

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



**ŞEKER OTUNDA (*Stevia rebaudiana* BERTONİ) ANTER KÜLTÜRÜ
YOLUYLA HAPLOİD EMBRİYO UYARTIMI VE BİTKİ REJENERASYONU**

Nawab NASIR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

AĞUSTOS 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



ŞEKER OTUNDA (*Stevia rebaudiana* BERTONİ) ANTER KÜLTÜRÜ
YOLUYLA HAPLOİD EMBRİYO UYARTIMI VE BİTKİ REJENERASYONU

Nawab NASIR

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TARLA BİTKİLERİ

ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

AĞUSTOS 2024

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞEKER OTUNDA (*Stevia rebaudiana* BERTONİ) ANTER KÜLTÜRÜ
YOLUYLA HAPLOİD EMBRİYO UYARTIMI VE BİTKİ REJENERASYONU

Nawab NASIR
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) tarafından FDK-2022-6103 nolu proje ile desteklenmiştir.

AĞUSTOS 2024

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ŞEKER OTUNDA (*Stevia rebaudiana* BERTONI) ANTER KÜLTÜRÜ
YOLUYLA HAPLOİD EMBRİYO UYARTIMI VE BİTKİ REJENERASYONU

Nawab NASIR
TARLA BİTKİLERİ
ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

Bu tez 26/07/2024 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Kenan TURGUT (Danışman)
Prof. Dr. Ersin POLAT
Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI
Prof. Dr. Orhan KURT
Prof. Dr. İsa TELCİ

ÖZET

ŞEKER OTUNDA (*Stevia rebaudiana* BERTONİ) ANTER KÜLTÜRÜ YOLUYLA HAPLOİD EMBRİYO UYARTIMI VE BİTKİ REJENERASYONU

Nawab NASIR

Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Ağustos 2024; 93 sayfa

Stevia rebaudiana'nın yapraklarından elde edilen doğal bir tatlandırıcı olan Stevia, sıfır kalorili, tatlılığı ve sağlığa faydaları nedeniyle popülerlik kazanmıştır. Anter kültürü yoluyla haploid üretimi, *Stevia rebaudiana*'da genetik iyileştirmeyi artırmak ve ıslah programlarını hızlandırmak için umut verici bir tekniktir. Bu çalışmada, T1 ila T7 olarak etiketlenen yedi farklı ortam formülasyonunun etkileri, her biri belirli bileşimlere sahip olarak incelenmiştir: T1 (MS), T2 (MS+0.5 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP), T3 (MS+1.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP), T4 (MS+2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP), T5 (MS+0.5 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ Kin), T6 (MS+1.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ Kin), and T7 (MS+2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ Kin). Ek olarak, Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü gibi üç stevia çeşidi, embriyogenik kallus, embriyo üretimi ve anter kültürü yoluyla bitki rejenerasyonu üzerindeki etkilerini belirlemek için araştırılmış ve her deneme üç kez gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, M1 (MS), M2 (MS + 0.25 mg l⁻¹ BAP), M3 (MS + 0.5 mg l⁻¹ BAP) ve M4 (MS + 1.0 mg l⁻¹ BAP) olarak belirlenen dört ortamda sürgün çoğalması gerçekleştirilmiştir. Sürgün üretiminin ardından, sürgünler üç farklı ortamda köklendirilmiştir (1/2 MS, 1/2 MS+1 mg l⁻¹ NAA ve 1/2 MS+1 mg l⁻¹ IBA). Son olarak, üretilen bitkiler aklimatize edilmiş ve ploidi seviyeleri kloroplast sayısı, stoma sayısı, stoma boyutu ve kromozom sayısı ile belirlenmiştir.

Anterler, yeşilimsi bir renk, kırılabilirlik ve çok sayıda mikrospor içeren iki lob ile karakterize edilen tek çekirdekli aşamada kültüre alınmıştır. Filamentler kültürden önce tamamen uzaklaştırılmıştır. Kültüre alındıktan sonra, anterler on gün boyunca karanlıkta tutulmuştur. Bu sürenin ardından, (T1) MS içerenler hariç, ortamların çoğunda embriyogenik kalli başlatmışlardır. Anter duvarı yarılmış, mikrosporların embriyogenik kalli ve embriyo oluşumunu başlatmasına izin vermiş ve bazı durumlarda doğrudan bitkiciklere dönüşmüştür.

Elde edilen sonuç ve gözlemlere göre, tüm çeşitler ve ortamlar iyi tepki göstermiştir. Ancak, aralarında önemli farklılıklar bulunmaktadır. İlk denemede, ortalama kallus oranı, ortalama embriyo sayısı ve kallus başına ortalama embriyo yüzdesi Levent 93'te diğer çeşitlere kıyasla daha yüksek olmuştur. Uygulamalarla ilgili olarak, ortalama kallus oranı T4'te daha yüksekken, bunu T2, T3 ve T5 takip etmiştir. Embriyo üretim sayısı ve oranı T4, T7, T5 ve T2 ortamlarında daha yüksek görülmüştür. İnteraksiyon sonuçları, Levent 93'ün T4'te en yüksek ortalama kallus üretimi, ortalama embriyo sayısı ve yüzdesi sahip olduğunu göstermiştir. Aynı uygulamada, Tütüncü ve ardından Turgut 82 en yüksek kallus üretimini göstermiştir.

İkinci denemede, ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve yüzdesi Levent 93 ve Turgut 82'de Tütüncü'ye kıyasla daha yüksek olmuştur. Benzer şekilde, T4 kallus üretimi, embriyo sayısı ve yüzde açısından daha iyi bir tepki göstermiştir. T4 ortam, embriyo sayısı ve yüzdesi açısından T7 ile önemli bir fark göstermemiştir. Turgut 82 ortalama kallus üretimi, embriyo sayısı ve yüzdesi için T4'te iyi sonuçlar göstermiştir. Onu aynı ortamda Levent 93 ortalama kallus üretimi için takip etmiştir. Ancak, T4 ortamındaki Turgut 82 ile T7, T6 ve T4 ortamlarındaki Levent 93 arasında embriyo sayısı ve yüzdesi açısından önemli bir fark bulunmamıştır.

Üçüncü denemede, ortalama kallus üretimi Levent 93 ve Turgut 82'de Tütüncü'ye kıyasla daha yüksek olmuştur. Bununla birlikte, embriyo sayısı ve yüzdesi tüm çeşitler arasında önemli farklılıklar göstermemiştir. Ortalama kallus üretiminde, T4, T2'ye benzer şekilde olumlu bir yanıt göstermiş ve bunu T3 izlemiştir. Ancak üçüncü denemede, embriyo üretim sayıları ve oranlarında önemli bir fark görülmemiş, T4, T2, T5, T6 ve T7 benzer sonuçlar göstermiştir. Turgut 82, T4 ve T2'de Turgut 82, T2'de Tütüncü ve T6'da Levent 93 ile karşılaştırıldığında T3'te daha yüksek ortalama kallus üretimi sergilemiştir. Ortamlar ve çeşitler arasındaki etkileşime bağlı olarak embriyo üretim sayıları ve oranlarında önemli bir farklılık görülmemiştir.

Çeşitler arasında sürgün çoğalmasında önemli bir farklılık gözlenmemiştir. Bununla birlikte, M3 ortamı tüm çeşitlerde diğer ortamlara kıyasla önemli ölçüde daha yüksek sürgün üretmiştir. Sürgünler 1/2 MS ortamlarda başarılı bir şekilde köklenmiştir. Ancak, diğer ortamlarda sürgünlerin köklenmesi daha düşük olmuştur. MS ortamının yarısı doğrudan kökten sürgün üretirken, hormon içeren MS ortamı önce kallus ve daha sonra çoklu kök üretmiştir. Aklimatizasyon 20 gün içinde gerçekleşmiştir. Stoma analizi, *in vitro* anter kültüründen elde edilen bitkiler ile kontrol arasındaki farklılıkları ortaya koymuş ve anterden elde edilen bitkiler arasında haploid ve diğer ploid seviyelerinin varlığını göstermiştir.

Özet olarak, bu çalışmada *Stevia rebaudiana*'da haploid bitki elde etmek için anter kültürünün potansiyeli araştırılmıştır. Yedi ortam formülasyonunun ve üç çeşidin değerlendirilmesiyle kallus üretimi, embriyo oluşumu ve kök gelişiminde önemli farklılıklar gözlenmiştir. T4, birden fazla parametrede üstün sonuçları teşvik etmede özellikle etkili olarak ortaya çıkmıştır. Başarılı iklimlendirme ve ploid değerlendirilmesi, bu biyoteknolojik yaklaşımın stevia yetiştiriciliğindeki pratik uygulamalarının altını çizmektedir. Bu çalışma, stevia üretimini daha da ilerletmek için ortam formülasyonlarını optimize etmeyi ve genetik stabiliteyi sağlamak amacıyla gerçekleştirilecek olan gelecekteki araştırmalar için kaynak potansiyeli taşımaktadır.

ANAHTAR KELİMELEER: Anter Kültürü, Haploid, Ploid Analizi, Rejenerasyon, Stevia

JÜRİ: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI

Prof. Dr. Orhan KURT

Prof. Dr. İsa TELCİ

ABSTRACT

INDUCTION OF HAPLOID EMBRYOS AND PLANT REGENERATION VIA ANTHR CULTURE IN STEVIA (*Stevia rebaudiana* BERTONI)

Nawab NASIR

PhD Thesis in the Department of Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Kenan TURGUT

August 2024; 93 pages

Stevia, a natural sweetener derived from the leaves of *Stevia rebaudiana*, is gaining popularity for its zero-calorie sweetness and health benefits. Haploid production through anther culture represents a promising technique for advancing genetic improvement and accelerating breeding programs in *Stevia rebaudiana*. In this study, the effects of seven different media formulations labeled as T1 to T7 were examined, each with specific compositions: T1 (MS), T2 (MS+0.5 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP), T3 (MS+1.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP), T4 (MS+2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP), T5 (MS+0.5 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ Kin), T6 (MS+1.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ Kin), and T7 (MS+2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ Kin). Additionally, three stevia cultivars such as Levent 93, Turgut 82, and Tütüncü were investigated to determine their effects on the production of embryogenic callus, embryos, and plant regeneration through anther culture, with each experiment conducted three times. Subsequently, shoot multiplication occurred in four media designated as M1 (MS), M2 (MS + 0.25 mg l⁻¹ BAP), M3 (MS + 0.5 mg l⁻¹ BAP), and M4 (MS + 1.0 mg l⁻¹ BAP). Following shoot production, the shoots were rooted in three additional distinct media (1/2 MS, 1/2 MS+1 mg l⁻¹ NAA, and 1/2 MS+1 mg l⁻¹ IBA). Finally, the produced plants were acclimatized, and their ploidy level was determined through chloroplast count, stomata count, stomata size, and chromosome count.

The anthers were cultured at the uninucleate stage, characterized by a greenish color, fragility, and two lobes containing numerous microspores. The filaments were completely removed before culture. After culturing, the anthers were kept in the dark for ten days. Following this period, they initiated embryogenic calli in most of the media, except those containing T1 (MS). The anther wall split, allowing the microspores to initiate the formation of embryogenic calli and embryos, and in some cases, they directly developed into plantlets.

Based on the results and observations, all cultivars and media responded well. However, there were significant differences among them. In the first experiment, the mean callus ratio, mean embryo number and percentage per callus were higher in Levent 93 compared to the other cultivars. Regarding treatments, the mean callus ratio was higher in T4, followed by T2, T3 and T5. The number and rate of embryo production were higher in T4, T7, T5, and T2 media. The results of the interaction showed that Levent 93 had the highest mean callus production, mean embryo production, and mean root production in T4. In the same treatment, Tütüncü, followed by Turgut 82, showed the subsequent highest callus production.

In the second experiment, the mean callus ratio, the average number of embryos and percentage per callus were higher in Levent 93 and Turgut 82 compared to Tütüncü. Similarly, T4 showed a better response in terms of callus production, embryo number, and percentage. There was no significant difference between T4 and T7 in terms of embryo number and percentage. Turgut 82 showed good results in T4 for mean callus production, embryo number, and percentage, followed by Levent 93 in terms of average callus production in the same medium. However, there was no significant difference in embryo number and percentage between Turgut 82 in T4 and Levent 93 in T7, T6, and T4 media.

In the third experiment, mean callus production was higher in Levent 93 and Turgut 82 compared to Tütüncü. However, there were no significant differences observed in embryo number and percentage among all cultivars. In terms of average callus production, T4 showed a positive response similar to T2, followed by T3. Nonetheless, in the third experiment, there were no significant differences in embryo production numbers and rates; T4, T2, T5, T6, and T7 showed similar results. When compared to Turgut 82 in T4 and T2, Turgut 82 in T2, Tütüncü in T6, and Levent 93 in T3 exhibited higher average callus production. There were no significant differences in embryo production numbers and rates due to interactions between media and cultivars.

There were no significant differences observed in shoot multiplication between cultivars. However, M3 media produced significantly higher shoots compared to other media across all cultivars. Shoots were successfully rooted in 1/2 MS media. However, the rooting of shoots was lower in other media. The half-strength MS medium produced directly root to shoot while hormone-containing MS media produced callus first and later on a bunch of roots. Acclimatization occurred within 20 days. Stomatal analysis identified differences between plants derived from *in vitro* anther culture and the control plants, revealing the presence of haploid and other ploidy levels among the anther-derived plants.

In summary, this study explores the potential of anther culture for haploid plant production in *Stevia rebaudiana*. Significant variations in callus production, embryo formation, and embryo rate were observed by evaluating seven media formulations and three cultivars. T4 emerged as particularly effective in promoting superior outcomes across multiple parameters. Successful acclimatization and ploidy assessment underscores the practical applications of this biotechnological approach in stevia cultivation. This study has the potential as a resource for future research aimed at optimizing media formulations and ensuring genetic stability to further advance stevia production.

KEYWORDS: Anther Culture, Haploid, Ploidy Analysis, Regeneration, Stevia

COMMITTEE: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Ersin POLAT

Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI

Prof. Dr. Orhan KURT

Prof. Dr. İsa TELCİ

ÖNSÖZ

Stevia yetiştiriciliği, doğal, düşük kalorili bir tatlandırıcı olma potansiyeli nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmektedir. Ticari tatlandırıcı üretiminde kullanılan başlıca tür olan *Stevia rebaudiana*'ya olan talep, verimini, tatlılık profilini ve çeşitli çevresel koşullara uyumunu iyileştirmek için kapsamlı araştırmalar yapılmasına yol açmaktadır.

Tek bir kromozom seti içeren haploid bitkiler, homozigot hatların hızlı bir şekilde üretilmesini kolaylaştırdıkları ve böylece arzu edilen özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesini hızlandırdıkları için bitki ıslahında çok değerlidir. Bu bağlamda, anter kültürü yoluyla haploid bitkiler üretmek, ıslah programlarını hızlandırmak ve genetik iyileştirmeler elde etmek için umut verici bir biyoteknolojik yaklaşımı temsil etmektedir.

Bu araştırma projesinde tescilli üç stevia çeşidi Levent 93, Tütüncü ve Turgut 82 kullanılmıştır. Bu çeşitler, çalışma için çeşitli bir genetik havuz sağlayan farklı genetik geçmişlerine ve agronomik özelliklerine göre seçilmiştir.

Bu araştırmanın temel amaçları şunlardır:

1. Stevia türünde anter kültürü için etkili bir protokol geliştirmek.
2. Seçilen stevia çeşitlerinden haploid bitki üretimini teşvik etmek.
3. Protokolün canlı haploid bitkiler üretmedeki etkinliğini değerlendirmek.
4. Üretilen haploid bitkilerin genetik stabilitesini ve potansiyel agronomik faydalarını analiz etmek.

Çalışmada, kullanılan metodolojiler, karşılaşılan zorluklar ve süreç boyunca geliştirilen çözümler hakkında kapsamlı bilgiler sağlamak üzere yapılandırılmıştır. Bu araştırmanın, bitki biyoteknolojisi ve stevia ıslahına önemli ölçüde katkıda bulunması ve bu değerli ürünün genetik gelişimini artırmak için bir yöntem sunması beklenmektedir.

Doktora çalışmalarım sırasında bana destek olan tez danışmanım Prof. Dr. Kenan TURGUT'a içtenlikle teşekkür ederim. Prof. Dr. Ersin POLAT ve Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI'ya tez izleme komiteme (TİK) katkılarından dolayı müteşekkirim. Pro. Dr. Kenan TURGUT (Danışman), Prof. Dr. Ersin POLAT, Prof. Dr. Hüseyin ÇANCI, Prof. Dr. Orhan KURT ve Prof. Dr. İsa TELCİ'ye tez savunma jürimdeki değerli katkılarından dolayı bir kez daha teşekkür ederim.

Stevia genotipleri de dahil olmak üzere tez materyallerini sağlayan Güney Agripark Ar-Ge Merkezi'ne değerli yardımları için içtenlikle teşekkür ederiz.

Prof. Dr. Ahmet Naci ONUS, Doç. Dr. Tuğçe ÖZSAN KILIÇ, Öğr. Gör. Dr. Buse ÖZDEMİR ÇELİK, Doç. Dr. Adem DOĞAN, Doç. Dr. Utku YÜKSELBABA, Doç. Dr. Mehmet TEKİN ve Dr. Öğr. Üyesi Sevinç ATEŞ'e laboratuvarlarını kullanmama cömertçe izin verdikleri için minnettarım. Laboratuvar arkadaşlarım ve dostlarım Hikmet DEVECİ, Ayşe SAĞIR, Şerife ÜNNÜ, Leyla KURGAN, Ahmad Ratib SHARAFAT, Arş. Gör. Ömer ÖNEL, Ahmet İZMİRLİ ve Qasid ALİ'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yurtdışında eğitim görmemi destekleyen aileme teşekkür ederim. Son olarak, bu tezi maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve Türkiye'deki eğitimim süresince maddi destek sağlayan Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı aracılığıyla Türkiye Cumhuriyeti'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
AKADEMİK BEYAN	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	5
2.1. Stevia bitkisi ve doku kültürü teknikleri :	5
2.1.1. Embriyo kültürü:	5
2.1.2. Meristem kültürü:	5
2.1.3. Mikroçoğaltım:	6
2.1.4. Somatik embriyogenez:	8
2.1.5. Somaklonal varyasyonu:	8
2.1.6. <i>İn vitro</i> seleksiyon:	9
2.1.7. Anter kültürü	10
2.1.8. Protoplast kültürü	11
2.2. <i>Stevia rebaudiana</i> 'nın ıslah programları	12
2.2.1. Genetik çeşitlilik ve gen kaynakları	13
2.2.2. Steviol glikozit içeriği ve tatlılık profilleri:.....	14
2.2.3. Haploid ve double haploid bitki üretimi:	16
2.2.4. Haploid bitkilerin keşfedilmesi:	16
2.2.5. Haploid bitkilerin belirlenmesi:.....	16

2.3. Asteraceae familyasındaki türlerin ıslahında haploid ve double haploid çalışmaları	17
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Materyal	21
3.2. Metot	22
3.2.1. Sitolojik çalışmalar ve tomurcukların toplanması	22
3.2.2. Yüzey sterilizasyonu	23
3.2.3. Tomurcuklardan anterlerin Embriyogenik kallus / embriyo teşvik ortamına alınması ve uygulamaları	23
3.2.4. Embriyonik kallusların ve embriyoların farklılaşma ortamına aktarılması.....	27
3.2.5. Bitkiciklerin köklendirilmesi	28
3.2.6. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması	29
3.2.7. Ploidi analizleri.....	30
3.2.7.1. Kloroplastlar, stoma sayısı ve boyutu.....	30
3.2.7.1.1. Kloroplast boyanması	32
3.2.7.1.2. Stomaların hazırlanması	32
3.2.7.2. Kromozom Sayımı.....	34
3.2.7.3. Kromozom sayımında ikinci yöntem	36
3.2.8. İstatistiksel analiz:	38
4. BULGULAR	39
4.1. İlk denemede ortalama kallus üretimi, kallus başına embriyo sayısı (adet) ve embriyo yüzdesi (%).....	39
4.2. İkinci denemede ortalama kallus üretimi, kallus başına embriyo sayısı (adet) ve embriyo yüzdesi (%).....	48
4.3. Üçüncü denemede ortalama kallus üretimi, kallus başına embriyo sayısı (adet) ve embriyo yüzdesi (%).....	54

4.4. Embriyogenik kalluslardan sürgün oluşumu.....	57
4.5. Sürgünlerin köklenmesi.....	58
4.6. Aklimatizasyon.....	61
4.7. Kloroplast sayısı.....	62
4.8. Stoma Sayısı, Stoma Uzunluğu (µm) ve Genişliği (µm)	64
4.9. Kromozom sayımı	74
5. TARTIŞMA	75
5.1. Farklı ortam ve genotiplerin <i>Stevia rebaudiana</i> 'nın embriyo üretimi ve bitki rejenerasyonu üzerine etkileri	75
5.2. Bitki rejenerasyonları ve aklimatizasyon	78
5.3. Ploidi seviyesini belirleme	78
6. SONUÇLAR	81
6.1. Çeşitler Arasındaki Farklar:	81
6.2. Ortamın Etkisi	81
6.3. İnteraksiyon sonuçları	81
6.4. Sürgün Üretimi	82
6.5. Köklendirme ve Aklimatizasyon.....	82
6.6. Kloroplast ve Stoma Analizi	82
6.7. Kromozom sayımı	82
7. KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora tezi olarak sunduğum “Şeker Otunda (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Anter Kültürü Yoluyla Haploid Embriyo Uyartımı ve Bitki Rejenerasyonu” başlıklı bu çalışmanın, akademik kurallara ve etik değerlere uygun olarak tarafımdan yazıldığını, yararlandığım eserlerin tamamının kaynaklarda gösterildiğini ve çalışmanın içinde kullanıldıkları her yerde bunlara atıf yapıldığını belirtir ve bunu onurumla doğrularım. Bu tezde bana ait olmayan tüm bilgilere kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

24/06/2024

Nawab NASIR

İmzası

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	: Yüzde
.	: Nokta (ondalık ayracının)
±	: Artı-eksi
≈	: Yaklaşık
°C	: Santigrat derece
°F	: Fahrenheit derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
g	: Gram
Kg	: Kilogram
L	: Litre
M	: Mol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
N	: Normalite
nm	: Nanometre
ppm	: Milyonda bir (Parts per million)

Kısaltmalar

AB	: Avrupa Birliđi
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BA	: Benzyladenine (Benzylaminopurine olarak da adlandırılır)
BAP	: Benzylaminopurine (6-Benzylaminopurine olarak da adlandırılır)
2iP	: (2-Isopentenyl) adenine
2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
DH	: Double haploid
FCF	: Fungal kültür filtratı
Gy	: Gray
HCL	: Hidroklorik asit
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografi
IBA	: Indole-3-butyric Acid
IAA	: Indole-3-acetic acid
KBESY	: Kallus başına embriyo sayısı yüzdesi
Kin	: Kinetin
MS	: Murashige ve Skoog
NAA	: Naphthaleneacetic Acid
NaCl	: Sodyum klorür (Sodium chloride)
Ort.	: Ortalama
Ö.D	: Önemli değil
PEG	: Polyethylene Glycol
SG	: Steviol glikozitler
TDZ	: Thidiazuron
UHPLC	: Ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi
UV	: Ultraviyole

Uyg. : Uygulama
vd. : ve diğlerleri
WHO : Dünya Sağlık Örgütü



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Tescilli çeşitlere (Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü) ait bitkileri, yetiştirme mevsiminde Güney Agripark Ar-Ge Merkezi seralarında genel görünüşleri.	21
Şekil 3.2. Çiçek gelişimini yakalamak: tomurcuktan tam çiçeklenmeye kadar, anterler ve dişi organlar genel görünüşü	22
Şekil 3.3. Steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyon işlemlerinden bir görüntü.....	23
Şekil 3.4. Otoklavlamadan sonra besi ortamının steril kabin içinde petri kaplarına aktarılması.	24
Şekil 3.5. A) Filamentsiz anter ve B) Filament içeren anter.....	25
Şekil 3.6. Besi ortamına ekimi yapılan anterlerin karanlık şartlarda kalabilmesi için petrilerin aliminyum folyo ile sarılması. A) Besi ortamına alınmış anterler, B) Karanlık şartlardaki anterler.....	26
Şekil 3.7. Kültüre alınan anterlerin inkübasyonunda kullanılan iklimlendirme kabini..	27
Şekil 3.8. A) Alt kültüre alınan kalluslar, B) Embriyolardan başarılı bir şekilde sürgünlere gelişimi.....	28
Şekil 3.9. Sürgünlerin steril kabin içinde dipten kesilerek köklendirme ortamına aktarılması. A) Farklılaşmış sürgünlerin kesim için çıkarılması, B) Sürgünlerin köklendirme ortamına yerleştirilmesi ve köklenmenin oluşması.....	29
Şekil 3.10. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması süreci.	30
Şekil 3.11. Kloroplastlar stomaların her iki koruyucu hücrelerinde de sayılması.....	31
Şekil 3.12. Stomaların genişliği ve uzunluğu mikrometre (μm) cinsinden ölçülmesi....	32
Şekil 3.13. Stomaları sayılması, uzunluklarının ve genişliklerinin ölçülmesi.....	33
Şekil 3.14. Etanol asetik asitte yaprak fiksasyonu. A) 3:1 etanol asetik asit çözeltisine daldırıldıktan sonra yaprak ve B) Mikroskopik lam.	34
Şekil 3.15. Kromozom sayımı için çeliklerin hazırlanması. A) Çelik ve B) 10 gün içinde köklenen bitkiler.....	35
Şekil 3.16. A) Ön işlem görmüş kök, B) Enzim veya HCl içinde inkübe edilmiş köklere sahip slaytlar, C) Masere edilmiş ve boyanmış kök , D) Mikroskop altında kromozomları görülebilen stevia hücreleri.	36
Şekil 4.1. Levent 93 çeşitinde anterler farklı pozisyonlardan çatlamış ve embriyogenik kallı başlangıcı yaklaşık 20 gün sonra gerçekleşmiştir.....	42

Şekil 4.2. Turgut 82 çeşidinde anterler farklı pozisyonlardan çatlamış ve embriyogenik kallı başlangıcı yaklaşık 20 gün sonra gerçekleşmiştir.....	42
Şekil 4.3. Tütüncü çeşidinde anterler farklı pozisyonlardan çatlamış ve embriyogenik kallı başlangıcı yaklaşık 20 gün sonra gerçekleşmiştir.....	43
Şekil 4.4. Levent 93 çeşidinde 30 gün sonra farklı embriyo tipleri; A) T2 ortamı, B) T3 ortamı, C ve D) T4 ortamı, E) T6 ortamı, ve F) T7 ortamı	44
Şekil 4.5. Turgut 82 çeşidinde 30 gün sonra farklı embriyo tipleri; A) T2 ortamı, B-D) T4 ortamı, E-G) T6 ortamı, ve H) T7 ortamı.....	45
Şekil 4.6. Tütüncü çeşidinde 30 gün sonra farklı embriyo tipleri; A-B) T5 ortamı ve C-D) T4 ortamı.....	46
Şekil 4.7. Levent 93 çeşidinde çubuk embriyoları; A) T2 ortamı, B) T3 ortamı, C) T4 ortamı, D) T5 ortamı ve E) T7 ortamı.....	50
Şekil 4.8. Turgut 82 çeşidinde çubuk embriyoları; A) T2 ortamı, B) T4 ortamı ve C) T6 ortamı	51
Şekil 4.9. Tütüncü çeşidinde T4 ortamında çubuk embriyoları.....	51
Şekil 4.10. Embriyogenik kallustan gelişin sürgünler	58
Şekil 4.11. Farklı ortamlarda kök üretimi. A-C) IBA veya NAA hormonu olmadan ve D) hormonlu (NAA veya IBA).....	60
Şekil 4.12. Aklimatizasyon'dan sonra dış koşullara alışmış bitkiler	61
Şekil 4.13. Stevia çeşitlerinin koruyucu hücrelerinin içindeki ortalama kloroplast.	63
Şekil 4.14. Şekilde anter türevi bitkilerin stomalarının iki farklı koruyucu hücresindeki kloroplast sayıları gösterilmektedir	63
Şekil 4.15. Şekilde kontrol bitkileri stomalarının iki farklı koruyucu hücresindeki kloroplast sayıları gösterilmektedir.....	64
Şekil 4.16. Turgut 82 rejenerant bitkilerini stoma sayısı.....	65
Şekil 4.17. Turgut 82 rejenerant bitkilerinin stoma uzunluğu (µm)..	66
Şekil 4.18. Turgut 82 rejenerant bitkilerinin stoma genişliği (µm)..	67
Şekil 4.19. Çeşitli anter türevli Turgut 82 rejenerantlarında stoma uzunluğu ve genişliği (µm).	68

Şekil 4.20. Tütüncü rejenerant bitkilerinin stoma sayısı.....	69
Şekil 4.21. Tütüncü rejenerant bitkilerinin stoma uzunluğu (µm).....	70
Şekil 4.22. Tütüncü rejenerant bitkilerinin stoma genişliği (µm).....	71
Şekil 4.23. Çeşitli anter türevli Tütüncü rejenerantlarında stoma uzunluğu ve genişliği (µm).....	71
Şekil 4.24. Levent 93 rejenerant bitkilerinin stoma sayısı.....	72
Şekil 4.25. Levent 93 rejenerant bitkilerinin stoma uzunluğu (µm).....	73
Şekil 4.26. Levent 93 rejenerant bitkilerinin stoma genişliği (µm).....	73
Şekil 4.27. Çeşitli anter türevli Levent 93 rejenerantlarında stoma uzunluğu ve genişliği (µm).....	74
Şekil 4.28. A) Köklenmiş bitki ve B) Levent 93 hücre içerisinde kromozomları.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Embriyogenik kallus ve embriyo indüksiyon ortamları	26
Çizelge 3.2. Embriyogenik kallus farklılaşması için kullanılan ortamlar.....	27
Çizelge 3.3. Çeşitli ortamların bitki köklenmesini teşvik etme üzerindeki etkileri.....	29
Çizelge 3.4. Stevia kromozom sayımı için kullanılan ön işlem yöntemleri	35
Çizelge 4.1. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve embriyo oranı (%) üzerindeki etkileri.....	41
Çizelge 4.2. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve kallus başına ortalama embriyo oranı üretimi üzerindeki etkileri	47
Çizelge 4.3. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve embriyo oranı (%) üzerindeki etkileri.....	52
Çizelge 4.4. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve kallus başına ortalama embriyo oranı üretimi üzerindeki etkileri	53
Çizelge 4.5. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve embriyo oranı (%) üzerindeki etkileri.....	55
Çizelge 4.6. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve kallus başına ortalama embriyo oranı üretimi üzerindeki etkileri	56
Çizelge 4.7. Çeşitlerin ve ortamların embriyogenik kallusun sürgün üretimi üzerine etkileri.....	57
Çizelge 4.8. Embriyogenik kallusun sürgün üretimi üzerine çeşit ve ortamın etkileri	58
Çizelge 4.9. Farklı ortamların <i>in vitro</i> bitkilerin kök üretimi üzerindeki etkileri	59
Çizelge 4.10. Turgut 82, Levent 93 ve Tütüncü çeşitlerini bitkilerin dış koşullara alıştırılması	62

1. GİRİŞ

Tarih boyunca insanlar gıda, kozmetik, sağlık gibi çeşitli endüstrilerde, tıbbi bitkileri kullanmış ve geleneksel tıbbın temeli olarak çeşitli hastalıkları tedavi etmişlerdir (Niazian, 2019; Rolnik ve Olas, 2021). Rolnik ve Olas (2021) Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, küresel nüfusun %80'den fazlasının sentetik alternatiflere kıyasla daha uygun fiyatlı, erişilebilir ve daha az yan etkiye sahip olması nedeniyle bitki bazlı ilaçları tercih ettiğini ve geleneksel halk tıbbının güvenilir olduğunu belirtmişlerdir. Modern analiz yöntemleri, geleneksel tıbbi bitkilerde birçok umut verici bileşiği ortaya çıkarmıştır.

Geleneksel olarak, bu bitkilerin ıslahı klasik biyoteknolojik yöntemlere dayanmıştır. Ancak Niazian (2019), daha iyi sonuçlar için gelişmiş tekniklerin benimsenmesini önermektedir. Genetik çeşitlilik değerlendirmesi, korunma, çoğaltma ve artan üretim, genetik ve biyoteknolojinin tıbbi bitkilerin geliştirilmesini hızlandırabileceği temel yollar arasındadır (Niazian, 2019).

Çiçekli bitkiler Dünya'daki vasküler türlerinin en az %95'ini oluşturmakta ve ayçiçeği veya papatya ailesi olarak bilinen *Asteraceae* (Compositae) familyası, bu çeşitliliğin yaklaşık %10'unu kapsamaktadır. Bu, 25,000 ila 35,000 türü kapsayan en büyük çiçekli bitki ailesi olarak bilinmektedir. Bu ailenin taksonomik karmaşıklığı, geniş boyutu ve yaygın dağılımı nedeniyle öncelikle sınıflandırma için önemli zorluklar oluşturmaktadır (Mandel vd., 2019).

Stevia rebaudiana Bertoni, *Asteraceae* familyasından, yüksek miktarda SG (Steviol glikozitler) içermesi nedeniyle tatlandırıcı özelliği için kültüre alınan ve dünya çapında yetiştirilen çok yıllık bir çalıdır. SG, sükroza göre 100-300 kat daha tatlıdır (Ahmad vd., 2020). Boyu 65-80 cm'ye ulaşan bu küçük çok yıllık çalı, karşılıklı dizilmiş yapraklara sahiptir (Goyal vd., 2010). Kırılğan bir gövde üzerinde sırayla düzenlenmiş eliptik yapraklarla birlikte otsu bir büyüme alışkanlığı sahiptir. Belirsiz küçük beyaz çiçekler üretir ve bu çiçeklerin poleni güçlü alerjik reaksiyonlara neden olabilir (Singh ve Rao, 2005). Her çiçek tomurcuğu içinde beş çiçekçik bulunur, bu da beş çiçeğin ortaya çıkmasına neden olur. Anterler küçük boyutlarda, beşerli setler halinde bulunurken, stigma merkezden çıkan çift loblu ya da bifurke olarak adlandırılan bir yapı sergiler, stil anterler tarafından çevrelenir.

Goyal vd. (2010) çeşitli türleri arasında *S. rebaudiana*'nın en tatlısı olduğunu ve çoklu potansiyel tatlandırıcı bileşikleri içerdiğini belirtmişlerdir. Yarı nemli subtropikal iklimlerde gelişen, 6.5-7.5 pH aralığında, drenajı iyi kırmızı toprak veya kumlu toprakları tercih etmekte, ancak tuzlu topraklardan kaçınmaktadır. Ancak, belirli iklim koşullarında tek yıllık ve çok yıllık büyüme özellikleri göstermekte ve genellikle subtropikal ve tropikal iklimlerde yetiştirilmektedir (Gautam vd., 2022).

Stevia rebaudiana bitkisinin taksonomik sınıflandırılması aşağıda verilmiştir (Grashoff, 1972) bulunmaktadır.

Alem—*Plantae*

Bölüm—*Magnoliophyta*

Sınıf—*Magnoliopsida*

Grup—*Monoklamid*

Takım—*Asterales*

Familya—*Asteraceae*

Kabile—*Eupatorieae*

Cins— *Stevia*

Tür—*rebaudiana*

Botanik adı: *Stevia rebaudiana* Bertoni

Stevia hem eşeyli hem de eşeysiz olarak çoğaltılabilir. Doğal habitatında, genellikle küçük tohumlarla çoğalır ve bir hektarlık ekim alanı için yaklaşık 40 g tohum gerekir (Gautam vd., 2022).

Ancak, tohum çimlenmesi genellikle düşüktür, bunun sebebi tohumların çimlenme oranının düşük olması ve belirli bitki çeşitlerine veya seçimlerine, kendine uyumsuzluğa dayandırılmaktadır ve neredeyse hiç canlı tohum üretilmemektedir (Singh ve Rao, 2005). Çelikle ya da doku kültüründe mikroçoğaltma ile eşeysiz olarak çoğaltılabilmektedir.

Ancak, Khalil vd. (2014), hem çelik ve tohumla çoğaltmanın daha yüksek biyokütle ve sağlıklı fideler elde etmek için maliyetinin uygun olmadığını belirtmiş ve en etkili yaklaşımın mikroçoğaltma olduğunu öne sürmüşlerdir. Bu bağlamda rejenerasyon için yaprak eksplantı kullanarak bir protokol geliştirmişlerdir. Gautam vd. (2022), fidelerinin genellikle ocak-mart ayları arasında yetiştirildiğini, ancak polikarbonatlı seralarda yıl boyunca yetiştirilebileceğini ve 5–7 yapraklı iki aylık fidelerin tarlaya şaşırtılabildiğini belirtmişlerdir.

Stevia'nın doğal tatlılığı böcekleri uzaklaştırıcı bir etki göstermektedir ve bu da yetiştiriciliğinde insektisitlere olan ihtiyacı azaltmaktadır (Singh ve Rao, 2005). Kanada'da rapor edilmiş fungus hastalıkları olmasına rağmen (*Septoria* (yaprak lekesi) ve *Sclerotinia sclerotiorum*), genel olarak güçlü bir zararlı direncine sahiptir. En uygun hasat dönemi, çiçeklenmeden önce başlamaktadır. Hasat işlemi budama makası kullanılarak dalların kesilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Singh ve Rao, 2005).

İnsanların doğal tatlandırıcılara olan ilgilerinin artmasıyla, düşük şeker ve az kalorili yiyeceklere olan talep de artmıştır. Tatlandırıcılar, kökenlerine (sentetik veya doğal), besin değerlerine (kalorili veya kalorısız), dokularına (şuruplar veya tozlar) ve teknik fonksiyonlarına (dolgular veya tatlandırıcılar) göre sınıflandırılmaktadır. Doğal tatlandırıcılar, glukoz, fruktoz ve sukroz gibi şeker türevleri; eritritol, manitol ve sorbitol gibi şeker alkolleini; ayrıca *stevia* ve *taumatin* gibi çeşitli bileşikler içermektedir. Avrupa ve ABD'nde, yiyeceklerde kullanım için güvenli kabul edilen yalnızca altı düşük kalorili tatlandırıcının bulunduğu belirtilmektedir: sukraloz, neotam, acesulfame-K, sakarin, aspartam ve *stevia*'dır (Olas, 2022). *Stevia*'nın taze yapraklar,

kurutulmuş yapraklar, stevia özütü ve sıvı konsantreler olmak üzere farklı formlarda kullanımı mevcuttur. Bu formlar arasındaki seçim, istenen tatlılık seviyesine bağlı olarak değişmektedir ve beyaz özüt tozlarının en tatlı olduğu belirtilmektedir (Singh ve Rao, 2005).

Dyduch-Sieminska vd. (2020) ye göre Japonya’da SG’lerin tatlandırıcı olarak güvenliği hakkında 40,000’den fazla klinik çalışma yürütülmüş olup, özlerinin intravenöz enjeksiyon çalışmaları da dahil olmak üzere, farelerdeki potansiyel tıbbi uygulamaları olan glukoz metabolizması, diürez, organ ağırlıkları, endokrin fonksiyon ve anti-androjenik aktivite üzerinde derinlemesine incelendiğini belirtmişlerdir. SG; ABD, Kanada, Brezilya, Güney Afrika ve AB’nde gıda üretiminde kullanılmaktadır (Kurek ve Krejpcio, 2019). Dünya genelinde birçok bölgede Stevia’nın mevcudiyeti ve yasal durumunun bilinmediği ancak bunun hızla değiştiği ve Stevia özütlerinin kullanımının daha yaygın hale gelmiştir. Örneğin, çikolata, yoğurt, ketçap, konserve sebzeler, reçel, dondurma, sakız, çeşitli içecekler ve sofrada kullanılan tatlandırıcılar bu özütleri içermektedir. Ayrıca, stevia ilk kez Japonya’nın gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılmış olup popüleritesi giderek artmaktadır (Uskutoglu vd., 2019).

Stevia’nın artan piyasa değeri, daha yüksek glikozit konsantrasyonuna sahip yeni çeşitler geliştirme hedefi ortaya çıkarmıştır. Ancak yeni çeşit geliştirmek için önemli zorluklar bulunmaktadır (Uskutoglu vd., 2019). Araştırmacılar, stevia’nın yabancı tozlaşan bir bitki olduğunu ve geleneksel yöntemlerle ıslahının 8-10 yıl sürdüğünü belirtmişlerdir. Ayrıca, Stevia bitkisi kendine kısırdır ve bu nedenle düşük çimlenme oranına sahiptir. Bu faktörler nedeniyle, geleneksel stevia ıslah tekniklerinin geleceği belirsiz olmasına karşın DH (double haploid) teknolojisi genellikle Stevia ıslahı için iyi bir seçenektir. Bu teknoloji, bitki ıslahında çok önemli olan %100 homozigot hatlar üretmeye olanak sağlamaktadır.

Gametik kromozom sayısına (n) sahip olan sporofitler, haploid bitkiler olarak bilinmektedir. Bu bitkilerin kromozomları kendiliğinden (spontan) veya yapay olarak katlandığında elde edilen bitkiler, DH bitkiler olarak adlandırılmaktadırlar (Germana, 2011). DH bitkiler, kromozomların tüm lokuslarının aynı alellere sahip, DH bir kromozom takımından türetilmiş diploid bir genomu olan (%100 homozigot) bitkilerdir (Segui-Simarro vd., 2021).

Bu bitkilerin temel ve uygulamalı araştırmalarda ve ıslah programlarında saf hatlar olarak sıkça tercih edildiği ve melez tohum üretimi için kullanılan %100 homozigot bireyler oldukları belirtilmektedir. Teorik olarak, haploid hücreler sadece iki kaynaktan elde edilmektedir. Bunlar, mikrospor ana hücrelerinin mayozundan elde edilen erkek haploid çekirdekler veya megaspor ana hücrelerinin mayozundan türetilen dişi haploid çekirdeklerdir. Ancak, bu haploid hücrelerin sadece birkaçı gerçekte haploid/DH bitkiler oluşturmaktadır. Doğal veya deneysel koşullar altında bitkilerde bulunan bir dizi sürecin kullanılmasıyla, bu hücrelerin haploid ve/veya DH bitkiler oluşturmaya neden olabilecek farklı yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bunlardan en yaygın iki yaklaşım, *in vitro* ve *in vivo* tekniklerdir. *İn vitro* yöntemler arasında mikrosporlar, anter, ovaryum, ovüller ve çiçek tomurcukları bulunurken, *in vivo* yöntem haploid indüktör hatlarını içermektedir. Erkek haploid hücrelerden haploid/DH bitkilerin oluşturulmasına *in vitro* androgenezis, dişi haploid hücrelerden haploid/DH bitkilerin üretilme sürecine ise *in vitro* ginogenezis adı verilmektedir. Mikrosporlar ve

dişi yumurta hücreleri, *in vitro* haploid/DH indüksiyonunun en başarılı olduğu haploid hücrelerdir. Androgenik DH'ların *in vitro* oluşturulması, ginogenik DH'ların oluşturulmasından daha etkili olduğu kanıtlanmıştır. Androgenezin iki temel yöntemi olan anter ve izole mikrospor kültürü bulunmaktadır (Warchol vd., 2019). Anter kültürü, DH'lerin üretilmesi için en yaygın kullanılan yöntemdir. Teknik olarak basittir ve genellikle aşağıda listelenen aşamalardan oluşmaktadır (Segui-Simarro vd., 2021).

