

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Stevia rebaudiana* Bertoni BİTKİSİNDE YÜKSEK REBAUDİOSİD A VE
STEVİOSİD DİTERPEN GLİKOZİTLERİNİ İÇEREN GENOTİPLERİN
SELEKSİYON YOLUYLA ISLAHI**

Begüm KAPLAN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

ŞUBAT 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



***Stevia rebaudiana* Bertoni BİTKİSİNDE YÜKSEK REBAUDİOSİD A VE
STEVİOSİD DİTERPEN GLİKOZİTLERİNİ İÇEREN GENOTİPLERİN
SELEKSİYON YOLUYLA ISLAHI**

Begüm KAPLAN

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

ŞUBAT 2018

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Stevia rebaudiana* Bertoni BİTKİSİNDE YÜKSEK REBAUDİOSİD A VE
STEVİOSİD DİTERPEN GLİKOZİTLERİNİ İÇEREN GENOTİPLERİN
SELEKSİYON YOLUYLA ISLAHI**

Begüm KAPLAN
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ

**Bu tez çalışmasıTÜBİTAK tarafından 0862.STZ.2015 proje koduyla SAN-TEZ
projesi olarak yürütülmüştür.**

ŞUBAT 2018

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***Stevia rebaudiana* Bertoni BİTKİSİNDE YÜKSEK REBAUDİOSİD A VE
STEVIOSİD DİTERPEN GLİKOZİTLERİNİ İÇEREN GENOTİPLERİN
SELEKSİYON YOLUYLA ISLAHI**

**Begüm KAPLAN
TARLA BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

Bu tez 01/12/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

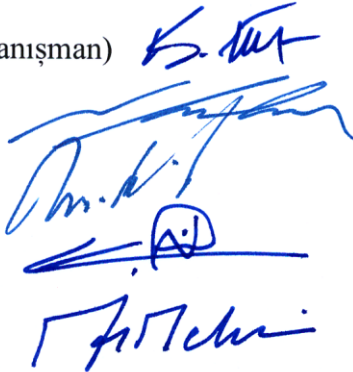
Prof. Dr. Kenan TURGUT (Danışman)

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Prof. Dr. Mehmet BİLGİN

Prof. Dr. Emine BAYRAM

Prof. Dr. İsa TELCİ



ÖZET

***Stevia rebaudiana* Bertoni BİTKİSİNDE YÜKSEK REBAUDİOSİD A VE STEVİOSİD DİTERPEN GLİKOZİTLERİNİ İÇEREN GENOTİPLERİN SELEKSİYON YOLUYLA ISLAHI**

Begüm KAPLAN

Doktora Tezi, Tarla Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Şubat 2018, 122 sayfa

Antalya koşullarında 2014, 2015 ve 2016 yıllarında yürütülen bu çalışmada *Stevia rebaudiana* Bertoni’de rebaudiosid A ve steviosid miktarı ile rebaudiosid A / steviosid oranı yüksek olan genotiplerin seçilerek klon seleksiyon yöntemiyle, üstün özellikte çeşit adaylarının ortaya çıkartılması amaçlanmıştır. Birinci yıl 200 genotip ile başlanılan çalışmada, elde edilen veriler doğrultusunda ikinci yıl seçilen 40 genotipten alınan çelikler sıralarda yetiştirilmiş (A klonları), üçüncü yıl A klonlarından seçilen 10 genotipten (B klonları) alınan çelikler üç tekerrürlü olarak tesadüf blokları deneme desenine göre sıralarda yetiştirilmiştir. Verilerin değerlendirilmesi sonucu seleksiyon kriterlerine uygun olan, üstün özellikteki dört bitki seçilmiştir (C klonları). Dikimler 60 cm sıra arası 40 cm sıra üzeri mesafede yapılmıştır.

Elde edilen verilere göre; 200 genotipten seçilerek gelen 4 genotip değerlendirilen özellikler bakımından öne çıkmıştır. 82 numaralı genotip içerdiği rebaudiosid A miktarı bakımından üstün özellikli bir çeşit adayı olarak görülmüştür. 109 numaralı genotip yalnız steviosid içermesi bakımından dikkat çekici olmuştur. 133 numaralı genotip sadece diterpen glikozitlerin miktarının yüksekliği değil aynı zamanda çalışma boyunca agronomik özelliklerinin de ortalamanın üzerinde olması nedeniyle üretilip işlenmeye uygun bir endüstriyel materyal olarak görülmüştür. 196 numaralının genotip steviosid ve rebaudiosid A miktarı bakımından yüksek olması nedeniyle çeşit adayı olarak seçilmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Islah, Rebaudiosid A, *Stevia rebaudiana*, Steviosid

JÜRİ: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Prof. Dr. Mehmet BİLGEN

Prof. Dr. Emine BAYRAM

Prof. Dr. İsa TELCİ

ABSTRACT

SELECTIVE BREEDING OF GENOTYPES WITH HIGH CONTENT OF REBAUDIOSIDE A AND STEVIOSIDE DITERPPENE GLYCOSIDES IN *Stevia rebaudiana* Bertoni

Begüm KAPLAN

PhD Thesis in Field Crops

Supervisor: Prof. Dr. Kenan TURGUT

February 2018, 122 pages

This study, conducted in Antalya, Turkey in 2014-2016, aimed to determine the genotypes with a high rebaudioside A/stevioside ratio and a high amount of rebaudioside A and stevioside in *Stevia rebaudiana* Bertoni and to reveal superior candidate varieties by the clone selection method. The study started with 200 genotypes in the first year, then the stem cuttings from 40 genotypes selected in the second year accordance with the obtained data were grown in row (A clones) and the 10 genotypes (B clones) selected from the clones in the third year were grown in three replicated according to the completely randomized block design. Four plants with superior characteristics were selected (C clones) in accordance with the criteria for the evaluation of the results. Row and intrarow spacing were 60 cm X 40 cm with all the clones per plot.

Genotype 82 was regarded as a candidate with superior characteristics in terms of the amount of rebaudioside content. Genotype 109 was noteworthy for stevioside alone. Genotype number 133 was considered as not only high in the amount of diterpene glycosides but also as an industrial material suitable for processing and production due to the fact that the agronomic properties were above average during the study. As number 196 was determined to be high in terms of the amount of genotype stevioside and rebaudioside, it was selected as a variety candidate.

KEYWORDS: Breeding, Rebaudioside A, *Stevia rebaudiana*, Stevioside,

COMMITTEE: Prof. Dr. Kenan TURGUT

Prof. Dr. Mustafa KARHAN

Prof. Dr. Mehmet BİLGEN

Prof. Dr. Emine BAYRAM

Prof. Dr. İsa TELCİ

ÖNSÖZ

Tıbbi ve aromatik bitkilere ilginin her geçen gün arttığı günümüzde, sentetik ilaçlara alternatif olabilecek bitkiler önem kazanmıştır. Modern çağın hastalıklarından diyabet ve obezite ile mücadelede kalorisiz düşük tatlandırıcılar kullanılmaktadır. Asteraceae familyasından çok yıllık bir bitki olan *Stevia rebaudiana* Bertoni yapay tatlandırıcıların olumsuz etkilerine karşı tercih edilen doğal tatlandırıcılar için iyi bir kaynaktır. İçerdiği diterpen glikozitler sayesinde sindirimde insülin salgılanmasına neden olmaz ve kalori içermez. Yapraklarında bulunan steviosid ve rebaudiosid A glikozitleri sayesinde sahip olduğu doğal tatlılık şekere kıyasla göreceli olarak 200-300 kattır.

Antalya koşullarında yürütülen adaptasyon çalışmaları *Stevia rebaudiana* Bertoni'nin çok yıllık olarak rahatlıkla tarımının yapılabileceğini göstermiştir. Ancak, üretimdeki en önemli sorunlardan birisi, Akdeniz iklimi koşullarına adapte olmuş yüksek kalitede steviol glikozit içeren çeşitlerin bulunmamasıdır. Özellikle, tatlandırıcı kalitesi bakımından çok önemli olan rebaudiosid A miktarı ve rebaudiosid A / steviosid oranı yüksek olan çeşit veya çeşitlerin geliştirilmesi önemlidir. Ayrıca, ekstraksiyon firmaları, hem randımanın yüksek olması ve hem de saflaştırma maliyetinin düşürülmesine önemli katkı sağlayacak olan yüksek kalitede yeni çeşitlerin geliştirilmesini talep etmektedir. *Stevia* tarımında diğer önemli bir sorun da, sürdürülebilir bir vejetatif çoğaltma yönteminin bulunmaması nedeniyle tohumla üretimin yaygın olarak kullanılmasıdır. Tohumla üretimde ise genetik açılmalar nedeniyle homojenlik kaybolmakta ve kalite düşmektedir. Yabancı döllendiği ve kendine uyumsuzluk gösterdiği için *stevia* populasyonlarında genetik çeşitliliğin çok yüksek olduğu gözlenmektedir.

Bu tez çalışmasında açık tozlanan *stevia* bitkilerinden, genetik açılmaları önlemek amacıyla sürdürülebilir bir vejetatif çoğaltım yöntemiyle ve seleksiyon ıslahı yoluyla, steviosid, rebaudiosid A miktarı ile rebaudiosid A / steviosid oranı yüksek olan, üstün özellikteki çeşit adayları tespit edilmiştir.

Çalışmalarım boyunca bilgi ve desteği ile beni bu çalışmaya yönlendiren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Kenan TURGUT'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Tez İzleme Komitesi'nde yer alarak bana destek olan Sayın Prof. Dr. Mustafa KARHAN ve Sayın Prof. Dr. Mehmet BİLGİN'e teşekkürlerimi sunarım. Tezimin analizleri sırasında göstermiş olduğu her türlü yardım ve katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Cengiz TOKER'e ve Dr. Asuman GÖNCÜ SÜRÜ' ye teşekkürlerimi sunuyorum. Tezimin arazi çalışmaları sırasında benden yardımını esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Yaşar ÖZYİĞİT'e çok teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında göstermiş oldukları ilgi, yardım ve desteklerinden dolayı arkadaşlarım Recep BALKIÇ'a, Araştırma Görevlisi Gülçin Ece ASLAN'a ve Araştırma Görevlisi Cihan KARACA'ya çok teşekkür ederim. San-Tez projesi olarak yürüttüğüm doktora tezimde proje ortağı olarak verdikleri destekten dolayı Gow Fide Üretim ve Ticaret A.Ş.'ye teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca benden inancını ve desteğini esirgemeyen, bu süreci benimle beraber yaşayarak maddi ve manevi yanımda olan sevgili anneme, sevgili babama, canım kardeşime ve sevgili eşime sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
AKADEMİK BEYAN	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER.....	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	5
2.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni’ nin Kökeni ve Tarihçesi	5
2.1.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni’ nin sınıflandırılması.....	7
2.1.2. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni’ nin botanik özellikleri.....	8
2.1.3. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni’ nin etnobotaniği ve farmakolojik özellikleri	10
2.1.4. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni’ nin ekolojik istekleri.....	11
2.2. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni’ nin Kimyasal Bileşimi ve Özellikleri.....	12
2.2.1. Steviol glikozitler.....	13
2.2.2. Stevianın farklı kısımlarındaki steviol glikozit içeriği	17
2.2.3. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni’ nin biyolojik aktivitesi.....	18
2.3. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni’ de Islah Yaklaşımları	19
2.4. <i>Stevia rebaudiana</i> ’ nın Tatlandırıcı Özelliğinin Geliştirilmesi Çalışmaları.....	26
3. MATERYAL VE METOT	28
3.1. Materyal.....	28
3.2. Deneme Alanı.....	28
3.3. İklim Verileri	29
3.4. Metot	31
3.4.1. Deneme deseni.....	31
3.4.2. Varyasyon kaynağı	32
3.4.3. Arazi çalışmaları ve agronomik ölçümler.....	33

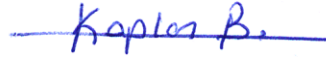
3.4.3.1. Denemenin birinci yılında yapılan çalışmalar.....	33
3.4.3.2. Denemenin ikinci yılında yapılan çalışmalar.....	34
3.4.3.2.1. A klonlarının seleksiyonu.....	34
3.4.3.2.2. Varyasyon kaynağından alınan çeliklerden fide elde edilmesi ve fidelerin araziye aktarılması	34
3.4.3.2.3. A klonlarında uygulanan kültürel işlemler	35
3.4.3.2.4. Hasat öncesi yapılan çalışmalar ve hasat.....	36
3.2.3.3. Denemenin üçüncü yılında yapılan çalışmalar	37
3.2.3.3.1. B klonlarının seleksiyonu.....	37
3.2.3.3.2. A klonlarından fide elde edilmesi ve araziye aktarılması	37
3.2.3.3.3. B klonlarında uygulanan kültürel işlemler	38
3.2.3.3.4. Hasat öncesi yapılan çalışmalar ve hasat.....	38
3.4.4. Analiz metodları ve <i>In vitro</i> çoğaltım çalışmaları	38
3.4.4.1. Hasat sonrasında yapılan çalışmalar	38
3.4.4.2. Bitkisel materyalin ekstraksiyonu	39
3.4.4.3. Bitkisel materyalin kromatografik analizi	40
3.4.4.4. Klorofil a ve klorofil b yoğunluğu	42
3.4.4.5. Toplam fenolik madde (TFM) tayini	42
3.4.4.6. Toplam antioksidan aktivite tayini.....	43
3.4.4.7. Temel besi ortamlarının hazırlanması.....	44
3.4.4.7.1. Birinci alt kültüre alma.....	44
3.4.4.7.2. İkinci alt kültüre alma.....	44
3.4.4.7.3. Üçüncü alt kültüre alma	45
3.4.4.7.4. Köklendirme	45
3.4.4.7.5. Bitkilerin alıştırma odasına alınması	45
3.2.2. Verilerin değerlendirilmesi	46
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	47
4.1. Varyasyon Kaynağı'na Ait Bulgular	47
4.1.1. Bitki boyu ve klorofil yoğunluğu	47
4.1.2. Yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı	49
4.1.3. Yeşil herba, yeşil yaprak ve yeşil sap miktarı	52

4.1.4. Steviosid ve rebaudiosid A	57
4.1.5. Varyasyon kaynağına ait verilerin değerlendirilmesi	64
4.2. A Klonlarına Ait Bulgular	68
4.2.1. A klonlarının seleksiyonu	68
4.2.2. Bitki boyu ve klorofil yoğunluğu	69
4.2.3. Yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı	70
4.2.4. Yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap ve kuru yaprak miktarı	71
4.2.5. Steviosid ve rebaudiosid A	73
4.2.6. Toplam fenolik madde	74
4.2.7. A klonlarına ait verilerin değerlendirilmesi.....	75
4.3. B Klonlarına Ait Bulgular	78
4.3.1. B klonlarının seleksiyonu	78
4.3.1. Bitki boyu ve klorofil yoğunluğu	79
4.3.2. Yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı	80
4.3.3. Yeşil herba. yeşil yaprak. yeşil sap ve kuru yaprak miktarı	81
4.3.4. Steviosid ve rebaudiosid A	82
4.3.5. Toplam fenolik madde	83
4.3.6. Toplam antioksidan aktivite.....	84
4.3.7. B klonlarına ait verilerin değerlendirilmesi	85
4.5. B Klonlarına Ait Özelliklerin Korelasyon Analizi.....	91
4.6. C klonlarının seleksiyonu	95
4.5. <i>In vitro</i> Çoğaltım Bulgular	96
4.5.1. Kültüre Alma	96
4.5.2. Alt Kültüre Alma	101
4.5.3. Alt kültüre alma	101
4.5.4. Köklendirme ve bitkilerin alıştırma odasına alınması	101
5.SONUÇ	103
6. KAYNAKLAR	105
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Doktora Tezi olarak sunduğum ''*Stevia Rebaudiana* Bertoni Bitkisinde Yüksek Rebaudiosid A ve Steviosid Diterpen Glikozitlerini İçeren Genotiplerin Seleksiyon Yoluyla Islahı'' adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak bulunduğunu belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

20/02/2018



Begüm KAPLAN

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

C	Karbon
Ca	Kalsiyum
CaCO ₃	Kalsiyumkarbonat
CaO	Kalsiyumoksit
Ca(NO ₃) ₂	Kalsiyumnitrat
CO ₂	Karbondioksit
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
H	Hidrojen
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
K	Potasyum
K ₂ O	Potasyumoksit
KNO ₃	Potasyumnitrat
kg	Kilogram
MgO	Magnezyumoksit
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mm ²	Milimetrekare
mM	Milimolar
Mg	Magnezyum
N	Azot

Na ₂ CO ₃	Sodyumkarbonat
nm	Nanometre
O	Oksijen
P	Fosfor
P ₂ O ₅	Difosforpentaoksit
r	Korelasyon Katsayısı
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
°C	Santigrat derece
β	Beta

Kısaltmalar

BAP	Benzil amino pürin
CDP	Kopalil difosfat
CGTase	Siklomaltodekstrin-glikonotransferaz
DAD	Diyot dizi dedektörü
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DXP	1-deoksi-D-ksiluloz 5-fosfat
DMADP	Dimentilalil difosfatın
EST	İfade edilmiş dizi etiketleri
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GA3	Giberellik asit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)
IAA	İndol asetik asit
IBA	İndol bütirik asit

IDP	İzopentenil difosfatın
KN	Kinetin
MS	Murashige ve skoog
NAA	Naftalen asetik asit
TEAK	Troloks eşdeğeri
2,4-D	2,4-Dikloro fenoksi asetik asit



ŞEKİLLER

Şekil 2.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni' ye ait yaprak yapısı	9
Şekil 2.2. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni' ye ait çiçek yapısı	9
Şekil 2.3. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni' ye ait tohum yapısı	10
Şekil 2.4. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni yaprağında bulunan ana bileşik steviosidin kimyasal omurgası ve diğer ilişkili bazı bileşikler (Ahmed vd. 2011)	14
Şekil 3.1. Deneme alanının genel görünümü	28
Şekil 3.2. 2014-2015-2016 yılları ortalama yağış miktarı (mm)	30
Şekil 3.3. 2014-2015-2016 yılları ortalama nem miktarı (%).....	31
Şekil 3.4. Vejetatif üreyebilen yabancı döllen bitkilerde ana hat seleksiyon ıslahı şeması.....	32
Şekil 3.5. Varyasyon kaynağı olarak kullanılan <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni popülasyonu	33
Şekil 3.6. Denemenin birinci yılında arazide yürütülen çalışmalar	33
Şekil 3.7. Denemenin ikinci yılında arazide yürütülen çalışmalar	36
Şekil 3.8. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni yapraklarının ekstraksiyon şeması.....	39
Şekil. 3.9. Standart çözeltilere ait eğimler	41
Şekil 3.10. Denemenin üçüncü. yılına ait arazi ve laboratuvar çalışmaları.....	42
Şekil 3.11. Gallik asit standart çözeltileri ile elde edilmiş eğim.....	43
Şekil 3.12. Farklı konsantrasyonlarda trolox standartlarıyla elde edilen eğim.....	44
Şekil 3.13. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni' de <i>in vitro</i> çoğaltım çalışmaları.....	45
Şekil 4.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni' ye ait örnek kromatogram	63
Şekil 4.2. Reb A ve yaprak kalınlığı (mm) arasındaki dağılım grafiği.....	66
Şekil 4.3. Reb A ve klorofil arasındaki dağılım grafiği.....	67
Şekil 4.4. Seçilmiş C klonlarının steviol glikozit dağılımı a) 82 numaralı klon b)196 numaralı klon c) 133 numaralı klon d)109 numaralı klon	95
Şekil 4.5. En iyi gelişim gösteren 3 ortam a) MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin içeren 11 numaralı (gelrite) ve 31 numaralı (agar) b) MS+0.10 NAA+1.0 BAP içeren 16 numaralı (gelrite) ve 36 numaralı (agar) c) 15 numaralı (gelrite) ve 35 numaralı (agar) MS+0.25 Kinetin	101
Şekil 4.6. Doku kültürü ortamında köklenen sürgünler	102

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. <i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni'nin sınıflandırılması	8
Çizelge 2.2. Steviol glikozitlerle ilgili bileşiklerin yapısal türevleri	16
Çizelge 3.1. Deneme Alanının Toprak Özellikleri	29
Çizelge 3.2. 2014-2015-2016 yıllarına ait iklim verileri	30
Çizelge 3.3. A klonlarının çelik ve fide sayıları	34
Çizelge 3.4. B klonlarının çelik ve fide sayıları	37
Çizelge 3.5. Mikro-çoğaltımda kullanılan deneme deseni.....	45
Çizelge 4.1. Denemenin birinci yılında ölçülmüş olan bitki boyu ve klorofil yoğunluğu.....	47
Çizelge 4.2. Denemenin birinci yılında yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı	50
Çizelge 4.3. Denemenin birinci yılında yeşil herba, yeşil yaprak ve yeşil sap miktarı.....	53
Çizelge 4.4. Denemenin birinci yılına ait steviosid, rebaudiosid A, steviosid+rebaudiosid A miktarı ve reb A / steviosid oranı	58
Çizelge 4.5. Varyasyon kaynağında bazı karakterlere ait korelasyon değerleri	67
Çizelge 4.6. A klonlarının seleksiyon kriterleri	68
Çizelge 4.7. A klonlarında bitki boyu ve klorofil yoğunluğu	70
Çizelge 4.8. A klonlarında yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı	71
Çizelge 4.9. A klonlarında yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap, kuru yaprak, yaprak/sap miktarı	72
Çizelge 4.10. A klonlarında steviosid, rebaudiosid A, steviosid+rebaudiosid A miktarı ve reb A / steviosid oranı	73
Çizelge 4.11. A klonlarında toplam fenolik madde (mg/L) miktarları	74
Çizelge 4.12. 4 numaralı klonal hatta ait değişim.....	76
Çizelge 4.13. 14 numaralı klonal hatta ait değişim.....	76
Çizelge 4.14. 109 numaralı klonal hatta ait değişim.....	77
Çizelge 4.15. 159 numaralı klonal hatta ait değişim.....	77
Çizelge 4.16. B klonları için seleksiyon kriterleri	79
Çizelge 4.17. B klonlarında bitki boyu ve klorofil yoğunluğu	79
Çizelge 4.18. B klonlarının klorofil a ve klorofil b yoğunluğu	80
Çizelge 4.19. B klonlarında yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı	81
Çizelge 4.20. B klonlarında 3 tekerrürde yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap, kuru yaprak, yaprak/sap miktarı	81
Çizelge 4.21. B klonlarında steviosid, rebaudiosid A, steviosid+rebaudiosid A miktarı ve reb A / steviosid oranı	83

Çizelge 4.22. B klonlarında toplam fenolik madde (mg/L) miktarları	84
Çizelge 4.23. B klonlarında toplam antioksidan madde (mg/L TEAK) miktarları	84
Çizelge 4.24. B klonlarında toplam fenolik madde ve antioksidan madde miktarlarının değerlendirilmesi	85
Çizelge 4.25. Seçilen 10 genotipe ait reb A (%). steviosid (%). reb A/ stv ve reb A + stv miktarları	87
Çizelge 4.26. B klonlarına ait morfolojik özelliklere ilişkin varyans analiz sonuçları...	89
Çizelge 4.27. B klonlarına ait morfolojik özelliklere ilişkin veriler	89
Çizelge 4.28. B klonlarına ait agronomik özelliklere ilişkin varyans analiz sonuçları...	90
Çizelge 4.29. B klonlarına ait agronomik özelliklere ilişkin veriler.....	90
Çizelge 4.30. B klonlarına ait steviol glikozit içeriklerine ilişkin varyans analiz sonuçları	91
Çizelge 4.31. B klonlarına ait steviol glikozit içeriklerine ilişkin veriler	91
Çizelge 4.32. B Klonlarına ait özelliklerin korelasyon analizi	94
Çizelge 4.33. Gelrite (%3) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki sürgün sayısı (adet). sürgün uzunluğu (cm). çoğaltım katsayısı ve gözlemler	96
Çizelge 4.34. Gelrite (%3) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki özelliklere ilişkin varyans analiz sonuçları	97
Çizelge 4.35. Gelrite (%3) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), çoğaltma katsayısı ve gözlemlerin değerlendirilmesi.....	98
Çizelge 4.36. Agar (%0.7) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki sürgün sayısı (adet). sürgün uzunluğu (cm). çoğaltma katsayısı ve gözlemler.....	98
Çizelge 4.37. Mikroçoğaltımda sürgün oluşumuna ilişkin varyans analiz sonuçları	99
Çizelge 4.38. Agar içeren ortamlarda mikroçoğaltımda sürgün oluşumuna ilişkin verilerin değerlendirilmesi	100

1. GİRİŞ

Günümüzde sağlıklı bir yaşam sürdürmek ve hastalıklarla mücadelede tıbbi ve aromatik bitkiler hızla önem kazanmaktadır. Modern çağın hastalığı olarak tanımlanan obezitenin, giderek artmasına bağlı olarak ülkelerin obeziteyi önlemeye yönelik çalışmalarında da artış gözlenmektedir. Pek çok ülkede ulusal gıda programları sağlık için, dengeli beslenme, egzersiz, şeker ilaveli gıdaların tüketiminin azaltılması yönünde önerilerde bulunmaktadır. Tüketicilerde beslenme bilincinin artmasıyla beraber beslenme alışkanlıklarında doğala yönelik alternatif arayışlar karşımıza çıkmaktadır. Obezite ve diyabetin Türkiye’de de önemli sağlık sorunlarının başında geldiği ve ulusal sağlık giderlerinin yükselmesinin nedenlerinden olduğu düşünülürse bu durum için alternatif bitkiler ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinin önemli olduğu görülmektedir. Diyabet ve obezite vakalarındaki artış birçok ülkede yaygın bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir. İnsanlar şekerli ve kalorisi düşük olan gıdalara yönelmekte, doğal tatlandırıcılara olan ilgi her geçen gün daha fazla artmaktadır. Bu nedenle şekerin insan vücudu üzerindeki olumsuz etkilerinin azaltılması için, doğal kaynaklardan tatlandırıcı eldesine yönelik çalışmalar hız kazanmıştır. Tedavilerde alternatif tıp yöntemlerinden ve bitkilerden daha fazla yararlanılmaya başlanması bu alanda doğal tatlandırıcı özelliğine sahip olan *Stevia rebaudiana* Bertoni’ye olan ilgiyi arttırmıştır.

Şeker olmayan ve tatlı olan maddelere “tatlandırıcı” adı verilmektedir. Tatlandırıcılar da yapay veya doğal olabilmektedir. Yapay tatlandırıcılar, uzun yıllardır gıda sanayinde ve diyet ürünlerinde kullanılmaktadır. Ancak, yapay tatlandırıcıların insanlar üzerinde yan etkilerinin olabileceği her zaman tartışma konusu olmuştur. Bu nedenle, son yıllarda doğal tatlandırıcıların kullanım alanları giderek artmaktadır. Başta şeker hastaları olmak üzere diyetine dikkat etmesi gereken insanlar bu ürünlerin başlıca tüketicileridir. Bunun yanı sıra önemli bir sağlık sorunu olmamakla birlikte bu tip ürünlere meyilli olan çok sayıda tüketici bulunmaktadır. Bunun sonucunda da tüm dünyada ve özellikle gelişmiş ülkelerde diyet ürünleri pazarı giderek genişlemektedir. Tatlandırıcılar meyve suları, gazlı içecekler, her türlü tatlılar, çikolata, bisküvi, pasta ve kekler, tatlandırılan konserve ürünleri gibi daha birçok gıda ürünlerinde kullanılmaktadır veya kullanılma potansiyeli bulunmaktadır. Doğal tatlandırıcılardan beklenen en önemli özellikler ise; kalorisinin düşük olması, herhangi bir yan etkisinin olmaması ve üretim maliyetinin düşük olmasıdır. Bu açıdan baktığımızda, Güney Amerika kökenli olan *Stevia rebaudiana* Bertoni ön plana çıkmaktadır. Bu bitki türü, yapraklarında bulunan steviol glikozitler sayesinde halen birçok ülkede doğal tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Steviol glikozitlerin en önemli özellikleri ise, çok güçlü bir tatlandırıcı olması ve kalorisinin sıfır olmasıdır.

Stevia rebaudiana, bazı ülkelerde doğal tatlandırıcı olarak kullanılmakta ve ekstrelerinin sukrozdan 200-300 kat daha tatlı olduğu bildirilmektedir. Toz haline getirilmiş stevia yaprağı yüz yılı aşkın süredir Paraguay’da içecekleri tatlandırmak için kullanılmıştır, ancak bu uygulama yalnızca küçük bir alanda kalmış gibi görünmektedir. Paraguay ve Brezilya’da 40 yıldan bu yana şeker hastalarına verilen stevia, kristalize edilmiş şeker ve yapay tatlandırıcıların aksine, hazmedildiği esnada insülin salgılanmasına gerek duymamaktadır. Bu bitkiden elde edilen sıvı haldeki ekstre, kan şekerini düzenleyici olarak kabul edilmektedir (Singh ve Rao 2005).

Stevia rebaudiana'nın yapraklarında yüksek düzeyde tatlı diperten glikozit, steviosid ve rebaudiosid A bulundurması, bitki yapraklarının normalde ikincil metabolit deposu olarak görülmediği düşünüldüğünde dikkat çekicidir. Bu olgu, stevia familyasının yalnızca bir diğer üyesinin, *Stevia phlebophylla*'nın tatlı ent-kauren bileşenlerinin biyosentezini gerçekleştirdiği düşünülünce, daha da sıra dışı hale gelmektedir (Kingham vd. 1984). Buna göre, *Stevia rebaudiana*'nın kemotaksonomisi bu kadar çok merak uyandırmıyorsa, steviosid ve rebaudiosid A sukroza kıyasla bu kadar yüksek bir tatlılık yoğunluğuna sahip olmasaydı, uygun maliyetli olmayacağından *Stevia rebaudiana* ürünleri sukroz alternatifi olarak bu kadar geniş bir ticari kullanım alanı bulamazdı.

Stevia rebaudiana dünyada tarımı ve endüstrisi hızla gelişen bitkilerin başında gelmektedir. *Stevia rebaudiana* ürünleri çeyrek yüzyılı aşkın süredir Japonya'da giderek artan bir şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde, steviosid içeren birçok Japon yiyeceği ve içeceği mevcuttur. Son birkaç yıl içinde, steviosid Güney Kore'de alkollü bir içecek olan sojunun formülasyonunda iç tüketim için yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Steviosid, Brezilya'da alkolsüz içecekler de dahil olmak üzere çeşitli ürünlerde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, *Stevia rebaudiana* ürünleri Amerika Birleşik Devletleri'nde ve İtalya gibi Batı Avrupa ülkelerinde besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. Dünyanın çeşitli yerlerindeki bu yaygın kullanıma rağmen, biyomedikal literatürde steviosid içeren *Stevia rebaudiana* ekstratlarının tüketimi dolayısıyla insanlarda görülen olumsuz etkilerle ilgili herhangi bir kanıt bulunmamaktadır.

Stevia rebaudiana Japonya, Çin, Tayvan, Kore, Meksika, ABD, Tayland, Malezya, Endonezya, Avustralya, Tanzanya, Kanada, Brezilya ve Rusya'da kullanılmaktadır ve yetiştiriciliği yapılmaktadır (Megeji vd. 2005). Dünyanın stevia yetişen diğer alanlarıyla kıyaslandığında Güney Amerika en fazla çeşitliliğin olduğu alandır. 1970' ler de artan stevia talebiyle doğuda tarımı yaygınlaşmaya başlamış ve günümüzde Asya'da geniş tarım alanlarında stevia üretimi yapılmaktadır (Nabors 2001).

Kore, yurt içinde yetiştirilen şeker kamışı veya şeker pancarından sukroz üretmemektedir. Dolayısıyla, şeker yerine kullanabilecek alternatif tatlandırıcıların araştırılması gerekli hale gelmiştir. Bu alternatif tatlandırıcılar arasında, steviosid umut verici bir sukroz alternatifi olarak kabul edilmiş ve steviosidin kaynağı olan *Stevia rebaudiana*, Kore'ye 1973 yılında getirilmiştir ve steviosidin tatlandırıcı olarak kullanımına 1984 yılından beri izin verilmektedir. Dolayısıyla, Kore'de *Stevia rebaudiana* yetiştirme yönünde önemli bir çaba görülmüştür. Hali hazırda, steviosid Kore'deki tatlandırıcı pazarının % 40'ını teşkil etmektedir ve gıda sektöründe, dondurma, pasta, şekerleme, sakız, turşu, sos, kalorisiz diyet yiyecekler ve içecekler gibi ürünlerde, diğer şeker alternatifi tatlandırıcıların hepsinden daha yoğun şekilde kullanılmaktadır. Özellikle, Kore'de steviosidin toplam tüketiminin %50'si, alkollü bir içecek olan soju aracılığıyla yapılmaktadır (Kang ve Lee 1981).

Stevia rebaudiana ve steviosid üzerine yayımlanan çok sayıda makale ve patentte, bunların botanik, biyolojik, kimyasal ve farmakolojik özellikleri işlenmiştir. Ancak, bilimsel literatürde belki de en çok önem verilen üç konu, steviosid ve rebaudiosid A'nın saflaştırılması için kullanılacak yöntemler, steviosidin duyuşal

parametrelerini geliştirmeyi sağlayacak prosedürlerin geliştirilmesi ile steviosid farmakolojisi ve toksikolojisi ile steviosidin enzimatik olarak üretilen aglikonu olan steviol üzerine çalışmalar olmuştur. Steviosidin tatlılığı ve lezzetini iyileştirmek için Japonya’da çok sayıda başarılı teknik girişimde bulunulmuştur ve bu da stevia bazlı ürünlerin artan kullanımına katkı sağlayan bir diğer etken olmuştur.

Özellikle AB ülkelerinde stevia’nın gıda katkı maddesi olarak kullanımına izin verilmesi bu bitkinin değerini daha da artırmıştır. Ülkemizde Akdeniz Bölgesi, yarı tropik (sıcak ve nemli) bir iklim özelliğine sahip olduğundan, stevia yetiştiriciliği için de uygun ortam özellikleri taşımaktadır. Uluslararası stevia pazarı çok hızlı gelişmekte olup, bitkinin dekar başına getirisi oldukça yüksektir. Gelecekte de yüksek getirisi ve talebi olan tarımsal ürünler arasında en ön sıralarda bulunacağı öngörülmektedir. Ayrıca üreticilerin daha fazla gelir getirici alternatif ürün arayışında bulunması stevia’nın ülkemiz tarımındaki geleceği açısından önemlidir. Stevia’nın gelecek 10 yıl içerisinde küresel ürünler arasına gireceği, dünya yıllık stevia kuru yaprak talebinin 6-8 milyon tonu geçeceği, halen 5 milyar Dolar olan dünya stevia pazar değerinin birkaç yıl içerisinde 10 milyar Doları geçeceği ve stevia ürünlerinin dünya tatlandırıcı pazarındaki payının % 20-25’e çıkacağı tahmin edilmektedir.

Endüstriyel açıdan önemi olan bu bitki çok sayıda üretici ve sanayicinin dikkatini çekmiştir. Ülkemizde de bu bitkinin üretiminin hızla artması beklenmektedir. Ancak, üretimdeki en önemli sorunlardan birisi, Akdeniz iklimine sahip bölge koşullarına adapte olmuş yüksek verimli ve yüksek steviol glikozit içeren çeşitlerin bulunmamasıdır. Yabancı döllenen ve kendine uyumsuzluk özelliği gösteren stevia popülasyonlarında genetik çeşitliliğin çok yüksek olduğu gözlenmektedir. Bu nedenle, özellikle klon seleksiyon yöntemi uygulanarak genetik ilerleme sağlanabilmesi olasıdır. Özellikle, stevia’nın tatlandırıcı kalitesi bakımından çok önemli olan rebaudiosid A miktarı ile rebaudiosid A / steviosid oranı yüksek ve bitki başına yaprak verimi ile yaprak / sap oranı yüksek olan çeşit veya çeşitlerin geliştirilmesi önem arz etmektedir (Yadav vd. 2011). Stevia bitkisinde yapılmış olan kalıtım çalışmalarında; verim ve kalite bakımından çok önemli olan yaprak verimi, yaprak / sap oranı ve steviosid miktarının kalıtım dereceleri oldukça yüksek bulunmuştur (Brandle ve Rosa 1992). Diğer taraftan rebaudiosid A glikozitinin varlığı veya yokluğu dominant tek bir gen tarafından kontrol edilirken miktarının çoklu lokuslar tarafından kontrol edildiği ileri sürülmektedir (Brandle 1999). Verim ve kalite ile ilgili karakterlerin kalıtım derecelerinin yüksek olması ıslah çalışmalarının başarısı için çok önemlidir. Bu bulgular, steviada yapılacak verim ve kalite ıslahı çalışmalarının başarılı olma olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Özellikle, yüksek yaprak verimli ve kaliteli (rebaudiosid A miktarı ile rebaudiosid A / steviosid oranı yüksek) yeni çeşitlerin geliştirilmesi stevia üreticisi ve sanayicisinin dünyadaki rekabet gücünü arttırılması açısından önemlidir.

Stevia üretimindeki diğer bir önemli sorun ise tohumla üretilen bitkilerin genetik bakımdan homojen olmamaları ve açılma göstermeleridir. Bu durum, stevia bitkisinin kendine kısır olmasından dolayı tamamen yabancı döllenenmesinden kaynaklanmaktadır. Söz konusu sorunun çözülmesi için mutlaka sürdürülebilir bir vejetatif çoğalma yönteminin uygulanması gerekmektedir. Özellikle geliştirilecek olan ıslah çeşitlerinin genetik olarak açılmalarını önlemek amacıyla, mikro-çoğaltma ve gövde çelikleri

kullanılarak homojen stevia fidelerinin elde edilmesi bitkinin sürdürülebilir bir şekilde üretimi açısından önemlidir.

Özellikle, yüksek kalitedeki kuru yaprak ürünlerinin başta Almanya olmak üzere birçok Avrupa ülkesinde talep gördüğü ve bu taleplerin karşılanması bakımından yetersiz kalındığı bilinmektedir. Bunun en önemli nedeni, stevia kuru yaprak tedarikçisi olarak Çin'in ön plana çıkması ve Avrupa'nın Çin'de üretilen ürünlere sıcak bakmamasıdır. Türkiye ise bulunduğu konum, iklim ve arazi koşulları nedeniyle önemli bir avantaja sahiptir. Türkiye'de sürdürülebilir stevia üretiminin başarılması ilgili firmaların uluslararası rekabette bir adım öne geçmesini sağlayacak ve güvenilirliğini artıracaktır. Böylece, hem iç pazara ve hem de dış pazarlara yüksek kalitede kuru yaprak ürünleri temin edilerek tüketicilerin haklı talepleri karşılanmış ve üreticilerin de gelir düzeylerinde artışlar sağlanmış olacaktır.

Bu çalışmayla; açık tozlanan stevia bitkilerinden seleksiyon ıslahı yoluyla yaprak verimi ve kalitesi yüksek (rebaudiosid A miktarı ile rebaudiosid A/steviosid oranı yüksek) yeni çeşitlerin ıslahı, geliştirilen ıslah çeşitlerinde genetik açılmaları önlemek amacıyla sürdürülebilir bir vejetatif çoğaltım yönteminin (çelikle çoğaltım) geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Böylece; tıbbi ve endüstriyel bakımdan önemli olan stevia bitkisinin üretiminde ülkemizin uluslararası rekabet gücü artacak, üreticilerin birim alandan daha yüksek gelir elde etmesi sağlanmış olacaktır. Ayrıca, ülkemizde bitkiyi işleyecek olan tatlandırıcı sektörünün gelişmesine önemli katkı sağlayacaktır. Bu noktada, tüketicilerin ürünü daha uygun fiyatlarda temin edebileceği ve ürün tüketiminin yaygınlaşacağı göz önüne alınırsa halk sağlığının korunmasına da katkıda bulunulacaktır. Stevia bitkisinin üretimi özellikle Akdeniz Bölgesi gibi bitkinin yetişmesi için uygun olan yerlerde üreticiler için yeni ve alternatif bir geçim kaynağı olacak, stevia üretimi ülkemiz için de planlı ve sürdürülebilir bir tarımsal faaliyet halini alacaktır. İhracat potansiyeli oldukça yüksek olan ürünün işleme sanayinin geliştirilmesiyle katma değerün ülkemizde kalması sağlanabilecektir.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni' nin Kökeni ve Tarihçesi

Asteraceae (Compositae) familyasından *Stevia rebaudiana* Bertoni yapraklarının çok yüksek bir tatlılık derecesine sahip olmasının fark edilmesi, önemli bir botanik keşiftir. Bu keşfin ne zaman yapıldığı tam olarak bilinmemekle birlikte, bilim camiasının gündemine getirilmesi yaklaşık yüz yıl öncesine dayanmaktadır (Gosling 1901; Bertoni 1905).

1887 yılının sonlarına doğru, Paraguay'ın kuzey doğusundaki botanik keşiflerin erken döneminde, 1882 yılında Paraguay'a göç eden ve Paraguay vatandaşlığı alan İtalyan-İsviçreli bir botanikçi-doğabilimci olan Bertoni (1857-1929), kuzeydoğulu şifacılar ve Mondaíh yerlilerinden (Brezilya sınırında, Ciudad de Este'nin batısında bulunan, önceden Puerto Stroesner/Franco/Bertoni olarak bilinen, Monday Nehri) bu bölgelerde tatlı bir bitki bulunduğunu öğrenmiştir. Mondaíh yerlileri, bu bitkiyi Mbaeverá ve Kaá Guasú çayırılarından bilmektedir (günümüzde Caaguazú olarak geçer) Bertoni (1905) bitkinin nadir olduğunu ve söz konusu tarihte bitkinin bir örneğine ulaşamadığını belirtmiştir.

Yıllar sonra, Paraguay'ın başkenti Asunción'da, Daniel Candía adında bir gümrük memuru kendisine bu tatlı bitkinin, kök, yapraklar ve çiçeklerden oluşan, acı mate içkisini ezilmiş haldeki yapraklarını katarak tatlandırmak için kullanılmak üzere hazır formda bir örneğini vermiştir. Görünüşe göre, örneği veren gümrük memuru bitkiyi ülkenin kuzey kısmındaki bir şifacıdan almıştır. Bertoni ezilmiş örneğin ne olduğunu tespit etmeyi başarmış ve Compositae'nin Eupatorieae familyasında, doğru taksonomik konumuna yerleştirmiştir. Ancak, örneğin parçalar halindeki yapısından dolayı, bitkinin Eupatorium familyasına ait olup olmadığını tam olarak belirlemeyi başaramamıştır. Yine de, bilimsel olarak yeni bir bitki olduğuna karar vermiş ve bitkiyi 1899 yılında Boletín de la Escuela Agrícola de Asunción, cilt 2:35'te *Eupatorium rebaudianum* Bertoni ismiyle bilim camiasına sunmuştur. Rebaudianum sıfatı, Bertoni tarafından oldukça takdir edilen ve sonraları Bertoni tarafından sunulan numuneler üzerinde bitki ile ilgili ilk kimyasal çalışmaları yapan Paraguaylı kimyacı Ovidio Rebaudi'den gelmektedir.

Bu yeni türün yayınlanmasının ardından, Asunción'da bulunan İngiliz konsolosu H.B.M. Cecil Gosling, İngiltere'nin Kew kasabasında bulunan Kraliyet Botanik Bahçeleri'ni tatlı bitki *Eupatorium rebaudianum*'un varlığından haberdar etmiş ve mektubu ile birlikte bitkinin bazı parçalarını ve yeni tür ile ilgili Latince açıklamalar göndermiştir. Gosling'in mektubu ve Latince açıklamalar 1901 yılında Kew Bülteni'nde, anonim olarak yayınlanmış daha sonra ise yazara "Gosling 1901" şeklinde atıfta bulunulmuştur.

" Stevia " adı ilk kez stevia cinsinin farklı türlerini çalışan İspanyol botanikçi Petri Iacobi Stevus (Pedro Jaime Esteve 1500-1556) tarafından verilmiştir. 1905 yılında ise; kimyager Ovidio Rebaudi'nin bitkinin içeriğindeki tatlı bileşenleri analiz etmesine ithafen bitki Moises Santiago de Bertoni tarafından *Stevia rebaudiana* Bertoni olarak adlandırılmıştır (Kingham 2002). Latince terim *Stevia rebaudiana*, literatürde ilk defa 1905 yılında Moisés Santiago de Bertoni tarafından kullanılmıştır (Bertoni 1905). Bu

ismin kullanılmasına yol açan olaylar, Bertoni'nin 1905 ve 1918 tarihli makalelerinde açıklanmıştır (Bertoni 1905; 1918).

Paraguay ve Brezilya'da yetişen *Stevia rebaudiana*, Paraguay kızılderilileri tarafından "Tatlı ot" ve "Ballı yaprak" gibi değişik isimlerle adlandırılmıştır. Başlangıçta ağızda yoğun bir tat daha sonra metalik, acı, meyan gibi bir tat bırakan steviadan elde edilen tatlandırıcılar sukrozdan 200-300 kat daha tatlıdır. 1500 yıldır Güney Amerika'nın yerli kabileleri, stevianın yaprak ve ekstrelerini yiyecek içecekleri tatlandırmanın yanı sıra baş ağrısı, sindirim problemleri, diş çürükleri, cilt sorunları gibi rahatsızlıkları tedavi etmek amacıyla da kullanmışlardır (Singh ve Rao 2005).

Stevia 20. yüzyılda yüksek yoğunluklu doğal tatlandırıcı olarak popülerlik kazanmıştır. Savaş sırasında meyan kıtlığında, soya sosu üreticileri tarafından soya preperatlarında katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmış, bu dönemde Dünya' da ki en büyük stevia tüketicisi de Japonya olmuştur (Kingham 2002). Stevianın yaprakları, ekstraktları ve tatlı bileşenlerini içeren fraksiyonlar saflaştırılarak ticarileştirilmiş, alkollü içecekler, şekerleme, dondurma gibi ürünlerde kullanımı yaygın hale gelmiştir (Nabors 2001). 1970 ve 1980' ler de stevia tatlandırıcıları Kuzey Amerika ve Avrupa'da bitkisel ürünler satan marketlerde görünmeye başlamış, Japonya'da 1970'li yılların ortalarında steviosid ekstresi birçok sentetik tatlandırıcının yerine içeceklerde ve yiyeceklerde aroma verici ve tatlandırıcı amacıyla ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır.

Yirminci yüzyılda, bu yerel Paraguay türü ve tatlı bileşenleri 1.000'den fazla bilimsel makaleye ve patent başvurusuna konu olmuş ve tatlandırıcı olarak ticari kullanımı sayesinde önemli bir ekonomik bitki haline gelmiştir. Türün yapraklarında en bol bulunan tatlı bileşen olan steviosid ve ent-kauren diterpen glikozit ilk olarak yirminci yüzyılın ilk on yılında katışık şekilde izole edilmiştir (Bertoni 1918), ancak son yapısına gelmesi yaklaşık altmış yıl sonrasına kadar gerçekleşmemiştir (Mosettig vd. 1963). 1970'lerde, Japonya'nın Hiroşima Üniversitesi'nde Profesör Osamu Tanaka ve ekibi *Stevia rebaudiana* yapraklarından elde edilen ikinci önemli tatlandırıcı ent-kauren diterpen glikozit olan rebaudiosid A'yı izole etmiştir (Kohda vd. 1976). Sonrasında dulkosid A, rebaudiosid B-E ve steviolbiosid olmak üzere tatlandırıcı özelliği daha az olan altı diğer glikozit türden izole edilmiştir (Yamasaki vd. 1976; Kobayashi vd. 1977; Tanaka 1982).

1970'lerin ortalarında Japonya'da, *S. rebaudiana*'nın standart ekstratları ve saflaştırılmış steviosid, bu dönemde Japonya pazarında yasaklanan sentetik tatlandırıcıların yerine yiyecekleri ve içecekleri tatlandırmak için ticari olarak kullanılmaya başlanmıştır. 1987 yılına gelindiğinde, steviosid içeren *Stevia rebaudiana* ekstratları Japonya'daki "yüksek yoğunluklu" tatlandırıcı pazarının % 41'ini oluşturur hale gelmiştir (Anonim 1988). Günümüzde, steviosidin en yaygın ve çeşitli olarak kullanıldığı yer yine Japonya'dır, ancak bu bileşen, temel kullanım amacı soju adı verilen alkollü içeceğin tatlandırılması olan Güney Kore'de de gittikçe daha fazla kullanılır hale gelmektedir (Seon 1995). Steviosid, Brezilya'da ve diğer Güney Amerika ülkelerinde onaylı bir tatlandırıcı olarak listelenmektedir (Bakal ve O'Brien Nabors 1986; Kinghorn ve Soejarto 1991). Uygulamada, *Stevia rebaudiana* ekstratları Amerika Birleşik Devletleri'nde ve belirli Batı Avrupa ülkelerinde besin takviyesi olarak oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır (Bonvie ve Bonvie 1996; Moroni 1999).

Steviosid, hacimdeki ağırlığı % 0.4 olan sukroza kıyasla göreceli olarak (relatif) 300 kat daha fazla tatlılık yoğunluğuna sahiptir, ancak tatlılık yoğunluğu % 10'luk konsantrasyona sahip sukrozla karşılaştırıldığından 100 kata kadar düşer. Ne yazık ki, bu bileşik ağızda metal benzeri acı bir tat bırakmaktadır (Bakal ve O'Brien Nabors 1986).

Stevia rebaudiana yapraklarından elde edilen ikinci önemli tatlandırıcı *ent-*kauren diterpen glikozit olan rebaudiosid A, hem suda daha iyi çözündüğünden hem de ağızda daha hoş bir tat bıraktığından, stevioside kıyasla yiyecek ve içeceklerde kullanılmak için daha uygundur (Kinghorn ve Soejarto 1991; Tanaka 1997). Steviosid genel olarak gliserizin ile karıştırılır ve elde edilen karışım her iki tatlandırıcının da lezzet profili iyileştirildiğinden sinerjistikdir. Ayrıca, steviosidin aspartam, asesülfam-K ve siklamat ile sinerjistik olduğu, ancak sukroz ile sinerjistik olmadığı rapor edilmiştir (Bakal ve O'Brien Nabors 1986).

2.1.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni' nin sınıflandırılması

1904 yılında, Bertoni bitkiden ilk kurutulmuş çiçekli numuneyi elde edebilmiş, ancak ülkedeki iç savaş nedeniyle üst Paraná bölgesine seyahat etmek zorunda kalmıştır. Asunción'a dönüşünde, San Pedro'da yaşayan birinden bitkinin canlı bir numunesini almıştır. Bertoni'nin bitkiyi stevia cinsine doğru taksonomik yerleştirme ile dahil etmesi bu numune sayesinde olmuştur ve daha sonra keşfini *Stevia rebaudiana* Bertoni adıyla yayınlamıştır (Bertoni 1905). [Terimlendirme bakımından tam yazar atfı şu şekilde olmalıdır: *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni.]. Bertoni'nin 1905 yılındaki makalesinden habersiz, 1906 yılında Hooker's Icones Plantarum'un editörü D. Prain (Prain 1906), türün Latince açıklamaları eşliğinde *Stevia rebaudiana* ' nın bir çizimini yayınlamış ve Latince terim kökenini Hemsley'e atfetmiştir (Hemsley 1906). Uluslararası Botanik Adlandırma Kılavuzu tarafından belirlenen kurallara göre *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsley ismi, *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni isminden bir yıl sonra ortaya çıktığı için, öncelik ile ilgili sebeplerden dolayı, Hemsley versiyonu Bertoni versiyonunun sinonimi haline gelmiştir (Geuter vd. 1994).

