



T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ÇANAKKALE KOŞULLARINDA YETİŞTİRİLEN *Stevia rebaudiana*
BİTKİSİNİN BAZI BİTKİSEL ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ VE
MOLEKÜLER TANIMLANMASI**

Gölnur KARAOĞLU

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Zootečni Anabilim Dalı

ÇANAKKALE

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇANAKKALE KOŞULLARINDA YETİŞTİRİLEN *Stevia rebaudiana*
BİTKİSİNİN BAZI BİTKİSEL ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ VE
MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Gölnur KARAOĞLU

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Tezin Sunulduğu Tarih: 20/08/2019

Tez Danışmanı:

Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

ÇANAKKALE

Gölnur KARAOĞLU tarafından Prof. Dr. İskender TİRYAKİ yönetiminde hazırlanan ve 20/08/2019 tarihinde aşğıdaki jüri karşısında sunulan “Çanakkale Koşullarında Yetiştirilen *Stevia rebaudiana* Bitkisinin Bazı Bitkisel Özelliklerin Belirlenmesi Ve Moleküler Tanımlanması” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

.....

Başkan

Prof. Dr. Metin TUNA

.....

Üye

Doç. Dr. Şemun TAYYAR

.....

Üye

Prof. Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Gülnur KARAOĞLU

TEŞEKKÜR

Bu tezin yürütülmesi sırasında bilgi ve tecrübeleri ile yardımlarını esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. İskender TİRYAKİ' ye, jürideki katkılarından dolayı Doç. Dr. Şemun TAYYAR' a, Akım sitometri analizlerinin gerçekleştirilmesi için laboratuvarını açan ve jüri katılımı ile destek veren Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr. Metin TUNA' ya, çalışma materyalinin temin edilmesinde yardımcı olan Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü Müdürülüğüne ve bu kuruma çalışanı Ziraat Yüksek Mühendisi Ahmet TINMAZ'a, hayatımın her evresinde maddi ve manevi bana destek olan, kol kanat geren değerli aileme ve çalışmam boyunca yanımda olan Tolga ÖZAK' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Gülnur KARAOĞLU
Çanakkale, Ağustos 2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
C	Santigrat derece
cm	Santimetre
da	Dekar
kg	Kilogram
g	Gram
m	Metre
ml	Mililitre
μl	Mikrolitre
Max.	Maksimum
Min.	Minumum
Ort.	Ortalama
P ₂ O ₅	Fosfor
pH	Toprak reaksiyonu
EGF	En küçük güvenilir fark
DNA	Deoksiribonükleik asit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
<i>T_m</i>	Erime sıcaklığı
<i>T_a</i>	Bağlanma sıcaklığı
EtBr	Ethidium bromide

ÖZET

ÇANAKKALE KOŞULLARINDA YETİŞTİRİLEN *Stevia rebaudiana* BİTKİSİNİN BAZI BİTKİSEL ÖZELLİKLERİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER TANIMLANMASI

Gülnur KARAOĞLU

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi

Danışman : Prof. Dr. İskender TİRYAKİ

20/08/2019, 51

Bu çalışma Adana, Antalya, Bilecik ve Samsun kökenli şeker otu (*Stevia rebaudiana*) genotiplerinin Çanakkale şartlarındaki bazı agronomik özelliklerini belirlemek ve genotiplerin moleküler tanımlanmasını yapmak amacıyla yürütülmüştür. Çalışma amacıyla temin edilen bitki fideleri 3 tekerrürlü olacak şekilde tesadüf blokları deneme planına göre Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Dardanos Araştırma ve Uygulama İstasyonunda önceden hazırlanmış tarlaya 13 Mayıs 2016 tarihinde dikilmiştir. Çalışmada bitki boyu (cm), anadal sayısı (adet/bitki), yan dal sayısı (adet/bitki), bitki başına yaş ve kuru ağırlıkları (g/bitki) belirlenmiştir. Genotiplerin moleküler olarak tanımlanmalarında bitkilerde tuz stresine tolerans ile ilişkili oldukları bilinen 8 adet lokus spesifik DNA markörü kullanılarak genotipler arası genetik ilişki incelenmiş ve akım sitometri yöntemi ile çekirdek DNA içerikleri (genom hacmi) belirlenmiştir. Şeker otu bitkisinde daha önce test edilmemiş olan 8 adet lokus spesifik DNA markörü ile toplamda 23 bant elde edilmiş ve bantların 17' sinin polimorfik olduğu belirlenmiştir. Markör başına elde edilen ortalama bant sayısı ile ortalama polimorfizm bant sayısı sırasıyla 3,8 ve 2,8 olarak tespit edilmiştir. Markörlere ait ortalama polimorfizm oranı % 74,16 olurken en yüksek ve en düşük polimorfizm bilgi içerikleri (PIC) sırasıyla *AtNHX1*, *MtActin* (0,56) ve *P5CS* (0,12) markörlerden elde edilmiştir. UPGMA yöntemine göre oluşturulan dendrogramda Adana ve Bilecik genotipleri genetik olarak birbirine en yakın iki genotip olurken Samsun genotipi diğerlerinden ayrılmıştır. Akım sitometri kullanılarak elde edilen çekirdek DNA analiz verilerine göre şeker otu genotiplerinin 2C çekirdek DNA içeriklerine ait değerlerin 1,52 ile 1,67 pg arasında değiştiği gözlenmiş ve

analiz edilen tüm genotiplere ait değerler kullanılarak şeker otu için ortalama 2C ekirdek DNA içeriği 1,62 pg olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar, Çanakkale koşullarında yapılan tek yıllık agronomik çalışmanın daha fazla sayıda bitki genotipi kullanılarak tekrar edilmesi gerektiğini, tuz stresi ile ilişkili lokus spesifik DNA markörlerinin şeker otu bitkisinin DNA parmak izlerinin çıkarılması ve genetik ilişkilerin ortaya konması amacıyla başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir. Sonuçlar aynı zamanda çalışmada kullanılan genotiplere ait ekirdek DNA miktarları bakımından önemli bir farkın olmadığını göstermiştir.

Anahtar sözcükler: şeker Otu, Tuz Stresi, ekirdek DNA İeriği, Markör, Polimorfizm.

ABSTRACT

DETERMINATION of SOME PLANT CHARACTERISTICS and MOLECULAR IDENTIFICATION of *Stevia rebaudiana* PLANT GROWN in CANAKKALE

Glnur KARAOGLU

Çanakkale Onsekiz Mart University

Faculty of Agriculture

Master of Science Thesis in Agricultural Biotechnology

Advisor : Prof. Dr. İskender TIRYAKI

20/08/2019, 51

This study was carried to determine some agronomic features and molecular characterizations of sugar leaf genotypes (*Stevia rebaudiana*) sourced from Adana, Antalya, Bilecik and Samsun regions under Canakkale growth conditions. The seedlings which were specifically provided for this study were planted by hand in a pre-prepared field of Canakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Agriculture, Dardanos Research and Application Station in a completely randomized block design with 3 replications on May 13, 2016. The length of the plant (cm), number of major and minor branches per plant, fresh and dry weights of herba (g/plant) have been evaluated. To make molecular characterization, 8 locus specific DNA markers known to be effective against salt stress in plants were used to reveal genetic relationship among genotypes and nuclear DNA contents were determined by flow cytometry. Salt related locus-specific DNA markers which have never been tested in sugar leaf plants produced a total of 23 bands, 17 of those were polymorphic. Average numbers of amplified bands and polymorphic bands were determined as 3,8 and 2,8, respectively. Average polymorphism ratio of markers was 74,16% while the highest and the lowest polymorphism information content (PIC) of markers was obtained from *AtNHX1*, *MtActin* (0,56) and *P5CS* (0,12), respectively. The dendrogram based on the UPGMA cluster analysis showed that Adana and Bilecik were genetically the closest genotypes while genotype Samsun distinctly separated from the others. The results of nuclear DNA content analysis using flow cytometry revealed that the nuclear DNA content of genotypes ranged between 1,52 and 1,67 pg, an average of 1,62

pg. The results indicated that annual agronomic study conducted under Canakkale conditions should be repeated by using more plant genotypes and salt related locus specific DNA markers can be successfully used to determine DNA fingerprints as well as to reveal genetic relationships of sugar leaf plants. The results also revealed that nuclear DNA content of genotypes used in this study was not significantly different.

Keywords: *Stevia*, Salt Stress, DNA Content, Marker, Polymorphism.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ SINAV SONUÇ FORMU	ii
İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1. Şeker Otu Bitkisinin Sistematığı	2
1.2. Geçmişten Günümüze Şeker Otu	3
1.3. Şeker Otunun Botanik Özellikleri	3
1.4. Şeker Otunun Adaptasyon İstekleri	7
1.5. Şeker Otunun Kimyasal İçeriği	8
1.6. Şeker Otunun Diğer Etkileri.....	9
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	11
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	16
3.1. Materyal	16
3.2. Yöntem.....	17
3.2.1. Arazi Çalışmaları.....	17
3.2.1.1. Deneme Alanının Toprak Yapısı	17
3.2.1.2. İklim Verileri	17
3.2.1.3. Arazi Çalışması.....	18
3.2.1.4. Kültürel Uygulamalar	19
3.2.1.4.1. Gübre Uygulanması	19
3.2.1.4.2. Deneme Alanının Sulanması Ve Yabancı Ot Mücadelesi	19
3.2.2. İncelenen Bitkisel Özellikler	21
3.2.3. Moleküler Çalışmalar	22

3.2.3.1. Materyal Örneklerinin Hazırlanması	22
3.2.3.2. DNA İzolasyonu	22
3.2.3.3. Genomik DNA' larda Konsantrasyon Eşitlenmesi	25
3.2.3.4. Araştırmada Kullanılan Gen Spesifik Markörler	25
3.2.3.5. PCR Amplifikasyonu	26
3.2.4. Akım Sitometri Analizi	29
3.2.5. Verilerin İstatiksel Analizi	32
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	33
4.1. Arazi Denemeleri	33
4.1.1 Bitki Boyu (cm)	33
4.1.2. Anadal Sayısı (adet/bitki)	34
4.1.3. Yandal Sayısı (adet/bitki)	35
4.1.4. Yaş Ağırlık (g/bitki)	36
4.1.5. Kuru Ağırlık (g/bitki)	37
4.2. Moleküler Analiz Sonuçları	37
4.2.1. Lokus Spesifik DNA Markör Analiz Sonuçları	37
4.3. Akım Sitometri Analiz Sonuçları	40
BÖLÜM 5	
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	I

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. 1. Şeker otu bitkisinin geniş ve tırtıklı yapraklarının örnek görüntüsü .	5
Şekil 1. 2. Şeker otu bitkisinin küçük ve beyaz renkli taç yapraklarının görüntüsü	6
Şekil 1. 3. Şeker otu tohumuna ait örnek görsel	7
Şekil 3. 1. Dikimde kullanılan 3-4 yapraklı şeker otu fideleri ve araziye dikilmiş fideler (a) Dikime hazır haldeki fideler, (b) araziye şaşırtılmış fidelere ait örnek görüntü	16
Şekil 3. 2. 13 Mayıs 2016 tarihinde araziye dikimi gerçekleştirilen şeker otu bitkilerine ait görüntü	19
Şekil 3. 3. Damlama sulama sistemi kurulmuş deneme alanına ait görüntü	20
Şekil 3. 4. Dikimden 45 gün sonra şeker otu fidelerine ait görünüm	20
Şekil 3. 5. 26 Ağustos 2016 tarihinde deneme alanı ve şeker otu bitkilerinin görünüşü	21
Şekil 3. 6. DNA ekstraksiyonda kullanılan temel adımlar.	23
Şekil 3. 7. Bitki doku örneklerinin homojenizasyonu için kullanılan cihaz.	23
Şekil 3. 8. Şeker otu bitkisinin DNA izolasyonunda örneklerin vortekslenmesi (a) ve ekstraksiyon sonrası elde edilen genomik DNA' lara ait genel görüntü (b)	25
Şekil 3. 9. Konsantrasyon işlemi için genomik DNA' ların elektroforezde koşturulması (a) ve jelde 1-4 sırasıyla Adana, Antalya, Bilecik ve Samsun genotiplerine ait genomik DNA.	25
Şekil 3. 10. Çalışmada kullanılan Veriti (applied Biosystem) Termal Cycler ve PCR döngüleri	27
Şekil 3. 11. %2' lik agaroz jele örneklerin yüklenmesi için tarakların yerleştirilmesi.	28
Şekil 3. 12. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve elektroforezi (a) PCR ürünlerinin %2' lik jele yüklenmesine ait görüntü, (b) Elektroforezde kullanılan güç kaynağı ve sabit akıma ait (70 volt) görüntü.	28
Şekil 3. 13. Stevia rebaudiana' nın akım analizinde kullanılacak standartın belirlenmesi sırasında domates ve şeker otu bitkilerine ait histogram görüntüsü.	29
Şekil 3. 14. Akım sitometri analizi için doku örneklerinin hazırlanması (a) Standart bitki (S.lycopersicum) ve şeker otu bitkisi (S. rebaudiana), (b) Örneklerin izolasyon buffer ile muamelesi , (c) Örneklerin Cell Trics filtre ile süzülerek tüp içerisine aktarılması (d) Tüpe aktarılan örneklerin inkubasyon sonrası akım sitometri cihazına yerleştirilmesi.	31
Şekil 4. 1. Çalışmada kullanılan lokus spesifik SOS1 ve SOS2 DNA markörlerine ait jel görüntüsü: 1- Adana, 2- Samsun, 3- Antalya, 4- Bilecik.	38
Şekil 4. 2. Çalışmada kullanılan lokus spesifik MtP5CS, AtNHX1, MtProDH, Mt-Actin DNA markörlerine ait jel görüntüsü: 1- Adana, 2- Samsun, 3- Antalya, 4- Bilecik.	38
Şekil 4. 3. UPGMA yöntemine göre oluşturulan genetik uzaklık dendrogram.	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. 1. Şeker otu bitkisinin taksonomik sınıflandırılması (Yadav ve ark. 2011)	2
Çizelge 3. 1. Denemenin yapıldığı toprağın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	17
Çizelge 3. 2. 2016 yılı ortalamalarına ilişkin Çanakkale iline ait bazı meteorolojik parametreler.....	18
Çizelge 3. 3. Araştırmada kullanılan tuz stresi ile ilişkili lokus spesifik markörlerin adı, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları (Ta)	26
Çizelge 4. 1. Şeker otu bitkisinde bitki boyu değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları	33
Çizelge 4. 2. Bitki boyu, anadal sayısı, yandal sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık bakımından genotiplere ait LSD sonuçları.....	34
Çizelge 4. 3. Şeker otu bitkisinde anadal sayısı değerlerine ilişkin varyans analiz verileri	35
Çizelge 4. 4. Şeker otu bitkisinde yandal sayısı değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları	35
Çizelge 4. 5. Şeker otu bitkisinde yaş ağırlık değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları .	36
Çizelge 4. 6. Şeker otu bitkisinde kuru ağırlık değerlerine ilişkin varyans analiz verileri ..	37
Çizelge 4. 7. Tuz stresi ile ilişkili lokus DNA markörlerin adı, elde edilen amplifiye bant sayısı, polimorfizm oranları (%) ve PIC değerleri	39
Çizelge 4. 8. Tablo 1 Şeker otu bitkisinde çekirdek DNA içerik değerlerine ilişkin varyans verileri.	40
Çizelge 4. 9. Çalışmada kullanılan genotiplere ait çekirdek DNA miktarları	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Tıbbi ve aromatik bitkiler, hastalıklarda şifa vermek amacı ile yüzyıllar boyunca kullanılagelen, gıdalarda, kozmetik ve parfümeri sektörü başta olmak üzere kullanımı ülkeden ülkeye değişen farmakolojik etkiye sahip bitkilerdir.

Eski büyük medeniyetlerden Sümerliler başta olmak üzere Mısırlılar, Hititliler, Asurlular, Romalılar, İnkalar gibi medeniyetler hastalıkların tedavisinde şifalı otları fazlaca kullanmışlardır (Baydar, 2005). 2010 yılında yayınlanmış Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerinde yaklaşık 20.000 bitkinin tıbbi bitkiler olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Bayram ve ark., 2010). Türkiye’ nin jeolojik konumu ile iklim, toprak ve bitki çeşitliliğinin tarıma elverişli olması, tıbbi ve aromatik bitkilerin yetiştirilmesi açısından büyük öneme sahiptir.