- (1) Uygun çiçek tomurcuğunu toplama,
- (2) Çiçek tomurcuklarından anterlerin izolasyonu,
- (3) Kültür ortamında inokülasyon ve *in vitro* kültüre alma,
- (4) Embriyoların izolasyonu,
- (5) Bitkilerin rejenerasyonu,
- (6) Rejenerantların analizi

Anter kültür performansını etkileyen birçok değişken olup, bunlar arasında genotip, donör bitkinin büyüme koşulları, çeşitli stres faktörleri, mikrospor gelişim evresi ve ortam bileşimi bulunmaktadır (Uskutoglu vd., 2019). Bu değişkenler arasında genotip en önemli olanıdır ve genotip embriyogenezis için yetersizse diğer uygulama etkisiz olabilmektedir.

Bu çalışmada, farklı çeşitleri (Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü) kapsayan Stevia'da anter kültürünün potansiyeli araştırılmıştır. Anter kültürü tekniğinin kullanılarak, Stevia'nın antenlerinden doğrudan veya dolaylı embriyoların gelişmesiyle mikrospordan türetilmiş haploid veya DH bitkilerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Bu yenilikçi yaklaşım, Stevia'da çeşit geliştirme ve üreme stratejilerinin ilerletilmesinde umut vadetmektedir. Araştırmada, Stevia'nın üreme biyolojisinin anlaşılmasına katkıda bulunma, genetik iyileştirme ve ürün geliştirme alanında yeni yaklaşımlar geliştirmek hedeflenmiştir. Son olarak, bu çalışmada gelişmiş özelliklere ve yüksek verime sahip iyileştirilmiş Stevia çeşitlerinin geliştirilmesini kolaylaştırarak, doğal tatlandırıcılar ve farmasötik bileşenler için artan talebi karşılamayı amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. Stevia bitkisi ve doku kültürü teknikleri :

Bitki doku kültürü, daha iyi tarımsal performans için bitki manipülasyonunun geliştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Smith ve Drew (1990), doku kültürünü, steril koşullar altında çeşitli bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının yetiştirilmesini içeren bir süreç olarak tanımlamışlardır. Bu, kesilmiş embriyolar ve protoplastları da içermektedir. Ancak, belirli bitki türlerinin dokularının kültürlenmesinde zorluklarla karşılaşılması, *in vitro* yetiştirme koşullarının optimize edilmesini gerektirmektedir. Başarılı bitki doku kültürü için şu temel ilkelere uyulmalıdır: (1) sağlıklı eksplantın seçilmesi, (2) eksplanttan mikrobiyal kontaminasyonun uzaklaştırılması, (3) eksplantın uygun bir kültür ortamına aktırılması ve (4) kontrollü çevre koşullarının sürdürülmesi.

In vitro rejenerasyonu geçirmiş bitkiler için, sera koşullarında adaptasyon, onların *ex vitro* koşullara aktarılmasından önce gerçekleştirilir (Loyola-Vargas ve Ochoa-Alejo, 2018). Araştırmacılar, kültüre alınan bitki kısmına dayanarak, bunları hücre kültürü (gametik hücreler, hücre süspansiyonu ve protoplast kültürü), doku kültürü (kallus ve farklılaşmış dokular) ve organ kültürü (zigotik embriyolar, kökler, sürgünler, anterler vb.) şeklinde kategorize ettiklerini belirtmişlerdir. Çeşitli kültürler hem temel hem de biyoteknolojik uygulamalarda farklı amaçlar için kullanılır. Genel olarak, aşağıdaki doku kültürü teknikleri ve uygulamaları mevcuttur.

2.1.1. Embriyo kültürü:

Embriyo kültürü, bitki ıslahında kullanılan ilk doku kültürü yöntemlerinden biri olarak kabul edilir. Bu süreç, embriyonun tohumdan çıkarılmasını ve ortaya çıkan bitkinin daha fazla olgunlaşması için toprağa aktarılana kadar *in vitro* ortamda büyümesini gerektirir (Smith ve Drew, 1990). Embriyonun zarar vermeden hassas bir şekilde izole edilmesi, uygun besin ortamının hazırlanması ve devam eden Embriyogenik büyüme ve fide oluşumunun başlatılmasına dayanan bu teknikte, hem olgunlaşmamış hem de olgun zigotik embriyolar kullanılabilir (Bridgen, 1994). Olgunlaşmamış embriyo kültürünün, tipik olarak olumsuz koşullardaki embriyoları kurtarmak için kullanılan bir strateji olduğu belirtilmiştir. Diğer yandan, olgunlaşmış tohumlardan elde edilen olgun embriyoların kültürü, özellikle dormansi gibi konuların ele alınması gerektiğinde, tohum çimlenmesine engel olan faktörlerini ortadan kaldırma veya üreme döngüsünü hızlandırma amacına hizmet eder.

Bildiğimiz kadarıyla, stevia embriyo kültürü üzerine mevcut herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Bunun sebepleri tohumlarının çok küçük boyutta ve tohum veriminin düşük olması olabilir.

2.1.2. Meristem kültürü:

Morel (1960), tipik olarak meristemin iki veya üç yaprak primordiası ile birlikte çıkarılmasını ve ardından uygun bir besin ortamında kültüre alınmasını ihtiva eden bir teknik olan meristem kültürüne öncülük etmiştir. Meristem kültürünün sarımsak, çilek,

patates ve şeker kamışı gibi çeşitli bitkilerdeki virüsleri ortadan kaldırmada etkili olduğu kanıtlanmıştır (Quack, 1977). Bu teknik şu anda bitki materyallerinden çok sayıda viral hastalığın sistematik olarak yok edilmesi için standart bir uygulamadır. Mikroçoğaltma yöntemlerinin entegre edilmesiyle, meristematik eksplantlar kullanılarak hastalıklardan arındırılmış bol miktarda bitki üretmek mümkün hale gelmiştir. Smith ve Murashige (1970), *Nicotiana tabacum* L., *Daucus carota* L., *Nicotiana glauca* Grah., *Tropaeolum majus* L. ve *Coleus blumei* Benth'den izole edilmiş sürgün apikal meristemlerini kullanarak tam bitki gelişimini başarıyla gerçekleştirmiştir. Eksplantlar yalnızca meristematik uç dokusundan oluşmuş ve gözlemlenebilir yaprak primordiası içermemiştir. İzole bitki organlarını yetiştiren araştırmacılar, daha doğru bir şekilde sürgün ucu olarak adlandırılması gereken apikal meristem terimini genellikle belirsiz bir şekilde kullanmışlardır. Cutter (1965), gözlemlenen farklılıklara dayanarak, morfogenetik davranışta bir ayrım belirlemiştir ve apikal meristemi sürgün ucuyla ayırmıştır. Cutter'a göre çoğu bitki türünde apikal meristem, sürgün ucunun en genç yaprak primordiumunun ötesinde yer alan kısmını kapsar. Bu arada, sürgün ucu hem apikal meristemi hem de alta yatan birkaç yaprak primordiumunu içerir.

Ali vd (2010) *Stevia rebaudiana* Bertoni'in hem apikal hem de nodal meristemlerden mikroçoğaltım potansiyelini araştırmak için *in vitro* çoğaltımını ve yaprak, düğüm ve internod eksplantları kullanarak kallogenezini gerçekleştirmişlerdir. Sürgün oluşumu için en uygun ortam 1.0 mg l⁻¹ BAP ile desteklenmiş MS bazal ortamı olarak belirlenmiştir. Bu ortam, sürgün apikal veya nodal meristemlerden türetilmiş olmasına bakılmaksızın, meristem inokülasyonundan sonraki 12 gün içinde %90 oranında sürgün oluşumu yanıtı vermiştir. Ayrıca, Majumder ve Rahman (2016) *Stevia rebaudiana* Bertoni'nin doğrudan ve dolaylı organogenez yoluyla tekrarlanabilir rejenerasyon protokolünü geliştirmiştir. Sürgün ucu, yaprak ve nodal eksplantlar, çeşitli bitki büyüme düzenleyicileri ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün tepesi doğrudan organogenez sergilerken, yaprak segmenti dolaylı organogenez ortaya koymuştur. Tersine, nodal segmentte hem doğrudan hem de dolaylı organogenez gözlenmiştir. En yüksek miktarda yeşil kompakt kallus, 1.0 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ IAA ile desteklenmiş MS ortamında nodal eksplantlardan üretilmiştir. Daha sonra, indüklenen kallı sürgün çoğalmasını teşvik etmek için kültüre alınmıştır. En yüksek sürgün tomurcuğu oluşumu 1.5 mg l⁻¹ BAP + 0.5 mg l⁻¹ IAA ile zenginleştirilmiş MS ortamında gözlenmiş ve maksimum 15.30 ± 0.15'e ulaşmıştır. Uzama ortamındaki müteakip kültür, çoklu sürgün tomurcuklarının hızlı uzamasıyla sonuçlanmış ve en büyük uzama (6.90 cm) 1.0 mg l⁻¹ BAP + 1.0 mg l⁻¹ IAA içeren MS'de gözlenmiştir. Uzayan sürgün tomurcukları, 1.0 mg l⁻¹ IBA ile güçlendirilmiş yarı kuvvetli MS ortamında 4.40 cm ölçülerinde sağlam kökler geliştirmiştir.

2.1.3. Mikroçoğaltım:

Mikroçoğaltma, hastalıklardan ve zararlılardan arı, üstün bitki genotiplerinin hızlı, klonal çoğaltılmasına odaklanan geleneksel bitki çoğaltma yöntemlerinin bir uzantısı olarak kullanılmaktadır (Smith ve Drew, 1990). Araştırmacılar, mikroçoğaltmanın öncelikle yüksek kaliteli bitkilerin büyük ölçekli çoğaltılması için

kullanıldığını belirtmektedir. Ancak, geleneksel çoğaltma yöntemleri genellikle yavaş ilerler ve hastalıklar ile zararlılar gibi sorunlar, üretimi engelleyebilir.

Mikroçoğaltım yılda binlerce hatta milyonlarca bitki üretme potansiyeline sahip olsa da, pratik uygulaması genellikle kullanım sınırlamaları nedeniyle kısıtlanmaktadır. 21. yüzyılda olmamıza rağmen, mikroçoğaltımda bazı zorluklar devam etmektedir. Bu zorluklar, mevcut tekniklerin verimliliğinin artırılmasını, yeni yöntemlerin geliştirilmesinde yenilik eksikliğini, mikroçoğaltma için dirençli türlerin korunmasındaki zorlukları ve yüksek maliyeti nedeniyle mikroçoğaltmanın daha ucuz alternatiflerle potansiyel olarak ikame edilmesini içermektedir (Cardoso vd, 2018).

Stevia rebaudiana Bertoni, tıp, eczacılık ve gıda endüstrisinde değerli bir bitki olup, son yıllarda giderek daha belirgin hale gelmektedir. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada (Miladinova-Georgieva vd., 2022), *S. rebaudiana*'yı yetiştirmek için biyoteknolojik yaklaşımların uygulanmasının bitkilerin tarımsal özelliklerini geliştirebileceği ve steviol glikozit üretimini iyileştirebileceği sonucuna varılmıştır.

Örneğin, Kaplan vd. (2019) çoğaltma için *Stevia rebaudiana*'nın nodal eksplantını kullanmış ve 13 hafta içinde yaklaşık 200 kat artış bildirmiştir. Bu, Gelrite ile katılaştırılmış $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP ve $0,25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ kinetin ile zenginleştirilmiş MS ortamı kullanılarak elde edilmiştir.

Soliman vd. (2014), stevia'nın çoğaltılması için MS ortamında nodal segmentler kullanarak, değişen BA, NAA, IAA ve TDZ konsantrasyonları ile ilgili yürüttükleri çalışmada optimum aksiller sürgün sayısı (3.24) ve maksimum sürgün uzunluğu (3.12 cm) MS ortamında 1.0 mg l^{-1} BA + 0.05 mg l^{-1} NAA ve 2.0 mg l^{-1} BA + 0.05 mg l^{-1} NAA ile gerçekleşmiş, iki hafta içinde köklenme, sırasıyla $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IAA ve $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ IAA ile zenginleştirilmiş MS ortamında en yüksek kök indüksiyon yüzdesini (%98.72), sürgün başına maksimum kökü (9.46) ve en uzun kök uzunluğunu (9.87 cm) göstermiştir.

Rokosa ve Kulpa'ya (2020'ye) göre, MS ortamında çoğaltılan bitkilerden alınan tek boğumlu sürgün parçaları, $0,5$, 1 , 2 ve $5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ konsantrasyonlarında BAP, 2iP ve KIN ile desteklenmiş ortamda kültüre alınmıştır. Köklenme aşamasında, IAA, IBA ve NAA 1 , 2 , 4 ve $8 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ konsantrasyonlarında eklenmiştir. En yüksek sürgün ve yaprak sayısı $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP ile zenginleştirilmiş MS ortamında çoğaltılan bitkilerde gözlenmiştir. *Stevia*, $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IAA ile zenginleştirilmiş MS ortamında kültüre alındığında en fazla sayıda en uzun kökleri sergilemiştir.

Ramírez-Mosqueda vd. (2016'da) Otomatik Geçici Daldırma için (RITA®) kullanarak uygun maliyetli, otomatik bir mikroçoğaltma protokolü önermişlerdir. Optimize edilmiş koşullar altında, her 8 saatte bir 2 dakikalık daldırma ile 1 mg l^{-1} BA içeren protokol, en yüksek sürgün sayısını (18.37) sağlamıştır. MS ortamında bitki büyüme düzenleyicileri (PGR) olmadan köklenme (%100) sağlanmıştır. Rejenere edilen bitkiciklerin %90'ının sera koşullarında başarılı bir şekilde alıştırıldığı ve düşük bir genetik varyasyon yüzdesine (%10.4) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bu protokol, *Stevia rebaudiana*'nın ticari mikroçoğaltımı için pratik ve ekonomik olarak uygulanabilir bir çözüm sunmaktadır.

Başka bir çalışmada, *S. rebaudiana* için sürecin büyük bir kısmında bitki büyüme düzenleyicileri içermeyen MS bazal ortamı kullanılarak uygun maliyetli bir mikro çoğaltım protokolü geliştirilmiştir. Nodal segmentlerden sürgün oluşumu BAP ve KIN (0.1, 0.5, 1.0 veya 2.0 mg l⁻¹) içeren veya içermeyen MS ortamında gerçekleşmiştir. Tüm uygulamalar 3 hafta sonra eksplant başına iki sürgün vermesine rağmen, daha yüksek KIN ve BAP konsantrasyonları daha fazla kallus oluşumuna neden olmuştur. Köklenme, 0.25 mg l⁻¹ IAA içeren MS ortamında başarılı olmuş ve 3 hafta sonra sürgün başına 8.1 kök üretmiştir (Yücesan vd., 2016).

Vives vd. (2017) *in vitro* tekniklerin cazip bir alternatif sunduğunu, ancak düşük çoğaltma ve yeniden üretilebilirlik oranlarının endişe verici olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle, BIT® gibi biyoreaktör sistemlerin *in vitro* doğal tatlandırıcı üretimini geliştirmek için çeşitli yöntemler gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Yarı katı ortam, sıvı ortam ve BIT® arasında yapılan bir karşılaştırma, 21 günlük kültürde BIT® türevi sürgünlerin üstün morfolojik kalitesini ortaya koymuştur. Sürgün taze ve kuru ağırlığı ile birlikte, BIT® sıvı veya yarı katı ortamda mikroçoğaltımdan daha iyi performans göstererek yedi kattan fazla artış göstermiştir. Ayrıca, üretilen steviol glikozitlerin toplam içeriği biyoreaktörlerde daha yüksek olmuştur.

BIT®'in *in vitro* bitki metabolitleri üretmedeki etkinliği bilinmektedir, ancak sürecin ekonomik verimliliğini artırmak için daha fazla deneme yapılması gerekmektedir. Diğer etkili çalışmalar arasında (Mitra ve Pal, 2007; Seyis vd., 2017; Yesmin, 2019; Rezvankhah vd., 2022) yer almaktadır.

2.1.4. Somatik embriyogenez:

Somatik embriyogenez, somatik (gametik olmayan) kökenli hücrelerden embriyoları andıran yapıların oluşumunu ifade etmektedir (Smith ve Drew, 1990). Somatik embriyogenezin önemli bir aşaması, hücre kimliğinin somatik bir hücreden embriyonik bir hücreye dönüşümünü içermektedir (Guan vd., 2016). Stevia'daki kendine uyumsuzluk nedeniyle, yapay tohum üretimi için somatik embriyo gelişiminin araştırılması bu bitkide önem taşımaktadır (Keshvari vd., 2018). Keshvari vd., (2018) üç tekrarlı bir faktöriyel deneme yürüterek Stevia'da kallus indüksiyonunun özelliklerini araştırmıştır. Çalışmada incelenen faktörler arasında on adet hormon kombinasyonu, bir kontrol, iki tür ortam (MS ve B5) ve iki eksplant türü (yaprak ve internod) yer almaktadır. En iyi kallus oluşumu, 1 mg l⁻¹ NAA ve 1 mg l⁻¹ BAP kombinasyonu ile elde edilmiştir. B5 ortamına 1 mg l⁻¹ 2,4-D+1 mg l⁻¹ BAP ilave edildiğinde (yaprak eksplantları için) ve 0.25 mg l⁻¹ 2,4-D+0.1 mg l⁻¹ BAP (boğum arası eksplantları için) ile en yüksek taze/kuru kallus ağırlıkları gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da süspansiyon kültürünün uygulanabilirliğini göstermektedir. Süspansiyon kültüründe somatik embriyogenezin araştırılmasında, altı hormon uygulaması araştırılmış ve en yüksek somatik embriyogenez yüzdesi 2 mg l⁻¹ 2,4-D+ 0.5 mg l⁻¹ NAA+0.5 mg l⁻¹ BAP ile desteklenmiş MS ortamında elde edilmiştir.

2.1.5. Somaklonal varyasyonu:

Bitki popülasyonları içindeki varyasyon, bitki ıslahı için hayati önem taşımaktadır. Tüm kültür bitkileri, uygun çeşitler ve hibritler geliştirmek için bitki popülasyonlarındaki doğal varyasyondan yararlanılarak ortaya çıkmıştır. Bitki doku

kültürü yöntemlerini kullanarak somaklonal varyasyon yaratmak, bir ıslah programlarının ihtiyaç duyduğu genetik çeşitliliği sağlamak için kullanılan bir yöntemdir (Smith & Drew, 1990).

Genetik çeşitlilik, gen mutasyonlarından veya epigenetik modifikasyonlardan kaynaklanan somaklonal varyasyonlardan ortaya çıkabilmektedir. (Krishna vd., 2016). Bu genetik varyasyonlar, farklılaşmamış hücrelerde, izole edilmiş protoplastlarda, kaluslarda, dokularda ve *in vitro* olarak yetiştirilen bitkilerin morfolojik özelliklerinde sergilenmektedir (Bairu vd., 2011; Currais vd., 2013). Yüksek derecede farklılaşmış dokular, kökler, yapraklar ve gövdeler gibi, genellikle aksenel tomurcuklar ve sürgün uçları gibi önceden var olan meristemlere sahip eksplanlardan daha fazla varyasyon oluşmaktadır (Duncan, 1997). Genellikle, rejenerasyon için daha eski ve/veya daha özelleşmiş dokular kullanıldığında, rejeneratif bitkilerde geri kazanılma olasılığı artmaktadır. Bunun nedeni, bu koşullar altında, adventif sürgün rejenerasyonunun (sürgün organogenezi) ya doğrudan ya da dolaylı olarak bir kallus aşaması yoluyla atipik köken noktalarından gerçekleşmesidir.

2.1.6. *In vitro* seleksiyon:

Tarımsal üretim, biyotik ve abiyotik stres koşullarından dolayı risk altındadır. Bu nedenle strese dayanıklı bitkilerin geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Doku kültüründen *in vitro* seleksiyon, bu tür bitkilerin geliştirilmesi için makul ve uygun maliyetli bir teknik olarak düşünülebilir (Rai vd., 2011). Çünkü geleneksel seleksiyon, genellikle çevresel koşullardan etkilenebilen tarladaki büyük popülasyonları kullanır ve özellikle 10-20 yıla kadar uzayabilen kantitatif özellikler söz konusu olduğunda süreç uzun olmaktadır (Wenzel ve Foroughi-Wehr, 1993). Optimum özelliklere sahip bitkilerin seleksiyonu ve yeniden üretilmesi, bitki hücrelerinin, dokularının veya organlarının seçici maddeler içeren bir ortamda kültüre alınmasıyla mümkün olabilir (Rai vd., 2011).

Brandle ve Rosa (1992), belirli bir stevia yerel çeşidi içinde, arzu edilen özelliklere sahip hatların seçilmesini sağlamak için yeterli genetik varyasyon olup olmadığını belirlemek amacıyla yaptıkları araştırma sonucu. Stevia bitkilerinin özelliklerini seleksiyon yoluyla geliştirmenin mümkün olduğunu öne sürmüşlerdir. Hastoy vd (2019) *Septoria* spp.'nin neden olduğu *Septoria* yaprak lekesinin stevia üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Araştırmanın amacı, Fransa'da ilk kez stevia tarlasında bulunan beş *Septoria* sp. izolatını morfolojik ve genetik olarak karakterize etmek ve çeşitli kökenlerden gelen *S. rebaudiana* genotiplerinin *Septoria* sp. enfeksiyonuna tepkisini otomatik bir inokülasyon yöntemi kullanarak değerlendirmektir. Çalışmada *Septoria* sp. izolatları arasındaki genetik ilişkileri belirlemek için çoklu lokus dizi tiplemesi kullanılmıştır. On farklı *S. rebaudiana* genotipinin *Septoria* sp. enfeksiyonuna tepkisi, görsel puanlama ve görüntü analizi kullanılarak hastalık şiddetine göre değerlendirilmiştir. Bulgular, farklı genotipler arasında *Septoria* sp.'ye karşı tepkide değişkenlik olduğunu, bazılarının ("Gawi" ve "Esplac1") orta derecede duyarlılık sergilediğini ve diğerlerinin ("E8", "C" ve "E161718") daha yüksek duyarlılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Genel olarak, çalışma *Septoria* yaprak lekesinin stevia yetiştiriciliği üzerindeki potansiyel etkisini vurgulamakta ve *Septoria* sp.'ye dirençli veya daha az duyarlı yeni çeşitler geliştirmek için ıslah stratejilerine ihtiyaç duyulduğunu ve böylece *Stevia rebaudiana*'nın sürdürülebilir ve organik üretimini teşvik ettiğini göstermektedir. *S. rebaudiana*'daki

genetik çeşitliliğin, bilinen çeşitler ve yerel çeşitler de dahil olmak üzere çeşitli genotipleri içeren ilk kapsamlı değerlendirmesi Cosson vd (2019) tarafından yapılmıştır. Bu çalışma, *S. rebaudiana* germplasmının yapılandırılmış doğasını vurgulamakta ve SG bileşimi de dahil olmak üzere özelliklerin iyileştirilmesi için genetik bir kaynak olarak yerel popülasyonların önemini ortaya koymaktadır.

2.1.7. Anter kültürü

Anter kültürünün ıslah çalışmalarındaki potansiyeli, ilk olarak 1964 yılında *Datura* anterlerinin *in vitro* kültürlerinden haploid embriyo oluşumunun başarılmasıyla ortaya çıkmıştır (Guha ve Maheshwari, 1964; 1966). Bunu bütün bitkisinde *in vitro* haploit bitki elde edilmesi izlemiştir (Nitsch ve Nitsch, 1969). Bu yöntem, bitkiden anterlerin ve/veya olgunlaşmamış polenlerin çıkarılmasını ve ardından bunların, mikrosporların veya polenlerin haploid dokusundan rejenerasyonunu teşvik etmek için uygun bir kültür ortamına yerleştirilmesini içermektedir. Bu çalışmada yukarıda belirtilen teknikler ve uygulamalar arasında özellikle anter kültürüne odaklanılmıştır. Geleneksel kendileme yöntemi, homozigot hat elde etmek için 6-8 nesil kendi kendine tozlaşma gerektirmektedir. Buna karşılık, anter kültürü, haploid ve dihaploid üretmek için *in vitro* rejenerasyon sistemlerinde yaygın olarak kullanılmakta ve homozigot hatların hızlı bir şekilde üretilmesi mümkün olabilmektedir (Cardoso vd., 2016).

Bu çalışmada anter kültürünün tercih edilme sebebi, tıbbi bitkilerin uzun süredir kullanılması ve son zamanlarda artan ilgisinden kaynaklanmaktadır. Geçmişte insanlar tarafından çoğunlukla yabani bitkiler kullanıldığından bitki ıslahı insan ihtiyacını karşılayamamaktaydı (Ferrie, 2009). DH nin kullanılması, güçlü ve genetik olarak homojen tıbbi bitki hatları oluşturma bir yoldur. Bazı bitkiler DH yi (DH'liği) kendiliğinden ortaya koysa da, bu nadiren gerçekleşmektedir. Araştırmacı, tıbbi bitkilerin buğday, arpa ve Brassica türleri gibi ürünlere kıyasla kısıtlı ıslah ve genetik araştırmaya tabi tutulduğunu vurgulamıştır (Ferrie, 2009).

Diploid türlerden ($2n=2x$) elde edilen haploidler veya monoploidler, sporofitik fazda ($2n=x$) yalnızca tek set kromozom taşımaktadır. Araştırmacılar haploid bitkilerin mayoz bölünme sırasında kromozom eşleşme sorunları nedeniyle daha küçük, daha zayıf ve kısır olduklarını belirtmişlerdir. Haploid bitkilerin, tohumlama ile çoğaltılması ve ıslah programlarına entegre edilmesi için, spontane veya indüklenmiş kromozom ikiye katlama yoluyla fertilitesi geri kazandırılmaktadır. Ortaya çıkan ve tüm lokuslarda homozigot olan DH'ler, kendi kendine tozlaşan bitkilerde yeni bir çeşit olarak veya yabancı tozlanan bitkilerde hibrit çeşit üretimi için ebeveyn kendilenmiş hat olarak hizmet edebilmektedir (Murovec ve Bohanec, 2012).

Haploid indüksiyonu için *in vitro* ve *in vivo* tabanlı sistemler olmak üzere iki temel yaklaşım mevcuttur (Niazian ve Shariatpanahi, 2020). Gynogenesis ve androgenesis yaygın olarak kullanılan *in vitro* bazlı haploid indüksiyon yöntemleridir ve bitki doku/hücre kültürü yoluyla haploid bitkiler üretmek için kullanılan en yaygın yaklaşımlardır. Bu teknikler arpa, biber, kolza, çeltik, şeker pancarı ve buğday gibi önemli bitkilerde başarıyla uygulanmaktadır. Androgenez, anter kültürü, mikrospor kültürü ve shed-mikrospor kültürlerini içermektedir (Niazian ve Shariatpanahi, 2020). Günümüzde, gynogenesis düşük etkinliği nedeniyle daha az tercih edilmektedir; ancak, daha verimli yöntemlere yanıt vermeyen türler için kullanılmıştır (Forster vd., 2007).

Anterlerin *in vitro* kültüre tepkisi, donör bitkilerin genotipi, fizyolojik durumu ve büyüme koşullarının yanı sıra polen gelişim aşaması, çiçek tomurcuklarının veya anterlerin ön uygulaması ve *in vitro* kültür ortamının bileşimi ve koşulları dahil olmak üzere çeşitli faktörlerden büyük ölçüde etkilenmektedir (Germana, 2011). Bu faktörler, etkileşimleriyle birlikte, *in vitro* anter kültürünün sonucunu toplu olarak belirlemektedir. Bildiğimiz kadarıyla, Uskutoglu vd. (2019) tarafından ideal çiçek tomurcuğu aşamasını, büyüme düzenleyicilerinin etkilerini ve ön işlemleri belirlemek için yapılan bir çalışma dışında, *stevia rebaudiana* için herhangi bir anter kültürü çalışması mevcut değildir. Söz konusu çalışmada çubuk şeklinde embriyolar ve Embriyogenik kallus elde edilmiştir; ancak haploid bitkiler elde edilememiştir. Ayrıca, Tavarini vd. (2019) 1998-2016 yılları arasında *stevia* çeşitleriyle ilgili patent çalışmalarını rapor etmiştir.

2.1.8. Protoplast kültürü

Protoplastlar, hücre duvarının mekanik ve/veya enzimatik işlemlerle ortadan kaldırıldığı hücrelerdir (Smith ve Drew, 1990). Protoplast tabanlı tek hücre deney sistemi, gen haritalama (Eeckhaut vd., 2013), transgenik ifade (Zhao vd., 2016), protein etkileşim analizi (Jung vd., 2015), ışık/kloroplast ile ilgili aktivitelerin belirlenmesi (Augustynowicz vd., 2009) ve sinyal iletim yollarının araştırılması (Fraiture vd., 2014) dahil olmak üzere çeşitli bitki hücre mühendisliği uygulamaları için değerli bir araçtır. Protoplastların etkili bir şekilde izolasyonu, füzyon ve ardından füzyon ürünlerinin rejenerasyonu, somatik bir hibritin geliştirilmesinde temel aşamalarıdır. Bu nedenle, tekniklerin koordineli bir şekilde entegrasyonunu gerektirmektedir (Duquenne vd., 2007). Protoplast füzyonu, ayrı iki tür veya cinse ait protoplastların birleştirilerek yeni çeşitlerin oluşturulmasını içeren, paraseksüel hibridleşme olarak da bilinir. Bu süreç, özellikle eşeyli ve ön veya son döllenme engellerini ortadan kaldırmak için etkilidir. Protoplast füzyonları, her iki ebeveynin tüm genomlarının birleştiği simetrik ve bir donörden bir alıcıya kısmi bir genom transferini içeren asimetrik yapıda olabilmektedir (Wang vd., 2013).

Tarihsel olarak, çeşitli türler arasında protoplast hibritleri, *Brassica* ve *Arabidopsis* (Gleba ve Hoffmann, 1980) *brassica oleracea* L. ve *Moricandia arvensis* (L.) DC. (Toriyama vd., 1987), *Eruca sativa* Lam. ve *Brassica juncea* (L.) Czern (Sikdar vd., 1990), ile *B. nigra* ve *B. Oleracea* (Narasimhulu vd., 1992) oluşturulmuştur. Ayrıca, portakalın mandarin veya mandarin hibrit çeşitleri ile birleştirilerek narenciye somatik hibritler oluşturulmuş ve karakterize edilmiştir (Soriano vd., 2012).

Protoplast izolasyonunda genellikle hipokotil, kotiledonlar, kök tüyleri, kökler ve yapraklar gibi olgunlaşmamış bitki dokuları kullanılmaktadır (Davey vd., 2005). Bunlar arasında, yaprak mezofil dokuları, *Arabidopsis thaliana* (Xuan ve Menczel, 1980), *Oryza sativa* (Davey vd., 2005) ve *Nicotiana tabacum* (Nagata ve Takebe, 1971) gibi çeşitli model bitkilerde, ayrıca *Panicum virgatum* (Mazarei vd., 2008), *Hevea brasiliensis* (Zhang vd., 2016), *Elaeis guineensis* (Masani vd., 2014), *Magnolia* (Shen vd., 2017) ve *Phaseolus vulgaris* (Nanjareddy vd., 2016) gibi model olmayan farklı bitkilerde protoplast izolasyonunun başlıca kaynağı olarak hizmet etmektedir.

Ayrıca, *in vitro* yetiştirilen *Stevia* yapraklarından protoplastlar dört haftalıkken verimli bir şekilde izole edilmiştir (Lopez-Arellano vd., 2015). Ghose vd (2022), ES5

(%1.25 selüloz R-10 ve %0.75 makerozim R-10) kullanarak *in vitro* koşullarda yetiştirilen stevia bitkiciklerinin yaprak mezofilinden gram taze ağırlık başına 3.16×10^6 ya ulaşarak en yüksek protoplast verimini elde etmişlerdir.

2.2. *Stevia rebaudiana*'nın ıslah programları

Bitki çeşitlerini geliştirmek istenilen özelliklerin aktarılmasıyla mümkündür. Ancak burada mevcut varyasyonların seçimi kritik bir rol oynamaktadır (Akhtar vd., 2022). Geleneksel ıslah yöntemleri, son yirmi yılda ortaya çıkan modern biyoteknolojik yöntemlere kıyasla zaman alıcıdır. Bu gelişmiş yöntemler, genetik özelliklerin daha iyi anlaşılmasını sağlar ve yeni çeşitlerin geliştirilmesini hızlandırır. Modern biyoteknolojinin geleneksel ıslah yöntemleri ile bütünleştirilmesi, geliştirilmiş bitki çeşitlerinin piyasaya sürülmesini hızlandırır. Bu kombinasyon, çevresel streslere karşı üstün kalite, miktar ve dayanıklılığa sahip çeşitlerin oluşturulması için yeni yollar açmaktadır. Ayrıca, bitkilerin kültüre alınması, üretici güdümlü seleksiyon ve çeşitli melezleme teknikleri gibi yöntemlerle yerel adaptasyon sağlanabilmektedir (Akhtar vd., 2022). *Stevia rebaudiana* (Bertoni), 22 kromozoma ($2n=22$) sahip çok yıllık otsu bir bitki olup, yaklaşık 230 otsu, çalı ve alt çalı türünü içeren *Stevia* cinsine aittir (Yadav vd., 2011). *Stevia* yaprakları diterpen glikozitler, özellikle steviosit ve rebaudiosid üretir; bunlar besleyici olmayan, toksik olmayan ve şükrozu 300 kat aşan oldukça güçlü tatlılıklarıyla bilinmektedir. *Stevia*, tatlandırıcı özelliğinin ötesinde, tıbbi değer ve uygulamaları da içermektedir. Entomofil tozlaşma davranışına sahip, kendine uyumsuz bir bitki olarak bitki ıslahında önemli bir rol oynamaktadır. *Stevia* yapraklarındaki glikozitlerden Rebaudiosit-A, özellikle üstün lezzet profili için arzu edilirken, steviosit ağızda kalan acı tattan sorumludur. Bitki ıslahçıları, doğal tatlandırıcıları geliştirmek için daha yüksek Rebaudiosit-A içeriğine ve daha düşük steviosit sahip yeni *S. rebaudiana* çeşitleri geliştirmeye odaklanmaktadır. Rebaudiosit-A ve -C'nin oranları, aynı enzim tarafından sentezlendiğini gösteren ve birlikte ayrılan tek bir katkı geninden etkilenmektedir. Rebaudiosit-A ve -C pozitif bir korelasyon gösterirken, steviosit ve rebaudiosit-A negatif bir korelasyon sergilemektedir. Arzu edilen genotipler arasında seçim ve melezlemeyi içeren geleneksel bitki ıslahı yöntemleri, yüksek oranda yabancı tozlaşan bir bitki olan stevia için kalite özelliklerinin geliştirilmesinde etkili olmaktadır. Özel glikozit miktarları artırılmış RSIT 94-1306, RSIT 94-75 ve RSIT 95-166-1 gibi çeşitli patentli bitki çeşitleri, seleksiyon ve melezlemeyoluyla geliştirilmiştir (Yadav vd., 2011). Tavarini ve diğerlerine (2019) göre, stevia için ıslah programlarının temel hedefleri aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Birim alanda yaprak veriminin maksimize edilmesi
- Yüksek yaprak-sap oranı elde etmek
- Hızlı büyüme ve yeniden büyüme kapasitesini teşvik etmek
- Fotosentetik aktivitenin artırılması
- Yapraklardaki steviol glikozit içeriğinin artırılması
- Özellikle rebaudiositA (Reb A) gibi bazı steviol glikozitlerin belirgin seviyelerinin hedeflenmesi
- Çok çeşitli toprak ve iklim koşullarına uyum sağlama
- Çevresel streslere, zararlılara ve hastalıklara karşı direnç geliştirmek
- Fotoperiyot duyarsızlığı elde etmek
- Etkili tohum üretimi için kendine uyumluluğun sağlanması

Araştırmacılar, Morita ve Yucheng'in *S. rebaudiana* çeşit geliştirmek için tekrarlayan ıslah ve seçim tekniklerini kullandıklarını ve steviosit göre 2.56 kat daha yüksek Reb A içeriği elde ettiklerini bildirmişlerdir (Yadav vd., 2011). Toplam steviol glikozitlerin %80'ine kadar ulaşan Reb-A içeriğine sahip, minimum acılık ve ağızda kalan tat ile karakterize edilen çok sayıda çeşit geliştirilmiştir. Araştırmacılar ayrıca yeni stevia çeşitleri için yapılan patent başvurularına da atıfta bulunmuşlardır. Stevia için ıslah programlarında kullanılan birincil yaklaşım, geleneksel bitki ıslahı yöntemleri olmakla birlikte, çeşitli ileri genetik teknikler de mevcuttur. Bu yöntemler tipik olarak; kalite özelliklerini geliştirmek için kimyasal yapıyı düzenleyerek, arzu edilen kimyasal içeriğe sahip farklı genotipler arasında seçim ve melezlemeyi içermektedir.

2.2.1. Genetik çeşitlilik ve gen kaynakları

Amien vd., (2021), steviada verim ve diğer özelliklerde genetik parametreleri ve genetik avantajı tahmin etmek için tarla denemesi yürütmüştür. Çalışmada, her bir özellik için üstün stevia genotipleri seçmişlerdir. Huber ve Wehner (2021) stevia genotiplerini verim, glikozitler ve bitki morfolojisi gibi özellikler açısından karakterize etmiş ve özellikler arasındaki korelasyonlarını belirlemişlerdir. Verim ve glikozitler için popülasyonlar arasında çeşitli genetik tabana işaret eden yüksek değişkenlik bulmuşlardır. Bazı genotipler biyokütle ve glikozit konsantrasyonu için yüksek verim sergilemişlerdir. Bu da artan biyokütle için ıslah potansiyeline işaret etmektedir. En yüksek glikozit seviyelerine sahip genotipler, Seed Savers'tan temin edilen NC1003 ve NC-1022 olarak belirlenmiş ve arzu edilen glikozitleri geliştirme potansiyellerini göstermiştir. Çalışma, elit ıslah popülasyonları geliştirmek ve stevia'da ilgilenilen özellikleri iyileştirmek için kullanılabilecek genotiplerin varlığını vurgulamaktadır. Özetle, bu çalışma, stevia çeşitlerinde verim ve glikozit içeriğini artırmak için genetik çeşitlilik ve potansiyel ıslah seçenekleri konusunda değerli bilgiler sunmuştur. Cosson vd. (2019), "UC Davis'in Compositae Genom Projesi"nden elde edilen 150.258 EST'den genetik bilgileri kullanarak 18 EST-SSR markör geliştirmiştir. Bu markörler daha sonra dünya çapında çeşitli bölgelerden otuz bir çeşit ve otuz bir yerel çeşitten elde edilen 145 *Stevia rebaudiana* bitkisinin genotiplenmesi için kullanılmıştır. Bu çalışmanın *Stevia rebaudiana*'daki genetik çeşitliliğin ilk kapsamlı analizi olduğu ve farklı kökenlerden gelen hem çeşitleri hem de yerel popülasyonları kapsayan 145 genotipi ihtiva ettiği sonucuna varmışlardır. Dyduch-Sieminska vd. (2020), moleküler yöntemler ve biyokimyasal testlerin bir kombinasyonunu kullanarak, çeşitli *Stevia rebaudiana* genotiplerinin genetik ve biyokimyasal çeşitliliğini değerlendirmişlerdir. RAPD analizi, genotipler arasında önemli polimorfizm ve diferansiyel bant desenleri ortaya çıkararak tür içindeki genetik değişkenliği ortaya koymuştur. HPLC sonuçları, genotipler arasındaki biyokimyasal profillerde, özellikle de Stevia'nın tatlı tadından sorumlu olan steviol glikozitlerin içeriğinde belirgin farklılıklar olduğunu göstermiştir. Fas, Polonya, Mısır ve Nijerya gibi belirli bölgelerden köken alan genotiplerin, mevcut steviol glikozit miktarı açısından daha yüksek kaliteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, *rebaudiosit A*'nın steviosit oranı bir seçim kriteri olarak değerlendirilmiş ve Avustralya, Çin, Hindistan ve Pakistan kökenli genotipler, yeni çeşitlerin ıslahında potansiyel değer taşıdıkları vurgulanmıştır. Çalışma Fas, Mısır, Polonya, Nijerya, Çin ve Hindistan'dan gelenler gibi genetik ve biyokimyasal farklılık gösteren genotiplerin, gelişmiş tatlılık, daha yüksek verim veya belirli çevresel koşullara daha iyi uyum gibi

arzu edilen özelliklere sahip *Stevia* çeşitlerinin geliştirilmesini amaçlayan daha ileri ıslah programları için değerli adaylar olabileceğini göstermiştir.

Bir başka çalışma, yapay seleksiyonun genetik farklılık ve popülasyon yapısı üzerindeki etkisine odaklanarak *Stevia rebaudiana*'nın ekili popülasyonları içindeki ve arasındaki genetik çeşitliliği araştıran Luz vd. (2020) tarafından yürütülmüştür. Çalışma, SR1'in en yüksek polimorfizm oranını (%89.24) sergilediğini, SR2'nin ise en düşük oranı (%60.13) gösterdiğini ortaya koymuştur. ISSR markörleri, vejetatif çoğaltım için istenen özelliklere sahip bitkilerin seleksiyonun genetik olarak tek tip popülasyonlar oluşturma eğiliminde olduğunu, eşeyli olarak çoğaltılan bitkilerin ise daha fazla genetik farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Çalışma kapsamında stevianın üretiliği farklı beş bölge arasındaki yüksek genetik farklılık seviyelerinin, genetik olarak yapılandırılmış popülasyonları işaret ettiği vurgulanmıştır. SR2 ve SR4, SR3 ve SR5'e kıyasla seçilen özellikler açısından genetik olarak daha homojen bitkileri içermekte olduğunu. SR2 ve SR4'teki bu baskın ve homojen genotipler, kontrollü koşullarda arzu edilen agronomik özelliklere sahip *Stevia* bitkilerini geliştirmeyi amaçlayan ıslah programlarında genitör olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir.

Kaplan ve Turgut (2019) yaptıkları çalışmada; *Stevia rebaudiana* Bertoni'nin yüksek rebaudiosit A seviyelerine ve yüksek reb A / steviosit oranına sahip genotiplerini tanımlayarak, klon seçim yöntemiyle üstün aday çeşitleri seçmeyi amaçlamıştır. Araştırma sonuç; 82, 109, 133 ve 196 numaralı genotiplerin reb A içeriği, reb A/stv oranı ve endüstriyel işleme ve üretime uygunluk açısından üstün özellikleri nedeniyle klonal çeşit adayları olarak seçilmiştir. *Stevia* genetik çeşitliliği üzerine yapılmış birçok çalışma daha mevcuttur (Subositi vd., 2011; Chester vd., 2013; Thiagarajan ve Venkatachalam, 2015; Abdelsalam vd., 2016; Sharma vd., 2016; Othman vd., 2018).

