültüründe haploid bitki oluşumunu etkileyen faktörler 11
2.4.1.1. Genotip 11
2.4.1.2. Polen gelişim aşaması 11
2.4.1.3. Donör bitkinin fizyolojik durumu ve yetişme şartları 12
2.4.1.4. Tomurcuk veya anterlere yapılan ön uygulamalar 13
2.5. Anter Kültürü ile İlgili Kaynak Taramaları 16
3. MATERYAL ve METOT 19
3.1. Materyal 19
3.2. Metot 21
3.2.1. Sitolojik çalışmalar 21
3.2.1.1. Çiçek tomurcuklarının sınıflandırılması ve uygun tomurcuk zamanının belirlenmesi 21
3.2.2. Tomurcukların yüzey sterilizasyonu 23
3.2.3. Anterlerin kültüre alınması 23
3.2.4. Anterlere yapılan ön uygulamalar 25
3.2.5. Kullanılan besin ortamı 25
3.2.6. Birinci yıl denemeleri 27
3.2.7. İkinci yıl denemeleri 27
4. BULGULAR ve TARTIŞMA 30
4.1. Uygun Tomurcuk Safhasının Tespiti 30
4.2. Birinci Yıl Deneme Bulguları 33

4.3. İkinci Yıl Deneme Bulguları 36
5. SONUÇ 45
6. KAYNAKLAR 47
ÖZGEÇMİŞ

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

°C	Santigrad Derece
cm	Santimetre
g	Gram
l	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
sa	Saat
sn	Saniye
%	Yüzde

Kısaltmalar

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AB	Avrupa Birliği
ABA	Absisik Asit
$AgNO_3$	Gümüş Nitrat
2,4-D	2,4 Diklorofenoksi Asetik Asit
BAP	6-Benzil Amino Pürin
CO_2	Karbondioksit
DH	Double Haploid
EtBr	Ethidium Bromide
Fe-EDDHA	Ethilendiamin Di-2-Hidroksifenil Asetat Ferrik
Fe-EDTA	Ethilendiamintetraasetik Asit Ferrik Sodium
HCI	Hidroklorik Asit
IBA	İndol-3-Bütirik Asit
NAA	Naftelin Asetik Asit
MS	Murashige ve Skoog
NaOH	Sodyum Hidroksit
TDZ	Thidiazuron

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bitki yaşam döngüsünde haploid bitki üretim aşamaları 7

Şekil 2.2. Anter kültürü basamakları 10

Şekil 2.3. Mikrosporların gametofitik ve sporofitik gelişimleri 14

Şekil 3.1. (a) Arazide çiçeklenme başlangıcındaki *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin görünümü (b) Kışı toprak altı rizomlarında geçiren şeker otu bitkisinin yeni dönemde tekrar sürmesi 19

Şekil 3.2. Akdeniz Üniversitesi deneme parsellerinde *S. rebaudiana* Bertoni bitkisinin görünümü 20

Şekil 3.3. Stevia bitkisinin tomurcuklarının genel görünümü 20

Şekil 3.4. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin farklı safhadaki çiçek tomurcuklarının sınıflandırılması; a ve b erken dönemdeki çiçek tomurcukları c ve d uygun safhadaki tomurcuklar e ve f ise geç dönemdeki çiçek tomurcukları 21

Şekil 3.5. Farklı dönemlerdeki çiçek tomurcuklarının gelişimi 21

Şekil 3.6. Uygun safhadaki tomurcukların görünümü (c safhasındaki 5 adet çiçekçik) 22

Şekil 3.7. Anterlerin mikroskop altında görünümü 22

Şekil 3.8. (a) Sterilizasyon aşamasındaki tomurcuklar (b) Petri kutusunda anterlerin görünümü 24

Şekil 3.9. Panasonic MLR-352-PE'markalı iklimlendirme kabini 24

Şekil 4.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi çiçek tablasındaki 5'er adetlik tomurcuklar 31

Şekil 4.2. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde 1 çiçek tablasındaki 7 adet tomurcuk 31

Şekil 4.3. (a) (b) (c) *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin tek çekirdekli mikrospor evresi (d) (e) Çift çekirdekli evreye geçmiş mikrosporlar (f) Gelişimini tamamlamış olgun polen tanesi 32

Şekil 4.4. Flamentleri kesilerek kültüre alınan *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin anterleri 34

Şekil 4.5. MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamından elde edilen sarı yeşil ve koyu sarı bölgeleri olan kallus 34

Şekil 4.6. MS 2.00 NAA+0.5 BAP ortamında gelişen koyu yeşil renkli çubuk embriyo ve antosiyaninli yapıları içeren embriyojenik kallus 35

Şekil 4.7. MS 2.0 NAA+0.5 BAP ortamında gelişen sarı sulu ve gevrek yapıdaki kallus 35

Şekil 4.8. MS 2.0 NAA+0.5 BAP ortamında gözlenen yeşil embriyojenik kallus ve tüylü antosiyaninli yapılar 36

Şekil 4.9. MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamında elde edilen embriyojenik kallus 38

Şekil 4.10. MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamında 3 farklı anterden gelişen embriyojenik kalluslar 38

Şekil 4.11. MS 2.0 NAA+0.5 Kinetin ortamından sıcak uygulaması ile elde edilen tek bir adet kallustan gelişen çok sayıda embriyo oluşumu 39

Şekil 4.12. MS 2.0 NAA+0.5 Kinetin ortamında meydana gelen çubuk embriyolar 39

Şekil 4.13. MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamı soğuk uygulaması sonucu kallus aracılığıyla meydana gelen organogenesis 40

Şekil 4.14. Kalluslardan bisturi yardımıyla kesilerek ayrılan sürgünler ½ MS+1 mg/l IBA içeren ortamlarda köklendirilmesi 41

Şekil 4.15. Yeterince gelişen bitkilerden koltuk altı tomurcukları kullanılarak klonal çoğaltma 42

Şekil 4.16. Soğuk uygulaması ve MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamından kallus aracılığı ile meydana gelen bitkiciklerin toprağa alıştırılması (Buradaki 15 adet bitkicik *in vitro* koşullarda klonal olarak çoğaltılmıştır). 43

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Doğal yolla oluşan haploid bitkilere ait seçilmiş bazı örnekler 8

Çizelge 2.2. Bazı bitkilerde androgenesisi arttıran çeşitli stres faktörü / Ön uygulamalar (Islam ve Tuteja 2012) 15

Çizelge 3.1. MS temel besi ortamının içeriği 26

Çizelge 3.2. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde birinci yıl denemelerinde kullanılan ortam ve değişik hormon konsantrasyonları 27

Çizelge 3.3. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde ikinci yıl denemelerinde kullanılan ortam ve değişik hormon konsantrasyonları 28

Çizelge 4.1. Farklı kallus / embriyo teşvik ortamlarında *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin birinci yıl denemesinde kallus oluşturma frekansı 33

Çizelge 4.2. Farklı kallus / embriyo teşvik ortamlarında *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin ikinci yıl denemesinde kallus oluşturma frekansı..... 37

1. GİRİŞ

İnsanlık tarihinin başlangıcından bu güne kadar insanlar yiyecekleri lezzetlendirmek veya tatlandırmak için çeşitli yollar denemişlerdir. Günümüze gelene kadar bu isteklere cevap veren maddelerin başında ise yüksek kalorisi ile birlikte şeker gelmektedir.

Gıda sanayisinin en temel girdilerinden biri olan şeker, gerek içerdiği yüksek orandaki kalori gerekse tatlandırıcı özelliğinden dolayı, bugün dünyada yaklaşık 120 ülkede üretilmektedir. Yüksek kalorili bir besin maddesi olan şeker, üretildiği her ülkenin stratejik tarım ürünleri grubunda yer almaktadır. Bilindiği üzere ülkeler şeker ihtiyacını yaşadıkları bölgenin ekolojik koşullarına uyum sağlayan şeker kamışı veya şeker pancarı olmak üzere farklı iki bitki ile karşılayabilmektedir. Dünya şeker üretiminin %70'i şeker kamışından, %30'u ise şeker pancarından üretilmektedir. Şeker kamışından üretilen şeker, şeker pancarına kıyasla üretim maliyeti daha düşüktür, fakat istediği iklim koşullarından dolayı tüm dünya genelinde üretilememekte ve dolayısıyla yetişmediği yerlerde alternatifi olan şeker pancarı devreye girmektedir. Şeker kamıştan şeker üretiminde lider ülkeler; Brezilya, Hindistan, Tayland, Meksika, Kolombiya ve Küba'dır. Pancar şekeri üretiminde ise dünyanın önde gelen ülkeleri ABD ve AB üyesi ülkeler başta olmak üzere; Ukrayna, Türkiye ve Rusya'dır (Anonim 2011).

Bugün dünya üzerinde şeker üretiminin 2016 yılı itibari ile 173 milyon ton, ihracatının ise dünya üzerinde 52 milyon tona ulaşması beklenmektedir (Anonim 2015). Bu denli önemli bir paya sahip olan şekerin kullanım fazlalığının getirdiği bir takım sağlık zararları da göz ardı edilmemelidir. Bu zararlardan bazıları ise şu şekilde sıralanabilir:

1-) Kandaki şekeri ani yükseltip, çok kısa sürede normal değerin altına düşürür.
2-) Şeker ve şekerli besinlerin fazla tüketimi ve bunların diş üzerinden temizleyecek diş bakımı uygulamasının olmayışı diş çürüklerine neden olur.
3-) Şeker tüketimiyle çok fazla enerji alınmaktadır. Fazla şeker tüketimi ayrıca vücutta yağ depolanmasını hızlandırarak "şişmanlık ve buna bağlı kalp damar hastalıkları ve diyabet riskini" artırmaktadır (Baysal vd 1999, Arslan vd 2001).

Değişen yaşam tarzları, şeker kaynaklı obezite ve diş hastalıkları gibi rahatsızlıkları tetiklemesi veya diyabet hastalarının şeker kullanamaması gibi sebeplerden ötürü bu yüksek kalorili şekerin tadını alabilecek daha düşük kalorili ve yüksek tatlandırma yeteneğine sahip alternatif ürünlerin bulunması insanlar için zaruri olmuştur. Bu amaçla üretilen düşük kalorili sentetik tatlandırıcılar eczacılık ve gıda sektöründe piyasaya çıkmış fakat daha sonra anlaşılan zararlı etkilerinden dolayı kullanımları sınırlandırılmış veya tamamen yasaklanmıştır (Inglett 1976, Sardesai ve Waldshan 1991).

Dolayısıyla kullanılabilecek kalorisiz tatlandırıcı isteği insanları bitkisel kökenli zararsız tatlandırıcılara yönlendirmiştir. Tatlandırıcının az kalorili olması, düşük konsantrasyonlarda bile tadını verebilmesi ve zararlı yan etkilerinin bulunmaması iyi bir tatlandırıcıda istenilen özelliklerin başında gelmektedir. Bunlara ilaveten geniş bir sıcaklık ve pH aralığında stabilitesini koruması, nem çekmemesi, suda kolay çözünmesi, ağızda acı tat bırakmaması ve diğer tatlandırıcılarla birlikte kullanılabilmesi gibi özellikler de istenmektedir (Surana vd 2006). Bu açığı kapatmak adına son yıllarda bilinirliği gitgide artan bitkisel kökenli tatlandırıcı kaynağı olan *Stevia rebaudiana* Bertoni (Şeker Otu) bitkisi içerdiği diterpen glikozitleri sayesinde bu istekleri karşılayabilecek potansiyele sahiptir.

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Asteraceae (Compositae) familyasından çok yıllık, yabani, küçük ve çalımsı bir bitki olup, anavatanı Paraguay ve Brezilya sınırındaki Amambi dağlarıdır (Cortes vd 2007). Stevia çok yıllık bir bitkidir fakat sıcaklığın 0 °C'nin altına düştüğü yerlerde tek yıllık olarak görülebilir. En iyi gelişimi sıcak iklimde 15-30 °C'de bol yağış alan yerlerde gösterir. Ekildiği tarlalarda nemli toprak isterken toprağın geçirgenliğinin de yüksek olması ve fazla su tutmaması gerekmektedir (Chan vd 2000). Yaygın olarak Brezilya, Paraguay, Kolombiya, Venezuela gibi ülkelerde yetiştirilen stevia, Paraguay'da 1500 yıldan daha uzun bir süredir kullanılmaktadır. Stevia'nın yapraklarında bulunan steviosid ve rebaudiosid gibi diterpen glikozitleri sayesinde şekerden 200-300 kat daha tatlıdır (Tanaka 1982). Doğal tatlandırıcı olan stevia bu özelliğinden dolayı "tatlı ot", "tatlı yaprak" ve "bal yaprak" gibi isimlerle adlandırılmaktadır (Chalapathi ve Thimmegowda 1997). Stevia'dan elde edilen şeker diyabet için kullanılan aspartam ve sakarin gibi suni tatlandırıcılara en iyi doğal alternatif olarak görülmektedir. Ayrıca stevianın içerdiği şekerin yüksek kalitede ve kalorisiz olması da bitkinin önemini arttırmaktadır (Bharati 2003, Preethi vd 2011).

Her ne kadar şeker otunun verdiği tat şekere kıyasla daha geç alınsa da, sofralık şeker (sükroz) ile kıyaslandığında şeker otunun tatlandırıcı olarak gıdalarda kullanılması günden güne artmaktadır. Sükroz ile kıyaslandığında belli başlı özelliklerinden dolayı stevia tatlandırıcı olarak tercih edilmektedir.

Bu özellikler aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1-) Kalorisinin düşük yani diyetik olması
2-) Kan şekerini yükseltmemesi, diyabetik olması
3-) Yan etkilerinin olmaması
4-) Yüksek sıcaklık ve geniş pH aralığında stabilitesini korumasıdır.

Stevia tatlandırıcısı geniş oranda diyabetliler ya da diyet yapan kişiler tarafından tüketilmektedir (Fronza ve Folegatti 2003). 2014 yılı itibari ile dünyada tahmini olarak 387 milyon insan diyabet ile birlikte yaşamaktadır. Önümüzdeki 20 yıllık tahminlerde ise bu rakamın 595 milyon insana çıkması beklenmektedir ki bu rakam yaklaşık olarak yetişkin insanların %10'una tekabül etmektedir. Bugün yapılan sağlık harcamalarının

her 9 dolarından 1 doları diyabet ve diyabetin yol açtığı hastalıkların tedavisi için harcanırken, bu harcamalar 612 milyar dolara kadar ulaşmıştır. Yıllık olarak diyabet ve onun yol açtığı hastalıklardan 4.9 milyon insan ölmekte ve bu rakamda her 7 saniyede dünya genelinde 1 insanın ölmesi anlamına gelmektedir (IDF 2015). Çıktığı günden bu güne bazı sağlık sorunlarına yol açtığı iddia edilse de şeker otunda yapılan araştırmalarda elde edilen ekstre veya yapraklarının kullanımının herhangi bir zararlı etkisi olmadığı anlaşılmıştır (Lee 1979, Kinghorn 1982). Bitkisel kökenli bir tatlandırıcı olması ve içerdiği özellikler bakımından şeker hastalarının da kullanımına uygun olması bu bitkinin önemini daha da arttırmaktadır.

Şeker otu bu derece önemli bir bitki olmasına rağmen maalesef ülkemizde yetiştiriciliği henüz yaygınlaşmamış ve yeterince bilimsel çalışma yapılmamıştır. Yabancı döllenen ve genellikle kendine uyuşmazlık özelliği gösteren şeker otunda kendileme ile homozigotluk sağlamak oldukça zor görünmektedir. Ayrıca, haploidi tekniği kullanılarak çok daha kısa sürede homozigot saf hatlar elde edilebilmektedir. Yabancı döllenen bitkilerde, kendileme ile homozigot hatların elde edilmesi 8-10 generasyon sürmesine karşın haploidi tekniği ile bir generasyonda %100 homozigot hatlar elde edilebilmektedir. Birçok bitki türünde haploidi araştırmaları yürütülmüş ve hâla yürütülmektedir. Bazı türlerde hiç başarı elde edilemezken bazılarında çok düşük oranda haploid bitkiler elde edilmiştir. Haploidi teknikleri olarak; androgenesis (anter ve mikrospor kültürleri), gynogenesis (ovül ve ovaryum kültürleri) ve ışınlanmış polenlerle tozlanma yöntemleri ön plana çıkmaktadır. Bunların içerisinde ise anter kültürü en yaygın olarak kullanılan tekniktir.

Bu çalışmada; şeker otu bitkisinde farklı ön uygulamalar ve ortamların anter kültürü üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmada yöntem olarak anter kültürünün seçilmesinin iki önemli nedeni vardır;

1) Anter kültürünün farklı türlerde başarılı olması,

2) Uygulanmasının daha kolay olmasıdır.

Stevia rebaudiana Bertoni'nin anterlerini kullanarak değişik ön uygulama ve farklı ortamların *in vitro* androgenesise olan etkisinin araştırılması ile birlikte ileride yapılacak olan haploidi çalışmalarına da temel oluşturabilecektir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE KAYNAK TARAMALARI

2.1. Şeker Otunun (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Keşfedilmesi ve Tarihsel Gelişimi

Astereceae (Compositae) familyası bitkilerinden biri olan *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin yapraklarının içerdiği yüksek orandaki tatlandırıcı içeriğinin tam olarak ne zaman keşfedildiği bilinmese de bilim dünyanın ilgisini çekmesi 115 yıl öncesine kadar dayanmaktadır. Paraguay'ın başkenti olan Asunción da İngiliz konsolosu olarak görev yapan Cecil Gosling, şeker otunun bulunmasında İtalyan-İsviçreli botanikçi olan Dr Moisés S.Bertoni'ye önemli katkılar sağlamıştır. Bitki üzerinde çalışma yapan ve yeni bir tür teşhis eden Bertoni, daha sonra bitkiye *Stevia rebaudiana* Bertoni ismini vermiştir (Gosling 1901, Bertoni 1905).

Paraguay kökenli şeker otu bitkisi tatlandırıcı özelliğinden dolayı yirminci yüzyıl boyunca binin üzerinde bilimsel makaleye ve çeşitli patent başvurularına konu olmuştur. Steviosid, şeker otu yapraklarına tatlılık veren ve yapraklarında en çok bulunan bileşendir. Ent-kaurene diterpen glikozitleri ise saf olmayan formda, şeker otu bitkisinden ilk defa yirminci yüzyılın başlarında elde edilmiştir (Bertoni 1918). Bu glikozitlerin önemi ve yenileri ise ancak ilerleyen yıllarda keşfedilebilmiştir. 1970'lerin başlarında Japon araştırmacılar stevia yapraklarında bulunan ve en önemli ikinci bileşen olan ent-kaurene diterpen glikozitlerininden olan rebaudiosid A'yı izole etmeyi başarmışlardır (Kohda vd 1976). Şeker otu yapraklarında bulunan ve tatlılık veren glikozitlerden olan fakat bitki yapraklarında daha az bulunan; dulcosid A, rebaudiosid B-E ve steviolbiosid ise daha sonradan keşfedilmiştir (Tanaka 1982). *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi, stevia cinsi diğer bitkilerle kıyaslandığında anormal bir şekilde steviosid ve rebaudiosid A diterpen glikozitlerini yapraklarında biriktirmektedir. Yaklaşık olarak 230 bitkiden oluşan stevia cinsindeki hiçbir bitkinin yapraklarında bu kadar yüksek oranda steviosid ve rebaudiosid A rastlanmamaktadır (Soejarto vd 1982). Şeker otu bitkisinin yapraklarında bulunan fakat tatlılık vermeyen birçok glikozit de günümüzde tanımlanmıştır.

Şeker otu bitkisinden ekstrakt elde edilmesi ve saflaştırılarak tatlandırıcı veya gıdalarda kullanılması 1970'lerde Japonya'da başlanmış ve o dönemde yasaklanan bazı yapay tatlandırıcılarla birlikte süreç hızla ilerlemiştir. Aspartamın keşfedilmesinden önce 1987'de steviosid Japonya'da ki yüksek konstantrasyondaki tatlandırıcı pazarının %41'ini oluşturmaktaydı (Anonim 1988). Dünyada en geniş ürün yelpazesi ve kullanımı ile günümüzdede Japonya bu alanda öncü ülke konumundadır. Güney Kore'de ise steviosid ilk kez alkol endüstrisinde kullanılmış ve giderek ülke genelinde kullanım alanı yayılmıştır (Seon 1995). Brezilya ve Güney Amerika ülkelerinde steviosidin tatlandırıcı olarak kullanılabilmesi onaylanmışken, Kuzey Amerika ve 15 kadar Avrupa birliği ülkesinde şeker yerine tatlandırıcı olarak kullanılması yasal olarak onaylanmamıştır (Bakal ve O'Brien 1986). Her ne kadar yasal olarak onaylanmasada pratikte Amerika Birleşik Devletlerinde ve Kuzey Avrupa'da birçok alanda tatlandırıcı

olarak yararlanılmaktadır (Moroni 1999). 1991'de Amerika'da *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin yaprak ihracatı yasaklanmış fakat bu yasak 1995 yılında yürürlükten kaldırılmıştır. Bazı ülkelerde sağlığa zararlı olup olmadığı tartışılsa da stevia bitkisinden elde edilen ekstraktların zaralı olduğuna dair yapılan bir araştırma olmadığı gibi zararlı olmadığına ilişkin uzun soluklu bir çalışmada bulunmamaktadır.