Stevia Amerika Birleşik Devletleri' nin güneybatısından Meksika boyunca Orta Amerika' nın aşağısına kadar yayılış göstermektedir. Amazon dışında Güney Amerika ve güneye doğru Arjantin' de bulunmaktadır (King ve Robinson 1987). Brezilya' da stevianın 36 türü bulunur ve merkez bölgelerde yayılış gösterir (Frederico vd. 1996). Paraguay' ın kuzeydoğusunda Brezilya ile sınır olan yüksek kesimlerinde 25-26 ° güney paralelinde yer alan Amambay dağları arasında yer alan Rio Monday vadisinden köken alan *Stevia rebaudiana* Paraguay' da Guarani yerlileri arasında yaygın olarak Caá hê-é (tatlı bitki) olarak bilinir ve yeşil bitkisel çayları olan 'mate' çaylarında aroma verici olarak kullanılırdı (Soejarto vd. 1983).

Stevia rebaudiana Asteraceae familyasına ait 950 cinsten bir tanesidir (Lester 1999). Yaklaşık 230 türü olmasına rağmen tatlılık özelliğine sahip en çok bilinen türü *Stevia rebaudiana* Bertoni tatlılık özelliğine sahiptir (Soejarto vd. 1983a).

2.1.2. *Stevia rebaudiana* Bertoni' nin botanik özellikleri

Stevia cinsi otsu, çalimsı, yarı çalimsı olmak üzere yaklaşık 230 tür içerir. Kromozom sayısı $2n=22$ ' dir. Kısa gün bitkisidir. Güney yarımkürede Ocak' tan Mart' a kuzey yarımkürede ise Eylül' den Aralık' a kadar bitkide çiçek bulunur. Kısa gün koşullarında çiçeklenme çeşidin gün uzunluğuna hassasiyetine bağlı olarak dikimden sonraki 54-104 gün arasında meydana gelir. Fotoperiyot hasasiyeti ise 8 saatten 14 saate kadar değişebilir (Chalapathi 1997). Yoğun bir kök sistemine sahiptir. Gövdesi oldukça nazik ve kırılmandır. Doğal yayılış alanlarında 65 cm, kültür koşullarında 100 cm ya da daha fazla boylanabilir.

Çizelge 2.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni' nin sınıflandırılması

Alem	Plantae
Alt Alem	Tracheobionta
Şube	Magnoliophyta
Sınıf	Magnoliopsida
Alt Sınıf	Asteridae
Takım	Asterales
Aile	Asteraceae
Alt Aile	Asteroideae
Cins	<i>Stevia</i>
Tür	<i>rebaudiana Bertoni</i>

Stevia rebaudiana 30–60 cm uzunluğunda, çok yıllık rizomları, basit, karşılıklı ve az da olsa eliptik sapa doğru incelen ya da spatulat sapa doğru incelen yaprakları, demet halinde beyaz çiçekleri ve çok sayıda, eşit uzunlukta tüyümsü dikenleri olan akenleri olan tüylü otsu bir bitkidir. Botanik kayıtlar Amambay Sıradağları'nda, Paraguay'ın kuzeydoğu kesiminde doğal bir dağılıma işaret etse de, çeşitli literatür raporları türün Paraguay'ın Amambay bölgesine sınır komşusu olan Brezilya ve Arjantin bölgelerinde doğal olarak bulunduğu işaret etmektedir.

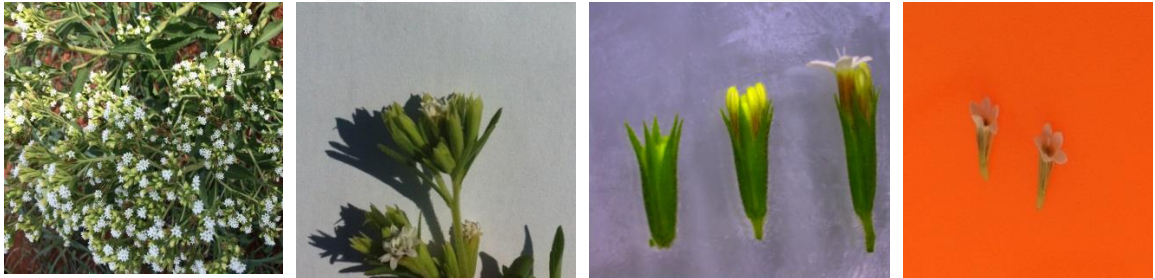
Yaprakları 2-8 cm uzunluğunda, kenarları ince dişli oval şeklindedir. Yaprak yüzeyinde bulunan tüyler iki boyutta bulunmaktadır. Bunlardan büyük olan yaklaşık 4-5 mm küçük olan ise 2.5 mm'dir (Shaffert ve Chebotar 1994). Yapraklar alternat dizilişlidir ve gövde tepesine doğru sarmal oluşturur. Her boğumdan bir yaprak çıkar ve bunların arasında belli bir açı vardır. Bitki kültür koşullarında 1 m ya da daha fazla uzunluğa ulaşabilir (Shock 1982). *Stevia* yapraklarının kalitesi toprak koşulları, sulama

sistemleri, güneş ışığı, hava, tarım uygulamaları, işleme ve depolama dahil olmak üzere birçok çevresel faktörden etkilenir. Yaprak, yapısında acı bileşenlerle çevrilmiş tatlı bileşenler içerir ve ağızda oldukça hoş, tatlı bir tat bırakır (Maiti ve Purohit 2008).



Şekil 2.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni' ye ait yaprak yapısı

Çiçekler indeterminant özelliktedirler ve dalların uçlarında bulunurlar. Çiçek yapısı 2-6 adet ufak beyaz çiçekçikten oluşan küçük salkım şeklindedir ve iki eşeylidir (Goettemoeller ve Ching 1999). Bitki en az dört yaprak oluştuktan sonra ve bir aydan fazla süren çeşitli çiçeklenme aşamalarından geçtikten sonra çiçeklenmeyi başlatabilir (Taiariol 2004). Beş adet küçük anter bulunur ve alerjik olabilir. Stigma ortasından iki loblu anterlerle çevrilmiş durumdadır. Bitkide kendine uyumsuzluk olduğu için tozlanma için böcek gerekmektedir (Miyagawa vd. 1986; Chalapathi vd. 1997).



Şekil 2.2. *Stevia rebaudiana* Bertoni' ye ait çiçek yapısı

Tozlanmanın olmadığı durumlarda çimlenme yeteneği olmayan veya çok düşük olan tohumlar oluşmaktadır. Tohumlar 3 mm uzunluğunda aken tipindedir. Her bir aken yaklaşık 20 tüye sahiptir (Oddone 1997). Çok küçük bir endosperme sahiptir ve rüzgarda tüyler aracılığıyla dağıtılır. Fertil tohumlar genellikle koyu renkteyken, infertil tohumlar soluk açık renktedirler (Monteiro 1980; Oddone 1999). Tohumlar çok küçüktür bin dane ağırlığı ortalama 0,3-1 gramdır. Fideler oldukça yavaş gelişim gösterdikleri için, araziye aktarılana kadar 45-60 gün süre geçer (Colombus 1997). 200 hektar yaprak üretimi için 1 hektar tohum üretimi yeterlidir (Lester 1999).

2.1.3. *Stevia rebaudiana* Bertoni' nin etnobotaniği ve farmakolojik özellikleri

Hastalıkların ya da sağlıkla ilgili şikayetlerin genel olarak karmaşık doğasından ötürü, hastaları muayene etmeden ve tanı koymadan hastalık ya da şikayetlerin kesin etiyojisi belirlenmek çok zor ya da imkansızdır. Yine de, bazı şikayetlerden sorumlu ajanlarla ilgili çıkarımlarda bulunulabilir ve tedavi amaçlı bitkilerden yararlanılabilir. Eski yıllardan beri farklı kültürlerin bulunduğu, stevianın dağılım gösterdiği alanlarda bulunan popülasyonların sağlık bakımı uygulamalarında, stevia önemli bir yer edinmiştir.



Şekil 2.3. *Stevia rebaudiana* Bertoni' ye ait tohum yapısı

Stevia ve insan arasındaki en eski etnobotanik kayıt, 1570 ve 1576 yılları arasında İspanyol bir hekim olan Francisco Hernández tarafından kaleme alınan Yeni İspanya Bitkilerinin Doğal Tarihi adlı kitapta bulunmaktadır. Ne yazık ki, *stevia* bitkilerinin kitapta Nahuatl dilinde listelenen isimleri üzerinden kimlikleri kesin olarak belirlenememektedir. Benzer şekilde, daha güncel etnobotanik kayıtları olan bir dizi bitkinin de kimliği kesin olarak belirlenememektedir.

Stevia türüne ait karışımlarla çeşitli hastalıklara karşı tedavi yöntemleri geliştirilmiştir ve en az 16 *stevia* türü tedavide rol almıştır. Tıbbi kullanım geçmişi olan 16 türden 13' ü sindirim yolu sorunları, cilt sorunları, sıtma, ateş, soğuk algınlığı hastalıkları tedavi etmek amacıyla kullanılmıştır. Diğer sağlık şikayetleri ile ilgili olarak, 16 türün 10'u metabolik, merkezi sinir sistemi ilişkili, kardiyak ve kadın hastalıkları ilişkili sorunların tedavisi için kullanılmıştır. Meksika'da bulunan türlerin çoğu nedeniyle, stevianın bu ülkedeki tıbbi kullanımının diğerlerine kıyasla daha fazla olması beklenen bir durumdur. Yaygın olarak dağılım gösteren bir tür olan, Meksika'dan Kolombiya ve Venezuela' ya kadar Orta Amerika ülkeleri boyunca yetişen otsu çalı *Stevia lucida*' nın, Meksika, Guatemala, Kolombiya ve Venezuela'da inflamasyon ile ilişkili ağrı ve romatizma hastalıklarının tedavisinde benzer şekilde kullanılıyor olması ilgi çekicidir.

Yaklaşık 230 *stevia* türünden, sadece dört tanesi, tatlandırma özelliklerinin yanı sıra biyolojik değerlendirmeye tabi tutulmuştur. Bu dört tür *Stevia eupatoria*, *Stevia rebaudiana*, *Stevia satyroides* ve *Stevia serrata*'dır. Ancak, *Stevia serrata* üzerinde yapılan biyolojik değerlendirmeler, iddia edilen etnomedikal özellikleri ile ilgili değildir. Planas ve Kuc (1968) halk tarafından tıbbi kullanımının doğrulanması amacıyla, *Stevia eupatoria* ve *Stevia rebaudiana* üzerinde biyolojik değerlendirmeler yapmışlardır. *Stevia eupatoria* söz konusu olduğunda ise, erken dönemde yapılan farmakolojik bir çalışmanın dışında çalışma bulunmamaktadır (Soejarto vd. 1983b). Bu

durum, *Stevia eupatoria* ve *Stevia rebaudiana* haricinde diğer hiçbir tür ile ilgili etnomedikal doğrulama girişiminde bulunulmadığı anlamına gelmektedir.

Stevia rebaudiana bu familyanın botanik, fitokimyasal ve farmakolojik anlamda kapsamlı şekilde incelenen tek üyesidir (Kingham ve Soejarto 1985). Türe gösterilen bu özel ilginin sebebi; bitkinin tatlı özellikleri ve tatlandırıcı olarak ticari kullanımının olmasıdır. *Stevia* cinsinin birçok türü üzerinde, çeşitli kimyasal çalışmalar yapılmıştır. Sonuç olarak, günümüzde bu familyanın bitkilerinde bulunan çok sayıda farklı ikincil metabolit bilinmektedir.

Bitkinin sahip olduğu bu kimyasal çeşitlilik, *stevia* türleri ile ilgili çeşitli tıbbi ilişkileri açıklamaktadır. Örneğin, *stevia* bitkilerinin karakteristiklerinden biri acı bir tat vermeleridir (Soejarto vd. 1983a). Acı tat, seskiterpen laktonların (Rodriguez 1977) ya da belirli diterpenlerin varlığı ile ilişkilendirilir (Sticher 1977). Seskiterpen varlığı Asteraceae familyasının üyelerinde karakteristik bir özellik gibi görünmektedir (Herz 1977) ve çeşitli seskiterpenler *stevia* türlerinden izole edilmiştir (Salmon vd. 1977; Bohlmann vd. 1982). Yakın zamanda (Mata vd. 1992), son derece acı bir tadı olan entatisen diterpen glikozidin *Stevia salicifolia* köklerinde de bulunduğu rapor edilmiştir. Bileşikler konusundaki çeşitlilik, *stevia* üyelerinde bulunan ve bazı türler için zaman zaman "keçi kokusu" olarak karakterize edilen, karakteristik keskin aromatik kokuyu da açıklamaktadır. Bitkilerce üretilen güçlü ve aromatik kokular, eterik yağların varlığından dolayıdır (Bruneton 1995). Bu belki de bir çok *stevia* türünün bulaşıcı hastalıkların tedavisinde kullanılmasının sebeplerinden biridir. Bu eterik yağlar, ateş düşürücü, romatizma azaltıcı ve terletici gibi bazı diğer tedavi edici özelliklerden sorumlu olabilir.

Stevia türlerinin rahim gevşetici, kardiyak sorunlarının tedavisi, analjezik, saç dökülmesinin önlenmesinde kullanıldığı bilinmektedir. Fakat diğer tedavi edici faaliyetlerin fitokimyasal temeli şu anda tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.1.4. *Stevia rebaudiana* Bertoni' nin ekolojik istekleri

Türler subtropik, yarı kurak, deniz seviyesinden 500-3500 m yüksekliklerde çayır, bataklıklar ve dağ yamaçlarına bitişik olarak yayılım gösterirler (Kingham 2002). En iyi gelişmeyi yıllık sıcaklık ortalaması 31 °C, yağışı ise 1400 mm olan alanlarda göstermektedir. Gelişme aşamaları boyunca soğuğa oldukça hassastır. Don olaylarının minimum olduğu, yüksek ışık yoğunluğu olan ve yüksek sıcaklığa sahip bölgelerde daha yüksek yaprak üretimi sağlanmaktadır. Yapılan agronomi çalışmaları bitkinin mutlak -3 °C ile 15-30 °C arasında değişen sıcaklık değerlerine dayanabildiğini göstermiştir.

Devamlı ve yeterli nem içeren ve iyi drenajlı toprakları sevmektedir. *Stevia* bitkisi su göllenmesine çok duyarlıdır, bu nedenle toprak uzun süre nemli kalmamalıdır. Yüksek kil içeriğine sahip topraklarda yetiştiriciliği önerilmez. Hafif bünyeli, alüviyal ya da kırmızı topraklarda iyi gelişir ve pH 5-7.5 olan asidik ya da hafif bazik toprakları sever. *Stevia*'nin besleyici kökleri toprak yüzeyine oldukça yakın olduğu için, özellikle kumlu topraklara ilave besin olarak kompost eklenmesi gelişmeyi olumlu yönde etkilemektedir. Yağışın yetersiz olduğu yerlerde mutlaka sulanmalıdır. *Stevia* bitkisinin yıllık ortalama sıcaklık isteği ise 24 °C'dir (Singh ve Rao 2005). *Stevia* bitkisi, tropik ve

suptropik iklim kuşaklarına daha iyi adapte olmaktadır. Çok yıllık bir bitki olması ve düşük sıcaklıklardan zarar görmesi nedeniyle karasal iklim koşullarına adaptasyonu olası görülmemektedir.

Stevia bir kısa gün bitkisidir. Bitkinin gelişmesinde gün uzunluğu ışık yoğunluğundan daha kritiktir. Uzun bahar ve yaz günleri yaprak gelişmesi için idealdir. Buna karşın kısa gün koşulları ise çiçeklenmeyi teşvik etmektedir. *Stevia* güneş ışınlarının aşırı yoğun olması durumunda, yaz aylarında kısmen de olsa gölgeye ihtiyaç duymaktadır. Bitkinin dikimi sırasında toprak sıcaklığının 18 °C olması uygundur.

2.2. *Stevia rebaudiana* Bertoni' nin Kimyasal Bileşimi ve Özellikleri

Komissarenko vd. (1994) yaptıkları çalışmalarda *stevia* bitkisine ait ekstraktlarda flavonoid, alkaloit, suda çözünen klorofil ve ksantofil, hidroksisinnamik asit, nötral suda çözünen oligasakkarit, serbest şeker, aminoasit, lipid, eterik yağlar ve alüminyum, demir, çinko gibi iz elementlerin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Stevia' da ki ilk eterik yağ analizi Arjantin'den toplanan *Stevia satureiaefolia* türünde gaz kromatografisi ile yapılmış ve temel bileşenler olarak monoterpen borneol, sineol, pulegon, geraniyol, nerol, linalol asetat, limonen ve fenilpropanoid bulunmuştur (Montes 1969). Meksika'dan çiçeklenme sezonun başında ve sonunda, sırasıyla Eylül' de ve Kasım' da toplanan *Stevia porphyrea* çiçeklerinden elde edilen eterik yağlar üzerinde ikinci bir analitik çalışma gerçekleştirilmiştir. Gaz kromatografi ile birlikte kütle spektroskopisi ile analiz edilen bu eterik yağlardan Eylül ayında elde edilen eterik yağ temel olarak timol, -pinen ve 7-etil-2,4- dimetil azulen içerirken, Kasım ayında elde edilen eterik yağ temelde nerol, -felandren ve -humulen (-karyofilin) seskiterpenleri ve farnesol içerdiğinden, oldukça farklı çıkmıştır (Pérez vd. 1995). *Stevia achalensis* türünün uçucu bileşen analizindeyse temel bileşenler β -selinen, β -karyofilin ve -muurolen olarak bulunmuştur (Zygadlo vd. 1997).

Bu çalışmalara ek olarak, Meksika'dan toplanan *Stevia serrata* çiçekleri üzerinde yapılan buhar distilasyonu sonucunda, yüksek miktarda seskiterpen kamazulen bulunmuş, *Stevia salicifolia* türünün toprak üstü kısımlarından elde edilen lipofil ekstratlarda ise -pinene ve -mirtenil sinamat bulunmuştur (Bohlmann ve Zdero 1985).

Steviadan çeşitli uçucu seskiterpenler de izole edilmiştir. Bu grup hidrokarbonlar ve monooksijenli maddelerden oluşmaktadır. Bu bileşiklerin çoğu, analiz edilen bitki malzemelerinin toprak üstü parçalarından ya da köklerinden hazırlanan toplam ham ekstratlardan elde edilen lipofil fraksiyonlarından izole edilmiştir. Böylece, Bolivya'dan toplanan *Stevia sarensis* ve *Stevia yaconensis* türlerinin toprak üstü parçalarında -humulen bulunmuştur (Zdero vd. 1988). Kuzey Amerika türleri olan *Stevia polycephala*, *Stevia serrata* ve *Stevia ovata*'nın köklerinde izohumulen bulunurken (Bohlmann vd. 1977), *Stevia salicifolia* türünün toprak üstü parçalarında γ -humulen bulunmuştur. Bu bileşik, Paraguay' dan toplanan *Stevia aristata* köklerinden de izole edilirken (Zdero vd. 1987), Meksika'dan toplanan *Stevia berlandieri* türünün toprak üstü kısımlarından himayalol izole edilmiştir. Kuzeydoğu Brezilya' dan toplanan *Stevia myriadenia* köklerinde karyofilin bulunurken *Stevia berlandieri*, *Stevia salicifolia* ve *Stevia amambayensis* (Schmeda-Hirschmann vd. 1986) köklerinde karyofilin epoksi bulunmuştur. 4 α ,5- β -epoksi-8-hidroksi türevi, *Stevia triflora* türünden izole edilmiştir

(Amaro-Luis ve Adrián 1997). *Stevia achalensis* (Bohlmann vd. 1986), *Stevia amambayensis*, *Stevia myriadenia* ve *Stevia polyphylla* (Zdero vd. 1988) türlerinde bisiklogermakren bulunmuştur. β -Bergamoten, *Stevia amambayensis* köklerinden de izole edilmiştir. *Stevia ovata* türünün toprak üstü kısımlarından asiklik seskiterpenoidler nerolidol ve β -farnesol ile birlikte poliasetilen pentanen elde edilmiştir. Nerolidol *S. salicifolia* türünün toprak üstü kısımlarından da elde edilmiştir (Bohlmann ve Zdero 1985).

2.2.1. Steviol glikozitler

Stevia yaprağı dokularında, tatlandırıcı özelliği olan sekiz diterpen glikozit tespit edilmiştir. Bunlar, en azından başlangıç aşamalarında, önemli bir bitki hormonu olan giberellik asit için kullanılan yolun aynısı ile sentezlenir (Singh ve Rao 2005). Dört temel tatlandırıcı steviosid (stv), rebaudiosid A (reb A), rebaudiosid C (reb C), ve dulkosid A (dul A)'dır. İki temel glikozit, genellikle kuru yaprak ağırlığının %5-10 kadarını oluşturan steviosid ve % 2-4 kadarını oluşturan rebaudiosid A' dır. Bunlar en tatlı bileşiklerdir. Rebaudiosid B (reb B), rebaudiosid C (% 1-2), rebaudiosid D (reb D), rebaudiosid E (reb E), rebaudiosid F (reb F), dulkosid A (dul A), dulkosid C (dul C) ve steviolbiyosid gibi küçük glikozitler ve bunların yanı sıra flavonoid glikozitler, kumarinler, sinanamik asitler, fenilpropanoidler ve bazı eterik yağlar da dahil olmak üzere, diğer ilgili bileşenler de mevcuttur (Dacome vd. 2005; Sekaran vd. 2007).

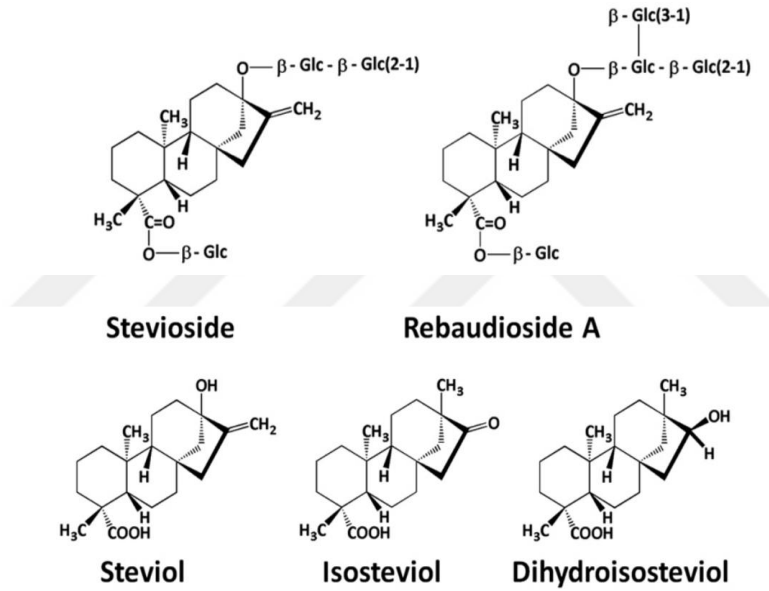
Stevianın bileşenleri arasında, rebaudiosid A adı verilen bileşen, en çok istenen lezzet profiline uyduğu için oldukça ilgi çekicidir (DuBois 2000). Steviosid geleneksel olarak tatlandırıcının büyük bir kısmını oluşturur (toplam glikozit içeriğinin % 60-70 kadarı) ve şekerden 110-270 kat daha tatlı olarak değerlendirilir. Bazen "meyan kökü" tadı olarak rapor edilen, tüketim sonrasında bıraktığı acı tat da stevioside bağlıdır. Tatlılığın yanı sıra, steviosidin kalıcı bir etkisi ya da belirli bir seviyede acılığı da vardır. Bu acılık insanların çoğunluğu tarafından beğenilmez ve steviosidin kabul edilebilirliğini azaltır. Rebaudiosid A genel olarak toplam tatlılığın % 30-40 kadarını oluşturur ve en tatlı tada sahiptir. Ağızda acı tat (meyan kökü tadı ya da kalıcı etki) bırakmadan, şekerden 180-400 kat daha tatlı olarak değerlendirilir.

Rebaudiosid A / steviosid oranı, ideal tatlılık ölçüsü olarak kabul edilir. Daha çok rebaudiosid A, daha iyi sonuç demektir. Mevcut rebaudiosid A miktarı, stevioside eşit olduğunda, ağızda kalan acı tat giderilmiş olur. Küçük glikozitlerin daha az tatlı olduğu, tatlılık düzeylerinin şekerin 30-80 katı olduğu kabul edilir (Crammer ve Ikan 1986). Bu bileşenlerin tatlılık etkisi yalnızca lezzetle alakalıdır. Sindirilmeyen ve kimyasalın hiçbir parçası vücut tarafından emilmez. Bu yüzden herhangi bir besin değerleri yoktur (Hutapea 1997). Tatlandırıcı bileşenlerin yaprak dokusundaki verim düzeyi, gün uzunluğuna (Metivier ve Viana 1979) ve tarımsal uygulamalara (Shock 1982) göre değişebilir. Birçok düşük kalorili tatlandırıcının aksine, steviosid yüksek sıcaklıklarda (100 °C) ve geniş bir pH değeri aralığında kararlıdır (Kingham ve Soejarto 1985). Kalorisi yoktur, mayalanamaz ve pişirildiği takdirde kararmaz (Crammer ve Ikan 1986).

Steviosid içeriğinin, yetiştirme koşullarına bağlı olarak, kuru ağırlık bazında % 4 ile 20 arası değiştiği rapor edilmiştir (Kennely 2002; Starrat vd. 2002). Steviosid, rebaudiosid A, rebaudiosid B, rebaudiosid C, rebaudiosid D, rebaudiosid E, dulkosid A

ve steviolbiyosid bileşenlerinin tatlılık potansiyeli (sukroz = 1) sırasıyla 250-300, 350-450, 300-350, 50-120, 200-300, 520-300, 50-120 ve 100-125 kadardır. Genel olarak, Paraguay steviası yaprakları en yüksek tatlı steviosid-rebaudiosid molekülü konsantrasyonuna (% 9-13) sahiptir, Çin steviası yalnızca % 5-6 kadar bir konsantrasyona sahipken ve Hint steviası bu iki tür arasında kalan bir konsantrasyona sahiptir. Hindistan koşulları altında steviosid konsantrasyonu kuru yaprak ağırlığının % 9.08'i civarındadır (Ashwini 1996; Chalapathi 1996).

İtalya' nın Toskana kıyısında bulunan beş farklı *Stevia rebaudiana* genotipinin uçucu yağ bileşimi Kolon Kromatografisi (CC) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) ile incelenmiştir. Kırk farklı bileşen tespit edilmiştir ve incelenen tüm numunelerdeki temel bileşenlerin spatulenol (% 13.4-40.9), karyofilen oksit (% 1.3-18.7), beta-karyofilen (% 2.1-16.0) ve beta-pinen (% 5.5-21.5) olduğu görülmüştür (Cioni vd. 2006).



Şekil 2.4. *Stevia rebaudiana* Bertoni yaprağında bulunan ana bileşik steviosidin kimyasal omurgası ve diğer ilişkili bazı bileşikler (Ahmed vd. 2011)

Steviol glikozit ve gibberellin mekanizmaları, kauren sentezinde ayrılır. Steviada, kauren tatlı glikozitlerin bel kemiği olan steviole dönüştürülür ve ardından esas tatlandırıcıları oluşturmak üzere glikozile ya da rhaminoz edilirler. Öncül bileşikler kloroplast içinde sentezlenir ve buradan endoplazmik retikulum ve golgi aygıtına taşınır ve koful haline gelir. Söz konusu bu bileşiklerin stevia bitkisindeki rolü henüz net değildir, ancak yapraktaki yüksek konsantrasyonları ve tür içindeki mekanizmanın dönüşümü, evrim süresince bu bileşiklere sahip olan bitkilerin önemli avantaja sahip olduğunu göstermektedir. Bazı araştırmacılar bunların böcekleri püskürtmeye yaradığını düşünürken, bazılarıysa gibberellik asit düzeyinin kontrol edilmesi için gelişmiş bir araç olduğunu bildirmişlerdir (Smith ve Van-Stadin 1992).

İfade edilmiş dizi etiketleri (Expressed Sequence Tag - EST) genomik araştırmalar sonunda ortaya çıkan güçlü bir araçtır. İfade edilmiş dizi etiketi derlemeleri, gen ekspresyon desenleri, gen regülasyonu ve dizi çeşitliliğini gösterebilir. Günümüzde zengin kütüphaneler ve verimli yüksek işlem hacmine sahip yöntemler yaygın olduğundan, EST'ler metabolik odaklı durumlarda gen keşfetmek için etkili bir araç haline gelmiştir (Sterky vd. 1998; Ohlrogge ve Benning 2000). Bu kavram ilk olarak kene otundan oleat hidroksilaz izole etmek için kullanılmıştır (Van de Loo vd. 1995). Bu ilk uygulamadan sonra, EST'ler farklı bitkilerin 1-deoksi-D-ksiluloz 5-fosfat (DXP) mekanizmalarından yeni genler bulmak için kullanılmıştır. Günümüzde, transkriptom analizinin birçok farklı metabolik olayda rol alan, yüksek derecede ekspres edilen genlerin tespit edilmesi için kullanılabileceği anlaşılmıştır (Brandle vd. 2002). Yoğun tatlılıkları ve giberellik asit ile yakın yapısal ilişkileri, mekanizmanın oldukça aktif niteliği ile bir araya gelerek, steviol glikozit biyosentezi ve metabolizmaya olan ilgiyi artırmıştır (Totte vd. 2000). *Stevia rebaudiana*'da, bu bileşikler yalnızca yapraklarda bulunan mezofil hücrelerinde sentezlenir ve köklerde bulunmaz. *Stevia rebaudiana*'nın toplam metabolizmanın büyük bir kısmını steviol glikozitlerin sentezine ayırdığı açıktır ve bu durum *Stevia rebaudiana*'yı EST tabanlı gen keşfi çalışmaları için iyi bir aday yapar. Bu olağanüstü metabolik yeteneğine rağmen, steviol glikozitlerin biyosentezinde rol alan genlerden yalnızca birkaçı izole ve karakterize edilebilmiştir (Brandle vd. 2002).

Son yıllarda yapılan deneyler, steviol biyosentezinin ilk adımlarının mevalonat yoluyla değil, plastid lokalize DXP yoluyla olduğunu göstermiştir (Totte vd. 2000). Bu nedenle, steviol glikozit biyosentezinin ilk adımı, tiamin fosfat bağımlı DXP sentaz yoluyla pirüvat ve gliseraldehit 3-fosfattan DXP oluşumudur (Lange vd. 1998; Eisenreich vd. 2001). Ayrıca, dimetilalil difosfatın (DMADP), izopentenil difosfatın (IDP) öncüsü olmayabileceği, IDP ve DMADP'nin farklı sentezlerden meydana geliyor olabileceği de bulunmuştur (Arigoni vd. 1999; Rodriguez- Concepcion vd. 2000).

İzopentenil difosfat ve DMADP, üç ardışık yoğunlaşma reaksiyonu ile meydana gelen geranilgeranil difosfat sentezi yoluyla geranilgeranil difosfata dönüştürülür (McGarvey ve Croteau 1995). Tüm diterpenler gibi, steviol ilk önce protonasyon tarafından başlatılan kopalil difosfat (CDP) sentezi yoluyla -kopalil difosfat siklizasyonu ile GGDP'den sentezlenir (Hedden ve Phillips 2000). Ardından, kauren sentaz tarafından katalize edilen iyonizasyon bağımlı siklizasyon yoluyla, CDP'den kauren üretilir (Richman vd. 1999). Daha sonra kauren, yeni bir P450 mono-oksijenaz tarafından C-19 pozisyonunda kaurenik aside okside edilir (Helliwell vd. 1999). Steviol, C-13 pozisyonunda kaurenik asidin hidroksilasyonu ile üretilir, ancak bu FAD bağımlı mono-oksijenaz için henüz gen izole edilmemiştir (Kim vd. 1996). İki okside edilmiş fonksiyonel steviol gubu, C-19 karboksilatı ve C-13 alkolü, farklı glikozitlerin kimliğini belirleyen şeker yan zincirleri için bağlantı noktaları sağlar. C-13 alkolü arka arkaya glikozile edilir, ilk önce steviolmonosid, sonra steviolbiyosidten steviosid oluşturan C-19 karboksilatı glikosile edilir (Shibata vd. 1991; 1995). Bu biyokimyasal süreç rebaudiosid A oluşturan steviosidin glikozile edilmesiyle son bulur. Rhamnoz edilmiş glikozitler, steviolmonoside UDP ramnoz kısmının ilave edilmesiyle de oluşturulabilir (Richman vd. 1999).

Steviol glikozilasyonunda rol alan enzimler kısmen karakterize edilmiştir ve belirli glikozit kalıplarının kalıtımıyla ilgili bilgi mevcuttur, ancak ilgili genler izole

edilmemiştir (Shibata vd. 1991; Richman vd. 1999). Gen keşfi için kaynak yaratma ve steviol glikozit sentezini anlama düşüncesiyle, Brandle vd. (2002) bir *Stevia rebaudiana* yaprak kütüphanesinden rastgele aldıkları 5548 cDNA'yı dizilemiştir. Elektronik problemler, veritabanı arama ve fark gösterimi ile steviol glikozit biyosentetik yolundaki adımlar için aday genlerin % 70'i aranmıştır. İkincil metabolizma kategorisinde sınıflandırılan 278 EST'nin 62 tanesinin diterpen glikozit sentezi için aday olduğu görülmüştür. Mevalonik asit yolunun hiçbir üyesi, *Stevia rebaudiana* yaprak EST'leri arasında tespit edilmemiştir. Bu bulgu Totte vd. (2000) tarafından yapılan çalışmayı destekler niteliktedir ve DXP yolunun, steviole dönüştürülmek üzere IDP sentezlemekte kullanıldığını kanıtlar. Pirüvat ve gliseraldehit 3-fosfattan rebaudiosid-A'ya olan yolun adımları için adayların % 70'i tespit edilmiştir. En belirgin şekilde yansıtılan EST, kaurenden kaurenik aside üç adımlı oksidasyonda rol aldığı bilinen *Arabidopsis* GA3 geni ortologlarından biri olmuştur (Helliwell vd. 1999). Kaurenik asit sentezi, hem steviol hem de giberellik asit sentezinde kilit bir adımdır.

Çizelge 2.2. Steviol glikozitlerle ilgili bileşiklerin yapısal türevleri

Bileşik	R1 zincir	R2 zincir
Steviosid	β - Glc	β - Glc- β -Glc (2→1)
Steviolbiosid	H	β - Glc- β -Glc (2→1)
Rebaudiosid A	β - Glc	β - Glc- β -Glc (2→1) β - Glc- (3→1)
Rebaudiosid B	H	β - Glc- β -Glc (2→1) β - Glc- (3→1)
Rebaudiosid C	β - Glc	β - Glc- α -Rha (2→1) β - Glc- (3→1)
Rebaudiosid D	β - Glc- β -Glc (2→1)	β - Glc- β -Glc (2→1) β - Glc- (3→1)
Rebaudiosid E	β - Glc- β -Glc (2→1)	β - Glc- β -Glc (2→1)
Dulcoside A	β - Glc	β - Glc- α -Rha (2→1)

Stevia Amerika Birleşik Devletleri'nin bazı kısımları da dahil olmak üzere, subtropikal bölgelerde çok yıllık bir bitki olarak ve yüksek enlem bölgelerinde yıllık bir bitki olarak yetiştirilir (Goettemoeller ve Ching 1999). Bitkinin gelişimi radyasyon, gün uzunluğu, sıcaklık, toprak nemliliği ve rüzgardan etkilenir. Yapılan çalışmalar verimin iklim ve çevre koşullarından etkilenen stevianın genetik karakterine bağlı olduğunu gösterir (Ermakov ve Kotechetov 1996). Ayrıca, terpenlerin sentezi iklimsel ve çevresel koşullardan etkilenir (Langston ve Leopold 1954). Chen ve diğerleri (1995), steviosid içeriğinin mevsimsel değişimini araştırmıştır. Tateo ve diğerleri (1998), çevresel ve tarımsal faktörlerin steviosid üretimi üzerinde daha fazla etkisi olduğu yönünde görüş bildirmiştir. *Stevia* için ideal sıcaklığın 23 °C ortalama ile 6.0 ile 43°C arasında

değiştirdiği, yarı nemli subtropikal bir iklimdir (Brandle ve Rosa 1992). Mısır'da yapılan bir araştırmada, sıcaklık, ışık periyodu uzunluğu ve yoğunluğu gibi iklim koşullarının, kışa kıyasla yazın elde edilen verimdeki bariz artıştan da anlaşıldığı gibi, stevia üretimini ve kalitesini önemli derecede etkilediği ortaya konulmuştur.

Kısa günlere kıyasla, uzun gün koşulları boğum arası uzunluğu, yaprak alanını ve kuru ağırlığı artırır ve *Stevia rebaudiana*'da bulunan ardışık yaprak çiftleri arasındaki aralığı azaltır. Toplam çözünür şeker, protein ve steviosid içeriği de hem göreceli hem de mutlak anlamda artar ve steviosid içindeki mevcut aglikon ile steviol biyosentezide % 45 oranında artar. Stevia yapraklarındaki glikozit konsantrasyonu, bitki uzun gün koşulları altında yetiştiğinde artış gösterir. Glikozit sentezi çiçeklenme sırasında ya da çiçeklenmeden hemen önce azaldığı için, çiçeklenmenin uzun gün koşulları sayesinde geciktirilmesi, glikozit birikimi için daha fazla zaman yaratır (Metivier ve Viana 2005). Sekaran vd. (2007), *ex vitro* yeşil yapraklarda 1.65 lik ve *in vitro* fidanlarda 0.9' lik bir rebaudiosid A/steviosid oranı göstermiştir. Sadece şiddetli kalsiyum (Ca) eksikliği glikozit konsantrasyonunda azalmaya sebep olmuştur (DeLima vd. 1997). En son tamamıyla genişleyen yaprak çiftlerinin kimyasal içeriği, bitkinin besinsel durumunu göstermiştir (Utumi vd. 1999).

2.2.2. Stevianın farklı kısımlarındaki steviol glikozit içeriği

Bitki organları aşağıdaki sıraya göre azalan, farklı miktarlarda tatlı glikozit içerir: yaprak, çiçek, sap, tohum ve kök. Kökler steviosid içermeyen tek organlardır. Yapraklardaki tatlılık, çiçeklerdeki tatlılığın iki katı yüksektir (Dwivedi 1999). Sekaran vd. (2007) bireysel stevia dokularındaki steviosid miktarının, aşağıdaki sıraya göre azalmak üzere ciddi anlamda farklılık gösterdiğini rapor etmiştir: yaprak, fidan, kök, çiçek. En yüksek steviosid içeriğinin yapraklarda bulunması, yaprakların steviosid bileşiklerinin hem sentezi, hem de birincil birikimi için temel doku görevi gördüğünü gösterir. En yüksek steviosid miktarı üstteki genç, aktif olarak büyüyen fidan kısımlarında bulunurken, en alttaki yaşlanan fidan bölümleri en düşük steviosid miktarına sahiptir. Ontojeni sırasında, hem olgun yapraklardaki hem de saplardaki steviosid konsantrasyonunda kademeli bir artış gözlenmiştir ve bu süreç çiçeklenmenin başlangıcındaki tomurcuklanma aşamasına kadar sürmüştür.

Stevianın alttaki olgun yapraklarında, üstteki daha genç yapraklara kıyasla yaprak yüzey alanı başına daha az salgı bezi vardır. Bu da salgı bezi dağılım yoğunluğu ile steviol glikosid içeriği arasında pozitif bir korelasyon olduğu anlamına gelir. Bu korelasyon muhtemelen üst genç yapraklarda, alttaki yaşlanan yapraklara kıyasla %30'dan %170'e artmış olan glikozit birikimi lehinedir. Klona bağlı olarak, toplam glikozit içeriğindeki rebaudiosid A oranı da artış göstermiştir. Ontojeni sırasında, glikozit içeriğindeki küçük varyasyon köklerde de görülür. Bitkisel aşamadan çiçeklenmeye kadar, bu organlardaki glikozit içeriğinde kademeli bir azalma gözlenmiştir. Tohum gelişim aşamasında, glikozit düzeyinin başlangıçtaki seviyeye döndüğü tespit edilmiştir. Ancak, köklerdeki toplam glikozit içeriği asla % 0.1'i geçmez (Bondarev vd. 2003). Kang ve Lee (1981), yapraklardaki en yüksek steviosid içeriğine çiçek tomurcuklarının oluşumu sırasında ulaşıldığını, sonrasında kademeli olarak azalma gerçekleştiğini göstermiştir. Tüm bu bilgiler, steviol glikozitinin generatif organlara taşındığının indikatörü olabilir. Benzer sonuçlar *Rhaponticum carthamoides*, *Ajuga reptans* ve *Serratula coronata*'da bulunan disteroidler için de bulunmuştur

(Anufrieva vd. 1998).

Steviol glikozitler tüm bitki düzeyinde, yaşlandıkça dokularda birikme eğilimi gösterir. Böylece daha olgun alt yapraklar, daha genç üst yapraklara kıyasla daha fazla tatlandırıcı barındırır. Kloroplastlar öncül sentezde önemli olduğundan, kök ve alt sap gibi klorofil ihtiva etmeyen dokularda glikozit bulunmaz ya da eser miktarda bulunur. Çiçeklenme başladıktan sonra, yapraklardaki glikozit konsantrasyonu azalmaya başlar (Singh ve Rao 2005). Stevia bitkisinin sapsı tatlandırıcı içermez ya da çok az miktarda içerir. Buna rağmen sapsı gıda maddeleri veya alkollü içeceklerin iyileştirilmesi için kullanılabilecek bazı lezzet artırıcılar, koku veren maddeler ya da diğer ajanların olduğu belirtilir (Singh ve Rao 2005). Sapsı olgunlaştıkça ve renklerini kaybettikçe, mevcut tüm steviosid içeriği kaybolur. Stevia köklerinin yapısı, gelişimi ve kimyasal içeriği de dikkat çekmiştir (Yamazaki vd. 1991; Zubenko vd. 1995).

2.2.3. Stevia rebaudiana Bertoni'nin biyolojik aktivitesi

Stevia rebaudiana türünün tatlı diterpen glikozitleri üzerine kapsamlı farmakolojik ve toksikolojik çalışmaların aksine, çok az sayıda izole edilmiş maddenin biyolojik potansiyeli rapor edilmiştir. Ayrıca, stevia türlerinde de bulunan, ancak farklı bitkisel kaynaklardan elde edilen birçok bileşiğin önemli biyolojik ve/veya farmakolojik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Seskiterpen laktonlar, Asteraceae familyasının biyolojik olarak geniş ve çeşitli aktif madde bileşeni grubunu oluşturur ve stevianın tıbbi özelliklerinden bazıları bu bileşiklerin yüksek miktarda bulunmasının bir sonucudur. Daha önce yapılan önemli incelemelerde, bu aktif maddelerin kimyasal ve taksonomik önemi ve biyolojik aktiviteleri ele alınmıştır (Robles vd. 1995). *Stevia yaconensis* ve *Stevia chamaedrys* türlerinin toprak üstü kısımları da dahil olmak üzere (Zdero vd. 1988) bir çok şifalı bitkinin aktif bir bileşeni olan kostunolid, insan hepatom (karaciğer tümörü) hücrelerinde Hepatit B virüs yüzey antijeni gen ekspresyonunu bastırır (Chen vd. 1995). *Stevia sarensis* (Zdero vd. 1988), *Stevia procumbens* ve *Stevia maimarensis* (Hernández vd. 1996 b) türlerinden izole edilen öpatoriyopikrin ve bunun yanı sıra *Stevia yaconensis* var. *subeglandulosa* (Sosa vd. 1989) türünden izole edilen lökozin türevlerinin, şempanzeler tarafından tüketilen ve tedavi edici özellikleri olduğu iddia edilen bitkilerin önemli bileşenleri olduğu tespit edilmiştir. Öpatoriyopikrinin, farelerde Lewis akciğer tümör sisteminde güçlü anti-tümör aktivitesi olduğu gösterilirken, lökozinin, 13-dehidro türevinin anti-ülser aktivite gösterdiği ortaya koyulmuştur (Robles vd. 1995). Bu maddenin aynı zamanda, halk tıbbında anti-ülser ajanı olarak kullanılan *Artemisia douglasiana* (Asteraceae: Anthemideae) yapraklarındaki gastrik hücre koruyucu ajan olduğu tespit edilmiştir (Giordano vd. 1990). *Stevia yaconensis* var. *Subeglandulosa* türünden izole edilen ludartinin, dehidrolökozinden daha güçlü bir hücre koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (Giordano vd. 1990).

Stevianın ham ekstratları, anti-mikrobiyal ve anti-mantar aktivite göstermiş ve bu bazı durumlarda seskiterpen lakton ve/veya flavonoid varlığı ile ilişkilendirilmiştir (Montanaro vd. 1996). Biyootografik deneylerle yapılan değerlendirmelere göre, *Stevia brevifolia* (Hernández vd. 1994) türünde bulunan kastisinin, *Cladosporium cucumerinum*'a karşı *Psiadia trinervia* (Asteraceae: Astereae) ekstratları tarafından gösterilen anti-mantar aktiviteden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Wang vd. 1989). *Stevia organoides* (Rajbhandari ve Roberts 1985a), *Stevia satureiaefolia*, *Stevia procumbens*

(Sosa vd. 1989), ve *Stevia brevifolia* (Hernández vd. 1994) türlerinde bulunan flavonoid öpatorin, solunum dizisinin complex I (NADH-koenzim Q redüktaz) kısmında, temel bir inhibisyon bölgesi gösteren mitokondriyal NADH oksidaza karşı inhibitör etkinlik göstermiştir (Hodnick vd. 1994). Tarımsal anlamda önemli olan mantar patojenlerinin büyümesinin, seçilen seskiterpen laktonlarla inhibe edilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. En aktif bileşiklerin isoalantolakton ve bunların izomerleri olduğu bulunmuştur (Picman ve Schneider 1993; Calera vd. 1995) ve bunlar da *Stevia polyphylla* türünün önemli bileşenleridir.

Eupatorium riparium (Asteraceae:Eupatorieae) türünden izole edilen metilripariyokromen, tropikal bir patojen türü olan *Colletotrichum gloeosporioides* de dahil olmak üzere beş mantar türüne karşı anti-fungal aktivite göstermiştir (Bandara vd. 1992). Daha önce belirtildiği gibi, bu madde *Stevia serrata* türünün bilinen bir bileşenidir. *Stevia purpurea* (Bohlmann vd. 1976) türünden izole edilen bisabolen epoksidlerin, *Nezaria viridula* (Heteroptera: Pentatomidae) böceğinin erkek seks feromon ana bileşenleri olduğu bulunmuştur (Brezot vd. 1994). *Eucommia ulmoides* (Eucommiaceae) türünden izole edilen ve *Stevia gisebachiana* (Sigstad vd. 1991) türünde de mevcut olan loliolid 151 numunesi, orta düzeyde immünsüpresif aktivite göstermiştir. Bu maddenin T lenfosit çoğalma perturbasyonu gerçekleştirildiği öne sürülmüştür (Okada vd. 1994).

2.3. *Stevia rebaudiana* Bertoni'de Islah Yaklaşımları

Stevia için ıslah programları toplam steviol glikozit, rebaudiosid A / steviosid oranı ve yüksek yaprak verimini elde etmeye yönelik olmalıdır. Şimdiye kadar, steviada ıslah çalışmaları büyük ölçüde yaprak verimini ve rebaudiosid A konsantrasyonunu geliştirmeye odaklanmıştır. Yapılan çalışmalar steviada yaprak verimi, rebaudiosid A / steviosid oranı ve istenilen oranda rebaudiosid A konsantrasyonu elde etmek için gerekli genetik çeşitliliğin var olduğunu ortaya koymaktadır (Shizhen 1995). *Stevia rebaudiana* yapraklarındaki rebaudiosid A / steviosid oranı genellikle 0.5 ya da daha azdır. Steviosid glikozitinin ham ekstresi karakteristik bir acı tat verir. Bunun aksine, en değerli ekstreler ana bileşen olarak organoleptik ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı diğer tüm glikozitlere göre en iyi profile sahip olan ve suda çözünebilen rebaudiosid A içerenlerdir (Huang vd. 1995). Bu nedenle, yüksek oranda rebaudiosid A içeren yeni *Stevia rebaudiana* çeşitlerinin fitokimyasal karakterizasyonlarının geliştirilmesi, bu doğal tatlandırıcı kaynağının değerlendirilerek, kullanılabilir hale getirilmesi bu bitkiyle çalışan ıslahçıların birincil amacı olmuştur (Sekaran vd. 2007). Yabancı tozlandığı ve doğal çeşitlilik yüksek olduğu için, yetiştiriciler yapraklardaki tatlılık seviyesinin ve rebaudiosid A / steviosid oranının yüksek olduğu hatları elde edebilirler (Huang vd. 1995).

Steviada iki tür tohum bulunur; siyah ve taba renkli tohumlar. Siyah tohumlar, taba tohumlara kıyasla daha ağırdır. Goettemoeller ve Ching (1999) stevianın düşük tohum çimlenmesini araştırmış ve tetrazolium klorüre dayalı olarak tohum canlılığını test etmiş, siyah tohumların canlılığının (% 76.7) taba tohumların canlılığına (% 8.3) kıyasla çok daha yüksek olduğunu bulmuştur. Çapraz tozlaşma ve kendi kendine tozlaşma, polenin bir kürdanın ucundaki bombus arısı (*Bombus impatiens*) göğsü ile aktarılması ile başarılmıştır. Tozlaşma işlemlerinin yanı sıra, ışık ve karanlığın çimlenme üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. Işık siyah tohumların çimlenmesini

artırır, ancak taba tohumlarınınkini artırmaz. Bu durum, taba tohumlarının döllenme olmadan üretilen cansız tohumları temsil ettiğini gösterir.

Bombus arısı ile çapraz tozlaşma (% 78.3), elle çapraz tozlaşma (% 92.0), rüzgarla çapraz tozlaşma (% 68.3), elle kendi kendine tozlaşma (% 93.3) ve kontrol (% 36.3) olmak üzere beş tozlaşma işleminden elde edilen tohum çimlendirme çalışması, bu klonlarda uyumsuzluğun etken olmadığını göstermiştir. Ancak tüm tozlaşma işlemleri, siyah tohumların çimlenmesini kontrole kıyasla artırmıştır. Bu durum tozlaşmanın elde edilmesi için çiçeklerin aktif manipülasyonunun gerekli olduğunu gösterir (Goettemoeller ve Ching 1999).

Stevia tohumlarının çimlenme oranları büyük değişiklik gösterir. 25°C sıcaklıkta % 62-90 arası son çimlenmenin üçte ikisine ulaşılması 4-6 gün sürebilir. Çimlenme en az 20°C ve genellikle 25°C üzeri sıcaklık gerektirir ve ışık genel itibarıyla çimlenmeyi artırır. Sıcaklığın 24 saatten kısa bir süre için artırılması (nemli kağıt üzerinde 40°C) çimlenmeyi hızlandırabilir, ancak toplam çimlenmeyi azaltır (Tanaka 1985). Japonya’da, tohum düşük nemlilik ve karanlıkta saklandığında, 3 yıla kadar canlılığını sürdürmüştür (Kawatani vd. 1977). Bu durum 0°C optimum saklama sıcaklığında, 3 yıldan sonra canlılığın % 50 azaldığı iddiasıyla ters düşer. Başka bir deneyde, araziden ve seradan toplanan tohumlar çimlenme bakımından karşılaştırılmıştır. Seradan toplanan tohumlar % 90 çimlenme oranına sahipken, araziden toplanan tohumların yalnızca % 34 çimlenme oranına sahip olduğu görülmüştür (Carneiro 1996). 1 yılda üretilen toplam canlı tohum sayısı belirsizdir. 200 hektarlık ürün için, % 50 çimlenme ile 8 kg ha⁻¹ kadar tohum verimi yeterlidir (Lester 1999).