2.2.2. Steviol glikozit içeriği ve tatlılık profilleri:

Obezite, tip 2 diabetes mellitus ve kardiyovasküler hastalıklar gibi önemli beslenme ve tıbbi sorunların küresel yaygınlığı, şeker ve diğer diyet kaynaklarından aşırı kalori tüketimine bağlanmaktadır. Bu endişe verici eğilime karşılık olarak, pazar için düşük kalorili ve doğal şeker ikamelerinin geliştirilmesine yönelik artan bir ilgi söz konusudur (Kunová vd., 2014). *S. rebaudiana*'nın yapraklarında başta steviosit olmak üzere tatlı tada sahip diterpen glikozitleri biriktirmesiyle tanınan *Stevia*, en umut verici doğal seçeneklerden biri olarak ortaya çıkmaktadır. Steviosit ticari ürünlerde bulunan başlıca glikozit olmakta birlikte, steviol glikozitlerin konsantrasyonları, genotip ve üretim koşulları gibi faktörlere bağlı olarak önemli ölçüde değişmektedir (Puri vd., 2011). Bugüne kadar birçok çalışma sekonder metabolitleri geliştirmek amacıyla yapılmıştır. Örneğin, Thakur vd. (2021) *Stevia rebaudiana*'nın *in vitro* sürgün kültüründe polietilen glikol, aljinat, kitosan, salisilik asit ve maya özütü gibi elisitörlerin büyüme, biyokütle verimi ve rebaudiosidler de dahil olmak üzere steviol glikozitlerin birikimi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. UHPCL kullanılarak ölçülen steviol glikozit içeriğinin belirli elisitörlerle önemli ölçüde arttığını tespit etmişlerdir. Özellikle, steviosit içeriği 2.0 mg l⁻¹ ALG ile 5 kat (0.77 mg g⁻¹ yaprak kuru ağırlık) artarken, RA içeriği 0.5 mg l⁻¹ ALG ile 7 kat (1.9 mg g⁻¹ yaprak kuru ağırlık) artmıştır. Bu çalışma; aljinatın *Stevia rebaudiana*'nın biyokütle kalitesini artırmak ve metabolit profilini iyileştirmek için umut vaat eden bir elisitör olduğunu ortaya koymuştur.

Javed vd. (2017) *Stevia rebaudiana*'nın *in vitro* kültürü sırasında MS ortamında bakır oksit kullanmışlardır. Bu nanopartikülü, nodal segmentlerden *S. rebaudiana*'nın doğrudan organogenezi için MS ortamında 0, 0.1, 1.0, 10, 100 ve 1000 mg l⁻¹ konsantrasyonlarda uygulamışlar ve 10 mg l⁻¹'lik bakır oksit konsantrasyonun sürgün organogenezinin olumlu yönde etkilediğini tespit etmişlerdir. HPLC analizine göre yine aynı konsantrasyondaki uygulamanın, hem rebaudiosit A hem de steviosit'te artışa neden olduğu belirlenmiştir. Çalışmaya göre, bakır oksidin biyoaktif bileşiklerin üretimini uyarabileceği ve *in vitro* kültürlerde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Gupta vd. (2016), dört hafta boyunca NaCl (%0.05-0.20) ve Na₂CO₃ (%0.025-0.10), Prolin (2.5-10 mM) ve Polietilen Glikol (%2.5-10) gibi abiyotik streslerin nodal eksplantlardan elde edilen *S. rebaudiana* sürgünlerinde büyüme parametreleri ve steviol glikozit üretimi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Bu nodal eksplantlar, belirtilen tuz konsantrasyonlarını içeren 2.0 mg l⁻¹ kinetin ile desteklenmiş MS ortamında *in vitro* olarak kültürlenmiştir. NaCl ve prolin sürgün büyümesini teşvik ederken, Na₂CO₃ ve PEG kontrole kıyasla zayıf büyümeyle sonuçlanmıştır. Stres uygulaması, *in vitro* bitkilerde kontrole kıyasla daha iyi steviol glikozit üretimi ile sonuçlanmıştır. En yüksek toplam SGs içeriği (Steviosit ve Rebaudiosit A) %2.60 ile %0.025 Na₂CO₃ ile muamele edilen sürgünlerde bulunurken, bunu 5.0 mM prolin (%1.65), %0.10 NaCl (%1.25) ve %5 PEG (%1.15) takip etmiştir. Özetle, büyümede bir miktar azalmaya neden olmasına rağmen, kimyasal stres uygulaması SGs üretimini kontrol bitkilerine kıyasla üç kata kadar artırmıştır. Ayrıca, Bondarev vd. (2019) *Stevia rebaudiana* hücre kültürlerinde SG'lerin büyümesini ve biyosentezini etkilemede besin ortamı bileşimi, büyüme düzenleyicileri, ışığa maruz kalma ve hücre farklılaşması gibi çeşitli faktörlerin önemini bildirmişlerdir.

Kumari ve Chandra (2015), ikincil metabolitlerin üretimini artırmak ve bitki özütünün antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek için *Stevia rebaudiana in vitro* kültürü için çoğaltma protokolü geliştirmeyi araştırmışlardır. HPLC sonuçlarına göre, her iki ikincil metabolit (steviosit ve Reb A) kallustan organogenez yoluyla geliştirilen *in vitro* sürgünlerde arttığı belirlenmiştir.

Rameshsing vd. (2015) kolhisin kullanarak poliploidi indüksiyonu yoluyla SG geliştirmiş ve daha yüksek glikozit içeriğine sahip yeni mutantlar (steviosit ve rebaudiosit A) elde ederek poliploidi indüksiyonu için kolhisinin kullanışlılığını doğrulamışlardır. Ayrıca, Mathur ve Shekhawat (2013) *S. rebaudiana* hücre süspansiyon kültürlerinin biyoteknolojik olarak steviosit üretimi için etkili bir yöntem sunduğunu belirtmişlerdir. Kültür ortamı bileşimi, büyüme düzenleyicileri ve inokulum yoğunluğu gibi faktörler büyümelerini ve steviosit üretimini etkilemektedir. Gerçekleştirilen çalışmalar, biyoreaktörlerde *S. rebaudiana* süspansiyon kültürleri kullanılarak büyük ölçekli steviosit üretiminin potansiyelini ortaya koymuştur.

Birçok çalışma *Stevia rebaudiana*'da doku kültürü tekniklerini kullanarak steviol glikozit üretimini artırmanın yollarını araştırmış olsa da, haploidi üretimi için anter kültürüne odaklanan araştırmalarda dikkate değer bir boşluk bulunmaktadır. Anter kültürü haploid bitkilerin oluşturulmasına yardımcı olarak ıslah ve genetik çalışmaları hızlandırabilir. Bu boşluğun giderilmesi stevia genetiği anlayışımızı geliştirebilir ve daha fazla steviol glikozit ve diğer arzu edilen özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.

2.2.3. Haploid ve double haploid bitki üretimi:

Double Haploid (DH) teknolojisi, büyük ölçekli hibrit tohum üretimi için çok önemli olan kendilenmiş saf, tamamen homozigot ebeveyn hatları üretmek için gereken zamanı ve ilgili masrafları önemli ölçüde azaltarak bitki ıslahında oldukça verimli bir strateji sunar. Bu etkinlik, hem özel sektörde hem de akademik çevrelerde homozigot bireylerin üretimi için yaygın olarak benimsenmesinin temel nedenidir. Ayrıca DH bitkileri, diğer uygulamaların yanı sıra rekombinasyon fraksiyonlarının tahmin edilmesi, bağlantı çalışmalarının yürütülmesi, karmaşık niteliksel özelliklerin haritalanması, homozigotluk yoluyla transgenlerin stabilize edilmesi ve çekinik mutantların ortaya çıkarılması gibi görevleri kolaylaştırarak uygulamalı genetik araştırma çabalarında hayati bir rol oynamaktadır. DH teknolojisi, aslında bitki gametleri veya onların öncülleri olan haploid hücrelerin temelinde, haploid embriyoların gelişimini teşvik etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu durum doğal ortamlarda nadir görülür ve deneysel manipülasyon gerektirir. Haploid embriyo elde edildikten sonra, kendiliğinden genom ikiye katlanması olarak adlandırılan diploid (DH) hale gelebilir veya kromozom ikiye katlanması için daha ileri uygulamalar gerekebilir (indüklenmiş ikiye katlanmış haploid).

2.2.4. Haploid bitkilerin keşfedilmesi:

Haploid bitki gelişiminin doğal oluşumu, bu fenomeni *Datura stramonium* bitkisinde Blakeslee tarafından 1922 yılında keşfedilmiştir (Blakeslee vd., 1922). Daha sonraki raporlar; tütün (*Nicotiana tabacum*) (Clausen ve Mann, 1924), buğday (*Triticum aestivum*) (Gaines ve Aase, 1926) ve diğer bitkilerde (Kimber ve Riley, 1963; Riley, 1974) de benzer durumları doğrulamıştır. Ne yazık ki, laboratuvar bazlı haploid bitki üretimi için protokollerin oluşturulması 40 yıldan daha uzun zaman almıştır. Bu dönüm noktası, *Datura*'da anter kültürü (Guha ve Maheshwari, 1964; 1966) ve ardından türlerarası melezlemelerde kromozom eliminasyonu (Kasha ve Kao, 1970) yoluyla elde edilmiştir. Araştırma, kısır haploid bitkileri verimli (fertil), homozigot double haploid bitkilere dönüştüren kromozom sayısını ikiye katlama tekniklerinin ($n-2n$) ilerlemesiyle hızla yaygınlaşmıştır (Jensen, 1974). Nitekim haploid ve double haploid oluşuma sahip türlerin sayısı 384 olarak belirlenmiştir (Seguí-Simarro vd., 2021).

2.2.5. Haploid bitkilerin belirlenmesi:

Haploid bitkiler, diploid benzerlerinden çeşitli yollarla ayırt edilebilir. Bu farklar genellikle morfolojik, sitolojik ve genetik özelliklerin detaylı analiziyle belirlenmektedir. Haploidler; daha küçük hücre boyutları nedeniyle daha küçük bir görünüm sergilerler. Zira bitkilerdeki hücre hacmi doğrudan ploidi seviyeleri ile ilişkilidir. Bir bitkinin haploid durumu, çeşitli yöntemlerle doğrulanabilir (Dunwell, 2010). Örneğin, flow sitometrisi, kromozom sayımı, stomal koruyucu hücrelerde kloroplast sayımı, stomaların boyut ve uzunluğunun ölçülmesi, nükleolüs sayımı, polen oluşumu ve canlılığının değerlendirilmesi, hücre boyutunun analizi ve morfolojik belirteçlerin incelenmesi gibi yöntemler kullanılabilir (Ochatt ve Seguí-Simarro, 2021).

2.3. Asteraceae familyasındaki türlerin ıslahında haploid ve double haploid çalışmaları

Daha önce de belirtildiği gibi *Asteraceae* çiçekli bitkilerin en büyük ailesidir ve *stevia* bu ailenin bir üyesidir. *Stevia* bitkilerinin ıslah programları yoluyla geliştirilmesine yönelik bir talep vardır ve haploid optimum bir seçenек olabilir. Bugüne kadar, anter kültürü yoluyla haploidi üretimi için tek bir çalışma vardır. Uskutoğlu vd. (2019) tarafından, tatlılığıyla bilinen çok yıllık bir bitki olan *Stevia rebaudiana* Bertoni'de *in vitro* androgenezin etkinliğini artırmak için bir çalışma yürütülmüştür. Bitki anterlerinden embriyo oluşumunu teşvik etmek için çeşitli besin bileşenleri değerlendirilmiştir. İlk yıl, embriyo oluşumunu kolaylaştıran 2.0 mg l⁻¹ α-naftalenasetik asit (NAA) + 0.5 mg l⁻¹ 6-benzilaminopürin (BAP) ile desteklenmiş MS ortamı en etkili uygulama olmak üzere umut verici sonuçlar gözlemlenmiştir. Ancak, bu embriyoların daha sonra farklılaştığı gözlenmemiştir. İkinci yılda, araştırmalar sıcaklık ön işlemlerinin etkisine odaklanmış ve yüksek (35°C) ve soğuk (4°C) sıcaklıklar arasında herhangi bir fark bulunamamıştır. Embriyo üretimi için en uygun besin bileşimi, yüksek sıcaklık koşulları altında 2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ Kinetin ile desteklenmiş MS olarak belirlenmiş ve önemli bir embriyo verimi elde edilmiştir. Soğuk uygulama da, öncelikle kallus oluşumunu teşvik ederek diploid bitkiler elde edilmesini sağlasa da, düşük düzeyde etkinlik göstermiştir.

Asteraceae familyası bitkilerinde, özellikle *Tagetes* spp. için haploid üretimi üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Örneğin, Kumar vd. (2019) *Tagetes* spp. türlerinde *in vitro* androgenesis teknikleri yoluyla haploidleri indüklemek için başarılı bir protokol geliştirmiştir. Androgenezi etkileyen tomurcuk boyutu ve mikrospor aşaması gibi çok sayıda faktör optimize edilmiştir. Fransız kadife çiçeği, tomurcuk boyutu 3.5-4.0 mm arasında olduğunda erken tek çekirdekli ile erken iki çekirdekli aşamada en yüksek mikrospor yüzdesini sergilerken, Afrika kadife çiçeği 3.0-3.5 mm tomurcuk boyutunda en iyi sonuçları göstermiştir. Test edilen çeşitler arasında, *T. patula* cv. Pusa Arpita ve *T. erecta* cv. Pusa Basanti Gaiinda sırasıyla %0 ila %78.6 ve %0 ila %63.9 arasında değişen sürgün oluşum frekansları göstermiştir. Fransız kadife çiçeği çeşitleri, Afrika kadife çiçeği çeşitlerine kıyasla daha yüksek androjenik tepkiler göstermiştir. Diğer bileşenlerin yanı sıra hindistan cevizi suyu, gümüş nitrat (Ag.NO₃) ve PVP ile zenginleştirilmiş bazal (EMS) ortamında kültüre alınan anterler, diğer ortamlara kıyasla en yüksek gelişimi göstermiştir. Araştırmacılar ayrıca, anterlerin on günlük soğuk ön işleme ve ardından 20 günlük karanlık inkübasyona tabi tutulmasının haploid indüksiyonunu önemli ölçüde artırdığını bulmuşlardır. 424 rejeneranttan 56 bitki ploid analizi için rastgele seçilmiştir. Sonuçlar, rejenerantların %14.3'ünün dihaploid, %66.1'inin tetraploid ve %19.6'sının poliploid olduğunu ortaya koymuştur.

Kumar vd. (2020), eksplant olarak tozlaşmamış ovülleri kullanarak *Tagetes erecta*'nın iki heterozigot erkek steril hattından haploid üretmek için bir protokol standardize etmişlerdir. Büyüme düzenleyicileri, ovül gelişim aşaması, bazal ortam, sükröz konsantrasyonu, fotoperiyot ve soğuk şok süresi dahil olmak üzere *in vitro* jinojenik yanıtı etkileyen çeşitli faktörler araştırılmıştır. Sonuçlar, tozlaşmamış ovüllerin 2 mg l⁻¹ BAP ve 0.5 mg l⁻¹ NAA veya 2 mg l⁻¹ BAP ile birlikte 2 mg l⁻¹ 2,4-D ile desteklenmiş EMS (Hindistan cevizi suyu, AgNO₃, PVP vb. ile zenginleştirilmiş MS ortamı) ortamında kültüre edildiğinde 'Yerel Portakal' çeşidinde partenojenik embriyoların doğrudan indüklendiğini göstermektedir. Çiçek tomurcuklarının gelişim

aşamasının başarılı embriyo indüksiyonu için çok önemli olduğu ve yarı açık çiçek tomurcuklarından elde edilen ovüllerin en yüksek duyarlılığı gösterdiği bulunmuştur. EMS ortamı, jinogenez için en etkili ortam olarak bulunmuştur. Ayrıca, çiçek tomurcuklarının soğuk ön işleminin jinogenezini olumsuz etkilediği ve karanlık kültür koşullarının uzun süreli ışığa maruz kalmaya kıyasla doğrudan partenogenik embriyo indüksiyonuna daha elverişli olduğu gözlemlenmiştir.

Ayrıca, Chinnathambi vd. (2024) *Tagetes patula* L. yerel türünü 2-4.5 mm arasında değişen çiçek boyutlarıyla *in vitro* androgenez için araştırmışlardır. 2.0 ml l⁻¹ BAP, 0.5 ml l⁻¹ NAA, %3 sakkaroz ve %0.8 agar-agar ile desteklenmiş EMS ortamında (MS + organik ve inorganik takviyeler + %5 hindistan cevizi suyu) yetiştirilen yaklaşık 3-3.5 mm'lik bir çiçek büyüklüğünün çeşitli parametreler için optimal olduğu bulunmuştur. Sitolojik analiz ve stoma koruyucu hücrelerinin kloroplast sayımına dayanarak, taranan 25 bitkiden biri dihaploid, 15'i tetraploid ve 9'u poliploid olarak tespit edilmiştir. Kloroplast sayımı sonucunda, taranan 25 bitkiden biri (%4) koruyucu hücrelerinde ortalama 8 kloroplast ile dihaploid olarak belirlenmiştir. Diğer yandan, 15 bitki (%60) koruyucu hücrelerinde ortalama 16 kloroplast ile tetraploid olarak saptanmış, ve 9 bitki (%36) koruyucu hücrelerinde ortalama 18 ila 20 kloroplast ile poliploid olarak tanımlanmıştır. Son olarak, anterden elde edilen rejeneranttan bir haploid izole edilmiş, sitolojik analiz ve kloroplast sayımı ile doğrulanmıştır.

Theiler-Hedtrich ve Hunter (1995) mikrosporların izolasyonu ve kültürü yoluyla dihaploid hindiba bitkilerinin başarılı bir şekilde üretimini araştırmışlardır. Mikrosporlar 0.5 mg l⁻¹ 2,4-D, 0.5 mg l⁻¹ IAA ve 2.0 mg l⁻¹ zeatin ile desteklenmiş modifiye MS ortamında kültüre alınmıştır. Ortaya çıkan gametoplastların ve kalusların sonraki alt kültürleri 0.5 mg l⁻¹ BA ve 0.5 mg l⁻¹ IAA ile desteklenmiş aynı bazal besiyerinde gerçekleşmiştir. Sürgün büyümesi artışı, 0.4 mg l⁻¹ kinetin ve 0.2 mg l⁻¹ IAA ile desteklenmiş düşük tuz içeren bir ortamda elde edilmiştir. Sürgünlerin köklenmesi, toprağa aktarılmadan önce yarım kuvvetli 0.2 mg l⁻¹ IBA içeren Lepoivre ortamında geliştirilmiştir. Çalışma, 34 kapituladan sadece dördünden izole edilen mikrospordan geliştirilen bitkilerle, mikrospor türevi kallustan dihaploid hindiba bitkilerini başarılı bir şekilde yeniden üretmiştir. Sera ve tarla koşullarında 450'nin üzerinde bitki üretilmiştir. Araştırmacılar, sera ve tarla koşullarında yetiştirilen bitkiler arasında çeşitli ploidi seviyeleri belirlemişlerdir ve 44 bitki, diploid bir arka plana rağmen genellikle haploid hücre bileşimi sergilemiştir. Regenere bitki fenotiplerinin ebeveyn genotipleriyle karşılaştırılması, haploidlerin ticari hindiba ıslahında potansiyel kullanımını önermektedir.

Todorova vd. (1997), dört polen verici ve dört alıcı hibrit içeren ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) bitkilerinde 48 uygulamayı değerlendirmişlerdir. Polenler değişen dozlarda gama ışınına (300 Gy, 600 Gy ve 900 Gy) maruz bırakılmıştır. Toplamda 2.279 embriyo *in vitro* koşullarda kültüre alınmış ve bunlardan 1.107 mutant bitki elde edilmiştir; bu bitkilerin 582'si kendi kendine tozlaşma sonrasında tohum oluşturmuştur. Rejenerantların değerlendirilmesi, elde edilen bitkiciklerin 296'sının haploid olduğunu ortaya koymuştur. Bu haploidlerin bazıları kendiliğinden diploidizasyona uğrarken, diğerleri kromozom ikiye katlanmasını teşvik etmek için kolhisin solüsyonu ile muamele edilmiştir. Elde edilen diploid bitkicikler, ginojenik kökenlerini belirlemek amacıyla genetik ve biyokimyasal analizlere tabi tutulmuştur.

Aktaş vd. (2023) tarafından yürütülen benzer bir çalışmada, polen ışınlama ve dişi çiçeklerin ışınlanmış polenlerle tozlaşması yoluyla haploid embriyolar başarıyla üretilmiştir. Işınlanmış polenin ayçiçeğinde (*Helianthus annuus* L.) haploid oluşumuna etkisi, Türkiye Ulusal Ayçiçeği Islah Programı'ndan 16 ayçiçeği hattında değerlendirilmiştir. Yağlı tohum ayçiçeklerinde partenogenetik haploid embriyoları indüklemek için polen taneleri değişen dozlarda gama ışınlarıyla (500-1000 Gy) ışınlanmıştır. Embriyolar, tozlaşmadan 12-20 gün sonra, kontrollü koşullar altında (16/8 saat fotoperiyot, 25°C) modifiye MS kültür ortamına yerleştirilmiştir. Farklı gelişim aşamalarındaki toplam 18.457 partenogenetik embriyo *in vitro* ortamda kurtarılmış ve 650'si başarılı bir şekilde çimlendirilmiştir. Rejenerantların ploidi analizi, kromozom sayımı ve flow sitometrisi yoluyla gerçekleştirilmiş ve 500 Gy hariç tüm ışınlama dozajlarının embriyo ve haploid bitkileri indüklemedeki etkinliğini ortaya koymuştur. Çalışmada, "K3AD SN:8", "IMI 069" ve "IMI 044" ayçiçeği genotiplerinin uygun gama ışını dozu ve embriyonik gelişim aşaması seçilerek partenogenetik haploid embriyolar üretebildiği belirlenmiştir. Çalışmanın ana odağı, ıslah için açılmayan hatların üretimini hızlandırmak amacıyla ayçiçeği DH'lerinin kazanımıdır.

Piosik vd. (2016), *Asteraceae* familyasından marul (*Lactuca sativa* L.) için etkili bir haploidizasyon yöntemi geliştirmek amacıyla bir çalışma yürütmüşlerdir. Haploid embriyo gelişimini teşvik etmek için, *Helianthus annuus* L. veya *H. tuberosus* L. polenleri ile *in vivo* tozlaşma gerçekleştirilmiştir. Ancak, tozlaşmadan sonra elde edilen haploid proembriyolar, hücrel endosperm varlığına rağmen daha fazla gelişmemiştir. Bunu aşmak için, partenogenetik embriyolar ile izole edilmiş embriyo keselerinin *in vitro* kültürü çeşitli modifiye MS ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Bu durum, 23 adet haploid *L. sativa* bitkisinin yeniden üretildiği kallus dokusunun oluşmasına yol açmıştır. Haploid durumun doğrulanması, flow sitometrisi ile genom boyutunun tahmin edilmesi, kök ucunda kromozom sayımı, stoma hücre boyutunun ölçülmesi ve anormal mikrosporogenezden kaynaklanan anormal polen oluşumunun gözlemlenmesi yoluyla elde edilmiştir. Bu çalışma, marul yetiştiriciliğinde haploidizasyon hakkında değerli bilgiler sağlamakta ve *L. sativa*'nın haploid bitkilerini elde etmek için eksiksiz bir protokol sunmaktadır.

Khandakar md vd. (2014) Krizantem bitkisinde haploid bitki üretme potansiyelini araştırmışlardır. Üç Kore çeşidi olan 'Yes Morning', 'Hi-Maya' ve bir saksı çeşidinden ('Peace Pink') anterler kültüre alınmıştır. Çeşitler arasında kallus indüksiyonu, 1 mg l⁻¹ 2,4-D, 2 mg l⁻¹ BA, 250 mg l⁻¹ kazein hidrolizat ve 45 mg l⁻¹ süktroz ile desteklenmiş; 2.75 g l⁻¹ gelrite ile katılaştırılmış bir bazal MS ortamında tatmin edici sonuçlar elde ederek minimum farklılıklar göstermiştir. Kallus indüksiyonu, anterlerin 48 saat boyunca 4°C'deki ortamda ön muameleye tabi tutulmasıyla artırılmıştır. Kalluslar sürgün oluşumu için, 2 mg l⁻¹ BA, 0.1 mg l⁻¹ NAA, 30 g l⁻¹ süktroz ile desteklenmiş, 2.75 g l⁻¹ gelrit ile katılaştırılmış MS ortamında kültüre alınmıştır. Kalluslardan sürgün oluşumu çeşitler arasında biraz farklılık göstermiştir. Kalluslardan elde edilen sürgünler köklendirme amacıyla 0.1 mg l⁻¹ NAA, 3 g l⁻¹ gerlit ve 30 g l⁻¹ süktroz içeren MS ortamına aktarılmıştır. Aklimatizasyon ve toprağa transferin ardından, her bir çeşitten 50 adet rejenere olmuş bitkicik ploidi gözlemi için rastgele seçilmiştir. Kromozom sayımı, 'Yes Morning' bahçe çeşidinde haploid bir bitkicikğin varlığını ortaya koymuştur.

Literatür taramasına dayanarak, stevia gibi *Asteraceae* familyası bitkilerinin ıslah programları yoluyla geliştirilmesine yönelik bir talep olmasına rağmen, bu türlerde haploidi üretimi konusunda yalnızca sınırlı araştırma yapıldığı sonucuna varılabilir. Uskutoğlu vd. (2019), *Stevia rebaudiana* Bertoni üzerinde embriyo oluşumunu teşvik etmek için besin bileşimlerine odaklanan bir çalışma yürütmüş, ancak embriyoların tutarlı bir şekilde farklılaşması sağlanamamıştır. Buna karşılık, başta *Tagetes* spp. olmak üzere diğer *Asteraceae* familyası bitkilerinde haploid üretimi üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kumar vd. (2019, 2020) ve Chinnathambi vd. (2024), *Tagetes* türlerinde haploidleri indüklemek için androgenezi etkileyen çeşitli faktörleri optimize eden başarılı protokoller geliştirmiştir. Hindiba ve ayçiçeğinde haploid üretimi üzerine yapılan çalışmalar da bu tekniğin *Asteraceae* familyası bitkilerinde genetik iyileştirme potansiyeline ilişkin değerli bilgiler sağlamaktadır. Genel olarak, bu alanda yapılacak daha fazla araştırma, *Asteraceae* familyası türlerinde mahsul verimliliğini ve kalitesini artırmak için umut vaat etmektedir.



3. MATERYAL VE METOT

Araştırma 2022-2024 yıllarında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Laboratuvarı ile Bahçe Bitkileri Bölümü Doku Kültürü Laboratuvarı ve Güney Agripark Ar-Ge Merkezi'nde yürütülmüştür. Çalışmada toplam 3 deneme yapılmış (paralel çalışma olarak) ve bu denemelerin ikisi Eylül 2022 yılında yapılırken bir denemede Eylül 2023 yılında yapılmıştır. Ultra saf su cihazı, steril kabin, iklimlendirme kabini, büyüme odası, otoklav gibi tüm gerekli ekipmanlar kullanılmıştır. Ayrıca, laboratuvarlarda kullanılan kimyasallar ve doku kültürü besiyeri malzemeleri de kullanılmıştır.

3.1. Materyal

Bitki materyali olarak *Stevia rebaudiana* Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü tecilli çeşitleri kullanılmıştır. Söz konusu çeşitlere ait bitkiler klonal çoğaltılarak Güney Agripark Ar-Ge Merkezi seralarında yetiştirilmiştir (Şekil.3.1).

Stevia bitkisinde çiçeklenme indeterminant özelliktedir ve bu nedenle bir bitkide aynı anda çiçeklenmenin farklı dönemlerini görmek mümkündür. *Stevia* bitkisi çiçeklenmeye Akdeniz ikliminde genellikle Eylül ayında başlamakta ve çiçeklenme periyodu yaklaşık olarak 1 ay devam etmektedir. Bu süre boyunca anter kültürü için uygun safhada çiçek tomurcukları kolaylıkla bulunabilmektedir.

Eylül ayı içerisinde üç çeşidin çiçek tomurcukları uygun dönemde toplanarak laboratuvarımıza getirilmiştir. Anterler, bu tomurcuklarından optimal gelişim aşamalarında çıkarılmış ve denemelerde eksplant olarak kullanılmıştır.

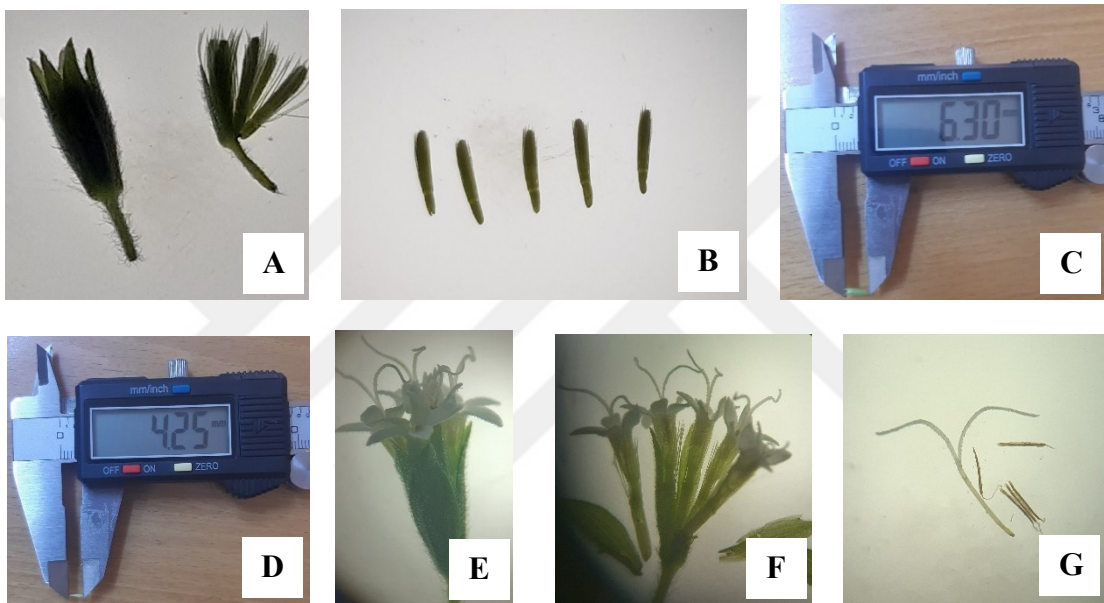


Şekil 3.1. Tescilli çeşitlere (Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü) ait bitkilerin, yetiştirme mevsiminde Güney Agripark Ar-Ge Merkezi seralarında genel görünüşleri

3.2. Metot

3.2.1. Sitolojik çalışmalar ve tomurcukların toplanması

Çiçek tomurcukları sabah saatlerinde Uskutoğlu vd. (2019) tarafından belirtilen protokol izlenerek toplanmıştır. Tomurcukları 7 sınıfa ayırarak en uygun aşamaları önermişlerdir. Ancak bizim gözlemlerimiz, Uskutoğlu vd. (2019) tarafından en erken evre olarak tanımlanan B sınıfının en uygun tomurcukları temsil ettiğini göstermektedir. Bu uygun tomurcuk aşamasında, anterlerin gevrek olduğu, yeşilimsi bir renk sergilediği ve sulu jel gibi parlak ve pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.2). Stevia'nın anterleri iki lobdan oluşur.



Şekil 3.2. Çiçek gelişimini yakalamak: tomurcuktan tam çiçeklenmeye kadar, anterler ve dişi organların genel görünüşü

- A) Anterlerde çoğunlukla tek çekirdekli mikrosporları içeren çiçek tomurcuğu (kapitulum)
- B) Uygun dönemdeki çiçek tomurcuğundan alınmış olan beş adet çiçekçik
- C) Optimal çiçek tomurcuğunun boyutu milimetre cinsindendir
- D) Optimalçiçek tomurcuğu içindeki bir çiçekçiğin boyutu milimetre cinsindendir
- E) Tamamen çiçekçikleri açmış çiçek tomurcuğu
- F) Tamamen çiçeklenmiş beş adet çiçekçik
- G) Tamamen çiçeklenmiş çiçeğin dişi kısımları ile ince ve küçük filamentlere sahip beş adet anter

3.2.2. Yüzey sterilizasyonu

Ön işlemlerden geçirilen tomurcuklar öncelikle yüzey sterilizasyonuna tabi tutulmuştur (Şekil 3.3). Uygun safhada, yani tek çekirdekli mikrosporlara sahip anterleri içeren tomurcuklar; önce akan su ile yıkanıp, ardından steril kabin içerisinde %70'lik etil alkolde 1 dakika bekletilmiş ve steril su ile durulanmıştır. Daha sonra %20'lik ticari sodyum hipoklorit ve 1-2 damla Tween-20 (Duchefa-Polysorbate 20, P1362, Hollanda) içeren çözeltide 15 dakika bekletilerek, hafifçe çalkalanmıştır. Son olarak steril su ile üç kez yıkanıp yüzey sterilizasyonu işlemlerinden geçirilmiştir.



Şekil 3.3. Steril kabin içerisinde yüzey sterilizasyon işlemlerinden bir görüntü

3.2.3. Tomurcuklardan anterlerin Embriyogenik kallus / embriyo teşvik ortamına alınması ve uygulamaları

Besi ortamları standart prosedürlere göre hazırlanmış ve ardından sterilizasyonu sağlamak için 121°C'de 15 psi basınç altında 15 dakika boyunca otoklavlanmıştır (NC 40M, NUVE Sanayi, Ankara, Türkiye). Murashige ve Skoog (MS) temel besiyeri 4.4 g.l⁻¹ (Duchefa, MO222, Hollanda) olarak tartılıp, %0.7 oranında agar (Duchefa-Phyto, P1001, Hollanda) ve %3 süktroz (Duchefa-kristalize süktroz, S0809, Hollanda), eklenerek hazırlanmıştır ve Çizelge 3.1'de belirtildiği gibi α -Naphthaleneacetic acid (NAA), 6-Benzylaminopurine (BAP) alternatifi olarak üçüncü denemede Benzyladenin (BA) ve Kinetin dahil olmak üzere çeşitli hormon konsantrasyonları eklenmiştir. Kullanılan hormonlar Duchefa, Hollanda'dan temin edilmiştir. Çözeltinin pH değeri HL 2211 pH/ORP metre (Hanna, Romanya) kullanılarak izlenmiş ve 5.7 ile 5.8 arasında tutulmuştur. pH ayarlamaları 1N HCl ve NaOH kullanılarak yapılmıştır.

Embriyo üretimini teşvik etmek için ortama %1 Gümüş nitrat (AgNO₃) eklenmiştir; ancak bunun etkisiz olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, embriyo veya Embriyogenik kallus üretimini teşvik etmek için çiçek tomurcuklarının bir gün boyunca 4°C'de soğutulması da etkili sonuçlar vermemiştir. Dolayısıyla, stevia'nın soğuk ön

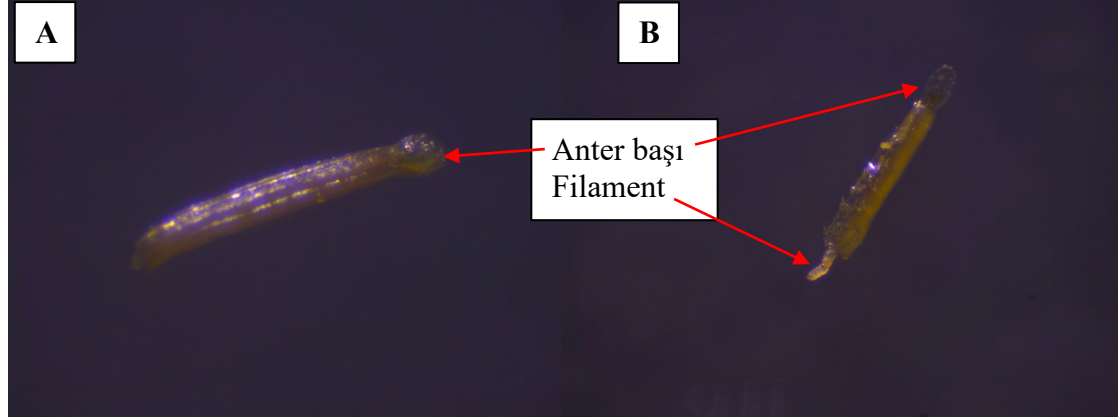
işleme veya AgNO_3 'ün ortama dahil edilmesine gerek kalmadan embriyo üretebildiği görülmektedir.

Daha sonra, yaklaşık olarak 25 mL ortam steril kabin içerisinde petri kaplarına dağıtılmıştır (Şekil 3.4). Bu adım, ortamın homojen bir şekilde dağıtılmasını sağlamış ve kontrollü laboratuvar koşullarında Embriyogenik kallus kültürlerinin büyümesini kolaylaştırmıştır.



Şekil 3.4 Otoklavlamadan sonra besi ortamının steril kabin içinde petri kaplarına aktarılması

Steril koşullarda, tomurcuklardan kesilerek alınan anterler 7 farklı MS ortamına, 10 anter/petri (90 mm) olacak şekilde yerleştirilmiştir. Her bir uygulama 5 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.1). Anterler steril kabin (JSCB-900SB, JSR, Gongju-Şehir, Kore) içinde stereo mikroskop (C-LEDS, Nikon SMZ445 Çin) altında tomurcuklardan dikkatlice çıkarılmış ve ardından belirtilen besiyerlerinde kültüre alınmıştır. Bu aşamada, anterlerin çıkarılması özellikle kırılganlıkları ve küçük filamentlerin varlığı nedeniyle son derece kritiktir. Bu filamentler, diğer bitkilerin anterlerinde olduğu kadar kolaylıkla çıkarılamaz. Dolayısıyla, sadece anterlerin kültürüne odaklanarak bu filamentlerin dikkatlice çıkarılmasına özen gösterilmelidir. Aksi takdirde, filamentlerden kallus oluşabilir (Şekil.3.5). Ekimden sonra, uygulamalar ilk 10 gün süresince karanlıkta tutulmuş ve ardından 16/8 fotoperiyot altında, 5000 lüks ışık koşullarında yerleştirilmiştir.



Şekil 3.5. A) Filamentsiz anter ve B) Filament içeren anter

Hem karanlık hem de fotoperiyot koşulları için muhafaza edilen sıcaklık 25°C olarak ayarlanmıştır. Kontrollü bir karanlık ortam oluşturmak için alüminyum folyo kullanılmış ve dış ışık etkilerinin önlenmesi sağlanmıştır (Şekil. 3.6). Ek olarak, fotoperiyodu düzenlemek için Panasonic iklimlendirme kabini (MLR-352-PE, Panasonic, Sakata, Oizumi-Machi-Ora-Gun, Gunma, Japon) kullanılmış ve deneysel ihtiyaçlara göre ayarlanmış hassas ışık/karanlık döngüleri sağlanmıştır (Şekil. 3.7). Bu denemenin sonunda kallus oranı, kallus başına embriyo sayısı, ve kallus başına embriyo oranı sayılmıştır. Petri kabı başına ortalama kallus oranı, gelişmiş kallilerin sayılması ve petri kabı sayısına bölünmesi ve ardından yüzde olarak ifade etmek için 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Petri başına ortalama kallus oranı (\%)} = \left(\frac{\text{Toplam gelişmiş kallus sayısı}}{\text{Petri kabı sayısı}} \right) \times 100$$

Kallus başına ortalama embriyo sayısını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır:

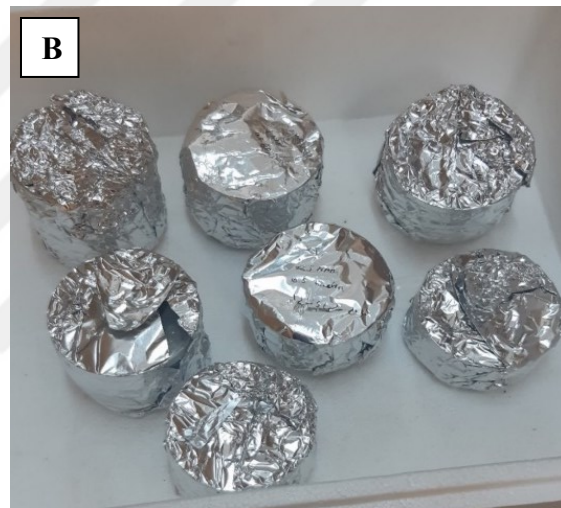
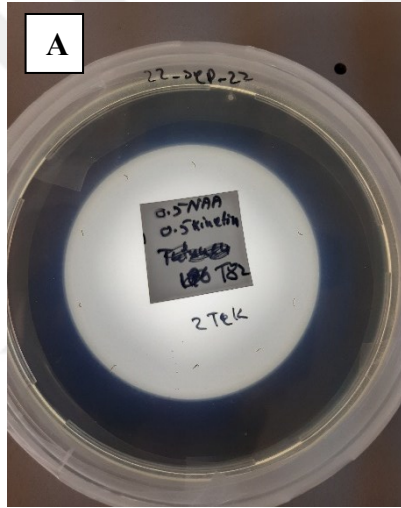
$$\text{Kallus başına ortalama embriyo sayısı} = \frac{\text{Sayılan toplam embriyo sayısı}}{\text{Toplam kallus sayısı}}$$

Toplam embriyo sayısı, her biri 10 kallus içeren beş petri kabında sayılmıştır. Kallus başına ortalama embriyo sayısı, toplam embriyo sayısının toplam kallus sayısına bölünmesi ve ardından yüzde olarak ifade etmek için 100 ile çarpılmasıyla hesaplanmıştır.

$$\text{Kallus başına ortalama embriyo oranı (\%)} = \left(\frac{\text{Sayılan toplam embriyo sayısı}}{\text{Toplam kallus sayısı}} \right) \times 100$$

Çizelge 3.1. Embriyogenik kallus ve embriyo indüksiyon ortamları

Ort.No	Tekerrür	Anter/Petri	Ortamlar
T1	5	10	MS (Kontrol)
T2	5	10	MS + 0.5 mg l ⁻¹ NAA + 0.5 mg l ⁻¹ BAP
T3	5	10	MS + 1.0 mg l ⁻¹ NAA + 0.5 mg l ⁻¹ BAP
T4	5	10	MS + 2.0 mg l ⁻¹ NAA + 0.5 mg l ⁻¹ BAP
T5	5	10	MS + 0.5 mg l ⁻¹ NAA + 0.5 mg l ⁻¹ Kinetin
T6	5	10	MS + 1.0 mg l ⁻¹ NAA + 0.5 mg l ⁻¹ Kinetin
T7	5	10	MS + 2.0 mg l ⁻¹ NAA + 0.5 mg l ⁻¹ Kinetin

**Şekil 3.6.** Besi ortamına ekimi yapılan anterlerin karanlık şartlarda kalabilmesi için petrilerin aliminyum folyo ile sarılması. A) Besi ortamına alınmış anterler, B) Karanlık şartlardaki anterler



Şekil 3.7. Kültüre alınan anterlerin inkübasyonunda kullanılan iklimlendirme kabini

3.2.4. Embriyogenik kallusların ve embriyoların farklılaşma ortamına aktarılması

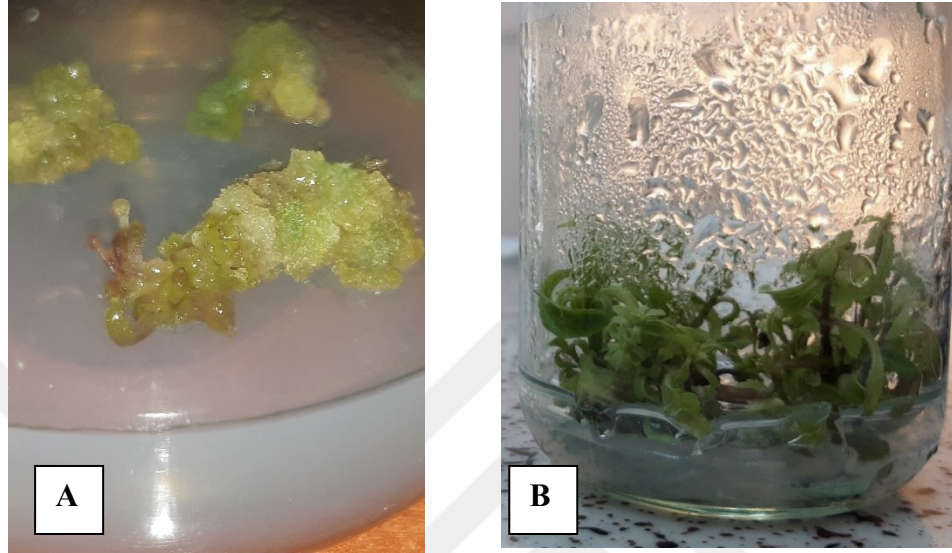
Embriyogenik kalluslar sürgün oluşumunu teşvik etmek amacıyla 4 farklı MS ortamına aktarılmıştır (Çizelge 3.2). Her bir uygulama için ayrı 200 ml'lik kavanozlara üç Embriyogenik kallus kültüre edilerek tüm örneklerde hem yaş hem de boyut açısından tekdüzelik sağlanmıştır (Şekil 3.8). Her bir uygulama için 5 kavanoz bulunmaktadır, her biri tekrarlanmıştır. Deneysel prosedürde, her bir kavanoza yaklaşık 30 mL ortam dağıtılmıştır.