Son yıllarda aşırı şeker tüketiminin artması ve obezite, insülin direnci, şeker, gibi, sağlığa olumsuz etkilerin ortaya çıkması sonucu insanlar bitkisel kaynaklı doğal, düşük veya sıfır kalorili tatlandırıcılara yönelmiş ve bu bitkilere ilgi artmıştır (Philippe ve ark., 2014). Son dönemlerde adını sıkça duyduğumuz, şekere alternatif olabilecek ve kullanımı gün geçtikçe artan *Stevia* (şeker otu) bitkisi, orijini Paraguay olan tıbbi ve aromatik bir bitkidir. Bitkinin farklı şekillerde kullanımı mevcuttur. *Stevia* cinsi yaklaşık olarak 150-200 türden oluşmaktadır.

Şeker otu çok yıllık bir bitki olarak subtropikal bölgelerde çalı formatında görülmektedir. Bitki Brezilya ve Paraguay arasında sınır bölge olan Monday nehrinin kaynağına yakın ve Amambay dağlık arazilerinde yabani olarak yetişmektedir. Güney Amerika’ nın kuzey bölgelerinde ise doğal olarak yetişmektedir. Ayrıca Çin, Tayvan, Tayland, Kore, Brezilya ve Malezya başta olmak üzere başka ülkelerde de yetiştiriciliği yapılmaktadır (Soejarto ve ark., 1983; Lester, 1999).

Şeker otunun Kuzey ve Orta Amerika türlerinin sistematiği Grashoff (1972) tarafından yapılmış bir çalışmada incelenmiştir. Soejarto ve ark. (1983), yaklaşık 200’ e yakın üyesi bulunan cinsin *Stevia rebaudiana* türünden şeker esansı elde etmiştir.

Stevia normalde Paraguay’ da doğal ortamlarda çok yıllık bitki olarak görülmektedir (Ramesh ve ark., 2006).

Şeker otunun Paraguay’ın dağlık bölgelerinde yaşayan Guarani Hintlilerce tatlı ot anlamına gelen ‘caâ-êhê’ olarak bilindiği belirtilmiştir (Brandle ve ark., 1998). *Stevia*’ nın şeker tadını ilk kez İsviçre’ li botanist olan Moises Santiago Bertoni (1899) bildirmiştir (Bertoni ve ark., 1899).

Bu çalışmada Türkiye' nin değişik iklim koşullarına sahip olan farklı bölgelerinden (Adana, Antalya, Bilecik, Samsun) temin edilmiş ve orijini Güney Amerika olan 4 farklı şeker otu bitkisinin Çanakkale koşullarında bitkisel özelliklerinin (bitki boyu, anadal sayısı, yandal sayısı, bitki başına taze yaş ağırlığı, bitki başına kuru yaş ağırlığı) belirlenmesi ve bazı moleküler yöntemlerle tanımlanması amaçlanmıştır.

1.1. Şeker Otu Bitkisinin Sistematigi

Şeker otu bitkisinin taksonomisi Çizelge 1.1' de gösterilmiştir. Çizelge 1.1' de gösterildiği üzere şeker otu bitkisi *Asteraceae* (Papatyagiller) familyasına ait olup çok yıllık bir bitkidir. Bu familyanın ismi görünümü yıldız şeklinde çiçekleri olan *Aster* türünden gelmektedir. *Asteraceae* familyasına ait 950 cins vardır (Lester, 1999; Soejarto ve ark., 1983).

Şeker otu cinsi içerisinde *Stevia eupatoria*, *Stevia ovata*, *Stevia plummerae* gibi yaklaşık 200 tür bulunmakla birlikte en yaygın bilinen türü *Stevia rebaudiana*' dır.

Yadav ve ark. (2011), araştırmalarına göre *Stevia* bitkisinin botanik sınıflandırılması aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Çizelge 1. 1. Şeker otu bitkisinin taksonomik sınıflandırılması (Yadav ve ark. 2011)

Taksonomik sınıflandırma	
Alem	<i>Plantae</i>
Alt alem	<i>Tracheobionta</i>
Bölüm	<i>Spermatophyta</i>
Alt bölüm	<i>Magnoliophyta</i>
Sınıf	<i>Magnoliopsida</i>
Alt sınıf	<i>Asteridae</i>
Grup	<i>Monochlamydae</i>
Takım	<i>Asterales</i>
Familya	<i>Asteraceae</i>
Alt familya	<i>Asteroideae</i>
Tribü	<i>Eupatorieae</i>
Cins	<i>Stevia</i>
Tür	<i>Rebaudiana</i>

1.2. Geçmişten Günümüze Şeker Otu

Şeker otu Brezilya ve ona sınır ülke olan Paraguay’ da endemik bir bitkidir (Felipe, 1977). Şeker otu esas Je jui Guazu’ nun yakınında San Pedra Yhu’ un bölgesine dahil Amambay’ da (Paraguay) bulunmuştur (Schmeling, 1967). Tatlandırıcı olarak yüzyıllar boyunca kullanılmıştır.

Şeker otu ilk olarak 1800’ lü yıllarda Avrupalıların dikkatini çekmiştir (Ramesh ve ark., 2006). Şeker otunun tarihçesi Machado ve Dietrich (1981) tarafından detaylı olarak ele alınmıştır.

Coğrafi bakımdan yaygın olmasına rağmen, şeker otu bitkisi özellikle Güney Amerika ve merkezi ile, Amerika Birleşik Devleti’ nin tropikal ve subtropikal bölgelerinde görülmektedir (Robinson ve King, 1977).

Şeker otu eski zamanlardan beri Paraguay halkı tarafından tatlandırıcı ve bitkisel ilaç olarak kullanılmaktadır.

İlk raporlar, 16. yüzyıl boyunca İspanyolların bu bitkiyi bildiğini göstermiştir fakat Bertoni tarafından, 1888 yılında Avrupalıların ilgisini çekmeyi başarmıştır. Bertoni 1905 yılında ise bitkinin adını *Stevia* olarak değiştirmiştir (Bertoni, 1905).

Şeker otu bitkisinin yaprakları Ka-a He-e olarak Guarani Hintlilerince biliniyor olması yanında yüzyıllar boyunca Maté (Paraguay çayı) gibi sert içeceklerde kullanılmıştır (Soejarto ve ark., 1983).

Crammer ve Ikan (1986), araştırmaları sonucu şeker otunun 1971 yılında Brezilya’ dan Japonya’ ya getirildiğini ve bitkinin potansiyelini değerlendirmek için araştırmalara başladığını bildirmiştir. Bugün Japonya’ da tatlandırıcı olarak önemli bir pazara sahip olan bu bitkinin tahıllar, çay ve alkolsüz içecekler dahil birçok gıda ürünlerinde kullanımı onaylanmıştır. Şeker otu Kuzey Doğu Paraguay’ da Rio Monday’ in asit çorak kumluklarında veya çorak kumluklarında, bataklık arazi üzerinde yaygın bir şekilde yetişmektedir. Kanada’ da, şeker otu bitkisi yabancı ortamlarından alınıp, modern tarım teknikleri ile farklı üretim ortamlarında yetiştirilmektedir.

1.3. Şeker Otunun Botanik Özellikleri

Shock (1982), yaptığı çalışmada şeker otunun başlangıçta yavaş geliştiğini bildirmiştir. İlk bir ayın ardından, uygun hava koşullarına bağlı olarak gelişme ve büyümesinde artış olduğunu tespit edilmiştir. Şeker otunun büyüme modeli 4 evrede değerlendirilmiştir. İlk evre çimlenme ikinci evre ise büyümedir. Üçüncü evre, tozlaşma

için iek tomurcuğunun oluşunu ve döllenme, dördüncü evre ise tohumun gelişmesini içermektedir.

Tohumun imlenmesi ekim zamanı ve sıcaklığa bağlıdır. 24 ° C sıcaklık tohumun çimlenmesi için optimal olarak kabul edilmektedir (Goettemoeller ve Ching, 1999). Diğer büyüme evreleri ise iklim ve toprak koşullarına bağlı olarak değişmektedir.

Bitki geniş bir kök sistemine sahiptir. Kök ipliksi, filiform ve uzun ömürlüdür (Schmeling, 1967). Bitkinin ince kökleri derin bölgelerdeki kalın kökler ile toprak yüzeyi etrafında birleşmektedir (Sunk, 1975). Toprak yüzeyindeki kısmı stevioside içermez (Vargas, 1980; Zaidan ve ark., 1980).

Yapraklar küçük, mızrak şeklinde, boyu eninden fazla, dikdörtgen, yukarıya doğru kıvrık ve tırtıklıdır (Dwivedi, 1999) (şekil 1.1). şeker otu yapraklarının kalitesi, sulama yöntemlerine, gün ışığına, havanın durumuna, sanitasyon gibi çeşitli tarımsal uygulamalara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Yapraklar ağızda tatlı ve ferahlatıcı bir etkiye sahiptir (Dwivedi, 1999).

İlk fotosentetik organları, tohumun çimlenmesine bağlı olarak iki kotiledon yaprağın oluşunu ile başlamaktadır.

şeker otu, kendine uyurşmazlık gösteren bir bitkidir (Chalapathi ve ark 1997; Miyagawa ve ark., 1986) ve sıklıkla böcek ile tozlaşma görülmektedir (Oddone, 1997).

Çiçekler soluk mor renkte ta yapraklarla birlikte küçük ve beyaz renklidir (Dwivedi, 1999) (şekil 1.2). Çiçekler hermafrodit yani hem dişi hem de erkek organlara sahiptir. Polenleri oldukça alerjen olabilmektedir. Küçük iekleri taşıyan salkım, panikulada sıralanmıştır (Goettemoeller ve Ching, 1999). Bitki, minimum 4 gerçek yaprak oluşturduktan sonra çiçeklenmeye başlayabilmektedir. Bir bitkinin çeşitli iek gelişim evrelerini tamamlaması ve tüm çiçeklerini üretmesi bir aydan daha fazla zaman almaktadır (Taiariol, 2004).



Şekil 1. 1. Şeker otu bitkisinin geniş ve tırtıklı yapraklarının örnek görüntüsü (G. Karaoğlu).



Şekil 1. 2. Şeker otu bitkisinin küçük ve beyaz renkli taç yapraklarının görüntüsü (G. Karaoğlu)

Tohumlar aken, yaklaşık 3 mm uzunluğundadır. Her aken 20 kalıcı pappus tüylere sahiptir (Şekil 1.3). Tohumun yaşayabilirliği zayıf ve oldukça değişkendir (Lester, 1999). Tohumlar çok az endosperme sahiptir ve pappus tüyü yoluyla rüzgarda dağılmaktadır. Fertil tohumlar genellikle koyu renkli iken açık renkli tohumları infertil olabilmektedir (Oddone, 1997).

Şeker otu fideleri tohum ekiminden 45-60 gün sonra tarlaya aktarımı için uygun büyüklüğe ulaşabilmektedir (Brandle ve ark., 1998).



Şekil 1.3. Şeker otu tohumuna ait örnek görsel (G. Karaoğlu)

1.4. Şeker Otunun Adaptasyon İstekleri

Şeker otunun kökeni 23-24° güney enlem (Shock, 1982) ve 54-56° doğu boylam arasında olan Paraguay' ın kuzeydoğusunun dağlık bölgelerinde olmasına rağmen dünyanın çeşitli coğrafi bölgelerinde başarılı bir şekilde yetiştirilmektedir (Alvarez, 1984; Bertonha ve ark., 1984; Monteiro, 1986). Şeker otu, çok yıllık bitki olarak Amerika' nın güney kesimleri de dahil subtropikal bölgelerde yetiştirilmektedir (Goettemoeller ve Ching, 1999).

Yapılan araştırma sonuçlarına göre bitki veriminin esasen, iklim ve çevresel faktörler tarafından yönetilen fenotip ile bitkinin genetik karakterine bağlı olduğu ortaya konulmuştur (Ermakov ve Kotechetov, 1996; Metivier ve Viana, 1979).

Stevioside üretiminde çevresel ve agronomik faktörlerin büyüme ve alışkanlığından daha fazla etkilendiği görülmektedir (Tateo ve ark., 1998). Şeker otu bitkisi için, ideal iklim -6 °C ile 43 °C, ortalama 23 °C sıcaklık ile yarı nemli subtropikal iklim olarak bildirilmiştir (Brandle ve Rosa, 1992).

Gündüz ve gece uzunluğunun etkisini, sıcaklık değişiminin stevioside seviyesi üzerindeki etkileri bakıldığında şeker otunun gün ışığına 12-16 saat ve gün uzunluğuna oldukça duyarlı olduğunu görülmektedir (Kudo ve Koga, 1977).

Gün uzunluğunun değişimi, bitkinin vejetatif büyümesi üzerinde oldukça etkili olduğu yapılan çalışmalarda saptanmıştır (Metiver ve Viana, 1979). Ayrıca gün uzunluğu bitkinin çiçeklenme süresini de etkilemektedir. Şeker otu 11 saat gün uzunluğunda 46 gün

içinde çiçeklenmenin meydana geldiği, fotoperiyod 12,5 saat olduğunda ise 96 günde çiçeklenmenin meydana geldiği rapor edilmiştir (Kudo, 1974).

Şeker otu bitkileri, doğal habitatlarında (21-22° güney enlemlerinde), Ocak ile Mart ayları arasında, kuzey yarım kürede ise Temmuz ile Eylül ayları arasında çiçek açmaktadır. Eğer şeker otu, sürekli uzun gün koşullarında (16 saatlik fotoperiyot) ve yaklaşık 25 °C' de yetiştirilirse, vejetatif aşamada kalmaktadır (Monteiro ve ark., 2001).

Sıcaklığın, çimlenme ile bitki ve sürgünlerin büyümesini, kışın hayatta kalmasını, fotosentez ve solunumu etkilediği gözlemlenmiştir. Bitkinin gelişmesi için optimal sıcaklık aralığının 15-30 °C olduğu bildirilmiştir (Sumido, 1980). Sıcaklığın doğrudan ya da gün içerisinde değişimi verimi etkilemektedir (Parsons, 2003). Şeker otunun iyi bir şekilde vejetatif büyümesini gerçekleştirebilmesi için gündüz sıcaklığının 40 °C' yi geçmemesi ve gece sıcaklığının 10 °C' nin altına düşmemesi gerekmektedir.

Gölge, şeker otu bitkisinin büyümesini ve çiçek açma oranını azaltmaktadır. Ayrıca, ışıktaki % 60' lık bir azalma, çiçek açmayı geciktirme ve bitki biyokütle üretimi ile çiçek açma oranını düşürmektedir (Slamet ve Tahardi, 1988).

1.5. Şeker Otunun Kimyasal İçeriği

Günümüzde şeker tüketiminin aşırı bir şekilde artması ve genel olarak tüketicilerin doğal ürünlere yönelmiş olması, doğal sıfır kalorili tatlandırıcılara talebin önemli ölçüde artmasına sebep olmaktadır (O'Brien, 2011). Sıfır kalorili, doğal kaynaklı tatlandırıcıların küresel talebi, tüketicilerin giderek bilinçli hale gelmesi ile son 10 yılda önemli ölçüde artmıştır. Onsekizinci yüzyılın başlarından bu yana birçok sentetik ve doğal tatlandırıcı bileşikler tespit edilmiştir. (O'Brien, 2011).

Stevioside, şeker otu bitkisinin yapraklarından izole edilen doğal bir tatlandırıcıdır. Stevioside, sakkarozdan (% 0,4 çözelti) 300 kat daha tatlıdır. İçeriğinin, çeşit ve yetiştirme koşullarına bağlı olarak değiştiği ve yaprak kuru ağırlığının % 4-20 arasında olduğu bildirilmiştir (Geuns, 2003). Stevioside, temel şeker bileşenidir.