2.2. Stevia Bitkisinin Morfolojik Özellikleri

Stevia çok yıllık 30-50 cm derinlere kadar inebilen saçak köklü, narin ve dikine gelişen bir gövdeye sahiptir. Köklere yakın bölgelerden kolayca sürgün verir ve her yıl öldükten sonra tekrar yenilenir. Doğal ortamında bitki narin ve küçük dallı, dallar ve yapraklar yeşil ve küçük beyaz tüycüklerle kaplanmıştır. Kültür formunda ise bitki genellikle birçok yandal meydana getirir ve kalabalık yuvarlağımsı bir taç oluşturur. Bitkinin ezilen yaprakları ise çevreye ağır bir koku yaymaktadır. Ayrıca bitkinin tüm yeşil aksamının tadı ise tatlıdır.

Yaprakları basit yapıda neredeyse sapsız ve boğum arası 2-4 cm uzunluğundadır. Yaprakları ince ve kayışımsı olup çok değişik boyut ve şekildedir. Dar elips şeklinde, tepe noktası yuvarlak, aşağıya inildikçe darlaşan ya da uzatılmış yuvarlak biçimli yaprakları 2-3 cm uzunluğunda ve 0.6-1 cm genişliğindedir. Yaprakların tepe noktası ya yuvarlağımsı ya da keskin bir şekilde birleşir. Yaprağın alt kısmı ise kama şeklindedir. Yaprak kenarları bütündür ve genellikle üst yarısı dişli yapıdadır, alta inildikçe yaprak kenarı düzleşir. Yaprak tabanında belirgin 3 adet damar görünürken üst tarafta da dağınık ağsı ikincil damar düzeni görülmektedir. Kuru durumdaki yapraklar zeytin yeşilinden yeşil-kahverengi arasında bir renk almakla birlikte genellikle üst tarafı daha koyudur.

Kapitulumu gevşek, dal uçlarında ise salkım çiçek şekli görünür. Çiçek sapı çok narin, 1-4 cm uzunluğundadır. Her kapitulumun çiçek sapçığı narin ve 1-4 mm uzunluğundadır. Çiçek yaprağı uzunlamasına mızrak şeklinde olup, 1-2 mm uzunluğundadır. Her kapitulum neredeyse çiçek sapı uzunluğunda bir yaprak demeti tarafından sarılır, alt kısmı yeşil üst kısmı ise sarımtırak bir renktedir. Çiçek tablası 5 parçalıdır, gençken yeşil renkte tüylü yapıda olup, 4-5 mm uzunluğundadır. Her kapitulum 5 disk çiçekten meydana gelmektedir (Kinghorn 2003).

Çiçekleri küme şeklinde, rastgele dağılım gösterir. Çiçekleri 15-17 mm arasında olup, gayet küçük ve beyaz renklidir (Marsolais vd 1998). Küçük beyaz çiçekleri tam çiçek yapısında olup, erkek ve dişi organ aynı çiçekte bulunmaktadır. Bir çiçek salkımında iki ile altı adet arasında çiçek bulunur (Goettemoeller ve Ching 1999). Bitki en erken 4 gerçek yaprak oluştuktan sonra çiçeklenmeye başlayabilir. Çiçeklenme bitkide yaklaşık 1 ay sürmekte ve bu dönem içerisinde bitkide farklı gelişim dönemlerindeki çiçekler görülmektedir.

Şeker otu bitkisinin kökleri ağsı yapıdadır. Kışı toprak altında geçiren rizomları sayesinde soğuk iklimlerde üst bölgeleri ölse de toprak altında kalan rizomları sayesinde, kış sonrasında bitki tekrar canlanır ve yeni sürgünler vermeye başlar (Taiariol 2004). Steviol glikozitler kök sisteminde depo edilmemekte ve toplam biyokütlenin %1 kadarını kökler oluşturmaktadır (Bondarev vd 2003).

Tohumları hassas bir kabukla kaplı ve 3 mm uzunluğundadır. Kabukların üzerinde sayıları 20'ye yaklaşan tüyler veya çıkıntılar bulunmaktadır. Tohumları az miktarda endosperm içermekte ve tohumları küçük olduğundan dolayı rüzgâr ile birlikte etrafa yayılmaktadır (Ramesh vd 2006). Fertil tohumlar koyu renkte, daha açık olan tohumlar ise boş yani fertil değildir (Goettemoeller ve Ching 1999). Genel olarak tohumların canlılığı azdır ve büyük bir değişkenlik göstermektedir. Tohumları 0 °C'de saklanmalıdır, eğer daha yüksek sıcaklıklarda saklanırsa 3 yıl içinde canlılığını %50 oranında kaybetmektedir. Stevia bitkisinin tohumları çok küçüktür, 1000 tane ağırlığı yalnızca 0.15-0.3 g arasında değişmektedir (Brandle vd 1998).

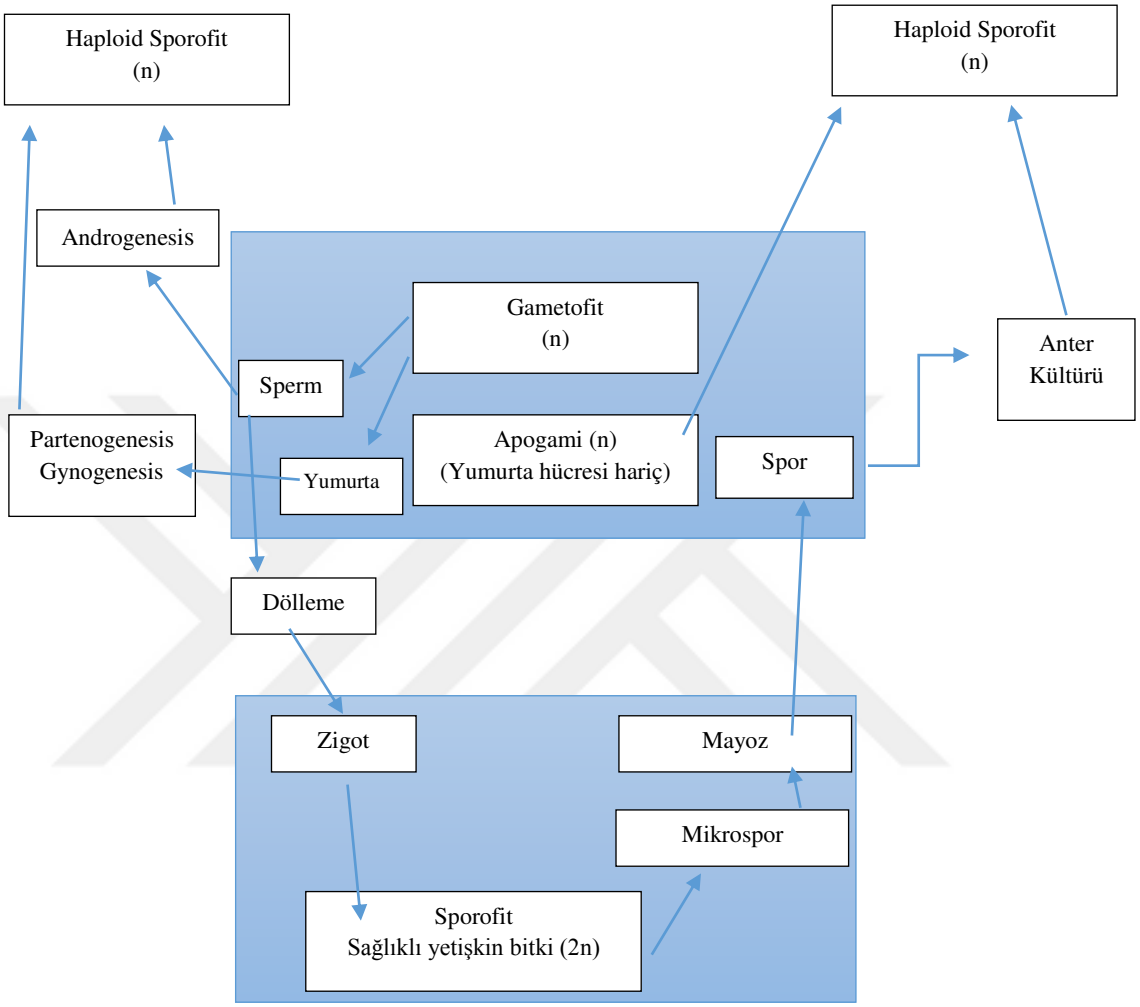
2.3. Haploidinin Kısa Tarihçesi

Birçok organizmada genetik katkı her iki ebeveynden sağlanırken bunun bazı önemli istisnaları da vardır. Bazı organizmalar ve bitkilerde dahil bunların haploidleri elde edilebilmektedir. Bu konuda kullanılan "Haploid sporofit" tanımı bitkilerde somatik hücrelerindeki kromozom sayısının gamet hücrelerindeki kromozom sayısına eşit olduğunu anlatmak için kullanılmaktadır (Palmer ve Keller 2005). Bitkilerin yaşam çevriminde 2 çeşit üreme vardır; bunlardan biri sporofitik üreme iken diğeri gametofitik üremedir. Yüksek yapılı bitkilerin baskın yaşam çevriminde sporofitik evre baskındır, yani bunların yaşam çevrimi tümüyle sporofittir. Sporofit erkek veya dişi gametin döllenmesi sonucu oluşur ve ebeveynlerden ikisinin de bir set kromozomunu taşır. Genetik yapı itibariyle ise 2n yapıdadır. Gametofit ise sporofit yapının aksine tek set kromozom (n) yapısı içerir ve bu yapı ise hücrenin mayoz geçirirken kromozom sayısının yarıya indirgenmesi ile meydana gelir.

Haploid bitkiler tek bir bireyin kromozomunu içeren (n) gametofit yapıdaki sporofit bitkilerdir. Diploid (2n) bitkilerden farkı ise tek set kromozom yapısı içermesidir. Bitkinin yaşam evresinin hangi dönemlerinde haploid bitkilerin üretilebileceği ise Şekil 2.1'de gösterilmiştir (Kasha ve Maluszynsky 2003).

İlk doğal sporofitik haploid bitki 1921 yılında Bergner tarafından *Solanaceae* familyasından *Datura Stramonium* L. da gözlemlenmiştir (Blakeslee vd 1922). Tahıllarda ilk haploid bitki ise Gaines ve Aase (1926) tarafından Pasifik'in kuzeybatısında yetişen kış varyetesi olan *Triticum Compactum var. Humboldtii'*da rapor edilmiştir. İlerleyen yıllarda haploid bitkilerin ıslah ve genetik araştırmalarda kullanılabileceğinin farkına varılmasından sonra doğada az rastlansa da başka bitkilerde de (Çizelge 2.1) kendiliğinden haploid bitkiler oluştuğu 1974 yılında Kasha tarafından

gözlenmiş ve 100 farklı kapalı tohumlu bitkide de bu şekilde haploid bitkiler oluştuğu rapor edilmiştir (Dunwell 2010).



Şekil 2.1. Bitki yaşam döngüsünde haploid bitki üretim aşamaları

Spontane yollarla oluşan haploid bitkilerin oluşmasındaki frekans düşüklüğü bu bitkilerin pratik uygulamalarda kullanımlarını kısıtlamıştır. İlk haploid bitkinin bulunmasından 40 yıl sonra Guha ve Maheshwari (1964) *Datura Innoxia'*da *in vitro* koşullar altında alınan polenlerinin uyarılarak normal gametofitik gelişiminin sporofitik yöne kaydırılabileceğini ve bu yolla oluşan tam bir bitkinin haploid olacağını tespit etmiştir.

Anter kültürü yolu ile ilk haploid bitki *Nicotiana tabacum* türünde Bourgin ve Nitsch (1967) tarafından elde edilmiştir.

Çizelge 2.1. Doğal yolla oluşan haploid bitkilere ait seçilmiş bazı örnekler

Türler	Referans
Tütün	Chipman ve Goodspeed, 1927; Ruttle, 1928; Kostoff, 1929; Goodspeed ve Avery, 1929; McCray, 1932; Povolochko, 1937; Ivanov, 1938; Bolsunov, 1939; Prakken, 1943
Domates	Lindstrom, 1929, 1941; Lindstrom ve Koos, 1931;Humphrey, 1934; Newcomer, 1941; Rick, 1945; Kirillova ve Bogdanova, 1978
Çeltik	Morinaga ve Fukushima, 1931, 1934; Ramiah vd 1933, 1935
Hardal	Morinaga ve Fukushima, 1933; Komatsu, 1936;Ramanujam, 1941; Mizushima, 1944; Kuriyama ve Watanabe, 1955; Olsson ve Hagberg, 1955; Fukushima ve Iwasa, 1964; Prakash, 1973
Buğday	Chizaki, 1933, 1934; Smith, 1946
Arpa	Johansen, 1934; Tometorp, 1939
Pamuk	Skovsted, 1935; Grüneberg, 1936
Patates	Lamm, 1938; Bains ve Howard, 1950; Hougas ve Peloquin, 1957; Rieman vd, 1959; Hougas vd,1964, Nordenskiöld, 1939; Nishiyama, 1961
Yulaf	Nordenskiöld, 1939; Nishiyama, 1961
Biber	Nishiyama, 1940; Morgan ve Rappleye, 1954
Sorgum	Brown, 1943
Orkide	Hagerup, 1944, 1947; Kondo, 1970
Kuşkonmaz	Randall ve Rick, 1945
Mısır	Chase, 1949
Kahve	Vishveshwara, 1960; Sreenivasan vd 1982
Çilek	Islam, 1961

Yapılan bu keşifin ardından anter kültürü ile ilgili çalışmalar artmış, *Solanaceae* (Patlıcangiller), *Brassicaceae* (Turpgiller), *Gramineae* (Buğdaygiller) familyalarında başarılı sonuçlar rapor edilmiş, fakat benzer başarılar tüm kapalı tohumlu bitkilerde sağlanamamıştır.

Arpa (*Hordeum vulgare* L.), Kolza (*Brassica napus* L.), Tütün (*Nicotiana tabacum*) ve Buğday (*Triticum aestivum* L.) yüksek embriyo rejenerasyonu sebebiyle model bitkiler olarak seçilmiştir (Forster vd 2007).

Bilimsel önemi olan *Arabidopsis*, birçok odunsu bitki ve baklagiller ise günümüzde hala inatçı türler olarak bilinmekte ve *in vitro* morfogenesise cevap vermemektedir (Sangwan-Norreel vd 1990).

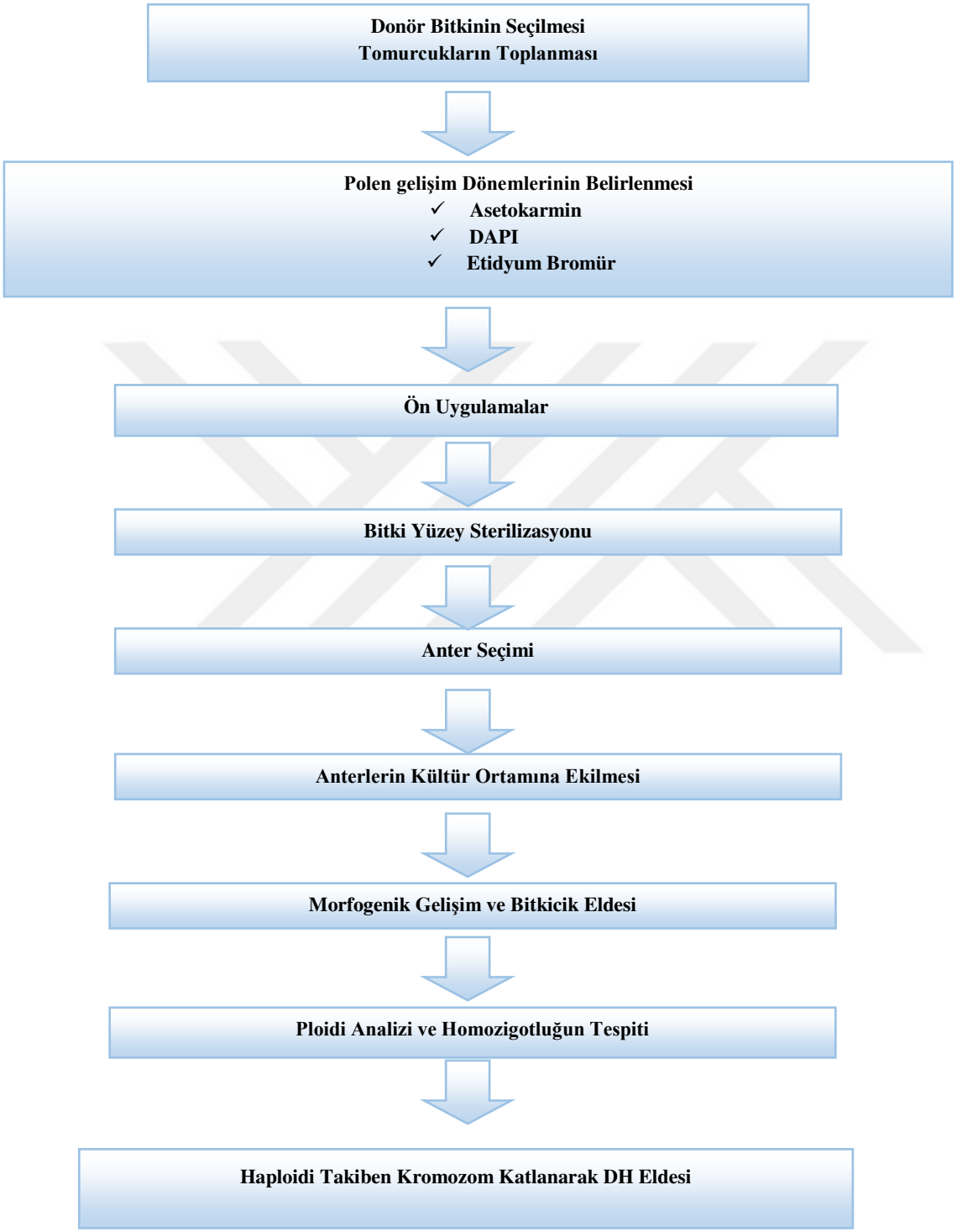
2.4. Anter Kültürü

Bitkilerdeki doku kültürü çalışmalarının temeli, ilk olarak Schwann ve Schleiden'in 1838 yılında totipotensi teorisini öne sürmeleri ile atılmıştır. Genel olarak bitkiler, hücresel totipotensi için olağanüstü bir potansiyele sahiptir. Aslında, çekirdeğini muhafaza ettiği sürece herhangi farklılaşmış bir bitki hücresi, embriyogenik şartlara dönme ve tam olarak yeni bir bitki oluşturma yeteneğindedir. Hücresel totipotensinin en çarpıcı örneklerinden birisi androgenesis fenomenidir (Arı 2006). Anter kültürü uygun koşullar altında, içerisinde olgunlaşmamış polenleri (mikrosporları) bulunduran anterlerin, tomurcuklardan ayrılarak *in vitro* koşullarda yapay besin ortamlarına yerleştirilmesi ve burada olgunlaşmamış polenlerden haploid embriyolar elde edilmesidir.

Haploid ve double haploid (DH) bitkilerin elde edilmesi bitki ıslahı için çok güçlü bir araç olarak kullanılabilecek potansiyele sahiptir fakat albino bitkilerin oluşması, düşük embriyo oluşumu, oluşan embriyoların yaşama şansındaki azlıklar, yüksek oranda genotipe bağlılık, sezona bağlı olarak anterlerin tepkisi gibi bazı problemlerin üstesinden gelinmesi gerekmektedir. Her ne kadar her türün veya aynı türe ait farklı cinslerin bile kendine ait özel istekleri ve farklı prosedürleri olsa da bu alanda Maluszynski vd 2003 yılında 33 bitki türüne ait 44 protokolün detaylarını yayınlamışlardır. Anter kültürünün uygulanışı ile ilgili genel bir çerçeve çizmek mümkün olmakta ve kısaca Şekil 2.2 'deki gibi özetlenebilmektedir (Germana 2010).