Stevia rebaudiana ’nın yabani popülasyonlarında, fenotip ve yaprak analizleri büyük değişkenlik gösterir. Shock (1982) canlılık denemesi için 200 sıra bitki ekmiş ve 17 sıranın verimliliğini izlemiştir. Seleksiyon programı belirli bir süre devam ettikten sonra bile, yapraklardaki steviosid içeriği, bitkiler arasında önemli ölçüde değişiklik gösterebilmektedir (% 4-16). Bu doğal değişkenlik kısmen de olsa türün büyük ölçüde genetik olarak kendisine yakın olmayan bitkilerle çaprazlanması nedeniyle olabilir.

Monteiro (1980), popülasyonda bulunan fenotipik farklılıkları araştırmış ve bunları geçerli bir taksonomik çeşitliliğe ayırmayı başaramamıştır. Ayrıca, ekilen *Stevia rebaudiana* bitkilerinden elde edilen tatlandırıcı moleküllerin üretiminde nicel ve nitel düzensizlik olduğu rapor edilmiştir. Popülasyon içindeki fenotipik çeşitlilik, türün açık tozlaşma davranışı ile ilişkilendirilir (Tateo vd. 1998). Nurhaimi ve Toruan (1995), altı bitkicik gubu arasında DNA parmak izleri bakımından somaklonal varyasyonlar olduğunu göstermiştir. Çin’de yapılan bir araştırmada, tek bir klondan alınan bitki numunelerinde, steviosid içeriğinin % 1.48’den % 6.98’ e kadar, rebaudiosid A içeriğinin % 4.5’ den % 12.1’ e kadar ve toplam glikozidin % 10.26’ dan % 19.57’ ye kadar değiştiği rapor edilmiştir (Huang vd. 1995). Çin’de yapılan başka bir araştırmada, bazı sıralardaki toplam tatlı glikozit konsantrasyonunun % 20.5’ e kadar çıktığı ve farklı bir çeşitte rebaudiosid A / steviosid oranının 9/1 olabildiği rapor edilmiştir (Shizhen 1995). Hammaddedeki böyle bir çeşitlilik, bireysel glikozitleri tekrar kristalize etmeye gerek kalmadan, % 85’ in üzerinde rebaudiosid A içeren stevia tatlandırıcılarının geleneksel ekstraksiyon metotlarıyla üretilmesini mümkün kılacak niteliktedir. Palampur’ da bulunan Himalaya Biyokaynak Teknoloji Enstitüsü tarafından incelenen *Stevia rebaudiana* popülasyonunda önemli morfolojik varyasyon gözlenmiştir. Bu

popülasyon aynı zamanda steviosid içeriği bakımından, % 1 ile % 10 arasında değişebilen, önemli bir varyasyon göstermiştir (Megeji vd. 2005). Elde edilen bilgileri ideal bir bitki tipi geliştirmek adına kullanmak için stevianın genetik anlamda iyileştirilmesi, ancak mevcut morfolojik, kimyasal, biyokimyasal, sitogenetik ve moleküler çeşitliliğin karakterize edilmesiyle mümkündür. Delhi Araştırma İstasyonu'nda (Ontario, Kanada) yetiştirilen stevia bitkilerinin yaprak kuru ağırlığının, sap kuru ağırlığından 1.22 kat daha fazla olduğu bulunmuştur, bu oran Kaliforniya' da yetiştirilen bitkiler içinse yaklaşık 0.67 olarak bulunmuştur (Brandle ve Rosa 1992).

Gen kaynağı, ürünlerin geliştirilmesi için çok önemli bir malzemedir. Bir alandan diğerine gen kaynağı sunulması, özellikle gelişmekte olan ülkelerde yetiştirme için önemli bir durumdur. Yetiştirme programlarında gen kaynağındaki gen çeşitliliğinin yüksek olduğu ve üstün özelliklere sahip olanlar gen kaynağı olarak kullanılır. Sunulan gen kaynağı doğrudan ticari çeşitler olarak kullanılabilir. Ancak, gen kaynağı adaptasyonu uzun vadeli bir programdır. Gen kombinasyonları birçok nesil boyunca devam ettirilmeli ve istenilen gen kombinasyonları için seleksiyonu kademeli olarak uygulanmalıdır.

Dünya çapında stevia araştırma ve derleme çalışmaları yapan kurumlar, Paraguay'daki yabani, doğal ortamından tohum ve bitki malzemesi toplamıştır (Tateo vd. 1998). Tohum toplama altında yatan mantık, genotiplerin değil, genlerin muhafaza edilmesidir. Büyüme alışkanlıkları ve tatlılık bakımından morfolojik olarak çeşitlilik gösteren iki *Stevia rebaudiana* genotipi, Himalaya Biyokaynak Teknoloji Enstitüsü tarafından muhafaza edilerek çoğaltılmaktadır. Arzu edilen bitki türlerini elde etmek için seçimin devamında, bireysel olarak seçilen bitkilerin döller ayrılmaktadır.

Stevia yetiştirme işleminin başarısı, ebeveyn seçimine, çaprazlamaya, yeterli popülasyon yetiştirmeye ve seçime bağlıdır. Doğada, stevia yapraklarındaki toplam glikozit konsantrasyonu tipik olarak kuru ağırlık bazında % 2 ile 10 arasında değişir. Yürütülen ıslah ve seleksiyon çalışmalarıyla, stevia yapraklarındaki glikozit konsantrasyonu neredeyse % 20'ye kadar çıkarılmıştır (Huang vd. 1995). Ancak, stevia yapraklarındaki toplam glikozit konsantrasyonu dikkate alınarak, fenotipik seçime dayalı olarak yapılan bu çalışmalar toprak, iklim gibi çevresel koşullardan ciddi anlamda etkilenmektedir. Daha da önemlisi, büyümenin nispeten geç bir döneminde seçim yapılmasını gerektirir. Erken büyüme evresinde yapılan seçim en düşük etkiye sahiptir, zira fidanlar çeşitliliğin yalnızca % 20-30 kadarının genetik olacağı derecede çevre koşullarından etkilenir (Brandle ve Rosa 1992). Sonuç olarak, yüksek miktarda glikozit üreten bitkilerin seçilmesi pahalı ve zaman isteyen bir işlemdir (Yao vd. 1999).

Stevia üzerine bir süredir araştırma yapan ülkelerin hepsi, özellikle Japonya, Çin, Kore, Tayvan ve Rusya, yetiştirme/seçim programlarının başarılı olduğunu rapor etmişler ve iyileştirilmiş glikozit içeriği ve daha yüksek verime sahip yeni çeşitler üretmişlerdir. Yetiştirme programlarının çoğu melezleme ve seçim üzerine kuruludur. Klonlama tek tek seçilen bitkilerin çoğaltılması için sıkça kullanılmaktadır. Bu seçimlerden bazıları, çok verimli olmalarına rağmen, kendi içinde uyumsuzdur ve yalnızca bitkisel olarak çoğaltılabilir (Lee vd. 1982). Yeni melezler üretmek için kullanışlı olsalar da, bu durum ticari kullanımlarını kısıtlar.

Dünyanın başka yerlerinde yapılan girişimler, üstün bitki türleri için patentlerle sonuçlanmıştır. Başlangıç malzemesindeki 0.36:1'lik rebaudiosid A / steviosid oranına kıyasla, 0.96:1'lik rebaudiosid A / steviosid oranına ve % 22.4 oranında toplam glikozite sahip bir çeşit geliştirilmiştir (Lee vd. 1982). Rebaudiosid A / steviosid oranı 9.1/1'e kadar çıkan diğer bitkiler de yetiştirilmiştir, ancak bunların toplam steviol glikozit oranı yalnızca % 10.1 kadardır (Morita 1987). Yine kendi içinde uyumsuz olmasından dolayı, söz konusu çeşit, tohum bazlı bir üretim sistemi kullanılarak yeniden üretilmemiştir.

Tekrarlayan seleksiyon, çapraz tozlaşma uygulanan türün kantitatif kalıtsal karakterlerini iyileştirmek için yararlıdır. Kendi içinde uyumsuzluğun yüksek heterojenlik seviyesi sağladığı *Stevia rebaudiana*'da, tekrarlayan seleksiyon çimlenme veriminin yanı sıra toplam glikozit içeriğini artırmanın da en etkili yoludur. Popülasyon iyileştirmede, bitki yetiştiricileri üstün rekombinasyonların seçimi ile istenilen allellerin sıklığını arttırmayı amaçlamaktadır. Tekrarlayan seçim tipik olarak kaynak popülasyondan bireysel açık tozlaşan bitkilerin hasatı ile başlar. Bu bitkilerin tohumlarının bir kısmı bir rezerv olarak saklanır. Döl sıralarının tarımsal karakterleri görsel olarak değerlendirilir ve üstün sıralar tespit edilir. Seçilen sıralar ayrı olarak hasat edilir. Döl performansına dayalı olarak, seçilen tekil bitkilerden eşit miktarda rezerv tohum karıştırılır. Bu ilk tekrarlayan seleksiyon döngüsü, yeni kompozitin bitkiler arasında rastgele eşlemeye izin verilen izole bir arazide yetiştirilmesiyle başlar. Her kompozitin kalan bitkilerinden, her tekrarlayan seçim döngüsünde iyileştirilmesi hedeflenen karakterlerin seçime verdiği yanıtı belirlemek için, çoğaltılmış verim denemelerinde kullanılmak üzere toplu tohum örneği hasat edilir. Tekrarlayan seçim, seçime karşı uygun bir yanıt elde edene kadar devam eder. Her tekrarlayan seçim döngüsü, potansiyel bir çeşit olan yeni bir popülasyon üretir. İstenen allel sıklığı artırılarak geliştirilmiş popülasyon, çeşit olarak ya da üstün bireysel genotipleri tespit etmek için bir kaynak olarak kullanılabilir.

Rebaudiosid A bakımından zenginleştirilmiş ve yüksek steviol glikozit içeriğine sahip, tohumdan üretilen transplantlara dayalı olarak nispeten düşük maliyetli bir yöntemle üretilen bir stevia çeşit geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle, klonların melezlenmesi ya da tekrarlayan seçim döngüsünde bir yetiştirme popülasyonundan alınan aynı soydan gelen sıralardan bir sentetik çeşit gereklidir. Sentetik bir çeşidin geliştirilmesi için birden fazla sıraya ihtiyaç vardır ve sıralar ya da klonlar genellikle kombinasyon becerileri bakımından test edilir, sentetik çeşit korunur ve rastgele melezleme ile kombine edilir. Bu gibi sentetik çeşitlerin bitki üretim sistemlerinde kullanılması amaçlanır. Türün büyük ölçüde genetik olarak kendisine yakın olmayan bitkilerle çaprazlanması ve etkili bir tozlaşma kontrolü sisteminin olmayışı nedeniyle, kompozitler ve sentetikler mevcut heterozun bir kısmını yakalamak için kullanılır. En pratik ve en etkili yetiştirme yöntemi budur. Japonya ve bazı diğer ülkelerde, sentetik çeşit geliştirmeye dayalı olarak steviayı bir tarımsal ürün haline getirme konusunda yoğun çabalar söz konusudur.

Mutagenез, çeşitliliği artırmak ve istenen ekonomik özellikleri geleneksel yetiştirme prosedürlerine kıyasla daha kısa sürede izole etmek için kullanılacak bir araçtır. Doğada bulunan çeşitliliğin kaynağı, bitkinin evrimi sırasında gerçekleşen doğal mutasyonların birikimidir. Hem fiziksel hem de kimyasal mutajenik ajanların keşfiyle birlikte, bitki yetiştiricileri çeşitlilik yaratma ve bu çeşitliliği yetiştirme programlarında

kullanma imkanını elde etmiştir. X ışınları, gamma ışınları, hızlı nötronlar, termal nötronlar ve kimyasallar da dahil olmak üzere bir çok mutajenik ajan yararlı mutasyonlar üretmek için kullanılabilir. Kobalt-60 gamma ışınları ile yapılan irradasyon işlemi, yetiştirme hatlarında çeşitlilik yaratmak için kullanılmıştır (Toruan-Mathius vd. 1995). Popülasyon söz konusu karakterle ilgili olarak düşük çeşitlilik gösterdiği takdirde, istenilen karakterler ancak mutasyon yoluyla geliştirilebilir. Bu bitkinin ekonomik açıdan önemli kısmı yapraklar olduğundan, mutasyon ile yetiştirme stevianın geliştirilmesinde çok önemli bir rol oynayabilir. Stevia tohumlarının gama irradasyonu çimlenmeyi etkilemez, ancak yüksek dozlarda uygulandığında kök gelişimini bastırır.

Melezleme büyük genetik varyasyonlar ve heterotik yanıtlar elde etme fırsatı sunar. Hangi bitki söz konusu olursa olsun, melez geliştirmedeki başarı ekonomik verim bakımından heterotik yanıtın varlığına ve tohum üretim maliyeti bakımından ekonomik elverişliliğe bağlıdır. Budama işlemlerinden elde edilen dişi bitkilerin tohumları ile eril bitkilerin tohumlarının toplanması ve melezlenmesini kapsayan bir melez *Stevia rebaudiana* tohumu yetiştirme metodu önerilmiştir. Avantajları düşük maliyetli olması, rebaudiosid A ve steviosid içeriğinin yüksek olmasıdır. Wang (2006), sistematik olarak iyi tekil bireylerin yetiştirilmesi, iyi kombinasyonların seçilmesi ve uygulanması, klon ebeveyn bitkilerin yayılması, üretken tohumların melezlenmesi ve toplanan tohumların karıştırılmasını içeren, sistematik olarak bir *Stevia rebaudiana* klon ebeveyn bitkisi yetiştirilmesi yoluyla yeni bir melez çeşit üretilmesini önerir. Ebeveyn bitkinin aseksüel yayılmasındaki amaç, iyi özelliklerin korunması ve ebeveyn bitki klonunun grup melezlemesini gerçekleştirmesini sağlamaktır. Bu da geleneksel yetiştirme yöntemlerine kıyasla daha basit bir program ve daha hızlı verim elde etmek demektir. Bu metoda göre, yetiştirilen yeni *Stevia rebaudiana* çeşidi daha yüksek dayanıma, yüksek yaprak randımanına ve yapraklarda yüksek toplam glikozit içeriğine sahiptir.

Tarımsal verimi artırmak için poliploidi indüksiyonu, ekonomik nedenlerle üretilen bitkilerde yaygın olarak kullanılan bir süreçtir (Allard 1960) ve *Nicandra physaloides* (Gupta ve Roy 1986), kahve (Cruz vd. 1993), *Clitoria ternatea* (Gandhi ve Patil 1997) ve portakal gibi diğer türler için kullanılmıştır. Bireylerin daha iyi adaptasyonu ve artan organ ve hücre boyutları genellikle poliploidi ile ilişkilendirilir (Guerra 1988). Kromozom sayısı farklı bireyler arasında melezleme genellikle steril döle yol açar. Allard'a göre (1960), ebeveynleri diploid ve tetraploid olan çeşitli tarımsal bitkilerde, dölleri kısmen ya da bütünüyle steril ve tohum ihtiva etmeyen triploidlerdir.

Valois (1992), *Stevia rebaudiana* tohumlarını % 0.001 ve % 0.5 arasında değişen konsantrasyonlarda 18 saat boyunca dokuz işlemde kolhisine (antimitotik bir ajan) batırarak poliploid türleri geliştirmiştir. Poliploidleşme yalnızca iki işlemde doğrulanmıştır, bu da en düşük kolhisin konsantrasyonuna denk gelir. Yani, triploid *Stevia rebaudiana* bitkileri, tetraploid dişi ebeveyn ve diploid eril ebeveynin çiftleşmesiyle üretilir. Triploid *Stevia rebaudiana* bitkileri yüksek miktarda, çok tatlı bir diterpenoid olan rebaudiosid A içerir (Shuichi vd. 2001). Poliploidler kullanılarak stevianın glikozit kalitesi geliştirilmiş olur. Triploid ve tetraploid bitkileri, diploidlere kıyasla daha düşük bir tetrad normalite oranına sahiptir. Tüm poliploid türleri cansız polenlere sahiptir. Dolayısıyla, ploid sayısı arttıkça, polen ve stoma boyutu artar ve bunların birim alandaki sayıları azalır. Triploid türlerden en kısa ve en düşük çiçek

sayısına sahip bitkiler üretilirken, tetraploid türü en geniş yapraklara sahiptir. Varyans analizi, ploidi düzeyi ve incelenen tüm morfolojik özellikler arasında pozitif yönde bir korelasyonla birlikte, türler arasında yüksek düzeyde istatistiksel farklılık olduğunu ortaya çıkarmıştır (Oliveira vd. 2004).

Shuichi vd. (2001) tarafından triploid stevia bitkileri yetiştirilmiş ve sekiz çeşite ayrılan 42 adet triploid bitki elde edilmiştir. Kök ucu hücrelerin kromozom sayısı hesaplanarak ve flow sitometrisi analizi sonucunda ortaya çıkan kromozom sayısı, bu bitkilerin triploid olduğunu göstermiştir ($2n = 33$). Bu triploid bitkilerde, yapraklar, çiçekler ve koruyucu hücreler diploid olarak sınıflandırılan bitkilere nazaran daha geniştir. Triploid bitkilerin yaprak şekli, iğnemi veya geniş iğnemi olarak kategorize edilmiştir. Yüksek rebaudiosid A içeriğine sahip tetraploid SMX1W ile yüksek rebaudiosid A içeriğine sahip yedi çeşit diploid çeşitinin melezlenmesinden elde edilen, T1'den T7'ye yedi çeşit triploid bitki üzerinde yapılan ince tabaka kromatografisi ve HPLC analizleri, 0.63'den yüksek bir oranla (rebaudiosid A: steviosid) yüksek bir rebaudiosid A içeriği göstermiştir. Diğer yandan, yüksek steviosid içeriğine sahip tetraploid KSW ile yüksek rebaudiosid A içeriğine sahip diploid SMX6 melezlenmesinden elde edilen T-8 yüksek steviosid içeriği göstermiştir (rebaudiosid A oranı = 0.23). Triploid bitkilerin toplam tatlandırıcı içeriği ve rebaudiosid A oranının mevsimsel değişimi, toplam içeriğin Ağustos ayına kadar arttığını, rebaudiosid A oranının sabit kaldığını göstermiştir (Shuichi vd. 2001).

Stevia tohumları, oldukça düşük bir çimlenme yüzdesi gösterir. Stevianın hızlı çoğaltılmasına yönelik bilinen en etkin proses doku kültürüdür. Stevianın sürgün uçları ve yapraklardan *in vitro* mikro-çoğaltımına (Ahmed vd. 2007) dair çok az rapor vardır (Miyagawa vd. 1986). Hücre ve doku kültürü teknikleri, yaygın olarak iki çenekli bitkilerin büyümesi ve metabolizmasının çalışmak üzere kullanılmıştır (Ahsan vd. 2000). *In vitro* kültürden bitki rejenerasyonu, embriyogenez veya organogenez ile elde edilebilir. Steviada rejenerasyon, yapraklar (Ferreira ve Handro 1987a, b), yan sürgünler (Bespalkok-Filho vd. 1992), kök uçları (Tamura vd. 1984b), süspansiyon kültürleri (Ferreira ve Handro 1988) ve anterler (Flachsland vd. 1996) gibi eksplantlarından organogenez ile elde edilmiştir. Somatik embriyogenez, daha önce yapraklar (Bespalkok-Filho vd. 1993) ve köklerden (Miyagawa vd. 1984) rapor edilmiştir. Somatik embriyogenez ayrıca, 2,4-D (9,05 ve 18,10 mM) ve kinetin (0 ila 9,29 mM) ile takviye edilmiş MS ortamında kültürlen *Stevia rebaudiana*'nın çiçekçik eksplantlarından elde edilebilir. 9.05 mM 2,4-D ile takviye edilen ortamda maksimum embriyojenik kallus oluşumu, kinetin içermeyen ortamda meydana gelmiştir. 18.10 mM 2,4-D ile takviye edilen ortamda en iyi sonuç veren uygulama, 2.32 mM kinetindir. Embriyojenik kallus, taç ve yumurtalık tabanında başlamıştır (Bespalkok Filho ve Hattori 1997). Embriyojenik kallus, genel olarak açık yeşil veya açık sarı bir renk, kompakt bir yapı ve yüzeyinde globüler somatik embriyoların varlığı ile karakterize edilir. Embriyojenik kallus ilk olarak taç ve/veya yumurtalık tabanında meydana gelmiştir ve sonrasında tüm eksplant boyunca çoğalmıştır. Beyaz bir renk ve bir hiperhidrik görünüş ile karakterize edilen embriyojenik olmayan kallus da bulunabilir. 2,4-D gibi bir sentetik oksin, genel olarak somatik embriyogenezin indüksiyonuna yönelik kullanılır (Merkle vd. 1990). Oksin, farklılaşmanın giderilmesine neden olmak ve totipotensi sağlamak için gereklidir (Bespalkok-Filho ve Hattori 1997).

Pande ve Gupta'ya (2013) göre, *in vitro* çoğaltım, ticari ve tıbbi açıdan önemli olan bitkilerin geleneksel çoğaltım yöntemlerine karşı, güçlü bir alternatif potansiyele sahiptir. Embriyogenez veya organogenez yoluyla elde edilen stevianın *in vitro* rejenerasyonla büyümesi ile ilgili çok sayıda rapor bulunmaktadır. Bununla birlikte eksplant kaynağı, sterilizasyon süreci, ortam formülasyonları, kültür koşulları, fenolik bileşenlerin ortamda birikimi ve ortamın renk değişikliği, aynı türdeki farklı genotiplerden bile sürgün rejenerasyonunun önemli ölçüde etkiler (Gantait vd. 2014).

Çoğaltım frekansı, kullanılan eksplantın çeşidine bağlıdır. Stevia'da *in vitro* olarak doğrudan organogenezin başarıyla başlatılması, kök uçları (İbrahim vd. 2008a), yapraklar (Jain vd. 2009; Kalpana vd. 2010), nodal segmentler (Hwang 2006; Ahmed vd. 2007; Modi vd. 2012) ve aksiller tomurcuklar (Das vd. 2011) gibi bir dizi eksplant kullanılarak gerçekleştirilir. Stevia'daki somatik embriyogenezde yapraklar (Bespalkhok-Filho vd. 1993), çiçekler ve sapların kullanıldığı bildirilmiştir (Bespalkhok-Filho ve Hattori 1997). Süspansiyon kültürlerinde ise eksplant kaynağı olarak saçak kök (Yamazaki vd. 1991), genç yapraklar (Janarthanam vd. 2009), yaprak diskler (Banerjee ve Sarkar 2008) ve anterler (Flachslan vd. 1996) dolaylı organogenez yoluyla rejenerasyon için kullanılmıştır. Singh vd. (2014), nodal segmentin, sürgün ucu ve inter-nodal segmente kıyasla, stevia'daki birden çok sürgün indüksiyonu açısından daha iyi performans gösterdiğini kanıtlamışlardır.

Stevia bitkilerinin doku kültüründen sonra uyum sağlaması diğer tıbbi bitkilerde olduğu gibi, kültür işlemlerinin başarısına bağlıdır. *In vitro* ortamından gelen rejenere stevia fideciklerinin daha sonraki ortama alışması ışık, sıcaklık ve nem gibi iklimsel faktörlerle ilişkilidir. Acuna vd. (1997) 6 haftalık fidelerin nodal segmentlerini MS ortamında % 50 makro element içeriği ile 0.9 mg l⁻¹ NAA varlığında ilk kültüre almışlardır. *In vitro* bitkilerin *in vivo* koşullara transferinde köklenme işlemini desteklemek için nodal segmentler % 5 IAA içeren solüsyonuna daldırılmış ve bitkiler 1 ay süreyle bir serada yetiştirildikten sonra tarlaya aktarılmıştır. Cocopeat içeren ortamlarda % 70 oranında hayatta kalmışlardır (Sivaram ve Mukundan 2003).

Anter kültürü, genel olarak kendine uyumsuzluğun, homozigot bitkiler veya tür içi üreme gelişimine yönelik sınırlayıcı faktör olduğu durumlarda kullanılır. Bu yöntemde farklılaşan bir popülasyondan olgun olmayan anterler, substrat üzerinde büyütülür. Anter kültürü, genel olarak bir ıslah programının başlangıcında uygulanır. Özel bir özelliğe yönelik homozigot olan bitkilerin popülasyonu kullanılabilir olduğunda, hibridizasyon ile yeni değişiklik çeşitler geliştirilebilir ve genetik çalışmalar, etkili bir şekilde gerçekleştirilebilir.

Flachslan vd. (1996)' ya göre *Stevia rebaudiana* anterlerinden yeniden üretilen bitkiler, tanımlanan koşullar altında *in vitro* ortamda kültüre alınmıştır. Anterler (tek çekirdekli mikrosporları içerir), 0.1 ila 1 mg l⁻¹ BAP ile takviye edilmiş Murashige ve Skoog sıvı ortamında aseptik olarak kültürlendiklerinde kallus oluşturmak üzere indüklenmiştir. Sürgünlerin rejenerasyonu, kallus parçalarının aynı bileşime sahip taze katı ortama aktarılması ile kolaylıkla elde edilmiştir. Sürgünler, 0.1 mg l⁻¹ NAA içeren ortama aktarılarak, kök oluşturmak üzere indüklenmiştir. Küçük bitkiler, başarılı bir şekilde dikilmiştir, ancak yeniden üretilen bitkilerden kök uçlarının sitolojik çalışmaları, kromozomların normal bir diploit (2n=22) sayısını ortaya çıkarmıştır. Bu çalışma, anter

duvarının somatik hücrelerinin, ortamda yüksek BAP konsantrasyonuna yanıt verdiğini ileri sürer.

Somaklonal varyasyonlar, *in vitro* streslere bağlı olarak ortaya çıkar ve DNA metilasyonu, kromozomların yeniden düzenlenmeleri ve nokta mutasyonları şeklinde fark edilirler (Phillips vd. 1994). Mikro çoğaltımla elde edilen bitkilerin klonal doğruluğunu değerlendirmek için moleküler çalışmalar, sitolojik değerlendirmeler ve biyokimyasal testler gibi çeşitli yaklaşımlardan yararlanılmaktadır. Genetik varyasyonun belirlenmesi, *in vitro*'da zararlı somaklonal varyasyonları gidermede germplazmanın korunması için olduğu kadar mikro çoğaltım için de gereklidir. PCR temelli teknikler: RAPD, ISSR ve AFLP'nin, tıbbi bitkilerin yanı sıra, aloe (Gantait vd. 2010a), allium (Gantait vd. 2010a) ve gerbera (Gantait vd. 2010c) gibi süs bitkilerinde de *in vitro* ve genetik stabilitenin oluşturulmasında çok yararlı olduğu bulunmuştur. Doku kültürü'nde üretilen steviada biyokimyasal ve moleküler markörün bir kombinasyonu kullanılarak yapılan çalışmada, varyasyonun değerlendirilmesine ilişkin ilk rapor Das vd. (2011) tarafından yayımlanmıştır.

Moleküler markör teknolojisi gelişimi ve sonucunda önemli tarımsal özellikler ile bağlantılı markör lokuslarının tanımlanması, bitki ıslahçıları için heyecan verici yeni olanaklar yaratmıştır. Markör destekli seleksiyon, daha erken seleksiyon ve azalmış bitki popülasyon boyutuna olanak sağlayarak seçim etkinliğinin geliştirilmesine yönelik potansiyel sağlar (Staub vd. 1996). Son yıllarda genetik haritaların oluşturulması, yeni bir bitki ıslah aracının temeli olmuştur. Bitki genom haritalamasının önceliklerinden biri, ekonomik olarak önemli özellikler ile bağlantılı genlerin tanımlanması ve bu bilginin ürünlerin daha fazla geliştirilmesine yönelik kullanımıdır. Moleküler markörlerin bağlantı haritalarının geliştirilmesine yönelik değeri ve bunların ekonomik olarak önemli özelliklerin analizinde kullanımı, tarla bitkileri (Paran ve Michelmor 1993) ve orman ağaçlarında yaygın olarak gösterilmiştir (Bradshaw ve Stettler 1995). Moleküler bağlantı haritaları, birçok ana ürün bitkisine yönelik oluşturulmuştur (Paterson 1996). Bu haritalar, kolaylıkla algılanabilir genetik markörlere olan bağlantıları yoluyla istenilen nitel ve nicel özelliklerin seçimine yönelik daha doğrudan bir yöntem sağlarlar (Yao vd. 1999).

Lata vd. (2012), mikro çoğaltımla üretilmiş ve güçlendirilmiş stevia bitkilerinin genetik stabilitesini değerlendirmek için ISSR markörlerini kullanmışlardır. Soliman vd. (2013), 14 ISSR primeri kullanarak stevia'nın mikro çoğaltım frekansını ve anaç bitkilerinin genetik stabilitesini değerlendirmişlerdir.

Modi vd. (2012), RAPD markörlerini kullanarak doku kültürü ile üretilmiş bitkilerin arasında somaklonal varyasyon olmadığını göstermiştir. Somaklonal varyasyon üzerine yapılan bir çalışmada Khan vd. (2013), transgenik ve somaklonal bitkilerin ISSR profillemesinin % 43.36 monomorfik ve % 56.64 polimorfik bantları olduğunu göstermişlerdir. Singh vd. (2014), mikro çoğaltımla üretilmiş stevia fidelerinin genetik doğruluğunun, ISSR analizi ile doğrulandığında, kallustan elde edilen *in vitro* bitkilerin, kültür döneminde genetik varyasyon gösterdiğini, buna karşın, nodal segmentlerden olanların göstermediğini bildirmişlerdir.

2.4. *Stevia rebaudiana*'nın Tatlandırıcı Özelliğinin Geliştirilmesi Çalışmaları

Metalik tat sorununun bu tatlandırıcının daha yaygın şekilde kullanılmasını engelleyen kısıtlayıcı faktör olarak görülmesinden dolayı, steviosidin tatlı özelliklerinin iyileştirilmesi yönünde birçok girişimde bulunulmuştur. Örneğin; steviosidin birçok tat maskeleyici ve tatlılık pekiştirici ajanla formüle edilmesi mümkündür ve *Stevia rebaudiana* ekstraktları ve steviosid için iyileştirilmiş tatlandırıcı kompozisyonları içeren birçok patent ortaya koyulmuştur. Stevioside kıyasla rebaudiosid A' nın tercih edilen özelliklerini elde etmek için, yabani Paraguay popülasyonu ile karşılaştırıldığında stevioside göre rebaudiosid A oranı daha yüksek olan *Stevia rebaudiana* türleri üretmek için girişimlerde bulunulmuştur (Kingham ve Soejarto 1991). Doğal steviosid kıyasla tatlılık parametreleri geliştirilmiş türevler üretmek için sentetik yaklaşımlarda bulunulmuştur (DuBois ve Stephenson 1985). Alternatif bir strateji olarak, steviosidin enzimatik transglukozilasyonu ile üst maddeye göre tat profilleri geliştirilmiş analoglar elde edilmiştir (Tanaka 1997). Örneğin; steviosidin şeker kısmının 19 ° C'de modifikasyonu enzimatik transglukozilasyon ile yapılabilir ve daha sonra transglukozilasyonu katalize etmek için siklomaltodekstrin-glikonotransferaz (CGTase) kullanılabilir. Bileşiklerin karışımına ait glikosil zinciri β -amilaz kullanılarak CGTase işlemi ile kısaltılarak üretilen, transglukozilasyon uygulanmış ("şeker transferi yapılmış") bir steviosid ürünü Japonya'da satılmaktadır (Tanaka 1997).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

Çalışmada bitkisel materyal olarak Asteraceae familyasına ait olan Paraguay kökenli *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisi kullanılmıştır. Ülkemizde ‘şeker otu’ olarak bilinen bitki sindirim esnasında insülin salgılanmasına neden olmaz ve yaprakları kendine has tatlılık özelliğine sahiptir. Bu tatlılık şekerden 200-300 kat fazla olarak ifade edilmektedir ve bitkinin içerdiği steviol glikozitlerden kaynaklanmaktadır.

Çalışma 2014, 2015 ve 2016 yılları arasında, Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü’nde yürütülmüştür. 2011 yılında fideliklerde çimlendirildikten sonra 2012 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Deneme Arazisi’ne dikilen, her türlü bakım ve sulama işlemleri yapılarak yetiştirilen *Stevia rebaudiana* Bertoni bitkisel materyal olarak kullanılmıştır.

3.2. Deneme Alanı

Çalışma Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Deneme Arazisi’nde yürütülmüştür. Deneme alanı 36°53'54.01''K ve 30°38'35.71''D koordinatlarındadır. Yükseklik 34 metredir. Çalışmanın yürütüldüğü alanın Google earthden alınmış görüntüsü Şekil 3.1 ‘de gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Deneme alanının genel görünümü

3.2.1. Deneme alanının toprak özellikleri

Çalışmanın yürütüldüğü alan hafif bünyeli, kırmızı toprak olup, killi tınlı yapıdadır. Toprağın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin analizi için deneme alanında 0-

30 cm derinlikten alınan toprak örnekleri analiz edilmiş ve elde edilen değerler Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Deneme Alanının Toprak Özellikleri

Toprak Özellikleri	Birim	Metotlar	Analiz Sonucu (0-30cm)	Değerlendirme
pH	—	1 : 2.5	7.7	Hafif Alkali
Kireç	(%)	Kalsimetrik	33.9	Çok Fazla Kireçli
Tuz	(%)	1 : 2.5	0.030	Tuzsuz
Doygunluk	(%)	Saturasyon	59	Bünye: Killi Tınlı
Organik Madde	(%)	Walkley Black	1.55	Az
Toplam N	(%)	Kjeldahl	0.113	İyi
Alınabilir P	kg P ₂ O ₅ /da	Olsen-Spekt.	11.8	Az
Alınabilir K	kg K ₂ O/da	A.Asetat-ICP	111.3	Fazla
Alınabilir Ca	kg CaO/da	A.Asetat-ICP	1996.8	Fazla
Alınabilir Mg	kg MgO/da	A.Asetat-ICP	88.6	Yeterli
Alınabilir Fe	ppm	DTPA-ICP	2.80	Yeterli
Alınabilir Mn	ppm	DTPA-ICP	29.48	Yeterli
Alınabilir Zn	ppm	DTPA-ICP	1.00	Yeterli
Alınabilir Cu	ppm	DTPA-ICP	0.90	Yeterli

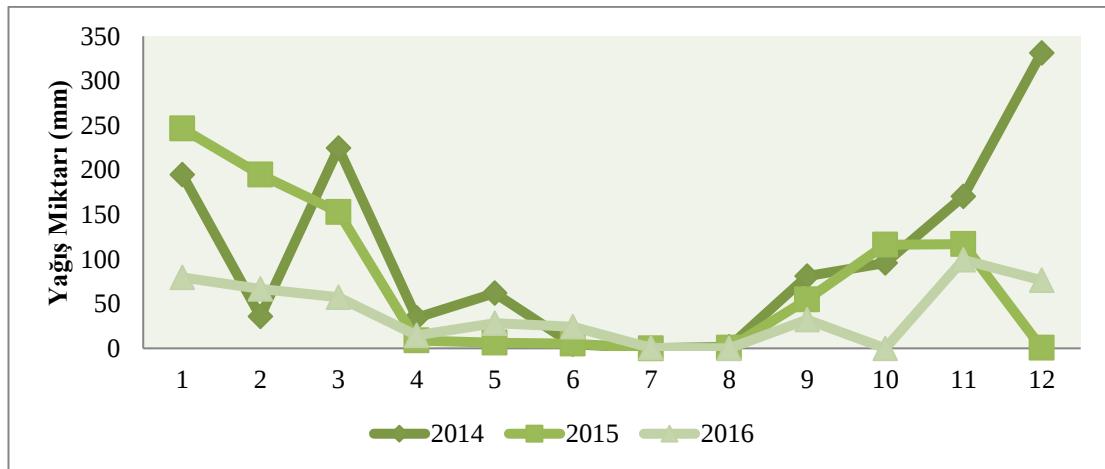
3.3. İklim Verileri

Deneme 2014-2016 yılları arasında üç yıl süreyle yürütülmüştür. Denemenin yürütüldüğü döneme ait meteorolojik veriler Antalya Meteoroloji Bölge Müdürlüğü’nden alınmıştır. Çalışmanın yürütüldüğü döneme ait iklim verileri Çizelge 3.2’de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. 2014-2015-2016 yıllarına ait iklim verileri

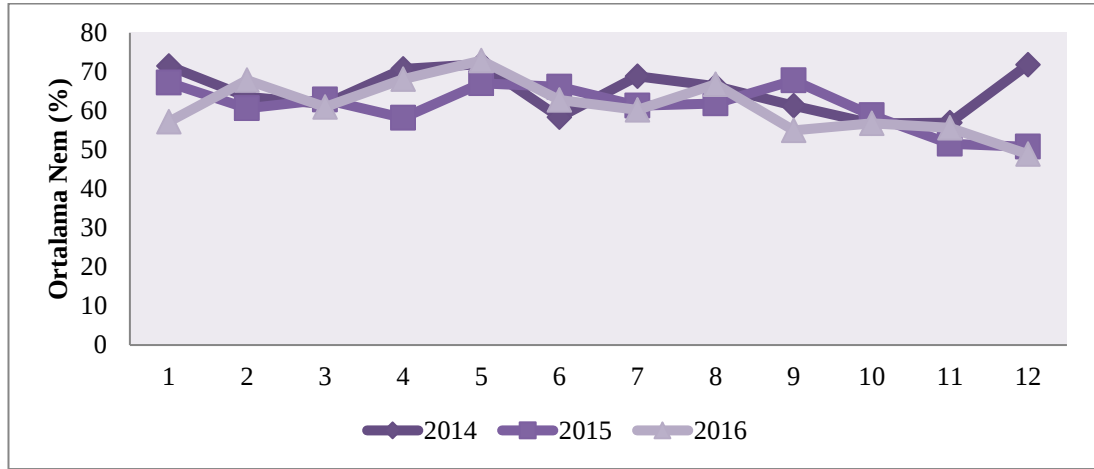
Aylar	Sıcaklık (°C)			Yağış (mm)			Nem (%)		
	2014	2015	2016	2014	2015	2016	2014	2015	2016
Ocak	12.8	10.8	10.4	194.6	246.5	79.4	71.5	67.2	57.2
Şubat	13.2	11.9	14.5	35.6	194.9	66.7	63.6	60.7	67.9
Mart	14.7	14.2	15.2	224.4	152.8	57.2	61.7	62.9	61.0
Nisan	17.1	16.0	19.0	34.2	9.0	14.4	70.8	58.2	68.1
Mayıs	20.2	21.3	20.4	61.8	6.4	28.2	72	67.1	72.9
Haziran	25.4	23.9	26.8	4.6	5.4	24.3	58.4	66.2	62.8
Temmuz	27.7	28.3	29.9	0.2	0.0	0.6	68.9	61.3	60.3
Ağustos	29.2	29.2	29.5	1.8	0.4	0.0	66.3	61.9	66.8
Eylül	25.8	26.4	26.5	81	54.8	32.3	61.3	67.8	55.0
Ekim	21.7	22.6	23.3	95.8	116.1	0.0	56.8	58.9	56.8
Kasım	16.3	18.4	17.5	170.4	116.9	99.2	57	51.6	55.7
Aralık	14.6	13.3	11.2	331.3	0.4	76.3	71.8	50.8	48.9
Ortalama	19,89	19,69	20,35	1235,7	903,6	478,6	65,01	61,22	61,12

Aylara göre ortalama yağış miktarının 2014-2015-2016 yıllarındaki değişimi Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. 2014-2015-2016 yılları ortalama yağış miktarı (mm)

Aylara göre ortalama nemin 2014-2015-2016 yıllarındaki değişimi Şekil 3.3'te gösterilmiştir.

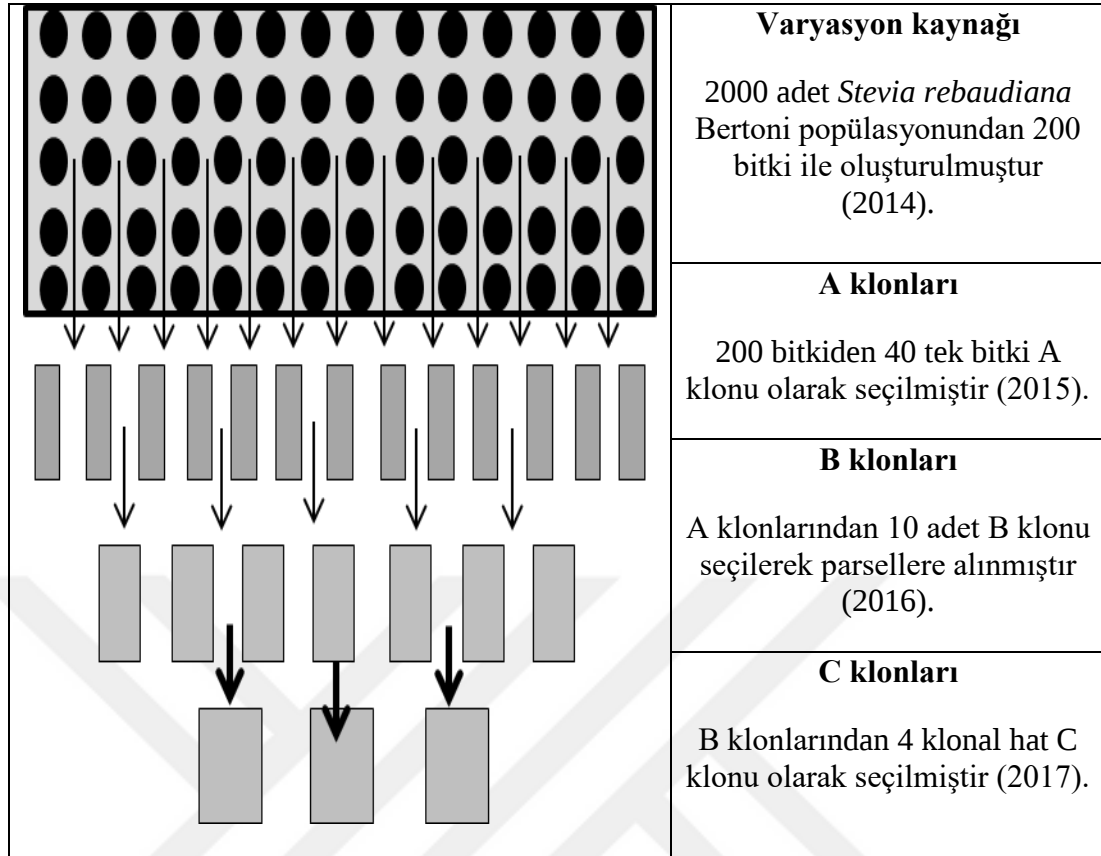


Şekil 3.3. 2014-2015-2016 yılları ortalama nem miktarı (%)

3.4. Metot

3.4.1. Deneme deseni

Çalışmada vejetatif olarak üretimi daha başarılı olan *Stevia rebaudiana* Bertoni' de klon seleksiyonu ıslah yöntemi kullanılmıştır. Çalışmanın birinci yılında (2014) deneme arazisinde var olan yaklaşık 2000 *Stevia rebaudiana* Bertoni popülasyonundan 200 tek bitki fenotipik gözlemlere dayalı olarak seçilmiştir. Seçilen bitkilerde agronomik ölçümler ve içerik analizleri yapılmıştır. Çalışmanın ikinci yılında (2015) varyasyon kaynağından 40 tek bitki seçilerek A-klonu oluşturulmuştur. Her bir genotipten alınan A-klonları sıralara 10 bitki olacak şekilde dikilmiştir. Çiçeklenmenin hemen öncesinde agronomik ölçümleri ve hasat sonrasında içerik analizleri yapılmıştır. Çalışmanın üçüncü yılında (2016) A-klonlarından seçilen 10 genotipten 100 adet çelik alınarak 3 tekerrürlü olarak her parselde bir genotipe ait 10 bitki olacak şekilde 30 parselde dikilmiş ve B-klonları elde edilmiştir. Deneme, tesadüf blokları deneme desenine göre 3 tekerrürlü olarak yürütülmüştür. Parseller tek sıra, sıra üzeri mesafe 40 cm, sıra arası mesafe 60 cm olacak şekilde ve 12 metre boyunda kurulmuştur. B-klonlarından seleksiyon kriterlerine uygun olan ve istatistiki olarak öne çıkan 4 adet klonal hat C-klonu olarak seçilerek ıslah değerleri tespit edilmiştir. Şekil 3.4' te vejetatif üreyebilen yabancı döllen bitki türünde klon seleksiyonu şeması gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Vejetatif üreyebilen bitki türünde klon seleksiyonu şeması

3.4.2.Varyasyon kaynağı

Varyasyon kaynağı olarak 2011 yılında fideliklerde çimlendirildikten sonra 2012 yılında Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Deneme Arazisi'ne dikilerek yetiştirilen 3 yıllık bitkiler kullanılmıştır. Yaklaşık 2000 *Stevia rebaudiana* Bertoni popülasyonundan 200 bitki fenotipik gözlemlere dayalı olarak seçilmiştir. Seçilen 200 bitkiye rastgele 1' den 200'e kadar numara verilmiştir ve numaralı etiketler bitkilerin başına dikilmiştir. Şekil 3.5' de varyasyon kaynağı olarak kullanılan *Stevia rebaudiana* Bertoni popülasyonunun arazideki görüntüsü gösterilmektedir.



Şekil 3.5. Varyasyon kaynağı olarak kullanılan *Stevia rebaudiana* Bertoni popülasyonu

3.4.3. Arazi çalışmaları ve agronomik ölçümler

3.4.3.1. Denemenin birinci yılında yapılan çalışmalar

Varyasyon kaynağı oluşturulduktan sonra, biçimden hemen önce bitkilerin toprak yüzeyinden en uç noktasına kadar olan yüksekliği ölçülerek bitki boyu cm cinsinden belirlenmiştir. Yine biçim öncesi 200 bitkinin yapraklarının klorofil içeriklerinin renk yoğunluğu değerleri tespit edilmiştir (her bitkiden 10 yaprak). SPAD-502, Osaka, Japan klorofil metre aleti kullanılmıştır.

Çiçeklenmenin hemen öncesinde seçilen 200 adet bitki biçim yüksekliği yerden 10 cm olacak şekilde hasat edilerek Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Laboratuvarları'na götürülmüştür. Her bitkiden ayrılan dört adet yaprak örneğinde yaprak alanı ve yaprak çevresi ölçümleri yapılmış, dijital kumpasla yaprak kalınlığı ölçülmüştür. Hasat sonrasında bitkiler tartılarak bitki başına yeşil herba miktarı bulunmuştur. Ardından yaprak ve sapları birbirinden ayrılarak, bitki başına yaprak, sap ve yaprak/sap oranları belirlenmiştir. Yapraklar kurutma dolabında 37 °C' de 7-10 gün süreyle kurutulduktan sonra bitki başına kuru yaprak miktarları tespit edilmiştir. Kurutulan yapraklar içerik analizleri yapılmak üzere muhafaza edilmiştir. Denemenin birinci yılında arazide yürütülen çalışmalar Şekil 3.6' da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Denemenin birinci yılında arazide yürütülen çalışmalar

3.4.3.2. Denemenin ikinci yılında yapılan çalışmalar

3.4.3.2.1. A klonlarının seleksiyonu

Hasat öncesi ve sonrasında elde edilen veriler yaprak kalınlığı (mm), bitki boyu (cm), yaprak alanı (mm²), yaprak çevresi (mm), klorofil, bitki başına yeşil herba miktarı (g), bitki başına yeşil yaprak miktarı (g), bitki başına yeşil sap miktarı (g) ile steviosid, rebaudiosid A oranları değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre seleksiyon kriteri olarak; yüksek glikozit oranı, yüksek reb A/stv, yalnız stv içeren, dengeli reb A/ stv, yüksek stv oranı ve yüksek reb A oranı belirlenmiştir. Buna uygun olarak 40 bitki A-klonu olarak seçilmiştir.

3.4.3.2.2. Varyasyon kaynağından alınan çeliklerden fide elde edilmesi ve fidelerin araziye aktarılması

Seleksiyonu yapılan bitkilerin her birinden, Mayıs 2015'te 15 adet olacak şekilde yaklaşık 6-8 cm boyunda çelikler alınarak, etiketli ıslak bezlere sarılmıştır. Islak bez ile sarılmış olan bitkiler taşınabilir saklama kabına alınarak, köklendirilmek üzere, hızlı bir şekilde Grow Fide'ye götürülmüştür. 6-8 cm boyundaki çelikler, Grow Fide' ye ait sisleme serasında, torf+perlit (1:1) hacimsel ortamına aktarılmadan önce her defasında steril edilmiş makaslarla temizlenerek 216' lık viollere her violde 5 bitkiden en az 15 çelik olacak şekilde dikilmiştir. Her bir çeliğin sap kısmı dikimden önce 10 saniye kadar 500 ppm indol bütirik asit (IBA) içerisinde bekletilmiştir. Ardından kontrollü koşulların olduğu sisleme seralarına köklendirilmek üzere alınmıştır. Sisleme sistemi otomatik olup, ilk birkaç gün 2 dakika aralıkla daha sonra 10 dakika aralıkla çalışmıştır.

Çizelge 3.3. A klonlarının çelik ve fide sayıları

KLON NO	ÇELİK ADEDİ	FİDE ADEDİ	KLON NO	ÇELİK ADEDİ	FİDE ADEDİ
1	16	16	93	18	18
4	31	31	96	32	32
7	10	10	98	16	16
14	22	22	100	27	27
15	41	0	105	23	23
16	24	24	109	24	24

Devamı arkada

Çizelge 3.3' ün devamı.

31	17	17	110	25	25
44	31	31	111	29	29
51	31	31	116	21	21
52	24	24	119	16	16
54	18	18	129	28	28
56	30	30	133	22	22
66	24	24	141	23	23
71	41	41	152	31	31
72	23	23	159	28	28
78	30	30	161	24	24
82	30	30	185	36	36
83	22	22	191	26	26
84	34	34	196	25	25
88	17	17	202	29	29

Seçilen bitkilerden alınan çelikler (yaklaşık olarak 800 adet çelik) Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Deneme Arazisi'ne getirilmeden önce, arazi dikim için hazırlanmıştır. Toprak hazırlığı yapılmış, damlama sulama sistemi kurulmuş, sıralar açılarak bitkilerin etiketleri araziye çakılmıştır. Seçilen bitkilerden alınan çelikler (yaklaşık olarak 800 adet çelik) Grow fidede 21 günde 40 genotipi temsil eden çelikler köklendirildikten sonra araziye aktarılmıştır. Dikimde sıra arası mesafe 60 cm, sıra üzeri mesafe 40 cm olacak şekilde, 15-20 cm derinliğinde açılan ocaklara dikim yapılmıştır. Dikimden hemen sonra can suyu verilmiştir. 40 bitkiye ait 10 klon deneme arazisine yine bu 40 bitkiye ait her bitki için 8 adet klonda oluşabilecek bir olumsuzlukta kullanılmak üzere çalışmanın yedeği olarak araziye dikilmiştir. 40 genotipten alınan çelik sayıları ve fide oluşum sayısı Çizelge 3.3'te gösterilmektedir. 40 genotipten alınan çelik sayısı kadar fide oluşmuş, fide elde yüzdesi %100 olmuştur.

3.4.3.2.3. A klonlarında uygulanan kültürel işlemler

Dikimden önce deneme alanı derin bir şekilde sürdürülmüş ve üzerine diskaro geçirilerek keseklerin kırılmasıyla düzgün bir alan oluşturulmuştur. Deneme alanına damlama sulama sistemi, damlama boruları her bir bitkinin yanından geçecek şekilde döşenmiştir. Yüksek sıcaklıkların olduğu dönemlerde su ihtiyacı fazla olduğundan

günde yaklaşık olarak 8-10 saat süreyle, nem miktarının % 60 üzerinde olduğu Antalya koşullarında günde yaklaşık olarak 4-5 saat sulama yeterli olmuştur. Bitkilerin gelişme ve büyüme gösterdiği dönem boyunca yabancı ot kontrolü el ile sökülerek uzaklaştırmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Deneme süresince bitkilerde herhangi bir hastalık ve zararlı etmenine rastlanmamıştır.