Şeker otu bitkisinin hem özü hemde Stevioside içeriği Güney Amerika, Asya, Japonya, Çin ve Avropanın farklı ülkelerinde yıllardan beri tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Brezilya, Kore ve Japonya'da şeker otu yaprakları, Stevioside ve yüksek rafine edilmiş özleri düşük kalorili tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Mizutani ve Tanaka, 2002). Amerika Birleşik Devletinde, şeker otu yaprakları toz haline getirilmiş ve 1995 yılından beri diyetlerde besin takviyesi olarak kullanılmaktadır. 1931 yılına kadar

Stevioside izolasyonu ve şeker otunun kimyasal karakterizasyonu ile ilgili önemli bir gelişme olmamıştır (Bridel ve Lavieille, 1931a). Bu maddenin salyangoz sıvısı ile muamele edilmesi 3 mol glikoz ve 1 mol steviol, asit hidrolizi ile de izosteviol ürününü sağladığı tespit edilmiştir (Bridel ve Lavieille., 1931b). Seyreltik sülfürik asit içinde ısıtıldığında izosteviol elde edilmiştir. Daha sonraki çalışmalar yedi tatlı glikozidinin izolasyonuna yön vermiştir. Yabani şeker otu bitkilerinin yapraklarında bulunan 4 büyük glikozitler: Dulcosid, Rebaudiosid C, Rebaudiosid A ve Stevioside' dir (Brandle ve ark., 1998)

Glikozit ile ilgili yapılan araştırmalar, alkalın koşullar altında Steviolbioside üreten bir D-glucopyranose'un atıklarının bir karboksil grubuna bağlandığını ve diğer ikisinin b-glikosidik bağlantı aracılığıyla aglycone' a bağlanmış bir sophorosyl grubunun bileşenleri olduğunu göstermiştir (Yamasaki ve ark., 1976).

Şeker otu yaprakları ekstraktlarının daha fazla incelenmesi diğer şeker diterpenoid glikozitlerin izolasyonu ve tanımlanmasıyla sonuçlanmıştır (Yamasaki ve ark., 1976).

Alkalın hidroliz ile Stevioside'den ilk hazırlanan önemli şeker maddesi Stevioside ve Steviolbiosid ile birlikte metanol ekstraktından rebaudiosid A ve B' yi ilk olarak elde edilmiştir (Kohda ve ark., 1976). Daha sonra, izolasyon sırasında Rebaudioside B, Rebaudioside A' dan düzenlenen bir yapı olduğu öne sürülmüştür (Kaneda ve ark., 1977). Stevioside enzimatik ve kimyasal prosedürlerle Rebaudiosid A'ya dönüştürülmüştür (Kaneda ve ark., 1977). Hem Rebaudiosid A hem Rebaudiosid D, sadece ester işlevselliğinin farklı olduğunu gösteren alkali hidrolizi yoluyla Rebaudiosid B' ye dönüştürülebildiği saptanmıştır (Kohda ve ark., 1976).

1.6. Şeker Otunun Diğer Etkileri

Şeker otu özleri, insanlarda kalp atım hızını azalmakta ve arteriyel kan basıncını düşürmektedir (Boeckh ve Humboldt., 1981).

40-60 gün boyunca şeker otunun sulu ekstratıyla beslenen sıçanlarda hipotansiyon oluştuğu; ortalama arteriyel basınç, 40 günlük tedavi periyodu boyunca 110 mm Hg' dan 90 mm Hg' ya düştüğü bildirilmiştir (Melis, 1995).

Sıçanlarda 40-60 gün boyunca ağızdan verilen şeker otu ekstraktları, diürez ve natriürez i indüklemiş ve renal plasma akışını arttırmış, vazodilatasyon olduğunu belirtmiştir (Melis 1995; 1996). Glomerüler filtrasyon hızı değişmeden kalmıştır. Ekstrakt günde iki kez verilen 1,33 g kurutulmuş yaprak ile eş değerdir. Ortalama arteriyel basınç,

normal ve Goldblatt hipertansif sıçanlarda 30 gün boyunca 2,67 g kuru yaprağa eşdeğer ekstrat verildiğinde azalttığı belirtilmiştir (Melis, 1996).

Şeker otunun sulu ekstraktının dişi sıçanların doğurganlığını azalttığı konusunda tartışmalar bulunmaktadır (Planas ve Kuc 1968). Paraguaylı Kızılderililer tarafından sözde kontraseptif olarak kullanıldığı varsayılan miktar sıçanlara uygulanmıştır.

Sıçanlar üzerinde yapılan araştırmalarda şeker otu bitkisinin doğurganlık üzerine herhangi bir etkisi görülmemiştir (Akashi ve Yokoyama, 1975). Yapılan bir çalışmada, sıçanın yemeğine 21 gün süreyle % 0,14' lük stevioside ekstratı eklenmiş ve her iki cinsiyette üreme üzerine etkisi görülmediği saptanmıştır (Akashi, 1975).



BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Liu ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada *Arabidopsis thaliana*' da hücre içi Na^+ ve K^+ homeostaz için aşırı hassas tuz 2 (SOS2) genini pozisyonel klonlama aracılığıyla izole etmişlerdir. SOS2' nin, SNF1 kinaz mayasıninkine benzer bir N-terminal katalitik domain olan serin/ treonin tipi protein kinaz kodlaması beklenmiştir. SOS2 mutant allellerin sekans analizleri, hem N-terminal katalitik domain hem de SOS2' nin C- terminal düzenleyici bölgesinin fonksiyonel olarak gerekli olduğunu ortaya koymuştur. SOS2 transkriptin sabit durum seviyesi, kökteki tuz stresi ile düzenlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, SOS2' nin aktif bir protein kinaz olduğu, mevcut mutasyon ile SOS2 protein kinaz aktivitesinin tuz toleransı için gerekli olduğunu göstermiştir.

Asif ve ark. (2011) çalışmalarında *Agrobacterium tumefaciens* transformasyon sistemi kullanarak 35S promotörü tarafından *AtNHX1*, yer fıstığına yerleştirilmiştir. *AtNHX1* geninin stabil entegrasyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve southern blot analizi ile doğrulanmıştır. Sonuç olarak, *AtNHX1* genine sahip transgenik bitkilerin, yüksek konsantrasyondaki tuz ve su yokluğunda, yabani tip bitkilere göre daha dirençli olduğu bulunmuştur. Ayrıca, *AtNHX1* geninin aşırı ekspresyonunun, sadece tuz toleransını geliştirmekte kalmayıp, aynı zamanda kuraklık toleransının da arttırdığını belirtmişlerdir.

Carvalho ve Marchio (2011), çalışmalarında *S. rebaudiana* Ber. yapraklarında ki a- ve b- esteraz lokuslarındaki polimorfizmi tanımlamak için poliakrilamid jel elektroforezi kullanılmıştır. Est-2 ve Est-4 lokuslarından üretilen esterazların güçlü boyanmış bantlar olduğu görülmüştür. Bu lokusların her birinde, analiz edilen 428 *S. rebaudiana*' dan dört alel tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan esteraz analizi, artan yükseklik ve erken çiçeklenme gibi spesifik üniform özelliklere sahip bitki örneklerinin seçiminin, *S. rebaudiana* popülasyonlarında alleler ve a/b esteraz fenotip desenlerinin fiksasyonuna yol açabileceğini göstermiştir.

Chester ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada Hindistan'ın farklı coğrafi bölgelerinden elde ettikleri çeşitli şeker otu bitkisinde, rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) markörleri ve yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) analizi yöntemlerini kullanarak bitkilerin sahip olduğu genetik ve metabolik değişkenliği araştırmışlardır. Elde ettikleri sonuçlarda, 11 şeker otu üyesinden, Delhi ve Mohali çeşitleri RAPD ve HPTLC analizinde üstün genotip olma açısından benzerlik gösterdiği tespit

edilmiştir. Çalışmadan elde edilen bilgilerin bu tıbbi bitkinin yetiştirilmesi için stratejiler geliştirmek açısından değerli olduğunu bildirmişlerdir.

Lata ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada ISSR markörlerini kullanarak şeker otu bitkilerinde genetik analizler ile invitro çalışmalar yapmışlardır. Aksillar tomurcukları içeren nodal segmentler, % 3 sukroz, % 0,8 agar içeren MS besiyerlerine eksplant olarak kullanmışlardır. En iyi in vitro indüksiyonu (% 87), herhangi bir büyüme düzenleyicisi içermeyen, yarı kuvvetli MS ortamında elde edilmiştir. Bitki örnekleri ISSR analizi için belirli bir olgunluğa gelene kadar yetiştirme kabininde büyütülmüştür. ISSR tarafından toplam 45 bant üretilmiştir. Analiz sonucunda iki tür arasındaki kimyasal profiller ve sekonder metabolitler arasında farklılıklar görülmemiştir. Şeker otu bitkilerinin klonal kütle çoğaltılması için uygun ve uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Kırmacı ve ark. (2015), yaptıkları araştırmada prebiyotik lif içeren şeker otu ilavesinin prebiyotik dondurmaların bazı kalite özellikleri üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada şeker yerine değişik oranlarda (%0- kontrol, %25, %50, %75, %100) şeker otu kullanmışlardır. Araştırmacılar, prebiyotik lif içeren şeker otu ilavesinin dondurmaların duyuşal özelliklerini olumsuz etkilemediğini, dondurmaların fiziksel özelliklerini iyileştirdiğini ve dondurma üretiminde %50' ye kadar şeker otu kullanımının mümkün olabileceğini bildirmişlerdir.

Shen ve ark. (2015), araştırmalarında pamuğun kuraklık ve tuz toleransını arttırmak için, *Arabidopsis vacuolar Na⁺/ H⁺ antiporter* genini ifade eden transgenik pamuk bitkileri üretilmiştir. *AVP1/ AtNHX1* birlikte, aşırı ifade eden bitkilerin boyu, koza sayısı ve lif verimi, salin ve kuraklık koşulları altında *AVP1-* aşırı ifade eden, *AtNHX1-* aşırı ifade eden, transgenik olmayan ve yabani tip bitkilerden daha yüksek olduğu görülmüştür. *AVP1/ AtNHX1* ile birlikte aşırı eksprese eden pamuk bitkileri, düşük sulama koşullarında % 24 daha yüksek elyaf verimi ve kuru olan koşullarında, tarladaki yabani tip pamuk ile karşılaştırıldığında % 35 daha yüksek elyaf verimi ürettiği tespit edilmiştir.

Uçar ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada *S. rebaudiana*' ya uygulanan farklı azot dozlarının (0,50, 100, 150 ve 200 N kg ha⁻¹) makro/ mikro besin içeriği, kuru madde oranı ve yapraklardaki klorofil miktarını araştırmışlardır. Bitkilerin çiçeklenme başlangıcı, klorofil miktarları, klorofil metre yardımıyla her yapraktan üç okuma ile belirlenmiştir. Hasat sonrası makro ve mikro besin elementleri incelenmiştir. Sonuç olarak, en yüksek klorofil miktarı 200 kg ha⁻¹ azot uygulaması altında belirlenmiştir. En düşük klorofil ve azot miktarı kontrol grubunda tespit edilmiştir. Aynı zamanda bitki yaprak klorofil içeriği

ile azot miktarı arasında korelasyon belirlenmiştir. Artan yeşil kısım ile klorofil miktarında doğrusal bir artış gözlemlenmiştir.

Zaman ve Chowdhvy (2015) yaptıkları çalışmada şeker otu bitkisinin Bangladeş' in kireçli olmayan ve asit topraklarında daha iyi yetiştirdiklerini rapor etmişlerdir. Yapraklardaki biyokütle verimi kalkerli olmayan topraklarda % 90,11 olarak belirlenmiştir. Bitki boyu, dal ve yaprak sayısı, yaprak alanı, kuru ağırlığı gibi parametrelerin en düşük değerlerini asit topraklarda yetişen bitki örneklerinden tespit etmişlerdir.

Bharti ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, buğday bitkileri üzerinde PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria) aşılınmış bitkilerle, aşılınmamış kontrol bitkilerine kıyasla tuz stresi kaynaklı bir gen olan *TaST*' ın gelişmiş ifadesi gözlemlenmiştir. SOS yolu ile ilgili genlerin ekspresyonu (*SOS1* ve *SOS4*) PGPR uygulanmış buğday filizlerinde ve kök sistemlerinde modüle edilmiştir. Çalışmanın sonucunda, gen ekspresyonu ve PGPR aşılınmış buğday bitkilerinde daha yüksek prolin içeriği, tuzluluk stresine toleransın artmasına katkıda bulunduğu gözlemlenmiştir.

Gedik ve Tansı (2016) Çukurova bölgesinde şeker otu ile ilgili yetiştirme çalışmaları yapmış ve şeker otu ile ilgili çeşitli parametreleri araştırmışlardır. Araştırmada, 2015 ve 2016 yıllarına ait 3 ve 4 yaşındaki bitkilerde 30 x 60, 45 x 60, 60 x 60 cm dikim sıklığından pozitif veriler elde etmişlerdir. En yüksek yaprak verimi (268 kg da⁻¹) 3. yılda 45 x 60 cm dikim sıklığından elde edilmiştir.

Wei ve ark. (2016), çalışmalarında abiyotik stres altındaki bitkilerde prolin birikimlerinin stres toleransına olan etkilerini araştırmışlardır. Bu amaçla *LrP5CS1*, *LrP5CS2* ve *LrP5CS3* içeren üç *P5CS* geni *Lilium regale* den izole edilmiştir. *P5CS* genlerinin ekspresyonu transgenik Arabidopsis üzerinde ozmotik, kuraklık ve tuz toleransı oluşturmuştur. Tuz stresi altında, *LrP5CS2* hatları diğerlerinden daha az prolin biriktirmiştir. *LrP5CS1* hatlarının kökleri, kök uzamasında daha iyi yanıt vermiştir ve *LrP5CS3* hatlarının kökleri ozmotik stres koşulları altında diğerlerinden daha iyi uzama göstermiştir. Sonuçlara bakıldığında üç *P5CS* geninin, prolin birikiminde ve abiyotik stres toleransında sırasıyla farklı roller oynadığını göstermiştir.

Souksu (2017), yapmış olduğu çalışmada şeker otu bitkisinde azot uygulamalarının bitki besin elementi ve verim değerlerine olan etkilerini incelemiştir. Çalışma sonucunda bitki gelişimi bakımından değişiklik gösteren azot dozlarının bitki ağırlığı açısından etkisi olduğu, bitkinin toprak üstü kısımlarında azot dozları arttıkça istatistiki olarak artışı olduğu

tespit edilmiştir. Azot dozu olarak 16 kg da⁻¹ ise şeker otu bitkisinin yetiştiriciliği yönünden uygun miktar olduğu belirlenmiştir.

Tansı ve ark. (2017), araştırmalarında şeker otu bitkisinde farklı bitki yoğunluğunun ve ontogenetik varyabilitenin bitki boyu, dal sayısı, taze ve kuru yaprak, taze ve kuru herba verimine olan etkileri incelenerek Çukurova koşullarındaki performansını incelenmiştir. En yüksek kuru yaprak verimi, çiçeklenme öncesi denemenin 2. yılında (300 kg/da) ve 30 x 60 cm bitki yoğunluğundan elde edilmiştir.

Aslan (2018), yapmış olduğu çalışmada şeker otu bitkisinin farklı sulama formları altında bitki gelişimi, bitki verimi, su tüketimi, kalite parametrelerinin tespiti ve spektrometrik yansıma verilerinin sulama tekniğinde kullanabilirliğini araştırmayı amaçlamıştır. Araştırmada 6 sulama rejimi (I120, I100, I80, I60, I40, I20) ve 2 azot fertigasyon (kontrol-sıfır azot-N0 ve önerilen azot- 10 kg/da-NI) seviyesi kullanılmıştır. En yüksek verimi I120' den elde edilmiştir. Bununla beraber, damla sulama tekniği ile yetiştirilen şeker otu bitkisinde spektrometrik ölçümlerden elde edilen verilere göre bitki gelişimi ve bitkinin su tüketimi arasındaki ilişki değerlendirilmiştir. Sonuçlar, bitki gelişimi ve verim parametreleri üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Abdulameer ve ark. (2018), şeker otu (*Stevia rebaudiana*) genotiplerinde farklı gün uzunluklarının etkisini araştırmışlardır. Sekiz şeker otu genotipini 12 saat gün ışığı ve 14 saatten fazla simüle edilmiş gün ışığı altında büyütmüşler ve bazı agronomik özelliklerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda, *S. rebaudiana*' nın agronomik performansı, kısa gün uzunluğu (< 12 saat) ortamına kıyasla uzun gün boyu (> 14 saat) ortamında önemli derecede fazla olduğu tespit edilmiştir. Güneş ışığı altındaki şeker otu bitkileri yedi hafta sonra çiçek açmaya başlarken, simüle edilmiş ışık altındaki şeker otu bitkilerinin çiçek açmadığı gözlemlenmiştir.