Anter kültüründe uygun boyuttaki tomurcuklar sabahın erken saatlerinde toplanır ve laboratuvar koşullarında uygun boyama teknikleri ile (Etidyum bromür, DAPI, Asetokarmin, vb) erken veya geç tek çekirdekli evresi tespit edilir. Araziden toplanan uygun aşamadaki çiçek tomurcukları sterilize edilmiş distile su ile 3 defa yıkandıktan sonra uygun yüzey sterilizasyon ajanları ile sterilize edilir. Sterilize edilen

tomurcuklar en az 3 defa daha steril distile su ile durulandıktan sonra işleme hazır hale gelmektedir.



Şekil 2.2. Anter kültürü basamakları

Stereo-mikroskop yardımı ile anterlerden diploid sürgünler vermemesi için filamentler dikkatlice steril pens ve bisturi yardımı ile kesilir. İzole edilen anterler ise önceden hazırlanmış ve petri kaplarına dökülmüş besin ortamlarına alınarak, ağızları parafilm veya streç film ile kapatılarak kültür işlemi gerçekleştirilir. Genel olarak anterlerin, anter başına 1.5 ml ortam gelecek yoğunlukta konulması tavsiye edilmektedir. Yapılan tüm aşamalarda herhangi bir fungal veya bakteriyel kontaminasyon olmaması için steril hava kabini içerisinde kontrollü koşullar altında işlemler gerçekleştirilir (Mishra vd 2014).

2.4.1. Anter kültüründe haploid bitki oluşumunu etkileyen faktörler

2.4.1.1. Genotip

Birçok faktörün etkisi altında olan polen embriyogenesisinde en önemli faktörlerin başında genotip gelmektedir. Bu konuda yapılan araştırmalarda aynı türün içinde, farklı genotiplerle yürütülen çalışmalarda, bazı genotiplerden başarılı sonuçlar alınırken bazı genotiplerden ise başarılı sonuçlar alınamamıştır.

Ekmeklik buğdayda (*Triticum avestium*) yapılan bir çalışmada 21 farklı çeşit kullanılmış, yapılan çalışmaların sonucunda ise 10 farklı genotipte gelişme olduğu gözlemlenmiştir. Çeltikte yapılan diğer bir araştırmada ise japonica çeşidinin indica çeşidine oranla anter kültürüne daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Bajaj 1990).

Eş zamanlı olarak geniş bir çeşitliliğe sahip *Citrus* cinslerinde (4 farklı klementine mandalina, 2 farklı mandarin, 4 farklı tatlı portakal, 4 farklı turunç, 5 farklı limon, 4 farklı greyfurt) yapılan bir çalışmada; 11 farklı ortam ve çeşitli ön uygulamalar uygulanmış, aynı muamelelere maruz kalan çeşitlerden tek bir klementine mandalini ve tek bir limon çeşidinde haploid kallus elde edilmiştir (Germana 2007).

Heberle-Bors'e (1982) göre mikrospor embryogenesisini çekirdek ve sitoplazmik genler ile çevrenin etkileşimi birlikte kontrol etmektedir.

Patateste (*Solanum tuberosum*) yapılan çalışmalarda ise mikrosporlardan embriyogenesis oluşturma kabiliyetinin, aktarılabilen bir özellik olduğu ve bu özelliğin birden fazla gen ile birlikte kontrol edildiği ve bu genlerin ise resesif bir karakterde olduğu tespit edilmiştir (Chupeau vd 1998, Rudolf vd 1999, Smykal 2000).

2.4.1.2. Polen gelişim aşaması

Anter kültüründe mikrosporların, kültür koşulları veya yapılan uygulamaların etkisiyle birlikte normal ve sağlıklı bir çiçek tozu oluşumuyla sonuçlanan gametofitik doğrultudaki gelişme yerine, haploid embriyo oluşumuyla sonuçlanan sporofitik yöndeki gelişmeye doğru yönlendirilebilmesi için mutlaka buna uygun gelişme döneminin tespit edilmesi gerekir. Bu dönem, tek çekirdekli (uninucleate) mikrospor gelişme dönemi veya birinci polen mitozundan hemen önceki dönemdir (Bajaj 1983).

Polen gelişim dönemleri üzerine yapılan başka bir araştırmada ise, polen ana hücresinden olgun polenin oluşumuna kadar geçen bütün aşamaları kapsayan polen mikrosporogenesisi başlıca 3 ana evrede özetlenmiştir. Bunlar:

1. Mayoz bölünme ve tetratların oluşması
2. Tetratların ayrılması ve mikrosporların gelişmesi
3. Mikrosporların polen taneleri halinde olgunlaşmasıdır.

Birinci ve ikinci devrede polenlerin tek hücreli durumda olduğu, ikinci evrenin sonu ile üçüncü evrenin başında birinci hücre bölünmesinin meydana geldiği ve üçüncü evrenin ise çok hücreli gametofitler veya polen tanelerinin olduğu bildirmiştir (Ercan 2002).

Anter kültüründe başarıyı etkileyen hayati faktörlerden biri olan mikrosporların gelişim dönemlerindeki küçük değişiklikler, anter kültüründe başarıda büyük değişimler meydana getirmektedir. Bu alanda tütünde yapılan bir çalışmada, tütün taç yapraklarında meydana gelen 2 mm'lik değişimin anter kültürü yoluyla elde edilen bitkicik oranını 4 kat arttırdığı tespit edilmiştir (Dunwell ve Sunderland 1975).

Uygun polen gelişim dönemi türden türe değişmektedir. Tütünde en uygun zaman ilk polen mitozu geçirdiği dönem iken, tahıllarda ise çok daha erken tek çekirdekli dönemlerde başarı sağlanmakta ve birçok türde ise tek çekirdekli dönemlerde daha başarılı sonuçlar alınmaktadır. Uygun polen gelişim aşamalarının tespitinin yapılması için sitolojik araştırmalar yapılması gerekmektedir. Sitolojik araştırmaların yerine her ne kadar daha az güvenilir olsa da taç yaprağın boyutu gibi belli morfolojik özelliklerde polen gelişim dönemi hakkında bilgi vermektedir (Dunwell 2010).

Yapılan araştırmalarda bazı türlerde polenlerin asimetrik geliştiği yani bazı polenlerin erken olgunlaşırken bazı polenlerin ise henüz olgunlaşmadığı ve bununda olgunlaşan polenlerin salgıladıkları bazı maddelerden ötürü olgunlaşmayan polenler üzerinde toksik (zehirli) etki yarattığı tespit edilmiştir (Bhojwani ve Razdan 1996).

2.4.1.3. Donör bitkinin fizyolojik durumu ve yetişme şartları

Donör bitkinin fiziksel durumu, oluşan polen sayısını doğrudan etkilediği ve iyi yetişen bir bitkide oluşan polen sayısının daha fazla olması veya bitkinin içsel hormonal seviyesinin değişmesi, besin durumunun değişmesi gibi faktörlerin hepsi anter kültüründe başarıyı etkileyen sebepler arasında yer almaktadır (Sunderland ve Dunwell 1977, Heberle-Bors 1982).

Ellialtıoğlu vd (2002) donör bitkinin genotipi son derece uygun dahi olsa, mikrosporlardan *in vitro* koşullarda polen embriyogenesisini başlatabilmek bu bitkinin yetiştiği koşullara bağlı olduğunu söylemiş, ayrıca bitkilerin yetiştirildiği dönemdeki sıcaklık, ışık yoğunluğu ve günlük ışıklanma süresi, havadaki CO_2 konsantrasyonu, bitkinin beslenme koşulları başta olmak üzere tüm çevresel faktörler, o bitkilerden

alınan anterlerden, dolayısıyla da anter kültüründen elde edilecek başarı üzerinde etkili olabileceğini bildirmiştir.

Birçok genotipte anter kültürünün sezona bağlı olduğu gözlemlenmiştir. Vasil (1980), tarla koşullarında yetişen bitkilerden alınan anterlerin, sera koşullarında yetişen bitkilerden alınan anterlere oranla başarının daha fazla olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca yapılan araştırmalarda yetiştirilen donör bitkilerden alınan ilk çiçeklerin anter kültüründe başarı şansını arttırdığı ve bu çiçeklerin anter kültürüne daha duyarlı olduğu bildirilmiştir (Sunderland 1971).

Dunwell (1981) ilk defa tütünde anter kültürü öncesi donör bitkinin yetişme koşullarını incelemiş, fotoperiyot ve ışık şiddetinin oluşan mikrospor embriyo sayısı ve elde edilen bitkicik sayısını etkilediğini tespit etmiştir. Haberle Bors ve Reinert (1981), bitkinin yetişme koşulları sırasında maruz kaldığı şartlar, kısa gün koşulları ve düşük sıcaklık gibi bitkinin büyümesi sırasında arzu edilmeyen koşulların donör bitkideki polen sayısını arttırdığını ortaya koymuşlardır.

Donör bitkilerin yetişme dönemlerinde karşılaştıkları sıcakların, androgenesise olan tepkilerinin incelendiği çalışmalarda; Arpa (Foroughi-Wehr ve Mix 1976), Kolza (Keller ve Stringham 1978, Dunwell vd 1985),Turp (Keller vd 1983) ve Buğdayda (Lazar vd 1984) yetişen bitkilerin sıcaklıkla birlikte androgenesise olan tepkilerinde dikkate değer farklılıklar olduğu fakat hangi sıcaklık şartlarının optimum olduğu konusunda bir genelleme yapılamamakla birlikte uygun sıcaklık şartlarının bitkiden bitkiye değiştiği gözlemlenmiştir.

Tütünde yapılan 2 farklı çalışmada bitkinin azot durumunun mikrospor embriyo verimini çok büyük oranda etkilediği tespit edilmiştir. Bu çalışmaların ilkinde "azot açlığı" çeken bitkilerin gübrelenen bitkilere oranla daha iyi sonuçlar verdiği raporlanmıştır. İkinci çalışmada ise 5 farklı azot oranının gelişimi incelenmiş, yapılan karşılaştırmalarda ise 15 mM azot içeren kültür ortamında en iyi sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Sunderland 1978, Tsay 1981, 1982).

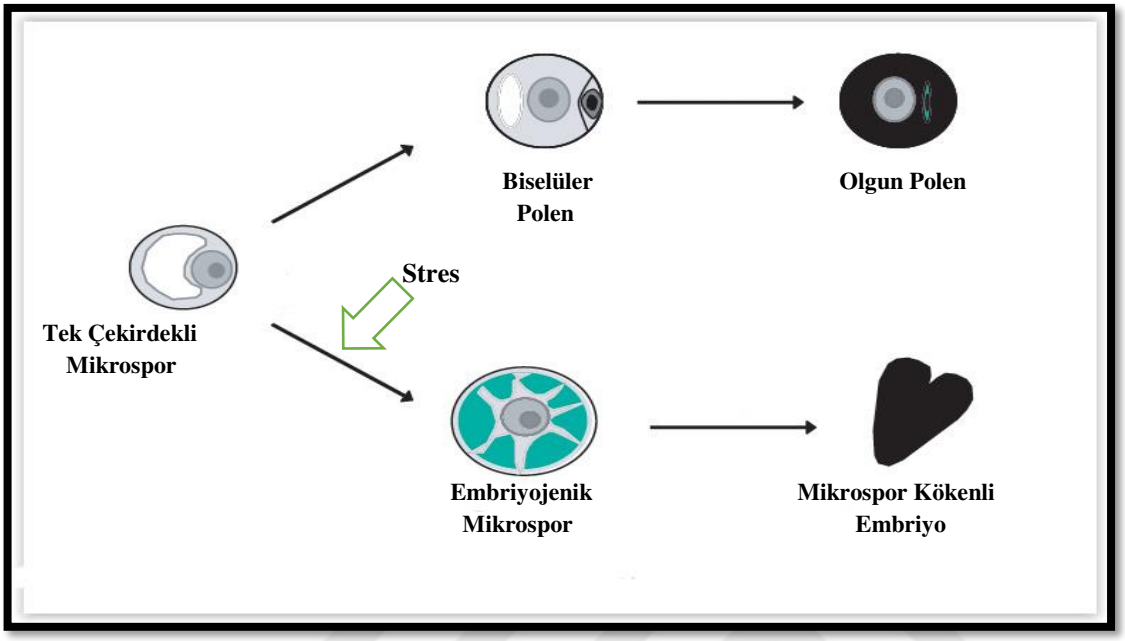
Hatipoğlu (1999), donör bitkilerden anter alma dönemine gelmeden 4-5 hafta önce bitkilerde herhangi bir pestisit uygulamasından kaçınılması gerektiğini bildirmiştir.

2.4.1.4. Tomurcuk veya anterlere yapılan ön uygulamalar

Birçok bitkide çiçeklenen tomurcuklara veya anterlere, kültüre alınmadan önce yapılan ön uygulamalar, anterlerin normal gelişimini devam ettirip olgun polen oluşturması (gametofitik) yerine, gelişimlerini sporofitik yöne kaydırmada tetikleyici rol oynamaktadır. Mikrosporların stres faktörleri ile birlikte gametofitik veya sporofitik gelişimi Şekil 2.3'de gösterilmiştir.

Olgunlaşmamış polen taneleri (mikrospor) normal şartlar altında gametleri oluşturmak için programlanmışlardır fakat belli uyartılar sonucunda *in vitro* koşullar

altında farklı bir ayrıma girerek embriyo yapılarını oluştururlar (Wang vd 2000). Androgenesis totipotensinin çarpıcı bir örneğidir. Tek çekirdekli veya erken çift çekirdekli evredeki mikrosporların gelişimlerinin yönü değiştirilerek, bu yapılardan tam bir bitki oluşumu sağlanmaktadır (Goralski vd 2005).



Şekil 2.3. Mikrosporların gametofitik ve sporofitik gelişimleri (Shariatpanahi vd 2006)

Uygulanan uyartıların ve stres faktörlerinin temel amacı; mikrospor gelişimini yavaşlatmak, normal gelişimini engellemek ve gelişimi farklı yönlere kaydırmaktır. Bu uyarım sağlandıktan sonra bunu takiben farklılaşma meydana gelmekte ve gamet oluşumu yerine embriyo oluşmaktadır (Matthys-Rochon 2005). Yapılan çalışmalarda +4°C soğuk şoku uygulamanın mikrosporların gelişimini generatif yönden vejetatif yöne doğru kaydırdığını göstermiştir. Bu tarz stres faktörleri genelde monokotiledon bitkilerde yani arpa, mısır ve çavdar gibi bitkilerde androgenesisi uyarmak için kullanılmaktadır (Dorota Krzyzarowska vd 2008).

Soğuk şokları, yüksek sıcaklık, yüksek nem, su stresi, havasızlık, santrifüjleme, şeker ve azot açlığı, etanol, gama ışıması, elektrostimulasyon, yüksek pH, ağır metal uygulaması anter kültüründe kullanılan en yaygın ön uygulamalar arasındadır. Bu uygulamalar arasında en yaygın kullanılan ve en etkili olan uygulamalar ise sıcaklık şokları olarak bilinmektedir (Germana 2010). Çizelge 2.2'de ise bazı bitkilerde androgenesisi teşvik eden stres ve ön uygulamalar detaylandırılmıştır.

Wenzel vd (1983) yaptığı araştırmalarda arpa gibi tahıllarda başakları 28 gün boyunca 4°C de tutmanın mikrosporlardan oluşan kallus miktarında büyük artış sağladığını tespit etmiştir. Patateste (*Solanum tuberosum*) yapılan araştırmalarda ise 6 °C'de 2 gün ön

uygulama önerilmektedir. Optimum sıcaklık ve uygulama süresi türden türe değişmekle birlikte aynı zamanda kullanılacak eksplant (tüm çiçek, sadece tomurcuklara veya izole edilmiş anterlere) kaynağına göre de uygulama süreleri değişmektedir (Dunwell 1981).

Çizelge 2.2. Bazı bitkilerde androgenesisi arttıran çeşitli stres faktörü / ön uygulamalar (Islam ve Tuteja 2012).

Bitki	Stres Faktörü /Ön Uygulamalar	Mikrospor Gelişim Aşaması
Elma	Soğuk uygulama ve açlık	Geç tek çekirdekli dönem
Arpa	Soğuk uygulama ve açlık Soğuk uygulama Ethanol Mannitol ABA	Erken-orta tek çekirdekli dönem Orta-Geç tek çekirdekli dönem Geç tek-erken 2 çekirdekli dönem Geç tek, erken 2 çekirdekli dönem Erken çift çekirdekli dönem
Yabani hardal	Soğuk Uygulama Sıcak Uygulama Kolhisin Uygulaması Gama Işıması Ethanol	Orta-Geç tek çekirdekli dönem Geç tek çekirdekli dönem Geç tek çekirdekli dönem Orta-Geç tek çekirdekli dönem Geç tek, erken 2 çekirdekli dönem
Brokoli	Sıcak Uygulama	Geç tek, erken 2 çekirdekli dönem
Mısır	Soğuk Uygulama Soğuk ve Sıcak Kolhisin 2.4-D (25-40 mg/l) 2-HNA (İnducer Kimyasal)	Orta tek çekirdekli dönem Orta-Geç tek çekirdekli dönem Orta tek çekirdekli dönem Orta tek çekirdekli dönem Geç tek, erken 2 çekirdekli dönem
Buğday	**a-)Ekmeklik Buğday** Soğuk uygulama Soğuk ve açlık Sıcak ve Açlık Kuraklık Açlık Kolhisin Ethrel 2-HNA ve sıcaklık **b-) Makarnalık Buğday** Soğuk Soğuk ve Ozmatik Stres **c-)Tritikale** Soğuk ABA	Erken-orta tek çekirdekli dönem Orta-Geç tek çekirdekli dönem Geç tek çekirdekli-Mitoz öncesi Erken-orta tek çekirdekli dönem Orta-Geç tek çekirdekli dönem Orta-Geç tek çekirdekli dönem Geç tek, erken 2 çekirdekli dönem Orta-Geç tek çekirdekli dönem Orta tek çekirdekli dönem Orta tek-erken çift çekirdekli dönem Orta tek çekirdekli Erken çift çekirdekli dönem
Tütün	Soğuk Uygulama Sıcak ve Açlık Ph Şeker Açlığı Ağır Metal Stresi/$LiNO_3$ ABA, Düşük Atmosferik Basınç Gama Işıması	Geç tek, erken 2 çekirdekli dönem Geç tek çekirdekli dönem Geç tek çekirdekli dönem Geç tek çekirdekli dönem Erken çift çekirdekli dönem Erken çift çekirdekli dönem Orta-Geç tek çekirdekli dönem
Çeltik	Soğuk Sıcak Şeker Açlığı Gama Işıması	Orta tek-erken çift çekirdekli dönem Geç tek çekirdekli dönem Geç tek çekirdekli dönem Orta-Geç tek çekirdekli dönem

Soğuk uygulama sadece mikrosporların gametofitik gelişimini durdurmak için değil, aynı zamanda tüm mikrosporların aynı gelişim aşamasında kalmasını da sağlamaktadır (Hu ve Kasha 1999). Mikrosporların/hücrelerin yaşlanmasını ve bozulmasını önlediği bunlara ek olarak hücrelerin çürümesini sağlayan veya zehirlenmelerine yol açan kimyasallara karşıda koruduğu da bilinmektedir (Duncan ve Heberle 1976).

Brassica türlerinde yapılan çalışmalarda normal kültür koşullarına (25°C) alınmadan önce kısa süreli olarak uygulanan yüksek sıcaklıkların (30-35 °C) gelişim yönünü değiştirdiği tespit edilmiştir. Ayrıca uygulanan azot ve şeker gibi besin açlıkları tütünde polen embryogenesisini başlatmak için uygulanan rutin stress faktörleri arasındadır (Kyo ve Harada 1986).

2.5. Anter Kültürü ile İlgili Kaynak Taramaları

Stevia rebaudiana Bertoni (Şeker otu) bitkisinde androgenesisle ilgili yapılan tek bir çalışma olduğundan, önce bu çalışma ardından ise bağlı olduğu Astereceae familyasındaki bitkiler ve diğer yararlanılabilecek çalışmalar incelenmiştir.

Flachsland vd (1996) sıvı MS ortamında 0.1 mg/L ve 1 mg/L BAP içeren horman konsantrasyonlarında tek çekirdekli olduğunu düşündükleri *Stevia rebaudiana* Bertoni anterlerini kültüre almışlardır. Kallus aracılıgıyla oluşan sürgün yapılarını 0.1 mg.L(-1) NAA içeren katı MS ortamına alıp sürgünlerinin gelişmesini sağlamışlardır. Gelişen bitkicikler saksılara şaşırtılmış ve yapılan sitolojik incelemelerden sonra gelişen bitkiciklerin kromozom sayıları normal sayıda yani 2n=22 diploid olduğunu belirtmişlerdir.