Çizelge 3.2. Embriyogenik kallus farklılaşması için kullanılan ortamlar

Ort.No	Tekerrür	Kalus/Kavanoz	Ortamlar
M1	5	3	MS (Kontrol)
M2	5	3	MS + 0.25 mg l ⁻¹ BAP
M3	5	3	MS + 0.5 mg l ⁻¹ BAP
M4	5	3	MS + 1.0 mg l ⁻¹ BAP

Bu hacim dikkatlice ölçülmüş ve kültürlerin büyüme koşullarında tutarlılığı sağlamak için tüm deneme birimlerinde standardize edilmiştir. Kültüre alınanın

ardından kavanozlar, 16 saat ışık ve 8 saat karanlıktan oluşan bir fotoperiyot döngüsü eşliğinde 5000 Lux aydınlatma yoğunluğu sağlayacak şekilde programlanmış bir iklimlendirme kabinine yerleştirilmiştir. Bu denemeler sırasında sıcaklık 25°C olarak sabitlenmiştir. Eksplantlar her üçüncü haftada bir aynı besiyeri kullanılarak alt kültüre alınmış ve alt kültüre alma deneme boyunca yaklaşık 4 ila 5 kez gerçekleştirilmiştir. Bu süreç sonunda, kallus başına düşen ortalama sürgün sayısı belirlenmiştir.



Şekil 3.8. A) Alt kültüre alınan kalluslar, B) Embriyolardan başarılı bir şekilde sürgünlere gelişimi

3.2.5. Bitkiciklerin köklendirilmesi

Sürgünler elde edildikten sonra, kök oluşumunu teşvik etmek için aşağıdaki ortamlar kullanılmıştır (Çizelge3.3). Her bir uygulama için, 20 sürgün kök oluşturma ortamına aktarılmıştır. Sürgünler steril kabin içerisinde sürgün oluşan bölgesinin tabana yakın bir yerinden dikkatlice kesilip alınmış ve köklendirme ortamına aktarılmışlardır (Şekil. 3.9). Bu süre zarfında, ilk kök başlangıcına kadar geçen günler, kültüre alınan 20 sürgünden kök oluşumu başlayan sürgün sayısı, sürgün başına ortalama kök sayısı, köklenen sürgünlerin yüzdesi ve özellikleri kaydedilmiştir. Her biri için yaklaşık 30 ml ortam içeren 200 ml'lik bir kavanoz kullanılmıştır. Her kavanozda dört sürgün yer almış ve 5 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

Sürgün başına ortalama kök sayısı ve 20 sürgünde köklenen sürgün yüzdesi aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır:

$$\text{Sürgün başına ortalama kök sayısı} = \frac{\text{Sayılan toplam kök sayısı}}{\text{Toplam sürgün sayısı}}$$

$$\text{Köklenen sürgün yüzdesi} = \left(\frac{\text{Köklenen sürgün sayısı}}{\text{Toplam sürgün sayısı}} \right) \times 100$$

Çizelge 3.3. Çeşitli ortamların bitki köklenmesini teşvik etme üzerindeki etkileri

Uyg. No	Tekerrür	Sürgün/Kavanoz	Uygulamaları
1	5	4	$\frac{1}{2}$ MS
2	5	4	$\frac{1}{2}$ MS + 1mg l ⁻¹ NAA
3	5	4	$\frac{1}{2}$ MS + 1 mg l ⁻¹ IBA

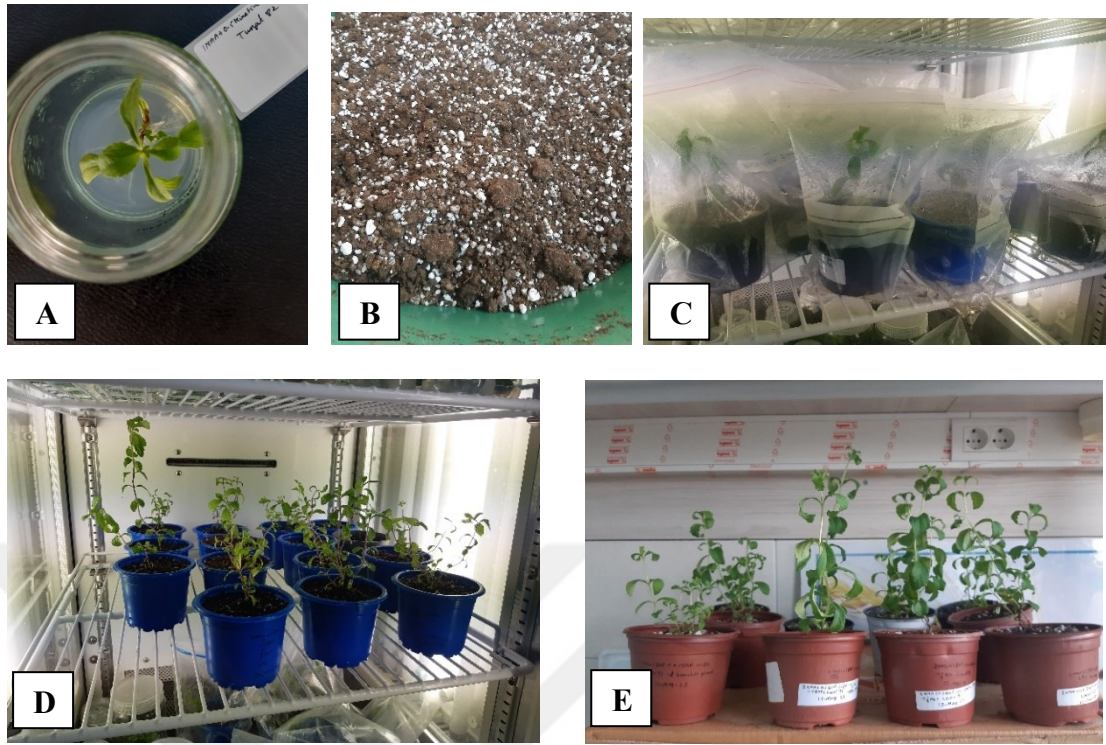


Şekil 3.9. Sürgünlerin steril kabin içinde dipten kesilerek köklendirme ortamına aktarılması. A) Farklılaşmış sürgünlerin kesim için çıkarılması, B) Sürgünlerin köklendirme ortamına yerleştirilmesi ve köklenmenin oluşması

3.2.6. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması

Sürekli *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş ve köklenmiş olan bitkiler, plastik örtüler altında kademeli olarak dış koşullara alıştırılmıştır (Şekil. 3.10). Öncelikle, köklenmiş bitkicikler, kavanozlardan pens yardımıyla çıkarılarak köklerdeki agar artıkları akan su altında temizlenmiştir. Agardan tamamen arındırılan bitkicikler, torf:perlit içeren 2:1 oranında hazırlanmış saksılara (9x7 cm, Özka Vakum Türkiye) dikilmiştir. Bitkiler iklim şartlarına uyum sağladıktan sonra, daha büyük saksılara aktarılmıştır.

Kontrollü büyüme odasına yerleştirilen saksıların üstü fermuarlı plastik örtü ile kapatılarak kademeli olarak açılmıştır. 10 gün boyunca kilitli poşet içerisinde 16/8 fotoperiyotta ve 25 °C sıcaklıkta bekletilmiştir. Ardından kilitli poşetlerin ağızları açılmıştır ve 5 gün daha aynı fotoperiyotta 25°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Daha sonra ise bitkiler kilitli poşetten tamamen çıkarılarak 5 gün daha aynı şartlarda bekletilmiştir. Doku kültürü yapılan bitkiler nakledilmeden önce toprak yeterince nemli olmalıdır. Bu nedenle, nem seviyesi günlük olarak kontrol edilmiş ve plastik torbaların içindeki nem düzenli olarak su püskürtülerek korunmuştur. Aşırı sulama veya kuruluk bitkilerin büyümesini önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Son olarak, bitkiler sera ortamına alınmıştır.



Şekil 3.10. Bitkilerin dış koşullara alıştırılması süreci

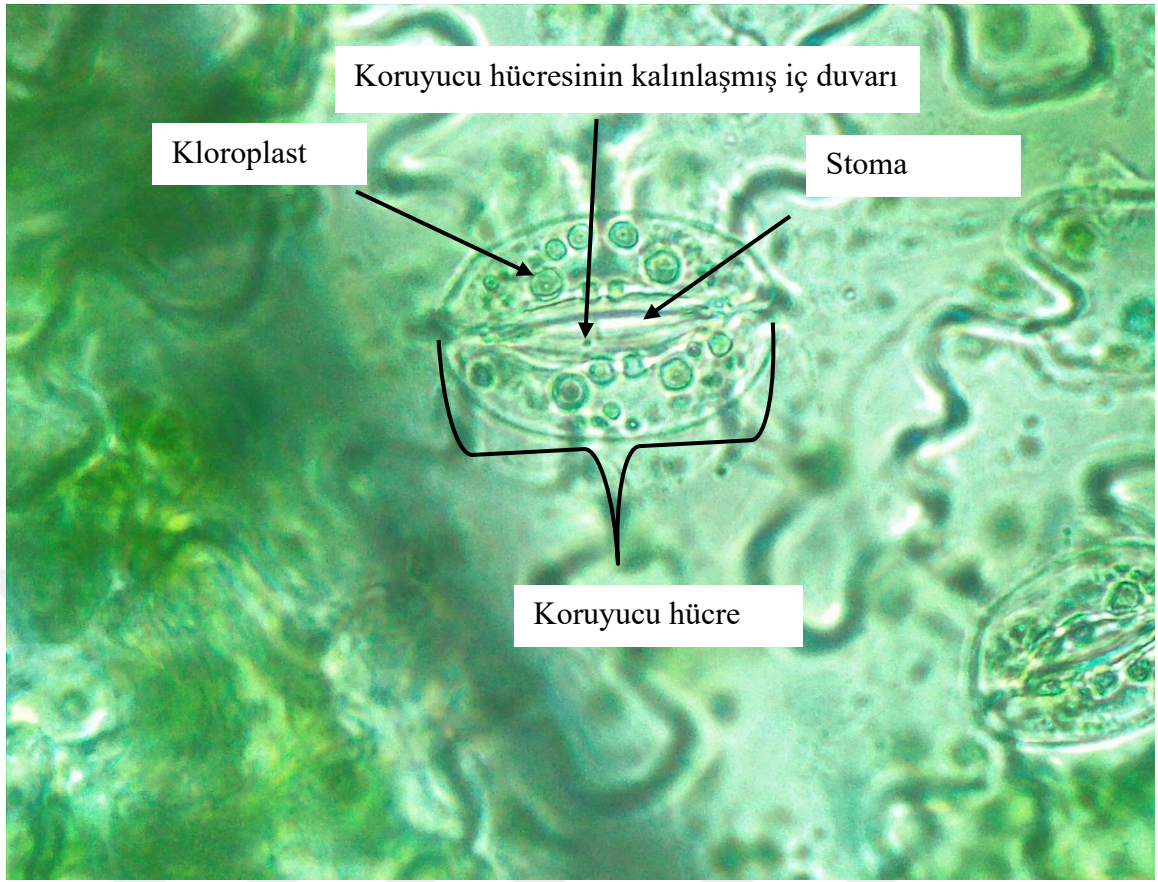
- A) Köklü bitkiler aklimatizasyon için hazırlanması
- B) Dikim ortamı olarak 2:1 oranında torf ve perlit karışımı hazırlanması
- C) Bitkiler kontrollü bir ortam yaratmak için fermuarlı plastik torbaların içine dikkatlice yerleştirilmesi ve bir büyüme odasına aktarılması
- D) Plastik torbaların bitkilerden çıkarılması ve 5 gün boyunca büyüme odasında daha uzun süre iklimlenmeye bırakılması
- E) Aklimatizasyon döneminin ardından bitkiler dış koşullara tamamen adapte olması ve nakil için hazır hale gelmiş bitkiler

3.2.7. Ploidi analizleri

Bitkilerin ploidi seviyesi dört temel parametre kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu parametreler şunlardır: stoma sayısı, stoma boyutu, kloroplast sayısı ve kromozom sayısı. Birden fazla örnekteki ploidi seviyesi belirlenmesinin doğruluğunu artırmak için flow sitometrisi kullanılması gerekmektedir.

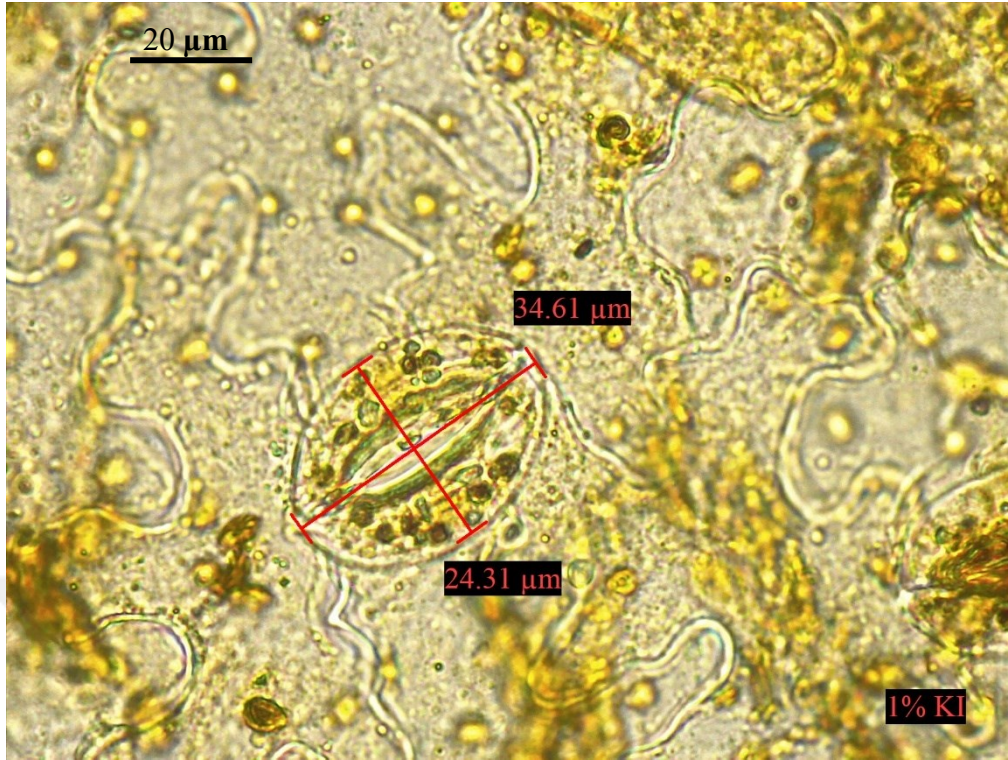
3.2.7.1. Kloroplastlar, stoma sayısı ve boyutu

Kloroplastlar 10 stoma hücresinde sayılmış ve her bir koruyucu hücresi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Stoma sayısı, her biri üç farklı bölümden oluşan üç farklı yaprakta, mikroskop alan görüşüne dayanarak kaydedilmiş ve bunun için ortalama bir değer hesaplanmıştır (Şekil.3.11).



Şekil 3.11. Kloroplastlar stomaların her iki koruyucu hücrelerinde de sayılması

Stoma ölçümleri Hosseini vd. (2018) göre modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Stoma genişliği ve uzunluğu, üç yapraktan alınan on stoma örneğinde ölçülmüştür ve her biri için bir ortalama değer hesaplanmıştır (Şekil.3.12). Bu amaçla LEICA DM 750 bileşik ışık mikroskobunda 40x görüş alanı gözlemlenmiştir ve LASEZ yazılımı kullanılmıştır.



Şekil 3.12. Stomaların genişliği ve uzunluğu mikrometre (μm) cinsinden ölçülmesi

3.2.7.1.1. Kloroplast boyanması

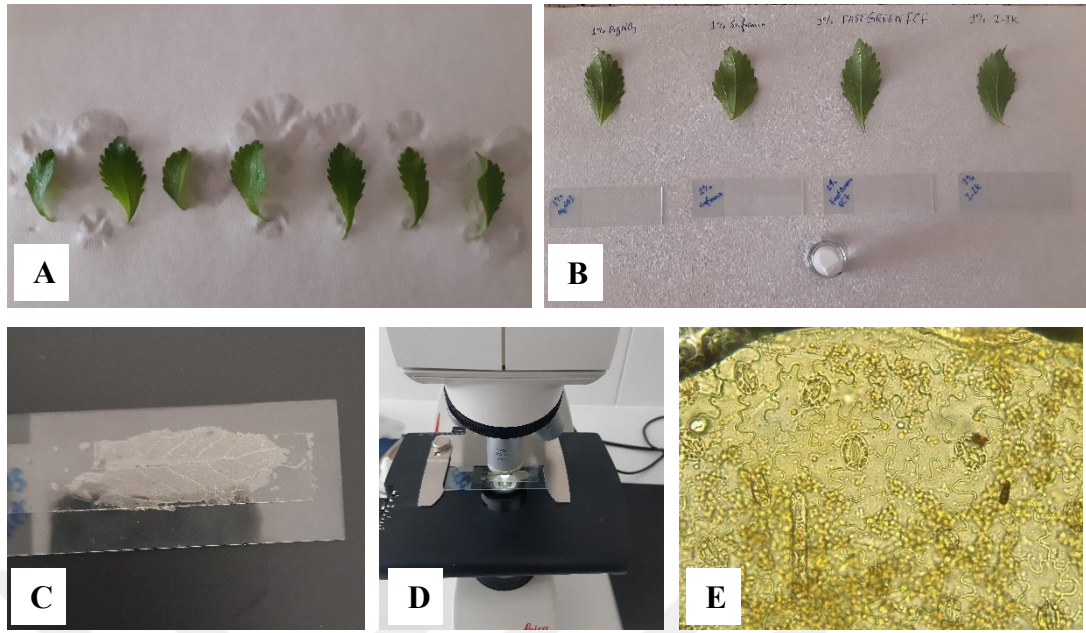
Boyama için beş çözelti hazırlanmıştır bunlar: %1 AgNO_3 (Duchefa, SO536, Hollanda), %1 Safranin (Merck, Almanya), %1 Fast Green FCF (Merck, Almanya), %1 I-KI lugol çözeltisi (Merck, Almanya; Duchefa, P0518, Hollanda) ve 1:3 I:KI lugol çözeltisi'dir. Her %1'lik çözelti için, 100 ml'lik son hacme her bileşenden 1 gram eklenmiştir. Boyar madde olarak önceden hazırlanmış aseto karmin de (Norateks Kimya, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır.

3.2.7.1.2. Stomaların hazırlanması

Stevia yapraklarının epidermisi çok ince ve yapışkandır, bu da epidermisin çıkarılmasını zorlaştırır. Bu nedenle, boyama sonuçları tek bir yöntemle tatmin edici olmadığı için yaprak epidermisini elde etmek için altı yöntem uygulanmıştır.

A: Birinci yöntem

Stoma sayımı için, taze yapraklar gündüz toplanıp, akan su ile yıkanıp ve kurutulmuştur. Yöntem Brewer'a (1992) göre modifikasyonlarla gerçekleştirilmiştir. Şeffaf tırnak ojesi sürülmüş ve en az 15 dakika kurumaya bırakılmış, ardından tırnak ojesi sürülen kısma şeffaf bir bant uygulanmış ve epidermisi ortaya çıkarmak için bant çıkarılmıştır. Bunu takiben boyama solüsyonu uygulanmıştır. Fazla boya deiyonize su ile yıkanmıştır ve örnekler kurutulmuştur. Açıkta kalan epidermisli şeffaf bant daha sonra temiz bir cam lam üzerine yapıştırılmış ve mikroskop altında (LEICA DM 750) gözlemlenmiştir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. Stomaların sayılması, uzunluklarının ve genişliklerinin ölçülmesi

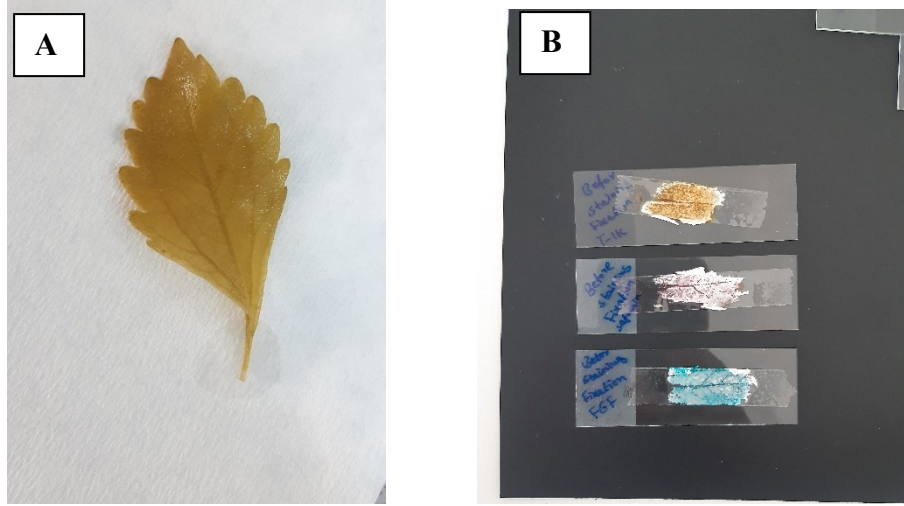
- A) Yaprakların su ile yıkanması ve kurumaya bırakılması
- B) Şeffaf ojenin yapraklara uygulanması
- C) Epiderminin şeffaf plastik bant kullanılarak çıkarılması
- D) Lam mikroskop altında gözlemlenmesi
- E) Stomanın mikroskop altındaki görüntüsü

B: İkinci yöntem

Yaprakların en az 15 dakika boyunca boya solüsyonlarına daldırılmasını ve ardından suyla yıkanmasını içermektedir. Yaprak kuruduktan sonra yukarıda tarif edildiği gibi şeffaf oje uygulanmıştır.

C:Üçüncü yöntem

Üçüncü yöntem Detrez vd. (1989) göre küçük değişikliklerle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, taze yaprakların renginin değiştirilmesini içermektedir. Yapraklar, renkleri değişene kadar etanol ve glasiyal asetik asit (3:1) çözeltisine daldırılmıştır. Bu çözelti, kloroplastları stabil hale getirerek ve hücrelerin geçirgenliğini artırmış, boyama çözeltisinin etkili bir şekilde nüfuz etmesini sağlamıştır. Ardından, yapraklar en az 5 dakika süreyle I-KI (1:3) boyama çözeltisine aktarılmıştır. Fazla boya çıkarıldıktan sonra şeffaf oje sürülmüş ve epidermis şeffaf bant ile çıkarılmıştır (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. Etanol asetik asitte yaprak fiksasyonu. A) 3:1 etanol asetik asit çözeltisine daldırıldıktan sonra yaprak ve B) Mikroskopik lam

D: Dördüncü yöntem

Dördüncü yöntem yaprak üzerinde küçük bir kesim yapılmasını ve tüm yaprağın 30 dakika boyunca doymuş bir I-KI (1:3) boyama çözeltisine daldırılmasını içermektedir. Fazla boya yıkanmış, yaprak kurutulmuş ve Brewer'a (1992) göre epidermis yukarıda oje ve şeffaf bant tarif edildiği gibi çıkarılmıştır .

E: Beşinci yöntem

Bu yöntem taze yaprağa en az 15 dakika boyunca doğrudan oje sürülmesini ve ardından şeffaf bant kullanılarak epidermisin çıkarılmasını içermektedir (Brewer,1992). Daha sonra, bir damla I-KI (1:3) daha önce de belirtildiği gibi bileşik mikroskop altında gözlemlenmeden önce birkaç dakika boyunca lam üzerine yapıştırılmıştır.

F: Altıncı yöntem

Nazıkçe ve dikkatli bir şekilde epidermisin el ve jilet kullanılarak çıkarılmasını içermektedir. Çıkarılan parça bir lam üzerine yapıştırılmış ve yukarıda bahsedilen boyadan bir damla eklenerek bir dakika bekletildikten sonra lamel ile kapatılarak mikroskop altında kontrol edilmiştir. Bu yöntem uygun boyama sonuçları vermiştir.

3.2.7.2. Kromozom Sayımı

Kromozom sayımı için aktif köklenmeyi başlatmak üzere gövde çelikleri kullanılmış ve aşağıdaki ön işlem, fiksasyon, maserasyon ve boyama adımları gerçekleştirilmiştir. Çelikler yaklaşık 5 cm uzunluğunda ve her birinin tepesinde iki küçük yaprak olacak şekilde hazırlanmıştır. Çelikler 1 mg ml⁻¹ NAA çözeltisine daldırılmış ve 2:1 oranında torf ve perlit karışımı içeren küçük saksılarda kültüre alınmıştır. Saksılar nemi korumak için plastikle kilitli poşet ile kaplanmış ve köklenme için oda sıcaklığında tutulmuştur. Çelikler 10 gün içinde köklenmiştir (Şekil 3.15). Çelik Köklendirme Hormonu İnpower (NAA+IBA hormonları) (SAFA TRIM, KONYA) kullanılarak el kitabında belirtildiği şekilde kesim için başka bir yöntem kullanılmış, ancak daha az etkili olmuştur.



Şekil 3.15. Kromozom sayımı için çeliklerin hazırlanması. A) Çelik, B) 10 gün içinde köklenen bitki

Aşağıdaki protokoller Kondo vd. (2020), Libik-Konieczny vd. (2018) ve Piosik vd. (2016) tarafından yapılan değişikliklere göre yürütülmüştür.

A: Ön işlem

Kökler, ön işlem için sabah 7:00, 8:00, 9:00, 10:00 ve 11:00 olmak üzere belirli zaman aralıklarında toplanmıştır. Metafaz hücrelerinin sayısını artırmak ve kromozom yoğunlaşmasını geliştirmek için aşağıdaki ön işlemler kullanılmıştır.

Çizelge 3.4. Stevia kromozom sayımı için kullanılan ön işlem yöntemleri

Ajan (Kimyasal)	Konsantrasyon	Zaman (h)	Koşullar (sıcaklık/ışık)
8-hydroxyquinoline	2mM	24	4 °C'de karanlık
kolhisin	%1	24	4 °C'de karanlık
1-bromonaphtaline	doymuş	24	4 °C'de karanlık

B: Sabitleme (Fiksasyon)

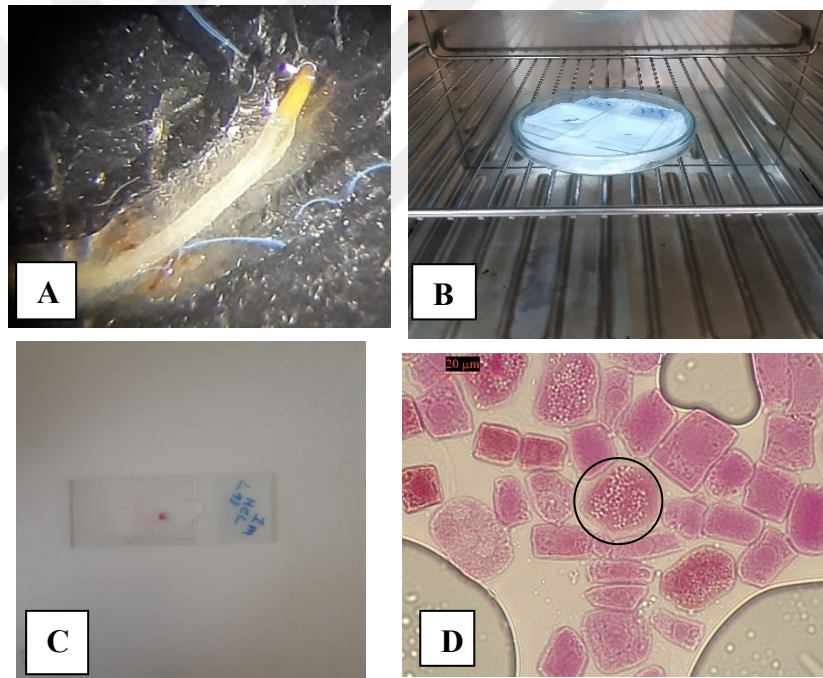
Ön işlemden geçirilen kökler çıkarılıp damıtılmış suyla durulandıktan sonra 3:1 etanol asetik asit çözeltisi içinde oda sıcaklığında karanlıkta beş saat bekletilmiştir. Fiksasyondan sonra, kökler kromozom sayımından önce 4°C'de %70 etanol içinde saklanabilmektedir.

C: Maserasyon, boyama ve kromozom sayımı

Kökleri maserasyona tabi tutmadan önce, etanol kalıntılarını gidermek için bir saat boyunca damıtılmış su ile durulanmıştır. Durulamadan sonra, maserasyon 1 M HCl ve %2 enzim solüsyonlarında 37°C'de 20 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Enzim çözeltisi Macerozyme R-10 (Duchefa Biochemie, Hollanda) ve Selülaz Onozuka R-10

(Duchefa Biochemie, Hollanda) kullanılarak hazırlanmıştır. 0.5 mm'lik bir kök ucu kesilmiş ve 10 µL enzim çözeltisi içeren bir cam lam üzerine ve 1 M HCl içeren ayrı bir lam üzerine yerleştirilmiştir. İnkübasyon sırasında nemi korumak için cam bir petri kabının içine bir kağıt ıslatılarak yerleştirilmiştir. Lamlar daha sonra petri kabının içine yerleştirilmiş ve 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir (Memmert, D-91126 Schwabach, FRG, Almanya). İnkübasyon süresinin uzunluğu köklerin sertliğine bağlı olarak değişmiştir daha yumuşak kökler daha kısa bir inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon süresini kök durumuna göre ayarlamak önemlidir. Özellikle Steviada, en iyi sonuçları elde etmek için inkübasyon süresinin dikkatli bir şekilde gözlemlenmesi gerekir.

İnkübasyon süresinden sonra, kökler başparmak kullanılarak bir damla asetokarmin boyama solüsyonunda maserasyona tabi tutulmuş ve ardından mikroskop altında gözlemlenmiştir (Şekil.3.16). Hem 1 M HCl hem de enzim çözeltisi kökleri etkili bir şekilde maserasyona tabi tutarken, ortaya çıkan kromozom görünümü tatmin edici bir sonuç ortaya koymamıştır. Bunun üzerine protokol Kondo vd. (2020) göre revize edilmiş ve aşağıda özetlendiği gibi yeni bir deneme gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.16. A) Ön işlem görmüş kök, B) Enzim veya HCl içinde inkübe edilmiş köklere sahip slaytlar, C) Masere edilmiş ve boyanmış kök, D) Mikroskop altında kromozomları görülebilen stevia hücreleri

3.2.7.3. Kromozom sayımında ikinci yöntem

Bu protokolda aşağıdaki adımlar uygulanmıştır.

A: Kök numune hazırlama

Taze ve beyaz kökler gözlem için en uygun aşamadaki köklerdir. Tohumların ekimden 3 hafta sonra gözlemlenmesi tavsiye edilirken, çelikler için gözlem ideal olarak dikimden 3-4 hafta sonra yapılmalıdır. Saksılar yoğun köklendiklerinde kök uçlarını çıkarmak ve bulmak zorlaşmaktadır. Bu gözlem sürelerini bitkilerin özel büyüme modellerine göre ayarlamak önemlidir. Örnekleme için ardışık güneşli günler tercih edilmiştir. Örnekleme günü ve öncesindeki günler için hava tahmininin güneşli koşullar öngörmesi durumunda bir örnekleme günü seçilmesi tavsiye edilir. Bu, doğru örnekleme ve gözlem için en uygun koşulları sağlamaktadır. Kök uçları, 5 ila 8 mm uzunluğunda ve sabah 10:30 civarında toplanmıştır. Bu uzunluk aralığı detaylı inceleme ve analiz için uygundur. Örnekleme sürecine herhangi bir müdahale olmaması için, örnekleme günü öncesinde bitkilere sulama yapılmaması tavsiye edilir.

B: 2 mM 8-hidroksikinolin içinde ön işlem

Bu işlem kromozom yoğunlaşmasına ve Metafazdan sonra hücre bölünmesinin engellenmesine neden olmaktadır. Süre ve sıcaklıklar ön testler ve önceki raporların incelenmesi ile belirlenmelidir. Genel olarak, uzun süre işlem ve yüksek sıcaklık güçlü etkiye sahiptir. Ön testler için aşağıdaki 6 ön işlemi denenmiştir.

1. 4°C 5 saat ve 24 saat fiksasyon
2. 25°C (Oda sıcaklığı) 4 saat ve 5 saat fiksasyon
3. 4°C 24 saat ve 24 saat fiksasyon
4. 25°C 24 saat ve 5 saat fiksasyon
5. 4°C 24 saat ve 5 saat fiksasyon
6. 25°C 2 saat + 4°C 2 saat ve 5 saat fiksasyon

Uygun olmayan ön işlem, kromozomların doğru sayımı için çok uzamış kromozom ya da hücre ölümü nedeniyle yok olmuş kromozomlarla sonuçlanabilmektedir.

C: Fiksasyon

Kökler fiksasyon için oda sıcaklığında 5 ve 24 saat boyunca 3:1 (v/v) etanol ve asetik asit karışımı ile tutulmuştur. Fiksasyondan sonra, kök uçları kullanılmadan önce 4°C'de %70 etanol içinde saklanabilir.

Depolanan kök uçları, etanolü temizlemek için 20-60 dakika boyunca damıtılmış suda bekletilmiştir. Kök segmentleri, damıtılmış suya daldırılan kök uçlarının 2.0 mm'lik bir kısmını izole etmek için bir cam lam üzerinde kesilmiştir. Her bir kök ucu daha sonra üç küçük parçaya bölünmüştür. Bir pipet kullanılarak su çıkarıldıktan sonra, kök segmentlerine hemen %2 (w/v) Selülaz Onozuka RS (Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japonya) ve %2 (w/v) Pektoliyaz Y-23 (Kikkoman Corporation, Chiba, Japonya) içeren bir enzim çözeltisinden 10 µL eklenmiştir. Segmentler daha sonra su ile nemlendirilmiş kapalı bir kapta inkübe edilmiştir. Inkübasyon 37°C'de 20 dakika boyunca gerçekleştirilmiştir.

Bu işlemde önemli olan nokta inkübasyon süresi bitkinin köküne göre 2 ila 20 dakika arasında değişmesidir. Stevia'nın, köklerinin sert olması nedeniyle 20 dakikalık bir inkübasyon süresi yeterli olmuştur. Diğer önemli olan bir noktada köklerdeki toprak parçacıklarının ve diğer kalıntıların mikroskop altında tamamen temizlenmesidir.

İnkübasyondan sonra, enzim solüsyonu dikkatlice çıkarılmış ve bir damla (20µl) %45 asetik asit 1-2 dakika boyunca kök ucuna damlatılmıştır. Daha sonra kök uçlarının üzerine bir lamel yerleştirilmiş ve hücreler bir iğne ile dürtülmek suretiyle dağıtılmıştır.

Yine lamın her iki tarafından 20 µl (her bir taraf 10 µl) %45 asetik asit uygulanmıştır ve iğne ile köşeden köşeye dürtmeden önce her seferinde ısıtılmıştır. Uygulama sonunda örnekler başparmakla hafifçe ezilmiştir . Önce yavaşça bastırılmış ve daha sonra kuvvetlice bastırılmıştır. Hazırlanan lam alüminyum folyo ile kaplanmış ve bir gün boyunca -80°C’de ya da sıvı nitrojende bu imkanlar sağlanamıyorsa -20 °C’de en az bir hafta süre ile bekletilmiştir. Floresan mikroskop ile gözlem almak için lamel jiletle kaldırıldıktan sonra hücreler 5 µg ml⁻¹ DAPI ile boyanmıştır .

Optik mikroskop için, %1.5(w/v) orcein, %45(v/v) asetik asit ve geri kalan distile su karıştırılır ve boyama için kullanılır. Hazırlanmış asetokarmin de kullanılır.

Eğer lamaların gece boyunca -80°C’de bekletilmesi tercih edilmiyor ve doğrudan orcein veya asetokarmin ile boyamak isteniyorsa, şu adımları izlenmelidir: sıcak bir petri kabına %45 asetik asitle ıslatılmış bir kağıt mendil yerleştirilmelidir. Bir pipet kullanarak boyama solüsyonunu lamelin her iki tarafından köklerin üzerine bırakılmalı ve tamamen boyanana kadar beklenmelidir.

3.2.8. İstatistiksel analiz:

Bu araştırma, üç farklı çeşidin, yedi farklı ortamın ve çeşitli ölçüm parametrelerinin deneme sonuçları üzerindeki etkisini incelemiştir. Her bir deneme düzeneği beş petri kabından oluşmuştur ve her bir kap 10 anter içermektedir, bu da bir tekrarı temsil etmektedir. Çeşitlerin, ortamların ve bu etkileşimlerin etkilerini ayrıntılı olarak analiz etmek için iki yönlü ANOVA gerçekleştirilmiştir ve anter kültüründen sonra elde edilen bitkilerle farklı genotipler arasında kloroplast sayısı, stoma sayısı ve boyutunu karşılaştırmak için tek yönlü ANOVA yapılmıştır. Daha sonra, anlamlılık seviyesi $P \leq 0.05$ olarak belirlenmiş olan LSD Post Hoc çoklu aralık testi, RStudio sürüm 2024.04.1 (Build 748) kullanılarak Posit Software, PBC tarafından uygulanmıştır. Bu kapsamlı istatistiksel yaklaşım, çeşit varyasyonlarının, ortam farklılıklarının ve gözlemlenen sonuçlar üzerindeki birleşik etkilerinin önem düzeylerinin detaylı bir şekilde incelenmesini sağlamıştır.

4. BULGULAR

4.1. İlk denemede ortalama kallus üretimi, kallus başına embriyo sayısı (adet) ve embriyo yüzdesi (%)

Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü gibi farklı çeşitlerden anterler, materyal ve yöntemler bölümünde ayrıntılı olarak açıklandığı gibi optimum aşamalarında kültüre alınmış, mikrosporlardan Embriyogenik kallus oluşumu da anter duvarının yarılmasını takiben on günlük karanlıktan sonra başlamıştır. Anterlerin çatlaması, anterin farklı bölümlerinde gerçekleşmiştir; bu gözlemler tüm çeşitler ve ortamlar için aynı şekilde gözlemlenmiştir. Bu durum, anterin farklı bölgelerinde bulunan mikrosporların varlığından kaynaklanabilir. Filamentlerin tamamen çıkarılması ve sadece anterlerin kültüre alınması gerektiğine dikkat etmek önemlidir (Şekil 4.1- 4.3).

Dairesel, küresel, çubuk ve kalp şeklinde olmak üzere farklı embriyo tipleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.5 - 4.7). Bitki oluşturmamayan çubuk benzeri embriyoların, özellikle ortam yüksek oranda oksin içerdiğinde, tüm çeşitlerde üretildiğine dikkat etmek önemlidir.

İlk denemede, iki yönlü ANOVA sonuçlarına göre; çeşitlerin, ortamın ve bunların interaksyonunun ortalama kallus üretimi, embriyogenik kallus başına ortalama embriyo sayısı ve embriyogenik kallus başına ortalama embriyo yüzdesi üzerinde önemli etkileri olduğunu ortaya koymuştur. Kallus üretimi için, genotip faktörü 33.41 (***) F değeri ile oldukça önemli bir etki göstermiş, ortam faktörü de 69.16 (***) F değeri ile oldukça önemli bir etkiye sahip olmuş ve genotip ile ortam arasındaki intraksiyon 11.55 (***) F değeri ile önemli bir sonuç ortaya koymuştur. Ortalama embriyo sayısı için, genotip faktörü 23.19 (***) F değeri ile oldukça önemli bir etkiye sahiptir, ortam faktörü 4.43 (***) F değeri ile önemli bir etkiye sahip olmuş ve genotip ile ortam arasındaki interaksiyon 4.63 (***) F değeri ile önemli bir sonuç ortaya koymuştur. Benzer şekilde, embriyo yüzdesi için genotip faktörü 23.19 (***) F değeri ile oldukça önemli bir etki göstermiş, ortam faktörü 4.43 (***) F değeri ile önemli bir etkiye sahiptir ve genotip ile ortam arasındaki interaksiyon 4.63 (***) F değeri ile önemlidir. Genel olarak, bu sonuçlar kallus üretimi, ortalama embriyo sayısı ve embriyo yüzdesini etkilemede hem genotip ve ortamın hem de bunların interaksyonunun önemini vurgulamaktadır. Daha sonra LSD (En Küçük Önemli Fark) testi yapılmış, bu teste göre ANOVA analizinin ardından birbirinden önemli farklılıklar gösteren belirli ortalama çiftlerinin belirlenmiştir.

Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü'ye kıyasla önemli ölçüde daha yüksek kallus yüzdesi (%47.4), kallus başına daha fazla embriyo sayısı (3.38) ve daha yüksek embriyo yüzdesi (%33.80) üretmiştir. Turgut 82 ve Tütüncü sırasıyla %30.8 ve %33.4 kallus yüzdesi, 0.60 ve 0.71 kallus başına embriyo sayısı ve %6.00 ve %7.14 embriyo yüzdesi ile tüm bu ölçütlerde daha düşük değerlere sahipti. Farklılıklar, %5 düzeyinde LSD testi ile belirlendiği üzere, 0.000'den küçük p-değerleri ve kallus yüzdesi için 33.41 ve hem kallus başına embriyo sayısı hem de embriyo yüzdesi için 23.19 F-değerleri ile istatistiksel olarak anlamlıydı (Çizelge 4.1).

Çalışmada kullanılan ortamlardan T4 ortamı, en yüksek ortalama kallus yüzdesini (%64.6), en fazla embriyo sayısını (2.83) ve en yüksek embriyo yüzdesini (%28.33) üretmiştir. Bunu kallus üretimi açısından sırasıyla %46.0 ve %43.3'lük

yüzdelere T2 ve T3 ortamı takip etmiştir. Ek olarak, T5, T7 ve T2, T4 ortamı ile benzer sayıda embriyo ve embriyo yüzdesi sergilemiş, T5 ortamı 2.39 adet embriyo ve %23.91 embriyo yüzdesi, T7 ortamı 2.51 adet embriyo ve %25.16 embriyo yüzdesi ve T2 ortamı da 1.47 adet embriyo ve %14.73 embriyo yüzdesi göstermiştir. Farklılıklar, %5 düzeyinde LSD testi ile belirlendiği üzere, 0.000'den küçük p-değerleri ve kallus yüzdesi için 69.16 ve hem embriyo sayısı hem de embriyo yüzdesi için 4.43 F-değerleri ile istatistiksel olarak anlamlıydı (Çizelge 4.1).