Mahdi ve ark. (2018), yapmış oldukları çalışmada farklı kolhisin konsantrasyonları (% 0,25, % 0,50, % 0,75, % 1,0, % 1,5, % 2,5) kullanılarak şeker otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) bitkisinde (2n=22) poliploidi indüklemiştir. Bitki boyu, yaprak uzunluğu ve genişliği, birim alandaki stoma sayısı ile bitki başına çiçeklenme sayısı gibi morfolojik ölçümler incelenmiştir. Sonucunda, yapraklardaki Stevioside yüzdesinin tetraploid bitkilerde daha fazla olduğu belirtilmiştir.

Yüksel (2019), çalışmasında şeker otu bitkisinin ekstratından yararlanılarak kek ve kurabiyelerde enerji konsantrasyonunun düşürülmesini amaçlamıştır. Araştırmada şeker otunun yaprak tozu (SYT) veya % 90 buğday nişastasası şeker ekstratı olarak kullanılmıştır. Üretilen kek ve kurabiyelerde yapısal, fiziksel ve duyusal analizler yapılmıştır. % 0, % 25,

% 50, % 75 ve % 100 oranında şeker azaltılmış ve yerine şeker otu őrünüyle birlikte diğer ilave maddelerde kullanılmıştır. Sonuęlar hem kek hem kurabiyelerde enerji değerinde dūřuř olduğunu gōstermiřtir.



BÖLÜM 3

MATERYAL VE YÖNTEM

Arazi çalışmaları Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Dardanos Araştırma ve Uygulama İstasyonunda yapılmıştır. Tezin moleküler çalışmaları ise Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitki Moleküler Genetik ve Biyoteknoloji laboratuvarında yürütülmüştür. Genotiplerin akım sitometri analizleri ise Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Bitki Genetiği ve Sitogenetiği laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Materyal

Araştırmada bitki materyali olarak kullanılan şeker otu (*Stevia rebaudiana*) fideleri Yalova Atatürk Bahçe Kültürleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir (Şekil 3.1). Gönderilen bitki genotiplerinin Adana, Antalya, Bilecik ve Samsun etiketli ve kaynaklı oldukları belirtilmiştir. Temin edilen 3-4 yapraklı fideler metot kısmında verilen arazi çalışmaları kısmında açıklandığı şekilde 13 Mayıs 2016 tarihinde dikilmiştir.



Şekil 3. 1. Dikimde kullanılan 3-4 yapraklı şeker otu fideleri ve araziye dikilmiş fideler (a) Dikime hazır haldeki fideler, (b) araziye şaşırtılmış fidelere ait örnek görüntü.

3.2. Yöntem

3.2.1. Arazi Çalışmaları

Araştırma Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dardanos Araştırma Ve Uygulama İstasyonunda 2016 yaz döneminde yapılmıştır. Deneme alanı 40°04'21"N Kuzey enlemleri ve 26°21'49"E Doğu boylamlarındadır.

3.2.1.1. Deneme Alanının Toprak Yapısı

Araştırmanın yürütüldüğü deneme alanı toprağının bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri Çizelge 3.1' de verilmiştir. Denemenin yapıldığı toprak tekstürü killi-tınlı, hafif alkali pH yapısına sahip (7,94) ve orta düzeyde kireçlidir (%12,48). Ayrıca deneme toprakları yarıyışlı Fosfor (6,49 kg/da), Potasyum (71,40 kg/da) ve düşük oranda organik madde (% 1,9) içermektedir.

Çizelge 3. 1. Denemenin yapıldığı toprağın bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri

Bulunduğu Mevki	Derinlik (cm)	İşba (%)	E.C. (Ms/cm)	pH	Kireç (%)	Organik madde (%)	Fosfor (kg/da)	Potasyum (kg/da)
Dardanos	0-20	64,9	0,57	7,94	12,48	1,9	6,49	71,40
		Killi-Tınlı	Tuzsuz	Hafif alkali	Orta kireçli	Az	Yeterli	Yeterli

3.2.1.2. İklim Verileri

Denemenin yürütüldüğü yetiştirme dönemine ait meteorolojik veriler Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3. 2. 2016 yılı ortalamalarına ilişkin Çanakkale iline ait bazı meteorolojik parametreler (Çanakkale Meteoroloji Müdürlüğü, Çanakkale, 2016)

Aylar	Sıcaklık °C			Yağış Miktarı (mm)	Aylık Ort Nisbi Nem (%)
	min	max	ort		
Ocak	-6,5	18,1	7,1	110,2	72,6
Şubat	-1,3	20,9	10,9	88,4	77,5
Mart	0,5	20,5	11,1	53,6	74
Nisan	6,6	27,6	15,6	15	67,3
Mayıs	9,2	25,9	18,2	26,8	69,7
Haziran	13,2	36,7	24,4	39,9	61,9
Temmuz	19,1	35,1	26,9	0	54,5
Ağustos	19,4	35,5	26,9	0	58,6
Eylül	11,5	32	22,5	1,8	59,6
Ekim	6	28,1	17,1	8,6	65,5
Kasım	0,9	24,2	12,5	210,3	70,2
Aralık	-2,5	15,7	5,1	16,3	69,1

3.2.1.3. Arazi Çalışması

Adana, Antalya, Bilecik ve Samsun menşeli 3-4 gerçek yapraklı gelişme dönemindeki fideler, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dardanos Araştırma ve Uygulama İstasyonunda 3 tekerrürlü olarak tesadüf blokları deneme planına göre sıra üzeri 45 cm ve sıra arası 65 cm olacak şekilde 13 Mayıs 2016 tarihinde elle dikilmiştir (Şekil 3.2). Çalışmada parsel büyüklüğü 5,265 m² (1,95 x 2,7 m) olarak hesaplanmıştır. Her parselde toplam 28 bitki (7 bitki içeren 4 sıra) olacak şekilde dikim yapılmıştır. Blok ve parsel aralarında 1 m' lik aralık bırakılmıştır.



Şekil 3. 2. 13 Mayıs 2016 tarihinde araziye dikimi gerçekleştirilen şeker otu bitkilerine ait görüntü

3.2.1.4. Kültürel Uygulamalar

3.2.1.4.1. Gübre Uygulanması

Araştırmada dikimden hemen sonra 17 Mayıs 2016 tarihinde parsel başına % 33' lük saf azot içeren 13,86 gr amonyum nitrat gübresi verilmiştir.

3.2.1.4.2. Deneme Alanının Sulanması Ve Yabancı Ot Mücadelesi

Dikimden sonraki aşamada deneme alanına damla sulama sistemi kurulmuş ve ihtiyaç duyuldukça tüm parsellere eşit miktarda su verilecek şekilde sulama işlemi yapılmıştır (Şekil 3.3- 3.5). Çalışmada yabancı ot mücadelesi el ve çapa ile gerektiği zamanlarda yapılmıştır.



Şekil 3. 3. Damlama sulama sistemi kurulmuş deneme alanına ait görüntü.



Şekil 3. 4. Dikimden 45 gün sonra şeker otu fidelerine ait görünüm



Şekil 3. 5. 26 Ağustos 2016 tarihinde deneme alanı ve şeker otu bitkilerinin görünüşü (G. Karaoğlu)

3.2.2. İncelenen Bitkisel Özellikler

Ölçüm ve gözlem işlemleri parsel başlarındaki birer bitki çıkartıldıktan sonra parselin orta iki sırasında bulunan 10 bitki arasından tesadüfen seçilmiş 6 bitki üzerinde aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır.

1. Bitki boyu (cm): Toprak yüzeyinden bitkinin en uç noktasına kadar olan yükseklik cm olarak ölçülmüş ve ortalamaları alınarak kaydedilmiştir.

2. Anadal sayısı (adet/ bitki): Biçimden önce bitkiler üzerinde oluşmuş olan dallar sayılmış ve ortalamaları alınarak adet olarak bitki başına anadal sayısı belirlenmiştir.

3. Yandal sayısı (adet/ bitki) : Biçimden önce bitkiler üzerinde meydana gelen yan dallar sayılmış ve ortalamaları alınarak adet olarak bitki başına yandal sayısı belirlenmiştir.

4. Bitki Başına Taze Yaş Ağırlığı (g/ bitki): Bitkiler toprak yüzeyinden 5 cm yukarıdan kesilip, tartıldıktan sonra, ortalamaları alınmış ve bitki başına taze yaş ağırlığı (g/bitki) hesaplanmıştır.

5. Bitki Başına Kuru Yaş Ağırlığı (g/ bitki): Taze yaş ağırlığı için hasad edilmiş olan bitki materyali sera koşullarında 12 gün boyunca kurutulup, hassas terazide tartılmış ve ortalaması alınmıştır.

3.2.3. Moleküler Çalışmalar

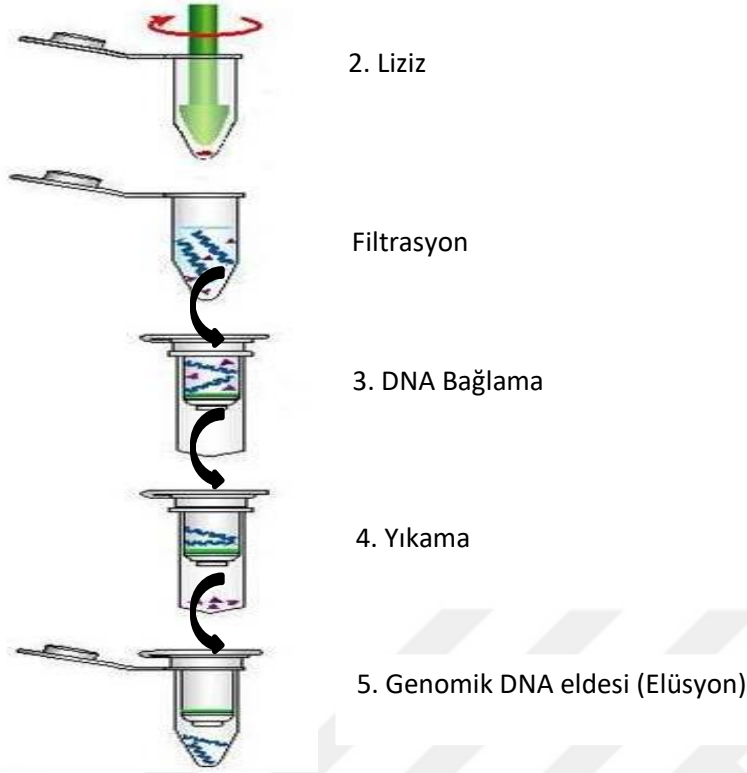
3.2.3.1. Materyal Örneklerinin Hazırlanması

Deneme alanında yetiştirmekte olan parsel başına 3-4 şeker otu bitkisine ait tesadüfen seçilen genç ve taze yapraklardan doku numuneleri alınarak kilitli poşetlere konulmuş ve etiketlenmesi yapılmıştır. Etiketlenen numuneler -80 °C’ de moleküler analizler yapılana kadar muhafaza edilmiştir.

3.2.3.2. DNA İzolasyonu

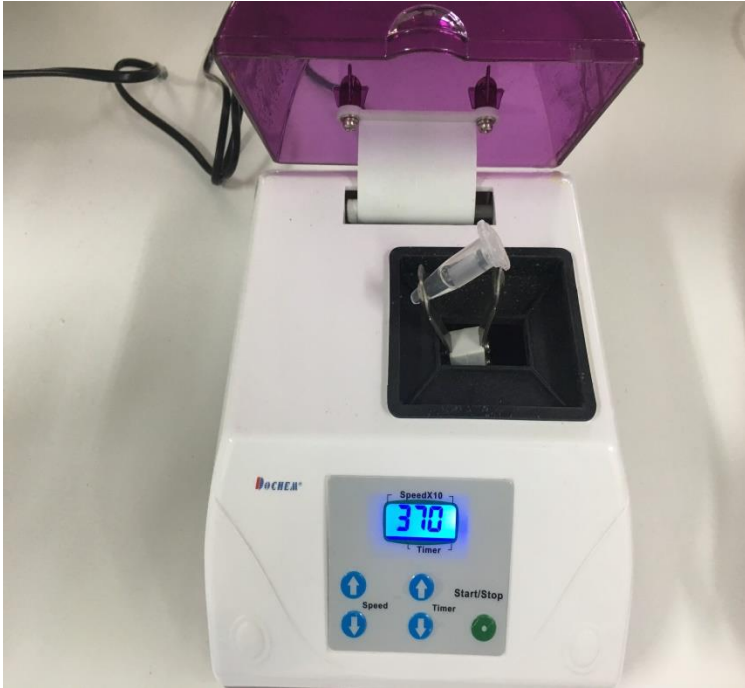
Deneme alanında yetiştirilmekte olan şeker otu fidelerinden elde edilen, her bir genotipe ait tesadüfen seçilen 5-6 genç yaprak örneğinden DNA izolasyon işlemi, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Bitki Moleküler ve Biyoteknoloji laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Bitki numunelerinden genomik DNA izolasyonu, Favorgen DNA Ekstraksiyon Kit’ i ile firmanın talimatlarına uygun olarak yapılmıştır. DNA ekstraksiyonuna ait temel adımlar Şekil 3.6’ da verilmiştir.

↓ 1. Öğütülen bitki örnekleri



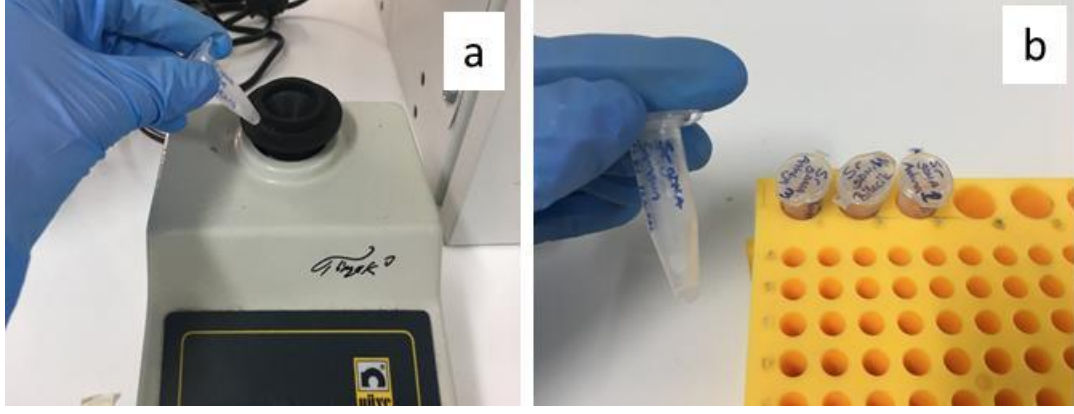
Şekil 3. 6. DNA ekstraksiyonda kullanılan temel adımlar.

1. Aşama (Doku Homojenizasyonu): 50 mg (100 mg' a kadar) -80 °C' de bekletilen dondurulmuş bitki dokusu içerisinde 500 µl FAGG1 Buffer bulunan eppendorf tüplerin içine konularak homojenizasyonu yapılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3. 7. Bitki doku örneklerinin homojenizasyonu için kullanılan cihaz.

2. Aşama (Liziz ve Filtrasyon): Örneklerin olduğu tüpe 400 µl FAPG1 tampon ve 8 µl RNase A (50 mg / ml) ilave edilmiştir ve vorteksleme yapılmıştır (Şekil 3.8). 65 °C' de 10 dakika inkübe edilmiştir. Kuluçka sırasında tüp her 5 dakikada bir ters çevrilmiştir. Aynı zamanda, 65 °C' de gereken Elution Buffer' ı (örnek başına 200 µl) önceden ısıtılmıştır. 130 µl FAPG2 tampon ilave edilmiş ve vorteksleme ile karıştırılmıştır. 5 dakika boyunca buzda inkübasyona bırakılmıştır. 2 ml' lik bir toplama tüpüne bir filtre sütunu yerleştirilmiştir. Karışım önceki adımdan filtre sütununa uygulandıktan sonra 3 dakika tam hızda (13.000 rpm) santrifüjlenmiştir. Filtre sütunu atılmıştır ve temizlenmiş süpernatanı koleksiyon tüpü içine dikkatlice yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır.
3. Aşama (DNA bağlama): Temizlenmiş lizata 1,5 hacim FAPG3 tamponu (etanol eklenir) ilave edilmiştir ve hemen vortekslenerek 5 saniye karıştırılmıştır. Örneğin, 500 µl lizat için 750µl FAPG3 tampon eklenmiştir. 2 ml' lik bir toplama tüpüne bir FAPG sütunu yerleştirilmiştir. 2 dakika tam hızda (13.000 rpm) santrifüjlenmiştir.
4. Aşama (Yıkama): Kolona 500 µl W1 tampon (etanol eklenir) ilave edilmiştir. 750 µl yıkama tamponu (etanol eklenir) sütuna ilave edilmiştir. 30 saniye boyunca tam hızda (13.000 rpm) santrifüjlenmiştir.
5. Aşama (DNA Elüsyonu): Kurutulmuş FAPG kolonunu 1,5 ml olan mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Kolon matrisinin merkezine 50-200 µl önceden ısıtılmış elution buffer eklenmiştir. Elution buffer matris tarafından absorbe olana kadar 3 dakika bekletilmiştir. Saflaştırılmış DNA' yı çıkarmak için 2 dakika boyunca tam hızda (13.000 rpm) santrifüjlenmiştir. Standart elüsyon hacmi 200µl olarak ayarlanmıştır. Elde edilen DNA' lar analiz için -20° C' de saklanmıştır (Şekil 3.8).