Zhong vd (1995)'de ayçiçeğinde (*Helianthus annuus*) yaptıkları çalışmada; MS temel besin ortamında petri kaplarına yerleştirdikleri anterlerden 12 gün sonra kallus ve embriyo elde etmişler. Ortama ekledikleri 0.1% polyvinylpyrrolidone (PVP) ortamın ve anterlerin kahverengileşmesini geciktirdiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca sukrozun %10 dan %6 veya %3 düşürmenin ise embriyo oluşumunu artırdığını tespit etmişler ve daha sonra yaptıkları kromozom sayımlarında elde edilen bitkilerin diploid olduğunu ve bunların ise anter duvarlarından veya anterleri keserken kalan somatik hücrelerden kaynaklandığını rapor etmişlerdir.

Çeltikte inatçı genotipler üzerinde yapılan bir çalışmada karbon kaynağı olan sukroz, maltoz ile değiştirildiğinde ve ortama gümüş nitrat ($AgNO_3$) eklendiğinde elde edilen kallus oranının %6.3'den %20.6'ya kadar yükseldiği gözlemlenmiştir. Elde edilen kalluslardan bitkicik oluşumuna kadar geçen sürede ise karbon kaynağının değiştirilmesi ve gümüş nitrat eklenmesinin bitkicik oluşumuna herhangi bir etkisi olmadığı anlaşılmıştır (Lentini vd 1995).

Lezin vd (1996) beş farklı arpa (*Hordeum vulgare* L.) genotipin ve soğuk uygulanıp uygulanmamasının androgenesis üzerine etkilerini test etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada 4 tane diploid hat ve 1 tane kolhisin ile katlama yaptıkları tetraploid arpa kullanmışlardır. Yapılan çalışma tesadüf blokları deneme deseninde 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Donör bitkileri ise kontrollü şartlarda, sera ortamında yetiştirmişlerdir. Her genotipten 1400 anter üzerinde yapılan çalışmada soğuk uygulamanın anterlerin androgenik kapasitesi üzerinde olumlu etki yaptığını tespit etmişlerdir. Ayrıca kolhisin ile katlama yaptıkları tetraploid hat ile başarı elde edememişler, diploid hat ise tetraploid hata göre daha başarılı bulunmuştur. 4°C'de 14 gün boyunca bekletilen anterlerden önemli oranda embrioid artışı meydana gelmiş, ayrıca aynı sürede uygulanan soğuk uygulamasının, yeşil bitkiciklerin meydana gelme oranında da artış meydana getirdiğini tespit etmişlerdir.

Saji ve Sujatha (1998) ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) kallus elde etmeye ve kalluslardan embryogenesisi teşvik için protokol geliştirmeye çalışmışlardır. Yaptıkları çalışmalarda; besi ortamı olarak Murashige&Skoog (MS) ve 2.0 mg/l NAA, 1.0 mg/l BA kullanmışlardır. Agar konsantrasyonu, sukroz konsantrasyonu ve karbonhidrat kaynaklarını değiştirmişler ve bu değişimlerin kallus oluşumuna önemli derecede etki etiğini tespit etmişlerdir. Bunun yanında ise aydınlık veya karanlık uygulamalarının, kapitulumlara 1-6 gün arasında değişen soğuk uygulanmasının ve genotopin kallus oluşturmada etkili olmadığını gözlemlemişlerdir. Tüm bu faktörlerin kalluslardan gelişen embryogenesise etkili olduğu anlaşılmıştır. Elde edilen kalluslar, kallus gelişim ortamı olan 0.1 mg/l NAA ve 0.5 mg/l BA içeren MS ortamına aktarılmıştır. Kültüre alınan anterlerden %100 oranında kallus elde edilebilirken bunlardan ancak %44'ünde embryogenesis teşvik edilebilmiştir, embryogenesis teşvik edilen kalluslardan ise %14,3'ünde bitkicik elde etmeyi başarmışlardır.

Šafářová vd (2005) *Silene latifolia* ssp. Alba, kısa süreli sıcaklık şoklarının ve farklı ortam kombinasyonlarının androgenesis üzerine etkilerini araştırmışlardır. Sıcaklık şokları (33 ve 37 °C) 1, 3 ve 5 günlük sürelerde uygulanmıştır. Uygulamalar arasında en iyi androgenik tepki 25°C ve daha sonrasında ise 1 günlük 33°C uygulamasında gözlemlenmiş ve diğer sıcaklık uygulamalarının ise anterlerin androgenik tepkisini düşürdüğü gözlemlemişlerdir. Farklı ortam testlerinde ise en etkili sonucu 6-benzilaminopürin (0.5 mg) içeren BMS ve sukroz kullanılan ortamdan almışlardır.

Shahvali-Kohshour vd (2013) çilekte beş farklı genotip üzerinde; soğuk uygulamanın, gümüş nitratın ve farklı demir kaynaklarının androgenesis üzerine etkilerini araştırmışlardır. Üç farklı bağımsız uygulama üzerinden yürütülen araştırmada androgenik anter, embryogenesis ve kallus oluşumuna etkileri gözlemlenmiştir. İlk kurulan denemede, 4°C soğuk uygulamasının, 2 ve 3 gün süre ile uygulanması üç farklı genotipteki anterlerden yüksek oranda androgenik anter oluşturduğu tespit edilmiştir. İkinci denemede Fe-EDDHA'nın Fe-EDTA'dan daha etkili olduğunu ve yapılan

uygulamalarda Fe-EDTA demir kaynağı olarak kullanılmasının androgenik anter oluşumunu ve embryogenesisi teşvik ettiği anlaşılmıştır. Üçüncü denemede ise 15 mg/l gümüş nitratın ortama eklenmesinin sonuçları gözlemlenmiş; gümüş nitrat ilavesinin sadece bir genotipte önemli oranda androgenik anter oluşumunu ve embryogenesisi teşvik ettiğini tespit etmişlerdir.

Khandakar vd (2014)'de üç farklı krizantemde (*Dendranthema grandiflorum*) yaptıkları çalışmada; MS ve 1 mg/l 2,4-D, 2 mg/l BA, 250 mg/l kazein hidrolizat katılaştırıcı olarak ise 2.75 g/l gelrite içeren ortamlarda üç farklı çeşitte kallus elde etmişlerdir. Ön uygulama olarak ise kültür ortamına yerleştirdikleri anterleri 48 saat 4°C'de bekletmişlerdir. Daha sonra ise gelişen kallusları, kallus gelişim ortamı olarak MS ve 2 mg/l BA, 0.1 mg/l NAA, 30 g/l sukroz ve katılaştırıcı olarak ise 2.75 g/l gelrite kullanılan ortama transfer etmişlerdir. Kalluslardan sürgün gelişimi ise çeşitlere göre farklılık göstermiştir. Bu çeşitlerden elde edilen 50 bitkicik ise yeterli gelişim sağlandıktan sonra dış ortama alınmış ve gelişen çeşitlerden rasgele bitkiler seçilerek kromozom sayımları yapılmış ve sadece bir çeşitte gelişen bitkiciklerin haploid olduğu rapor edilmiştir.

Soğuk uygulamasıyla ilgili havuçta (*Daucus carota* L.) Kiszczak vd (2015) yürüttüğü bir çalışmada ise; havuç anterlerine uygulanan 9, 12, 21 günlük farklı sürelerdeki 4°C soğuk uygulamasının ardından, anterler kültüre alınmıştır. Yapılan soğuk uygulamalarından ise en başarılı olanı 24.3 emb./100 anter oranı ile 12 günlük soğuk uygulamasının olduğu tespit edilmiştir.

3. MATERYAL ve METOT

Araştırma 2014-2015 yıllarında, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'ne ait arazi ve Tarla Bitkileri Bölümü Laboratuvarları ile birlikte Bahçe Bitkileri Bölümü'ne ait laboratuvarlarda yürütülmüştür. Birimde; arazide kullanılacak tüm ekipmanlar (çapa, tırmık, bağ makası vb.) ve laboratuvarda kullanılacak cihazlar (distile su cihazı, buzdolabı, iklimlendirme kabini, etüv, steril kabin, ışık mikroskobu vb.) bulunmaktadır.

3.1. Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak; Paraguay kökenli, çok yıllık ve kışı toprak altı rizomlarında geçirebilen, baharın gelmesiyle birlikte ise tekrardan toprak altı rizomlarından gelişen, şeker otu olarak da bilinen *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi kullanılmıştır (Şekil 3.1).

Şekil 3.1. (a) Arazide çiçeklenme başlangıcındaki *Stevia rebaudiana* Bertoni görünümü (b) Kışı toprak altı rizomlarında geçiren şeker otu bitkisinin yeni dönemde tekrar sürmesi

S. rebaudiana Bertoni'ye ait fideler 2014 Nisan ayı içerisinde deneme parsellerine dikilerek rutin bakım işlemleri yapılmış ve damla sulama sistemiyle gerektiğinde sulama işlemi gerçekleştirilmiştir. Fidelerin temini ve damlama sulama sisteminin kurulması, Antalya'nın önemli fide firmalarından olan Grow Fide A.Ş.

tarafından yapılmıştır. Bitkiler stresten uzak herhangi bir hastalık ve zararlı olmadan sağlıklı koşullarda arazi şartlarında büyütülmüştür.

Şekil 3.2. Akdeniz Üniversitesi deneme parsellerinde *S. rebaudiana* Bertoni bitkisinin görünümü

Şeker otu bitkisinin çiçeklenmesi Akdeniz ikliminde Eylül ayı içerisinde yaklaşık bir ay kadar sürmekte ve bu sürede uygun safhada çiçek tomurcukları bulunabilmektedir. Bu tarihlerde uygun anterleri içerdiği düşünülen sağlıklı bitkilerden, tomurcuklar sabah saatlerinde cam kavanozlara toplanmış, daha sonra ise buzlu saklama kaplarında laboratuvara gelene kadar muhafaza edilmiştir. Şeker otu bitkisinin tomurcuklarının genel görünümü Şekil 3.3'te görülmektedir.

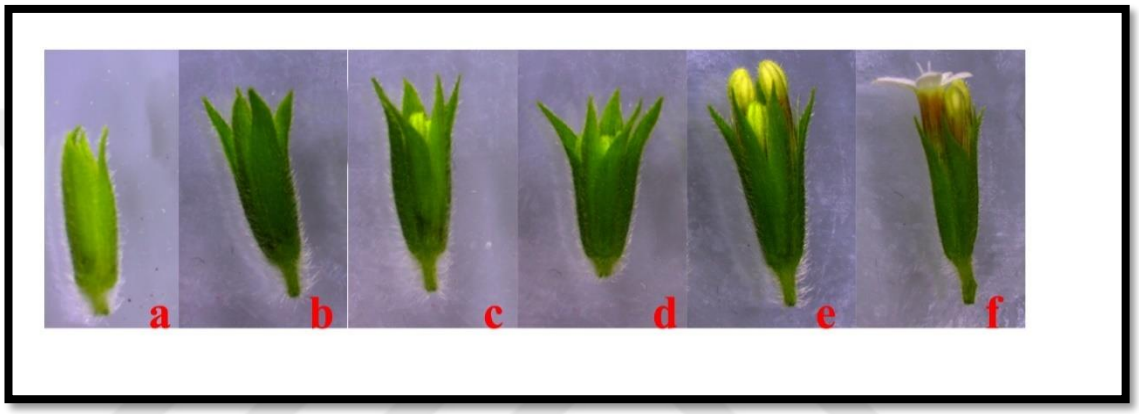
Şekil 3.3. Stevia bitkisinin tomurcuklarının genel görünümü

3.2. Metot

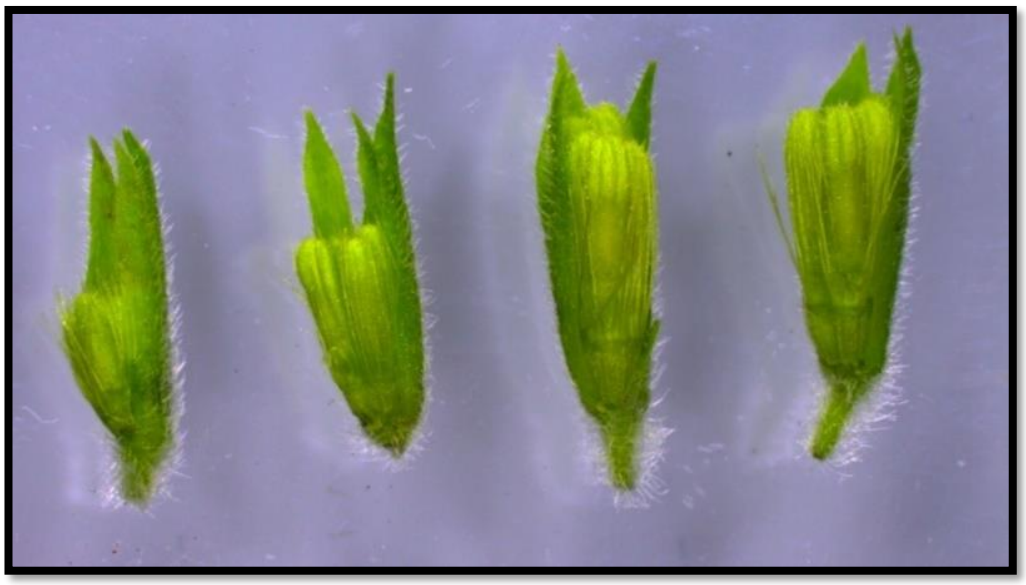
3.2.1. Sitolojik çalışmalar

3.2.1.1. Çiçek tomurcuklarının sınıflandırılması ve uygun tomurcuk zamanının belirlenmesi

Anter kültürü çalışmalarında uygun tomurcuk safhasını belirlemek için tomurcuk şekli ve büyüklüğü ile mikrosporların gelişme safhası arasında bir ilişki kurulmaya çalışılmıştır (Şekil 3.4). Stevia bitkisinde çiçeklenme bir ay gibi uzun sayılabilecek bir sürede gerçekleşmekte, bir bitkide farklı dönemlere ait birçok çiçek bulunabilmektedir.

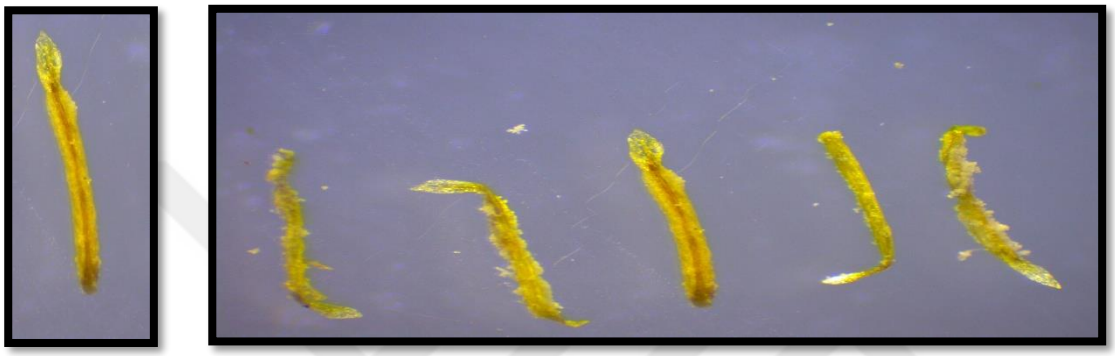


Şekil 3.4. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin farklı safhadaki çiçek tomurcuklarının sınıflandırılması; a ve b erken dönemdeki çiçek tomurcukları c ve d uygun safhadaki tomurcuklar e ve f ise geç dönemdeki çiçek tomurcukları.



Şekil 3.5. Farklı dönemlerdeki çiçek tomurcuklarının gelişimi.

Şekil 3.6. Uygun safhadaki tomurcukların görünümü (c safhasındaki 5 adet çiçekçik)



Şekil 3.7. Anterlerin mikroskop altında görünümü

Tek çekirdekli mikrospor dönemini belirlemek amacıyla Asetokarmin, Lakto-Proponik-Orsein ve Ethidium Bromide ile boyama yöntemleri kullanılmıştır.

Asetokarmin ile Boyama: Tek çekirdekli mikrospor safhasını tespit etmek amacıyla kullanılan yöntemler arasında en pratik yöntem olarak bilinen bu yöntemde, farklı büyüklükteki canlı tomurcuklardan alınan anterler lam üzerine yerleştirilmiş ve bisturi ucu yardımıyla anterlerin içerisindeki mikrosporlar serbest hale getirilmiştir. Üzerine 1-2 damla asetokarmin damlatıldıktan sonra üstü lamelle kapatılan ezme preparatlar ışık mikroskobunda incelenmiştir.

Asetokarmin Hazırlanışı: 55 ml saf su içerisine 45 ml glasiyel asetik asit ilave edilerek kaynatılmış ve sonra bu karışıma 1 g karmin eklenerek filtre edilmiştir.

Lakto-Propionik-Orsein ile Boyama: Günün erken saatlerinde araziden toplanan tomurcuklardan, uygun safhada olduklarını düşündüğümüz tomurcukların anterleri mikroskop yardımıyla lam üzerine çıkartılmıştır. Anterlerin mikrosporları bisturi ucuyla serbest hale getirildikten sonra üzerine 1-2 damla lakto-propionik orsein damlatılmıştır. Üstü lamelle kapatılan ezme preparatlar daha sonra ışık mikroskobunda incelenmiştir.

Lakto-Propionik-Orsein Hazırlanışı: Eşit orandaki laktik asit ve propionik asitten oluşan 100 ml lik karışıma 2 g orsein eklenerek filtre edilmiş, daha sonra çözelti %45'lik olacak şekilde sulandırılmıştır.

Ethidium Bromid ile Boyama: Bu çalışmada ise Ethidium Bromid (EtBr)'in saf suyla hazırlandığı %0.1'lik stok solüsyonu kullanılmıştır. Bu solüsyon 0, 10 ve 50 kez sulandırılmıştır. Ayrıca her 50 ml'lik EtBr çözeltisine 2 damla %0.1'lik Triton-100 solüsyonundan ilave edilerek karıştırılmıştır. Farklı büyüklükteki canlı tomurcuklardan alınan anterler lamlar üzerine yerleştirilip mikrosporları serbest hale getirildikten sonra üzerlerine 1-2 damla yukarıda bahsedilen EtBr çözeltilerinden damlatılmıştır. Lamelleri kapatılan ezme preparatlara daha sonra floresan mikroskobunda gözlem yapılmıştır.

Yürütülen sitolojik çalışmalar sonucunda asetokarmin ve lacto-propionik-orsein boyamasının stevia anterleri için uygun olmadığı anlaşılmış ve EtBr boyamasından olumlu sonuçlar alınmış ve tek çekirdekli dönemin tespiti yapılmıştır.

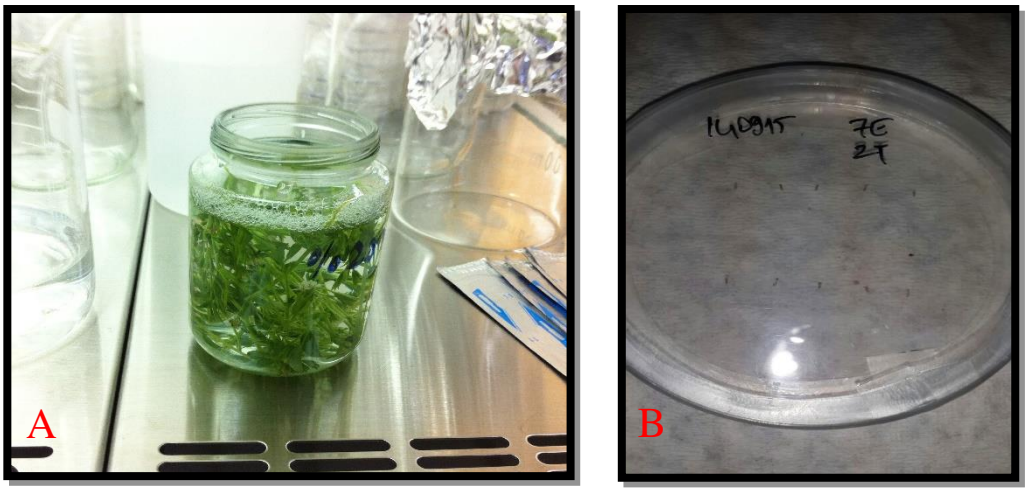
Stevia bitkisinin tomurcuk şekillerinden de anlaşılacağı üzere, stevia bitkisinde anter kültürü çalışmalarının en zor aşaması anterlerin tomurcuklardan kesilerek alınma aşamasıdır. Çünkü bir tomurcuk içerisinde ortalama 4-5 adet çiçekçik bulunmakta olup, her bir çiçekçikte de 5 adet anter bulunmaktadır. Söz konusu anterler çok küçük olup, çıplak gözle çalışılması mümkün değildir. Bu nedenle, anterlerin alınması işlemi sterio mikroskop altında gerçekleştirilmiştir. Anterler çok hassas yapıda olduğundan dolayı çalışmalar büyük bir titizlikle yürütülmüş ve anterlerin kültüre alınması sırasında zedelenmemesi ve zarar görmemesine büyük bir özen gösterilmiştir.