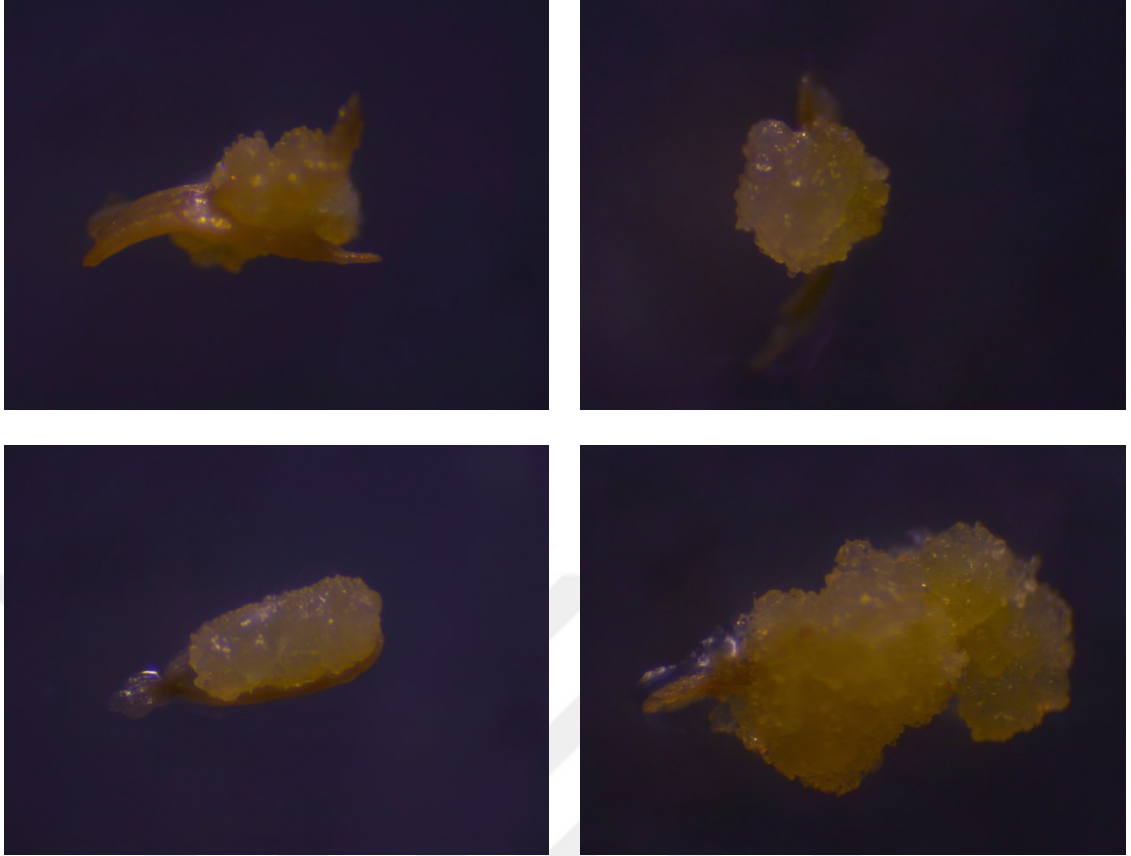
Çeşitler ve ortamlar arasındaki interaksyonlar, T4 ortamındaki Levent 93 çeşidinin en yüksek ortalama kallus yüzdesini (%78) ürettiğini, ardından aynı ortamdaki Tütüncü çeşidinin (%64), T7 ve T2 ortamındaki Levent 93 çeşidinin (%62 ve %56 sırasıyla) olduğunu göstermiştir. Embriyo sayısı ve yüzdesi de en yüksek T4 (7.5 ve %75 sırasıyla) ve T7 (6.1 ve %61 sırasıyla) ortamlarındaki Levent 93 çeşidinde; ardından T2 ortamındaki Levent 93 çeşidinde 3.62 adet embriyo ve %36.2 embriyo yüzdesi, T5 ortamında Tütüncü çeşidinde ise 3.6 adet embriyo, %36.00 embriyo yüzdesi, T5 ve T3 ortamlarında Levent 93 çeşidinde 3.57 adet (%35.7) ve 2.62 adet (%26.20) görülmüştür. Son olarak Turgut 82 çeşidinde T6 ortamında 2.2 embriyo sayısı ve %22 embriyo yüzdesi; T4 ortamında da 1 adet embriyo üretirken embriyo yüzdesi de %10 olarak kaydedilmiştir. Bu farklılıklar, %5 düzeyinde LSD testi ile belirlendiği üzere, 0,000'dan küçük p-değerleri ve kallus yüzdesi için 11.55 ve hem embriyo sayısı hem de embriyo yüzdesi için 4.63 F-değerleri ile istatistiksel olarak anlamlıydı (Çizelge 4.2).

Bu denemenin sonuçları, hem genotipin hem de ortamın kallus oluşumu, embriyo sayısını ve embriyo yüzdesini önemli ölçüde etkilediği göstermektedir. Levent 93, ölçülen tüm parametrelerde Turgut 82 ve Tütüncü'den daha iyi performans göstererek daha yüksek kallus üretimi, daha fazla embriyo sayısı ve daha yüksek embriyo yüzdesi sergilemiştir. Farklı ortamlar arasında kallus üretimi için T4'ün en etkili olduğu görülmüş, bunu T2, T3 ve T5 ortamı izlemiştir. T5, T7 ve T2 ortamları T4'e benzer embriyo sayıları ve yüzdeleri göstermiştir. İnteraksyon etkileri ayrıca, T4 ortamında Levent 93'ün en yüksek kallus ve embriyo ölçümlerini verdiği, bunu T4'te Tütüncü ve T7'de Levent 93'ün izlediğini ortaya koymuştur. Bu bulgular, anter kültürlerinde kallus ve embriyo üretimini optimize etmek için uygun genotip ve ortam seçiminin önemli rolünü vurgulamaktadır.

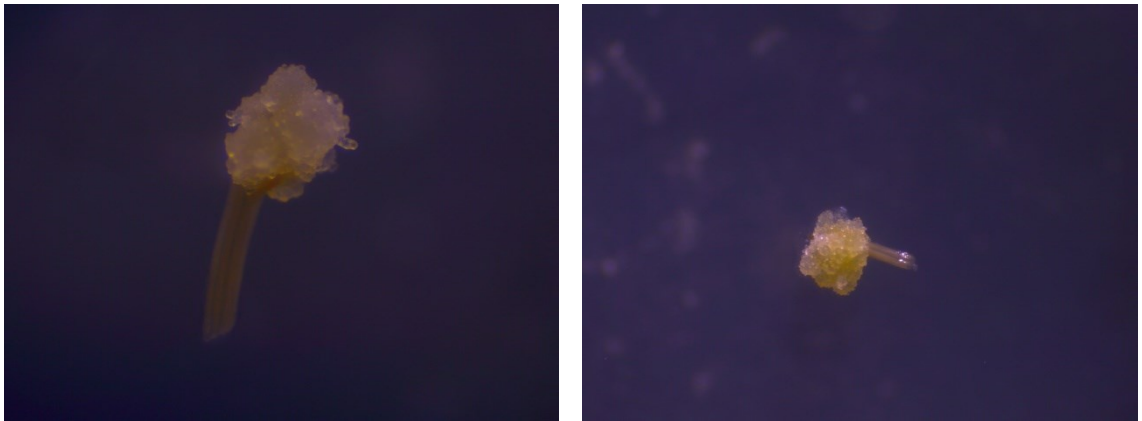
Çizelge 4.1. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve embriyo oranı (%) üzerindeki etkileri

Kaynak	Kallus Oranı (%)	Kallus başına Embriyo Sayısı (Adet)	Embriyo Oranı (%)
Çeşitler			
Levent 93	47.4 a ¹	3.38 a	33.80 a
Turgut 82	30.8 b	0.60 b	6.00 b
Tütüncü	33.4 b	0.71 b	7.14 b
P- değeri	<0.000	<0.000	<0.000
F- değeri	33.41	23.19	23.19
LSD (%5)	4.33	0.91	9.18
Ortam			
T1	0.00 e	0.00 c	0.0 c
T2	46.0 b	1.47 ab	14.73 ab
T3	43.3 b	0.87 bc	8.73 bc
T4	64.6 a	2.83 a	28.33 a
T5	40.0 bc	2.39 a	23.91 a
T6	36.0 cd	0.86 bc	8.66 bc
T7	30.6 d	2.51 a	25.16 a
P- değeri	<0.000	<0.000	<0.000
F- değeri	69.16	4.43	4.43
LSD (%5)	6.62	1.40	14.03

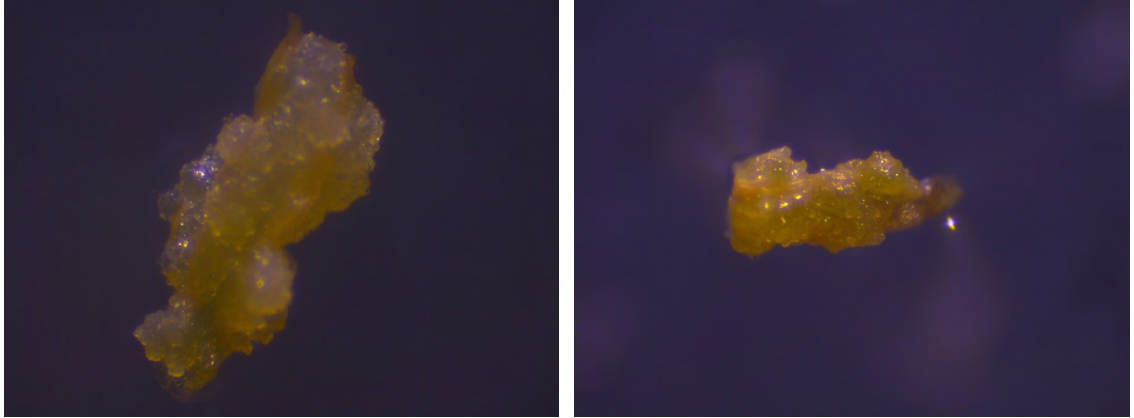
¹: Aynı harfler LSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalarla belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir. n = 5 (her bir tekerrür 5 Petri kabından oluşmuştur ve her bir kap 10 anter içermektedir), p ≤ 0.05.



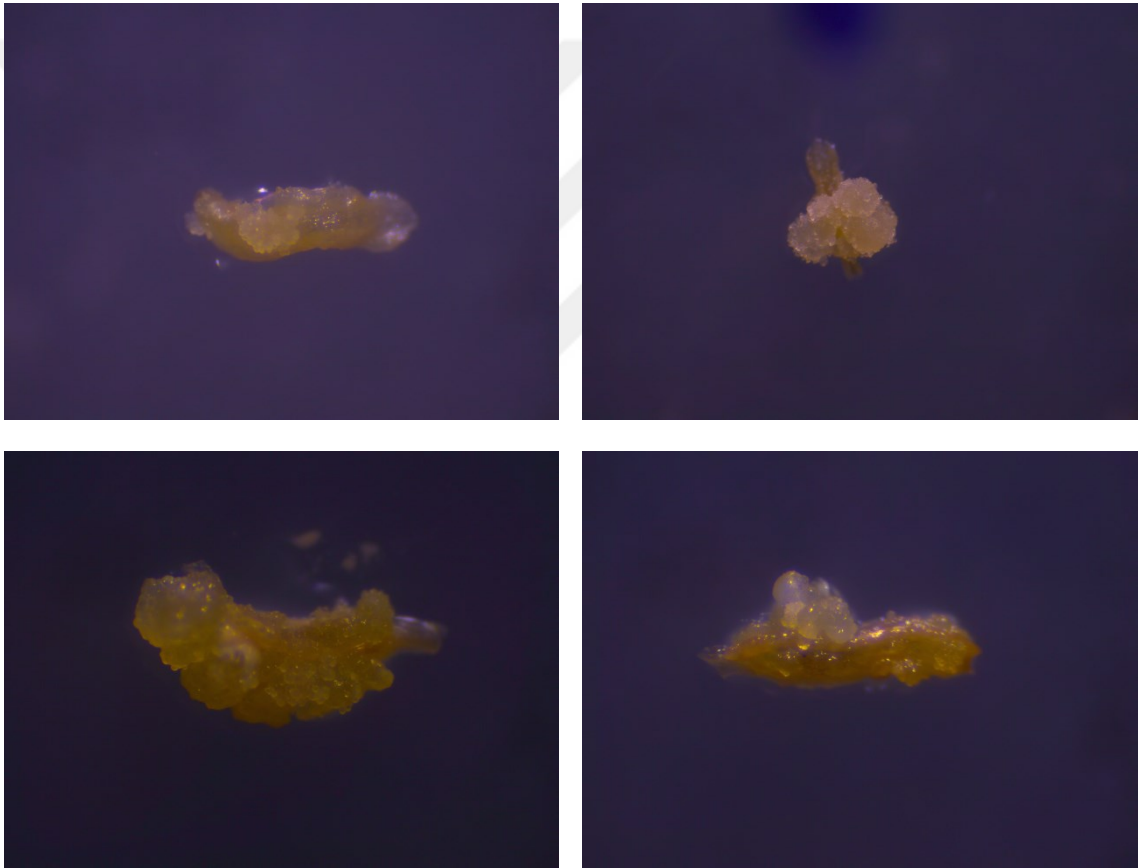
Şekil 4.1. Levent 93 çeşidinde anterler farklı pozisyonlardan çatlamış ve embriyogenik kalli başlangıcı yaklaşık 20 gün sonra gerçekleşmiştir



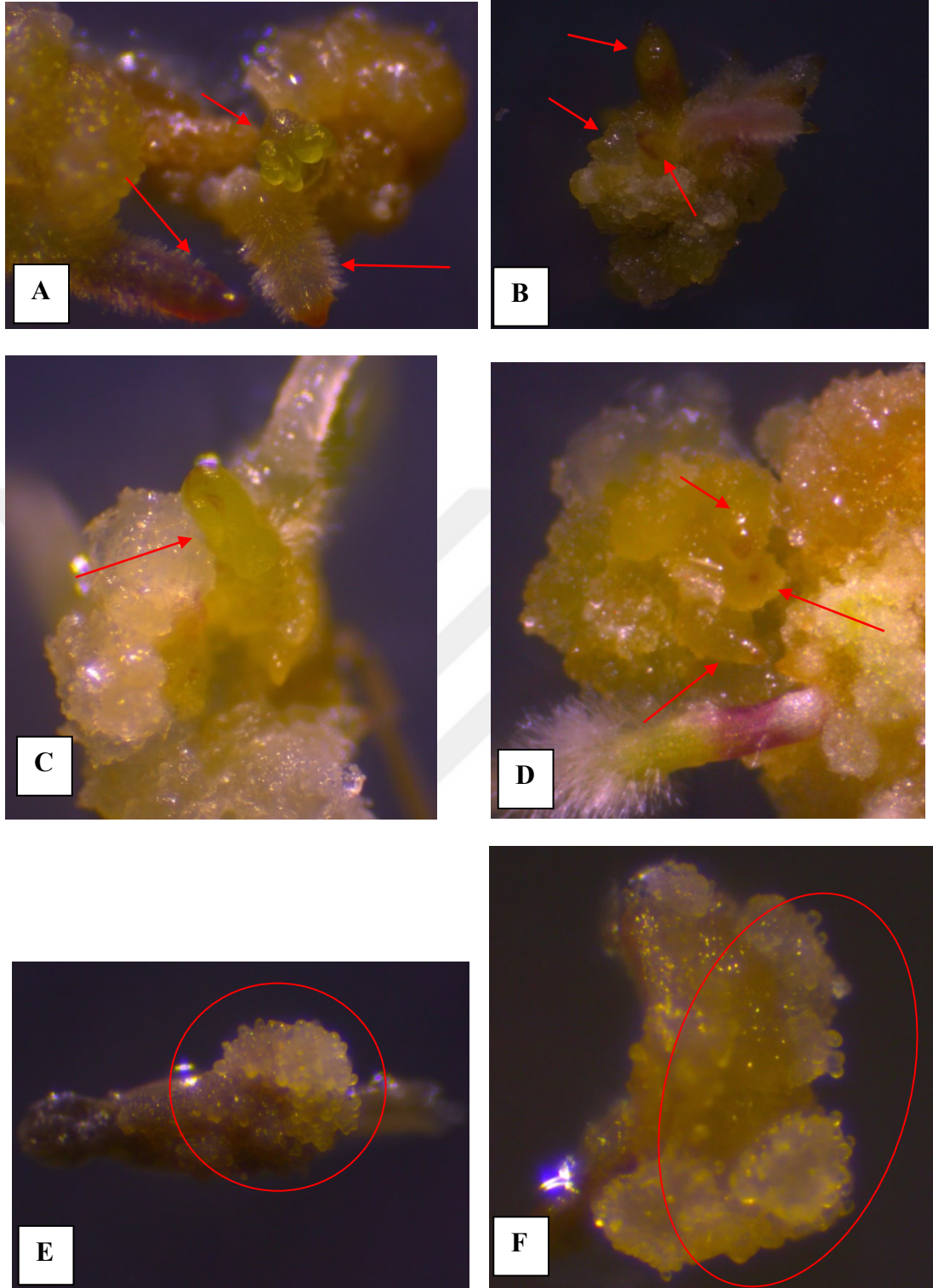
Şekil 4.2. Turgut 82 çeşidinde anterler farklı pozisyonlardan çatlamış ve embriyogenik kalli başlangıcı yaklaşık 20 gün sonra gerçekleşmiştir



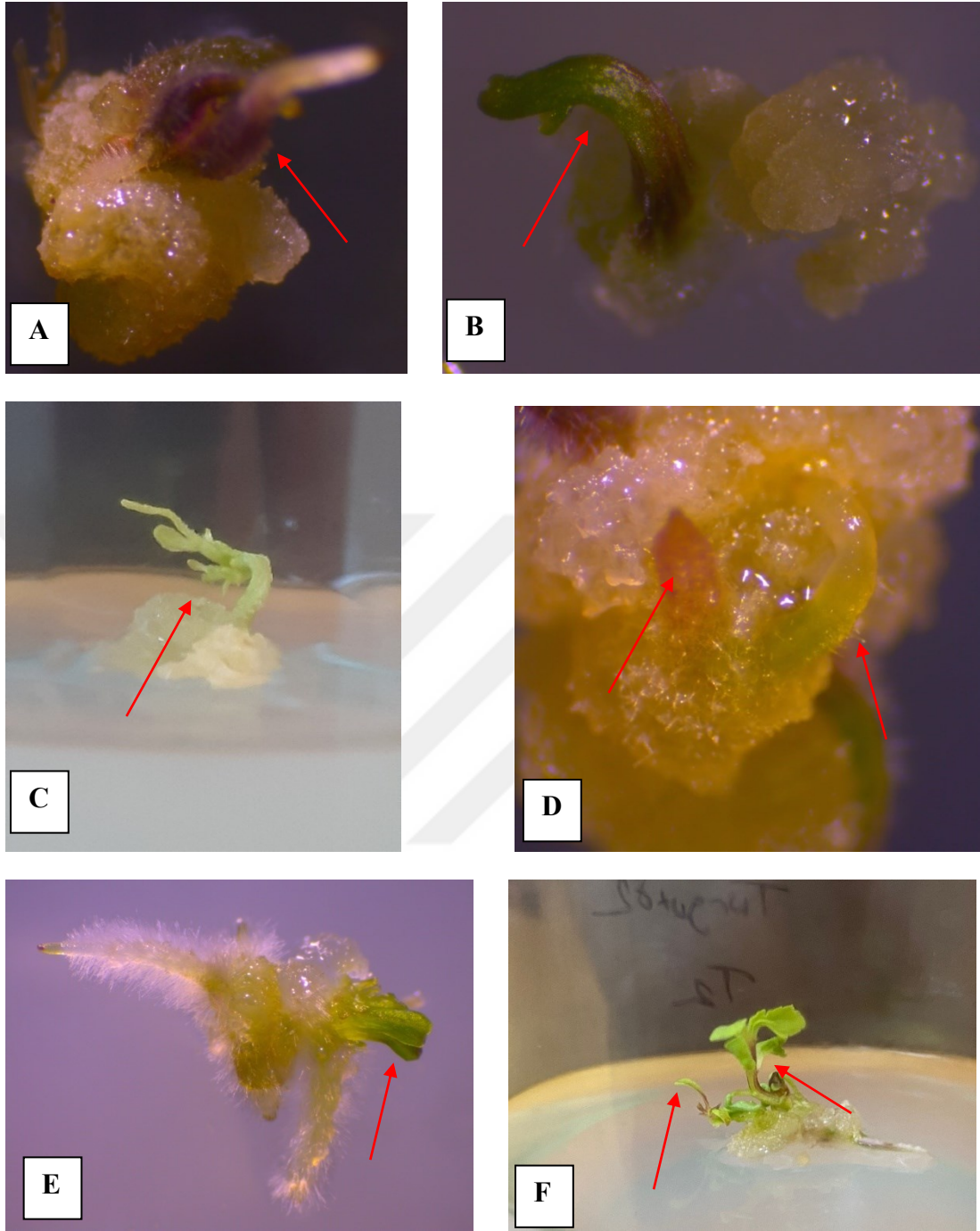
Şekil 4.2'nin devamı



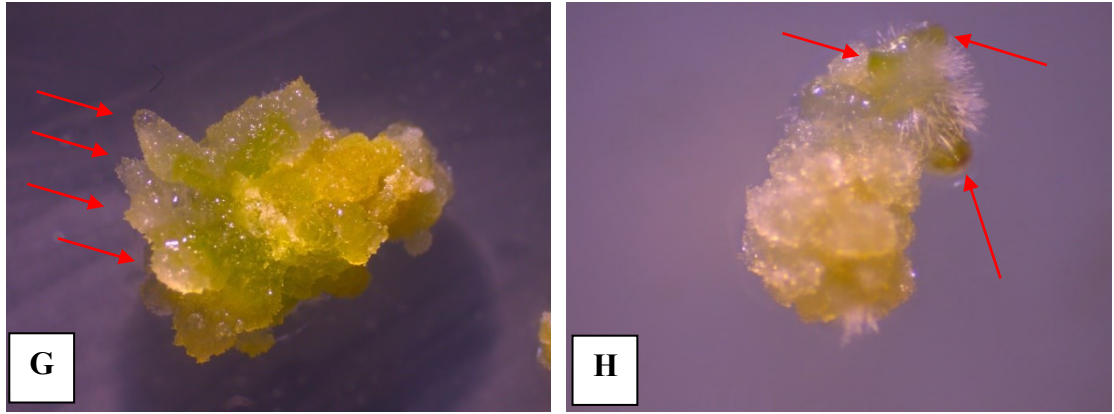
Şekil 4.3. Tütüncü çeşidinde anterler farklı pozisyonlardan çatlamış ve embriyogenik kalli başlangıcı yaklaşık 20 gün sonra gerçekleşmiştir



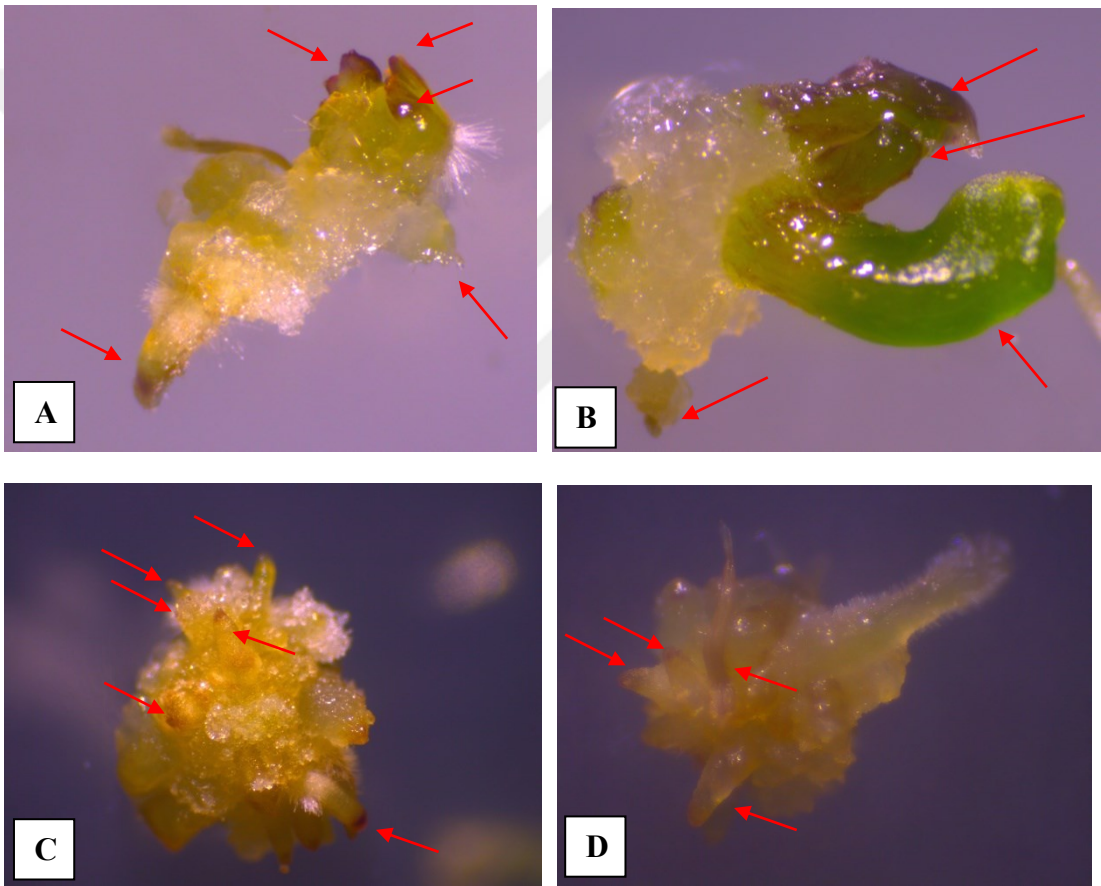
Şekil 4.4. Levent 93 çeşidinde 30 gün sonra farklı embriyo tipleri; A) T2 ortamı, B) T3 ortamı, C ve D) T4 ortamı, E) T6 ortamı, ve F) T7 ortamı



Şekil 4.5. Turgut 82 çeşidinde 30 gün sonra farklı embriyo tipleri; A) T2 ortamı, B-D) T4 ortamı, E-G) T6 ortamı, ve H) T7 ortamı



Şekil 4.5'in devamı



Şekil 4.6. Tütüncü çeşidinde 30 gün sonra farklı embriyo tipleri; A-B) T5 ortamı ve C-D) T4 ortamı

Çizelge 4.2. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve kallus başına ortalama embriyo oranı üretimi üzerindeki etkileri

Kaynak	Kallus Oranı (%)			Kallus başına Embriyo Sayısı (Adet)			Embriyo Oranı (%)		
	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü
T1	0.00 j ¹	0.00 j	0.00 j	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d	0.00 d
T2	56.00 bcd	38.00 fg	44.00 efg	3.62 b	0.00 d	0.80 cd	36.20 b	0.00 d	8.00 cd
T3	36.00 g	42.00 efg	52.00 cde	2.62 bc	0.00 d	0.00 d	26.20 bc	0.00 d	0.00 d
T4	78.00 a	52.00 cde	64.00 b	7.50 a	1.00 cd	0.00 d	75.00 a	10.00 cd	0.00 d
T5	48.00 def	22.00 h	50.00 de	3.57 b	0.00 d	3.60 b	35.75 b	0.00 d	36.00 b
T6	52.00 cde	42.00 efg	14.00 hi	0.20 cd	2.20 bcd	0.20 cd	2.00 cd	22.00 bcd	2.00 cd
T7	62.00 bc	20.00 hi	10.00 ij	6.15 a	1.00 cd	0.40 cd	61.50 a	10.00 cd	4.00 cd
P- değeri	<0.000			<0.000			<0.000		
F- değeri	11.55			4.63			4.63		
LSD (%5)	11.48			2.43			24.30		

¹: Aynı harfler LSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalarla belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir. n = 5 (her bir tekerrür 5 Petri kabından oluşmuştur ve her bir kap 10 anter içermektedir), p ≤ 0.05.

4.2. İkinci denemede ortalama kallus üretimi, kallus başına embriyo sayısı (adet) ve embriyo yüzdesi (%)

İkinci denemede, iki yönlü ANOVA sonuçları genotipler, ortam ve bunların interaksiyonları arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermiştir. Post-hoc LSD testi gruplar arasındaki bu farklılıkları daha da aydınlatmıştır.

ANOVA'nın ardından yapılan post-hoc LSD testi, kallus oluşum oranı, kallus başına embriyo ve embriyo oluşum oranı açısından test edilen çeşitler arasında önemli farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Levent 93 ve Turgut 82 çeşitleri, %30.00 ile Tütüncü'ye kıyasla sırasıyla %47.14 ve %42.57 ile daha yüksek kallus oluşum oranları sergilemiştir. Benzer şekilde, Levent 93 ve Turgut 82, Tütüncü'ye (0.38 adet embriyo) kıyasla kallus başına daha fazla embriyo (sırasıyla 1.76 ve 1.38 adet embriyo) üretmiştir. Ayrıca, Levent 93 ve Turgut 82, Tütüncü'ye (%3.80) kıyasla daha yüksek embriyo oluşum oranları (sırasıyla %17.62 ve %13.80) göstermiştir. Bu farklılıklar, ANOVA testlerinin gösterdiği gibi, 0.000'den küçük P-değerleri ile istatistiksel olarak anlamlıydı (Çizelge 4.3). İkinci denemede, çubuk şeklindeki embriyolar tüm çeşitlerde tutarlı bir şekilde önemli sayıda üretilmiştir (Şekil 4.7-4.9).

Ortam (T1-T7) analizi, iki yönlü ANOVA ve ardından LSD testleri ile belirlendiği üzere kallus oluşum oranı, kallus başına embriyo sayısı ve embriyo oluşum oranında önemli farklılıklar ortaya koymuştur. T4 ortamı %71.33 ile en yüksek kallus oluşum oranını göstermiş ve diğer tüm ortam türlerinden önemli ölçüde farklılık göstermiştir. Kallus üretim oranını T3 (%50,66) ve T2 (%45,33) ortamları takip etmiştir. Benzer şekilde, T4 kallus başına en yüksek embriyoyu (2.79 adet) vermiştir ve T7 (1.88 adet) hariç diğer ortamların çoğundan önemli ölçüde daha yüksektir. Bu embriyo üretimini T6 (1.29 adet), T5 (0.93 adet) ve T3 (0.91 adet) ortamları takip etmiştir. Embriyo oluşum oranı bakımından da T4, %27.95 ile T7 (%18.83) ortamı hariç yine diğer tüm ortamlarına kıyasla önemli ölçüde daha yüksektir. Buna karşılık, kontrol ortamı (T1) ihmal edilebilir kallus oluşumu ve minimum embriyo üretimi ile tüm parametrelerde sürekli olarak en düşük değerleri göstermiştir. Bu farklılıklar, 0.000'dan küçük P-değerleri ile istatistiksel olarak anlamlıydı ve gözlemlenen farklılıklar için sağlam istatistiksel verilerini desteklemektedir (Çizelge 4.3).

Kallus oluşum oranları üzerinde ortamlar (T1-T7) ve çeşitler (Levent 93, Turgut 82, Tütüncü) arasındaki interaksiyon önemli farklılıklar göstermiştir. T4 ortamı %96.00 ile Turgut 82 için en yüksek kallus oluşum oranıyla sonuçlanmış ve bu oran diğer tüm kombinasyonlardan önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Turgut 82'yi takiben, Levent 93 en yüksek kallus oranına T7, T6, T4 ve T3 ortamlarında sırasıyla %70.00, %66.00, %66.00 ve %60.00'a ulaşmıştır. Ancak, Levent 93'ün T7, T6, T4 ve T3 besi ortamları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Levent 93'ü takiben, Tütüncü için de T4 ortamı %52.00, T2 ve T3 ortamları %48.00 ile en yüksek kallus oluşum oranını göstermiştir. T1 ortamı tüm çeşitlerde tutarlı bir şekilde kallus oluşumu göstermemiştir. Bu bulgular, 0.000'dan küçük P-değeri ve 13.37 F-değeri ile kallus oluşum oranlarını etkilemede ortam tipi ve çeşit arasında önemli bir interaksiyon olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.4).

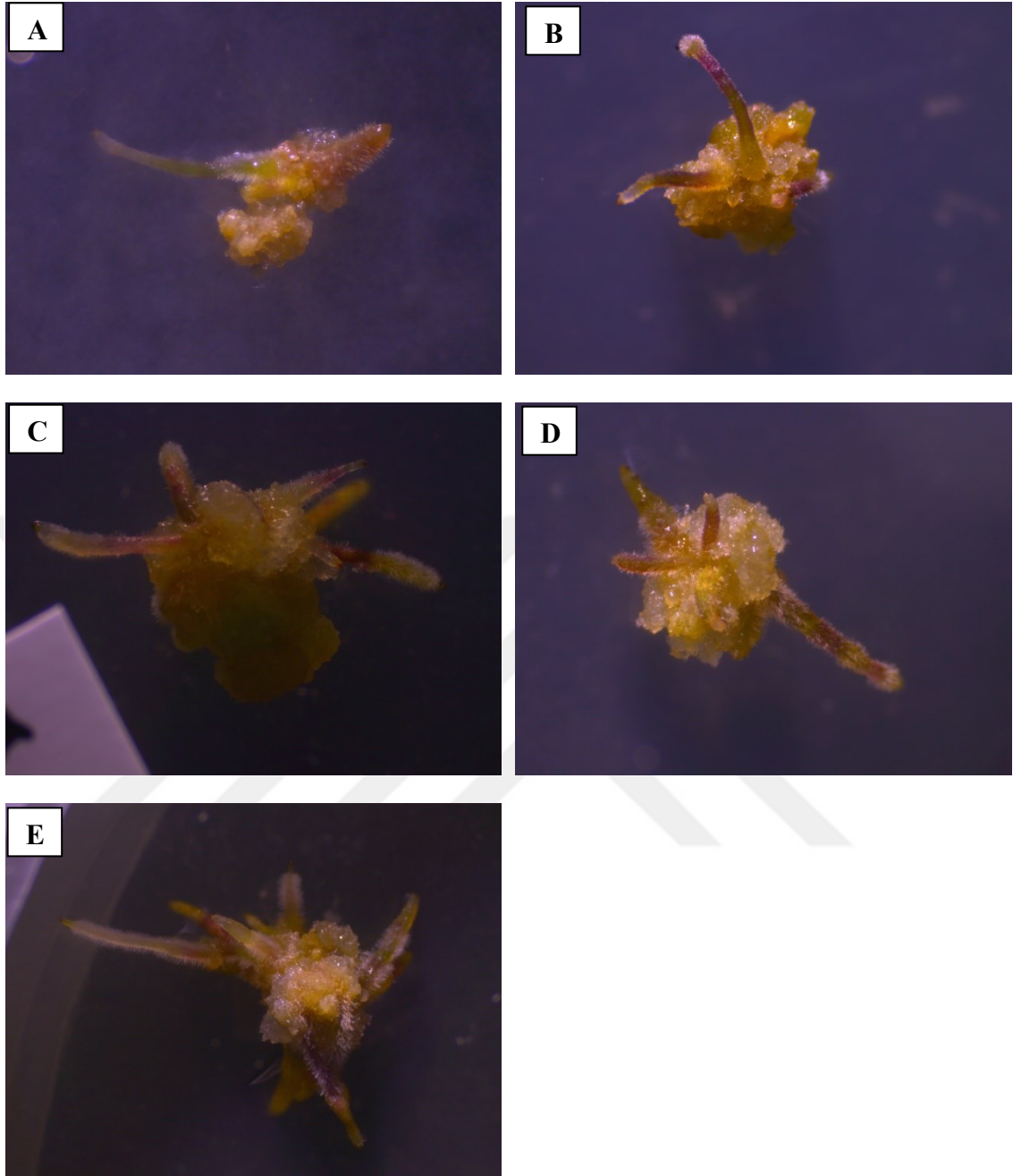
Ortam (T1-T7) ve çeşitler (Levent 93, Turgut 82, Tütüncü) arasındaki kallus başına embriyo sayısı üzerindeki interaksiyon etkileri önemli bulunmuştur. T4 ortamı,

Turgut 82 için kallus başına 4.75 embriyo ile en yüksek embriyo sayısını üretmiştir. Levent 93 için, kallus başına en yüksek embriyo sayısı 4.05 ile T7 ortamında elde edilirken, T4 ortamında 3.15 ve T6 ortamında 3.40 embriyo sayıları gözlemlenmiştir. Ancak, Turgut 82'nin T4 ortamındaki embriyo sayısı ile Levent 93'ün T7, T4 ve T6 ortamlarındaki embriyo sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Tütüncü çeşidi için ise kallus başına en yüksek embriyo sayısı 1.80 ile T5 ortamında gözlenirken, bunu 0.46 ile T4 ve 0.40 ile T2 ortamları izlemiştir. T1 ortamı tüm çeşitlerde hiç embriyo oluşumu göstermemiştir.

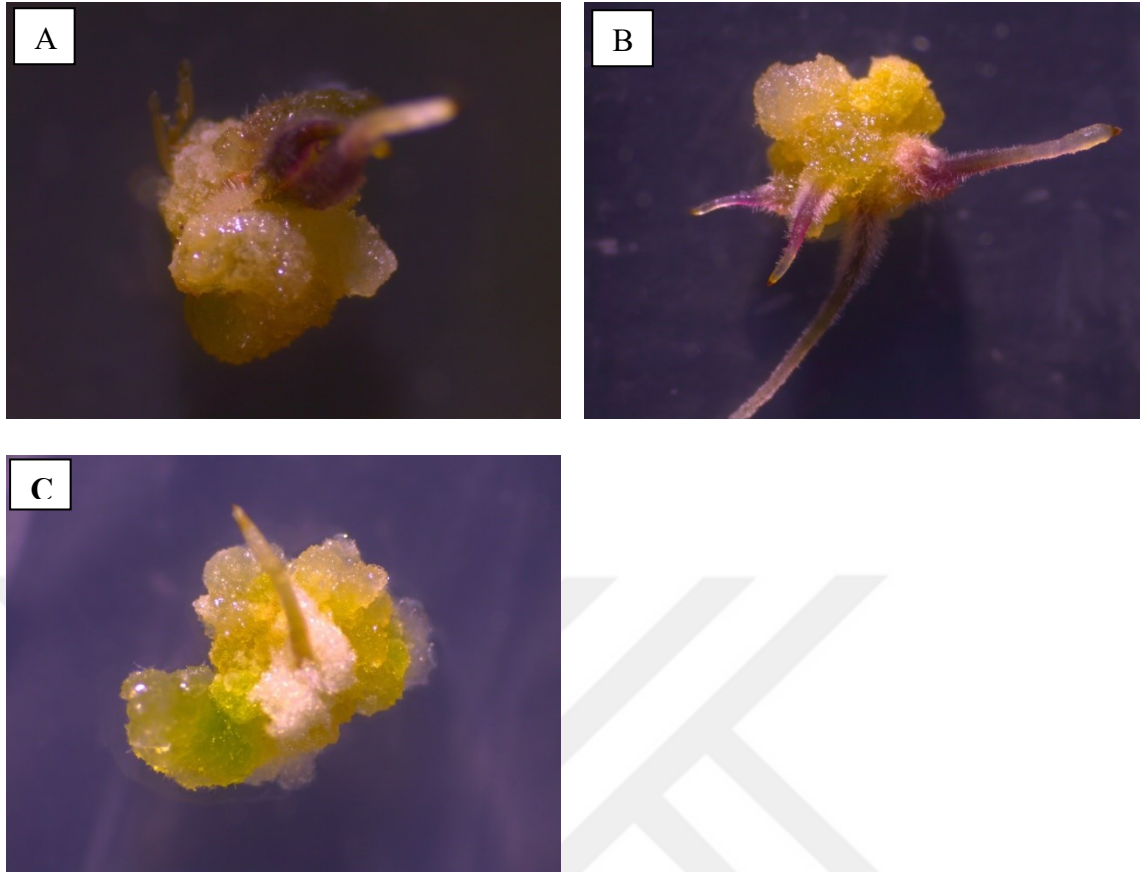
Bu bulgular, kallus başına embriyo sayısını etkilemede ortam tipi ve çeşit arasında 0.000'dan küçük bir P-değeri ve 4.40'lık bir F-değeri ile önemli bir interaksiyon olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.4).

Embriyo oluşum oranı (%) üzerinde ortam tipleri (T1-T7) ve çeşitler (Levent 93, Turgut 82, Tütüncü) arasındaki interaksiyon etkileri önemli bulunmuştur. T4 ortamı, Turgut 82 çeşidi için %47.75 ile en yüksek embriyo oluşum oranıyla sonuçlanmış, ancak bu oran Levent 93'ün T7, T6 ve T4 ortamlarındaki embriyo oluşum oranları ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde farklı değildir. Levent 93 çeşidinde en yüksek embriyo oluşum oranı %40.50 ile T7 ortamında elde edilirken, bunu %34.00 ile T6 ve %31.50 ile T4 ortamları izlemiştir. Tütüncü için, T5 ortamı %18.00 ile en yüksek embriyo oluşum oranıyla sonuçlanmış, bunu %4.60 ile T4 ortamı izlemiştir. T1 ortamı tüm çeşitlerde hiç embriyo oluşumu göstermemiştir. Bu bulgular, 0.000'dan küçük P-değeri ve 4.40 F-değeri ile embriyo oluşum oranını etkilemede ortam tipi ve çeşit arasında önemli bir interaksiyon olduğunu göstermektedir (Çizelge 4.4).

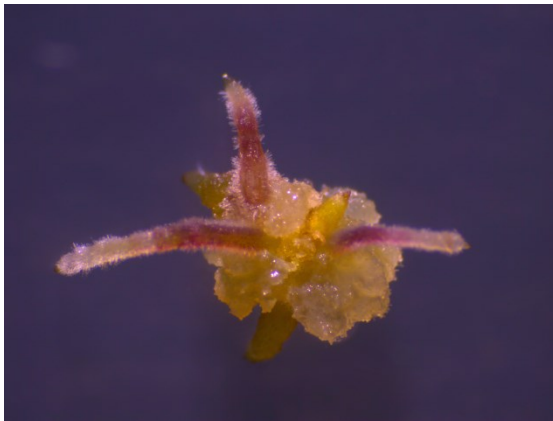
İkinci denemede, iki yönlü ANOVA ve post-hoc LSD testleri ile gösterildiği gibi çeşitler, ortamlar ve bunların interaksiyonları arasında önemli farklılıklar bulunmuştur. Levent 93 ve Turgut 82, Tütüncü'ye kıyasla daha yüksek kallus oluşum oranları, kallus başına embriyo ve embriyo oluşum oranları sergilemiştir. T4 ortamı, özellikle Turgut 82 için, tüm çeşitler arasında tutarlı bir şekilde en iyi performansı göstermiştir. Ortam tipleri ve çeşitler arasındaki interaksiyonlar, sonuçları önemli ölçüde etkilemiş, kallus ve embriyo üretimini optimize etmede her iki faktörün de önemini vurgulamıştır. Bu bulgular, P-değerlerinin 0.000'dan küçük olmasıyla istatistiksel olarak güvenilirliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4.7. Levent 93 çeşidinde çubuk embriyoları; A) T2 ortamı, B) T3 ortamı, C) T4 ortamı, D) T5 ortamı ve E) T7 ortamı



Şekil 4.8. Turgut 82 çeşidinde çubuk embriyoları; A) T2 ortamı, B) T4 ortamı ve C) T6 ortamı



Şekil 4.9. Tütüncü çeşidinde T4 ortamında çubuk embriyoları

Çizelge 4.3. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve embriyo oranı (%) üzerindeki etkileri

Kaynak	Kallus Oranı (%)	Kallus başına Embriyo Sayısı (Adet)	Embriyo Oranı (%)
Çeşitler			
Levent 93	47.14 a ¹	1.76 a	17.62 a
Turgut 82	42.57 a	1.38 a	13.80 a
Tütüncü	30.00 b	0.38 b	3.80 b
P- değeri	<0.000	<0.000	<0.000
F- değeri	25.74	9.01	9.01
LSD (%5)	4.92	0.66	6.68
Ortam			
T1	0.00 e	0.00 d	0.00 d
T2	45.33 bc	0.40 cd	4.00 cd
T3	50.66 b	0.91 bcd	9.13 bcd
T4	71.33 a	2.79 a	27.95 a
T5	30.00 d	0.93 bcd	9.33 bcd
T6	40.66 c	1.29 bc	12.96 bc
T7	41.33 c	1.88 ab	18.83 ab
P- değeri	<0.000	<0.000	<0.000
F- değeri	65.94	6.62	6.62
LSD (%5)	7.51	1.02	10.21

¹: Aynı harfler LSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalarla belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir. n = 5 (her bir tekerrür 5 Petri kabından oluşmuştur ve her bir kap 10 anter içermektedir), p ≤ 0.05.