3.4.3.2.4. Hasat öncesi yapılan çalışmalar ve hasat

A-klonlarında biçimden hemen önce bitkilerin toprak yüzeyinden en uç noktasına kadar olan yüksekliği ölçülerek bitki boyu cm cinsinden belirlenmiştir. Biçim öncesi sıralardaki bitkilerin yapraklarının klorofil içeriklerinin renk yoğunluğu SPAD-502, Osaka, Japan klorofil metre aleti ile tespit edilmiştir (her bitkiden 10 yaprak). Taşınabilir klorofil metre cihazı klorofili dolaylı olarak ölçer ve değerler 1 ile 100 arasında olup, birimsizdir.

Sıralardaki bitkilerin hasadı çiçeklenmenin hemen öncesinde Antalya koşullarında Eylül ayının ikinci haftası gerçekleştirilmiştir. Sıralardan bitki biçim yüksekliği yerden 10 cm olacak şekilde hasat edilen bitkiler Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Laboratuvarları'na götürülmüştür.

A klonlarının yaprak kalınlığı (mm), yaprak alanı (mm²), yaprak çevresi (mm), bitki başına yeşil herba miktarı, bitki başına yeşil yaprak miktarı, bitki başına yeşil sap miktarı ve bitki başına yaprak / sap oranları belirlendikten sonra yapraklar oda sıcaklığında (37 °C) 7-10 gün süreyle kurutulduktan sonra bitki başına kuru yaprak miktarları tespit edilmiştir. Daha sonra kurutulan yapraklar içerik analizleri yapılmak üzere muhafaza edilmiştir. Şekil 3.7'de denemenin ikinci yılında arazide yürütülen çalışmalar gösterilmektedir.



Şekil 3.7. Denemenin ikinci yılında arazide yürütülen çalışmalar

3.2.3.3. Denemenin üçüncü yılında yapılan çalışmalar

3.2.3.3.1. B klonlarının seleksiyonu

Hasat öncesi ve sonrasında elde edilen veriler (yaprak kalınlığı (mm), bitki boyu (cm), yaprak alanı (mm²), yaprak çevresi (mm), klorofil, bitki başına yeşil herba miktarı, bitki başına yeşil yaprak miktarı, bitki başına yeşil sap miktarı) ile steviosid, rebaudiosid A oranları değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre seleksiyon kriteri olarak; yüksek glikozit oranı, yüksek rebaudioside A miktarı, yalnız steviosid içermesi ve rebaudiosid A / steviosid oranının yüksek olması belirlenmiştir. Buna uygun olarak 10 bitki B-klonu olarak seçilmiştir.

3.2.3.3.2. A klonlarından fide elde edilmesi ve araziye aktarılması

Seleksiyonu yapılan bitkilerin herbirinden en az 40 adet olacak şekilde yaklaşık 6-8 cm boyunda çelikler alınarak, etiketli ıslak bezlere sarılmıştır. Islak bez ile sarılmış olan bitkiler taşınabilir saklama kabına alınarak, köklendirilmek üzere, hızlı bir şekilde Grow Fide'ye götürülmüştür. 6-8 cm boyundaki çelikler, Grow Fide'ye ait sisleme serasında, torf+perlit (1:1) hacimsel ortamına aktarılmadan önce her defasında steril edilmiş makaslarla temizlenerek 216' lık violle her violde 10 bitkiden en az 40 çelik olacak şekilde dikilmiştir. Her bir çeliğin sap kısmı dikimden önce 10 saniye kadar 500 ppm indol bütirik asit (IBA) içerisinde bekletilmiştir. Ardından kontrollü koşulların olduğu sisleme seralarına köklendirilmek üzere alınmıştır. Stevia bitkisi nemi sevdiği için, sisleme sistemi dikimden sonra ilk 5 gün boyunca 5 dakikada 1 defa 10 saniye süre ile, daha sonraki günlerde 10 dakikada 1 defa olacak şekilde çalıştırılmıştır. Sisleme sisteminin üzerine gölgelendirmek amacıyla yeşil örtü serilmiştir. B klonlarının çelik ve fide sayıları Çizelge 3.4' te gösterilmektedir.

Çizelge 3.4. B klonlarının çelik ve fide sayıları

KLON NO	ÇELİK ADEDİ	FİDE ADEDİ
82	50	30
83	54	30
100	88	30
109	64	30
111	85	30
116	41	30
133	58	30
185	46	30
191	78	30
196	73	30

B klonlarını temsil eden fideler Grow fidede köklendirildikten sonra (yaklaşık olarak 4 hafta) Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Deneme Arazisi'ne dikim için getirilmiştir. Fideler uygulama alanına getirilmeden önce, arazi dikim için hazırlanmıştır. Toprak hazırlığı yapılmış, damlama sulama sistemi kurulmuş,

sıralar açılarak bitkilerin etiketleri araziye çakılmıştır. Her bir klon için 10 bitki sıra parsellere aktarılmış, bir parselde 1 klondan 10 bitki olacak şekilde, bir tekerrürde 10 parsel 100 bitki olacak şekilde deneme üç tekerrürlü olarak tesadüf blokları deneme desenine uygun şekilde oluşturulmuştur. Dikimde sıra arası mesafe 60 cm, sıra üzeri mesafe 40 cm olacak şekilde, 15-20 cm derinliğinde açılan ocaklara dikim yapılmıştır. Dikimden hemen sonra can suyu verilmiştir.

3.2.3.3.3. B klonlarında uygulanan kültürel işlemler

Dikimden önce deneme alanı derin bir şekilde sürdürülmüş ve üzerine diskaro geçirilerek keseklerin kırılmasıyla düzgün bir alan oluşturulmuştur. Deneme alanına damlama sulama sistemi, damlama boruları her bir bitkinin yanından geçecek şekilde döşenmiştir. Yüksek sıcaklıkların olduğu dönemlerde su ihtiyacı fazla olduğundan günde yaklaşık olarak 8-10 saat süreyle, nem miktarının % 60 üzerinde olduğu Antalya koşullarında günde yaklaşık olarak 4-5 saat sulama yeterli olmuştur. Bitkilerin gelişme ve büyüme gösterdiği dönem boyunca yabancı ot kontrolü el ile sökülerek uzaklaştırmak suretiyle gerçekleştirilmiştir. Deneme süresince bitkilerde herhangi bir hastalık ve zararlı etmenine rastlanmamıştır.

3.2.3.3.4. Hasat öncesi yapılan çalışmalar ve hasat

B klonlarında biçimden hemen önce bitkilerin toprak yüzeyinden en uç noktasına kadar olan yüksekliği ölçülerek bitki boyu cm cinsinden belirlenmiştir. Biçim öncesi sıralardaki bitkilerin SPAD-502, Osaka, Japan klorofil metre aleti kullanılarak yapraklarının klorofil içeriklerinin renk yoğunluğu değerleri tespit edilmiştir (her bitkiden 10 yaprak). Taşınabilir klorofil metre cihazı klorofili dolaylı olarak ölçer ve değerler 1 ile 100 arasında olup, birimsizdir.

Parsellerdeki bitkilerin hasadı çiçeklenmenin hemen öncesinde Antalya koşullarında Eylül ayının ikinci haftası gerçekleştirilmiştir. Parsellerden bitki biçim yüksekliği yerden 10 cm olacak şekilde hasat edilen bitkiler Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü Laboratuvarları'na götürülmüştür.

3.4.4. Analiz metodları ve *in vitro* çoğaltım çalışmaları

3.4.4.1. Hasat sonrasında yapılan çalışmalar

Denemenin üç yılı boyunca hasat sonrasında her bitkiden (birinci yıl; 200 adet bitki, ikinci yıl; 400 adet bitki, üçüncü yıl; 300 adet bitki) ayrılan 5 adet yaprak örneğinde yaprak alanı ölçümleri ve dijital kumpasla yaprak kalınlığı ölçümleri yapılmıştır. Yaprak alanı ve yaprak çevresi ölçümleri Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Yapılar ve Sulama Bölümü'n de bulunan CI-202 Laser Area Meter cihazıyla yapılmıştır.

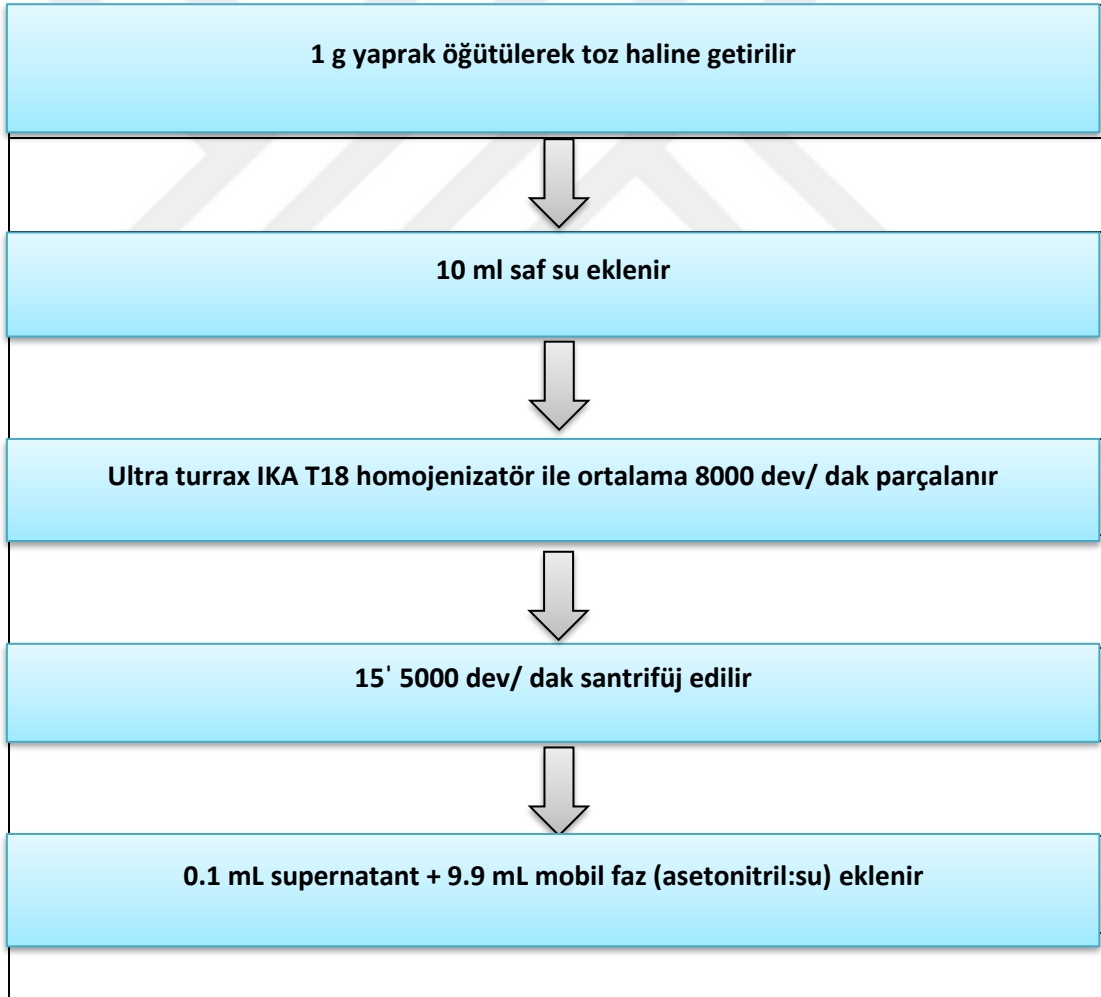
Her yıl hasat sonrasında bitkiler tartılarak bitki başına taze herba ağırlığı (g/bitki) belirlenmiştir. Yaprak ve saplar birbirinden ayrılarak tartılmış, bitki başına taze dal ağırlığı (g/bitki) ve bitki başına taze yaprak ağırlığı (g/bitki) belirlenmiştir.

Daha sonra 35 °C' de 7-10 gün süreyle kurutma dolabında kurutulan yapraklar

tartılarak kuru yaprak miktarı (g/bitki) belirlenmiştir. Kurutulan yapraklar içerik analizleri yapılmak üzere muhafaza edilmiştir.

3.4.4.2. Bitkisel materyalin ekstraksiyonu

Çalışmanın devam ettiği üç yıl boyunca her hasat sonrasında kurutularak muhafaza edilen yapraklar (1.yıl; varyasyon kaynağına ait olan, 2. yıl; A klonlarına ait olan, 3. yıl; B klonlarına ait olan) analizi yapılmak üzere ekstrakte edilmiştir. Her bir bitkiden 1 g bitki tartılarak son hacim ultra saf su ile 10 mL' ye tamamlanmıştır. Ardından ultra turrax IKA T18 cihazı ile önce 7000 dev/dak'dan başlanıp 12000 dev/dak hıza kadar çıkılarak yaklaşık 10 dakika boyunca homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 5000 dev/dak. da 15 dakika süresince santrifüj edilmiş ve işlem sonunda posa uzaklaştırılarak supernatattan 0.1 mL alınarak mobil faz [asetonitril:su (80:20)] olan karışımla son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Daha sonra muhafaza edilmek üzere buzdolabına kaldırılmıştır. Şekil 3.8'de çalışmamızda *Stevia rebaudiana* Bertoni yapraklarının ekstraksiyonunda izlediğimiz aşamaları gösteren şema gösterilmektedir.



Şekil 3.8. *Stevia rebaudiana* Bertoni yapraklarının ekstraksiyon şeması

3.4.4.3. Bitkisel materyalin kromatografik analizi

Örneklerde steviosid ve rebaudiosid A miktarları HPLC ile harici standart metodu kullanılarak izokratik koşullarda belirlenmiştir (Wölver- Rieck vd. 2010). Kromatografik analizler için HPLC sistemi olarak Tarla Bitkileri Bölümü Laboratuvarları'nda bulunan Agilent 1200, G1311A Quaternary Pompa, G1313A Standart otomatik örnekleyici, G1316A Colcom kolon fırını ve soğutucu ile G1315A Diode Array Detector (DAD) kullanılmıştır.

Steviosid ve rebaudiosid A steviol glikozitlerinin HPLC ile analizleri aşağıda verilen konfigürasyona göre yapılmıştır.

a) Pompa: Basıncı 400 bar'a kadar çıkabilen Agilent 1200 marka (G1311 A model) 4'lü pompa (quaternary pump) kullanılmıştır.

b) Dedektör: Agilent 1200 marka ve G1315 D model DAD dedektör (Diode Array Dedektör) kullanılmıştır.

c) Kolon: Nucleodur HILIC (250 x 4.6 mm, 5 µm) kolon kullanılmıştır.

d) Degaz işlemi: Agilent 1200 marka G1322 A model degasser kullanılarak mobil fazda oluşan gazlar uzaklaştırılmıştır.

e) Kaydedici (Integrator): Dedektörün gönderdiği uyarılar "Chemstation" adlı yazılım kullanılarak bilgisayar ortamına kaydedilmiştir.

f) İzokratik sistem: İzokratik sistem, sabit konsantrasyondaki mobil fazın 1.0 ml/dk akış hızı ile beraber maddelerin kolonlardaki alıkonma zamanına bağlı olarak birbirlerinden ayrılabilmesi temeline dayanmaktadır.

g) Mobil (sürükleyici) faz: Mobil faz olarak, **Asetonitril** (HPLC grade, Merck) : **Su** (Ultra saf su) (80 : 20 v/v) kullanılmıştır.

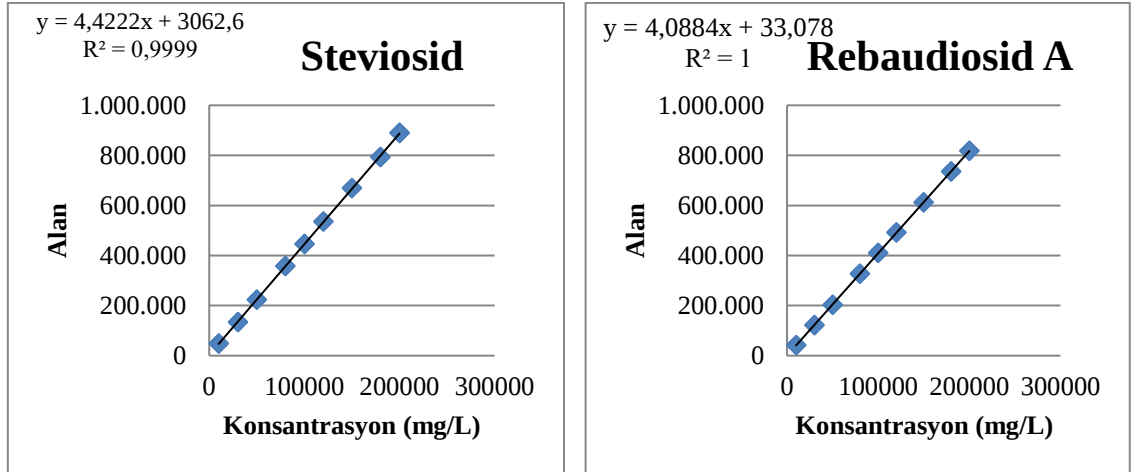
h) UV absorbans değerleri: Steviol glikozitler için 210 nm'ye ayarlanmıştır.

i) Kolon sıcaklığı: Sistemde Agilent 1200 marka G1316 A model termostatlı kolon fırını bulunmaktadır. Kolon sıcaklığı 36 °C' ye ayarlanmıştır.

j) Akış hızı: Hareketli faz akışı 1 ml/dk olarak belirlenmiştir.

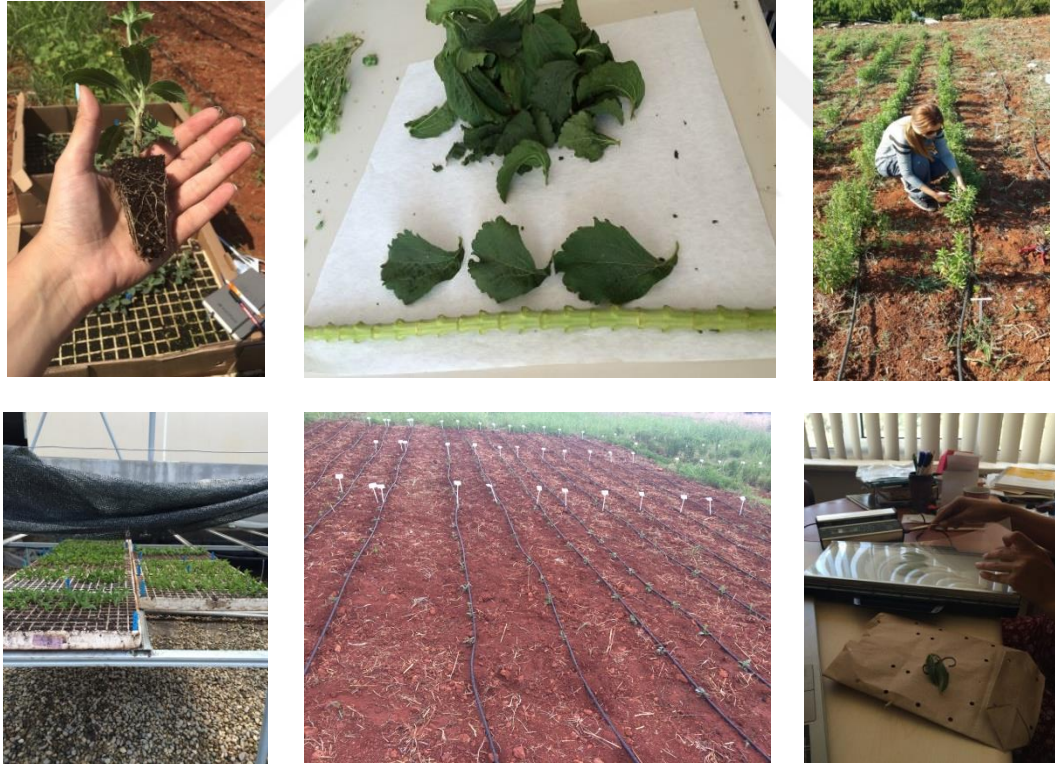
k) Enjeksiyon hacmi: Agilent 1200 marka G1313A standart otomatik örnekleyici enjeksiyon bloğuna 20 µl örnek enjekte edilmiştir.

Daha önce ekstraksiyonu yapılarak buzdolabında muhafaza edilen örnekler 0.45 µm steril şırıngadan süzülerek viallere alınmıştır. Sisteme vialler içinden 20 µL enjeksiyon yapılarak ölçümler gerçekleştirilmiştir. Miktar tayini için hedef bileşenlerin saf standartlarından farklı konsantrasyonlarda çözeltiler hazırlanarak Şekil 3.9 da gösterilen eğim değerleri elde edilmiştir.



Şekil. 3.9.Standart çözeltilere ait eğimler

Denemenin üçüncü yılına ait arazi ve laboratuvar çalışmalarına ait fotoğraflar Şekil 3.10'da gösterilmektedir.





Şekil 3.10. Denemenin üçüncü yılına ait arazi ve laboratuvar çalışmaları

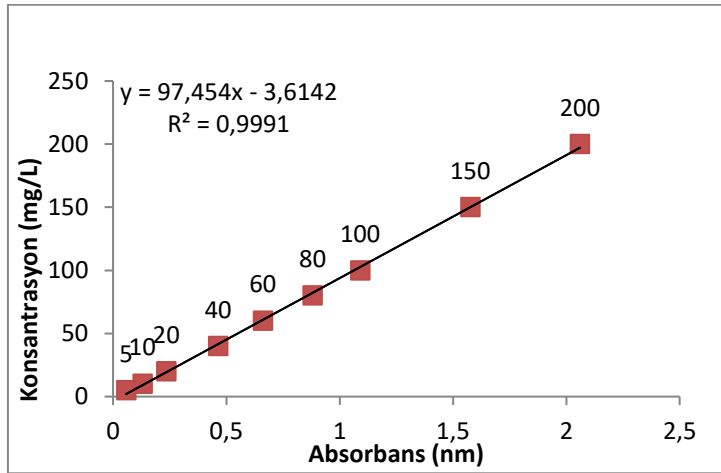
3.4.4.4. Klorofil a ve klorofil b yoğunluğu

Yaprak örneklerinde klorofil analizi taze alınmış bitki örneklerinde yapılmıştır. Taze yapraklar yıkanıp kurutulduktan sonra, kuruyan yapraklar steril bir makas yardımıyla parçalanmıştır. Karanlık ortamda 0.25 g taze yaprak örneği üzerine CaCO_3 ve aseton eklendikten sonra ultra turrax IKA T18 ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen ekstraktların 645 ve 663 nm dalga boylarında spektrofotometrede (UV-vis T60) absorbansları kaydedilmiştir. Klorofil a ve klorofil b içerikleri ayrı ayrı hesaplanarak sonuç mg/g taze örnek olarak verilmiştir (Witham vd. 1971).

3.4.4.5. Toplam fenolik madde (TFM) tayini

A klonları ve B klonlarında toplam fenolik madde tayini yapılmıştır. Toplam fenolik madde miktarı spektrofotometrik yöntemle belirlenmiştir (Spanos ve Wrolstad 1992). Sızdırmaz kapaklı cam bir tüpe elde edilen ekstraktlardan uygun oranda seyreltilmiş 0.5 mL örnek ve üzerine 2.5 mL 0.2 N Folin-Ciocalteu ayracı eklenmiştir. 5 dak süre ile beklendikten sonra karışıma 2 mL %7.5'lik Na_2CO_3 çözeltisi eklenmiştir. Elde edilen karışım vorteksle yaklaşık 5 dak karıştırıldıktan sonra 50°C'deki su banyosunda 5 dk bekletilerek inkübe edilmiştir. Ardından karanlık ortamda 10 dak süre ile oda sıcaklığına soğutulularak spektrofotometrede (UV-vis T60) 760 nm dalga boyunda, köre karşı absorbansı okunmuştur. Elde edilen absorbans değerleri gallik asit çözeltileri ile oluşturulan standart eğri yardımıyla mg gallik asit eşdeğeri (GAE)/mg kuru örnek ağırlığına dönüştürülmüştür (Skerget vd. 2005). Sonuçlar mg gallik asit

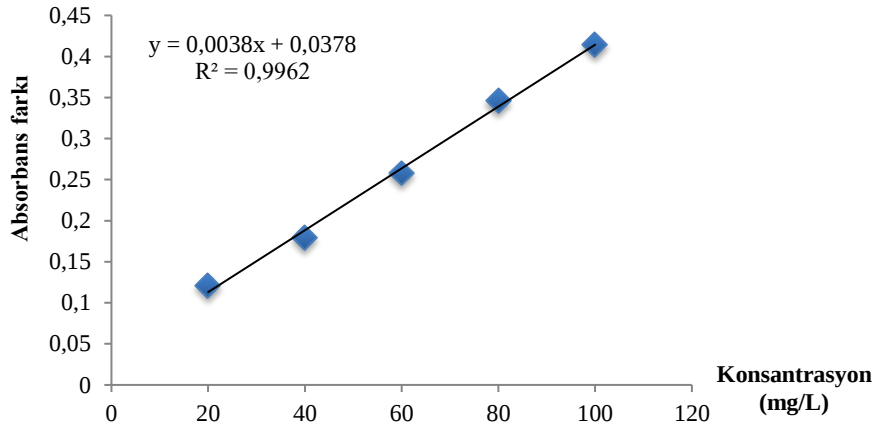
eşdeğeri (GAE)/L olarak ifade edilmiştir (Şekil 3.11).



Şekil 3.11. Gallik asit standart çözeltileri ile elde edilmiş eğim

3.4.4.6. Toplam antioksidan aktivite tayini

Çalışmanın üçüncü yılında B klonlarını temsil eden 10 stevia genotipinin ekstraktlarında antioksidan aktivite tayini spektrofotometrik olarak DPPH radikalinin (Sigma Aldrich, ABD) inhibisyonuna dayanan yöntemle gerçekleştirilmiştir (Fernández-León vd. 2013). Serbest radikallerin antioksidanlar tarafından süpürülme güçlerinin belirlenmesinde kullanılan bu yöntem; antioksidanların bir hidrojen atomu veya elektronlarını vererek DPPH ‘in serbest radikal özelliğini yok etmesi temeline dayanmaktadır (Archana vd. 2005) ve polifenolik bileşiklerin antiradikal etkilerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır (San Chez vd. 1998). Ekstraktlar belli oranda seyreltildikten sonra 50 µL alınarak üzerine 950 µL taze hazırlanmış 60 µM DPPH çözeltisi ilave edilerek oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 30 dak bekletilmiştir. Ekstraktlara ilave edilen DPPH çözeltisinin absorbansı analiz süresinin başında 517 nm dalga boyunda saf metanole karşı ölçülerek kaydedilmiştir. 30 dakika sonunda örneklerin 517 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılmış ve DPPH çözeltisine göre absorbans farkları belirlenmiştir. Örneklerin antioksidan aktivitesi bu absorbans farkları kullanılarak, farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış troloks (Sigma Aldrich, ABD) standartları ile elde edilen eğri yardımıyla (Şekil 3.12) hesaplanmış ve mg troloks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAK)/L olarak ifade edilmiştir.



Şekil 3.12. Farklı konsantrasyonlarda trolox standartlarıyla elde edilen eğim

3.4.4.7. Temel besi ortamlarının hazırlanması

Stevia bitkisinin mikro-çoğaltma çalışmaları Akdeniz Üniversitesi Teknokent içinde yer alan Kuzey Agripak firması doku kültürü laboratuvarlarında yürütülmüştür. Bitki seçiminde özel bir klon seçilmeden klonlar arasından tesadüfi olarak seçilen bitkiler çoğaltım materyali olarak kullanılmıştır. Çalışmanın ilk aşamasında, belirlenen deneme desenine uygun ortamlar hazırlanmıştır. Temel besi ortamı olarak MS (Murashige & Skoog); ortam katılaştırıcı olarak agar (%0.7) ve gelrite (%3); hormon denemeleri için ise BAP, Kinetin ve IAA kullanılmıştır. Oluşturulan deneme desenine uygun olarak; BAP'ın 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l dozları ile IAA'nın 0.5 mg/l dozu; Kinetinin 0.25 mg/l dozu ve NAA'nın 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 mg/l dozları uygulanmıştır. Çalışmada kullanılan deneme deseni Çizelge 3.5.'te gösterilmiştir.

Çalışmada 2 farklı jel 20 farklı hormon kombinasyonu kullanılarak hazırlanan 40 ortama, sterilizasyonu yapılan *Stevia rebaudiana* Bertoni' ler aktarılmıştır. Her bir uygulama için tekrerrü temsil eden 10 kavanozda olmak üzere toplam 400 kavanoz kullanılmış, her bir kavanoza 5 adet eksplant yerleştirilmiştir. Toplamda kullanılan eksplant sayısı 2000 olmuştur. Ardından kültürler; 25 °C sıcaklık, 4000 lux ışık şiddeti ve 16 / 8 h fotoperiyot koşullarındaki büyüme odasında inkübe edilmişlerdir.

3.4.4.7.1. Birinci alt kültüre alma

Yaklaşık 4 haftanın sonunda bitkiler kesilerek değerlendirme yapılmıştır. Buna göre gelrite'in agara göre daha iyi bir gelişim ortamı olduğu gözlenmiştir. En iyi performans gösteren 3 ortam belirlenmiş ve alt kültür ortamı olarak kullanılmıştır.

3.4.4.7.2. İkinci alt kültüre alma

4 haftanın sonunda 11 numaralı ortamın (MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin) en iyi olduğu gözlenmiştir. Üretim frekansının yüksek olabileceği düşünülerek sadece belirli kavanozlar üretime alınmıştır. 11 numaralı ortamdan gelen bitkilerden 4000 adet bitki kesimi yapılmıştır.

3.4.4.7.3. Üçüncü alt kültüre alma

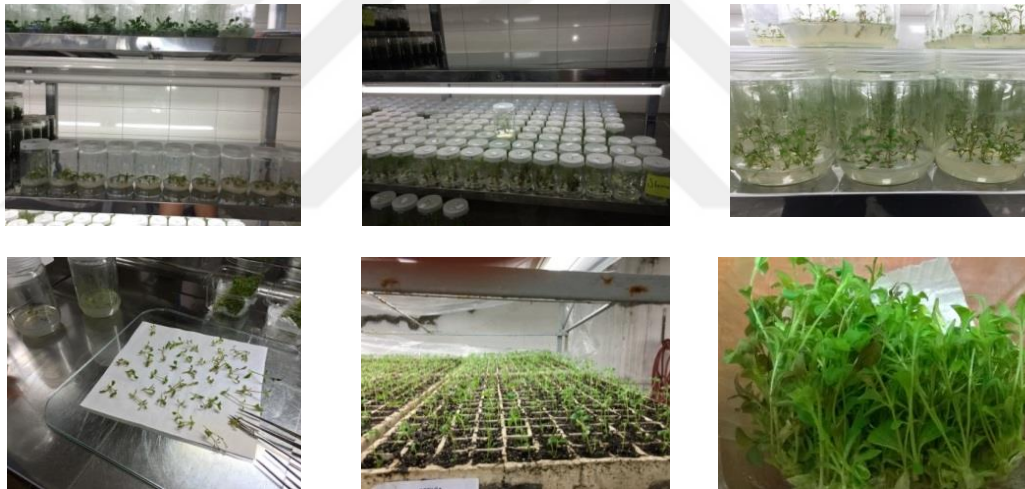
Yaklaşık 4 hafta sonunda bitkilerde yaşlanmayı önlemek için 4000 adet bitki kesilerek yeniden 11 numaralı ortama (MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin) alınmıştır.

3.4.4.7.4. Köklendirme

Bir sonraki aşamada 1000 bitki kullanılarak 30000 adet bitki köklendirilmiştir. Köklendirme ortamı olarak MS0 kullanılmıştır. Bir hafta içinde köklenme gözlenmiştir.

3.4.4.7.5. Bitkilerin alıştırma odasına alınması

İn vitro koşullarda yetişmiş ve köklenmiş olan bitkicikler kavanozlardan pens yardımıyla çıkarılarak köklerdeki agar akan su altında temizlenmiştir. 2 hafta alıştırma ortamında 25 °C sıcaklık, 4000 lux ışık şiddeti ve 16 / 8 h fotoperiyot koşullarında tutulduktan sonra seraya alınmıştır. Çalışmaların yürütüldüğü iklimlendirme odaları, köklenen bitkilerin ortamdan alınması ve alıştırma odalarındaki görüntüleri Şekil 3.13 ' te gösterilmektedir.



Şekil 3.13. *Stevia rebaudiana* Bertoni'de *in vitro* çoğaltım çalışmaları

Çizelge 3.5. Mikro-çoğaltımda kullanılan deneme deseni

No	Ortam	Katılaştırıcı Ajan (%0.7)	No	Ortam	Katılaştırıcı Ajan (%3)
1	MS0 (Kontrol)	gelrite	21	MS0 (Kontrol)	agar
2	MS+0.5 BAP	gelrite	22	MS+0.5 BAP	agar
3	MS+1.0 BAP	gelrite	23	MS+1.0 BAP	agar
4	MS+1.5 BAP	gelrite	24	MS+1.5 BAP	agar

Devamı arkada

Çizelge 3.5'in devamı.

5	MS+2.0 BAP	gelrite	25	MS+2.0 BAP	agar
6	MS+0.5 BAP+0.5 IAA	gelrite	26	MS+0.5 BAP+0.5 IAA	agar
7	MS+1.0 BAP+0.5 IAA	gelrite	27	MS+1.0 BAP+0.5 IAA	agar
8	MS+1.5 BAP+0.5 IAA	gelrite	28	MS+1.5 BAP+0.5 IAA	agar
9	MS+2.0 BAP+0.5 IAA	gelrite	29	MS+2.0 BAP+0.5 IAA	agar
10	MS+0.5 IAA	gelrite	30	-MS+0.5 IAA	agar
11	MS+0.5BAP+0.25 Kinetin	gelrite	31	MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin	agar
12	MS+1.0 BAP+0.25 Kinetin	gelrite	32	-MS+1.0 BAP+0.25 Kinetin	agar
13	MS+1.5 BAP+0.25 Kinetin	gelrite	33	MS+1.5 BAP+0.25 Kinetin	agar
14	MS+2.0 BAP+0.25 Kinetin	gelrite	34	MS+2.0 BAP+0.25 Kinetin	agar
15	MS+0.25 Kinetin	gelrite	35	MS+0.25 Kinetin	agar
16	MS+0.10 NAA+1.0 BAP	gelrite	36	MS+0.10 NAA+1.0 BAP	agar
17	MS+0.15 NAA+1.0 BAP	gelrite	37	MS+0.15 NAA+1.0 BAP	agar
18	MS+0.20 NAA+1.0 BAP	gelrite	38	MS+0.20 NAA+1.0 BAP	agar
19	MS+0.25 NAA+1.0 BAP	gelrite	39	MS+0.25 NAA+1.0 BAP	agar
20	MS+0.5BAP+0.25 Kinetin+ 0.5 IAA	gelrite	40	MS+0.5BAP+0.25 Kinetin+0.5 IAA	agar

3.2.2. Verilerin değerlendirilmesi

Denemeden elde edilen verilerin istatistiksel analizleri SAS paket programı kullanılarak yapılmıştır. İstatistiksel analiz sonuçlarının değerlendirilmesinde farklar arasındaki önemlilik düzeyi % 5 ve % 1 olarak ifade edilmiştir. Seçilen genotipler Duncan çoklu karşılaştırma testi ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1. Varyasyon Kaynağı'na Ait Bulgular

4.1.1. Bitki boyu ve klorofil yoğunluğu

Denemenin ilk yılında kaynak popülasyondan seçilen 200 bitkide biçim öncesi bitki boyu (cm) ve SPAD-502, Osaka, Japan klorofil metre aleti kullanılarak yapraklarının klorofil içeriklerinin renk yoğunluğu değerleri tespit edilmiştir (her bitkiden 10 yaprak). Buna göre; bitki boyu ortalaması 71.64 cm ve klorofil içeriklerinin renk yoğunluğu ortalaması 41.19 olarak belirlenmiştir. Bitki boyu bakımından 120 ve 60 numaralı genotipler 100 cm ile en yüksek değere sahip olurken, 193 numaralı genotip 46 cm ile en düşük bitki boyuna sahip olduğu gözlenmiştir. Klorofil yoğunluğu bakımından en yüksek klorofil yoğunluğu 148 ve 200 numaralı genotiplerde 50.3 iken, en düşük klorofil yoğunluğu 101 numaralı genotipte 31.1 olarak ölçülmüştür. Denemenin birinci yılına ait bitki boyu ve klorofil yoğunluğu Çizelge 4.1.' de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Denemenin birinci yılında ölçülmüş olan bitki boyu ve klorofil yoğunluğu

Klon No	Bitki Boyu (cm)	Klorofil	Klon No	Bitki Boyu (cm)	Klorofil
1	55	40.9	103	54	33,9
2	51	37.7	104	81	40,7
3	57	39.1	105	89	37,3
4	60	32.9	106	70	37
5	25	42.7	107	60	35,23
6	63	39.3	108	79	43
7	75	44.7	109	73	42,4
8	61	39.9	110	93	38,5
9	63	45.4	111	62	38
10	63	23.1	112	60	38
11	70	43.6	113	58	37
12	73	45.8	114	59	42,3
13	69	39.1	115	63	40.8
14	80	42.9	116	75	46.6
15	77	39	117	59	47.7
16	77	46	118	68	45.4
17	87	39.9	119	75	37.5
18	63	42.1	120	100	44.3
19	68	33.9	121	86	43.2
20	72	40.9	122	51	46.5
21	58	44.2	123	78	45.2
22	78	44	124	84	41.5

Devamı arkada

Çizelge 4.1'in devamı.

23	80	32.5	125	79	40.2
24	69	38.4	126	75	41.2
25	72	41.1	127	81	39.3
26	64	36.9	128	61	43.4
27	70	36.7	129	85	40.2
28	57	32.6	130	56	43.1
29	81	45.9	131	83	53.3
30	52	35.7	132	62	39.9
31	55	38.5	133	63	39.4
32	75	38.4	134	75	39.6
33	60	38.2	135	70	42.2
34	67	38.7	136	77	39.69
35	66	37.7	137	64	48.1
36	90	49.3	138	67	34.4
37	66	41.9	139	74	39.4
38	81	40.4	140	79	42.8
39	67	38.3	141	71	45.7
40	71	37.8	142	56	39.2
41	84	38.9	143	61	37.6
42	89	44.3	144	76	38.2
43	92	42.3	145	78	35.5
44	96	46.9	146	93	42.7
45	72	44.1	147	93	43.4
46	76	45.7	148	86	50.3
47	76	47	149	84	37.3
48	72	40.7	150	77	38.9
49	68	45.7	151	60	39.4
50	82	43.8	152	71	36.4
51	60	44.1	153	75	39.32
52	60	37.2	154	66	39.5
53	57	35.8	155	70	38.1
54	78	43.6	156	65	40.4
55	66	45.2	157	60	37.3
56	62	38.9	158	57	43.1
57	80	47.1	159	90	41.8
58	76	45.2	160	65	42.9
59	71	39.1	161	69	43.7
60	100	38.9	162	65	37.5
61	82	43.4	163	89	39.5
62	60	46.2	164	70	45
63	80	38.8	165	91	42.6
64	69	43.3	166	79	40.4
65	72	41.8	167	75	43.6
66	83	47.6	168	76	39.3

Devamı arkada

Çizelge 4.1'in devamı.

67	58	43.3	169	62	41.3
68	74	39.3	170	71	39.7
69	71	43.4	171	56	44.6
70	71	46.1	172	70	45.8
71	57	39.7	173	75	40.6
72	71	44.7	174	68	44.5
73	67	42.6	175	71	38
74	76	43.2	176	61	40
75	86	36.9	177	60	44.9
76	69	43.4	178	72	39.1
77	58	40.1	179	89	35.7
78	75	40.6	180	66	39.1
79	85	41.4	181	71	37.9
80	82	45.3	182	55	43.8
81	66	38.3	183	60	39
82	77	46.46	184	80	38.6
83	75	39.1	185	67	46.9
84	68	45.4	186	61	39.6
85	79	40.5	187	63	35.5
86	58	40.9	188	69	47.2
87	80	40.7	189	67	42.1
88	69	44.1	191	84	46.5
89	85	38	192	91	42.6
91	63	41.8	193	46	34.1
92	62	43.1	194	78	45.3
93	78	40.5	195	67	35.9
94	68	43.5	196	76	40.7
95	81	46.4	197	81	38
96	92	47.1	198	90	40.6
97	93	43.2	199	66	39.9
98	75	41	200	69	50.3
99	75	46.1	201	62	36.7
100	83	45.2	202	82	43
101	65	31.1	Ortalama	71.64	41.19
102	76	41.4			

4.1.2. Yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı

Hasat sonrasında 200 bitkide her bitkiden ayrılan 3 adet yaprak örneğinde yaprak alanı, yaprak çevresi ölçümleri yapılmış ve dijital kumpasla yaprak kalınlığı ölçülmüştür. Yaprak alanı ortalaması 24.7 cm², yaprak çevresi ortalaması 16.6 cm ve yaprak kalınlığı ortalaması 0.35 cm olarak belirlenmiştir. Yaprak alanı bakımından en yüksek değer 38.87 cm² olan 139 numaralı genotipken, en düşük değer 15.49 ile 4 numaralı genotipe aittir. Yaprak çevresi en uzun genotip 23.37 cm ile 68 numaralı genotip olurken, en kısa genotip 11.67 uzunluğa sahip olan 42 numaralı genotiptir.

Yaprak kalınlığı en kalın olan 66 numaralı genotip 0.56 mm olurken, en ince olan genotip 0.2 mm olan 87'dir. Denemenin birinci yılına ait yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı Çizelge 4.2.' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Denemenin birinci yılında yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı

Klon No	Yaprak kalınlığı (mm)	Yaprak alanı (cm ²)	Yaprak çevresi (cm)	Klon No	Yaprak kalınlığı (mm)	Yaprak alanı (cm ²)	Yaprak çevresi (cm)
1	0.29	24.11	19.69	101	0.47	17.08	13.00
2	0.45	18.38	12.82	102	0.37	27.91	17.10
3	0.27	23.03	17.17	103	0.35	22.51	15.01
4	0.39	15.49	15.71	104	0.37	21.71	15.14
5	0.38	28.79	17.19	105	0.37	22.49	16.23
6	0.33	27.63	17.00	106	0.43	34.41	21.24
7	0.36	25.26	17.07	107	0.44	28.09	16.83
8	0.31	28.01	16.70	108	0.43	27.62	16.34
9	0.36	22.97	17.25	109	0.46	21.56	14.96
10	0.39	23.19	15.86	110	0.31	13.15	12.01
11	0.28	18.72	16.35	111	0.39	17.95	15.23
12	0.33	22.42	14.85	112	0.39	14.28	14.50
13	0.3	24.99	18.93	113	0.43	30.92	18.29
14	0.36	15.59	13.78	114	0.41	22.41	16.78
15	0.27	20.34	17.50	115	0.44	32.63	20.56
16	0.36	16.17	13.83	116	0.38	30.17	17.10
17	0.33	18.78	13.95	117	0.35	18.93	14.09
18	0.32	19.71	15.31	118	0.45	25.08	17.22
19	0.29	33.16	21.21	119	0.35	14.90	14.97
20	0.33	28.85	17.49	120	0.44	26.39	16.41
21	0.36	31.95	18.86	121	0.4	26.88	18.50
22	0.36	22.40	15.81	122	0.35	25.57	15.17
23	0.32	21.23	17.73	123	0.42	25.86	17.01
24	0.32	26.46	17.29	124	0.32	23.41	16.89
25	0.31	21.17	15.90	125	0.36	26.97	17.45
26	0.34	32.86	18.15	126	0.31	17.40	13.86
27	0.28	34.92	19.38	127	0.44	20.86	16.71
28	0.29	14.99	14.18	128	0.33	23.87	16.81
29	0.28	23.88	15.90	129	0.32	24.47	15.84
30	0.38	26.81	17.33	130	0.34	27.74	16.77
31	0.24	28.91	17.81	131	0.36	22.40	15.61
32	0.31	32.57	17.73	132	0.37	18.57	13.85
33	0.15	21.12	15.48	133	0.43	22.52	15.74

Devamı arkada

Çizelge 4.2'nin devamı.

34	0.33	14.37	12.70	134	0.39	14.52	15.01
35	0.23	22.64	16.12	135	0.36	22.60	14.69
36	0.37	20.41	15.27	136	0.34	21.71	16.73
37	0.25	24.80	15.51	137	0.45	20.79	14.95
38	0.45	25.20	16.96	138	0.29	21.31	14.96
39	0.29	22.87	15.44	139	0.41	38.88	20.94
40	0.31	20.77	15.78	140	0.27	14.95	14.02
41	0.29	20.95	15.64	141	0.33	16.06	12.89
42	0.34	16.87	11.67	142	0.36	19.81	14.22
43	0.26	22.31	16.87	143	0.35	24.16	15.85
44	0.34	29.24	20.11	144	0.37	30.44	17.76
45	0.26	33.46	18.48	145	0.34	30.05	19.40
46	0.47	28.70	19.67	146	0.32	36.52	18.09
47	0.23	24.54	17.49	147	0.33	24.34	16.65
48	0.31	28.97	15.50	148	0.39	29.28	17.24
49	0.16	32.88	20.33	149	0.26	25.53	18.60
50	0.36	20.31	16.62	150	0.44	16.95	12.56
51	0.37	21.40	15.52	151	0.4	22.60	16.42
52	0.36	26.10	16.42	152	0.36	19.36	15.62
53	0.29	19.22	13.95	153	0.48	21.27	17.04
54	0.42	25.06	15.17	154	0.41	27.71	16.92
55	0.31	17.83	14.78	155	0.31	26.08	17.73
56	0.27	26.04	16.38	156	0.41	28.20	18.15
57	0.38	31.47	18.99	157	0.41	23.80	19.54
58	0.41	25.74	18.04	158	0.38	27.20	16.76
59	0.35	36.15	22.46	159	0.44	30.49	16.28
60	0.45	33.05	17.94	160	0.34	37.78	21.23
61	0.26	20.58	15.65	161	0.31	20.80	13.91
62	0.38	19.65	14.89	162	0.33	28.76	18.62
63	0.26	17.26	14.18	163	0.4	21.56	14.29
64	0.37	25.26	16.82	164	0.38	15.79	11.46
65	0.31	25.26	21.82	165	0.34	27.63	15.59
66	0.56	23.49	16.20	166	0.37	20.77	14.82
67	0.43	20.54	14.18	167	0.34	26.26	15.57
68	0.42	42.54	23.37	168	0.29	28.23	18.04
69	0.44	23.05	17.04	169	0.32	31.83	20.32
70	0.41	29.25	19.62	170	0.43	15.00	13.14
71	0.26	21.73	17.38	171	0.37	28.53	16.57
72	0.36	23.77	15.65	172	0.39	24.25	17.48
73	0.37	25.99	16.74	173	0.35	28.96	17.48

Devamı arkada

Çizelge 4.2'nin devamı.

74	0.37	26.06	15.28	174	0.39	18.46	15.62
75	0.3	20.83	15.17	175	0.32	24.51	15.59
76	0.31	16.97	13.98	176	0.38	20.88	15.87
77	0.27	24.20	15.18	177	0.4	20.67	12.18
78	0.38	23.53	15.56	178	0.31	33.27	19.71
79	0.28	22.11	17.73	179	0.39	35.31	19.12
80	0.4	40.75	21.12	180	0.42	27.86	16.99
81	0.28	16.86	12.12	181	0.39	34.66	18.93
82	0.4	20.67	15.07	182	0.34	35.90	20.42
83	0.3	31.67	17.50	183	0.44	30.71	20.39
84	0.38	25.30	15.84	184	0.31	29.88	17.79
85	0.25	23.05	15.82	185	0.43	36.66	21.24
86	0.26	21.46	14.31	186	0.29	19.79	14.78
87	0.2	24.23	17.37	187	0.36	24.77	15.73
88	0.42	17.28	13.46	188	0.35	26.49	16.11
89	0.25	19.51	16.20	189	0.38	33.07	19.35
91	0.36	29.92	19.79	191	0.39	28.09	17.60
92	0.38	37.49	20.52	192	0.43	16.21	14.13
93	0.31	28.66	18.87	193	0.35	16.95	13.03
94	0.25	26.14	18.76	194	0.39	24.34	16.93
95	0.38	22.61	16.72	195	0.48	26.14	17.71
96	0.36	27.72	18.94	196	0.29	20.78	15.22
97	0.28	16.75	14.97	197	0.43	24.90	20.80
98	0.34	27.08	17.32	198	0.37	27.36	15.93
99	0.37	32.83	17.73	199	0.39	33.56	18.09
100	0.43	22.39	17.20	200	0.34	20.97	12.89

4.1.3. Yeşil herba, yeşil yaprak ve yeşil sap miktarı

Hasat sonrasında yeşil bitkilere ait bitki başına yeşil herba miktarı (g/bitki) yaprak miktarı (g/bitki), sap miktarı (g/bitki), herba miktarı (g/bitki) ve yaprak/sap oranları belirlenmiştir. Bitki başına yeşil yaprak miktarı ortalaması 125.3 g, bitki başına yeşil sap miktarı ortalaması 96.5 g, bitki başına yeşil herba miktarı ortalaması 263.0 g olarak tespit edilmiştir. Bitki başına yeşil yaprak miktarı en yüksek 183 numaralı genotip 323.56 g, en düşük 186 numaralı genotip 41.5 g olarak ölçülmüştür. Bitki başına yeşil sap miktarı bakımından en yüksek miktar 100 numaralı genotipte 299.1 g olurken, en düşük miktar ise 25.84 g ile 160 numaralı genotiptir. Bitki başına yeşil herba miktarı 68 numaralı genotipte 655.4 g ile en yüksek, 186 numaralı genotipte 76.2 g ile en düşük miktarlar olarak ölçülmüştür. Denemenin birinci yılına ait yeşil herba, yeşil yaprak ve yeşil sap miktarı Çizelge 4.3.' te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Denemenin birinci yılında yeşil herba, yeşil yaprak ve yeşil sap miktarı

Klon No	Bitki başına yeşil herba miktarı (g/bitki)	Bitki başına yeşil yaprak miktarı (g/bitki)	Bitki başına yeşil sap miktarı (g/bitki)
1	153,5	84.8	41
2	126.6	62.97	37.46
3	168	81.1	45.1
4	130.7	63.37	41.29
5	133.84	55.7	46.1
6	170	83.63	53.66
7	172.2	105.8	49.3
8	185.8	83.18	64.41
9	132.2	64.7	43.3
10	271.9	124.67	74.96
11	229.1	111.9	84.6
12	306.9	155.42	121.75
13	255.2	116.4	103.3
14	326	152.46	131.85
15	132.7	69.5	46.5
16	196.4	75.4	80.22
17	170.3	76.3	68.5
18	234	116.89	80
19	398.04	221.3	149.7
20	192.05	97.98	57.58
21	162	120.8	43.3
22	273	136.23	99.02
23	185.2	107.9	65.2
24	203.74	106.21	64.57
25	203.43	89.3	72.2
26	275.2	119.05	101.68
27	281.98	136.1	94.2
28	100.88	40.74	31.26
29	285.6	143.6	79.6
30	145.5	73.74	36.26
31	174.24	95.5	44.2
32	304.93	100.61	111.77
33	151.3	74.1	38
34	204.15	95.42	63.74
35	167.4	101.1	44.8
36	483.8	169.41	197.06
37	221.56	113.6	79.8
38	330.52	155.24	121.2
39	296	156.2	89.7

Devamı arkada

Çizelge 4.3'ün devamı.