3.2.2. Tomurcukların yüzey sterilizasyonu

Uygun safhada yani tek çekirdekli mikrosporlara sahip anterleri içeren tomurcuklar, önce saf suda çalkalanmış ve yüzeylerindeki toz, kum ve toprak gibi partiküllerin saf su aracılığı ile yıkanarak, tomurcukların ön sterilizasyonu yapılmıştır. Ön yıkaması yapılan tomurcuklar %70' lik etil alkolde 1 dakika, sonra %20' lik sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween-20 içeren çözeltide 10 dakika bekletilerek yüzey sterilizasyonu tamamlanmıştır.

3.2.3. Anterlerin kültüre alınması

Stevia rebaudiana Bertoni bitkisinin sabah saatlerinde araziden toplanan tomurcukları, ilk önce saf su içinde bekletilerek tomurcuk ön temizliği yapılmıştır. Daha sonraki işlemler ise steril kabin içerisinde yürütülmüştür. Tomurcuklar %70'lik Etil alkol ile bir dakika sterilize edilmiş daha sonra ise en az 3 defa saf su ile durulanan tomurcuklar %20'lik sodyum hipoklorit ve 1-2 damla tween-20 içeren çözeltide 10 dk bekletilerek tekrar durulama işlemine tabi tutulmuş ve sterilizasyon işlemi sonlandırılmıştır (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 (a) Sterilizasyon aşamasındaki tomurcuklar (b) Petri kutusunda anterlerin görünümü

Şekil 3.9. Panasonic MLR-352-PE'markalı iklimlendirme kabini

Sterilizasyonu tamamlanan tomurcuklardan anterler, steril kabin içerisine yerleştirilen sterio mikroskop ile çok ince uçlu pens ve bisturi yardımıyla tomurcuklardan kesilerek alınmıştır. Dikkatli bir şekilde kesilen anterler, 10 anter/petri (90 mm) olacak şekilde yerleştirilmiştir. Parafilm aracılığıyla kapatılan petri kapları kültürün ilk haftasında karanlıkta bekletileceğinden dolayı toplu olarak alüminyum folyoya sarılmış ve bir hafta 4°C de bekletilmiştir. Daha sonra kültürler; 25°C sıcaklık, 4000 lux ışık şiddeti ve 16 / 8 sa fotoperiyot koşullarındaki büyüme odasında inkübe edilmişlerdir.

3.2.4. Anterlere yapılan ön uygulamalar

İki yıl boyunca yürütülen çalışmanın ilk yılında anterler doğrudan kültüre alınmış ve deneme 3 tekerrürlü olarak kurulmuştur.

İkinci yıl çalışmalarında ise aşağıda belirtilen 3 ön uygulama yapılmış ve deneme 4 tekerrürlü olarak dizayn edilmiştir.

İkinci Yıl Denemesindeki Ön Uygulamalar;

1. Normal kültür koşullarında 1 Hafta karanlık + Normal Kültür Koşulları*
2. 4°C 2 gün soğuk uygulama**+ 5 gün karanlık + Normal Kültür Koşulları*
3. 35 °C 2 gün sıcak uygulama** + 5 gün karanlık + Normal Kültür Koşulları*

* Normal kültür koşulları: 25°C sıcaklık, 4000 lux ışık şiddeti ve 16 / 8 sa fotoperiyot

** Soğuk uygulamaları buzdolabında-sıcak uygulaması ise etüvde yapılmıştır.

Yapılan tüm uygulamalarda kültürlerin hepsi ilk hafta karanlıkta tutulmuş, sonrasında alüminyum folyo ile ışık alması engellenen kültürler, ikinci hafta açılarak normal kültür koşullarında gelişimleri takip edilmiştir.

3.2.5. Kullanılan besin ortamı

Stevia bitkisinde yapılmış bir anter kültürü çalışması olmadığı için *Asteraceae* familyasına ait bitkilerdeki çalışmalar incelenmiştir. Anter kültürü çalışmalarında (özel istekli bitkiler dışında; orkide vb.) genel izlenen yolda ilk önce MS temel besi ortamı tercih edilmekte, sonuç alınamaması durumda ise şartlara göre diğer besin ortamlarına başvurulmaktadır. *Asteraceae* familyasına ait bitkilerde özellikle ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) yapılan androgenesis çalışmalarında da en başarılı sonuçlar MS temel besin ortamından alınmıştır (Saji ve Sujatha 1998). Bu amaçla çalışmada MS (Duchefa-Murashıge ve Skoog Medium) temel besi ortamı tercih edilmiş (Çizelge 3.2.5.1) ve farklı hormon konsantrasyonları denenmiştir. İlk yıl denemelerinde katılaştırıcı olarak %0.8 agar (Duchefa-Phyto Agar P1003) kullanılırken ikinci yıl denemelerinde anterlerin küçük olması ve besi ortamından daha fazla yararlanması için katılaştırıcı olarak % 0.4 gelrite (Duchefa- GELRITE G1101) kullanılmıştır.

Kültüre alınan bitki, doku, organ ve her türlü hücresinden etilen salgılanmakta ve stress koşulları arttığında salgılama miktarı da değişebilmektedir (Garcia ve Einset 1982). Gümüş iyonlarının bitkilerde etilen mekanizmasını kontrol ettiği bilinmektedir fakat aynı zamanda bakır alımını da engelleyebilmektedir (Beyer 1976a,b). Bu amaçla ortama salgılanan etilen miktarının kontrol edilmesi için ortamlarda gümüş iyon kaynağı olarak başlangıçta 5mg/l $AgNO_3$ kullanılmış ikinci yıl denemelerinde bu oran 2mg/l kadar düşürülmüştür.

Çizelge 3.1. MS temel besi ortamının içeriği

Mikro Elementler	**mg/l**	**µM**
$CoCl_2.6H_2O$	0.025	0.11
$CuSO_4.5H_2O$	0.025	0.10
FeNaEDTA	36.70	100.00
H_3BO_3	6.20	100.27
KI	0.83	5.00
$MnSO_4.H_2O$	16.90	100.00
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0.25	1.03
$ZnSO_4.7H_2O$	8.60	29.91
Makro Elementler	**mg/l**	**mM**
$CaCl_2$	332.02	2.99
KH_2PO_4	170.00	1.25
KNO_3	1900.00	18.79
$MgSO_4$	180.54	1.50
NH_4NO_3	1650.00	20.61

Ortamların tümünün pH'sı, 1N NaOH veya 1N HCl kullanılarak 5.7'e ayarlanmış, sterilizasyon işlemi ise 121°C'de 1 atmosfer basınca sahip otoklavda 20 dakika sürede gerçekleştirilmiştir.

3.2.6. Birinci yıl denemeleri

Denemenin birinci yılında bitkiler sera koşullarında yetiştirilmiştir. Kültüre alınan anterler ilk yıl denemelerinde 1 hafta karanlıkta tutulmuş daha sonra normal kültür koşulları olan 25°C sıcaklık, 4000 lux ışık şiddeti ve 16 / 8 sa fotoperiyot altında inkübe edilmiştir. İlk yıl denemelerine 1 kontrol+10 farklı hormon konsantrasyonları (Çizelge 3.2) olan ortamlarla başlanmıştır. Anterlerin canlılığına pozitif etkisi olduğu bilinen $AgNO_3$ ortamlara 5mg/l olarak ilave edilmiştir. Anterlerden hem doğrudan embriyo oluşumu hem de kallus yoluyla embriyo oluşumunun teşvik edilmesi amaçlanmıştır.

Çizelge 3.2. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde birinci yıl denemelerinde kullanılan ortam ve değişik hormon konsantrasyonları

Uygulama No	**Tekerrür**	**Ortam ve Hormon Konsantrasyonları**
1	3	MS0 (Kontrol)
2	3	MS 0.5 NAA+0.5 BAP
3	3	MS 1.0 NAA+0.5 BAP
4	3	MS 2.0 NAA+0.5 BAP
5	3	MS 4.0 NAA+0.5 BAP
6	3	MS 0.5 2,4-D+0.5 BAP
7	3	MS 1.0 2,4-D+0.5 BAP
8	3	MS 2.0 2,4-D+0.5 BAP
9	3	MS 0.5 NAA+0.5 KİNETİN
10	3	MS 1.0 NAA+0.5 KİNETİN
11	3	MS 2.0 NAA+0.5 KİNETİN

3.2.7. İkinci yıl denemeleri

İkinci yıl denemelerinde donör bitkiler tarla koşullarında gerekli bakım ve sulamaları yapılarak yetiştirilmiştir. İlk yılda kurulan denemenin sonuçlarına göre başarı sağlanamayan yüksek konsantrasyonlu hormon uygulamaları çıkarılmış ve daha önce denenmeyen 2,4-D ve kinetin kombinasyonları eklenmiştir. Ayrıca deneme planındaki tekerrür sayısı da 4'e çıkarılmıştır. İlk yıl denemelerinde ortama eklenen 5 mg/l $AgNO_3$ ikinci yıl denemelerinde 2 mg/l olacak şekilde optimize edilmiştir. Androgenesisi

başlatmak için yaygın olarak kullanılan sıcak ve soğuk şokları da uygulanarak anterlerden doğrudan veya dolaylı yollardan embriyogenesis teşvik edilmeye çalışılmıştır. Soğuk uygulaması 2 gün 4°C, sıcak uygulaması ise 2 gün 35°C olarak uygulanmıştır. Ön uygulamalar tomurcuklara değil doğrudan anterlere uygulanmıştır. Araziden sabah saatlerinde toplanan anterler Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Laboratuvarları'na getirilmiş ve vakit kaybetmeden sterilizasyonu yapılarak kültüre alınmıştır. Soğuk uygulamasına tabi olan anterler 2 gün boyunca buzdolabında +4°C'de alüminyum folyoya sarılı (ışık alması engellenerek) vaziyette bekletilmiş, sonrasında ise 5 gün boyunca normal kültür koşullarına sahip iklimlendirme kabininde bekletildikten sonra alüminyum folyo açılarak 25°C sıcaklık, 4000 lux ışık şiddeti ve 16 / 8 sa fotoperiyot altında inkübe edilmiştir.

Çizelge 3.3. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde ikinci yıl denemelerinde kullanılan ortam ve değişik hormon konsantrasyonları

Uygulama No	**Tekerrür**	**Ortam ve Hormon Konsantrasyonları**
1	4	MS0 (Kontrol)
2	4	MS 0.5 NAA+0.5 BAP
3	4	MS 1.0 NAA+0.5 BAP
4	4	MS 2.0 NAA+0.5 BAP
5	4	MS 0.5 NAA+0.5 KİNETİN
6	4	MS 1.0 NAA+0.5 KİNETİN
7	4	MS 2.0 NAA+0.5 KİNETİN
8	4	MS 0.5 2,4-D +0.5 BAP
9	4	MS 1.0 2,4-D +0.5 BAP
10	4	MS 2.0 2,4-D +0.5 BAP
11	4	MS 0.5 2,4-D+0.5 KİNETİN
12	4	MS 1.0 2,4-D+0.5 KİNETİN
13	4	MS 2.0 2,4-D+0.5 KİNETİN

Sıcak uygulamasında da benzer bir yol izlenmiştir. Sıcak uygulaması uygulanacak kültürler 35°C'de 2 gün boyunca alüminyum folyoya sarılı vaziyette (ışık alması engellenerek) etüvde tutulmuş daha sonra ise normal kültür koşullarına sahip iklimlendirme kabininde 5 gün bekletilmiştir. Alüminyum folyo açılarak iklimlendirme kabinine alınan kültürler 25°C sıcaklık, 4000 lux ışık şiddeti ve 16 / 8 sa fotoperiyot altında inkübe edilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

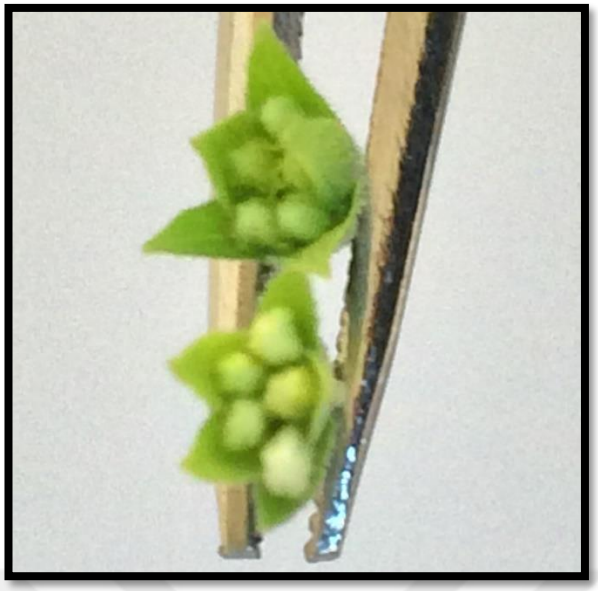
4.1. Uygun Tomurcuk Safhasının Tespiti

Anter kültüründe başarıyı etkileyen en önemli faktörlerin başında mikrosporların gelişim dönemleri gelmektedir. Bu konuda birçok araştırma yapılmış ve en uygun dönemin her ne kadar bitkiden bitkiye değişiklik gösterse de genel olarak tek çekirdekli (erken veya geç tek çekirdekli) dönemlerde anterlerden haploid gelişiminin uyarıldığı düşünülmektedir. Dolayısıyla anter kültürü çalışmalarının en önemli aşaması mikrosporların gelişim dönemlerinin tespit edilmesidir.

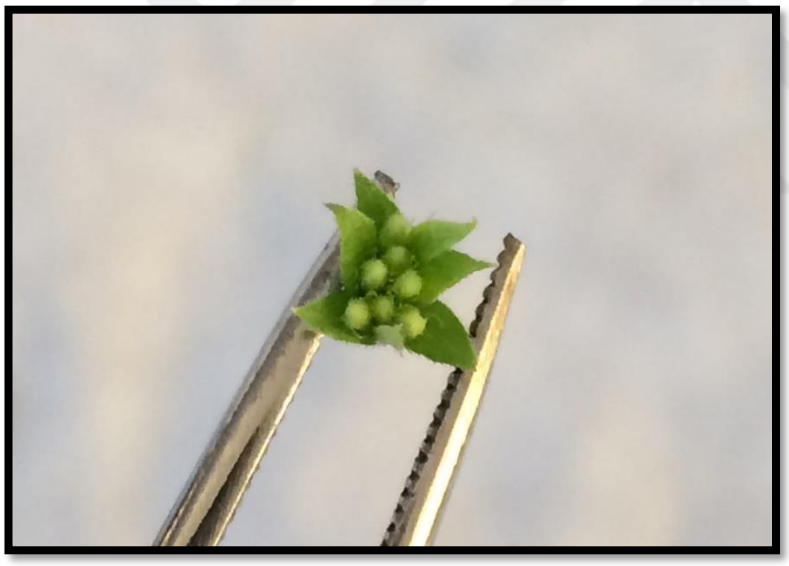
Mikrosporların gelişim dönemlerinin tespitinde tomurcuk dışından anlaşılabilecek birçok yöntem keşfedilmiş ve bu uygulamalar sayesinde çalışmalara pratiklik kazandırılmıştır. Bazı bitkilerde tomurcuk boyu önemli bir kıstas olurken bazı bitkilerde ise çanak ve taç yaprakların durumu mikrosporlar hakkında fikir vermektedir.

Şeker otu bitkisinde daha önce yapılmış bir tomurcuk sınıflandırmasına rastlanılmadığından bu çalışmada uygun tomurcuk safhasının tespiti önemli bir rol oynamaktadır. Araştırmada ilk önce tomurcuk büyüklüğü ile mikrospor gelişimi arasında bir ilişki kurulmaya çalışılmış fakat bir tomurcuk içinde farklı büyüklükte anterlerin bulunması ve her defasında aynı sonuçların alınamaması tomurcuk boyu ile anter gelişiminin arasında doğrudan bir bağlantı olmadığını göstermiştir. 7 mm'lik bir tomurcukta bazen tek çekirdekli mikrosporlar gözlemlenirken aynı büyüklükteki başka bir tomurcukta çift çekirdekli döneme rastlanmaktadır. Daha sonraki araştırmalarda tomurcukların açılması izlenmiş ve çiçeklenmeye geçmeden önceki dönem olan tomurcukların açılıp taç yaprakların hizasında veya hemen altındaki tomurcukların anterlerinin doğru safhada yani tek çekirdekli dönemde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan gözlemler sonucu bulunan diğer bir kriter ise, tomurcuk başlarındaki renk değişimidir. Tomurcukların gelişimi ilerledikçe, tomurcuk başlarında çiçek rengi olan beyaz renk hâkim olmaktadır. İlk aşamalarda tüm tomurcuklar açık yeşil iken ilerleyen safhalarda tomurcuk başları sırasıyla önce sarı sonra beyaza dönmekte ve sonrasında çiçek açmaktadır. Dolayısıyla kültüre alınacak anterlerin seçiminde bu renk dönmesi de dikkate alınmış ve seçimde tüm tomurcuğun açık yeşil olmasına özen gösterilmiştir. Her ne kadar tüm bu kriterler büyük bir titizlikle izlense de bir tomurcuk içindeki tüm anterler aynı karakteri göstermemekte ve bunların içinde de mikroskop altında kötü olduğu ve aynı karakterleri taşımadığı düşünülen anterler de kültüre alınmamıştır.

Stevia rebaudiana Bertoni bitkisinde bir çiçek tablasında 5 adet tomurcuk bulunmakta, nadirde olsa bu sayı az ya da fazla olarak değişebilmektedir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Her bir tomurcuk içinde ise 5 adet anter bulunmakta ve çoğunlukla anterler benzer gelişim dönemlerinde bulunmaktadır.