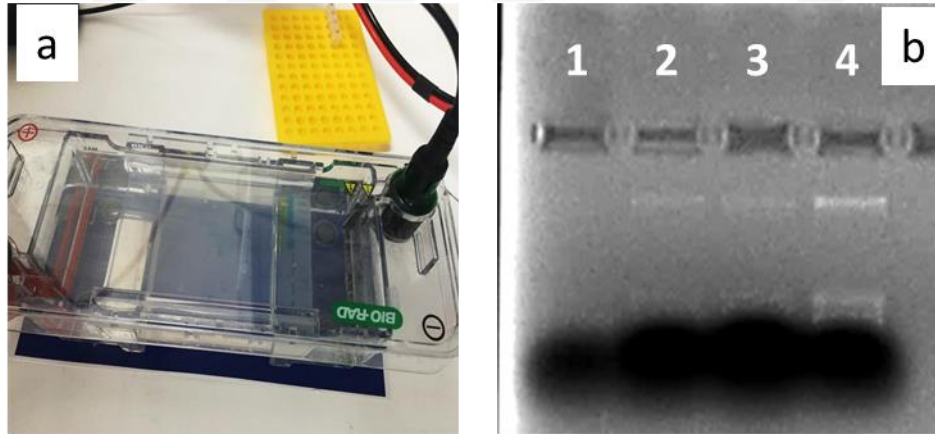


Şekil 3. 8. Şeker otu bitkisinin DNA izolasyonunda örneklerin vortekslenmesi (a) ve ekstraksiyon sonrası elde edilen genomik DNA' lara ait genel görüntü (b)

3.2.3.3. Genomik DNA' larda Konsantrasyon Eşitlenmesi

DNA konsantrasyonu gerçekleştirmek için genomik DNA' lardan her bir genotip için 5µl DNA ve 3 µl jel yükleme boyası (Bromophenol Blue) karıştırılmıştır.

Elektroforez işlemi için, %2' lik agaroz jelde 90 Voltta 30 dk koşturulmuştur (Şekil 3.9). Koşturulma işlemi sonrası görüntüleme cihazında genomik DNA' lar incelenmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3. 9. Konsantrasyon işlemi için genomik DNA' ların elektroforezde koşturulması (a) ve jelde 1-4 sırasıyla Adana, Antalya, Bilecik ve Samsun genotiplerine ait genomik DNA.

3.2.3.4. Araştırmada Kullanılan Gen Spesifik Markörler

Çalışmada kullanılan gen spesifik markörlere ait detaylı bilgiler Çizelge 3.3' de verilmiştir. Çalışmada tuz ve kuraklık stresine yönelik toplam 8 adet DNA markörü kullanılmıştır.

Çizelge 3. 3. Araştırmada kullanılan tuz stresi ile ilişkili lokus spesifik markörlerin adı, baz dizilimleri ve bağlanma sıcaklıkları (Ta)

Genin Açık Adı	Gen	Forward/ Reverse primer dizisi (5'-3')	Bağlanma sıcaklığı (Ta, °C)
Salt Overly Sensitive Gene 1	<i>SOS1</i>	Forward:GCTGACTTTCCCGTATG Reverse:TGGCACCCAGTTCTTTC	48
Salt Overly Sensitive Gene 2	<i>SOS2</i>	Forward:CCGTGGTATCTTCTGTT Reverse:CAAGGGTTAGGTGTATT	48
Salt Overly Sensitive Gene 3	<i>SOS3</i>	Forward:TCTGAGGCAAACAGGGTA Reverse:CTGGGAAATGCTAAGGTAAT	48
Dehydration Responsive Element Binding factor	<i>DREB1B</i>	Forward:GGATCCTGATCAATGAACTACATTTTC Reverse: AGCTCCCATTCTAAAAAGGAAC	50
Delta1 pyrroline -5-carboxylate synthase	<i>P5CS</i>	Forward: TCAGAGGACTACGTGTTGGA Reverse: ATGAGTACTAAGCAGAGAGG	55
<i>Medicago truncatula</i> P5CS	<i>MtP5CS</i>	Forward: GAGAGGGAACGGCCAAGTG Reverse: CAGATCCTTGTGTGTATA	52
<i>Medicago truncatula</i> Prolin DeHydrogenase	<i>MtProDH</i>	Forward: CCAACGTCCACGCTGATAAGA Reverse: ACAGGTCCTATAGCCGTTGCA	57
Sodium proton exchangers	<i>AtNHXI</i>	Forward: CAACACCCCAAAAATCCATAC Reverse: ATATCCCTTTGTTGGACCAA	52

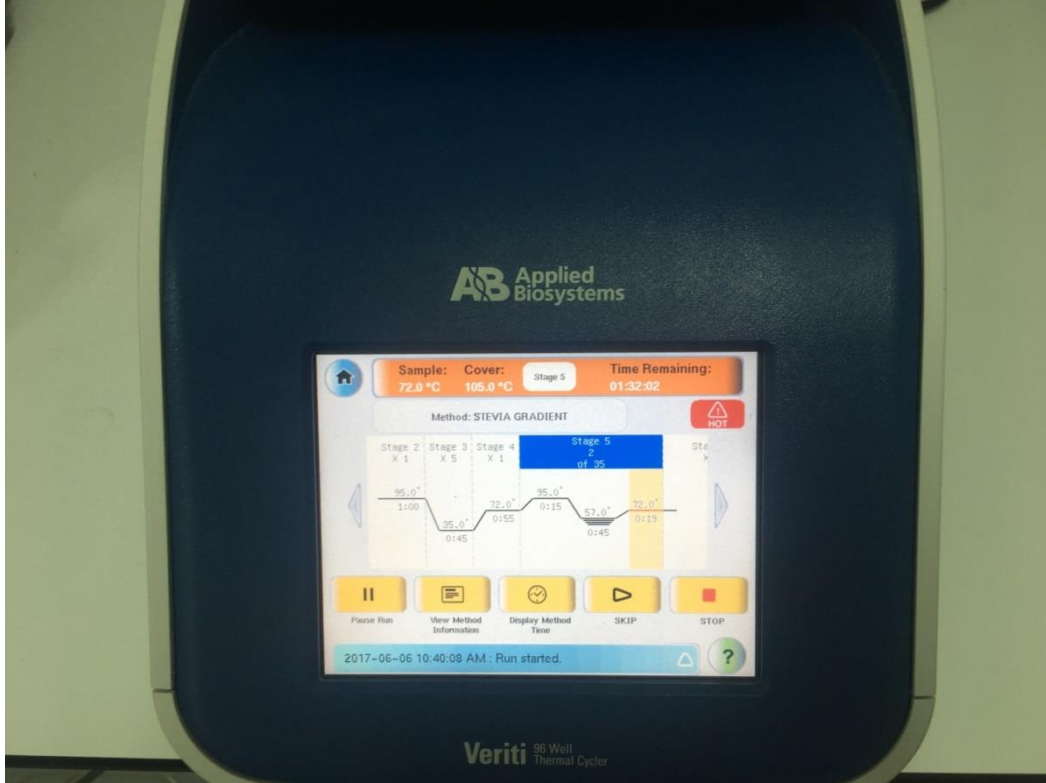
3.2.3.5. PCR Amplifikasyonu

PCR amplifikasyonunda her primer için optimizasyon çalışması yapılmış ve optimum Ta değeri belirlenerek asıl PCR işleminde kullanılmıştır (Çizelge 3. 3). PCR amplifikasyonu için 22 µl dH₂O, 10 µl 5X Buffer, 3 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 10 µM Primer, 0,25 birim Taq Polimeraz ve 1 µl genomik DNA ilave edilerek hazırlanmıştır.

PCR reaksiyonları 37,25 µl' lık PCR karışımı ile Veriti Termal Cyler (Applied Biosystem) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.10) (Cil ve Tiryaki, 2016). PCR döngüsü ön ve asıl döngü olarak iki aşamada olmuştur Ön döngü için 94 °C' de 4 dakika denatürasyon, 35 °C' de 0.45 dakika bağlanma, 72 °C' de 0.50 dakika uzama olacak şekilde

5 döngü, asıl döngü olarak ise 95 °C’ de 0.45 dakika denatürasyon, Çizelge 3.3’ de verilen primer bağlanma sıcaklıklarında 1 dakika bağlanma ve 72 °C’de 1.10 dakika uzama olacak şekilde toplam 35 döngü kullanılmıştır. PCR işlemi 72 °C’de 3 dakika ile sonlandırılmıştır.

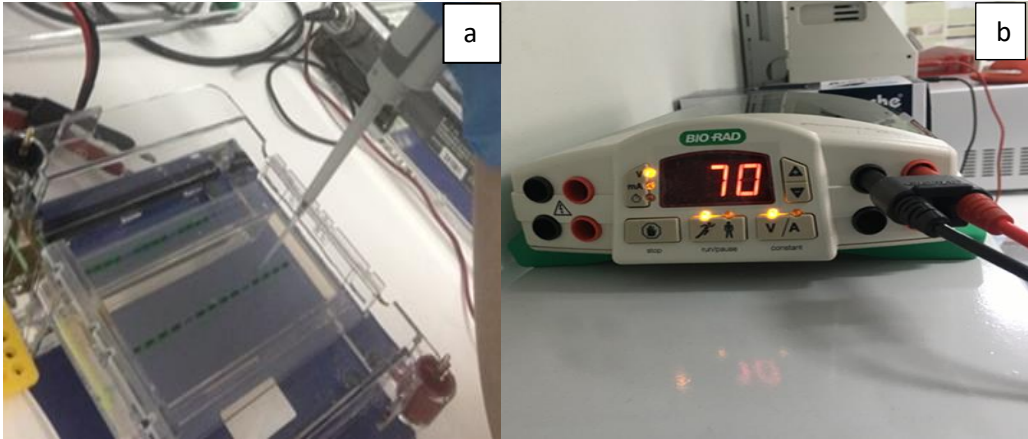
PCR ürünleri 1µl EthBr içeren, 1x TBE solüsyonundan hazırlanan %2’ lik agaroz jele yüklenmiş (Şekil 3.12) ve devamında 70 Volt sabit akımda 1 saat süre ile koşturulmuştur (Şekil 3.12).



Şekil 3. 10. Çalışmada kullanılan Veriti (applied Biosystem) Termal Cycler ve PCR döngüleri



Şekil 3. 11. %2' lik agaroz jele örneklerin yüklenmesi için tarakların yerleştirilmesi.



Şekil 3. 12. PCR ürünlerinin jele yüklenmesi ve elektroforezi (a) PCR ürünlerinin %2' lik jele yüklenmesine ait görüntü, (b) Elektroforezde kullanılan güç kaynağı ve sabit akıma ait (70 volt) görüntü.

Jel görüntüleri UV altında görüntülenerek kaydedilmiş ve agarose jeldeki DNA bantları var (1) ve yok (0) şeklinde skorlanmıştır. Benzerlik matriksi DICE göre NTSYSpc paket programı kullanılarak (Versiyon 2,1) oluşturulmuş ve devamında UPGMA (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic average) yöntemine göre kümeleme analizi gerçekleştirilmiştir (Çil ve Tiryaki, 2016).

Çalışmada yer alan her bir lokus spesifik marköre ilişkin polimorfizm bilgi içeriği (PIC, Polymorphism Information Content) aşağıda gösterilen formüle dayanarak hesaplanmıştır (Botstein ve ark. 1980).

$$PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$$

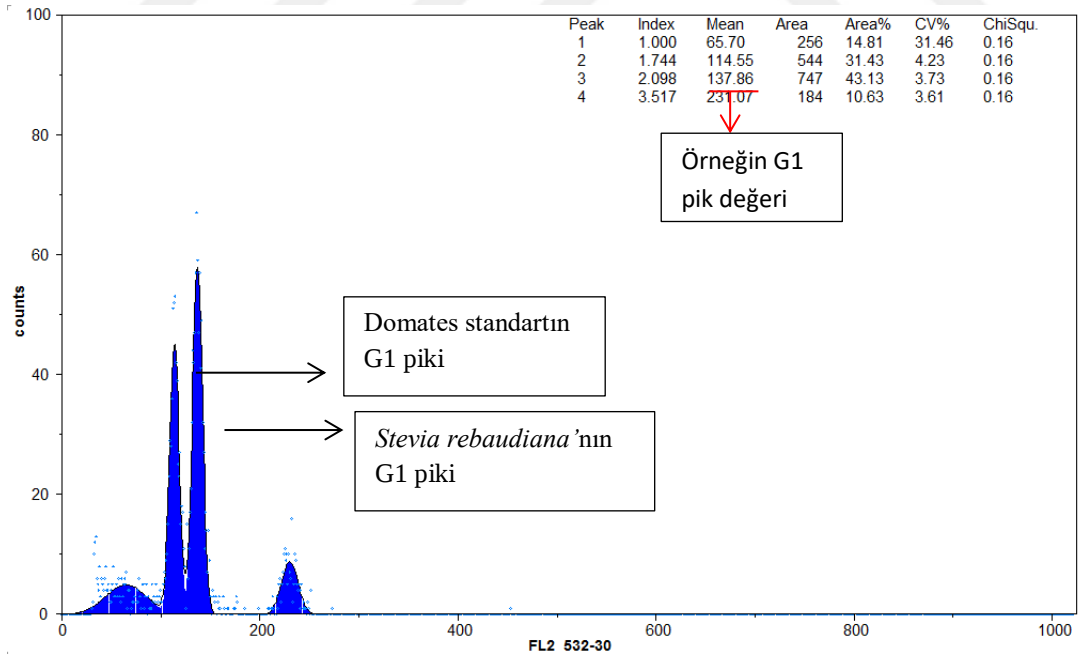
PIC= polimorfizm bilgi içeriği.....(3.1)

P_{ij}= i'nin allelin frekansı,

n= allel sayısının toplamı.

3.2.4. Akım Sitometri Analizi

Bitkinin çekirdek DNA içeriği belirlenmesi için, analizi yapılmak istenen bitkinin DNA içeriği, DNA içeriği önceden bilinen standart ile kıyaslanmaktadır (Tuna, 2016). Bu nedenle yapılan ön denemeler ile şeker otu bitkisi için en iyi standart bitki olarak domates bitkisi belirlenmiş ve çalışmada bu bitki standart olarak kullanılmıştır (Şekil 3.13). Analiz Sysmex Partec model Akım Sitometri cihazı ile yapılmıştır.



Şekil 3. 13. Stevia rebaudiana' nın akım analizinde kullanılacak standart belirlenmesi sırasında domates ve şeker otu bitkilerine ait histogram görüntüsü.