40	266.2	119	86.1
41	302.1	130.9	104.2
42	209.28	91.65	58.25
43	184.86	71.8	71.8
44	426.7	152	156.33
45	272.2	105.8	92.2
46	403.9	182.35	118.67
47	265.9	127.5	95.4
48	532.5	254.74	183.08
49	89.3	41.9	29.2
50	366.3	130.65	108.54
51	207.86	96.3	68.6
52	231.7	105.7	55.3
53	207.9	105.1	60.2
54	401.4	138.08	160
55	160.8	77.6	45
56	234.7	86.6	58.07
57	331.97	155.4	121.09
58	147.86	55.26	38.27
59	227.1	99.9	44.8
60	376	150.62	125.28
61	252.1	96.8	70.1
62	404.78	207.6	113.89
63	263.5	127.8	70.6
64	360.4	162.68	110.88
65	170.18	51.1	69
66	340.34	158.16	131.86
67	300.6	145.2	98.3
68	655.4	282.75	229.45
69	321.43	131.2	124.2
70	454.7	186.57	169.1
71	181.9	76.3	44.1
72	224.6	92.4	69.12
73	251.75	121.6	91.3
74	200.5	82.84	60.2
75	303.6	90.6	89.4
76	208.83	79.22	54.38
77	195.3	112.5	49.7
78	271.63	111.47	81.26
79	231.74	123.4	73
80	218.1	85.62	69.09

Devamı arkada

Çizelge 4.3'ün devamı.

81	252.9	105.5	66.2
82	260.9	97.96	83.87
83	221.15	58.4	51.8
84	259.5	102.7	51.82
85	204.7	99.5	43.1
86	248.85	101.85	55.19
87	328.04	124.8	95.5
88	269.2	106.77	74.42
89	331.2	131	103
91	320.09	128.1	95.4
92	309.08	129.07	82.57
93	393.05	285.3	108.2
94	309.27	133.43	79.73
95	389.4	100.8	108.7
96	297.2	103.68	83.4
97	301.1	103.31	88
98	190.6	94.1	58.65
99	336.5	123.97	82.86
100	617.3	290.7	299.1
101	232.55	133.44	82.14
102	250.1	114	97.2
103	131.86	66.25	52.21
104	261.4	134.2	96.5
105	200.6	67.72	71.63
106	259.8	119.8	110.7
107	296.82	162.36	101.41
108	237	105.2	96.4
109	334.42	152.11	127.9
110	250.9	94.3	153.2
111	267.45	156.78	86.64
112	432.2	232.7	131.7
113	257	144.42	93.06
114	259.4	133.4	90.2
115	336.58	183.62	132
116	228.3	108.8	102.9
117	177.06	86.5	71.7
118	530.7	315.5	199.8
119	226.95	110.61	110.29
120	245.2	137	114.3
121	222.63	88.47	105.6
122	304.8	164.7	116.8

Devamı arkada

Çizelge 4.3'ün devamı.

123	556.48	301.6	215.68
124	146.2	71.1	60.4
125	253.76	105.42	127.95
126	306	161.3	133.4
127	332.42	160.34	149.53
128	279.1	160.5	104.1
129	212	102.17	87.97
130	312.8	177.6	116.8
131	152.47	62.76	62.83
132	173.4	90.9	73.3
133	303.67	116.94	114.64
134	227.8	118.8	102.7
135	117.34	58.11	43.33
136	122.7	49.8	60
137	285.79	176.35	81.41
138	174.6	86.5	79.8
139	157.61	74.1	57.42
140	221.8	89.8	122.2
141	137.9	116.02	108.34
142	139.3	120	71.3
143	94.95	54.16	25.45
144	204.6	106.8	91.6
145	180.57	137.98	117.92
146	332.3	141.6	193.4
147	346.18	167.48	158.66
148	304.5	151.9	149.6
149	276.61	131.67	114.06
150	99.1	47.7	47.9
151	231.13	124.98	79.31
152	233.27	109.91	66.11
153	234.34	102.6	91.11
154	324.93	147.54	130.72
155	319.72	170.02	123.83
156	225.91	101	86.65
157	150.21	77.6	57.41
158	185.21	92.56	67.08
159	284.61	143.65	135.9
160	77.3	30.25	25.84
161	167.2	88.5	70.9
162	314.7	177.5	131.2
163	137.84	66.9	66.9

Devamı arkada

Çizelge 4.3'ün devamı.

164	460.3	285.7	146.5
165	213.06	82.46	98.69
166	491.7	224.1	165.3
167	165.31	80.44	67
168	241.9	122.2	107.4
169	286.51	149.27	104.61
170	320.7	125.2	91
171	229.76	121.21	82.38
172	172.7	89.3	80.3
173	170.33	87.8	59.2
174	261.9	141.1	105.7
175	170.3	86.79	67.43
176	235.4	118.5	71.8
177	312.92	160.32	119.53
178	226.4	121.4	93.3
179	472.4	227.03	212
180	274.6	159.5	111.5
181	193.8	87.52	75.19
182	277.1	163.1	105.6
183	638	323.56	291.12
184	296.6	164	128.3
185	389	200.01	167.82
186	76.2	41.5	27.2
187	186	88.19	76.06
188	119.1	103.5	71.2
189	238	126.76	88.5
191	380.9	173.29	170.92
192	398.7	171.7	204.7
193	217.11	123.9	63.27
194	325.3	167.4	136
195	280	128.35	122.22
196	306.7	156.9	124.2
197	366.46	161.72	183.73
198	309	166.5	126
199	261.3	202.24	141.29
200	387.52	115.8	124.6

4.1.4. Steviosid ve rebaudiosid A

200 adet bitkide kurutulmuş stevia yapraklarından HPLC ile yapılan içerik analizlerinde bitki başına ortalama steviosid miktarı % 8.1, bitki başına ortalama rebaudiosid A miktarı % 4.7, bitki başına ortalama steviosid+rebaudiosid A miktarı %

12.8 ve bitki başına ortalama reb A / steviosid oranı 0.59 olarak ölçülmüştür. Bitki başına rebaudiosid A miktarı en yüksek 146 numaralı genotipte % 13.69 olurken en düşük 30 numaralı genotipte % 1.94 olarak ölçülmüştür. Bitki başına steviosid miktarı bakımından en yüksek genotip % 16.0 içeren 66 numaralı genotip olurken, en düşük genotip 19 numaralı % 2.1 içeren olmuştur. 66 numaralı genotip 200 bitki için yapılan ölçümlerde % 23.83 ile en yüksek steviosid+rebaudiosid A miktarına sahip olmuştur. Denemenin birinci yılına ait steviosid ve rebaudiosid A miktarı, steviosid+rebaudiosid A miktarı ve reb A / steviosid oranı Çizelge 4.4.' te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Denemenin birinci yılına ait steviosid, rebaudiosid A, steviosid+rebaudiosid A miktarı ve reb A / steviosid oranı

Klon No	reb A (%)	stv (%)	reb A/stv	reb A+stv (%)
1	8.58	12.5	0.69	21.05
2	6.73	11.0	0.61	17.72
3	5.02	9.7	0.52	14.73
4	8.09	10.9	0.74	18.97
5	4.49	8.4	0.54	12.88
6	3.49	8.1	0.43	11.58
7	7.04	5.5	1.27	12.56
8	6.65	7.1	0.94	13.75
9	4.35	8.9	0.49	13.30
10	6.94	8.5	0.81	15.47
11	4.93	10.4	0.47	15.36
12	3.95	3.2	1.25	7.11
13	4.97	8.3	0.60	13.31
14	7.24	5.9	1.22	13.18
15	-	11.6	-	11.61
16	7.95	7.8	1.01	15.80
17	7.14	10.6	0.67	17.74
18	5.96	8.0	0.74	13.96
19	0.92	2.1	0.44	3.03
20	6.03	10.4	0.58	16.48
21	5.94	9.0	0.66	14.93
22	5.66	7.3	0.77	12.98
23	4.50	9.2	0.49	13.67
24	3.75	7.7	0.49	11.43
25	5.30	11.4	0.46	16.71
26	4.29	11.4	0.38	15.70
27	4.12	8.9	0.46	13.01
28	-	12.3	-	12.29

Devamı arkada

Çizelge 4.4'ün devamı.

29	-	0.0		-
30	1.94	4.9	0.40	6.82
31	6.63	2.8	2.34	9.47
32	-	11.1	-	11.06
33	7.14	7.7	0.93	14.83
34	5.84	9.3	0.63	15.13
35	-	11.4	-	11.41
36	5.23	10.2	0.51	15.46
37	3.64	7.9	0.46	11.56
38	4.08	9.2	0.44	13.25
39	5.58	5.1	1.08	10.72
40	2.46	7.0	0.35	9.50
41	4.61	6.8	0.68	11.44
42	-	10.0	-	10.00
43	2.29	9.6	0.24	11.92
44	7.86	8.4	0.94	16.25
45	2.93	9.3	0.32	12.21
46	5.44	7.8	0.70	13.19
47	-	2.7	-	2.74
48	6.62	7.3	0.90	13.95
49	3.42	8.5	0.40	11.91
50	3.55	7.0	0.51	10.50
51	5.22	14.1	0.37	19.31
52	5.22	13.8	0.38	18.98
53	3.04	2.8	1.09	5.81
54	8.74	11.6	0.75	20.35
55	5.72	9.8	0.58	15.52
56	9.85	11.8	0.83	21.66
57	5.45	12.8	0.43	18.22
58	6.45	6.8	0.95	13.23
59	3.81	4.5	0.84	8.34
60	4.25	4.8	0.88	9.09
61	6.72	8.5	0.79	15.22
62	6.02	8.9	0.67	14.95
63	3.99	7.5	0.53	11.51
64	3.91	10.1	0.39	14.00
65	5.91	6.2	0.95	12.15
66	7.87	16.0	0.49	23.83

Devamı arkada

Çizelge 4.4'ün devamı.

67	3.30	6.2	0.53	9.52
68	5.82	12.2	0.48	18.04
69	7.87	8.3	0.94	16.21
70	7.44	6.9	1.07	14.38
71	6.50	12.6	0.52	19.10
72	6.83	7.1	0.96	13.98
73	4.68	13.2	0.36	17.85
74	3.34	6.8	0.49	10.16
75	5.94	4.7	1.27	10.64
76	6.24	9.5	0.66	15.73
77	6.97	10.3	0.68	17.24
78	6.24	12.9	0.48	19.16
79	-	11.1	-	11.08
80	4.74	9.6	0.49	14.34
81	4.37	11.7	0.37	16.04
82	7.95	5.4	1.48	13.33
83	7.27	6.7	1.09	13.93
84	5.95	15.2	0.39	21.19
85	3.69	7.8	0.47	11.52
86	-	0.0	-	-
87	3.83	7.8	0.49	11.64
88	7.99	10.4	0.77	18.40
89	-	0.0	-	-
91	5.68	5.8	0.98	11.47
92	3.70	12.8	0.29	16.46
93	7.50	8.1	0.92	15.61
94	2.36	5.5	0.43	7.83
95	-	11.0	-	11.01
96	7.09	9.2	0.77	16.34
97	4.91	4.2	1.17	9.10
98	5.87	14.3	0.41	20.20
99	6.46	8.5	0.76	14.97
100	7.60	10.1	0.75	17.72
101	5.87	7.0	0.84	12.84
102	4.68	3.3	1.43	7.96
103	-	9.7	-	9.67
104	6.16	6.3	0.97	12.48
105	6.78	12.3	0.55	19.06

Devamı arkada

Çizelge 4.4'ün devamı.

106	3.50	5.9	0.59	9.38
107	6.28	7.9	0.79	14.22
108	3.83	10.0	0.38	13.84
109	-	15.3	-	15.28
110	7.93	12.5	0.64	20.39
111	6.86	4.8	1.42	11.69
112	3.27	8.7	0.37	12.00
113	4.47	6.4	0.70	10.89
114	4.05	7.4	0.55	11.44
115	5.26	10.5	0.50	15.76
116	7.40	6.7	1.11	14.09
117	4.49	8.9	0.51	13.38
118	6.03	7.7	0.79	13.69
119	5.46	15.5	0.35	20.92
120	6.19	6.3	0.98	12.50
121	4.77	8.3	0.58	13.03
122	4.30	8.1	0.53	12.39
123	4.06	10.3	0.39	14.41
124	4.46	4.9	0.91	9.33
125	4.35	13.2	0.33	17.58
126	4.03	11.8	0.34	15.79
127	4.24	12.4	0.34	16.62
128	3.95	11.0	0.36	14.98
129	6.22	5.5	1.13	11.75
130	4.09	13.7	0.30	17.78
131	4.95	8.9	0.56	13.80
132	3.78	4.6	0.83	8.33
133	8.47	8.2	1.03	16.68
134	4.50	8.0	0.57	12.45
135	4.26	8.6	0.50	12.87
136	5.51	8.0	0.69	13.53
137	6.51	12.2	0.53	18.74
138	-	10.5	-	10.46
139	3.61	10.1	0.36	13.71
140	3.39	11.2	0.30	14.56
141	8.56	11.8	0.73	20.33
142	3.34	10.8	0.31	14.17
143	3.74	7.1	0.52	10.87

Devamı arkada

Çizelge 4.4'ün devamı.

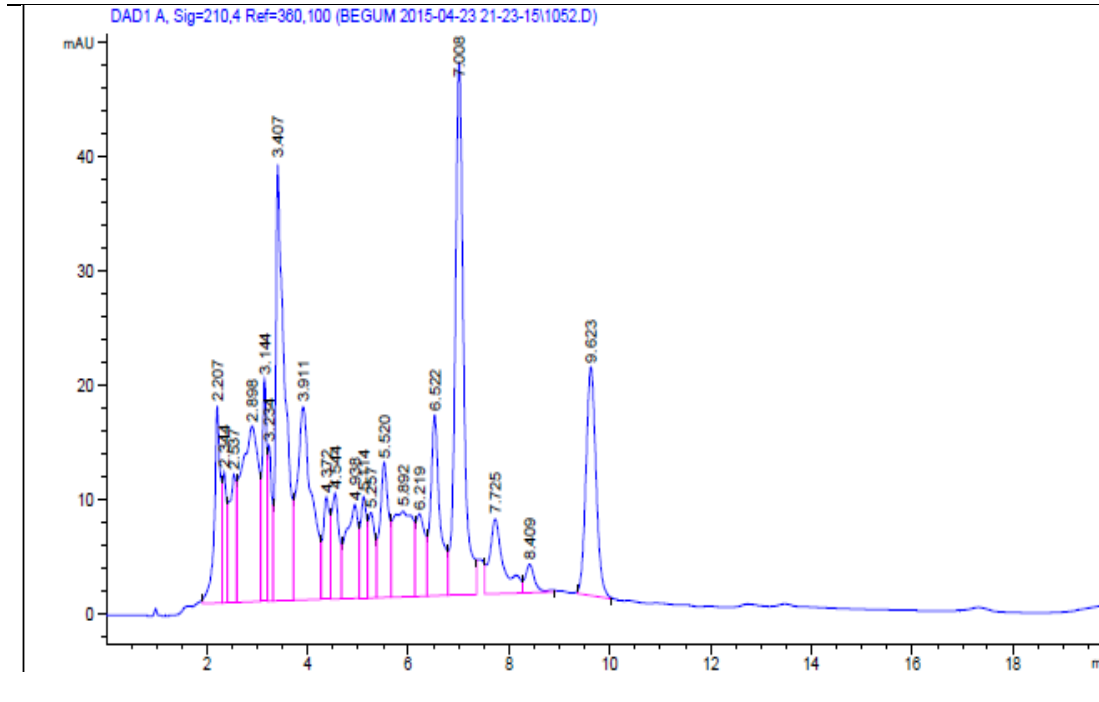
144	-	5.2	-	5.21
145	4.76	12.9	0.37	17.70
146	13.69	9.6	1.42	23.34
147	6.79	8.0	0.85	14.79
148	5.72	5.5	1.05	11.20
149	-	0.0	-	-
150	5.60	5.0	1.12	10.63
151	5.83	8.0	0.73	13.83
152	-	13.9	-	13.94
153	6.10	12.8	0.48	18.88
154	3.05	6.9	0.44	9.96
155	4.58	7.5	0.61	12.11
156	4.94	6.1	0.81	11.03
157	2.62	4.9	0.54	7.51
158	7.21	4.0	1.80	11.20
159	4.47	14.5	0.31	18.93
160	4.56	7.0	0.65	11.59
161	9.20	8.1	1.14	17.28
162	3.60	7.4	0.48	11.04
163	4.18	6.6	0.63	10.81
164	4.18	10.4	0.40	14.62
165	6.54	3.4	1.91	9.95
166	4.56	6.7	0.68	11.27
167	6.41	7.0	0.91	13.45
168	3.49	10.0	0.35	13.45
169	4.36	11.7	0.37	16.08
170	6.24	11.6	0.54	17.87
171	5.90	6.3	0.93	12.24
172	3.64	8.6	0.42	12.20
173	5.86	5.7	1.03	11.55
174	5.72	3.8	1.49	9.57
175	5.76	3.9	1.47	9.68
176	5.44	6.1	0.89	11.58
177	5.21	9.7	0.54	14.86
178	6.96	4.6	1.52	11.52
179	4.97	5.7	0.87	10.66
180	4.73	5.1	0.93	9.80
181	4.70	5.7	0.83	10.36

Devamı arkada

Çizelge 4.4'ün devamı.

182	5.91	6.0	0.98	11.92
183	7.14	7.7	0.93	14.81
184	6.51	5.5	1.18	12.02
185	8.61	8.6	1.01	17.16
186	3.23	4.0	0.80	7.27
187	4.31	9.9	0.43	14.24
188	6.40	6.7	0.96	13.10
189	-	6.4	-	6.44
191	7.51	7.5	1.00	14.99
192	5.55	0.0	-	5.55
193	-	8.0	-	7.98
194	6.36	7.4	0.85	13.81
195	4.32	5.0	0.87	9.29
196	7.57	10.7	0.70	18.31
197	3.92	10.8	0.36	14.68
198	-	8.1	-	8.14
199	5.40	12.7	0.43	18.08
200	3.22	7.8	0.41	11.00

Şekil 4.1'de stevia yaprağından ekstrakte edilmiş bir örneğe ait kromotogram gösterilmektedir.

Şekil 4.1. *Stevia rebaudiana* Bertoni' ye ait örnek kromotogram

105 numaralı genotipe ait kromotogramda 7. dakikada gelen steviosid ve 9. dakikada gelen rebaudiosid A pikleri görülmektedir. Bu genotipin steviosid miktarı % 12.3, rebaudiosid A miktarı % 6.78 olarak ölçülmüştür.

4.1.5. Varyasyon kaynağına ait verilerin değerlendirilmesi

Stevia bitkisi 21-27 ° güney enlemleri içinde yer alan Paraguay subtropikal bölgesinde doğal yayılış gösteren bir bitki olmasına rağmen, farklı coğrafyalarda da bu türün yetiştirilmesi için çeşitli denemeler yapılmıştır. Kore'ye 1973 yılında ilk kez tanıtılan stevia bitkisi için yapılan adaptasyon çalışmalarıyla, beş yıl gibi kısa bir sürede dekardan elde edilen stevia yaprağı 200-250 kg olmuştur (Chung ve Lee 1978). Lokasyondan kaynaklı iklimsel farklılıklardan dolayı *Stevia rebaudiana* yetiştirme koşullarının Kore için optimize edilmesi gerekmiştir (Chung ve Lee 1978; Lee vd. 1980). Örneğin; bitki için gereken kritik gündüz uzunluğunun 12 saat olduğu, gün uzunluğu 12 saatin altına düştüğünde bitkinin büyümesinin ciddi anlamda yavaşladığı gözlenmiştir. En yüksek steviosid içeriği bitki yapraklarının üst kısmında görülürken, en düşük steviosid içeriği ise alt 20 cm altındaki bitki kısımlarında bulunmuştur. Tavarini ve Angelini (2013) hasat zamanıyla rebaudiosid A / steviosid oranı arasında ilişki olduğunu ve çiçek oluşum zamanına kadar hasadın geciktirilmesinin, yaprak kuru ağırlığını fark edilir şekilde arttırdığını bildirmişlerdir. Bu çalışmayla benzer şekilde Antalya şartlarında önceki yıllarda adaptasyonu sağlanmış olan stevia bitkisi için uygun hasat zamanının çiçeklenmenin hemen öncesinde olduğu ve yine glikozit içeriğinin bu dönemde en üst seviyeye geldiği tarafımızca tespit edilmiştir (Turgut vd. 2015). Bu nedenle denemenin yürütüldüğü üç yıl boyunca hasat çiçeklenmenin hemen öncesinde yapılmıştır.

İklim bitkilerin büyüme ve gelişmeleri üzerindeki en önemli çevresel faktörlerdendir. Bitkinin ihtiyaç duyduğu iklimsel koşullar bitkiye göre değişkenlik gösterir. Stevia bitkisinin doğal yayılış alanı subtropikal iklim koşullarına sahiptir. Bu bölgenin (Asuncion) ortalama yıllık sıcaklığı ilkbahar ve yaz aylarında (Ekim'den Mart'a kadar) 21° C ile 32°C arasında olurken sonbaharda ve kışın (Nisan'dan Eylül'e kadar) sıcaklık 10° C ile 21°C arasındadır. Yılın büyük bir bölümünde sıcak ve nemli iklim vardır. Bu bölgede Haziran'dan Ağustos'a kadar olan dönemde geceleri çok düşük sıcaklıklar görülebilir. Stevia en iyi gelişmeyi yıllık sıcaklık ortalaması 31 °C, yağıışı ise 1400 mm olan alanlarda göstermektedir. Don olaylarına karşı hassastır. Yüksek ışık yoğunluğu olan ve yüksek sıcaklığa sahip bölgelerde daha yüksek yaprak üretimi sağlanmaktadır. Yapılan agonomi çalışmaları bitkinin mutlak -3 °C ile 15-30 °C arasında değişen sıcaklık değerlerine dayanabildiğini göstermiştir. Antalya'nın genel olarak iklim karakteristiği Akdeniz iklimidir. Yazları sıcak ve kurak, kışları ılık ve yağışlı olarak geçer. Deniz seviyesi'ne yakın olan kesimlerde nem miktarı özellikle Temmuz Ağustos aylarında oldukça yüksektir, yıllık ortalama nispi nem % 64 civarındadır. Deniz seviyesi'nden yüksek kesimlerde yarı karasal iklim görülür. Yazın ortalama sıcaklık 28-36 °C arasındadır. Don bazı yıllarda birkaç gün hariç neredeyse hiç görülmez. Stevia'nın soğuğa karşı dayanıklı olmadığı ve çok kısa bir süre sıfıra yakın sıcaklığa dayanabildiği bildirilmiştir (Sing ve Rao 2005). Antalya'nın kıyı bölgesinde yazlar hem uzun hem de sıcaktır. Uzun yaz günlerinde gün uzunluğu neredeyse 15 saate yakın olmaktadır. Haziran ayı ortalama gün uzunluğu 14.8 saat olurken Eylül ayı ortalama gün uzunluğu 12.4 saat olarak kaydedilmiştir. Yıllık ortalama yağış miktarı ise 1100 mm civarındadır.

Stevianın büyümesi ve çiçeklenmesi radyasyon, gün uzunluğu, sıcaklık, toprak nemliliği ve rüzgar gibi çevresel faktörlerden etkilenir. Yapılan çalışmalar verimin temel olarak fenotipik ekspresyonunun iklim ve çevre koşullardan etkilenen bitkinin genetik karakterine bağlı olduğunu gösterir (Metivier ve Viana 1979; Ermakov ve Kotechetov 1996). Stevianın iyi bir gelişim gösterebilmesi için toprak tuzluluğunun düşük, pH'ının 6.5-7.7 arasında ve drenajının iyi olması gerektiği bildirilmiştir (Landazuri ve Tigero 2009).

Denemenin yürütüldüğü üç yıl değerlendirildiğinde yıllar boyunca ortalama sıcaklık değerleri büyük bir değişkenlik göstermezken 2016 yılında yıl içi ortalama sıcaklık değeri diğer yıllara göre yaklaşık olarak 1°C artış göstermiştir. Yıllık yağış miktarı çalışmanın yürütüldüğü yıllarda büyük değişkenlikler göstermiştir. 2014 yılında yıllık toplam yağış miktarı 1.235,70 mm, 2015 yılında 903.60 mm ve 2016 yılında 478.60 mm olarak ölçülmüştür. Ortalama nem miktarı deneme süresince ilk yıl (2014) %65 olarak ölçülürken diğer yıllarda bu değer %61 olarak kaydedilmiştir.

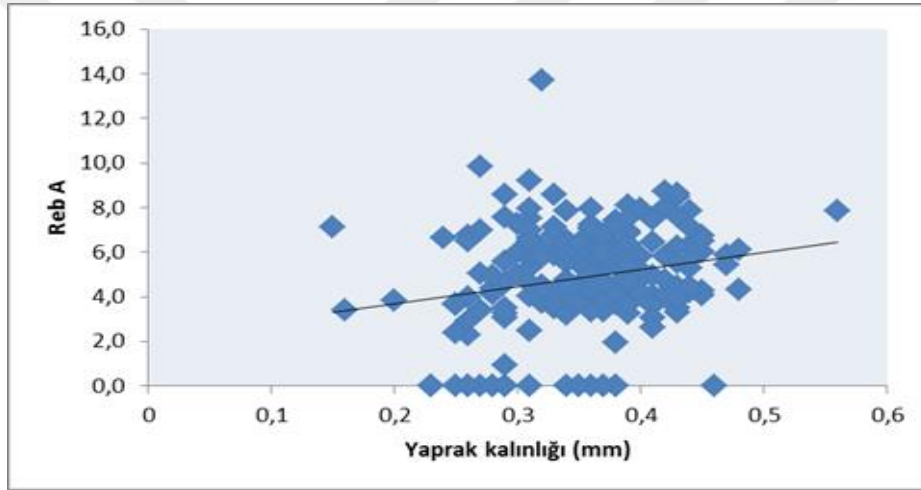
Çalışmanın birinci yılında seçilen bitkiler araziye üç yıl önce dikilmiştir. Bu nedenle varyasyon kaynağının oluşturulduğu ilk yıl bitkiler agronomik açıdan değerlendirildiğinde iyi gelişim göstermiş ve bulundukları ortama uyum sağlamışlardır. Yaprak alanının ve yaprak çevresinin bir yıllık klonal olarak yetiştirilen bitkilerin diğer bitkilerden neredeyse 2.5 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Buradan bitkinin yaşı ile yaprak alanı ve yaprak çevresi arasında pozitif yönde bir ilişki olduğu öne sürülebilir. Yaprak kalınlığı üç yaşındaki varyasyon kaynağında 0.39 mm olurken bir yaşındaki bitkilerdeki iki yılın ortalaması 0.43 mm olmuştur. Bu da bitkinin yaşlandıkça yaprak kalınlığının azaldığını göstermektedir. Bunun da nedeni değişen çevresel faktörlere uyum sağlama sürecindeki ve kendi fizyolojik aktivitelerini devam ettirdiği süreçteki değişen metabolik aktiviteleri olabilir. Yaprak/ sap oranı ilk yıl 1.18 olarak bulunmuştur. Tüm herba ve yaprak miktarının yarıya düştüğü bir yaşında klonların olduğu diğer yıllarda ise oran 0.98-1.03 arasındadır. Bu da bize yaprak/sap oranında çok büyük bir değişkenlik olmadığını göstermektedir. Tateo vd. (1998) yaptıkları çalışmada toplam steviosid miktarının yaprak/sap miktarıyla pozitif korelasyon gösterdiğini bildirmişlerdir.

Varyasyon kaynağını temsil eden üç yaşındaki bitkilerde herba miktarı, yeşil yaprak miktarı, sap miktarı ve kuru yaprak miktarı bir yıllık diğer bitkilerden neredeyse iki kat daha fazladır. Çalışmamızda verim kriterleri başlangıçta belirlediğimiz seleksiyon kriterlerinden olmadığı için değerlendirme sürecinde kimyasal içerikler ön planda tutulmuştur.

Çevresel koşulların ve çeşitlerin farklı olmasında bitkiye ait performans özelliklerinin farklı olabilmesine neden olmaktadır. Bu nedenle özellikle çevresel faktörlerden yüksek oranda etkilenen stevia bitkisi için yapılacak olan verim ve içeriğe ait bulguların her yılın iklimsel koşullarında, bulunduğu lokasyonda değerlendirilmesi uygun olacaktır. Özellikle ıslah çalışmalarında bitkinin bu hassasiyeti göz önünde bulundurulması gerekir. Kumar vd. (2014) iki farklı stevia çeşidiyle yaptıkları çalışmada yaprak/sap oranının 1.14 'den 3.83'e Megeji vd. (2005) ise 0.9'dan 2.0' a kadar değiştiğini bildirmişlerdir. Ceunen ve Genus (2013) bu farklılığın çevresel koşullardan özellikle fotoperiyodizmden olabileceğini ortaya koymuşlardır. Yaptığımız çalışmada lokasyonun ve kullanılan çeşidin aynı olduğu göz önüne alındığında;

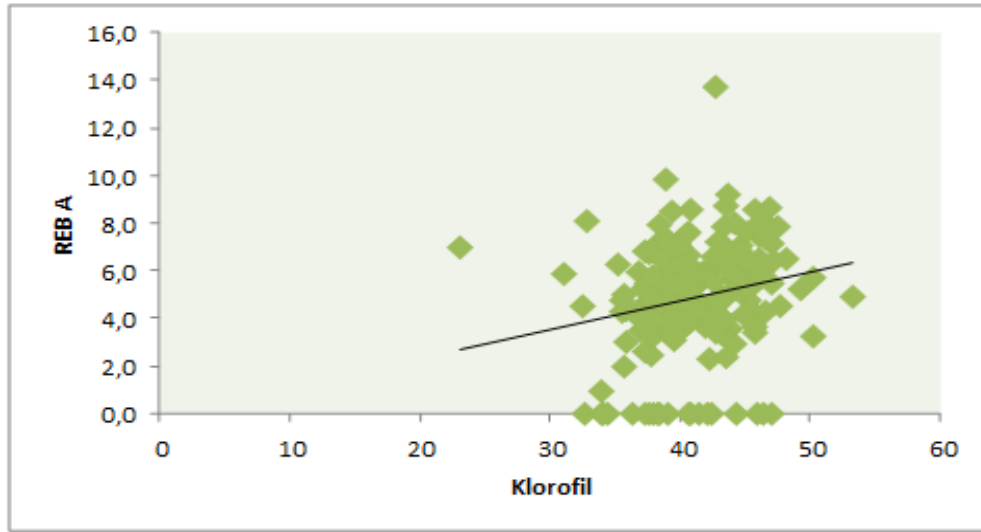
yaprak/sap oranı 0.98 ile 1.18 arasında değişmiş çalışmanın yürütüldüğü üç yıl boyunca çok büyük bir farklılık göstermemiştir. Brandle ve Rosa (1992) yaprak/sap oranının steviosid içeriği ve verimle ilişkisinin olmadığını fakat agronomik ve kimyasal iyileştirmelerle bunun mümkün olabileceğini bildirmişlerdir. Tateo vd. (1998) yaprak/sap oranının steviosid içeriğiyle pozitif ilişkili olduğunu ortaya koymuşlardır.

Hasat öncesinde elde edilen bazı agronomik verilerle, hasat sonrasında elde edilen ve temel seleksiyon kriterlerimiz olan reb A, stv ve reb A+stv arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Yaprak kalınlığı ile reb A arasında pozitif yönde yaklaşık olarak % 20' lik ilişki gözlenmiştir. Benzer şekilde Shyu (1994) yaptığı çalışmada yaprak kalınlığı ile rebaudioside A arasında yüksek oranda ilişki olduğunu bildirmiştir. Giberelin biyosentez yolundan üretilen reb A için yaprak kalınlığı ile giberellin sentezi arasındaki ilişkide incelenebilir. Reb A ve yaprak kalınlığı (mm) arasındaki dağılım grafiği Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.2. Reb A ve yaprak kalınlığı (mm) arasındaki dağılım grafiği

Reb A ve klorofil miktarı arasındaki ilişki değerlendirildiğinde yaklaşık olarak % 20' lik pozitif ilişki olduğu bulunmuştur. Weng vd. (1996) benzer şekilde yüksek reb A miktarıyla klorofil ve yaprak alanı arasında pozitif ilişki olduğunu bildirmişlerdir. Reb A ve klorofil arasındaki dağılım grafiği Şekil 4.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3. Reb A ve klorofil arasındaki dağılım grafiği

Yaprak kalınlığı ile steviosid arasında zayıf bir ilişki olduğu gözlenmiştir. Bu da biyosentez yolunda rebaudiosid A'nın steviosidten sonra sentezlenmesiyle ilişkili olabilir. Değişkenler arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde klorofille reb A arasındaki ilişkinin, klorofille steviosid arasındaki ilişkiden daha yüksek olduğu söylenebilir. Çizelge 4.6.'da varyasyon kaynağında bazı karakterlere ait korelasyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.5. Varyasyon kaynağında bazı karakterlere ait korelasyon değerleri

Değişkenler	Pearson Korelasyon Katsayısı (r)	p değeri
Yaprak kalınlığı-Reb A	0.209	0.003
Yaprak kalınlığı-Stv	0.148	0.037
Yaprak kalınlığı-Reb A+Stv	0.23	0.001
Klorofil-Reb A	0.208	0.003
Klorofil-Reb A+Stv	0.145	0.04
Bitki başına yeşil sap miktarı-Reb A	0.177	0.013

Burada daha çok steviol glikozitlerin bitkinin morfolojik ve anatomik özellikleriyle arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Çevresel koşullardan daha çok etkilenen bitki boyu, yaprak kalınlığı, yaprak alanı gibi karakterlerin çevresel koşullardan çok iç faktörlerden etkilenen rebaudioside A ve steviosid arasındaki

ilişkinin çok güçlü olmadığı görülmüştür. *Stevia rebaudiana*'nın yabancı popülasyonlarında, fenotip ve yaprak analizleri büyük değişkenlik gösterir.

Çeşitli yetiştirme ve ıslah programlarında, yapraklarında farklı düzeylerde steviosid bulunan çeşitli bitki genotipleri ile seleksiyon çalışmaları yürütülmüştür. Shock (1982) steviada yaptığı çalışmada 200 sıra bitki dikmiş, 17 sıranın steviosid içeriğini izlemiş ve seleksiyon programı belirli bir süre devam ettikten sonra bile, yapraklardaki steviosid içeriğinin, bitkiler arasında önemli ölçüde değişkenlik (% 4-16) gösterebildiğini bildirmiştir (Bian 1981; Nakamura ve Tamura 1985). Handro vd. (1993) ise bu doğal değişkenliğin kısmen de olsa türün büyük ölçüde genetik olarak farklı bitkilerle çaprazlanması nedeniyle olabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda varyasyon kaynağı olarak seçtiğimiz 200 bitki tamamen fenotipik görünüşlerine göre (yaprak sayısı, dal sayısı, boy uzunluğu vb.) seçilmiştir. Yaptığımız içerik analizleri sonucunda bu 200 bitki arasında steviosid ve rebaudiosid A bakımından oldukça geniş bir varyasyon olduğu ortaya çıkmıştır. Steviosid içeriği % 2-16 arasında değişirken rebaudiosid A içeriği % 1-13 arasında değişkenlik göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise; popülasyonda bulunan fenotipik farklılıklar araştırılmış ve bunların geçerli bir taksonomik çeşitliliğe göre sınıflandırılmaları başılamamıştır (Monteiro 1980). Bunun yanı sıra; ekilen *Stevia rebaudiana* bitkilerinden elde edilen tatlandırıcı moleküllerin üretiminde nicel ve nitel düzensizlik olduğu rapor edilmiştir. Popülasyon içindeki fonetipik çeşitlilik, türün açık tozlaşma davranışı ile ilişkilendirilmektedir (Tateo vd. 1998).

4.2. A Klonlarına Ait Bulgular

4.2.1. A klonlarının seleksiyonu

Varyasyon kaynağına ait hasat öncesi ve sonrasında elde edilen veriler (yaprak kalınlığı (mm), bitki boyu (cm), yaprak alanı (mm²), yaprak çevresi (mm), klorofil, yeşil herba miktarı (g/bitki), yeşil sap miktarı (g/bitki), ile steviosid (% stv), rebaudiosid A (% reb A) oranları değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre seleksiyon kriteri olarak; yüksek glikozit oranı, yüksek reb A/ stv, yalnız stv içeren, reb A=stv, yüksek stv oranı ve yüksek reb A oranı belirlenmiştir. Buna uygun olarak 40 genotip A klonu olarak seçilmiştir. Seleksiyon kriterleri Çizelge 4.6.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.6. A klonlarının seleksiyon kriterleri

Klon No	REB A (%)	STV (%)	REB A+ STV (%)	Seleksiyon Kriteri
1	8.6	12.5	21.1	reb A+stv
4	8.1	10.9	19.0	reb A+stv
7	7.0	5.5	12.5	reb A/ stv
14	7.2	5.9	13.1	reb A/ stv
15	0.0	11.6	11.6	yalnız stv

Devamı arkada

Çizelge 4.6'nın devamı.

16	8.0	7.8	15.8	reb A=stv
28	0.0	12.3	12.3	yalnız stv içeren (yedek)
31	6.6	2.8	9.4	reb A/ st v
44	7.9	8.4	16.3	reb A= stv
51	5.2	14.1	19.3	yüksek stv
52	5.2	13.8	19.0	yüksek stv
54	8.7	11.6	20.3	reb A+stv
56	9.8	11.8	21.6	reb A+stv
66	7.9	16.0	23.9	yüksek stv
71	6.5	1.6	19.1	yüksek stv
72	6.8	7.1	13.9	reb A/ stv
78	6.2	12.9	19.1	yüksek stv
82	7.	5.4	13.3	reb A/ stv
83	7.3	6.7	14.0	reb A/ stv
84	6.0	15.2	21.2	yüksek stv
88	8.0	10.4	18.4	yüksek reb A
93	7.	8.1	15.6	yüksek reb A
96	7.1	9.2	16.3	reb A=stv
98	5.9	14.3	20.2	yüksek stv
100	7.6	10.1	17.7	yüksek stv
105	6.8	12.3	19.1	reb A+stv
109	0.0	15.3	15.3	yalnız stv
111	6.9	4.8	11.7	reb A / stv
116	7.4	6.7	14.1	reb A/ stv
119	5.5	15.5	21.0	reb A+stv
129	6.2	5.5	11.7	reb a/ stv
133	8.5	8.2	6.7	yüksek reb A
141	8.6	11.8	20.4	reb A+stv
152	0.0	13.9	13.9	yalnız stv içeren
159	4.5	14.5	19	yü sek stv
161	9.2	8.1	17.3	yüksek reb A
185	8.6	8.6	17.2	reb A/stv
191	7.5	7.5	15.0	reb A/stv
196	7.6	10.7	18.3	yüksek reb A oranı
202	7.4	7.3	14.7	reb A=stv

4.2.2. Bitki boyu ve klorofil yoğunluğu

A klonlarını oluşturan 40 klonda (her klondan 5 bitki) biçim öncesi bitki boyu (cm) ve SPAD-502, Osaka, Japan klorofil metre aleti kullanılarak yapraklarının klorofil içeriklerinin renk yoğunluğu değerleri tespit edilmiştir (her bitkiden 10 yaprak). Buna göre; bitki boyu ortalaması 78.32 cm ve klorofil içeriklerinin renk yoğunluğu ortalaması

47.17 olarak belirlenmiştir. A klonlarında bitki boyu bakımından en uzun olan 84 numaralı genotipin 88.6 cm, en kısa olan 31 numaralı genotipin ise 52.6 cm boya sahip olduğu gözlenmiştir. Klorofil yoğunluğu bakımından ise en yüksek 72 numaralı genotipin 54.62, en düşük 111 numaralı genotipin 40.58 olduğu belirlenmiştir. A klonlarında bitki boyu ve klorofil yoğunluğu Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. A klonlarında bitki boyu ve klorofil yoğunluğu

Klon No	Bitki Boyu (cm)	Klorofil	Klon No	Bitki Boyu (cm)	Klorofil
1	79.0	40.72	15	68.4	43.2
66	84.6	45.02	98	69.6	45.12
7	81.2	45.54	100	70.2	45.58
14	86.8	49.96	105	74.8	42.50
16	62.0	46.56	109	77.8	49.78
4	72.6	50.60	110	80.2	46.48
44	81.0	47.80	111	70.2	40.28
51	73.4	47.40	116	88.0	48.84
52	84.0	42.00	119	69.2	47.34
54	76.4	48.28	129	69.4	44.00
28	72.6	46.52	133	73.2	48.78
56	74.8	42.20	141	67.0	52.18
71	86.2	46.92	152	64.4	42.32
72	82.0	54.62	159	65.3	44.36
78	74.2	48.72	161	69.2	48.24
82	76.0	44.84	185	69.4	50.90
83	81.6	49.98	191	73.2	53.28
84	88.6	44.6	196	67.0	45.34
88	80.4	50.98	202	64.4	46.26
96	57.6	48.82	31	52.6	41.35

4.2.3. Yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı

A klonlarında hasat sonrasında her klonu temsil eden 5 adet bitkiden ayrılan 5 adet yaprak örneğinde yaprak alanı, yaprak çevresi ölçümleri yapılmış ve dijital kumpasla yaprak kalınlığı ölçülmüştür. Yaprak kalınlığı ortalaması 0,41 mm, yaprak alanı ortalaması 38,28 mm² ve yaprak çevresi ortalaması 51.74 mm olarak belirlenmiştir. A klonlarından yaprak kalınlığı en fazla olan 78 numaralı genotip 0.60 mm, en az olan genotipler ise 0.31 mm ile 44 ve 196 numaralardır. Yaprak alanı en fazla olan 116 numaralı genotip 21.17 cm², en az olan ise 7.43 cm² olan 191 numaralı genotiptir. Yaprak çevresi en uzun olan 116 numaralı genotip 25.04 cm olurken, 191 numaralı genotipin 12.79 cm ile en kısa boya sahip olduğu gözlenmiştir. A klonlarında yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı Çizelge 4.8.'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. A klonlarında yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı

Klon No	Yaprak kalınlığı (mm)	Yaprak alanı (cm ²)	Yaprak çevresi (cm)	Klon No	Yaprak Kalınlığı (mm)	Yaprak alanı (cm ²)	Yaprak çevresi (cm)
1	0.42	14.18	17.95	15	0.39	13.43	16.22
66	0.47	10.54	16.08	98	0.41	13.10	16.76
7	0.41	13.80	18.29	100	0.45	16.12	20.49
14	0.49	9.95	15.66	105	0.35	10.61	15.73
16	0.42	7.97	14.81	109	0.42	11.04	16.44
4	0.40	12.63	16.34	110	0.35	9.83	18.01
44	0.31	16.36	19.78	111	0.36	9.57	15.61
51	0.39	18.01	20.29	116	0.49	21.17	25.04
52	0.27	14.21	18.22	119	0.44	9.83	18.09
54	0.40	14.67	18.26	129	0.40	15.84	20.24
28	0.51	18.42	21.44	133	0.45	13.51	16.93
56	0.48	13.66	16.70	141	0.37	7.88	12.89
71	0.50	9.44	15.13	152	0.37	9.26	13.43
72	0.46	15.11	18.08	159	0.38	9.56	12.61
78	0.60	11.89	16.28	161	0.39	11.28	16.44
82	0.38	13.53	16.88	185	0.38	18.49	23.49
83	0.39	14.20	18.74	191	0.44	7.43	12.79
84	0.39	10.82	15.90	196	0.31	9.12	15.22
88	0.40	14.14	17.15	202	0.43	16.04	19.89
93	0.49	13.15	16.93	31	0.49	8.99	15.34
96	0.36	11.01	15.55				

4.2.4. Yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap ve kuru yaprak miktarı

Hasat sonrasında A klonlarının yeşil herba miktarı (g/bitki) yaprak miktarı (g/bitki), sap miktarı (g/bitki), herba miktarı (g/bitki) ve yaprak/sap oranları belirlenmiştir. Bitki başına yeşil herba miktarı ortalaması 238.55 g, yeşil yaprak miktarı ortalaması 112.7 g, yeşil sap miktarı ortalaması 119.48 g ve yaprak/ sap oranı 0,94 olarak tespit edilmiştir. Her sıradan 5 adet bitkide kuru yaprak miktarı ortalaması 33.08 g olarak ölçülmüştür. Yeşil herba miktarı bakımından 100 numaralı genotip 368.93 g ile en fazla ağırlığa sahip olurken, 56 numaralı genotipin 70.54 g ile en düşük ağırlığa sahip olduğu gözlenmiştir. 72 numaralı genotipin 68.62 g ile en yüksek yeşil yaprak miktarı içerdiği, 56 numaralı genotipin ise 39.18 g ile en az yeşil yaprağa sahip olduğu belirlenmiştir. Yeşil sap miktarı bakımından değerlendirildiğinde 110 numaralı genotip 208.48 g, 56 numaralı genotipin ise 30.48 g yeşil sap miktarlarıyla A klonlarındaki en yüksek ve en düşük miktarlar olduğu gözlenmiştir. Kuru yaprak miktarı bakımından ise 119 numaralı genotipin 46.82 g ile en yüksek, 12.22 g ile 56 numaralı genotipin en düşük ağırlığa sahip olduğu gözlenmiştir. A klonlarında yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap, kuru yaprak ve yaprak/sap miktarı Çizelge 4.9.' da verilmiştir.

Çizelge 4.9. A klonlarında yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap, kuru yaprak, yaprak/sap miktarı

Klon No	Yeşil herba miktarı (g/bitki)	Yeşil yaprak miktarı (g/bitki)	Yeşil sap miktarı (g/bitki)	Yaprak/sap oranı	Kuru yaprak miktarı(g/bitki)
1	251.10	136.11	112.26	1.21	34.96
66	179.64	86.37	91.01	0.95	25.12
7	211.18	106.53	101.94	1.05	32.48
14	207.63	91.61	113.19	0.81	28.32
16	225.91	92.50	127.02	0.73	30.44
4	155.08	70.35	79.70	0.88	26.16
44	223.44	91.56	119.46	0.77	31.04
51	251.29	119.19	114.37	1.04	41.48
52	181.04	86.70	93.38	0.93	32.90
54	194.18	85.20	107.26	0.79	26.08
28	201.60	112.86	86.06	1.31	33.06
56	70.54	39.18	30.48	1.29	12.22
71	190.10	93.36	90.38	1.03	26.94
72	355.22	168.62	180.36	0.93	44.46
78	243.44	113.40	124.58	0.91	32.64
82	267.10	135.08	128.94	1.05	42.46
83	245.30	116.24	112.40	1.03	38.26
84	240.28	125.84	111.30	1.13	32.62
88	287.84	116.62	164.52	0.71	39.53
93	282.38	127.00	150.14	0.85	37.64
96	231.78	119.74	105.59	1.13	33.74
15	264.20	112.90	98.65	1.14	35.90
98	202.36	105.79	91.94	1.15	29.58
100	368.93	171.72	186.59	0.92	43.84
105	235.54	101.90	124.65	0.82	31.24
109	305.06	148.52	139.27	1.07	40.62
110	354.85	117.57	208.48	0.56	36.44
111	173.77	92.23	75.06	1.23	25.22
116	279.32	113.94	148.33	0.77	32.74
119	323.25	157.67	154.69	1.02	46.82
129	369.87	160.61	194.61	0.83	41.80
133	178.20	95.98	79.92	1.20	28.08
141	193.20	100.84	129.96	0.78	28.24
152	317.62	160.88	152.56	1.05	42.94
159	254.58	125.52	124.86	1.01	40.14
161	228.06	106.02	108.96	0.97	28.90
185	259.72	127.64	115.66	1.10	34.76

Devamı arkada

Çizelge 4.9'un devamı.

191	201.30	100.90	97.24	1.04	28.24
196	226.24	107.14	115.68	0.93	30.06
202	229.12	101.54	125.46	0.81	27.18
31	145.03	80.83	60.85	1.33	23.65

4.2.5. Steviosid ve rebaudiosid A

A klonlarında hasat sonrasında kurutulmuş stevia yapraklarından HPLC ile yapılan içerik analizlerinde sıra başına ortalama steviosid miktarı % 5.26, sıra başına ortalama rebaudiosid A miktarı % 6.3, sıra başına ortalama steviosid+rebaudiosid A miktarı % 11.59 ve sıra miktarı başına ortalama Reb A/ steviosid oranı 1.20 olarak ölçülmüştür. A klonlarında reb A miktarı en fazla çıkan genotip % 6.96 ile 31 numaralı genotiptir. Reb A miktarı % 3.32 ile en düşük miktara sahip olan 84 numaralı genotiptir. Steviosid içeriği en yüksek olan aynı zamanda hiç reb A içermeyen 109 numaralı genotip % 8.54 steviosid içerirken, en düşük steviosid içeren % 4.26 ile 129 numaralı genotiptir. 4 numaralı genotipin ise % 14.9 ile diğer genotipler arasında toplam rebA+stv bakımından en yüksek içeriğe sahip olduğu gözlenmiştir. Buna göre; 4 numaralı ve 196 numaralı genotipler içerdikleri yüksek reb A ve steviosid miktarları bakımından, 52 numaralı genotip % 9.36 steviosid içermesi açısından, 82 numaralı genotip % 7.77 ile en yüksek reb A içermesinden ve 109 numaralı genotip sadece steviosid içermesinden dolayı A klonları arasında ön plana çıkan genotipler olmuşlardır. A klonlarında steviosid, rebaudiosid A, steviosid+rebaudiosid A miktarı ve reb A / steviosid oranı Çizelge 4.10.' da verilmiştir.

Çizelge 4.10. A klonlarında steviosid, rebaudiosid A, steviosid+rebaudiosid A miktarı ve reb A / steviosid oranı

Klon No	REB A (%)	STV (%)	REB A/STV (%)	REB A+ STV (%)
1	4.83	6.17	0.78	11
4	6.86	8.04	0.85	14.9
7	6.69	5.92	1.13	12.61
14	6.67	5.35	1.25	12.02
28	6.03	5.3	1.14	11.33
16	4.72	5.54	0.85	10.26
31	6.96	5.23	1.33	12.19
44	4.01	5.97	0.67	9.98
51	4.99	6.09	0.82	11.08
52	4	9.36	0.43	13.36
54	5.14	6.81	0.75	11.95
56	4.9	5.97	0.82	10.87
66	4.79	8.32	0.58	13.11
71	4.83	6.3	0.77	11.13

Devamı arkada

Çizelge 4.10'un devamı.

72	5.02	4.91	1.02	9.93
78	3.42	6.46	0.53	9.88
82	7.77	5.2	1.49	12.97
83	6.11	4.6	1.33	10.71
84	3.32	8.67	0.38	11.99
88	4.92	6.23	0.79	11.15
93	6.91	4.97	1.39	11.88
96	6.15	7.53	0.82	13.68
98	4.55	7.21	0.63	11.76
100	6.04	6.3	0.96	12.34
105	4.66	7.83	0.60	12.49
109	0	8.54	-	8.54
111	5.62	7.95	0.71	13.57
116	5.72	4.8	1.19	10.52
119	3.8	7.56	0.50	11.36
129	5.17	4.26	1.21	9.43
133	6.81	4.99	1.36	11.8
141	4.88	4.41	1.11	9.29
152	3.57	6.42	0.56	9.99
159	3.77	7.39	0.51	11.16
161	5.92	5.46	1.08	11.38
185	6.48	5.08	1.28	11.56
191	6.62	5.92	1.12	12.54
196	6.46	7.92	0.82	14.38
202	5.92	5.81	1.02	11.73

4.2.6. Toplam fenolik madde

A klonlarında toplam fenolik madde (mg/L) miktarları Çizelge 4.11'de verilmiştir. Buna göre A klonlarının toplam fenolik madde bakımından ortalamasının 2.746 mg/ L olduğu gözlenmiştir. En yüksek fenolik madde miktarının 3.675 mg/L içeren 66 numaralı klonal hatta ait olduğu, en düşük fenolik madde miktarının ise 1.293 mg/L içeren 44 numaralı klona ait olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.11. A klonlarında toplam fenolik madde (mg/L) miktarları

Klon No	Toplam Fenolik Madde mg/L	Klon No	Toplam Fenolik Madde mg/L
1	2.798,54	15	2.486,69
66	3.675,63	98	2.346,36
7	2.087,13	100	2.104,67

Devamı arkada

Çizelge 4.11'in devamı.