Çizelge 4.4. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve kallus başına ortalama embriyo oranı üretimi üzerindeki etkileri

Kaynak	Kallus Oranı (%)			Kallus başına Embriyo Sayısı (Adet)			Embriyo Oranı (%)		
	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü
T1	0.00 i ¹	0.00 i	0.00 i	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e	0.00 e
T2	48.00 cde	40.00 def	48.00 cde	0.00 e	0.80 de	0.40 de	0.00 e	8.00 de	4.00 de
T3	60.00 bc	44.00 def	48.00 cde	1.74 bcde	1.00 de	0.00 e	17.40 bcde	10.00 de	0.00 e
T4	66.00 b	96.00 a	52.00 cd	3.15 abc	4.77 a	0.46 de	31.50 abc	47.75 a	4.60 de
T5	20.00 gh	32.00 fg	38.00 ef	0.00 e	1.00 de	1.80 bcd	0.00 e	10.00 de	18.00 bcd
T6	66.00 b	46.00 de	10.00 hi	3.40 ab	0.48 de	0.00 e	34.00 ab	4.88 de	0.00 e
T7	70.00 b	40.00 def	14.00 h	4.05 a	1.60 cde	0.00 e	40.50 a	16.00 cde	0.00 e
P- değeri	<0.000			<0.000			<0.000		
F- değeri	13.37			4.40			4.40		
LSD (%5)	13.01			1.76			17.69		

¹: Aynı harfler LSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalarla belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir. n = 5 (her bir tekerrür 5 Petri kabından oluşmuştur ve her bir kap 10 anter içermektedir), p ≤ 0.05.

4.3. Üçüncü denemede ortalama kallus üretimi, kallus başına embriyo sayısı (adet) ve embriyo yüzdesi (%)

Benzer şekilde üçüncü denemede, çeşitlerin, ortamın ve bunların interaksiyonunun kallus üretim oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve embriyo yüzdesi üzerindeki etkileri iki yönlü ANOVA ve Post-hoc LSD testleri kullanılarak incelenmiştir.

Kallus üretim oranı çeşitler ($F=24.01$), ortam ($F=152.88$) ve bunların interaksiyonunda ($F=31.35$) önemli ölçüde etkilenmiştir. LSD testlerine göre, Turgut 82 ve Levent 93 en yüksek kallus üretim oranlarını sergilemiş (sırasıyla %56.28 ve %53.14) ve Tütüncü'yü (%41.71) önemli ölçüde geride bırakmıştır. Ortamlar arasında T2 (%82.66) ve T4 (%79.33) en yüksek oranları gösterirken, bunları T3 (%70.00) izlemiştir (Çizelge 4.5).

LSD sonuçları genotip-ortam interaksiyonlarını daha da detaylandırmıştır. Örneğin, T3 ortamındaki Turgut 82 en yüksek kallus üretim oranını (%94.00) göstermiş olup, T4 ve T2 ortamlarındaki Turgut 82 (%90.00 ve %84.00), T6 ortamındaki Levent 93 (%84.00) ve T2 ortamındaki Tütüncü (%84.00) hariç diğer kombinasyonlardan önemli ölçüde farklıdır. Buna karşılık, T1 ortamındaki tüm çeşitler en düşük kallus üretim oranını (%0.00) sergilemiştir. İnteraksiyon, %5 anlamlılık düzeyinde 11.64 LSD değeri ile <0.000 P-değerine sahiptir (Çizelge 4.6).

Kallus başına embriyo üretimi ve oranı ile ilgili olarak, çeşitler, ortam veya bunların interaksiyonu için önemli bir etki gözlenmemiştir ($P > 0.05$). Kallus başına embriyo sayısı için LSD değeri %5 anlamlılık düzeyinde 0.77'dir. Benzer şekilde, embriyo yüzdesi de 7.76 LSD değeri ile önemli bir farklılık göstermemiştir ($P > 0.05$).

Özetle, çeşitler ve ortam kallus üretim oranını önemli ölçüde etkilemiş, interaksiyon etkileri de kayda değer olmuştur. Bununla birlikte, kallus başına embriyo sayısı ve embriyo yüzdesi için önemli bir etki gözlenmemiştir. LSD testleri, kallus üretim oranı için çeşitler, ortamlar ve bunların interaksiyonları arasındaki spesifik farklılıklar hakkında ayrıntılı bilgi sağlamıştır.

Çizelge 4.5. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve embriyo oranı (%) üzerindeki etkileri

Kaynak	Kallus Oranı (%)	Kallus başına Embriyo Sayısı (Adet)	Embriyo Oranı (%)
Çeşit			
Levent 93	53.14 a ¹	1.08 a	10.85 a
Turgut 82	56.28 a	0.37 a	3.71 a
Tütüncü	41.71 b	0.48 a	4.85 a
P- değeri	<0.000	>0.05	>0.05
F- değeri	24.01	1.93	1.93
LSD (%5)	4.40	0.77	7.76
Ortam			
T1	0.00 f	0.00 c	0.00 c
T2	82.66 a	1.26 ab	12.66 ab
T3	70.00 b	0.20 bc	2.00 bc
T4	79.33 a	1.46 a	14.66 a
T5	40.66 d	0.40 abc	4.00 abc
T6	48.00 c	0.33 abc	3.33 abc
T7	32.00 e	0.86 abc	8.66 abc
P- değeri	<0.000	>0.05	>0.05
F- değeri	152.88	1.76	1.76
LSD (%5)	6.72	1.18	11.85

¹: Aynı harfler LSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalarla belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir. n = 5 (her bir tekerrür 5 Petri kabından oluşmuştur ve her bir kap 10 anter içermektedir), p ≤ 0.05.

Çizelge 4.6. Çeşitlerin ve ortamların ortalama kallus oranı, kallus başına ortalama embriyo sayısı ve kallus başına ortalama embriyo oranı üretimi üzerindeki interaksyonları

Kaynak	Kallus Oranı (%)			Kallus başına Embriyo Sayısı (Adet)			Embriyo Oranı (%)		
	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü
T1	0.00 j ¹	0.00 j	0.00 j	0.00 c	0.00 c	0.00 c	0.0 c	0.0 c	0.0 c
T2	80.00 bcd	84.00 abc	84.00 abc	2.20 ab	0.40 bc	1.20 abc	22.0 ab	4.0 bc	12.0 abc
T3	38.00 f	94.00 a	78.00 cd	0.00 c	0.60 bc	0.00 c	0.0 c	6.0 bc	0.0 c
T4	76.00 cd	90.00 ab	72.00 de	2.80 a	0.60 bc	1.00 abc	28.0 a	6.0 bc	10.0 abc
T5	24.00 gh	64.00 e	34.00 fg	0.00 c	0.00 c	1.20 abc	0.0 c	0.0 c	12.0 abc
T6	84.00 abc	44.00 f	16.00 hi	1.00 abc	0.00 c	0.00 c	10.0 abc	0.0 c	0.0 c
T7	70.00 de	18.00 hi	8.00 ij	1.60 abc	1.00 abc	0.00 c	16.0 abc	10.0 abc	0.0 c
P- değeri	<0.000			>0.05			>0.05		
F- değeri	31.35			0.85			0.85		
LSD (%5)	11.64			2.05			20.53		

¹: Aynı harfler LSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalarla belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir. n = 5 (her bir tekerrür 5 Petri kabından oluşmuştur ve her bir kap 10 anter içermektedir), $p \leq 0.05$.

4.4. Embriyogenik kalluslardan sürgün oluşumu

ANOVA sonuçları, ortam türünün yanıt değişkenini önemli ölçüde etkilediğini ($p < 0.001$), çeşitlerin ve ortamla etkileşimlerinin ise önemli bir etki göstermediğini ($p > 0.05$) ortaya koymaktadır. Bu durum, ortam seçiminin sonuç üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu (Çizelge.4.7), çeşitler arasındaki farklılıkların ve bunların ortamla etkileşiminin önemli bir rol oynamadığını göstermektedir (Çizelge.4.8). Bu bulgu, denemede ortam seçiminin önemini vurgularken, test edilen koşullar altında çeşit varyasyonunun ihmal edilebilir etkisinin altını çizmektedir. Tüm çeşitler kallus başına benzer ortalama sürgün üretimine sahiptir ve p-değeri 0.05'ten büyük olduğundan, çeşitler arasında (Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü) sürgün üretimi açısından önemli bir fark yoktur. Denemede kullanılan bütün ortamlar birbirleriyle kıyaslandığında M3 ortamı, diğer ortamlardan önemli ölçüde daha yüksek sürgün üretimi göstermiştir. M3 ortamı dışındaki ortamların hepsi 1.0'ın altında olmak üzere önemli ölçüde daha düşük sürgün üretimine sahiptir. Bu ortamlar arasındaki sürgün üretimi farklılıkları oldukça önemlidir ($p < 0.000$), bu da ortamın sürgün üretimi üzerinde önemli bir etkisi olduğunu göstermektedir. Şekil 4.10'da Embriyogenik kallustan üretilmiş sürgünler gösterilmektedir.

Sonuçlar, çeşidin test edilen koşullar altında kallus başına sürgün üretimini önemli ölçüde etkilemediğini göstermektedir. ortam, kallus başına sürgün üretiminde önemli bir rol oynamış ve M3, M1, M2 ve M4'e kıyasla daha yüksek sürgün üretimine özellikle elverişli olmuştur. Bu bulgular, bu çalışmada kallus başına sürgün üretimini etkilemede genetik farklılıklardan ziyade ortam koşullarının önemini vurgulamaktadır.

Çizelge 4.7. Çeşitlerin ve ortamların embriyogenik kallusun sürgün üretimi üzerine etkileri

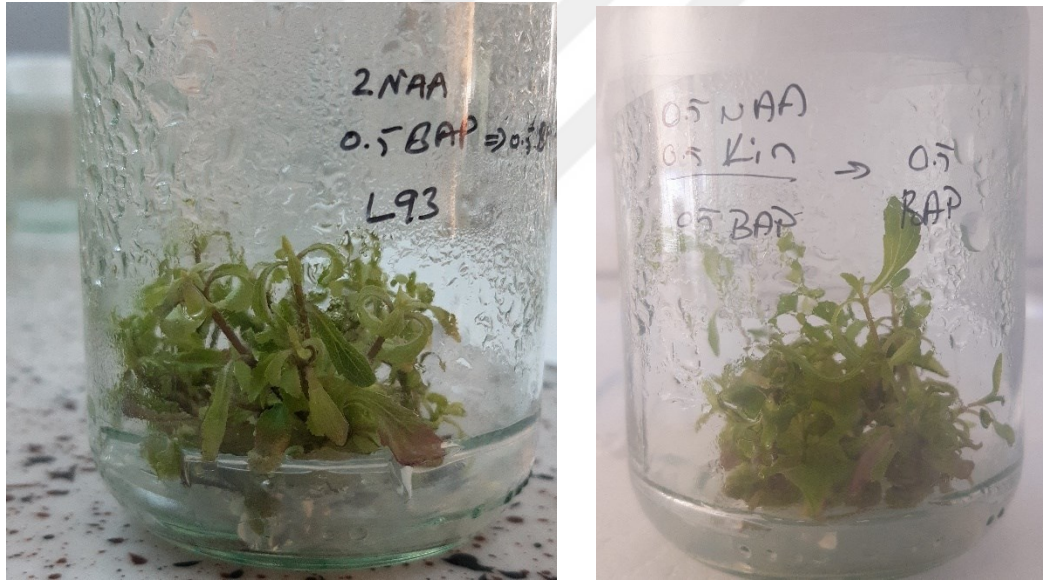
Kaynak	Ort. Sürgün Sayısı
Çeşit	
Levent 93	1.71 a ¹
Turgut 82	1.63 a
Tütüncü	1.78 a
P- değeri	>0.05
F- değeri	0.186
LSD (%5)	0.49
Ortam	
M1	0.80 b
M2	0.73 b
M3	4.37 a
M4	0.93 b
P- değeri	<0.000
F- değeri	78.34
LSD (%5)	0.57

¹: Aynı harfler LSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalarla belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir. n = 5 (her bir tekerrür 5 kavanozdan oluşmuştur ve her bir kavanoz 3 embriyogenik kallus içermektedir), $p \leq 0.05$.

Çizelge 4.8. Embriyogenik kallusun sürgün üretimi üzerine çeşit ve ortamın interaksiyon etkileri

Kaynak	Ort. Sürgün Sayısı		
	Levent 93	Turgut 82	Tütüncü
Ortam			
M1	0.80 b ¹	0.80 b	0.80 b
M2	0.60 b	0.80 b	0.80 b
M3	4.46 a	4.13 a	4.53 a
M4	1.00 b	0.80 b	1.00 b
P- değeri	>0.05		
F- değeri	0.13		
LSD (%5)	0.98		

¹: Aynı harfler LSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalarla belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir. n = 5 (her bir tekerrür 5 kavanozdan oluşmuştur ve her bir kavanoz 3 embriyogenik kallus içermektedir), $p \leq 0.05$.



Şekil 4.10. Embriyogenik kallustan gelişen sürgünler

4.5. Sürgünlerin köklenmesi

Çizelge.4.9’da, 1/2 MS ortamında farklı fitohormon kombinasyonlarının üç stevia (Levent 3, Turgut 82 ve Tütüncü) çeşidinde kök oluşumu üzerindeki etkilerini göstermektedir. Uygulamalar tek başına 1/2 MS ortamı, 1/2 MS ile 1 mg l⁻¹ NAA ortamı ve 1/2 MS ile 1 mg l⁻¹ IBA ortamını içermektedir. Tüm uygulamalar için 20 sürgün kültüre alınmıştır. Çeşitler 1/2 MS ortamında kültüre alındığında, Levent 93 çeşidinden kültüre alınan 20 sürgünün 15’inin 12 gün sonra köklendiği ve sürgün başına ortalama 7.2 kök ile %75’lik bir kök oluşum yüzdesi elde edildiği görülmüştür. Turgut 82 çeşidinde 20 sürgünden 16’sı 9 gün içinde köklenmiş, sürgün başına ortalama 6 kök

düşmüş ve %80 kök oluşum yüzdesi elde edilmiştir. Tütüncü çeşidinde 20 sürgünden 14'ü 13 günde köklenmiş, sürgün başına ortalama 5 kök ve %70 kök oluşum yüzdesi elde edilmiştir.

1/2 MS 1 mg l⁻¹ NAA ile desteklendiğinde, Levent 93 çeşidinde 20 sürgünden 4'ü 10 gün içinde köklenmiş, sürgün başına ortalama 4 kök ve %20 kök oluşum yüzdesi elde edilmiştir. Turgut 82 çeşidinde 20 sürgünden 3'ü 9 günde köklenmiş, sürgün başına ortalama 3 kök ve %15 kök oluşum yüzdesi elde edilmiştir. Tütüncü çeşidinde 20 sürgünden 4'ü 9 günde köklenmiş, sürgün başına ortalama 4 kök ve %20 kök oluşum yüzdesi elde edilmiştir.

1/2 MS 1 mg l⁻¹ IBA ile desteklendiğinde, Levent 93 çeşidi, 20 sürgünden 9'unun 12 günde köklenmiştir, sürgün başına ortalama 5 kök ve %45 kök oluşum yüzdesi göstermiştir. Turgut 82 çeşidinde 20 sürgünden 12'si 9 günde köklenmiş, sürgün başına ortalama 6 kök ve %60 kök oluşum yüzdesi elde edilmiştir. Tütüncü çeşidinde 20 sürgünden 5'i 10 günde köklenmiş, sürgün başına ortalama 4 kök ve %25 kök oluşum yüzdesi elde edilmiştir.

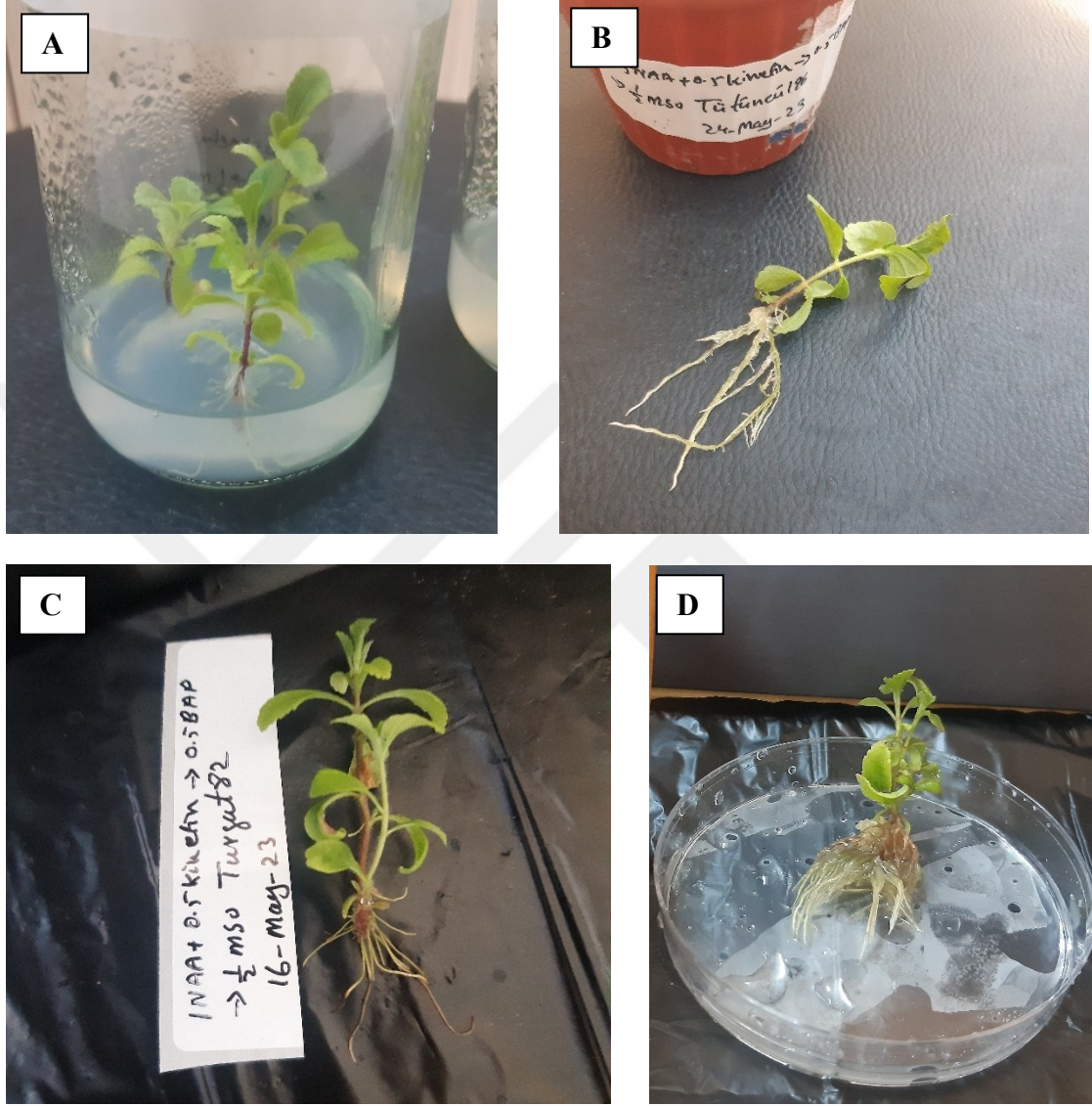
Bu sonuçlar, 1/2 MS ortamının tek başına test edilen tüm stevia çeşitlerinde kök oluşumunu teşvik etmede en etkili olduğunu ve Turgut 82'nin en yüksek başarı oranını gösterdiğini ortaya koymaktadır. NAA ilavesi köklenme başarısını önemli ölçüde azaltırken, IBA ilavesi orta düzeyde sonuçlar sağlamıştır.

Çizelge 4.9. Farklı ortamların *in vitro* bitkilerin kök üretimi üzerindeki etkileri

Uyg.	Çeşit	Kül. sürg.	Kök. gün	Kök. sürg. sayısı	Ort. kök sayısı	Kök oluşumu(%)
1/2 MS	Levent 93	20	12	15	7.2	75
	Turgut 82	20	9	16	6	80
	Tütüncü	20	13	14	5	70
1/2MS+1NAA	Levent 93	20	10	4	4	20
	Turgut 82	20	9	3	3	15
	Tütüncü	20	9	4	4	20
1/2MS+1IBA	Levent 93	20	12	9	5	45
	Turgut 82	20	9	12	6	60
	Tütüncü	20	10	5	4	25

Denememizde, 1/2 MS ortamıyla hem 1 mg l⁻¹ NAA hem de 1 mg l⁻¹ IBA hormonu uygulandığında, sürgünler önce kallus oluşturmuş, ardından güçlü kök büyümesi gerçekleşmiştir (Şekil.4.11). Bunun aksine, hormonsuz yerleştirildiğinde, sürgünler doğrudan köklenmeye başlamıştır. Ayrıca, başlangıçta sürgünlerin 1/2 MS'de

hem 1 mg l^{-1} NAA hemde 1 mg l^{-1} IBA ile kültüre alınması tercih edildiğinde ve kallus başlangıcı için düzenli olarak gözlemlenmesi tarafımızca önerilmektedir. Kallus başlangıcı gözlemlendiğinde, sürgünler kök gelişimi için derhal yarı kuvvetli MS ortamına aktarılmalıdır. Bu aynı zamanda kök oluşumunu da kolaylaştırabilir.



Şekil 4.11. Farklı ortamlarda kök üretimi. A-C) IBA veya NAA hormonu olmadan ve D) Hormonlu (NAA veya IBA)

4.6. Aklimatizasyon

Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü'nün dış koşullara aklimatizasyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil.4.12). Aklimatizasyonda 2 mg l^{-1} NAA ve 0.5 mg l^{-1} BAP içeren MS ortamından elde edilen Levent 93 için, 20 gün sonra 25 bitkiden 22'si hayatta kalmıştır ve bu da %88'lik bir hayatta kalma oranı ile sonuçlanmıştır (Çizelge.4.10). Benzer şekilde, 1 mg l^{-1} NAA ve 0.5 mg l^{-1} Kin içeren MS ortamından elde edilen Turgut 82'de de 20 gün sonra 25 bitkiden 22'si hayatta kalmış ve %88 hayatta kalma oranı elde edilmiştir. 0.5 mg l^{-1} NAA ve 0.5 mg l^{-1} Kin içeren MS ortamından elde edilen Tütüncü için, 20 gün sonra 25 bitkiden 21'i hayatta kalmış ve %84 hayatta kalma oranı elde edilmiştir. Bu sonuçlar, verilen koşullar altında her üç çeşit için de yüksek oranda başarılı bir iklimlendirme olduğunu göstermektedir.



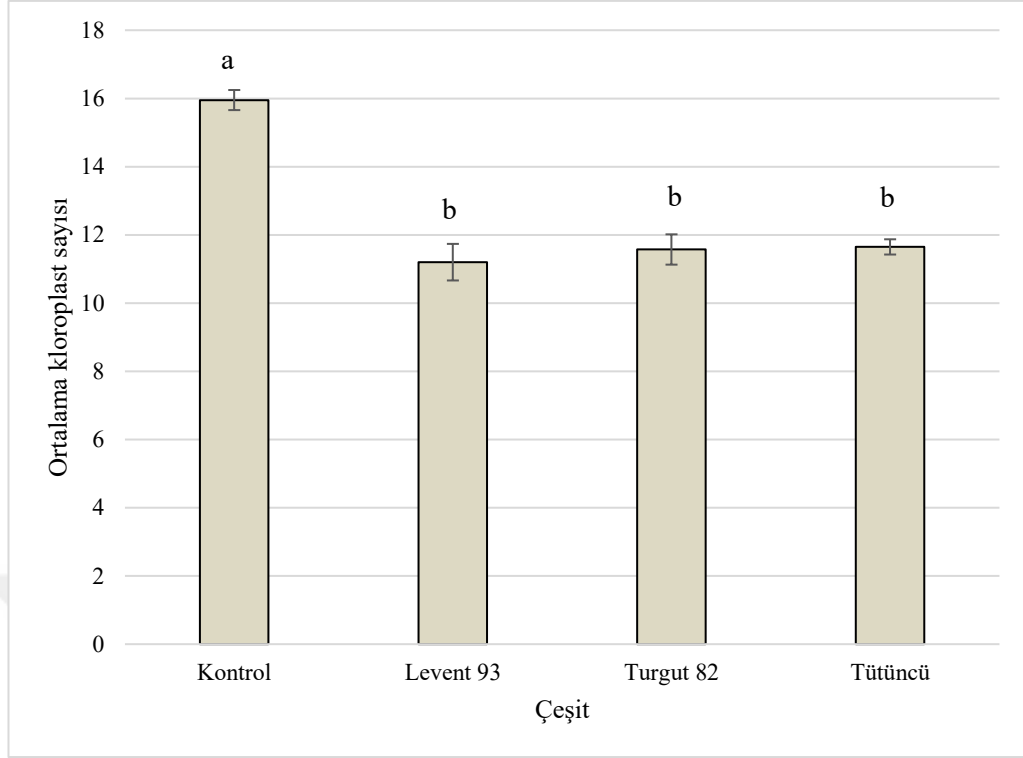
Şekil 4.12. Aklimatizasyon'dan sonra dış koşullara alışmış bitkiler

Çizelge 4.10. Turgut 82, Levent 93 ve Tütüncü çeşitlerini bitkilerin dış koşullara alıştıırılması

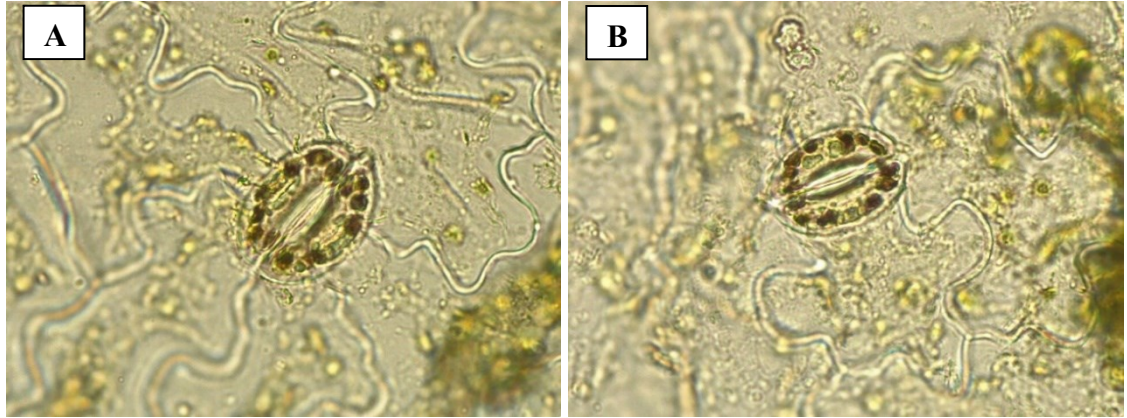
Çeşit	Uyg.	Torf:Perlit	Toplam bitki sayısı	Alıştırılma günleri	Canlı Bitkiler	Canlı Bitkiler(%)
Levent 93	MS+2NAA+0.5BAP	2:1	25	20	22	88
Turgut 82	MS+1NAA+0.5Kin	2:1	25	20	22	88
Tütüncü	MS+0.5 NAA+0.5Kin	2:1	25	20	21	84

4.7. Kloroplast sayısı

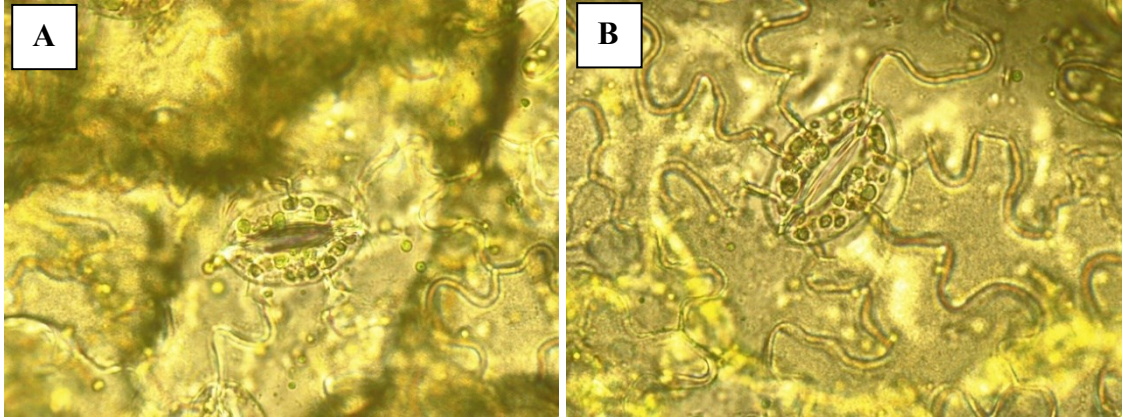
Şekil 4.13’da üç çeşit (L93, T82 ve T196) ve genel bir kontrol grubu için kloroplast sayısı gösterilmektedir. Anter kültüründen elde edilen bitkiler, kontrol grubuna kıyasla daha düşük sayıda kloroplast sergilemiştir. Özellikle, anter kültüründen elde edilen çeşitler arasında kloroplast sayısında önemli bir fark bulunmamıştır. Bu durum, anter kültüründen elde edilen bitkiler arasında haploid bitkiler olabileceğini düşündürmektedir. Anter türevi bitkilerin stomalarının koruyucu hücrelerindeki kloroplast sayıları Şekil 4.14’de gösterilmiştir. Kontrol bitkilerin stomalarının koruyucu hücrelerindeki kloroplast sayıları Şekil 4.15’de gösterilmiştir.



Şekil 4.13. Stevia çeşitlerinin koruyucu hücrelerinin içindeki ortalama kloroplast sayısı. Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir ($n = 10$, $p = 0.05$). Her veri noktasındaki küçük dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir



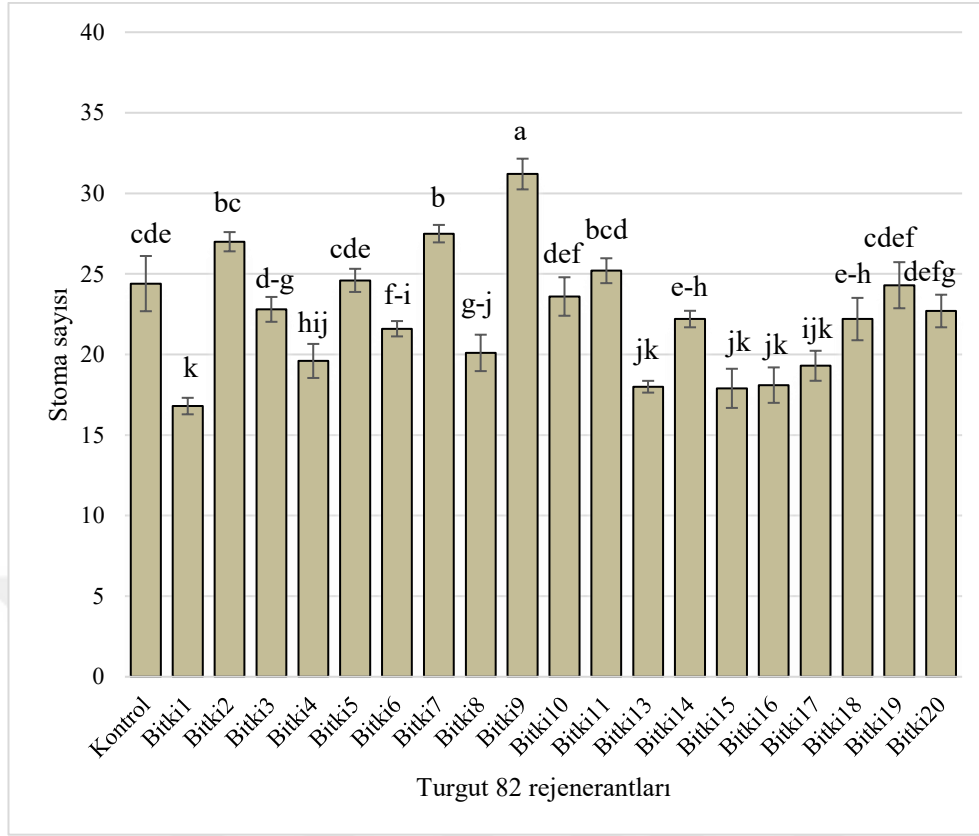
Şekil 4.14. Şekilde anter türevi bitkilerin stomalarının iki farklı koruyucu hücreindeki kloroplast sayıları gösterilmektedir. A) 12 adet ve B) 14 adet kloroplast içermektedir



Şekil 4.15. Şekilde kontrol bitkileri stomalarının iki farklı koruyucu hücresindeki kloroplast sayıları gösterilmektedir. A) 16 adet ve B) 20 adet kloroplast içermektedir

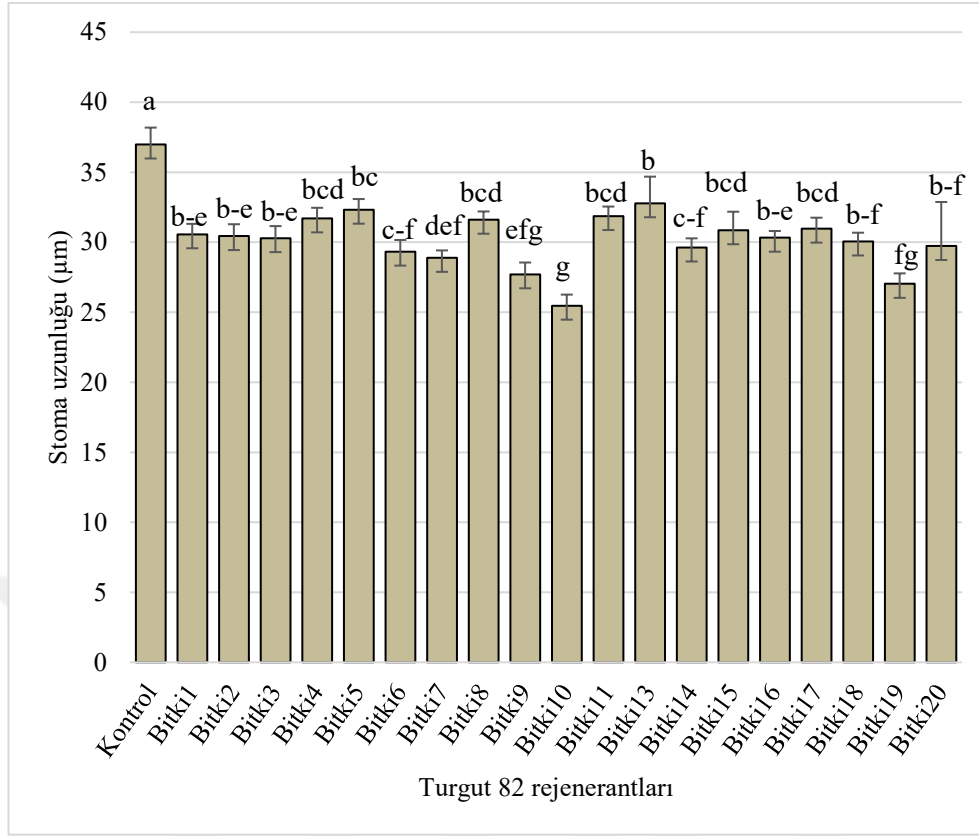
4.8. Stoma Sayısı, Stoma Uzunluğu (μm) ve Genişliği (μm)

Tek yönlü ANOVA sonuçlarına göre, T82 çeşidinin 20 farklı bitki grubu arasında stoma sayısı açısından önemli bir fark bulunmuştur (F değeri=14.18 ve $p < 0.001$). Bu, ortalama stoma sayılarının bu gruplar arasında önemli ölçüde değiştiğini göstermektedir. Takip eden LSD testi, bitki grupları arasında ayrıntılı ikili karşılaştırmalar sağlamıştır. Dokuzuncu bitki, 31.2 ile en yüksek stoma sayısını sergilemektedir ve diğer tüm bitkilerden önemli ölçüde farklıdır (Şekil.4.16). Yedinci bitki, 27.5 stoma sayısı ile onu takip etmektedir ve 27.0 ve 25.2 stoma sayısına sahip olan ikinci ve on birinci bitkiden önemli ölçüde farklı değildir. Birbirlerinden önemli ölçüde farklı olmayan ancak dokuzuncu bitkiden farklı olan on birinci bitki (25.2), beşinci bitki (24.6), kontrol (24.4) ve on dokuzuncu bitkide (24.3) orta derecede yüksek stoma sayıları gözlenmektedir. Birinci bitki 16.8 ile en düşük stoma sayısına sahiptir ve diğer tüm bitkilerden önemli ölçüde farklıdır. Analiz sonucu, bu bitki grupları arasındaki fizyolojik veya genetik farklılıklar hakkında, ıslah veya yetiştirme stratejileri için faydalı olabilecek bilgiler sağlamaktadır.



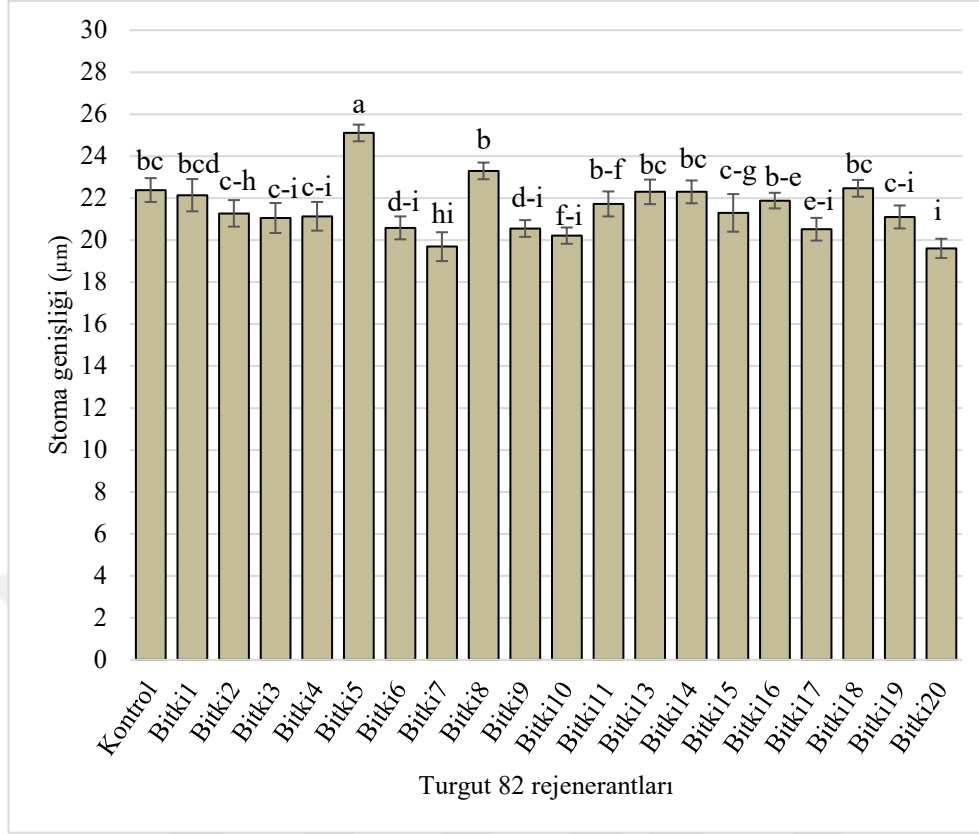
Şekil 4.16. Turgut 82 rejenerant bitkilerinin stoma sayısı. Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir ($n = 10$, $p = 0.05$). Her veri noktasındaki küçük dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir

Şekil 4.17, bir kontrol grubu da dahil olmak üzere çeşitli Turgut 82 rejenerantları için stoma uzunluğunu (μm) göstermektedir. Kontrol grubu yaklaşık 37 μm ile en yüksek stoma uzunluğunu sergilemiştir. Bu, diğer tüm rejenerantlardan önemli ölçüde daha yüksek çıkmıştır. Bu da kontrol bitkilerinin rejenerantlara kıyasla daha büyük stomalara sahip olduğunu göstermektedir. Onuncu bitki en düşük stoma uzunluğuna sahiptir ve bu uzunluk, dokuzuncu ve on dokuzuncu bitkiler hariç, diğer tüm bitkilerden önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Diğer rejenerantlar, farklı harflerle gösterildiği gibi, değişen istatistiksel öneme sahip bir dizi stoma uzunluğu göstermiştir.

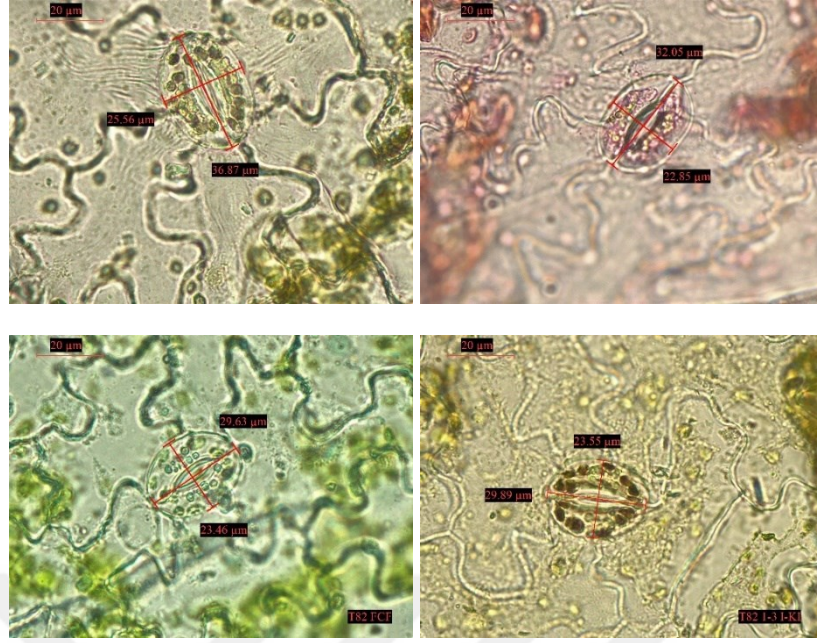


Şekil 4.17. Turgut 82 rejenerant bitkilerinin stoma uzunluğu (µm). Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir (n = 10, p = 0.05). Her veri noktasındaki küçük dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir

Şekil 4.18, bir kontrol ve birinci bitkiden yirminci bitkiye kadar etiketlenmiş yirmi farklı bitki dahil olmak üzere çeşitli bitki örnekleri için stoma genişliğini göstermektedir. Beşinci bitki en yüksek stoma genişliğine (~25 µm) sahip olmuştur ve diğer örneklerin çoğundan önemli ölçüde farklılık göstermiştir; yedinci bitki ve yirminci bitki en düşük stoma genişliğine (~19 µm) sahip olmuştur. Kontrol ve diğer bitkilerin çoğu yaklaşık 22 µm stoma genişliği sergilemiştir. Bu veriler, bitki örnekleri arasında stoma genişliğinde önemli değişkenlik olduğunu ortaya koymakta ve gaz alışverişini, su düzenlemesini veya diğer önemli süreçleri etkileyebilecek fizyolojik farklılıklara işaret etmektedir. Çeşitli anter türevli Turgut 82 rejenerantlarında stoma uzunluğu ve genişliği (µm) şekil 4.19’de gösterilmiştir.