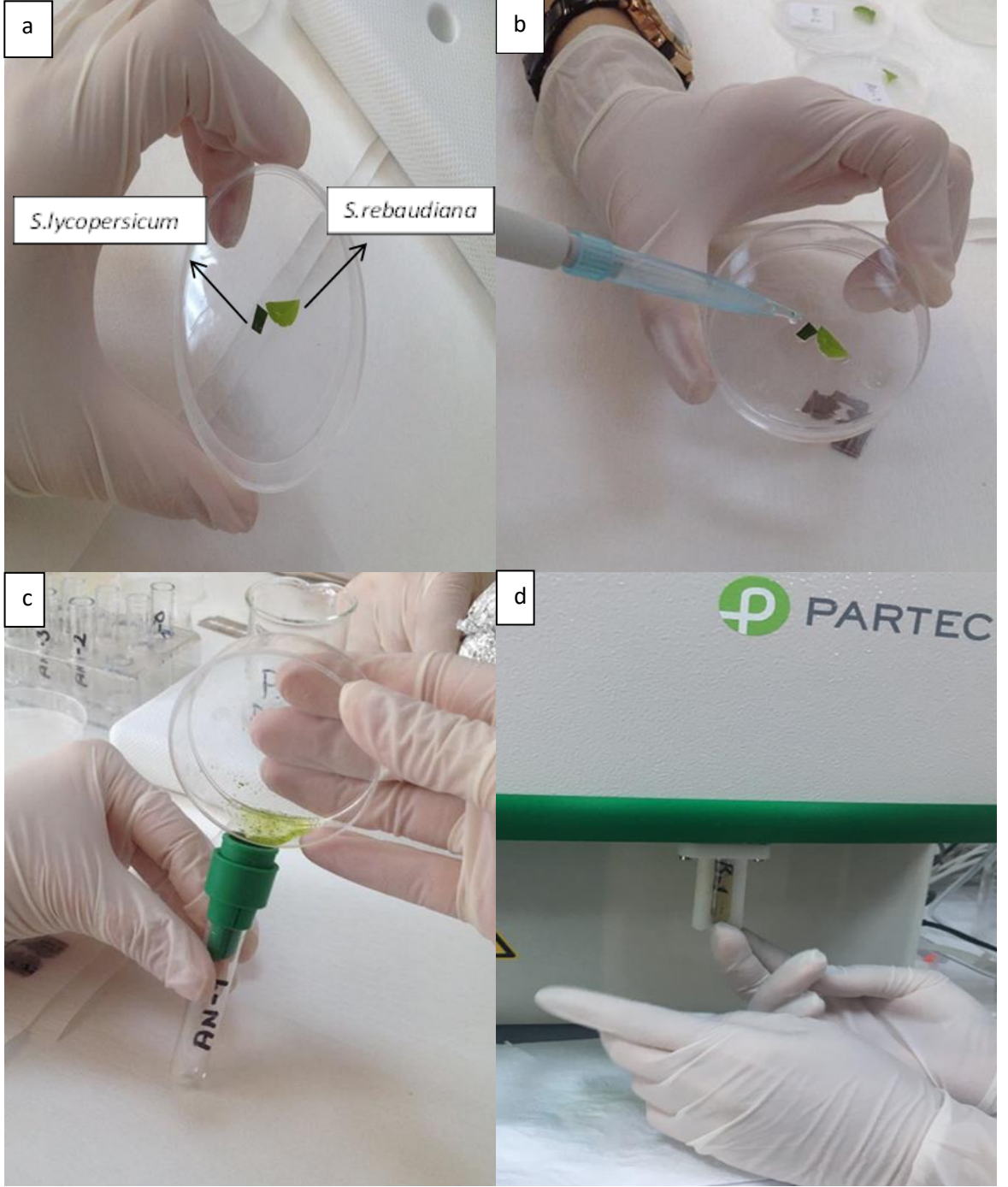
Domates standart ve *S. rebaudiana* bitkilerine ait yaprak dokularının karıştırılmasıyla hazırlanmış olan örneğin akım sitometri ile analizi sonucu bitkilere ait (domates ve şeker otu) G1 piklerinin bir birlerine göre pozisyonları Şekil 3.13' te gösterilmiştir.

Akım sitometri analizleri Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümünde Bitki Genetiği ve Sitogenetiği Laboratuvarında yapılmıştır. Yaprak dokuları kilitli naylon poşetlerde buz kaplarının bulunduğu bir kutu içerisinde nakledilmiştir. Analizler 9-10 Eylül 2017 tarihlerinde aşağıda açıklandığı şekilde yapılmıştır.

Doku örneklerinin Akım Sitometri Analizi için hazırlanması:

1. Solusyonların Hazırlanması: İzolasyon bufferi, boyama solüsyonu, propidium iodide ve RNase, kitin içerisinde bulunmaktadır. Boyama solüsyonu her örnek için; 2 ml boyama solüsyonu, 6 µl RNase ve 12 µl PI karıştırılarak kullanılmadan hemen önce hazırlanmıştır.
2. Örneğin Hazırlanması: Şeker otu ve domates (standart) bitkilerine ait taze yaprak örneklerinden sırasıyla yaklaşık 40 ve 20 mg yaprak dokusu alınmış ve petri kabına konulmuştur (Şekil 3.14a). Üzerine 500 µl izolasyon buffer eklenilmiştir (Şekil 3.14b).

Yaprak dokusu jilet yardımıyla yaklaşık 1 dakika boyunca küçük parçalara ayrılincaya kadar parçalanmıştır. Örnekler petri kabında buffer ile 10-15 saniye boyunca çalkalanarak muamele edilmiştir. Çalkandıktan sonra 30-90 saniye kadar petri kabında örnekler bekletilmiş ve Partec marka 50 µl Cell Trics filtre ile süzülerek tüpe aktarılmıştır (Şekil 3.14c). Daha önce hazırlanmış 2 ml boya solüsyonu tüp içersine ilave edildikten sonra örnekler ışıksız bir ortamda 30-60 dakika süre ile inkübe edilmiştir. Süre tamamlandıktan sonra örnekler Akım Sitometri cihazıyla analiz edilmiştir (Şekil 3.14d).



Şekil 3. 14. Akım sitometri analizi için doku örneklerinin hazırlanması (a) Standart bitki (*S.lycopersicum*) ve şeker otu bitkisi (*S. rebaudiana*), (b) Örneklerin izolasyon buffer ile muamelesi , (c) Örneklerin Cell Trics filtre ile süzülerek tüp içerisine aktarılması (d) Tüpe aktarılan örneklerin inkubasyon sonrası akım sitometri cihazına yerleştirilmesi.

Örneklerin hazırlanması için takip edilen protokol sonucunda, bitki dokularını oluşturan hücreler fiziki olarak birbirinden ayrılmış ve çekirdek hücrenin geri kalan kısımlarından ayrılmıştır. Serbest hale gelen hücre çekirdek zarında, Buffer içerisinde yer

alan kimyasal maddeler aracılığıyla delikler oluşmuştur. Propidium iodide, bu deliklerden çekirdek içerisine girerek nükleik asitlere bağlanmıştır. PI (Propidium iodide) miktarı ile çekirdekteki DNA miktarı birbiriyle orantılı olduğundan analiz sırasında örneklerin lazer ışığı önünden geçerken sahip oldukları PI miktarı ile doğru orantılı olacak şekilde floresan ışıma yapmaktadırlar. Yayılma işlemindeki floresanlar, çeşitli işlemlerden geçtikten sonra digital değerlere (sayılara) dönüşmekte ve bilgisayar ekranında histogram olarak verilmektedir (Tuna, 2016). Çekirdek DNA miktarı aşağıda verilen formül ile hesaplanmıştır (Tuna, 2016). Analiz ve hesaplamalar 3 biyolojik tekrarın ortalaması alınarak gerçekleştirilmiştir.

$$\text{Çekirdek DNA içeriği (pg)} = \frac{\text{Örneğe ait G1 pikinin değeri}}{\text{Standart G1 pikinin değeri} \times \text{Standardın DNA içeriği (pg)}} \quad (3.2)$$

3.2.5. Verilerin İstatiksel Analizi

Elde edilen verilerden bitki boyu, anadal sayısı, yandal sayısı, kuru ağırlık ve yaş ağırlık ile çekirdek DNA içerikleri için varyans analizi SAS paket programından yararlanılarak (SAS, 1997) 3 tekerrürlü olacak şekilde tesadüf blokları deneme planına göre yapılmıştır. Genotipler arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla Fisher' ın en küçük önemli fark (LSD) testi %5 seviyesinde analiz edilmiştir.

BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Arazi Denemeleri

Çanakkale koşullarında 2016 yılında yürütülen bu çalışma ile 4 farklı ilden temin edilmiş şeker otu bitkilerinde; bitki boyu, anadal sayısı, yandal sayısı, kuru ağırlık, yaş ağırlık gibi morfolojik özellikler incelenmiştir.

İncelenen özelliklere ilişkin verilerin istatistik analizi ile oluşan varyans analiz tabloları ile çoklu karşılaştırma sonuçları aşağıda sunulmuştur.

4.1.1 Bitki Boyu (cm)

Bitki boyuna ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.1' de, çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.2' de sunulmuştur. Sonuçlar, bitki boyu açısından genotipler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğunu ($P \leq 0,0097$) göstermiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 1. Şeker otu bitkisinde bitki boyu değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynaklar	Serbestlik dereceleri	Kareler ortalaması	P değerleri
Genel	11		
Blok	2	17,57	0,2325
Genotip	3	92,72	0,0097
Hata	6	9,35	

Çizelge 4. 2. Bitki boyu, anadal sayısı, yandal sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık bakımından genotiplere ait LSD sonuçları

Genotip	Bitki Boyu (cm)	Anadal Sayısı (adet/bitki)	Yandal Sayısı (adet/bitki)	Yaş Ağırlık (g/bitki)	Kuru Ağırlık (g/bitki)
ADANA	61,87 ^b	1,06 ^b	18,89	168,10 ^c	51,43
ANTALYA	59,06 ^b	1,00 ^b	14,78	245,70 ^b	64,27
BİLECİK	71,44 ^a	1,61 ^a	14,00	329,50 ^a	92,94
SAMSUN	60,78 ^b	1,11 ^b	14,89	219,40 ^{cb}	64,3
P	0,0097	0,0007	0,0796	0,0082	0,0173

*Her özellikte farklı harflerle gösterilen ortalamalar arasındaki farklar

P<0,05 seviyesinde önemlidir

Hasat sonrası bitki boyu incelendiğinde genotiplere ait bitki boyunun 59,1 cm ile 71,4 cm arasında değiştiği, tüm genotiplere ait bitki boyu ortalamasının ise 62,2 cm olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.2.). En yüksek bitki boyu 71,4 cm ile Bilecik genotipinden en kısa bitki boyu ise 59,1 cm ile Antalya genotipinden elde edilmiştir. Gedik ve Tansı (2016), Çukurova bölgesinde yapmış oldukları çalışmada 3 ve 4 yaşındaki şeker otu bitkilerinde bitki boyunu 90,3 cm olarak rapor etmiştir. Shyu ve ark. (1994) 3 farklı hasat zamanının (Mayıs, Temmuz, Eylül) şeker otu bitkisinin boyunu önemli derecede etkilediğini, ekimden geçen zamana bağlı olarak artan gün sayısına paralel olarak bitki boyununda artacağını belirtmişlerdir. Bu durum çalışmamızda elde edilen bitki boyu ile literatürde belirtilen bitki boyları arasındaki farklılıkların asıl nedeninin bitki yaşı ve bitkilerin yetiştirildikleri farklı ekolojilerden kaynaklandığına işaret etmektedir.

4.1.2. Anadal Sayısı (adet/bitki)

Anadal sayısına ilişkin varyans analiz sonuçları Çizelge 4.3' de, çoklu karşılaştırma verileri ise Çizelge 4.2' de sunulmuştur.

Sonuçlar, anadal sayısı bakımından genotipler arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar olduğunu ($P \leq 0,007$) göstermiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 3. Şeker otu bitkisinde anadal sayısı değerlerine ilişkin varyans analiz verileri

Kaynaklar	Serbestlik dereceleri	Kareler ortalaması	P değerleri
Genel	11		
Blok	2	0,0024	0,7703
Genotip	3	0,2388	0,0007
Hata	6	0,0088	

Genotiplere ait ortalama anadal sayısı 1,19 adet olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.2). En yüksek anadal sayısı 1,61 adet ile Bilecik genotipinden elde edilmiştir. En düşük anadal sayısı ise 1,00 adet ile Antalya genotipinden elde edilmiştir. Sözmen (2015)' nin araştırma bulgularında şeker otu bitkisine ait ortalama anadal sayısının 1. yıl verilerinde en yüksek 3 adet olduğunu rapor etmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında Sözmen (2015)' in çalışmasına göre çalışmamızda bitki başına ortalama anadal sayısının daha az olduğu görülmüştür. Birçok bitkide ana dal sayısının oluşmasında bitki genotipi, bitkilerin yetiştirildiği toprak ve iklim şartları ile yetiştiricilik sırasında yapılan kültürel uygulamalar gösterilebilir. Ana dal sayısının oluşmasında etken olan diğer önemli bir faktör ise ekim ya da dikim sıklığının belirlenmesinde kullanılan sıra arası ve sıra üzeri mesafelerdir.

4.1.3. Yandal Sayısı (adet/bitki)

Yandal sayısına ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.4' de, çoklu karşılaştırma sonuçları ise çizelge 4.2' de sunulmuştur. Sonuçlar, yandal sayısı bakımından genotipler arasındaki fark önemli ($P < 0,0796$) bulunmamıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4. 4. Şeker otu bitkisinde yandal sayısı değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynaklar	Serbestlik dereceleri	Kareler ortalaması	P değerleri
Genel	11		
Blok	2	4,00	0,4132
Genotip	3	14,55	0,0796
Hata	16	3,89	

Hasat sonrası yandal sayısı incelendiğinde örneklere ait genel ortalama yandal sayısı 15,63 adet/bitki olarak tespit edilmiştir. En yüksek yandal sayısı 18,89 ile Adana genotipinden en düşük yandal sayısı ise 14,00 ile Bilecik genotipinden elde edilmiştir. Karaman (2017) Ege bölgesi Bornova koşullarında, farklı lokasyonlardan topladığı şeker otu bitkilerinde yapmış olduğu çalışmada en fazla yandal sayısını 32 adet olarak

Burhaniye/Balıkesir lokasyonundan elde etmiştir. Çalışmamızda bitki başına elde edilen yan dal sayısı Karaman (2017)'e göre oldukça düşüktür. Bu durumun ana dal sayısının oluşmasına etki eden genetik, çevre, toprak, yetiştirilme şartları ile dikim sıklığından kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.1.4. Yaş Ağırlık (g/bitki)

Yaş ağırlıklara ait varyans analiz sonuçları Çizelge 4.5' de, çoklu karşılaştırma testi sonuçları ise Çizelge 4.2' de sunulmuştur. Sonuçlar, yaş ağırlık bakımından genotipler arasında istatistiksel bakımından önemli farklılıklar olduğu ($P \leq 0,0082$) görülmüştür (Çizelge 4.5).

Çizelge 4. 5. Şeker otu bitkisinde yaş ağırlık değerlerine ilişkin varyans analiz sonuçları

Kaynaklar	Serbestlik dereceleri	Kareler ortalaması	P değerleri
Genel	11		
Blok	2	8522,34	0,0302
Genotip	3	13642,09	0,0082
Hata	6	1284,19	

Hasat sonrası yaş ağırlık incelendiğinde örneklere ait genel ortalama 240,68 g/bitki bulunmuştur. En yüksek yaş ağırlık 329,50 g/bitki ile Bilecik genotipinden elde edilmiştir. En düşük yaş ağırlık ise 168,10 g/bitki ile Adana genotipinden elde edilmiştir.

Karaman (2017) yapmış olduğu çalışmada, şeker otu bitkileri arasında bitki başına düşen yaş ağırlığı bakımından en fazla yaş ağırlık ortalamasını, Balıkesir/Burhaniye lokasyonundan 297,6 g/bitki olarak elde etmiştir. Bu lokasyonu İzmir/Bayındır 281,6 g/bitki ve Bursa/Gürsu 238 g/bitki takip ederek yapılan bu çalışmaya benzer sonuçlar elde etmiştir.

Samadpourrigani (2014), Çukurova bölgesinde yapmış olduğu araştırmasında ise şeker otu bitkisinde en yüksek bitki başına düşen yaş ağırlığını 204 g/bitki olarak elde etmiştir. Bu çalışmada bitki başına elde edilen ortalama yaş ot ağırlığı literatürde bildirilen ortalama değerlere yakın olduğu görülmektedir. Ancak Bilecik genotipi ortalamadan belirgin şekilde daha yüksek yaş ot değerine sahip olduğu tespit edilmiştir.

4.1.5. Kuru Ağırlık (g/bitki)

Kuru ağırlığa ait varyans analiz verileri Çizelge 4.6’ da, çoklu karşılaştırma verileri ise Çizelge 4.2’ de sunulmuştur. Sonuçlar, kuru ağırlık bakımından genotipler arasındaki fark önemli ($P<0,0173$) bulunmamıştır (Çizelge 4.6).