14	2.917,44	105	2.558,81
16	2.810,24	109	2.697,19
4	2.582,19	110	2.894,05
44	1.293,85	111	2.319,07
51	2.135,86	116	3.153,28
52	2.182,63	119	3.340,39
54	2.724,48	129	2.860,91
28	3.215,65	133	2.933,03
56	2.515,93	141	2.486,69
71	2.455,50	152	3.394,96
72	3.104,55	159	3.326,74
78	1.755,79	161	2.258,65
82	2.496,44	185	3.383,27
83	2.849,22	191	3.578,17
84	2.919,39	196	3.578,17
88	2.925,23	202	3.430,04
93	2.574,40	31	2.283,99
96	2.714,73	Ortalama	2.746,20

4.2.7. A klonlarına ait verilerin değerlendirilmesi

İlk yıl varyasyon kaynağına ait veriler değerlendirildikten sonra 200 genotipten 40 genotip A klonu olarak seçilmiştir. Seçim yapılırken seleksiyon kriterleri olarak daha çok içerdikleri diterpen glikozitlerin miktarı ve bunlar arasındaki oran dikkate alınmıştır. İlk yıl verileri üç yaşında bitkilerden elde edildiği için A klonlarına ait bulgular bir önceki yıllara kıyaslandığında özellikle agronomik özellikler açısından neredeyse yarı yarıya bir azalış gözlenmiştir. Klorofil miktarı ve yaprak/sap oranında çok büyük bir değişiklik gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra, bizim temel seleksiyon kriterlerimiz olan özellikler bakımından farklılıklar gözlenmiştir.

A klonları oluşturulurken 9 genotip içerdiği yüksek steviosid miktarı, 9 genotip reb A ve steviosid oranının yaklaşık olarak birbirine eşit olması, 7 genotip reb A/stv oranına göre yüksek olanlar, 6 genotip reb A+ stv miktarı toplamda yüksek olanlar, 6 genotip yüksek reb A miktarı ve 3 genotipte yalnız steviosid içermesi bakımından seçilmiştir. A klonlarında yapılan çalışmalarda ise bazı genotiplerin seleksiyonlarına neden olan özelliklerini korudukları, bazılarında ise büyük farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Örneğin 4 numaralı klonal hat bir önceki yıl içerdiği reb A + stv miktarı (% 19.0) nedeniyle seçilmişken bir sonraki yıl reb A+stv miktarı (% 14.9) bakımından yaklaşık olarak % 21.6 kadar değişiklik göstermiştir. Bu değişkenliğe rağmen yıl içi toplam reb A+ stv miktarı ortalamasına göre ortalamanın üzerinde bir toplam değere sahiptir. Yani aslında miktar azalsada genotipin seçilmesine neden olan karakterin özelliğini koruduğu görülmektedir. Çizelge 4.12.'de 4 numaralı klonal hatta ait değişim gösterilmektedir.

Çizelge 4.12. 4 numaralı klonal hatta ait değişim

	2014				2015		
	Reb A	Stv	Reb A+ Stv	Seleksiyon nedeni	Reb A	Stv	Reb A+ Stv
Klon No	%	%	%	reb A + stv	%	%	%
4	8.1	10.9	19.0	Değişim % 21.6 (↓)	6.86	8.04	14.9

14 numaralı genotipin birinci yıl ve ikinci yıl durumu değerlendirildiğinde; ilk yıl yapılan değerlendirmeye göre reb A/ stv oranının yüksek olması nedeniyle seçilmiş olduğu görülmektedir. İkinci yıl rakamsal olarak değerler değişmesine rağmen aradaki oranın neredeyse hiç değişmediği görülmüştür. İlk yıl 1.22 olan reb A/ stv oranı ikinci yıl 1.24 olmuş ve değişim miktarı sadece %1.63 olmuştur. Bu da bize rebaudiosid A ve steviosidin sentezinin çevresel faktörlerden çok etkilenmiyor olduğunu gösterebilir. Çizelge 4.13.'te 14 numaralı klonal hatta ait değişim gösterilmektedir.

Çizelge 4.13. 14 numaralı klonal hatta ait değişim

	2014				2015		
	Reb A	Stv	Reb A/ Stv	Seleksiyon nedeni	Reb A	Stv	Reb A/ Stv
Klon No	%	%	%	reb A / stv	%	%	%
14	7.2	5.9	1.22	Değişim % 1.63(↑)	6.67	5.35	1.24

İlk yıl 200 stevia bitkisinde yapılan içerik analizlerinde bazı genotiplerde reb A olmadığı tespit edilmiştir. Bu genotiplerden de seleksiyon yapılarak sonraki yıllarda özelliklerini klonal olarak devam ettirip ettirmedikleri takip edilmiştir. İlk yıl sadece steviosid içerdiği rebaudiosid A içermediği için seçilen 109 numaralı klonal hatta ikinci yıl steviosid miktarının yaklaşık olarak % 45 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Nicel olarak azalmasına rağmen yine de seleksiyonuna neden olan karakter özelliğini koruduğu görülmektedir. İkinci yıl verilerinde genel olarak görülen bu azalma ilk yıl varyasyon kaynağını oluşturan bitkilerin üç yaşında ikinci yıl A klonlarını oluşturan bitkilerin bir yaşında olmasından kaynaklanmaktadır. 109 numaralı genotipte iki yıl yapılan içerik analizlerinde hem üç yaşındaki ana bitkide hem ana bitkiye ait bir yaşındaki klonda rebaudiosid A bulunamamıştır. Ayrıca steviosid oranı bir önceki yıla kıyasla azalmış olsa da yine de seçilmiş 40 genotipin 2015 yılı steviosid ortalaması % 6.32 iken 109 numaralı genotipin steviosid ortalaması % 8.54 olmuştur. Çizelge 4.14.'te 109 numaralı klonal hatta ait değişim gösterilmektedir.

Çizelge 4.14. 109 numaralı klonal hatta ait değişim

	2014				2015		
	Reb A	Stv	Reb A+ Stv	Seleksiyon nedeni	Reb A	Stv	Reb A+ Stv
Klon No	%	%	%	yalnız stv	%	%	%
109	0	15.3	15.3	Değişim % 45.06 (↓)	0	8.54	8.54

159 numaralı genotip değerlendirildiğinde yüksek miktarda steviosid içerdiği için seçildiği görülmektedir. Steviosid değeri ikinci yıl yaklaşık olarak % 50 oranında azalmıştır. Ancak ilk yıl 200 adet stevia bitkisine ait steviosid ortalaması % 8.3 iken 159 numaralı genotipin % 14.5 değeri ortalamadan yaklaşık olarak % 44 gibi bir farklılık gösterirken, steviosid ortalamasının % 6.3 olduğu ikinci yıl bir yıllık 159 numaralı genotip %7.39 steviosid miktarıyla ortalamadan pozitif yönde % 15.5 kadar bir fark göstermiştir. Çizelge 4.15.’te 159 numaralı klonal hatta ait değişim gösterilmektedir.

Çizelge 4.15. 159 numaralı klonal hatta ait değişim

	2014				2015		
	Reb A	Stv	Reb A+ Stv	Seleksiyon nedeni	Reb A	Stv	Reb A+ Stv
Klon No	%	%	%	yüksek stv	%	%	%
159	4.5	14.5	18.9	Değişim % 50.7 (↓)	3.77	7.39	11.16

Çalışmamızın ilk yılında 200 genotip içerisinde seçilen 40 genotipten reb A+ stv oranı yüksek olan 6 tanesinden 3 tanesinin aynı özelliklerini ikinci yılda da devam ettirdikleri görülmüştür. Yalnız steviosid içeren 3 tane genotipin 1 tanesinin bu özelliği ikinci yılda da devam ettirdiği gözlenmiştir. Reb A miktarı steviosid miktarına yakın olduğu için seçilen 9 genotipten 6 tanesinin çalışmanın ikinci yılında da benzer şekilde olduğu bulunmuştur. Varyasyon kaynağından steviosid içeriği yüksek olduğu için seçilmiş olan 9 genotipten 6 tanesinin ikinci yılda da steviosid miktarlarının ortalamasının üzerinde olduğu, reb A miktarı yüksek olduğu için seçilmiş olan 6 genotipten 3 tanesininde aynı şekilde bu özellik bakımından özelliğini devam ettirdiği görülmüştür. Yapılan çalışmada bizim için en önemli seleksiyon kriterlerinden biri olan reb A/ stv oranı 1’ in üzerinde ve yüksek olan 7 genotipten 6 genotipin ikinci yıl çalışmalarında da oranının yüksek olduğu gözlenmiştir.

Birinci yıl bulgularında steviosid ortalaması % 8.3, ikinci yıl ise % 5.26’ dır. Birinci yıl verileri değerlendirildiğinde reb A ortalamasının % 6.71, ikinci yıl ise % 6.32

olduğu görülmektedir. Steviosid miktarının bir önceki yıla göre % 38 oranında değişmesinin nedenlerinden en önemlisi varyasyon kaynağını oluşturan genotiplerin üç yaşında, A klonlarının bir yaşında olması olabilir. Bunun da nedeni bir yaşındaki bitkilerin bulundukları ortama uyum sağlama sürecinde steviol akümülesyonunu yüksek düzeyde gerçekleştirememiş olması, fizyolojik faaliyetlerini daha çok bitkinin adaptasyonu, büyüme ve gelişmesi yönünde devam ettirmiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Steviol glikozitler tüm bitki düzeyinde, yaşlandıkça dokularda birikme eğilimi gösterir. Böylece daha yaşlı alt yapraklar, daha genç üst yapraklara kıyasla daha fazla tatlandırıcı barındırır. Kloroplastlar öncül sentezde önemli olduğundan, kök ve alt sap gibi klorofil ihtiva etmeyen dokularda glikozit bulunmaz ya da eser miktarda bulunur. Çiçeklenme başladıktan sonra, yapraklardaki glikozit konsantrasyonu azalmaya başlar (Singh ve Rao 2005). Reb A miktarı bakımından iki yıl arasında sadece % 5.66 gibi bir değişimin gözlenmesi, reb A diterpen glikozitinin çevresel faktörlerden az, etkilendiğini, genetik faktörlerin etkisinin yüksek, dolayısıyla kalıtım derecesinin yüksek olabileceğini göstermektedir.

Bunun yanı sıra çalışmanın yürütüldüğü iki yıl arasındaki iklimsel farklılık olup olmadığınıda göz önünde bulundurmak gerekir. Bu açıdan bakıldığında iki yıl arasında sıcaklık ve yağış değerleri arasında bitkide strese ya da fizyolojik değişikliklere neden olacak kadar büyük bir fark olmadığı belki nem değerinin bir miktar (% 65-% 61) değiştiği görülmektedir.

A klonlarına ait bitki boyu, klorofil, yaprak alanı, yaprak çevresi, yeşil sap miktarı, yeşil yaprak miktarı, herba miktarı, kuru yaprak miktarı ve yaprak/sap oranları değerlendirildiğinde, varyasyon kaynağına göre bitki boyu, klorofil ve yaprak/sap oranı hariç diğer parametrelerin neredeyse yarıya yakın bir azalış gösterdikleri görülmüştür. Yapılan klonal seleksiyonda öncelikli kriterlerimiz içeriklerin yüksek olması olduğundan dolayı, özellikle çevresel faktörlerden daha fazla etkilenen verimle ilişkili parametrelere ait veriler öncelikli olarak değerlendirilmemiştir. Seleksiyon yaparken aynı karakter bakımından birbirine yakın değerlere sahip iki genotip arasındaki seçimlerde tarla koşullarındaki performansları da göz önünde bulundurularak seçim yapılmıştır. İleri ki çalışmalarda hedefe yönelik durulmuş, içeriği yüksek çeşitler geliştirildiğinde verime dayalı parametrelerinde iyileştirilmesi için çalışmalar yapılabilir.

4.3. B Klonlarına Ait Bulgular

4.3.1. B klonlarının seleksiyonu

A klonlarına ait hasat öncesi ve sonrasında elde edilen veriler (yaprak kalınlığı (mm), bitki boyu (cm), yaprak alanı (mm²), yaprak çevresi (mm), klorofil, yeşil herba miktarı (g/bitki), yeşil sap miktarı (g/bitki), ile steviosid (% stv), rebaudiosid A (% reb A) oranları değerlendirilmiştir. Elde edilen verilere göre B klonları oluşturulurken seleksiyon kriteri olarak; yüksek glikozit oranı, yüksek reb A/ stv, yalnız stv içeren, yüksek stv oranı ve yüksek reb A oranı belirlenmiştir. Buna uygun olarak 10 genotip B klonu olarak seçilmiştir. Seçimler yapılırken genotiplerin önceki yıllardaki verileride dahil olmak üzere tarla performansları da dikkate alınmıştır. Seleksiyon kriterleri Çizelge 4.16.'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. B klonları için seleksiyon kriterleri

Klon no	REBA(%)	STV (%)	rebA/stv	Seleksiyon Kriteri
82	7.77	5.20	1.49	reb A/ stv
83	6.11	4.60	1.33	reb A/ stv
100	6.04	6.30	0.96	yüksek stv
109	-	8.54	-	yalnız stv
111	5.62	7.95	0.71	reb A+stv
116	5.72	4.80	1.19	reb A/ stv
133	6.81	4.99	1.36	yüksek reb A
185	6.48	5.08	1.28	reb A/ stv
191	6.62	5.92	1.12	yüksek reb A
196	6.46	7.92	0.82	reb A+stv

4.3.1. Bitki boyu ve klorofil yoğunluğu

B klonlarını oluşturan 3 tekerrürde, 10 klonda (her klondan 5 bitki) biçim öncesi bitki boyu (cm) ve SPAD-502, Osaka, Japan klorofil metre aleti kullanılarak yapraklarının klorofil içeriklerinin renk yoğunluğu değerleri tespit edilmiştir (her bitkiden 10 yaprak). Buna göre; bitki boyu ortalaması birinci tekerrürde 62.50 cm, ikinci tekerrürde 49.06 cm ve üçüncü tekerrürde 60.62 cm olarak ölçülmüştür. Klorofil içeriklerinin renk yoğunluğu birinci tekerrürde 49.06, ikinci tekerrürde 50.45 ve üçüncü tekerrürde 51.55 olarak belirlenmiştir. B klonlarında bitki boyu ve klorofil yoğunluğu Çizelge 4.17.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.17. B klonlarında bitki boyu ve klorofil yoğunluğu

Klon No	1. Tekerrür		2. Tekerrür		3. Tekerrür		Ortalama	
	Bitki Boyu (cm)	Klorofil	Bitki Boyu (cm)	Klorofil	Bitki Boyu (cm)	Klorofil	Bitki Boyu (cm)	Klorofil
82	59.60	48.19	60.80	47.38	66.00	53.76	62.13	49.78
83	61.60	51.78	69.40	56.4	61.20	53.84	64.07	54.01
100	59.60	46.06	54.60	48.02	60.00	53.02	58.07	49.03
109	65.80	50.06	66.60	50.12	70.80	52.5	67.73	50.89
111	61.40	38.46	50.00	39.3	43.80	43.1	51.73	40.29

Devamı arkada

Çizelge 4.17'nin devamı.

116	64.60	47.52	65.40	57.36	54.00	54.18	61.33	53.02
133	72.40	50.98	65.20	56.36	70.40	43.78	69.33	50.37
185	56.80	54.08	54.60	59.02	55.00	55.5	55.47	56.20
191	62.20	55.58	63.40	46.8	63.20	57.48	62.93	53.29
196	61.00	47.92	63.20	43.74	61.80	48.32	62.00	46.66
Ortalama	62.50	49.06	61.32	50.45	60.62	51.55	61.48	50.35

B klonlarında klorofil a ve klorofil b yoğunluğu ayrıca ölçülmüştür. Buna göre en yüksek klorofil a yoğunluğu 196 numaralı klonda en yüksek klorofil b yoğunluğu ise 116 numaralı klonda ölçülmüştür. B klonlarının ortalama klorofil a yoğunluğu 5.76 olurken, ortalama klorofil b yoğunluğu ise 2.42 olarak bulunmuştur. Çizelge 4.18.' de B klonlarının klorofil a ve klorofil b yoğunluğu gösterilmiştir.

Çizelge 4.18. B klonlarının klorofil a ve klorofil b yoğunluğu

Klon No	Klorofil a	Klorofil b	Klon No	Klorofil a	Klorofil b
82	6.17	2.39	116	5.55	3.26
83	5.7	2.27	133	3.26	2.99
100	5.81	2.02	185	5.87	1.76
109	5.17	2.56	191	3.62	2.48
111	6.17	2.03	196	6.71	2.75

4.3.2. Yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı

B klonlarında hasat sonrasında üç tekerrürde de her klonu temsil eden 5 adet bitkiden ayrılan 5 adet yaprak örneğinde yaprak alanı, yaprak çevresi ölçümleri yapılmış ve dijital kumpasla yaprak kalınlığı ölçülmüştür. Yaprak kalınlığı ortalaması birinci tekerrürde 0.52 mm, ikinci tekerrürde 0.40 mm ve üçüncü tekerrürde 0.44 mm olarak ölçülmüştür. Yaprak alanı ortalaması birinci tekerrürde 16.11 cm², ikinci tekerrürde 14.63 cm² ve üçüncü tekerrürde 14.51 cm² ölçülmüştür. B klonlarında yaprak çevresi ortalaması birinci tekerrürde 4.52 mm, ikinci tekerrürde 4.36 cm ve üçüncü tekerrürde 4.55 cm 'dir. B klonlarında yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı Çizelge 4.19.' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.19. B klonlarında yaprak alanı, çevresi ve kalınlığı

Klon No	1. Tekerrür			2. Tekerrür			3. Tekerrür		
	Yaprak Kalınlığı (mm)	Yaprak Alanı (cm ²)	Yaprak Çevresi (cm)	Yaprak Kalınlığı (mm)	Yaprak Alanı (cm ²)	Yaprak Çevresi (cm)	Yaprak Kalınlığı (mm)	Yaprak Alanı (cm ²)	Yaprak Çevresi (cm)
82	0.52	17.32	4.34	0.38	14.11	4.69	0.44	16.06	4.27
83	0.5	18.36	5.00	0.39	16.82	4.43	0.45	16.39	4.64
100	0.53	15.99	5.44	0.34	16.64	4.40	0.45	14.97	5.00
109	0.58	15.29	4.16	0.42	14.43	4.46	0.47	13.26	4.69
111	0.46	19.28	5.09	0.44	13.01	3.96	0.4	13.94	4.20
116	0.58	12.18	3.01	0.37	13.48	3.61	0.42	12.78	4.32
133	0.55	16.56	5.29	0.45	15.58	4.85	0.49	12.57	3.94
185	0.58	18.30	4.83	0.49	16.03	4.17	0.53	19.75	5.44
191	0.48	14.36	4.42	0.36	11.84	4.41	0.36	12.42	4.64
196	0.47	13.49	3.63	0.43	14.34	4.62	0.43	12.95	4.41
Ort	0.525	16.11	4.52	0.407	14.63	4.36	0.444	14.51	4.55

4.3.3. Yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap ve kuru yaprak miktarı

B klonlarına ait tekerrürlerin herbiri için yeşil herba miktarı (g/bitki), yeşil yaprak miktarı (g/bitki), yeşil sap miktarı (g/bitki), herba miktarı (g/bitki) ve yaprak/sap oranları belirlenmiştir. Birinci tekerrürde bitki başına yeşil herba miktarı ortalaması 143.53 g, yeşil yaprak miktarı ortalaması 62.57 g, yeşil sap miktarı ortalaması 66.615 g, kuru yaprak miktarı ortalaması 25.32 g ve yaprak/ sap oranı 0.97 olarak ölçülmüştür. İkinci tekerrürde bitki başına yeşil herba miktarı ortalaması 145.86 g, yeşil yaprak miktarı ortalaması 64.31 g, yeşil sap miktarı ortalaması 69.118 g, kuru yaprak miktarı ortalaması 25.41 g ve yaprak/ sap oranı 0.97 olarak ölçülmüştür. Üçüncü tekerrürde bitki başına yeşil herba miktarı ortalaması 133.51 g, yeşil yaprak miktarı ortalaması 57.65 g, yeşil sap miktarı ortalaması 60.88 g, kuru yaprak miktarı ortalaması 24.60 g ve yaprak/ sap oranı 0.99 olarak ölçülmüştür. B klonlarında yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap ve kuru yaprak miktarı Çizelge 4.20.' de verilmiştir.

Çizelge 4.20. B klonlarında 3 tekerrürde yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap, kuru yaprak, yaprak/sap miktarı

Klon No	yeşil herba (g/bitki)	yeşil yaprak (g/bitki)	yeşil sap miktarı (g/bitki)	kuru yaprak miktarı (g/bitki)	yaprak/sap oranı
82	131.74	58.42	61.81	23.48	0.94
83	164.16	62.79	75.97	25.94	0.82
100	166.61	84.28	76.68	31.36	1.09
109	179.20	72.43	85.72	27.26	0.84
111	121.30	67.84	47.28	27.20	1.43
116	163.56	51.59	81.78	21.96	0.63
133	167.42	79.32	72.52	29.30	1.09

Devamı arkada

Çizelge 4.20'nin devamı.

185	59.75	31.08	25.32	18.02	1.22
191	122.65	49.31	62.7	22.42	0.78
196	158.86	68.69	76.37	26.22	0.89
ortalama	143.53	62.57	66.615	25.32	0.97
Klon No	yeşil herba (g/bitki)	yeşil yaprak (g/bitki)	yeşil sap miktarı (g/bitki)	kuru yaprak miktarı (g/bitki)	yaprak/sap
82	125.84	57.48	60	24.76	0.95
83	131.62	49.20	60.6	21.94	0.81
100	142.50	68.46	69.24	25.26	0.98
109	146.12	64.24	68.12	24.40	0.94
111	124.14	72.00	48.22	26.40	1.49
116	173.62	56.06	84.56	23.78	0.66
133	144.46	70.70	60.54	26.14	1.16
185	119.42	62.92	50.84	26.04	1.23
191	173.64	72.18	103.08	28.04	0.70
196	177.26	69.86	85.98	27.36	0.81
ortalama	145.86	64.31	69.118	25.41	0.97
Klon No	yeşil herba (g/bitki)	yeşil yaprak (g/bitki)	yeşil sap miktarı (g/bitki)	kuru yaprak miktarı (g/bitki)	yaprak/sap
82	171.19	68.89	83.37	29.58	0.82
83	143.32	56.42	67.55	22.74	0.83
100	113.07	55.68	54.65	23.80	1.01
109	145.17	62.80	64.61	25.80	0.97
111	96.47	45.54	29.89	21.54	1.57
116	104.29	35.98	49.14	20.18	0.73
133	175.61	82.34	80.85	29.32	1.01
185	106.90	55.20	43.62	24.14	1.26
191	137.36	54.30	66.18	23.88	0.82
196	141.75	59.32	68.94	24.98	0.86
ortalama	133.51	57.65	60.88	24.60	0.99

4.3.4. Steviosid ve rebaudiosid A

B klonlarında kurutulmuş stevia yapraklarından HPLC ile yapılan içerik analizlerinde birinci tekerrürde bitki başına ortalama steviosid miktarı % 4.53, ortalama rebaudiosid A miktarı % 5.2, bitki başına ortalama steviosid+rebaudiosid A miktarı % 9.73 ve ortalama reb A/ steviosid oranı 1.15 olarak ölçülmüştür. İkinci tekerrürde bitki başına ortalama steviosid miktarı % 5.09, ortalama rebaudiosid A miktarı % 6.24, bitki başına ortalama steviosid+rebaudiosid A miktarı % 11.33 ve ortalama reb A/ steviosid oranı 1.23 olarak ölçülmüştür. Üçüncü tekerrürde bitki başına ortalama steviosid miktarı % 5.08, ortalama rebaudiosid A miktarı % 6.38, bitki başına ortalama steviosid+rebaudiosid A miktarı % 11.46 ve ortalama reb A/ steviosid oranı 1.26 olarak ölçülmüştür. B klonlarında reb A bakımından değerlendirildiğinde 133 numaralı genotip

% 6.4 ile en yüksek. 111 numaralı genotipin % 4.85 ile en düşük değere sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca 82 ve 191 numaralı genotiplerin sırasıyla % 6.37 ve % 6.24 reb A miktarı içerdikleri gözlenmiştir. Steviosid bakımından değerlendirildiğinde 109 numaralı genotipin % 7.59 steviosid içeriğiyle B klonları içinde en yüksek, 111 numaralı genotipin ise % 3.84 ile en düşük miktara sahip olduğu görülmüştür. 109 numaralı genotipin sadece steviosid içeriyor olması dikkat çekicidir. 82 numaralı genotipin reb A / steviosid oranı bakımından 1.48 ile en yüksek, 196 numaralı genotipin ise 0.89 ile en düşük orana sahip olduğu bulunmuştur. B klonları steviosid+rebaudiosid A miktarı bakımından değerlendirildiğinde 196 numaralı genotipin % 13.58, 109 numaralı genotipin % 7.59 ile en düşük miktara sahip olduğu görülmüştür. 191 numaralı genotipinde steviosid+rebaudiosid A miktarı bakımından, % 11.0'in üzerinde olması önemlidir. B klonlarında steviosid, rebaudiosid A, steviosid+rebaudiosid A miktarı ve reb A / steviosid oranı Çizelge 4.21.' de verilmiştir.

Çizelge 4.21. B klonlarında steviosid, rebaudiosid A, steviosid+rebaudiosid A miktarı ve reb A / steviosid oranı

Klon No	% reb A	% steviosid	rebA/stv	reb A+ stv (%)
82	6.37	4.29	1.48	10.66
83	5.69	4.43	1.29	10.12
100	5.52	4.75	1.16	10.27
109	-	7.59	-	7.59
111	4.85	3.84	1.26	8.69
116	6.06	4.90	1.18	10.96
133	6.40	4.35	1.34	10.75
185	6.11	4.40	1.38	10.51
191	6.24	5.10	1.16	11.34
196	6.20	7.38	0.89	13.58
Ortalama	5.94	5.08	1.21	10.44

4.3.5. Toplam fenolik madde

B klonlarında spektrofotometrik yöntemle belirlenen toplam fenolik madde (mg/L) miktarları Çizelge 4.22'de verilmiştir. Örnekler arasında farklılıklar istatistiksel olarak %1 düzeyinde önemli bulunmuştur. Çizelge 4.21'de klonlar arasında fenolik madde bakımından değerlendirme gösterilmektedir. Buna göre; 196 numaralı genotip en yüksek toplam fenolik madde miktarına sahip olurken 185 numaralı genotip ise en düşük fenolik madde miktarına sahip olmuştur. 82, 100, 109 ve 191 numaralı genotipler aynı grupta yer almışlardır.

Çizelge 4.22. B klonlarında toplam fenolik madde (mg/L) miktarları

Klon No	1. TEKERRÜR mg/L	2. TEKERRÜR mg/L	3. TEKERRÜR mg/L	3. YIL ortalama
82	2112.47	2549.06	1734.35	2131.96
83	2416.52	2356.10	2445.76	2406.13
100	1777.22	2512.03	2128.06	2139.10
109	2332.71	2235.26	2317.12	2295.03
111	1995.52	2463.30	2272.29	2243.70
116	2334.66	2704.99	2552.96	2530.87
133	2673.80	2494.49	2543.21	2570.50
185	2053.99	1977.98	2204.07	2078.68
191	2116.36	2627.02	2221.62	2321.67
196	2897.95	2613.38	2878.46	2796.59
Ortalama	2271.12	2453.36	2329.79	2351.42

4.3.6. Toplam antioksidan aktivite

B klonlarında toplam antioksidan (mg/L TEAK) miktarları Çizelge 4.23’de verilmiştir. Antioksidan kapasitede genotipler arasında önemli bir fark gözlenmemiştir. Radikal süpürücü etki yaptığımız çalışmada çok yüksek bulunmamıştır. Yapılan bir çalışmada ise alkollü içeceklerde ve tütün sanayisinin yanısıra dondurma, meyve suyu, şekerleme gibi birçok endüstriyel gıdada stevia’nın antioksidan kaynağı olarak kullanılabilecek bir ürün olduğu bildirilmiştir (Penner 2004).

Çizelge 4.23. B klonlarında toplam antioksidan madde (mg/L TEAK) miktarları

Klon No	1. Tekerrür mg/L TEAK	2. Tekerrür mg/L TEAK	3. Tekerrür mg/L TEAK	3. Yıl ortalama
82	64.132	23.678	24.007	37.272
83	73.671	28.546	29.533	43.917
100	87.816	31.737	33.743	51.099
109	69.461	31.178	26.704	42.447
111	56.303	20.454	23.118	33.292
116	95.184	36.704	39.072	56.987
133	93.474	37.724	38.086	56.428
185	65.645	28.283	28.217	40.715
191	83.276	33.316	34.072	50.221
196	109.066	48.151	48.414	68.544
Ortalama	79.803	31.977	32.497	48.092

Yapılan değerlendirmede klonlar arasında antioksidan aktivite bakımından istatistiksel olarak önemli bir fark bulunmamıştır. Şekil 4.24’de klonların antioksidan ve fenolik madde bakımından çoklu karşılaştırma değerlendirmesi yer almaktadır.

Çizelge 4.24. B klonlarında toplam fenolik madde ve antioksidan madde miktarlarının değerlendirilmesi

Klon No	Fenol*	Antioksidan
82	2132.00 bc	37.27
83	2406.10 abc	43.92
100	2139.10 bc	51.10
109	2295.00 bc	42.45
111	2243.70 bc	33.29
116	2530.90 ab	56.99
133	2570.50 ab	56.43
185	2078.70 c	40.72
191	2321.70 bc	50.22
196	2796.60 a	68.54

4.3.7. B klonlarına ait verilerin değerlendirilmesi

A klonlarından elde edilen 10 genotipten oluşan B klonlarına ait agronomik veriler değerlendirildiğinde; bir yaşındaki klonların ortalama standartlarda performans gösterdiği söylenebilir. Yaprak alanı ve yaprak kalınlığı bakımından, üç yaşındaki popülasyon dikkate alınmadığında bir yaşındaki A ve B klonlarının benzer sonuçlar gösterdiği görülmektedir. Klorofil içeriği bakımından üç yaşındaki ana popülasyonda dahil olmak üzere klonlarda çok büyük bir değişkenlik gözlenmemiştir. Benzer şekilde yaprak/sap oranları arasında da varyasyon kaynağı ile A ve B klonları arasındaki en büyük fark % 20 olmuştur. Bunların dışındaki yeşil yaprak miktarı, yeşil herba miktarı, yeşil sap miktarı ve kuru yaprak miktarı gibi agronomik değerler birbirinden farklılık göstermiştir. Kısa günlere kıyasla, uzun gün koşulları boğumlar arası uzunluğu, yaprak alanını ve kuru ağırlığı artırır ve şeker otunda bulunan ardışık yaprak çiftleri arasındaki aralığı azaltır. Stevianın yetiştirildiği lokasyonda agronomik veriler bakımından farklılıklar ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Kanada’da yetişen stevia bitkilerinin kuru yaprak ağırlığının, kuru sap ağırlığına oranı 1.22 olarak bulunurken, Kaliforniya’da bu oran yaklaşık 0.67 olarak bulunmuştur (Brandle ve Rosa 1992).

Başlıca seleksiyon kriterimiz olan diterpen glikozitlerin miktarı bakımından 10 genotipin üç yıllık özellikleri değerlendirilmiştir.

82 numaralı genotipin ilk yıl A klonları oluşturulurken seçilme nedeni reb A / stv oranının yüksek olmasıdır. Bir sonraki yıl B klonları oluşturulduğunda da 82 numaralı genotipin aynı özelliği devam ettirdiği görülmüştür. Reb A ve steviosid miktarları her yıl değişse de reb A / stv oranının çok büyük bir değişkenlik göstermemiş ilk yıl 1.48, ikinci yıl 1.49 ve üçüncü yıl 1.48 olmuştur.

83 numaralı genotip ilk yıl reb A / stv oranının yüksek olması nedeniyle A klonu olarak seçilmiştir. B klonlarında da bu özelliğini devam ettirmiştir. Ana popülasyondaki reb A / stv oranı 1.09 iken A klonlarında 1.33 ve B klonlarında 1.28 olarak başlangıçta seçilmesine neden olan oranın çok daha üzerinde bir performans göstermiştir.

116 numaralı genotipin ilk yıl seleksiyon nedeni reb A / stv oranının yüksek olmasıdır. Çalışmanın sonraki yıllarında da reb A / stv oranı çok büyük bir değişikliğe uğramadan devam etmiştir. Birinci yıl 1.11, ikinci yıl 1.19 ve üçüncü yıl 1.24 bulunan reb A / stv oranı bu genotip için neredeyse stabil olarak devam etmiştir.

185 numaralı genotip ilk yıl reb A / stv oranı popülasyon içindeki diğer bireylerden yüksek olduğu için seçilmiştir. Çalışmanın ikinci ve üçüncü yılında bu özelliğini koruyarak nicelik olarak artış göstermiştir. İlk yıl 1.01 olan reb A / stv oranı, ikinci yıl 1.28 ve üçüncü yıl 1.39 olmuştur. Reb A / stv oranı yüksek olması bakımından seçilen 82-83-116 ve 185 numaralı genotipler beraber değerlendirildiğinde bütün genotiplerin seçilmelerine neden olan özelliklerini korudukları görülmektedir. Özellikle endüstriyel açıdan stevia bitkisinde olması istenen başlıca özelliklerden biri olan reb A / stv oranının yüksek olması ve bunu çalışmanın yapıldığı yıllar boyunca genotip özelliği olarak devam ettirmesi önemli bir bulgudur. Bu belki de reb A üretiminin çevresel etkenlerden az etkilenmesinden olabilir. Bir diğer bakış açısıyla biyosentez yolunda steviosidden sonra sentezlenen reb A 'nın üretiminin stevioside bağlı olduğu ve ikisinin üretimi arasındaki ilişkide bu genotiplerde bir denge olduğu da düşünülebilir.

100 numaralı genotip ilk yıl içerdiği yüksek steviosid miktarı nedeniyle seçilmiştir. İlk yıl % 10.11 gibi ortalamanın üzerinde bir miktara sahipken ikinci yıl bu miktar % 6.30 olmuş ve yine A klonları steviosid ortalamasının üzerinde olduğu için seçilmiştir. Ancak üçüncü yıl B klonlarında steviosid ortalaması genel olarak azalmış ve 100 numaralı genotipte de % 4.75 miktarı bulunmuştur. Bu da steviosid bakımından genotip özelliğinin çevresel faktörlere göre değişkenlik göstermesinden kaynaklanıyor olabilir.

109 numaralı genotip değerlendirildiğinde, ana popülasyon kaynağında steviosid ve rebaudiosid A analizleri yapıldığında, 200 genotipten 3 tanesinde rebaudiosid A olmadığı yalnız steviosid içerdiği gözlenmiştir. Bu özelliğin o yıla özgü bir durum mu yoksa genotip özelliği mi olduğunu görmek açısından 3 genotip seçilmiştir. Bunlardan sadece 109 numaralı genotipin ikinci yılda da yalnız steviosid içerdiği görülmüştür. Ana varyasyon kaynağından B klonlarına kadar 109 numaralı genotipin hiç rebaudiosid A içermediği bulunmuştur ve önemli bir bulgu olabilir. Tateo vd. (1998), çevresel ve tarımsal faktörlerin steviosid üretimi üzerine etkili olduğu yönünde görüş bildirmiştir.

133 numaralı genotip yüksek reb A içermesi nedeniyle seçilmiştir. Çalışmanın yürütüldüğü yıllar boyunca yüksek reb A içermiştir. Reb A miktarına bağlı olarak reb A / stv oranları da hep yüksek olmuştur. İlk yıl reb A miktarı % 8.47, ikinci yıl % 6.81 ve üçüncü yıl % 6.4 olmuştur.

191 numaralı genotip ilk yıl reb A / stv oranı yüksek olduğu için seçilmiştir. İlk yıl reb A / stv oranı 1.0 olarak bulunmuştur. A klonları için yapılan değerlendirmede ise yine aynı özelliğini devam ettirmiş aynı zamanda reb A oranı da yüksek olduğu için B klonu olarak seçilmiştir. 191 numaralı genotipin üç yıl boyunca hem reb A miktarı hem de reb A / stv oranı yüksek olmuştur.

111 numaralı genotip ilk yıl reb A / stv oranı yüksek olduğu için (1.42) seçilmiştir. Sonraki yıl bu özelliğini devam ettirmediği görülmüştür. Ancak reb A+ stv miktarı yüksek olduğu için (%12.34) bu genotipin bir sonraki yıl içinde seçimi

yapılmıştır. B klonlarında ise seçilen iki özellik bakımından da karakterleri devam ettirmediği muhtemelen çevresel şartlara göre değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. Mısır 'da yapılan bir araştırmada, sıcaklık, ışık periyodu uzunluğu ve yoğunluğu gibi iklim koşullarının, kışa kıyasla yazın elde edilen verimdeki bariz artıştan da anlaşıldığı gibi, stevia üretimini ve kalitesini önemli derecede etkilediği ortaya koyulmuştur (Allam vd. 2001). Yıllar arasında aynı genotipte ortaya çıkan farklılık en büyük çevresel faktörlerden biri olan iklimden kaynaklanıyor olabilir.

196 numaralı genotip ilk yıl hem reb A + stv miktarı yüksek olduğu (% 18.31) hem de reb A miktarı (% 7.57) yüksek olduğu için seçilmiştir. Üç yıl boyunca iki özellik bakımından da karakterini devam ettirmiştir. Özellikle reb A ' ya bağlı karakterlerin aynı özellikleri devam ettirmesi bakımından önemlidir. Çizelge 4.25.'te 3 yıllık deneme süresinde seçilen 10 genotipin reb A (%), steviosid (%) ve reb A/ stv miktarları gösterilmektedir. Stevia yapraklarındaki glikozit konsantrasyonu, bitki uzun gün koşulları altında yetiştiğinde artış gösterir. Glikozit sentezi çiçeklenme sırasında ya da çiçeklenmeden hemen önce azaldığı için, çiçeklenmenin uzun gün koşulları sayesinde geciktirilmesi, glikozit birikimi için daha fazla zaman yaratır (Metivier ve Viana 1979, 2005; Singh ve Rao 2005).

Çizelge 4.25. Seçilen 10 genotipe ait reb A (%). steviosid (%).ve reb A/ stv miktarları

Klon	REB A(%)			STV (%)			REB A/STV		
No	1. yıl	2.yıl	3.yıl	1. yıl	2.yıl	3.yıl	1. yıl	2.yıl	3.yıl
82	7,95	7,77	6,37	5,38	5,20	4,29	1,48	1,49	1,48
83	7,27	6,11	5,69	6,66	4,60	4,43	1,09	1,33	1,28
100	7,60	6,04	5,52	10,11	6,30	4,75	0,75	0,96	1,16
109	-	-	-	15,28	8,54	7,59	-	-	-
111	6,86	5,62	4,85	4,84	7,95	3,84	1,42	0,70	1,26
116	7,40	5,72	6,06	6,69	4,80	4,90	1,11	1,19	1,24
133	8,47	6,81	6,4	8,20	4,99	4,35	1,03	1,36	1,47
185	8,61	6,48	6,11	8,55	5,08	4,40	1,01	1,28	1,39
191	7,51	6,62	6,24	7,48	5,92	5,10	1,00	1,12	1,22
196	7,57	6,46	6,2	10,74	7,92	7,38	0,70	0,82	0,84
ORTALAMA	6,92	5,76	5,94	8,39	6,13	5,09	0,96	1,02	1,17

Elde edilen bulgular stevianın sentezlediği sekonder metabolitlerden olan glikozitlerin sentezinin değişken olduğunu göstermektedir. Farklı yerlerde yapılan çalışmalarda da bunun örnekleri görülmüştür. Örneğin; Huang vd. (1995) Çin 'de yaptıkları bir araştırmada, tek bir klondan alınan bitki numunelerinde, steviosid içeriğinin % 1.48'den % 6.98 'e kadar. rebaudiosid A içeriğinin % 4.5' den % 12.1' e kadar ve toplam glikozitin % 10.26 ' dan %19.57' ye kadar değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir. Çin' de yapılan başka bir araştırmada, bazı sıralardaki toplam tatlı glikozit konsantrasyonunun % 20.5'e kadar çıktığı ve farklı bir çeşitte rebaudiosid A / steviosid oranının 9:1 olabildiği rapor edilmiştir (Morita 1987; Shizhen 1995). Yaptığımız çalışmada üç yıl boyunca genotiplerin içerdikleri glikozit konsantrasyonu bakımından geniş bir varyasyon gözlenmiştir. Megeji vd. (2005) tarafından incelenen stevia popülasyonunda önemli morfolojik varyasyon gözlenmiştir. Bu popülasyon aynı

zamanda steviosid içeriği bakımından, %1 ile %10 arasında değişebilen, önemli bir varyasyon göstermiştir.

Hammaddedeki böyle bir çeşitlilik, bireysel glikozitleri tekrar kristalize etmeye gerek kalmadan, %85' in üzerinde rebaudiosid A içeren stevia tatlandırıcılarının geleneksel ekstraksiyon metotlarıyla üretilmesini mümkün kılacak niteliktedir.

Elde edilen bilgileri ideal bir çeşit geliştirmek adına kullanmak için stevianın genetik anlamda iyileştirilmesi, ancak mevcut morfolojik, kimyasal, biyokimyasal, sitogenetik ve moleküler çeşitliliğin karakterize edilmesiyle mümkündür. Stevia üzerine bir süredir araştırma yapan ülkelerin hepsi, özellikle Japonya, Çin, Kore, Tayvan ve Rusya, seleksiyon programlarının başarılı olduğunu rapor etmişler ve iyileştirilmiş glikosid içeriği ve daha yüksek verime sahip yeni çeşitler üretmişlerdir.

B klonlarında elde edilen veriler doğrultusunda; bitki boyu, yaprak alanı, yaprak çevresi ve klorofile ait varyans analizi sonuçlarına ilişkin veriler Çizelge 4.26' da verilmiştir. Yapılan istatistik analizi sonucunda genotipler arasında bitki boyu açısından % 1 düzeyinde önemli bir farkın olduğu görülmektedir. Gruplandırılmalar incelendiğinde klonal hatların beş farklı grupta yer aldığı görülmektedir. Bitki boyu bakımından 133 numaralı genotip 69.33 cm' le en uzun boya sahip olurken, bunu 67.73 cm boya sahip olan 109 numaralı klonal hat izlemiştir. Yine 83 ile 191 ve 82 ile 196 numaralı klonal hatların aynı gruplar içerisinde yer aldıkları gözlenmiştir. En kısa boya sahip olan 111 numaralı genotip 51.73 cm ve buna en yakın grupta yer alan 185 numaralı klonal hattın 55.47 cm olduğu gözlenmiştir. Bitki boyunun kantitatif kalıtılan bir özellik olduğu ve çevresel faktörlerden etkilendiği bildirilmiştir (Salehi vd. 2006). Yaprak alanı bakımından klonal hatlar değerlendirildiğinde % 1 düzeyinde fark olduğu görülmektedir. En yüksek yaprak alanının 18.07 cm² olan 185 numaralı genotipe, en düşük yaprak alanının 12.81 cm² olan 116 numaralı genotipe ait olduğu görülmektedir. Bunun yanı sıra 109, 133 ve 196 numaralı klonal hatların aynı grupta yer aldığı görülmüştür. Yaprak kalınlığı bakımından gruplar arasındaki fark 0.40 mm ve 0.44 mm arasında değişkenlik göstermiştir. 133 numaralı klonal hattın en fazla yaprak kalınlığına sahip olduğu, 109 ve 116 numaralı klonal hatların aynı grupta yer aldığı görülmüştür. B klonlarında yaprak çevresi bakımından klonal hatlar arasındaki fark önemli bulunmamıştır. En fazla yaprak çevresi 14.83 cm olan 100 numaralı genotip, en az yaprak çevresi ise 116 numaralı klonal hatta 10.94 cm olarak ölçülmüştür. Klorofil açısından genotipler arasında % 1 düzeyinde fark olduğu tespit edilmiştir. Klorofil miktarı en yüksek olan 185 numaralı genotipte 56.2, en düşük olan 196 numaralı genotipte 46.66 olarak bulunmuştur. Klorofil miktarı bakımından 82, 83, 116 ve 191 numaralı genotipler aynı grupta yer alırken, 109 ve 133 numaralı klonal hatların ise aynı grupta olduğu görülmüştür. Çizelge 4.27' de Duncan çoklu karşılaştırma testine göre; bitki boyu, yaprak kalınlığı, yaprak alanı, yaprak çevresi ve klorofil özellikleri bakımından genotipler değerlendirildiğinde 133 ve 185 numaralı genotiplerin değerlendirilen karakterler bakımından yüksek değerlere sahip olduğu, 111 numaralı genotipin ise değerlendirilen karakterler bakımından düşük özelliklere sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.26. B klonlarına ait morfolojik özelliklere ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D	Bitki Boyu (cm)	Yaprak Kalınlığı (mm)	Yaprak alanı (cm ²)	Yaprak çevresi (cm)	Klorofil
Blok	2	45.14	0.182	359.99**	4.748	31.37
Genotip	9	421.85**	0.022**	408.53**	17.749	309.86**
Hata	120	67.43	1.38	71.85	11.14	60.22
CV (%)		13.36	23.22	18.73	24.83	15.31

*: % 5 düzeyinde önemli. **: % 1 düzeyinde önemli

Çizelge 4.27. B klonlarına ait morfolojik özelliklere ilişkin veriler

Klon No	Bitki boyu (cm)	Yaprak kalınlığı (mm)	Yaprak alanı (cm ²)	Yaprak çevresi (cm)	Klorofil
82	62.13 bc	0.449 bc	15.83 abc	13.311	52.93 ab
83	64.07 abc	0.451 bc	17.19 ab	14.08	54.01 ab
100	58.07 cd	0.443 bc	15.86 abc	14.835	49.03 bc
109	67.73 ab	0.495 ab	14.32 cd	13.311	50.89 abc
111	51.73 e	0.435 bc	15.41 bc	13.266	40.29 d
116	61.33 bcd	0.460 ab	12.81 d	10.949	53.02 ab
133	69.33 a	0.497 a	14.90 cd	14.084	50.37 abc
185	55.47 de	0.405 c	18.07 a	14.447	56.20 a
191	62.93 abc	0.444 bc	12.87 d	13.466	53.29 ab
196	62.00 bc	0.449 bc	13.59 cd	12.668	46.66 c

Klonal hatlar arasında yeşil herba miktarı açısından % 1 düzeyinde fark olduğu görülmüştür. 162.50 g olan 133 numaralı klonal hat en yüksek yeşil herba miktarına sahip olurken, bunu 159.29 g olan 196 numaralı klonal hat ve 156.83 g olan 109 numaralı klonal hat izlemiştir. En düşük yeşil herba miktarı 95.36 g ortalaması olan 185 numaralı genotipe ait olmuştur. 82, 83, 100, 116 ve 191 numaralı klonal hatlar aynı grup içinde yer almışlardır. Yeşil yaprak miktarı, yeşil sap miktarı ve yaprak / sap açısından ise klonal hatlar arasında % 1 düzeyinde fark olduğu görülmüştür. Yeşil yaprak bakımından en yüksek genotip 77.45 g ortalaması olan 133 numaralı genotip olurken, bunu 69.47 g olan 100 numaralı klonal hat ve 66.49 g olan 109 numaralı klonal hat izlemiştir. 116 numaralı genotip 47.88 g ortalaması ile en düşük yeşil yaprak miktarına sahip olmuştur. Klonal hatlar arasında yeşil sap miktarı bakımından % 1 düzeyinde fark olduğu görülmektedir. Yapılan istatistiki analiz sonucunda iki grup oluşmuş, en yüksek yeşil sap miktarı 191 numaralı genotipte 77.32 g olurken, en düşük sap miktarı 185 numaralı genotipte 39.93 g olarak görülmüştür. 82, 83, 100, 109, 116, 133, 191 ve 196 numaralı genotipler aynı grupta yer alırken, 111 ve 185 numaralı genotiplerin aynı grupta yer aldığı görülmektedir. Kuru yaprak miktarı bakımından genotipler arasında % 5 düzeyinde farkın olduğu belirlenmiştir. Kuru yaprak bakımından en yüksek 133 numaralı genotip 28.25 g ve en düşük 116 numaralı genotipin 21.97 g olduğu görülmektedir. Klonal hatlar arasında yaprak / sap oranı açısından % 1 düzeyinde önemli bir farkın olduğu görülmektedir. Duncan testine göre yapılan gruplandırma

incelendiğinde birçok klonal hattın farklı grupta yer aldığı görülmektedir. 111 numaralı genotipin 1.54 oranıyla en yüksek olduğu, bunu 185 numaralı genotipin 1.26 oranıyla izlediği görülmektedir. 116 numaralı genotipin ise 0.67 oranıyla en düşük orana sahip olduğu görülmektedir. Değerlendirilen özellikler bakımından 133 numaralı genotipin yeşil herba miktarı, yeşil yaprak miktarı, yeşil sap miktarı ve kuru yaprak miktarı bakımından gruplar içinde en yüksek ortalama değerlere sahip olduğu görülmektedir. Çizelge 4.28.'de B klonlarına ait bazı özelliklere ilişkin varyans analiz sonuçları ve Çizelge 4.29.' de B klonlarına ait bazı özelliklere ilişkin veriler gösterilmektedir.

Çizelge 4.28. B klonlarına ait agronomik özelliklere ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D	Yeşil herba miktarı (g)	Yeşil yaprak miktarı (g)	Yeşil sap miktarı (g)	Kuru yaprak miktarı (g)	yaprak/sap
Blok	2	2151.51	597.15	891.25	9.94	0.0054
Genotip	9	6573.25**	1206.86**	2723.14**	55.294*	0.9398**
Hata	120	2105.09	399.01	604.36	24.99	0.0285
CV (%)		32.54	32.47	37.50	19.91	16.67

*: % 5 düzeyinde önemli. **: % 1 düzeyinde önemli

Çizelge 4.29. B klonlarına ait agronomik özelliklere ilişkin veriler

Klon No	Yeşil herba miktarı (g)	Yeşil yaprak miktarı (g)	Yeşil sap miktarı (g)	Yaprak/Sap oranı	Kuru yaprak miktarı (g)
82	142.92 ab	61.60 abcd	68.40 a	0.996 de	25.94 abc
83	146.36 ab	56.14 bcd	68.04 a	0.836 f	23.54 bc
100	140.73 ab	69.47 ab	66.86 a	1.059 cd	26.81 ab
109	156.83 a	66.49 ab	72.82 a	0.938 def	25.82 abc
111	113.97 bc	61.79 abcd	41.80 b	1.542 a	25.05 abc
116	147.16 ab	47.88 d	71.83 a	0.679 g	21.97 c
133	162.50 a	77.45 a	71.31 a	1.131 c	28.25 a
185	95.36 c	49.74 cd	39.93 b	1.263 b	22.73 bc
191	144.55 ab	58.60 bcd	77.32 a	0.821 f	24.78 abc
196	159.29 a	65.96 abc	77.10 a	0.871 ef	26.19 ab

Yapılan değerlendirme sonucunda klonal hatlar arasında steviosid, rebaudiosid A ve reb A / stv açısından % 1 düzeyinde fark olduğu görülmüştür (Çizelge 4.30). Steviosid bakımından değerlendirildiğinde 109 ve 196 numaralı genotiplerin gruptaki diğer klonlarla kıyaslandığında daha yüksek oranda steviosid içerdiği, (sırasıyla % 7.59 ve % 7.38) 111 ve 133 numaralı genotiplerin ise düşük oranda steviosid içerdiği (sırasıyla % 3.84 ve % 4.35) görülmektedir (Çizelge 4.31). Gruplar değerlendirildiğinde 82 ve 83 numaralı klonal hatların aynı grupta, 100 ve 116 numaralı klonal hatların aynı grupta yer aldıkları görülmektedir. Rebaudiosid A bakımından değerlendirildiğinde 82, 133 ve 191 numaralı genotiplerin aynı grupta yer aldığı ve yüksek rebaudiosid A miktarı içerdikleri görülmektedir. 82 ve 133 numaralı genotiplerin % 6.40 ve 196

numaralı genotipin % 6.20 rebaudiosid A içerdikleri görülmektedir. 111 numaralı genotipin ise % 4.85 miktarıyla B klonları arasında en az rebaudiosid A içeren klon olduğu görülmektedir. Reb A / stv oranı bakımından 82 ve 185 numaralı genotipler yüksek oranda bulunmaktadır. 111 numaralı klonal hattın 1.26 ve 116 numaralı klonal hattın 1.18 oranına sahip olduğu görülmektedir. Ancak değerlendirmelerimizde önemli bir seleksiyon kriteri olan reb A / stv oranı açısından bakıldığında, bu oranın B klonlarında yüksek çıktığı genotiplerde steviosid oranının düşük olması bunun seleksiyonda yanıltıcı olabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle bir önceki A klonlarında 111 numaralı genotip için bu oranın 0.7 çıkmış olması bu özelliğin bu genotip için devamlı olmadığını göstermektedir. Burada reb A / stv oranı bakımından 82 numaralı genotipin özelliğini klonlar boyunca koruduğunun gözlenmesi değerlendirmeler açısından önemlidir.