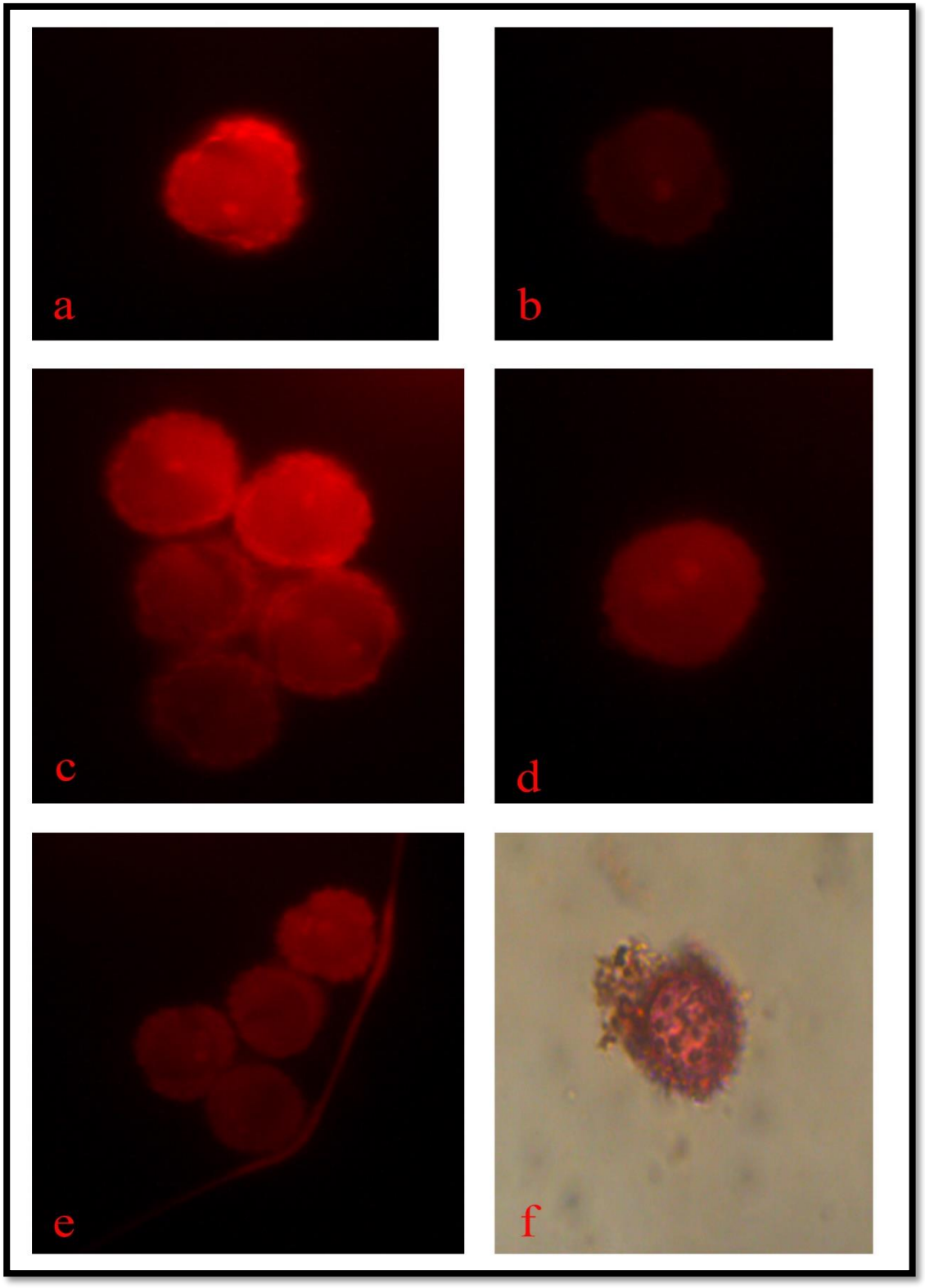


Şekil 4.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi çiçek tablasındaki 5'er adetlik tomurcuklar



Şekil 4.2. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde 1 çiçek tablasındaki 7 adet tomurcuk

Şeker otu bitkisinde uygun anter safhasının tespiti için; asetokarmin ile boyama, lakto-propionik-orsein çözeltisi ile boyama ve ethidium bromid olmak üzere 3 farklı boyama yöntemi kullanılmıştır. Yapılan boyama çalışmalarında tek çekirdekli dönem en belirgin olarak ethidium bromid ile boyamada sağlanmış ve tek çekirdekli dönem tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. (a)(b)(c) *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin tek çekirdekli mikrospor evresi (d)(e) Çift çekirdekli evreye geçmiş mikrosporlar (f) Gelişimini tamamlamış olgun polen tanesi.

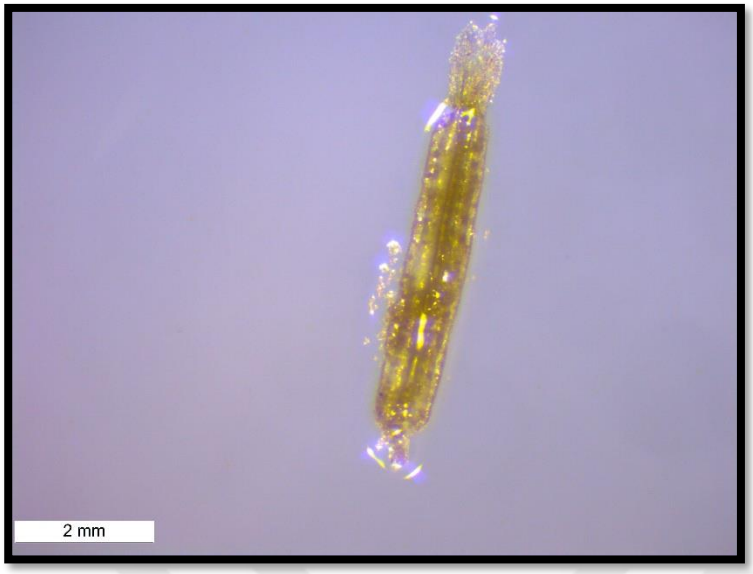
4.2. Birinci Yıl Deneme Bulguları

Uygun gelişme döneminde kültüre alınan anterler, birinci yıl denemelerinde belirtilen 12 farklı MS ortamına 3 tekerrürlü, 10 anter/petri (90 mm) olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kültürler, ilk bir hafta 25°C sıcaklıkta ve karanlık koşullarda; daha sonra 25°C sıcaklık, 4000 lux ışık şiddeti, 16/8 sa fotoperiyot altında inkübe edilmişlerdir.

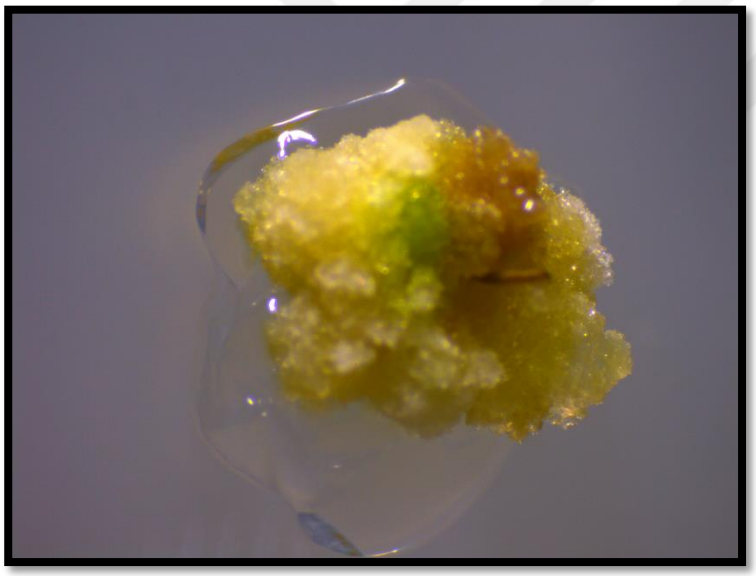
Çizelge 4.1. Farklı kallus / embriyo teşvik ortamlarında *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin birinci yıl denemesinde kallus oluşturma frekansı

Ortam	Kallus Adet / %
1-)MS0 (Kontrol)	**0/0**
2-)MS 0.5 NAA+0.5 BAP	**0/0**
3-)MS 1.0 NAA+0.5 BAP	**1/3,33**
4-)MS 2.0 NAA+0.5 BAP	**4/13,33 (emb)**
5-)MS 4.0 NAA+0.5 BAP	**0/0**
6-)MS 0.5 2,4-D+0.5 BAP	**3/10**
7-)MS 1.0 2,4-D+0.5 BAP	**0/0**
8-)MS 2.0 2,4-D+0.5 BAP	**0/0**
9-)MS 0.5 NAA+0.5 KİNETİN	**0/0**
10)MS 1.0 NAA+0.5 KİNETİN	**0/0**
11-)MS 2.0 NAA+0.5 KİNETİN	**0/0**

Şeker otu bitkisinin anterleri çok küçük olduğundan kabin içerisine yerleştirilen sterio mikroskop altında ilk önce tomurcuklar kesilerek açılmış daha sonra dişi organ ayrılarak anterler ortaya çıkarılmıştır. Çıkarılan anterlerin flamentleri çok ince uçlu pens ve bisturi yardımıyla dikkatli bir şekilde kesilmiş ve anterler petri kaplarına, petri başına 10 anter olacak şekilde yerleştirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Flamentleri kesilerek kültüre alınan *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin anteri

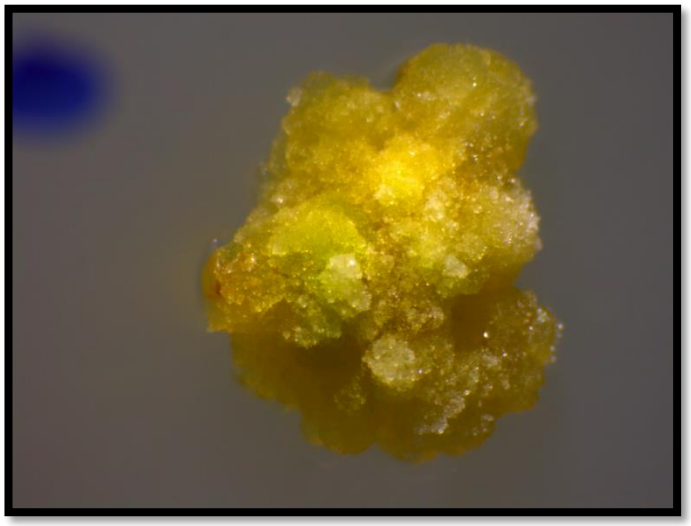


Şekil 4.5. MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamından elde edilen sarı yeşil ve koyu sarı bölgeleri olan kallus

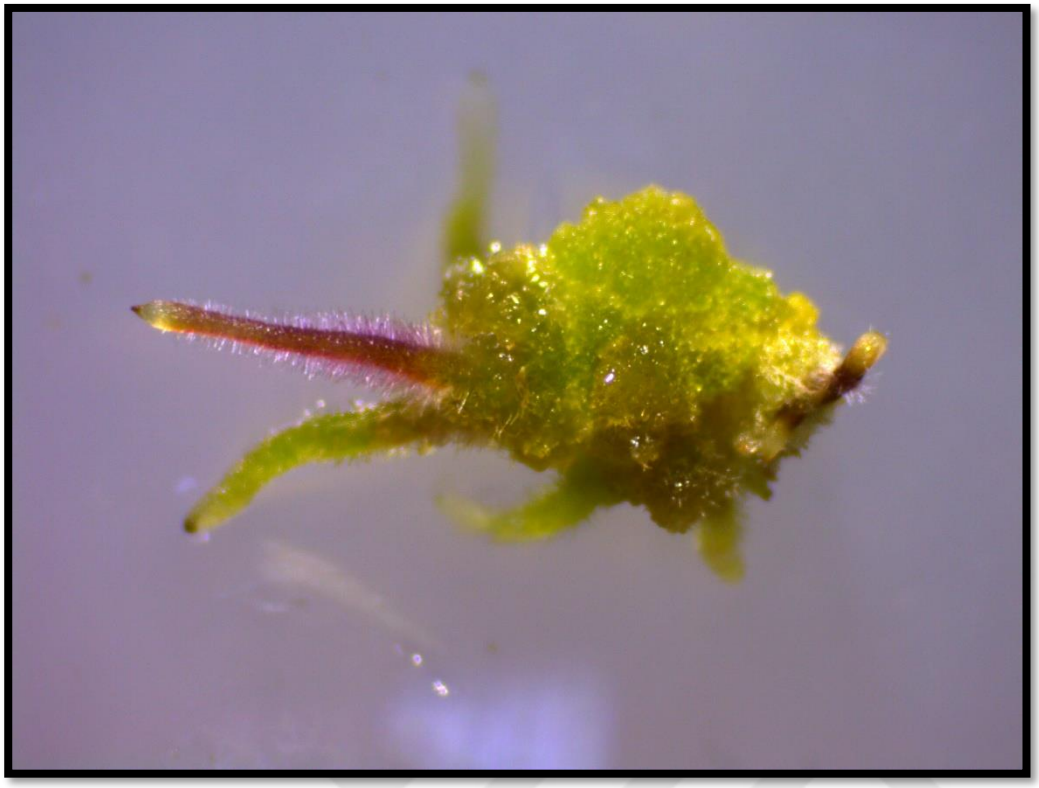
Şekil 4.5'de yeşil bölgeler embriyojenik kısımları göstermektedir. Açık sarı yapılar sulu ve gevrek bir yapıda olmakla birlikte birbirine sıkı halde bağlıdır. Genellikle bu yapılardan, ilerleyen zamanlarda herhangi bir farklılaşma görülmemekte ve zamanla bu yapılar canlılığını yitirmektedir. Şekilde orta üst kısımda görülen koyu kısımlar ise kırılgan bir yapıda olup, kallus pens ile hareket ettirildiğinde bu yapılar ufalanmakta ve ana yapıdan kolayca ayrılmaktır. İlerleyen zamanlarda yapılan gözlemlerde bu yapıların 2-3 hafta sonra canlılıklarını kaybettiği belirlenmiştir.

Şekil 4.6. MS 2.0 NAA+0.5 BAP ortamında gelişen koyu yeşil renkli çubuk embriyo ve antosiyaninli yapıları içeren embriyojenik kallus

Şekil 4.6'da görülen yapılar incelendiğinde bu yapılar ileriye dönük umut vaat etmektedir. Üzerinde görülen çubuk şeklindeki yapıların, literatür taramalarından sonra çubuk embriyo oldukları teşhis edilmiştir. Fakat yapılan çalışmalarda bu yapıların bitkiciğe dönüşümlerinde ciddi sorunlara rastlanmaktadır. Bu çalışmada da literatür sonuçları ile benzer sonuçlarla karşılaşılmış, elde edilen çubuk embriyolar MS0 ortamına alınmış fakat herhangi bir gelişme gözlemlenmemiş ve bu yapılar da ilerleyen zamanlarda canlılıklarını yitirmiştir.



Şekil 4.7. MS 2.0 NAA+0.5 BAP ortamında gelişen sarı sulu ve gevrek yapıdaki kallus



Şekil 4.8. MS 2.0 NAA+0.5 BAP ortamında gözlenen yeşil embriyojenik kallus ve tüylü antosiyaninli yapılar

İlk yıl denemeleri sonucunda elde edilen embriyojenik kalluslardan bitkiciklere dönüşüm sağlanamamıştır. Bu amaçla ikinci yıl denemelerinde embryogenesisi teşvik etmek amacıyla, anter kültüründe yaygın kullanılan sıcaklık şokları (sıcak ve soğuk) kullanılarak yeni bir deneme planı hazırlanmış ve ilk yılda denenen ortamlara ilave olarak, ilk yıl kullanılmayan 2.4-D ve kinetin kombinasyonlarının da denenmesine karar verilmiştir.

4.3. İkinci Yıl Deneme Bulguları

2015 Eylül ayında şeker otu bitkisinin çiçeklenme aşamasına gelmesiyle birlikte ikinci yıl denemelerine başlanmıştır. Birinci yıl denemelerinde başarı sınırlı kaldığı ve tepki veren anter sayısı az olduğu için, ikinci yıl denemelerinde embryogenesisi teşvik etmek amacıyla denemeye sıcaklık şokları (soğuk ve sıcak) eklenmiştir. Ayrıca birinci yılda denenmeyen 2,4-D ve kinetin kombinasyonları da ilave edilerek denemelere başlanmıştır. Denemeler 4 tekerrürlü olarak kurulmuştur. Toplamda 13 ortam x 3 Uygulama x 4 Tekerrür x 10 anter/ petri olacak şekilde 1.560 anter kültüre alınmıştır.

Çizelge 4.2. Farklı kallus / embriyo teşvik ortamlarında *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinin ikinci yıl denemesinde kallus oluşturma frekansı.

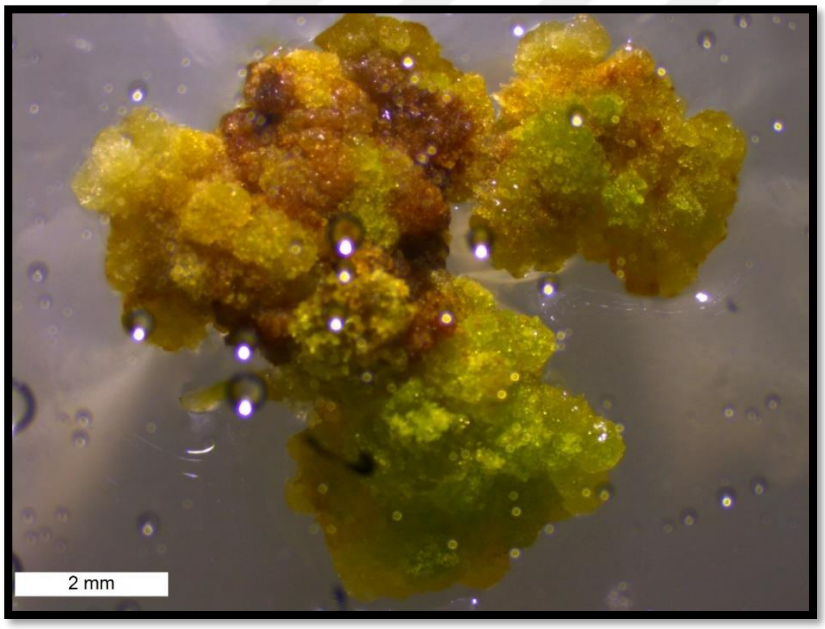
	Kallus Adet/ % Oran		
ORTAMLAR	**U1 Kontrol**	**U2 35 C**	**U3 4 C**
1-)MS0 (Kontrol)	0/0	0/0	0/0
2-)MS 0.5 NAA+0.5 BAP	**3/7.5*** **	0/0	0/0
3-)MS 1.0 NAA+0.5 BAP	**3/7.5*** **	0/0	**3/7.5****
4-)MS 2.0 NAA+0.5 BAP	0/0	0/0	0/0
5-)MS 0.5 NAA+0.5 KİNETİN	0/0	0/0	0/0
6-)MS 1.0 NAA+0.5 KİNETİN	0/0	**1/2.5*** **	0/0
7-)MS 2.0 NAA+0.5 KİNETİN	0/0	**15/37.5* (emb)**	0/0
8-)MS 0.5 2,4-D +0.5 BAP	0/0	0/0	0/0
9-)MS 1.0 2,4-D +0.5 BAP	0/0	0/0	0/0
10-)MS 2.0 2,4-D +0.5 BAP	0/0	0/0	0/0
11-)MS 0.5 2,4-D+0.5 KİNETİN	0/0	0/0	0/0
12-)MS 1.0 2,4-D+0.5 KİNETİN	0/0	0/0	0/0
13-)MS 2.0 2,4-D+0.5 KİNETİN	0/0	0/0	0/0

***** 2 adet kallustan oluşan 15 adet çubuk şeklinde embriyo oluşumu
****** Kallus ve kallustan meydana gelen organogenesis
******* Embriyojenik yeşil ve sarı renkte globular ve torpedo yapılarının olduğu kalluslar.

MS 0.5 NAA+0.5 BAP ve MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamlarının her birinden %7.5 oranında embriyojenik kallus elde edilmiştir (Şekil 4.9, 4.10). Sıcak ön uygulamasında ise MS 1.0 NAA+0.5 Kinetin ortamı %2.5 oranında embriyojenik kallus oluşturmuş, MS 2.0 NAA+0.5 Kinetin ortamı ise %37.5 oranında çubuk şeklinde embriyo oluşturmuştur (Şekil 4.11, 4.12). Soğuk ön uygulamasında MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamı %7.5 oranında kallus yoluyla organogenesis vermiştir (Şekil 4.13). Yapılan

çalışmada ön uygulamalar arasında önemli bir fark gözlenmezken MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamı daha başarılı olmuştur. Kinetinli ortamda ise doğrudan ya da kallus aracılığıyla çubuk embriyo yapılarının geliştiği gözlemlenmiştir.