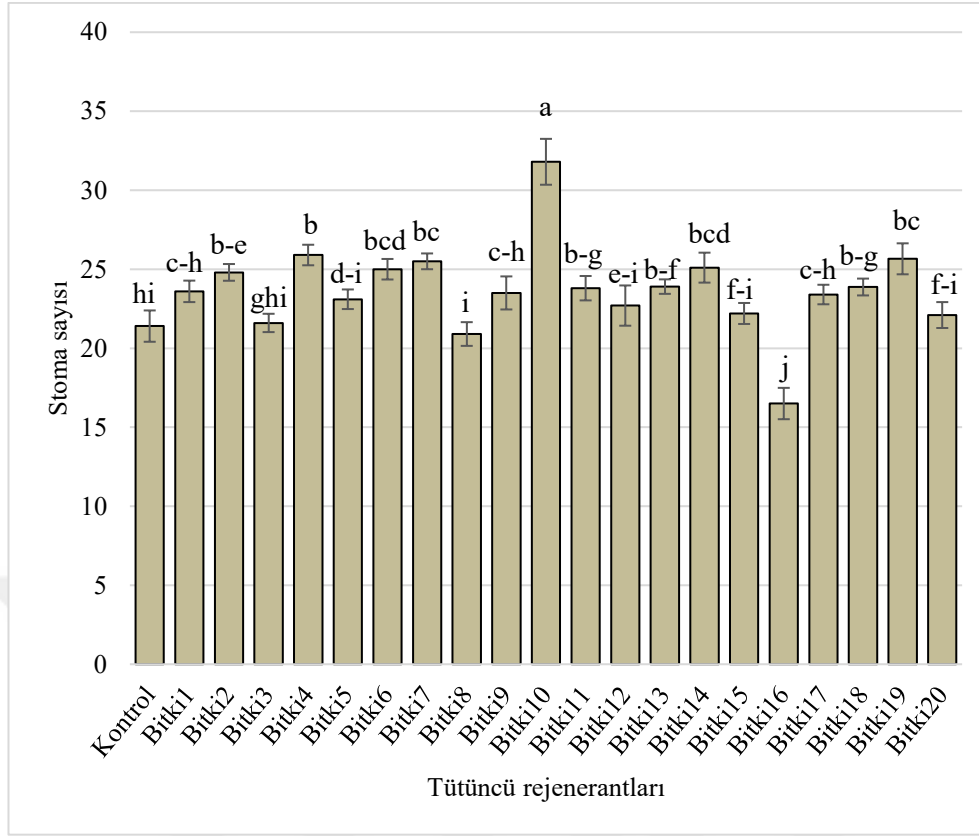


Şekil 4.18. Turgut 82 rejenerant bitkilerinin stoma genişliği (µm). Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir (n = 10, p = 0.05). Her veri noktasındaki küçük dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir



Şekil 4.19. Çeşitli anter türevli Turgut 82 rejenerantlarında stoma uzunluğu ve genişliği (µm)

Şekil (4.20), Tütüncü çeşidindeki farklı bitkiler arasında stoma sayılarındaki önemli değişkenliği vurgulamaktadır. Kontrol grubu ortalama 21.4 stoma sayısı sergilemiş olup, bu değer daha yüksek ortalama sayılarla ardışık olarak etiketlenen diğer bitkilerden önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Örneğin, onuncu bitki en yüksek ortalama sayıyı (31.8) gösterirken, on altıncı bitki en düşük ortalama sayıyı (16.5) sergilemiştir. Bu analiz, aynı çeşit içindeki diğer bitkilere kıyasla kontrol grubundaki farklı stoma gelişiminin altını çizmekte ve Tütüncü'deki stoma özelliklerini anlamada bireysel değişkenliği tanımanın önemini vurgulamaktadır.

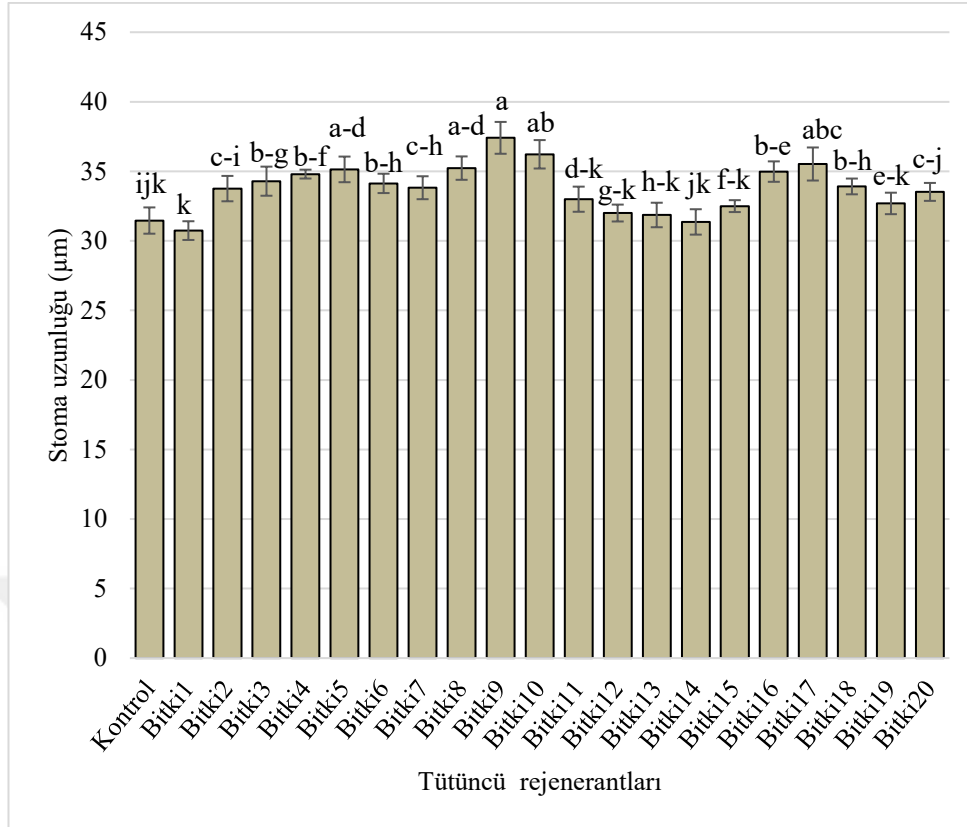


Şekil 4.20. Tütüncü rejenerant bitkilerinin stoma sayısı. Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir (n = 10, p = 0.05). Her veri noktasındaki küçük dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir

Tütüncü'nün farklı bitkileri arasında stoma uzunluğu için LSD testi sonuçları, 31.4 μm stoma uzunluğu ile kontrol bitkisine kıyasla önemli farklılıklar göstermiştir (Şekil.4.21). En uzun stoma uzunluğu 37.4 μm olan dokuzuncu bitki kontrolden çok daha uzun olma özelliği gösterirken onuncu bitki (36.2 μm) ve 17 (35.5 μm) de önemli ölçüde daha uzun stoma uzunluklarına sahiptir. Sekizinci, beşinci, on altıncı, dördüncü ve üçüncü bitkiler, 35.2 μm ile 34.2 μm arasında değişen stoma uzunlukları göstermiştir.

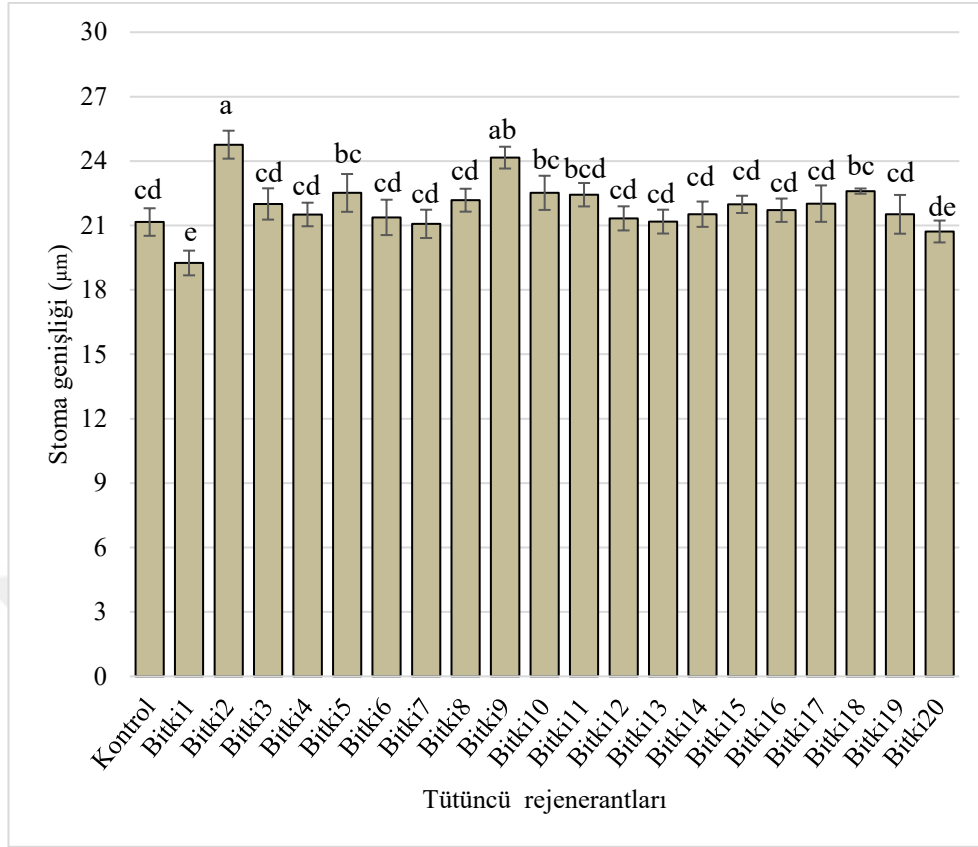
Yedinci bitki (33.8 μm) ve ikinci (33.7 μm) orta derecede daha uzun stoma uzunluğu göstermiştir. On dokuzuncu (32.6 μm), on beşinci (32.4 μm) ve on ikinci (32.0 μm) bitkiler kontrole yakın stoma uzunluklarına sahiptir. Stoma uzunluğu 30.7 μm olan iki numaralı bitki, kontrolün biraz altında stoma uzunluğu gösteren tek bitkidir.

Bu sonuçlar, Tütüncü'deki fenotipik çeşitliliği vurgulamakta ve bitkiler arasında fizyolojik işlevler ve adaptasyon açısından farklılıklar olduğunu göstermektedir.

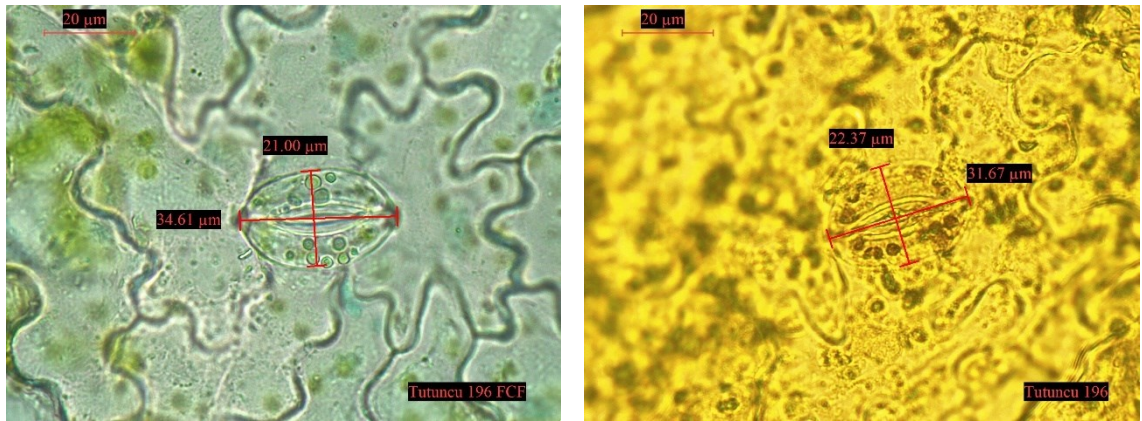


Şekil 4.21. Tütüncü rejenerantlarının stoma uzunluğu (µm). Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir (n = 10, p = 0.05). Her veri noktasındaki küçük dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir

Şekil (4.22), 21.1 µm genişliğe sahip olan kontrol ile karşılaştırıldığında Tütüncü bitkileri arasındaki stoma genişliği değişimlerini göstermektedir. İkinci bitki, 24.7 µm'lik en geniş stoma genişliği ile öne çıkmakta ve dokuzuncu (24.1 µm'lik) bitki hariç hem kontrol hem de diğer bitkilerden önemli ölçüde yüksek özellik göstermiştir. Aralarında sekizinci, on yedinci, üçüncü, on beşinci, on altıncı, on dokuzuncu, on dördüncü, dördüncü, altıncı, on ikinci, on üçüncü, yedinci ve yirminci bitkinin de bulunduğu birkaç bitki, 22.1 µm ile 20.7 µm arasında değişen ve 'cd' grubunda sınıflandırılan, kontrole yakın stoma genişlikleri sergilemektedir. Buna karşılık, birinci bitki (19.2) µm ile en küçük stoma genişliğine sahiptir ve kontrolden önemli ölçüde daha dar stoma genişliği ile 'e' grubuna yerleştirilmiştir. Çeşitli anter türevli Tütüncü rejenerantlarında stoma uzunluğu ve genişliği (µm) şekil 4.23'de gösterilmiştir.



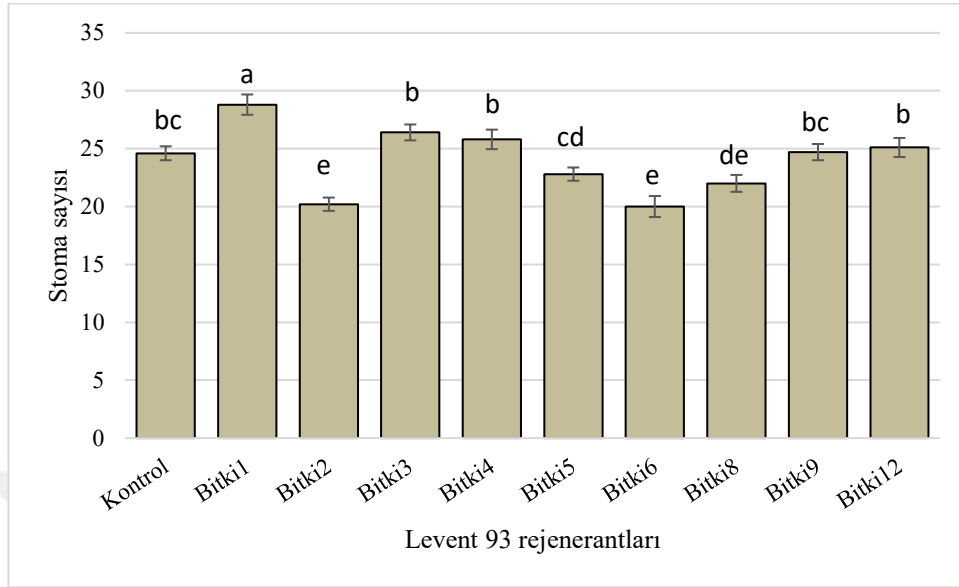
Şekil 4.22. Tütüncü rejenerantlarının stoma genişliği (μm). Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir (n = 10, p = 0.05). Her veri noktasındaki küçük dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir



Şekil 4.23. Çeşitli anter türevli Tütüncü rejenerantlarında stoma uzunluğu ve genişliği (μm)

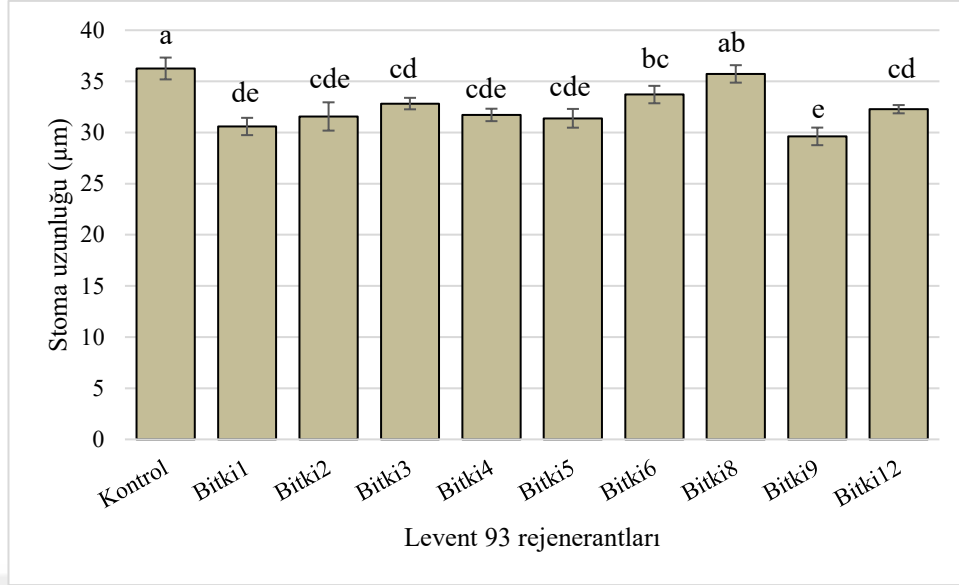
Şekil 4.24'da Levent 93 rejenerant bitkileri kontrol grubuna kıyasla ortalama stoma sayısı gösterilmektedir. Birinci bitki, diğer tüm bitkilere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek stoma sayısı göstermiştir. Buna karşılık, ikinci ve altıncı bitkiler test edilen bitkiler arasında en düşük stoma sayısına sahip olmuştur. Bununla birlikte, üçüncü,

dördüncü, beşinci, dokuzuncu ve on ikinci numaralı bitkiler kontrole benzer stoma sayıları göstermiş ve aralarında önemli bir fark gözlenmemiştir.



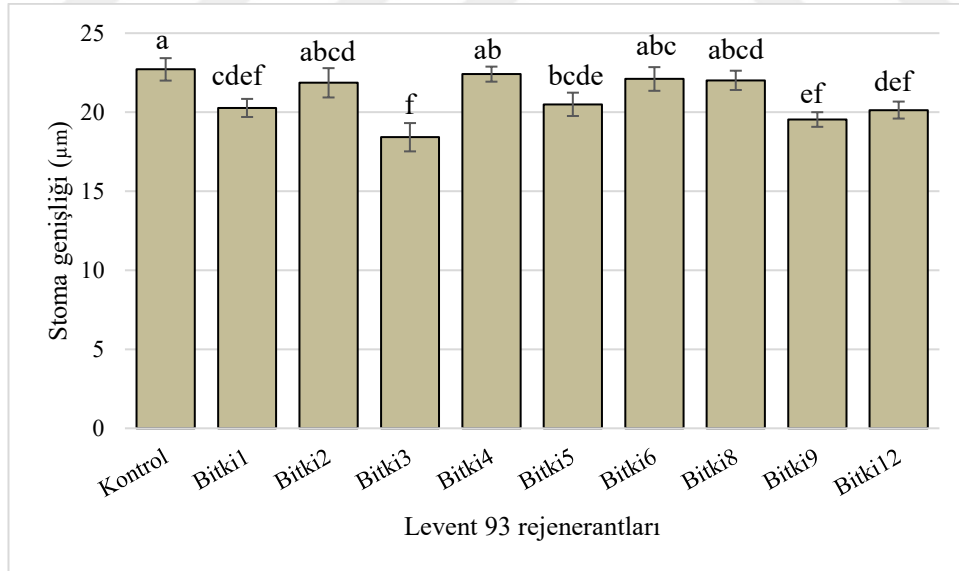
Şekil 4.24. Levent 93 rejenerantlarının stoma sayısı. Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir ($n = 10$, $p = 0.05$). Her veri noktasındaki dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir

Levent 93 bitkilerin arasında stoma uzunluğunun karşılaştırılması farklı modeller ortaya koymuştur: kontrol, sekizinci bitkiden hariç diğer tüm bitkilerden önemli ölçüde en uzun stomaları göstermiştir (Şekil.4.25). Buna karşılık dokuzuncu bitki, diğerlerine kıyasla önemli ölçüde daha kısa stomalara sahip olmuştur. Bu arada, birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü, beşinci, altıncı, ve on ikinci bitkiler kendi aralarında karşılaştırılabilir stoma uzunlukları göstererek 'de' ile 'cde' gruplarını oluşturmuş ve bu gruplar içinde stoma uzunluğunda önemli bir farklılık olmadığını göstermiştir. Bu durum, test edilen bitkiler arasında stoma uzunluğunda değişkenlik olduğunu ve kontrol grubu, dokuzuncu bitki ve diğer bitkiler arasında kayda değer farklılıklar gözlemlendiğini göstermektedir.

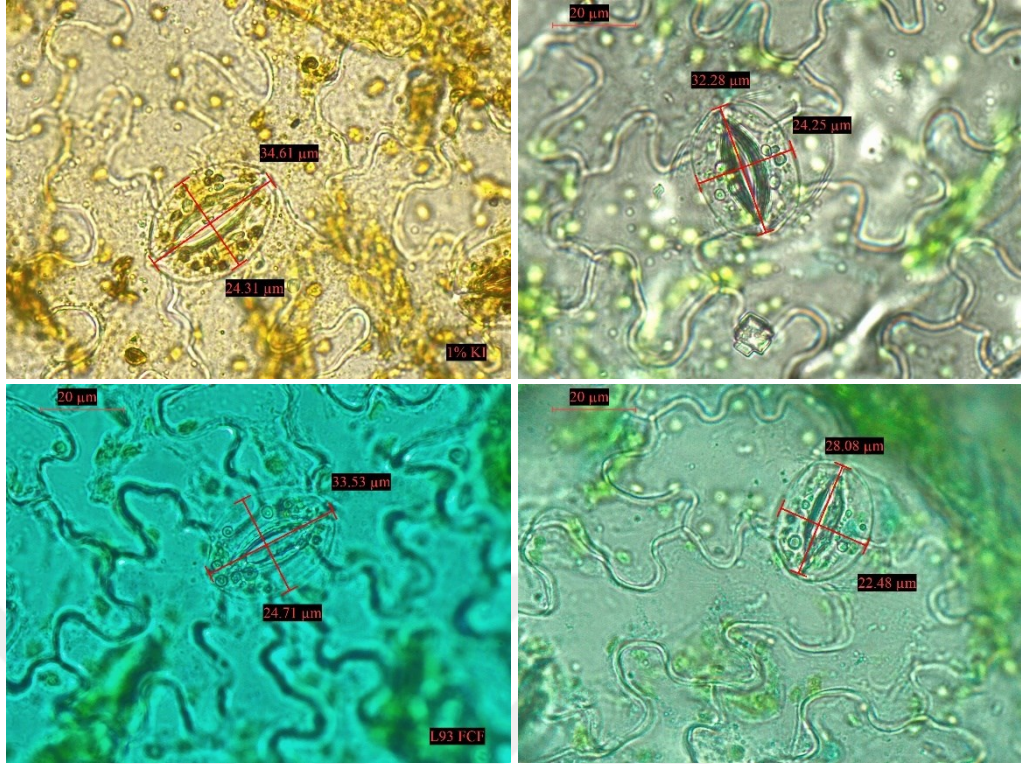


Şekil 4.25. Levent 93 rejenerantlarının stoma uzunluğu (µm). Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir (n = 10, p = 0.05). Her veri noktasındaki dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir

Şekil 4.26, kontrol grubunun (22.7) µm ile en uzun stomaya sahip olduğunu, üçüncü bitkinin 18.4 µm ile en kısa stomaya sahip olduğunu ve diğer bitkilerin aralarında değişen stoma uzunluklarını göstermektedir. Çeşitli anter türevli Levent 93 rejenerantlarında stoma uzunluğu ve genişliği (µm) şekil 4.27’de gösterilmiştir.



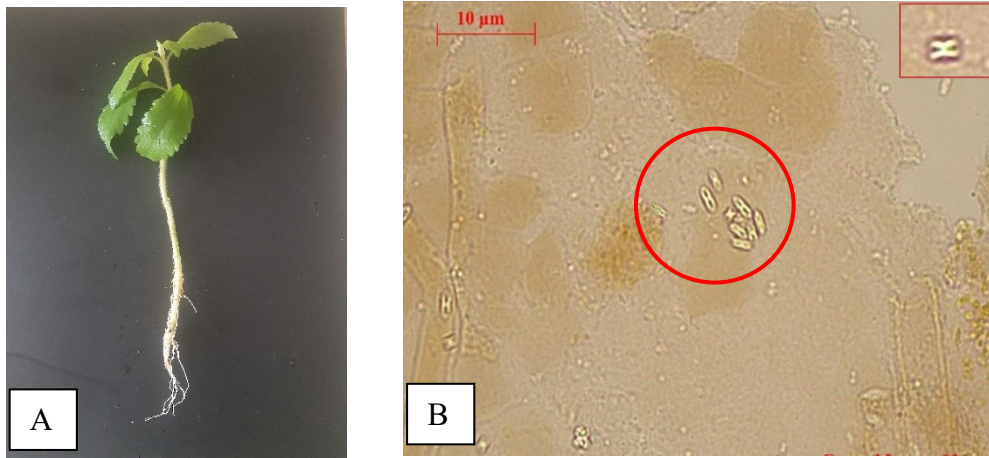
Şekil 4.26. Levent 93 rejenerantlarının stoma genişliği (µm). Aynı harfler LSD testi kullanılarak belirlenen anlamlı olmayan farklılıkları göstermektedir (n = 10, p = 0.05). Her veri noktasındaki dikey çubuklar ortalamanın standart hatasını temsil etmektedir



Şekil 4.27. Çeşitli anter türevli Levent 93 rejenerantlarında stoma uzunluğu ve genişliği (µm)

4.9. Kromozom sayımı

Stevia çelikleri başarılı bir şekilde köklendirilmiştir. Ön kromozom sayım denemeleri, köklerin sabah saat 10.30 ile 11.00 arasında toplanması gerektiğini göstermiştir. En uygun ön işlem koşulu 4°C'de 24 saat boyunca 2 mM 8-hidroksikinolin olmuştur. Fiksasyon süresi yaklaşık 5 saat olmuştur. Hem %2 enzim solüsyonu hem de 1 M HCl kökleri etkili bir şekilde maserasyona uğratmıştır. İnkübasyon süresi 37°C'de yaklaşık 20 dakika olmuştur. Kromozomlar aseto-orcein ile boyanmıştır (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. A) Köklenmiş bitki ve B) Levent 93 hücre içerisinde kromozomları

5. TARTIŞMA

5.1. Farklı ortam ve genotiplerin *Stevia rebaudiana*'nın embriyo üretimi ve bitki rejenerasyonu üzerine etkileri

Stevia rebaudiana da dahil olmak üzere çeşitli bitki türlerinde anter kültürü yoluyla haploid ve double haploid (DH) üretiminin araştırılması, bu tekniğin bitki ıslah programlarının hızlandırılmasındaki kritik rolünü vurgulamaktadır. Haploidler gametofitik kromozom sayısına sahipken, DH'ler kromozom duplikasyonundan kaynaklanmaktadır. Gametik embriyogenez, heterozigot ebeveynlerden tek bir adımda tamamen homozigot hatların doğrudan geliştirilmesini sağlayarak, birden fazla nesil kendine döllenmeyi içeren geleneksel ıslah yöntemlerine kıyasla süreyi önemli ölçüde azaltmaktadır. Haploid ve DH üretimi, homozigot bitkilerin hızlı üretimini kolaylaştırarak bitki ıslahında devrim yaratan güçlü bir biyoteknolojik yöntemdir. Bu teknolojiler artık birçok önemli ürün için ıslah programlarının ayrılmaz bir parçasıdır ve özellikle *in vitro* anter veya izole mikrospor kültürü yöntemleriyle elde edilmektedir (Germanà, 2011). Bu tartışma, farklı bitkilerde anter kültürü ile ilişkili etkinlik ve zorlukları tanımlamak için kullandığımız yöntem de dahil olmak üzere çeşitli çalışmalardan elde edilen bulguları sentezlemektedir.

Çalışmamız, *Stevia rebaudiana* çeşitlerinin (Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü) kallus, embriyo ve bitki rejenerasyonu üretimi için farklı ortam formülasyonlarına verdiği yanıtta önemli değişkenlikler olduğunu göstermiştir. Özellikle, T4 ortamı (MS+2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP), anter kültürü sonuçlarını optimize etmede ortam bileşiminin önemini vurgulayan diğer çalışmalardan elde edilen bulgularla tutarlı olarak en etkili olmuştur.

Tüm çeşitler kallus ve embriyo üretimine iyi yanıt vermiştir; ancak, Levent 93 ve ardından Turgut 82 en iyi sonuçları göstermiştir. Optimum aşamalarındaki anterler bölünmüş ve Embriyogenik kallus oluşumunun yanı sıra embriyo oluşumu da doğrudan mikrospordan başlatılmıştır. Bu çalışmada küresel, dairesel, çubuk ve kalp şeklinde embriyolar gözlemlenmiş, bunlardan çubuk embriyolar bitki üretmemiştir.

İkinci denemede, tüm çeşitlerde tutarlı bir şekilde daha yüksek sayıda çubuk şekilli embriyo gözlemlenmiştir. Bu gözlem, Uskutoglu vd. (2019) *Stevia rebaudiana*'da farklı hormon konsantrasyonları altında çubuk şeklindeki embriyolar da dahil olmak üzere çeşitli Embriyogenik kallus oluşumlarının belgelendiği bulgularıyla benzerlik göstermektedir. Özellikle, Uskutoglu vd. (2019) MS 2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP ortamında koyu yeşil renkli çubuk şeklinde embriyoların yanı sıra diğer Embriyogenik kallus ve yapı biçimlerini de kaydetmiştir. Çalışmamız, *Stevia rebaudiana* doku kültüründe çubuk şeklindeki embriyoların önemini pekiştirmekte ve bitkiye dönüşememelerine rağmen oluşumlarını en aza indirmek için koşulların optimize edilmesinde tutarlı bir zorluk olduğunu göstermektedir.

Uskutoglu vd. (2019), *Stevia rebaudiana*'nın anter kültürü için dirençli bir tür olarak kabul edilebileceğini belirtmiş ve bu bulguları desteklemek için daha fazla araştırma yapılması gerektiğini vurgulamıştır. Marciniak vd. (1998) genotip, ortam ve şekerin tritikale anter kültürü üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Maltozun sükrozdan daha etkili olduğunu ve P2 ortamının en fazla sayıda yeşil bitki verdiğini tespit ederek ortam bileşenlerinin kritik rolünü göstermişlerdir. Benzer şekilde, Khandakar vd. (2014) Kore Krizantem çeşitlerini incelemiş ve genotip ve ortam bileşiminin kallus indüksiyonu ve ardından haploid bitki üretimi üzerindeki önemli etkilerini vurgulamıştır. Çalışmalar, ortam formülasyonlarının belirli genotiplere göre optimize edilmesi gerektiğinin altını çizmektedir; bu bulgu, Levent 93'ün diğer çeşitlerden sürekli olarak daha iyi performans gösterdiğini ve onu Turgut 82 ve Tütüncü'nün izlediğini göstermiştir.

Chen ve Dribnenki (2002), etkili bir DH üretim sistemi için duyarlı genotiplerin belirlenmesinin ve verimli protokollerin geliştirilmesinin önemini vurgulamışlardır. A₂₂C-9 ve NLN-12 ortamlarını kullanarak 16 düşük linolenik keten genotipini değerlendirmişler ve genotipe özgü yanıtlar bulmuşlardır. 96-3-F₁ hibriti NLN-12 ile daha yüksek kallus indüksiyonu gösterirken, 96-45-F₁ hibriti her iki ortamda da karşılaştırılabilir kallus üretimine göstermiştir ancak A₂₂C-9 ile daha yüksek sürgün rejenerasyonu göstermiştir. Bu durum, stevia'daki bulgularımızla uyumlu olarak, ortam formülasyonlarının belirli genotipik yanıtları geliştirmek için uyarlanması gerektiğini göstermektedir.

Başarılı haploid ve DH üretimi için PGR seçimi çok önemlidir. Çalışmamız, T4 ortamındaki spesifik NAA ve BAP kombinasyonlarının kallus ve embriyo oluşumunu önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Uskutoglu vd. (2019) *Stevia rebaudiana*'da bu bileşenlerin önemini vurgulayan bir çalışma yürütmüştür. Uygun tomurcuk aşamasını ve farklı büyüme düzenleyicilerinin ve ön işlemlerin *in vitro* androjenez üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Elde ettikleri bulgulara göre, NAA ve BAP ile desteklenmiş MS ortamından embriyoları gelişimi sağlanmıştır bu da T4 ortamında elde ettiğimiz sonuçları destekler niteliktedir. Bu çalışma ayrıca MS 2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP'ın embriyo oluşumunda etkili olduğunu doğrulamakta ve ortam bileşimi seçimimizi desteklemektedir. Uskutoglu vd. (2019) da yüksek sıcaklık ve soğuk ön işlemler uygulamış ve MS 2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ kinetin ile yüksek sıcaklık işleminin en başarılı olduğunu ve %37.5 embriyo oranı elde ettiğini bulmuştur. Bu sonuçlar, hassas PGR kombinasyonlarının ve ön işlem koşullarının anter kültürü sonuçlarını optimize etmedeki kritik rolünün altını çizmektedir.

Saji ve Sujatha (1998), spesifik PGR kombinasyonlarının ayçiçeğinde kallus indüksiyonu ve rejenerasyonunu etkilediğini, agar ve sükroz konsantrasyonları gibi değişkenlerin kallus oluşumunu önemli ölçüde etkilediğini, inkübasyon koşulları ve genotipin ise minimum etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Uskutoglu vd. (2019) de *Stevia*'da farklı PGR kombinasyonlarının rolünü vurgulamış, NAA ve BAP

kombinasyonlarının önemli ölçüde kallus ve embriyo oluşumuyla sonuçlandığını belirtmişlerdir. Bu bulgular, T4 ortamının özellikle etkili olduğu çalışmamızda görüldüğü gibi, PGR'lerin hassas optimizasyonuna olan ihtiyacı vurgulamaktadır.

Wang vd. (2014) Krizantem üzerinde haploid ve DH üretiminin karmaşıklıklarını ve sonuçlarını vurgulayan bir çalışma yürütmüşlerdir. Araştırmaları, Krizantem'in yüksek oranda heterozigot doğasının yarattığı zorlukların altını çizerek, genetik analiz ve ıslah amacıyla haploid formlar elde etmek için özel teknikler gerektirmiştir. Bulguları, *in vitro* kültür ve kolhisin tedavisi yoluyla başarılı haploid ve DH hatlar üretilirken, haploid ve double haploid döller ile ana ebeveyn arasında morfolojik ve fizyolojik farklılıklar gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Özellikle haploidler, ikiye katlanmış haploid muadillerine ve ana çeşide kıyasla daha düşük boy ve değişmiş çiçek özellikleri sergilemiştir. Ayrıca, Wang vd. (2014) sitozin metilasyon modellerini aydınlatmak için metilasyona duyarlı amplifikasyon polimorfizmi (MSAP) profili kullanarak haploidizasyonla ilişkili önemli değişiklikleri ve kromozom ikiye katlandıktan sonra iyileşmeyi ortaya çıkarmıştır.

Stevia rebaudiana üzerinde yaptığımız çalışmada, çeşitlerin anter kültürü sırasında farklı ortam formülasyonlarına ve büyüme düzenleyici kombinasyonlarına verdiği yanıtta önemli değişkenlikler gözlemlenmiştir. T4 ortam formülasyonu (MS + 2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP) Embriyogenik kallus ve embriyo oluşumunu teşvik etmede en etkili olduğunu kanıtlayarak, istenen özellikleri geliştirmek için kültür koşullarını optimize etmenin önemini yansıtmaktadır. Wang vd. (2014) bulguları, türetilen hatlarda sitozin metilasyonu ve morfolojik varyasyonla ilişkili doğal zorluklara rağmen, genetik heterojenliğin üstesinden gelmede ve ıslah programlarını hızlandırmada haploid ve DH teknolojisinin daha geniş etkilerinin altını çizmektedir.

Saensee vd. 2018'de anter kültüründe ortam bileşimi ve çiçek morfolojisinin önemini daha da vurgulamak için yaptıkları çalışmada, ayçiçeğinde çiçek özellikleri ve mikrospor gelişim aşamalarını anter kültürü sonuçlarıyla ilişkilendirmişlerdir. Elde ettikleri bulgular, uygun kültür ortamıyla birlikte daha yüksek oranda orta-geç çekirdek mikrospor içeren daha büyük disk floretler kullanıldığında en iyi sonuçların elde edildiğini vurgulamaktadır. Bu korelasyon, T4 ortamının (MS + 2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP) Embriyogenik kallus üretimini ve ardından bitki rejenerasyonunu önemli ölçüde artırdığı *Stevia rebaudiana*'da yaptığımız çalışmayla örtüşmektedir. Bu bulguları bütünleştirerek, tartışmamız çeşitli bitki türlerinde anter kültürü protokollerini optimize etmede çiçek morfolojisi, mikrospor gelişim aşamaları ve ortam bileşimi arasındaki kritik etkileşimin altını çizmektedir.

Ayrıca Dayan ve Arda (2016), farklı ışık koşulları altında ayçiçeği anterlerinde NAA ve BA'nın androjenez üzerindeki sinerjik etkilerini araştırmışlardır. Çalışmaları, NAA ve BA'nın birlikte uygulanmasının kallus indüksiyon oranlarını önemli ölçüde artırdığını vurgulayarak, *Stevia rebaudiana*'da Embriyogenik kallus ve embriyo

oluşumunu teşvik etmede büyüme düzenleyicilerinin (NAA ve BAP) önemli rolüne ilişkin bulgularımızı pekiştirmiştir. Bu, MS + 2.0 mg l⁻¹ NAA + 0.5 mg l⁻¹ BAP'ın sağlam kallus ve embriyo üretimini kolaylaştırdığı T4 ortam formülasyonunu kullanımızla uyumlu olmuştur. Genel olarak, T4 ortamı hem kallus hem de embriyo üretim oranları için her üç denemede de en etkili ortam olarak ortaya çıkmıştır. Özellikle, T2, T3, T5, T6 ve T7 umut verici sonuçlar gösterirken, başarılı bitki üretimi sadece T4, T6 ve T5'te gözlenmiştir. Bu durum, bu ortam formülasyonlarında çubuk şeklindeki embriyolar dışındaki embriyo türlerinin varlığının bu sonuçlara katkıda bulunmuş olabileceğini düşündürmektedir. Tartışmamız, bu bilgileri entegre ederek, bitki ıslah programlarında genetik iyileştirme stratejilerini hızlandırmak için gerekli olan başarılı anter kültürü sonuçlarına ulaşmada büyüme düzenleyicilerinin ve bunların optimizasyonunun çok önemli rolünü genişletmektedir.

5.2. Bitki rejenerasyonları ve aklimatizasyon

Çalışmamız birinci ve ikinci denemelerde kök gelişimini ve fidanların aklimatizasyonunu başarıyla sağlamıştır. Ancak, üçüncü denemede, karşılaşılan pratik zorlukları gösteren hiçbir bitki elde edilememiştir. Bu bulgu, Nakas vd. (2023) tarafından aspir genotiplerinde bildirilen zorluklarla tezat oluşturmakta, ortam ve PGR kombinasyonlarımızın etkinliğini vurgulamaktadır. Bununla birlikte, sonuçlarımız üçüncü denemede köklü bitki elde edilememesi sonucuyla uyumludur. İleriye dönük olarak, rejenerasyon ve aklimatizasyon için geliştirdiğimiz protokolün, özellikle aklimatizasyon sürecinde bitki sağlığının titizlikle izlenmesi çok önemlidir. Aklimatizasyon başarısında nemin kritik rolü göz önünde bulundurulduğunda, günlük nem kontrolleri hayati önem taşır.

5.3. Ploidi seviyesini belirleme

Ploidi değerlendirmesi, haploid bitkiler üretmede anter kültürünün başarı oranını belirlemek için gereklidir. Anter kültürünün başarısını değerlendirmek için flow sitometrisi, kromozom sayımı, stoma koruyucu hücrelerinde kloroplast sayımı, stoma boyutu ve uzunluğunun ölçümü, nükleol sayımı, polen oluşumu ve canlılığının değerlendirilmesi, hücre boyutunun analizi ve morfolojik marker analizi gibi çeşitli metodolojiler kullanılmaktadır (Ochatt vd. 2021).

Çalışmamızda Levent 93, Turgut 82 ve Tütüncü'nün anter türevi bitkilerinde kloroplast sayıları ve stoma özellikleri kontrollere kıyasla incelenmiş, ilkinde haploid bitkilerin potansiyel göstergesi olarak kloroplast sayılarının azaldığı görülmüştür. Bu durum, Yuan vd. (2009) lahana, brokoli ve Çin lahanasında kloroplast sayılarının ploidi seviyeleriyle önemli ölçüde değiştiği ve ploidi ile kloroplast sayıları arasında bir korelasyon kurduğu bulgularıyla paralellik göstermektedir. Bu arada, Hosseini vd. (2018) diploid ve tetraploid bitkiler arasında stoma yoğunluğu ve boyutunda belirgin farklılıklar tespit ederek, farklı bitki gruplarında değişken stoma özelliklerine ilişkin gözlemlerimizi desteklemiştir. Ayrıca, Bat vd. (2021) stoma özelliklerini biber ve patlıcanda ploidi seviyelerinin güvenilir göstergeleri olarak araştırmış ve poliploid bitkilerde daha yüksek kloroplast sayılarına dikkat çekmiştir. Çalışmamız, geleneksel,

emek yoğun yöntemlerin aksine, stoma özelliklerinin ploidi belirleme için yayılan zararlı etki, doku oluşumları olmayan belirteçler olarak faydasını vurgulayarak bu bulgularla uyumludur. Bu çalışmalar birlikte, bitki popülasyonları arasındaki genetik ve fizyolojik varyasyonların anlaşılmasında kloroplast ve stoma özelliklerinin öneminin altını çizmekte, adaptasyon ve ıslah stratejilerine ilişkin içgörüler sunmaktadır.