Çizelge 4. 6. Şeker otu bitkisinde kuru ağırlık değerlerine ilişkin varyans analiz verileri

Kaynaklar	Serbestlik dereceleri	Kareler ortalaması	P değerleri
Genel	11		
Blok	2	584,35	0,0547
Genotip	3	924,22	0,0173
Hata	6	119,18	

Hasat sonrası kuru ağırlık incelendiğinde örneklere ait genel ortalama 68,23 g/bitki iken, en yüksek kuru ağırlık 92,94 g/bitki ile Bilecik genotipinden elde edilmiştir. En düşük kuru ağırlık ise 51,43 g/bitki ile Adana genotipinde tartılmıştır. Samadpourrigani (2014) ise şeker otu bitkisinde 45x60 ekim sıklığında kuru herba ağırlığını bulgularımıza benzer olarak 58,20 g/bitki elde ettiklerini bildirmişlerdir.

4.2. Moleküler Analiz Sonuçları

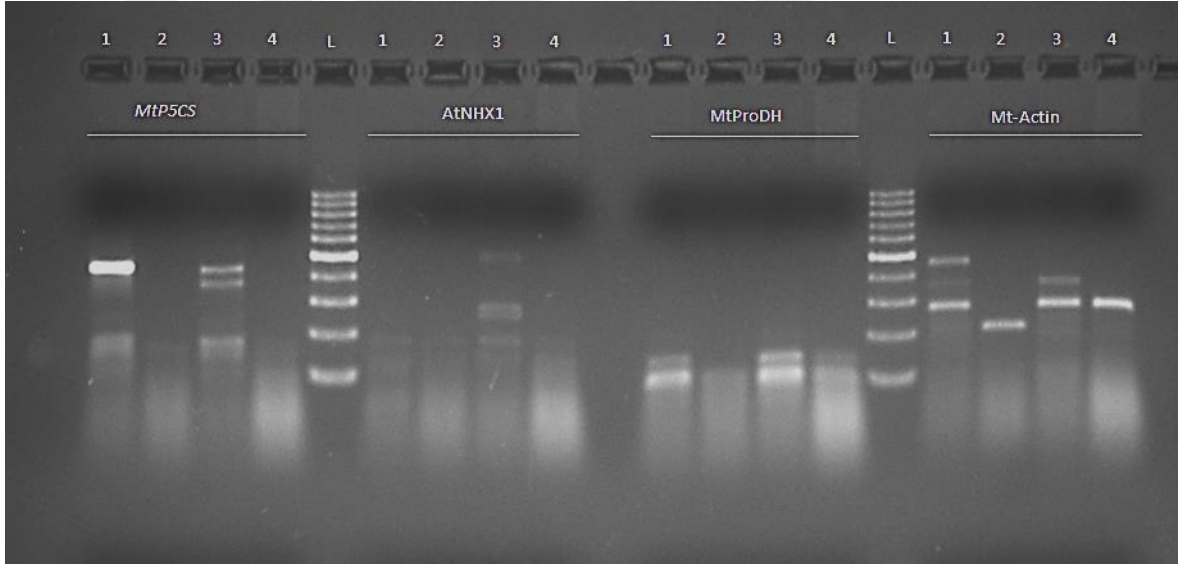
4.2.1. Lokus Spesifik DNA Markör Analiz Sonuçları

Moleküler markörler, bitki genotiplerinin belirlenmesi ve genomlar arasındaki farklılıkların kısa sürede tespit edilmesinde büyük bir kolaylık ve avantaj sağlamaktadır.

Çalışmada tuz stresi ile ilişkili lokus spesifik 8 adet DNA markörü ilk defa şeker otu bitkisinde test edilmiştir (Çizelge 4.7). Bu markörlerden *SOS3* ve *DREB1B* herhangi bir emplikon üretmemiştir. Kalan 6 markör ise PCR ürünü oluşturmuştur. İlgili markörlere ait jel görüntüleri Şekil 4.1- 4.2’ de verilmiştir.



Şekil 4. 1. Çalışmada kullanılan lokus spesifik SOS1 ve SOS2 DNA markörlerine ait jel görüntüsü: 1- Adana, 2- Samsun, 3- Antalya, 4- Bilecik.



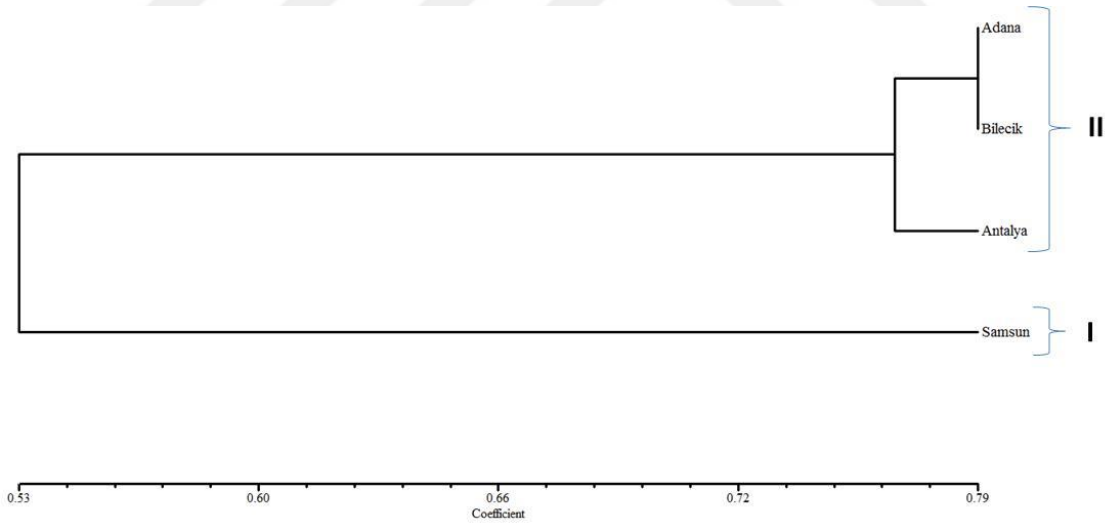
Şekil 4. 2. Çalışmada kullanılan lokus spesifik MtP5CS, AtNHX1, MtProDH, Mt-Actin DNA markörlerine ait jel görüntüsü: 1- Adana, 2- Samsun, 3- Antalya, 4- Bilecik.

Emplifiye olan ampliconların skorlanması sonucunda yapılan analiz sonuçları 6 adet markörün toplam 23 bant ürettiğini ve bunların 17 tanesinin polimorfik olduğunu göstermiştir. Markör başına ortalama 3,8 bantın üretildiği ve bunların 2,8' nin polimorfik olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.7). Lokus spesifik markörlerden *SOS2* ve *AtNHX1* markörleri 5 bant ile en çok bant üreten markör olurken *MtP5CS* genine ait markör toplam 3 bant ile en az bant üreten markör olmuştur.

Çizelge 4. 7. Tuz stresi ile ilişkili lokus DNA markörlerinin adı, elde edilen amplifiye bant sayısı, polimorfizm oranları (%) ve PIC değerleri

Markör isimleri	Amplifiye edilen bant sayısı	Polimorfik bant sayısı	Polymorfizm Oranı (%)	PIC değeri
SOS 1	4	3	75	0, 37
SOS 2	5	3	60	0, 25
AtNHX1	5	3	60	0, 56
MtProDH	2	1	50	0, 25
MtP5CS	3	3	100	0, 12
MtActin	4	4	100	0, 56
Toplam bant sayısı	23	17		
Ortalama bant sayısı	3, 8	2,8	74,16	0, 35

DICE' a göre oluşturulan benzerlik matrisi kullanılarak UPGMA yöntemine göre oluşturulan genetik uzaklık dendrogram Şekil 4.3 'de verilmiştir.



Şekil 4. 3. UPGMA yöntemine göre oluşturulan genetik uzaklık dendrogram.

UPMGA yöntemine göre yapılan analizde genotipler iki ana grup (I ve II) oluşturmuştur (Şekil 4.3).

Samsun genotipi diğer 3 genotipten ayrılarak tek başına grup I oluşturmuştur. Buna karşın II grupta Antalya genotipi diğer iki genotipten ayrılarak alt grup oluşturmuştur.

Adana ve Bilecik genotipleri genetik olarak birbirine en yakın iki genotip olarak tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar çeşit bazında tanımlanmamış ancak piyasada var olan şeker otu genotiplerinin temin edildiği araştırma kuruluşları arasında farklı amaçlarla paylaşımların yapıldığını bu nedenle Adana ve Bilecik şeker otu genotiplerinin aynı genetik tabana sahip olduğuna işaret etmektedir. Diğer taraftan aynı genotiplere ait bitkisel veriler incelendiğinde (Çizelge 4.2.) iki genotipin incelenen özellikler bakımından önemli farklılıklara sahip olduğu görülmektedir. Bu durum tek yıllık tarla verilerinin tekrar edilmesi gerektiğine işaret etmektedir.

Dendrogram sonuçları aynı zamanda genetik varyasyonun oluşturulması için Samsun genotipi ile diğer genotipler arasında yapılacak melezleme çalışmalarının yerinde olacağına işaret etmektedir.

4.3. Akım Sitometri Analiz Sonuçları

Akım Sitometri analizi ile elde edilen çekirdek DNA içeriğine ait varyans analiz verileri Çizelge 4.8’ de verilmiştir.

Çizelge 4. 8. Tablo 1 Şeker otu bitkisinde çekirdek DNA içerik değerlerine ilişkin varyans verileri.

Kaynaklar	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	P Değerleri
Genel	11		
Blok	2	0,0091	0,2910
Genotip	3	0,0142	0,1697
Hata	6	0,0060	

Varyans analiz verileri (Çizelge 4.8) şeker otu genotiplerine ait çekirdek DNA miktarları arasında istatistiksel açıdan önemli bir farkın olmadığını göstermiştir ($P < 0,1697$).

Çizelge 4.9. Çalışmada kullanılan genotiplere ait çekirdek DNA miktarları.

Genotip	cDNA miktarı (pg)
Adana	1,67
Antalya	1,66
Bilecik	1,64
Samsun	1,52
Ortalama (n=3)	1,62

Genotiplere ait çekirdek DNA miktarlarının 1,52 pg ile 1,67 pg arasındaki değiştiği, ortalama 1,62 pg olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.9). Çekirdek DNA içerik sonuçları genetik ilişki verilerini destekler nitelikte olup genotiplerin aynı ya da benzer genetik arka plandan geldiklerine işaret etmektedir. Özellikle yabancı tozlanan bitkilerde evrimsel sürece bağlı olarak daha kısa sürede oluşabilecek DNA eksilme ve ilaveleri (deletion/insertion) arttırabileceği bu durumun çalışmada kullanılan genotipler içinde geçerli olabilmesi düşünülmektedir.

BÖLÜM 5

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışma, Adana, Antalya, Bilecik, Samsun kökenli şeker otu genotiplerinin Çanakkale koşullarında bazı bitkisel parametreleri ve genotipler arasındaki farklılıkları belirlemek ve ilerde şeker otuyla ilgili yapılacak moleküler analiz çalışmalarına yardımcı olmak amacıyla yapılan ilk çalışmadır.

Şeker otu genotiplerinin genetik olarak çeşitliliğini belirlemek amacıyla bitki boyu, anadal sayısı, yandal sayısı, yaş ağırlık ve kuru ağırlık olmak üzere toplamda 5 bitkisel parametre incelenmiştir. Sonuçlar, Fisher'ın en küçük önemli fark (LSD) testine göre % 5 seviyesinde analiz edilmiştir. Buna göre bitki boyu ($P \leq 0,0097$), anadal sayısı ($P \leq 0,0007$) ve yaş ağırlık ($P \leq 0,0082$) bakımından genotipler arasında fark önemli iken, yandal ($P < 0,0796$) ve kuru ağırlık bakımından ($P < 0,0173$) genotipler arasında fark önemli bulunmamıştır.

Moleküler tanımlanması ve genotipler arası farklılığı belirlemek için kullanılan 8 adet tuz stresine ait lokus spesifik DNA belirteci, toplam 23 bant üretmiş olup bunların 17'sinin polimorfik olduğu tespit edilmiştir. Markörlere ait ortalama polimorfizm oranı % 74,16 olarak belirlenmiştir. Markör başına ortalama 3,8 adet bant üretmiş olup, polimorfik bant sayısı 2,8 adet olarak hesaplanmıştır. Markörlere ait ortalama polimorfizm bilgi içeriği (PIC) 0,35 olarak tespit edilmiştir. En düşük PIC değeri 0,12 ile *P5CS*, en yüksek PIC değeri ise 0,56 ile *AtNHX1* ve *MtActin* marköründe hesaplanmıştır. Sonuçlar tuz stresine ilişkin lokus spesifik DNA markörlerinin şeker otu bitkisinde genetik ilişkisinin belirlenmesinde başarılı bir şekilde kullanılabileceğini göstermiştir.

UPMGA yöntemine göre yapılan dendrogramda genotipler iki ana grup (I ve II) oluşturmuştur (Şekil 4.3). Samsun genotipi diğer 3 genotipten ayrılarak tek başına grup I oluşturmuştur. Buna karşın II grupta Antalya genotipi diğer iki genotipten ayrılarak alt grup oluşturmuştur. Adana ve Bilecik genotipleri genetik olarak birbirine en yakın iki genotip olarak tespit edilmiştir.

Dendogram sonuçları genetik varyasyonun oluşturulması için Samsun genotipi ile diğer genotipler arasında yapılacak melezleme çalışmalarının başarılı sonuçlar vereceğini göstermiştir.

Akım sitometri ile elde edilen çekirdek DNA analiz verilerine göre, şeker otuna ait ortalama 2C çekirdek DNA miktarının 1,62 pg olduğu belirlenmiştir. En düşük 2C çekirdek DNA miktarının 1,57 pg ile Samsun genotipi ve en yüksek çekirdek DNA miktarı 1,67 pg ile Adana genotipinde tespit edilmiştir.

Sonuçlar, Çanakkale şartlarında çok yıllık şeker otu bitkisi ile yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç duyulduğunu, bu çalışmada elde edilen agronomik sonuçların en az iki yıllık yapılacak yeni çalışmalar ile tekrar edilmesi gerektiğini göstermiştir.



KAYNAKLAR

- Abdulameer D. A., Osman M. B., Sulaiman Z., Yusop M. R., Abdullah S., Azizi P., Muttaleb Q. A., 2018. Assessment of *Stevia rebaudiana* Bertoni Genotypes via Morpho-Agronomic Traits under Two Light Conditions. *American Journal of Plant Sciences*, 9 (07), 1403.
- Akashi H., 1975. Safety of Dried-leaves Extracts of *Stevia* (Report of Toxicological Test). *Shokuhin Kogyo (Food Industry)* 18, 1–4.
- Akashi H., Yokoyama Y., 1975. Safety of dried-leaf extracts of *Stevia rebaudiana*. *Shokuhin Kogyo*, 18(20), 34-43.
- Alvarez M., 1984. *Stevia rebaudiana* Bert. Estado Atual do Conhecimento. Universidade Estadual de Maringa, Maringa, 118.
- Anonim, 2016. Çanakkale İli Meteorolojik Verileri. Çanakkale Meteoroloji İl Müdürlüğü.
- Asif M. A., Zafar Y., Iqbal J., Iqbal M. M., Rashid U., Ali G. M., 2011. Enhanced Expression of AtNHX1, in Transgenic Groundnut (*Arachis hypogaea* L.) Improves Salt and Drought Tolerance. *Molecular Biotechnology*, 49 (3), 250-256.
- Aslan G., 2018. Farklı Sulama ve Azot Uygulamalarının Şeker Otunun (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Verim Kalite Parametrelerine Etkileri ve Spektrometrik Ölçümlerle İlişkilendirilmesi. Doktora Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Türkiye.
- Baydar H., 2005. Tıbbi, Aromatik Ve Keyf Bitkileri, Bilim Ve Teknoloji, 500 : 1-216.
- Bayram E., Kirici S., Tansi S., Yilmaz A.O., Kizil S., 2010. Tıbbi ve aromatik Bitkiler Üretiminin Arttırılması Olanakları. TMMOB Ziraat Mühendisleri Odası, Ziraat Mühendisliği VII. Teknik Kongresi (2010), 11-5.
- Bertonha A., Muniz A. S., Carneiro J. W. P., Martins E. N., Jabur I. C., Thomaz S. I. 1984. Estudo de Cultivo, Reproducao e Selecao Das Variedades Mais Productivas de *Stevia rebaudiana*, En Solos Do Norte de Prana. *Maringa, UEM*, 103.
- Bertoni M. S., 1899. *Ei Kaa-Hee* (Eupatorium rebaudianum, species Novas). *Revista de Agronomia* 1, 35–37.