Şekil 4.9. MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamında elde edilen embryojenik kallus

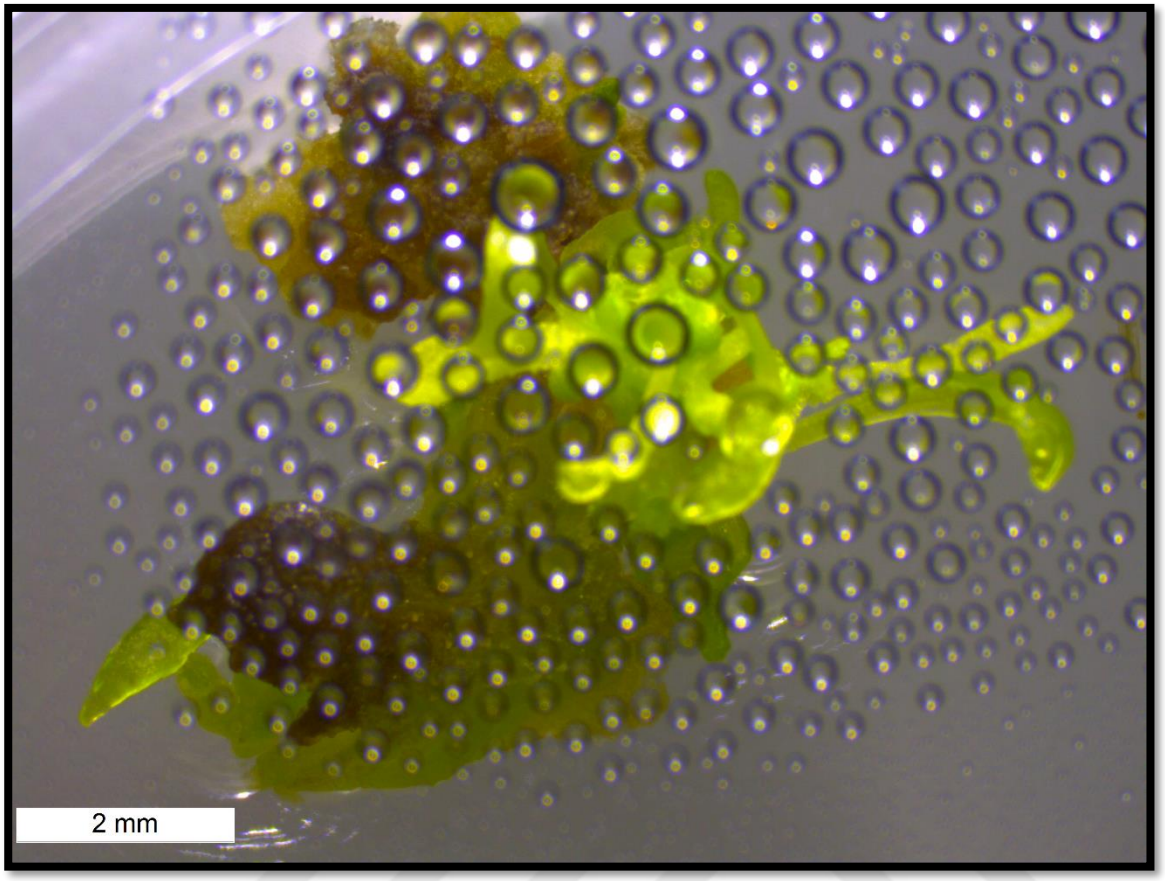


Şekil 4.10. MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamında 3 farklı anterden gelişen embriyojenik kalluslar

Şekil 4.11. MS 2.0 NAA+0.5 KİNETİN ortamından sıcak uygulaması ile elde edilen tek bir adet kallustan çok sayıda çubuk embriyo oluşumu

Elde edilen çubuk şeklindeki embriyolar daha sonra kesilerek 1/2Ms+1 mg/l IBA içeren ortamlara hem gelişimi teşvik etmek hemde köklendirmek amacıyla kavanozlara aktarılmış fakat bu embriyolardan bitkiye dönüşüm sağlanamamıştır. Başka familyalarda da elde edilen çubuk embriyolardan bitkiciklere dönüşümde ciddi sorunlar yaşandığı bilinmektedir.

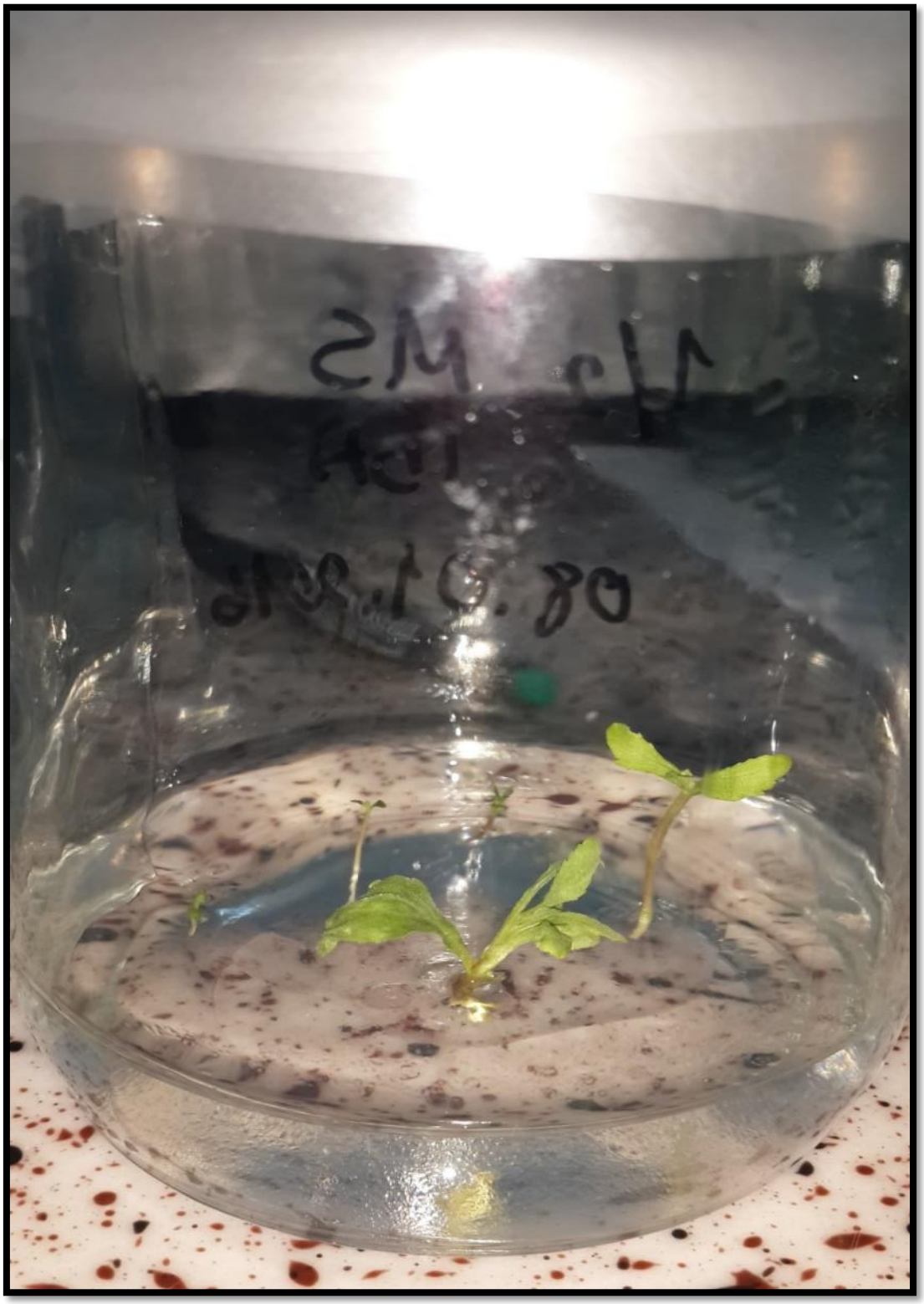
Şekil 4.12. MS 2.0 NAA+0.5 KİNETİN ortamında meydana gelen çubuk embriyolar



Şekil 4.13. MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamı soğuk uygulaması sonucu kallus aracılığıyla meydana gelen organogenesis

Soğuk uygulama (kallustan organogenesis) sonucu elde edilen üç adet bitkicik kesilerek, köklendirmek amacıyla kavanozlara alınmıştır (Şekil 4.14). Köklenmeyi teşvik etmek amacıyla ½ MS+1 mg/l IBA ortamı kullanılmıştır. Kavanozda yeterince gelişen bitkiciklerin koltuk altı tomurcukları kullanılarak klonal çoğaltma yapılmıştır (Şekil 4.15). Buradan gelişen bitkicikler de yukarıda belirtilmiş olan köklendirme ortamına alınarak köklenmeleri sağlanmıştır. Ortalama 10-12 gün sonra yeterince köklenen bitkicikler toprağa alınarak alıştırma serasına konulmuştur (Şekil 4.16). İki hafta alıştırma serası koşullarında bekletilen bitkiler normal sera koşullarına alınarak saksılara aktarılmıştır.

Morfolojik olarak haploid bitki görünümünde olmayan bitkilerin yapraklarında kontrol bitkileri ile karşılaştırmalı olarak stoma sayımları yapılmıştır. Sterio mikroskop altında yapılan sayımlarda söz konusu bitkilerin kontrol bitkilerinden farklı olmadığı bulunmuştur.



Şekil 4.14. Kalluslardan bistüri yardımıyla kesilerek ayrılan sürgünler ½ MS+ 1 mg/l IBA içeren ortamlarda köklendirilmesi

Şekil 4.15. Yeterince gelişen bitkilerden koltuk altı tomurcukları kullanılarak klonal çoğaltma

Şekil 4.16. Soğuk uygulaması ve MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamından kallus aracılığı ile meydana gelen bitkiciklerin toprağa alıştırılması (Buradaki 15 adet bitkicik *in vitro* koşullarda klonal olarak çoğaltılmıştır).

Yukarıda bulguları verilen bu çalışmada şeker otu bitkisinde optimum koşulların bulunması için anterler NAA, 2,4-D, BAP, Kinetin ve bunların farklı dozları ile birlikte kombine edilerek, anterler kültüre alınmıştır. En fazla kallus MS 1.0 mg/l ve 2.0 mg/l NAA+0.5 BAP içeren ortamlardan alınmıştır.

Bitki büyüme düzenleyiciler, özellikle oksin hormunu bitkilerden androgenesisi başlatmada yaygın olarak kullanılmakta, gerekli hormon konsantrasyonları ise bitkiden bitkiye değişmektedir (Kasha vd 1990). Bitkilere uygulanan stress uygulamaları ise farklı türlerde androgenesisi uyardığı ve elde edilen androgenik kallus oranını arttırdığı bilinmektedir (Touraev vd 1997, Immonen ve Robinson, 2000, Pechan ve Smykal, 2001). Özellikle soğuk ve sıcaklık uygulamaları mikrosporların gelişimlerinin ilk evresinde bitki gelişimini yönlendirmekte ve elde edilen başarıyı türden türe değiştirmekle birlikte pozitif yönde etkilediği bilinmekte fakat yapılacak uygulamalar ve bu uygulamaların süresi ise her türde farklılık göstermekte, ayrıca muamelenin yapılacağı bitki organında da (izole edilmiş anter, tüm bitki ya da sadece tomurcuk) farklılıklar bulunmaktadır (Ferrie vd 1995). Şeker otunda bu alanda yapılmış bir çalışma bulunmadığından dolayı 2 günlük sıcaklık şokları (+4 °C ve 35 °C) denenmiş, sıcaklık uygulamalarının kallus oluşumuna herhangi bir etkisi olduğu gözlemlenmemiştir.

Ayçiçeğinde, Badigannavar ve Kuruvinashetti (1996) yaptıkları çalışmada soğuk uygulama, karanlıkta inkübasyon ve farklı hormon konsantrasyonları (2,4-D, BAP ve NAA) ile ayçiçeğinde kallus oluşturma frekanslarını izlemişlerdir. En yüksek oranda kallus soğuk uygulamalar sonucunda elde edilebilmiş ve soğuk uygulama başarılı bulunurken en başarılı ortamlar ise 2,4-D (2 mg/l)+BAP (1 mg/l) ve NAA (1mg/l)+BAP (1 mg/l) olduğu gözlemlenmiştir. Ayçiçeğinde yapılan başka bir araştırmada ise Saji ve Sujatha (1998) ayçiçeğinde hasat ettikleri tomurcuklara uyguladıkları 4 °C soğuk uygulamasının kallus oluşumuna etkisinin olmadığını ancak embriyogenesisi 4 kat arttırdığını tespit etmişlerdir. Yaptığımız araştırmada da benzer sonuçlara raslanmış kallus oluşumunda bir farklılık olmazken kallustan organogenesis soğuk uygulaması sonucu meydana gelmiştir. En başarılı ortam ise NAA (1 mg/l) ve BAP (0.5 mg/l) konsantrasyonundan alınmış ve ayçiçeğinde yapılan bu çalışmayla benzer ortamlardan kallus elde edilebilmiştir. Prasad vd 1990 yılında aspirde (*Carthamus tinctorius* L.) yaptıkları araştırmada farklı genotiplerin 5 farklı kültür ortamında 0-15 gün arası soğuk ön uygulaması (+5 °C) ile BAP ve NAA hormonun etkileri incelenmiştir. Yaptıkları araştırmada soğuk uygulaması tüm genotiplerde kallus oranını kontrol uygulamasına göre arttırdığını tespit edilirken uzayan soğuk uygulamalarında ise anterlerin canlılığını kaybettiği bulunmuştur. Artan oranlarda uygulanan BAP (0.5-2.0 mg/l) ve sabit tutulan NAA (0.5 mg/l) oranlarında kallus oluşumunun çok az miktarda azaldığı fakat elde edilen kalluslardan ise sürgün meydana gelme olasılığının arttığını gözlemlemişlerdir. Sabit oranlarda tutulan BAP (0.5 mg/l) ve artan oranlardaki NAA (1.0-3.0 mg/l) konsantrasyonlarında ise kallus ve kalluslardan sürgün oluşumunun azaldığını tespit etmişlerdir. Şeker otunda yürüttüğümüz çalışmada BAP (0.5 mg/l) oranı sabit tutularak değişik oranlarda oksin hormonları kullanılmıştır. NAA (1-2.0 mg/l) ve BAP (0.5 mg/l) konsantrasyonlarından kallus gelişimi gözlemlenmiş ve NAA (4.0 mg/l) yüksek konsantrasyonlarında ise bitki gelişimini olumsuz etkilediği ve herhangi bir gelişim olmadığı görülmüştür. Anterlerden haploid bitki uyartımı birçok faktörün etkisi altındadır ve soğuk uygulamanın ise bazı türlerde başarılı olmadığı ve etkisinin ise türden türe değiştiği farklı genotiplerde farklı sonuçlar alındığı bilinmekte hatta aynı genotiplerde farklı yetişme koşullarında farklı tepkiler meydana gelebilmektedir (Ali 2008). Bu yüzden kesin bir yargıya varmak için soğuk uygulamanın farklı sürelerde ve farklı şekillerde ki uygulamalarınında daha detaylı olarak incelenmesi gerekmektedir.

Anter kültüründe elde edilen bitkiler ya anter duvarlarından (somatik kökenli) ya da mikrospordan (androgenik kökenli) olabilmekte ve birçok türde somatik kökenli meydana gelen bitkicikler sorun teşkil etmektedir. Zhong vd 1995 yılında ayçiçeğinde yaptıkları araştırmada yüksek oranlarda kallus elde ettikleri ve bu kalluslardan bitkiciklere dönüşüm sağlamışlardır. Fakat elde ettikleri bitkiciklerin birçoğu anter duvarından gelişmiş yani somatik dokulardan köken almış diploid bitkicikler olduğunu bulmuştur, nitekim yaptığımız çalışmadada elde ettiğimiz bitkicik somatik dokulardan gelişmiş yani diploid karakterde olduğu tespit edilmiştir. Anter kültüründe yaygın karşılaşılan bu durum devam ettiği takdirde anternatifi olan mikrospor kültürünün denemesi gerekmekte anter duvarları uzaklaştırılarak mikrosporlar doğrudan kültüre alınarak gelişimin mikrospor kökenli olması sağlanmalı ve haploid bitki gelişim oranının arttırılması gerekmektedir.

5. SONUÇ

Bu çalışmada; *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde farklı hormon ve ön uygulamaların androgenesis üzerine etkileri araştırılmıştır. Birinci yıl çalışmalarında MS besin ortamında 11 farklı hormon konsantrasyonunun androgenesis üzerine etkisine bakılmıştır. Birinci yıl denemeleri sonucunda şeker otu bitkisinden elde edilen kalluslardan bitkiciklere dönüşüm sağlanamadığı için ikinci yıl denemelerinde bazı yüksek hormon konsatrasyonları çıkarılmış, bunun yerine denenmeyen 2,4 D ve Kinetin kombinasyonları eklenmiş ve toplamda 13 ortamda 4 tekerrürlü olarak yürütülen araştırmada ön uygulamasız (Kontrol) ve 2 farklı sıcaklık (+4°C ve +35°C) uygulamalı olarak toplamda 1.560 anter kültüre alınarak ikinci yıl çalışmaları da tamamlanmıştır.

Anter kültüründe optimum sıcaklık ve uygulama süresi türden türe değişmekle birlikte aynı zamanda kullanılacak explant (tüm çiçek, sadece tomurcuklara veya izole edilmiş anterlere) kaynağına göre de uygulama süreleri değişmektedir (Dunwell 1981). Ön çalışma olarak önceden yürüttüğümüz farklı sürelerde (2, 4, 6, 8 gün +4°C) tomurcuklara uygulanan soğuk uygulamalarından sonuç alınamadığından, uygulamalar tomurcuklara değil doğrudan kültüre alınan anterlere uygulanmış, tüm mikrosporların aynı aşamada kalması ve mikrosporların gelişimini generatif yönden vejatatif yöne doğru kaydırılması amaçlanmıştır. Nitekim sıcak uygulamasının da altında yatan sebep tepki vermeyen anterlerin gelişiminin yönlendirilmesidir. Birinci yıl denemelerinde 3 farklı ortamdan kallus elde edilebilmiş, diğer kültür ortamlarında anterlerden herhangi bir farklılaşma meydana gelmemiştir. Birinci yıl denemeleri sonucunda en iyi tepki MS 2.0 NAA+0.5 BAP ortamından %13.33 embriyo oranı ile elde edilmiş bu sonucu %10 kallus oluşturma oranı ile MS 2,4-D+0.5 BAP ve sonuncu olarak ise %3.33 kallus oranı ile MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamı takip etmiştir. Elde edilen hem embriyojenik kalluslar hemde sarı sulu gevrek yapıdaki embriyojenik olmayan kalluslardan sonradan bir farklılaşma meydana gelmemiş ve bu yapılar yavaş yavaş kahverengiye dönerek canlılıklarını yitirmiştir.

İkinci yıl denemeleri sonuçlarında her ne kadar uygulamalar arasında önemli bir fark görülmesede, soğuk uygulamasından kallus aracılığı ile organogenesis meydana gelmiş, sıcak uygulamasından ise çok sayıda çubuk embriyo elde edilmiştir. Ön uygulamasız MS 0.5 NAA+0.5 BAP ve MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamlarının her birinden %7.5 oranında embriyojenik kallus elde edilmiştir. Sıcak ön uygulamasında ise MS 1.0 NAA+0.5 Kinetin ortamı %2.5 oranında embriyojenik kallus oluşturmuş, MS 2.0 NAA+0.5 Kinetin ortamı ise %37.5 oranında çubuk şeklinde embriyo oluşturmuştur. Soğuk ön uygulamasında MS 1.0 NAA+0.5 BAP ortamı %7.5 oranında kallus yoluyla organogenesis meydana gelmiştir.

Farklı sitokinin uygulamaları (BAP, TDZ, Kinetin) anterler üzerinde farklı tepkilere sebep olmaktadır. Bu çalışmada 2 farklı sitokinin uygulanmış ve bunlar değişik hormonlarla kombine edilmiştir. Sitokinin olarak kullanılan kinetin hormonunun

kültüre alınan anterlerde doğrudan çubuk embriyoları teşvik ettiği başka araştırmalarda da görülmüştür. Nitekim bu yapılardan bitkiciklere dönüşümde tüm çalışmalarda benzer sorunlarla karşılaşılmakta, belli süreler sonunda ise çubuk embriyolar canlılıklarını kaybetmektedir. Yürüttüğümüz bu araştırmada da benzer sonuçlara rastlanmış, elde edilen çubuk embriyolar MS ortamının kuvvetli geleceği düşünülerek ½ MS ortamına alınmış fakat canlılıkları korunamamış ve 2 hafta sonra bu yapılar kahverengileşerek ölmüşlerdir.

Soğuk uygulamasından kallus aracılığı ile elde edilen organogenesis bitkicikleri kalluslardan özenle kesilerek ayrılmış ve köklendirme ortamı olan ½ MS ve 1 mg/l IBA içeren ortamda yeterli gelişimleri sağlandıktan sonra *in vitro* koşullarda çoğaltılarak alıştırma seralarına alınmıştır. İki hafta boyunca alıştırma seralarında bekletilen bitkilerin yeterli gelişimleri sağlandıktan sonra morfolojik gözlemler yapılmıştır. Morfolojik olarak haploid bitki görünümünde olmayan bitkilerin yapraklarında kontrol bitkileri ile karşılaştırmalı olarak stoma sayımları yapılmıştır. Sterio mikroskop altında yapılan sayımlarda söz konusu bitkilerin kontrol bitkilerinden farklı olmadığı yani diploid olduğu gözlemlenmiştir. Daha sonra kesin sonuçlar için kök ucu kromozom sayımı ve flow sitometri analizi de yapılacaktır. *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisinde bundan önceki tek çalışma niteliği taşıyan fakat detaylarına ulaşılamayan çalışmada da elde edilen bitkilerin diploid karakterde olduğu bilinmektedir.

Şeker otu bitkisinin anterlerinin çok hassas ve tomurcuk içinden çıkan anterlerin birbirlerine temas halinde olması bu bitkide yapılan çalışmaları zorlaştırmaktadır. Her ne kadar kültüre alınan anterlerde yaralanma gözlemlenmese de flamentleri kesilen ve birbirlerinden ayrılan anterlerde mekanik yaralanmalar olabileceği göz önüne alınmalıdır. Bundan sonraki çalışmalara yol göstermesi bakımından, anterlerin kültüre toplu olarak ve flamentleri kesilmeden alınması halinde elde edilecek başarının arttırılabileceği düşünülmektedir.