Doğru kromozom sayımı, bitkilerdeki ploidi seviyelerini belirlemek için çok önemlidir ve mitotik veya mayotik hücre bölünmesi analizi ile elde edilebilir (Maluszynska, 2003). Mitotik kromozom sayımı, basitliği ve hızı nedeniyle tercih edilir ve kök uçları mitotik hücrelerin en erişilebilir kaynağıdır. Köklerin olmadığı durumlarda genç tomurcuklar, yapraklar veya kallus kullanılabilir. Kromozom hazırlama ve boyama protokolleri belirli bitki türlerine göre değiştirilir ancak temel adımları paylaşmaktadır: materyal toplama, fiksasyon ve boyama. Hazırlık aşaması ya ezmeden önce sağlam dokuların boyanmasını ya da boyamadan önce kromozom örneklerinin hazırlanmasını içermektedir. Birçok türde etkili olan Feulgen boyama gibi yöntemler, daha küçük genomlu bitkilerde daha zayıf sonuçlar verebilmektedir. Küçük kromozomlu bitkiler için DAPI ile floresan boyama, floresan mikroskobu gerektirmesine rağmen etkinliği nedeniyle tavsiye edilmektedir. Her iki yöntem de sitoplazmanın boyanmadan kalmasıyla kromozomların net bir şekilde görüntülenmesini sağlamaktadır (Maluszynska, 2003). Kromozom sayımına ilişkin ön çalışmamızda, genç kök uçları farklı süreler boyunca kolhisin, bromonaftalin ve 8-hidroksikinolin dahil olmak üzere çeşitli kimyasallarla ön işleme tabi tutulmuştur. Ön işleminden geçirilen kökler daha sonra 5 veya 24 saat boyunca 3:1 (v/v) etanol-asetik asit çözeltisinde fikse edilmiştir. Fiksasyonun ardından kökler 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiş ve yöntemler bölümünde açıklandığı gibi 1M HCl veya %2 enzim solüsyonuna tabi tutulmuştur. İnkübe edildikten sonra %45 asetik asit ile maserasyon yapılmıştır. Kökler daha sonra asetokarmin ya da asetoorcein ile boyanmıştır. En başarılı sonuçlar, 2 mM 8-hidroksikinolin ile 24 saat boyunca 4°C'de ön işleme tabi tutulan, 5 saat boyunca fikse edilen ve iyi inkübe edilen köklerde elde edilmiştir. İnkübasyondan sonra enzim solüsyonu çıkarılmış ve kökler ya 45% asetik asit ile maserasyona tabi tutulmuş ya da doğrudan aseto-orcein ile boyanmıştır; aseto-orcein hem maserasyon hem de boyama işlemleri için kullanılmıştır.

Piosik vd. (2015) göre, rejenere haploid bitkilerden ve diploid bitkilerden elde edilen genç kökler, 22°C'de 1 saat boyunca %0,1'lik kolhisin çözeltisi ile ön işleme tabi tutulmuştur. Ön işlemin ardından kökler FAA çözeltisinde (90 ml %70 etanol, 5 ml formalin ve 5 ml glasiyal asetik asit içeren) 1 saat boyunca sabitlenmiştir. Kökler daha sonra %45 glasiyal asetik asit içinde %1 asetokarmin solüsyonu ile 20 dakika boyanmış ve 1M hidroklorik asit içinde maserasyona tabi tutulmuştur. Kromozom sayıları, ışık mikroskobu altında gözlemlenen ezilmiş slaytlar kullanılarak metafazdaki meristematik hücrelerden belirlenmiştir.

Kondo vd. (2020) tarafından tanımlanan kromozom sayma yöntemi, Koehler vd. den (2008) uyarlanan modifikasyonlarla takip edilmiştir. *Dendrobium* hibritlerinin ve

indüklenmiş amfidiploidlerin analizi için en az üç bitkiden yeşil kök uçları toplanmıştır. Kök uçları, 5 ila 8 mm uzunluğunda, sabah 10.30 civarında hasat edilmiş ve 36 saat boyunca 4°C'de 2 mM 8-hidroksikinolin içinde ön işleme tabi tutulmuştur. Ön işlemin ardından, kök uçları oda sıcaklığında 5 saat boyunca 3:1 (v/v) etanol-asetik asit karışımında sabitlenmiştir. Fiksasyondan sonra, kök uçları bir sonraki kullanıma kadar 4°C'de %70 etanol içinde saklanmıştır. Kromozom gözlemi için, kök uçları etanolü uzaklaştırmak üzere 1 saat boyunca damıtılmış suda bekletilmiştir. Kök uçlarının distal 0,5 mm'si bir cam lam üzerinde kesilerek izole edilmiş, ardından 10 µL enzim solüsyonu (%2 Selülaz Onozuka RS [Yakult Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Tokyo, Japonya] ve %2 Pektoliyaz Y-23 [Kikkoman Corporation, Chiba, Japonya] içeren) ile karıştırılmış ve kapalı, nemlendirilmiş bir kaptan 37°C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Enzim muamelesinden sonra, üstüne bir örtü yerleştirmeden önce 1-2 dakika boyunca bir damla %45 asetik asit uygulanmıştır. Kök uçları daha sonra bir parmak kullanılarak elle ezilmiş ve lamlar -80°C'de 1 gün süreyle dondurularak muhafaza edilmiştir. Dondurma işleminin ardından, örtü bir jilette kaldırılmıştır. Hücreler (Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA) 5 µg/mL DAPI ile boyanmış, floresan mikroskop altında ×1000 büyütmede (Model BX53; Olympus, Tokyo, Japonya) gözlemlenmiş ve Cool SNAP Myo kamera (Photometrics, Tucson, AZ) ile fotoğraflanmıştır. Kromozom sayıları, iyi yayılmış kromozomlara sahip en az 10 mitotik hücreden belirlenmiştir (Kondo vd. 2020).

Libik-Konieczny vd. (2018) tarafından stevia üzerinde yapılan çalışmada, perlit içinde köklendirilmiş yumuşak ağaç çeliklerinden elde edilen genç radiküller üzerinde kromozom analizi yapılmıştır. Radiküller toplanmış ve 4°C'de yaklaşık 24 saat boyunca doymuş sulu α-bromonaftalin çözeltisinde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, 1:3 (v/v) glasiyal asetik asit ve mutlak etanol karışımında sabitlenmiştir. Sabitlenen kök uçları daha sonra distile su ile durulanmış, 60°C'de 10 dakika boyunca 1M HCl içinde hidrolize edilmiş ve %45 asetik asit içinde ezilmiştir. Sıvı nitrojende dondurulduktan sonra kapak camları çıkarılmış ve preparatlar %0,1 sulu toluidin mavisi çözeltisi ile boyanmıştır. Lamalar havada iyice kurutuldu ve Entellan New® ile monte edilmiştir. Kromozom sayımları ve fotoğrafları Nikon DS-Fi1c kamera ve NIS Elements yazılımı ile donatılmış bir Nikon Microphot-FXA mikroskop kullanılarak elde edilmiştir.

6. SONUÇLAR

Her üç denemeden elde edilen bulgulara dayanarak aşağıdaki kapsamlı sonuçlar çıkarılabilmektedir:

6.1. Çeşitler Arasındaki Farklar:

1. Kallus Üretimi:

Levent 93, tüm denemelerde ortalama kallus üretimi açısından genel olarak Tütüncü'den daha iyi performans göstermiştir. İlk denemede önemli ölçüde daha yüksek kallus üretimi göstermiştir (% 47.4). İkinci denemede, hem Levent 93 (% 47.1) hem de Turgut 82 (% 42.5) aralarında önemli bir fark olmaksızın yüksek kallus üretimi sergilemiştir. Üçüncü denemede, Levent 93 (% 53.1) ve Turgut 82 (%56.2) benzer sonuçlar göstererek bu iki genotipin kallus oluşumundaki sağlamlığını göstermiştir.

2. Kallus başına embriyo sayısı (Adet)

İlk denemede Levent 93 (3.38 adet), Turgut 82 (0.60 adet) ve Tütüncü (0.71 adet) çeşitlerine kıyasla kallus başına daha yüksek ortalama embriyo sayısı göstermiştir. Bununla birlikte, ikinci denemede embriyo sayısı Levent 93'te (1.76 adet) ve Turgut 82'de (1.38 adet) Tütüncü çeşidine (0.38 adet) kıyasla daha yüksek olmuştur. Üçüncü denemede ise genotipler arasındaki embriyo üretimindeki farklılıklar önemli düzeyde olmasa da, Levent 93 için 1.08, Turgut 82 için 0.37 ve Tütüncü için 0.48 embriyo sayısı kaydedilmiştir.

3. Kallus başına embriyo oranı

İlk denemede Levent 93 (%33.8) çeşidi, Turgut 82 (%6.0) ve Tütüncü (%7.1) çeşitlerine kıyasla kallus başına daha yüksek ortalama embriyo sayısı göstermiştir. Bununla birlikte, ikinci denemede embriyo üretim oranları Levent 93'te (%17.6) ve Turgut 82'de (%13.8) Tütüncü'ye (%3.8) kıyasla daha yüksek olmuştur. Üçüncü denemede ise genotipler arasındaki embriyo üretimindeki farklılıklar önemli düzeyde olmasa da, Levent 93 için %10.8, Turgut 82 için %3.7 ve Tütüncü için %4.8 embriyo üretimi oranları kaydedilmiştir.

6.2. Ortamın Etkisi

T4 ortamı, tüm denemelerde sürekli olarak en yüksek kallus üretimini destekleyerek kallus başlangıcını ve büyümesini teşvik etmedeki etkinliğini göstermiştir. Ayrıca, çeşitli denemelerde daha yüksek embriyo sayısı ve yüzdeleri üreterek doku kültürü için genel uygunluğunu vurgulamıştır. Bununla birlikte, T2, T3, T5, T6 ve T7 ortamları da bu parametreler açısından kıyaslanabilir sonuçlar göstermiştir.

6.3. İnteraksiyon sonuçları

Genotip ve ortam arasındaki etkileşim, belirli optimum kombinasyonları vurgulayarak önemli bulunmuştur. Örneğin, ilk denemede Levent 93, T4'te en yüksek kallus, embriyo sayısı ve yüzdesi üretimini göstermiştir. Bununla birlikte, ikinci

denemede, Turgut 82 T4'te en yüksek kallus üretimini (9.6), en yüksek embriyo sayısı sergilerken, Levent 93 T7 ve T4 ortamında en uygun embriyo üretimini göstermiştir. Üçüncü denemede, Turgut 82 yine T3'te en yüksek kallus üretimini (9.4) gösterirken, T4'ten (9.0) önemli bir fark göstermemiştir.

Tüm genotipler ve ortamlar denemelerde kallus üretimini, embriyo sayısı ve yüzdesini önemli ölçüde etkilemiştir. Bununla birlikte, Levent 93 çeşitli deneysel koşullar altında birden fazla parametrede (kallus üretimi, embriyo sayısı ve embriyo yüzdesi) güçlü performans göstermiştir. Turgut 82 de özellikle uygun ortam koşullarında iyi performans göstermiştir. Tütüncü ise performans ölçütlerinde genel olarak geride kalmıştır.

6.4. Sürgün Üretimi

Sürgün üretimi açısından çeşitler arasında önemli bir fark olmamasına rağmen, T3 ortamı diğer uygulamalara kıyasla daha fazla sürgün üretmiştir. Üçüncü denemede sürgün üretimi gerçekleşmemiştir.

6.5. Köklendirme ve Aklimatizasyon

Tüm bitkiler her üç ortamda da köklenmiştir. NAA ve IBA içeren MS ortamı kallus ve ardından bir grup kök üretirken, tek başına MS ortamı doğrudan kök üretmiştir. Köklendirmeden sonra bitkiler 20 gün içinde başarılı bir şekilde iklime alıştırmıştır.

6.6. Kloroplast ve Stoma Analizi

Kloroplast, stoma boyutu ve sayım analizlerine dayanarak, tüm bitkiler ve kontrol grubu arasında, uygulamaların neden olduğu fizyolojik farklılıkları gösteren varyasyonlar bulunmuştur.

6.7. Kromozom sayımı

Levent 93'ün kontrol bitkisindeki kromozomlar, 4°C'de 24 saat boyunca 2 mM 8-hidroksikinolin içeren bir ön işlem protokolü kullanılarak sayılmıştır. Ön işlemde geçirilen kökler daha sonra 1:3 (v/v) asetik asit ve etanol karışımında 5 saat boyunca sabitlenmiştir. Fiksasyonun ardından kökler 37°C'de 20 dakika boyunca enzim solüsyonu ya da 1M HCl içinde inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra kökler maserasyona tabi tutulmuş ve yöntemler bölümünde ayrıntılı olarak açıklandığı gibi asetoorcein ile boyanmıştır.

7. KAYNAKLAR

- Ahmad, J., Khan, I., Blundell, R., Azzopardi, J., & Mahomoodally, M. F. (2020). *Stevia rebaudiana* Bertoni.: an updated review of its health benefits, industrial applications and safety. *Trends in Food Science & Technology*, 100, 177-189. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.030>
- Akhatar, J., Kaur, H., & Kumar, H. (2022). Conventional Plant Breeding to Modern Biotechnological Approaches in Crop Improvement. In *Technologies in Plant Biotechnology and Breeding of Field Crops* Springer. https://doi.org/doi.org/10.1007/978-981-16-5767-2_1
- Aktaş, Y. E., Aydin, Y., & Altinkut Uncuoglu, A. (2023). Induction of haploid plants for speed-up breeding in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by pollen irradiation. *Genetics & Applications*, 7(1). <https://doi.org/10.31383/ga.vol7iss1ga05>
- Ali, A., Gull, I., Naz, S., & Afghan, S. (2010). biochemical investigation during different stages of *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana*. *Pak. J. Bot*, 42(4), 2827-2837.
- Amien, S., Maulana, H., Ruswandi, D., & Nurjanah, S. (2021). Genetic gain and relationship of yield and yield attributes of mutant and cross-bred stevia (*Stevia rebaudiana*) genotypes. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(8). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220805>
- Augustynowicz, J., Krzeszowiec, W., & Gabrys, H. (2009). Acquisition of plastid movement responsiveness to light during mesophyll cell differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 53(1), 121-127. <https://doi.org/10.1387/ijdb.062140ja>
- Bairu, M. W., Aremu, A. O., & Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulation*, 63(2), 147-173. <https://doi.org/10.1007/s10725-010-9554-x>
- Bat, H., Altındağ, F. N., Yiğit, M. A., Ellialtıoğlu, Ş. Ş., & Çömlekçioğlu, N. (2021). Ploidy estimation in pepper and eggplant via stomata characteristics. *International Journal of Agriculture Forestry and Life Sciences*, 5(2), 139-146.
- Blakeslee, A. F., John Belling, Farnham, M. E., & Dorothy Bergner, A. (1922). Blakeslee-1922-A-haploid-mutant-in-the-jimson-weed. *SCIENCE*, 55(1433), 646-647.
- Bondarev, N., Reshetnyak, O., Bondareva, T., Il'in, M., & Nosov, A. (2019). Impact of cultivation factors *in vitro* on the growth and the biosynthesis of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* cell cultures. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 25(4), 1091-1096. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00680-6>
- Brandle, J. E., & Rosa, N. (1992). Heritability for yield, leaf:stem ratio and stevioside content estimated from a landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Canadian journal of plant Science*, 72(4), 1263-1266.

- Brewer, C. A. (1992). Responses by stomata on leaves to microenvironmental conditions. *Tested studies for laboratory teaching*, 13, 67-75.
- Bridgen, M. P. (1994). A Review of Plant Embryo Culture. *HortScience*, 29(11), 1243-1246.
- Cardoso, J. C., Abdelgalel, A. M., Chiancone, B., Latado, R. R., Lain, O., Testolin, R., & Germana, M. A. (2016). Gametic and somatic embryogenesis through *in vitro* anther culture of different Citrus genotypes. *Plant Biosystems*, 150(2), 304-312. <https://doi.org/10.1080/11263504.2014.987847>
- Cardoso, J. C., Sheng Gerald, L. T., & Teixeira da Silva, J. A. (2018). Micropropagation in the Twenty-First Century. In *Plant Cell Culture Protocols* (4 ed., pp. 17-46). <https://doi.org/doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4>
- Chester, K., Tamboli, E. T., Parveen, R., & Ahmad, S. (2013). Genetic and metabolic diversity in using RAPD and HPTLC analysis. *Pharmaceutical Biology*, 51(6), 771-777. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.765898>
- Chen, Y., & Dribnenki, P. (2002). Effect of genotype and medium composition on flax *Linum usitatissimum* L. anther culture. *Plant Cell Reports*, 21, 204-207.
- Chinnathambi, V., Panwar, S., Singh, K. P., Namita, Lekshmy, S., Mallick, N., & Mehraj, U. (2024). *In vitro* androgenesis for isolation of haploid and ploidy analysis in marigold (*Tagetes patula* L.). *Scientia Horticulturae*, 330, 112962. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2024.112962>
- Clausen, r. e., & Mann, m. c. (1924). The resurgence of haploids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 10(4), 121-124.
- Cosson, P., Hastoy, C., Errazzu, L. E., Budeguer, C. J., Boutié, P., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). Genetic diversity and population structure of the sweet leaf herb, *Stevia rebaudiana* B., cultivated and landraces germplasm assessed by EST-SSRs genotyping and steviol glycosides phenotyping. *Bmc Plant Biology*, 19(1). <https://doi.org/ARTN 43610.1186/s12870-019-2061-y>
- Currais, L., Loureiro, J., Santos, C., & Canhoto, J. M. (2013). Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 114(2), 149-159. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0311-5>
- Cutter, E. G. (1965). Recent experimental studies of the shoot apex and shoot morphogenesis. *The Botanical Review*, 31, 7-113.
- Davey, M. R., Anthony, P., Power, J. B., & Lowe, K. C. (2005). Plant protoplast technology: Current status. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 117-130.
- Dayan, S., & Arda, H. (2016, May). Effects of Naphthaleneacetic Acid and N6-benzyladenine on Androgenesis in *Helianthus annuus* L. In *Proceedings of the 19th International Sunflower Conference, Edirne, Turkey* (pp. 177-184).
- Detrez, C., Sangwan, R. S., & Sangwan-Norreel, B. S. (1989). Phenotypic and karyotypic status of *Beta vulgaris* plants regenerated from direct organogenesis in petiole culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 77, 462-468.

- Dunwell, J. M. (2010). Haploids in flowering plants: origins and exploitation. *Plant Biotechnology Journal*, 8(4), 377–424. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00498.x>
- Duncan, R. R. (1997). Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Advances in Agronomy*, Vol 58, 58, 201-240. <Go to ISI>://WOS:000072973000005
- Duquenne, B., Eeckhaut, T., Werbrouck, S., & Van Huylenbroeck, J. (2007). Effect of enzyme concentrations on protoplast isolation and protoplast culture of *Spathiphyllum* and *Anthurium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91(2), 165-173. <https://doi.org/10.1007/s11240-007-9226-3>
- Dyduch-Sieminska, M., Najda, A., Gawronski, J., Balant, S., Swica, K., & Zaba, A. (2020). *Stevia rebaudiana* Bertoni, a Source of High-Potency Natural Sweetener-Biochemical and Genetic Characterization. *Molecules*, 25(4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040767>
- Eeckhaut, T., Lakshmanan, P. S., Deryckere, D., Van Bockstaele, E., & Van Huylenbroeck, J. (2013). Progress in plant protoplast research. *Planta*, 238(6), 991-1003. <https://doi.org/10.1007/s00425-013-1936-7>
- Ferrie, A. M. R. (2009). Current Status of Doubled Haploids in Medicinal Plants. In *Advances in Haploid Production in Higher Plants*
- Fraiture, M., Zheng, X. Z., & Brunner, F. (2014). An *Arabidopsis* and Tomato Mesophyll Protoplast System for Fast Identification of Early MAMP-Triggered Immunity-Suppressing Effectors. *Plant-Pathogen Interactions: Methods and Protocols*, 2nd Edition, 1127, 213-230. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-986-4_17
- Gaines, E. F., & Aase, H. C. (1926). A Haploid Wheat Plant. *American Journal of Botany*, 13(6), 373. <https://doi.org/10.2307/2435439>
- Gautam, R. D., Kumar, R., Kashyap, U., Kumar, P., Singh, S., Singh, S., & Kumar, A. (2022). Genetic Improvement of Stevia: A Natural Non-Calorie Sweetener. In H. Wang (Ed.), *Case Studies of Breeding Strategies in Major Plant Species*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.105510>
- Germana, M. A. (2011). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 104(3), 283-300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>
- Ghose, A. K., Abdullah, S. N. A., Md Hatta, M. A., & Megat Wahab, P. E. (2022). DNA Free CRISPR/DCAS9 Based Transcriptional Activation System for UGT76G1 Gene in *Stevia rebaudiana* Bertoni Protoplasts. *Plants (Basel)*, 11(18). <https://doi.org/10.3390/plants11182393>
- Gleba, Y. Y., & Hoffmann, F. (1980). Arabidobrassica - a Novel Plant Obtained by Protoplast Fusion. *Planta*, 149(2), 112-117. <https://doi.org/10.1007/Bf00380870>

- Goyal, S. K., Samsher, & Goyal, R. K. (2010). Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr*, 61(1), 1-10. <https://doi.org/10.3109/09637480903193049>
- Grashoff, J. L. (1972). *a systematic study of the north and central american species of stevia* The University of Texas at Austin].
- Guan, Y., Li, S. G., Fan, X. F., & Su, Z. H. (2016). Application of Somatic Embryogenesis in Woody Plants. *Front Plant Sci*, 7, 938. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00938>
- Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1964). *In vitro* Production of Embryos from Anthers of Datura. *Nature*, 204(4957), 497-497. <https://doi.org/10.1038/204497a0>
- Guha, S., & Maheshwari, S. C. (1966). Cell Division and Differentiation of Embryos in the Pollen Grains of Datura *in vitro*. *Nature*, 212(5057), 97-98. <https://doi.org/10.1038/212097a0>
- Gupta, P., Sharma, S., & Saxena, S. (2016). Effect of abiotic stress on growth parameters and steviol glycoside content in *Stevia rebaudiana* (Bertoni) raised. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 3(4), 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2016.03.004>
- Hastoy, C., Le Bihan, Z., Gaudin, J., Cosson, P., Rolin, D., & Schurdi-Levraud, V. (2019). First Report of Septoria sp. Infecting *Stevia rebaudiana* in France and Screening of *Stevia rebaudiana* Genotypes for Host Resistance. *Plant Dis*, 103(7), 1544-1550. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1747-RE>
- Hosseini, H. R., Chehraz, M., Ahmadi, D. N., & Soresani, M. M. (2018). Colchicine-induced autotetraploidy and altered plant cytogenetic and morpho-physiological traits in *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. *Adv. Hortic. Sci*, 32, 229-238.
- Huber, B. M., & Wehner, T. C. (2021). Performance of 16 seed cultigens for glycosides and yield in North Carolina. *Scientia Horticulturae*, 277. <https://doi.org/ARTN10980310.1016/j.scienta.2020.109803>
- Javed, R., Mohamed, A., Yücesan, B., Gürel, E., Kausar, R., & Zia, M. (2017). CuO nanoparticles significantly influence *in vitro* culture, steviol glycosides, and antioxidant activities of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 131(3), 611-620. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1312-6>
- Jensen, C. J. (1974). Chromosome doubling techniques in haploids. 153-190.
- Jung, H. I., Yan, J. P., Zhai, Z. Y., & Vatamaniuk, O. K. (2015). Gene Functional Analysis Using Protoplast Transient Assays. *Plant Functional Genomics: Methods and Protocols*, 2nd Edition, 1284, 433-452. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2444-8_22
- Kaplan, B., & Turgut, K. (2019). Improvement of rebaudiosit A diterpene glycoside content in *SteviarebaudianaBertoni* using clone selection. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 43(2), 232-240. <https://doi.org/10.3906/tar-1803-37>

- Kaplan, B., Duraklioglu, S., & Turgut, K. (2019). Sustainable micropropagation of selected *Stevia rebaudiana* Bertoni genotypes. *Acta Scientiarum Polonorum. Hortorum Cultus*, 18(6), 47-56. <https://doi.org/10.24326/asphc.2019.6.5>
- Karp, A. (1994). Origins, Causes and Uses of Variation in Plant Tissue Cultures In *Plant Cell and Tissue Culture* (pp. 139-151). Springer, Dordrecht.
- Kasha, K. J., & Kao, K. N. (1970). High Frequency Haploid Production in Barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature*, 225(5235), 874–876. <https://doi.org/10.1038/225874a0>
- Keshvari, T., Najaphy, A., Kahrizi, D., & Zebarjadi, A. (2018). Callus induction and somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni as a medicinal plant. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 64(2), 46-49. <https://doi.org/10.14715/cmb/2018.64.2.9>
- Khalil, S. A., Zamir, R., & Ahmad, N. (2014). Selection of suitable propagation method for consistent plantlets production in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Saudi J Biol Sci*, 21(6), 566-573. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.02.005>
- Khandakar, R. K., Jie, Y. U., Mi-Kyoung, W. O. N., CHOI, H. G., Ha-Seung, P. A. R. K., Jong-Jin, C. H. O. I., ... & Yong-Jin, P. A. R. K. (2014). Regeneration of haploid plantlet through anther culture of Chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 42(2), 482-487.
- Kimber, G., & Riley, R. (1963). Haploid Angiosperms. *The Botanical Review*, 29(4), 480–531. <https://doi.org/10.1007/BF02860814>
- Kondo, H., Phlaetita, W., Mii, M., Kikuchi, S., Deguchi, A., & Miyoshi, K. (2020). Efficient chromosome doubling of an interspecific hybrid Dendrobium Stardust 'Fire Bird' by treatment of amiprofos-methyl to protocorm-like body. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56, 738-749.
- Krishna, H., Alizadeh, M., Singh, D., Singh, U., Chauhan, N., Eftekhari, M., & Sadh, R. K. (2016). Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*, 6(1), 54. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>
- Kumari, M., & Chandra, S. (2015). Stevioside glycosides from *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* and antimicrobial assay. *Brazilian Journal of Botany*, 38(4), 761-770. <https://doi.org/10.1007/s40415-015-0193-3>
- Kumar, K. R., Singh, K. P., Bhatia, R., Raju, D. V. S., & Panwar, S. (2019). Optimising protocol for successful development of haploids in marigold (*Tagetes spp.*) through *in vitro* androgenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 138(1), 11–28. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01598-3>
- Kumar, K. R., Singh, K. P., Raju, D. V. S., Bhatia, R., & Panwar, S. (2020). Maternal haploid induction in African marigold (*Tagetes erecta* L.) through *in vitro* culture of un-fertilized ovules. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 143(3), 549–564. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01940-0>

- Kunová, G., Rada, V., Vidaillac, A., & Lisova, I. (2014). Utilisation of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) by lactobacilli and bifidobacteria in *in vitro* conditions. *Folia Microbiologica*, 59(3), 251-255. <https://doi.org/10.1007/s12223-013-0291-1>
- Kurek, J. M., & Krejpcio, Z. (2019). The functional and health-promoting properties of *Stevia rebaudiana* Bertoni and its glycosides with special focus on the antidiabetic potential - A review. *Journal of Functional Foods*, 61. <https://doi.org/ARTN 103465 10.1016/j.jff.2019.103465>
- Libik-Konieczny, M., Capecka, E., Kałol, E., Dziurka, M., Grabowska-Joachimciak, A., Sliwinska, E., & Pistelli, L. (2018). Growth, development and steviol glycosides content in the relation to the photosynthetic activity of several *Stevia rebaudiana* Bertoni strains cultivated under temperate climate conditions. *Scientia horticultruae*, 234, 10-18.
- Lopez-Arellano, M., Dhir, S., Albino, N., Santiago, A., Morris, T., & Dhir, S. (2015). Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration from Protoplast Culture of *Stevia rebaudiana*. *British Biotechnology Journal*, 5(1), 1-12. <https://doi.org/10.9734/bbj/2015/13884>
- Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2018). An introduction to plant tissue culture: advances and perspectives. In *Plant Cell Culture Protocols* (4 ed., pp. 3-13).
- Luz, G. C., Strioto, D. K., Mangolin, C. A., & Machado, M. (2020). ISSR markers to assess genetic diversity of cultivated populations from artificial selection of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Breed Sci*, 70(4), 508-514. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.20014>
- Maheshwari, S. C., Tyagi, A. K., Malhotra, K., & Sopory, S. K. (1980). Induction of Haploidy from Pollen Grains in Angiosperms - the Current Status. *Theoretical and applied genetics*, 58(5), 193-206. <https://doi.org/Doi 10.1007/Bf00288437>
- Majumder, S., & Rahman, M. M. (2016). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. through direct and indirect organogenesis. *Journal of Innovations in Pharmaceutical and Biological Science*, 3, 47-56.
- Maluszynska, J. (2003). Cytogenetic tests for ploidy level analyses — chromosome counting. In: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. (eds) *Doubled Haploid Production in Crop Plants*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4_51
- Marciniak, K., Banaszak, Z., & Wędzony, M. (1998). Effect of genotype, medium and sugar on triticale ($\times$ Triticosecale Wittm.) anther culture response. *Cereal Research Communications*, 26(2), 145-151.
- Masani, M. Y., Noll, G. A., Parveez, G. K., Sambanthamurthi, R., & Prufer, D. (2014). Efficient transformation of oil palm protoplasts by PEG-mediated transfection and DNA microinjection. *PLoS One*, 9(5), e96831. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096831>

- Mathur, S., & Shekhawat, G. S. (2013). Establishment and characterization of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) cell suspension culture: an *in vitro* approach for production of stevioside. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(3), 931-939. <https://doi.org/10.1007/s11738-012-1136-2>
- Mazarej, M., Al-Ahmad, H., Rudis, M. R., & Stewart, C. N., Jr. (2008). Protoplast isolation and transient gene expression in switchgrass, *Panicum virgatum* L. *Biotechnol J*, 3(3), 354-359. <https://doi.org/10.1002/biot.200700189>
- Miladinova-Georgieva, K., Geneva, M., Stancheva, I., Petrova, M., Sichanova, M., & Kirova, E. (2022). Effects of Different Elicitors on Micropropagation, Biomass and Secondary Metabolite Production of *Stevia rebaudiana* Bertoni-A Review. *Plants (Basel)*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/plants12010153>
- Mitra, A., & Pal, A. (2007). *In vitro* regeneration of *Stevia rebaudiana* (Bert) from the nodal explant. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 16, 59-62.
- Morel, G. M. (1960). Producing virus-free Cymbidium. *Amer. Orchid Soc. Bull*, 29, 495-497.
- Murovec, J., & Bohanec, B. (2012). Plant Breeding. In I. Y. Abdurakhmonov (Ed.). <https://doi.org/10.5772/1389>
- Nagata, T., & Takebe, I. (1971). Plating of isolated tobacco mesophyll protoplasts on agar medium. *Planta*, 99(1).
- Nakas, D. B., Avcı, S., & Kaya, M. D. (2023). Response of Different Safflower Genotypes to Anther Culture. *Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tarım ve Doğa Dergisi*, 26(2), 293-298.
- Nanjareddy, K., Arthikala, M. K., Blanco, L., Arellano, E. S., & Lara, M. (2016). Protoplast isolation, transient transformation of leaf mesophyll protoplasts and improved Agrobacterium-mediated leaf disc infiltration of *Phaseolus vulgaris*: tools for rapid gene expression analysis. *BMC Biotechnol*, 16(1), 53. <https://doi.org/10.1186/s12896-016-0283-8>
- Narasimhulu, S. B., Kirti, P. B., Prakash, S., & Chopra, V. L. (1992). Resynthesis of Brassica-Carinata by Protoplast Fusion and Recovery of a Novel Cytoplasmic Hybrid. *Plant Cell Reports*, 11(8), 428-432. <Go to ISI>://WOS:A1992JJ82600012
- Niazian, M. (2019). Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants. *Planta*, 249(4), 953-973. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03099-1>
- Niazian, M., & Shariatpanahi, M. E. (2020). *In vitro*-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica*, 216(5). <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02609-7>
- Ochatt, S. J., & Seguí-Simarro, J. M. (2021). Analysis of Ploidy in Haploids and Doubled Haploids (pp. 105–125). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3_4
- Olas, B. (2022). *Stevia rebaudiana* Bertoni and its secondary metabolites: Their effects on cardiovascular risk factors. *Nutrition*, 99-100, 111655. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111655>

- Othman, H. S., Osman, M., & Zainuddin, Z. (2018). Genetic Variabilities of *Stevia rebaudiana* Bertoni Cultivated in Malaysia as Revealed by Morphological, Chemical and Molecular Characterisations. *Agrivita*, 40(2), 267-283. <https://doi.org/10.17503/agrivita.v40i2.1365>
- Pijut, P. M., Beasley, R. R., Lawson, S. S., Palla, K. J., Stevens, M. E., & Wang, Y. (2012). *In vitro* propagation of tropical hardwood tree species—a review (2001–2011). *Propag Ornament Plants*, 12(1), 25-51.
- Piosik, Ł., Zenkteler, E., & Zenkteler, M. (2016). Development of haploid embryos and plants of *Lactuca sativa* induced by distant pollination with *Helianthus annuus* and *H. tuberosus*. *Euphytica*, 208(3), 439–451. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1578-x>
- Puri, M., Sharma, D., & Tiwari, A. K. (2011). Downstream processing of stevioside and its potential applications. *Biotechnol Adv*, 29(6), 781-791. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.06.006>
- Quack, F. (1977). *Meristem culture and virus free plants*.
- R Abdelsalam, N., SM Haraz, A., Khalid, A. E., SH Saleh, M., & EA Elsheikh, A. (2016). Genetic improvement through selection of different *Stevia rebaudiana* genotypes. *Alexandria Science Exchange Journal*, 37, 10-25.
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P., & Dhawan, A. K. (2011). Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection—An overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71(1), 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.10.021>
- Rajan, R. P., & Singh, G. (2021). A review on application of somaclonal variation in important horticulture crops. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, 22, 161-175.
- Rameshsing, C. N., Hegde, S. N., & Vasundhara, M. (2015). Enhancement of steviol glycosides in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) through induction of polyploidy. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9(2), 141-146.
- Ramírez-Mosqueda, M. A., Iglesias-Andreu, L. G., Ramírez-Madero, G., & Hernández-Rincón, E. U. (2016). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bert. in temporary immersion systems and evaluation of genetic fidelity. *South African Journal of Botany*, 106, 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.07.015>
- Rezvankeh, M., Askari, H., Tohidfar, M., & Rezadoost, H. (2022). Economic micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and evaluation of *in vitro* cultures in order to improve steviol glycosides. *Scientia Horticulturae*, 305(111372).
- Riley, R. (1974). The status of haploid research. In K. J. Kasha (Ed.), *Haploids in higher plants. Advances and potential. I. Introduction and scope* (pp. 1–9). Guelph University.
- Rokosa, M. T., & Kulpa, D. (2020). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* plants. *Ciência Rural*, 50(1). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20181029>

- Rolnik, A., & Olas, B. (2021). The Plants of the Asteraceae Family as Agents in the Protection of Human Health. *Int J Mol Sci*, 22(6). <https://doi.org/10.3390/ijms22063009>
- Saji, K. V., & Sujatha, M. (1998). Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica*, 103, 1-7.
- Saensee, K., Machikowa, T., Kaya, Y., & Muangsan, N. (2018). Relationship between floret size and anther culture response in an ornamental sunflower. *Asia-Pac. J. Sci. Technol.*, 23, 1-9.
- Seyis, F., Yurteri, E., & Özcan, A. (2017). *In vitro* Multiplication of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Genotypes Using Different Explants. *International Journal of Crop Science and Technology*, 3(2), 36-41. <https://doi.org/10.26558/ijcst.326792>
- Segui-Simarro, J. M., Moreno, J. B., Fernández, M. G., & Mir, R. (2021). Doubled haploid technology. *Methods in Molecular Biology*, 2287, 50.
- Sharma, N., Kaur, R., & Era, V. (2016). Potential of RAPD and ISSR markers for assessing genetic diversity among *Stevia rebaudiana* Bertoni accessions. *Indian Journal of Biotechnology*, 15(1), 95-100. <Go to ISI>://WOS:000381839000013
- Shen, Y., Meng, D., McGrouther, K., Zhang, J., & Cheng, L. (2017). Efficient isolation of Magnolia protoplasts and the application to subcellular localization of MdeHSF1. *Plant Methods*, 13, 44. <https://doi.org/10.1186/s13007-017-0193-3>
- Sikdar, S. R., Chatterjee, G., Das, S., & Sen, S. K. (1990). "Erussica", the intergeneric fertile somatic hybrid developed through protoplast fusion between *Eruca sativa* Lam. and *Brassica juncea* (L.) Czern. *Theoretical and applied genetics*, 79, 561-567.
- Singh, S. D., & Rao, G. P. (2005). Stevia: The herbal sugar of 21st century. *Sugar Tech.*
- Smith, M. K., & Drew, R. A. (1990). Current Applications of Tissue-Culture in Plant-Propagation and Improvement. *Australian Journal of Plant Physiology*, 17(3), 267-289. <https://doi.org/Doi 10.1071/Pp9900267>
- Smith, R. H., & Murashige, T. (1970). *In vitro* development of the isolated shoot apical meristem of angiosperms. *American Journal of Botany*, 57(5), 562-568.
- Soliman, H. I. A., Metwali, E. M. R., & Almaghrabi, O. A.-H. (2014). Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni and assessment of genetic stability of *in vitro* regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Plant Biotechnology*, 31(3), 249-256. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.14.0707a>
- Soriano, L., Mourao, F. D. A., Camargo, L. E. A., Cristofani-Yaly, M., Latado, R. R., Pacheco, C. D., de Azevedo, F. A., & Mendes, B. M. J. (2012). Regeneration and characterization of somatic hybrids combining sweet orange and mandarin/mandarin hybrid cultivars for citrus scion improvement. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 111(3), 385-392. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0204-z>

- Subositi, D., Rina Sri, K., & Budi, S. D. (2011). Genetic diversity of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni based on molecular characters. . *Bioscience and Biotechnology (ICBB)*, 2011, 2037.
- Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H., & Tabata, M. (1984). Clonal propagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni by stem-tip culture. *Plant Cell Report*.
- Tavarini, S., Passera, B., & Angelini, L. G. (2019). Crop and Steviol Glycoside Improvement in *Stevia* by Breeding. *Steviol Glycosides: Cultivation, Processing, Analysis and Applications in Food*, 7, 1-31. https://doi.org/Book_Doi 10.1039/9781788010559
- Thakur, K., Ashrita, Sood, A., Kumar, P., Kumar, D., & Warghat, A. R. (2021). Steviol glycoside accumulation and expression profiling of biosynthetic pathway genes in elicited *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* *in vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 57(2), 214-224. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10151-3>
- Theiler-Hedtrich, R., & Hunter, C. S. (1995). Regeneration of dihaploid chicory (*Cichorium intybus* L. var. *foliosum* Hegi) via microspore culture. *Plant Breeding*, 114(1), 18–23. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.1995.tb00752.x>
- Thiyagarajan, M., & Venkatachalam, P. (2015). Assessment of genetic and biochemical diversity of *Stevia rebaudiana* Bertoni by DNA fingerprinting and HPLC analysis. *Annals of Phytomedicine-an International Journal*, 4(1), 79-85. <Go to ISI>://WOS:000219218600010
- Todorova, M., Ivanov, P., Shindrova, P., Christov, M., & Ivanova, I. (1997). Doubled haploid production of sunflower (*Helianthus annuus* L.) through irradiated pollen-induced parthenogenesis. *Euphytica*, 97(3), 249–254. <https://doi.org/10.1023/A:1002966824988>
- Toriyama, K., Hinata, K., & Kameya, T. (1987). Production of Somatic Hybrid Plants, *Brassicomoricaandia*, through Protoplast Fusion between *Moricandia arvensis* and *Brassica oleracea*. *Plant Science*, 48(2), 123-128. <https://doi.org/Doi> 10.1016/0168-9452(87)90139-7
- Uskutoglu, T., Uskutoglu, D., & Turgut, K. (2019). Effects on Pre-treatment and Different Tissue Culture Media for Androgenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Sugar Tech*, 21(6), 1016-1023. <https://doi.org/10.1007/s12355-019-00722-z>
- Vives, K., Andújar, I., Lorenzo, J. C., Concepción, O., Hernández, M., & Escalona, M. (2017). Comparison of different *in vitro* micropropagation methods of *Stevia rebaudiana* B. including temporary immersion bioreactor (BIT®). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 131(1), 195-199. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1258-8>
- Wang, J., Jiang, J. J., & Wang, Y. P. (2013). Protoplast fusion for crop improvement and breeding in China. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 112(2), Cp4-142. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0221-y>
- Wang, H., Dong, B., Jiang, J., Fang, W., Guan, Z., Liao, Y., ... & Chen, F. (2014). Characterization of *in vitro* haploid and doubled haploid *Chrysanthemum*

- morifolium* plants via unfertilized ovule culture for phenotypical traits and DNA methylation pattern. *Frontiers in plant science*, 5, 738.
- Warchol, M., Czaczylo-Mysza, I., Marcinska, I., Dziurka, K., Noga, A., Kaploniak, K., Pilipowicz, M., & Skrzypek, E. (2019). Factors inducing regeneration response in oat (*Avena sativa* L.) anther culture. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(5), 595-604. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09987-1>
- Wenzel, G., Foroughi-Wehr, B. (1993). *In vitro* selection. In: Hayward, M.D., Bosemark, N.O., Romagosa, I., Cerezo, M. (eds) Plant Breeding. Plant Breeding Series. Springer, Dordrecht. https://doi.org/doi.org/10.1007/978-94-011-1524-7_22
- Xuan, L. T., & Menczel, L. (1980). Improved protoplast culture and plant regeneration from protoplast-derived callus in *Arabidopsis thaliana*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 96(1), 77-80. [https://doi.org/10.1016/s0044-328x\(80\)80102-4](https://doi.org/10.1016/s0044-328x(80)80102-4)
- Yadav, A. K., Singh, S., Dhyani, D., & Ahuja, P. S. (2011). A review on the improvement of stevia [*Stevia rebaudiana*(Bertoni)]. *Canadian journal of plant Science*, 91(1), 1-27. <https://doi.org/10.4141/cjps10086>
- Yang, Y. W., Hsing, Y. I., & Chang, W., C. (1981). Clonal propagation of *Stevia Rebaudiana* Bertoni through axillary shoot proliferation *in vitro*. *Bot. Bull. Academia Sinica*, 22, 57-62.
- Yesmin, S. (2019). *In vitro* Micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 29(2), 277-284. <https://doi.org/10.3329/ptcb.v29i2.44516>
- Yuan, S. X., Liu, Y. M., Fang, Z. Y., Yang, L. M., Zhuang, M., Zhang, Y. Y., & Sun, P. T. (2009). Study on the relationship between the ploidy level of microspore-derived plants and the number of chloroplast in stomatal guard cells in *Brassica oleracea*. *Agricultural Sciences in China*, 8(8), 939-946.
- Yücesan, B., Büyükgöçmen, R., Mohammed, A., Sameeullah, M., Altuğ, C., Gürel, S., & Gürel, E. (2016). An efficient regeneration system and steviol glycoside analysis of *Stevia rebaudiana* Bertoni, a source of natural high-intensity sweetener. *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 52(3), 330-337. <https://doi.org/10.1007/s11627-016-9765-6>
- Zhang, X., Wang, L., He, C., & Luo, H. (2016). An efficient transient mesophyll protoplast system for investigation of the innate immunity responses in the rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 126(2), 281-290. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0997-2>
- Zhao, F. L., Li, Y. J., Hu, Y., Gao, Y. R., Zang, X. W., Ding, Q., Wang, Y. J., & Wen, Y. Q. (2016). A highly efficient grapevine mesophyll protoplast system for transient gene expression and the study of disease resistance proteins. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 125(1), 43-57. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0928-7>

ÖZGEÇMİŞ

Nawab NASIR

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora	Akdeniz Üniversitesi
2019-2024	Fen Bilimleri Enstitüsü, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı Antalya
Yüksek Lisans	Ibaraki Üniversitesi
2013-2016	Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ibaraki, Japonya
Lisans	Kandahar Üniversitesi
2007-2011	Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kandahar, Afganistan

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Öğretim Görevlisi	Afghanistan National Agriculture Science and Technology University (ANASTU)
2011-Devam Ediyor	Bahçe Bitkileri Bölümü, Kandahar, Afganistan

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

- 1- Nasir, N., & Sato, T. (2023). Effect of Nutrient Solution Concentration on Growth, Yield, and Fruit Quality of Tomato Grown Hydroponically in Single-Truss Production System. *Journal of Horticultural Research*, 31(2), 127-144.
- 2- A case study of tomato cultivation and marketing in Nangarhar, Afghanistan (Abstract) Tokoshima, Japan in 27/09/2015