- Bertoni M. S., 1905. La Kaa He e-Sa nature et ses proprietes. Anal cient paraguayos 5, 1–14.
- Bertoni M. S., 1918. Stevia rebaudiana. Stevin and Rebaudin, new sweetening substances. Analcient paraguayos 2, 129–134.
- Bharti N., Pandey S. S., Barnawai D., 2016. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Dietzia Natronolimnaea Modulates the Expression of Stress Responsive Genes Providing Protection of Wheat from Salinity Stress. Scientific Reports, 6, 34768.
- Boeckh E. M. A., Humboldt G., 1981. Cardio-circulatory Effects of Total Water Extract in Normal Persons and of Stevioside in Rats. Ciência e Cultura (São Paulo) 32, 208–210.
- Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. 1980. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. American Journal of Human Genetics, 32(3), 314.
- Brandle J. E., Rosa N., 1992. Heritability for Yield, Leaf: Stem Ratio and Stevioside Content Estimated from a Landrace Cultivar of *Stevia rebaudiana*. Canadian Journal of Plant Science, 72(4), 1263-1266
- Brandle J. E., Starratt A.N., Gujzen M., 1998. Stevia rebaudiana : Its Agricultural, Biological And Chemical Properties. Can.J. Plant Sci. 78 : 527-536. Estimated from a landrace cultivar of Stevia rebaudiana. Can. J. Plant Sci. 72, 1263–1266.
- Bridel M., Lavielle R., 1931a. Le Principe à Saveur Sucrée du Kaà-hê-é (*Stevia rebaudiana*) Bertoni. Bull. Soc. Chim. Biol. 13: 636–655.
- Bridel M., Lavielle R., 1931b. Le principe sucré du Kaà-hêé (*Stevia rebaudiana* Bertoni). II. L'hydrolyse diastasique du stéviol. III. Le stéviol de l'hydrolyse diastasique et l'isostéviol de l'hydrolyse acide. Bull. Soc. Chim. Biol. 13: 781–796.
- Carvalho M., Marchio C., 2011. The Use of Esterase Polymorphism for Analysis of The Genetic Diversity and Structure of Stevia Populations. Biochemical systematic and Ecology 39, 594-599.

- Chalapathi M. V., Thimmegowda S., Rama K.V. R., Prasad T. G., 1997. Natural non-Calorie Sweetener Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni): A future Crop of India. *Crop Res.* 14, 347–350.
- Chester K., Tamboli T. E., Parvean R., ve Ahmad S., 2013. Genetic and Metabolic Diversity in *Stevia rebaudiana* Using RAPD And HPTLC Analysis. *Pharmaceutical Biology*, 51(6) : 771-777.
- Cil A., Tiryaki I., 2016. Sequence-related Amplified Polymorphism and Inter-simple Sequence Repeat Marker-based Genetic Diversity and Nuclear DNA Content Variation in Common Vetch (*Vicia sativa* L.). *Plant Genetic Resources*, 14(3), 183-191.
- Crammer B., Ikan R., 1986. Sweet Glycosides from The Stevia Plant. *Chem. Br.* 22, 915–917.
- Dwivedi R. S., 1999. Unnurtured and Untapped Sweet Non-sacchariferous Plant Species in India. *Current Sci.* 76, 1454–1461.
- Ermakov E. I., Kochetov A. A., 1996. Specific Features in Growth and Development of Stevia Plants Under Various Light Regimes to Regulated Conditions. *Doklady Rossiitskoi Akademii Sel'Skokhozyaisivennykh Nauk* 0, 8.
- Felipe G. M., 1977. *Stevia rebaudiana* Bert. A Review. *Cien Cult.*, 29 (1977): 1240-1248.
- Fronza D., Folegatti M. V., 2003. Water Consumption of the Stevia (*Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni) Crop Estimated Through Microlysimeter. *Scientia Agricola*, 60 (3), 595-599.
- Gedik S., Tansı S. L., 2016. Çukurova Koşullarında Bitki Yoğunluğu ve Bitki Yaşının Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni)' nun Verimine Etkisi. *Iğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der. / Iğdır Univ. J. Inst. Sci. & Tech.* 7(3): 285-292.
- Geuns J. M. 2003. Stevioside. *Phytochemistry*, 64(5), 913-921.
- Goettemoeller J., Ching A. 1999. Seed Germination in *Stevia rebaudiana*. *Perspectives on New Crops and New Uses*. ASHS Press, Alexandria, VA, 510-511.

- Grashoff J. L., 1972. A Systematic Study of the North and Central American Species of *Stevia*. University of Texas.
- Karaman H., 2017. Şeker Otu (*Stevia rebaudiana*) Bitkisinin Morfolojik ve Sitolojik Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Türkiye.
- Kaneda N., Kasai R., Yamasaki K., Tanaka O., 1977. Chemical Studies on Sweet Dieterpene-glycosides of *Stevia rebaudiana*: Conversion of Stevioside into rebaudioside-A. Chem. Pharm. Bull. 25: 2466–2467.
- Kırmacı H., Kuşçu H., Atasay F., 2015. Farklı Oranlarda Prebiyotik Lif İçeren *Stevia* Özütü İlavesinin Prebiyotik Dondurmanın Kalite Özellikleri Etkisi. Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 18 (3), 48-59.
- Kinghorn A.D., 2002. Overview. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor and Francis, London and NY, pp. 1–17.
- Kohda H., Kasai R., Yamasaki K., Murakami K., Tanaka O., 1976. New Sweet Dieterpene Glucosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 15: 981–983.
- Kudo M., 1974. *Stevia rebaudiana* (Bert.). Science and Cultura 34, 2.
- Kudo M., Koga Y., 1977. Photoperiodic Response and Its Variation in *Stevia rebaudiana* (Bert.). Jap. J. Trop. Agric. 20, 211–217.
- Lata H., Chandra S., Techen N., 2013. Molecular Analysis of Genetic Fidelity In Micropropagated Plants Of *Stevia rebaudiana* Bert. Using ISSR Markör. American Journal Of Plant Sciences, 964-971.
- Lester T., 1999. *Stevia rebaudiana*. Sweet leaf. The Australian New Crops Newsletter 11,1.
- Liu J., Ishitai M., Halfter U., Kim C., Zhu J., 2000. The Arobidapsis Thaliana SOS2 Gene Encodes a Protein Kinase That is Required for Salt Tolerance. 3730-3734.
- Machado S., Dietrich C., 1981. *Stevia rebaudiana* Bert. History. In “Abstracts of First Brazilian Seminar on *Stevia rebaudiana*,” Brazil, June 25–26, pp. 1.1–1.2.

- Mahdi S. A., Meena C. M., Tholakabavi A., 2018. Induction of Genetic Variability by Colchicine Treatment in *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Al-Qadisiyah Journal Of Pure Science*, 23(3), 161-173.
- Melis M.S., 1995. Chronic Administration of Aqueous Extract of *Stevia rebaudiana* in rats: Renal effects. *Journal of Ethnopharmacology* 47, 129–134.
- Melis M.S., 1996. A crude Extract of *Stevia rebaudiana* Increases The Renal Plasma Akım of Normal and Hypertensive Rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 29, 669–675.
- Metivier J., Viana A. M., 1979. The Effect of Long and Short Day Length Upon The Growth of Whole Plants and The Level of Soluble Protien, Sugars and Stevioside in Leaves of *Stevia rebaudiana*. *J. Experimental Bot.* 30, 1211–1222.
- Miyagawa H., Fujioka N., Kohda H., Yamasaki K., Taniguchi K., Tanaka R., 1986. Studies on the Tissue Culture of *Stevia rebaudiana* and Its Components; (II) 1. Induction of Shoot primordia. *Planta medica*, 52 (04), 321-323.
- Mizutani K., Tanaka O., 2002. Use of *Stevia rebaudiana* Sweeteners in Japan. In: Kinghorn, A.D. (Ed.), *Stevia, the Genus Stevia. Medicinal and Aromatic Plants—Industrial Profiles*, Vol. 19. Taylor and Francis, London and NY, pp. 178–195.
- Monteiro R., 1986. Biological Flora de *Stevia rebaudiana* Tese de Mestrado, Univ. Est. de Campinas, Brazil.
- Monteiro W. R., Castro M. D. R., Viveiros S. C. M., Mahlberg P. G., 2001. Development and Some Histochemical Aspects of Foliar Glandular Trichomes of *Stevia rebaudiana*, Asteraceae. *Revista Brasileira de Botanica* 24, 349–357.
- O'Brien N. L., 2011. *Alternative Sweeteners*. CRC Press. 587 p.
- Oddone B., 1997. “How to Grow Stevia. Technical Manual.” Guarani Botanicals, Pawtucket, CT. Potential sweetening agents of plant origin. II. Field search for Sweet-tasting Stevia Species. *Econ. Bot.* 37, 71–79.
- Parsons P., 2003. Stevia too Good to Be Approved. *Organic NZ* 62, 26.

- Philippe R. N., De M., Anderson, J., Ajikumar P. K. 2014. Biotechnological Production of Natural Zero-Calorie Sweeteners. *Current Opinion in Biotechnology*, 26, 155-161.
- Planas G. M., Kuć J., 1968. Contraceptive properties of *Stevia rebaudiana*. *Science*, 162 (3857), 1007-1007.
- Ramesh K., Singh V., Megeji N. W. 2006. Cultivation of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bert.) Berton]: A Comprehensive Review. *Advances in Agronomy*, 89, 137-177.
- Robinson H., King R. M., 1977. Eupatoriae Systematic Review. In “The Biology and Chemistry of the Compositae” (V. H. Heywood, J. B. Harbone, and B. L. Turner, Eds.), Vol. 1., Academic Press Inc., London. pp. 286–437.
- Samadpourrigani E., 2014. Çukurova Koşullarında Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* B.)’ unda Farklı Ekim Sıklıkları, Biçim Zamanları ve Biçim Sayılarının Verim ve Kaliteye Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Çukurova Üniversitesi, Türkiye.
- SAS Institute, 1997. SAS User’s Guide, Release 6.12 ., SAS Institute Inc. Cary, N.C.
- Schmeling A., 1967. Natural Non Calorie Edulcorante. *Research Centre of Stevia XXIX*,5.
- Shen G., Wei J., Qiu X., Hu R., Kuppu S., Auld D., Zhang H., 2015. Co- overexpression of AVP1 and AtNHX1 in Cotton Further Improves Drought and Salt Tolerance in Transgenic Cotton Plants. *Plant Molecular Biology Reporter*, 33 (2), 167-177.
- Shock C. C., 1982. Experimental cultivation of *Rebaudia’s stevia* in California. *Univ. California, Davis Agron. Progr. Rep*, 122.
- Shyu Y.T., Liu S.Y., Lu H.Y., Wu W.K., Su C.G., 1994. Effects of Harvesting Dates on the Characteristics, Yield and Sweet Components of *Stevia rebaudiana* Bert. Lines. *Jour. Agric. Res. China* 43 (1): 29-30.
- Slamet I. H., Tahardi S., 1988. The Effect of Shading and Nitrogen Fertilisation on The Akimering of *Stevia rebaudiana*. *Menara Perkebunan* 56, 34–37.0
- Soejarto D. D., Compadre C. M., Medon P. J., Kamath S. K., Kinghorn A. D., 1983. Ethnobotanical notes on *Stevia*. *Botanical Museum Leaflets, Harvard University*, 29 (1), 1-25.

- Souksu H., 2017. Kahramanmaraş Türkoğlu Topraklarında Şeker Otu Bitkisinin Azot İhtiyacının Belirlenmesi. Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, 31 (3), 109-114.
- Sözmen E., 2015. Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Bitkisinin Bazı Verim ve Kalite Özellikleri Üzerine Farklı Azot Dozlarının Etkisi. Doktora Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Türkiye.
- Sözmen U. E., Ozyigit Y., 2017. Effect of Different Nitrogen Doses on Dry Matter Ratio, Chlophyll and Macro/ Micro Nutrient Content in Sweet Harb (*Stevia rebaudiana* Bertoni). Communications in Soil Science and Plant Analysis, 48: 10, 1231-1239.
- Sumida T., 1980. Studies on *Stevia rebaudiana* Bertoni as a Possible New Crop for Sweetening Resource in Japan. J. Central Agricultural Exp. Stn. 31, 1–71.
- Sunk T., 1975. Studies on *Stevia rebaudiana* Like Edulcorante. Japan J. Crop Sci.
- Taiariol D.R., 2004. Characterization of the *Stevia rebaudiana* Bert. 06 Ekim 2016, <http://www.monografias.com/trabajos13/Stevia/stevia.html>.
- Tansı S., Gedik L., 2016. Çukurova Koşullarında Bitki Yoğunluğu ve Bitki Yaşının Şeker Otu (*Stevia rebaudiana* Bertoni)'nın Verimine Etkisi. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 73: 285-292.
- Tansı S., Samadpourrigani E., Gedik S., 2017. Ontogenetik Varyabilite ve Bitki Yoğunluğunun Şeker Otu Verimine Etkisi. KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi, 20, 323-326.
- Tateo F., Mariotti M., Bononi M., Lubian E., Martello S., Cornara L., 1998. Stevioside Content and Morphological Variability in a Population of *Stevia rebaudiana* (Bertoni) Bertoni from Paraguay. Italian J. Food Sci. 10, 261–267.
- Tuna M., 2016. Akım Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı. II. Akım Sitometri ve Tarımsal Araştırmalarda Kullanımı Eğitim Programı. Namık Kemal Üniversitesi. Tekirdağ. S: 6-7.
- Ucar E., Köse E., Ozyigit Y., Turgut K., 2015. Bazı Tıbbi ve Aromatik Bitkilerde Esansiyel Yağların Antimikrobiyal Aktivitelerin Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 10 (2) : 118- 124.

- Vargas R., 1980. Informe sobre viaje al Japo'n para observar la produccio'n, comercializacio'ne industrializacio'n de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni Asuncio'n, Julio..
- Wei C., Cui Q., Zhang X. Q., Zhao Y. Q., Jia G. X. 2016. Three P5CS Genes Including a Novel One from *Lilium regale* Play Distinct Roles in Osmotic, Drought and Salt Stress Tolerance. *Journal of plant biology*, 59(5), 456-466.
- Yadav A. K., Singh S., Dhyani D., Ahuja P. S., 2011. A review on the Improvement of *Stevia* [*Stevia rebaudiana* (Bertoni)]. *Can. J. Plant Sci.* 91: 1, 27.
- Yamasaki K., Kohda H., Kobayashi T., Kasai R., Tanaka O., 1976. Structures of *Stevia* Diterpene-glycosides: Application of ¹³C NMR. *Tetrahedron Lett.* 1005–1008.
- Yüksel N. G., 2019. Şeker Otu (*Stevia rebaudiana*) ve Ürünlerinin Kek ve Kurabiyede Şeker Yerine Kullanılabilirliğinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Akdeniz Üniversitesi, Türkiye.
- Zaidan L. B. P., Dietrich S. M. C., Felipe G. M. 1980. Effect of Photoperion on Akımering and Stevioside Contenet in Plants of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Japan Journal of Crop Science*, 49 (4): 569-574.
- Zaman M., Chowdhvy M., 2015. Growth Parameters and Leaf Biomass Yield of *Stevia* (*Stevia rebaudiana*, Bertoni) as Influenced by Different Soil Types of Bangladesh *J. Bangladesh Agril Univ.* 13 (1) : 31- 37.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Gülnur KARAOĞLU

Doğum Yeri: Kadıköy

Doğum Tarihi: 15.07.1992

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

- a) Yayınlar – SCI-Diğer
- b) Bildiriler- Uluslararası- Ulusal: İkinci Uluslararası Balkan Tarım Kongresi, Poster Bildirisi
- c) Katıldığı Projeler

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl: Servier İlaç ve Araştırma A.Ş, Ağustos 2017- Devam etmekte

İLETİŞİM

E-posta Adresi: gulnurkaraoglu2@gmail.com