Şeker otu bitkisinde elde edilen embriyojenik kalluslar ve çubuk embriyolar bu bitkide yapılan çalışmalardan haploit bitkiler elde edilebileceğini gözler önüne sermiştir. Her iki yıl denemesinde de en başarılı ortamlar MS 1.0 mg/l ve MS 2.0 mg/l NAA+0.5 BAP içeren ortamlardan alınmıştır. Çubuk embriyo elde edilmesi bakımından en başarılı sonuç ise ikinci yıl denemesinde MS 2.0 NAA+0.5 Kinetin içeren sıcak uygulamasından elde edilmiştir.

Bu çalışmada haploid bitkilerin elde edilmesi bakımından tam bir protokol geliştirilememiş olmasına rağmen, ileride yapılacak çalışmalara bir temel oluşturulmuştur.

6. KAYNAKLAR

ALİ, A.K. 2008. Some factors affecting the success of anther culture of *Solanum melongena* L. in vitro. MSc Thesis, Al- Nahrin University, Baghdad, Iraq.

ANONİM. 1988. High intensity sweeteners—market size 7.2 billion yen. Stevia occupies 41%, but future gains will be made by aspartame. *Food Chemicals*, 6: 19–26.

ANONİM. 2011. Şeker İş Sendikası şekerin geleceği. http://www.sekeris.org.tr/multimedia/EKERNGELECESONBASKI.pdf. [Son erişim tarihi: 16.08.2016]

ANONİM. 2015. Sugar: World Markets and Trade, Foreign Agricultural Service/USDA November.

ARI, E. 2006. Türkiye'de Doğal Olarak Yetişen *Anemone coronaria* var. *coccinea*'da Anter Kültürü Çalışmaları. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Adana 180 s.

ARSLAN, P., BOZKURT, N., KARAAĞAOĞLU, N., MERCANLIGİL, S., ERGE, S. 2001. Yeterli-Dengeli Beslenme ve Sağlıklı Zayıflama Rehberi. Özgür Yayınları, İstanbul, 180 s.

BADIGANNAVAR, A.M., KURUVINASHETTI, M.S. 1996. Callus induction and shoot bud formation from cultured anthers in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Helia*, 19: 39–46.

BAJAJ, Y.P.S. 1983. In vitro production of haploids. Handbook of Plant Cell Culture, pp. 228-287, MacMillan Press, New York.

BAJAJ, Y.P.S. 1990. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Springer, pp. 1–44, Berlin.

BAKAL, A.I. and O'BRIEN NABORS, L. 1986. Stevioside in alternative sweeteners, Marcel Dekker Inc, pp. 295–307, New York.

BAYSAL, A., BOZKURT, N., PEKCAN, G. 1999. Diyet El Kitabı, Yenilenmiş 3. Baskı, Hatiboğlu Yayınevi, Ankara.

BERTONI, M.S. 1905. Le Kaá hê-é: sa nature et ses propriétés. *Anales Cientificos Paraguayos*, 5 (1): 1–14.

BERTONI, M.S. 1918. La *Stevia Rebaudiana* Bertoni. La estevina y la rebaudina, neuvas substancias edulcorantes. *Anales Cientificos Paraguayos*, 6 (2): 29–134.

BEYER, E.M. 1976a. Silver ion: a potent antiethylene agent in cucumber and tomato. *Horticultural Science*, 11: 195-196.

BEYER, E.M. 1976b. A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol*, 58: 268-271.

BHARATI, N. 2003. Stevia-the calorie free natural sweetener. *Natural Product Radiance,* 2: 120–123.

BHOJWANI, S.S. AND RAZDAN, M.K. 1996. Plant Tissue Culture: Theory and practice, a revised edition. Elsevier. *Studies in Plant Science*, 5: 167-214.

BLAKESLEE, A.F., BELLING, J., FARNHAM, M.E., BERGNER, A.D. 1922. A haploid mutant in the Jimson weed *Datura stramonium*. *Science*, 55: 646–647.

BONDAREV, N., SUKHANOVA, M., RESHETNYAK, O., NOSOV, A. 2003. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics during ontogeny. *Biologia Plantarum*, 47: 261-264.

BOURGIN, J. P., NITSCH., J. P. 1967. Obtention de nicotiana haploides a partir d'etamines cultivees in vitro. *Ann. Pysiol. Veget.*, 9: 377-382.

BRANDLE, J., STARRATT, A., GIJZEN, M. 1998. *Stevia rebaudiana*: Its agricultural, biological, and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78: 527-536.

CHALAPATHI, M.V. and THIMMEGOWDA. 1997. Natural non-calorie sweetener stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A future crop of India. *Crop Research Hisar*, 14 (2): 347-350.

CHAN, P., TOMLINSON, B., CHEN, Y. J., LIU, J. C., HSIEH, M. H., CHENG, J. T. 2000. A double blind placebo – controlled study of the effectiveness and tolerability of oral stevioside in human hypertension. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 50 (3): 215–220.

CHUPEAU, Y., CABOCHE, M., HENRY, Y. 1998. Androgenesis and haploid plants. INRA/Springer, Berlin, 122 p.

CORTES, R., HERNANDEZ-CERUELOS, A., TORRES-VALENCIA, J.M., GONZALEZ-AVILA, M., ARRIAGA-ALBA, M., and MADRİGALBUJAİDAR, E. 2007. Antimutagenicity of *Stevia pilosa* and *Stevia eupatoria* evaluated with the ames test. *Toxicology in Vitro*, 21 (4): 691-697.

DUNCAN, E.J., HEBERLE, E. 1976. Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma*, 90 (1–2): 173–177.

DUNWELL, J.M. and SUNDERLAND, N. 1975. Pollen ultrastructure in anther cultures of *Nicotiana tabacum* III. *The first sporophyticdivision. J. Exp. Bot*., 26: 240–252.

DUNWELL, J.M. 1981. Stimulation of pollen embryo induction in tobacco by pretreatment of excised anthers in a water saturated atmosphere. *Plant Science Letters,* 21: 9–13.

DUNWELL, J.M. and CORNİSH, L.M. 1985. Influence of preculture variables on microspore embryo production in *Brassica napus* ssp. *oleifera* cv. *Duplo. Ann. Bot.,* 56: 281-289.

DUNWELL, J.M. 2010. Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal,* 8: 377–424.

ELLİALTIOĞLU, Ş., SARI, N., ABAK, K., 2002. Haploid bitki üretimi. Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (Ed.) Bitki Biyoteknolojisi I. Selçuk Ünv. Vk. Yay. ss. 137-189, Konya.

ERCAN, N. VE BİNER, Ş.B. 2002. Farklı irilikteki biber tomurcuklarında polen gelişme döneminin belirlenmesi, *Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, *15* (1): 53–59.

FERRIE, A.M.R, PALMER, C.E, KELLER, W.A. 1995. Haploid embryogenesis. In: Thorpe TA (ed) In vitro embryogenesis in plants, vol 20. Kluwer, pp. 309–344, Dordrecht.

FLACHSLAND, E., MROGINSKI, L. AND DAVINA, J. 1996. Regeneration of plants from anthers of *Stevia rebaudiana* Bertoni (Compositae) cultivated in vitro. *Biocell*, 20 (1): 87-90.

FOROUGHI-WEHR, B., MIX, G. 1976. In vitro responses of *Hordeum vulgare* L. Anthers cultured from plants grown under different environments. *Environmental and Experimental Botany,* 19: 303–309.

FORSTER, B.P., HERBERLE-BORS, E., KASHA, K.J., TOURAEV, A. 2007. The resurgence of haploids in higher plants. *Trends Plant Sci*, 12 (8): 368–375.

FRONZA, D. and FOLEGATTI, M.V. 2003. Water consumption of the Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) crop estimated through micro-lysimeter. *Scientia Agricola,* 60: 1–5.

GAINES, E.F. and AASE, H.C. 1926. A haploid wheat plant. *American Journal of Botany*, 13: 373–385.

GARCIA, F. and EINSET, J.W. 1982. Ethylene and ethane production in salt-stressed or 2,4-D-stressed tobacco tissue cultures. *In Vitro*, 18: 275.

GERMANA, M.A. 2007. Haploidy. In: Khan I (ed) Citrus. Genetics, breeding and biotechnology. CABI, pp. 167–196, Wallingford.

GERMANA, M.A. 2010. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell-Tissue and Organ Culture,* 104: 283-300.

GÓRALSKI, G., POPIELARSKA, M., ŚLESAK, H., SIWIŃSKA, D., and BATYCKA, M. 2005. Organogenesis in endosperm of Actinidia deliciosa cv. Hayward cultured in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47 (2): 121–128.

GOSLING, C. 1901. Caá-êhê or azuca-caá. Kew Bulletin, pp. 183–194, Paraguay.

GOETTEMOELLER, J. and CHING, A. 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. ASHS Press, pp. 510-511, Alexandria.

GUHA, S., MAHESHWARI, S.C. 1964. In vitro production of embryos from anthers of Datura. *Nature*, 204: 497–498.

HARDMAN, R. 2002. Medicinal and Aromatic Plants — Industrial Profiles, CRC Press, 185 p.

HATİPOĞLU, R., 1999. Bitki Biyoteknolojisi. Ç.Ü.Z.F. Genel Yayın No:190, Ders Kitapları Yayın No: A-58, Adana, 178 s.

HEBERLE-BORS E., REINERT J. 1981. Environmental control and evidence for predetermination of pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* pollen. *Protoplasma*, 109: 249–255.

HEBERLE-BORS, E. 1982. *In vitro* pollen embryogenesis in *Nicotiana tabacum* L. and its relation to pollen sterility, sex balance and floral induction of the pollen donor plants. *Planta*, 156: 396–401.

HEBERLE-BORS, E. 1985. *In vitro* haploid formation from pollen: A critical review. *Theoretical and Applied Genetics*, 71: 361-374.

HU, T.C., KASHA, KJ. 1999. A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome,* 42 (3): 432-441.

IDF. 2015. (International Diabetes Federation). http://www.idf.org. [Son erişim tarihi: 11.5.2016]

IMMONEN, S., ROBINSON, J. 2000. Stress treatments and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture. *Plant Sci,* 150: 77–84.

INGLETT, G.E. 1976. A history of sweeteners — natural and synthetic, *Journal of Toxicology and Environmental Health,* 2 (1): 207-214.

ISLAM, S.M.S. and TUTEJA, N. 2012. Plant Science Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. *Plant Science*, *182*: 134–144.

KASHA, K.J., ZIAUDDIN, A. and CHO, U.H. 1990. Haploids in cereal improvement: anther and microspore culture. In Gene Manipulation in Plant Improvement II, ed. J.P. Gustafson. Plenum Press, pp. 213-235, New York.

KASHA, K. J. and MALUSZYNSKY, M. 2003. Production of doubled haploids in crop plants. An introduction. In: Maluszynsky M, Kasha, KJ, Forster BP, Szaejko I (eds) Doubled haploid production in crop plants. A manual. Kluwer/FAO-IAEA, pp1-4, Dordrecht.

KHANDAKAR, R. K., YU, J., MIN, S., WON, M., CHOI, H. G., PARK, H., PARK, Y. 2014. Regeneration of Haploid Plantlet through Anther Culture of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, *42* (2): 482–487.

KELLER, W.A., STRINGHAM, G.R. 1978. Production and utilization of microspore derived plants. In: Thorpe TA (ed) Frontiers of plant tissue culture. Calgary University Press, pp. 113–122, Calgary.

KELLER, W.A., ARMSTRONG, K.C., DE LA ROCHE, A.I. 1983. The production and utilization of microspore-derived haploids in Brassica crops. In: Sen SK, Giles KL (eds) Plant cell culture in crop improvement. Plenum Press, pp. 169–183, New York.

KINGHORN, A.D. 1982. Purification of *Stevia rebaudiana* sweet constituents by droplet counter current chromatography. *Journal of Chromatography*, 237 (3): 478–483.

KINGHORN, A.D. 2003. Stevia: the genus Stevia. Taylor and Francis, CRC Press, New York, 224 p.

KISZCZAK, W., KOWALSKA, U., KAPUŚCIŃSKA, A., BURIA, M., GÓRECKA, K. 2015. Effect of low temperature on in vitro androgenesis of carrot (*Daucus carota* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant,* 51 (2): 135-142.

KOHDA, H., KASAI, R., YAMASAKI, K., MURAKAMI, K. AND TANAKA, O. 1976. New sweet diterpene glucosides from Stevia rebaudiana. *Phytochemistry,* 15: 981–983.

KRZYZAROWSKA, D. and GORECKA, K. 2008. Effect of various stress factors on the induction of androgenesis in anther cultures of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* L. var. Gemmifera). *Vegetable Crops Research Bulletin*, 69: 5–13.

KYO, M., HARADA, H. 1986. Control of the developmental pathway of tobacco pollen *in vitro. Planta*, 168: 427–432.

LAZAR, M.D., SCHAEFFER, G.W., BAENZIGER PS. 1984. Cultivar and cultivar x environment effects on the development of callus and polyhaploid plants from anther cultures of wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 67: 273–277.

LEE, S.J. 1979. A study on the safety of stevioside from *Stevia rebaudiana* as a new sweetening source. *The Korean Journal of Food Science and Technology,* 11 (4): 224–231.

LENTINI, Z., REYESA, P., MARTINEZA, C. P., and ROCAB, W.M. 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Science*, 110: 127–138.

LEZIN, F., SARRAFI, A. and ALBERT, G. 1996. The effects of genotype, ploidy level and cold pretreatment in barley anther culture responsiveness. *Cereal Research Communications*, 24 (1): 7-13.

MALUSZYNSKI, M., KASHA, K.J., FORSTER, B.P. and SZAREJKO, I. (Eds.). 2003. Doubled Haploid Production in Crop Plants: A Manual, Kluwer Academic Publishers, ISBN 1-4020-1544-5, Dordrecht, 416 p.

MARSOLAIS, A., BRANDLE, J. and SYS, E. A. 1998. Stevia plant named 'RSIT 94-751' United States Patent PP10564.

MATTHYS-ROCHAN, E. 2005. Secreted molecules and their role in embryo formation in plants; a mini-review. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47 (1): 23-29.

MISHRA, V.K., NUZVID, T., DISTRICT, K., PRADESH, A., NUZVID, T., DISTRICT, K. and PRADESH, A. 2014. Haploid Production in Higher Plant, *International Journal of Chemical and Biological Sciences*, 1 (1), 25–45.

MORONI, L. 1999. Stevia: è naturale, sana, dietetica, e fino a 300 volte più doce dello zucchero. *Natura Scienza*, 12 (1): 25–27.

NITSCH, J.P. and NITSCH, C. 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85-7.

PALMER, C.E. and KELLER, W.A. 2005. Overview of haploidy. In: Haploids in Crop Improvement II, Vol. 56 (Palmer, C.E., Keller, W.A. and Kasha, K.J., eds), Springer, pp. 3–9. Heidelberg.

PECHAN, P.M, SMYKAL, P. 2001. Androgenesis: affecting the fate of the male gametophyte. *Physiol Plant*, 111: 1–8.

PRASAD, B.R., KHADEER, M.A., SEETA, P., ANWAR, S.Y. 1990. Influence of genotype and cold pretreatment on anther culture response in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) *Indian Journal of Experimental Biology*, 28: 924–927.

PREETHI, D., SRİDHAR, T.M., and NAİDU, T.M. 2011. Carbohydrate concentration influences on in vitro plant regeneration in *Stevia rebaudiana*. *Journal of Phytology*, 3: 61–64.

RAMESH, K., SINGH, V., MEGEJI, N.W. 2006. Cultivation of Stevia [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni]: A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy,* 89: 137-177.

RUDOLF, K., BOHANEC, B., HANSEN, M. 1999. Microspore culture of White cabbage, *Brassica oleracea* var. capitata L.: genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. *Plant Breed*, 118: 237–241.

ŠAFÁŘOVÁ, D., KOPECKÝ, D. and VAGERA, J. 2005. The effect of a short heat treatment on the in vitro induced androgenesis in *Silene latifolia* ssp . alba. *Biologia Plantarum*, *49* (2), 261–264.

SAJI, K. V., SUJATHA, M. 1998. Embryogenesis and Plant Regeneration in Anther Culture of Sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, 103: 1–7.

SANGWAN, R.S., SANGWAN-NORREEL, B.S. 1990. Anther and pollen culture. In: Bhajwari SS (ed) Plant tissue culture. Applications and limitations. Elsevier, pp. 220–241, Amsterdam.

SARDESAI, V.M. and WALDSHAN, T.H. 1991. Natural and synthetic intense sweeteners. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2 (5): 236-244.

SEON, J.H. 1995. Stevioside as natural sweetener. Report of the Pacific R & D Center, pp. 1–8, Seoul.

SHARIATPANAHI, M.E., BAL, U., HEBERLE-BORS, E., TOURAEV, A. 2006. Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards in vitro embryogenesis. *Physiol Plant*, 127: 519–534.

SHAHVALI-KOHSHOUR, R., MOIENI, A., BAGHIZADEH, A. 2013. Positive effects of cold pretreatment, iron source, and silver nitrate on anther culture of strawberry (Fragaria x ananassa Duch.). *Plant Biotechnology Reports*, 7 (4): 481-488.

SMYKAL, P. 2000. Pollen embryogenesis—the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biologia Plantarum,* 43: 481–489.

SOEJARTO, D.D., KINGHORN, A.D. AND FARNSWORTH, N.R. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of Stevia leaf herbarium samples for sweetness. *Journal of Natural Products*, 45: 590–599.

SUNDERLAND, N., DUNWELL, J.M. 1977. Anther and pollen culture. In:Street HE (ed) Plant tissue and cell culture. Blackwell, pp. 223–265, Oxford.

SUNDERLAND, N. 1971. Anther culture: a progress report. *Sci Prog (Oxford)*, 59: 527–549.

SUNDERLAND, N. 1978. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: Proc Symp Plant Tissue Culture. Science Press, pp. 65–86, Peking.

SURANA, S.J., GOKHALE, S.B., RAJMANE, R.A. AND JADHAV, R.B. 2006. Non-saccharide natural intense sweeteners An overview of current status. *Natural Product Radiance*, *5* (4): 270–278.

TAIARIOL, D.R. 2004. Characterization of the Stevia rebaudiana Bert. [Online] Available: http://www.monografias.com/trabajos13/stevia/stevia html. [Son erişim tarihi: 10.02.2015]

TANAKA, O. 1982. Steviol-glycosides: new natural sweeteners. *Trends in Analytical Chemistry*, 1: 246-248.

TOURAEV, A., VICENTE, O., HEBERLE-BORS, E. 1997. Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Sciences*, 2: 285–303.

TSAY, H.S. 1981. Effects of nitrogen supply to donor plants on pollen embryogenesis in cultured tobacco anthers. *Journal of Agricultural Research*, 30: 5–13.

TSAY, H.S. 1982. The microspore development and haploid embryogenesis of anther culture with five nitrogen doses to the donor tobacco plants. *Journal of Agricultural Research*, 31: 1–13.

WANG, M., VAN BERGEN, S., VAN DUIJN, B. 2000. Insights into a key developmental switch and its importance for efficient plant breeding. *Plant Physiology*, 124: 523–530.

WENZEL, G., BAPAT, V.A. AND UHRIG, H. 1983. New strategy to tackle breeding problems of potato. In: Plant Cell Culture in Crop Improvement (Sen, S.K. and Giles, K.L., eds), Plenum Press, pp. 337–349, New York.

VASIL, I.K. 1980. Androgenic haploids. *International review of cytology. Supplement,* 11 (A): 195–223.

ZHONG, D., I, N. M. and COUMANS, M. 1995. Assay for doubled haploid sunflower (*Helianthus annuus*) plant production by androgenesis : fact or artifact ? Part 1. In vitro anther culture. *Plant Cell-Tissue and Organ Culture*, 41 (2): 91–97.

ÖZGEÇMİŞ

Araştırıcı 15.08.1989 yılında Merzifon'da doğdu. İlkokulu Merzifon'da ortaokulu Konya'da ve liseyi Antalya'da tamamlayarak, 2008 yılında lisans öğrencisi olmaya hak kazandığı Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü'nden 2013 yılında mezun oldu. 2014 yılının Şubat ayında Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı ve 2015 yılının Kasım ayında girdiği sınavı kazanarak Bozok Üniversitesi Tarım ve Doğa Bilimleri Fakültesi Tarla Bikileri Anabilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Araştırıcı halen aynı anabilim dalında görevine devam etmektedir.