Çizelge 4.30. B klonlarına ait steviol glikozit içeriklerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D	Stv (%)	Reb A (%)	RebA/stv
Blok	2	5.13**	18.03**	0.72
Genotip	8	34.80**	3.60**	1.55**
Hata	105	80.78	0.72	0.29
CV (%)		16.74	14.23	38.07

*: % 5 düzeyinde önemli. **: % 1 düzeyinde önemli

Çizelge 4.31. B klonlarına ait steviol glikozit içeriklerine ilişkin veriler

Klon No	Steviosid	Rebaudiosid A	Reb A / stv
82	4.29 c	6.37 a	1.48 ab
83	4.43 c	5.69 ab	1.29 b
100	4.75 cb	5.52 bc	1.16 bc
109	7.59 a	-	-
111	3.84 d	4.85 c	1.26 a
116	4.90 cb	6.06 ab	1.18 ab
133	4.35 d	6.40 a	1.34 ab
185	4.40 d	6.11 ab	1.38 a
191	5.10 b	6.24 a	1.16 bc
196	7.38 a	6.20 ab	0.89 c

4.5. B Klonlarına Ait Özelliklerin Korelasyon Analizi

Temel bileşen analizinde kullanılan karakterlere ait korelasyon değerleri Çizelge 4.32.' de verilmiştir. Bitki boyu ile incelenen özellikler arasında bir ilişki bulunmamıştır. Shyu (1994) bitki boyu ile yeşil ve kuru yaprak miktarı arasında pozitif yönde ilişki olduğunu bildirmiştir. Buana ve Goenadi (1985) sera koşullarında yürüttükleri bir çalışmada stevia bitkisinde dikimden iki ve dört hafta sonra yaptıkları gözlemlerde bitki boyu ve yaprak sayısının bitkinin biyokütlesiyle pozitif ilişkisi olduğunu bildirmişlerdir. Buana (1989) daha sonra yaptığı çalışmada 4 haftalık

bitkilerde bitki boyu ile yaprak ve dal sayısı arasında ilişki bulunmadığını bildirmiştir. Bitkilerin büyümesi ve bulunduğu ortama uyum sağlayarak gelişim göstermesi, iç ve dış faktörlere bağlıdır. Dış faktörler daha çok ışık, su, sıcaklıkken, iç faktörler her bitkiye göre değişen o bitkinin çoğunlukla genetik özelliklerine bağlı olarak değişen hormonlardır. Bitki büyüme hormonlarından giberellinlerin farklı dozlarının farklı bitkilerin büyüme ve gelişmesi üzerine etkisinin araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur. Steviol glikozit ve gibberellin mekanizmaları, kauren sentezinde ayrılır. Steviada, kauren tatlı glikozitlerin bel kemiği olan stevirole dönüştürülür ve ardından esas tatlandırıcıları oluşturmak üzere glikozile ya da rhaminoz edilirler. Öncül bileşikler kloroplast içinde sentezlenir ve buradan endoplazmik retikulumla ve golgi aygıtına taşınır ve koful haline gelir. Söz konusu bu bileşiklerin stevia bitkisindeki rolü henüz net değildir, ancak yapraktaki yüksek konsantrasyonları ve tür içindeki mekanizmanın dönüşümü, evrim süresince bu bileşiklere sahip olan bitkilerin önemli avantaja sahip olduğunu göstermektedir. Bazı araştırmacılar bunların böcekleri uzaklaştırmaya yaradığını düşünürken, bazılarıysa giberellik asit düzeyinin kontrol edilmesi için gelişmiş bir araç olduğunu bildirmişlerdir (Smith ve Van-Stadin 1992). Yaptığımız çalışmada yaprak alanı ile yaprak çevresi arasında %61 pozitif ilişki bulunmuştur. Alan ve çevre ölçümlerinde aynı değişkenler kullanılmasından dolayı aradaki ilişki beklenen bir sonuç olarak değerlendirilebilir. Yaprak alanı ile reb A/stv arasında % 1 önem düzeyinde % 38 pozitif ilişki görülmüştür. Yaprak çevresi ile yeşil herba, yeşil yaprak, yeşil sap ve kuru yaprak miktarı arasında %85 üzerinde pozitif ilişki olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan bir çalışmada yaprakların steviosid içeriğinin diğer parametrelerle ilişkisi değerlendirildiğinde gelişim düzeyine bakılarak fide dönemi ile olgun dönemdeki bitkilerin steviosid içeriği arasında ilişki gözlenmemiş ve seleksiyonda fide döneminin etkisiz olduğu ortaya konulmuştur (Shyu 1994). Truong vd. (1999) steviosid içeriğinin kök sayısı ve yaprak alanı ile ilişkili olduğunu, yaprak alanıyla ilişkisinin daha güçlü olduğunu ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızda ise steviosid miktarı yeşil sap ile %5 önem düzeyinde %29 farklılık bulunmuştur. Yine steviosidle yaprak çevresi arasında ise %1 önem düzeyinde %41 pozitif yönde ilişki olduğu görülmüştür. Steviosid ile yaprak alanı arasında %1 önem düzeyinde %36 negatif ilişki, reb A ile %53 pozitif ilişki olduğu gözlenmiştir. Yeşil herba ve yeşil yaprak miktarı arasında %85'in üzerinde pozitif ilişki gözlenmiştir. Kuru yaprak miktarının yeşil herba, yeşil yaprak ve yeşil sap miktarı ile % 80 üzerinde pozitif ilişkisi olduğu gözlenmiştir. Yapılan bir çalışmada Shyu (1994) kuru yaprak miktarının yaprak alanı ve yaprak kalınlığı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. Yine aynı çalışmada kuru yaprak miktarının bitki boyu ve bitki başına yaprak miktarıyla pozitif ilişkili olduğu ortaya konulmuştur. Rebaudiosid A / steviosid oranının yaprak kalınlığı ile pozitif ilişkili olduğu bildirilmiştir (Shyu 1994). Weng vd. (1996) yüksek rebaudiosid A miktarının geniş yaprak alanıyla, yüksek klorofil ve protein miktarıyla ilişkili olduğunu belirlemişlerdir.

Verim morfolojik özellikler ve kimyasal yapısı arasındaki ilişkiler değerlendirildiğinde stevia bitkisine karakteristik özelliklerini veren diterpen glikozitlerin diğer karakterlerle ilişkisinin zayıf olduğu, bunun da nedeninin daha çok çevresel faktörlerin neden olduğu stres koşullarında sentezlenen sekonder metabolitlerden kaynaklandığı ileri sürülebilir.

Yapılan çalışmalarda fide dönemindeki ve olgun dönemdeki yapraklardaki steviosid içeriği arasında ilişki olmadığını steviada seleksiyon yaparken fide döneminde yapmanın etkisiz olduğu ortaya konmuştur.



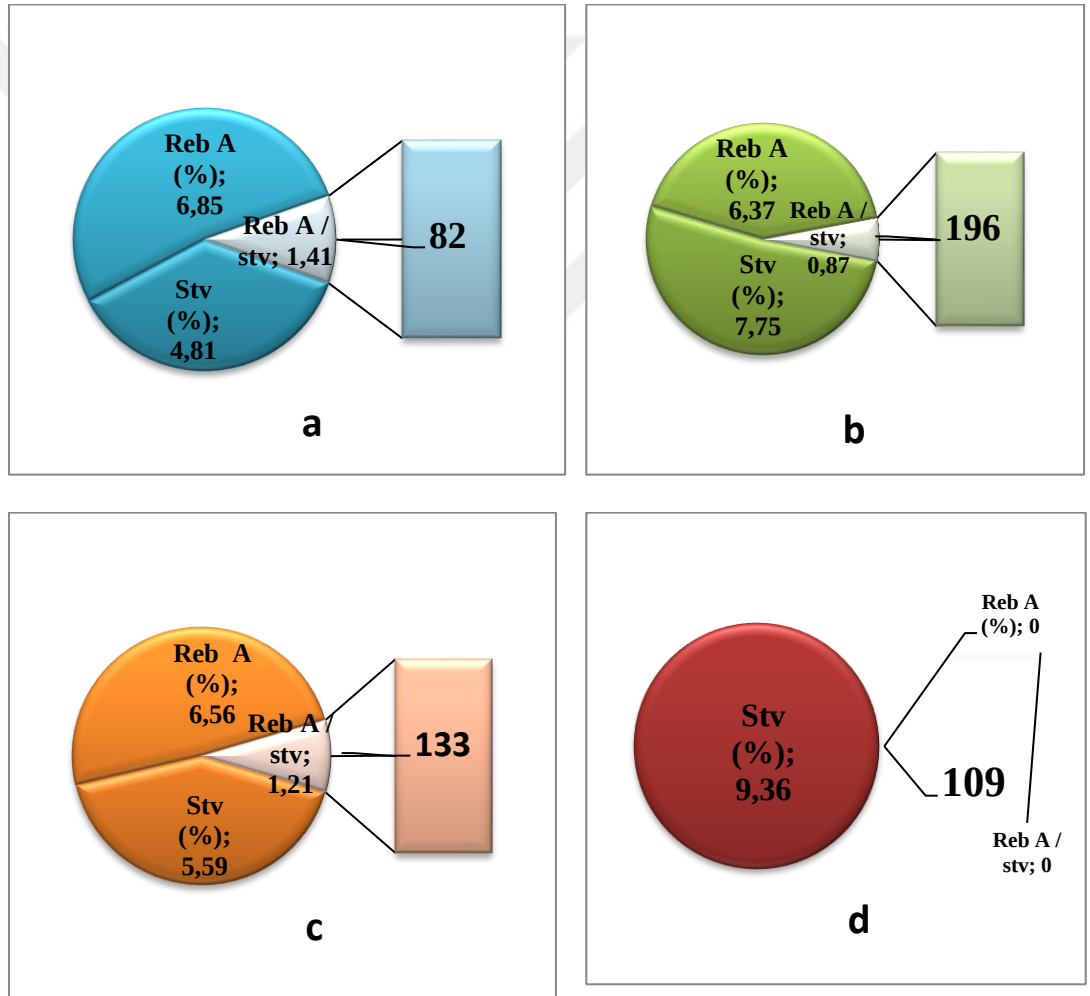
Çizelge 4.32 B Klonlarına ait özelliklerin korelasyon analizi

	yaprak kalınlık	bitki boy	yaprak alan	yaprak çevre	klorofil	yeşil herba	yesil yaprak	yeşil sap	yaprak/sap	kuru yaprak	stv	reb A	reb A/stv
yaprak kalınlık	1	0,197	0,135	-0,046	0,102	0,124	0,075	0,137	-0,118	0,061	-0,002	-0,174	0,055
bitki boy	0,197	1	0,006	0,061	-0,012	0,105	0,085	0,091	-0,035	0,055	0,046	-0,146	0,088
yaprak alan	0,135	0,006	1	0,618**	-0,01	-0,082	0,076	-0,127	0,447**	0,053	-0,363**	-0,099	0,386**
yaprak çevre	-0,046	0,061	0,618**	1	-0,036	-0,003	0,159	-0,062	0,410**	0,142	-0,259	-0,111	0,198
klorofil	0,102	-0,012	-0,01	-0,036	1	0,035	-0,031	0,067	-0,153	-0,013	-0,045	0,121	0,113
yeşil herba	0,124	0,105	-0,082	-0,003	0,035	1	0,920**	0,982**	-0,422**	0,848**	0,233	-0,126	-0,223
yesil yaprak	0,075	0,085	0,076	0,159	-0,031	0,920**	1	0,862**	-0,081	0,937**	0,102	-0,202	-0,116
yeşil sap	0,137	0,091	-0,127	-0,062	0,067	0,982**	0,862**	1	-0,541**	0,792**	0,293*	-0,099	-0,292
yaprak/sap	-0,118	-0,035	0,447**	0,410**	-0,153	-0,422**	-0,081	-0,541**	1	-0,032	-0,455**	-0,134	0,468**
kuru yaprak	0,061	0,055	0,053	0,142	-0,013	0,848**	0,937**	0,792**	-0,032	1	0,036	-0,248	-0,109
stv	-0,002	0,046	-0,363**	-0,259	-0,045	0,233	0,102	0,293*	-0,455**	0,036	1	0,537**	-0,779**
reb A	-0,174	-0,146	-0,099	-0,111	0,121	-0,126	-0,202	-0,099	-0,134	-0,248	0,537**	1	0,04
reb A/stv	0,055	0,088	0,386**	0,198	0,113	-0,223	-0,116	-0,292	0,468**	-0,109	-0,779**	0,04	1

*: % 5 düzeyinde önemli. **: % 1 düzeyinde önemli

4.6. C klonlarının seleksiyonu

Üç yıl boyunca yürütülen çalışma sonucunda B klonlarını temsil eden 10 genotipe ait birinci, ikinci ve üçüncü yıl performansları değerlendirilerek C klonları seçilmiştir. Bu seçim yapılırken temel seleksiyon kriterlerimiz olan diterpen glikozitler göz önünde bulundurulmuştur. Bunun yanı sıra değerlendirmelerde performansları iyi olsa da arazi koşullarında bitkinin durumu, araziye aktarıldıktan sonra adaptasyonu ve yaprak miktarları da dikkate alınmıştır. Yapılan seleksiyonda stevia bitkisine karakteristik özelliğini veren steviol glikozitlerden steviosid ve rebaudiosid A miktarları ve bunlar arasındaki oran öncelikli olarak esas alınmıştır. Buna göre; 82 numaralı genotip reb A / stv oranının deneme süresince 1.20'nin üzerinde olmasından, 109 numaralı genotip sadece steviosid içerdiğinden, 133 numaralı genotip bütün kriterler bakımından üstün performans göstermesi ve 196 numaralı genotip steviosid ve rebaudiosid A miktarlarının yüksek olmasından dolayı C klonları olarak seçilmişlerdir.



Şekil 4.4. Seçilmiş C klonlarının steviol glikozit dağılımı **a)** 82 numaralı klon **b)** 196 numaralı klon **c)** 133 numaralı klon **d)** 109 numaralı klon

4.5. *In vitro* Çoğaltım Bulgular

4.5.1. Kültüre alma

Gelrite (%3) 20 farklı kombinasyondaki ortamlarından elde edilen sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu(cm), çoğaltma katsayısı ve gözlemler Çizelge 4.33.' te gösterilmiştir. Gelrite içeren ortamlarda sürgün oluşturma oranı ortalama olarak % 96.5 olurken, bitki başına sürgün sayısı ortalama 2.46 ve ortalama sürgün uzunluğu ise 10.07 cm olarak ölçülmüştür.

Çizelge 4.33. Gelrite (%3) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), çoğaltım katsayısı ve gözlemler

Ortam (gelrite)(%3)	Sürgün Oluşturma Oranı (%)	Sürgün Sayısı (bitki başına)	Sürgün Uzunluğu (cm)	Gözlemler
MS0 (Kontrol)	100	1.3	16.5	Gelişim düzgün, kök oluşumu
MS+0.5 BAP	100	2.7	13.3	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+1.0 BAP	100	2.5	10.7	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+1.5 BAP	90	2.6	7.8	Alt boğumlarda vitrifikasyon
MS+2.0 BAP	100	2.7	7.7	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+0.5 BAP+0.5 IAA	90	2.3	12.1	Gelişim düzgün, alt yapraklarda kahverengileşme
MS+1.0 BAP+0.5 IAA	100	2.4	10.3	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+1.5 BAP+0.5 IAA	100	2.3	10.7	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+2.0 BAP+0.5 IAA	100	2.0	8.6	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.5 IAA	100	1.5	14.4	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin	100	3.0	10.3	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+1.0 BAP+0.25 Kinetin	90	3.1	9.3	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+1.5 BAP+0.25 Kinetin	80	2.4	5.9	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+2.0 BAP+0.25 Kinetin	100	2.5	5.7	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.25 Kinetin	100	2.1	12.3	Gelişim düzgün, kallus oluşumu

Devamı arkada

Çizelge 4.33'ün devamı.

MS+0.10 NAA+1.0 BAP	100	2.8	9.1	Gelişim düzgün, Vitrifikasyon
MS+0.15 NAA+1.0 BAP	90	2.9	9.4	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.20 NAA+1.0 BAP	90	2.8	9.5	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.25 NAA+1.0 BAP	100	2.9	8.7	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+0.5BAP+ 0.25 Kinetin+0.5 IAA	100	2.4	9.1	Gelişim düzgün, kallus oluşumu

Gelrite (%3) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki özelliklere ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.34'te gösterilmektedir. Katılaştırıcı ajan olarak gelrite kullanılan ortamlar arasında 0.01 önemlilik düzeyinde ortamlar arasında fark vardır.

Çizelge 4.34. Gelrite (%3) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki özelliklere ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D	Sürgün Sayısı	Sürgün Uzunluğu	Çoğaltma Katsayısı
Önemlilik düzeyi		**	**	**
Ortam	19	1.090	39.59	30.47
Hata	80	0.135	6.56	5.75
CV (%)		14.96	25.00	24.12

Yapılan istatistiki değerlendirmede sürgün sayısı bakımından gelrite içeren 20 farklı kombinasyondaki hormon ortamlarından MS+0.5 BAP, MS+1.0 BAP, MS+1.5 BAP, MS+1.0 BAP+0.5 IAA, MS+1.5 BAP+0.25 Kinetin, ve MS+2.0 BAP+0.25 Kinetin içerenlerin aynı grupta yer aldığı görülmüştür. MS+2.0 BAP ve MS+0.10 NAA+1.0 BAP ortamlarında aynı grup içinde yer almışlardır. Sürgün uzunluğu ile farklı ortamlar arasındaki ilişki değerlendirildiğinde MS+1.0 BAP, MS+1.0 BAP+0.5 IAA, MS+1.5 BAP+0.5 IAA ve MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin içeren ortamların aynı grupta olduğu görülmüştür. Çoğaltma katsayısı bakımından MS+1.5 BAP, MS+2.0 BAP, MS+1.0 BAP+0.5 IAA, MS+1.0 BAP+0.25 Kinetin, MS+0.10 NAA+1.0 BAP ve MS+0.25 NAA+1.0 BAP içeren ortamların aynı grupta yer aldıkları görülmüştür. Gelrite (%3) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), çoğaltma katsayısı ve gözlemlerin değerlendirilmesi Çizelge 4.35'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.35. Gelrite (%3) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), çoğaltma katsayısı ve gözlemlerin değerlendirilmesi

Ortam	Sürgün sayısı (adet)	Sürgün uzunluğu (cm)	Çoğaltma katsayısı
MS0 (Kontrol)	1.26f	16.40a	5.34f
MS+0.5 BAP	2.58bcde	13.06abc	12.80ab
MS+1.0 BAP	2.50bcde	10.73cde	12.62ab
MS+1.5 BAP	2.62bcde	7.89ef	11.31abc
MS+2.0 BAP	2.70abcd	7.72ef	10.16abc
MS+0.5 BAP+0.5 IAA	2.32de	12.16bcd	13.38a
MS+1.0 BAP+0.5 IAA	2.46bcde	10.38cde	10.84abc
MS+1.5 BAP+0.5 IAA	2.30de	10.74cde	12.36ab
MS+2.0 BAP+0.5 IAA	2.08e	8.68def	8.64cdef
MS+0.5 IAA	1.52f	14.46ab	5.86f
MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin	3.00ab	10.36cde	12.42ab
MS+1.0 BAP+0.25 Kinetin	3.18a	9.30cdef	11.46abc
MS+1.5 BAP+0.25 Kinetin	2.48bcde	5.92f	6.32ef
MS+2.0 BAP+0.25 Kinetin	2.50bcde	5.78f	6.56def
MS+0.25 Kinetin	2.12e	15.08ab	8.50cdef
MS+0.10 NAA+1.0 BAP	2.82abcd	9.18def	11.19abc
MS+0.15 NAA+1.0 BAP	2.92abc	9.48cdef	9.84abcd
MS+0.20 NAA+1.0 BAP	2.2.38cde	9.58cdef	9.70bcde
MS+0.25 NAA+1.0 BAP	2.96ab	8.78def	11.20abc
MS+0.5BAP+0.25 Kinetin+0.5 IAA	2.40cde	9.18def	8.46cdef

Agar (%0.7) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki ortamlarından elde edilen sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu(cm), çoğaltma katsayısı ve gözlemler Çizelge 4.36' da gösterilmiştir.

Çizelge 4.36. Agar (%0.7) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki sürgün sayısı (adet). sürgün uzunluğu (cm). çoğaltma katsayısı ve gözlemler

Ortam (agar) (%0.7)	Sürgün oluşturma oranı (%)	Sürgün sayısı (bitki başına)	Sürgün uzunluğu(cm)	Gözlemler
MS0 (Kontrol)	100	1.3	16.5	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.5 BAP	100	2.7	13.3	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+1.0 BAP	100	2.5	10.7	Kallus oluşumu, vitrifikasyon

Devamı arkada

Çizelge 4.36'nun devamı.

MS+1.5 BAP	100	2.6	7.8	Kallus oluşumu, Vitrifikasyon
MS+2.0 BAP	80	2.7	7.7	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.5 BAP+0.5 IAA	90	2.3	12.1	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+1.0 BAP+0.5 IAA	90	2.4	10.3	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+1.5 BAP+0.5 IAA	100	2.3	10.7	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+2.0 BAP+0.5 IAA	90	2.0	8.6	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.5 IAA	80	1.5	14.4	Kallus oluşumu, kahverengi yapraklar
MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin	80	3.0	10.3	Gelişim düzgün, kallus oluşumu
MS+1.0 BAP+0.25 Kinetin	90	3.1	9.3	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+1.5 BAP+0.25 Kinetin	90	2.4	5.9	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+2.0 BAP+0.25 Kinetin	100	2.5	5.7	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.25 Kinetin	100	2.1	12.3	Kallus yok, vitrifikasyon
MS+0.10 NAA+1.0 BAP	70	2.8	9.1	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.15 NAA+1.0 BAP	100	2.9	9.4	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.20 NAA+1.0 BAP	90	2.8	9.5	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.25 NAA+1.0 BAP	100	2.9	8.7	Kallus oluşumu, vitrifikasyon
MS+0.5BAP+0.25 Kinetin+0.5 IAA	90	2.4	9.1	Kallus oluşumu, vitrifikasyon

Agar (%0.7) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki özelliklere ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.37'de gösterilmektedir. Katılaştırıcı ajan olarak agar kullanılan ortamlar arasında 0.01 önemlilik düzeyinde fark vardır.

Çizelge 4.37. Mikroçoğaltımda sürgün oluşumuna ilişkin varyans analiz sonuçları

Varyasyon Kaynakları	S.D	Sürgün Sayısı	Sürgün Uzunluğu	Çoğaltım Katsayısı
Önemlilik düzeyi		**	**	**
Ortam	19	0.67	16.43	5.55
Hata	80	0.0845	1.64	0.41
CV (%)		15.98	43.84	22.04

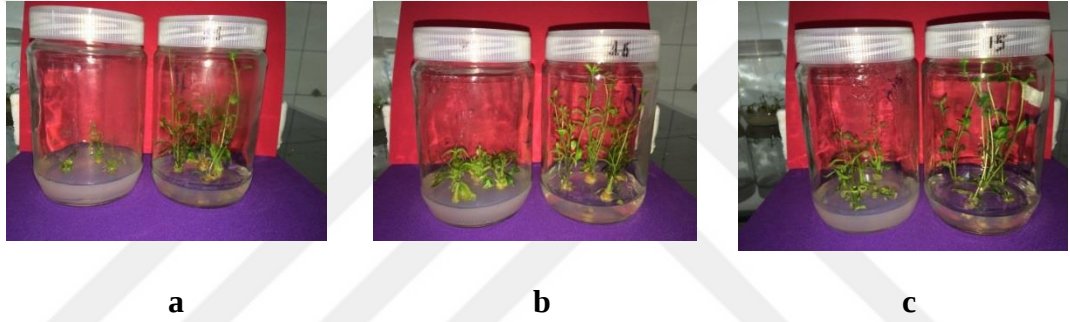
Yapılan istatistiki değerlendirmede sürgün sayısı bakımından gelrite içeren 20 farklı kombinasyondaki hormon ortamlarından MS+0.15 NAA+1.0 BAP, MS+0.25 NAA+1.0 BAP ve MS+0.5BAP+0.25 Kinetin+0.5 IAA ortamları aynı grup içinde yer almışlardır. Sürgün uzunluğu ile farklı ortamlar arasındaki ilişki değerlendirildiğinde MS+0.5 BAP, MS+1.0 BAP , MS+1.5 BAP, MS+0.5 BAP+0.5 IAA, MS+1.0 BAP+0.5 IAA, MS+1.5 BAP+0.5 IAA, MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin, MS+1.0 BAP+0.25 Kinetin, MS+1.5 BAP+0.25 Kinetin, MS+0.15 NAA+1.0 BAP, MS+0.20 NAA+1.0 BAP, MS+0.25 NAA+1.0 BAP, MS+0.5BAP+0.25 Kinetin+0.5 IAA ve MS+2.0 BAP+0.25 Kinetin içeren ortamların aynı grupta olduğu görülmüştür. Çoğaltma katsayısı bakımından MS+0.5 BAP, MS+0.5 BAP+0.5 IAA, MS+0.15 NAA+1.0 BAP ve MS+0.5BAP+0.25 Kinetin+0.5 IAA içeren ortamların aynı grupta yer aldıkları görülmüştür. Agar (%0.7) içeren 4 farklı hormonla 20 farklı kombinasyondaki sürgün sayısı (adet), sürgün uzunluğu (cm), çoğaltma katsayısı ve gözlemlerin değerlendirilmesi Çizelge 4.38’te gösterilmiştir.

Çizelge 4.38. Agar içeren ortamlarda mikroçoğaltımda sürgün oluşumuna ilişkin verilerin değerlendirilmesi

Ortam	Sürgün Sayısı(adet)	Sürgün uzunluğu(cm)	Çoğaltma Katsayısı
MS0 (Kontrol)	1.48fg	9.76a	5.04b
MS+0.5 BAP	1.98cde	2.14cd	3.10cde
MS+1.0 BAP	1.92cde	1.94cd	2.72cdef
MS+1.5 BAP	1.62defg	1.76cd	1.90fg
MS+2.0 BAP	1.44fg	1.54d	1.94fg
MS+0.5 BAP+0.5 IAA	1.86cdef	2.42cd	3.0cde
MS+1.0 BAP+0.5 IAA	1.56efg	2.34cd	2.48efg
MS+1.5 BAP+0.5 IAA	1.46fg	2.0cd	2.0fg
MS+2.0 BAP+0.5 IAA	1.4g	1.5d	1.72g
MS+0.5 IAA	1.44fg	3.54bc	3.46cd
MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin	2.02bcd	2.14cd	2.54defg
MS+1.0 BAP+0.25 Kinetin	1.56efg	2.02cd	2.56defg
MS+1.5 BAP+0.25 Kinetin	1.62defg	1.84cd	2.28efg
MS+2.0 BAP+0.25 Kinetin	1.46fg	1.90cd	1.92fg
MS+0.25 Kinetin	2.64a	4.52b	5.90a
MS+0.10 NAA+1.0 BAP	2.40ab	2.36cd	3.66c
MS+0.15 NAA+1.0 BAP	2.12bc	2.18cd	3.02cde
MS+0.20 NAA+1.0 BAP	1.98cde	2.0cd	2.52defg
MS+0.25 NAA+1.0 BAP	2.22bc	2.10cd	3.60c
MS+0.5BAP+0.25 Kinetin+0.5 IAA	2.18bc	2.42cd	3.04cde

4.5.2. Alt kültüre alma

En iyi performans gösterdiği belirlenen 3 ortamdan alt kültür olarak; gelrite içeren ortamlardan 11 ve 16 numara ile agar içeren 35 numaralı ortam seçilmiştir. Şekil 4.5. a) MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin içeren 11 numaralı (gelrite) ve 31 numaralı (agar) ortamlarındaki gelişimi karşılaştırmalı olarak görülmektedir. Şekil 4.5. b) MS+0.10 NAA+1.0 BAP içeren 16 numaralı (gelrite) ve 36 numaralı (agar) ortamlarına aittir. Şekil 4.5. c) 15 numaralı (gelrite) ve 35 numaralı (agar) MS+0.25 Kinetin ortamları görülmektedir. 11 numaralı ortamda (MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin) sürgün uzunluğu ortalama 20 cm olurken, bitki başına sürgün sayısı 3.4 adet ve çoğaltım frekansı yaklaşık 20 kat olarak ölçülmüştür. Gelişim düzgündür. 16 numaralı ortamda (MS+0.10 NAA+1.0 BAP) ortalama sürgün uzunluğu 15 cm, bitki başına sürgün sayısı 2.3 adet, çoğaltım frekansı yaklaşık 10 kat olarak ölçülmüştür ve vitrifikasyon gözlenmiştir. 35 numaralı ortamda (MS+0.25 Kinetin) ortalama sürgün uzunluğu yaklaşık olarak 6-7 cm, bitki başına sürgün sayısı 7.8 adet, çoğaltım frekansı yaklaşık 5 kat olarak ölçülmüştür. Sürgün boğum aralarının dar, sürgün uzunluklarının kısa olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.5. En iyi gelişim gösteren 3 ortam **a)** MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin içeren 11 numaralı (gelrite) ve 31 numaralı (agar) **b)** MS+0.10 NAA+1.0 BAP içeren 16 numaralı (gelrite) ve 36 numaralı (agar) **c)** 15 numaralı (gelrite) ve 35 numaralı (agar) MS+0.25 Kinetin

4.5.3. Alt kültüre alma

11 numaralı ortamdan gelen bitkilerden 4000 adet bitki kesimi yapılmıştır. Her bir bitkiden ortalama olarak bir bitkinin 20 katı kadar bitki elde edilmiştir. Tüm kültüre alma ve alt kültür işlemleri üstten üfleli steril kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir.

11 numaralı ortamda sürgün uzunluğu ortalama 20 cm olurken, bitki başına sürgün sayısı 3.6 adet ve çoğaltım frekansının bazı bitkilerde yaklaşık 30 katına kadar çıktığı gözlenmiştir. Çoğaltım frekansı ortalama olarak 25 kat olarak ölçülmüştür.

4.5.4. Köklendirme ve bitkilerin alıştırma odasına alınması

Yaklaşık bir haftalık bir süre içinde köklenme gözlenmiştir. Köklenme oranı % 100 olarak gerçekleşmiştir. Başarı oranı %100 olmuştur. Şekil 4.6.' da köklenen sürgünler gösterilmektedir.



Şekil 4.6. Doku kültürü ortamında köklenen sürgünler

Islah programları çoğunlukla melezleme ve seleksiyon üzerine kuruludur. Klonal çoğaltım yöntemi tek tek seçilen bitkilerin çoğaltılması için sıkça kullanılmaktadır. Bu seçimlerden bazıları, çok verimli olmalarına rağmen, kendi içinde uyumsuzdur ve yalnızca bitkisel olarak çoğaltılabilir (Lee vd. 1982). Yeni melezler üretmek için kullanışlı olsalar da, bu durum ticari kullanımlarını kısıtlar. Yine kendi içinde uyumsuz olmasından dolayı, ticari olarak geliştirilen birçok çeşit tohum bazlı bir üretim sistemi kullanılarak yeniden üretilmemiştir. Klonal çoğaltım içinse tek sorun, büyük ölçekli stevia bitki üretiminin genel uygulanabilirliğini sınırlandıran maliyetler olabilir.

Geliştirilen çeşitlerin üretimlerinin yaygın, pratik ve kısa zamanda daha fazla miktarda yapılabilmesi için yararlanılabilecek en etkili yöntemlerden bir diğeri doku kültüründe mikroçoğaltımdır. Stevia tohumlarının düşük çimlenme yüzdesine sahip olması ve doku kültürünün stevia'nın kitlesel çoğaltılmasına yönelik tek ve en hızlı süreç olması bitkinin üretim potansiyeli açısından önemlidir. Çalışmamızda herhangi seçilmiş bir genotipten yola çıkmaksızın stevia bitkisi için üretim potansiyelini en azından fide oluşum frekansını gözlemlemek için doku kültürü koşullarında da denemeler yapılmıştır. Farklı ortamlar, farklı hormonlar ve konsantrasyonlarında stevia için en uygun gelişim ortamı bulunmuştur. Buna göre; MS+0.5 BAP+0.25 Kinetin ve gelrite içeren ortam bitkilerin en iyi gelişim gösterdiği ortam olmuştur. Yaklaşık olarak üç haftada bir alt kültüre alınan bitkiler üç alt kültüre alma sonunda 25 kat çoğaltım frekansına sahip olmuştur. Steviada doku kültürü ve çelikle çoğaltım gibi vejetatif üretimin tohumla göre daha uygun bir çoğaltım şekli olduğu bildirilmiştir (Schnelle 2010).

5. SONUÇ

Besleyici olmayan yüksek yoğunluklu doğal tatlandırıcı kaynağı olmasından dolayı endüstriyel açıdan önemli olan *Stevia rebaudiana* Bertoni, içerdiği diterpen glikozitlerle dünyanın önde gelen gıda bilimcileri tarafından "geleceğin tatlandırıcısı" olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle, stevia araştırmalarında yaşanan her yeni gelişme, heyecanla beklenmekte ve yayımlandığında etraflıca analiz edilmektedir.

Yapılan çalışmalarda steviaya karakteristik tadını veren glikozitleri içeren yaprağın bütün halinde kullanılması, etken maddelerin izole edilip tatlarının iyileştirilmesi çalışmalarından daha pratik ve ekonomik bir yöntemdir. Çalışmalar daha çok steviosid ve rebaudiosid A' nın tadını iyileştirmeye yöneliktir. Bunlarda da izlenen yol, izole stevia bileşenlerine, diğer tür tipik şekerlerin eklenmesidir. Rebaudiosid A' nın tadının istenen tat profiline daha uygun olması, araştırmacıların steviosidden sentetik olarak rebaudiosid A elde etmek için yeni yöntemler aramasına neden olmuştur. Ancak gerekli tatlılığı elde etmek için, rebaudiosid A diğer şeker türleriyle karıştırılmak durumundadır. Bunun yanısıra, stevioside ait tadı geliştirmek için, bunları doğrudan steviadan elde edilen diğer maddelerle kombine etmeyi amaçlayan süreçler geliştirilmektedir.

Dünya' nın birçok ülkesinde stevianın yetiştirilmesi ve ıslahıyla ilgili çalışmalar yürütülmektedir. Yapılan çalışmalar daha çok diterpen glikozit içeriği ve daha yüksek verime sahip yeni çeşitler üretilmesi üzerinedir. Çimlenme yüzdesi düşük olan steviada yetiştirme işleminin başarısı, ebeveyn seçimine, çaprazlamaya, yeterli popülasyon yetiştirmeye ve seleksiyona bağlıdır. Yapılan ıslah ve seçim sonucunda, stevia yapraklarındaki glikozit konsantrasyonu neredeyse % 20' ye kadar çıkarılmıştır. Ülkemizde geliştirilmiş ve adaptasyonu sağlanmış bir çeşit bulunmamaktadır.

Klon seleksiyonuyla reb A ve steviosid diterpen glikozitleri yüksek olan genotiplerden üstün özellikte olanların seçilmesi amacıyla yürütülen çalışmada ana popülasyon kaynağı olarak gelişimlerini tamamlamış ve istenilen fenotipik olgunluğa gelmiş üç yaşında stevia bitkileri kullanılmıştır. Agronomik özellikler ve steviol glikozit miktarı bakımından Antalya lokasyonunun bitkinin gelişimi için elverişli olduğu görülmüştür. Bölgeye adaptasyonunu tamamlamış olan üç yaşındaki stevialar literatürdeki ortalama değerlerin üzerinde bir gelişim göstermiştir.

Klonal olarak yetiştirilen seçilmiş genotiplerin bir yaşında nicel olarak değerleri değişkenlik gösterse de taşıdıkları karakterler bakımından özelliklerini devam ettirdikleri görülmüştür. Nicelik bakımından değişkenlik gösteren karakterlerin daha çok çevresel faktörlerden etkilenen yeşil herba miktarı, yeşil yaprak miktarı, yeşil sap miktarı ve kuru yaprak miktarı olduğu gözlenmiştir. Bunun dışında klorofil, yaprak kalınlığı, yaprak/ sap oranı bakımından ana popülasyondan B klonlarına kadar önemli bir farkın olmadığı görülmüştür.

İçerdiği diterpen glikozitler bakımından değerlendirildiğinde steviosid miktarının daha çok değiştiği, rebaudiosid A miktarının daha stabil olduğu gözlenmiştir. Çalışma boyunca on üç farklı parametreye ait veriler alınmış, seleksiyon kriteri olarak glikozit içeriği öncelikli olarak değerlendirilmiştir. 200 genotipten seçilerek gelen 4 genotip değerlendirilen özellikler bakımından öne çıkmıştır. 82 numaralı genotip içerdiği

rebaudiosid A miktarı ve klonlar boyunca stabilitesini devam ettiren reb A/ stv oranı bakımından üstün özellikli bir çeşit adayı olarak görülmüştür. 109 numaralı genotip yalnız steviosid içermesi bakımından dikkat çekici olmuştur. Enzimatik ve kimyasal reaksiyonlarla biyosentez yolunda kendisinden sonraki basamakta sentezlenen rebaudiosid A' ya dönüştürülebilecek iyi bir materyal olabilmesi açısından önemli bulunmuştur. 133 numaralı genotip sadece diterpen glikozitlerin miktarının yüksekliği değil aynı zamanda çalışma boyunca agronomik özelliklerinin de ortalamanın üzerinde olması nedeniyle üretilip işlenmeye uygun bir endüstriyel materyal olarak görülmüştür. 196 numaralı genotip steviosid ve rebaudiosid A miktarı bakımından yüksek olması bu genotipte sekonder metabolit sentezinin yoğun olduğunu göstermiştir ve çeşit adayı olarak seçilmiştir. 82 ve 196 numaralı üstün özellikte olduğu tarafımızca tespit edilen genotipleri tescil ettirmek üzere ilgili başvurular yapılmıştır.

Gıda tüketicilerinin artan sağlıklı ve doğal beslenme eğilimi üreticileri, doğal ve doğala özdeş ürünler üretmeye yönlendirmiştir. Steviada yapay tatlandırıcılara alternatif olan önemli bir üründür. İçerdiği etken madde bakımından ıslah edilmiş çeşitlerin artması, bu maddelerin saflaştırılarak izole edilme sürecini azaltarak, endüstriyel maliyetlerin düşürülmesi açısından önemlidir. Elde edilen sonuçlara göre, ülkemiz için yeni ve alternatif bir ürün olan stevia bitkisi Antalya koşullarına kolayca uyum sağlayabilen, yeni çeşit ve çeşit adaylarının geliştirilmesine uygundur. Stevia'nın üretiminin yaygınlaşması ve işlenmesi için uygun bitkisel materyaller üretilerek ülke ekonomisine katkı sağlanabilmesi mümkündür.

6. KAYNAKLAR

- Acuna, I., Nepovim A. and Vallicek, P. 1997. Micropropagation of plants *Stevia rebaudiana* in vitro and content of steviosides in leaves after application of growth regulators. under field condition. *Agricultura Tropica et Subtropica*, 30: 51-60.
- Ahmed, B., Hossain, M., Islam, R., Kumar Saha, A. and Mandal, A. 2011. A review on natural sweetener plant stevia having medicinal and commercial importance. *Agronomski glasnik*. 73 (1-2), 75-91.
- Ahmed, M. B., Salahin, M., Karim, R., Razvy, M. A., Hannan, M. M., Sultana, R., Hossain, M. and Islam, R. 2007. An efficient method for in vitro clonal propagation of a newly introduced sweetener plant (*Stevia rebaudiana* Bertoni) in Bangladesh. *American-Eurasian Journal of Scientific Research*, 2 (2): 121-125.
- Ahmed, M. S. and Dobberstein, R. H. 1982. *Stevia rebaudiana* II. High performance liquid chromatographic separation and quantitation of steviosid. rebaudiosid A and rebaudiosid C. *Journal of Chromatography*. 236: 523-526.
- Ahsan, M., Mehdi, S. S. and Khaliq, I. 2000. Tissue culture and breeding of maize (*Zea mays* L.). A review. *Pakistan Journal of Biological sciences*, 11: 1985-1988.
- Amaro-Luis, J.M. and Adrian, R.M. 1997. A new caryophyllane derivative from *Stevia triflora*. *Pharmazie*, 52. 162-163.
- Andlib, A., R.N. Verma and A. Batra, 2011. Synthetic seeds an alternative source for quick regeneration of a zero calorie herb-*Stevia rebaudiana* bertoni. *J. Pharm. Res.*, 4: 2007-2009.
- Anonim, 1988a. High intensity sweeteners - market size 7.2 billion yen. *Stevia* occupies 41%, but future gains will be made by aspartame. *Food Chemicals*, Tokyo, No. 6, 19.
- Anonim, 1998. Paraguay: 'Bertoni Project'. Helvetas World Wide Web <http://www.helvetas.ch/helvetas/projects/eparaguay/pa31.html> [Son erişim tarihi: 07.01.2011].
- Anonim, 1999a. European Commission. Scientific Committee on Food. Opinion on steviosid as a sweetener (adopted on 17 June 1999). Brussels. Belgium pp. 1-7. <http://europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scf/indexen/html>. [Son erişim tarihi: 03.02.2009].
- Anonim, 1999b. European Commission. Scientific Committee on Food. Opinion on *Stevia rebaudiana* Bertoni plants and leaves (adopted on 17 June 1999). Brussels. Belgium. pp.1-4. <http://europa.eu.int/comm/dg14/health/sc/scf/indexen/html>. [Son erişim tarihi: 08.08.2011].
- Anufrieva, E. N., Volodin, V. V., Nosov, A. M., Garcia, M. and Lafont, R. 1998. The content and composition of ecdysteroids in plants and tissue cultures of *Serratula caranata*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 45: 326-332.

- Archana, B., Dasgupta, N. De. B. 2005. *In vitro* study of antioxidant activity of syzygium cumini fruit. *Food Chemistry*, 90. 727-733.
- Arigoni, D., Eisenreich, W., Latzel, C., Sagner, S., Radykewicz, T., ZENK, M. H. and Bacher, A. 1999. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(4):1309-1314.
- Ashwini, K. S. 1996. Production of multiple shoots and somatic embryogenesis in *Stevia rebaudiana* Bertoni through in vitro propagation. M.Sc. (Agi.) thesis. UAS. Bangalore. India.
- Bakal, A. I. and O'Brien Nabors, L. 1986. Steviosid in Alternative Sweeteners. O'Brien Nabors and R.C.Gelardi (Eds). Marcel Dekker. Inc., New York, pp. 295-307.
- Bandara, B. M. R., Hewage, C. M., Karunaratne, V., Wannigama, G. P. and Adikaram, N.K.B. 1992. An antifungal chromene from *Eupatorium riparium*. *Phytochemistry*, 31. 1982-1985.
- Banerjee, M. and Sarkar P. 2008. *In vitro* callusing in *Stevia rebaudiana* Bertoni using cyanobacterial media- a novel approach to tissue culture. *International Journal of Integrative Biology*, 3: 163-168.
- Bertoni, M.S. (1905) Le Kaá hê-é: sa nature et ses propriétés. *Anales Cientificos Paraguayos. Serie I* 5. 1-14.
- Bertoni, M.S. (1918) La *Stevia rebaudiana* Bertoni. La estevina y la rebaudina. nuevas sustancias edulcorantes. *Anales Cientificos Paraguayos. Serie II* 6. 29-134.
- Bespalhok-Filho, J. C., Vieira, L. G. E. and Hashimoto, J. M. 1992. Factors influencing the in vitro micropropagation of axillary shoots of *Stevia rebaudiana* (Bert). Review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 4: 59-61.
- Bespalhok-Filho, J. C., Hashimoto, J. M. and Vieira, L. G. E. 1993. Induction of somatic embryogenesis from leaf explants of *Stevia rebaudiana* . *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 5: 51-53.
- Bespalhok-Filho, J. C. and Hattori, K. 1997. Embryogenic callus formation and histological studies from *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni floret explants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 9: 185-188.
- Bohlmann, F., Zdero, C. and Schoneweiss, S. 1976. Über die Inhaltsstoffe aus Stevia-Arten. *Chemische Berichte*, 109. 3366-3370.
- Bohlmann, F., Suwita, A., Natu, A. A., Czerson, H. and Suwita, A. 1977. Über weitere - Longipinen-Derivate aus Compositen. *Chemische Berichte* 110. 3572-3581.
- Bohlmann, F., Dutta, L.N., Dorner, W., King, R.M. and Robinson, H. 1979. Zwei neue Guajanolide sowie weitere Longipinester aus Stevia-Arten. *Phytochemistry* 18. 673-675.
- Bohlmann, F., Zdero. C., King. R.B. and Robinson. H. 1982. Sesquiterpenes. guaianolides and diterpenes from *Stevia myriadenia*. *Phytochemistry*, 21. 2021-2025.
- Bohlmann, F., and Zdero. C. 1985. Stevisalicinon. ein neuer diterpentyp. sowie weitere Inhaltsstoffe aus Stevia-Arten. *Liebigs Annalen der Chemie*. 1764-1783.

- Bohlmann, F., Zdero, C., King, R.M. and Robinson, H. 1986. Neue Sesquiterpenlactone und andere Inhaltsstoffe aus *Stevia mercedensis* und *Stevia achalensis*. *Liebigs Annalen der Chemie*, 799-813.
- Bondarev, N. I., Sukhamova, M. A., Reshetnyak, O. V. and Nosov, A. M. 2003. Steviol glycoside content in different organs of *Stevia rebaudiana* and its dynamics through ontogeny. *Journal of Plant Biology*, 47: 261-264.
- Bonvie, L. and Bonvie, B. 1996. Sinfully sweet? New Age Journal. January–February. pp. 60–64. 120. 122. 124. 126-128.
- Bradshaw, JR. H. D. and Stettler, R. F. 1995. Molecular genetics of growth and development in *Populus*. IV. Mapping QTLs with large effects on growth. form and phenology traits in a forest tree. *Genetics*, 139: 963-973.
- Brandle, J. E. and Rosa, N. 1992. Heritability for yield. leaf:stem ratio and steviosid content estimated from landrace cultivar of *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Plant Science*, 72: 1263-1266.
- Brandle, J. E., Richman, A., Swanson, A. K. and Chapman, B. P. 2002. Leaf ESTs from *Stevia rebaudiana* A resource for gene discovery in diterpene synthesis. *Plant Molecular Biology*, 50: 613-622.
- Brandle, J. E., Starratt, A. N. and Gijzen, M. 1998a. *Stevia rebaudiana*: its agricultural. biological. and chemical properties. *Canadian Journal of Plant Science*, 78: 527-536.
- Brezot, P., Malosse, C., Mori, K. and Renou, M. 1994. Bisabolene epoxides in sex pheromone in *Nezara viridula* (L.) (Heteroptera. Pentatomidae): Role of cis isomer and relation to specificity of pheromone. *Journal of Chemical Ecology*, 20. 3133-3147.
- Bruneton, J. 1995. Pharmacognosy. Phytochemistry. Medicinal Plants. Lavoisier. Paris. pp. 422-423.
- Calera, M.R., Soto, F., Sánchez, P., Bye, R., Hernández-Bautista, B., Anaya, A.L., Lotina-Hennsen, B. and Mata, R. 1995. Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry*, 40. 419-425.
- Carneiro, J. W. P. and Guedes, T. A. 1992. Influence of the contact of stevia seeds with the substrate. evaluated by means of the Weibull function. *Revista Brasileira de Sementes*, 14: 65-68. [English abstract.]
- Carneiro, J. W. P. 1996. Influence of seed number on evaluation of germination performance in *Stevia rebaudiana*. *Revista Brasileira de Sementes*, 18: 1-5.
- Ceunen, S. Geuns, J. M. C. 2013. Influence of photoperiodism on the spatio-temporal accumulation of steviol glycosides in *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Plant Science*, 198:72-82.
- Chalapathi, M. V. 1996. Methods of planting. fertilization. rooting and standardization of vegetative propagation techniques in stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). M.Sc. (Agi.) thesis.
- Chalapathi, M. V., Shivaraj, B. and Ramakrishna Prama, V. R. 1997. Nutrient uptake and yield of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) as influenced by methods of

- planting and fertilizer levels. *The Journal of Agriculture and Crop Research*, 14: 205208.
- Chamberlain, J.J. and Abolnik, I. Z. 1997. Pulmonary edema following a licorice binge. *Western Journal of Medicine*, 167-184.
- Chatsudthipong and Muanprasat, 2009 Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. *Pharmacol Therapeut* 121, 41-54.
- Chen, H. C., Chou, C. K., Lee, S.D., Wang, J.C. and Yeh, S.F. 1995. Active compounds from *Saussurea lappa* Clark that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Research*, 27. 99-109.
- Chen, S. and Shu, S. 1995. Study on storage technique of *Stevia rebaudiana* seed. *Acta Agronomica Sinica*, 21: 102-105.
- Chung, M. H. and Lee, M.Y. 1978. Studies on the development of *Hydrangea* and *Stevia* as a natural sweetening product. *Korean Journal of Pharmacognosy*, 9. 149-156.
- Cioni, P. L., Morelli, L., Andolfi, L., Macchia, M. and Ceccarini, L. 2006. Qualitative and quantitative analysis of essential oils of five lines *Stevia rebaudiana* Bert. Genotypes cultivated in Pisa (Italy). *Journal of. Essential Oil Research*. 18: 76-79.
- Clark, S. 2000. Sweet dreams. London Sunday Times. *Style section*. 1 April. p. 51.
- Cocker, W. 1966. Some aspects of the chemistry of diterpene bitter principles. *Planta Medica*, 14 (Suppl.). 78-85.
- Colombus, M. 1997. The Cultivation of stevia. “nature’s sweetener”. Ontario Ministry of Agriculture. *Food and Rural Affairs*. Toronto. ON. p. 4.
- Crammer, B. and Ikan, R. 1986. Sweet glycosides from the stevia plant. *Chemistry of Britain*, 22: 915-916.
- Dacome, A. S., Da Silva, C. C., Da Costa, C. E. M., Fontana, J. D., Adelman, J. and Da Costa, S. C. 2005. Sweet diterpenic glycosides balance of a new cultivar of *Stevia rebaudiana* (Bert) Bertoni: isolation and quantitative distribution by chromatographic, spectroscopic and electrophoretic methods. *Process of Biochemistry*. 44: 3587-3594.
- Das, A., Gantait, S. and Mandal, N. 2011. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research*, 6: 40-48.
- De Klerk, G.J., Nieuwenhuis, M.G. and Beutler, J.J. 1997. Hypokalaemia and hypertension associated with liquorice flavoured chewing gum. *British Medical Journal* 314. 731-732.
- Delima, O. F., Malavolta, E. and Yabico, H. Y. 1997. Influence of nutritional stress on content and production of stevioside during *Stevia rebaudiana* development. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 32: 489-494.
- Domínguez, X.A. 1977. Eupatorieae-chemical review. In *The Biology and Chemistry of the Compositae*, V. H. Heywood. J. B. Harborne. and B.L. Turner (Eds). *Academic Press*. London. 1. 487-502.

- Dubois, G. E. 2000. Sweeteners: non-nutritive. Pages 2245-2265 in F. J. Francis. ed. Encyclopedia of food science and technology Vol.4. 2nd ed. *John Wiley and Sons. Inc.*. New York. NY.
- Dubois, G.E. and Stephenson, R.A. 1985. Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of steviosid analogues with improved organoleptic properties. *Journal of Medicinal Chemistry*, 28. 93-98.
- Dubois, G.E., Bunes, L.A., Dietrich, P. S., and Stephenson, R. A. 1984. Diterpenoid sweeteners. Synthesis and sensory evaluation of biologically stable analogues of steviosid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32. 1321-1325.
- Dwivedi, R. S. 1999; Sekaran, T., Giridhar, P. and Ravishankar, G. A. 2007. Unnurtured and untapped super sweet nonsacchariferous plant species in India. *Current Science*, (Bangalore) 76: 1454-1461.
- Dzyuba, O. O. 1998. *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Hemsley- a new source of natural sugar substitute for Russia. *Rastitel'Nye Resursy*, 34: 86-95. [in Russian. English abstract]
- Eisenreich, W., Rohdich, F. and Bacher, A. 2001. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends Plant Science*, 6: 678-684.
- Erich, M., Peter, Q., Berlinges, U., Nakes, A., Waters, H. and Helment, V. 1961. Direct correlation of the diterpene alkaloids and hydrocarbons of the phyllocladene group: Interconversion of garryfoline and steviol. *Journal of the American Chemical Society*, 84: 3163-3164.
- Erik, V., Hewritt, G. and Fletcher, J. R. 1956. Steviosid. IV. Evidence that steviosid is a sophoroside. *Journal of the American Chemical Society*, 78: 4709-4710.
- Ermakov, E. I. and Kotechetov, A. A. 1996. Specific features in growth and development of *Stevia* plants under various light regimes in regulated conditions. *Doklady Rossiiskoi Akademii Sel'skokhozyaistvennykh Nauk* 10: 8-9.
- Esaki, S., Tanaka, R. and Kamiya, S. 1984. Synthesis and taste of certain steviol glycosides. *Agricultural and Biological Chemistry*, 48. 1831-1834.
- Felippe, G. M. 1977. *Stevia rebaudiana* Bert.: uma revisão. *Ciência e Cultura* (São Paulo) 29. 1240-1248.
- Felippe, G. M. 1978. *Stevia rebaudiana*. A review. *Journal of Chromatography*, 161: 403-405. [in Portuguese. English abstract.]
- Fenwick, G.R., Lutomski, J. and Nieman, C. 1990. Liquorice. *Glycyrrhiza glabra* L.-composition. uses. and analysis. *Food Chemistry*, 38. 119-143.
- Fernández-León, M., Fernández-León, A., Lozano, M., Ayuso, M., Amodio, M., Colelli, G. and González-Gómez, D. 2013. Retention of quality and functional values of broccoli 'Parthenon' stored in modified atmosphere packaging. *Food Control*, 31(2):302-313.

- Ferreira, C. M. and Handro, W. 1988. Production, maintenance and plant regeneration from cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton. *Plant Cell Reports*, 7: 123-126.
- Flachsland, E., Mroginski, L. and Davina, J. 1996. Regeneration of plants from anthers of *Stevia rebaudiana* Berton (Compositae) cultivated in vitro. *Biocell*, 20: 87-90.
- Flores, L. 1907. Manual terapeutico de las plantas Mexicanas. Yerba del Borrego *Stevia eupatoria*. Anales del Instituto Médico Nacional. Mexico. 9. 369-370.
- Frederico, A. P., Ruas, P. M., Marin-Morales, M. A., Fuas, C. F. and Nakajima, J. N. 1996. Chromosome studies in some *Stevia* Cav. (Compositae) species from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Genetics*. 19: 605-609.
- Gandhi, S. and Patil, V. P. 1997. Colchicine-induced autotetraploidy in *Clitoria ternatea* L. *Cytologia*, 62: 13-18.
- Gantait, S., Mandal, N. Bhattacharyya, S. and Das, P. K. 2010c. An elite protocol for accelerated quality-cloning in *Gerbera jamesonii* Bolus cv. Sciella. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 46: 537-548.
- Gantait, S., N. Manda, S. Bhattacharyya. and Das, P. K. 2010a. A novel strategy for in vitro conservation of *Aloe vera* L. through long term shoot culture. *Biotechnology*, 9: 326-331.
- Gantait, S., Sinniah, U. R. and Das, P. K. 2014. Aloe vera: A review update on advancement of in vitro culture. *Acta Agriculturae Scandinavica*, Section B- Soil Plant Science 64: 1-12.
- Giordano, O. S., Guerreiro, E., Pestchanker, M.J., Guzmán, J., Pastor, D. and Guardia, T. 1990. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *Journal of Natural Products*, 53. 803-809.
- Goettemoeller, J. and Ching, A. 1999. Seed germination in *Stevia rebaudiana*. In: J. Janick (Ed), *Perspectives on New Crops and New Uses*, ASHS Press, Alexandria, VA., pp. 510-511.
- Gorham, J. R. 1973a. The history of natural history in Paraguay. In Paraguay: Ecological Essays. J.R.Gorham (Ed.). *Academy of the Arts and Sciences of the Americas*. Miami. Florida. pp. 1-8.
- Gosling, C. 1901. Caá-êhê or azuca-caá. *Kew Bulletin*. pp. 183-194.
- Gashoff, J. L., Burner, M. W. and Northington, D. K. 1972. Chromosome number in North and Central American Compositae. *Brittonia*, 25: 379-394.
- Geuter, W., Barrie, F.R., Burdet, H.M., Chaloner, W.G., Demoulin, V., Hawksworth, D.L., Jorgensen, P.M., Nicolson, D.H., Silva, P.C., Trehane, P. and McNeill, J. 1994. *International Code of Botanical Nomenclature* (Tokyo Code). p. 103.
- Guerra, M. 1988. Introdução à Citogenética Vegetal. Editora Guanabara. Rio de Janeiro. 142 pp. [English summary]
- Gupta, S. K. and Roy, S. K. 1986. Induced colchiploidy in *Nicandra physaloides*. *Cytologia*, 51: 319-324.

- Harry, B., Wood, J. R., Hewritt, G. and Fletcher, J. R. 1956. Steviosid. III. The anomeric 2.3.4.6-tetra-O-acetyl-1-Omeritoyl- D glucopyranoses and their behaviour with alkali. *The Journal of the American Chemical Society*, 78: 207-210.
- Hedden, P. and Phillips, A. L. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trends Plant Science*. 5: 523-530.
- Hegnauer, R. 1977. The chemistry of the Compositae. In *The Biology and Chemistry of the Compositae*. V.H. Heywood. J.B.Harborne and B.L.Turner (Eds). Academic Press. London. New York. 1. 283-335.
- Helliwell, C. A., Poole, A., Peacock, W. J. and Dennis, E. S. 1999. Arabidopsis entkaurene oxidase catalyzes three steps of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiology*. 119: 507-510.
- Hemsley, W.B. 1906. *Stevia rebaudiana* Hemsley. In *Hooker's Icones Plantarum*. D.Prain (Ed.). Dulau and Co., London (4th Set.). 9. 2816.
- Hernández, L.R., Catalán, C.A.N., Cerda-García-Rojas, C.M. and Joseph-Nathan. P. 1994. Sesquiterpene lactones from *Stevia breviaristata*. *Phytochemistry*, 37. 1331-1335.
- Hernández, L.R., De Riscala, E.C., Catalán, C.A.N., Díaz, J.G. and Herz, W. 1996b. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Stevia maimarensis* and *Synedrellopsis gisebachii*. *Phytochemistry*, 42. 681-684.
- Herz, W. 1977. Sesquiterpene lactones in the Compositae. In *The biology and Chemistry of the Compositae*. V. H. Heywood. J.B.Harborne and B.L.Turner (Eds). Academic Press. London. New York. 1.337-357.
- Hiroshi, K., Ryon, K., Kazuo, Y., Kuniko, M. and Usamu, T. 1976. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana* . *Phytochemistry*, 15: 981-983.
- Hodnick, W.F., Duval, D.L. and Pardini, R.S. 1994. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanidestimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. *Biochemical Pharmacology*, 47. 573-580.
- Huang, Y. S., Guo, A. G., Qian, Y., Chen, L. Y. and Gu, H. F. 1995. Studies on the variation of steviosids content and selection of type R-A in *Stevia rebaudiana* . *The Journal of Plant Research*. 4: 28-32. [In Chinese. English summary.]
- Hutapea, A. M. 1997. Digestion of steviosid. a natural sweetener. by various digestive enzymes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 23: 177-186.
- Hutapea, A. M., Toskulkao, C., Wilairat, P. and Buddhasukh, D. 1999. High-performance liquid chromatographic separation and quantitation of steviosid and its metabolites. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*. 22. 1161-1170.
- Hwang, S.J. 2006. Rapid in vitro propagation and enhanced stevioside accumulation in *Stevia rebaudiana* Bert. *Journal Plant Biology* 49: 267-270.

- Ibrahim, I.A., Nasr, M.I., Mohammed, B.R., and El-Zefzafi, M.M. 2008a. Plant growth regulators affecting in vitro cultivation of *Stevia rebaudiana*. *Sugar Tech*, 10: 254-259.
- Jain, P., Kachhwaha, S. and Kothari, S. L., 2009. Improved micropropagation protocol and enhancement in biomass and chlorophyll content in *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni by using high copper levels in the culture medium. *Scientia Horticulturae*, 119: 315-319.
- Janarthanam, B., Gopalakrishnan, M., Lakshmi, G., and Sekar, T., 2009. Plant regeneration from leaf derived callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 19: 133-141.
- Kalpana, M., Anbazhagan, M. Natarajan, V. and Dhanavel, D. 2010. Improved micropropagation method for the enhancement of biomass in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Recent Research on Science and Technology*, 2: 8-13.
- Kang, K. H. and Lee, K. W. 1981. Physio-ecological studies on stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni). *Korean Journal of Crop Science*, 26: 69-89.
- Kawatani, T., Kaneki, Y. and Tanabe, T. 1977. The cultivation of kaa he-e (*Stevia rebaudiana*). II Seed germination with special reference to the optimum temperature and light sensitivity. *Japanese Society for Tropical Agriculture*, 20: 137-142.
- Kennely, E. J. 2002. Sweet and non-sweet constituents of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni. Pages 68-85 in A. D. Kinghorn. ed. *Stevia. the genus Stevia: Medical and plant industrial profiles*. Vol.19. Taylor and Francis. London. UK.
- Khan, S.A., Rahman, L.U. Shanker, K. and Singh, M. 2013. Agrobacterium tumefaciens-mediated transgenic plant and somaclone production through direct and indirect regeneration from leaves in *Stevia rebaudiana* with their glycoside profile. *Protoplasma* (Online) DOI 10.1007/s00709-013-0568-x.
- Kim, K. K., Sawa, Y. and Shibata, H. 1996. Hydroxylation of entkaurenoic acid to steviol in *Stevia rebaudiana* Bertoni: purification and partial characterization of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 332: 223-230.
- King, R. M. and Robinson, H. 1987. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). Monographs in systematic botany. *Missouri Botanical Garden*. St. Louis. MO.
- Kinghorn, A. D., Soejarto, D. D., Nanayakkara, N. P. D., Compadre, C. M., Makapugay, H. C., Hovanec-Brown, J. M. VD. (1984) A phytochemical screening procedure for sweet ent-kaurene glycosides in the genus *Stevia*. *Journal of Natural Products* 47. 439-444.
- Kinghorn, A. D. and Soejarto, D. D. 1985. Current status of steviosid as a sweetening agent for human use. In *Progress in Medicinal and Economic Plant Research*. H.Wagner. H.Hikino and N.R.Farnsworth. (Eds). Academic Press. London. 1:1-51.

- Kinghorn, A. D. 1987. Biologically active compounds from plants with reputed medical and sweetening properties. *Journal of Natural Products*. 50: 1009-1024.
- Kinghorn, A. D. and Soejarto, D. D. 1991. Steviosid. In *Alternative Sweeteners* (2nd edn. Revised and Expanded). L.O'Brien Nabors and R.C.Gelardi (Eds). Marcel Dekker. Inc.. New York. pp. 157-171.
- Kinghorn, A. 2002. Stevia: The genus Stevia. *Medicinal and Aromatic Plants-Industrial*
- Kobayashi, M., Horikawa, S., Degandi, I. H., Ueno, J. and Mitsushashi, H. 1977. Dulcosides A and B. new diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana* . *Phytochemistry*, 16. 1405-1407.
- Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K. and Tanaka, O. 1976 a. New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana* . *Phytochemistry*, 15. 981-983.
- Kohda, H., Yamazaki, K. and Tanaka, O. 1976 b. Methylripariochromene A from *Stevia serrata*. *Phytochemistry*, 15. 846-847.
- Lange, B. M., Wildung, M. R., Mc Caskill, D. and Croteau, R. 1998. A family of transketolases that directs isoprenoid biosynthesis via a mevalonate-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 95: 2100-2104.
- Langston, R. G. and Leopold, A. C. 1954. Chen, K., Chang, T. R. and Chen, S. T. 1978. Photoperiodic responses of pepper mint. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, 63: 347-352.
- Lata, H., Chandra, S. Techen, N. Elsohly, M. A. and Khan, I. A. 2012. Determination of genetic stability of micropropagated plants of *Stevia rebaudiana* Bert. using inter-simple sequence repeat (ISSR) Markers. *Planta Medica*, 78: P-1.
- Lee, J. I., Kang, K. H. and Park, H. W. 1982. New high rebaudiosid A stevia variety 'Suweon 11'. Res. Rept. ORD 24: 186-188. [in Korean. English summary.]
- Lee, J.I., Kang, K.H., Park, H.W. and HAM, Y.S. 1980. Effect on the new sweetening resources plant *Stevia* (*Stevia rebaudiana* Bertoni M.) in Korea. *Nongupshinbo* 22. 138-144.
- Lester, T. 1999. *Stevia rebaudiana* (sweet honey leaf). Aust. New Crops News Lett. 11. Nat. Prod. Radiance 2: 120.
- Lewis, W.H. 1992. Early uses of *Stevia rebaudiana* (Asteraceae) leaves as a sweetener in Paraguay. *Economic Botany*, 46. 336-337.
- Maiti, R. K. and Purohit, S. S. 2008. *Stevia: A miracle plant for human health*. Agrobios (India) Jodhpur. India.
- Makapugay, H. C., Nanayakkara, C. and Kinghorn, A. D. 1984. Improved high performance liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycosides using linear gradient elution. *Journal of Chromatography*, 203: 391-395.
- Marles, R. J., Pazos-Sanou, L., Compadre, C. M., Pezzuto, J. M., Bloszyk, E. and Arnason, J. T. 1995. Sesquiterpene lactones revisited. Recent developments in the assessment of biological activities and structure relationships. In

- Phytochemistry of Medicinal Plants*. J. T. Arnason. R. Mata and J. T. Romeo (Eds). Plenum Press. New York. pp. 333-356.
- Masur, K., Shui, H., Isolde, H. D., Junko, U. and Hiroshi, M. 1977. New diterpene glycosides. dulcoside A and B. were isolated from *S. rebaudiana* and their structures were established. *Phytochemistry*, 16: 1405-1408.
- Mata, R., Rodríguez, V., Pereda-Miranda, R., Kaneda, N. and Kinghorn. A. D. 1992. Stevisalioside A. a new ent-atrisene glycoside from the roots of *Steviasalicifolia*. *Journal of Natural Products*, 55. 660-666.
- Matsui, M., Sofuni, T. and Nohmi, T. 1996. Regionally targeted mutagenesis by metabolically activated steviol: DNA sequence analysis of steviol-induced mutants of guanine phosphoribosyltransferase (gpt) gene of *Salmonella typhimurium* TM677. *Mutagenesis* 11. 565-572.
- Mauri, P., Catalano, G., Gardana, C. and Pietta, P. 1996. Analysis of *Stevia* glycosides by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 17. 367-371.
- McGarvey, D. J. and Croteau, R. 1995. Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 7: 1015-1026.
- Megeji, N.W., Kumar, J.K., Singh, V., Kaul, V.K., Ahuja, P.S. 2005: Introducing *Stevia rebaudiana*, a natural zero-calorie sweetener. *Current Science*, 88: 801-80.
- Merkle, S. A., Parrot, W. A. and Williams, E. G. 1990. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. Pages 67-101 in S. S. Bhojwani. ed. *Plant tissue culture: applications and limitations*. Elsevier. New York. NY.
- Metivier, J. and Viana, A. M. 1979. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins. sugars and steviosid in leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. *The Journal of Experimental Botany*, 30: 1211-1222.
- Metivier, J. and Viana, A. M. 2005. The effect of long and short day length upon the growth of whole plants and the level of soluble proteins. sugars. and steviosid in leaves of *Stevia rebaudiana* Bert. *The Journal of Experimental Botany*, 30: 1211-1222.
- Miyagawa, H., Fujikawa, N., Kohda, H., Yamasaki, K., Taniguchi, K. and Tanaka, R. 1986. Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and its components: (II). Induction of shoot primordia. *Planta Medica*, 4: 321-324.
- Mizutan, K., Miyata, T., Kasai, R., Tanaka, O., Ogawa, S. and Doi, S. 1989. Study on the improvement of sweetness of steviol bisglycosides: selective enzymatic transglycosylation of the 13-O-glycosyl moiety. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53. 395-398.
- Miyagawa, H., Fujita, Y., Fujioka, N., Kohda, H. and Yamasaki, K. 1984. Studies on tissue culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni and its components. *Shoyakugaku Zasshi*. 38: 12-18. [in Japanese. English abstract.]
- Modi, A. R., Patil, G., Kumar, N., Singh, A. S. and Subhash, N. 2012. A simple and efficient in vitro mass multiplication procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and analysis of genetic fidelity of in vitro raised plants through RAPD. *Sugar Tech*, 14: 391-397.

- Montanaro, S., Bardón, A. and Catalán, C. A. N. 1996. Antibacterial activity of various sesquiterpene lactones. *Fitoterapia*, 67. 185-187.
- Monteiro, R. 1980. Taxonomia e biologia da reprodução da *Stevia rebaudiana* Bert. Ph.D. thesis. Univ. Estadual de Campinas. Brazil. [English abstract.] Montes. A.L. (1969) *Gas chromatography of essential oils of plants native to Central and Northern Argentina*. Anales de la Sociedad Científica Argentina 187. 21-48.
- Montes, A. L. 1969. Gas chromatography of essential oils of plants native to Central and Northern Argentina. Anales de la Sociedad Científica Argentina 187. 21-48.
- Morita, T. 1987. Dried leaves. *Japanes Patent* 62-96025.
- Moroni, L. 1999. Stevia: è naturale sana dietetica e fino a 300 volte più doce dello zucchero. Absorption, distribution, metabolism and excretion of steviosid in rats. *Journal of the Food Hygiene Society of Japan*, 27. 1-8.
- Mosettig, E., Beglinger, U., Dolder, F., Lichti, H., Quitt, P. and Waters. J. A. 1963. The absolute configuration of steviol and isosteviol. *Journal of the American Chemical Society*, 85. 2305-2309.
- Nishiyama, P., Alvarez, M. and Vieira, L.G.E. 1992. Quantitative analysis of steviosid in the leaves of *Stevia rebaudiana* by near infrared reflectance spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 59. 277-281.
- Ohlrogge, J. and Benning, C. 2000. Unravelling plant metabolism by EST analysis. *Current Opinion in Plant Biology*, 3: 224-228.
- Okada, N., Shirata, K., Niwano, M., Koshino, H., and Uramoto, M. 1994. Immunosuppressive activity of a monoterpene from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry* 37. 281-282.
- Oliveira, V., M. Forni-Martins, E. R., Magalhaes, P. M. and Alves, M. N. 2004. Chromosomal and morphological studies of diploid and polyploid cytotypes of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni (Eupatorieae. Asteraceae). *Genetics and Molecular Biology* 27: 215-222.
- Pande, S. S. and Gupta, P. 2013. Plant tissue culture of *Stevia rebaudiana* (Bertoni): A review. *Journal of Pharmacognosy Phytotherapy*, 5: 26-33.
- Paran, I. and Micheltore, R. W. 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance gene in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*. 85: 985-993.
- Paterson, A. H. 1996. Genome mapping in plants. Academic Press Inc., London. UK.
- Penner, R., 2004. *Stevia* From Paraguay. An Endeavor of: U.S. Agency for International Development. 64 P.
- Perez, G.R.M., Perez, G.S. and Perez, G.C. 1995. Chemical composition of the essential oil of *Stevia porphyrea* flowers. *Tecnología de Alimentos* 30. 5-7 [Chemical Abstracts 124. 211464w].
- Pezzuto, J.M. 1986. Chemistry, metabolism and biological activity of steviol (ent-13—hydroxykaur-13-en-19-oic acid). In *New Trends in Natural Products*

- Chemistry 1986. Studies in Organic Chemistry. vol. 26. Atta-ur-Rahman and P.W.Le Quesne. (Eds). *Elsevier Science Publishers BV*. Amsterdam. pp. 371-386.
- Pezzuto, J.M., Compadre, C.M., Swanson, S.M., Nanayakkara, N.P.D. and Kinghorn, A.D. 1985. Metabolically activated steviol, the aglycone of steviosid is mutagenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82. 2478-2482.
- Phillips, K.C. 1987. Stevia: steps in developing a new sweetener. In Developments in Sweeteners -3. T.H. Genby (Ed.). *Elsevier Applied Science*. London. pp. 1-43.
- Phillips, R.L., Kaeppler, S. M. and Olhoft P. 1994. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *Proceedings of National Academy of Science USA* 91: 5222-5226.
- Picman, A.K. and Schneider, E.F. 1993. Inhibition of fungal growth by selected sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*. 21. 307-314.
- Pinheiro, M.V.S., Oliveria, M.N., Penna, A.L.B. and Tamime, A.Y. 2005. The effect of different sweeteners in low-calorie yogurts, a review. *Int. J. Dairy Technol.* 58, 193–199.
- Planas, G.M. and Kuc, J. 1968. Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science* 162. 1007.
- Prakash, I., Clos, J.F. et al. (2012) *Food. Res. Int.* (48), 65-75.
- Putieva, Z. M. and Saatov, Z. 1997. Flavonoids of the leaves of *Stevia rebaudiana*. *Chemistry of Natural Compounds*. 33: 494.
- Rajbhandari, A. and Roberts, M. 1983. Chemical constituents of flowers of *Stevia rebaudiana*: The flavonoids of *Stevia rebaudiana*. *Agricultural and Biological Chemistry*. 47: 133-135.
- Rajbhandari, A. and Roberts, M.F. 1985a The flavonoids of *Stevia microchaeta*, *Stevia monardifolia* and *Stevia organoides*. *Journal of Natural Products*, 48. 502-503.
- Revina, T. A., Karnachuk, R. A. and Tailashova, P. YA. 1986. The dynamics of contents of ecdisterone in the above ground part of *Serratula coronata* L. and the effect of light of various spectral composition on it. *Rast Resursy*. 22: 70-72.
- Richman, A. S., Gijzen, M., Starratt, A. N., Yang, Z. and Brandle, J. E. 1999. Diterpene synthesis in *Stevia rebaudiana*: Recruitment and up-regulation of key enzymes from the gibberellin biosynthetic pathway. *The Plant Journal*, 19: 411-421.
- Rios, T., Romo Devivar, A. and Romo, J. 1967. Stevin. a new pseudoguaianolide isolated from *Stevia rhombifolia* HBK. *Tetrahedron*. 23. 4265-4269.
- Robles, M., Aregullin, M., West, J. and Rodriguez, E. 1995. Recent studies on the zoopharmacognosy. pharmacology and neurotoxicology of sesquiterpene lactones. *Planta Medica*, 61. 199-203.

- Rodríguez Concepcio'n, M., Campos, N., Lois, L.M., Maldonado, C., Hoeffler, J. F., Gosdemange-Billiard, C., Rohmer, M. and Boronat, A. 2000. Genetic evidence of branching in the isoprenoid pathway for the production of isopentenyl diphosphate and dimethylallyl diphosphate in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*. 473: 328-332.
- Rodríguez, E., Towers, G.H.N. and Mitchell, J.C. 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochemistry*, 15. 1573-1580.
- Rodríguez, E. 1977. Sesquiterpene lactones: chemotaxonomy. biological activity and isolation. *Revista Latinoamericana de Química*, 8. 56-62.
- Romero-Aranda, R., Bondada, B.R., Syvertsen, J.P., Gosser, J.W. Leaf characteristics and net gas exchange of diploid and autotetraploid citrus. *Annals of botany* 1997 v.79 no.2 pp.
- Sakaguchi, M. and Kan, T. 1982. Japanese research on *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni and steviosid. *Ciência e Cultura* (São Paulo), 34. 235-248.
- Salah, F., Latifi, N. and Amjadlan, M. 2006. The Effect of Planting Date on the Yield and yield Components of Soybean (*Glycine max* L.) Cultivar Williams in Gorgan Region. *Journal of Agronomy and Plant Breeding*, 13 (2): 19-26.
- Salmón, M., Díaz, E. and Ortego, A. 1973. Christinine. a new epoxyguaianolide from *Stevia serrata* Cav. *Journal of Organic Chemistry*, 38. 1759-1760.
- Salmón. M., Díaz. E. and Ortego. A. 1977. Epoxilactonas de *Stevia serrata* Cav. *Revista Latinoamericana de Química* 8. 172-175.
- San Chez, M.C., Larrauri, J.A., Saurra, C. F. 1998. A procedure to measure antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76. 270-276.
- Sanyo Kokusaku. 1990. New triploid of *Stevia rebaudiana* Bertoni contains sweet diterpenoid. Patent Number(s): JP2242622-A; JP2748141-B2.
- Schardt, D. 2000. *Stevia* a bittersweet tale. *Nutrition Action Health letter*. April. p. 3.
- Schmeda-Hirschmann, G., Zdero, C. and Bohlmann, F. 1986. Melampolides and germacranolides from *Stevia amambayensis*. *Phytochemistry*, 25. 1755-1756.
- Schnelle, R., 2010. *Stevia*. Pub: University of Kentucky. *College of Agriculture*, 4 P.
- Sekaran, T., Giridhar, P. and Ravishankar, G. A. 2007. Production of steviosids in *ex vitro* and *in vitro* grown *Stevia rebaudiana* Bertoni. *The Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87: 420-424.
- Sekaran, T., Giridhar, P. and Ravishankar, G. A. 2007. *Scienza* . Bussolengo. Verona. Italy. 12(1). 25-27.
- Seon, J. H. 1995. Steviosid as natural sweetener. Report of the Pacific R & D Center. Seoul. Korea. pp. 1-8.
- Shaffert, E. E. and Chebotar, A. A. 1994. Structure. topography and ontogeny of *Stevia rebaudiana* . *Botanicheskii Zhurnal*, 79:38-48.

- Schnelle R., 2010. Stevia Agriculture & Natural Resources. U.K. Cooperative extension service. University of Kentucky – College of Agriculture.
- Shibata, H., Sawa, Y., Oka, T., Sonoke, S., Kim, K. K. and Yoshioka, M. 1995. Steviol and steviol-glucoside: glucosyltransferase activities in *Stevia rebaudiana* Bertoni: purification and partial characterization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 321:390-396.
- Shibata, H., Sonoke, S., Ochiai, H., Nishihashi, H. and Yamada, M. 1991. Glucosylation of steviol and steviolglucosides in extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Physiology*, 95: 152-156.
- Shizhen, S. 1995. A study on good variety selection in *Stevia rebaudiana*. *Science of Agriculture*, 28: 37-41.
- Shock, C. C. 1982. Rebaudi's stevia: natural non-caloric sweeteners. *California Agriculture*,. 36: 4-5.
- Shu, S. 1989. *Stevia rebaudiana* variety trials. *Zuowu Pinzhong Ziyuan* 1: 17-18. [in Chinese. English abstract.]
- Shuichi, H., Tsuneo, Y. and Satoshi, F. 2001. Breeding of triploid plants of stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) with high rebaudiosid A content. *Japanese Society for Tropical Agriculture*, 45: 281-289.
- Sigstad, E. E., Catalán, C. A. N., Gutiérrez, A. B., Díaz, J.G., Goedken, V. L. and Herz, W. 1991. Guaianolides and germacranolides from *Stevia gisebachiana*. *Phytochemistry*, 30. 1933-1940.
- Singh, P., Dwivedi, P. and Atri, N. 2014. *In vitro* shoot multiplication of *Stevia* and assessment of stevioside content and genetic fidelity of the regenerants. *Sugar Tech* (Online) DOI 10.1007/s12355-013-0292-z.
- Singh, S. and Rao, G. 2005. Stevia: The herbal sugar of 21 st century. *Sugar Tech*, 7(1):17-24.
- Sivaram, L. and Mukundan, U. 2003. In vitro culture studies on *Stevia rebaudiana*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 39: 520-523.
- Škerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Hraš, AR. and Simonič M. 2005. Phenols. proanthocyanidins. flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food chemistry*. 89: 2. 191-198.
- Skerget, M., Kotnik, P., Hadolin, M., Rizner Hras, A., Simonic, M. and Zeljko, K. 2005. Phenols. proanthocyanidins. flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, 89 (2): 191-198.
- Smith, J. and Van-Stadin, H. 1992. Subcellular pathway of glycoside synthesis. *The South African Journal of Science*, 88: 206.
- Soejarto, D. D., Compadre, C. M., Medon, P. J., Kamath, S. K. and Kinghorn, A. D. 1983a. Potential sweetening agents of plant origin II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Economic Botany*, 37:71-78.
- Soejarto, D. D., Compadre, C. M., Medon, P. J., Kamath, S. K. and Kinghorn, A. D. 1983. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Economic Botany*, 37: 71-79.

- Soejarto, D. D., Kinghorn, A. D. and Farnsworth, N. R. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of Stevia leaf herbarium samples for sweetness. *Journal of Natural Products*, 45. 590-599.
- Soejarto, D. D., Kinghorn, A.D. and Farnsworth, N.R. 1982. Potential sweetening agents of plant origin. III. Organoleptic evaluation of Stevia leaf herbarium samples for sweetness. *Journal of Natural Products*. 45. 590-599.
- Soliman, H. I. A., Metwali, E. M. R. and Almaghrabi, O. A. 2013. Micropropagation of Stevia rebaudiana Betroni and assessment of genetic stability of in vitro regenerated plants using inter simple sequence repeat (ISSR) marker. *Archives Des Sciences*, 66: 343-359.
- Sosa, V. E., Gil, R., Oberti, J.C., Kulanthaivel, P. and Herz, W. 1985. Sesquiterpene lactones and flavones from Stevia procumbens. *Journal of Natural Products*, 48. 340-341.
- Sosa, V. E., Oberti, J.C., Gil, R. R., Rúveda, E. A., Goedken, V. L., Gutiérrez, A. B. VD.. 1989. 10-Epideoxycumambrin B and other constituents of Stevia yaconensis var. subglandulosa. *Photochemistry*, 28. 1925-1929.
- Spanos, G. A.; Wrolstad, R. E. 1992. Phenolics of apple, pear, and white grape juices and their changes with processing and storage a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 40:1478-1487.
- Starrat, A. N., Kirby, C. W., Pocs, R. and Brandle, J. E. 2002. Rebaudiosid F a diterpene glycoside from Stevia rebaudiana . *Phytochemistry*, 59: 367-370.
- Staub, J. E., Serquen, F. E. and Gupta, M. 1996. Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding. *Horticulture Science* 35: 729-741.
- Sticher, O. 1977. Plant mono-, di- and sesquiterpenoids with pharmacological or therapeutical activity. In *New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*, H.Wagner and P.Wolff (Eds). Springer-Verlag, Berlin, New York. pp. 137-176.
- Taiariol, D. R. 2004. Characterization of the Stevia rebaudiana Bert. [Online] Available: <http://www.monogafias.com/trabajos13/stevia/stevia.html>. [Son erişim tarihi: 09.18.2017].
- Takahashi, L., Melges, E. and Carneiro, J. W. P. 1996. Germination performance of seeds of Stevia rebaudiana under different temperatures. *Revista Brasileira de Sementes*. 18: 6-9.
- Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H. and Tabata, M. 1984a. Comparison of Stevia plants grown from seeds, cuttings and stem tip cultures for growth and sweet diterpene glycosides. *Plant Cell Reports*. 3: 180-182.
- Tamura, Y., Nakamura, S., Fukui, H. and Tabata, M. 1984b. Clonal propagation of Stevia rebaudiana Bertoni by stem-tipculture. *Plant Cell Reports*. 3: 183-185.
- Tanaka, O. 1982. Steviol-glycosides: new natural sweetener. *Trends in Analytical Chemistry* 1. 246-248.

- Tanaka, O. 1985. Application of C-nuclearmagnetic resonance spectrometry to structural studies on glycosides: saponins of *Panax* spp. and natural sweet glycosides. *Yakugaku Zasshi*. 105: 323-351.
- Tanaka, O. 1997. Improvement of taste of natural sweeteners. *Pure and Applied Chemistry* 69. 675-683.
- Tateo, F., Mariotti, M., Bononi, M., Lubian, E., Martello, S. and Cornara, L. 1998. Steviosid content and morphological variability in a population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. *Italian Journal of Food Science*. 10: 261-267.
- Taware, A.S., Mukadam, D.S., Chavan, A.M., Tawar, S.D. (2010): Comparative studies of in vitro and in vivo grown plants and callus of *stevia rebaudiana* (Bertoni). *International Journal of Integrative Biology* 9(1): 10-15.
- T.C. Şeker kurumu açıklaması, 2013. <http://www.sekerkurumu.gov.tr/faaliyetler.aspx> <http://www.ulusaltarim.com/912/-Yuksek-Yogunluklu>, [Son erişim tarihi: 08.02.2017].
- Thiyagarajan, M. and Venkatachalam, P. (2012) Large scale in vitro propagation of *Stevia rebaudiana* (bert) for commercial application: Pharmaceutically important and anti-diabetic medicinal herb. *Industrial Crops and Products*, 37, 111-117.
- Tomas, J., Campus, F., Coll, J., Mele, E. and Messeguer, J. 1993. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue cultures. *Phytochemistry*. 32: 317-324.
- Toruan-Mathius, N., Pratiwi, T. and Hutabarat, T. 1995. Somaclonal variations in *Stevia rebaudiana* Bertoni irradiated with Co-60 gamma rays. *Menara Perkebunan*. 63: 33-42.
- Totte', N., Caron, L., Rohmer, M., Compennolle, F., Baboeuf, I. and Geuns, J. M. C. 2000. Biosynthesis of the diterpenoid steviol, an ent-kaurene derivative from *Stevia rebaudiana* Bertoni, via the methylerythritol phosphate pathway. *Tetrahedron Letters*. 41: 6407-6410.
- Totte', N., Van Den Ende, W., Van Damme, E. J. M., Compennolle, F., Baboeuf, I. and GEUNS, J. M. C. 2003. Cloning and heterologous expression of early genes in gibberellin and steviol biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway in *Stevia rebaudiana*. *Canadian Journal of Botany*. 81: 517-522.
- Toyoda, K., Matsui, H., Shoda, T., Uneyama, C., Takada, K. and Takahashi, M. 1997. Assessment of the carcinogenicity of steviosid in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*. 35. 597-603.
- Truong, T. T., Valicek, P., Nepovim, A. and Vamel., T. 1999. Correlation between stevioside content in leaves. their surface and the number of roots in the plant. *Science Agriculture Bohemica*. 30: 249-258.
- Tsanava, V. P., Sardzhveladze, G. P. and Kharebava, L. G. 1989. Studies on the volatile compounds of *Stevia rebaudiana* . *Subtropicheskie Kul'Tury*. 3: 73-77.
- Turgut, K., Ucar, E., Tütüncü, B. and Ozyigit, Y. 2015. *Stevia rebaudiana* Bertoni Could be an Alternative Crop in the Mediterranean Region of Turkey. *Proceedings of the 8th Stevia Symposium*(Bonn), p:43-52.

- Utumi, M. M., Monnerat, P. H., Pereira, P. R. G., Fontes, P. C. R. and Godinho, V. D. 1999. Macronutrient deficiencies in Stevia: Visual symptoms and effects on growth. chemical composition. and steviosid production. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 34: 1039-1043.
- Valio, I. F. M. and Rocha, R. F. 1977. Effect of photoperiod and growth regulators on growth and flowering of Stevia rebaudiana Bertoni. *Jpn. Journal of Crop Science*. 46: 243-248.
- Valois, A. C. C. 1992. Stevia rebaudiana Bert: uma alternativa economica. *Comunicado Técnico Cenargen*. 13: 1-13. [English summary.]
- Van De Loo, F. J., Broun, P., Turner, S. and Somerville, C. 1995. An oleate 12-hydroxylase from Ricinus communis L. is a fatty acyl desaturase homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92: 6743-6747.
- Vereskovskii, V. V., Chekalinskaya, I. I. and Pashina, G. V. 1983. Dynamics of contents of ecdisterone in species of the genus. *Rhaponticum Ludw. Rast. Resursy*. 19: 60-65.
- Wang, Q. 2006. Method of cultivating hybrid new variety via systematically breeding *Stevia rebaudiana* clone parental plant. Patent no. CN1985575-A International patent no. A01H-001/02.
- Wang, Y., Hamburger, M., Gueho, M. and Hostettmann, K. 1989 Antimicrobial flavonoids from Psiadia trinervia and their methylated and acetylated derivatives. *Phytochemistry* 28. 2323-2327.
- Wasuntarawat, C., Temcharoen, P., Toskulkao, C., Munkornkarn, P., Suttajit, M. and Glinsukon, T. 1998. Developmental toxicity of steviol. a metabolite of steviosid. in the hamster. *Drug and Chemical Toxicology* 21. 207-222.
- Wingard, R.E., JR. Brown, J.P., Enderlin, F.E., Dale, J.A., Hale, R. L. and Sietz, C.T. 1980 Intestinal degradation and absorption of the glycosidic sweeteners steviosid and rebaudiosid A. *Experientia*. 36. 519-520.
- Wölwer-Rieck, U., Tomberg, W. and Wawrzun, A. 2010. Investigations on the Stability of Stevioside and Rebaudioside A in Soft Drinks. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 58 (23). pp 12216-12220.
- Xılı, L., Chengjiany, B., Eryı, X., Reiming, A., Yuengming, W., Haodong, S. and Zhiyian, H. 1992. Chronic oral toxicity and carcinogenicity study of steviosid in rats. *Food and Chemical Toxicology* 30. 957-965.
- Yadav, S.K., Guleria, P., Steviol Glycosides from Stevia: Biosynthesis Pathway Review and their Application in Foods and Medicine. *Critical Reviews Food Science*, 52:11, 988-998, (2012).
- Yadav AK, Singh S, Dhyani D, Ahuja PS, 2011. A review on the improvement of Stevia [Stevia rebaudiana (Bertoni)]. *Canadian Journal of Plant Scienc*. 91:1-27.
- Yamasaki, K., Kohda, H., Kobayashi, T., Kasai, R. and Tanaka, O. 1976. Structures of Stevia diterpeneglucosides: Applications of ¹³C NMR. *Tetrahedron Letters* 1005-1008.

- Yamasaki, T. and Flores, H. 1989. Production of steviol glucosides by hairy root cultures of stevia. *Plant Physiology*. (Rockville) 89: 10.
- Yamasaki, T., Flores, H., Shimomura, K. and Yoshihira, K. 1991. Examination of steviol glucosides production by hairy root and shoot cultures of *Stevia rebaudiana*. *Journal of Natural Products* (Lloydia) 54: 986-992.
- Yang, Y. W. and Chang, C. W. 1979. In vitro plant regeneration from leaf explants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Z. Pflanzenphysiol.* 93: 337-343.
- Yao, Y., Ban, M. and Brandle, J. 1999. A genetic linkage map for *Stevia rebaudiana*. *Genome* 42: 657-661.
- Yohei, H. and Masataka, M. 1978. High performance liquid chromatographic separation and quantification of stevia components on hydrophilic fore bed column. *Journal of Chromatography*. 161: 403-405.
- Zaidan, L. B. P., Dietrich, S. M. C. and Felipe, G. M. 1980. Effect of photoperiod on flowering and steviosid content in plants of *Stevia rebaudiana*. *Jpn. Journal of Crop Science*. 49: 569-574.
- Zdero, C., Bohlmann, F. and Schmeda-Hirschmann, G. (1987) Beyerene derivatives and other terpenoids from *Stevia aristata*. *Phytochemistry*. 26. 463-466.
- Zdero, C., Bohlmann, F., King, R. M. and Robinson, H. 1988. The first 12. 8 β -germacrolide and other constituents from Bolivian *Stevia* species. *Phytochemistry*. 27: 2835-2842.
- Zubenko, V. F., Koval'chuk, M. J. and Ges, E. I. 1995. The root system of vegetatively propagated stevia. *Sakharnaya Svekla*. 10: 21-22.
- Zygadlo, j.a., Ariza Espinar, I., Velasco Negueruela, A. and Perez Alonso, M. J. 1997. Volatile constituents of *Stevia achalensis* Hieronymus. *Flavour and Fragrance Journal*. 12(3):297-299.

ÖZGEÇMİŞ

BEGÜM KAPLAN
begumtutuncu@akdeniz.edu.tr



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

Doktora 2012-	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya
Yüksek Lisans 2004-2007	Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Denizli
Lisans 2000-2004	Pamukkale Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Denizli

MESLEKİ VE İDARİ GÖREVLER

Araştırma Görevlisi 2012-	Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Antalya
------------------------------	---

ESERLER

Uluslararası Bildiriler

- 1) **Begüm Tutuncu**, Vural Kuçukatay, Sevki Arslan, Barbaros Sahin, Aslı Semiz and Alaattin Sen. (2012).Alteration of drug metabolizing enzymes in sulphite oxidase deficiency. J.Clin. Biochem. Nutr. Vol.51, p:50-54.
- 2) **Begüm Tutuncu**, Alaattin Şen. A Potential Role of Sulphite Oxidase Deficiency in Xenobiotics Metabolism 31th FEBS Congress (2006) İstanbul 24-29 Haziran.
- 3) Alaattin SEN, Onur Kenan Ulutas, **Begüm Tutuncu**, Nusret Ertas, Ismet Cok (2010) Determination of 7-ethoxyresorufin-o-deethylase (EROD) induction in leaping mullet (Liza saliens) from the highly contaminated Aliaga Bay, Turkey. Environ Monit Assess 165 (1-4), 87-96.

- 4) Onur Kenan Ulutas, Nusret Ertas, Alaattin SEN, **Begum Tutuncu**, Ismet Cok. Determination of heavy metals and EROD induction in mullet from highly contaminated Aliaga Bay, Izmir, Turkey Toxiology Letters 172: S163-S163.,2007.
- 5) Kenan Turgut, Yaşar Ozyigit, Esra Ucar, **Begum Tutuncu**. "Breeding Of Wild Marjoram (*Origanum Majorana* L.) For Essential Oil Production", 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Munster, Germany, 1-5 Sept. 2013, vol.13, pp.1275-1275.
- 6) Yaşar Ozyigit, İnanç İndibi, Esra Uçar, **Begüm Tütüncü**, Kenan Turgut. "Determination Of Some Traits In Cultivated *Melissa officinalis* Subsp. *Altissima*.", 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Munster, Germany, 1-5 Sept. 2013, pp.1275-1275.
- 7) Kenan Turgut, Yaşar Ozyigit, Esra Uçar, **Begüm Tütüncü**. "Cultivation Studies Of *Stevia Rebaudiana* Bertoni In Turkey", 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Munster, Germany, 1-5 Sept. 2013, pp.1275-1275.
- 8) Kenan Turgut, **Begum Tutuncu**, Esra Ucar, Yaşar Ozyigit., "Chemical variations in open pollinated *Stevia Rebaudiana* Plants in the Mediterranean Region of Turkey", 6th World Congress on Stevia, Stevia Tasteful 2014:The Subtle Balance, Berlin, Germany,19-20 June, pp.28-28.
- 9) **Begum Tutuncu**, Yaşar Ozyigit, Esra Ucar, Kenan Turgut."Variations in Essential Oil of Selected *Origanum dubium* Boiss Genotypes", 45th International Symposium on Essential Oils, Istanbul, Turkey,7-10 Sept., 2014 pp.
- 10) Kenan Turgut, **Begum Tutuncu**, Esra Ucar, Yaşar Ozyigit."Chemical Composition of Essential Oils of Cultivated *Melissa officinalis* subsp. *altissima* "45th International Symposium on Essential Oils, Istanbul, Turkey,7-10 Sept.,2014 pp.
- 11) Kenan Turgut, Esra Ucar, **Begum Tutuncu**, Yaşar Ozyigit. "Stevia Rebaudiana Bertoni Could be an Alternative Crop in the Mediterranean Region of Turkey" 8th Stevia Symposium, Bonn, Germany, 27-28 Jan.,2015 pp.
- 12) Kenan Turgut, **Begum Tutuncu**, Yasar Ozyigit, Esra Ucar."Selected *Origanum dubium* Boiss Genotypes With High Essential Oil Yields and Carvacrol Rates" 8th Brazilian Symposium on Essential Oils (SBOE) – International Symposium on Essential Oils, Rio De Janeiro, Brasil, 10-13 Nov.,2015 pp.
- 13) Yaşar Ozyigit, Esra Uçar, **Begum Tutuncu**, İnanç İndibi, Kenan Turgut. The Effect of Different Nitrogen Doses on Yield and Some Yield Components of *Melissa officinalis* subsp. *L. Altissima* (*Sibth. et Smith*) Arcang), Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi, cilt3, ss.139-144, 2016.

- 14) Kenan Turgut, **Begüm Tütüncü**, Esra Uçar, Yasar Özyiğit, The Chemical Composition of Essential Oils of *Melissa officinalis* subsp. *altissima* from Turkey. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, cilt 11, ss.141-145, 2016.
- 15) Kenan Turgut, Yaşar Özyiğit, **Begüm Tütüncü**, Esra Uçar Sözmen. Agronomic and chemical performance of selected *Origanum dubium* Boiss. clones for industrial use. Turkish Journal of Agriculture and Forestry, vol 41, pp.272-277,2017.
- 16) Kenan Turgut, **Begüm Tütüncü**. Effect of Different Harvest Times on Stevioside and Rebaudioside A of *Stevia rebaudiana*,9th Stevia Symposium, September 2016 , Goteborg, İsveç.
- 17) Kenan Turgut, Tansu Uskutoğlu, **Begüm Tütüncü**.Anther Culture of *Stevia rebaudiana* Bertoni for Double-Haploid Technology, 9th Stevia Symposium, September 2016, Goteborg, İsveç.
- 18) Kenan Turgut, **Begüm Tütüncü**, Yaşar Özyiğit, Esra Uçar Sözmen. P 24: Clone Selection for High Quality Types of Oregano (*Origanum dubium* Boiss.). 6th International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants (BREEDMAP 6),Quedlinburg, June 19-23 2016, Almanya.
- 19) Kenan Turgut, Begüm Tütüncü, Hüseyin Basım, Ali Turgut. Seasonal variation in essential oil composition of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) under Mediterranean climate condition, International Symposium on Advances in Lamiaceae Science, 26-29 Nisan 2017, Antalya, Türkiye.
- 20) **Begüm Tütüncü**, Kenan Turgut. The Relationship between morphologic and agonomic characters of *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves.Proceedings of the10th Stevia Symposium 2017, Pisa, Italy, 13-15 Sept.,2017, pp.99
- 21) Kenan Turgut, **Begüm Tütüncü**.Sustainable High Frequency Micropropagation of *Stevia rebaudiana*.Proceedings of the10th Stevia Symposium 2017, Pisa, Italy, 13-15 Sept.,2017, pp.100-101.
- 22) Gülçin Ece Aslan, Ahmet Kurunç, Ahmet Tezcan, Cihan Karaca, Kenan Turgut, **Begüm Tütüncü**, Hazel Ekizoğlu. Farklı Tuzluluk Düzeyine Sahip Sulama Sularının Şeker Otunda (*Stevia rebaudiana*) Bitki Gelişim ve Verim Parametrelerine Etkisi.2.ULUSAL BİYOSİSTEM MÜHENDİSLİĞİ KONGESİ,29 Haziran-1 Temmuz 2017,Tokat, Türkiye.
- 23) G. Ece Aslan ,Ahmet Kurunç , Kenan Turgut , Harun Kaman , Cihan Karaca , **Begüm Tütüncü** , Hazel Ekizoğlu , Mehmet Can Karakaş.Effects of different irrigation regimes on quality parameters of *Stevia Rebaudiana* Bertoni. MESMAP-3 April 13th - 16th, 2017 / Girne-Turkish Republic of Northern Cyprus.

Ulusal Bildiriler

- 1) **Begüm Tütüncü**, Aslı Kırıkbakan and Alaattin ŞEN Characterization of Aniline 4-Hydroxylase Activity in Hamster Liver Microsomes 18 th National Biochemistry Congress (2004) Trabzon 13-19 Mayıs.
- 2) Kenan Turgut, **Begüm Tütüncü**, Yaşar Özyiğit, Esra Uçar., " Origanum dubium Boiss. Seleksiyon İslahında Geliştirilen Klonların Uçucu Yağ Verimleri ve Carvacrol Oranlarındaki Değişimler " II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Yalova, Türkiye, 23-25 Eylül., 2014 pp.
- 3) Kenan Turgut, Esra Uçar, **Begüm Tütüncü**, Yaşar Özyiğit. Antalya Koşullarında Şeker Otu (Stevia rebaudiana Bertoni) Yetiştirme Olanaklarının Araştırılması. II. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Sempozyumu, Yalova, Türkiye, 23-25 Eylül., 2014 syf:103-107.

Katıldığı Araştırma Projeleri :

- 1-“Sülfıt Oksidaz Yetersizliğinin Ksenobiyotik Metabolizması Üzerine Etkileri” Sen A., Tütüncü B.; TUBİTAK HD Projesi 106Y244. Yardımcı Araştırmacı, 2006-2007.
- 2-“Sülfıt Oksidaz Yetersizliğinin İlaçları Metabolize Eden Enzimler Üzerine Etkileri” PAÜ Bilimsel Arastırma Projesi, PAÜBAP-2006FBE002, Yardımcı Araştırmacı, 2007.
- 3-Antalya Florasında Yetişen Beyaz Kekikte (Origanum majorana L.) Yüksek Verim ve Kalite Tiplerin Seleksiyonu, TÜBİTAK 110O702 (2011-2015)
- 4-Şekerotu (Stevia rebaudiana) bitkisinde yüksek kalitede yaprak üretimi için çeşit ıslahı ve sürdürülebilir bir in vitro çoğaltma yönteminin optimizasyonu, SAN-TEZ 0862.STZ.2015 (2015-2017)